

**In vitro-Generierung dendritischer  
Zellen (DC) aus leukämischen Blasten  
bei Akuten Myeloischen Leukämien (AML)  
und Myelodysplastischen Syndromen (MDS)  
mit Hilfe eines serumfreien  
DC-Kultivierungsverfahrens**

**vorgelegt von  
Stefanie Kufner  
2006**

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**In vitro-Generierung dendritischer  
Zellen (DC) aus leukämischen Blasten  
bei Akuten Myeloischen Leukämien (AML)  
und Myelodysplastischen Syndromen (MDS)  
mit Hilfe eines serumfreien  
DC-Kultivierungsverfahrens**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Stefanie Kufner

aus Regensburg  
2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
Der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Helga Schmetzer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Emmerich

Prof. Dr. Th. Brocker

Dekan: Prof. Dr. med. De. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2006

**Meiner Familie und meinen  
lieben Freunden gewidmet**

**Lernen ist wie das Rudern  
gegen den Strom : Sobald man  
aufhört, treibt man zurück.**

**(Chinesische Weisheit)**

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

## **Abkürzungen**

A – C

## **1. Zusammenfassung**

1 – 2

## **2. Einleitung**

3 – 33

### **2.1. Geschichte, Definition und Einteilung der Leukämien**

3

### **2.2. Die Akute Myeloische Leukämie (AML) und die Myelodysplastischen Syndrome (MDS)**

4

#### 2.2.1. Epidemiologie

4

#### 2.2.2. Krankheitsbild

5

#### 2.2.3. Ätiologie und Pathogenese

6

#### 2.2.4. Einteilung, Diagnostik und Prognose

8

#### 2.2.5. Therapie

15

### **2.3. Immuntherapie**

18

#### 2.3.1. Ein kurzer Überblick über Immunsystem und Tumorummunologie

18

#### 2.3.2. Momentane Möglichkeiten der Immuntherapie bei AML und MDS

20

### **2.4. Dendritische Zellen**

23

#### 2.4.1. Definition und Funktion der DC

23

#### 2.4.2. Momentane Möglichkeiten der Krebsvakzinierung mit DC

29

### **2.5. Zielsetzung dieser Arbeit**

33

## **3. Material und Methoden**

34 – 48

### **3.1. Patientenkollektiv**

34

### **3.2. Verarbeitung des Zellmaterials**

39

### **3.3. Morphologische und zytochemische Untersuchungsmethoden**

40

### **3.4. Zytochemische Untersuchungsmethoden**

40

### **3.5. Generierung der DC**

40

### **3.6. Immunzytologische Untersuchungsmethoden (Durchflusszytometrie)**

41

### **3.7. Vitalitäts-Nachweis der DC**

45

### **3.8. Durchführung der simultanen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

45

### **3.9. Quantifizierung und Charakterisierung der DC**

46

### **3.10. Anfertigen der gemischten Lymphozyten-Kulturen (MLR) und Nachweis der T-Zell-Aktivierung durch leukämische DC**

47

### **3.11. Durchführung des Zytotox-Assays (Fluorolyse)**

48

### **3.12. Statistische Berechnungen**

48

## **4. Ergebnisse**

49 – 79

### **4.1. Charakterisierung des Ausgangsmaterials**

49

### **4.2. Methodenvergleich bei der DC-Generierung**

49

#### 4.2.1. Kulturmedien- und Kulturdauervergleich

49

##### 4.2.1.1. Die DC-Ausbeute in CellGro ist vergleichbar mit der Ausbeute in Xvivo

49

##### 4.2.1.2. Die Zugabe von 10%igem autologem Plasma verringert die DC-Ernte

51

##### 4.2.1.3. Die Zugabe von FL steigert die DC-Ernte

53

##### 4.2.1.4. Die DC-Ausbeute von leukämischen Proben erhöht sich nach einer 10-14tägigen Kultur in einem Medium mit GM-CSF, IL-4 und TNF $\alpha$

56

#### 4.2.2. Vergleich von unterschiedlichen Zellpopulationen als Ausgangsmaterial für die DC-Generierung

57

4.2.2.1. Die DC-Ausbeute von adhärenenten und totalen MNC-Fraktionen ist vergleichbar	57
4.2.2.2. Die Ernte vitaler DC von totalen MNC-Fraktionen ist höher als von T-Zell-depletierten MNC-Fraktionen (MNC(-))	59
4.2.2.3. Sowohl PB- als auch KM-MNC sind als DC-Quelle geeignet	61
4.2.2.4. Die Ausbeute vitaler DC ist bei der Verwendung eingeforener bzw. aufgetauter MNC erniedrigt	63
4.2.3. Charakterisierung der unter Xvivo + FL (14d) generierten DC	63
4.2.3.1. Reife DC aus AML- und MDS-MNC-Fraktionen exprimieren kostimulatorische Antigene	64
4.2.3.2. DC aus AML- und MDS-MNC-Fraktionen sind leukämischen Ursprungs	64
4.2.3.3. Die Umwandlung von MNC zu DC steigert die T-Zell-Aktivierung	65
<b>4.3. DC-Generierung unter standardisierten Bedingungen mit Xvivo + FL (14d)</b>	66
4.3.1. Weiterführende Charakterisierung der DC	67
4.3.1.1. DC generiert aus AML- und MDS-MNC-Fraktionen sind reif und vital	67
4.3.1.2. Der leukämische Ursprung generierter DC von AML- und MDS-Proben konnte mittels `FISH-IPA` bewiesen werden	69
4.3.1.3. `FISH-IPA` und Durchflusszytometrie ermöglichen die Quantifizierung der zu DC umgewandelten Blasten und der DC nicht-leukämischen Ursprungs	69
4.3.1.4. Die Expression von Migrationsantigenen auf DC kann durch die Kultivierung der DC in einem `MCM-Mimic`-Medium mit PGE <sub>2</sub> verbessert werden	71
4.3.2. Abhängigkeit der DC-Ernte vom FAB-Typ und der zytogenetischen Risikogruppe	72
4.3.2.1. Die DC-Ernte ist am höchsten bei monozytären FAB-Typen	72
4.3.2.2. Die DC-Ernte ist unabhängig von der zytogenetischen Risikogruppe	73
4.3.3. Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Lyse leukämischer DC durch zytotoxische T-Zellen	74
4.3.3.1. DC und autologe T-Zellen von AML- und MDS-MNC exprimieren Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle für die DC-abhängige T-Zell-Aktivierung	74
4.3.3.2. Die T-Zell-Aktivierung ist gekoppelt mit einer Zunahme der Proliferation und der Migrationsantigene	76
4.3.3.3. Durch MLR aktivierte zytotoxische T-Zellen sind zur Lyse leukämischer DC fähig	78
<b>5. Diskussion</b>	80 – 98
<b>5.1. Immunantwort und Immuntherapie bei AML und MDS</b>	80
<b>5.2. In vitro DC-Generierungsmethoden</b>	80
5.2.1. Zellquellen für die DC-Generierung	80
5.2.2. Kulturmedien und Zellkulturzusätze beeinflussen die DC-Ernte	82
<b>5.3. Vitale, reife leukämische DC können unter serumfreien Kulturbedingungen generiert werden und die Umwandlung der MNC zu DC erhöht die T-Zell-Aktivierung bei AML und MDS</b>	85
<b>5.4. Von AML- und MDS-MNC generierte DC beinhalten eine große Anzahl an DC leukämischen Ursprungs, die leukämische Marker zusammen mit DC-Antigenen exprimieren</b>	86
<b>5.5. Die höchste DC-Ernte kann von monozytären FAB-Typen erzielt werden, und die DC-Ausbeute ist unabhängig von zytogenetischen Risikogruppen</b>	88
<b>5.6. Leukämische DC induzieren eine autologe T-Zell-Aktivierung</b>	88
<b>5.7. Prostaglandin E<sub>2</sub> erhöht die Ausbeute an CCR7<sup>+</sup> DC</b>	90
<b>5.8. Probleme aktueller DC-Generierungsstudien</b>	91
<b>5.9. Bisherige in-vivo-Vakzinierungsstudien mit DC</b>	92
<b>5.10. Ausblick: Dendritische Zellen - Die Krebsvakzine der Zukunft?</b>	94
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	99 – 139

<b>Erklärung gemäß § 2 der Promotionsordnung</b>	140
<b>Eigene Publikationen und Kongressbeiträge</b>	141 - 142
<b>Danksagung</b>	143
<b>Lebenslauf</b>	144 - 145



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
>	größer
<	kleiner
	größer gleich
	kleiner gleich
∅	nicht vorhanden
?	nicht bekannt
	Summe
á	alpha
Ak	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
allog.	allogen
AML	akute myeloische Leukämie
AML-M1	AML-FAB-Typ M1
AML-M2	AML-FAB-Typ M2
AML-M3	AML-FAB-Typ M3
AML-M3v	AML-FAB-Typ M3-Variante
AML-M4	AML-FAB-Typ M4
AML-M4eo	AML-FAB-Typ M4 mit Eosinophilie
AML-M5	AML-FAB-Typ M5
AML-M6	AML-FAB-Typ M6
AML-M7	AML-FAB-Typ M7
AML-M0	AML-FAB-Typ M0
Ant.	Antwort
APC	antigenpräsentierende Zelle
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ATRA	all-trans-Retinolsäure
â	beta
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Karzinom
Ca	Kalzium
CD	Differenzierungsantigen ("cluster of differentiation")
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CR	komplette Remission ("complete remission")
CSF	Kolonie-stimulierender-Faktor
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
d	Tage ("days")
DC	dendritische Zellen
DC1	myeloide DC
DC2	lymphoide DC
Dc <sub>leu</sub>	DC leukämischen Ursprungs
Dgn	Diagnose
d.h.	das heißt
del	Deletion
der	Derivat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

evtl.	eventuell
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FISH-IPA	FISH-Immunphänotypisierung
ã	gamma
Geschl	Geschlecht
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-CSF
GVHD	Abstoßungsreaktion des Tansplantats gegen den Körper ("Graft-versus-Host-Disease")
H	Helferzelle
HLA	siehe MHC
ICAM	interzelluläres ("cellular") Adhäsionsmolekül
Id	Idiotypisches Protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
ins	Insertion
inv	Inversion
i.v.	intravenös
KLH	keyhole lympet hemocyamin
klin.	klinisch
KM	Knochenmark
KM-MNC	mononukleäre Zellen, aus dem KM gewonnen
KMT	Knochenmarkstransplantation
LDH	Laktatdehydrogenase
L	Ligand (z.B. CD40L = CD40-Ligand)
LFA	Lymphozyten-Funktions-assoziiertes Antigen
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
il	Mikroliter
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MHC	Haupt ("major")-Histokompatibilitätskomplex
MIC	Morphologie, Immunologie, Zytogenetik
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion ("mixed lymphocyte reaction")
MNC	mononukleäre Zelle
MNC-F.	MNC-Fraktion
MNC(-)-F.	T-Zell-depletierte MNC-Fraktion
moAbs	monoklonale Antikörper
MRD	minimale Residualeukämie ("minimal residual disease")
mRNA	messenger-RNA
MX	gemischter Krankheitszustand ("mixed disease")
n	Fallzahl
n.d.	nicht durchgeführt
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
Nr	Nummer
od.	oder

p	Wahrscheinlichkeit ("probability")
p-Arm	kurzer Arm des Chromosoms
p-Wert	Wahrscheinlichkeits-Wert
pAML	primäre AML
PAS	Periodic Acid Schiff
PAP	Saure Prostata-Phosphatase
PB	peripheres Blut
PBDC	DC des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte ("buffered") Saline
PBZT	Blutstammzelltransplantation
PC	partielle Remission ("partial remission")
PC5	Cy-5-PE-Tandem-Konjugat
PCR	Polymerase-Ketten ("chain")-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PL	Plasma
POX	Myeloperoxidase
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
q-Arm	langer Arm des Chromosoms
R.	Response
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess
RAEB-t	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation
RA	Refraktäre Anämie
RAS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
Reakt.	Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
sAML	sekundäre AML
SCF	Stammzell-Faktor
SC	stabile Erkrankung ("stable disease")
s.c.	subkutan
spezif.	spezifisch
SZT	Stammzelltransplantation
TAA	tumorassoziierte Antigene
Tauto	autologe T-Zellen
t(9;22)(q34;q11)	Translokation zwischen den Chromosomen 9 (Bruchpunkt am 1 Arm, Bande q34) und 22 (Bruchpunkt am q-Arm, Bande q11)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TT	Tetanus-Toxoid
U	Einheiten ("units")
v.a.	vor allem
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

## 1. Zusammenfassung

Leukämische Blasten bei AML können ex vivo in DC umgewandelt werden, wodurch Antigen-präsentierende Zellen entstehen, welche leukämische Antigene präsentieren.

Im kleineren Rahmen sollten zunächst Daten zu methodischen Vorversuchen ausgewertet werden, um bei AML und MDS unter serumfreien Bedingungen DC zu generieren. Diese methodischen Vorversuche an 50 AML-, 24 MDS-Patienten und 23 gesunden Probanden ergaben, dass adhärente Zellfraktionen die DC-Ausbeute im Vergleich zu totalen MNC-Fraktionen nicht verbessern, dass bei MACS-depletierten `MNC(-)`- und aufgetauten MNC-Fraktionen niedrigere DC-Zahlen erreicht werden, und dass die DC-Ernte bei AML- und MDS-Patienten nach 10-14tägiger Kulturzeit, bei gesunden Probanden jedoch nach 7tägiger Kulturzeit höher ist. Außerdem zeigte sich, dass die Zugabe von FL die DC-Ernte erhöht, der Einsatz von autologem Plasma dagegen in vielen Fällen einen inhibitorischen Effekt auf die DC-Generierung hat. Die Kulturmedien CellGro und Xvivo erzielten vergleichbare DC-Ausbeuten. Nach Ermittlung der optimalen Zellfraktion, Kulturdauer und -zusätze, wurden serumfreie DC von 100 AML-, 55 MDS- und 38 gesunden Proben in einem 10-14-tägigem serumfreien Xvivo-Kultursystem mit GM-CSF, IL-4, FL und TNF $\alpha$  angezüchtet und charakterisiert.

Bei der DC-Generierung unter standardisierten Bedingungen betrug die Ausbeute der MNC-Fraktionen durchschnittlich 20% bei MDS, 34% bei AML und 25% bei gesunden Probanden. Zwischen 53-58% der DC waren reife CD83<sup>+</sup>DC. Die DC-Ernten waren in den monozytären FAB-Klassen (AML-M4/5, MDS-CMML) am höchsten, dagegen unabhängig von den zytogenetischen Risikogruppen. Das Oberflächenmarkerprofil der DC von den AML- und MDS-Proben (einschließlich 1 MDS- und 3 AML-Zelllinien) war mit dem der gesunden DC vergleichbar. In parallelen Kulturansätzen konnte außerdem gezeigt werden, dass in einem `MCM-Mimic`-Medium mit PGE<sub>2</sub> der Anteil reifer, CCR7<sup>+</sup>DC besonders hoch war. Der leukämische Ursprung der AML- und MDS-DC wurde bei 5 AML- und 4 MDS-Fällen mittels FISH durch die Persistenz klonaler, zytogenetischer Aberrationen in den DC oder in übrigen Fällen durch die Coexpression leukämischer Antigene auf den DC bewiesen. Durch eine kombinierte FISH/Immunophänotyp-Analyse (FISH-IPA) konnte zudem nachgewiesen werden, dass obige klonale, numerische Aberrationen konstant in Kombination mit DC-Markern detektierbar, jedoch nicht alle klonalen Zellen zu leukämischen DC umwandelbar waren (durchschnittlich 53% der AML- und MDS-Blasten). Umgekehrt trugen auch nicht alle generierten DC die klonale Aberration (im Durchschnitt 51% der DC). In 41 AML-Fällen mit einer Leukämie-spezifischen bzw. aberranten Antigenexpression oder in AML-Fällen mit einem CD33<sup>+</sup> Blastenphänotyp und gleichzeitig <5% CD14<sup>+</sup>-Zellen sowie in 13 MDS-Fällen

mit einer detektierbaren CD34<sup>+</sup>- oder CD117<sup>+</sup>-Blastenpopulation konnten die FISH-IPA-Daten durchflusszytometrisch bestätigt werden. Auch hier zeigte sich, dass, obwohl leukämische DC konstant nachweisbar waren, durchschnittlich ca. 50-65% der Blasten bei AML und MDS zu leukämischen DC konvertiert werden konnten, sowie nur ca. 50-60% der detektierten DC nachweislich leukämischen Ursprungs waren. Deshalb empfiehlt sich möglicherweise, leukämische DC für zukünftige Impfungen zu selektionieren, um Kontaminationen durch nicht umgewandelte Blasten, die eine T-Zellantwort inhibieren könnten, oder durch nicht-leukämische DC, die Autoimmunreaktionen verursachen könnten, zu vermeiden bzw. alternativ die stimulatorische Effizienz der generierten DC funktionell zu testen. In 6% der AML- und in 31% der MDS-Fälle waren <10% der DC generierbar. Möglicherweise können bei diesen Fällen mit anderen Generierungsmethoden ausreichende Mengen von DC generiert werden. In gemischten Lymphozytenreaktionen (MLR) konnten wir eine Aktivierung und Proliferation autologer T-Zellen nach DC-Kontakt zeigen sowie in zwei Fällen mit AML-M0 und AML-M1 zytotoxische T-Zellen generieren, die fähig waren, naive Blasten im Fluorolyse-Assay zu lysieren. In 4 Fällen mit nur wenigen leukämischen DC oder vitalen T-Zellen nach der DC/MLR-Prozedur wurde keine Lyse der leukämischen Zellen nachgewiesen, was die bedeutende Rolle beider Partner bei dem Lyseprozess herausstellt.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit waren:

- 1, Die serumfreie Generierung leukämischer DC unter serumfreien Kulturbedingungen ist bei AML sowie bei MDS aus Blasten möglich.
  - 2, DC können nicht bei allen Patienten mit der von uns untersuchten Methode generiert werden.
  - 3, Die Konvertierungseffizienz leukämischer Zellen zu DC leukämischer Abstammung ist variabel.
  - 4, T-Zellen von AML-/ MDS-Patienten sind durch autologe DC dieser Patienten aktivierbar, sie proliferieren und bringen zytotoxische Zellen hervor, die naive Blasten lysieren können.
- Somit stellen aus leukämischen Zellen generierte DC bei AML und MDS möglicherweise ein interessantes immuntherapeutisches Medium dar, um autolog oder allogene die spezifische antileukämische Immunantwort zu verbessern.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Geschichte, Definition und Einteilung der Leukämien**

Rudolf Virchow veröffentlichte 1845 unter dem Titel „Weißes Blut“, als erster den Fallbericht eines Patienten, bei dem er eine Vermehrung der weißen Blutkörperchen feststellte, ohne dass er sich dies durch eine bekannte Erkrankung hätte erklären können. Erst unter einem späteren Titel bezeichnete Virchow diese Krankheit als Leukämie und definierte sie als eine Gruppe von Erkrankungen, die eine Zunahme der weißen Zelllinie aufwies, ohne dass eine Infektion nachweisbar war (Wehmeier A, 2001). Allgemein liegt den Leukämien eine maligne Neoplasie der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark zugrunde. Da es sich bei den Leukämien um eine klonale Erkrankung handelt, kommt es nach der Ausbreitung der klonalen Zellen im gesamten hämatopoetischen Gewebe zu einem Übergreifen auf extramedulläre Organe und zur Ausschwemmung unreifer Vorläuferzellen in das Blut. Diese unreifen Zellen (Blasten) führen im peripheren Blut zu einer Verdrängung der normalen Blutzellen, was die typischen Krankheitssymptome der Leukämien wie Anämie, Blutungen infolge der Thrombozytopenie und Abwehrschwäche infolge von Granulozytopenie erklärt (Roche, 1998).

Schon zu Virchows Zeiten wurde schnell klar, dass es sich hier um keine einheitliche Krankheitsgruppe handelt. Heute teilt man die Leukämien nach mehreren Gesichtspunkten ein. Die Kriterien sind hierbei Krankheitsverlauf (akut/ chronisch), Zelllinie der Blasten (myeloisch/ lymphatisch), Ätiologie (primär/ sekundär) und Differenzierungsgrad (reifzellig/ unreifzellig) (Herold G, 2004).

Während die malignen Zellen der akuten Leukämien meist eine niedrige Differenzierung aufweisen, findet man bei den chronischen Leukämien vorwiegend eine Mehrzahl an reifen Zellen. Auch hinsichtlich des Altersgipfels unterscheiden sich akute und chronische Leukämien. Chronische Leukämien sind hauptsächlich Erkrankungen des höheren Lebensalters, wohingegen akute Leukämien einen überproportionalen Anteil an der Sterblichkeitsrate jüngerer Patienten aufweisen. Aufgrund der vorherrschenden Zelllinie erfolgt die weitere Unterteilung der akuten und chronischen Leukämien in die vier Hauptgruppen ALL (akute lymphatische Leukämie), AML (akute myeloische Leukämie), CLL (chronische lymphatische Leukämie) und CML (chronische myeloische Leukämie). Die Ätiologie der primären Leukämien ist meist unbekannt, es sind aber auch Sekundärleukämien bekannt, also Leukämien, denen eine Entstehungsursache zugrunde liegt (Wilmanns W, 1994).

Darüber hinaus gibt es klonale Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, die den vier Leukämiegruppen nicht exakt zuteilbar sind, aber auch teilweise überlappende Merkmale aufweisen können. Dazu zählen beispielsweise die myeloproliferativen und die myelo-

dysplastischen Syndrome (Hiddemann, 2003).

Die Ähnlichkeiten hinsichtlich Morphologie und Zytogenetik sind vor allem zwischen der AML und den myelodysplastischen Syndromen (MDS) besonders groß. Gelegentlich lassen sich die beiden Erkrankungsbilder nur durch subtilste Merkmale unterscheiden, weshalb sie oft als Teil eines einheitlichen Erkrankungsspektrums gesehen werden (Hellström-Lindberg E, 2000). Nichtsdestotrotz muss man die MDS klinisch und biologisch von der AML abgrenzen (Albitar M, 2002). Da 13 % der AML-Fälle eine MDS-Erkrankung vorangeht (Fialkow PJ, 1987), wurden die MDS früher als Präleukämie bezeichnet (Kouides PA, 1996). Seit 1976 werden diese Krankheitsbilder nach der FAB-Einteilung unter der Bezeichnung dysmyelo-poetische bzw. myelodysplastische Syndrome (MDS) zusammengefasst (Bennett JM, 1976). Seitdem wurden die MDS als eigene Krankheitsentität immer weiter hinterfragt (Galton DA, 1986) und erforscht (Tricot G, 1986).

## **2.2. Die akute myeloische Leukämie (AML) und die Myelodysplastischen Syndrome (MDS)**

### 2.2.1. Epidemiologie

Allgemein machen Leukämien 2,6 – 2,8 % aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

Die **AML** ist hierbei in ca. 80 % der Fälle eine Erkrankung des mittleren und höheren Erwachsenenalters. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 63 Jahre. Nur ca. 15-20 % der AML-Patienten sind Kinder. Ab einem Alter von 45 Jahren bemerkt man einen steilen Anstieg der AML-Häufigkeit (Inzidenz 3,5/ 100.000), die bis zu den 70jährigen weiter ansteigt (Inzidenz 15/ 100.000) und schließlich einen Gipfel bei den über 90jährigen erreicht (Inzidenz 35/ 100.000). Die AML tritt bei Männern etwas häufiger als bei Frauen auf und zeigt auch geographische Unterschiede. So weisen z.B. Nordamerika, Westeuropa und Ozeanien die höchsten, Asien und Lateinamerika aber die niedrigsten AML-Erkrankungswerte auf (Fuchs R, 2002).

Die **MDS** sind genauso wie die AML eine Erkrankung des höheren Lebensalters, sie können aber auch, vor allem als Folge von hereditären Chromosomen-Fragilitätszuständen oder im Rahmen einer Sekundärneoplasie, im jüngeren Erwachsenenalter und bei Kindern auftreten (Solenthaler M, 2004; Masey JA, 1997). Die Häufigkeit aller Formen der MDS ist nach wie vor nicht genau bekannt, da die Diagnosestellung nicht immer eindeutig ist. Durch verbesserte hämatologische Diagnostik sind die MDS-Fälle deshalb in den letzten beiden Jahrzehnten gestiegen. Die Inzidenz beträgt demnach ca. 4-5/ 100.000 in der Gesamtbevölkerung, steigt aber

dann mit zunehmendem Lebensalter stark an und erreicht eine Zahl von 20/ 100.000 bei den über 70jährigen (Aul C, 2002). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren (Maynadie M, 2002). Grundsätzlich sind Männer etwas häufiger betroffen als Frauen (Wilmanns, 1994).

### 2.2.2. Krankheitsbild

Die Symptomatik der **AML** lässt sich hauptsächlich durch die klonale Expansion von unreifen Vorläuferzellen im Knochenmark erklären. Dadurch kommt es einerseits zur hämatopoetischen Insuffizienz, andererseits zur Zellinfiltration von extramedullären Organen und Geweben. Die daraus resultierende Anämie führt primär zu allgemeiner Schwäche, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Belastungsdyspnoe, Kopfschmerz und Schwindel. Da die Erkrankung vorwiegend ältere Menschen mit schon vorbestehenden Herzleiden betrifft, kann es durch die Anämie aber auch zu starken Tachykardien und zu Angina pectoris-Anfällen kommen, weshalb die Zeitspanne bis zur Diagnose in 40% der Fälle weniger als einen Monat beträgt. Der Krankheitsverlauf ist somit in der Regel sehr akut. Bei jungen Menschen kann die AML allerdings auch relativ lange beschwerdearm sein. Durch die Granulozytopenie im peripheren Blut besteht zudem eine erhöhte Infektanfälligkeit. Leitsymptome sind deshalb Fieber und vermehrte Schweißbildung. Durch die gestörte Abwehrlage können ebenfalls opportunistische Infektionen wie Herpes labialis, Mundsoor, Tonsillitiden, etc. auftreten. Da auch die Thrombozyten im Knochenmark (KM) und im peripheren Blut (PB) zurückgedrängt werden, klagen ca. 20 % der Patienten aufgrund der erhöhten Blutungsneigung auch über Zahnfleischbluten, Petechien und Suggilationen (flächenhafte Hautblutungen). Weitere Symptome, über die in der Anamnese manchmal berichtet wird, sind Knochenschmerzen, Gingiva-Hyperplasie und Hautinfiltrate. Dagegen sind eine Beteiligung des ZNS, Hepatosplenomegalie und Lymphknotenschwellungen eher seltener zu beobachten (Fuchs R, 2002).

Die **MDS** zeigen eine ähnliche Symptomatik wie die AML (Kouides PA, 1999). Jedoch wird die Diagnose oft erst als Zufallsbefund bei einer Routineblutuntersuchung gestellt. Die Symptome, die zur Diagnose führen, sind meist Folge einer unerkannten Anämie. Seltener fallen Patienten durch schwerere Thrombozytopenien oder Neutropenien auf (Fenaux P, 2002). Unter den MDS sind für die CMML Organomegalien (Hepatosplenomegalien), Lymphadenopathien und Hautinfiltrationen sehr charakteristisch (Hiddemann W, 2003). Für die übrigen Unterklassen der MDS sind Organomegalien allerdings mit im Durchschnitt weniger als 20 % der Fälle ebenso selten wie für die AML (Hoffmann R, 1991). Typischerweise findet sich bei den MDS ein hyperzelluläres Knochenmark, wobei oft alle drei hämatopoetischen Zelllinien morphologische Veränderungen aufweisen (Dansey R, 2000).



### 2.2.3. Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der **AML** ist bis heute noch nicht völlig geklärt. Man nimmt heutzutage eine multifaktorielle Genese an, unterteilt die AML aber grundsätzlich in eine primäre und sekundäre Form. Generell liegt der AML ein klonaler Ursprung zugrunde (Giles FJ, 2002), wobei zum genauen Vorgang der Klonbildung zwei verschiedene Hypothesen existieren. Eine geht davon aus, dass in unterschiedlichen Entwicklungsstufen innerhalb einer Vorläuferzellentität leukämische, mutationsbedingte Transformationen vorliegen, die andere, dass der Ursprung der Neoplasie nur in Mutationen einer primitiven pluripotenten Stammzelle liegt. Ungeachtet dieser beiden Modelle, kann diese Mutation (Translokation, Deletion oder Inversion) nun entweder auf spontanem Wege ablaufen, oder durch sogenannte Risikofaktoren sekundär ausgelöst werden. (Fuchs R, 2002). In beiden Fällen kommt es durch Veränderungen im Genom (Chromosomenaberrationen mit verminderter DNA-Reperatur, aktivierte Onkogene oder inaktivierte Tumorsuppressorgene, Apoptoseverhinderung) zu einer unkontrollierten Zellteilung (El-Deiry WS, 1997; Höfer I, 1996). Als Risikofaktoren werden hauptsächlich Noxen angesehen, bei denen vermutet wird, dass sie die hämatopoetischen Vorläuferzellen schädigen. Zu diesen Noxen gehören z.B. Chemikalien wie Benzole, Äthylenoxide und Pestizide, Chemotherapeutika, Rauchen und radioaktive Strahlung. Die Chemotherapie zählt mit einer Beteiligung von bis zu 20% bei den neudiagnostizierten AML-Fällen als einer der Hauptauslöser der Sekundär-AML. Vor allem von alkylierenden Substanzen wie Cyclophosphamid, Mechlorethin, Busulfan und Chlorambucil und von Substanzen mit Wirkung auf die Topoisomerase II wie die Anthracycline, Etoposid und Teniposid scheint hierbei eine große Gefahr auszugehen. So wurden zum Beispiel Studien veröffentlicht, die nach einer Therapie der ALL im Kindesalter mit Etoposid oder Teniposid (Pui CH, 1989), nach einer Therapie mit Cyclophosphamid beim Morbus Hodgkin (Pedersen-Bjergaard J, 1984) und nach einer Therapie mit Chlorambucil bei Polycythämien (Kwong YL, 1996) von erhöhten AML-Häufigkeiten berichten. Der sicherste Zusammenhang zwischen auslösender Noxe und Leukämie bzw. AML besteht aber wohl bei der radioaktiven Strahlung. Vor allem seit den Atombombenangriffen auf Hiroshima und Nagasaki ist dieser Zusammenhang greifbar. Die AML-Inzidenzen stiegen dabei um das ca. 30-fache. In der Regel betrug die Latenz zwischen Abwurf und Erkrankung bei den Überlebenden hierbei zwischen 5 und 21 Jahren (Ishimaru T, 1979). Auch nach dem Reaktorunfall 1986 in Tschernobyl war dies wieder nachvollziehbar (Mole RH, 1991). Seitdem wird auch schon des längeren darüber diskutiert, ob von Kernkraftanlagen ein erhöhtes Leukämierisiko ausgeht. Studien in Deutschland konnten keinen erhöhten Zusammenhang feststellen, wogegen eine Untersuchung in La Hague (Frankreich) bei Kindern und Jugendlichen, die in der Nähe einer Wiederaufbereitungsanlage wohnten, gestiegene Leukä-

mie-Inzidenzen nachwies (Fuchs R, 2002). Auch der Einfluss des Rauchens auf die Leukämie-Inzidenz sollte nicht unterschätzt werden. Experten gehen davon aus, dass Zigarettenrauchen das Risiko an einer Leukämie zu erkranken bis zu 50% erhöht. Darüber hinaus hat das Rauchen einen sehr schlechten Effekt auf den Krankheitsverlauf einer AML (Chelghoum Y, 2002). Neben diesen Noxen werden auch genetische und virale Faktoren als Auslöser von Leukämien diskutiert. Eine genetische Disposition konnte zwar bis dato nicht gesichert werden, die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen ist aber dennoch signifikant (Wilmanns W, 1994). Sicher ist allerdings, dass bei einigen genetisch bedingten Erkrankungen die Gefahr, an einer Leukämie zu erkranken, deutlich erhöht ist. Dazu gehören beispielsweise das Down-Syndrom, die Fancioni-Anämie, das Bloom-Syndrom, das Li-Fraumeni-Syndrom (Sandler DP, 1997), das Kostmann-Syndrom (Rosen RB, 1979), die Diamond-Blackfan-Anämie (Freedmann MH, 2000) und die Ataxia teleangiectasia (Seidemann K). Seit dem Auftreten von Tierleukämien (Bishop JM, 1992), liegt die Virusätiologie auch bei einigen humanen Leukämieformen nahe. Bereits 1986 wurde das HTLV 1 – ein Retrovirus – als Auslöser einer allerdings nur selten vorkommenden Erwachsenen-T-Zell-Leukämie nachgewiesen (Kuefler PR, 1986). Vor einigen Jahren wurde zudem eine Studie veröffentlicht, die von einer Koinzidenz der AML (v.a. FAB-Typ M4 und M5) mit der HIV-Infektion berichtet (Hentrich M, 2000).

Bei den **MDS** sind Ätiologie und Pathogenese der AML ziemlich ähnlich. (Hirai H, 2002). Wie bei der AML sind aber die Vorgänge, die zur Erkrankung führen, noch weitgehend unbekannt. Auch bei den MDS, die ebenfalls in primäre und sekundäre Dysplasien eingeteilt werden, nimmt man einen Multistep-Prozess an (Hirai H, 2003). Sowohl bei primären, als auch bei sekundären MDS resultiert daraus ein maligner Zellklon, der die normale Hämatopoese verdrängt und zur Ausschüttung unreifer Blasten in das periphere Blut führt (Heaney ML, 1999). Mutationen, die zu sekundären MDS führen, werden vor allem nach vorangegangener Chemo- oder Strahlentherapie beobachtet oder nach Exposition gegenüber Umweltnoxen (Rossi G, 2000; Willderling-Mollmann S, 2004). Erst kürzlich wurde in einer Studie berichtet, dass Mutationen bei schon vorbehandelten AML- und MDS-Patienten deutlich häufiger zu beobachten seien als bei neuerkrankten Patienten (Mauritzson N, 2002). Beispielsweise haben Patienten nach der antineoplastischen Therapie eines Hodgkin-Lymphoms eine zehnpromtente Wahrscheinlichkeit an einem MDS zu erkranken (Sanz GF, 1997). Analog zur AML vermutet man auch bei den MDS, dass Umweltgifte wie Benzol (Rigolin GM, 1998) und Zigarettenrauch (Bjork J, 2000) zur malignen Entartung führen können. Ebenso wie bei der AML scheint es auch bei den MDS angeborene Erkrankungen (z.B. Down-Syndrom, Monosomie 7, Fancioni-Anämie, Bloom-Syndrom, Neurofibromatose Typ 1, etc.) zu geben, die mit einer erhöhten MDS-Inzidenz verknüpft sind (Hiddemann W, 2003). Eine virale Genese wie bei der

AML konnte bis dato allerdings noch nicht gesichert werden.

#### 2.2.4. Einteilung, Diagnostik und Prognose

Die Einteilung der **AML** erfolgt mit Hilfe der FAB- (French-American-British) Klassifikation (Tabelle 1), die erstmals 1976 vorgeschlagen wurde (Bennett JM, 1976). Seitdem wurden immer wieder überarbeitete Einteilungen für akute Leukämien veröffentlicht (Bennett JM, 1985; Catovsky D, 1991; Bene MC, 1995) und diskutiert (Del Vecchio L, 1996).

**Tabelle 1:** Einteilung der AML nach der French-American-British-Klassifikation. POX Myeloperoxidase. NSE nicht-spezifische Esterase.

	Abkürzung	Bezeichnung	Charakterisierung	% der AML-Fälle
M0	AUL	Undifferenzierte Leukämie	Marker zytoplasmatisch POX <3%	5
M1		Myeloblasten-leukämie, undifferenziert	keine Granulozytendiff. evtl. Auerstäbchen POX-positiv (3%)	15-20
M2		Myeloblasten-leukämie mit geringer Differenzierung	eintretende Differenzierung (10% Promyelozyten) evtl. Auerstäbchen POX-positiv (64%)	30-40
M3	APL	Promyelozyten-leukämie	Promyelozytengranulation Auerstäbchen POX-positiv (> 64%) evtl. NSE-positiv	5-10
M3v		feingranuläre, promyelozytäre Leukämie	Promyelozyten mit minimaler Granulation evtl. Auerstäbchen POX-positiv (>3%) evtl. NSE-positiv	
M4	AMML	Myelomonozytäre Leukämie	Granulo- & Monozytendiff. zu je 20% POX-positiv (>3%)	20
M4eo			pathologische Eosinophile NSE-positiv (>20%)	5
M5	AMOL	Monozyten-leukämie	80% monozytäre Zellen POX-negativ Esterase positiv NSE-positiv	
M5a		monoblastisch, undiff.	80% Monoblasten	5
M5b		monozytisch, diff.	80% Pro- & Monozyten	5
M6	EL	Erythroleukämie	50% Erythropoese &	5

			30% Blasten aus Resthämatopoese POX-, PAS- & NSE-positiv	
M7		Megakaryoblasten-leukämie	30% Megakaryozytenblasten, POX-negativ NSE-positiv	1

Neuere Klassifikationen wie die MIC- (Morphologie, Immunologie, Zytogenetik) Klassifikation (De Vita, 1997) oder die der AML-CG (Ludwig WD, 1993) berücksichtigen aktuelle Fortschritte im Bereich der Immunzytologie und der Zytogenetik.

Auch die WHO hat eine Einteilung der AML vorgeschlagen, welche aber mit der FAB-Klassifikation nicht ganz konsistent ist und die MDS auch nicht völlig ausgrenzt (Harris NL, 1997).

Die WHO unterteilt die AML demnach in folgende vier Gruppen:

1. AML mit zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen
2. AML mit multilineärer Dysplasie (mit und ohne Myelodysplasie in der Vorgeschichte)
3. Therapie-assoziierte AML und MDS
4. AML ohne weitere Spezifizierung

Diagnostisch kann man die AML meist schon anhand der klinischen Symptomatik erkennen (siehe oben). Im Blutbild imponieren zunächst eine Anämie, eine Thrombozytopenie und eine Leukozytose (seltener eine Leukopenie), woraufhin ein weiteres diagnostisches Vorgehen erfolgen sollte. Dazu wird vorrangig eine weitere Untersuchung des peripheren Blutes und des Knochenmarksaspirates durchgeführt. Die panoptische May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim, die Myeloperoxidase (MPO)-Reaktion, die unspezifische Esterase (NSE)-Reaktion und eine PAS (Glykogen)-Färbung gehören dabei zur Standarddiagnostik.

Zeigt sich im panoptisch gefärbten Blut- oder Knochenmarkausstrich ein Blastenanteil von 20 % aller kernhaltigen Zellen, so ist die Diagnose einer akuten Leukämie nach den Kriterien der WHO sicher. In der FAB-Klassifikation wird dagegen ein Anteil von 30 % gefordert. Auch das Vorhandensein von sogenannten Auer-Stäbchen rechtfertigt die Diagnose einer AML, sofern der Blastenanteil im Blut oder im Knochenmark > 20 % beträgt. Der Nachweis von Auer-Stäbchen in Blut oder Knochenmark ohne die genannte Blastenerhöhung kann einen Hinweis auf eine MDS-RAEB oder seltener auf einen myeloischen Blastenschub einer CML geben. Andere morphologische Kriterien im mikroskopischen Bild (z.B. Promyelozyten mit sogenannten Reisigbündeln bei der AML-M3) können sogar einen Hinweis auf die FAB-Subklasse geben (Hoffbrand AV, 1989). Eine Peroxidasepositivität lässt sich in der Regel bei 3 % der Blasten nachweisen und ist beweisend für eine AML -M1 – M4 nach der FAB-Klassifikation. Eine positive NSE-Reaktion ist dagegen typisch für die AML-M4 und AML-

M5 nach FAB. Bei der AML-M6 kann teilweise eine positive PAS-Färbung gefunden werden.

Eine weitere immunzytologische und zytogenetische diagnostische Abklärung ist bei POX-negativen Fällen (z.B. AML-M0 und -M6) nötig, um die AML differentialdiagnostisch sicher von der ALL abzugrenzen und um die AML nach FAB klassifizieren zu können.

Eine immunphänotypische Abklärung der AML und MDS kann mittels monoklonaler Antikörper, die gegen die Oberflächenantigene der Blasten gerichtet sind, und einer Durchflusszytometrie erfolgen (Barnard DR, 1996). Durch eine eindeutige Zuordnung der Zellen zur myeloischen Zellreihe durch die Marker MPO, CD13, CD33, CD65s, CD14, CD15, CD64 ist die Abgrenzung zur ALL so gut wie sicher (Fuchs R, 2002; Cascavilla N, 1998; Re F, 2002). Eine Zellcharakterisierung nach Oberflächenantigenen bietet eine Hilfestellung bei der Einordnung der AML in die einzelnen FAB-Untergruppen (Tabelle 2), was in Kombination mit zytogenetischen Befunden eine Aussage hinsichtlich Prognose und Therapie zulässt (Bene MC, 1995; Rothe G, 1996; Hastka J, 1997). Ferner werden Blastenpopulationen durch ein bestimmtes Oberflächenmarkerprofil definiert, das im Verlauf der AML zur Residualleukämie-Wiederfindung dienen kann.

**Tabelle 2:** Immunphänotypisierung von AML-Untergruppen nach FAB-Klassifikation.

- Antigen nicht exprimiert. -/+ Antigen nur in <50% der Fälle exprimiert. +/- Antigen in der Mehrzahl der Fälle exprimiert. + Antigen exprimiert. Offene Felder stehen für partielle Expression oder fehlende Datenlage. M0-M7 FAB-Subklassen. CD Oberflächenantigene. (Tabelle in Anlehnung übernommen – mit Ergänzungen aus obigen Quellen – aus Fuchs R, 2002)

	CD13/ CD33	CD34	HLA-DR	MPO	CD64	CD14	CD15	Glyco-A	CD41/ CD61	CD117	CD65s	CD86
M0	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-/+	-/+
M1	+	+/-	+	+		-	-/+	-	-			-/+
M2	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	
M3	+	-	-	+	+/-	-	-/+	-	-	-/+	-/+	
M4	+	-/+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+
M5	+/-	+/-	+	-	+	+/-	+	-	-	-/+	+/-	+
M6	+/-	-/+	+/-	-		-	-	+	-			
M7	-/+	+/-	+/-	-		-	-	-	+		+/-	

Zusätzlich werden im Moment ständig neuere Oberflächenantigene gefunden, die evtl. prognostische Bedeutung für die AML haben könnten (Raspadori D, 2002; Brouwer RE, 2000 (I)).

Eine noch größere prognostische Aussagekraft für die AML hat die Zytogenetik. Mittels Chromosomenanalyse in der Metaphase (klassische Zytogenetik) oder in der Interphase (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) können numerische oder strukturelle Aberrationen nachge-

wiesen werden (Berger R, 1992). Spezifischere Verfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Mehrfarben-Immunfluoreszenz decken auch Punktmutationen im Genom auf (Serve H, 2000). Durch die hohe Sensitivität dieser Untersuchungsmethoden kann auch die sogenannte „minimale Residualleukämie“ (MRD, minimal residual disease), in der sich der Patient klinisch und zytomorphologisch in einer Vollremission befindet, detektiert werden (Taylor CG, 1996). Häufige Chromosomenaberrationen können die AML in Fälle mit günstiger, ungünstiger und intermediärer Prognose einteilen (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Häufige Chromosomenaberrationen bei der AML und ihre prognostische Bedeutung.

t Translokation. inv Inversion. q langer Arm eines Chromosoms.  
(Einteilung in Anlehnung übernommen aus Haferlach T, 2003)

Prognose	Karyotyp	assoziierte FAB-Subtypen	beteiligte Fusionsgene
günstig	t(8;21) t(15;17) inv(16)/t(16;16)	M2 M3 M3v M4eo	AML1/ETO PML/RAR $\alpha$ NPM/RAR $\alpha$ CBFB/MYH11
intermediär	normaler Karyotyp andere Aberrationen	M variabel M variabel	
ungünstig	t(11q23) 17q-Aberrationen inv(3)/t(3;3) komplex aberrant -5/5q- -7/7q-	M4, M5a M variabel M0, M4 M variabel M variabel M variabel	MLL, AF9 EVI1

Neben obiger Prognoseeinteilung nach zytogenetischen Risikogruppen existieren auch noch weitere Klassifikationen (Kern W, 2002; Ostendorf PC, 1997).

Darüber hinaus scheinen neuere Prognosefaktoren an Bedeutung zu gewinnen. Beispielsweise haben auch FLT3-Mutationen bei AML-Blasten eine ungünstige Prognose gezeigt (Kiyoi H, 1999). Auch die Expression des sogenannten C-kit-Rezeptors wird hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung noch überprüft (Tsao AS, 2004). Ganz aktuell ist der Ansatz, AML-Patienten mit normalem Karyotyp anhand ihres Genprofils prognostisch einzuschätzen (Bullinger L, 2004).

Von prognostischer Aussagekraft bei der AML sind auch einige funktionelle Parameter. Als prognostisch eher ungünstig werden ein Alter über 60 Jahre, initial hohe Leukozytenwerte, eine Serum-LDH über 700 U/l, eine fehlende Blastenreduktion nach Chemotherapie, das Vorgehen einer Myelodysplasie und eine MRD in Remission angesehen (Serve H, 2000). Neuerdings sind auch Spiegel spezieller Wachstumsfaktoren von prognostischer Bedeutung. Bei der AML zeigt z.B. ein hoher Spiegel des hepatozytischen Wachstumsfaktors (HGF) eine

günstige Prognose an (Gwang Kim J, 2005).

Als unabhängiger ungünstiger Prognosefaktor werden auch oft ein spätes Ansprechen auf die sogenannte Induktionstherapie (Kern W, 2004) und das Vorhandensein eines Philadelphia-Chromosoms angesehen (Keung Y-K, 2004).

Allgemein ist die Prognose der AML heutzutage im Großen und Ganzen unbefriedigend. Kinder haben eine Heilungsrate von 40-50% (Colby-Graham MF, 2003), und Erwachsene unter 60 Jahre überleben in 40-45% der Fälle (Newland A. 2002). In der Gruppe der über 60jährigen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 4% (Jackson GH, 2002).

Nach der Diagnose- und Prognosestellung müssen schließlich noch weitere klinische Untersuchungen durchgeführt werden, um dem Patienten eine optimale supportive Therapie (EKG, Sonographie Abdomen, Röntgen Thorax, Infektionsserologie, etc.) und evtl. später eine Transplantation zukommen zu lassen (HLA-Typisierung) (Hiddemann W, 2003).

Die **MDS** werden seit 1982 ebenso wie die AML nach dem FAB-Schema eingeteilt (Tabelle 4) (Bennett JM, 1982).

**Tabelle 4:** Einteilung der MDS nach der French-American-British-Klassifikation.

	Bezeichnung	Blastenanteile im Blut	Blastenanteile im Knochenmark	weitere Charakterisierung	Überleben (Monate)
RA	Refraktäre Anämie	<1%	<5%		41,5
RAS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	<1%	<5%	mindestens 15% Ringsideroblasten im Knochenmark	38,5
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess	<5%	5-20%		14
RAEB-t	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation	>5%	21-30%	evtl. Auer-Stäbchen	15
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie	<5%	5-20%	periphere Monozytose (>1000/l)	6

Vergleichbar mit der AML gab es aber auch bei den MDS ständig Versuche, an aktuelleren Einteilungsschemata zu arbeiten, um dem klinischen Anspruch hinsichtlich Prognose und Therapie gerecht zu werden (Lee JJ, 1999; Souto EX, 1997). Und obwohl die Kriterien der FAB-Gruppe nicht unumstritten sind, konnte sich dennoch keines dieser Schemata bis dato durchsetzen. Dies gilt auch für die bisher vorgeschlagene Klassifikation der WHO (Harris NL, 1997), welche die MDS folgendermaßen einteilt (Germing U, 2001):

1. RA ohne multilineäre Dysplasien (PRA)
2. RA mit multilineären Dysplasien (RCMD)
3. RAS ohne multilineäre Dysplasien (PSA)
4. RAS mit multilineären Dysplasien (RSCMD)

5. RAEB I
6. RAEB II
7. 5q-Anomalie
8. Unklassifiziertes MDS (MDS-U)

Deshalb arbeiten viele Studiengruppen daran, die Einteilung der MDS immer weiter zu verbessern (Langston AA, 2004).

Im Gegensatz zur AML ist in ca. 90 % der MDS-Fälle zwar ebenfalls eine Anämie, jedoch nur bei etwa einem Drittel der Patienten der klassische Befund einer Panzytopenie nachweisbar. Auch Leukozytose und Thrombozytose schließen ein MDS nicht aus. Ausgeprägte Dysmorphien der Erythrozyten (z.B. Akanthozyten, Hypochromasie, Döhle-Körper), der Thrombozyten (z.B. Granulierungsanomalien) und der Granulozyten (z.B. Pseudo-Pelger-Zellen) stellen weitere, allerdings nicht entscheidende Befunde, im peripheren Blutaussstrich dar. Im Serum sind Abweichungen vom normalen Serum-Immunglobulin-Spiegel häufig, und bei ca. einem Drittel der Betroffenen beobachtet man polyklonale Gammopathien. Gelegentlich ist auch eine erhöhte Inzidenz von Autoantikörpern zu verzeichnen (Okamoto T, 1997; Aul C, 2002).

Zur Diagnosesicherung ist letztendlich eine mikroskopische Untersuchung des Knochenmarks unabdingbar. Das Knochenmark zeichnet sich bei den MDS typischerweise durch eine variable, eher gesteigerte Zelldichte (hyperzelluläres Mark in 63%, hypozelluläres Mark in 8-28% der Fälle), eine Dysmyelopoese (Dyplasiezeichen in 50% der Zellen bei mindestens 2 Zellreihen) und einen über 5% erhöhten, für die Diagnose einer AML aber nicht ausreichenden, Blastenanteil aus. Kriterien der Dysgranulopoese sind z.B. Hypogranulation und Myeloperoxidasedefekte, Dyserythropoese der Ringsideroblasten und Dysmegakaryopoese der Mikromegakaryozyten (Bennett JM, 1982).

Die immunphänotypische Untersuchung zur Diagnosestellung und Prognoseeinteilung ist bei den MDS noch nicht etabliert, könnte aber in Zukunft bei unklarer Zellmorphologie und Zytogenetik von Nutzen sein (Stetler-Stevenson M, 2001). So scheint eine hohe Anzahl von Knochenmarkszellen mit der Expression der Marker CD13, CD33, CD34, CD14 und HLA-DR eine schlechte prognostische Bedeutung, dagegen ein hoher Prozentanteil an Zellen mit der Expression des Markers CD11b eine gute prognostische Bedeutung zu haben (Elgehtany MT, 1998; Zonghong S, 1998). Allerdings vertritt die Literatur noch keine einheitliche Meinung hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft von Oberflächenmarkern bei MDS.

Auch bei den MDS hat die Zytogenetik letztendlich die größte Prognosesicherheit (Nevill TJ, 1998). Chromosomale Aberrationen treten in 30-50% der neu diagnostizierten MDS-Fälle auf (Tassin F, 1998), die sich zum großen Teil mit den Chromosomenanomalien bei der AML decken und ebenfalls eine Zuteilung zu den drei oben genannten Prognosegruppen ermögli-



chen (Greenberg P, 1997) (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Prognostisch relevante zytogenetische Kategorien bei MDS.  
q langer Arm eines Chromosoms. der Derivat.

Prognose	Karyotyp	FAB-Typ
günstig	normaler Karyotyp - Y del(5q) del(20q)	RA RARS CMML
intermediär	andere Aberrationen	RA RARS RAEB RAEB-T CMML
ungünstig	komplex aberrante Anomalien des Chromosoms 7	RAEB RAEB-T CMML

Chromosomenaberrationen könnten bei den MDS auch als Verlaufsparemeter dienen, da bei guter Therapieantwort eine Reduktion der aberranten leukämischen Zellen festgestellt werden konnte (Schmetzer HM, 1997).

Als prognostisch ungünstig werden auch eine Transformation eines MDS in ein sekundäres AML (RAEB-t), ein hoher Zytopenie-Grad und eine große Anzahl an Knochenmarksblasten angesehen (Greenberg PL, 2002; Demyrkan F, 2000). Daneben stellen eine Fibrosierung, das Vorhandensein von Auerstäbchen und eine abnorme Lokalisation unreifer Vorläuferzellen prognostisch schlechte Befunde dar (Hiddemann W, 2003).

Der sogenannte IPSS-Risiko-Score, der neben der Zytogenetik auch den Grad der Zytopenie und die medulläre Blastenzahl berücksichtigt, konnte sich im Gegensatz zu anderen Scoringssystemen (Mufti GJ, 1985) inzwischen international durchsetzen (Tabelle 6) (Greenberg P, 1997).

Eine aktuelle retrospektive Studie, welche die diagnostische und prognostische Aussagekraft von FAB-, WHO-Klassifikation und IPSS-Score verglich, stellte eindeutige Vorteile der WHO- gegenüber der FAB-Klassifikation und noch deutlichere gegenüber dem IPSS-Risiko-Score dar (Lorand-Metze I, 2004).

In Zukunft könnten weitere Messparameter wie z.B. die Zytokin-Expression und der Grad an Zellproliferation und –apoptose bei MDS-Patienten prognostische Bedeutung erlangen (Reza S, 1999).

Neben den Spezialuntersuchungen zur prognostischen Einschätzung sollte man auch bei den MDS Screening-Untersuchungen wie Verlaufsblutbild, EKG, etc. nicht außer acht lassen. Außerdem empfiehlt es sich differentialdiagnostische Möglichkeiten wie z.B. eine HIV-Infektion, eine paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie oder einen Vitamin-B<sub>12</sub>- oder Folsäu-

remangel immer auszuschließen (Hiddemann W, 2003).

**Tabelle 6:** IPSS-Risiko-Score.

KM Knochenmark. Niedrig-Risiko: normaler Karyotyp. Intermediäres Risiko I + II: weder Hoch- noch Niedrigrisiko, Trisomie 8. Hoch-Risiko: komplexe Aberrationen, Aberrationen am Chromosom 7.

IPSS-Score	Score-Wert				
	0	0,5	1	1,5	2
Blasten im KM, %	<5	5-10	Ø	11-20	21-30
Zytogenetisches Risiko	günstig	intermediär	ungünstig	Ø	Ø
Zytopenien (Anzahl betroffener Linien)	0/1	2/3	Ø	Ø	Ø
Risiko-Score	Punktzahl		Medianes Überleben (Jahre)		
Niedrig-Risiko	0		5,7		
Intermediäres Risiko I	0,5-1		3,5		
Intermediäres Risiko II	1,5-2		1,2		
Hoch-Risiko	>2,5		0,4		

In Zukunft könnten die einzelnen FAB-Subklassen in eigene Risiko-Scores eingeteilt werden. Beispielsweise wurde für die CMML bereits eine eigene Risikoeinteilung in vier prognostische Gruppen anhand der Anzahl der medullären Blasten, dem Grad der Anämie und der Menge der Lymphozyten und unreifen mononukleären Zellen im peripheren Blut vorgeschlagen (Onida F, 2002).

Allgemein ist die Prognose der MDS immer noch infaust, v.a. wegen des hohen mittleren Erkrankungsalters (7.Lebensdekade) der Patienten, das oft nur noch palliative Therapiemöglichkeiten offen lässt (Hofmann WK, 2004). Je nach FAB-Typ und IPSS-Score kann der Krankheitsverlauf zwischen wenigen Wochen und mehreren Jahren liegen (Jaiyesimi IA, 2000).

### 2.2.5. Therapie

Ziel der aktuellen **AML**-Therapie ist es, eine komplette und dauerhafte Remission (CR = complete remission) zu erreichen (weniger als 5% leukämische Zellen im peripheren Blut oder im KM). Trotz inzwischen hoher Remissionsraten, sind Rückfälle relativ häufig, da bei vielen Patienten auch nach der Therapie weiterhin in sehr geringem Maße leukämische Zellen vorhanden sind, was man als „minimale Resterkrankung“ bezeichnet (engl. `Minimal Residual Disease`, MRD) (Thomas X, 2002; Stirewalt DL, 2003). Diese verursacht innerhalb der folgenden zwei Jahre bei 70-80% der Patienten ein Rezidiv.

Etablierte Therapiemöglichkeiten der AML sind die konventionelle Chemotherapie und die Stammzelltransplantation (SZT), die in Form einer peripheren Blutstammzell- oder Kno-

chenmarkstransplantation erfolgen kann (PBZT, KMT) (Bishop JF, 1997).

Bei der hochdosierten Polychemotherapie unterscheidet man zwischen der Induktions- und der Postremissionstherapie (Stone RM, 2002).

Die Induktionstherapie setzt sich dabei meist aus der Gabe von Cytosin-Arabinosid (Ara-C) und einem Anthrazyklin (z.B. Daunorubicin, Thioguanin) zusammen (Barge A, 1998). Auch neuere Chemotherapeutika (z.B. Mitoxantron, Troxacitabin, Fludarabin) werden in der Induktionstherapie bereits eingesetzt oder befinden sich noch in Erprobung (Giles FJ, 1999; Wedding U, 2004; Ossenkoppele GJ, 2004). Eine neuere Möglichkeit bietet zudem die Doppelinduktionstherapie mit TAD (Thioguanin, Cytarabin, Daunorubicin) und HAM (Cytarabin, Mitoxantron) (Buechner T, 2003).

Die danach folgende Postremissionstherapie unterteilt man in eine Konsolidierungs- und eine Erhaltungstherapie. Die Konsolidierungstherapie hat dabei zum Ziel, bei Patienten mit kompletter Remission die MRD zu bekämpfen. Deshalb wird mittels zweier weiterer Chemotherapiezyklen (verwendete Chemotherapeutika wie oben) oder einer SZT versucht, den malignen Klon ganz zu zerstören. Eine wenig intensivere Erhaltungstherapie über mehrere Monate oder Jahre dient letztendlich dazu, eine erreichte Remission auch langfristig zu erhalten (Winton EF, 2004).

Bei der SZT unterscheidet man die allogene von der autologen Form. Bei der allogenen SZT sind als Spender sowohl HLA-identische, verwandte Donatoren als auch unverwandte Spender bzw. HLA-differente Verwandte möglich. Dagegen bekommt der Patient bei der autologen SZT nach einer Chemotherapie sein eigenes, möglichst in kompletter Remission gewonnenes Stammzellpräparat, zu einem späteren Zeitpunkt wieder zurück. Vorteil der autologen SZT ist ein Ausbleiben einer Graft-versus-Host-Reaktion.

In der Frage, ob in der Konsolidierungstherapie der Polychemotherapie oder der SZT der Vorzug zu geben ist, herrscht noch keine komplette Einigkeit (Levi I, 2004). Gesichert scheint allerdings zu sein, dass die SZT durch eine höhere Komplikationsrate und therapieassoziierte Mortalität gekennzeichnet ist (Zittoun R, 1995), wohingegen bei Patienten mit ungünstiger Prognose (z.B. therapy-related AML), die allogene SZT der Chemotherapie vorzuziehen ist (Rund D, 2004). Abgesehen von den Nebenwirkungen stellt die SZT die einzig wirkliche kurative Therapieoption dar.

Insgesamt sollte man beachten, dass die AML unterschiedliche Krankheitsausprägungen mit einschließt, und dass individuelle Faktoren eines jeden Patienten bei der Therapie eine Rolle spielen sollten. Beispielsweise werden Patienten mit Promyelozytenleukämie (AML-M3) schon lange erfolgreich durch die Gabe von All-trans-Retinolsäure behandelt (Collins SJ, 1998). Dagegen erhalten Patienten ohne kurativen Therapieansatz eine umfassende palliative Therapie (Infektionsprophylaxe, Schmerztherapie, Bluttransfusionen) (Estey EH, 2002). Bei

manchen Patienten ist auch der Einsatz einer Gesamtkörperbestrahlung kurativ wirksam (Stelljes M, 2005).

Die Behandlungsmöglichkeiten bei den **MDS** sind insgesamt sehr eingeschränkt und nicht zufriedenstellend (Langston AA, 2004). Gerade bei MDS-Patienten sollte kein einheitliches Therapiekonzept erfolgen, sondern für jeden einzelnen Patienten individuell erstellt werden (Raza A, 2001). Insbesondere ältere Patienten profitieren von den zwei Haupttherapiestandbeinen Chemotherapie und SZT nicht mehr und sollten eine supportive Behandlung erhalten. Im Mittelpunkt stehen dabei eine Bluttransfusion bei Anämie, eine Thrombozytentransfusion zur Blutungsprophylaxe vor invasiven Eingriffen und die Gabe von Breitspektrumantibiotika zum Schutz vor Infektionen. Zur Behandlung der Anämien bei MDS wird neuerdings auch der Einsatz von humanem Erythropoetin erprobt (Rigolin GM, 2005). Als Nebenwirkung von Transfusionen über einen längeren Zeitraum ist eine Eisenüberladung häufig, weshalb von Zeit zu Zeit auch eine Chelationstherapie durchgeführt werden muss (Pomeroy C, 1991).

Die Chemotherapie und die SZT als einzige kurative Therapieoptionen für alle MDS-Subentitäten kommen wegen des hohen, durchschnittlichen Erkrankungsalters nur für eine Minderzahl an Patienten in Betracht.

Eine hochdosierte Chemotherapie – meist mit Thioguanin, Daunorubicin, Cytarabin, etc. – ist demnach nur bei deutlich jüngeren Patienten von Nutzen. Die Remissionsraten sind jedoch meist nur von kurzer Dauer. Ähnlich verhält es sich mit der niedrigdosierten Chemotherapie, deren am häufigsten eingesetzte Substanz wie bei der AML das Ara-C darstellt (Bennett JM, 2002). Neuere Therapieansätze wie z.B. die Behandlung des MDS mit Melphalan konnten sich bislang noch nicht durchsetzen (Denzlinger C, 2000). Eine Kombinationstherapie von Melphalan mit Fludarabine und Alemtuzumab zeigte allerdings selbst bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil ein exzellentes Ansprechen (van Besien, 2005).

Eine SZT, die meist ergänzend nach einer Chemotherapie erfolgt, ist bei MDS-Patienten sowohl autolog als auch allogene möglich. Eine längerfristige Kontrolle der Krankheit wird allerdings laut Studienergebnissen nur in 30-50% der Fälle erreicht. Bessere Chemotherapeutika und eine verbesserte Transplantationsnachsorge und Spendersituation könnten die Heilungschancen in der Zukunft evtl. erhöhen (Giralt S, 2004). Eine Studie, welche die alleinige Chemotherapie mit einer Kombinationsbehandlung aus Chemotherapie und SZT anhand der Vollremissionsraten und des erkrankungsfreien Überlebenszeitraumes der behandelten MDS-Patienten verglich, konnte weder in der einen noch in der anderen Therapie einen Vorteil erkennen (Oosterveld M, 2002). Ähnlich verhielt es sich mit einer Studie bei der Refraktären Anämie, einer FAB-Untergruppe der MDS, welche die Überlebensraten der Patienten mit und ohne SZT verglich. Diese stellte zwar mit SZT bessere Überlebensraten bei Patienten mit komplexem Karyotyp fest, aber schlechtere Überlebensraten bei den übrigen Patienten, was

hauptsächlich auf die SZT-assoziierten Abstoßungsreaktionen zurückzuführen war (Cermak J, 2004).

## **2.3. Immuntherapie**

### 2.3.1. Ein kurzer Überblick über Immunsystem und Tumorimmunologie

Unser Immunsystem ist ein sehr komplexer Mechanismus, an dem viele Zellen, Proteine und Organe teilhaben. Die Organe des Immunsystems unterteilt man in die primären lymphatischen, wo die unreifen Lymphoblasten sich zu immunkompetenten Zellen wandeln, und in die sekundären lymphatischen Organe, wo die gereiften immunkompetenten Zellen Kontakt zu Antigenen bekommen, was sie schließlich aktiviert. Zu den primären lymphatischen Organen zählt man den Thymus und das Knochenmark, zu den sekundären Milz, Lymphknoten und Tonsillen.

Die verschiedenen Zellen und Proteine unseres Immunsystems werden in vier Systeme unterteilt, nämlich in das zelluläre spezifische und unspezifische und das humorale spezifische und unspezifische System. Während die unspezifische Immunantwort sehr schnell auf Humanpathogene reagiert und sofort nach der Geburt anfängt zu arbeiten, hat das spezifische Immunsystem den Vorteil, dass es körperliche Fremdkörper gezielt angreift. Die zellulären Komponenten des unspezifischen Immunsystems wie z.B. Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK) und Dendritische Zellen (DC) sind aber sehr wichtig, um die Zeit bis zum Angreifen des spezifischen Systems zu überbrücken, da die Latenzzeit zwischen Antigenkontakt und spezifischer Immunantwort zwischen Tagen oder sogar Wochen liegen kann. Aber wenn die Zellen der spezifischen Immunantwort einmal aktiviert sind, stellen sie eine starke Waffe gegen jegliche Art mikrobieller Eindringlinge dar.

Zytotoxische T-Zellen erkennen und zerstören menschliche Zellen, die von Viren oder Tumorzellen angegriffen wurden, T-Helfer-Zellen aktivieren B-Zellen und Gedächtniszellen, eine andere Untergruppe der T-Zellen, welche die Fähigkeit besitzen, sich an Antigene zu erinnern, gegen die der Körper früher schon einmal angekämpft hat.

Auch die humoralen Mechanismen spielen bei der Immunabwehr eine sehr wichtige Rolle. Das unspezifische humorale Immunsystem verhindert mit ihrem Säureschutzmantel das Eindringen von Mikroben durch die menschliche Haut und aktiviert über Zytokine das spezifische Immunsystem. Das Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) stimuliert beispielsweise zytotoxische Killerzellen, das Zytokin Interferon (INF) aktiviert die Produktion von antiviralen Proteinen und Interleukine stimulieren T-Helferzellen und B-Zellen. Zur humoralen unspezifischen Immunantwort gehört auch das Komplementsystem, das aus neun Komplementfakto-

ren besteht, die sich nach Antigenkontakt gegenseitig in einer Kaskade aktivieren und unterschiedliche Aufgaben in der Abwehr erfüllen, wie z.B. die Aktivierung von Phagozyten oder die Lyse von körperfremden Zellen.

Der spezifische Teil des humoralen Systems wird schließlich durch die Antikörper repräsentiert, die von den B-Zellen gebildet werden. Von diesen Antikörpern gibt es fünf Typen (A, D, E, G, M), welche in unterschiedlichen Bereichen des Körpers verteilt sind und dort auch unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen (Römpp, 2000).

Das menschliche Immunsystem antwortet meist sehr effizient auf infektiöse, aber nur sehr schlecht auf neoplastische Vorgänge. Theoretisch gibt es eine Vielzahl an Mechanismen, mit denen das Immunsystem Krebszellen zerstören kann. Sowohl Antikörper, als auch T-Zellen können tumorassoziierte Antigene (TAA) erkennen und dadurch Krebszellen zerstören. Und auch über eine Lyse durch das Komplementsystem oder über eine Phagozytose durch Zellen des retikuloendothelialen Systems oder durch NK-Zellen ist eine Eindämmung des Krebswachstums möglich. In der Praxis ist der Kampf des Immunsystems gegen Tumorzellen aber nur sehr eingeschränkt wirksam. Beispielsweise wurde beobachtet, dass die Funktion und Anzahl von Abwehrzellen des menschlichen Körpers wie z.B. der DC bei verschiedenen Krebserkrankungen häufig reduziert sein kann (Mohty M, 2001; Ratta M, 2001; Laguens G, 2002). Vor allem liegt dies aber an der Komplexität der Karzinogenese einschließlich ihrer sogenannten „Immun-escape-Mechanismen“. Krebserkrankungen sind meist durch bestimmte genetische Veränderungen (z.B. Mutationen, Translokationen, Deletionen) in betroffenen somatischen Zellen bedingt. Zentraler Ausgangspunkt für die Krebsentstehung sind nun zelluläre Gene (Onkogene und Suppressorgene), die ein geregeltes Wachstum von Zellen im menschlichen Körper regeln (z.B. Zellproliferation, Differenzierung, Angiogenese, Embryogenese), aber durch die genannten genetischen Veränderungen ihrer Funktion nicht mehr nachkommen können. Durch Fehlen dieser Regulationsmechanismen können sich Tumorzellen unkontrolliert weiter vermehren. Nach einer frühen Wachstumsphase, in der die Krebszellen Nährstoffe über Diffusion aus der Umgebung aufnehmen, folgt die Phase der Angiogenese, in der der Tumor die Bildung von Kapillargefäßen im Wirtsgewebe induziert. Selbst bei hämatologischen Tumoren wie der ALL und der CLL scheinen angiogenetische Prozesse im Knochenmark eine Rolle zu spielen (Molica S, 2004). Bei der weiteren Metastasierung, die sowohl lymphogen als auch hämatogen verlaufen kann, spielen eine Reihe von Molekülklassen, die von den Krebszellen gebildet werden, eine zentrale Rolle. Adhäsionsmoleküle ermöglichen die Invasion von gesundem Gewebe, Degradationsmoleküle die Migration in zwischenzelluläres Bindegewebe und durch Basalmembranen, Wachstumsfaktoren das Wachstum in Metastasenzielorganen und eine Immunsuppression z.B. durch Funktionsverlust der DC (Laxmanan S, 2005), und Motilitätsfaktoren versetzen die Tumorzellen in die Lage zu wandern. Tumorzell-

len verfügen darüber hinaus über eine Vielzahl von „Immun-escape-Mechanismen“, mit denen sie ihr ungehemmtes Wachstum noch weiter fortsetzen können (Gemsa D, 1997; Brossart P, 2000 (II); Whiteway A, 2003) (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** „Tumor-Immun-escape-Mechanismen“.

Typ	Beispiel
Antigenmodulation	Resistenz gegen Lyse durch Antikörper und Komplement, ausgelöst durch Antitumor-Antikörper
MHC- oder Antigen-Verlust	Nichtererkennung durch Effektor-T-Lymphozyten
Antigenmaskierung	Maskierung von Tumorantigenen durch Substanzen wie z.B. Sialomucin
Antigen-Shedding	Abgabe von Tumorantigenen in die Mikroumgebung, Blockierung von Antikörpern oder T-Effektorzellen
Tumor "sneaking through"	"Unterwanderung" im Niedrigzellzahlbereich
Tumor "overriding"	"Überwanderung" im Hochzellzahlbereich
Kompetition für Wachstumsfaktoren	IL-2-Absorption durch Tumoren mit IL-2-Rezeptoren
Tumortoleranz	genetische "Non-Responsiveness" spezifische Inhibition, z.B. Mammary tumor virus (MTV)
tumorbedingte Immunsuppressionen	blockierende Faktoren (z.B. IL-10), Immunkomplexe Prostaglandine, VEGF virale Komponenten (z.B. P15E)

Ein weiteres Problem der Tumorummunologie stellt die Tatsache dar, dass nur ein Teil der TAA individualspezifisch sind. Meist sind Tumorantigene sowohl gruppenspezifisch (d.h. auf verschiedenen Tumoren des gleichen Typs vorhanden) als auch unspezifisch (d.h. mit weiter Verbreitung auf Tumorzellen sowie auch auf bestimmten normalen Zellen), was eine gezielte Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem verhindert. Zusätzlich scheinen gestörte apoptotische Prozesse an der Karzinogenese beteiligt zu sein, wie man sie z.B. auch bei den MDS beobachten kann (Ganten D, 1998; Greenberg PL, 1998).

### 2.3.2. Momentane Möglichkeiten der Immuntherapie bei AML und MDS

Da die Möglichkeiten der klassischen Antitumor-Therapie eingeschränkt sind, hat man nach Methoden geforscht, das Immunsystem in seinem Kampf gegen den Krebs zu unterstützen. Diese Anstrengungen, unsere Immunantwort auf therapeutischem Wege zu beeinflussen, kann man unter dem Begriff Immuntherapie zusammenfassen (Römpp, 2000). Diese neuen Strategien wurden unter anderem auch entwickelt, um Autoimmun- und Infektionskrankheiten zu behandeln, aber finden heute hauptsächlich in der Tumorthherapie Anwendung (Till SJ, 2004; Waller EK, 2004). Im Bereich der Immuntherapie wurden bis dato viele Methoden entwickelt, um die Aufmerksamkeit des eigenen Körpers auf den Krebs zu lenken (Seeler S, 2003), die unter anderem auch in der AML- und MDS-Therapie vielversprechende Ansätze liefern

(Mothy M, 2003; Selleri C, 2002; Matthews DC, 1998). Heute unterscheidet man zwischen der aktiven und passiven Immuntherapie (Gericke D, 1977).

Unter passiver Immuntherapie wird die Verabreichung monoklonaler Antikörper verstanden, welche in vielen Krebstherapiestudien schon eindruckliche Erfolge erzielt hat ([No authors listed], Treatmentupdate, 2003). Dabei induzieren die Antikörper Apoptose, indem sie an Rezeptoren der Krebszelle binden und somit eine Komplement-abhängige Lyse der Tumorzelle herbeiführen. Ein anderer Mechanismus, der über Antikörper vermittelt wird, ist eine Hemmung der antiidiotypischen Reaktion, welche eine Zunahme der Tumorzellanzahl meint (Ganten D, 1998). Jedoch ist eine Wirksamkeit einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern nur dann erfolversprechend, wenn die Krebszellen spezielle Tumorantigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Darüber hinaus exprimieren auch oft normale Körperzellen Krebs-assoziierte Antigene (TAA) auf ihrer Oberfläche, was eine spezifische Tumorbekämpfung einschränkt (Wölfel T, 2001). Inzwischen wurden neben den unkonjugierten auch sogenannte konjugierte Antikörper entwickelt, um das Immunsystem bestmöglich gegen den Krebs zu mobilisieren (Seeler S, 2003; Tallmann MS, 2002). Unter konjugierten Antikörpern werden Immunglobuline verstanden, die mit einem Zellgift fusioniert wurden (Steele TA, 2000). Der Vorteil dieser sogenannten Immuntoxine besteht darin, dass sie die Zellwand der Krebszelle passieren, woraufhin die toxische Substanz vom Antikörpermolekül freigegeben wird. Beispiele für konjugierte Antikörper in der AML- und MDS-Therapie sind das Gemtuzumab, ein CD33-Antikörper (Tsimberidou A, 2003), das inzwischen auch hinsichtlich seiner Anwendbarkeit und Verträglichkeit in der AML-Therapie von Kindern getestet wird (Zwaan CM, 2003), die Radioimmunotoxine (Bunjes D, 2002; Bunjes D, 2001) und andere Immuntoxine (Trail PA, 2003; Stasi R, 2002 (I)). Zusätzlich zu diesen Immunstrategien existieren inzwischen außerdem Studien, Antikörper zu entwickeln, welche nicht nur an das Tumor-assoziierte Antigen (TAA), sondern auch zusätzlich an andere Strukturen binden, wie z.B. an kostimulatorische Antigene von T-Zellen, Dendritischen Zellen oder NK-Zellen, was die Bindungsfähigkeit von Abwehrzellen an Krebszellen erhöht (Schirmacher V, 2002). Neben diesen sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist man inzwischen auch schon dabei, trispezifische Immunglobuline zu konstruieren (Song LP, 2003). Auch in der Therapie der AML sind bispezifische Antikörper bereits in der Erprobung (Kaneko T, 1994; Balaian L, 2001; Clark JJ, 2003). Trotz guter Responderaten z.B. in der Therapie des Lymphoms, des Brustkrebs und der CLL (Campbell P, 2003; Treon SP, 2000; Von Mehren M, 2003), blieben klinische Versuche mit bispezifischen Antikörpern insgesamt bis jetzt weniger erfolversprechend als angenommen, da die Plasmahalbwertszeit von bispezifischen Antikörpern um einiges kürzer ist, als die von normalen Antikörpern (Peipp M, 2002). Sowohl bei der AML als auch bei anderen Tumorerkrankungen könnte die Wirksamkeit einer Chemotherapie in Kombination mit mo-



noklonalen Antikörpern allerdings durchaus verbessert werden (Alvarado Y, 2003; Mavromatis B, 2003). Auch die passive Immuntherapie mit NK-Zellen könnte zukünftig in der AML-Therapie an Attraktivität gewinnen (Brune M, 1996; Lowdell MW, 2000; Moretta L, 2003). Besonders eine Subpopulation, sogenannte CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen, haben in verschiedensten Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt (Gritzapis AD, 2002; Lang P, 2002).

Die aktive Immuntherapie unterteilt man in aktive spezifische und aktive unspezifische Methoden. Der Unterschied liegt darin, dass bei der spezifischen Immuntherapie ein spezifisches Tumorantigen erkannt wird, während bei der unspezifischen Immuntherapie, das Zielantigen weitgehend unbekannt ist (Borrello IM, 2002). Chemische Substanzen und bakterielle Produkte sind Vertreter der unspezifischen Immuntherapie. Vor allem das BCG-Toxin wurde in vielen Krebsstudien getestet, zeigte aber bis jetzt nur Wirksamkeit in der Therapie kleiner, oberflächlicher Tumoren. Heute wird das BCG-Toxin hauptsächlich zur Therapie des Blasenkrebs eingesetzt. Auch die sogenannten "immune modifiers", zu denen alle Zytokine (Interleukine, Wachstumsfaktoren, Erythropoetin, Tumornekrosefaktor, etc.) zählen, welche die Kommunikation zwischen den Abwehrzellen ermöglichen, werden der aktiven unspezifischen Immuntherapie zugerechnet. Da maligne Neoplasien unter anderem auch durch ein Fehlen dieser Botenstoffe gekennzeichnet sind, stellen sie eine wertvolle Therapieoption dar (Waller KE, 2003). Vielversprechende Effekte stellten sich vor allem bei der Behandlung der Chemotherapie-assoziierten Leukopenie (Gottlieb D, 2002; Sultana TA, 2003; Balducci L, 2002) und in der Kombinationstherapie mit SZT, Chemotherapie oder Spender-Lymphozyteninfusionen (DLI) dar (He XY, 2003; Shibuya A, 2002; Ganser A, 2000; Stasi R, 2002 (II); Kolb H-J, 2002). Obwohl "immune modifiers" die zelluläre Immunität deutlich verbessern (Linn YC, 2002), treten immer wieder Nebenwirkungen (Grippe-ähnliche Symptome, Induzierung von leukämischen Reaktionen, cytogenetische Aberrationen, thromboembolische Komplikationen) auf (Farag SS, 2002; Aoyama Y, 2003; Marsh JCW, 2000; Bessho M, 2003; Bunworasate U, 2001; Steurer M, 2003). Die oben genannten Vorteile können aber dennoch ihren Einsatz in der Krebsimmuntherapie rechtfertigen (Braun S, 2000; Braun S, 2001). In einer ganz neuen Studie wird sogar von mit Diphtherietoxin konjugierten Wachstumsfaktoren berichtet (Clark JJ, 2003).

Eine große Hoffnung ruht aber insbesondere auf der spezifischen Immuntherapie, zu der zytotoxische T-Zellen und Dendritische Zellen (DC) gehören (Ridell SR, 2002; Coulie PG, 2003; Del Giudice G, 2003). In der T-Zell-Therapie spielt vor allem auch die Entdeckung von neuen Tumorantigenen eine bedeutende Rolle, die eine Antigen-spezifische Immuntherapie ermöglichen (Renner C, 2002; Van den Eynde B, 1995; Keilholz U, 2001). Zwar ist beispielsweise die Antwort cytotoxischer T-Zellen (CTL) auf eine Gen-Familie namens MAGE, die für Antigene auf Melanomzellen codiert, welche von CTL erkannt werden können (Boon T,

1994), in weiterführenden Studien enttäuschend und wohl auch nur auf solide Tumoren beschränkt (Lutz MB, 2002 (I)) - dennoch kann bei bis zu 29% rückfälliger AML-Patienten durch eine Spender-Lymphozyteninfusion gefolgt von einer allogenen SZT eine komplette Remission erreicht werden (Kochendorfer JN, 2001). Vor allem Zytokin-induzierte T-Zellen scheinen im Gegensatz zu Lymphokin-aktivierten T-Zellen eine starke Antitumorwirkung zu haben (Linn YC, 2003). Diese auf einer Graft-versus-Leukämie-Reaktion beruhende Lymphozyteninfusion zeigte bis jetzt vor allem in der Therapie der CML vielversprechende Erfolge und scheint auch keine gravierenderen Nebenwirkungen aufzuweisen (Kolb H-J, 1997; Falkenburg JHF, 1999). Aber auch bei AML- und MDS-Patienten konnten antileukämische T-Zellen generiert werden, und zeigt die Verabreichung von Lymphozytentransfusionen eine bessere Prognose (Kolb H-J, 2004; Beck JF, 2002; Montagna D, 2003). Auch ein Monitoring der Immunantwort auf Lymphozyteninfusionen bei Krebspatienten wird inzwischen schon versucht (Whiteside TL, 2000).

Am vielversprechendsten scheinen jedoch immuntherapeutische Strategien mit Dendritischen Zellen (DC) zu sein, da sie in immuntherapeutischen Studien am besten abschneiden und als antigenpräsentierende Zellen (APC) auch unabdingbar für die Generierung zytotoxischer T-Zellen sind (Rosenberg SA, 2004; Barratt-Boyes SM, 2004; Hon H, 2004).

## **2.4. Dendritische Zellen**

### 2.4.1. Definition und Funktion der DC

DC, die erstmals 1973 als eigenständige und neue Zellklasse beschrieben wurden (Steinman RM, 1973), nehmen als Teil des unspezifischen Immunsystems eine wichtige Stellung in der Kontrolle der Immunabwehr ein (Schlichting CL, 2004). Als potenteste APC haben sie einen großen Einfluss auf die T-Zell-Antwort (Racanelli V, 2004). Dabei nehmen sie nicht nur in der Tumorbekämpfung, sondern auch in der Infektionsbekämpfung, bei allergischen Reaktionen und bei Autoimmunerkrankungen eine wichtige Stellung ein (Ardavin C, 2004).

DC nehmen in der Peripherie mittels Pinozytose und Phagozytose Antigene auf, prozessieren diese intrazellulär und binden sie an MHC-Moleküle, um sie danach an die Zelloberfläche zu transportieren, wo sie von T-Lymphozyten erkannt werden (Boes M, 2004). Mittels Ausschüttung von Zytokinen werden die T-Zellen zusätzlich angelockt (Brossart P, 2002). Nur im Rahmen dieser Antigenpräsentation können T-Zellen ausreichend aktiviert werden (Turtle CJ, 2004). Somit nehmen die DC in den nicht-lymphatischen Geweben eine „Wächterfunktion“ wahr (Chung NP, 2004). Auch B-Zellen fungieren als APC - der Unterschied zwischen DC und B-Zellen als APC liegt allerdings darin, dass DC mehr MHC-Klasse-II-Moleküle und ak-

zessorische Moleküle exprimieren, dass sie grössere Mengen an IL-12, eines der potentesten Interleukine gerichteter Immunantwort, produzieren und Fremdantigene internalisieren (Banchereau J, 1998).

DC durchlaufen einen Reifungsprozess (Bild 1). Nach Antigenkontakt in der Haut oder auf mukösen Membranen werden die DC aktiviert, wandern zu lymphatischem Gewebe, wo sie zu APC reifen und T-Lymphozyten aktivieren (Sundquist M, 2003). Im Laufe dieses Reifungsvorgangs verlieren DC die Fähigkeit zur Phagozytose, ihre Zytoskelettstruktur wird neu organisiert, die Dichte ihrer an MHC-Moleküle gebundenen Antigene nimmt zu (Whiteside TL, 2004), ihr Energiespeicher wird mit großen Mengen an Fett und Glykogen angereichert (Maroof A, 2005), und eine veränderte Expression von Oberflächenmarkern und –rezeptoren ermöglicht den DC, in die Lymphknoten zu wandern und besser mit T-Zellen in Kontakt zu treten (Schnurr M, 2002) (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Unterschiede hinsichtlich des Reifegrades von DC. (Tabelle in Anlehnung übernommen aus Avigan D, 1999 mit Ergänzungen aus folgenden Quellen: Delgado E, 1998; Adema GJ, 1997; Arndt SO, 2000; de Saint-Vis B, 1998; Dermeure CE, 2000; Lieberam I, 1999; Kaser A, 1999; Kanazawa N, 1999; Muzio M, 2000; Sallusto F, 1998; Sallusto F, 1994; Tsuji S, 2000; Strobl H, 1998; Steinmann RM, 2000; Singh-Jasuja H, 2000)

Unreife DC	Reife DC
Fehlen dendritischer Fortsätze	Dendriten mit auslaufenden Fortsätzen
Hohe Expression an MHCII-Molekülen	Hohe Expression von MHCI und II-Molekülen
Niedrige Expression an kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen: CD40, CD86, CD80, CD54, CD83, HLA-DR	Hohe Expression an kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen: CD40, CD86, CD80, CD54, CD83, HLA-DR, CD1a, CD11c, CD28
Hohe Expression an Molekülen der Chemokin-Rezeptor-Familie: CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6, CXCR1	Hohe Produktion von Zytokinen: TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-12, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-16
Expression von Strukturen zur Antigenaufnahme und zum "processing": z.B. Fc-Rezeptoren, gp 96 (Hitzeschockprotein)	Expression von Strukturen zur Antigenpräsentation: z.B. CD1a, CD83, B7-1
Geringere Expression von Strukturen zum "Homing" in Lymphknoten: CD62L, CCR7, CXCR4 niedrig	Hohe Expression von Strukturen zum "Homing" in Lymphknoten CD62L, CCR7, CXCR4 hoch
Geringe Stimulierung von T-Zellen: CCL18, CCL17, CCL22 niedrig	Hohe Stimulierung von T-Zellen: CCL18, CCL17, CCL22 hoch
Expression von Strukturen zur Inhibition der DC-Reifung und Zytokin-Produktion: z.B. CD47	Expression von Strukturen zur T-Zell-DC-Interaktion: z.B. DC-SIGN

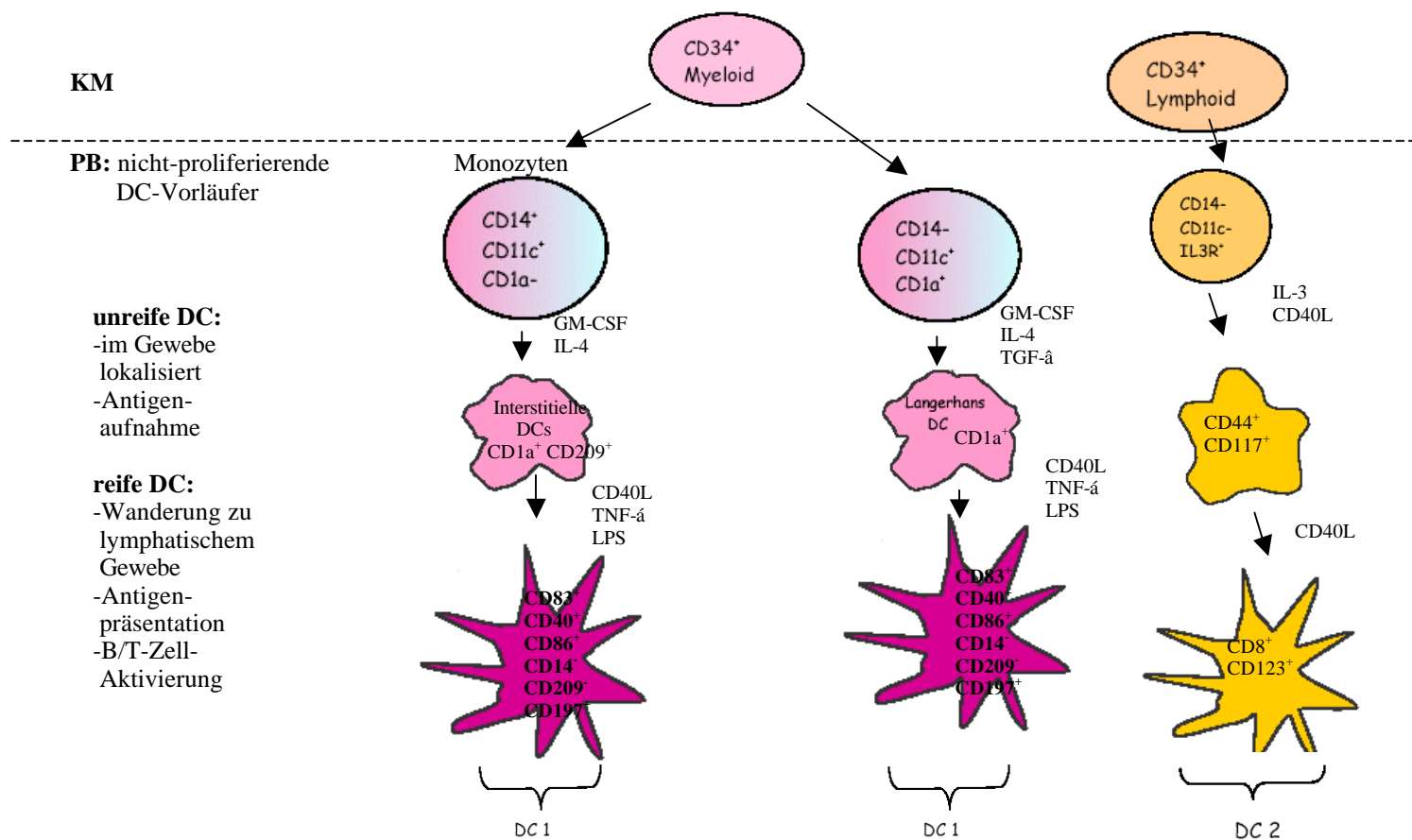
Die geringe Expression bestimmter kostimulatorischer, akzessorischer Moleküle unreifer DC verhindert eine Aktivierung von T-Zellen im ruhenden Gewebe. Unreife DC exprimieren z.B. die Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR5 und CCR6 und das kostimulatorische Molekül CD68, welche während des Reifungsvorganges herunterreguliert werden. An deren Stelle

nimmt die Expression von CD86, CD80, CD40, CCR7 und CD62L zu (Li L, 2003; Svane IM, 2003; Sallusto F, 1998).

Vor allem die Oberflächenstrukturen CCR7 und CD62L sind bei den Oberflächenmolekülen von besonderer Bedeutung, da sie die DC zum Eintritt in die drainierenden Lymphknoten befähigen. Oberflächenantigene zum DC-Kontakt auf T-Zellen sind z.B. CD40L, CD28, CD11a, CD18 und CD54 (Von Andrian UH, 2000; Martin P, 2002; Martin-Fontecha A, 2003; Scheeren RA, 1991). Im Idealfall können durch diese DC-T-Zell-Interaktion bis zu zwanzig T-Zellen von einer DC aktiviert werden (Langenkamp A, 2002).

Unter den DC herrscht eine große Heterogenität. Beim Menschen unterscheidet man zunächst zwischen den myeloiden und den plasmazytoiden/lymphoiden DC mit jeweils verschiedenen charakteristischen Merkmalen und Funktionen. Zu den myeloiden, „klassischen“ DC gehören die Langerhanszellen der Haut, die interstitiellen DC und die in-vitro generierten, von Monozyten oder Knochenmarksstammzellen abstammenden DC (Bild 1). Im Gegensatz zu den myeloiden DC sind plasmazytoide DC CD11c-negativ und CD123-positiv und zudem auch im Blut anzutreffen, allerdings fehlt ihnen selbst im lymphatischen Gewebe die typische DC-Morphologie. Ob sie an der T-Zell-Aktivierung teilhaben, ist unsicher. Da sie aber unter künstlichen Bedingungen die Form typischer DC annehmen können, zählt man sie zu der Klasse der DC (Chain BM, 2003). Beide Typen von DC werden zudem in DC1 (myeloide DC) und DC2 (lymphoide DC) unterteilt, da erstere CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vornehmlich in Richtung sogenannter T-Helfer 1 (TH1)-Antworten, während zweitens diese vor allem in Richtung T-Helfer 2 (TH2)-Antworten dirigieren (Arpinati M, 2000) (Bild 1).

Durch ihre Fähigkeit Antigene zu phagozitimieren und zu prozessieren, greifen DC – vor allem unreife DC – zudem auch in apoptotische Prozesse ein (Janjic BM, 2002). Unter Apoptose versteht man einen programmierten Zelltod, der über unterschiedliche Signalkaskaden initiiert werden kann (Römpp, 2000). Zellen des Immunsystems sind durch die Expression von Zelloberflächenrezeptoren charakterisiert, die Apoptosesignale vermitteln. Dadurch wird erreicht, dass aktivierte T-/NK-Zellen, Zielzellen (z.B. Tumorzellen) oder entzündungsvermittelnde Zellen physiologisch und auf reguliertem Weg vernichtet werden (Wu L, 2005; Friesen C, 1999). Umgekehrt sollen T-Zellen zur Vermeidung einer Überstimulierung durch Antigen-beladene DC ihrerseits einen Einfluss auf die DC-Apoptose haben (Nicoletti C, 2005). Über den programmierten Zelltod bei DC selbst ist allerdings bisher erst wenig bekannt (Nencioni A, 2002). Entsprechend Veröffentlichungen soll die Apoptose bei DC nur in eingeschränkter Weise vom `Fas-ligation-pathway` abhängig sein (Björck P, 1997), sondern HLA-DR-gesteuert sein (Bertho N, 2000).

**Bild 1:** Entwicklungsschema der DC.

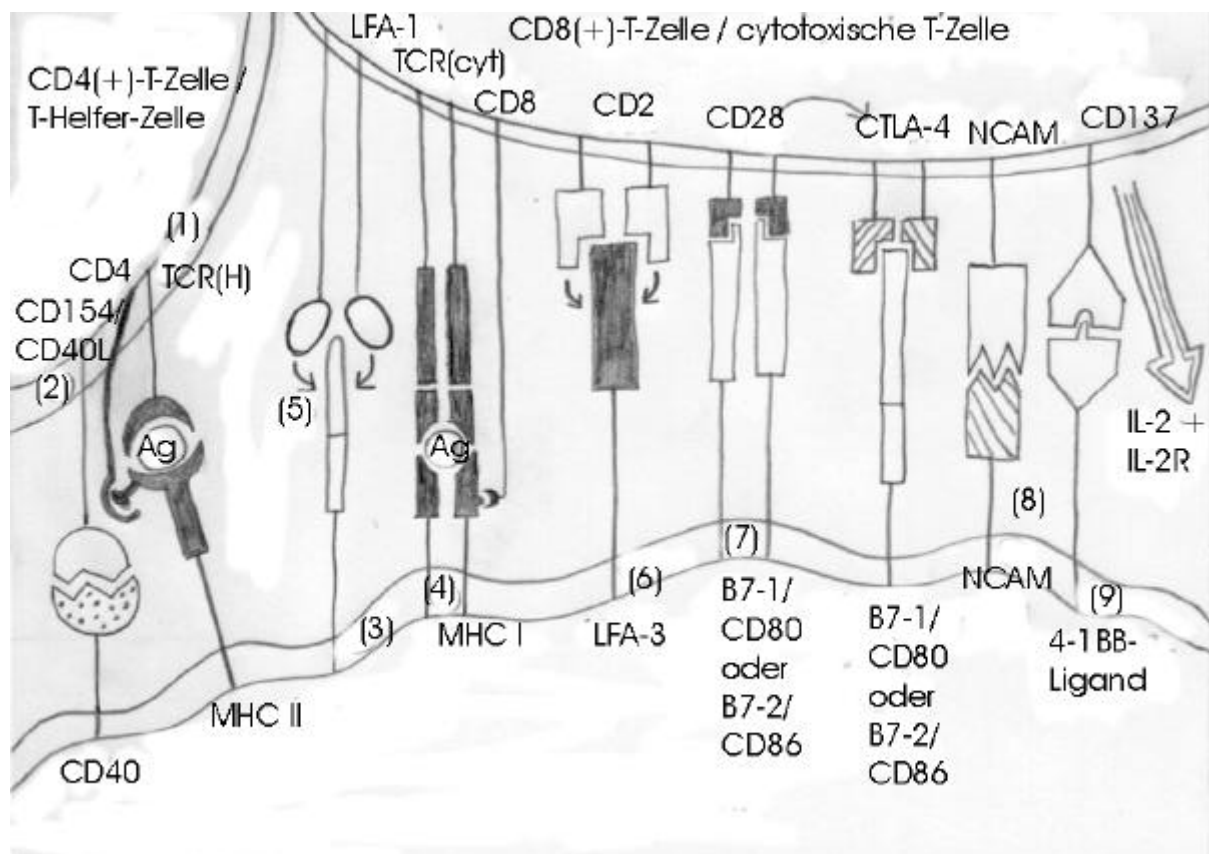
DC scheinen außerdem an der Entwicklung des T-Zell-Gedächtnis des menschlichen Körpers beteiligt zu sein. Dazu sind sie auch in unreifen Zustand fähig (Dumortier H, 2005). In vitro produzieren DC große Mengen an IL-15, wodurch sie CD8<sup>+</sup>-T-Gedächtniszellen stimulieren. Am Meerschweinchen und bei der Maus konnte die Differenzierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Gedächtniszellen durch DC auch in vivo gezeigt werden (Angelov GS, 2005; Badovinac VP, 2005). Sogar DC selbst scheinen ein immunologisches Gedächtnis zu besitzen. Dies lässt insgesamt vermuten, dass DC zur Schaffung eines Immungedächtnisses einen wichtigen Beitrag leisten (Steinman RM, 2003; Hebel K, 2002).

Neben der Stimulierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen (zytotoxische T-Zellen und Gedächtniszellen) über MHC-Klasse-I-Moleküle der DC, treten DC auch mit CD4<sup>+</sup>-Zellen (T-Helferzellen) über MHC-Klasse-II-Moleküle in Kontakt (Gatti E, 2003). Diese scheinen unverzichtbar für die Vorbereitung einer Immunantwort zu sein, da sie mit den DC und den CD8<sup>+</sup>-Zellen Hand in Hand zusammenarbeiten. CD4<sup>+</sup>-Zellen müssen die DC über eine CD40-CD40L-abhängige Interaktion wohl zuerst aktivieren, bevor diese über einen CD80/CD86-CD28-Signalweg mit den CD8<sup>+</sup>-Zellen kommunizieren und diese stimulieren können. Diesen Vorgang nennt man

„Cross-Priming“ (Cho HJ, 2003) (Bild 2).

**Bild 2:** Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung durch eine DC. Ag Antigen. TCR T-Zell-Rezeptor. H Helferzelle. cyt zytotoxische T-Zelle. APC antigenpräsentierende Zelle.

- 1) Auf eine Antigen-Präsentation der DC über MHCII an den TCR<sub>H</sub> der CD4<sup>+</sup>-T-Zelle folgt eine
- 2) Aktivierung der APC durch T-Helferzellen über eine CD-40-CD40L- abhängige Interaktion.
- 3) Danach bindet die APC zunächst niedrig affin über ICAM-1 an LFA-1 an die zytotoxische T-Zelle.
- 4) Bindet der TCR<sub>cyt</sub> der CD8<sup>+</sup>-T-Zelle spezifisch an das MHC I präsentierte Ag, so erfolgt eine
- 5) Konformationsänderung des LFA-1-Rezeptors, der daraufhin eine höhere Affinität zu ICAM-1 entwickelt.
- 6) Ebenso erfolgt eine Konformationsänderung des CD2-Moleküls, das an LFA-3 bindet.
- 7) Die Bindung von CD28 an die kostimulatorischen Moleküle B7-1 oder B7-2 induziert die Expression von CTLA-4, das ebenfalls an B7-1/-2 bindet, wodurch das kostimulatorische Signal inhibiert wird. Nur durch die kostimulatorischen Signale von CD2 und CD28 beginnen die T-Zellen zu proliferieren bzw. die Zelle zu lysieren.
- 8) Die über NCAM vermittelte Bindung an die T-Zelle unterstützt die T-Zellantwort.
- 9) Die Bindung des 4-1BB-Liganden an CD137 wirkt zusätzlich stimulierend.



DC sind außerdem indirekt daran beteiligt, zwischen fremdem und eigenem Gewebe zu unterscheiden, womit sie auch eine Rolle in der Toleranzentwicklung spielen. Hauptsächlich sind DC über eine Aktivierung „selbstreaktiver“ T-Zellen an Autoimmunreaktionen beteiligt

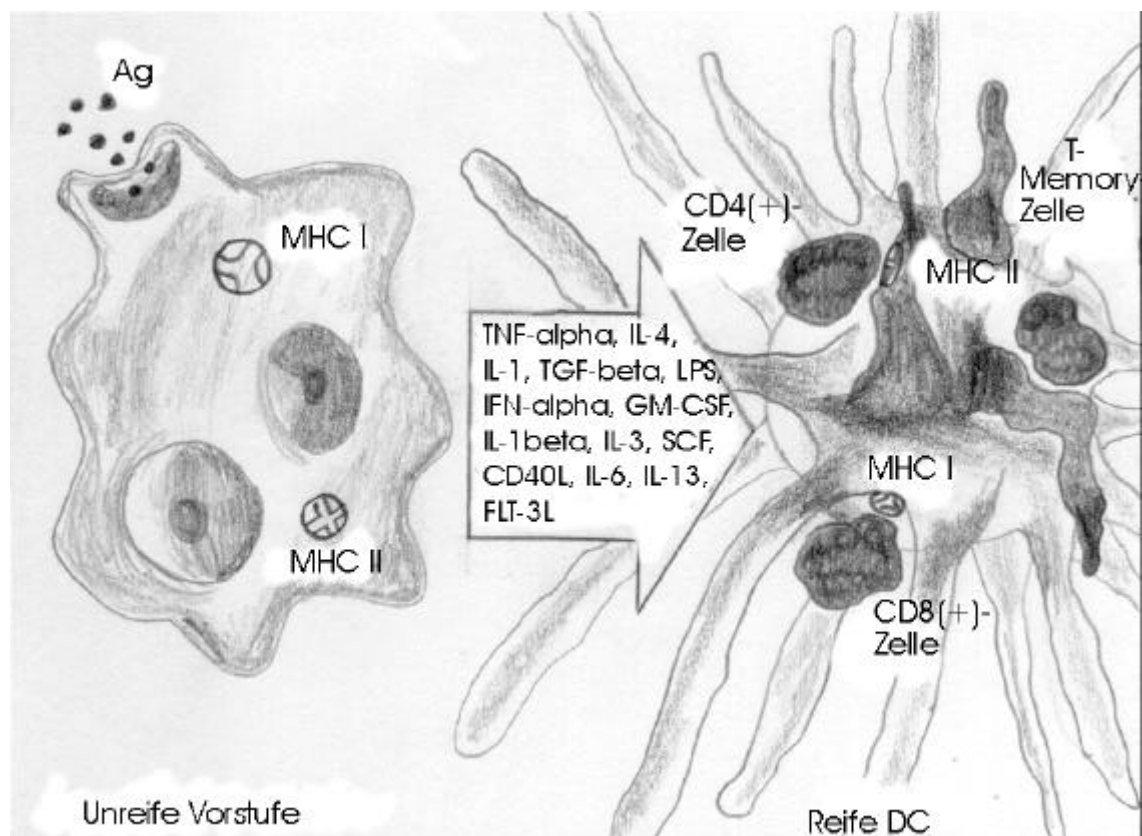
(Castellano G, 2004; `t Hart BA, 2004). Beispiele für Autoimmunreaktionen sind Autoimmunkrankheiten wie z.B. die Multiple Sklerose (MS) oder im weiteren Sinne auch die Graft-versus-Host-Reaktion (GVHD) bei der allogenen hämatopoetischen SZT (Gad M, 2003; Adikari SB, 2004; Brossart P, 2001; Seyfarth B, 2002). Im Rahmen einer Studie über die Genese der Atopischen Dermatitis wurde zudem herausgefunden, dass DC durch den Besitz des IgE-Rezeptors an der Entstehung autoimmunreaktiver Vorgänge im Körper beteiligt sein könnten (Novak N, 2005).

DC können nun aus unterschiedlichsten Zellpopulationen generiert werden (Schuler G, 2003). Sie können in-vitro aus CD34+-Vorläuferzellen, gewonnen aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripherem Blut oder aus CD14+-Monozyten (Dannull J, 2000; Gunzer M, 2001; Tan H, 2005) gewonnen werden. DC können zudem mit Tumorpeptiden, Tumorlysaten, Tumor-DNA/RNA oder ganzen Tumorzellen beladen werden (Galea-Lauri J, 2002 (I)). Auch eine DC-Generierung aus leukämischen Blasten ist möglich. Während die DC-Generierung aus leukämischen Blasten zunächst bei Mäusen erfolgreich umgesetzt wurde, hat sich die Methode inzwischen auch beim Menschen zumindest in-vitro durchgesetzt (Colombo BM, 2000; Kharfan-Dabaja MA, 2004). Daneben existieren inzwischen verschiedenste neuere Methoden, welche die Funktion der DC als APC maximieren sollen, wie z.B. eine Konjugation von leukämischen Blasten mit Fusionsproteinen bei AML, eine retrovirale Transduktion von TNF in AML-Blasten, eine verlängerte Antigenpräsentation mittels spezieller Mikrosphären bei monozytären DC, etc. (Moldenhauer A, 2004; Yanagita S, 2004; Waeckerle-Men Y, 2004; Van Tendeloo VFI, 2001; Bubenik J, 2001; Rea D, 2001).

Auch bezüglich des Vorganges der DC-Generierung werden viele verschiedene Methoden angewendet, wobei meist natürliche, die DC-Reifung beeinflussende Zytokine verwendet werden (Bild 2) (Kufner S, 2005 (I und II)). Am häufigsten werden GM-CSF zur granulopoetischen Makrophagendifferenzierung und IL-4 und TNF $\alpha$  zur direkten DC-Differenzierung verwendet (Koehler T, 2000). Andere Zellkulturzusätze differieren in Auswahl, Anzahl und Zusammensetzung stark, betreffen aber meist die in Bild 3 angegebenen Zytokine.

**Bild 3:** Strukturelle Darstellung einer reifen und unreifen DC mit Berücksichtigung beeinflussender Faktoren und Zytokine bei der DC-Reifung. Ag Antigen. T-Memory-Zelle = T-Gedächtniszelle.

(Darstellung in Anlehnung übernommen aus Bauchereau J, 1998 mit Ergänzungen aus folgenden Quellen: Antonysamy, 2000; Charbonnier, 1999; Choudhury 1999; Robinson 1998; Santiago-Schwarz, 1994 (I); Pickel, 1996; Arpinati, 2000; Santiago-Schwarz, 1993; Bendriss-Vermare, 2001)



Zusammengefasst können DC deshalb sowohl bei soliden als auch bei hämatologischen Krebserkrankungen als optimale Träger einer Antitumor-Immuntherapie angesehen werden (Tatsumi T, 2002; Dhokapkar MV, 2000 (I); Shurin MR, 2003; Nouri-Shirazi M, 2000). Vor allem zur Immuntherapie der AML sind DC besonders interessant, da die Idee, leukämische AML-Blasten in DC umzuwandeln, die ihrerseits wieder Leukämie-assoziierte Antigene exprimieren, eine aufwendige Koppelung von DC mit Tumormaterial unnötig macht (Li L, 2005).

#### 2.4.2. Momentane Möglichkeiten der Krebsvakzinierung mit DC

Eine tumorspezifische Vakzinierung mit DC wurde zuerst zur Behandlung solider Tumoren (v.a. Melanom, Prostatakrebs und kolorektales Karzinom) eingesetzt und zeigte dort erste hoffnungsvolle Ergebnisse (Sathaporn S, 2001; Esche C, 1999; Colino J, 2003) (Tabelle 9). Die erste Vakzinierungsstudie mit DC wurde im Jahre 1995 veröffentlicht. Seitdem wurden schon mehr als 1000 DC-Vakzinierungen durchgeführt (Ridgway D, 2003). Zum großen Teil werden die DC dabei zusätzlich mit Antigenen - sowohl synthetischer als auch idiotypischer Herkunft (d.h. mit Tumorantigenen) – beladen, oder neuerdings auch mit Tumormaterial zu einem Hybrid fusioniert (Banat GA, 2005; Xia D, 2005). Da Tumorzellen durch Mutation spezifische Tumorantigene verlieren können, wird inzwischen bevorzugt, mehrere antigene



Epitope (z.B. Peptidcocktails) zu verwenden (Markiewicz MA, 2004). In verschiedenen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass bei einer in vivo-Verabreichung von DC bei vielen Krebspatienten auch eine T-Zell-Immunität erzeugt wird. Methoden, die beim Immunmonitoring zur Anwendung kommen sind z.B. Hautreaktionen nach intradermaler Antigenexposition (DTH-Test), die Bestimmung von Frequenz und Phänotyp antigenspezifischer T-Lymphozyten oder die Erfassung der Funktionalität der T-Zellen anhand der Zytokinsynthese und lytischen Aktivität.

Bei hämatologischen Tumorerkrankungen stehen klinische Vakzinierungen mit DC eher noch am Anfang. Zwar haben sich bei hämatologischen Tumoren wie z.B. dem Lymphom und dem Multiplem Myelom schon erfolgreich Forschungsgruppen etabliert (Hajek R, 2000) (Tabelle 9), dagegen stellen die leukämischen Tumorerkrankungen bei in vivo-Vakzinierungen mit DC immer noch eine Herausforderung dar. Dennoch geben erste in vivo-Versuche bei Leukämien Anlass zu Hoffnung (Reichardt VL, 2005).

Erste klinische Versuche mit leukämischen DC als T-Zell-stimulierende Vakzine in Kombination mit IL-2 wurden in einigen IFN-refraktären oder Imatinib-vorbehandelten CML-Fällen initiiert (Claxton DF, 2001; Westermann J, 2004). Die Therapie wurde gut toleriert und zeigte einen Verlust von Philadelphia-positiven Metaphasen in fünf von neun Fällen und einen Verlust der Trisomie 8 im leukämischen Klon in einem anderen Fall.

Über in vivo-Vakzinierungsstudien bei **AML** ist dagegen bisher kaum berichtet worden. Neben dem Anderson Cancer Center in Houston (Molldrem J, 2002; Thomas M, 2001), gab noch eine Studie von Li L et al. erste Erkenntnisse über DC-Vakzinierungsversuche bei AML-Patienten bekannt (Li L, 2004). Dabei konnte eine spezifische T-Zell-Aktivierung und eine klinische Stabilisierung der Erkrankung für einige Monate in zwei von fünf AML-Patienten nach einer Vakzinierung mit leukämischen DC erzielt werden.

Bei den **MDS** steht momentan selbst die in-vitro-Generierung von DC aus Blasten noch am Anfang, so dass erfolgreiche in vivo-Studien bei MDS wohl so bald noch nicht zu erwarten sind (Rigolin GM, 2001; Claxton DF, 2000).

**Tabelle 9:** Neuere klinische Versuche mit DC bei soliden Tumoren, Lymphomen und Multiplem Myelomen.

MP influenza matrix peptide. KLH keyhole limpet hemocyanin. TT tetanus toxoid. Id Idiotypic protein. PSMA prostate-specific membrane antigen. PSM-P1, PSM-P2 = PSMA. PAP prostatic acid phosphatase. CR complete remission. PR partial remission. Ag Antigen. SD stable disease. PBDC peripheral blood DC.

[1] Antigen-spezifische-Reaktionen: Immunologische Reaktionen im Sinne einer T- ( $CD8^+$ ,  $CD4^+$ ) oder B-Zellantwort gegen tumorale Antigene, einer spezifischen Zytokin-Produktion (z.B. IL-10, IFN) und/oder einer Antigen-spezifischen Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ.

[2] Antitumor-Antwort: Therapeutisches Ansprechen in Form einer Remission (z.B. geringer Metastasenrückgang, MX (mixed disease) = teilweiser Metastasenrückgang bei gleichzeiti-

gem Auftreten neuer Metastasen, Tumorrückgang bei spezifischer molekularer Analyse).

[3] klinisches Ansprechen (Response): Klinisches Ansprechen in Form von klinischen Parametern (z.B. Stabilisierung des klinischen Zustandes (SD), Rückgang von spezifischen Tumorantigenen/-markern im Serumspiegel).

(Tabelle in Anlehnung übernommen aus Satthaporn S, 2001 mit eigenen Ergänzungen aus neuesten Studien)

Krebserkrankung	Antigen	Patientenzahl + Ansprechen	DC-Typ und -Quelle	Quellenangaben
Gesunde Probanden	MP, KLH	2 gesunde Probanden, 2 Ag-spezif. Reakt. [1]	Unreife DC	Dhodapkar MV, 2001
	MP, KLH, TT	9 Probanden, 9 KLH- und 5 von 6 TT-spezif. Reakt.	Monozyten-DC, reif	Dhodapkar MV, 1999
	MP, KLH, TT	Ag-spezif. Reakt.	Monozyten-DC, heterolog	Dhodapkar MV, 2000 (II)
Melanom	Tumorlysate od. Peptidcocktail (z.B. KLH)	16 Pat. 2 CR, 3 PR, 16 Ag-spezif. Reakt.	Monozyten-DC, reif	Nestle FO, 1998
	MAGE-1 u. -3, Melan-A, gp100, Tyrosinase	14 Pat. 2 Antitumor-Ant. [2], 5 Ag-spezif. Reakt.	Reife CD34(+)-DC	Mackensen, 2000 (I)
	MAGE-3	8 Pat. 8 Ag-spezif. Reakt.	Monozyten-DC, reif	Schuler-Thurner, 2000
	gp100, MART-1, Mage-3, Tyrosinase	18 Pat. 3 CR, 1 PR, 7 Antitumor-Ant., 16 Ag-spezif. Reakt.	Unreife CD34(+)-DC	Bauchereau, 2001
	Tumorlysate, MART-1 od. MAGE-1	Ag-spezif. Reakt.	Autologe DC	Chakraborty NG, 2004
	Tumorlysate	11 Pat. 1 PR, 2 Antitumor-Ant.	Monozyten-DC, reif	Vilella R, 2004
Multiples Myelom	Id, KLH	12 Pat. 2 CR, 9 PR, 2 Id-spezif., 11 KLH-spezif. Reakt.	Unreife PBDC	Reichardt VL, 1999
	Id, KLH	6 Pat. 5 Id-spezif., 6 KLH-spezif. Reakt., 1 klin. R. [3]	Monozyten-DC, unreif	Lim SH, 1999
Lymphom	Id	4 Pat. 1 CR, 1 PR, 2 Antitumor-Ant.	Unreife PBDC	Hsu FJ, 1996
	Tumorlysate, KLH	10 Pat. 1 CR, 4 PR, 5 Ag-spezif. Reakt.	Monozyten-DC, reif	Maier T, 2003
Prostata-CA	PSM-P1, PSM-P2	107 Pat. 30% Ansprechen	Monozyten-DC, reif	Lodge PA, 2000
	PAP-GM-CSF-Fusionspeptid	12 Pat. Ag-spezif. Reakt., 3 klin. R.	Unreife PBDC	Burch PA, 2000
	PSA-codierende mRNA	13 Pat. 3 Antitumor-Ant., 13 Ag-spezif. Reakt., 6/7 klin. R.	Monozyten-DC	Heiser A, 2002
Nieren-CA	Tumorlysate, KLH	4 Pat. 3 klin. R.	Monozyten-DC, reif	Rieser C, 2000
	Hybrid aus autolog. Tumorzelle u. allog. DC	17 Pat. 4 CR, 2 PR, 1 Antitumor-Antw., Ag-spezif. Reakt.	Monozyten-DC, allogene	Kugler A, 2000
	Renale Tumor-RNA	10 Pat. 6/7 Ag-spezif. Reakt.	Autologe DC	Su Z, 2003
	Tumorlysate	12 Pat. 1 PR	Reife PBDC	Gitlitz BJ, 2003
Brustkrebs	Cocktail aus p53-Peptiden	6 Pat. 2 Antitumor-Antw., 3 Ag-spezif. Reakt., 2 klin. R.	Autologe DC	Svane IM, 2004
Brust- und Eierstock-CA	HER-2/neu- od. MUC1-gewonnene Peptide	10 Pat. 5 Ag-spezif. Reakt.	Monozyten-DC, reif	Brossart P, 2000 (II)
Uterus- und Eierstock-CA	KLH, autolog. Tumorzelllysate	8 Pat. 6 Ag-spezif. Reakt., 3 klin. R.	Monozyten-DC, reif	Hernando JJ, 2002
Schilddrüsen-CA	Calcitonin, CA-Peptide	7 Pat. 1 PR, 7 Ag-spezif. Reakt., 3 von 7 klin. R.	Monozyten-DC, reif	Schott M, 2001
Pädiatrische solide CA	Tumorlysate, KLH	15 Pat. 1 PR, 6/10 KLH-spezif. Reakt., 5 klin. R.	Monozyten-DC, unreif	Geiger JD, 2001
Glioblastoma multiforme	Tumorlysate	14 Pat. 4/9 Ag-spezif. Reakt.	Reife PBDC	Yu JS, 2004

## 2.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Die meisten erfolgreich chemotherapierten AML-Patienten rezidivieren innerhalb kurzer Zeit. Für MDS-Patienten gibt es (außer der Stammzelltransplantation) bisher keine kurativen Behandlungsoptionen. Daher ist das Haupttherapieziel für die meisten AML-Patienten das Erreichen kompletter oder mindestens lang andauernder Remissionen, für MDS-Patienten das Aufrechterhalten stabiler Krankheitsphasen ohne Krankheitsprogress.

Als die effizientesten Antigen-präsentierenden Zellen initiieren und regulieren DC antigenspezifische Immunantworten. Sie präsentieren Tumorantigene (TAA), induzieren eine tumorspezifische T-Zellreaktion und stellen daher ein vielversprechendes tumorimmuntherapeutisches Konzept dar.

Für AML-Studien sind DC gerade deshalb so interessant, da die leukämischen, unreifen Vorläuferzellen direkt, ohne „Beladung“ mit Tumorantigenen in leukämische DC umgewandelt werden können.

Da nur reife DC durch eine hohe T-Zellstimulations- und Migrationsfähigkeit gekennzeichnet sind, und derzeit kein Standardkulturverfahren verfügbar ist, bestand das Ziel dieser Arbeit zunächst darin, die optimale serumfreie Kulturbedingung für die Generierung reifer DC aus leukämischen Blasten herauszufinden. Zunächst wurden daher diverse Zellfraktionen für unterschiedliche Zeiten mit unterschiedlichen Zusätzen ( $\pm$  autologes Plasma,  $\pm$  Fl,  $\pm$  PGE<sub>2</sub>, etc.) in einem Standardmedium (GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$ ) kultiviert. Ein besonderes Anliegen bestand in der Etablierung einer Methode zur Generierung von DC bei MDS. Nach Ermittlung der besten Methode sollten die erhaltenen DC im Hinblick auf ihr Expressionsprofil, ihre leukämische Abstammung sowie ihre autologe T-Zellaktivierende Fähigkeit in der gemischten Lymphozytenkultur hin getestet werden.

Insgesamt sollte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur weiteren Optimierung von DC-Generierungsstudien im Hinblick auf ihren künftigen klinischen Einsatz (in vivo-Studien) leisten, um bessere Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit AML und MDS zu erhalten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Patientenkollektiv

In diese Arbeit gingen Untersuchungen von insgesamt 108 AML Patienten, 56 MDS Patienten und 38 gesunden Probanden ein, deren heparinisertes Blut oder Knochenmarksproben mit deren Zustimmung zwischen 1997 bis 2004 unserem Labor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Grosshaderns zur Untersuchung überlassen wurden. Die meisten Patienten wurden im Rahmen von Studien diagnostiziert und behandelt. Die diagnostizierten Befunde (Zytomorphologie, Zytogenetik, Immunzytologie) wurden uns von den jeweiligen Einsendern zur Verfügung gestellt (Laboratorien für Leukämiediagnostik der Med. III, der Kliniken Berlin, Ulm oder Oldenburg). Mit Ausnahme der FISH-IPA-Analyseergebnisse, die zum großen Teil von mir selbst erstellt wurden, wurden mir alle diagnostizierten sowie im Rahmen aller Untersuchungen erstellten Untersuchungsergebnisse zur Auswertung überlassen.

Die Diagnosestellung der AML- und MDS-Proben erfolgte auf Grundlage der FAB-Klassifikation (Bennett JM, 1976; Bennett JM, 1982).

Die Proben von 50 AML Patienten (40 mit Erstdiagnose, 5 mit persistierendem Krankheitsverlauf und 5 mit Krankheitsrückfall), von 24 MDS Patienten und von 23 gesunden Probanden wurden für einen Methodenvergleich bei der DC-Generierung verwendet (siehe Kapitel 4.2.) (Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Patientencharakteristika für den Methodenvergleich. m männlich. w weiblich. AMLp primäre AML. AMLs sekundäre AML. nd nicht ausgewertet (not done). \* % der Blasten gemessen im Untersuchungsmaterial (PB oder KM) mit FACS-Analyse bzw. % CD34<sup>+</sup>-Zellen in MDS-Fällen. \*\* Oberflächenmarkerprofil der Blasten.

Patientennummer	FAB-Typ	Alter bei Diagnose/ Geschlecht	% ic Blasten* (KM/PB)	Blastenphänotyp** CD...	klonaler Marker
9	AMLp M0	59/ m	17	33,Dr	normal
25	AMLp M0	62/ m	39	33,13,34,7,117	normal
61	AMLp M0	69/ w	4	33,13,117,34	normal
130	AMLp M0	54/ m	76	13,33,117,7,2,65,15	t(9;18)(pq)
195	AMLp M0	55/ m	21	34	normal
2	AMLp M1	69/ m	94	117,33,13,64	normal
6	AMLp M1	36/ w	79	13,33,117,34,56	n.d.
53	AMLp M1	24/ m	87	33,13,Dr,117,4	normal
121	AMLp M1	70/ w	40	13,117	normal
17	AMLp M1	73/ w	89	33,13,Dr	normal
47	AMLp M1	45/ w	90	34,Dr,7,33	normal
38	AMLp M1	76/ w	59	13,34,117,Dr,7	n.d.
175	AMLs M1	69/ w	90	13,33,4,64,65,14,15	normal
7	AMLp M2	59/ m	62	117,33,13,65	normal
8	AMLp M2	44/ w	94	33,13,34,117,2,65,15	t(2;3)(pq)
22	AMLp M2	59/ m	21	33,34,13	t(8;21)
56	AMLp M2	37/ m	38	33,13,117,Dr	normal
104	AMLp M2	20/ w	33	15,33,123	t(3;5)(qq)

126	AMLp M2	58/ w	86	13,33	t(8;21)
66	AMLs M2	74/ m	86	33,13,14,64,Dr,116	normal
71	AMLs M2	47/ w	45	34,33	n.d.
80	AMLs M2	66/ w	6	19,65,15,34	normal
89	AMLs M2	67/ m	30	Dr,33,13,34,117	n.d.
191	AMLs M2	73/ m	12	34,117,33	+8
71	AMLs M2	47/ w	45	34,33	n.d.
49	AMLs M2	55/ w	n.d.	34,33,2	normal
33	AMLs M2	50/ m	91	34,117,33,13,56,7	t(3;18)(qq).ins(4;9)(q?).t(4;19)(p?).-5,t(7;11)(qq),+9,del(9q),t(9;12)(pq),t(5;10)(?p),-11,t(5;14)(?p),del(17p),-18,-19,-20
43	AMLp M3v	29/ w	58	33,13,64,Dr-	t(15;17),del(7q)
36	AMLp M4	41/ w	45	33,13	t(11;16)(pp)
29	AMLp M4	56/ m	31	33,Dr,64,14,15	normal
93	AMLp M4	52/ w	52	33,Dr,64,13,117	normal
12	AMLs M4	76/ m	91	7,13,33,Dr,14,64,34	+8,+9,+14
138	AMLs M4	68/ m	36	33,13,65,15,14,34	-7
10	AMLp M4eo	38/ w	43	13,33,117,34,Dr	inv(16),del(7q)
20	AMLp M4eo	57/ m	81	117,33,34,13,Dr	inv(16)
64	AMLp M4eo	70/ m	25	13,33,14	inv(16)
48	AMLp M4eo	40/ m	88	34,13,33,65,15,Dr	normal
46	AMLp M4eo	33/ w	75	33,15,4,64,Dr,56	normal
41	AMLp M5	42/ m	48	33,15,65,4,64,Dr,56	normal
44	AMLp M5	37/ m	43	33,Dr,64,15,56	normal
108	AMLp M5	48/ w	85	33,13,15,64,14	normal
196	AMLp M5	67/ w	91	64,33,13,4,15	n.d.
197	AMLp M5	50/ w	86	64,15,65,33,13	t(9;11)(q21;q23)
201	AMLp M5	48/ m	93	n.d.	normal
11	AMLs M5a	57/ w	74	7,1,13,33,86,Dr,15,56,64	+8,+13,+20,t(9;11)(pq23).inv(17)
18	AMLp M5b	77/ m	40	33,13,64,34	normal
23	AMLp M5b	53/ w	33	n.d.	t(11;22)(qq)
65	AMLs M5b	75/ w	79	33,65,15,64	r(1pq)
51	AMLs M6	31/ w	7	34	-7
54	AMLs M6	60/ m	11	34,33	ins(5;17),del(5q),t(6;17)
16	MDS	70/ w	5		del(5q)
28	MDS	?/ m	2		n.d.
78	MDS RA	40/ w	13		del(5q)
83	MDS RA	68/ m	12		normal
97	MDS RA	77/ m	2		normal
69	MDS RA	42/ m	15		t(2;10)(qp).-9,der(16q)
52	MDS RAS	60/ m	1		n.d.
84	MDS RAS	43/ w	1		+19
5	MDS RAEB	66/ m	0		n.d.
15	MDS RAEB	50/ m	1		normal
19	MDS RAEB	73/ w	2		t(3;5)(qq)
40	MDS RAEB	77/ w	1		n.d.
70	MDS RAEB	53/ m	n.d.		dic(5;17)(qp),+8,t(19;20)(qp),-20,+22,t(11;14)(?p)
190	MDS RAEB	68/ m	4		-Y
110	MDS RAEB	77/ w	2		normal
30	MDS RAEB	79/ w	4		-7
62	MDS RAEBt	52/ m	10		normal
26	MDS RAEBt	64/ m	3		normal
67	MDS RAEBt	72/ w	2		n.d.
77	MDS RAEBt	67/ m	13		normal
141	MDS RAEBt	64/ w	n.d.		i(17q)
158	MDS RAEBt	75/ w	3		n.d.
57	MDS CMML	68/ w	8		n.d.
75	MDS CMML	58/ w	4		-21

Von den AML Patienten stellten sich 13 mit einer undifferenzierten Leukämie (M0: n=5, M1: n=8), 15 Patienten mit einer unreifen granulozytären Leukämie (M2: n=14, M3: n=1), 20 Patienten mit einer monozytären Leukämie (M4: n=5, M4eo: n=5, M5: n=10) und 2 mit einer Erythroleukämie (M6) vor. Das Durchschnittsalter der AML Patienten betrug 55 Jahre, das Verhältnis Männer zu Frauen war 1:1. Von den MDS Patienten wurde bei 4 eine refraktäre Anämie (RA), bei 2 eine refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RAS), bei 8 Patienten eine refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB), bei 6 eine refraktäre Anämie mit Blasten-exzess in Transformation (RAEB-t) und bei 2 eine chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) nachgewiesen. Bei 2 MDS Patienten war kein FAB-Typ verfügbar. Das Durchschnittsalter der MDS Patienten betrug 64 Jahre, das Verhältnis Männer zu Frauen 1:1. Für eine weitere Studie, in der auf Ergebnisgrundlage des Methodenvergleichs serumfrei leukämische DC generiert wurden, flossen die Proben von 100 AML Patienten (83 mit Erstdiagnose, 7 mit persistierender Erkrankung und 10 mit Rezidiv), von 55 Patienten, als auch von 38 gesunden Probanden ein (siehe Kapitel 4.3.) (Tabelle 11). Zusätzlich wurden DC von 4 verschiedenen AML- und MDS-Zelllinien namens Mutz-1 (MDS-RAEB), Mutz-3(AML-M4), Kazumi und HL60 (beide AML-M2) generiert (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Charakteristika der Patienten und Zelllinien für die serumfreie DC-Generierungsstudie. Dgn Diagnose. m männlich. w weiblich. p M0 primäre AML FAB M0. sM? sekundäre AML nicht-FAB-klassifiziert. nd nicht durchgeführt. g günstiges Risiko. u ungünstiges Risiko. i intermediäres Risiko. Geschl Geschlecht. \* % der Blasten gemessen im Untersuchungsmaterial (PB or KM) mit FACS-Analyse bzw. %CD34<sup>+</sup>-Zellen in MDS-Fällen. \*\* Oberflächenmarkerprofil der Blasten.

	Pat.-Nr	FAB-Typ	Alter bei Dgn / Geschl	Klonaler Marker	zytogenetisches Risiko	ic-Blasten *	Blastenphänotyp (CD)**
AML	181	s M?	64/m	t(3:6)(qq,-7,del(16q),t(5:17)qq,t(6:10)(qp)	u	92	34,33,13
	211	M0	52/m	inv3,-7	u	84	33,34,13,117,4,7
	9	p M0	?/m	normal	i	17	33,Dr
	25	p M0	62/m	normal	i	39	33,13,34,7,117
	50	p M0	72/w	nd	-	10	33,13,Dr,117,10,14,4
	61	p M0	69/w	normal	i	4	33,13,117,34
	92	p M0	73/m	nd	-	5	34,117,38
	130	p M0	54/m	t(9:18)(pq)	i	76	13,33,117,7,2,65,15
	167	p M0	70/w	nd	-	8	33,13,7
	202	p M0	63/m	+8	i	95	13,33,117,64,7
	148	p M1	?/m	normal	i	95	33,123
	214	p M1	70/w	normal	i	64	33,13,15,40
	237	p M1	51/w	nd	-	2	34,117
	238	p M1	72/w	nd	-	53	13,33,117
	2	p M1	69	normal	i	94	117,33,13,64
	6	p M1	?/w	nd	-	79	13,33,117,34,56
	38	p M1	76/w	nd	-	59	13,34,117,Dr,7
	47	p M1	45/w	normal	i	90	34,Dr,7,33
	53	p M1	24/w	normal	i	87	33,13,Dr,117,4
	121	p M1	70/w	normal	i	40	13,117
	136	p M1	29/m	normal	i	62	33,13,117
	137	p M1	68/w	normal	i	69	13,33,MPO
	161	p M1	51/m	normal	i	90	13,33,117,4

	166	p M1	61/m	del(3pq)	i	66	13,33,65,34,4
	188	p M1	41/w	normal	i	96	123,56
	189	p M1	32/w	normal	i	22	13,33,117,65,15,7,2, c3
	17	p M1	73/w	normal	i	89	33,13,Dr
	175	s M1	69/w	normal	i	90	13,33,4,64,65,14,15
	198	s M1	71/m	+8	i	67	33,65,56,15,64
	220	s M1	64/m	nd	-	29	34,38,33(+)
	231	M2	?/w	normal	i	91	33,13
	7	p M2	59/w	normal	i	62	117,33,13,65
	8	p M2	44/w	t(2:3)(pq)	i	94	33,13,34,117,2,65,1 5
	22	p M2	59/m	t(8:21)	g	21	33,34,13
	210	p M2	76/w	normal	i	6	nd
	228	p M2	54/w	add(12p)	i	69	33,13,34,7
	56	p M2	37/m	normal	i	38	33,13,117,Dr
	105	p M2	20/m	t(3:5)(qq)	i	76	15,33,123
	126	p M2	58/m	t(8:21)(qq)	g	86	13,33
	140	p M2	83/w	normal	i	42	13,33,MPO
	144	p M2	75/m	normal	i	88	33,13
	176	p M2	58/m	normal	i	79	13,33,117,135
	182	p M2	52/w	normal	i	18	33,7,34
	200	p M2	33/w	normal	i	23	117,13,33,65
	205	p M2	39/m	t(8:21)	g	85	13,33,34
	33	s M2	55/m	t(3:18)(qq),ins(4:9)(q?),t(4:19)(p?), 5,t(7:11)(qq),+9,del(9q),t(9:12)(pq),t(5:10)(?p), 11,t(5:14)(?p),del(17p),-18,-19,-20	u	91	34,117,33,13,56,7
	37	s M2	67/m	-	-	79	33,117
	49	s M2	55/w	normal	i	2	34,33,2
	66	s M2	74/m	normal	i	86	33,13,14,64,Dr,116
	71	s M2	47/w	nd	-	45	34,33
	80	s M2	66/w	normal	i	6	19,65,15,34
	90	s M2	67/m	nd	-	86	Dr,33,13,34,117
	172	s M2	76/m	nd	-	75	13,33,15,117
	191	s M2	73/m	+8	i	12	34,117,33
	43	p M3v	29/w	t(15:17),del(7qq)	g	58	33,13,64,Dr-
	60	p M3v	57/w	t(15:17)	g	87	33,64,13,Dr-
	29	p M4	56/m	normal	i	31	33,Dr,64,14,15
	36	p M4	41/w	t(11:16)(pp)	i	45	33,13
	94	p M4	52/w	normal	i	76	33,Dr,64,13,117
	132	p M4	57/w	+4,+9,etc	u	82	33,34,38
	135	p M4	27/w	normal	i	52	13,33,MPO,33,38,34
	184	p M4	?/m	normal	i	71	nd
	207	p M4	64/m	+11,inv11(pq13)	i	61	33,65,14,4,56,135
	12	s M4	76/m	+8,+9,+14	u	91	7,13,33,Dr,14,64,34
	138	s M4	68/m	-7	u	36	33,13,65,15,14,34
	10	p M4eo	38/w	inv(16pq),del(7q)	g	43	13,33,117,34,Dr
	20	p M4eo	37/m	inv(16pq)	g	81	117,33,34,13,Dr
	46	p M4eo	33/w	normal	i	75	33,15,4,64,Dr,56
	48	p M4eo	40/m	normal	i	88	34,13,33,65,15,Dr
	64	p M4eo	70/m	inv(16pq)	g	25	13,33,14
	239	s M4	54/w	t(9:11)(q21:q23)	u	49	13,33,117,135
	41	p M5	42/m	normal	i	48	33,15,65,4,64,Dr,56
	44	p M5	37/m	normal	i	43	33,Dr,64,15,56
	108	p M5	48/w	normal	i	85	33,13,15,64,14
	147	p M5	69/m	-	-	81	33,34
	196	p M5	67/w	-	-	91	64,33,13,4,15
	197	p M5	50/w	t(9:11)(q21:q23)	u	86	64,15,65,33,13
	201	p M5	48/?	normal	i	93	nd
	11	s M5a	57/w	+8,+13,+20,t(9:11)(pq23),inv(17pq)	u	74	7.1,13,33,86,Dr,15,5 6,64
	18	p M5b	?/m	normal	i	40	33,13,64,34
	24	p M5b	53/w	t(11:22)(qq)	u	37	-
	65	p M5b	75/w	r(1pq)	i	79	33,65,15,64
	51	s M6	31/w	-7	u	32	34
	54	s M6	60/m	ins(5:17),del(5q),t(6:17)	u	11	34,33
<b>MDS</b>	16	MDS	70/w	del(5q)	g	5	
	28	MDS	?/m	nd	-	2	
	88	MDS	70/m	nd	-	3	
	139	MDS	29/m	normal	g	2	
	129	RA	50/w	normal	g	3	
	69	RA	42/m	t(2:10)(qp),-9,der(16q)	u	15	
	78	RA	40/w	del(5q)	g	nd	
	83	RA	68/m	normal	g	15	



	97	RA	77/m	normal	g	2	
	134	RA	79/w	del(5q)	g	8	
	145	RA	76/m	normal	g	3	
	52	RAS	60/m	nd	-	1	
	84	RAS	43/w	+19	i	1	
	223	RAEB	75/m	nd	-	3	
	208	RAEB	83/w	normal	u	6	
	215	RAEB	45/w	normal	g	2	
	234	RAEB	55/m	normal	-	10	
	5	RAEB	66/m	nd	-	0	
	15	RAEB	50/m	normal	g	1	
	19	RAEB	73/w	t(3;5)(qq)	i	2	
	30	RAEB	79/w	-7 (bei ED)	u	4	
	31	RAEB	80/m	normal	g	0	
	40	RAEB	77/w	nd	-	1	
	42	RAEB	43/m	nd	-	4	
	70	RAEB	53/m	dic(5;17)(qp),+8,t(19;20)(qp),-20,+22,t(11;14)(?p)	u	nd	
	85	RAEB	80/m	+8	i	nd	
	96	RAEB	62/m	normal	g	1	
	99	RAEB	76/m	normal	g	11	
	102	RAEB	67/m	XXYY	i	6	
	110	RAEB	77/w	normal	g	2	
	123	RAEB	63/w	nd	-	2	
	190	RAEB	68/m	-y	g	4	
	127	RAEB	64/w	der(5;17)(qq),-7,del(9q),t(9;12)(qq)	u	3	
	212	RAEBt	40/w	normal	g	5	
	225	RAEBt	80/m	nd	-	7	
	227	RAEBt	51/w	nd	-	10	
	62	RAEBt	52/m	normal	g	10	
	133	RAEBt	69/w	del(5q)	g	15	
	158	RAEBt	75/w	nd	-	3	
	160	RAEBt	65/m	normal	g	1	
	26	RAEBt	64/m	normal	g	3	
	27	RAEBt	52/m	normal	g	3	
	68	RAEBt	72/w	nd	-	nd	
	77	RAEBt	67/m	normal	g	13	
	141	RAEBt	64/w	i(17q)	i	7	
	179	RAEBt	83/m	+1,+2,+4,+8,+9,+14,-16,,+19,t(8;11)(pq),dic(q;11)(qp);t(9;19)(?q)	u	2	
	57	CMML	68/w	nd	-	8	
	75	CMML	58/w	-21	i	4	
<b>Zell linie</b>		HL60	p M2	-X,-8,-16,-17,+18,+22,ins(1;8)(p?q),t(5;17)(q;q),del(9p)(13)t(9;14)(q;q),t(9;14)(q;q),t(16;17)(q;q),sideline with:-2,-5,-15,del11(q;q)			13,33,15,4
		Kazumi	p M2	-9,-13,-16,t(8;21)(q;q),t(9;?)p(22;?)t(?)p(22;?)t(?)9;15)(p;q)			13,33,34,15,4
		Mutz-3	p M4	t(1;3)(q;q),inv(3)(q;q),t(2;7)(q;q),inv(7)(p;q),t(12;22)(p;q)			13,34,15,65,68
		Mutz 1	pRAEB	-X, add(1p), t(2;?11)(qq),t(3;5)(q;q),t(5;22)(q;q),del(3p),del(3q),del(5q),t(3;6)(p;p),t(7;11)(q;q),t(1;8)(q;q),add(9q),del(9p),add(14p):t(5;15)(p;p),t(7;16)(q;q),add(18p),add(21p)			Dr,56,19

Dabei hatten 35 AML Patienten eine undifferenzierte Leukämie (M0: n=14, M1: n=21), 31 eine unreife granulozytäre Leukämie (M2: n=29, M3: n=2), 29 eine monozytäre Leukämie (M4: n=13, M4eo: n=5, M5: n=14) und 2 eine Erythroleukämie (M6). In 2 AML-Fällen konnte kein FAB-Typ bestimmt werden. Bei 71 AML Patienten konnte eine pAML, bei 24 eine sAML festgestellt werden. Das mittlere Erkrankungsalter der AML Patienten betrug 56 Jahre, das Verhältnis Männer zu Frauen 1:1. Von den 55 MDS Patienten wurden 8 Patienten dem FAB-Typ RA, 2 dem FAB-Typ RAS, 22 dem FAB-Typ RAEB, 17 dem FAB-Typ RAEB-t und 2 dem FAB-Typ CMML zugeordnet. Bei den restli-

chen MDS Patienten war kein FAB-Typ verfügbar. Das Durchschnittsalter der MDS Patienten lag bei 65 Jahren, das Geschlechterverhältnis betrug 1:1.

### 3.2. Verarbeitung des Zellmaterials

Das Knochenmark wurde nach Aufklärung der Patienten durch Punktion des hinteren Beckenkammes gewonnen. Die Blutabnahmen erfolgten durch einfache Punktion einer peripheren Vene. Die Aufarbeitung des Zellmaterials erfolgte dann in unserem Labor. Als Kontrolle wurden auch Knochenmarks (KM)- bzw. Blutproben (PB) von gesunden Spendern verwendet. Die Antikoagulation der Proben erfolgte mit Heparin oder EDTA. Zur morphologischen und zytochemischen Beurteilung wurden KM- bzw. PB-Ausstriche angefertigt (siehe 3.3.). Für zytogenetische Untersuchungen wurden heparinisierte Voll-KM/PB-Proben angesetzt (siehe 3.4.). Zur Erstellung der übrigen Befunde wurden frisch separierte mononukleäre Zellen (MNC) verwendet, die über Dichtegradzentrifugation (Ficoll-Hypaque, Biochrom) gewonnen (Böyum A, 1984), danach gewaschen und in PBS suspendiert wurden (Biochrom). Dadurch wurden ausdifferenzierte Zellen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten oder Megakaryozyten abgetrennt und gesunde bzw. leukämische hämopoetische Vorläuferzellen, sowie Lymphozyten und Monozyten nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer weiter untersucht.

In einigen Parallelansätzen wurden aus den MNC zuvor B- und T-Zellen herausgefiltert. Dazu wurden die B- und T-Zellen mit magnetischen CD3- oder CD19-Antikörpern markiert und danach mit Hilfe des immunmagnetischen Zellsortiersystems von Miltenyi (MACS, Biotec) isoliert. Positiv-selektionierte CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden für gemischte Lymphozytenreaktionen (MLR) verwendet (siehe 3.10.), die Negativfraktion als `MNC(-)`-Fraktion weiterverwendet.

Bereits separierte MNC, die nicht am selben Tag weiterverarbeitet werden konnten, wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Für Fragestellungen dieser Arbeit wurden zum Teil MNC verarbeitet, die nach Kryokonservierung in flüssigen Stickstoff bei -196 °C aufgetaut worden waren (Fliedner TM, 1977).

Für den Methodenvergleich wurde bei einigen kryokonservierten MNC als Parallelansatz die sogenannte Adhärenzmethode angewendet. Dazu wurden die MNC in Plastik-Well-Platten ausgesät und für zwei Stunden inkubiert. In dieser Zeit setzt sich eine adhärenz, monozytenhaltige Zellfraktion, von einer nicht-adhärenz Zellfraktion ab. Die Plastik-adhärenz Zellen wurden als weitere DC-Quelle verwendet, während die nicht-adhärenz Zellen verworfen wurden.

### 3.3. Morphologische und zytochemische Untersuchungsmethoden

Die KM- und PB-Ausstriche wurden nach der panoptischen Methode von Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt und morphologisch entsprechend den FAB-Kriterien beurteilt (siehe Tabelle 1 und 4). Ebenso wurde der Anteil der Blasten zu allen MNC im Ausstrich beurteilt (=morphologisch bestimmter Blastenanteil). Zur genaueren Differenzierung wurden die KM- und PB-Ausstriche zusätzlich zytochemisch mit Myeloperoxidase, Sudanschwarz, alpha-Naphthylacetat-Esterase, Naphthol-ASD-Chloracetat-Esterase und PAS (Periodic Schiff-Säure) gefärbt.

### 3.4. Zytogenetische Untersuchungsmethoden

Die Präparation der Chromosomen zum Auffinden von numerischen oder strukturellen Aberrationen erfolgte an unstimuliertem Knochenmarksaspirat oder an peripherem Blut nach eintägiger Kultivierung der Zellen und Arretierung des Zellzyklus in der Metaphase durch das Spindelgift Colchicin. Durch Giemsa-Färbung wurden bestimmte Abschnitte der Chromosomen unterschiedlich stark angefärbt, so dass anhand dieser spezifischen Bandenmusterung neben der Größe der Chromosomen auch eine Sortierung nach ihrem Färbeverhalten und somit auch die Bestimmung des Karyotyps vorgenommen werden konnte (Schoch C, 1997). Durch Erstellung solcher Karyogramme konnten fehlende oder zusätzliche Chromosomen sowie Chromosomenumlagerungen dargestellt und chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden (Schmetzer H, 1997).

Nach der auf den Richtlinien des Internationalen Systems für menschliche, zytogenetische Nomenklatur basierenden Analyse der 100 AML und 55 MDS Patienten (Mitelman F, 1995), wurden die Patienten in zytogenetische Risikogruppen eingeteilt (Mrozek K, 1997; Greenberg P, 1997; Haferlach T, 2003): AML Patienten mit einem t(8;21)-, t(15;17)-, inv(16)- oder t(16;16)-Karyotyp wurden der günstigen Risikogruppe, AML Patienten mit einem -5/5q-, -7/7q-, t(11q23)-, inv(3)-, t(3;3), 17p- oder einem komplexen aberranten Karyotyp ( 3 zytogenetische Aberrationen) der ungünstigen Risikogruppe und AML Patienten mit einem normalem Karyotyp oder einer der restlichen Aberrationen der intermediären Risikogruppe zugeordnet. MDS Patienten mit günstigem Risikoprofil präsentierten einen auf del(5q), del(20q) oder -Y beschränkten aberranten Karyotyp bzw. einen normalen Karyotyp, mit ungünstigem Risikoprofil eine -7/7q-Aberration oder einen komplexen aberranten Karyotyp und mit intermediärem Risikoprofil jegliche übrigen Aberrationen.

### 3.5. Generierung der Dendritischen Zellen (DC)

Die MNC bzw. `MNC(-)` wurden für 7 (gesunde Zellproben) – 14 Tage (AML- und MDS-Proben) auf 12-Well-Platten ausgesät und in Xvivo 15- (BioWhittaker, Europe) FCS-freiem Medium in einer Kon-

zentration von  $2.5 \times 10^6$  Zellen/ml inkubiert. Für den Kulturmedienvergleich wurden einige Zellproben parallel zu gleichen Bedingungen in CellGro (CellGenix) angesetzt. Dazu wurden jeweils 800 U/ml GM-CSF (Sandoz), 500 U/ml IL-4 (Cell Concepts) und 40ng/ml FL (FLT3-Ligand, PromoCell) und für die letzten zwei Tage 200 U/ml TNF $\alpha$  (Cell Concepts) gegeben.

Für den Methodenvergleich wurden in Parallelansätzen DC auch ohne die Zugabe von 40ng/ml FL generiert. Außerdem wurden die Zellen parallel sowohl mit 10%igem autologem Plasma als auch ohne 10%iges Plasma kultiviert. Ebenso wurden für den methodischen Vergleich die DC parallel für 7 und für 14 Tage angesetzt.

Für die serumfreie DC-Generierungsstudie wurden die DC in einem parallelen Experiment in 'MCM-Mimic'-Medium kultiviert, das 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (Cell Concepts), 1000 U/ml IL-6 (Cell Concepts), 200 U/ml TNF $\alpha$ , 1 $\mu$ g/ml PGE $_2$  (Pharmacia) und als Zusatz 40 ng/ml FL enthielt. Alle 4 – 7 Tage wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Zytokin-angereichertes Medium ersetzt. Nach 7 – 14 Tagen wurden die DC für weitere Experimente geerntet.

### 3.6. Immunzytologische Untersuchungsmethoden (Durchflusszytometrie)

Unter Berücksichtigung des initialen diagnostizierten Befundes und unter Berücksichtigung des Blastenphänotypes wurde ein Ausgangsbefund in unserem Labor erstellt, der erlaubte, die Blastenmengen sowie die Anteile an B-, T-, NK-Zellen und Monozyten in der uns zugesandten Probe zu quantifizieren (Rothe G, 1996).

Bei MDS-Proben wurde zudem regelmäßig die Anzahl der CD34 $^+$ -positiven Zellen im PB bzw. KM bestimmt, um die Menge an undifferenzierten Zellen/ Blasten zu bestimmen (Campana D, 2000; Maynadie M, 2002; Stetler-Stevenson M, 2001). Die generierten DC wurden nach dem Ernten quantifiziert und charakterisiert (siehe 3.9.)

Zur Immunphänotypisierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe direkt Fluorochrommarkierter monoklonaler Maus-Antikörper (moAbs) des IgG-1- oder IgG-2-Subtyps untersucht. Um Unterschiede in der Antigenerkennung zu vermeiden wurde bei allen Analysen derselbe Antikörperklon mit demselben konjugierten Fluorochrom verwendet. Bei der Auswahl des Farbstoffs wurden Antigene, die in der Regel nur schwach auf der Zelloberfläche der untersuchten Zellen exprimiert werden, mit dem stark fluoreszierenden Fluorochrom Phycoerythrin (PE) oder dem etwas weniger stark fluoreszierendem Cy5-PE-Tandem-Konjugat (PC5) untersucht. Dagegen wurden eher hoch exprimierte Antigene mit Antikörpern untersucht, die mit dem etwas schwächer fluoreszierenden Fluorochrom Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugiert waren (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Verteilung und Funktion aller Fluorochrom-markierter Oberflächenantigene. BC Beckman Coulter. Ser Serotec. BD Becton Dickinson. FITC Fluoreszeinisothiocyanat. PE Phycoerythrin. PC5 PE-Cy5-Tandem-Konjugat. Phar Pharmingen. \* Fluorochrom-markierte Antikörper, die beim Methodenvergleich nicht verwendet wurden.

CD	Andere Namen	Hauptfunktion	Hauptverteilung	Vertrieb	Farbstoff
CD1a		Antigenpräsentation	Kortikale T-cells, DC	BC	PE
CD3	T3	T-Zell-Aktivierung, Signaltransduktion	T-Zellen	BC	FITC, PE, PC5
CD14	LPS-R	LPS-Rezeptor (GPI-verbunden)	Monozyten	BC	PC5, FITC
CD15	Lewis X	Beteiligt an der Adhäsion von Neutrophilen und an Phagozytose	Granulozyten	BC	PC5, PE
CD19	B4	B-Zell-Antwort	B-Zellen	BC	PE
CD28	CD86/86-ligand	T-Zell-kostimulatorisches Signal	T-Zell-Untereinheit	BC	FITC
CD33		AML-Diagnose	Pan-myeloider Marker	BC	FITC, PE, PC5
CD34		Stromaadhäsion, DC-Differenzierung	Hämatopoetische Vorläuferzellen	BC	FITC, PC5
CD40		TNF-R-Protein, beteiligt an der B-Zell-Differenzierung	B-Zellen, DC, Monozyten	BC	PE, FITC, PC5
CD56	N-CAM	Homophile Adhäsion	NK-Zellen, aktivierte T-Zellen	BC	PE
CD71	T9, Transferrin-Rezeptor	Kontrolliert die Eisenaufnahme während der Proliferation		PC	PE
CD80	B7.1	Nicht-spezifisches kostimulatorisches Antigen für T-Zellen	B-Zellen, DC	Ser	PC5
CD83	HB15	Antigenpräsentation	Differenzierte DC	BC	PC5, FITC, PE
CD86	B7.2	Nicht-spezifisches kostimulatorisches Antigen für T-Zellen	Aktivierte B-Zellen, Monozyten, DC	Ser	PE
CD117	SCRF, c-kit	Rezeptor für den Stammzellrezeptor	Hämatopoetische Vorläuferzellen	BC	PC5
CD135	FLT3	Tyrosinkinase-Rezeptor	Frühe, lymphatisch festgelegte Vorläuferzellen	BC	PE
CD137	4-1BB	TNF-R-Familie, Kostimulation der T-Zell-Aktivierung	T-Zellen	BD	PE
CD137L*	4-1BBL	Rezeptor für CD137 (4-1BB), kostimulatorisches Signal für T-Zellen	DC, B-Zellen, Monozyten	Biozol Phar	FITC PE
CD152	CTLA-4	Niederregulierung der T-Zell-Aktivierung, Ligand für CD80, CD86	Aktivierte T-Zellen	BC	PE
CD154	CD40L TRAP-1	Kostimulatorisches Molekül, Hauptpartner der B-Zell-Hilfe bei der T-Zell-Aktivierung	Aktivierte T-Zellen	BD	FITC
CD197*	CCR7, EBI1, BLR2	Homing von Lymphozyten und DC in Lymphknoten	T-, B-, NK-Zellen, DC, Monozyten, Makrophagen	R&D	PE
CD209*	DC Sign	Regulierung der T-Zell-Proliferation	DC	R&D	FITC
HLA-Dr	MHC Klasse II	Antigenpräsentation	B-Zellen, aktivierte T-Zellen, DC	BC	FITC, PC5

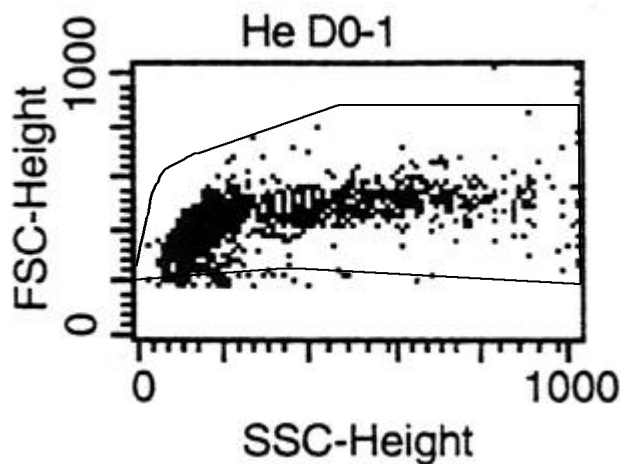
7.1	NG2-Antigen	Oberflächenantigen der 11q23-Aberration	Zellen mit Aberration	11q23- BC	PE
-----	-------------	--	--------------------------	-----------	----

Vor der Durchflusszytometrie wurden die MNC oder die kultivierten Zellen nach den Vorschriften des Herstellers in PBS mit 10% FCS (Biochrom) suspendiert und mit den mononukleären Antikörpern inkubiert. In der Isotypkontrolle, die regelmäßig durchgeführt wurde, wurden <3% positive Zellen toleriert. Mindestens 5000 Events/ Ereignisse wurden an einem Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (BD, FACS Calibur) ausgewertet. Die durchflusszytometrische Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest (BD). Die Leukämiepopulation zeigte entsprechend ihrer zellulären Charakteristika (Zellgröße, Granularität) in der Dot-Plot-Darstellungsform 'Vorwärtsstreuung' (y-Achse) gegen Seitwärtsstreuung (x-Achse) ein typisches Scatterbild, über das ein Auswertefenster gelegt wurde. Für die Analyse der DC und leukämischen Zellen wurde das Auswertefenster über die gesamte MNC-/DC-Fraktion gelegt (Bild 4). Für T-Zell-Analysen wurde ein 'Lymphozyten-Gate' geschaffen, das Lymphozyten und aktivierte Lymphozyten mit einschloss (Bild 5).

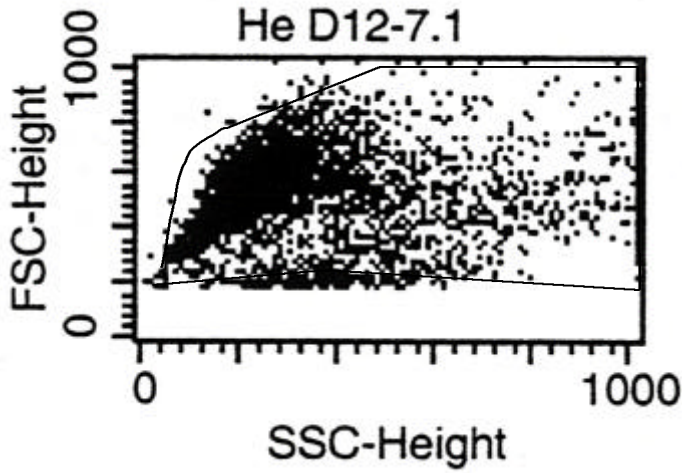
**Bild 4:** 'MNC-/DC-Gate' bei einem Patienten mit AML.

FSC Vorwärts-Scatter. SSC Seitwärts-Scatter. He Abkürzung des Patientennamens.

MNC(d0):

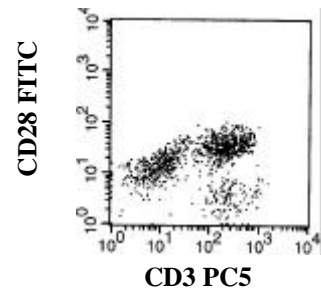
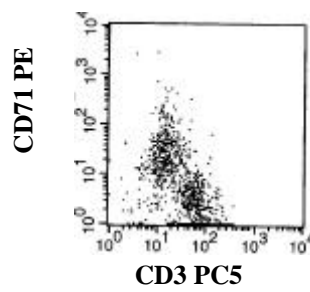
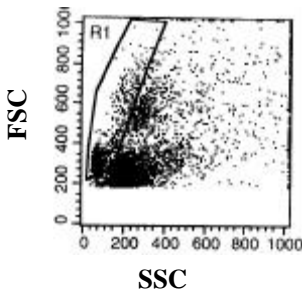


DC(d14):

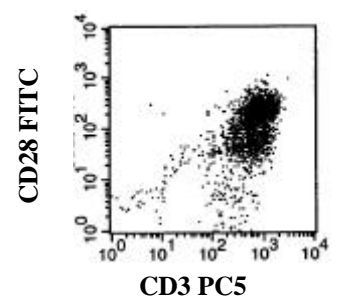
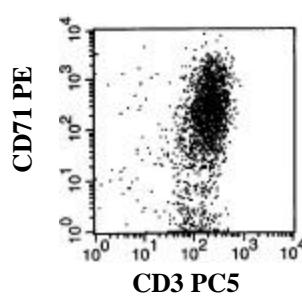
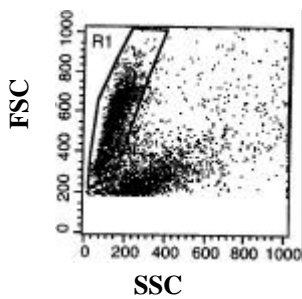


**Bild 5:** 'Lymphozyten-Gate' um DC-induzierte autologe T-Zellen bei einer AML-M5. FSC Vorwärts-Scatter. SSC Seitwärts-Scatter. PE Phycoerythin. FITC Fluoreszeinisothiocyanat. PC5 Cy-5-Phycoerythin-Tandem-Konjugat. MLR gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction).

MLR(d0): autologe T-Zellen + DC



MLR(d5): autologe T-Zellen + DC



### 3.7. Vitalitäts-Nachweis der DC

Vitalitätsanalysen wurden in unserem Labor angefertigt. Dabei wurden die apoptotischen Zellen nach einer bewährten Methode, der Annexin V-Durchflusszytometrie, sichtbar gemacht (Merchant SH, 2001; Pepper C, 1998; Van Engeland M, 1998). Um die Anzahl der vitalen Zellen oder vitalen DC nach der Kultivierungs-Prozedur zu berechnen, wurden die MNC oder DC gated und die vitalen (Annexin-PI) Zellen im Gate quantifiziert (Koehler T, 2000). Der Vitalitäts-Test wurde gemäß den Herstelleranordnungen durchgeführt (BioVision, BioCat). Demnach wurden  $1-3 \times 10^5$  Zellen in 300  $\mu$ l Bindungspuffer für 5 min mit 3  $\mu$ l Annexin V-FITC und 3  $\mu$ l PI im Dunkeln inkubiert. Ohne die Zellen vorher zu waschen, wurden die Zellen in einem Durchflusszytometer der Firma BD (FACS Calibur) mit dem Programm CellQuest (BD) ausgewertet.

### 3.8. Durchführung der simultanen, immunphänotypischen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH-IPA)

Alle FISH-IPA-Analysen wurden von mir gemeinsam mit Mitarbeitern von Herrn Dr. Zitzelsberger im Labor für Humangenetik in der GSF Neuherberg durchgeführt und ausgewertet.

AML- und MDS-Proben, von denen bekannt war, dass sie numerische, zytogenetische Aberrationen präsentierten, wurden zur immunphänotypischen FISH-Analyse (FISH-IPA) herangezogen. Dazu wurden MNC- und DC-Proben auf Objektträger zentrifugiert, luftgetrocknet und eingefroren. Nach 10minütiger Fixierung der Objektträger in Aceton wurde eine Oberflächenantigen-Markierung der Zellen mittels FITC- oder PE-konjugierten DC-Antikörpern (CD1a) durchgeführt (Hessel H, 1996). Auf eine 30minütige Inkubationszeit in einer feuchten Kammer folgte nach Herstellerangaben eine weitere Fixierung der Objektträger in 3% BSA (3 min), in Methanol-Eisessig (Verhältnis 3:1, 20 min tiefkalt) und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iger Alkohol gefrierschrankkalt, 90%iger Alkohol kühl-schrankkalt, 100%iger Alkohol kühl-schrankkalt, je 2 min).

Die Detektion der chromosomalen Aberrationen wurde mit Zentromer-spezifischen Sonden für die Chromosomen 7, 8 (Oncor), 9 oder 21 (Abbot/Vysis) durchgeführt. Vor der Hybridisierung mussten die Objektträger in 70% FA (Formaldehyd) 2xSSC bei 72 °C für 1,5 min und die Sonde nach einer Vorbehandlung gemäß Herstellerangaben bei 70 °C für 5 min denaturiert werden. Die Hybridisierung fand schließlich über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C statt.

Die Sondendetektion wurde am nächsten Tag - nach einer abermaligen Denaturierung in 50% FA 2xSSC bei 43 °C für 5 min und in 50% FA 2xSSC bei 37 °C für 8 min, nach Blocken der Reaktion mit PNM und einer anschließenden 20minütigen Inkubationszeit - mit Cy3-konjugiertem Streptavidin und

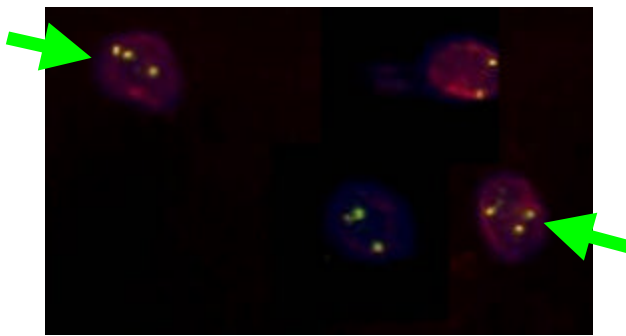


AMCA-konjugierten Antikörpern durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern mit DAPI gegengefärbt und die Objektträger mit Vectashield eingedeckelt.

Die Analyse der hybridisierten Objektträger erfolgte mit einem Zeiss-Mikroskop und einer CCD-Kamera, die mit einer Software für Image-Analysen (MetaSystems) ausgestattet war. DC, die den klonalen, chromosomalen Marker trugen, konnten so von  $CD1a^+$ -DC ohne klonalen Marker und von klonalen, zytogenetisch-aberranten Zellen, die keine DC-Antigene exprimierten, differenziert werden (Bild 6).

**Bild 6:** Beweis des leukämischen Ursprungs von DC bei Zellen eines MDS-RAEB-Falles durch FISH-IPA: Detektion einer Trisomie 8 bei  $CD1a^+$ -DC.

Die grünen Pfeile zeigen auf zwei DC leukämischen Ursprungs (DC-Oberflächenantigenfärbung bei gleichzeitig bestehender chromosomaler Aberration), die Zelle oben rechts ist eine normale DC (DC-Oberflächenantigenfärbung ohne chromosomale Aberration), die Zelle unten mittig eine leukämische Zelle (fehlende DC-Oberflächenantigenfärbung bei chromosomaler Aberration).

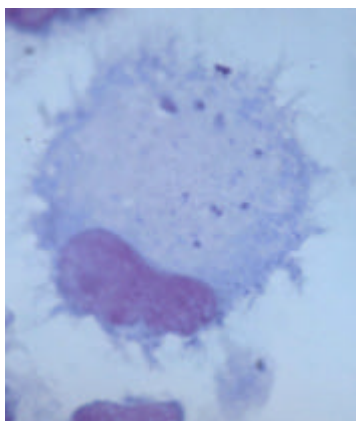


### 3.9. Quantifizierung und Charakterisierung der DC

Sämtliche folgend beschriebenen immunzytologischen Analysen und Auswertungen wurden in unserem Labor durchgeführt.

Nach dem Ernten der DC wurden zuerst sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl der DC gemessen. Dabei wurden große Zellen irregulärer Morphologie mit zytoplasmatischen Projektionen als DC angesehen (Bild 7).

**Bild 7:** Dendritische Zelle, generiert aus einer PB-MNC-Probe, bei einer AML-M4 zeigt eine charakteristische Morphologie mit irregulärer Form und zytoplasmatischen Projektionen.

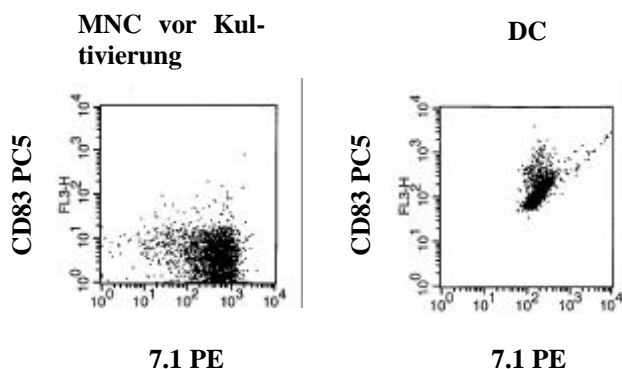


Giemsa stain, x800

Mittels Durchflusszytometrie wurden in einem `Gate`, das die gesamte MNC-/DC-Fraktion einschloss, Zellen, die ein typisches Scatter-Bild dendritischer Zellen zeigten und die typischen DC-Antigene exprimierten (CD86, CD80, CD40, CD1a, CD83) quantifiziert (Tabelle 12, Bild 4). Dabei galten Zellen mit der höchsten Expression dieser Marker als DC. DC, die CD83 coexprimierten wurden als reife DC eingestuft. Ein anderes Reifungskriterium in späteren Auswertungen war auch CD209-Positivität. In AML-Fällen mit einer immunphänotypisch detektierbaren Blastenpopulation in der MNC-Fraktion wurde die Anzahl der Blasten, die zu DC umgewandelt werden konnten, anhand der Coexpression spezifischer, aberranter Blastenantigene (z.B. 7.1, CD56, CD117) festgestellt (Bild 8) (Kufner S, 2005 (I,II und III)).

In Fällen ohne verfügbare spezifische Blastenantigen-Kombination, aber mit weniger als 5% CD14<sup>+</sup>-Zellen in der MNC-Fraktion, wurden CD33 oder CD13-Antikörper verwendet, um den Prozentsatz an Blasten zu schätzen, die in leukämische DC (DC<sub>leu</sub>) umgewandelt wurden. In MDS-Fällen mit weniger als 10% Blasten wurden CD34<sup>+</sup>- oder CD117<sup>+</sup>-Zellen verwendet, um den Anteil der Zellen, die zu DC<sub>leu</sub> umgewandelt wurden, und zu evaluieren. Zusätzlich wurden DC von AML und MDS Patienten, bei denen eine klonale Chromosomenaberration bei Diagnosestellung bekannt war, und die nach der DC-Generierung wiederum detektierbar war, als klonale/leukämische DC definiert ( siehe Bild 6).

**Bild 8:** Beweis des leukämischen Ursprungs von DC in einer AML-M5 durch Immunphänotypisierung: Coexpression des Blastenantigens 7.1 auf DC.



### 3.10. Anfertigen der gemischten Lymphozyten-Kulturen (MLR) und Nachweis der T-Zell-Aktivierung durch leukämische DC

Positiv selektionierte CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (Milteney Biotech, 1x10<sup>6</sup> Zellen/Well) von AML- und MDS-MNC wurden zusammen mit autologen, leukämischen DC (1x10<sup>5</sup>) in 1ml RPMI 1640 Medium (Biochrom), das 10% FCS enthielt, kultiviert. Nach 5 Kulturtagen wurde die T-Zellaktivierung hinsichtlich der Expression DC-relevanter Kontaktantigene durchflusszytometrisch bestimmt. Durch Vergleichen

der Expression von DC-Liganden (z.B. CD28, CD137, CD154) auf den T-Zellen vor und nach dem DC-Kontakt, und durch Evaluierung der Proliferationsaktivität der T-Zellen wurde die Fähigkeit der leukämischen DC zur T-Zell-Aktivierung schließlich bestimmt. Die T-Zell-Proliferation wurde errechnet, indem man die Koexpression von CD71 oder CD28 auf den T-Zellen vor und nach dem DC-Kontakt quantifizierte (Nguyen XD, 2003) (siehe Bild 5).

### **3.11. Durchführung des Zytotox-Assays (Fluorolyse)**

Für den Zytotox-Assay wurden zuerst positiv selektionierte CD3<sup>+</sup>-T-Zellen ( $2 \times 10^6$ ) zusammen mit  $5 \times 10^4$  DC oder MNC in einer 24-Wellplatte in 2ml RMPI + 10% FCS, angereichert mit IL-7 (Tag 0-21) (10<sup>8</sup> U/ml; CellConcepts, Deutschland) und IL-2 (Tag 7-21) (23 U/ml; Proleukin R5, Chiron), kultiviert. Die Restimulierung der T-Zellen erfolgte mit  $5 \times 10^4$  DC oder MNC am 7. und am 14. Tag. Alle 3-4 Tage wurde zudem die Hälfte des Mediums ausgewechselt. 6 Tage nach der letzten Restimulierung wurden die DC- oder MNC-stimulierten T-Zellen (Effektorzellen, E) geerntet und zusammen mit aufgetauten autologen DC oder MNC (Zielzellen/target cells, T) in einem E/T-Verhältnis von 6:1 und 1:1 für 3 h bei 37 °C unter 5%igen CO<sub>2</sub> in 1,5 ml Eppendorf-Behältern kultiviert. Als Kontrolle wurden Ziel- und Effektorzellen ohne vorherige gemeinsame Kultivierung zusammen generiert. Die Zielzellen und die E/T-Zell-Suspension wurden dann für 15 min mit FITC- oder PE-konjugierten, Blasten-markierenden Antikörpern und mit 7-AAD (BD, Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) markiert, um die Anzahl vitaler (7-AAD<sup>-</sup>) Blasten zu bestimmen. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen und nochmals in einer FACS-Lösung suspendiert, die eine bestimmte Menge an Calibrate APC-markierten Beads (BD, Heidelberg, Deutschland) enthielt, um den Zellverlust nach 3stündiger Inkubationszeit zu quantifizieren. Die Zellen wurden schließlich durchflusszytometrisch analysiert. Die prozentuale Lyse wurde über die Differenz der Anzahl an vitalen Blasten vor und nach dem Kontakt mit den Effektorzellen bestimmt (Kienzle N, 2002).

### **3.12. Statistische Berechnungen**

Die statistischen Auswertungen dieser Arbeit wurden mit dem Programm Excel 97 (Microsoft) durchgeführt. Dabei wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane, Schwankungsbereiche sowie Gruppenvergleiche mit dem zweiseitigen T-Test bzw. Qui-Quadrat-Test ermittelt. Ein p-Wert < 0.05 galt als statistisch signifikant.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Charakterisierung des Ausgangsmaterials**

Um die Anzahl der Monozyten, Lymphozyten, B-Zellen, NK-Zellen und Blasten im Ausgangsmaterial und den Blastenphänotyp bei leukämischen Proben zu bestimmen, wurden vor der DC-Generierung durchflusszytometrisch die MNC sowohl von 100 AML und 55 MDS Patienten als auch von 38 gesunden Probanden (siehe Tabelle 11) analysiert. Im Durchschnitt fanden sich in den MNC-Fractionen der AML-Proben 11% B-Zellen, 9% T-Zellen, 14% Monozyten (5% in nicht-monozytär differenzierten Leukämien), und 59% leukämische Zellen. In MDS-Proben waren 6% B-Zellen, 15% T-Zellen, 9% NK-Zellen, 12% Monozyten und 6% CD34<sup>+</sup>-Zellen nachzuweisen. In MNC-Proben gesunder Probanden konnten durchschnittlich 10% B-Zellen und 39% T-Zellen gefunden werden.

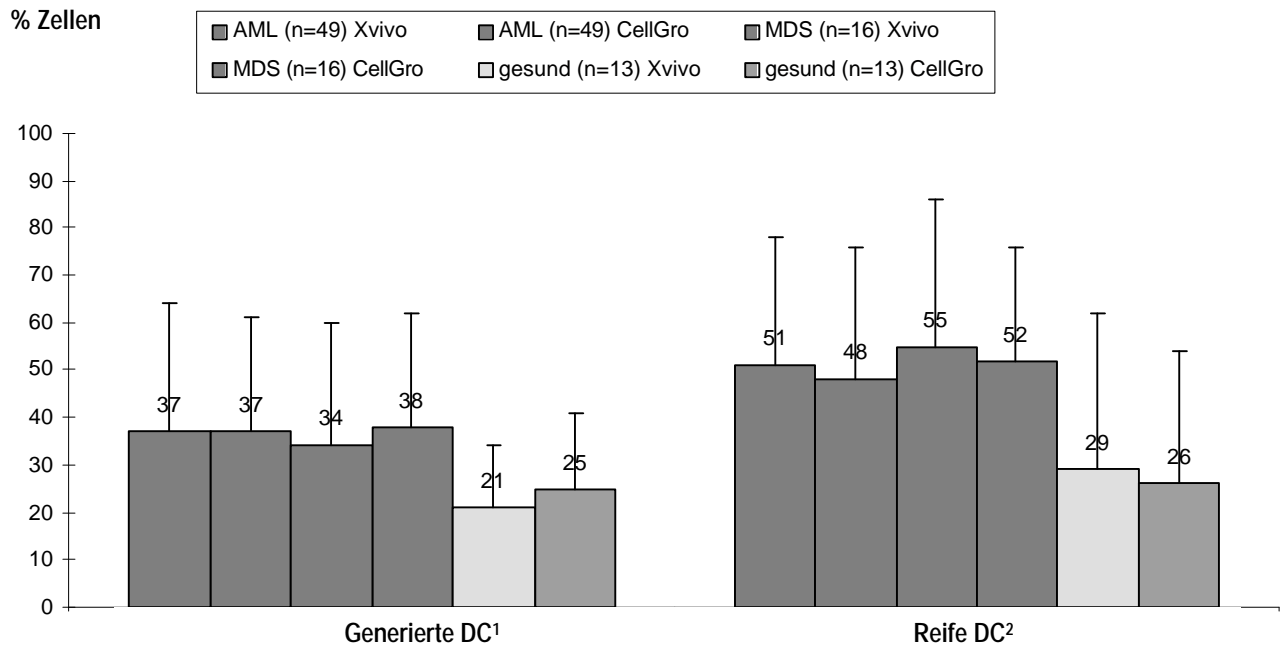
### **4.2. Methodenvergleich bei der DC-Generierung (Kufner S, 2005 (I und II))**

#### 4.2.1. Kulturmedien- und Kulturdauervergleich

##### 4.2.1.1. Die DC-Ausbeute in CellGro ist vergleichbar mit der Ausbeute in Xvivo

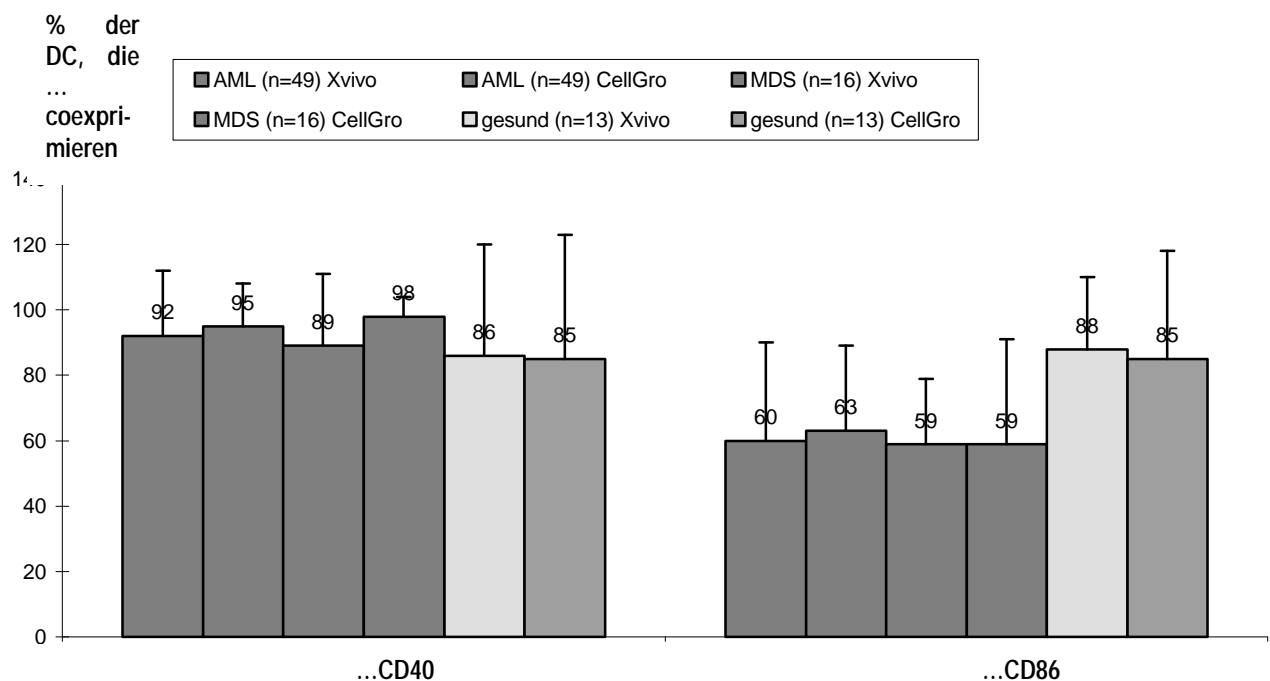
PB-MNC von 49 AML-, 16 MDS- und 13 gesunden PB-Proben wurden parallel unter serumfreien Bedingungen in Xvivo und CellGro kultiviert. Der immunphänotypisch bestimmbare Blastenanteil in den AML-MNC-Proben betrug durchschnittlich 56%, der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen in MDS-Proben 2%. Die DC-Ausbeute und Ernte reifer DC war in beiden Kontrollgruppen ähnlich (Bild 9).

**Bild 9:** Kulturmedienvergleich zwischen CellGro und Xvivo. <sup>1</sup>% nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>2</sup>DC mit Coexpression von CD83.

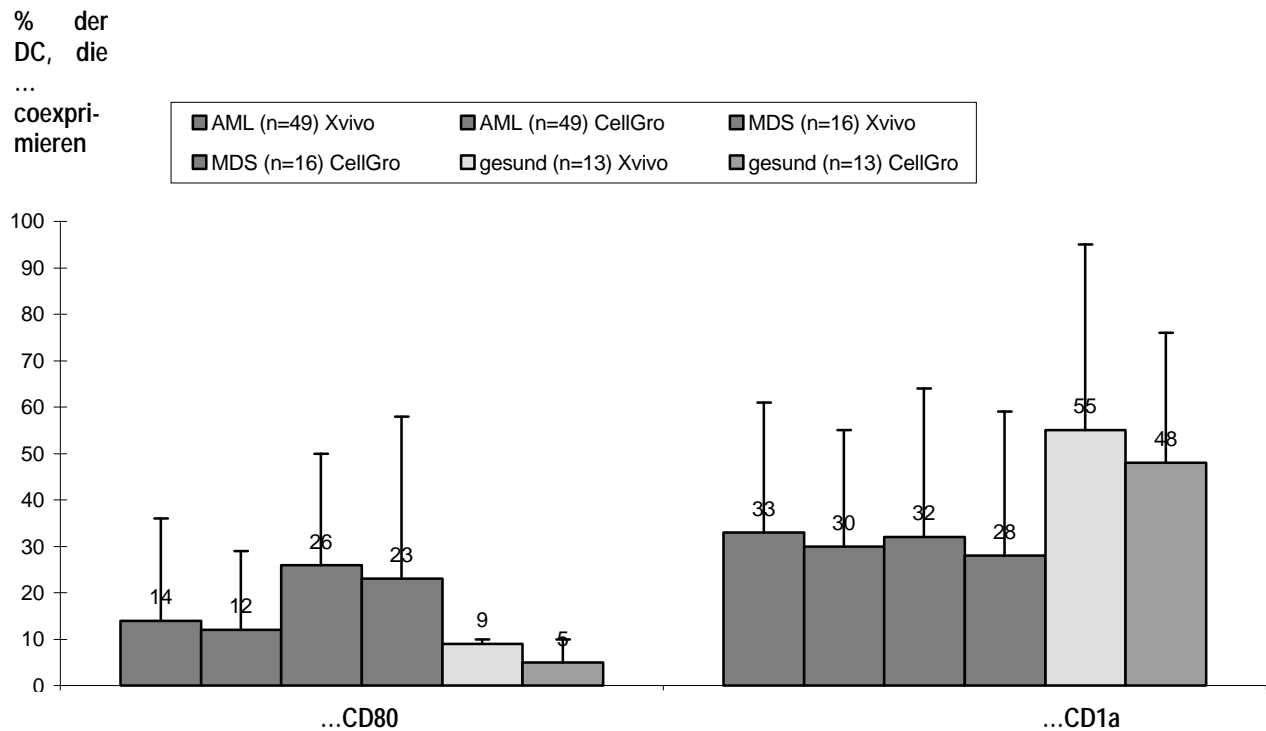


Auch die Coexpression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD86, CD80 und CD1a auf den DC unterschied sich hinsichtlich des verwendeten Mediums nicht (Bild 10 und 11). Wegen des niedrigeren Preises und der erlaubten Anwendbarkeit für klinische Versuche wurde Xvivo für weitere Versuche verwendet.

**Bild 10:** Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach 10-14tägiger Kultur (AML/MDS) oder 7tägiger Kultur (gesunde Probanden) in CellGro und Xvivo (Hinweis: CD40 am Tag 7 nicht gemessen, deshalb Wert von Tag 10-14).



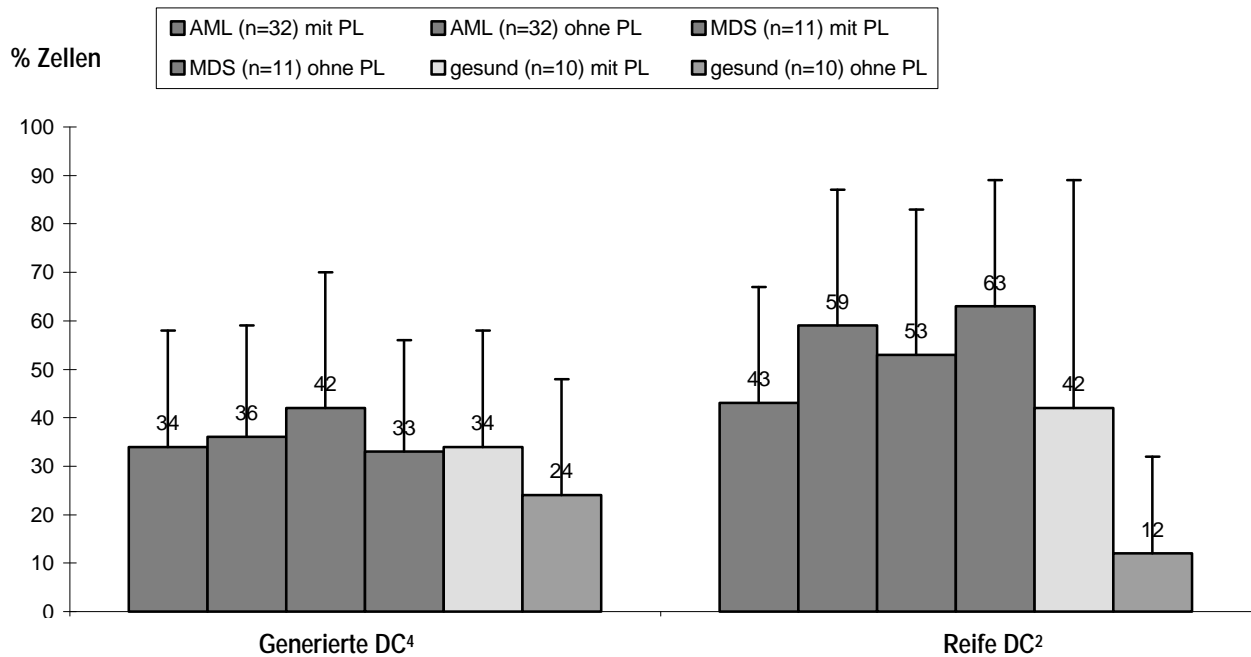
**Bild 11:** Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD1a nach 10-14tägiger Kultur (AML/MDS) oder 7tägiger Kultur (gesunde Probanden) in CellGro und Xvivo.



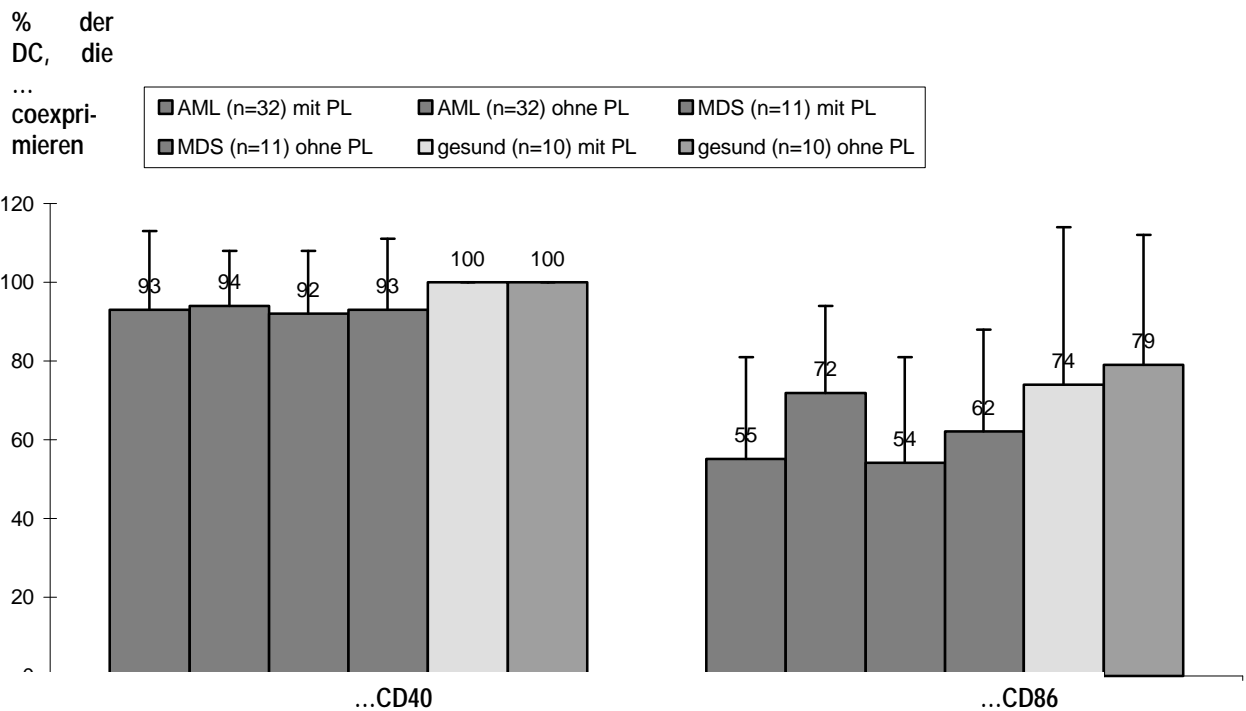
#### 4.2.1.2. Die Zugabe von 10%igem autologem Plasma verringert die DC-Ernte

Um zu wissen, ob die Zugabe von 10%igem autologem Plasma als Proteinquelle die DC-Ernte erhöht, wurden PB-MNC von 32 AML-, 11 MDS- und 10 gesunden Proben parallel mit und ohne autologem Plasma kultiviert (Bild 12). Der immunphänotypisch bestimmbare Blastenteil in den AML-MNC-Proben betrug durchschnittlich 71%, der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen in MDS-Proben 2%. Die Daten zeigen, dass die Zugabe von 10%igem autologem Plasma die DC-Ausbeute im Durchschnitt nicht erhöht. Eine detaillierte Analyse der Daten zeigte aber, dass in 17 von 32 AML-Fällen (53%), in 5 von 11 MDS-Fällen (46%) und bei 6 von 10 gesunden Proben (60%) nach der DC-Kultur eine Abnahme der relativen DC-Ernte von mindestens 10% in Anwesenheit von autologem Plasma beobachtet werden konnte. Die Coexpression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD86, CD80 und CD1a war in den beiden Kontrollgruppen nicht verschieden (Bild 13 und 14). Um allerdings hemmende Effekte im Kultursystem zu vermeiden, wurde entschieden, autologes Plasma nicht weiter für die DC-Generierung zu verwenden.

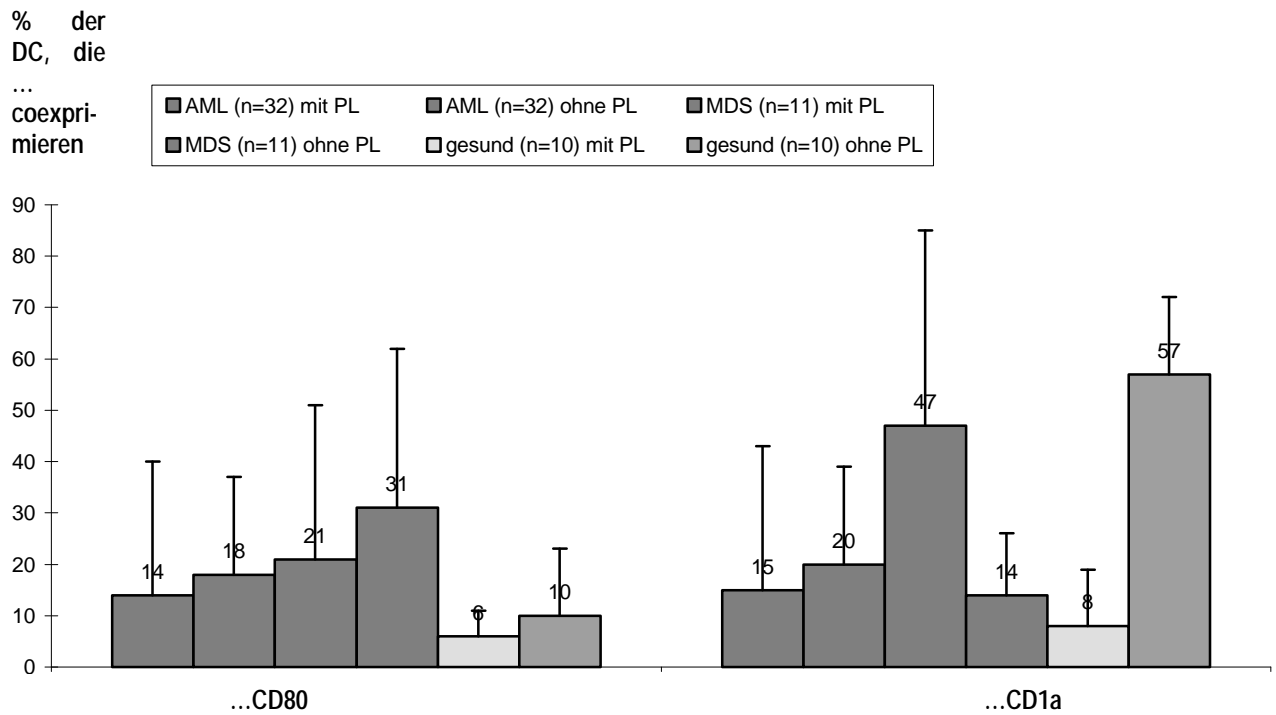
**Bild 12:** Kulturmediumvergleich mit und ohne autologem Plasma (PL). <sup>1</sup> % nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>2</sup> DC mit Coexpression von CD83.



**Bild 13:** Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach 10-14tägiger Kultur (AML/MDS) oder 7tägiger Kultur (gesunde Probanden) in Medium mit und ohne autologem Plasma (Hinweis: CD40 am Tag 7 nicht gemessen, deshalb Wert von Tag 10-14).



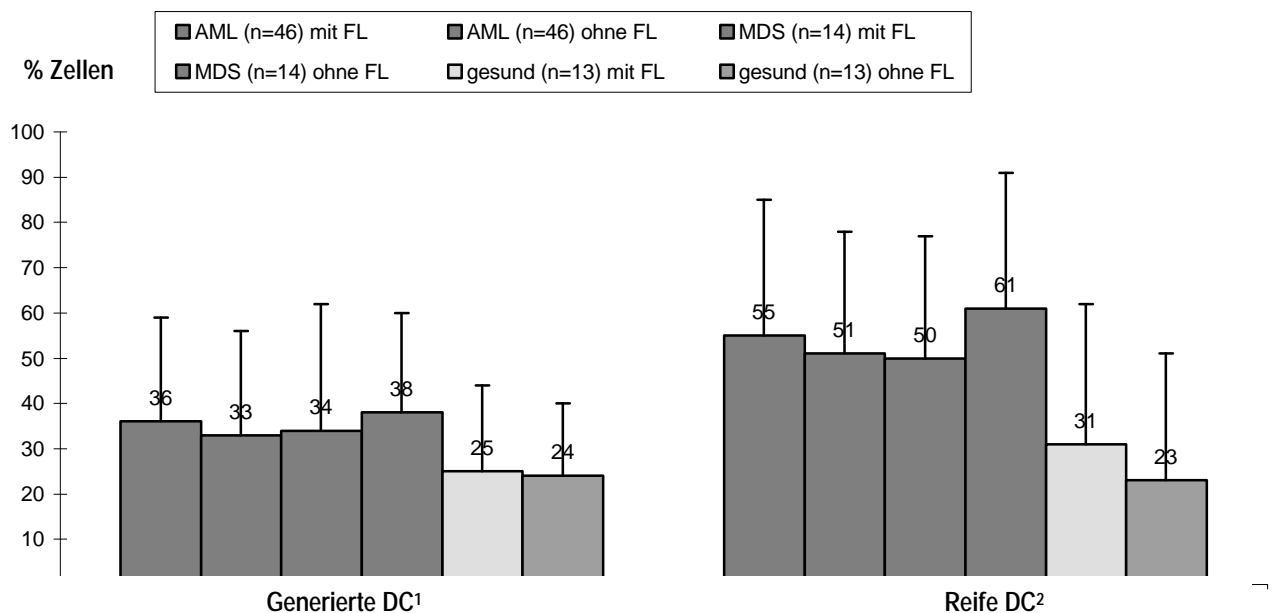
**Bild 14:** Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD1a nach 10-14tägiger Kultur (AML/MDS) oder 7tägiger Kultur (gesunde Probanden) in Medium mit und ohne autologem Plasma.



#### 4.2.1.3. Die Zugabe von FL steigert die DC-Ernte

Um den Einfluss von FL auf die DC-Ernte zu untersuchen, wurden 46 AML-, 14 MDS- sowie 13 gesunde Proben sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von FL kultiviert (Bild 15).

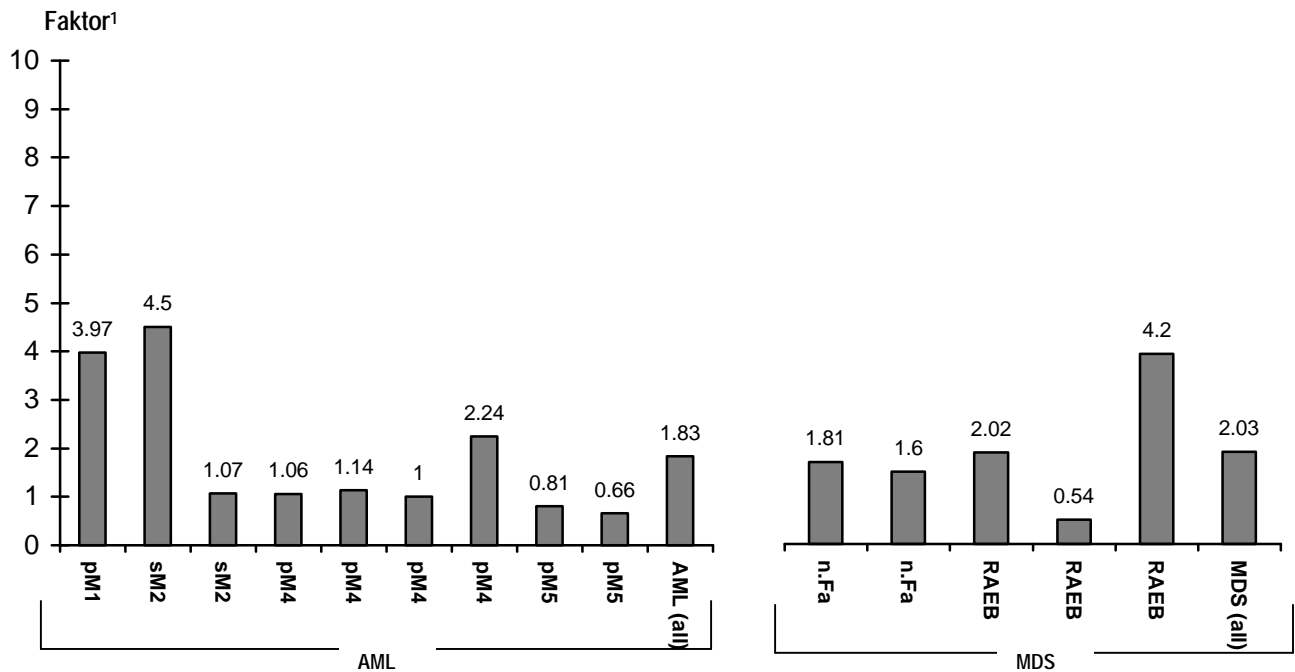
**Bild 15:** Die Zugabe von FL steigert nicht die prozentuale DC-Ernte. <sup>1</sup> % nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>2</sup> DC mit Coexpression von CD83.





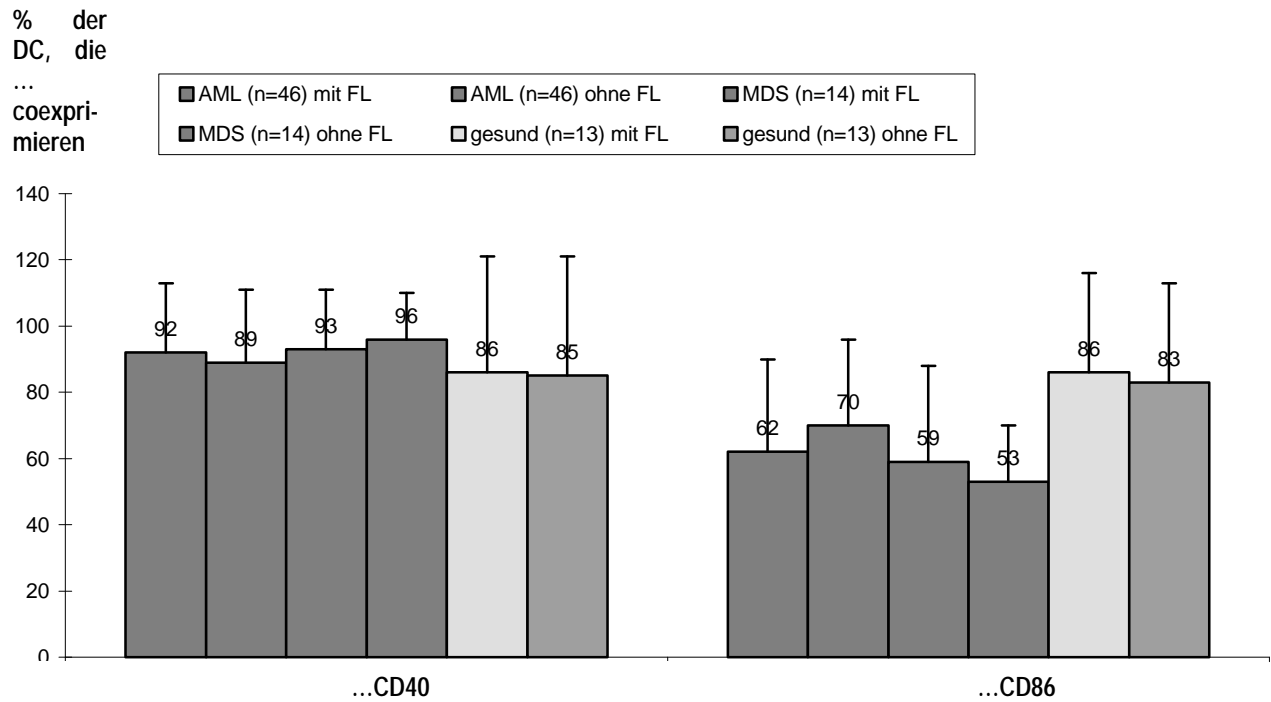
Der immunphänotypisch bestimmbare Blastenanteil in den AML-MNC-Proben betrug durchschnittlich 65%, der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen in MDS-Proben 4%. Die Daten zeigen, dass die Prozentzahlen an DC, die mit und ohne FL generiert wurden, ähnlich sind. Eine detaillierte Untersuchung der Daten zeigte allerdings, dass im Durchschnitt eine bis zu zweifache Steigerung der absoluten DC-Ausbeute zu finden war, wenn FL dem Kulturmedium zugegeben wurde (Bild 16).

**Bild 16:** Die Zugabe von FL steigert die absolute DC-Ausbeute. <sup>1</sup> Absolute Anzahl der DC nach der Generierung mit FL im Vergleich zur Anzahl der DC generiert ohne FL. n. Fa nicht FAB-klassifiziert.

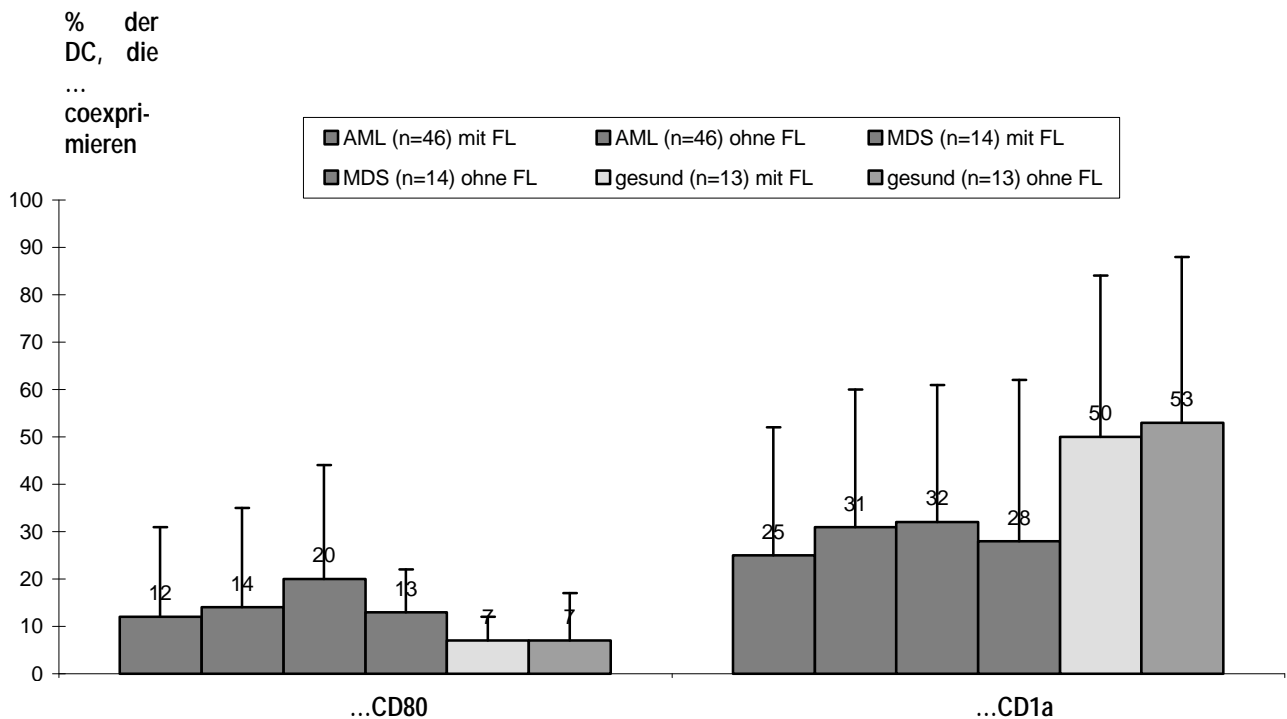


Die Coexpression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD86, CD80 und CD1a auf den reifen DC unterschied sich hinsichtlich der Verwendung von FL nicht (Bild 17 und 18). Deshalb wurde beschlossen, die DC unter Zugabe von FL zu generieren.

**Bild 17:** Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach 10-14tägiger (AML/MDS) und 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur in Medium mit und ohne FL (Hinweis: CD40 am Tag 7 nicht gemessen, deshalb Wert von Tag 10-14).



**Bild 18:** Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD1a nach 10-14tägiger (AML/MDS) und 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur in Medium mit und ohne FL.

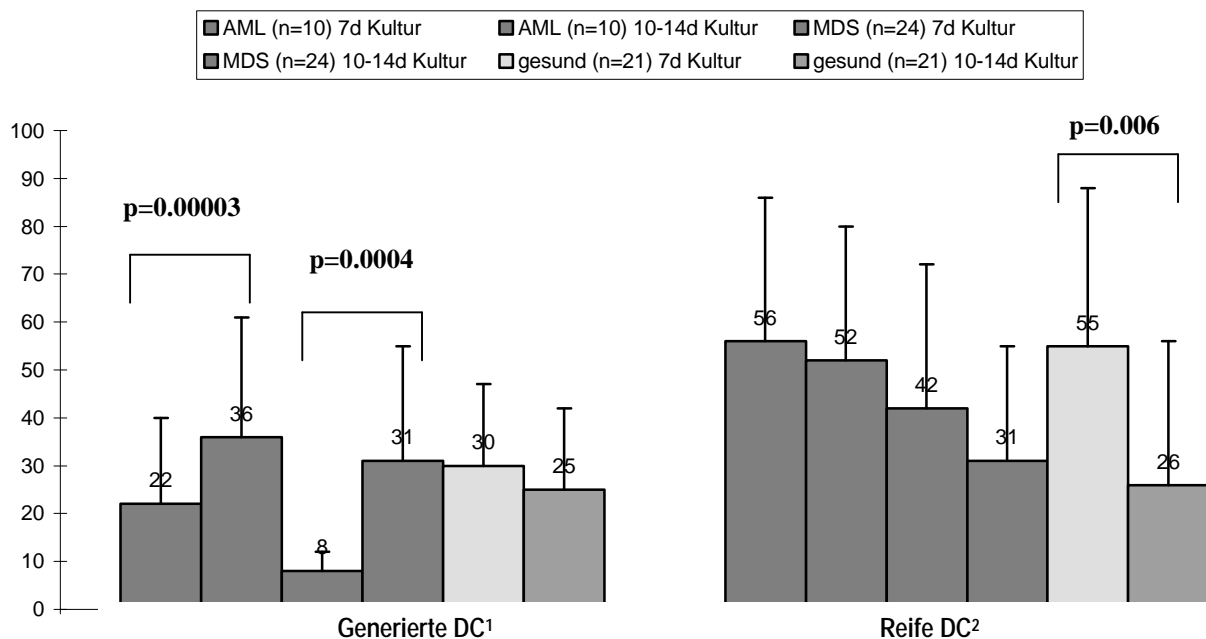


#### 4.2.1.4. Die DC-Ausbeute von leukämischen Proben erhöht sich nach einer 10-14tägigen Kultur in einem Medium mit GM-CSF, IL-4 und TNF $\alpha$

Die optimale Kulturzeit für die Generierung von DC von gesunden, AML- und MDS-Proben wurde insofern untersucht, als dass die Zellen für 6-8 Tage als auch für 10-14 Tage parallel in Xvivo oder CellGro unter unterschiedlichen Bedingungen generiert wurden (Bild 19). Immunphänotypisch war in den AML-MNC-Proben ein Blastenanteil von durchschnittlich 55%, in den MDS-Proben ein CD34<sup>+</sup>-Zellen-Anteil von durchschnittlich 2% nachzuweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass die DC-Zahlen am höchsten waren, wenn gesunde Proben für 6-8 Tage, MDS- und AML-Proben aber für 10-14 Tage kultiviert wurden (MDS: 31 vs. 8% DC,  $p=0.0004$ ; AML: 36 vs. 22%,  $p=0.00003$ ). Die Anzahl reifer DC war nach 7 oder 14tägiger Inkubationszeit bei AML- und MDS-Fällen vergleichbar, aber die von gesunden Proben signifikant höher nach 7tägiger Inkubationszeit.

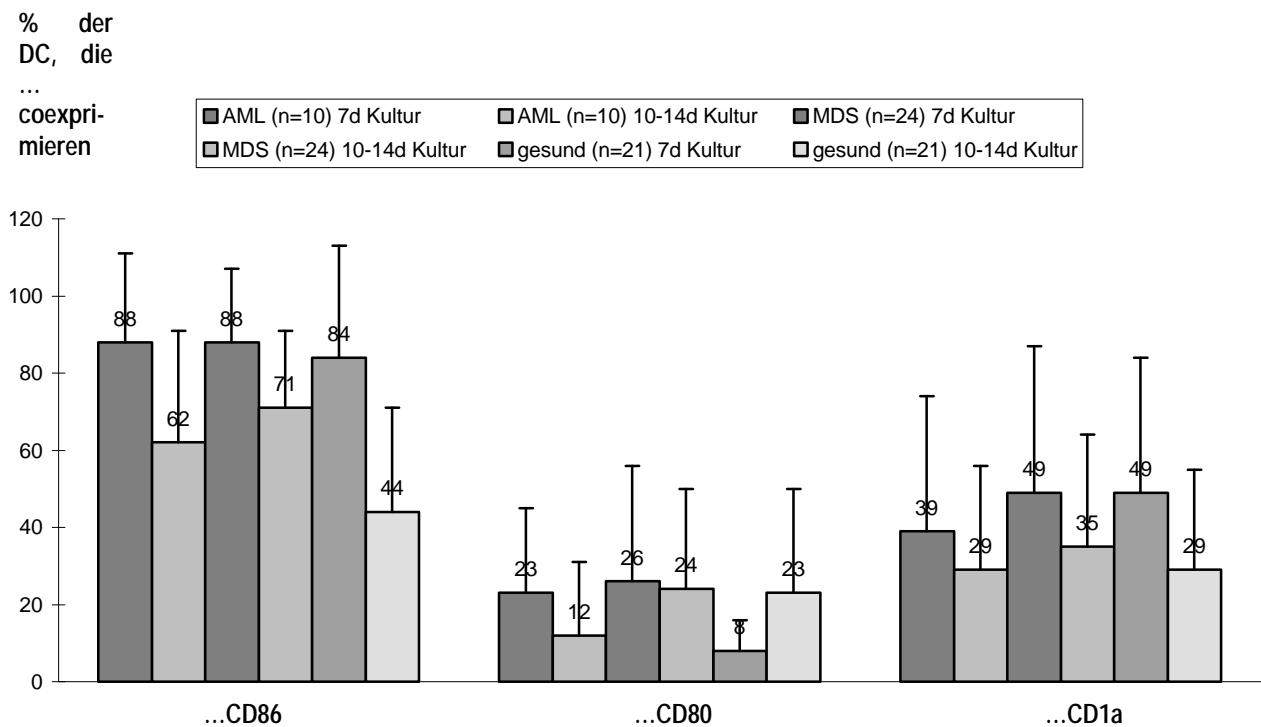
**Bild 19:** Kulturdauervergleich zwischen 6-8 Tagen und 10-14 Tagen. <sup>1</sup> % nach 7 oder 10-14tägiger Kulturzeit. <sup>2</sup> DC mit Coexpression von CD83.

% Zellen



Die Ernte an DC unterschied sich hinsichtlich der Coexpression kostimulatorischer Marker wie CD1a, CD86 und CD80 in den beiden Kontrollgruppen nicht (Hinweis: der kostimulatorische Marker CD40 wurde am Tag 7 nicht gemessen) (Bild 20). Deshalb wurde entschieden gesundes Zellmaterial für 6-8 Tage, dagegen leukämisches Zellmaterial für 10-14 Tage zu kultivieren.

**Bild 20:** Die Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD86, CD80 und CD1a nach 6-8 Tagen und 10-14 Tagen DC-Generierungszeit.

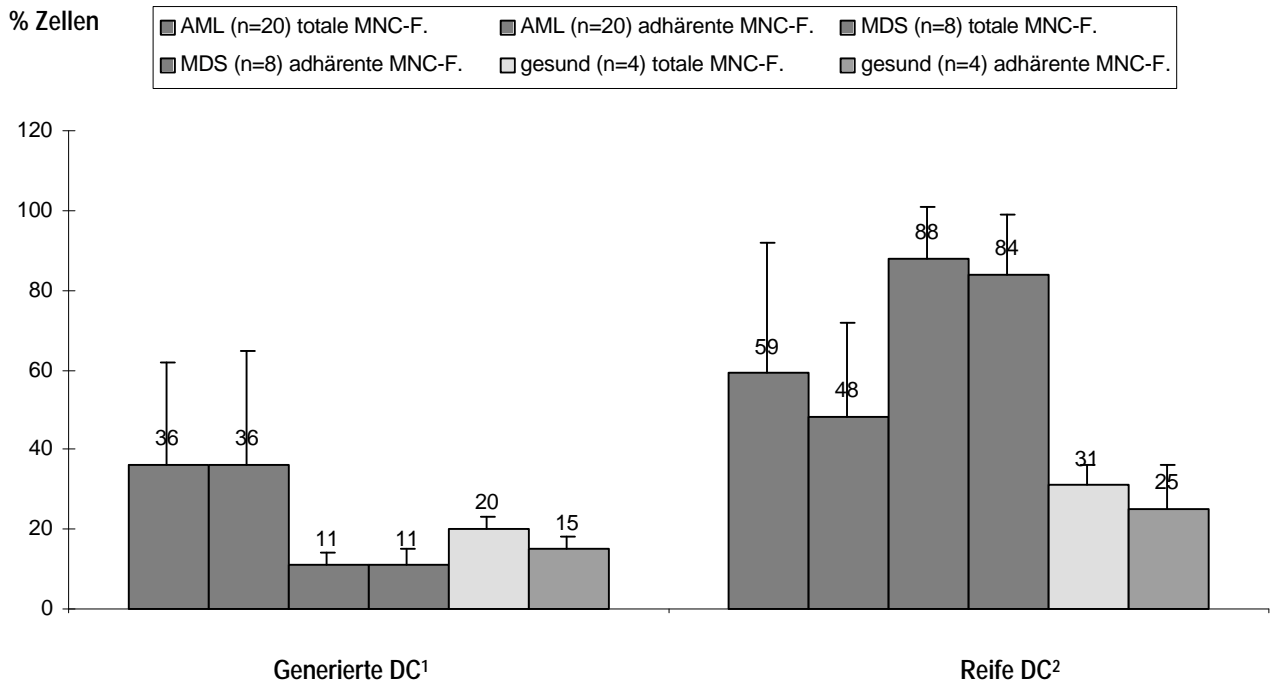


#### 4.2.2. Vergleich von unterschiedlichen Zellpopulationen als Ausgangsmaterial für die DC-Generierung

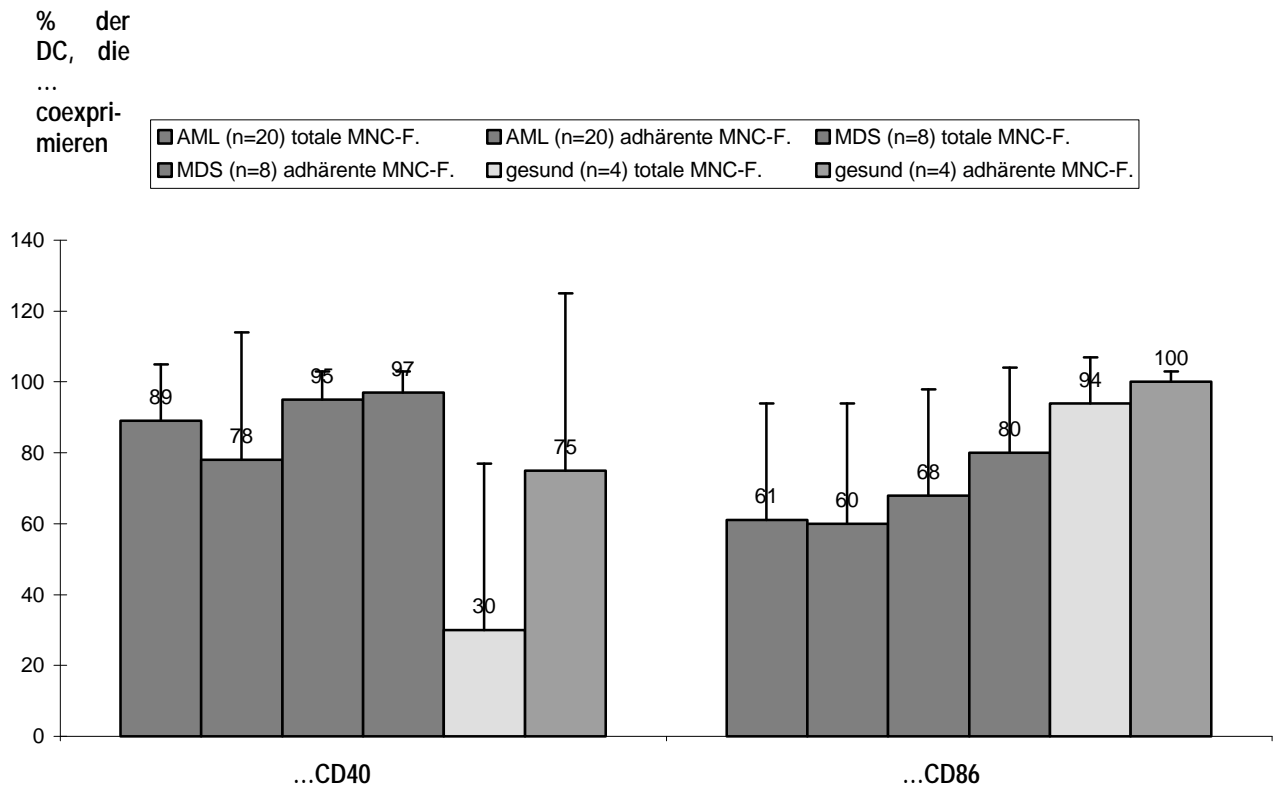
##### 4.2.2.1. Die DC-Ausbeute von adhärenenten und totalen MNC-Fractionen ist vergleichbar

Um zu erfahren, ob sich die DC-Ernte unterscheidet, wenn man die plastikadhärente Zellfraktion anstelle von totalen PB-MNC-Fractionen verwendet, wurden die Ergebnisse von 20 AML-, 8 MDS- und 4 gesunden Spendern verglichen, deren Proben parallel unter verschiedenen Kulturbedingungen entweder als adhärenente oder totale MNC-Fraktion kultiviert wurden. Die Daten zeigen, dass die Verwendung von adhärenenten Zellfraktionen als Zellquelle, die DC-Ausbeute sowohl in AML- und MDS-Fällen, als auch in gesunden Fällen nicht verbessert. Die Anzahl reifer DC unterschied sich hinsichtlich der beiden Zellpopulationen letztendlich nicht (Bild 21). Auch die Coexpression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD86, CD80 und CD1a differierte in den beiden Gruppen nicht (Bild 22 und 23). Aus diesem Grund wurde beschlossen, totale MNC-Fractionen als weitere Zellquelle für die DC-Generierung zu verwenden.

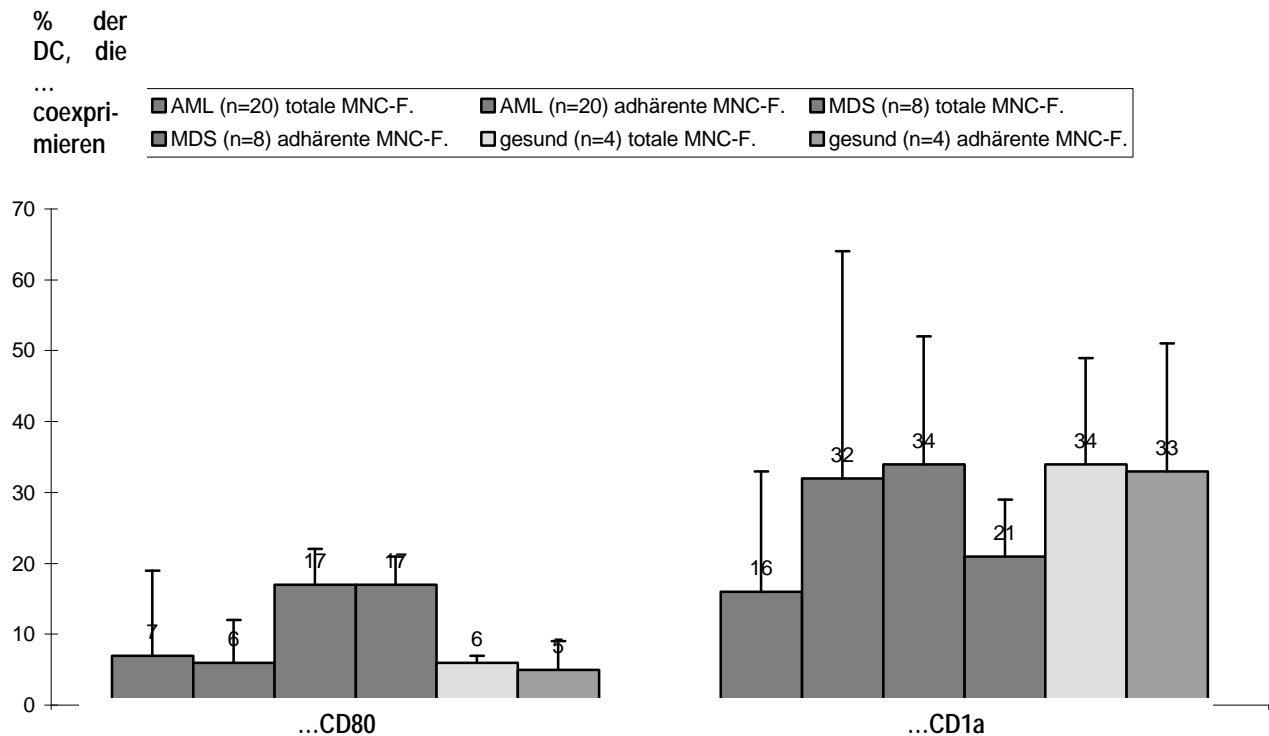
**Bild 21:** Vergleich zwischen adhärennten und MNC-Fractionen (F) als Zellquelle für die DC-Generierung. <sup>1</sup>% nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>2</sup>DC mit Coexpression von CD83.



**Bild 22:** Die Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach 10-14tägiger (AML/MDS) und 7tägiger (gesunde Probanden) Kulturzeit in totalen und adhärennten MNC-Fractionen (Hinweis: CD40 wurde am Tag 7 nicht gemessen, deshalb Wert von Tag 14).



**Bild 23:** Die Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD1a in totalen und adhären-ten MNC-Fractionen (F).

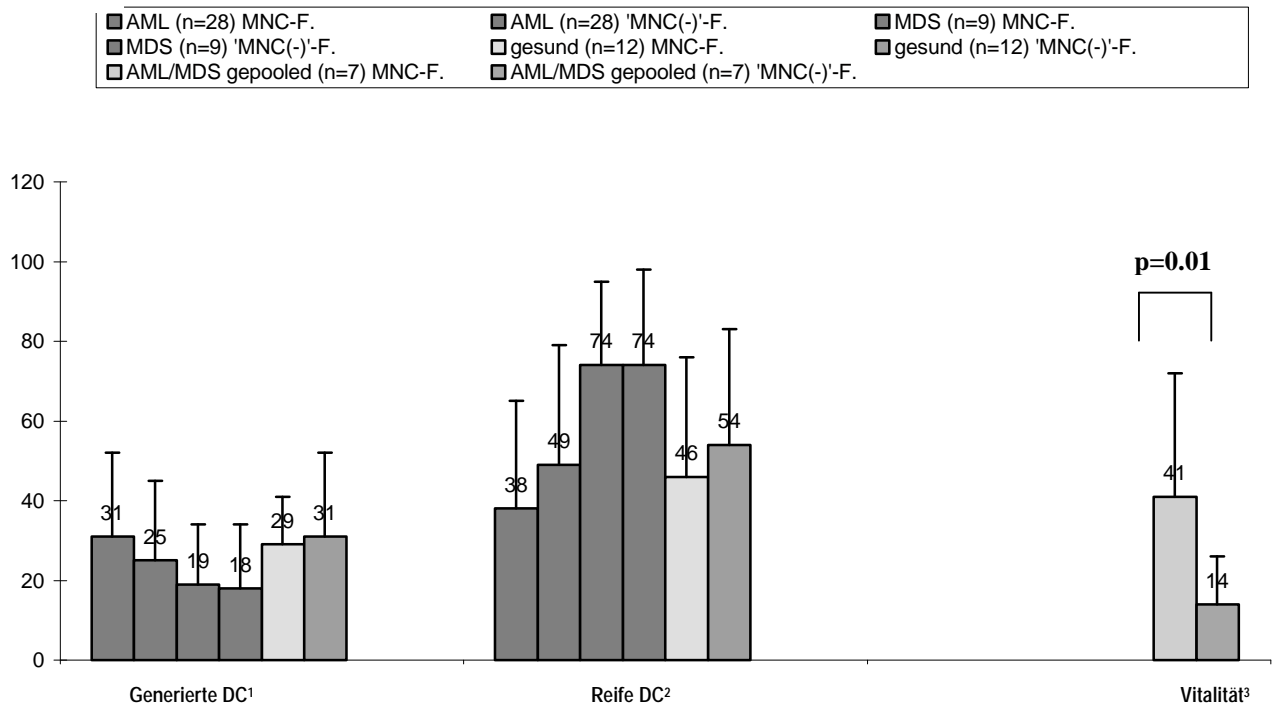


#### 4.2.2.2. Die Ernte vitaler DC von totalen MNC-Fractionen ist höher als von T-Zell-depletierten MNC-Fractionen ('MNC(-)')

DC von 28 AML-, 12 MDS- und 12 gesunden Spendern wurden parallel zu unterschiedlichen Kulturbedingungen aus totalen MNC-Fractionen und T-Zell-depletierten MNC-Fractionen ('MNC(-)') generiert und danach verglichen. Der immunphänotypisch bestimmbare Blastenanteil in den AML-MNC/'MNC(-)'-Proben betrug durchschnittlich 48%/52%, der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen in den MDS-Proben 4 bzw. 3%. Die Untersuchungen zeigen, dass die DC-Ausbeute in beiden Kontrollgruppen zwar vergleichbar, die Vitalität der geernteten DC aus 'MNC(-)'-Fractionen aber signifikant schlechter war (41 vs. 14% vitale DC in AML- oder MDS-Fällen (p=0.01, Fälle gepoolt); 55 vs. 18% in MDS-Fällen (p=0.01)) (Bild 24). Die Coexpression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD86, CD80 und CD1a unterschied sich in den beiden Gruppen allerdings nicht (Bild 25 und 26). Deshalb wurden in weiteren Versuchen totale MNC-Fractionen als DC-Quelle verwendet.

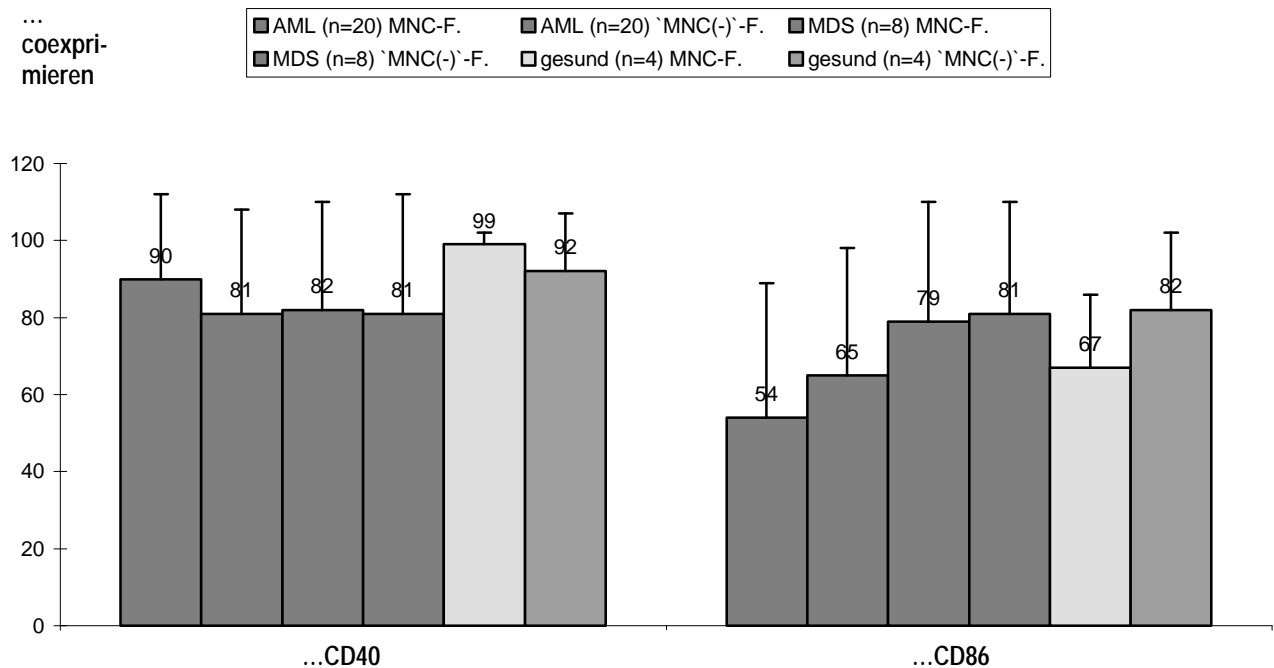
**Bild 24:** Vergleich zwischen totalen MNC- und 'MNC(-)''-Fraktionen (F) als Zellquelle für die DC-Generierung. <sup>1</sup> % nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>2</sup> DC mit Coexpression von CD83. <sup>3</sup> % Annexin<sup>+</sup> PIDC.

% Zellen

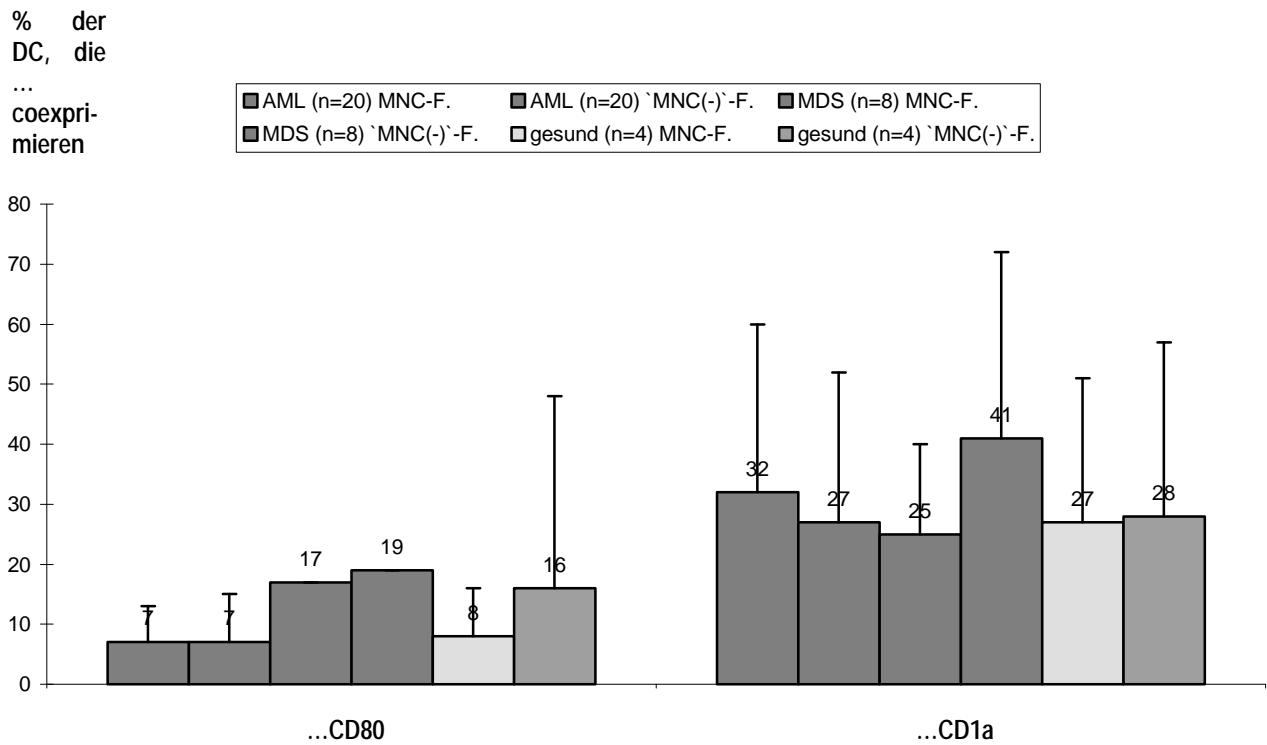


**Bild 25:** Die Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach 10-14tägiger (AML/MDS) und 7tägiger (gesunde Probanden) Kulturzeit in MNC- und 'MNC(-)''-Fraktionen (Hinweis: CD40 wurde am Tag 7 nicht gemessen, deshalb Wert von Tag 14).

% der DC, die ... coexpressieren



**Bild 26:** Die Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD1a nach 10-14tägiger (AML/MDS) und 7tägiger (gesunde Probanden) Kulturzeit in MNC- und `MNC(-)`-Fraktionen.



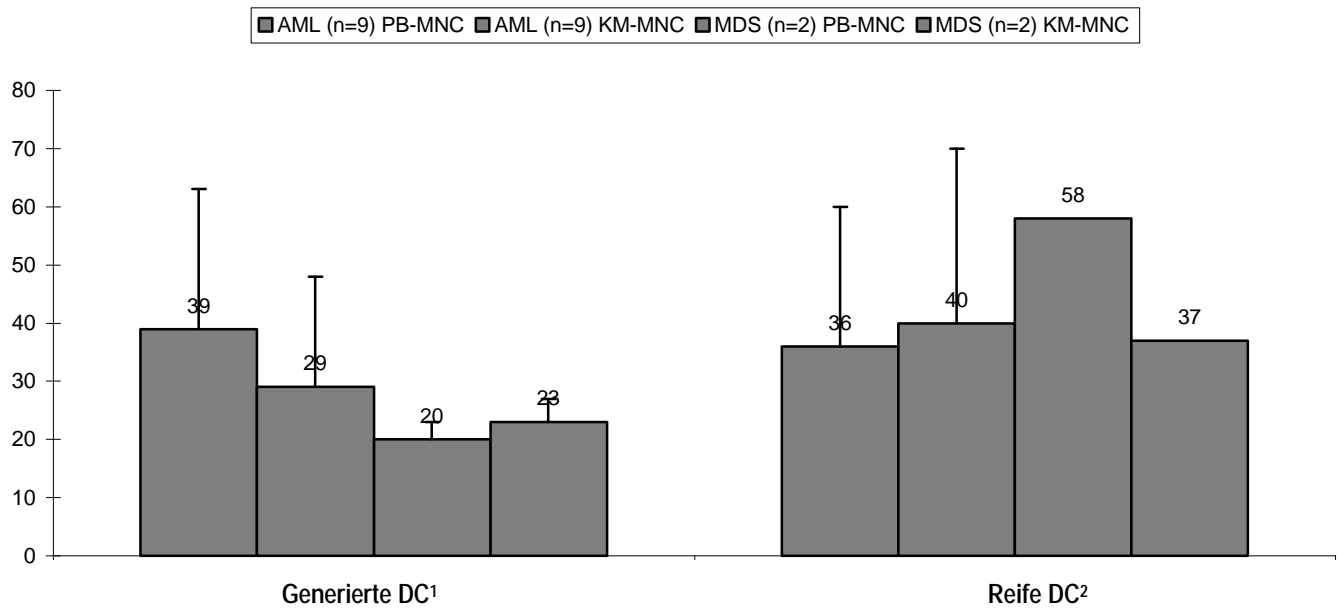
#### 4.2.2.3. Sowohl PB- als auch KM-MNC sind als DC-Quelle geeignet

DC von 9 AML und 2 MDS Patienten wurden sowohl aus PB- als auch aus KM-MNC generiert, um die Ernte zu vergleichen. Der immunphänotypisch bestimmbare Blastenanteil in den AML-PB/KM-Proben betrug durchschnittlich 69%/64%, der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen in den MDS-Proben 4 bzw. 3%. Die Ergebnisse zeigen, dass die DC-Ernte und die Anzahl reifer DC sich bezüglich dieser beiden Gruppen nicht unterscheidet (Bild 27). Auch die Coexpression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD86, CD80 und CD1a unterschied sich in der PB- und KM-Quelle nicht (Bild 28 und 29). Zusätzlich differierte die DC-Anzahl, die Blastenantigene coexpressierten, in Fällen mit AML und >50% Blasten nicht signifikant in den PB- und KM-Proben (42 vs. 45% DC). Aus diesem Grund wurden für weitere Versuche PB-Proben als DC-Quelle verwendet, aber auch KM-MNC falls verfügbar.

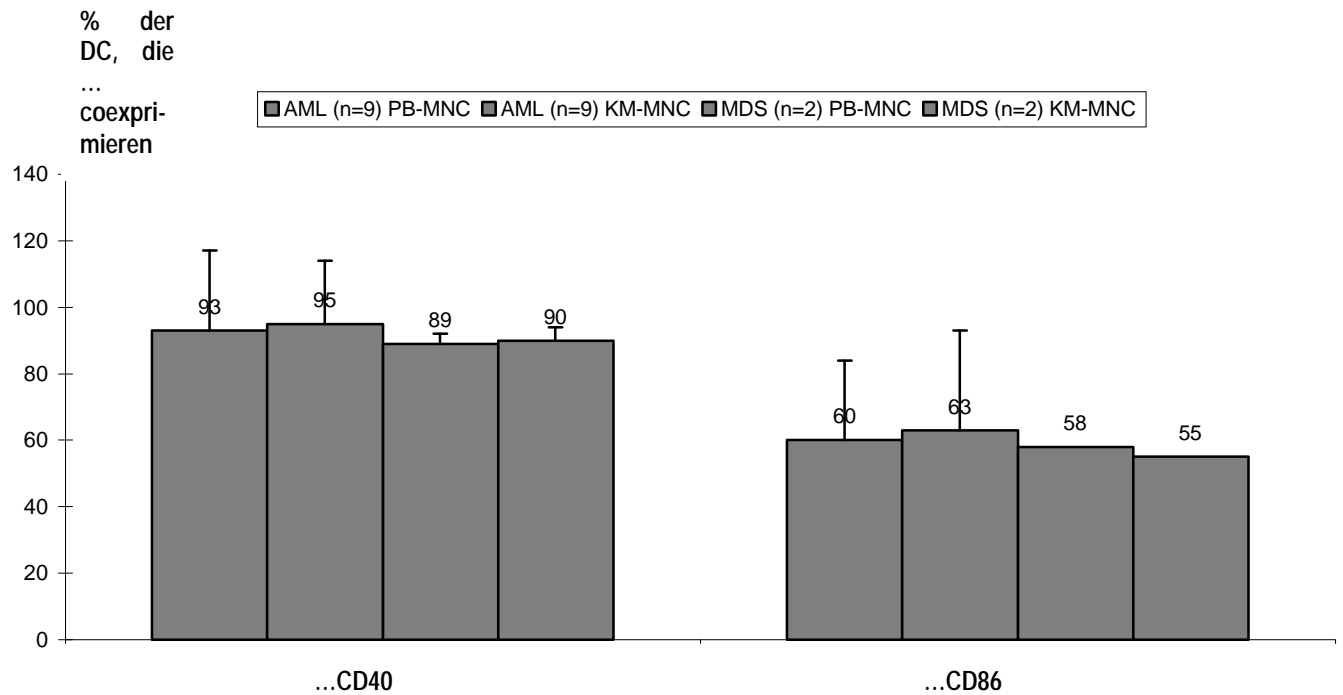


**Bild 27:** Vergleich zwischen PB- und KM-MNC als Zellpopulation für die DC-Generierung. <sup>1</sup> % nach 10-14tägiger (AML/MDS) Kultur. <sup>2</sup> DC mit Coexpression von CD83.

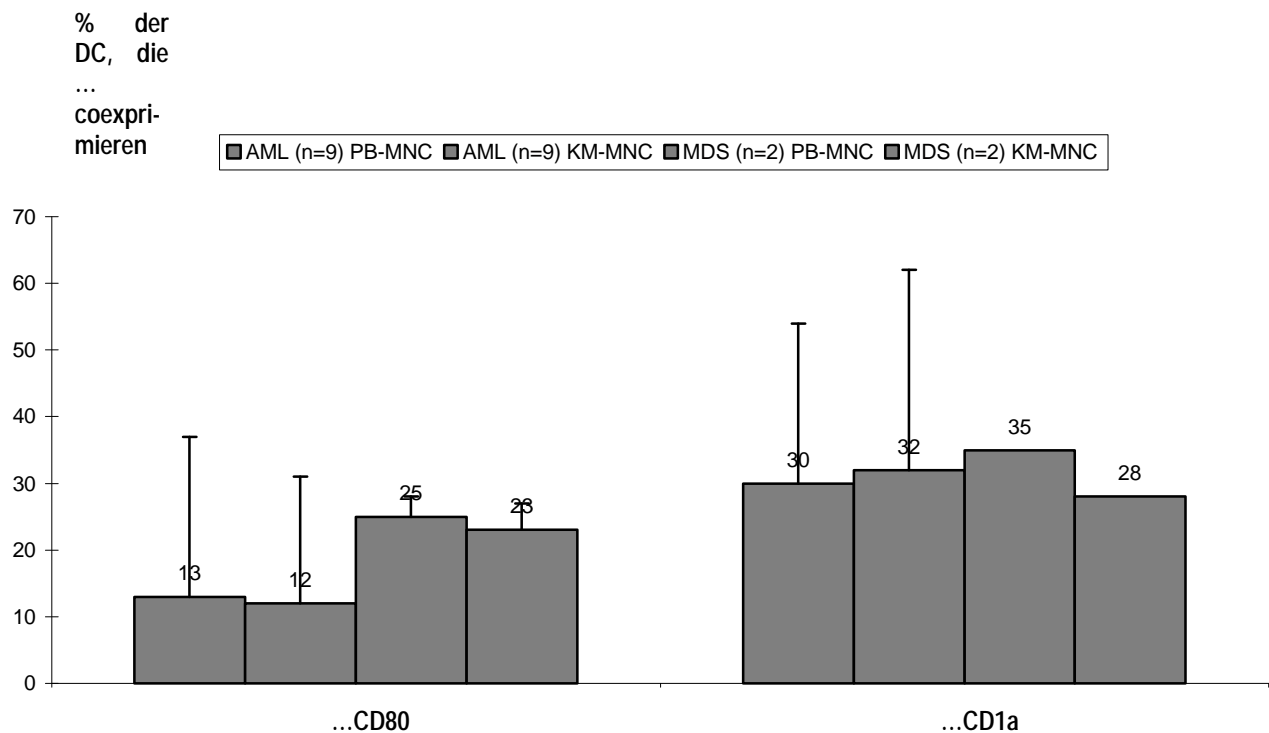
% Zellen



**Bild 28:** Die Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach 10-14tägiger (AML/MDS) und 7tägiger (gesunde Probanden) Kulturzeit in PB- und KM-Zellpopulationen (Hinweis: CD40 wurde am Tag 7 nicht gemessen, deshalb Wert von Tag 14).



**Bild 29:** Die Coexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD1a nach 10-14tägiger (AML/MDS) und 7tägiger (gesunde Probanden) Kulturzeit in PB- und KM-Zellpopulationen.



#### 4.2.2.4. Die Ausbeute vitaler DC ist bei der Verwendung eingefrorener bzw. aufgetauter MNC erniedrigt

Die DC-Ernte von 9 aufgetauten AML- und 5 aufgetauten MDS-Proben wurde mit derjenigen von 9 frischen AML- und 5 frischen MDS-Proben mit ähnlichen Blastenzahlen und FAB-Typen verglichen. Dabei kam heraus, dass sich die Anzahl reifer DC in den aufgetauten und frischen Proben nicht signifikant unterschied, obwohl die Vitalität in der DC-Fraktion schlechter war, wenn aufgetaute MNC als Zellquelle für die DC-Generierung verwendet wurden (19% vs. 43% vitale DC). Die Daten zeigen insgesamt, dass DC zwar aus eingefrorenen bzw. aufgetauten MNC generiert werden können, aber mit eingeschränkter Vitalität.

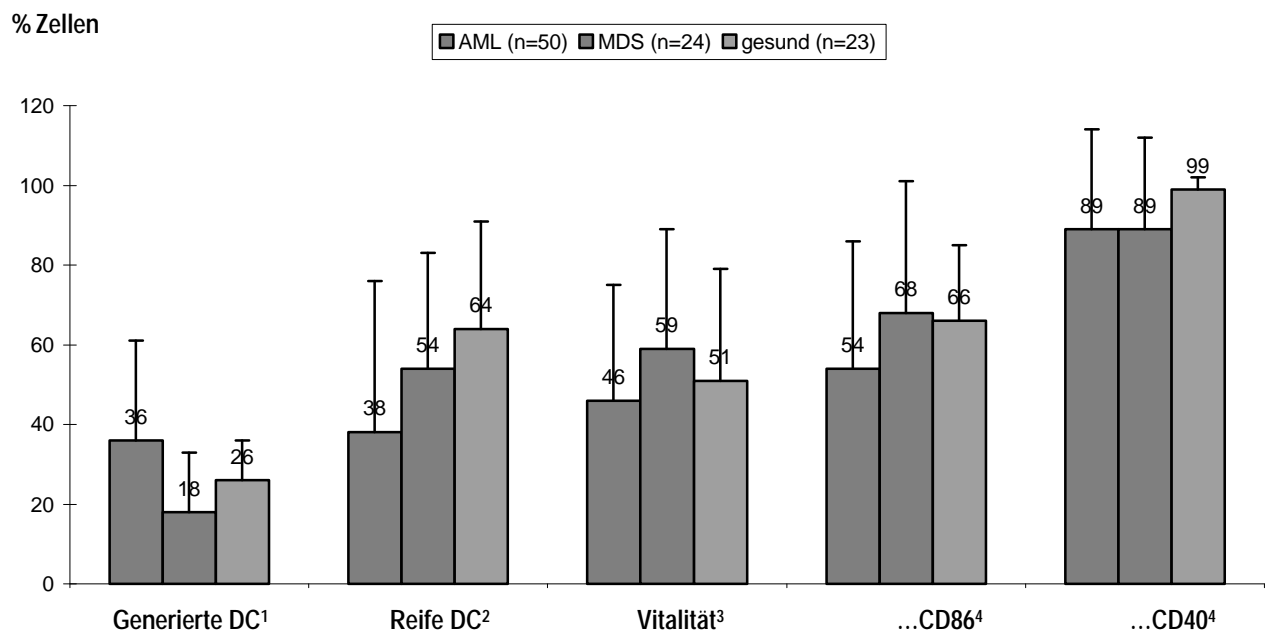
#### 4.2.3. Charakterisierung der unter Xvivo + FL (14d) generierten DC

Die entsprechend dem Ergebnisteil des Methodenvergleichs unter optimalen Bedingungen generierten DC (AML- und MDS-MNC-Fractionen nach 10-14tägiger Kultur unter Xvivo + GM-CSF + IL-4 + FL + TNF $\alpha$ ) wurden nun hinsichtlich der Coexpression kostimulatorischer Moleküle, des leukämischen Ursprungs und ihrer T-Zell-Aktivierung weiter charakterisiert.

#### 4.2.3.1. Reife DC aus AML- und MDS-MNC-Fraktionen exprimieren kostimulatorische Antigene

Die Untersuchung der Expression kostimulatorischer Antigene für den T-Zell-Kontakt (z.B. CD40, CD86, CD80) auf den DC zeigte eine vergleichbare Expression bei allen AML-, MDS- und gesunden Spendern. Sowohl die Anzahl der DC als auch der prozentuale Anteil an reifen DC bei AML und MDS war denen von gesunden Proben ähnlich. Die Anzahl vitaler DC war nach der Kultivierungsprozedur in AML- und MDS-Fällen allerdings geringer als bei gesunden Spendern (Bild 30).

**Bild 30:** Aus AML- und MDS-MNC können vitale, reife DC generiert werden, die kostimulatorische Moleküle exprimieren. <sup>1</sup> % nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>2</sup> DC mit Coexpression von CD83. <sup>3</sup> % Annexin<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>DC. <sup>4</sup> % an DC, die ... coexprimieren.



#### 4.2.3.2. DC aus AML- und MDS-MNC-Fraktionen sind leukämischen Ursprungs

Um den leukämischen/klonalen Ursprung von DC aus AML- und MDS-MNC-Proben zu beweisen, wurden in Fällen mit klonalen numerischen Aberrationen 'FISH-IPA'-Analysen durchgeführt. Die Detektion eines klonalen Markers in einer CD1a<sup>+</sup>-positiven Zelle wurde dabei als Beweis angesehen, dass die DC leukämischen Ursprungs ist (siehe Bild 6). Bei einem Fall von AML-M6 wurde eine Monosomie 7, bei einer AML-M4 eine Monosomie 9 in CD1a<sup>+</sup>-positiven Zellen nachgewiesen. Auch DC aus MDS-Zellmaterial waren leukämischen Ursprungs. Bei einem Fall von MDS-CMML konnte eine Monosomie 21, bei einer MDS-RAEB eine Trisomie 8 in CD1a<sup>+</sup>-positiven Zellen gefunden werden (Tabelle 13). Zusätzlich konnte bei einem Patienten mit AML-M5, bei dem eine 11q23-Aberration bei Diagnosestellung nachgewiesen worden war, die Coexpression des Blastenantigens 7.1, das Oberflä-

chenantigen-Produkt einer 11q23-Aberration, gefunden werden (siehe Bild 8). Dies beweist insgesamt, dass leukämische/klonale Zellen bei AML und MDS zu DC, die leukämische Antigene und klonale Marker präsentieren, umgewandelt werden können.

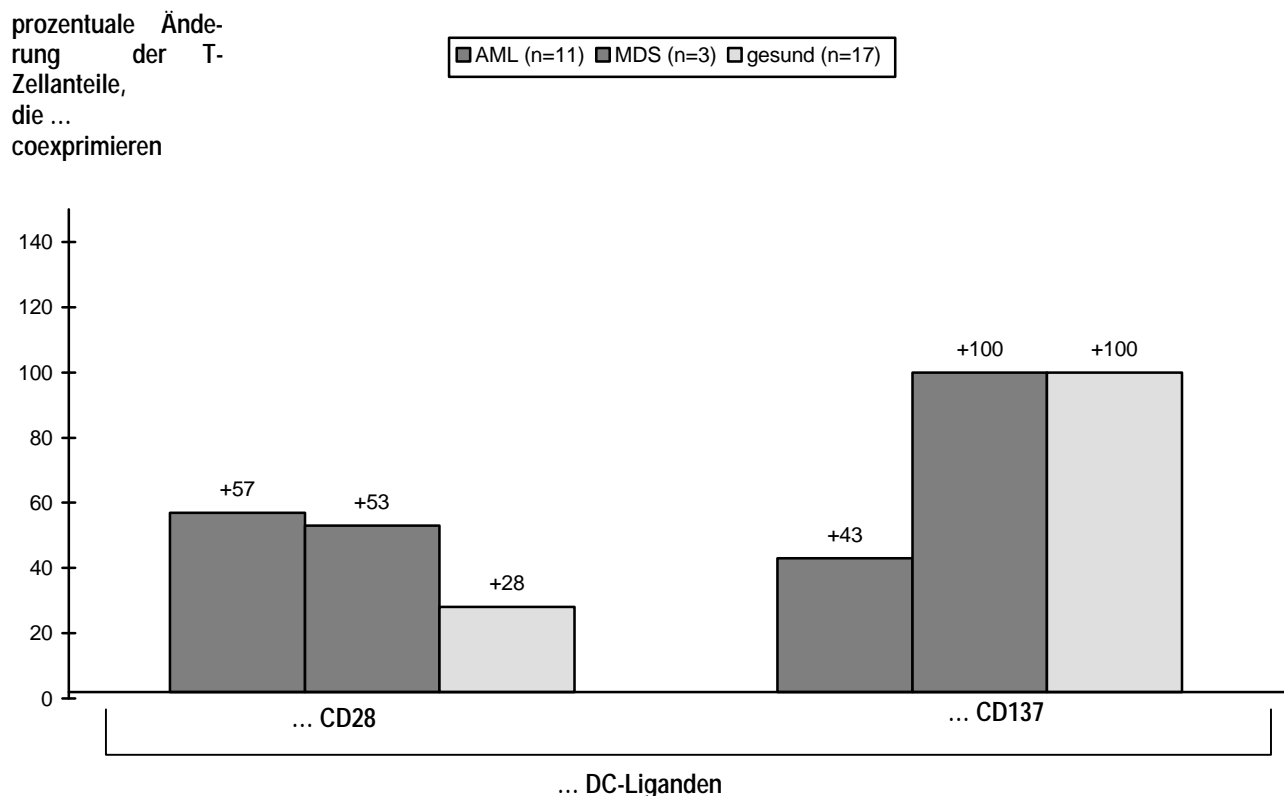
**Tabelle 13:** Die Codetektion eines klonalen Markers oder eines spezifischen Blastenantigens bei DC beweist den leukämischen/klonalen Ursprung.

AML-M4:	-9 in DC detektierbar	MDS-RAEB:	+8 in DC detektierbar
AML-M6:	-7 in DC detektierbar	MDS-CMML:	-21 in DC detektierbar
AML-M5:	7.1-Antigen auf DCs		

#### 4.2.3.3. Die Umwandlung von MNC zu DC steigert die T-Zell-Aktivierung

Es ist bekannt, dass T-Zellen nach dem Kontakt mit Antigen-präsentierenden DC die zur Bindung an DC relevanten Liganden (z.B. CD137L-Liganden CD80 und CD86, CD28, CD137) hoch regulieren. Deshalb wurde die Expression dieser Marker auf T-Zellen von 17 gesunden Probanden, 11 AML und 3 MDS Patienten vor dem DC-Kontakt mit der von T-Zellen verglichen, die mit autologen DC für 5 Tage in einer MLR kultiviert wurden (Bild 31).

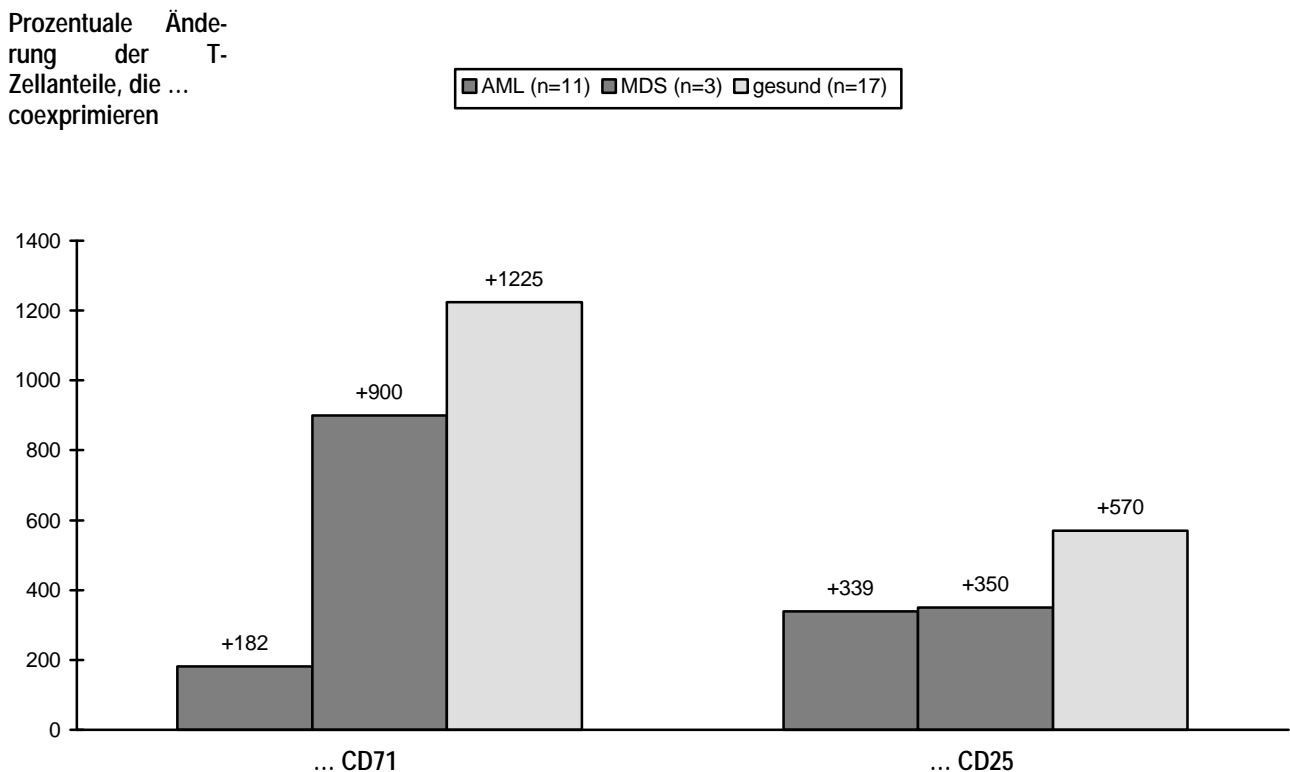
**Bild 31:** T-Zellen von AML und MDS Patienten regulieren DC-Kontaktantigene nach autologem DC-Kontakt hoch.



Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass die T-Zellen sowohl von gesunden Probanden als auch von AML und MDS Patienten die für den DC-Kontakt relevanten Liganden nach der MLR hoch regulieren.

Da T-Zellen nach einer Antigen-Stimulierung auch proliferieren, wurden die Anteile proliferierender T-Zellen von 11 AML-, 3 MDS- und 17 gesunden Probanden vor ihrem DC-Kontakt untersucht und mit denen nach dem Kontakt mit autologen DC in einem MLR-Setting verglichen (Bild 32).

**Bild 32:** T-Zellen von AML und MDS Patienten proliferieren nach autologem DC-Kontakt.



Die Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen von AML und MDS Patienten im Vergleich zu Kontrollen nach autologem DC-Kontakt dazu stimuliert wurden zu proliferieren. Bild 5 zeigt ein Beispiel aktivierter T-Zellen nach einer 5tägigen Stimulation von T-Zellen mit autologen DC bei einer AML-M2. Die Anzahl an T-Zellen, die CD71 (Proliferationsmarker) und CD28 (DC-Kontaktmolekül) coexprimiert, hat dabei nach 5tägiger MLR deutlich zugenommen.

#### 4.3. Generierung von DC unter standardisierten Bedingungen mit Xvivo + Fl (14d) (Kufner S, 2005 (III))

Insgesamt ließ sich feststellen, dass die erfolgreichste Ernte reifer DC leukämischen Ursprungs von AML- und MDS-Proben in Xvivo-Medium ohne Zugabe von autologem Serum, jedoch mit Zugabe

von FL zu GM-CSF, IL-4 und TNF $\alpha$  nach einer 10-14tägigen Kultur erreicht wurde. Sowohl PB- als auch KM-Proben sind gute Quellen für die in-vitro-Generierung von DC, wohingegen die Verwendung adhärenter Zellpopulationen im Vergleich zu totalen MNC-Fraktionen die DC-Ausbeute nicht erhöht. T-Zell-depletierte Zellfraktionen als DC-Quelle (MACS-Separation) zeigten eine schlechtere Vitalität im Vergleich zu totalen MNC-Fraktionen. Die weitere Charakterisierung der DC zeigte schließlich, dass diese unter der Methode Xvivo + FL (14d) leukämischer Herkunft waren, kostimulatorische Moleküle für den DC-Kontakt exprimierten und in einer 5tägigen MLR zur T-Zell-Proliferation fähig waren.

Anhand dieser Ergebnisse wurde beschlossen, alle weiteren AML- und MDS-MNC-Proben unter serumfreien Bedingungen 10-14 Tage in Xvivo + GM-CSF + IL-4 + FL + TNF $\alpha$  zu kultivieren.

#### 4.3.1. Weiterführende Charakterisierung der DC

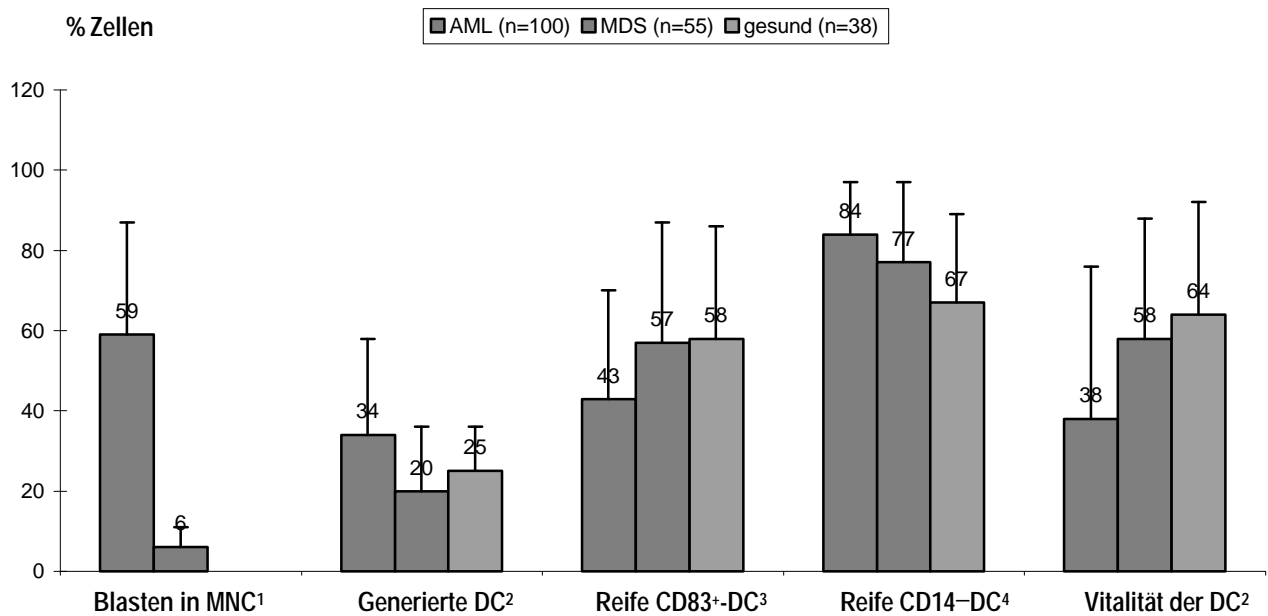
##### 4.3.1.1. DC generiert aus AML- und MDS-MNC-Fraktionen sind reif und vital

Im Folgenden dargestellt sind die Ergebnisse, die von 100 AML-, 55 MDS- und 38 gesunden Probanden sowie von 4 Zelllinien gewonnen wurden (siehe Tabelle 11).

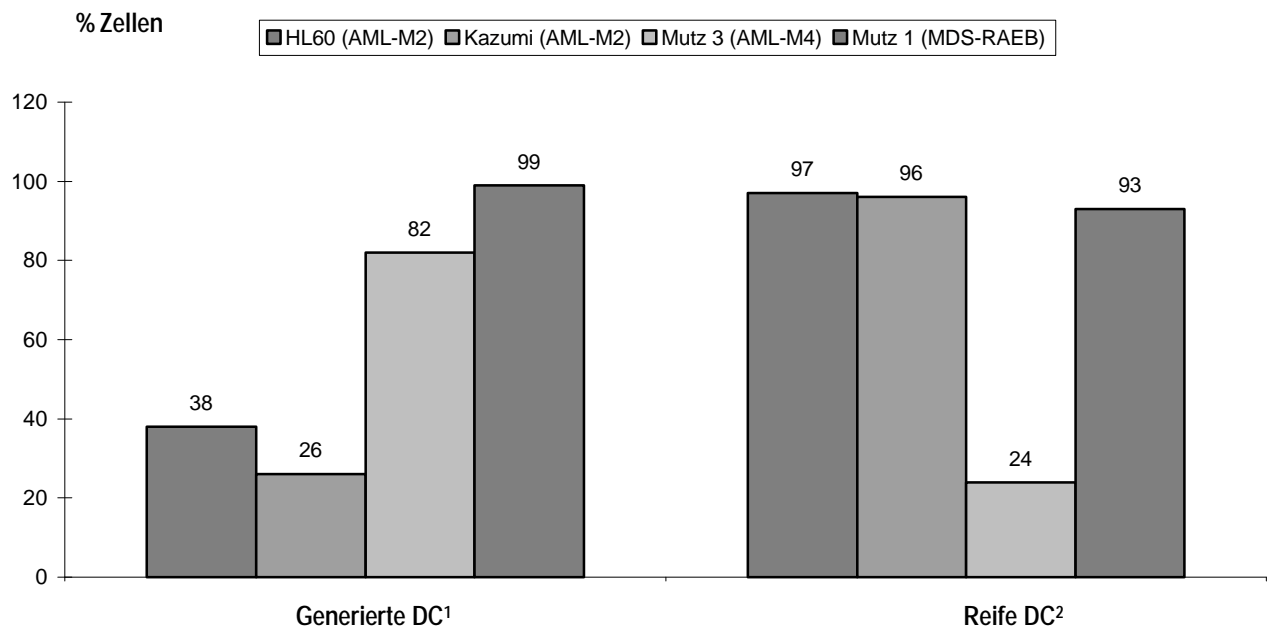
Es zeigte sich, dass nach der Kultivierungsprozedur im Durchschnitt 34% DC von AML-Proben, 20% DC von MDS-Proben und 25% DC von gesunden Proben in der Zellsuspension detektiert werden konnten (Bild 33). Zwischen 43-58% dieser DC coexprimierten CD83. Noch mehr dieser DC waren durchflusszytometrisch negativ für den Monozytenmarker CD14 (84% der DC bei AML, 77% bei MDS und 67% bei gesunden Proben) oder CD209-negativ (76% der DC bei AML, 56% bei MDS und 50% bei gesunden Proben), was bewies, dass ein beträchtlicher Anteil der Zellen zu reifen DC umgewandelt werden konnten. Die Vitalität der analysierten Zellen schwankte zwischen 38 und 64%. Allerdings wurden als Zellquelle sowohl frische als auch eingefrorene/aufgetaute Proben verwendet.

Die höchste DC-Ausbeute ließ sich mit der Mutz-3-Zelllinie (AML-M4) erzielen. Auch der Reifegrad der DC war bei den Zelllinien (Mutz-3 ausgeschlossen) im Vergleich zu den DC von Patienten höher (Bild 34).

**Bild 33:** Vitale und reife DC können aus AML-, MDS- und gesunden Proben kultiviert werden. <sup>1</sup> CD34<sup>+</sup>-Zellen bei MDS. <sup>2</sup> % nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>3</sup> DC mit Coexpression von CD83. <sup>4</sup> DC negativ für CD14.



**Bild 34:** Vitale und reife DC können aus leukämischen Zelllinien kultiviert werden. <sup>1</sup> % DC nach 10-14tägiger (AML/MDS) oder 7tägiger (gesunde Probanden) Kultur. <sup>2</sup> % DC mit Coexpression von CD83.



4.3.1.2. Der leukämische Ursprung generierter DC von AML- und MDS-Proben konnte mittels 'FISH-IPA' bewiesen werden

Zusätzlich zu den schon nachgewiesenen klonalen Aberrationen von 3 AML- und 2 MDS-Fällen, wurde an jeweils zwei weiteren AML- und MDS-Proben eine 'FISH-IPA'-Analyse durchgeführt, um mittels Codetektion einer klonalen numerischen Aberration in CD1a<sup>+</sup>-Zellen den leukämischen Ursprung der DC zu beweisen (Tabelle 14). Dabei ließen sich in zwei Fällen mit sAML jeweils eine Monosomie 7 und zwei MDS-Fällen (MDS-RAEB, MDS-RAEBt) jeweils eine Trisomie 8 in CD1a<sup>+</sup>-Zellen nachweisen.

**Tabelle 14:** DC leukämischen Ursprungs können aus AML- und MDS-MNC generiert werden.

sAML:	-7 in DC detektierbar	MDS-RAEB:	+8 in DC detektierbar
sAML-Rel:	-7 in DC detektierbar	MDS-RAEBt:	+8 in DC detektierbar

4.3.1.3. 'FISH-IPA' und Durchflusszytometrie ermöglichen die Quantifizierung der zu DC umgewandelten Blasten und der DC nicht-leukämischen Ursprungs

Um zu bestimmen, wie viele leukämische Zellen bei AML und MDS zu DC leukämischen Ursprungs ('DC<sub>leu</sub>') umgewandelt werden konnten, wurden die klonalen Zellen mit und ohne Coexpression von CD1a nach ihrer Umwandlung zu DC quantifiziert. Dabei war festzustellen, dass durchschnittlich 53% der klonalen Zellen bei AML/MDS (77% der leukämischen Zellen bei AML-DC-Kulturen und 37% der leukämischen Zellen bei MDS-DC-Kulturen (Schwankungsbereich zwischen 18-54%)) CD1a coexprimierten, was vermuten lässt, dass diese zu 'DC<sub>leu</sub>' umgewandelt werden konnten (Bild 35A).

Die meisten leukämischen Zellen sind bei der AML CD33<sup>+</sup> und somit durch einen myeloischen Blastenphänotyp gekennzeichnet. Um also den Prozentanteil an Blasten zu schätzen, die zu DC umgewandelt wurden, wurden CD33<sup>+</sup>-Blastenpopulationen, die CD1a coexprimierten und eindeutig als CD33<sup>+</sup>-Blasten-Fraktionen qualifizierbar waren, evaluiert. Dazu wurden Fälle in die Untersuchung eingeschlossen, die zusätzlich weniger als 5% CD14<sup>+</sup>-Zellen in der MNC-Fraktion enthielten, um normale, aus Monozyten entstandene DC auszuschließen, oder die einen CD117<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>-Blastenphänotyp aufwiesen. Dadurch war feststellbar, dass im Durchschnitt bei 57% dieser Fälle ein Zugewinn an DC-Markern auf der Blastenpopulation festgestellt werden konnte (beim Aufnehmen aller Fälle mit einem CD33<sup>+</sup>-Blastenphänotyp und mit mehr als 80% CD33<sup>+</sup>-Zellen in den MNC-

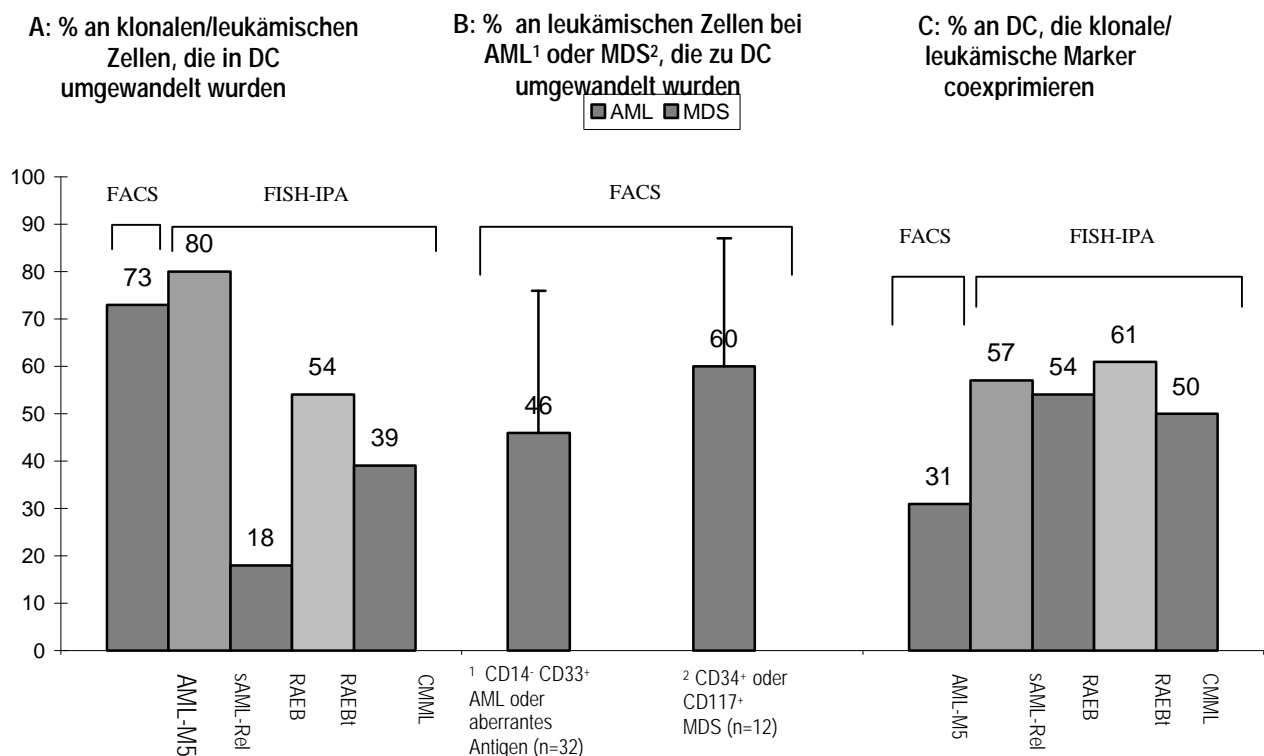


Fraktionen, coexprimierten durchschnittlich 52% der Blasten DC-Antigene nach 10-14tägiger Kulturzeit, was obig Dargestelltes bestätigt). Bei MDS-Proben von MDS Patienten mit fortgeschrittener Krankheit, wurde die Anzahl der CD34<sup>+</sup>- oder CD117<sup>+</sup>-Zellen, die DC-Antigene nach Kultur hinzugewannen bestimmt. Voraussetzung war ein Prozentanteil von >10% positiver, analysierbarer Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass 64% der CD34<sup>+</sup>-Zellen DC-Antigene coexprimierten (Bild 35B).

Bild 36 zeigt einige Beispiele für die durchflusszytometrische Darstellung von MNC/DC in Fällen von AML und MDS. Bei den ersten 3 Fällen kann man sehen, dass die leukämische Zellpopulation in der MNC-Fraktion, die positiv für CD33 (AML-M0), für CD117 (MDS-RAEBt) oder CD34 (RAEB) ist, in der DC-Kultur nach einer 10-14tägigen Kulturzeit als Zellpopulation, die immer noch positiv für diese Marker ist, wieder auffindbar ist, dass diese Zellpopulation aber zusätzlich auch durch eine für DC typische Zunahme im Seitwärts-Scatter gekennzeichnet ist. Die Coexpression dieser leukämischen Marker auf den DC legt die Umwandlung dieser Zellen zu 'DC<sub>leu</sub>' dar. In den Fällen 4 und 5 wird dargestellt, dass die leukämische Population quantitativ nicht die DC-typische Zunahme im Seitwärts-Scatter oder die Coexpression von DC-Antigenen auf allen Blasten angenommen hat, sondern dass die leukämischen Zellpopulationen immer noch die gleiche 'MNC-Scatter-Positionen' einnehmen.

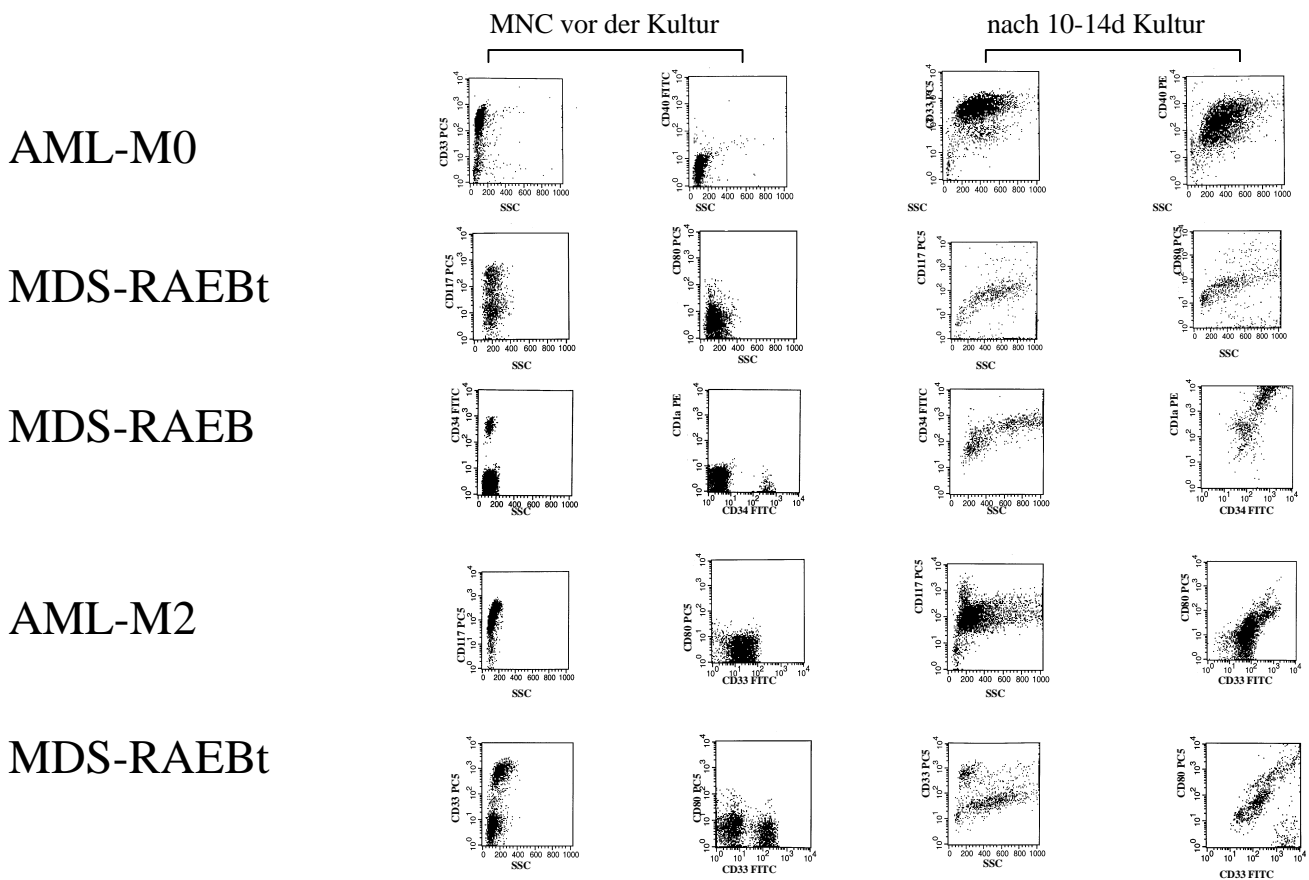
In Fällen mit klonaler Aberrationen zeigte sich außerdem, dass auch CD1a<sup>+</sup>-Zellen ohne den klonalen Marker der leukämischen Zellen generiert werden konnten (Bild 35C).

**Bild 35:** Nicht alle leukämischen/klonalen Zellen können in 'DC<sub>leu</sub>' umgewandelt werden.



Somit wurde insgesamt bewiesen, dass mit der verwendeten Methode konstant 'DC<sub>leu</sub>' in AML- und MDS-Fällen mit klonalen oder leukämischen Markern generiert werden konnten, die gleichzeitig DC-Antigene präsentierten. Weiter kann zusammengefasst werden, dass ca. 60% der klonalen/leukämischen Zellen bei AML oder MDS zu DC umwandelbar sind, und dass umgekehrt ca. 50% der generierten DC leukämischen Ursprungs sind. Das bedeutet, dass sowohl klonale/leukämische DC als auch DC nicht-leukämischer Herkunft in der DC-Kultur detektierbar sind.

**Bild 36:** Umwandlung von AML- und MDS-MNC zu DC in der FACS-Analyse.

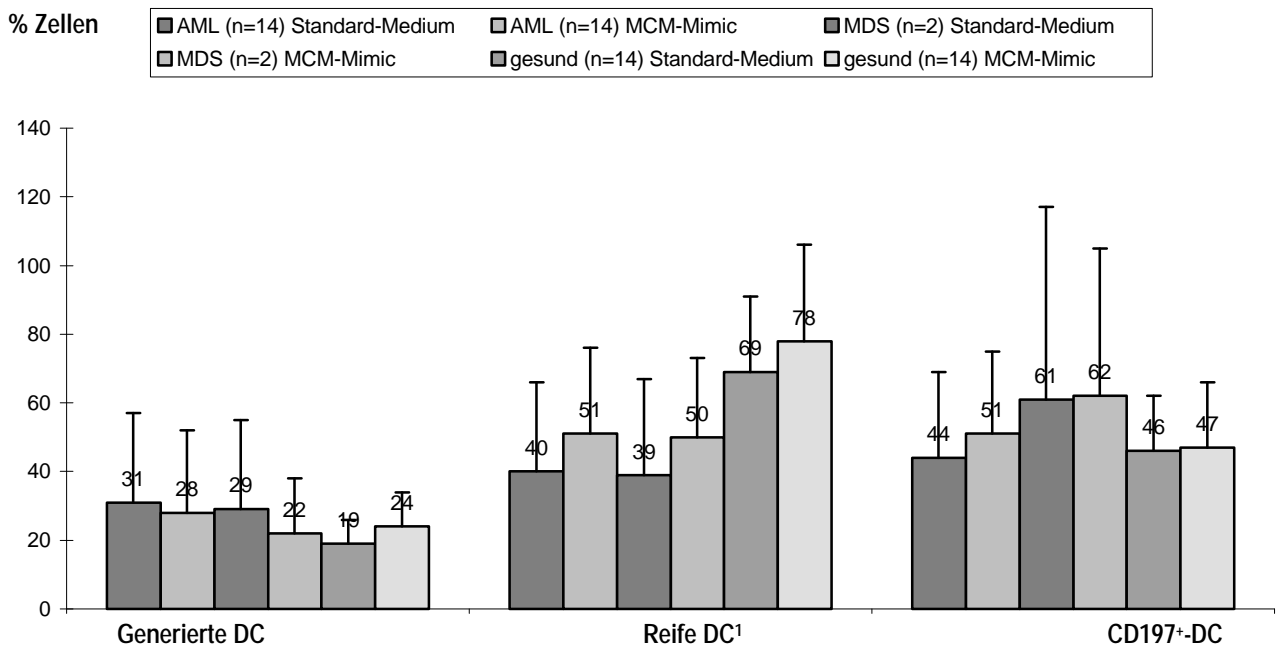


4.3.1.4. Die Expression von Migrationsantigenen auf DC kann durch die Kultivierung der DC in einem 'MCM-Mimic'-Medium mit PGE<sub>2</sub> verbessert werden

Nur DC, die Migrationsmarker wie CCR7 (CD197) coexpressieren, sind dazu fähig, in Lymphknoten zu wandern und naiven T-Zellen Antigene zu präsentieren. Um die Expression von Migrationsantigenen auf DC zu analysieren, wurden DC, die im Standard-Medium mit GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$  und FL mit DC verglichen, die in 'MCM-Mimic'-Medium mit GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$ , FL, IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> kultiviert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das 'MCM-Mimic'-Medium im Vergleich zum Standard-Medium nicht nur die prozentuale DC-Ausbeute erhöhte, sondern auch vor allem die

Anzahl CCR7-positiver DC in der DC-Kultur (Bild 37), während sich die Anzahl an DC, die kostimulatorische Moleküle coexprimierten, in den beiden Kulturgruppen nicht änderte. Diese Daten führten dazu, bei der DC-Generierung auf das 'MCM-Mimic'-Medium umzusteigen.

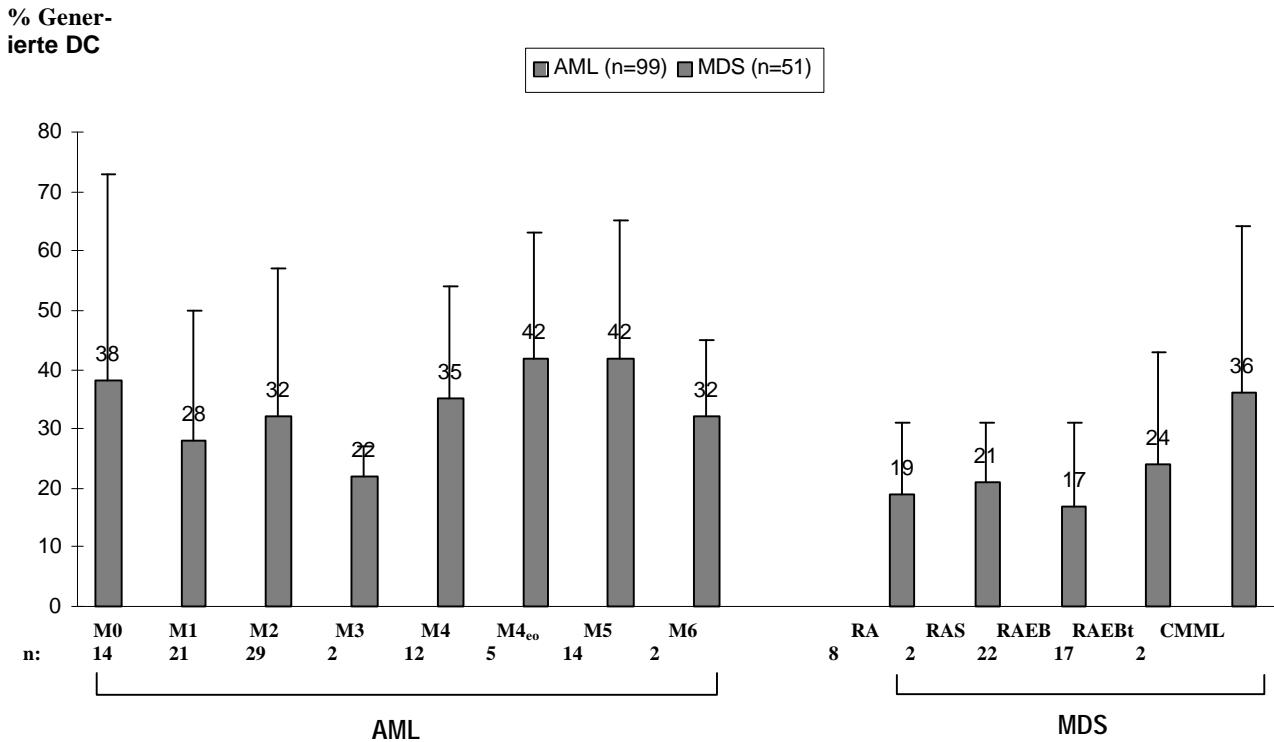
**Bild 37:** Vergleich des Standard-Mediums mit dem 'MCM-Mimic'-Medium bei der DC-Generierung.  
<sup>1</sup>= mit Coexpression von CD83



#### 4.3.2. Abhängigkeit der DC-Ernte vom FAB-Typ und der zytogenetischen Risikogruppe

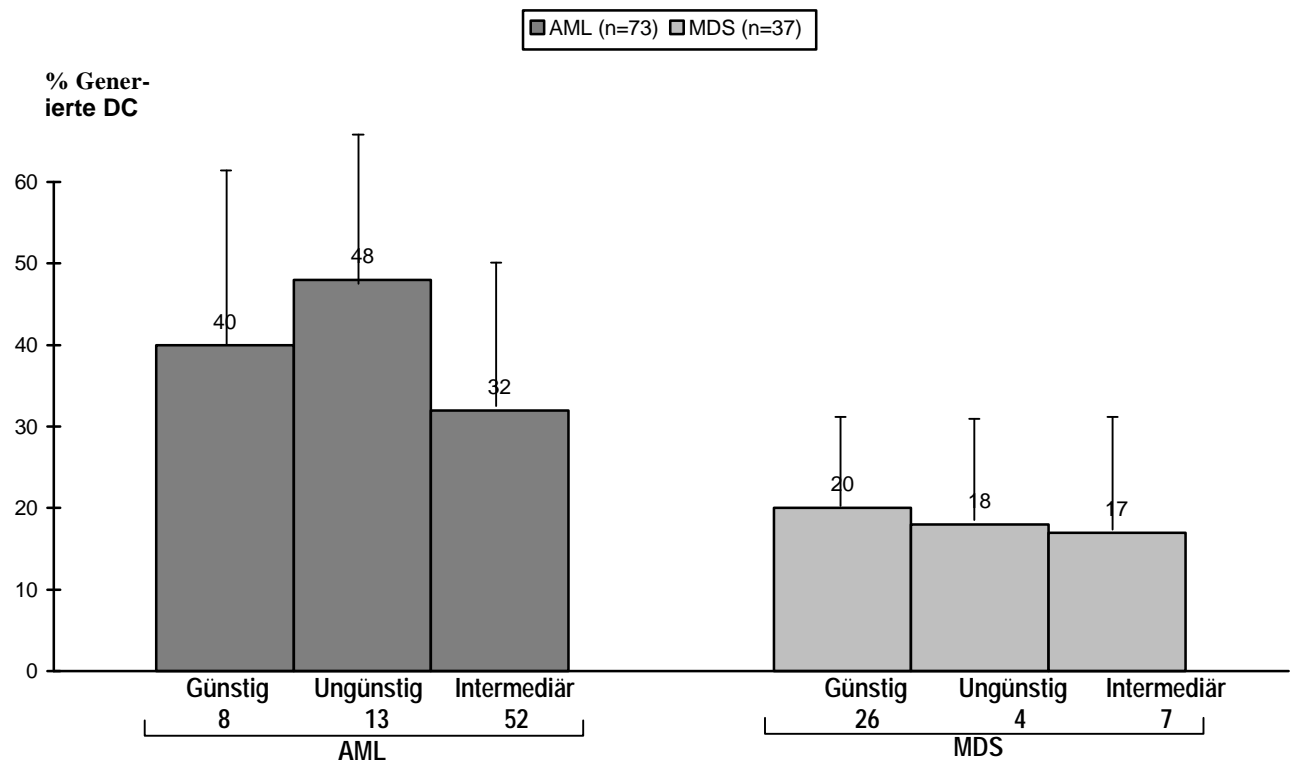
##### 4.3.2.1. Die DC-Ernte ist am höchsten bei monozytären FAB-Typen

Die DC-Ernte von AML- und MDS-Proben wurde nach einer Einteilung in verschiedene FAB-Typen und zytogenetische Risikogruppen analysiert. In die Berechnungen gingen nur Fälle mit Erstdiagnosestellung ein. Die DC-Ausbeute war mit durchschnittlich 30% DC in AML-Fällen und 20% DC in MDS-Fällen bei allen nicht-monozytären AML- und MDS-FAB-Typen vergleichbar. Die höchste DC-Anzahl wurde in den (myelo-)monozytären FAB-Klassen erreicht. Bei der AML waren es im Durchschnitt 40% DC, bei der CMML 36% DC (Bild 38). Dementsprechend waren auch in der AML-M4-Zelllinie Mutz3 hohe DC-Zahlen zu finden (siehe Bild 34).

**Bild 38:** Die DC-Ausbeute in den unterschiedlichen FAB-Klassen.

#### 4.3.2.2. Die DC-Ernte ist unabhängig von der zytogenetischen Risikogruppe

Keine Unterschiede gab es in den DC-Ernten entsprechend unterschiedlicher, zytogenetischer Risikogruppen zu finden (Bild 39).

**Bild 39:** Die DC-Ausbeute in den unterschiedlichen zytogenetischen Risikogruppen.

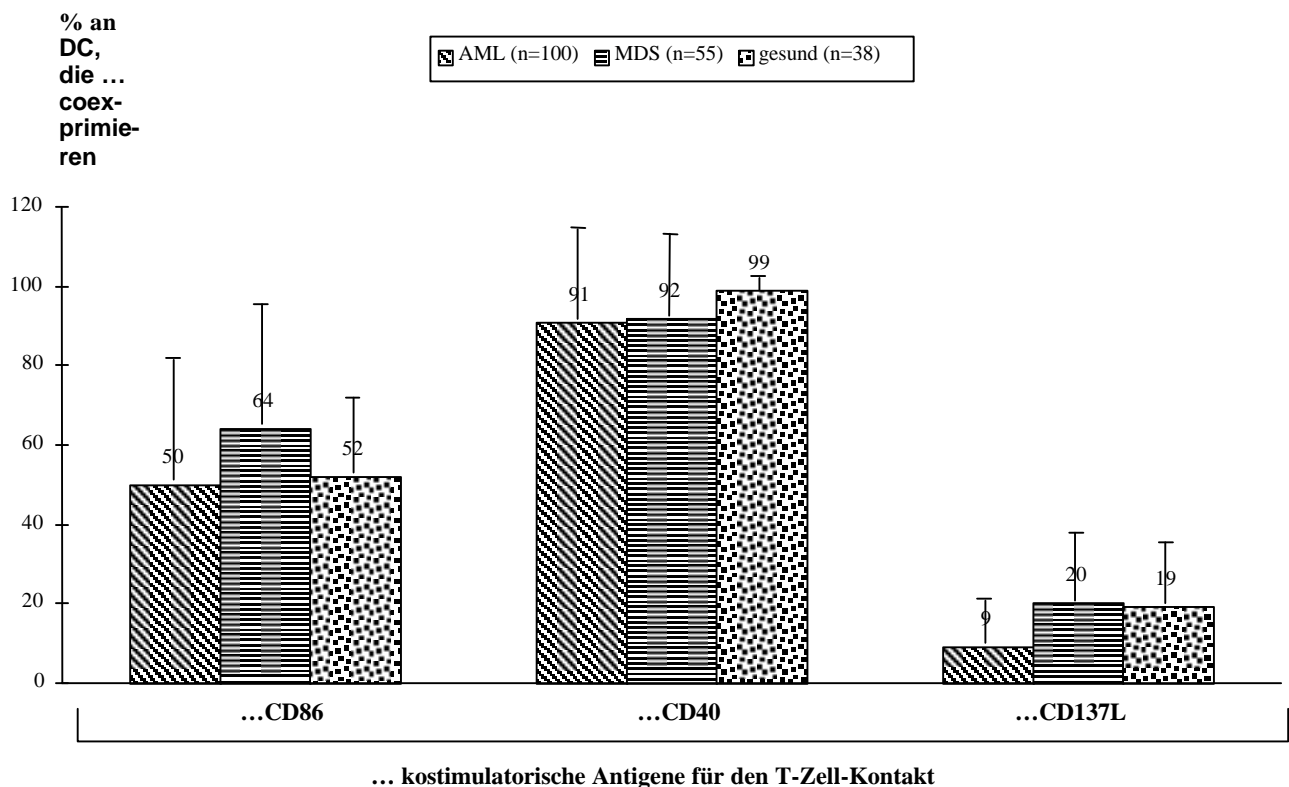
Zudem wurde analysiert, in welchen FAB-Subklassen der AML und MDS die Differenzierung von MNC zu DC eingeschränkt war. Dabei war festzustellen, dass in 6% der AML-Fälle, in 31% der MDS-Fälle und 8% der gesunden Probanden weniger als 10% DC generiert werden konnten. Bei der Untersuchung einer Abhängigkeit vom FAB-Typ fand man schließlich, dass in 9% der Fälle mit undifferenzierter AML (AML-M2), aber in keiner der übrigen FAB-Typen, und in 31% der Fälle mit RAEB oder RAEBt weniger als 10% DC generiert wurden.

#### 4.3.3. Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Lyse leukämischer DC durch zytotoxische T-Zellen

##### 4.3.3.1. DC und autologe T-Zellen von AML- und MDS-MNC exprimieren Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle für die DC-abhängige T-Zell-Aktivierung

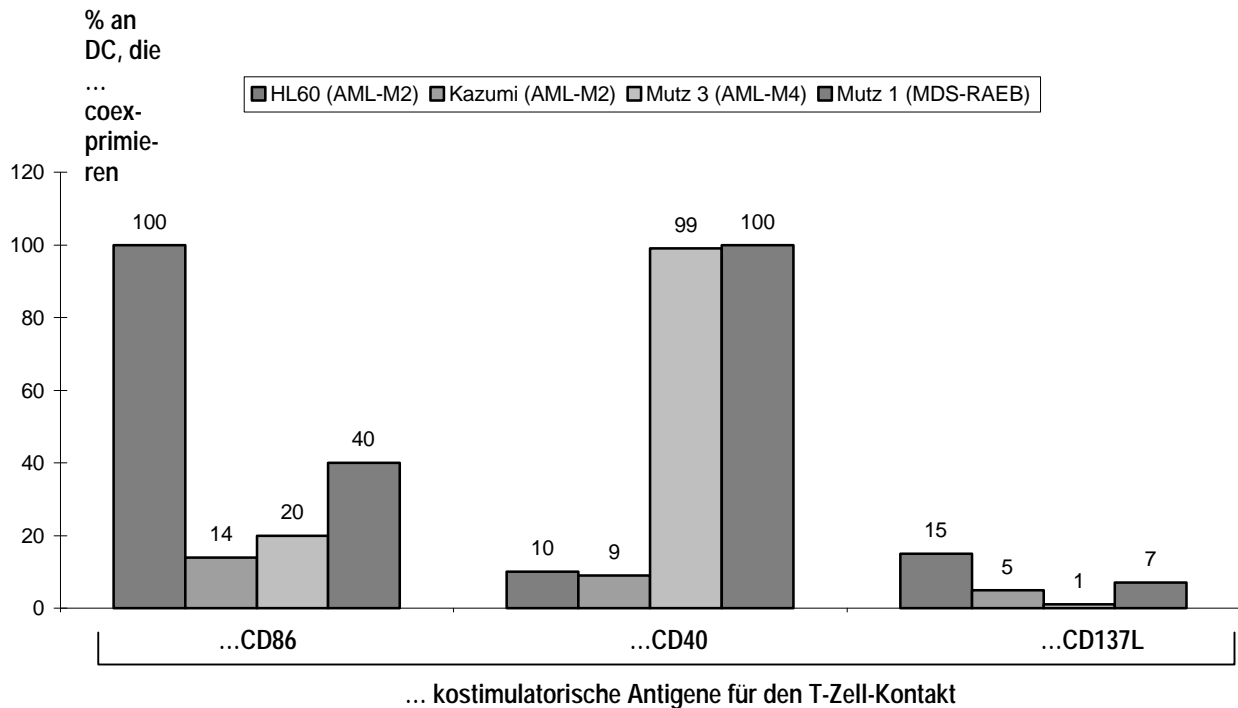
Die DC von den 100 AML-, 55 MDS- und 38 normalen Probanden wurden wiederum hinsichtlich ihrer Expression an Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Markern für den T-Zell-Kontakt (z.B. CD137L, CD40, CD86) untersucht und verglichen. Dabei bestätigte sich auch bei diesem größeren Patientenkollektiv, dass DC von gesunden sowie von AML- und MDS-Spendern vergleichbare Mengen kostimulatorischer Moleküle für den T-Zell-Kontakt coexprimieren (Bild 40).

**Bild 40:** DC gewonnen aus AML- und MDS-PB-MNC coexprimieren kostimulatorische Antigene für den T-Zell-Kontakt.



Ebenso konnte eine vergleichbare Expression an CD80 und CD1a in den AML-, MDS- und gesunden Proben nach der DC-Generierung gefunden werden. Auch auf den aus den Zelllinien generierten DC konnten diese kostimulatorischen und Adhäsionsmoleküle detektiert werden (Bild 41).

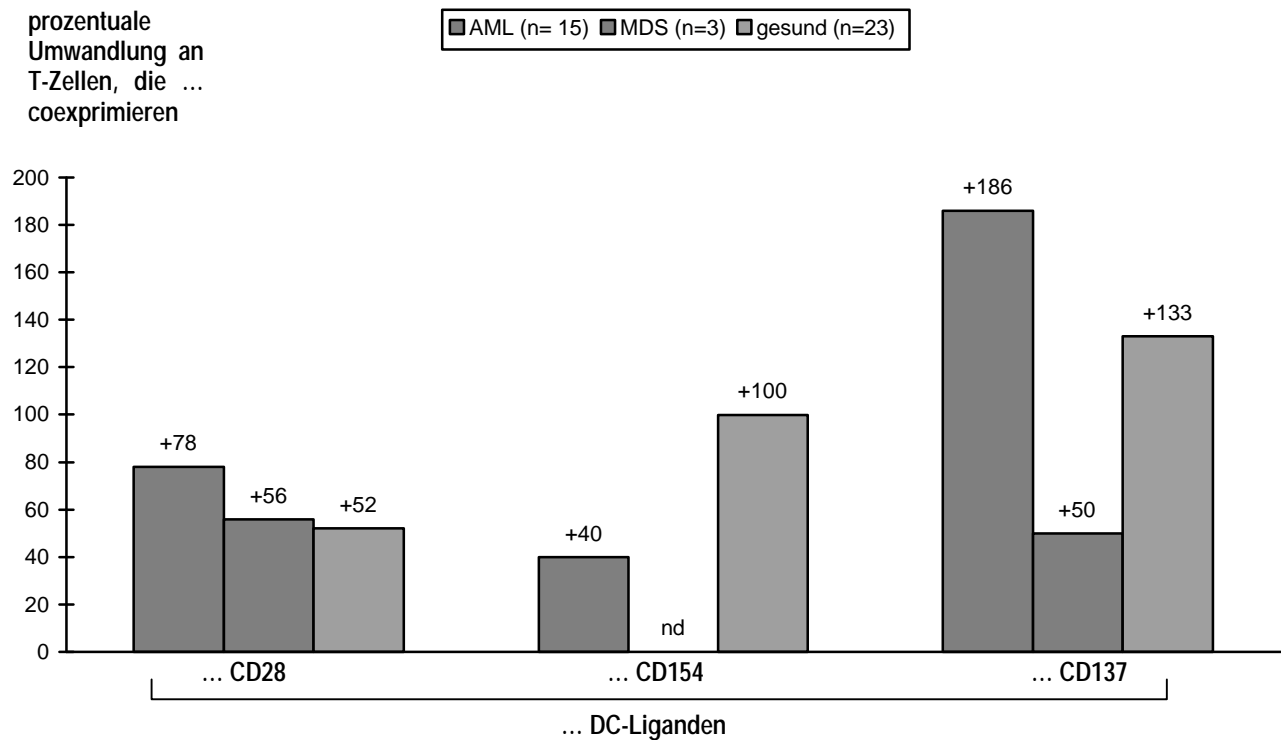
**Bild 41:** DC gewonnen aus AML- und MDS-Zelllinien coexpressieren kostimulatorische Antigene für den T-Zell-Kontakt.



Zusätzlich wurde analysiert, ob die DC-Liganden auf den T-Zellen, die mit autologen DC in einer MLR kultiviert wurden, ebenso hoch reguliert wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach einer 5tägigen MLR eine prozentuale Hochregulierung von 55-78% bezüglich des DC-Liganden CD28 (Ligand für CD86 und CD80), von 50-186% bezüglich des DC-Liganden CD137 (Ligand für BB4-L) und von 40-100% bezüglich des DC-Liganden CD154 auf den T-Zellen von 15 AML und 3 MDS Patienten statt gefunden hatte (Bild 42).

Das bedeutet insgesamt, dass die DC/T-Zell-Kontaktantigene sowohl auf DC als auch auf autologen T-Zellen bei leukämischen und gesunden Proben in vergleichbaren Mengen exprimiert und hoch reguliert wurden.

**Bild 42:** Hochregulierung von DC-Liganden und Migrationsmarkern auf T-Zellen nach autologem DC-Kontakt ([T<sub>auto</sub>+DC] vor der Kultur = 100%, [T<sub>auto</sub>+DC] nach 5tägiger Kultur = angegebene Differenz).

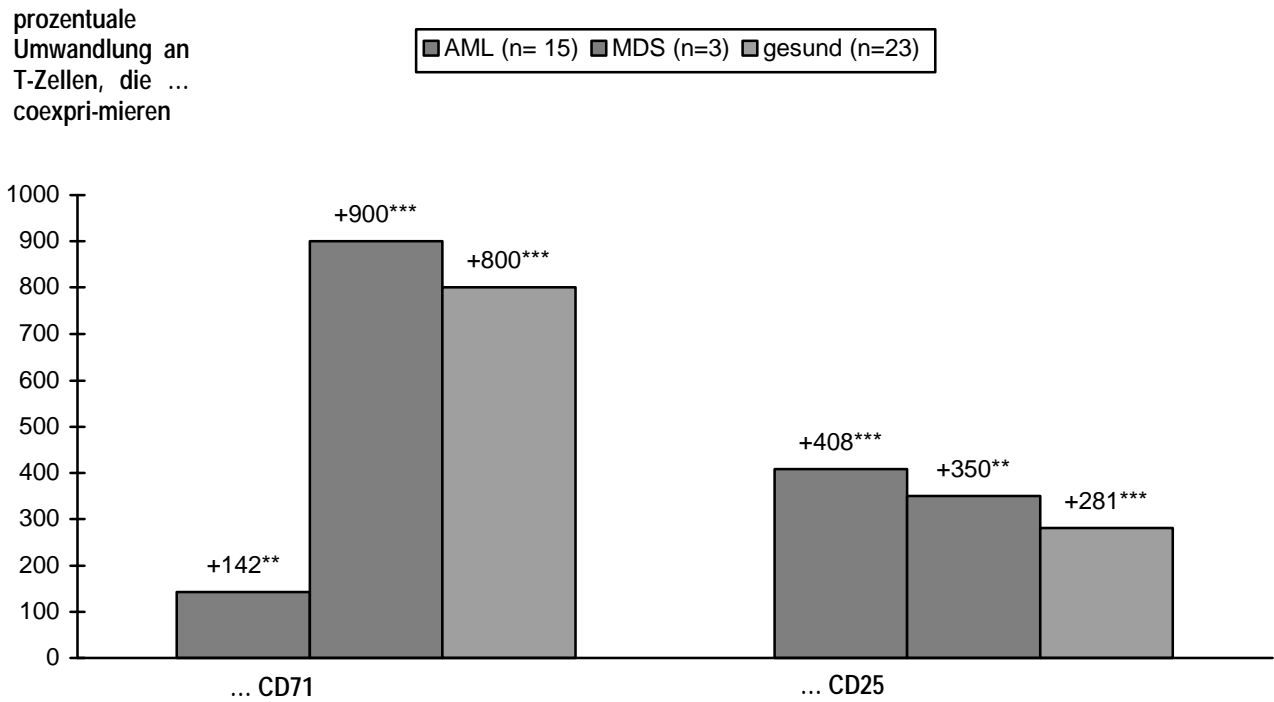


4.3.3.2. Die T-Zell-Aktivierung ist gekoppelt mit einer Zunahme der Proliferation und der migratorischen Antigene

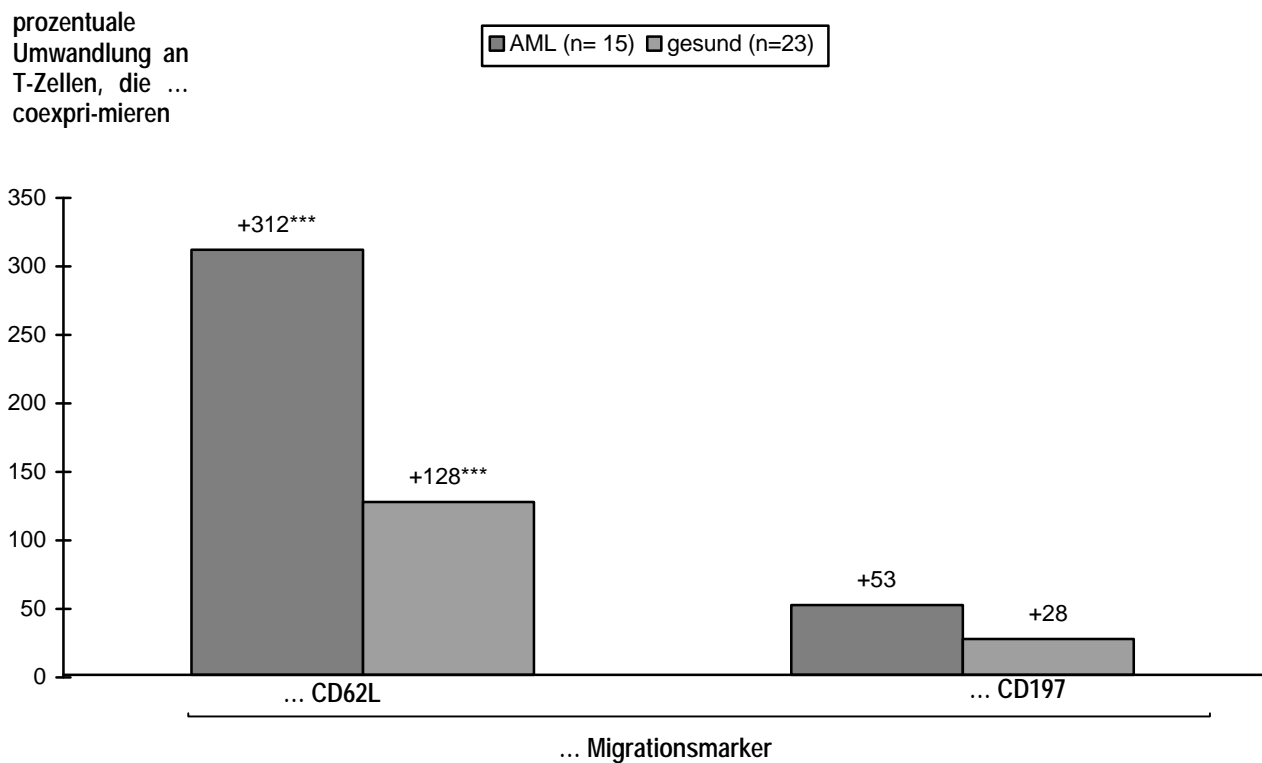
Auch in einem etwas größerem Patientenkollektiv (15 AML-, 3 MDS- und 23 gesunde Proben) konnte erneut bewiesen werden, dass bei DC-stimulierte T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten T-Zell-Kontrollen eine deutlich erhöhte Proliferation (zwischen 143-900%) nachzuweisen ist ( $p=0.0002$  bei MDS,  $p=0.009$  bei AML) (Bild 43).

Zusätzlich konnte herausgefunden werden, dass CD62L auf CCR7<sup>-</sup>- und CCR7<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert wird. Die Expression beider Marker auf T-Zellen ermöglicht die Wanderung in Lymphknoten. Die Daten zeigen, dass beide Migrationsantigene zwischen 28-312% nach autologem DC-Kontakt auf den T-Zellen von AML- und gesunden Probanden hochreguliert wurden (Bild 44).

**Bild 43:** T-Zellen proliferieren nach autologem DC-Kontakt ( $[T_{\text{auto}}+\text{DC}]$  vor der Kultur = 100%,  $[T_{\text{auto}}+\text{DC}]$  nach 5tägiger Kultur = angegebene Differenz). \*\* p 0.05. \*\*\* p 0.001.



**Bild 44:** T-Zellen regulieren nach autologem DC-Kontakt Migrationsmarker hoch. ( $[T_{\text{auto}}+\text{DC}]$  vor der Kultur = 100%,  $[T_{\text{auto}}+\text{DC}]$  nach 5tägiger Kultur = angegebene Differenz). \*\*\* p 0.001.

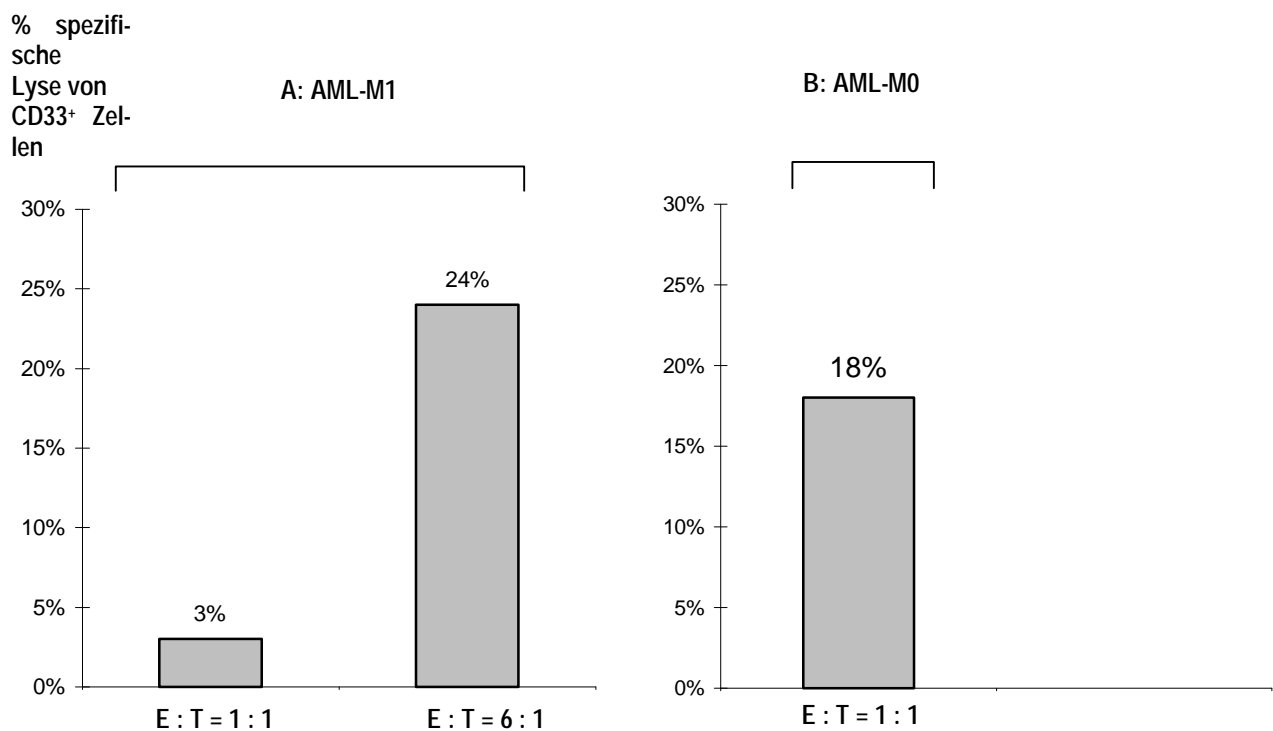




#### 4.3.3.3. Durch MLR aktivierte zytotoxische T-Zellen sind zur Lyse leukämischer DC fähig

Um die leukämisch-zytolytische Wirksamkeit von T-Zellen, die in einer MLR zusammen mit leukämischen DC generiert wurden, zu untersuchen, wurden diese zusammen mit autologen MNC eines Patienten mit AML-M1 kultiviert. Die MNC-Probe enthielt 50%  $CD33^+/CD117^+$  Blasten und das E:T-Verhältnis betrug 1:1 und 6:1. Nach 3 Stunden konnte eine spezifische Lyse von 3% bei einem E:T-Verhältnis von 1:1 und von 24% bei einem Verhältnis von 6:1 der  $CD33^+/CD117^+$  Blasten festgestellt werden (Bild 45A). In einem anderen Fall einer AML-M0, bei der die MNC-Probe 20%  $CD34^+$  Blasten enthielt, konnte im Vergleich zu Kontrollgruppen nach 3 Stunden eine spezifische Lyse von 18% der  $CD34^+$  Blasten durch autologe T-Zellen (E:T = 1:1) gemessen werden (Bild 45B).

**Bild 45:** T-Zellen, die in der Anwesenheit von leukämischen DC generiert wurden, lysieren autologe leukämische Zellen in einem Fall von AML-M1 (A) und in einem Fall von AML-M0 (B). ( $[T_{\text{auto}+DC}]$  vor der Kultur = 100%,  $[T_{\text{auto}+DC}]$  nach 5tägiger Kultur = angegebene Differenz). E Effektorzellen (aktivierte T-Zellen). T Zielzellen (target cells, leukämische MNC).



In vier anderen Fällen mit AML-M0, M2, M2 und M4, in denen eine MLR zusammen mit autologen T-Zellen und DC durchgeführt wurde, konnte keine spezifische Lyse nachgewiesen werden. In drei dieser Fälle konnte wiederum gezeigt werden, dass keine oder nur sehr wenige vitale T-Zellen für den Fluorolyse-Assay zur Verfügung standen. In dem verbleibenden Fall waren nur sehr kleine Mengen an leukämischen DC in der MLR zu finden.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass zytotoxische Subtypen dieser T-Zellen dazu fähig sind, spezifisch (autologe) leukämische Zellen zu lysieren, ohne autologe (unstimulierte) T-Zellen oder DC mit zu zerstören. Insgesamt machen diese Daten deutlich, dass leukämische DC und aktivierte T-Zellen eine zentrale Rolle spielen, um eine spezifische Lyse von autologen Blasten zu initiieren.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Immunantwort und Immuntherapie bei AML und MDS**

Sowohl bei AML- als auch bei MDS-Patienten besteht das Problem darin, dass die malignen Zellen keiner normalen Zelldifferenzierung und –reifung unterliegen (Hirai H, 2002). Da sich die leukämischen Zellen im ganzen Körper ausbreiten und verteilen, gestaltet es sich gerade bei diesen Patienten als sehr schwierig, den Krebs zu bekämpfen und zu besiegen (Appelbaum FR, 2003; Kurzrock R, 2002). Ca. 70% der mit konventionellen Therapien erfolgreich behandelten AML-Patienten (CR in 50-80 % der Fälle) werden in den darauffolgenden zwei Jahren rückfällig, und ca. 20-25% der MDS-Patienten aus mittleren und Hochrisikogruppen antworten nur kurzzeitig auf Chemotherapien (Behringer B, 2003; Aul C, 2002; Buechner T, 2003; Deeg HJ, 2002; Leopold LH, 2002). Deshalb stellen immuntherapeutische Strategien eine große Hoffnung in der Leukämiebekämpfung dar. Neuere immuntherapeutische Strategien mit CD33-Antikörper-Radioimmunokonjugaten, Immunotoxinen und bi- und trispezifischen Antikörpern, sind momentan nur in Fällen mit einer hohen Expression von tumorassoziierten Antigenen (TAA) vielversprechend (Tsimberidou A, 2003; Bunjes D, 2002; Trail PA, 2003; Balaian L, 2001; Song LP, 2003; Van der Bruggen P, 1991). Eine ungenügende Expression an kostimulatorischen Molekülen, an MHC-Molekülen und an TAA sind aber gerade die Hauptgründe für die unwirksame Immunantwort bei onkologischen Krankheiten. Dazu kommen noch gestörte Apoptosemechanismen (Restifo NP, 1993). Darum nimmt man an, dass DC in der Zukunft bei der Immuntherapie von AML- und MDS-Patienten eine große Rolle spielen könnten, da sie als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) überall im Körper vorkommen, eine große Migrations- und T-Zell-Aktivierungsfähigkeit besitzen, zudem leicht aus leukämischen Zellquellen generiert werden können und bis jetzt in klinischen Studien sehr gut vertragen wurden (Cella M, 1997; Brossart P, 1998; Schuler G, 2003; Nestle FO, 2001). Von entscheidender Bedeutung ist dabei hauptsächlich, dass die DC-Generierung aus leukämischen Zellquellen möglicherweise ein Schlüssel dazu ist, leukämische Antigene für immunreaktive Zellen wieder erkennbar zu machen. Bei der Therapie von soliden Tumoren sind DC – vor allem gekoppelt mit Tumorantigenen – schon länger in klinischer Erprobung (Tabelle 9) (Adler EM, 2004).

### **5.2. In vitro DC-Generierungsmethoden**

#### **5.2.1. Zellquellen für die DC-Generierung**

DC können aus gesunden und leukämischen PB-Monzyten, aus CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen oder aus MNC generiert werden (Ardavin C, 2001; Wang L, 2000; Strobl H, 1997; Caux C, 1997). Die meisten DC-

Forschungsgruppen wählten totale MNC-Fraktionen als Zellquelle für die Generierung leukämischer DC, aber einige auch T-Zell-depletierte MNC-Fraktionen oder adhärenente Zellfraktionen (Luft T, 2002; Suen Y, 2001; Charbonnier A, 1999; Brossart P, 1998). Die Studie von Suen et al. ist dabei die einzige, die wie in der hier vorliegenden Arbeit, die DC-Ernte und die DC-Charakteristika von adhärenenten und totalen MNC-Fraktionen verglichen hat. Auch in dieser Methodenstudie wurden keine Unterschiede hinsichtlich der DC-Ausbeute und des Oberflächenantigen-Profiles bei AML-Patienten gefunden (Suen Y, 2001). Ebenso wie in einer Studie von Bai et al. wurde in dieser Arbeit auch die DC-Ausbeute aus PB-MNC-Fraktionen mit der aus KM-MNC-Fraktionen verglichen. Während Bai et al. eine 7-25 mal höhere DC-Ernte (obwohl mit ähnlichem Phänotyp) bei gesunden KM-Proben im Vergleich zu gesunden PB-Proben feststellten, wurden in dieser Arbeit ähnliche DC-Mengen bei AML- und MDS-PB im Vergleich zu AML- und MDS-KM gefunden (Bai L, 2002). Um diese Ergebnisse zu stützen lag uns vor allem auch daran, die DC-Ernten von PB- und KM-Proben mit einer vergleichbaren Anzahl an leukämischen Zellen in den Zellquellen zu untersuchen. Deshalb wurden nur PB-/KM-Probenpaare mit vergleichbaren Blastenmengen und FAB-Typen in die Studie eingeschlossen. Unter diesen Voraussetzungen wurde festgestellt, dass aus PB- und KM-Proben eine ähnliche DC-Ausbeute hervorgebracht werden kann. Die Zellquellen gesunder PB- und KM-Proben in der Studie von Bai et al. enthielten eventuell unterschiedliche Mengen an DC-Vorläuferzellen. Außerdem konnten in dieser Arbeit DC generiert werden, die sowohl bei PB- als auch bei KM-Proben Blastenantigene coexprimierten. Dies ließe darauf schließen, dass leukämische DC gleichermaßen von PB- und KM-Proben – vorausgesetzt sie enthalten leukämische Zellen - kultiviert werden können. Dagegen können größere Mengen gesunder DC besser von gesunden KM- als von gesunden PB-Proben gewonnen und für weitere Experimente verwendet werden (Schuler G, 2003). Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit die DC-Ernten von aufgetauten mit frischen Zellproben verglichen und herausgefunden, dass DC zwar von zuvor eingefrorenen MNC-Fraktionen generiert werden können, jedoch einen geringeren Anteil an vitalen DC aufweisen. Deshalb sollten die Studien überdacht werden, die eine Methode für das Einfrieren von reifen DC für den klinischen Einsatz vorschlagen (Feuerstein B, 2000). Dennoch gibt es auch Studien, die von unveränderter Funktion der DC nach Kryokonservierung berichten (Westermann J, 2003). Ein unerwartetes Ergebnis war die signifikant reduzierte DC-Ausbeute und -Vitalität bei T-Zell-depletierten MNC-Fraktionen als DC-Quelle. Sogar ein Durchlauf von Zellen durch die magnetischen Säulen ohne Antikörper-konjugierte `Beads` resultierte in einer reduzierten DC-Ernte, was die Vermutung nahe legt, dass dendritische Vorläuferzellen auf magnetische Einflüsse empfindlich reagieren. Dagegen zeigten T-Zellen, die über magnetische Säulen selektioniert wurden, keine eingeschränkte Funktion in den gemischten Lymphozytenreaktionen (MLR). Anhand dieser Ergebnisse wird deshalb die Verwendung MACS-selektionierter T-Zellen (z.B. für MLR-Experimente), aber nicht die Verwendung von T-Zell-depletierten MNC-Fraktionen als DC-Quelle empfohlen. Andere Autoren legten in gleicher Weise die Verwendung MACS-selektionierter T-Zellen für die MLR nahe, aber gaben

in keiner Weise Empfehlungen für die Verwendung von T-Zell-depletierten MNC-Fraktionen als DC-Quelle (Stein GM, 2002; Charbonnier A, 1999). Obwohl in diesem Fall wohl eindeutig methodisch bedingt, kommen als weiterer Grund für den Verlust an vitalen DC im Allgemeinen auch immer induzierte Apoptosemechanismen durch Tumorzellen in Frage (Matsue H, 1999).

### 5.2.2. Kulturmedien und Zellkulturzusätze beeinflussen die DC-Ernte

Auch andere Kulturbedingungen für die Generierung von DC differieren in der Literatur stark. Die Kulturzeiten für leukämische Zellen schwanken beispielsweise meist zwischen 7 und 14 Tagen (Choudhury BA, 1999; Luft T, 2002; Loudovaris M, 2001; Zheng Z, 2000; Houtenbos I, 2003). Allerdings stehen hinter diesen Studien unterschiedlichste inhaltliche Ansätze wie z.B. variierende Zellquellen oder variierende Zytokin-Zugaben zu den auf GM-CSF, IL-4 und TNF $\alpha$  basierenden Kulturmedien. Einige Autoren empfehlen aber auch die Kultivierung leukämischer DC für 3-5 Tage bei auf GM-CSF + FL + SCF + TNF $\alpha$  oder auf GM-CSF + IL-4 + IFN $\gamma$  basierenden DC-Kulturmedien (Panoskaltis N, 2002; Dauer M, 2003). Andere wiederum favorisieren eine Inkubationszeit zwischen 10-14 Tagen (Woiciechowsky A, 2001; Luft T, 2002). Deshalb wurde in dieser Arbeit die DC-Ernte morphologisch und immunphänotypisch nach 7tägiger und 14tägiger Kulturzeit verglichen und festgestellt, dass bei gesunden Proben die höchste DC-Ausbeute schon nach 7 Tagen Inkubationszeit gefunden, während bei AML- und MDS-Proben höhere DC-Mengen erst nach 14tägiger Kulturzeit geerntet werden konnten. Die Anteil an reifen DC waren jedoch nach 7 und 14tägiger Kulturzeit ähnlich.

Die Kulturmedien in den DC-Generierungsstudien unterscheiden sich ebenfalls beträchtlich. Das häufigste Standardmedium ist das RPMI-Medium, das entweder mit 20%igem FCS (Woiciechowsky A, 2001; Caux C, 1997; Westers TM, 2003) oder mit autologem Humanserum angereichert wird (Waclawick M, 2001; Harrison BD, 2001). Zu den FCS-freien Medien, die bereits für DC-Generierungsstudien verwendet wurden, gehören StemSpan (Stemcell Technology, Houtenbos I, 2003; Bruserud O, 2000), CellGro (CellGenix, Houtenbos I, 2003), Aim V (Gibco, Choudhury BA, 1999) und Xvivo (Bio-Whittaker, Strobl H, 1997; Nguyen XD, 2003). Die Verwendung von Medien, die FCS, BSA oder allogene Seren enthalten, sollte vermieden werden, da diese anaphylaktische Reaktionen verursachen können (Mackensen A, 2000 (II)). Dagegen kann die Verwendung von autologen Seren eine Hemmung der DC-Reifung *in vitro* induzieren (Harrison BD, 2001). Dieser inhibitorische Effekt konnte auch in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, und war auch der Grund dafür, warum entschieden wurde, den DC-Kulturen kein autologes Plasma beizuzufügen. Wegen der angesprochenen Gefahr anaphylaktischer Reaktionen, bevorzugen die meisten Forscher ein serumfreies Kulturmedium zur DC-Generierung. In der Studie von Houtenbos et al. wurde mit 20%igem FCS angereichertes RPMI-Medium mit den StemSpan- und CellGro-Medien verglichen und herausgefunden, dass sowohl in serumfreiem als auch in mit Serum angereichertem Medium vergleichbare Mengen an DC

kultiviert werden können (Houtenbos I, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei serumfreien Medien CellGro und Xvivo miteinander verglichen und ebenfalls keine Unterschiede in der DC-Ausbeute und in den DC-Charakteristika festgestellt. Aus Kostengründen wurde entschieden, für die DC-Arbeit Xvivo für die weitere DC-Kultivierung zu verwenden.

Bis jetzt besteht auch kein einheitlicher Konsens hinsichtlich der Zugabe von unterschiedlichen Zytokinen und Zellkulturzusätzen zu den DC-Kultursystemen zur Unterstützung der DC-Differenzierung und –Reifung von AML-Blasten. Normalerweise enthalten DC-Medien GM-CSF zur granulopoetischen Makrophagendifferenzierung und IL-4 und TNF $\alpha$  zur direkten DC-Differenzierung (Koehler T, 2000). Zusätzlich wurden zu GM-CSF und TNF $\alpha$  IL-4 oder SCF + TGF $\beta$  oder IL-4 + SCF + TGF $\beta$  + IL-13 + FL oder CD40L oder IL-4 + SCF oder FL als ergänzende Zytokine getestet (Oehler L, 2000; Nguyen XD, 2003; Boyer MW, 2000; Koski GK, 1999). Manche Autoren beschreiben die DC-Differenzierung aber auch ohne die Zugabe von TNF $\alpha$ . Beispiele hierfür sind die Verwendung von GM-CSF, IL-4 und CD40L, von GM-CSF, IL-4 und IL-2 oder von IL-4 und Calcium-Ionophore für die DC-Generierung (Mohty M, 2002; Zhong RK, 2002; Westers TM, 2003; Osada T, 2002). Einige Forschungsgruppen halten wiederum die Zugabe von IL-4 als unabdingbar für die DC-Kultivierung, da sie die Differenzierung zu Makrophagen verhindere (Wang L, 2000; Lutz MB, 2002 (II)), wobei andere Gruppen auf die Verwendung von IL-4 zur DC-Kultivierung verzichten (Panoskaltsis N, 2002). Aber selbst bei völligem Verzicht auf Zytokinzusätze soll eine potente Immunantwort induzierbar sein (Banat GA, 2004). CD40L wird in DC-Kultivierungsstudien gerne verwendet (Brossart P, 1998), weil der Anteil an DC, der entlang des `Fas-ligation-pathway` stirbt, durch CD40L unempfindlich gegenüber diesem Apoptosemechanismus gemacht werden kann (Björck P, 1997; Aldinucci D, 2002). Die Verwendung von Retinolsäure konnte in einer Studie von Geary SM et al. 1996 den Beweis einer monozytären Differenzierung bei HL-60-AML-M3-Leukämiezellen mit einer darauffolgenden erhöhten immunstimulatorischen Fähigkeit in der gemischten Lymphozytenreaktion erbringen, was die Wirksamkeit von ATRA bei der akuten Promyelozytenleukämie noch einmal hervorhebt und verdeutlicht, dass zur DC-Differenzierung bei jeder FAB-Subklasse evtl. andere Zytokine und Zellkulturzusätze verwendet werden müssen (Geary SM, 1996). In einer Veröffentlichung von Weigel BJ et al. wurde ebenfalls ein immunstimulatorisches Agens (Cytosin-Phosphorothioate-Guanin-Oligodeoxynukleotid = CpGs) als Zellkulturzusatz bei der DC-Generierung aus Meerschweinchen-KM-Zellen erfolgreich eingesetzt, weshalb eine dementsprechende Verwendung durchaus überdacht werden könnte (Weigel BJ, 2002). Auch die Verwendung von Glukokortikoiden zur DC-Generierung könnte eine Möglichkeit darstellen, da diese einen positiven Einfluss auf die DC-Reifung haben sollen. Allerdings sollen sie ebenso die Entwicklung von IL-10-produzierenden T-Zellen fördern (Franchimont D, 2004). Ebenfalls kürzlich entdeckt wurde LIGHT, ein geklontes, neues Zytokin aus der TNF-Familie, das nachweislich positiv zur DC-Reifung und zur Sekretion der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  v.a. bei DC aus MDS-Monozyten beiträgt. Ein ähnlicher Effekt war auch bei der Zugabe von CD40L nachzuweisen (Zou

GM, 2004).

Mehrere Methoden sind auch zur DC-Kultivierung aus Monozyten beschrieben. Kultursysteme variieren neben den Standardzytokinen GM-CSF, TNF $\alpha$  + IL-4 zwischen der zusätzlichen Gabe von PGE $_2$  + IL-6 + IL-1 $\beta$ , PGE $_2$  + IL-6 + IL-1 $\beta$  + CD40L und TGF $\beta$  + FLT3L (Moldenhauer A, 2003; Choi GS, 2000; Scandella E, 2002; Bracho F, 2003). Aber auch hier gibt es Fälle, bei denen auf die Beigabe von TNF $\alpha$  oder von IL-4 verzichtet wurde (Wong EC, 2001; Zech NH, 2003).

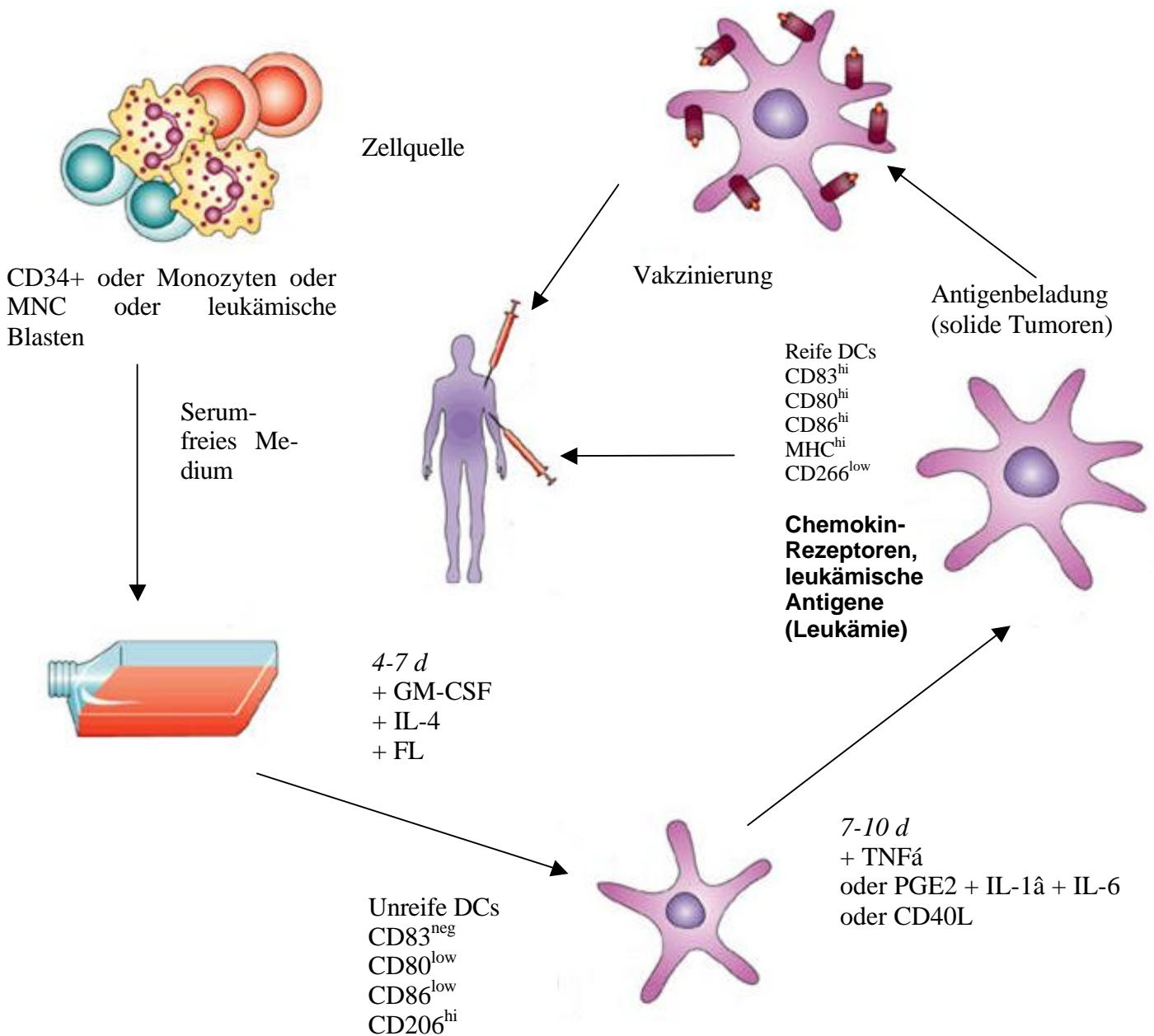
Auch bei anderen leukämischen Erkrankungen ist die Datenlage hinsichtlich der DC-Generierung ähnlich uneinheitlich. So wurden DC aus CML-Blasten beispielsweise mal mit dem gängigen Zytokinmix GM-CSF, TNF $\alpha$  und IL-4, ein anderes Mal mit IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und PGE $_2$  kultiviert (Choudhury A, 1997; Eisendle K, 2003).

Viele dieser Kulturbedingungen wurden allerdings nicht parallel getestet. So ist weder klar, welche Methode die Beste für die Generierung reifer leukämischer DC bei AML ist, noch welcher Stimulus für die DC-Reifung der Wirkungsvollste ist, um einen antileukämischen Effekt oder eine zytotoxische T-Zell-Antitumorantwort zu induzieren (Schuler G, 2003). Darüber hinaus gibt es kaum Erfahrungen für die DC-Generierung aus MDS-MNC. In einer Veröffentlichung von Vuckovic S et al. zeigten CMML-Monozyten nach Kultivierung mit GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$  und LPS typische DC-Eigenschaften (Vuckovic S, 1999). Da hierbei allerdings nur monozytäre MDS-Differenzierungen (CMML) eingeschlossen und als Zellquelle zudem nur Monozyten verwendet wurden, ist diese Studie nicht als repräsentativ anzusehen.

Da die meisten Forscher GM-CSF, TNF $\alpha$  und IL-4 für die Kultivierung von DC aus leukämischen Blasten wählten und in ihren Studien auf sehr ähnliche DC-Ergebnisse kamen (Harrison BD, 2001; Narita M, 2001; Cignetti A, 1999), wurde entschieden für diese Arbeit ein DC-Standardmedium zu verwenden, das ebenfalls GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$  und zusätzlich FL enthielt (Bild 46).

Die Zugabe von FL oder SCF schien die DC-Ernte in anderen Studien zu erhöhen (Woiciechowsky A, 2001; Panoskaltsis N, 2002), was auch durch diese Arbeit bestätigt werden konnte. Woiciechowsky et al. konnten eine durchschnittlich 1.5fache Erhöhung der absoluten DC-Ernte feststellen, während in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe von FL die DC-Ernte von AML- und MDS-Proben durchschnittlich sogar zwischen 1.8 und zweifach gesteigert werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zwar zu keinem einheitlichen Konsens hinsichtlich der DC-Kultivierung aus leukämischen Blasten, bekräftigen jedoch abermals, dass mit der gängigen Methode 'Standardmedium + GM-CSF + IL-4 + TNF $\alpha$  + FL' reife DC sowohl aus AML-MNC als auch aus MDS-MNC generiert werden können. Diese Datenlage konnte auch durch die Verwendung von Zelllinien als DC-Quelle bestätigt werden.

**Bild 46:** DC-Standardgenerierungsmethode. hi hoch (,high'). low niedrig. d Tage (,days'). neg negativ.



### 5.3. Vitale, reife, leukämische DC können unter serumfreien Kulturbedingungen generiert werden und die Umwandlung der MNC zu DC erhöht die T-Zell-Aktivierung bei AML und MDS

Viele Forschungsgruppen generierten und charakterisierten DC von AML-Patienten somit unter verschiedensten Kulturbedingungen (siehe obige Referenzen). Wie in den genannten Studien konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass DC aus AML- und MDS-MNC unter serumfreien



Kulturbedingungen generiert werden können, und dass diese DC kostimulatorische Antigene für den T-Zell-Kontakt und Reifemarker coexprimieren (z.B. Caux C, 1997; Choudhury BA, 1999; Woiciechowsky A, 2001). Die Hochregulierung von Reifemarkern (z.B. CD83, CD86, CD14<sup>+</sup>) und T-Zell-Kontaktmolekülen (z.B. CD40, CD86, CD80, CD1a, CD137L) ist ein notwendiger Prozess während der DC-Differenzierung, der auch schon von anderen Autoren beschrieben wurde (Caux C, 1992; Caux C, 1997; Li L, 2003; De Vries IJ, 2002; Kufner S, 2005 (I, II und III); Charbonnier A, 1999; Blazar BR, 2001). Um unreife DC zu detektieren, wurden einige der PB- und KM-Proben auch mit CD209-markierten monoklonalen Antikörpern inkubiert. Auszählungen zeigten dann, dass die meisten der DC bei AML-, MDS- und gesunden Proben negativ für den Marker CD209 waren, was sie als gut differenzierte DC identifizierte. Neben seiner Rolle als Unreifemarker für DC, scheint CD209 außerdem an Adhäsionsprozessen und DC-T-Zell-Interaktionen beteiligt zu sein, was CD209 insgesamt zu einem sehr nützlichen Marker für DC-Generierungsstudien macht (Relloso M, 2002; Van Kooyk Y, 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die meisten DC CD40 oder CD86 exprimierten, aber nur 10-15 % der DC CD137L coexprimierten. Jedoch war das DC-Expressionsprofil dieser Antigene im Vergleich zu gesunden Kontrollproben ähnlich. Als man in dieser Arbeit zudem die Reaktionen von autologen T-Zellen, die gemeinsam mit DC in einer MLR kultiviert wurden, beobachtete, wurde festgestellt, dass auch die DC-Liganden auf den T-Zellen für die genannten kostimulatorischen Antigene hinaufreguliert wurden, was zu der Annahme führte, dass die Kontaktmolekülpaare auf beiden Zellen, also sowohl auf den DC als auch auf den T-Zellen exprimiert werden.

#### **5.4. Von AML- und MDS-MNC generierte DC beinhalten eine große Anzahl an DC leukämischen Ursprungs, die leukämische Marker zusammen mit DC-Antigenen exprimieren**

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die aus AML- und MDS-MNC generierten DC leukämische Antigene oder klonale Marker coexprimieren, was die schon von anderen Autoren veröffentlichte Datenlage bestätigte (z.B. Nguyen XD, 2003; Strobl H, 1997; Woiciechowsky A, 2001). Santiago-Schwarz et al. waren dabei die ersten, die im Jahre 1994 beobachteten, dass aus Monozyten generierte DC von AML-Patienten einen leukämischen Monoblasten-Phänotyp exprimierten (Santiago-Schwarz F, 1994 (II)). Andere Autoren bekräftigten diese Daten, indem sie mittels Western-Blot demonstrieren konnten, dass DC, die von einem AML-Patienten generiert wurden, der eine inv(16)-Aberration trug, auch nach der Kultivierung das Leukämie-assoziierte CFBF-MYH11-Protein exprimierten, oder indem sie bei 11q23-aberranten AML-Fällen eine Coexpression von DC-Antigenen mit dem Proteinprodukt 7.1 zeigen konnten (Choudhury BA, 1999; Stripecke R, 2002; Kufner S, 2005 (I und II)). Außerdem konnte der leukämische Ursprung von DC in AML-Fällen mit einer klonalen Chromosomenaberration sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Veröffentlichungen durch die Detektion des klonalen Markers in den kultivierten DC bewiesen werden (Choudhury BA, 1999; Woicie-

chowsky A, 2001; Harrison BD, 2001; Strobl H, 1997). In dieser Arbeit konnten numerische Chromosomenaberrationen in CD1a<sup>+</sup>DC bei einem Fall von AML-M6, bei einem Fall von AML-M4 und bei zwei Fällen von sAML nachgewiesen werden. Vor allem bei den DC, die aus MDS-MNC - welche im Vergleich zur AML durch eine niedrigere Blastenzahl charakterisiert sind - generiert wurden, stand der Beweis noch aus, dass diese Zellen wirklich von den klonalen Vorläuferzellen abstammen. In der vorliegenden Arbeit konnten bei vier MDS-Fällen mit Chromosomenanomalie auch nach der Kultivierung die jeweiligen Aberrationen in den CD1a<sup>+</sup>DC gefunden werden, was bewies, dass DC konstant aus klonalen MDS-Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen generiert werden können, die leukämische und DC-Charakteristika präsentieren. Ein Beweis für den leukämischen Ursprung von MDS-DC wurde bis jetzt in diesem Ausmaße nur selten erbracht. In einer Veröffentlichung von Rigolin et al. wird die DC-Generierung bei 8 MDS-Patienten in FCS-Medium beschrieben, wobei eine defekte Antigen-Aufnahme und Antigenpräsentation dieser DC zu allogenen T-Zellen beobachtet wurde (Rigolin GM, 1999), was die schlechte Immunabwehr von MDS-Patienten bei Infektionen erklären könnte. In zwei dieser Fälle konnte auch eine klonale Herkunft der DC nachgewiesen werden, aber eine Untersuchung des T-Zell-aktivierenden Potentials dieser Zellen blieb die Studie schuldig. Ein anderer Autor untersuchte die Hautschichten von einem MDS-Patienten bezüglich der Dichte und Morphologie ihrer CD1a<sup>+</sup> Langerhanszellen. Ein Vergleich dieser Daten mit denen von gesunden Probanden zeigte, dass die DC von MDS-Patienten durch eine abnormale Morphologie gekennzeichnet waren, was wiederum die schlechte immunreaktive Funktion dieser Langerhanszellen widerspiegeln könnte (Sepp N, 1991).

FISH-IPA-Analysen ermöglichen aber nicht nur eine qualitative Detektion von klonalen Markern in DC, sondern auch eine quantitative Bestimmung, wie viele Zellen DC- und/oder klonale Marker exprimieren. Ebenso können dementsprechende quantitative Berechnungen bei AML-Fällen durchgeführt werden, die spezielle Blastenmarker wie z.B. das Proteinprodukt 7.1 zusammen mit DC-Antigenen coexprimieren. Ein interessantes Ergebnis war bei diesen Untersuchungen die Tatsache, dass quantitativ wohl nicht alle klonalen bzw. leukämischen Zellen bei AML und MDS zu leukämischen DC umgewandelt werden konnten, sondern dass in der DC-Kultur klonale bzw. leukämische Zellen verbleiben. Darüber hinaus konnten diese Daten bei allen AML- und MDS-Fällen mit FACS-nachweisbaren Blastenpopulationen in der MNC-Probe vor der Kultur durch die Verwendung markierter Antikörper gegen CD33, CD56, CD117 (bei AML) oder CD34 und CD117 (bei MDS) bekräftigt werden. Die genannten Antigene werden normalerweise auf AML- oder MDS-Vorläuferzellen bzw. Blasten exprimiert (Upham JW, 2000; Raspadori D, 2002; Cascavilla N, 1998; Re F, 2002). Nach der DC-Generierung waren aber nur auf 50-70% der DC diese Blastenantigene zusammen mit DC-Markern coexprimiert, was obig beschriebene Daten bestätigen könnte, dass nicht jede klonale/leukämische Zelle zu einer leukämischen DC umgewandelt wird. Die dennoch hohe DC-Gesamtausbeute in den Versuchen ließe sich nun dadurch erklären, dass auch gesunde CD34<sup>+</sup>- und CD14<sup>+</sup>-Zellen als DC-Quelle dienen. Tatsächlich konnten in dieser Arbeit auch AML- und MDS-

CD1a<sup>+</sup> DC ohne leukämische Herkunft generiert werden. Andererseits wäre es auch möglich, dass nicht alle leukämischen Blasten zu 100% positiv für Blastenantigene sind, und dadurch auch die umgewandelten, leukämischen DC diese Blastenmarker nicht coexprimieren.

Für zukünftige Vakzinierungsversuche mit DC sind diese Erkenntnisse von großer Bedeutung: Einerseits muss sichergestellt werden, dass keine naive Blasten retransfundiert werden, ferner könnte die Effizienz der Vakzinierung unter der Vermischung mit DC nicht-leukämischer Herkunft gemindert werden oder möglicherweise anders gerichtete Immunreaktionen zur Folge haben. Demnach müsste eine positive Selektion der DC<sub>leu</sub> oder eine funktionelle Testung der spezifischen antileukämischen Wirksamkeit der generierten DC einer Vakzinierung am Patienten vorausgehen.

In diesem Fall wäre ein schneller, einfacher klinischer Test zur Identifizierung der generierten DC (leukämisch vs. nicht-leukämisch) von Vorteil. Neuere, momentan in Erprobung stehende Methoden zum Nachweis des leukämischen Ursprungs von generierten DC sind z.B. die durchflusszytometrische Bestimmung der ACE („angiotensin-converting enzyme“) –Aktivität, die bei DC im Vergleich zu Monozyten bis zu einem Faktor von 150 erhöht ist (Danilov SM, 2003), oder die Bestimmung der Fibronektin-Genfragmente mittels PCR, die bei leukämischen DC im Vergleich zu monozytären DC übermäßig eprimiert werden (Vialle-Castellano A, 2004). Allerdings würden derartige funktionelle Tests keinen prozentualen Wert über die Umwandlung von Blasten in leukämische DC liefern.

### **5.5. Die höchste DC-Ernte kann von monozytären FAB-Typen erzielt werden, und die DC-Ausbeute ist unabhängig von zytogenetischen Risikogruppen**

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass die höchste DC-Ausbeute bei Patienten mit einer monozytär differenzierten AML bzw. bei monozytären AML-Zelllinien (M4/M5) erreicht werden kann (Tsuchiya T, 2002; Brouwer RE, 2000 (II)). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass auch bei MDS-Fällen mit monozytären FAB-Typen, die höchste DC-Ausbeute erzielt werden kann. Umgekehrt konnte wiederum gezeigt werden, dass der Großteil der AML-Fälle, bei denen weniger als 10% DC generiert werden konnten, meist zu den nicht-monozytär differenzierten (vor allem undifferenzierte AML-M0 und –M2) FAB-Typen gehörten. Dies lässt vermuten, dass für diese Patientengruppen andere Methoden für die DC-Differenzierung angewendet werden müssten, um höhere DC-Ausbeuten zu erzielen.

Ferner konnten wir erstmals zeigen, dass die DC-Ernte unabhängig von chromosomalen Aberrationen und somit von zytogenetischen Risikogruppen bei AML und MDS ist. Das könnte bedeuten, dass sich grundsätzlich Patienten aller zytogenetischen Risikogruppen für eine DC-basierte Immuntherapie qualifizieren könnten.

### **5.6. Leukämische DC induzieren eine autologe T-Zell-Aktivierung**

Der adoptive Transfer besonders von mit der Hilfe von DC kultivierten CTLs scheint eine klinisch sehr effektive Strategie für Patienten nach nicht-myeloablativer Chemotherapie zu sein (Dudley ME, 2002).

Die Signalübermittlung zwischen DC und T-Zellen kommt z.B. mit einem CD40-CD40L-, einem CD86/CD80-CD28- oder einem CD137-CD137L-Kontakt zustande. Sofern genügend autologe T-Zellen separierbar waren, wurde versucht mittels MLR-Kulturen eine autologe T-Zell-Aktivierung festzustellen. Wegen der niedrigen Anteile der CD3<sup>+</sup>-Zellen in den AML- und MDS-Proben war dies allerdings oft nicht möglich. Im Falle ausreichend separierbarer CD3<sup>+</sup>-Zellen konnten wir eine im Vergleich zu MNC-Fractionen erhöhte DC-vermittelte Expression von DC-Kontaktmolekülen auf T-Zellen und DC sowie eine Hochregulierung von Migrationsmarkern (CCR7, CD62L) zeigen, was für eine DC-induzierte, autologe T-Zell-Aktivierung sprechen könnte. Die genannten Migrationsmarker sind dabei notwendig für eine Wanderung der naiven T-Zellen oder der Gedächtnis-T-Zellen in die Lymphknoten und in die Peyerschen Plaques (Lanzavecchia A, 2002; Von Adrian UH, 2000; Sallusto F, 2002). Dies sind entscheidende Schritte für die in vivo-Aktivierung und -Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen (Sallusto F, 2000; Muller WA, 2001; Lanzavecchia A, 2002). Funktionelle Tests wurden in diesem Rahmen allerdings nicht durchgeführt.

Es wurde zwar gezeigt, dass kostimulatorische Antigene auf leukämischen Zellen häufig herunterreguliert sind, und somit ein Kontakt zu Effektorzellen erschwert ist (Vollmer M, 2003; Brouwer RE, 2000 (III)), jedoch konnten wir und andere Arbeiten zeigen, dass in 30-40% der AML-Fälle dennoch kostimulatorische Marker wie z.B. CD80 und CD86 (welche häufig in Abhängigkeit von der Expressionsdichte mit einer schlechten Prognose korrelieren) auf den leukämischen Zellen exprimiert sind (Graf M, 2004; Maeda A, 1998). Dies weist darauf hin, dass die Expression kostimulatorischer Marker auf naiven leukämischen Zellen einzig nicht ausreichend sein kann, um eine ausreichende anti-leukämische T-Zell-Antwort zu induzieren. Diese Daten bekräftigen somit die allgemeine Meinung, dass die simultane Präsentation von (leukämischen) Antigenen zusammen mit kostimulatorischen Markern durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie die DC notwendig ist, um T-Zellen zu aktivieren. Durch Verwendung leukämischer DC aus AML-MNC konnte in dieser Arbeit eine signifikante Proliferation von T-Zellen in der MLR gezeigt werden, was auch schon in anderen Studien festgestellt werden konnte (Woiciechowsky A, 2001; Harrison BD, 2001). Die vorliegende Arbeit erweitert die schon beschriebene Datenlage insofern, als dass hierin auch durch aus MDS-Proben gewonnenen DC eine signifikante T-Zell-Proliferation im Vergleich zu Kontrollen erzielt werden konnte. Untersuchungen zur autologen T-Zell-Differenzierung wurden auch schon in anderen Arbeiten unternommen. Alle diese Untersuchungen lassen zwar vermuten, dass mit Hilfe leukämischer DC spezifische zytotoxische T-Zellen bereitgestellt werden können, aber der Beweis für deren zytotoxische Fähigkeiten musste noch eindeutiger erbracht werden (Harrison BD, 2001). Die vorliegenden Daten zeigen, dass T-Zellen, die in einer MLR mit autologen, leukämischen DC generiert wurden, spezifisch

dazu fähig sind, naive Blasten nach nur 3 Tagen zu lysieren. Dies bestätigt die Fähigkeit und Funktion leukämischer DC autologe, zytotoxische T-Zellen zu stimulieren. Eine Inkubation von Blasten mit aktivierten T-Zellen über Nacht könnte möglicherweise die Rate an lysierten Zellen im Vergleich zu Kontrollansätzen noch erhöhen (Kienzle N, 2002). Andererseits konnten wir zeigen, dass die Generierung zytotoxischer T-Zellen nur möglich ist, wenn genügend vitale DC sowie T-Zellen der MLR beigegeben werden, was die herausragende Rolle leukämischer DC bei der Aktivierung Leukämie-zytotoxischer T-Zellen herausstellt. Um diese Ergebnisse zu verbessern, könnte deshalb die Verwendung von aussortierten, angereicherten, leukämischen DC dazu beitragen, Leukämie-zytotoxische T-Zellen spezifisch zu aktivieren und zu vermehren.

Basierend auf den Beobachtungen dieser und anderer Arbeiten wäre es wünschenswert, mit Hilfe von DC T-Zell-Subpopulationen zu generieren, die spezielle Funktionen, Wanderungsfähigkeiten oder Gedächtnisleistungen aufweisen könnten (Lanzavecchia A, 2002; Von Adrian UH, 2000; Falkenburg JHF, 1997).

Jedoch wurde gezeigt, dass eine AML-generierte DC-Zelllinie (CS-1) keine Immunstimulierung, sondern im Gegensatz eine Immunsuppression bei T-Zellen hervorrief (CS-1 abstammende DC zeigen keinen T-Zell-stimulierenden Effekt) (Erben U, 2003). Daher sollte vor einer in vivo-Vakzinierung mit DC die individuelle T-Zell-Aktivierungsfähigkeit vorab getestet werden, um mögliche inhibitorische Vorgänge (z.B. regulatorische T-Zellen) (Nicol A, 2000) aufzudecken.

### **5.7. Prostaglandin E<sub>2</sub> verbessert die Ausbeute an CCR7<sup>+</sup>-DC**

Schließlich wurde in dieser Arbeit noch getestet, ob die Generierung von DC in einem PGE<sub>2</sub>-enthaltendem Medium einen höheren Ertrag an reifen, CCR7<sup>+</sup> DC liefert. Obwohl noch nicht festgestellt wurde, welche DC-Generierungsmethode die Beste ist, um eine tumorspezifische T-Zell-Antwort zu erhalten, stellen MCM- und `MCM-Mimic`-Medien den momentanen Standard dar. Denn in diesen Medien können konstant homogene, lebensfähige und reife DC von Krebspatienten hergestellt werden, die zu Lymphknoten wandern, eine T-Helferzell-Antwort und zytotoxische Immunreaktionen in vitro und in vivo verursachen können (Schuler G, 2003; Lee AW, 2002). Über PGE<sub>2</sub> ist bereits bekannt, dass es einen Stimulus für die DC-Reifung und im besonderen für die CCR7-Expression auf DC darstellt (Bertho N, 2005; Norgauer J, 2003; Lee JJ, 2002). Dieser Marker steuert DC und T-Zellen zu den Lymphknoten (Schuler G, 2003; Sallusto F, 1999; Luster AD, 2002). Zudem scheint PGE<sub>2</sub> die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Helferzellen zu begünstigen und vor apoptotischen Einflüssen zu schützen (Lee JJ, 2002; Baratelli F, 2005). Auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass von AML- und MDS-Patienten mehr reife und CCR7<sup>+</sup>-DC in einem `MCM-Mimic`-Medium zusammen mit PGE<sub>2</sub> kultiviert wurden. PGE<sub>2</sub> kann in Kultur kombiniert mit dem biologischen `response modifier` OK-432 (gewonnen aus einem schwach virulenten Su-strain von Streptokokkus pyrogenes) – bis

jetzt vor allem verwendet für die DC-Generierung aus Monozyten bei Tumorpatienten – sogar nach schon 7tägiger Inkubationszeit reife CCR7<sup>+</sup>-DC hervorbringen (Sato M, 2003). Es sollte allerdings auch bedacht werden, dass eine in vivo-Stimulierung von leukämischen Blasten mit PGE<sub>2</sub> kaum in Betracht kommt, da die erhöhte Stimulation der CCR7-Expression im Körper eine Metastasenbildung begünstigen könnte, da Liganden von CCR7 (CCL19, CCL21) an der Infiltration von Tumorzellen beteiligt sind (Reiterer P, 2002). Ein weiterer Migrationsmarker, der für das Homing in Lymphknoten von entscheidender Bedeutung ist, ist das L-Selektin (CD62L) (Mackay IR, 2000), weshalb eine niedrige Expression dieses Markers auch mit einer schlechten Prognose bei der AML korrelieren könnte (Graf M, 2003). Aber auch anderen Adhäsionsmolekülen, die für das Homing von Bedeutung sind (z.B. MadCAM-1, GlyCAM-1), sollte man in Zukunft Beachtung schenken (Papadaki HA, 1999).

Hinsichtlich des Migrationsverhaltens der DC muss aber ergänzt werden, dass nur ca. 6% der in `MCM-Mimic`-Medium generierten DC die Lymphknoten innerhalb von 48 Stunden erreichen, was auf der einen Seite herausstellt, wie wichtig die migratorische Funktion der DC ist, und auf der anderen Seite, wie wichtig die richtige Injektionsstelle bei der Impfung ist (Schuler G, 2003). Untersuchungen zeigten, dass ein defekter Arachidonsäuremetabolismus – u.a. mitverursacht durch IL-4 – für das migratorische Handicap der DC verantwortlich zu sein scheint (Turner M, 2001). Arachidonsäure stellt eine Vorstufe der Prostaglandine dar. Da PGE<sub>2</sub> in DC-Kultursystemen die Expression an Migrationsmarkern zu steigern vermag, würde dies umgekehrt die These des defekten Arachidonsäuremetabolismus erklären. So könnte der Mangel an PGE<sub>2</sub> durchaus einer der Hauptgründe für die eingeschränkte Migrationsfähigkeit von DC in die Lymphknoten sein. Zur Kontrolle der migratorischen und adhäsiven Kapazität von DC könnte in Zukunft die Expression von Integrinen (z.B. CD49d) auf den leukämischen DC herangezogen werden (Sadovnikova E, 2004).

Bei der Verwendung von PGE<sub>2</sub> sollte auch bedacht werden, dass PGE<sub>2</sub> in einer Studie von Pai R et al. in Verdacht stand über eine Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors gastrointestinale Hypertrophien und Kolonkarzinome zu verursachen (Pai R, 2002). Außerdem ist problematisch, dass das Zytokin IL-12 (das entscheidende Zytokin für die Induzierung einer zellulären Immunantwort) auf DC, die in `MCM-Mimic`-Medium generiert wurden, nur gering exprimiert wird (Schuler G, 2003). Eine begleitende Impfung mit IL-12 könnte dabei evtl. Abhilfe schaffen (Ogata K, 1995). Prostaglandine scheinen insgesamt eine positive Wirkung auf DC zu haben, da kürzlich veröffentlicht wurde, dass DC, die mit PGD<sub>2</sub> generiert wurden, eine erhöhte Antigen-Präsentation und Antigen-Prozessierung zeigen (Gosset P, 2005).

## **5.8. Probleme aktueller DC-Generierungsstudien**

Obwohl die genannten Standardmedien, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, potente DC-Stimulatoren darstellen, können immer noch nicht von jedem Patienten DC generiert werden. Die

Probleme bei der DC-Kultivierung sind dabei sehr vielschichtig.

Um diese in den Griff zu bekommen, müssten DC-Generierungsstudien zuerst einmal alle unter standardisierten Bedingungen ablaufen.

Ein wichtiger Punkt wäre beispielsweise, darauf zu achten, dass die eingesetzten Zytokine unter guten Herstellerqualitätsbedingungen (GMP = good manufacturing practice) produziert werden. Auch das verwendete Zellmaterial sollte ein repräsentatives Patientenkollektiv darstellen. Demnach ist darauf zu achten, welches Patientengut in die AML-DC-Studien eingeschlossen wird. Eine Untersuchung zwischen 1985 und 1994 ergab, dass Studienpatienten nicht repräsentativ für die Gesamtheit der AML-Erkrankungsfälle in der Bevölkerung sind (Mengis C, 2003).

Außerdem verbleibt noch zu lösen, dass die DC-Kulturzeiten für den späteren Einsatz als Impfstoff zu lang sind (siehe Bild 32), was höhere Kosten nach sich zieht, und dass die Vitalität der kultivierten Zellen oft nicht optimal ist (Schuler G, 2003; Houtenbos I, 2003; Sato M, 2003; Roddie PH, 2002). Problematisch ist ebenfalls, dass bisher keine Einigung über ein standardisiertes DC-Generierungsmedium erzielt werden konnte. Weitere offene Fragen betreffen auch das Migrationsverhalten der DC, die T-Zell-Stimulierungsaktivität in vivo und das Risiko von Hypersensibilitätsreaktionen (Mule JJ, 2000). Außerdem sollte diskutiert werden, welche Patienten von einer DC-Vakzinierung profitieren könnten und ob möglicherweise autoimmune Reaktionen ausgelöst bzw. verstärkt werden können (Iwase O, 1995).

## **5.9. Bisherige in vivo Vakzinierungsstudien mit DC**

Die meisten DC-Vakzinierungsstudien bei Patienten mit soliden Tumoren zeigten bei 2wöchentlichen bis zu monatlichen Injektionen die besten Resultate hinsichtlich der Auslösung einer Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung. Beim Vergleich der möglichen Injektionsstellen schnitten die intradermalen und intralymphatischen Verabreichungen am besten ab. Eine Studie von Fong et al. untersuchte unterschiedliche Applikationsformen von DC bei metastasierenden Prostatakarzinomen. Dabei wurden bei allen Patienten T-Zell-Antworten nachgewiesen, obwohl die höchsten IFN $\gamma$ -Ausschüttungen und CD62L-Hochregulierungen nach intranodalen und intradermalen Impfungen gefunden wurden (Fong L, 2001). Bei soliden Tumoren besteht außerdem die zusätzliche Möglichkeit DC direkt in den Primärtumor oder in die Metastasen zu spritzen, was beispielsweise bei metastatischen Hautläsionen von Vorteil ist (Jonathan MA, 2000).

DC-Leukämie-Generierungsstudien mit DC wurden zuerst vor allem bei der CML unternommen (Eisendle K, 2003), weshalb erste klinische Versuche auch mit der CML starteten. Dietz et al. beispielsweise injizierten von CML-Patienten gewonnene DC subkutan in der Nähe von Lymphknoten (Dietz AB, 2001). Die ersten klinische Versuche mit leukämischen DC als T-Zell-stimulierende Vakzine wurden in 5 Fällen einer CML im letzten Interferon-refraktären Stadium in Kombination mit IL-2 ini-

tiiert (Claxton DF, 2001). Die Therapie wurde von den Patienten gut toleriert. Obwohl in einem untersuchten Fall kein Verlust des Philadelphia-Chromosomes erreicht werden konnte, konnte dagegen bei einem anderen leukämischen Klon der Verlust einer Trisomie 8 nach dem zweiten Therapiezyklus festgestellt werden. Erste DC-Vakzinierungsstudien bei AML fanden mit Mäusen oder Meerschweinchen statt. Dabei konnten erste vielversprechende Ergebnisse im Sinne einer antileukämischen Antwort (63% Langzeitüberlebensrate) erzielt werden (Pawlowska AB, 2001). Reinhardt et al. konnten schließlich bei therapierefraktären AML-Fällen nach einer Impfung mit leukämischen DC eine spezifische T-Zell-Aktivierung in vivo nachweisen - allerdings konnten keine Remissionen bei diesem Verfahren erzielt werden (Reinhardt P, 2002). Diese Daten beweisen insgesamt, dass auf DC basierende Therapien zu einer T-Zell-Aktivierung in vivo führen, dass jedoch eine Zerstörung von leukämischen Zellen sowohl bei CML- als auch bei AML-Patienten mit einer großen Tumorlast nicht allein durch diese T-Zellen erreicht werden kann. Dies bedeutet wiederum, dass Therapien mit DC bei AML-Patienten in Remission verwendet und getestet werden sollten, um restliche leukämische Zellen zu bekämpfen, oder bei MDS-Patienten, um rückfallfreie Überlebenszeiten zu verlängern.

In Krebsstudien mit soliden Tumoren muss versucht werden, die T-Zellen dadurch mehr zu stimulieren, indem die DC durch Koppelung mit Tumorpeptiden, Tumorlysaten, Tumor-DNA/RNA oder durch Fusionierung mit Tumorzellen in ihrer Funktion als APC gestärkt werden (Galea-Lauri J, 2002 (II); Zhou Y, 2002; Hellstrom KE, 2003; Titzer S, 2000; siehe Bild 46). Dies könnte gerade bei soliden Tumoren so erfolgversprechend sein, da immer mehr Tumorantigene für die einzelnen Krebserkrankungen gefunden werden (Weber J, 2002). Aber auch bei leukämischen Erkrankungen gibt es bereits derartige - allerdings ex vivo - Versuche. Meist wurden DC nichtleukämischen Ursprungs von AML-Patienten mit apoptotischen, leukämischen Blasten fusioniert (Spisek R, 2002; Fujii S-I, 1999). Die antileukämische Antwort war dabei vielversprechend, da sie spezifisch gegen AML-Blasten gerichtet war. Bei Tieren existieren bereits verschiedene Impfstudien mit gekoppelten DC. Zum Beispiel resultierte eine Vakzinierung mit Antigen-beladenen (bcr-abl-Peptid) DC bei Mäusen mit einer Immunisierung gegen bcr-abl-positive CML (He L, 2001). Eine weitere Innovation auf dem Gebiet der DC-Immuntherapie stellen gentechnisch modifizierte DC dar (Foley R, 2001). So können in DC unter anderem Gene für bestimmte Tumorantigene oder für Zytokine transduziert werden, was zu einer erhöhten Expression von TAA bzw. zu einer erhöhten Produktion von wachstumsfördernden Zytokinen der DC führt. Beispielsweise führten bei an AML erkrankten Meerschweinchen sogar Impfungen mit durch Transduktion von B7-1 (T-Zell-Ligand für CD28) gentechnisch modifizierten AML-Blasten zu einer langanhaltenden systemischen Immunität (5-6 Monate) gegenüber Wildtyp-AML-Zellen (Dunussi-Joannopoulos K, 1996). Auch beim Menschen zeigten Versuche mit gentechnisch modifizierten, leukämischen DC gute Ergebnisse bezüglich einer spezifischen T-Zellantwort Reaktionen (Mueller MR, 2003).

Ein zusätzliches Immunmonitoring wäre bei DC-Impfungen nun von Vorteil, um wichtige Informatio-



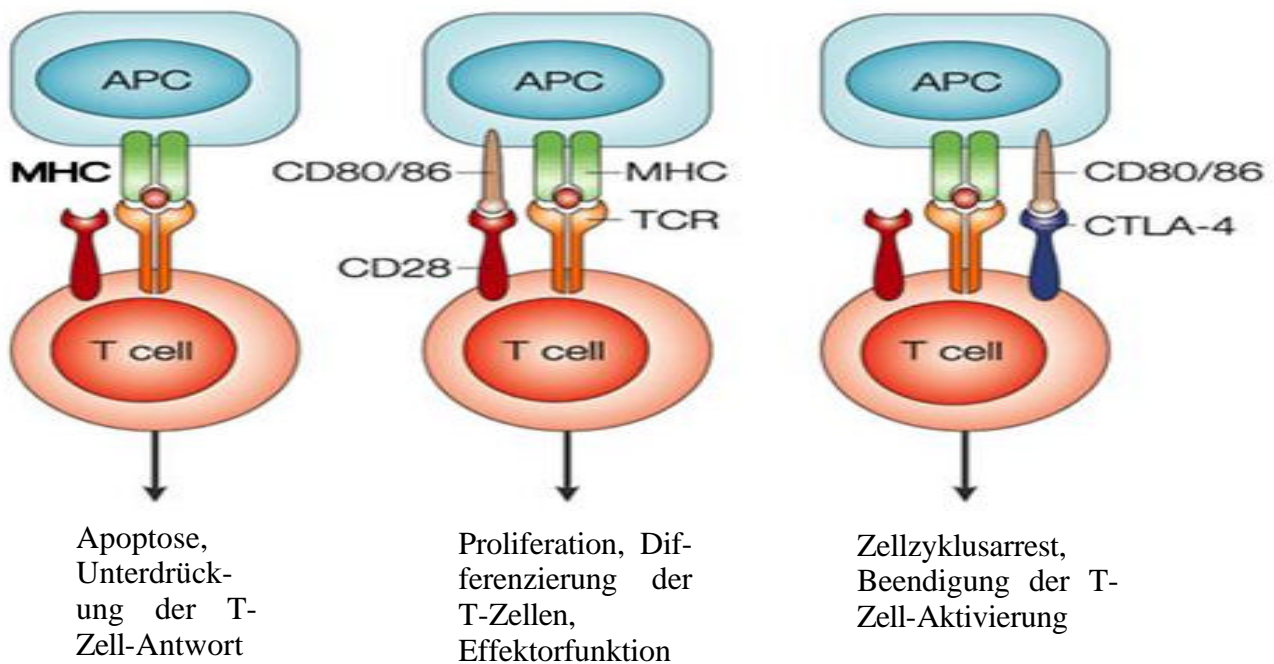
nen quantitativer und qualitativer Art über T-Zell-Untergruppen (T-Gedächtniszellen, T-Effektorzellen und naive T-Zellen) und ihren Aktivierungsstatus zu liefern (siehe Bild 48). Möglich wäre dies beispielsweise über eine Messung der intrazellulären Zytokinproduktion (z.B. IFN- $\gamma$ ) (Campbell JDM, 2003; Becker C, 2001). Dadurch könnte man auch vergleichen, ob eine Immunantwort bei der Verabreichung von beladenen oder gentechnisch modifizierten DC wirklich stärker ausfällt, als bei der Verwendung von DC leukämischen Ursprungs, die leichter herzustellen wären.

### **5.10. Ausblick: Dendritische Zellen - Die Krebsvakzine der Zukunft?**

Berichten der Süddeutschen Zeitung zufolge warnen Experten inzwischen vor „übereilter Euphorie“ und der „Geschäftemacherei privater Therapiezentren“ (Wormer H, 2002). Schließlich ist immer noch unklar, wie das Klinische Setting bei einer Vakzinierung mit DC am besten aussehen sollte (siehe Bild 48).

Unklar geblieben sind beispielsweise bisher sowohl die optimale Anzahl der zu verabreichenden DC als auch die möglichen Injektionsstellen (i.v., s.c., i.m., intradermal, intranodal, intralymphatic, in das KM). Auch die Grenzen einer DC-Immuntherapie wurden inzwischen von verschiedenen Seiten aufgezeigt. Beispielsweise ist heutzutage bekannt, dass DC nicht nur eine T-Zellantwort initiieren, sondern in manchen Fällen auch zu einer Unterdrückung der T-Zellfunktion (v.a. der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) führen können (Kubsch S, 2003; Munn DH, 2004; Bild 47). Bei leukämischen DC muss deshalb in besonderem Maße immer auch eine mögliche gegenläufige Beeinflussung des Immunsystems mitbedacht werden (Fujii S, 2003). Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass ex vivo generierte DC trotz Expression leukämischer Antigene nach der Vakzinierung dennoch keine Antitumorantwort erreichen können, da bei Krebserkrankungen auch eine sogenannte T-Zell-Toleranz vorherrschen kann (Fauriat C, 2005).

**Bild 47:** Mögliche DC-T-Zell-Interaktionen. APC Antigenpräsentierende Zelle. MHC Haupt-histokompatibilitätskomplex.



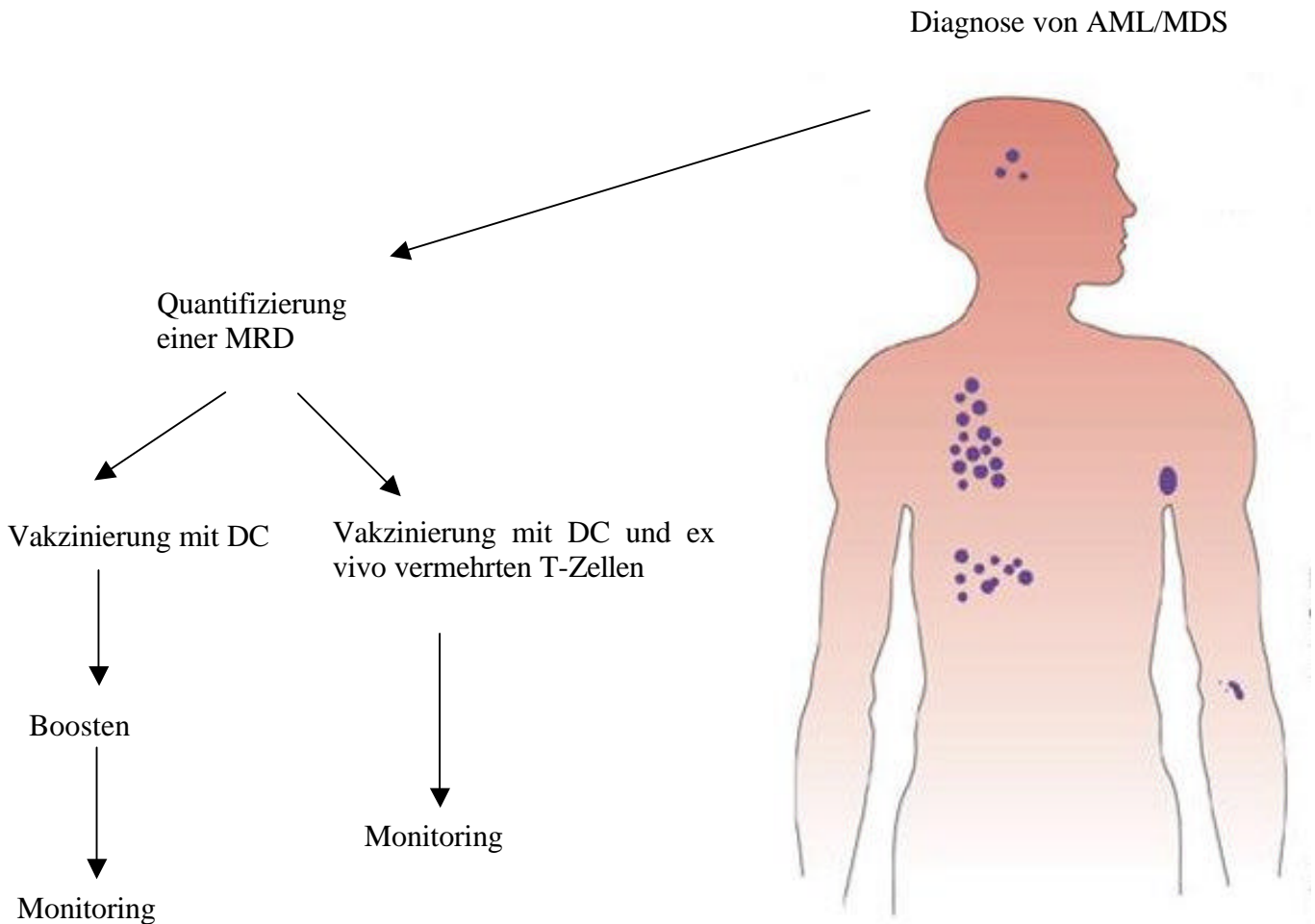
Auch die Kostenfrage wird sich in Zukunft stellen. Denn die DC müssten für eine Transfusionsbehandlung für jeden Patienten in vielen Einzelschritten individuell, zeitaufwendig und dementsprechend teuer hergestellt und zudem für den größeren Gebrauch eingefroren werden (Bild 46). Deshalb wäre die Umsetzung der Idee, Vorläufer der DC im Körper des jeweiligen Patienten zur Teilung anzuregen und über ihre Abkömmlinge das Immunsystem zu aktivieren, von Vorteil (Bauchreau J, 2003). Bei leukämischen Erkrankungen müsste auf dem gleichen Wege versucht werden, auch die Blasten im Körper des Patienten in DC umzuwandeln. Aus diesem Grund haben in der Leukämieforschung evtl. sowohl DC-Vakzinierungsstudien mit leukämischen DC, als auch solche mit nichtleukämischen DC wie z.B. die von Padley DJ et al. ihre Berechtigung, da auch DC aus gesunden Zellquellen, wenn sie im menschlichen Körper umgewandelt wurden, zu einer Stärkung des Immunsystems beitragen könnten (Padley DJ, 2001). Es könnte also versucht werden, gesunde und kranke DC-Vorläufer gleichermaßen in potente APC umzuwandeln. Allerdings bergen nicht-leukämische DC bei einer Transfusion die Gefahr, Autoimmunreaktionen zu verursachen. Außerdem muss dabei bedacht werden, dass andere Einflussgrößen die Blastenumwandlung im Körper vereiteln könnten. Zum Beispiel wurde herausgefunden, dass ein Wachstumsfaktor, der von vielen menschlichen Tumoren gebildet wird, der sogenannte vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), die DC-Reifung in vivo blockieren kann (Inoshima N, 2002), oder dass die DC-Differenzierung auch eine Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert zeigt (Eljaafari A, 1998).

DC-Vakzinierungen bei hämatologischen Erkrankungen können sicher keine Chemotherapie ersetzen,

vorstellbar wären aber Kombinationstherapien von DC  $\pm$  Zytokine zur Erhaltung stabiler Remissionen oder nach allogenen Transplantationen zur Generierung optimierter Spenderlymphozyteninfusionen (Bild 33; Kaminski ER, 2003; Gorin NC, 2000). Neben der Verabreichung von IL-12 zeigte beispielsweise auch IL-2 eine gute Wirksamkeit (Shimuzu K, 1999; Meloni G, 2002), wahrscheinlich bedingt durch die spezielle Aktivierung von CD95L<sup>+</sup>-T-Zellen, welche über den Fas-Rezeptor (CD95) einen apoptotischen Zelltod von leukämischen Zellen induzieren können (Komada Y, 1997).

Eine Studie von Rosenberg SA et al. gibt im Bereich der DC-Vakzinierung inzwischen auf jeden Fall zu Optimismus Anlass, da diese bei dem Vergleich von DC-Studien mit anderen immuntherapeutischen Studien (z.B. monoklonale Ak, „immune modifiers“) insgesamt immerhin von einem bis zu 4% höherem Ansprechen bei DC-Vakzinierungen berichtet (Rosenberg SA, 2004). Um dieses Ergebnis weiter zu verbessern, wäre einer der wichtigsten Punkte, zu erforschen, warum nicht bei allen AML- und MDS-Patienten leukämische DC generiert werden können. Dazu müßten verschiedene Methoden getestet werden, um in jedem Erkrankungsfall eine optimale Ausbeute an leukämischen DC zu erhalten. Dies würde zwar vorerst kein höheres klinisches Ansprechen versprechen, aber zumindest den Weg dazu ebnet. Diese Fortschritte könnten Kliniker in der Zukunft ermöglichen, spezielle auf den AML- bzw. MDS-Patienten abgestimmte Immuntherapien zu entwerfen und anzuwenden (Bild 48), indem sie z.B. mit DC impfen, allogene oder autologe T-Zellen für den klinischen Gebrauch durch auf DC-basierenden Kultursystemen kultivieren oder sogar T-Zell-Untergruppen (z.B. zytotoxische T-Zellen, T-Gedächtniszellen) generieren und auswählen (Walter EA, 1995; Zhong RK, 2002).

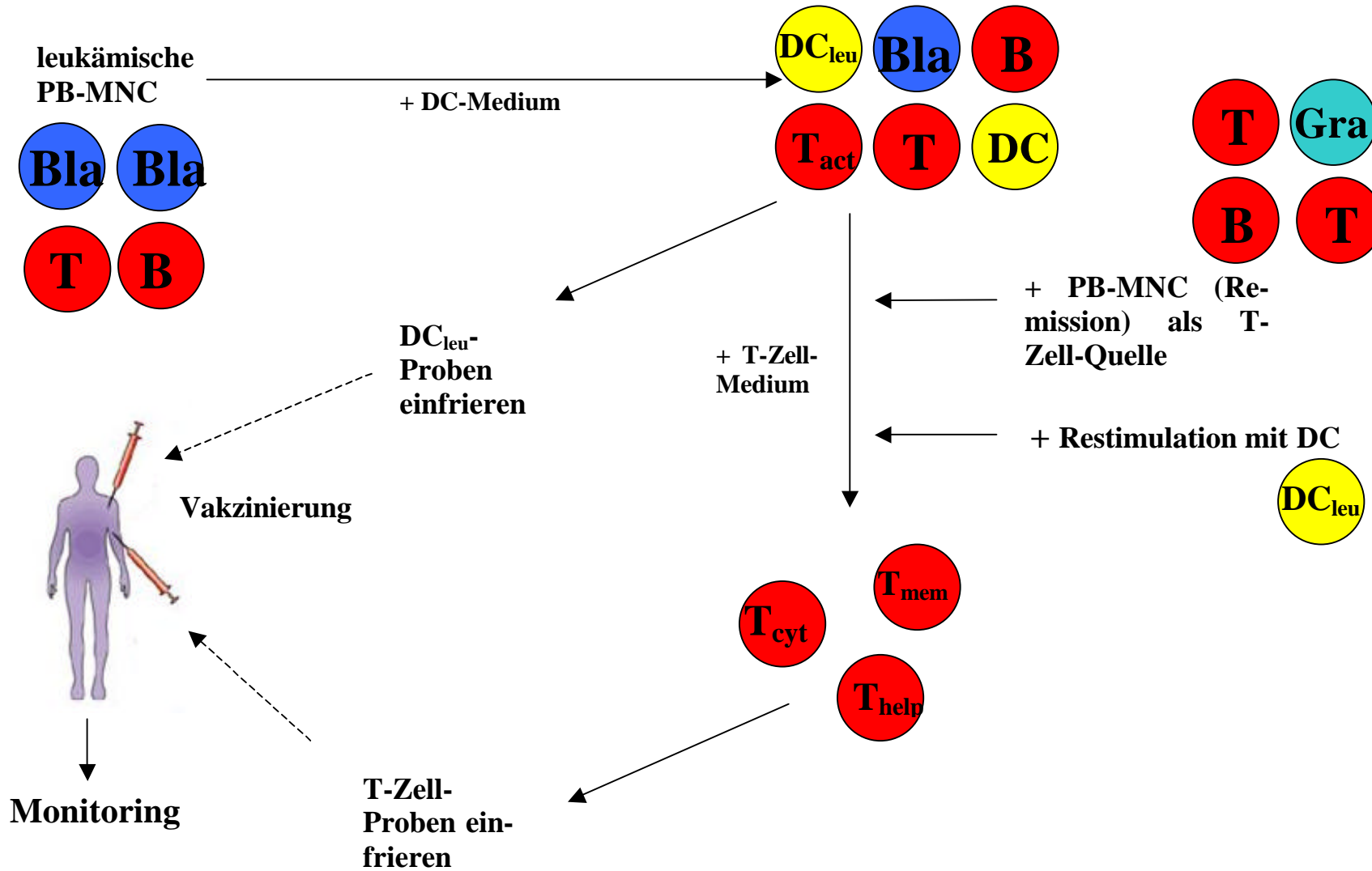
**Bild 48:** Impfung bei AML und MDS: Mögliches klinisches Setting.



Insgesamt zeigt diese Arbeit auf, dass klonale bzw. leukämische DC regelmäßig sowohl von AML- als auch von MDS-MNC in serumfreien MCM- und `MCM-Mimic`-Medien generiert werden können, und dass diese DC dazu fähig sind eine T-Zell-Aktivierung ex vivo zu induzieren. Möglicherweise können mit Hilfe DC-basierter Vakzinierungen intelligente und wirkungsvolle Immuntherapien entwickelt werden, die dazu beitragen, einen Krankheitsprogress bei AML und MDS zu verhindern oder sogar – in Kombination mit spezifisch generierten T-Zellen – wirkungsvoll zu behandeln.

**Bild 49:** Mögliche Strategie für einen klinischen Versuch einer Vakzinierung/Transfusion mit DC.

Bla Blasten. T T-Zellen. B B-Zellen. DC<sub>leu</sub> leukämische DC. T<sub>act</sub> aktivierte T-Zellen. Gra Granulozyten. T<sub>cyt</sub> zytotoxische T-Zelle. T<sub>mem</sub> T-Gedächtniszelle. T<sub>help</sub> T-Helferzelle.



## **6. Literaturverzeichnis**

Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*. 1997; 387(6634):713-717

Adikari SB, Petterson A, Soderstrom M, Huang YM, Link H. Interleukin-10-modulated immature dendritic cells control the proinflammatory environment in multiple sklerosis. *Scand J Immunol*. 2004; 59(6):600-606

Adler EM. Focus issue - tailoring the immune response. *Sci STKE*. 2004; 241:EG9

Albitar M, Manshour T, Shen Y, Liu D, Beran M, Kantarjian HM, Rogers A, Jilani I, Lin CW, Pierce S, Freireich EJ, Estey EH. Myelodysplastic syndrome is not merely "preleukemia". *Blood*. 2002; 100(3):791-798

Aldinucci D, Poletto D, Nanni R, Degan M, Rupolo M, Pinto A, Gattei V. CD40L induces proliferation, self-renewal, rescue from apoptosis, and production of cytokines by CD40-expressing AML blasts. *Exp Hematol*. 2002; 30(11):1283-1292

Alvarado Y, Tsimberidou A, Kantarjian H, Cortes J, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas D, Estey E, Giles FJ. Pilot study of Mylotarg, idarubicin and cytarabine combination regimen in patients with primary resistant or relapsed acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003; 51(1): 87-90

Angelov GS, Tomkowiak M, Marcais A, Leverrier Y, Marvel J. Flt3 Ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. *J Immunol*. 2005; 175(1):189-195

Antonysamy MA, Thomson AW. FLT3 Ligand (FL) and its influence on immune reactivity. *Cytokine*. 2000; 2:87-100

Aoyama Y, Nakamae H, Yamamura R, Makita K, Shima E, Hasegawa T, Sakamoto C, Kho G, Ohta K, Yamane T, Takubo T, Hino M. Analysis of factors for poor mobilization after administration of recombinant human granulocyte stimulating factor (rHuG-CSF) in healthy donors. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2003; 30(6):829-836

Appelbaum FR. New targets for therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003; 17(3):492-495

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg.). *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*. 2004; 9

Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trend Immunol*. 2001; 22(12):691-700

Ardavin C, Amigorena S, Reis E Sousa C. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity*. 2004; 20:17-23

Arndt SO, Vogt AB, Markovic-Plese S, Martin R, Moldenhauer G, Wolpl A, Sun Y, Schadendorf D, Hammerling GJ, Kropshofer H. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J*. 2000; 19(6):1241-1251

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-Colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood*. 2000; 95(8):2484-2490

Aul C, Giagounidis A, Germing U, Ganser A. Myelodysplastic syndromes. Diagnosis and therapeutic strategies. *Med Klin* 2002; 97(11):666-676

Avigan D, Wu Z, Gong J, Joyce R, Levine J, Elias A, Richardson P, Milano J, Kennedy L, Anderson K, Kufe D. Selective in vivo mobilisation with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)/granulocyte-CSF as compared to G-CSF alone of dendritic cell progenitors from peripheral blood progenitor cells in patients with advanced breast cancer undergoing autologous transplantation. *Clinical Cancer Res*. 1999; 5:2735-2741

Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT. Accelerated CD8(+) T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med*. 2005; 11(7):748-756

Bai L, Feuerer M, Beckhove P, Umansky V, Schirmacher V. Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocytes derived cells. *In J Oncol*. 2002; 20(2):247-253

Balaian L, Ball ED. Direct effect of bispecific anti-CD33 x anti-CD64 antibody on proliferation and signaling in myeloid cells. *Leuk Res*. 2001; 25(12): 1115-1125

Balducci L, Carreca I. The role of myelopoietic growth factors in managing cancer in the elderly. *Drugs*. 2002; 62(Suppl 1):47-63

Banat GA, Ihlow K, Usluoglu N, Hoppmann S, Hoeck M, Pralle H. Core-binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia cells induce T-cell responses. *Br J Haematol*. 2003; 123(5): 819-829

Banat GA, Usluoglu N, Hoeck M, Ihlow K, Hoppmann S, Pralle H. Dendritic cells fused with core binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia blasts cells induce activation of cytotoxic lymphocytes. *Br J Haematol*. 2004; 126(4):593-601

Baratelli F, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Zhu L, Escudero B, Sharma S, Reckamp K, Dohadwala M, Dubinett SM. *J Leukoc Biol*. 2005; [Epub ahead of print]

Barge A, Hoelzer D, Seipelt G. Acute myeloid leukemia: The role of haematopoietic growth factors. Consultant Series. 1998; 21:9-24

Barnard DR, Kalousek DK, Wiersma SR, et al. Morphologic, immunologic, and cytogenetic classification of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in childhood: a report from the Children Cancer Group. Leukemia. 1996; 10:5-12

Barratt-Boyes SM, Figdor CG. Current issues in delivering DCs for immunotherapy. Cytotherapy. 2004; 6(2):105-110

Bauchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998; 392: 245-252

Bauchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. Cancer Res. 2001; 61(17):6451-6458

Baucherau J. Impfen gegen Krebs. Spektrum der Wissenschaft. April 2003; 38-45

Beck JF, Klingebiel T, Kreyenberg H, Schaudt A, Wolle W, Niethammer D, Bader P. [Relapse of childhood ALL, AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism]. Klin Padiatr. 2002; 214(4):201-205

Becker C, Pohla H, Frankenberger B, Schüler T, Assenmacher M, Schendel DJ, Blankenstein T. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. Nature Medicine. 2001; 7(10):1159-1162

Behringer B, Pitako JA, Kunzmann R, Schmoor C, Behringer D, Mertelsmann R, Lubbert M. Prognosis of older patients with acute myeloid leukemia receiving either induction or noncurative treatment: a single-center retrospective study. Ann Hematol. 2003; 82(7):381-389

Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, Briere F. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. J Clin Invest. 2001; 107(7): 835-844

Bene MC, Bernier M, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, et al. for the European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. Leukemia 1995; 9:1783-1788

Bennett JM, Kouides PA, Forman SJ. The myelodysplastic syndromes: morphology, risk assessment, and clinical management (2002). Int J Hematol. 2002; 76(Suppl 2):228-238



- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flanderin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British J of Haematol.* 1982; 51:189-199
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative Group. *Brit J Haematol.* 1976; 33:451-458
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intn Med.* 1985; 103:626-629
- Berger R. Cytogenetics of acute leukemia. *Leukemia.* 1992; 6(2):7-11
- Bertho N, Drenou B, Laupeze B, Le Berre C, Amiot L, Grosset J-M, Fardel O, Charron D, Mooney N, Fauchet R. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stage of dendritic/monocytic APC. *The Journal of Immunology.* 2000; 164:2379-2385
- Bertho N, Adamski H, Toujas L, Debove M, Davoust J, Quillien V. Efficient migration of dendritic cells towards lymph node chemokines and induction of Th1 responses require maturation stimulus and apoptotic cells interaction. *Blood.* 2005; [Epub ahead of print]
- Bessho M, Hotta T, Ohyashiki K, Takahashi T, Mizoguchi H, Asano S, Ikeda Y, Sakurai M, Tojo A, Kizaki M, Iwagana M, Tomonaga M, Hirashima K. Multicenter prospective study of clonal implications in adult aplastic anemia patients following recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) administration. *Int J Hematol.* 2003; 77(2):152-158
- Bishop JF. The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 1997; 24:57-69
- Bishop JM. Krebsgene In: *Krebs – Forschung, Diagnostik, Therapie.* 1992; 116-130
- Björck P, Banchereau J, Flores-Romo L. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *International Immunology.* 1997; 9(3):365-372
- Bjork J, Albin M, Mauritzon N, Stromberg U, Johansson B, Hagmar L. Smoking and myelodysplastic syndromes. *Epidemiology.* 2000; 11:285-291
- Blair A, Rowbottom AW, Browne SJ, Goulden NJ, Steward CG, Oakhill A, Pamphilon DH. An optimized biphasic culture system for the generation of functional dendritic cells from patients with acute lymphoblastic leukaemia at presentation and in clinical remission. *Leukemia.* 2001; 15: 1596-1603
- Blazar BR, Kwon BS, Panoskaltis-Mortari A, Kwak KB, Peschon JJ, Taylor PA. Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplantant recipients. *J Immunol.* 2001; 166(5):3174

- Boes M, Cuvillier A, Ploegh H. Membrane specializations and endosome maturation in dendritic cells and B cells. *Trends in Cell Biology*. 2004; 14(4):175-183
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1994 ; 12:337-365
- Boyer MW, Waller EK, Bray RA, Unangst T, Johnson TS, Philips C, et al. Cytokine upregulation of the antigen presenting function of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2000; 14(3):412-418
- Borrello IM, Sotomayor EM. Cancer Vaccines for Hematologic Malignancies. *Cancer Control*. 2002; 9(2):138-151
- Böyum A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*. 1984; 4:269-274
- Bracho F, van de Ven C, Areman E, Hughes RM, Davenport V, Bradley MB, Cai JW, Cairo MS. A comparison of ex vivo expanded DCs derived from cord blood and mobilized adult peripheral blood plastic-adherent mononuclear cells: decreased alloreactivity of cord blood DCs. *Cytotherapy*. 2003; 5(5):349-361
- Braun S, Gerhartz HH, Schmetzer HM. Cytokines can reduce clonal, CD34-positive cells in acute myeloid leukemia in vitro. *Ann Hematol*. 2000; 79:363-373
- Braun S, Gerhartz HH, Schmetzer HM. Influence of cytokines and autologous lymphokine-activated killer cells on leukemic bone marrow cells and colonies in AML. *Acta Haematologica*. 2001; 105: 209-221
- Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Experimental Hematology*. 2001; 29:1247-1255
- Brossart P, Zobywalski A, Grünebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on t-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Research*. 2000 (I); 60:4485-4492
- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*. 2000 (II); 96(9):3102-3108
- Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Mohle R, Kanz L, et al. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998; 92(11):4238-4247
- Brossart P. Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfusion and Apheresis Science* 2002; 27:183-186

Brouwer RE, Hoefnagel J, Borger van der Burg B, Zwindermann AH, Starrenburg I, Jedema I, Barge RMY, Willemze R, Falkenburg JHF. Expression of costimulatory and adhesion molecules and apoptosis receptors on AML: a high CD40 expression correlates with poor prognosis. Abstracts of the 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology. 2000 (I); 452

Brouwer RE, van der Hoorn M, Kluin-Nelemans HC, van Zelderen-Bhola S, Willemze R, Falkenburg JH. The generation of dendritic-like cells with increased allostimulatory function from acute myeloid leukemia cells of various FAB subclasses. *Hum Immunol*. 2000 (II); 61(6):565-574

Brouwer RE, Zwinderman KH, Kluin-Nelemans HC, van Luxemburg-Heijs SAP, Willemze R, Falkenburg JH. Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukemic cells: implications for adoptive immunotherapy. *Experimental Hematology*. 2000 (III); 28: 161-168

Brune M, Hansson M, Mellqvist U-H, Hermodsson S, Hellstrand K. NK cell-mediated killing of AML-blasts: role of histamine, monocytes and reactive oxygen metabolites. *Eur J Haematol*. 1996; 57:312-319

Bruserud O, Gjertsen BT, von Volkman HL. In vitro culture of human acute myelogenous leukemia (AML) cells in serum-free media: studies of native AML blasts and AML cell lines. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000; 9(6):923-932

Bubenik J. Genetically engineered dendritic cell-based cancer vaccines (review). *Int J Oncol*. 2001; 18(3):475-478

Buechner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wormann B, Schoch C, Fonatsch C, et al. 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 2003; 21(24):4496-4504

Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 350(16):1605-1616

Bunjes D, Buchmann I, Duncker C, Seitz U, Kotzerke J, Wiesneth M, Dohr D, Stefanic M, Buck A, Harsdorf SV, Glatting G, Grimminger W, Karakas T, Munzert G, Dohner H, Bergmann L, Reske SN. Rhenium 188-labeled anti-CD66 (a,b,c,e) monoclonal antibody to intensify the conditioning regimen prior to stem cell transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome: results of a phase I-II study. *Blood*. 2001; 98(3):565-572

Bunjes D. 188Re-labeled anti-CD66 monoclonal antibody in stem cell transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002; 43(11):2125-2131

Bunworasate U, Arnouk H, Minderman H, O'Loughlin KL, Sait SN, Barcos M, Stewart CC, Baer MR. Erythropoietin-dependent transformation of myelodysplastic syndrome to acute monoblastic leukemia. *Blood*. 2001; 98(12):3492-3494

Burch PA, Breen JK, Buckner JC, Gastineau DA, Kaur JA, Laus RL, Padley DJ, Peshwa MV, Pitot HC, Richardson RL, Smits BJ, Sopapan P, Strang G, Valone FH, Vuk-Pavlovic S. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for poststate cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(6):2175-2182

Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods*. 2000; 243:59

Campbell P, Marcus R. Monoclonal antibody therapy for lymphoma. *Blood Rev*. 2003; 17(3): 143-152

Campbell JDM. Detection and enrichment of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells based on cytokine secretion. *Methods*. 2003; 31:150-159

Cascavilla N, Musto P, D'Arena G, Melillo L, Carella AM, Petrilli MP, Sanpaolo G, Carotenuto M. CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leucemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Haematologica*. 1998; 83:392-397

Castellano G, Woltmann AM, Schena FP, Roos A, Daha MR, van Kooten C. Dendritic cells and complement: at the cross road of innate and adaptive immunity. *Molecular Immunology*. 2004; 41: 133-140

Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, et al. A classification of acute leukaemia for the 1990's. *Ann Hematol*. 1991; 62:16-21

Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*. 1992; 360:258-261

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, et al. CD34+ hematopoietic progenitor 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*. 1997; 4:1458-1470

Cermak J, Vitek A, Michalova K. Combined stratification of refractory anemia according to both WHO and IPSS criteria has a prognostic impact and improves identification of patients who may benefit from stem cell transplantation. *Leuk Res*. 2004; 28:551-557

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion of Immunology*. 1997; 9:10-16

Chain BM. Current issues in antigen presentation – focus on the dendritic cell. *Immunology Letters*. 89:237-241

Chakraborty NG, Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, Mukherji B. Regulatory T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Hum Immunol*. 2004; 65(8):794-802

Charbonnier A, Gaugler B, Sainty D, Lafage-Pochitaloff M, Olive D. Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro in mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *Eur J Immunol*. 1999; 29:2567-2578

Chelghoum Y, Danaila C, Belhabri A, Charrin C, Le QH, Michallet M, Fiere D, Thomas X. Influence of cigarette smoking on the presentation and course of acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*. 2002; 13(10):1621-1627

Cho HJ, Bhardwaj N. Against the self: dendritic cells versus cancer. *Apmis*. 2003; 111(7-8): 805-819

Choi GS, Kang JM, Lee MG. Analysis of methods for the generation of dendritic cells from human peripheral blood monocytes. *Yonsei Med J*. 2000; 41(5):642-650

Choudhury A, Liang JC, Thomas EK, Flores RL, Xie QS, Agusala K, Sutarina S, Sinha I, Champlin RE, Claxton DF. Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood*. 1999; 3:780-786

Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, Popat U, Claxton DF, Kliche K-O, Andreeff M, Champlin RE. Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1997; 89(4):1133-1142

Chung NP, Chen Y, Chan VS, Tam PK, Lin CL. Dendritic cells: sentinels against pathogens. *Histol Histopathol*. 2004; 19(1):317-324

Cignetti A, Bryant E, Allione B, Vitale A, Foa R, Cheever MA. CD34+ acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells. *Blood*. 1999; 94(6):2048-2055

Clark JJ, Smith FO, Arceci RJ. Update in childhood acute myeloid leukemia: recent developments in the molecular basis of disease and novel therapies. *Curr Opin Hematol*. 2003; 10(1):31-39

Claxton DF, Konneh D, Champlin R, Choudhury A. Generation of immunologically active dendritic cells from chronic myelomonocytic leukemia (CMML). 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dezember 2000; Abstract 4853

Claxton DF, McMannis J, Champlin R, Choudhury A. Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: Preclinical and clinical progress. *Critical Reviews in Immunology*. 2001; 21:147-155

- Colby-Graham MF, Chordas C. The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs.* 2003; 18(2):87-95
- Colino J, Snapper CM. Dendritic cells, new tools for vaccination. *Microbes Infect.* 2003; 5(4): 311-319
- Collins SJ. Acute promyelocytic leukemia: relieving repression induces remission. *Blood.* 1998; 91: 2631-2633
- Colombo BM, Lacave R, Pioche-Durieu C, Masurier C, Lemoine FM, Guigon M, Klatzmann D. Cellular but not humoral immune responses generated by vaccination with dendritic cells protect mice against leukemia. *Immunology.* 2000; 99:8-15
- Coulie PG, van der Bruggen P. T-cell responses of vaccinated cancer patients. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15(2):131-137
- Danilov SM, Sadovnikova E, Scharenborg N, Balyasnikova IV, Svinareva DA, Semikina EL, Parovichinkova EN, Savchenko VG, Adema GJ. Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. *Exp Hematol.* 2003; 31(12):1301-1309
- Dannull J, Cerny T, Ackermann DK, Groettrup M. Current status of dendritic cell-based tumor vaccination. *Onkologie.* 2000; 23:544-551
- Dansey R. Myelodysplasia. *Curr Opin Oncol.* 2000; 12:13-21
- Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol.* 2003; 170(8):4069-4076
- Deeg HJ, Guardiola P. Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or myelofibrosis. *Int J Hematol.* 2002; 76(Suppl.2):29-34
- Delgado E, Finkel V, Baggioolini M, Mackay CR, Steinman RM, Granelli-Piperno A. Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several beta-chemokines. *Immunobiology.* 1998; 198(5):490-500
- Del Giudice G. Vaccination strategies: An overview. *Vaccine.* 2003; 21(Suppl 2):83-88
- Del Vecchio L, Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, Vacca C, Ferrara F, Rotoli B. Immunological classification of acute leukemias: comments on the EGIL proposals. *Leucemia.* 1996; 10(11):1832-1833
- Dermeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfatti M. CD47 engagement inhibits

cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 164(4):2193-2199

Demyrkan F, Cabuk M, Özsan GH, Pehlyvan M, Yüksel E, Öztıp Y, Ündar B. The use of different prognostic systems applied to myelodysplastic syndromes: A retrospective analysis. *Turk J Haematol.* 2000; 17(3):101-109

Denzlinger C, Benz D, Bowen D, Gelly K, Brugger W, Kanz L. Low-dose melphalan induces responses in elderly patients with high risk myelodysplastic syndromes and secondary leukemia. *Br J Haematol.* 2000; 108:93-95

De Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity.* 1998; 9(3):325-336

De Vita (Hrsg.). *Cancer: Principles and practice of Oncology.* 1997; 2293-2321

De Vries IJ, Eggert AA, Scharenborg NM, Vissers JL, Lesterhuis WJ, Boerman OC, Punt CJ, Adema GJ, Figdor CG. Phenotypical and functional characterisation of clinical grade dendritic cells. *J Immunother.* 2002; 25(5):429-435

Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001; 193(2):233-238

Dhodapkar MV, Steinmann RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, Donahoe SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF, Bhardwaj N. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest.* 1999; 104(2):173-180

Dhodapkar MV, Krasovsky J, Steinman RM, Bhardwaj N. Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans after without foreign helper epitopes. *J Clin Invest.* 2000 (I); 105: R9-R14

Dhodapkar MV, Bhardwaj N. Active immunization of humans with dendritic cells. *Journal of Clinical Immunology.* 2000 (II); 20(3):167-172

Dietz AB, Litzow MR, Gastineau DA, Vuk-Pavlovic S. Engineering dendritic cell grafts for clinical trials in cellular immunotherapy of cancer: Example of chronic myelogenous leukemia. *Croatian Medical Journal.* 2001; 42(4):428

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002; 298(5594):850

Dumortier H, van Mierlo GJ, Egan D, van Ewijk W, Toes RE, Offringa R, Melief CJ. Antigen presentation by an immature myeloid dendritic cell line does not cause CTL deletion *in vivo*, but generates CD8<sup>+</sup> central memory-like T cells that can be rescued for full effector function. *J Immunol.* 2005; 175(2):855-863

Dunussi-Joannopoulos K, Weinstein HJ, Nickerson PW, Strom TB, Burakoff SJ, Croop JM, Arceci RJ. Irradiated B7-1 transduced primary acute myelogenous leukemia (AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML. *Blood.* 1996; 87(7):2938-2946

Eisendle K, Lang A, Eibl B, Nachbaur D, Glassl H, Fiegl M, Thaler J, Gastl G. Phenotypic and functional deficiencies of leukaemic dendritic cells from patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2003; 120(1):63-73

El-Deiry WS. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. *Cancer biology*, Edt. Markowitz S. *Current Opinion in Oncology.* 1997; 9(1):79-88

Elgehtany MT. Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 1998; 83:1104-1115

Eljaafari A, Duperrier D, Mazet S, Bardin C, Bernaud J, Durand B, Gebuhrer L, Betuel H, Rigal D. 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.* 1998; 59(10): 625-634

Erben U, Thiel E, Bittroff-Leben A, Schoch C, Fichtner I, Durkop H, Notter M. CS-1, a novel c-kit<sup>+</sup> acute myeloid leukemia cell line with dendritic cell differentiation capacity and absent immunogenicity. *Int J Cancer.* 2003; 105(2):232-239

Esche C, Shurin MR, Lotze MT. The use of dendritic cells for cancer vaccination. *Curr Opin Mol Ther.* 1999; 1(1):72-81

Estey EH. Treatment of acute myelogenous leukemia. *Oncology (Huntingt).* 2002; 16(3):343-352, 355-356; discussion 357, 362, 365-366

Falkenburg JHF, Smit WM, Willemze R. Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses against acute or chronic myeloid leukemia. *Immunol Rev.* 1997; 157:223-230

Falkenburg JHF, Wafelmann AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CAM, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelermans HC, Fibbe WE, Willemze R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 1999; 94(4):1201-1208

Farag SS, George SL, Lee EJ, Baer M, Dodge RK, Becknell B, Fehinger TA, Silverman LR, Crawford J, Bloomfield CD, Larson RA, Schiffer CA, Caligiuri MA. Postremission therapy with



low-dose interleukin 2 with or without intermediate pulse dose interleukin 2 therapy is well tolerated in elderly patients with acute myeloid leukemia: Cancer and leukemia group B study 9420. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(9):2812-2819

Fauriat C, Moretta A, Olive D, Costello RT. Defective killing of dendritic cells by autologous natural killer cells from acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2005; [Epub ahead of print]

Fenaux P. Myelodysplastic syndrome. *Rev Prat.* 2002; 52(20):2301-2308

Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Röder C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen TL, Schuler G, Schuler-Thurner B. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. *Journal of Immunological Methods.* 2000; 245:15-29

Fialkow PJ, Singer JW, Rashkind WH et al. Clonal development, stem cell differentiation and clinical remission in acute nonlymphocytic leukemia. *New Engl J Med.* 1987; 317: 468-473

Fliedner TM, Körbling M, Calvow W, Bruch C, Herbst E. Cryopreservation of blood mononuclear leucocytes and stem cells suspended in a large fluid volume. *Blood.* 1977; 35:195-202

Foley R, Tozer R, Wan Y. Genetically modified dendritic cells in cancer therapy: implications for transfusion medicine. *Transf Med Rev.* 2001; 15(4):292-304

Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *Journal of Immunology.* 2001; 16:4254-4261

Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1024:124-137

Freedmann MH. Diamond-Blackfan anaemia. *Bailliere`s Best Pract Res Clin Haematol.* 2000; 13: 391-409

Friesen C, Fulda S, Debatin K-M. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia.* 1999; 13: 1854-1858

Fuchs R (Hrsg.). Akute myeloische Leukämie, Therapie – Forschung – Perspektiven. 2002; 16-85

Fujii S-I, Fujimoto K, Shimizu K, Ezaki T, Kawano F, Takatsuki K, Kawakita M, Matsuno K. Presentation of tumor antigens by phagocytic dendritic cell clusters generated from human CD34+ hematopoietic progenitor cells: induction of autologous cytotoxic T lymphocytes against leukemic cells in acute myelogenous leukemia patients. *Cancer Research.* 1999; 59:2150-2158

Fujii S, Shimizu D, Koji F, Kawano F. Malignant counterpart of myeloid dendritic cell (DC)

- belonging to acute myelogenous leukemia (AML) exhibits a dichotomous immunoregulatory potential. *J Leukoc Biol.* 2003; 73(1):82-90
- Gad M, Claesson MH, Pedersen AE. Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. *Apmis.* 2003; 111(7-8):766-778
- Galea-Lauri J. Immunological weapons against acute myeloid leukaemia. *Immunology.* 2002 (I); 107: 20-27
- Galea-Lauri J, Darling D, Mufti G, Harrison P, Farzaneh F. Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2002 (II); 51(6):299
- Galton DA. The myelodysplastic syndromes. Part I. What are they? Part II. Classification. *Scand J Haematol Suppl.* 1986; 45:11-20
- Ganser A, Heil G, Seipelt G, Hofmann W, Fischer JT, Langer W, Brockhaus W, Kolbe K, Ittel H, Brack N, Fuhr HG, Knuth P, Höffken K, Bergmann L, Hoelzer D. Intensive chemotherapy with idarubicin, ara-C, etoposide, and m-AMSA followed by immunotherapy with interleukin-2 for myelodysplastic syndromes and high-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol.* 2000; 79: 30-35
- Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.). *Tumorerkrankungen: Handbuch der Molekularen Medizin.* 1998; 154-173
- Gatti E, Pierre P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr Opin Cell Biology.* 2003; 15:468-473
- Geary SM, Ashman LK. HL-60 myeloid leukaemia cells acquire immunostimulatory capacity upon treatment with retinoic acid: analysis of the responding population and mechanism of cytotoxic lymphocyte activation. *Immunology.* 1996; 88:428-440
- Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, Chang AE, Braun TM, Mule JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res.* 2001; 61(23):8513-8519
- Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Hrsg.). *Immunologie.* Thieme Verlag. 1997; 201-218
- Gericke D. Probleme der Krebsimmuntherapie. *Münch Med Wschr.* 1977; 119(46):1497-1500
- Germsing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Hossfeld DK, Haas R, Aul C. Myelodysplastische Syndrome: Neue WHO-Klassifikation und Aspekte zur Pathogenese und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt.* 2001; 36:2272-2278

Giles FJ, Cortes JE, Baker SD, Thomas DA, O'Brien S, Smith TL, Beran M, Bivins C, Jolivet J, Kantarjian HM. Troxacitabine (BCH-4556), a novel dioxolane nucleoside analog, has anti-leukemic activity. *Blood*. 1999; 94(1 Suppl 2):230b (abstr.)

Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willmann CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *Hematology* 2002; 1:73-110

Giralt S. Bone marrow transplant in myelodysplastic syndromes: new technologies, same questions. *Curr Hematol Rep*. 2004; 3(3):165-172

Gitlitz BJ, Beldegrun AS, Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, Hinkel A, Mulders P, Moldawer N, Tso CL, Figlin RA. A pilot trial of tumor lysate loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother*. 2003; 26(5):412-419

Gorin NC, Estey E, Jones RJ, Levitsky HI, Borrello I, Slavin S. New developments in the therapy of acute myelocytic leukemia. *Hematology*. 2000; 69-89

Gosset P, Pichavant M, Faveeuw C, Bureau F, Tonnel AB, Trottein F. Prostaglandin D2 affects the differentiation and functions of human dendritic cells: impact on the T cell response. *Eur J Immunol*. 35(5):1491-1500

Gottlieb D. Cytokine manipulation of the immune response in the treatment of human acute leukemia. *Curr Pharm*. 2002; 8(5):419-431

Graf M, Reif S, Hecht K, Pelka-Fleischer R, Kroell T, Pfister K, Schmetzer H. High expression of costimulatory molecules correlates with low relapse free-survival-probability in acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol*. 2005; 84:287-297

Graf M, Reif S, Hecht K, Pelka-Fleischer R, Pfister K, Nuessler V, Schmetzer H. Low L-selectin (CD62L) expression in acute myeloid leukemia correlates with a bad cytogenetic risk. *Eur J Haematol*. 2003; 71:366-376

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

Greenberg PL. Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leukemia Research*. 1998; 22:1123-1136

Greenberg PL, Young NS, Gattermann N. Myelodysplastic Syndromes. *Hematology*. 2002; 1: 136-161

Gritzapis AD, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E, Baxevanis CN, Papamichail M. Large-scale

expansion of CD3(+)CD56(+) lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants. *Cancer Immunol Immunother.* 2002; 51(8):440-448

Gunzer M, Jänich S, Varga G, Grabbe S. Dendritic cells and tumor immunity. *Semin in Immunol.* 2001; 13:291-302

Gwang Kim J, Kyun Sohn S, Hwan Kim D, Ho Baek J, Young Lee N, Soo Suh J, Chae SC, Soo Lee K, Bo Lee K. Clinical implications of angiogenic factors in patients with acute or chronic leukemia: Hepatocyte growth factor levels have prognostic impact, especially in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2005; 46(6):885-891

Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, Fonatsch C, Ludwig WD, Wuchter C, Schlegelberger B, Staib P, Reichle A, Kubica U, Eimermacher H, Balleisen L, Gruneisen A, Haase D, Aul C, Karow J, Lengfelder E, Wormann B, Heinecke A, Sauerland MC, Buchner T, Hiddemann W. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol.* 2003; 21(2):256-259

Hajek R, Butch AW. Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma. *Medical Oncology.* 2000; 17:2-15

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia. *J Clin Oncol.* 1997; 17:3835-3849

Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Liu Yin JA. Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001; 97:2764-2771

Hastka J (Hrsg.). *Hämatologie.* 1997; 47-84

Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. *New Engl J of Med.* 1999; 340:1649-1660

Hebel K, Glauben R, Höhlig K, Thies B, Müller B. Memory of dendritic cells. 33. Annual Meeting of the DHfI, Marburg. September 2002; Abstract B.10

He L, Feng H, Raymond A, Kreeger M, Zeng Y, Graner M, Whitesell L, Katsanis E. Dendritic-cell-peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunother.* 2001; 50:31-40

He XY, Pohlmann B, Lichtin A, Rybicki L, Kalaycio M. Timed-sequential chemotherapy with concomitant granulocyte colony-stimulating factor for newly diagnosed de novo acute myelogenous

leukemia. *Leukemia*. 2003; 17(6):1078-1084

Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey K, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest*. 2002; 109(3):409-417

Hellström-Lindberg E, Willmann C, Barrett AJ, Sauntharajah. Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic syndromes. *Hematology (Educational Materials of the American Society of Hematology)*. 2000; 110-132

Hellstrom KE, Hellstrom I. Therapeutic vaccination with tumor cells that engage CD137. *J Mol Med*. 2003; 81(2):71-86

Hentrich M, Rockstroh J, Sandner R, Brack N, Hartenstein R. Acute myelogenous leukemias and myelomonocytic blast crisis following polycythemia vera in HIV positive patients: report of cases and review of literature. *Ann Oncol* 2000; 11:195-200

Hernando JJ, Park TW, Kubler K, Offergeld R, Schlebusch H, Bauknecht T. Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol Immunother*. 2002; 51(1):45-52

Herold G. (Hrsg.): *Innere Medizin*. 2004; 74-75

Hessel H, Mittermüller J, Zitzelsberger H, Weier HU, Bauchinger M. Combined immunophenotyping and FISH with sex-chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Histochem Cell Biol*. 1996; 106(5):481-487

Hiddemann W, Haferlach T (Hrsg.). *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*. Manual, Tumorzentrum München, 2003; 23-105

Hirai H. Molecular pathogenesis of MDS. *Int J Hematol* 2002; 2(Suppl 76): 213-221

Hirai H. Molecular Mechanisms of myelodysplastic syndromes. *Jpn J Clin Oncol*. 2003; 33(4):153-160

Höfer I (Hrsg.). *Wie Krebs entsteht. Spektrum der Wissenschaft. Spezial 5: Krebsmedizin*. 1996; 7-8

Hoffbrand AV, Pettit JE (Hrsg.). *Klinische Hämatologie*. Sandoz Atlas. 1989; 139-172

Hoffmann R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ (Hrsg.). *The Myelodysplastic syndromes. Hematology – Basic Principles and Practice*. 1991; 805-817

Hofmann WK, Lubbert M, Hoelzer D, Phillip Koeffler H. Myelodysplastic syndromes. *Hematol J*. 2004. 5(1):1-8

Hon H, Jacob J. Tracking dendritic cells in vivo: insights into DC biology and function. *Immunol Res.* 2004; 29(1-3):69-80

Houtenbos I, Westers TM, Stam AG, de Grujil TD, Scheper RJ, Ossenkoppele GJ, et al. Serum-free generation of antigen presenting cells from acute myeloid leukemic blasts for active specific immunisation. *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52(7):455-462

Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1996; 2:52-58

Inoshima M, Nakanishi Y, Minami T, Izumi M, Takayama K, Yoshino I, Hara N. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(11):3480-3486

Ishimaru T, Otake M, Ischimaru M. Dose-response relationships of neutrons and gamma rays to leukemia incidence among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki by type of leukemia. *Radiat Res.* 1979; 77:377-394

Iwase O, Aizawa S, Kuriyama Y, Yaguchi M, Nakano M, Toyama K. Analysis of bone marrow and peripheral blood immunoregulatory lymphocytes in patients with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.* 1995; 71(6):293-299

Jackson GH, Taylor PR. Acute myeloid leukemia: optimising treatment in elderly patients. *Drugs Aging.* 2002; 19(8):571-581

Jaiyesimi IA, Friedline JA, Mattson JC, Gyorfí T, Davis BH, Balasubramaniam M, Al-Khalili A, Burdakin J JR., Decker D, Zakalik D, Neumann K, Wilner F. Myelodysplastic syndrome at a large tertiary care community hospital: analysis according to the international prognostic scoring system. *Leuk Res.* 2000; 24:417-426

Janjic BM, Lu G, Pimenov A, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J Immunol.* 2002; 168(4):1823-1830

Jonathan MA. Antigen-presenting cells: Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:S146-S150

Kaminski ER, Goddard RV, Prentice AG. Dendritic cells and their potential therapeutic role in haematological malignancy. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44(10):1657-1666

Kanazawa N, Nakamura T, Tashiro K, Muramatsu M, Morita K, Yoneda K, Inaba K, Imamura S, Honjo T. Fractalkine and macrophage-derived chemokine: T cell-attracting chemokines expressed in

T cell area dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1999; 29(6):1925-1932

Kaneko T, Fusauch Y, Kakui Y, Okumura K, Mizoguchi H, Oshimi K. Cytotoxicity of cytokine-induced killer cells coated with bispecific antibody against acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 1994 ; 14(3-4): 219-229

Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ryan T, Schwabegger A, Cruikshank WW, Wiedermann CJ, Tilg H. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol.* 1999; 163(6):3232-3238

Keilholz U, Scheibenbogen C, Thiel E, Schadendorf D. Rational development of peptide vaccination in clinical oncology. *Onkologie.* 2001; 24:174-176

Kern W, Haferlach T, Schoch C, Hiddemann W. Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie. *Dtsch Med Wochenschr.* 2002; 127:2208-2213

Kern W, Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2004; 89:528-540

Keung Y-K, Beaty M, Powell BL, Molnar I, Buss D, Pettenati M. Philadelphia chromosome positive myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia – retrospective study and review of literature. *Leuk Res.* 2004; 28:579-586

Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, Lindner I, Cejas PJ, Bahlis NJ, Kolonias D, Carlson LM, Lee KP. Differentiation of acute and chronic myeloid leukemic blasts into the dendritic cell lineage: analysis of various differentiation-inducing signals. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54(1):25-36

Kienzle N, Olver S, Buttigieg K, Kelso A. The fluorolysis assay, a highly sensitive method for measuring the cytolytic activity of T cells at very low numbers. *J Immunol Methods.* 2002; 267(2):99

Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1999; 93:3074-80

Kochendorfer JN, Molldrem JJ. Leukemia Vaccines. *Current Oncology Reports.* 2001; 3(3): 193-200

Koehler T, Plettig R, Wetzstein W, Schmitz M, Ritter M, Mohr B, et al. Cytokine-driven differentiation of blasts from patients with acute myelogenous and lymphoblastic leukemia into dendritic cells. *Stem Cells.* 2000; 18(2):139-147

Kolb H-J, Holler E. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusions. *Curr Opin*

Oncology. 1997; 9:139-145

Kolb H-J, Schmid CH, Weisser M, Pihusch M, Tischer J, Pihusch R, Stoetzer O, Ledderose G, Schleuning M. Cytoreduction, DLI, or mobilized peripheral blood progenitors. *Ann Hematol.* 2002; 81(Suppl. 2):30-33

Kolb H-J, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood.* 2004; 103(3):767-776

Komada Y, Zhou Y-W, Zhang X-L, Chen T-X, Tanaka S, Azuma E, Sakurai M. Fas/APO-1 (CD95)-mediated cytotoxicity is responsible for the apoptotic death of leukaemic cells induced by interleukin-2-activated T cells. *Br J Haematol.* 1997; 96:147-157

Koski GK, Schwartz GN, Wenig DE, Gress RE, Engels FHC, Tsokos M, Czerniecki BJ, Cohen PA. Calcium-ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics independent of prior differentiation state, transformation status, or sensitivity to biologic agents. *Blood.* 1999; 94(4):1359-1371

Kouides PA, Bennett JM. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. *Semin Hematol.* 1996; 33(2):95-110

Kouides PA, Bennett JM. Advances in the therapy of the myelodysplastic syndromes. *Cancer Treatment Res.* 1999; 99:335-362

Kubsch S, Graulich E, Knop J, Steinbrink K. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1. *Eur J Immunol.* 2003; 33(7):1988-1997

Kuefler PR, Bunn PA. Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Haematol.* 1986 ; 15:695-726

Kufner S, Zitzelsberger H, Kroell T, Pelka-Fleischer R, Salem A, de Valle F, Schweiger C, Nuessler V, Schmid C, Kolb H-J, Schmetzer HM. Leukemia-derived dendritic cells (DC) can be generated from blood or bone marrow cells from patients with acute myeloid leukemia: A methodological approach under serum-free culture conditions. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2005 (I); 62:86-98

Kufner S, Zitzelsberger H, Kroell T, Pelka-Fleischer R, Salem A, de Valle F, Schmid C, Schweiger C, Kolb H-J, Schmetzer HM. Leukemia-derived dendritic cells (DC) can be generated from blood or bone marrow cells from patients with myelodysplasia: A methodological approach under serum-free culture conditions. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2005 (II); 62:75-85

Kufner S, Pelka-Fleischer R, Kroell T, Schmid C, Zitzelsberger H, Salih H, de Valle F, Treder W, Schmetzer HM. 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.* 2005 (III); (epub ahead of print)



- Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med.* 2000; 6(3):332-336
- Kurzrock R. Myelodysplastic syndrome overview. *Seminars in Hematology.* 2002; 39(3 Suppl 2): 18-25
- Kwong YL. Leukemic risk in polycythaemia vera and essential thrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 1996; 56: 90-92
- Laguens G, Coronato S, Laguens R, Portiansky E, Di Girolamo V. Human regional lymph nodes draining cancer exhibit a profound dendritic cell depletion as comparing to those from patients without malignancies. *Immunol Lett.* 2002; 84(3):159-162
- Lang P, Pfeiffer M, Handgretinger R, Schumm M, Demirdelen B, Stanojevic S, Klingebiel T, Kohl U, Kuci S, Niethammer D. Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29(6):497-502
- Langenkamp A, Casorati G, Garavaglia C, Dellabona P, Lanzavecchia A, Sallusto F. T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification. *Eur J Immunol.* 2002; 32(7):2046-2054
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(12):982
- Langston AA, Walling R, Winton EF. Update on myelodysplastic syndromes: new approaches to classification and therapy. *Semin Oncol.* 2004; 31(2 Suppl 4):72-79
- Laxmanan S, Robertson SW, Wang E, Lau JS, Briscoe DM, Mukhopadhyay D. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(1):193-198
- Lee JJ, Kim HJ, Chung JJ, Kim JS, Sohn SK, Kim BS, Lee KH, Kwak JY, Park YH, Ahn JS, Park YS. Comparisons of prognostic scoring systems for myelodysplastic syndromes: A Korean multicenter study. *Leukemia Res.* 1999; 5:425-432
- Lee JJ, Takei M, Hori S, Inoue Y, Harada Y, Tanosaki R, Kanda Y, Kami M, Makimoto A, Mineishi S, Kawai H, Shimosaka A, Heike Y, Ikarashi Y, Wakasugi H, Takauei Y, Hwang TJ, Kim HJ, Kakizoe T. The role of PGE(2) in the differentiation of dendritic cells: how do dendritic cells influence T-cell polarization and chemokine receptor expression? *Stem Cells.* 2002; 20(5):448-459
- Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau JF, Larsson M, Da Silva I, et al. A clinical grade

cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine*. 2002; 20(Suppl 4):A8

Leopold LH, Willemze R. The treatment of acute myeloid leukemia in first relapse: a comprehensive review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2002; 43(9):1715-1727

Levi I, Grotto I, Yerushalmi R, Ben-Bassalt I, Shpilberg O. Meta-analysis of autologous bone marrow transplantation versus chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukemia in first remission. *Leuk Res*. 2004; 28:605-612

Lieberam I, Foster I. The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 1999; 29(9):2684-2694

Li L, Schmitt A, Reinhardt P, Greiner J, Ringhoffer M, Vaida B, Bommer M, Vollmer M, Wiesneth M, Dohner H, Schmitt M. Reconstitution of CD40 and CD80 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Immun*. 2003; 3:8

Li L, Reinhard D, Hus I, Rolinski J, Dmoszynska A, Wiesneth M, Dohner H, Schmitt M. Dendritic cells (DC) generated from AML blasts express leukemia associated antigens eliciting specific cytotoxic T cell responses in the autologous host after DC vaccination (Abstract). 2004; 1812

Li L, Reinhardt P, Schmitt A, Barth TF, Greiner J, Ringhoffer M, Dohner H, Wiesneth M, Schmitt M. Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother*. 2005; 54(7):685-693

Lim SH, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer*. 1999; 83(2):215-222

Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44(9):1457-1462

Linn YC, Lau LC, Hui KM. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts. *Br J Haematol*. 2002; 116(1):78-86

Lodge PA, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res*. 2000; 60:829-833

Lorand-Metze I, Pinheiro MP, Ribeiro E, de Paula EV, Metze K. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. *Leuk Res*. 2004; 28:587-594

Loudovaris M, Hansen M, Suen Y, Lee SM, Casing P, Bender JG. Differential effects of autologous serum on CD34(+) or monocyte derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001; 10(4):

569-578

Lowdell MW, Koh MBC. Immunotherapy of AML: future directions. *J Clin Pathol.* 2000; 53:49-54

Ludwig WD, Thiel E. Diagnostik der akuten Leukämien mit morphologischen, immunologischen und zytologischen Verfahren. *Internist.* 1993; 54:498-510

Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman K-A, et al. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E2 regulates the migratory capacity of specific subsets. *Blood.* 2002; 100:1362-1372

Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2002; 14:129-135

Lutz MB. Forum Dendritische Zellen: Meeting Report DC2002 in Bamberg. *Immunologie Aktuell.* 2002 (I); 2(6):242

Lutz MB, Schnare M, Menges M, Rossner S, Rollinghoff M, Schuler G, Gessner A. Differential functions of IL-4 receptor types I and II and for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J Immunol.* 2002 (II); 169(7):3574-3580

Mackay IR, Rosen FS. T-cell function and migration. *New England Journal of Medicine.* 2000; 343(14):1020-1028

Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Kohler G, Noppen C, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V, Lindemann A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer.* 2000 (I); 68(3):385-392

Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000 (II); 49(3):152-156

Maeda A, Yamamoto K, Yamashita K, Asagoe K, Nohgawa M, Kita K, Iwasaki K, Ueda T, Takahashi A, Sasada M. The expression of costimulatory molecules and their relationship to the prognosis of human acute myeloid leukemia: Poor prognosis of B7.2-positive leukemia. *Br J Haematol.* 1998; 102:1257

Maier T, Tun-Kyi A, Tassis A, Jungius KP, Burg G, Dummer R, Nestle FO. Vaccination of cutaneous T-cell lymphoma patients using intranodal injection of autologous tumor lysate pulsed dendritic cells. *Blood.* 2003; 102(7):2338-2344

Markiewicz MA, Kast WM. Progress in the development of immunotherapy of cancer using ex vivo-generated dendritic cells expressing multiple tumor antigen epitopes. *Cancer Invest.* 2004; 22(3):417-434

Maroof A, English NR, Bedford PA, Gabrilovich DI, Knight SC. Developing dendritic cells become `lacy` cells packed with fat and glycogen. *Immunology*. 2005; 115(4):473-483

Marsh JCW. Hematopoietic growth factors in the pathogenesis and for the treatment of aplastic anemia. *Seminars in Hematology*. 2000; 37(1):81-90

Martin P, Ruiz SR, del Hoyo GM, Anjuere F, Vargas HH, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Dramatic increase in lymph node dendritic cell number during infection by the mouse mammary tumor virus occurs by a CD62L-dependent-blood-borne DC recruitment. *Blood*. 2002; 99(4):1282-1288

Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Uguccioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*. 2003; 198(4):615-621

Masey JA. The myelodysplastic syndromes. *British J of Biomed Science*. 1997; 54:65-70

Matsue H, Takashima A. Apoptosis in dendritic cell biology. *Journal of Dermatological Science*. 1999; 20:159-171

Matthews DC. Immunotherapy in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 1998; 12(Suppl 1):33-36

Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billstrom R, Ahlgren T, Mikoczy Z, Bjork J, Stromberg U, Nilsson PG, Mitelman F, Hagmar L, Johansson B. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia*. 2002; 16(12):2366-2378

Mavromatis B, Cheson BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003; 21(9):1874-81

Maynadie M, Picard F, Husson B, Chatelain B, Cornet Y, Le Roux G, Campos L, Dromelet A, Lepelley P, Jouault H, Imbert M, Rosenwadj M, Verge V, Bissieres P, Raphael M, Bene MC, Feuillard J. Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002; 100(7): 2349-2356

Meloni G, Trisolini SM, Capria S, Torelli GF, Baldacci E, Torromeo C, Valesini G, Mandelli F. How long can we give interleukin-2? Clinical and immunological evaluation of AML patients after 10 or more years after IL2 administration. *Leukemia*. 2002; 16(10):2016-2018

Mengis C, Aebi S, Tobler A, Dahler W, Fey MF. Assessment of differences in patient populations selected for excluded from participation in clinical phase III acute myelogenous leukemia trials. *J Clin Oncol*. 2003; 21(21):3933-3939

- Merchant SH, Gonchoroff NJ, Hutchinson RE. Apoptotic index by Annexin V flow cytometry: Adjunct to morphologic and cytogenetic diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry*. 2001; 46:28-32
- Mitelman F (Hrsg.). Guidelines for Cancer Cytogenetics, Anhang zu: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 1995. S. Karger, Basel, Schweiz
- Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, Zandotti C, Briere F, de Lamballeri XN, Isnardon D, Sainty D, Olive D, Gaugler B. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood*. 2001; 98(13):3750-3756
- Mohty M, Isnardon D, Blaise D, Mozziconacci MJ, Lafage-Pochitaloff M, Briere F, et al. Identification of precursors leukemic dendritic cells differentiated from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002; 16(11):2267-2274
- Mohty M, Gaugler B, Calmels B, Blaise D, Vey N, Chabannon C, Olive D. [Immunotherapy of acute myeloid leukemias: development of vaccines and cell therapy approaches]. *Bull Cancer*. 2003; 90(8-9):751-757
- Moldenhauer A, Nociari MM, Dias S, Lalezari P, Moore MA. Optimized culture conditions for the generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes. *Vox Sang*. 2003; 84(3):228-236
- Moldenhauer A, Frank RC, Pinilla-Ibarz J, Holland G, Scheinberg D, Salama A, Seeger K, Nimer SD, Moore MA. Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol*. 2004; 76(3):623-633
- Mole RH. Radiation from Tschernobyl and the risk of leukemia. 1991; 5:443-444
- Molica S, Vacca A, Levato D, Merchionne F, Ribatti D. Angiogenesis in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*. 2004; 28:321-324
- Molldrem J. Immune therapy of AML. *Cytotherapy*. 2002; 4(5):437-438
- Montagna D, Maccario R, Montini E, Tonelli R, Lisini D, Pagani S, Comoli P, Moretta A, Assirelli E, Basso S, Vitiello A, Pession A, Locatelli F. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leucemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. *Exp Hematol*. 2003; 31:1031-1038
- Moretta L, Ferlazzo G, Mingari MC, Melioli G, Moretta A. Update on natural killer cells: cross-talk with dendritic cells and role in the cure of acute myeloid leukemias. *Cancer J*. 2003; 9(4):232-237
- Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Boomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in

acute myeloid leukemia. *Seminars in Oncol.* 1997; 24:17-31

Mueller MR, Tsakou G, Gruenebach F, Schmidt SM, Brossart P. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood.* 2004; 103:1763-1769

Mufti GJ, Stevens JR, Oscier DG, Hamblin TJ, Machin D. Myelodysplastic syndromes: A scoring system with prognostic significance. *Br J Haematol.* 1985; 59:425-433

Mule JJ. Dendritic cells: at the clinical crossroads. *The Journal of Clinical Investigation.* 2000; 105(6): 707-708

Muller WA. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med.* 2001; 194(9): F47-F51

Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *The Journal of Clinical Investigation.* 2004; 114(2):280-290

Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL. Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment. *Prostate.* 1999; 39(1):54-59

Narita M, Takahashi M, Liu A, Nikkuni K, Furukawa T, Toba K, et al. Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 2001; 29(6):709-719

Nencioni A, Lauber K, Grunebach F, Brugger W, Denzlinger C, Wesselborg S, Brossart P. Cyclophentone prostaglandins induce caspase activation and apoptosis in dendritic cells by a PPAR-gamma-independent mechanism: regulation by inflammatory and T cell-derived stimuli. *Exp Hematol.* 2002; 30(9):1020-1028

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998; 4:328-330

Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nature Medicine* 2001; 7:761-765

Nevill TJ, Fung HC, Shepherd JD, Horsman DE, Nantel SH, Klingemann H-G, Forrest DL, Toze CL, Sutherland HJ, Hogge DE, Naiman SC, Le A, Brockington DA, Barnett MJ. Cytogenetic abnormalities in primary myelodysplastic syndrome are highly predictive of outcome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1998; 92(6):1910-1917

- Newland A. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia in adults. *Int J Hematol.* 2002; 76(Suppl 1):253-258
- Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Klueter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. *J Immunol Methods.* 2003; 9281:1-12
- Nicol A, Nieda M, Koezuka Y, Porcelli S, Suzuki K, Tadokoro K, Durrant S, Juji T. Dendritic cells are targets for human invariant Valpha24+ natural killer T-cell cytotoxic activity: an important immune regulatory function. *Exp Hematol.* 2000; 28(3):276-282
- Nicoletti C, Temblay JN, Regoli M, Bertelli E, Man AL. Differential regulation of dendritic cell-T cell cross talk in the gut-associated lymphoid tissue. *Mol Immunol.* 2005; [Epub ahead of print]
- [No authors listed]. Antibody therapy zaps cancer. *Treatmentupdate.* 2003;15(1):6
- Norgauer J, Ibig Y, Gmeiner D, Herouy Y, Fiebich BL. Prostaglandin E2 synthesis in human monocyte-derived dendritic cells. *Int J Mol Med.* 2003; 12(1):83-86
- Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay J, Palucka K. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Lett.* 2000; 74(1):5-10
- Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 53(2 Suppl 2):S171-176
- Oehler L, Berer A, Kollars M, Keil F, Konig M, Waclavicek M, et al. Culture requirements for induction of dendritic cell differentiation in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2000; 79(7): 355-362
- Ogata K, Tamura H, Yokose N, An E, Dan K, Hamaguchi H, Sakamaki H, Onozawa Y, Clark SC, Nomura T. Effects of interleukin-12 on natural killer cell cytotoxicity and the production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in patients with myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology.* 1995; 90:15-21
- Okamoto T, Okada M, Mori A, Saheki K, Takatsuka H, Wada H, Tamura A, Fujimori Y, Takemoto Y, Kanamaru A, Kakishita E. Correlation between immunological abnormalities and prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Int J Hematol.* 1997; 66:345-351
- Onida F, Kantarjian H, Smith T, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2002; 99:840-849
- Oosterveld M, Muus P, Suci S, Koller C, Verhoef G, Labar B, Wijermans R, Aul C, Fiere K, Selleslag D, Willemze R, Gratwohl A, Ferrant A, Mandelli F, Cortes J, de Witte T, Estey E. Chemotherapy only compared to chemotherapy followed by transplantation in high risk

myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia; two parallel studies adjusted for various prognostic factors. *Leukemia*. 2002; 16(9):1615-1621

Osada T, Nagawa H, Takahashi T, Tsuno NH, Kitayama J, Shibata Y. Dendritic cells cultured in anti-CD40 antibody-immobilized plates elicit a highly efficient peptide-specific T-cell response. *J Immunother*. 2002; 25(2):176-184

Ostendorf PC, Seeber S (Hrsg.). *Hämatologie-Onkologie*. 1997:463-474

Ossenkoppele GJ, Graveland WJ, Sonneveld P, Daenen SMGJ, Biesma DH, Verdonck LF, Schaafsma R, Westveer PHM, Peters F, Noordhuis P, Muus P, van der Holt R, Delforge M, Löwenberg B, Verhoef GEG. The value of fludarabine in addition to ARA-C and G-CSF in the treatment of patients with high-risk myelodysplastic syndromes and AML in elderly patients. *Blood*. 2004; 103:2908-2913

Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA, Vuk-Pavlovic S. Mature myeloid dendritic cells for clinical use prepared from CD14+ cells isolated by immunomagnetic adsorption. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001; 10(3):427-429

Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: A novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature Medicine*. 2002; 8(3):289-293

Panoskaltzis N, Belanger TJ, Liesveld JL, Aboud CN. Optimal cytokine stimulation for the enhanced generation of leukemic dendritic cells in short-term culture. *Leuk Res*. 2002; 26(2):191-201

Papadaki HA. Cell adhesion molecules in haematology. *Haema*. 1999; 2(4):180-191

Pawlowska AB, Hashino S, McKenna H, Weigel BJ, Taylor PA, Blazar BR. In vitro tumor-pulsed or in vitro Flt3 ligand-generated dendritic cells provide protection against acute myelogenous leukemia in nontransplanted or syngeneic bone marrow-transplanted mice. *Blood*. 2001; 97(5):1474-1482

Pedersen-Bjergaard J, Larsen SO. Incidence of acute non lymphocytic leukemia, preleukemia and acute myeloproliferative syndrome up to 10 years after treatment of Hodgkins`s disease. *New Engl J Med*. 1984; 307: 965-971

Peipp M, Valerius T. Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30(4):507-511

Pepper C, Thomas A, Tucker H, Hoy T, Bentley P. Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leukemia Res*. 1998; 22:439-444

Pickel WF, Majdic O, Stöckl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W. Molecular



and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14<sup>+</sup> peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 1996; 157:3850-3859

Pomeroy C, Oken M, Rydell RE. Infection in myelodysplastic syndromes. *American Journal of Medicine.* 1991; 90:338-344

Pospisilova D, Borovickova J, Polouckova A, Spisek R, Sediva A, Hrusak O, Stary J, Bartunkova J. Generation of functional dendritic cells for potential use in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunology Immunotherapy.* 2002; 51(2):72-78

Pui CH, Behm FG, Raimondy SC et al. Secondary acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllo-toxins for acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med.* 1989; 321:136-142

Racanelli V, Behrens S-E, Aliberti J, Reherrmann B. Dendritic cells transfected with cytopathic self-replicating RNA induce crosspriming of CD8<sup>+</sup> T cells and antiviral immunity. *Immunity.* 2004; 20: 47-58

Raspadori D, Damiani D, Michieli M, Stocchi R, Gentili S, Gozzetti A, Masolini P, Michelutti A, Geromin A, Fanin R, Lauria F. CD56 and PGP expression in acute myeloid leukemia: impact on clinical outcome. *Haematologica.* 2002; 87:1135-1140

Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Robustelli Della Cuna G, Tura S, Baccharani M, Lemoli RM. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood;* 2001; 100(1):230-237

Raza A. Evolving concepts in myelodysplastic syndromes. *Cancer Treat Res.* 2001; 108:1-24

Re F, Arpinati M, Testoni N, Ricci P, Terragna C, Preda P, Ruggeri D, Senese B, Chirumbolo G, Martelli V, Urbini B, Baccharani M, Tura S, Rondelli D. Expression of CD86 in acute myelogenous leukemia is a marker of dendritic/monocytic lineage. *Experimental Hematology.* 2002; 30:126-134

Rea D, Johnson ME, Havenga MJ, Melief CJ, Offringa R. Strategies for improved antigen delivery into dendritic cells. *Trends Mol Med.* 2001; 7(3):91-94

Reichardt VL, Okada CY, Lio A, Benike CJ, Stockerl-Goldstein KE, Engleman EG, Blume KG, Levy R. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma - a feasibility study. *Blood.* 1999; 93:2411-2419

Reichardt VL, Brossart P. Current status of vaccination therapy for leukemias. *Curr Hematol Rep.* 2005; 4(1):73-76

Reinhardt P, Schmitt M, Ringhoffer M, Greiner J, Maccari B, Schmitt A, et al. Autologous dendritic cells for the treatment of patients with refractory acute myeloid leukemia. *Onkologie.* 2002; 25 (Suppl.4):182. Abstract 640

Reiterer P, Fichtner I, Lipp M. Role of chemokine receptor CCR7 in organ-specific infiltration of tumor cells and metastasis formation. 33th Annual Meeting of the DGfI Marburg. 2002; Workshop D: Abstract D.20

Relloso M, Puig-Kroger A, Pello OM, Rodriguez-Fernandez JL, de la Rosa G, Longo N, Navarro J, Munoz-Fernandez MA, Sanchez-Mateos P, Corbi AL. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol.* 2002; 168(6):2634-2643

Re F, Arpinati M, Testoni N, Ricci P, Terragna C, Preda P, Ruggeri D, Senese B, Chirumbolo G, Martelli V, Urbini B, Bacarani M, Tura S, Rondelli D. Expression of CD86 in acute myelogenous leukemia is a marker of dendritic/monocytic lineage. *Exp Hematol.* 2002; 30(2):126-134

Renner C, Hartmann F, Pfreundschuh M. Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung solider Tumoren. *Deutsches Ärzteblatt.* 2002; 13:850-858

Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, et al. Identification of human cancer deficient in antigen processing. *J Exp Med.* 1993; 177:265-270

Reza S, Dar S, Andric T, Qawi H, Mundle S, Shetty V, Venugopal P, Ali I, Lisak L, Raza A. Biologic characteristics of 164 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma.* 1999; 33(3-4):281-287

Ridell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. T-cell therapy of leukemia. *Cancer Control.* 2002; 9(2):114-122

Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccines. *Cancer Invest.* 2003; 21(6):873-886

Rieser C, Ramoner R, Hörtl L, Rogatsch H, Papesh C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M. Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Int.* 2000; 63:151-159

Rigolin GM, Cuneo A, Roberti MG, Bardi A, Bigoni R, Piva N, Minotto C, Agostini P, DeAngeli C, Del Senno L, Spanedda R, Castoldi G. Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinicobiological findings. *British J of Haematol.* 1998; 103: 189-197

Rigolin GM, Howard J, Buggins A, Sneddon C, Castoldi G, Hirst WJR, et al. Phenotypic and functional characteristics of monocyte-derived dendritic cells from patients with myelodysplastic syndromes. *British J of Haematol.* 1999; 107:844-850

Rigolin GM, Della Porta M, Bigoni R, Tieghi A, Cuneo A, Castoldi G. Dendritic cells in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001; 114(4):830-833

Rigolin GM, Castoldi G. The role of rHuEpo in low-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Lymphoma*. 2005; 46(6):823-831

Robinson SP, English N, Jaju R, Kearney L, Knight SC, Reid CD. The in vitro generation of dendritic cells from blasts cells in acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 1998; 103:763-771

Roche. *Lexikon der Medizin*. 1998; 994-997

Roddie PH, Horton Y, Turner ML. Primary acute myeloid leukaemia blasts resistant to cytokine-induced differentiation to dendritic-like leukaemia cells can be forced to differentiate by the addition of bryostatin-1. *Leukemia*. 2002; 16(1):84-91

Römpf. *Lexikon Biochemie und Molekularbiologie*. Thieme Verlag. 2000; 289-291

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*. 2004; 10(9):909-915

Rosen RB, Kang S-JA. Congenital agranulocytosis terminating in acute myelomonocytic leukemia. *J Pediatr*. 1979; 94:406-408

Rossi G, Pelizzari AM, Bellotti D, Tonelli M, Barlati S. Cytogenetic analogy between myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia of elderly patients. *Leukemia*. 2000; 14: 636-641

Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996; 10:877-895

Rund D, Ben-Yehuda D. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: Evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Hematology*. 2004; 9(3): 179-187

Sadovnikova E, Parovichnikova EN, Semikina EL, Kopiltsova EA, Svinareva DA, Belkin VM, Torubarova NA, Savchenko VG. Adhesion capacity and integrin expression by dendritic-like cells generated from acute myeloid leukemia blasts by calcium ionophore treatment. *Exp Hematol*. 2004; 32(6):563-570

Sallusto F, Lanzavecchia A. 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*. 1994; 179(4):1109-1118

Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998; 28(9):2760-2769

Sallusto F, Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 2002; 4(Suppl.3):127-131

Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunological Rev.* 2000; 177:134-140

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector function. *Nature.* 1999; 402:34-38

Sandler DP, Ross JA. Epidemiology of acute leukemias in children and adults. *Semin Oncol.* 1997; 24:3-16

Santiago-Schwarz F, Divaris N, Kay C, Carsons SE. Mechanisms of tumor necrosis factor and granulocyte-macrophage-colony stimulating-factor induced dendritic cell development. *Blood.* 1993; 82(10):3019-3028

Santiago-Schwarz F, Belilio E, Diamond B, Carsons SE. TNF in combination with GM-CSF enhances differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J Leuk Biol.* 1994 (I); 52:274-281

Santiago-Schwarz F, Coppock DL, Hindenburg AA, Kern J. Identification of a malignant counterpart of the monocyte-dendritic cell progenitor in an acute myeloid leukemia. *Blood.* 1994 (II); 84(9):3054-3062

Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T. Etiopathology, prognosis and therapy of myelodysplastic syndromes. *Hematol and Cell Therapy.* 1997; 39:277-294

Sato M, Takayama T, Tanaka H, Konishi J, Suzuki T, Kaiga T, Tahara H. Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2). *Cancer Sci.* 2003; 94(12):1091-1098

Sathaporn S, Eremin O. Dendritic cells (II): role and therapeutic implications in cancer. *J R Coll Surg Edinb.* 2001; 46:159-167

Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2002; 100(4):1354-1361

Scheeren RA, Koopman G, Van der Baan S, Meijer CJ, Pals ST. Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1991; 21(5):1101-1105

Schirmmayer V. Immuntherapie von Karzinomen?. *Deutsches Ärzteblatt, Jg. 99, Heft 13, 2002;* 99(13):848-849

Schlichting CL, Schareck WD, Weis M. Dendritic cell endothelium interaction in autoimmunity. *Curr Pharm Des.* 2004; 10(2):171-181

Schmetzer HM, Poleck B, Mittermüller J, Duell T, Wilmanns W, Gerhartz HH. Clonality analysis as a tool to study the biology and response to therapy in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 1997; 11:660-666

Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Dauer M, Krug A, Hartmann G, Eigler A, Endres S. Dendritische Zellen: Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Deutsches Ärzteblatt.* 2002; 99(37): A-2408/B-2058/C-1929

Schoch C, Haase D, Fonatsch C, Haferlach T, Löffler H, Schlegelberger V, Hossfeld DK, Becher R, Sauerland MC, Heinecke A, Womann B, Buchner T, Hiddemann W. The significance of trisomy 8 in de novo acute myeloid leukemia: the accompanying chromosome aberrations determine the prognosis. German AML Cooperative Study Group. *Br J Haematol.* 1997; 99:605-611

Schott M, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum WA, Feldkamp J. Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(10): 4965-4969

Schui DK, Singh L, Schneider B, Knau A, Hoelzer D, Weidmann E. Inhibiting effects on the induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with lysates from acute myeloid leukemia blasts. *Leuk Res.* 2002; 26(4):383-389

Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinmann RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15:138-147

Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, Roder C, Haendle I, Leisgang W, Dunbar R, Cerundolo V, von Den Driesch R, Knop J, Brocker EB, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1 melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 165(6):3492-3496

Seeler S, Schütte J (Hrsg.). *Therapiekonzepte Onkologie.* 2003; 58-199

Seidemann K, Henze G, Beck JD, Sauerbrey A, Kuhl J, Mann F, Reiter A. Non-Hodgkins` lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials. *Ann Oncol.* 2000; Suppl 1:141-145

Selleri C, Maciejewski JP, Catalano L, Ricci P, Andretta C, Luciano L, Rotoli B. Effects of cyclosporine on hematopoietic and immune functions in patients with hypoplastic myelodysplasia. *Cancer.* 2002; 95:1911-1922

Sepp N, Zwierzina H, Smolle J, Schmalzl F, Fritsch P, Schuler G. Epidermal Langerhans cells in

myelodysplastic syndromes are abnormal. *J Invest Dermatol.* 1991; 96(6):932-936

Serve H, Büchner T, Berdel WE. Bewährtes und Neues in Diagnose und Therapie der akuten myeloischen Leukämie. *Educational DKK Berlin.* 2000; 25-30

Seyfarth B, Dreger P, Schmitz N. Hämatopoetische Stammzelltransplantation. *Onkologisch.* 2002; 1:4-7

Shibuya A, Ishii S, Obinata K. Successful bone marrow plus cord blood stem cell transplantation in a girl who developed myelodysplastic syndrome from hepatitis-associated aplastic anemia treated with long-term immunosuppressants and growth factors. *Hematology.* 2002; 7(5):301-304

Shimizu K, Fields RC, Giedlin M, Mule JJ. Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 2268-2273

Shurin MR. Preparation of human dendritic cells for tumor vaccination. *Methods Mol Biol.* 2003; 215:437-462

Singh-Jasuja H, Hilf N, Scherer HU, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H. The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells. *Cell Stress Chaperones.* 2000; 5(5):462-470

Solenthaler M, Tobler A. Myelodysplastische Syndrome - gar nicht so selten. *Ther Umsch.* 2004; 61(2):117-124

Song LP, Cheng JL, Wang XB, Zhang Z, Fang M, Zhou ZY, Huang HL. A new model of trispecific antibody resulting the cytotoxicity directed against tumor cells. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2003; 35(6):503-510

Souto EX, Chauffaile M de L, Moncau JE, Niero-Melo L, Braga GW, Silva MR, Kerbaux J. Myelodysplastic syndromes (MDS): prognostic factors and scoring systems. *Revista Paulista de Medicina.* 1997; 115(5):1537-1541

Spisek R, Chevallier R, Morineau N, Milpied N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Meflah K, Gregoire M. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res.* 2002; 62(10):2861-2868

Stasi R, Amadori S. Infliximab chimaeric anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment for patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2002 (I); 116(2):334-337

Stasi R, Brunetti M, Terzoli E, Amadori S. Sustained response to recombinant human erythropoietin and intermittent all-trans retinoic acid in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2002 (II);

99(5):1578-1584

Steele TA, Carpenter SS. Immunotherapeutic strategies for ovarian cancer. *Mod Asp Immunobiol.* 2000; 1(4):131-135

Stein GM, Bussing A, Schietzel M. Stimulation of the maturation of dendritic cells in vitro by a fermented mistletoe extract. *Anticancer Res.* 2002; 22(6C):4215-4219

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med.* 1973; 137:1142-1161

Steinman RM. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell.* 2000; 100(5):491-494

Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis.* 2003; 111(7-8):675-692

Stelljes M, Bornhauser M, Kroger M, Beyer J, Sauerland MC, Heinecke A, Berning B, Scheffold C, Silling G, Buchner T, Neubauer A, Fauser AA, Ehninger G, Berdel WE, Kienast J. Conditioning with 8 Gy total body irradiation and fludarabine for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005; [Epub ahead of print]

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

Steurer M, Sudmeier I, Stauder R, Gastl G. Thromboembolic events in patients with myelodysplastic syndrome receiving thalidomide in combination with darbepoetin-alpha. *Br J Haematol.* 2003; 121(1):101-103

Stirewalt DL, Meshinchi S, Radich JP. Molecular targets in acute myelogenous leukemia. *Blood Rev.* 2003; 17(1):15-23

Stone RM. Treatment of acute myeloid leukemia: state-of-the-art and future directions. *Semin Hematol.* 2002; 39(3 Suppl 2):4-10

Stripecke R, Levine AM, Pullarkat V, Cardoso AA. Immunotherapy with acute leukemia cells modified into antigen-presenting cells: ex vivo culture and gene transfer methods. *Leukemia.* 2002; 16:1974-1983

Strobl H, Scheinecker C, Riedl E, Csmarits B, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Majdic O, Knapp W. Identification of CD68<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol.* 1998; 161(2):740-748

Strobl H, Bello-Fernandez C, Riedl E, Pickl WF, Majdic O, Lyman SD, et al. Flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-

type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood*. 1997; 90(4):1425-1434

Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res*. 2003; 63(9):2127-2133

Suen Y, Lee SM, Aono F, Hou S, Loudovaris M, Ofstein G, et al. Comparison of monocyte enrichment by immuno-magnetic depletion or adherence for the clinical-scale generation of DC. *Cytotherapy*. 2001; 3(5):365-375

Sultana TA, Harada H, Ito K, Tanaka H, Kyo T, Kimura A. Expression and functional analysis of granulocyte colony-stimulating factor receptors on CD34<sup>++</sup> cells in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 2003; 121(1):63-75

Sundquist M, Johansson C, Wick MJ. Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity. *Apmis*. 2003; 111(7-8):715-724

Svane IM, Soot ML, Buus S, Johnsen HE. Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. *Apmis*. 2003; 111(7-8):818-828

Svane IM, Pedersen AE, Johnsen HE, Nielsen D, Kamby C, Gaarsdal E, Nikolajsen K, Buus S, Claesson MH. Vaccination with p53-peptide-pulsed dendritic cells, of patients with advanced breast cancer: report from a phase I study. *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53(7):633-641

Tallmann MS. Advancing the treatment of hematologic malignancies through the development of targeted interventions. *Semin Hematol*. 2002; 39(4 Suppl 3):1-5

Tan H, Zeng LJ, Ye X. Ex vivo induction of anti-leukemia cytotoxic T cell effect by dendritic cells from human umbilical cord blood origin. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2005; 13(3):472-478

Tassin F, Hermanne JP, Schaaf-Lafontaine N, Herens C, Thiry A, Paulus JM, Boniver J, Fillet G. [Myelodysplastic syndromes: preleukemic syndromes]. *Rev Med Liege*. 1998; 53(6):357-362

Tatsumi T, Storkus WJ. Dendritic cell-based vaccines and therapies for cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2002; 2(8):919-928

Taylor CG, Stasi R, Bastianelli C, et al. Diagnosis and classification of the acute leukemias: recent advances and controversial issues. *Hematopathol Mol Hematol*. 1996; 10(1-2):1-38

ˆt Hart BA, van Kooyk Y. Yin-Yang regulation of autoimmunity by DCs. *Trends in Immunology*. 2004; 25(7):353-359

Thomas M, Khorana S, Konneh D, Lu J, Maadani F, de Lima M, Champlin RE, McMannis JD.



Large scale production of dendritic cell cultures for generation of activated lymphocytes. Seventh annual symposium, Ishage. Juni 2001; Poster 118

Thomas X, Le QH. [Treatment of acute myeloid leukemias in the adult in relapse]. *Bull Cancer*. 2002; 89(9):795-807

Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch R, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. 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*. 1999; 190:1669-1678

Thurner M, Zelle-Rieser C. Deficiency in eicosanoid production may limit the therapeutic efficacy of human monocyte-derived dendritic cells. *Mod Asp Immunobiol*. 2001; 2(2):58-61

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(6):1025-1034

Titzer S, Christensen O, Manzke O, Tesch H, Wolf J, Emmerich B, Carsten C, Diehl V, Bohlen H. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *British Journal of Haematology*. 2000; 108:805-816

Trail PA, King HD, Dubowchik GM. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52(5): 328-337

Treon SP, Raje N, Anderson KC. Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies. *Seminars in Oncology*. 2000; 27(5):598-613

Tricot G, Mecucci C, Van den Berghe H. Evolution of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1986. 63(4):609-614

Tsao AS, Kantarjian H, Thomas D, Giles F, Cortes J, Garcia-Manero G, Huh Y, Yang Y, Shen Y, Albitar M, Estey E. C-kit receptor expression in acute leukemias – association with patient and disease characteristics and with outcome. *Leuk Res*. 2004; 28:373-378

Tsimberidou A, Estey E, Cortes J, Thomas D, Faderl S, Verstovsek S, Garcia-Manero G, Keating M, Albitar M, O'Brien S, Kantarjian H, Giles F. Gemtuzumab, fludarabine, cytarabine, and cyclosporine in patients with highly diagnosed acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2003; 97(6):1481-1487

Tsuchiya T, Hagihara M, Shimakura Y, Ueda Y, Gansuud B, Munkhbat B, Inoue H, Tazume K, Kato S, Hotta T. The generation of immunocompetent dendritic cells from CD34+ acute myeloid or lymphoid leukemia cells. *Int J Hematol*. 2002; 75(1):55-62

- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*. 2000; 68(12):6883-6890
- Turtle CJ, Hart DN. Dendritic cells in tumor immunology and immunotherapy. *Curr Drug Targets*. 2004; 5(1):17-39
- Upham JW, Lundahl J, Liang H, Denburg JA, O'Byrne P, Snider DP. Simplified quantification of myeloid dendritic cells in peripheral blood using flow cytometry. *Cytometry*. 2000; 40:50-59
- van Besien K, Artz A, Smith S, Cao D, Rich S, Godley L, Jones D, Del Cerro P, Bennett D, Casey B, Odenike O, Thirman M, Daugherty C, Wickrema A, Zimmerman T, Larson RA, Stock W. Fludarabine, Melphalan, and Alemtuzumab conditioning in adults with advanced acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: Excellent outcomes in patients with standard-risk disease. *J Clin Oncol*. 2005; [Epub ahead of print]
- Van den Eynde B, Gaugler B, van der Bruggen P, Coulie P, Brichard V, Boon T. Human tumour antigens recognized by T-cells: perspectives for new cancer vaccines. *Biochem Soc Trans*. 1995; 23(3):681-686
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on human melanoma. *Science*. 1991; 254:1643-1647
- Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-Affinity Assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998; 31:1-9
- Van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev*. 2002; 186:47-56
- Van Tendeloo VFI, Van Broeckhoven C, Bernemann ZN. Gene-based cancer vaccines: an ex vivo approach. *Leukemia*. 2001; 15:545-558
- Vialle-Castellano A, Gaugler B, Mohty M, Isnardon D, van Baren N, Olive D. Abundant expression of fibronectin is a major feature of leukemic dendritic cells differentiated from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004; 18(3):426-433
- Vilella R, Benitez D, Mila J, Lozano M, Vilana R, Pomes J, Tomas X, Costa J, Vilalta A, Malveyh J, Puig S, Mellado B, Marti R, Castel T. Pilot study of treatment of biochemotherapy-refractory stage IV melanoma patients with autologous dendritic cells pulsed with a heterologous melanoma cell line lysate. *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53(7):651-658
- Vollmer M, Li L, Schmitt A, Greiner J, Reinhardt P, Ringhoffer M, Wiesneth M, Döhner H, Schmitt M. Expression of human leucocyte antigens and co-stimulatory molecules on blasts of patients with

acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*. 2003; 120:1000-1008

Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. *The New England Journal of Medicine*. 2000; 343(14):1020-1034

Von Mehren M, Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med*. 2003; 54:343-69

Vuckovic S, Fearnley DB, Gunningham S, Spearing RL, Patton WN, Hart DNJ. Dendritic cells in chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 1999; 105:974-985

Waclawicek M, Berer A, Oehler L, Stöckl J, Schloegl E, Majdic O, et al. Calcium ionophore: a single reagent for the differentiation of primary human acute myelogenous leukemia cells towards dendritic cells. *British Journal of Hematology*. 2001; 114:466-473

Waeckerle-Men Y, Scandella E, Uetz-Von Allmen E, Ludewig V, Gillessen S, Merkle HP, Gander B, Groettrup M. Phenotype and functional analysis of human monocyte-derived dendritic cells loaded with biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres for immunotherapy. *J Immunol Methods*. 2004; 287(1-2):109-124

Waller KE, Ernstoff MS. Modulation of Antitumor Immune Responses by Hematopoietic Cytokines. *Cancer*. 2003; 97(7):1797-1809

Waller EK. Cellular immunotherapy and cancer. *Seminars in Oncology*. 2004; 31(2 Suppl 4):87-91

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Ridell SR. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*. 1995; 333(16):1038-1042

Wang L, Chen S, Liu Y, Fu J, Yu H, Li J, et al. The function of dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Za Zhi*. 2000; 8(3):161-165

Weber J. Peptide vaccines for cancer. *Cancer Invest*. 2002; 20(2):208-221

Wedding U, Bokemeyer C, Meran JG. Elderly patients with acute myeloid leukemia: Characteristics in biology, patients and treatment. *Onkologie*. 2004; 27:72-82

Wehmeier A, Löffel J. Einteilung der Leukämien: Epidemiologie und Prognose. *Innovartis, Das ärztliche Panorama*. 2001; 3:5-11

Weigel BJ, Nath N, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Chen W, Krieg AM, Brasel K, Blazar BR. Comparative analysis of murine marrow-derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL-4 and matured with immune stimulatory agents on the in vivo induction of antileukemia responses. *Blood*. 2002; 100(12):4169-4176

- Westermann J, Korner IJ, Kopp J, Kurz S, Zenke M, Dorken B, Pezzutto A. Cryopreservation of mature monocyte-derived dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties. *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52(3):194-198
- Westermann J, Kopp J, van Lessen A et al. Dendritic cells vaccination in BCR/ABL-positive chronic myeloid leukemia - final results of a phase I/II ASH (Abstract). 2004; 2934
- Westers TM, Stam AGM, Scheper RJ, Regelink JC, Nieuwint AWM, Schuurhuis GJ, et al. Rapid generation of antigen-presenting cells from leukemic blasts in acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52:17-27
- Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004; 53:240-248
- Whiteside TL. Immunologic monitoring of clinical trials in patients with cancer: technology versus common sense. *Immunological Investigations.* 2000; 29(2):149-162
- Whiteway A, Corbett T, Anderson R, Macdonald I, Prentice HG. Expression of co-stimulatory molecules on acute myeloid leukemia blasts may effect duration of first remission. *Br J Haematol.* 2003; 120(3):442-451
- Willderling-Mollmann S, Wilkens L, Schlegelberger B, Kaiser U. [Azathioprine-associated myelodysplastic syndrome with cytogenetic abnormalities]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004; 129(22):1246-1248
- Wilmanns W, Huhn D, Wilms K. (Hrsg.): *Internistische Onkologie.* 1994; 330-345
- Winton EF, Langston AA. Update in acute leukemia 2003: A risk adapted approach to acute myeloblastic leukemia in adults. *Seminars in Oncology.* 2004; 31(2 Suppl 4):80-87
- Wölfel T, Huber C. Therapeutic vaccination against T-cell-defined tumor antigens. *Onkologie.* 2001; 24:9
- Woiciechowsky A, Regn S, Kolb H-I, Roskrow M. 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* 2001; 15:246-255
- Wong EC, Maher VE, Hines K, Lee J, Carter CS, Goletz T, Kopp W, Mackall CL, Berzofsky J, Read EJ. Development of a clinical-scale method for generation of dendritic cells from PBMC for use in cancer immunotherapy. *Cytotherapy.* 2001; 3(1):19-29
- Wormer H. Generalangriff auf Tumoren. *Süddeutsche Zeitung.* 2002; 250:20

- Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Seminars in Oncology*. 2005; 17:304-312
- Xia D, Chan T, Xiang J. Dendritic cell/ myeloma hybrid vaccine. *Methods Mol Med*. 2005; 113: 225-233
- Yanagita S, Hori T, Matsubara Y, Ishikawa T, Uchiyama T. Retroviral transduction of acute myeloid leukemia-derived dendritic cells with OX40 ligand augments their antigen presenting activity. *J Leukoc Biol*. 2004; 124(4):454-462
- Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res*. 2004; 64(14):4973-4979
- Zech NH, Gunsilius E, Clausen J, Hoflehner E, Hoelzler K, Gastl G, Petzer AL. Expansion of mobilized peripheral blood progenitor cells under defined culture conditions using CD34+CD71-CD45- cells as a starting population. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003; 12(4):367-373
- Zheng Z, Takahashi M, Narita M, Toba K, Liu A, Furukawa T, Koike T, Aizawa Y. Generation of dendritic cells from adherent blood cells of cord blood by culture with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000; 9(4):453-464
- Zhong RK, Rassenti LZ, Kipps TJ, Chen J, Law P, Yu JF, Ball ED. Sequential modulation of growth factors: a novel strategy for adoptive immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 8(10):557-563
- Zhou Y, Bosch ML, Salgaller ML. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity. *J Immunother*. 2002; 25(4):289-303
- Zittoun R, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L, Leoni F, Damasio E, Visani G, Papa G, Caronia F, Hayat M, Stryckmans P, Rotoli B, Leoni P, Peetermans M, Dardenne M, Vegna M, Petti MC, Solbu G, Suci S. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Eng J Med*. 1995; 332: 217-223
- Zonghong S, Guibin C, Zexi L, Yizhi Z, Yushu H, Yulin C, Yizhou Z, Linsheng Q, Tianying Y, Chongli Y, Baozhang F. Immunphenotype of myeloid cells in myelodysplastic syndromes and its clinical implications. *Chinese Medical Journal*. 1998; 111(1):28-31
- Zou GM, Martinson J, Hu WY, Tam Y, Klingemann HG. The effect of LIGHT in inducing maturation of monocyte-derived dendritic cells from MDS patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53(8): 681-689
- Zwaan CM, Reinhardt D, Corbacioglu S, van Wering ER, Bokkerink JP, Tissing WJ, Samuelsson

U, Feingold J, Creutzig U, Kaspers GJ. Gemtuzumab ozogamicin: first clinical experiences in children with relapsed/refractory acute myeloid leukemia treated on compassionate-use basis. *Blood*. 2003; 101(10):3868-3871

## Erklärung

Erklärung gemäß § 2 Absatz 1 Punkt 2 und 4 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 01. Juni 1083, einschließlich der letzten Änderungssatzung vom 30.03.1998:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen angewandt wurden. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Die vorliegende Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, den 27.07.2005

Stefanie Kufner

## Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

S. Kufner, A. Salem, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, F. de Valle, H. Zitzelsberger, I. Zirpel, V. Nuessler, C. Schoch, K. Doehner, T. Haferlach, W. Hiddemann, H.M. Schmetzer. Generation and characterization of leukemia-derived dendritic cells (DC) in AML and MDS after contact with autologous or allogeneic T-cells. V. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, p16, Herrsching (2003)

S. Kufner, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, F. de Valle, I. Zirpel, C. Schoch, V. Nuessler, W. Kern, T. Haferlach, K. Doehner, E. Thiel, W. Hiddemann, H.M. Schmetzer. Generation and characterization of dendritic cells (DC) from mononuclear cells in AML and MDS. 7<sup>th</sup> International Meeting and 1<sup>st</sup> World Congress BIOTHERAPY OF CANCER, Munich (2003)

S. Kufner, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, F. de Valle, I. Zirpel, C. Schoch, V. Nuessler, W. Kern, T. Haferlach, K. Doehner, E. Thiel, W. Hiddemann, H.M. Schmetzer. Generation and characterization of dendritic cells (DC) from mononuclear cells in AML and MDS. SGMO, DGHO, ÖGHO Basel (2003)

H.M. Schmetzer, S. Kufner, A. Salem, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, F. de Valle, H. Zitzelsberger, I. Zirpel, W. Hiddemann, V. Nuessler. Generation and characterization of leukemia-derived dendritic cells (DC) in AML and MDS after contact with autologous or allogeneic T-cells. Blood, Vol 102, issue 11, Abstr. 4713, Nov 16 (2003)

S. Kufner, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, F. de Valle, H. Zitzelsberger, I. Zirpel, V. Nuessler, W. Kern, K. Doehner, T. Haferlach, E. Thiel, W. Hiddemann, H.M. Schmetzer. Generation and characterization of dendritic cells from mononuclear cells in AML and MDS. Onkologie. Vol 26 (Sonderheft 5): 220 (2003)

H.M. Schmetzer, S. Kufner, A. Salem, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, F. de Valle, H. Zitzelsberger, I. Zirpel, W. Hiddemann, V. Nuessler. Generation and characterization of leukemia-derived dendritic cells (DC) in AML and MDS after contact with autologous or allogeneic T-cells. Ann. Hemat. Vol 83, 1, 17 (2004)

H.M. Schmetzer, C. Schmid, S. Kufner, R. Pelka-Fleischer, T. Kroell, H. Zitzelsberger, W. Treder, H.J. Kolb. Generation of leukemia-derived dendritic cells (Dcleu) as a basis for specific immunotherapy in acute myeloid leukemia and myelodysplasia. Blood. Vol 104, 11, Abstr. 2547 (2004)

S. Kufner, H. Zitzelsperger T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, A. Salem, F. de Valle, C. Schmid, C. Schweiger, H.J. Kolb, H.M. Schmetzer. Leukemia-derived dendritic cells can be generated from blood or bone marrow cells from patients with Myelodysplasia: A methodological approach under serum-free culture conditions. Scandinavian Journal of Immunology. Vol 62: 75-85 (2005, I)

S. Kufner, H. Zitzelsperger T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, A. Salem, F. de Valle, C. Schweiger, V. Nüssler, C. Schmid, H.J. Kolb, H.M. Schmetzer. Leukemia-derived dendritic cells can be generated from blood or bone marrow cells from patients with acute myeloid leukemia: A methodological approach under serum-free culture conditions. Scandinavian Journal of Immunology. Vol 62: 86-98 (2005, II)

S. Kufner, R. Pelka-Fleischer, T. Kroell, C. Schmid, H. Zitzelsberger, F. de Valle, W. Treder, V. Nuessler, H.M. Schmet-



zer. Serum-free generation and quantification of functionally active leukemia-derived DC is possible from malignant blasts in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS). *Cancer Immunol Immunother.* [Epub ahead of print] (2005, III)

A. Kremser, J. Loibl, S. Kufner, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, H. Zitzlsberger, F. de Valle, I. Zirpel, H.M. Schmetzer. Can Leukemia-derived dendritic cells be generated from every patient? A methodological approach comparing different methods. [Abstract eingereicht für wissenschaftliches Treffen der Med. III im Kloster Irsee vom 22.–24.Juli 2005 sowie für die DGHO im Oktober 2005 in Hannover] (2005)

J. Loibl, A. Kremser, S. Kufner, T. Kroell, R. Pelka-Fleischer, H. Zitzlsberger, F. de Valle, I. Zirpel, H.M. Schmetzer. Value of immunophenotyping characterize and quantify leukemia-derived dendritic cells in AML and MDS. [Abstract eingereicht für wissenschaftliches Treffen der Med. III im Kloster Irsee vom 22.–24.Juli 2005 sowie für die DGHO im Oktober 2005 in Hannover] (2005)

## Danksagung

Bei Frau PD Dr. rer. nat. Helga Schmetzer möchte ich mich aufs herzlichste für die Überlassung dieses Themas einschließlich der durchflusszytometrischen Daten, vor allem aber auch für die unablässige Motivation, die mich immer wieder vor dem Aufgeben bewahrt hat, und die nun endlich zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit führte, bedanken. Ganz besonders schätzte ich während meiner Arbeit die menschliche und herzliche Art, welche im Labor stets trotz des ständigen Publikationsdrucks zu einem angenehmen und sympathischen Arbeitsklima führte.

Herrn Prof. Dr. med. Hiddemann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Labor und für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Medizin.

Ebenfalls ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Renate Pelka-Fleischer bedanken, da sie nicht nur im fachlichen Bereich ausgezeichnet zu unterstützen wusste, sondern auch immer ein offenes Ohr für die Probleme armer, in Geldnöten steckender Studenten hatte. Für ihren neuen Lebensabschnitt – den wohlverdienten Ruhestand – wünsche ich ihr nur das Beste.

Auch bei den anderen Mitarbeitern unseres Labors möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die fachkundige Unterstützung bedanken. Insbesondere Frau Tanja Kröll wusste immer Rat bei Problemen mit der Datenauswertung.

Herrn Prof. Dr. Dr. med. T. Haferlach aus dem Labor für Leukämiediagnostik sowie Herrn O.A. Dr. F. de Valle und Dr. I. Zirpel danke ich für die Überlassung morphologischer und zytochemischer Untersuchungsbefunde, von Patientenmaterial, sowie für die Übermittlung einiger klinischer Daten.

Bei Frau PD Dr. C. Schoch und Frau PD Dr. C. Doehner bedanke ich mich für die Überlassung der zytogenetischen Befunde.

Beim Labor von Prof. Thiel und PD Dr. Kern möchte ich mich für die Überlassung der immunphänotypischen Daten bedanken.

Herrn PD Dr. H. Zitzelsberger und Frau E. Kronhäuser vom Institut für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg möchte ich herzlich für die technische Unterstützung und Geduld bei den FISH-Auswertungen und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, bei der ich stets moralische Unterstützung fand.

Ganz zuletzt möchte ich mich bei all meinen guten Freunden bedanken („Happy Family“, „Wohnheimmädels“), die es in regelmäßigen Abständen geschafft haben, mich aus dem alltäglichen Trott herauszureißen, was mich davor bewahrte, als Roboter zwischen Studium, Nebenjob und Doktorarbeit zu enden.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: Kufner  
 Vorname: Stefanie Josefine  
 Geburtsdatum/ -ort: 17.01.1978, Regensburg  
 Heimatanschrift: Deggenauer Str. 1  
 94469 Deggendorf  
 Telefon: 0991/30512, mobil: 0176/20038266  
 Email: [stefaniekufner@yahoo.de](mailto:stefaniekufner@yahoo.de)  
 Familienstand: ledig

### **Hochschulbildung:**

April 1998 - September 2005 Ludwig-Maximilians-Universität München: Fachrichtung Medizin  
 April 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 April 2004 - März 2005 Praktisches Jahr:  
 Psychiatrie (Psychiatrische Klinik Nussbaumstrasse, München)  
 Innere Medizin (Universitätsklinik, Limoges/ Frankreich)  
 Chirurgie (Schwabinger Krankenhaus, München)  
 März 2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 März 2001 - September 2003 Famulaturen:  
 Innere Medizin (München, Taichung/ Taiwan)  
 Anästhesie (Deggendorf)  
 Chirurgie (Kaunas/ Litauen)  
 Gynäkologie (Budapest/ Ungarn)  
 März 2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 September 2000 Physikum

### **Doktorarbeit:**

Oktober 2002 - April 2005 III. Medizinische Klinik und Poliklinik Großhadern, München, in der  
 AG PD Dr. rer. nat. Helga Schmetzer `Zelluläre Modulation und Therapie`  
 (angegliedert an die KKG Hämatologische Transplantationen, Prof. H-J.  
 Kolb):  
 Generierung dendritischer Zellen aus leukämischen Blasten bei AML  
 und MDS

### **Nebentätigkeiten:**

September 2002 - September 2003 Tutorin für das Studentenwohnheim Oberwiesenfeld, München  
 März 1999 - Mai 2000 Pflegerische Tätigkeit im Altenheim Westendstrasse, München

**Schulbildung:**

August 1989 - März 1997

Comenius Gymnasium in Deggendorf

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

August 1984 - Juni 1988

Grundschule Theodor-Eckert in Deggendorf

**Sonstige Kenntnisse:**

EDV

Anwendungsorientierte Kenntnisse mit der Textverarbeitung Windows

Sprachen

Sehr gute Sprachkenntnisse in Englisch und Französisch

Akupunktur

Besuch des Arbeitskreises und der Vorlesungen an der LMU

München

Homöopathie

Leitung eines Arbeitskreises an der LMU München

**Auslandsprojekt:**

August 2005 - September 2005

Entwicklungshilfe mit der Studentenorganisation Commit in Ruanda:

AIDS-Aufklärung und Bearbeitung posttraumatischer Konflikte von

Kindern

München, den 27.07.05

Stefanie Kufner