

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Molekulare Immunologie
des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit

**Untersuchung zur T-Zell-Immunität bei Patienten mit
akuter myeloischer Leukämie:
Induktion Leukämie-spezifischer T-Zellen in vitro durch
antigenpräsentierende Zellen**

Anja Woiciechowsky

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

- 1. Hon.-Prof. Dr. Rudolf Balling, Technische Univ. Braunschweig**
- 2. Univ.-Prof. Dr. Klaus D. Pfeffer, Heinrich Heine Univ. Düsseldorf**
- 3. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl**

**Die Dissertation wurde am 13.01.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.02.2003 angenommen.**

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis I**Abkürzungsverzeichnis** V**1. Einleitung****1.1 Theoretische Grundlagen** 1

1.1.1 Akute myeloische Leukämie (AML) 1

1.1.2 Therapiemöglichkeiten für Patienten mit AML 4

1.1.3 Dendritische Zellen (DC) und anti-Tumorimmunität 8

1.1.4 Zytotoxische T-Lymphozyten 12

1.1.5 Immunevasions-Mechanismen 14

1.1.6 T-Lymphozyten und der Mechanismus der T-Zell-Aktivierung 17

1.1.7 Immuntherapeutische Strategien für die Behandlung der AML 26

1.2 Zielsetzung der Arbeit 30**2. Material und Methoden****2.1 Material** 32

2.1.1 Geräte 32

2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien 33

2.1.2.1 Zellkulturmedien und Einfrierlösung 33

2.1.2.2 Zellkulturzusätze 34

2.1.2.3 Reagenzien 34

2.1.3 Antikörper 35

2.1.3.1 Antikörper für die Durchflußzytometrie 35

2.1.3.2 Antikörper für die Selektion von Zellen 35

2.1.3.3 Antikörper für die T-Lymphozyten-Aktivierung 35

2.1.3.4 Antikörper zur Untersuchung der MHC-restringierten Lyse 35

2.1.4 Zellmaterial 36

2.2 Methoden	36
2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen	36
2.2.2 Zellzahlbestimmung	36
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.2.3.1 Einfrieren	37
2.2.3.2 Auftauen	37
2.2.4 Differenzierung von DC in vitro	37
2.2.4.1 Kultivierung von DC aus Patienten-peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMNC)	37
2.2.4.2 Kultivierung von DC aus gesunden Spender-PBMNC	38
2.2.5 Quantifizierung der dendritischen Zellausbeute	38
2.2.6 Morphologische Untersuchung von Zellen	39
2.2.7 Phänotypische Analyse von Zellen	39
2.2.8 Nachweis des leukämischen Klons	40
2.2.8.1 Anreicherung von CD83-positiven Zellen	40
2.2.8.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	40
2.2.9 Herstellung von Fusionszellen in vitro	42
2.2.9.1 Fusion von DC mit AML-Blasten	42
2.2.9.2 Überprüfung der Fusionseffektivität	43
2.2.10 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)	44
2.2.10.1 Allogene MLR	44
2.2.10.2 Autologe MLR	45
2.2.11 Herstellung von zytotoxischen-T-Lymphozyten (CTL) -Linien in vitro	46
2.2.11.1 Generierung von Leukämie-spezifischen CTL-Linien	46
2.2.11.2 Expansion der T-Lymphozyten von AML-Patienten	46
2.2.11.3 Zytotoxizitätstest	47
2.2.11.4 Antikörperblockierung	48

2.2.11.5 Immunphänotypisierung von generierten CTL	48
2.2.12 Vergleichende Untersuchungen von peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) bei AML-Patienten und gesunden Spendern	48
2.2.12.1 Phänotypische Analyse der T-Lymphozyten	48
2.2.12.2 Intrazelluläre Färbung der T-Zell-Rezeptor (TCR) -assoziierten zeta-Kette in PBL	49
2.2.12.3 Untersuchungen zur Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten	50
2.2.12.3.1 Stimulationsexperimente	50
2.2.12.4 Untersuchungen zum zytotoxischen Effektorstatus der T-Lymphozyten	51
2.2.12.5 Zytokinuntersuchungen mittels ELISA	52
2.2.13 Statistische Auswertung	53

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelle Untersuchungen	54
3.1.1 Generierung von DC aus AML-Blasten in vitro	54
3.1.2 Phänotypische Analyse von DC	58
3.1.3 Detektion von Gen-Umlagerungen in DC zum Nachweis ihres leukämischen Ursprungs	62
3.1.4 Funktionalität der von AML-Patienten generierten DC	63
3.1.4.1 Fähigkeit zur allogenen Stimulation	63
3.1.4.2 Nachweis der Präsentation von Antigenen durch DC	65
3.1.5 Zytotoxizität von T-Lymphozyten, die durch Stimulation mit "leukämischen" DC generiert wurden	67
3.1.6 Generierung von Fusionszellen aus DC und AML-Blasten in vitro	71
3.1.7 Funktionsanalyse der Fusionszellen	73

3.1.8	Phänotypische Untersuchungen von PBL bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern	76
3.1.8.1	Expression der TCR-assoziierten zeta-Kette in PBL	76
3.1.8.2	Analyse der CD28-Expression auf PBL	77
3.1.9	Untersuchungen zur Proliferation und Effektorfunktion von CD28 ⁺ PBL bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern	85
3.1.9.1	Proliferation der CD28 ⁺ T-Zellen	85
3.1.9.2	Zytotoxische Funktion und Zytokinsekretion der CD28 ⁺ T-Zellen	87
3.1.9.3	Aktivierungszustand der CD28 ⁺ T-Zellen	92

4. Diskussion

4.1	Experimentelle Untersuchungen	95
4.1.1	Generierung von DC aus AML-Blasten in vitro	95
4.1.2	Zytotoxizität von T-Lymphozyten, die durch Stimulation mit "leukämischen" DC generiert wurden	98
4.1.3	Generierung von Fusionszellen aus DC und AML-Blasten in vitro	101
4.1.4	Vergleichende Untersuchungen von PBL bei AML-Patienten und gesunden Spendern	105

5. Zusammenfassung **112**

Danksagung **CXIV**

Literaturverzeichnis **CXV**

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zellen (Antigen Presenting Cells)
CD	Cluster of Differentiation
CML	Chronische Myeloische Leukämie
Con-A	Concavalin-A
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (Cytotoxic T-Lymphocyte)
DC	Dendritische Zellen (Dendritic Cells)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DLI	Spender-Lymphozyten-Infusion (Donor Lymphocyte Infusion)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FCS	Fötale Kälber-Serum (Foetal Calf Serum)
FISH	Floreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT-3	FMS-like Tyrosine Kinase 3
FSC	Vorwärts-Lichtstreuung (Forward Scatter)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte-Colony-Stimulating Factor)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor)
GvHD	Transplantat-gegen-Empfänger-Krankheit (Graft-versus-Host-Disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft-versus-Leukemia [Effect])
Gy	Gray
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin

KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
MACS	Magnetische Zellseparation (Magnetic Cell Sorting)
mAK	Monoklonaler Antikörper
MDR	Multiple Medikamentenresistenz (Multidrug Resistance)
MDS	Myelodysplastische Syndrom
mHAG	Minor Histokompatibilitätsantigene (Minor Histocompatibility Antigen)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion (Mixed Lymphocyte Reaction)
MRD	Minimale Resterkrankung (Minimal Residual Disease)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBL	Periphere Blut Lymphozyten (Peripheral Blood Lymphocytes)
PBMNC	Periphere Blut Mononukleäre Zellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	Phosphat-Puffer (Phosphate buffered Saline)
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PML	Promyelozytenleukämie
RH	Rekombinant Human
SCF	Stammzelleffektor (Stem Cell Factor)
SSC	Seitliche Lichtstreuung (Side Scatter)
SZT	Stammzelltransplantation
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-Cell Receptor)
TGF	Transformierter Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)
TNF	Tumornekrosefaktor (Tumor Necrosis Factor)

1. Einleitung

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die Ursache der akuten myeloischen Leukämie ist die maligne klonale Entartung einer frühen myeloischen Vorläuferzelle der Blutbildung im Knochenmark (KM). Im Zuge dieser bösartigen Entartung kommt es zu einer variablen Beteiligung der hämatopoetischen Zellreihen. Fast immer ist die granulozytäre- und/oder monozytäre-, zum Teil zusätzlich die erythrozytäre Reihe betroffen, und gelegentlich ausschließlich die megakaryozytäre Zellreihe. Die leukämischen Zellen verlieren ihre Fähigkeit zu funktionsfähigen Blutzellen auszureifen und entziehen sich den normalen Kontrollmechanismen von Zellwachstum und Differenzierung. Es kommt zur abnormalen Vermehrung der leukämischen Zellen (AML-Blasten) im KM und im peripheren Blut, und somit zur Verdrängung der restlichen Hämatopoese. Diese Verdrängung äußert sich vor allem in einer schweren Blutarmut (Anämie). Außerdem haben die AML-Patienten ein erhöhtes Risiko an rasch und gefährlich verlaufenden Infektionen zu erkranken und neigen verstärkt zu Blutungen. Unbehandelt führen akute Leukämien binnen weniger Wochen zum Tode (Cripe 1997).

Das Erkrankungsalter von AML-Patienten liegt im Durchschnitt bei 63 Jahren. Die Inzidenz beträgt bei den unter 65 jährigen 1,4 Fälle pro 100.000 Einwohner/Jahr, ab dem 65. Lebensjahr beträgt sie 13,4 Fälle pro 100.000 Einwohner/Jahr. Es sind mehr Männer als Frauen von der AML betroffen (Ries 1997).

Zu den Risikofaktoren für die Entstehung einer AML gehören vor allem ionisierende Strahlen, Chemikalien, wie z.B. Benzol und zytotoxische Chemotherapeutika, alkylierende Substanzen oder Substanzen mit Wirkung auf die DNS-Topoisomerase II. Prädisponierende hämatologische Erkrankungen für die Entwicklung einer AML können das myelodysplastische Syndrom (MDS), das myeloproliferative Syndrom und die aplastische Anämie sein. Angeborene genetische Veränderungen, wie die Trisomie 21, die Franconi-Anämie, das Bloom-Syndrom und das Li-Fraumeni-Syndrom erhöhen das Risiko für die Entwicklung einer AML (Sandler 1997).

Bei der AML handelt es sich um eine heterogene Erkrankung, wobei man prinzipiell zwei Formen der Erkrankung unterscheidet. Zum Ersten die "de novo-AML", die primäre Erkrankung, die ohne erkennbare Ursache auftritt. Zum Zweiten existiert die "sekundäre AML". Sie kann durch vorangegangene Chemotherapien, die zur Behandlung anderer maligner Erkrankungen eingesetzt wurden, wie z.B. bei Mammakarzinomen oder malignen Lymphomen, oder durch Strahlenbelastungen ausgelöst worden sein (Karp 1997). Die sekundäre AML kann auch aus einem vorausgegangenem MDS entstehen (Tricot 1985).

Die Heterogenität der AML wird auch auf der morphologischen Ebene sichtbar. Deshalb wurde 1976 eine morphologische und zytochemische Klassifikation der myeloischen Leukämien von einer Gruppe von Hämatologen aus Frankreich, USA und England eingeführt (FAB-Klassifikation). Die Klassifikation der myeloischen Leukämien bezieht sich auf den dominierenden Zelltyp und den Entwicklungsgrad der Zellen. Bis auf die Promyelozytenleukämie (PML) hat die morphologische Klassifikation keinen Einfluß auf die Therapie. Mit bestimmten FAB-Typen können bestimmte chromosomale Veränderungen assoziiert sein, wie aus Tabelle 1 ersichtlich (Löwenberg 1999).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML assoziiert mit genetischen Veränderungen

FAB-Typ	Bezeichnung (% der Fälle)	Genotyp (% der Fälle)
MO	Akute undifferenzierte Leukämie (3%)	
M1	Akute unreife Myeloblastenleukämie (15-20%)	
M2	Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung M2Baso mit Basophilie (25-30%)	t (8;21) (40%)
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL) (5-10%)	t (15;17) (98%), t (11;17) selten
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie M4Eo mit > 5% abnormen Eosinophilen (20-30%)	11q23 (20%), inv (16), t (16;16) (80%)
M5	Akute Monoblastenleukämie M5a ohne Ausreifung M5b mit Ausreifung (2-10%)	11q23 (20%)
M6	Akute Erythroleukämie (3-5%)	
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie (3-12%)	

Bei zwei Dritteln der AML-Patienten werden numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen, von denen angenommen wird, daß sie eine ursächliche Rolle bei der Leukämieentstehung spielen (Mrózek 1997, Caligiuri 1997) und zum Teil prognostische Bedeutung haben. Es gibt zwei Mechanismen, durch die die beobachteten Translokationen oder Inversionen zur Leukämogenese führen: die Genaktivierung und die Genfusion. Als Beispiel sei die Translokation t (15;17) erwähnt. Ihr kommt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Promyelozytenleukämie zu. Dieser Leukämieform liegt der Austausch von Material zwischen dem Chromosom 15 und 17 zugrunde. Hierbei lagert sich das auf dem Chromosom 15 lokalisierte Gen für den Retinolsäurerezeptor alpha mit dem sogenannte PML-Gen auf Chromosom 17 zusammen. Aus dieser Translokation resultiert ein neues, pathologisches Fusionsprodukt: das Protein PML-RAR α . Dieses Protein verhindert die Transkription des DNS-Strangs und führt damit zur leukämischen Transformation (Grignani 1998). Aus der Kenntnis dieses Mechanismus ergibt sich die Möglichkeit, therapeutisch einzugreifen.

Eine Vielzahl an klinischen und biologischen Merkmalen, welche die Heterogenität der AML widerspiegeln, wurde genutzt, um über den Behandlungserfolg bei Patienten Aussagen treffen zu können (van Putten 1997). Die Zytogenetik, das Alter und die FAB-Klassifikation sind die drei wichtigsten prognostischen Faktoren bei Patienten mit AML (Tabelle 2).

Tabelle 2: Prognosefaktoren von AML-Patienten

Ungünstig	Günstig
Zytogenetik	
-5, 5q-, -7, 7q-, +8, 11q-, komplexer Karyotyp (> als 3 chromosomale Abnormalitäten)	inv (16) oder t (16/16), t (8;21), t (15;17)
Alter	
> 60 Jahre	< 40 Jahre
FAB-Klassifikation	
M0, M5a, M5b, M6, M7	M3, M4eo
<ul style="list-style-type: none"> • kurze Dauer der Erstremission • Sekundäre AML • Multidrug resistance (MDR)-Expression 	

Bei der Korrelation zwischen bestimmten FAB-Klassifikationen und den zytogenetischen Veränderungen sind die chromosomalen Veränderungen der wichtigere prognostische Faktor. Aufgrund dieser Faktoren kann man die AML in 3 prognostische Patientengruppen einordnen. In der Hochrisikogruppe finden sich Veränderungen wie z.B. die Monosomie 7 oder 8. Andere chromosomale Veränderungen wie die Translokation auf Chromosom 8 und 21 (t (8;21)), die Inversion auf Chromosom 16 inv (16) und die Translokation auf Chromosom 15 und 17 (t (15;17)) finden sich in der Niedrigrisikogruppe. Patienten mit einem normalen Karyotyp weisen ein intermediäres Risiko auf (Cripe 1997, Mrózek 1997).

1.1.2 Therapiemöglichkeiten für Patienten mit AML

In den letzten Jahren haben Fortschritte bei der Therapie der AML, aber auch Verbesserungen bei der Diagnose der verschiedenen Subtypen der AML, zu einer deutlich erhöhten Remissions- (Krankheitsfreiheit) und Überlebensrate geführt. Trotzdem kommt es bei Patienten unter 65 Jahren nur in 40% der Fälle zu einer dauerhaften Remission (Löwenberg 1999). Ziel der aktuellen Behandlungen ist es, bei Patienten eine komplette und dauerhafte Remission (weniger als 5% Blasten im peripheren Blut bzw. im KM) zu erreichen. Selbst wenn die Patienten sich in kompletter Remission befinden, sind bei der Hälfte der Patienten weiterhin in sehr geringem Maße leukämische Zellen vorhanden. Dieser Umstand wird als "minimale Resterkrankung" (engl. Minimal Residual Disease, MRD) bezeichnet und kann ein Rezidiv (Rückfall) begünstigen (Bishop 1997). Für AML-Patienten in Remission stehen zwei etablierte Therapiemöglichkeiten zur Verfügung: die konventionelle Chemotherapie und die myeloablative Therapie kombiniert mit einer (Blut-) Stammzelltransplantation (SZT) in Form der peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) oder der Knochenmarkstransplantation (KMT). Diese beinhaltet sowohl die allogene und autologe Stammzelltransplantation. Als Immuntherapie nach allogener SZT bei Rezidiven hat sich die Transfusion von Spenderlymphozyten (engl. Donor Lymphocyte Infusion, DLI) bewährt.

Die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) oder Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) wird unterstützend durchgeführt, um z.B. die Zytotoxizität von Chemotherapeutika *in vivo* zu erhöhen, um hämatopoetische Stammzellen vom Knochenmark ins Blut zu mobilisieren, sowie um eine verbesserte Infektionsabwehr zu gewährleisten (Terpstra 1997, Löwenberg 1993 und Stone 1995).

Bei der Diagnose einer AML ist mit wenigen Ausnahmen (z.B. hohes Alter) eine hochdosierte Polychemotherapie indiziert. Hierbei wird zwischen der Induktionstherapie und der Konsolidierungstherapie unterschieden. In der Induktionstherapie werden Aplasie erzeugende Chemotherapiekurse gegeben, um rasch eine komplette Remission zu erreichen. Als Standardtherapie gilt hier die Gabe von Cytosinarabinosid (Ara-C) und einem Anthrazyklin, wie z.B. Daunorubicin. Hierdurch kann bei jüngeren Patienten (60 Jahre oder jünger) in 70-80% und bei älteren Patienten (ab 60 Jahren) eine komplette Remission in 50% der Fälle erreicht werden. Neuere Chemotherapeutika sind Fludarabin, 2-Chlorodeoxyadenosine (2-CDA) (Clavio 1996 und Vahdat 1994) oder das Troxacitabin, ein vielversprechender Wirkstoff, der sich zur Zeit in Phase II-Studien befindet (Giles 1999). Mit der Konsolidierungstherapie wird der maligne Klon nach dem Erreichen einer kompletten Remission entweder durch zwei weitere Chemotherapiezyklen weiter reduziert oder im Rahmen der allogenen SZT eine Heilung des Patienten angestrebt (Löwenberg 1999). Ein Hauptproblem der Chemotherapie der AML ist, daß Leukämiezellen über verschiedene Resistenzmechanismen verfügen, mit denen sie dem Zytostatika-induzierten Zelltod entgehen können. Gerade bei Hochrisiko-Patienten wurde vermehrt das "Multidrug resistance Gen 1" (MDR-1) detektiert, welches wesentlich geringere Remissionsraten der Patienten bewirkt. Multidrug Resistance (MDR) ist mit der Expression eines P-Glykoproteins assoziiert (ein in der Zellmembran lokalisiertes ATP-abhängiges Transportprotein), welches in der Lage ist, die Zytostatika aus der Zelle zu pumpen (Willman 1997).

Die allogene KMT gehört heute zum wesentlichen Bestandteil der Therapie bei Patienten mit AML. Hierbei wird die erkrankte Hämatopoese eines Patienten durch die gesunde Hämatopoese eines geeigneten Spenders ersetzt. Die allogene KMT von einem HLA-identischen Spender ist heute eine gut etablierte Behandlungsmöglichkeit für Patienten, die nicht älter als 55 Jahre sind.

Von diesen Patienten überleben 60-70% länger als 5 Jahre. Die Effektivität dieser Therapie liegt nicht alleine in der vorab durchgeführten myeloablativen Chemotherapie (Zerstörung der Hämatopoese des Empfängers), sondern vor allem im Auftreten eines Transplantat-gegen-Leukämie-Effekts (engl. Graft-versus-Leukemia [Effect], GvL) (Antin 1993, Horowitz 1990). Hierunter versteht man die durch immunologische Mechanismen der alloreaktiven T-Lymphozyten (diese befinden sich physiologischerweise neben den Stammzellen im Transplantat) des Spenders vermittelte zytotoxische Wirkung gegen die Leukämiezellen. Der für die Patienten positive GvL-Effekt wird allerdings durch das Risiko, an einer Transplantat-gegen-Empfänger-Krankheit (engl. Graft-versus-Host-Disease, GvHD) zu erkranken, gemindert. Die GvHD wird ebenfalls durch alloreaktive Spender-T-Lymphozyten aus dem Transplantat ausgelöst, welche sich vor allem gegen die drei klassischen GvH-Organen (Haut, Leber und Darm) des Empfängers richten. Die Möglichkeit an einer GvHD zu erkranken ist auch der Grund für die bestehende Altersbegrenzung für AML-Patienten bei allogener KMT. Andererseits haben Patienten mit einer chronischen GvHD einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten ohne GvHD (Kolb 1997). Denn durch T-Zelldepletion des Transplantates kommt es zwar zur Verminderung der GvHD, aber auch zur Verminderung des GvL-Effekts, und somit zur erhöhten Rezidivhäufigkeit.

Kolb et al. (1990) konnten erstmals zeigen, daß Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML), die nach allogener KMT ein Rezidiv erlitten, durch die alleinige Infusion von Spenderlymphozyten eine erneute Vollremission erreichten. Bei der AML kann die Gabe von DLI nach allogener KMT eine stabile hämatopoetische Remission bei bis zu 25% der Patienten erreichen (van Rhee 1995, Kolb 1990). Die Verabreichung von Spenderlymphozyten ist allerdings nicht ohne Risiko, da viele der Patienten eine schwere GvHD oder eine Knochenmarkhypoplasie entwickeln.

Die autologe SZT stellt eine weitere Möglichkeit der Transplantation dar. Hierbei bekommt Patient sein eigenes, möglichst in kompletter Remission gewonnenes Stammzellpräparat, nach einer myeloablativen Therapie zu einem späteren Zeitpunkt zurück. Da die Gefahr besteht, daß das Autotransplantat AML-Blasten enthält, wird es einem Reinigungsverfahren, dem "Purging" unterzogen.

Bei der autologen Transplantation, die auch bei Patienten mit höherem Lebensalter durchgeführt werden kann, kommt es zu einer kompletten Remission bei ca. 50% der Patienten, wovon allerdings 25% einen Rückfall erleiden (Gorin 1995). Die autologe SZT ist nicht assoziiert mit einer GvHD. Allerdings gibt es aufgrund fehlender alloreaktiver Lymphozyten auch keinen GvL-Effekt, so daß die Rezidivrate gegenüber der allogenen SZT erhöht ist.

Zu den neueren Therapiemethoden gehört die Differenzierungstherapie. Hierbei werden bei Patienten mit Promyelozytenleukämie (die PML wurde bereits zuvor in dieser Arbeit erwähnt) durch die Gabe von All-trans-Retinolsäure (ATRA, die eine Ausreifung der leukämischen Blasten bewirkt) in Kombination mit der unverzichtbaren Chemotherapie komplette Remissionsraten bis zu 80% erreicht (Collins 1998).

Um die Remissionszeiten nach der Transplantation bei den AML-Patienten zu verlängern, kann bei Patienten Interleukin-2 eingesetzt werden. IL-2 ist ein bekanntes Zytokin, das die Proliferation von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bewirkt. Es wird angenommen, daß die so aktivierten T-Lymphozyten bzw. NK-Zellen effektiv gegen die residuellen Leukämiezellen vorgehen können (Foa 1993). In anderen Studien wurden Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK)-Zellen und hochdosiertes IL-2 bei Patienten eingesetzt. Diese Studien zeigten allerdings, daß es keinen zusätzlichen Nutzen durch LAK-Zellen gegenüber der IL-2 Monotherapie gab (Benyunes 1993).

Eine weitere Möglichkeit der Therapie gegen AML-Blasten ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAK), die gegen Oberflächenmoleküle auf AML-Blasten gerichtet sind. Ein solches Oberflächenmolekül ist CD33, welches auf normalen myeloischen Vorläuferzellen und myeloischen Leukämiezellen, nicht aber auf normalen Stammzellen exprimiert wird. In klinischen Studien werden zur Zeit der humanisierte anti-CD33-mAK, Hu-M195, der mit Radioisotopen gekoppelt ist, oder CMA-676, welcher mit einem Immuntoxin konjugiert ist, auf ihre Wirksamkeit hin getestet. In Phase-II-Studien wurden 142 Patienten mit CMA-676 behandelt. Bei 30% der Patienten kam es zu einer Remission, wobei die Hälfte von ihnen eine komplette Remission erreichten (Sievers 1999).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse stellt diese neuartige Therapie zur Zeit keinen entscheidenden Vorteil gegenüber den Standardtherapeutika dar.

1.1.3 Dendritische Zellen (DC) und anti-Tumorimmunität

Die Voraussetzung für eine effektive Tumorabwehr ist die adäquate Initiierung einer Immunantwort. Für die Induktion einer primären T-Zell-Antwort wird nicht nur die Antigenpräsentation über den Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC-Komplex) und die Erkennung des MHC/Peptid-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor (engl. T-Cell Receptor, TCR), erstes Aktivierungssignal, benötigt, sondern noch weitere sogenannte kostimulatorische Signale, zweite Signale. Um das zweite Aktivierungssignal auszulösen, ist die Interaktion zwischen dem T-Zell-Molekül CD28 und den B7-Molekülen (B7-1/CD80 bzw. B7-2/CD86) auf den antigenpräsentierenden Zellen (engl. Antigen Presenting Cells, APC) von besonderer Bedeutung (Guinan 1994). Naive AML-Blasten z.B. exprimieren zwar die MHC-Klasse-I/II-Moleküle auf ihrer Oberfläche, häufig aber nicht die wichtigen kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Somit sind AML-Blasten als APC nicht in der Lage, eine effektive T-Zell-Antwort zu induzieren. Dendritische Zellen (engl. Dendritic Cells, DC) sind die potentesten APC des Immunsystems und dazu fähig, auch naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie B-Lymphozyten zu aktivieren (Banchereau 1998).

Bei den DC handelt es sich um große Zellen, die an ihren langen zytoplasmatischen Ausläufern zu erkennen sind. DC stammen aus dem Knochenmark, das sie als unreife DC verlassen. Danach zirkulieren sie im Blut und wandern in die peripheren Gewebe. Dort haben die unreifen DC die Fähigkeit, durch Phagozytose, Endozytose oder Makropinozytose Antigene aufzunehmen. Ihre Reifung wird durch inflammatorische Stimuli wie Bakterien, Viren, Lipopolysaccharide (LPS) und Zytokine, wie z.B. $TNF-\alpha$, induziert. Während der Reifung migrieren die DC dann zu den sekundären lymphatischen Organen in die T-Lymphozyten-reichen Regionen. In der Zwischenzeit sind die DC in der Lage, die aufgenommenen Antigene in Peptide zu prozessieren und sie zusammen mit den MHC-Klasse-I/II-Molekülen zu präsentieren.

Reife DC exprimieren in hohem Maße zusammen mit den wichtigen kostimulatorischen Molekülen die MHC-Klasse-I/II-Molekül-Peptid-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche und präsentieren diese Antigen-spezifischen T-Lymphozyten, so daß diese optimal aktiviert werden können. Die so aktivierten T-Lymphozyten sind nun in der Lage, Tumorzellen zu bekämpfen (Banchereau 1998).

Immunphänotypische und funktionale Analysen haben zwei verschiedene DC-Populationen *in vivo* identifiziert. Aus den pluripotenten Knochenmarksstammzellen entwickeln sich die DC entweder entlang des myeloischen oder des lymphatischen Systems. Myeloische Knochenmarksvorläuferzellen führen zu myeloischen DC (DC Typ I), welche GM-CSF für ihre Entwicklung benötigen. Sie sind vor allem CD11c⁺, CD13⁺, CD33⁺ und CD123⁻ und sie produzieren nach der Stimulation mit TNF- α oder CD40L große Mengen an IL-12. Typ I-DC besitzen außerdem die Fähigkeit, naive T-Lymphozyten zu stimulieren, so daß diese zu T-Helfer-1 (TH1)-Zellen differenzieren und in der Lage sind, IFN- γ zu produzieren. "Lymphoide" DC (DC Typ II) wurden kürzlich im peripheren Blut und in den lymphatischen Geweben als überwiegend CD11c⁻, CD13⁻, CD33⁻ und CD123 (IL-3R)⁺ beschrieben. Sie exprimieren verstärkt die Prä-TCR α -Kette auf ihrer Zelloberfläche und benötigen IL-3 für ihre Differenzierung. Sie können naive T-Lymphozyten stimulieren, so daß diese zu TH2-Zellen ausdifferenzieren und IL-4 und IL-10 produzieren können (Arpinati 2000, Saunders 1996). Typ II-DC sind außerdem in der Lage, die Differenzierung von TH1-Zellen durch die Sekretion von IFN- α zu induzieren (Cella 2000).

Um kostimulatorische Moleküle und Tumorantigene auf einer Zelle zu vereinigen, besteht die Möglichkeit, AML-Blasten bzw. Tumorzellen *in vitro* in antigen-präsentierende Zellen, wie die DC, zu differenzieren. Eine weitere Alternative *in vitro* wäre die Zugabe von Tumorantigenen zu DC. Daraus ergeben sich als therapeutische Strategien einerseits, die *in vitro* gezüchteten DC als "natürliches Adjuvans" für Tumorstimmungen einzusetzen. Andererseits lassen sich die differenzierten DC *in vitro* nutzen, um Leukämie-reaktive T-Lymphozyten für den adoptiven T-Zelltransfer zu generieren.

DC können *in vitro* durch monozytäre Zellanreicherung (Plastikadhärenz) aus peripheren Blut-Monozyten ($CD14^+$) generiert werden, wobei die Zellen in GM-CSF, IL-4 oder IL-13 kultiviert werden (Pickel 1996, Romani 1994). $TNF-\alpha$ kann als Stimulus zur Ausreifung der Zellen hinzugefügt werden und bewirkt eine verstärkte Expression der MHC- und der kostimulatorischen Moleküle. Daraus resultiert die Fähigkeit der DC, T-Lymphozyten effektiv zu stimulieren (Chen 1998). Das Zytokin GM-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Entwicklung von DC aus myeloischen Vorläuferzellen fördert. IL-4 hingegen unterdrückt die Differenzierung von Makrophagen und Monozyten (Jansen 1989). Außerdem können DC *in vitro* aus $CD34^+$ Vorläuferzellen des KM des peripheren Bluts und aus Nabelschnurblut mit GM-CSF, Interleukin-4 (IL-4) und Tumornekrosefaktor- α ($TNF-\alpha$) für 14 Tage kultiviert werden, um $CD1a^+$, $CD83^+$ und $HLA-DR^{++}$ DC zu erhalten (Caux 1992, Reid 1992, Santiago-Schwarz 1992). Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, aus $CD34^+$ AML-Vorläuferzellen DC zu differenzieren. Hierzu wurden die verschiedensten Zytokine wie GM-CSF, IL-4, $TNF-\alpha$, IL-6, Stammzellfaktor (engl. Stem Cell Factor, SCF) und lösliches CD40-Ligand verwendet, um aus AML-Blasten, sowohl aus dem peripheren Blut als auch aus dem KM, DC zu differenzieren (Charbonnier 1999, Choudhury 1999, Robinson 1998, Santiago-Schwarz 1994).

Eine besondere Bedeutung bei der Generierung von DC kommt FLT-3 (FMS-like Tyrosine Kinase 3) -Ligand (L) zu. FLT-3-Ligand ist ein potentes, hämatopoetisches Zytokin, welches *in vivo* und *in vitro* zum Wachstum und zur Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen beiträgt. Dabei hat es die Fähigkeit, die Anzahl an DC bei Mäusen, wie auch bei Menschen zu erhöhen, was es als therapeutisches Agens sehr interessant macht (Antonysamy 2000). Unabhängig von der FAB-Klassifikation sind die meisten AML-Blasten FLT-3-positiv. Der Rezeptor ist ein Mitglied der Typ III-TKR (Tyrosin-Kinase-Rezeptor) -Familie, wozu auch der c-kit-, c-fms- und PDGF-Rezeptor gehört. Wachstumstests *in vitro* haben gezeigt, daß FLT-3-Ligand die AML-Blasten der meisten Patienten zur Proliferation anregen kann (Drexler 1996, Stacchini 1996, Birg 1992). Außerdem kann die Generierung von DC aus $CD34^+$ Zellen *in vitro* mit GM-CSF und $TNF-\alpha$ durch die Zugabe von FLT-3-Ligand in Kultur noch verstärkt werden (Szabolcs 1995).

Die Generierung von Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (engl. Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) stellt eine der effektivsten Maßnahmen zur Lyse von Tumorzellen dar (Pardoll 1998, Lanzavecchia 1993). DC besitzen die Fähigkeit, naive T-Lymphozyten *in vitro* zu stimulieren und somit CTL und T-Helfer-Zellen zu generieren (Banchereau 1998). Es gibt die verschiedensten Ansätze, um DC mit sogenannten tumorassoziierten Antigenen (TAA), die von vielen Tumoren exprimiert werden, zu vereinigen. Eine Vielzahl von TAAs, welche von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, wurden bis jetzt identifiziert (Boon 1996). Diese Tumorantigene können als HLA-Klasse-I-restringierte Peptide, ca. 9-11 Aminosäuren lang, definiert und zu reifen DC gegeben werden (Peshwa 1998, Tsai 1997, Celluzzi 1996, Bakker 1995). Es können auch längere Peptide oder komplette Proteine von Tumoren (Nieda 1998, Paglia 1996) verwendet werden. Sie werden dann von DC durch Endozytose aufgenommen, prozessiert, und über MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert. Die spezifischen Tumorantigene können außerdem nach Klonierung als cDNA in entsprechende Vektoren eingebaut werden, um damit DC zu transfizieren (Reeves 1996). In Experimenten mit Mäusen konnte überzeugend gezeigt werden, daß Mäuse, die mit TAAs beladenen DC immunisiert wurden, vor einer Herausforderung mit Tumorzellen geschützt waren bzw. bereits vorhandene Tumoren abstoßen konnten (Colombo 2000, Masurier 1999). Auch im humanen System, bei Patienten mit den verschiedensten Tumorerkrankungen, konnten DC, die zuvor mit TAAs beladen wurden, erfolgreich zur Immunisierung *in vivo* eingesetzt werden (Turner 1999, Tjoa 1998, Hsu 1996, Murphy 1996).

Ein Nachteil bei der Verwendung von definierten TAAs ist, daß diese erst identifiziert werden müssen. Für die meisten Tumoren konnten bis jetzt noch keine effektiven Tumorantigene identifiziert werden. Auch für die AML ist bis jetzt noch kein therapeutisch umsetzbares Tumorantigen bekannt. Immuntherapeutische Maßnahmen, die auf die Immun-Antwort gegen ein bestimmtes Tumorantigen abzielen, sind außerdem sehr anfällig gegenüber Immunevasions-Mechanismen (engl. immune escape mechanism), denn es kann zu einer verminderten Expression dieses Antigens kommen. Um gegen eine Vielzahl von potentiellen TAAs eine Immunantwort zu induzieren, stehen andere Methoden zur Verfügung. DC können mit Tumorlysat (Nair 1997), mit apoptotischen Zellen (Albert 1998) oder mit Peptiden, gewonnen durch Säureelution von Tumoren (Ribas 1999), beladen werden.

DC können zudem mit Tumorzell-RNA transfiziert werden (Nair 1998). Eine weitere Möglichkeit stellt die Kokultivierung von lebenden Tumorzellen mit DC dar (Celluzzi 1998). Zwei wichtige DC-Strategien stehen zur Verfügung, um eine Immunantwort gegen identifizierte und nicht identifizierte Tumorantigene hervorzurufen. Zum einen können DC mit Tumorzellen fusioniert werden. Dieses wurde erstmals von Gong et al. (1997) gezeigt. Studien mit Tumor-tragenden Mäusen konnten demonstrieren, daß die Vakzinierung mit Fusionszellen die Tumorregression von bestehenden Karzinomen, Lymphomen und Melanomen (Gong 1997, Lespagnard 1998, Wang 1998) bewirkt. Die Fusionszellen waren in der Lage, die Tumorantigene effektiv zu präsentieren, so daß in vitro eine spezifische T-Zellantwort induziert werden konnte (Gong 2000 a und b, Brossart 1998). Von Kugler et al. (2000) konnte gezeigt werden, daß die Gabe von Fusionszellen als Tumorstoffe in vivo bei Patienten mit Nierenzellkarzinom eine effektive Behandlungsmethode ist. Zum anderen können CD34⁺ AML-Vorläuferzellen mittels Zytokinen in vitro zu DC differenziert werden (Harrison 2001, Charbonnier 1999, Choudhury 1999). In einigen Fällen war es auch möglich, AML-spezifische CTL mit DC, die durch solche Differenzierungsmethode hergestellt wurden, in vitro zu generieren (Charbonnier 1999, Choudhury 1999, Choudhury 1998). Diese Methode bietet den Vorteil, daß die DC direkt aus den malignen Zellen generiert werden können, so daß alle leukämischen Antigene und die wichtigen kostimulatorischen Moleküle gemeinsam auf einer Zelle vereinigt werden. Es handelt sich um eine gut durchführbare Methode, weil mit dem peripheren Blut der Patienten gearbeitet werden kann, ein verhältnismäßig leicht zugängliches Material.

1.1.4 Zytotoxische T-Lymphozyten

Der adoptive Transfer von in vitro generierten Leukämie-spezifischen CTL könnte bei Patienten mit AML eine Methode darstellen, durch die der GvHD-Effekt minimalisiert wird, der GvL-Effekt hingegen voll zur Geltung kommt. Bei CTL kann es sich um CD4⁺ CTL, CD8⁺ CTL, NK-Zellen und LAK-Zellen handeln. CD8⁺ CTL sind überwiegend Killerzellen, die in der Lage sind, nach Aktivierung allogene Zielzellen, Virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen abzutöten. Dabei haben sie generell zwei Möglichkeiten, diejenigen Zielzellen zu lysieren, die spezifische Antigene im Kontext mit den entsprechenden MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zum einen über den Granzyme/Perforin-Mechanismus, zum anderen über den Fas/FasL-Weg.

CTL können außerdem zytotoxische Zytokine wie $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ sezernieren (Shresta 1998). Interferon- γ ($\text{INF-}\gamma$) ist ein Zytokin, welches von aktivierten T- und NK-Zellen sezerniert wird. Das Zytokin $\text{INF-}\gamma$ hat vielfältige, immunregulatorische, antiproliferative und antivirale Wirkungen auf die verschiedensten Zelltypen (Balkwill 1989). Es hat außerdem Einfluß auf andere Immunzellen, es stimuliert die Aktivierung von CTL (Maraskovsky 1989), die Zytotoxizität von NK-Zellen (Djeu 1982) und aktiviert Makrophagen. Diese Makrophagen sind dann in der Lage, in den entsprechenden Infektionsgebieten als antigenpräsentierende Zellen aber auch als Effektorzellen, z.B bei der Abtötung bestimmter intrazellulärer Erreger und zusammen mit $\text{TNF-}\alpha$ auch von Tumorzellen, zu wirken (Nathan 1991, Collart 1986). Zudem stimuliert $\text{INF-}\gamma$ die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und die Induktion von MHC-Klasse-II-Molekülen und trägt zu einer verstärkten Antigenprozessierung bei. Somit bewirkt $\text{INF-}\gamma$ eine verbesserte Antigenpräsentation, so daß die entsprechenden Zielzellen von den CTL effektiver erkannt und lysiert werden können (Boehm 1997, Farrar 1993, Buchmeier 1985). Außerdem berichteten Nakajima et al. (2001), daß $\text{INF-}\gamma$ im Mausmodell eine entscheidene Rolle bei der Rekrutierung von Tumor-spezifischen T-Lymphozyten an die Tumorzellorte spielt, damit die Lyse der Tumorzellen erfolgen kann.

Der häufigste Mechanismus der Zell-Lyse von CD8^+ CTL, nicht aber der von CD4^+ CTL, ist, nach der Erkennung des spezifischen Antigens auf der Oberfläche von Zielzellen, die Freisetzung von lytischen Granula. Diese Granula sind modifizierte Lysosomen, welche zwei Klassen von zytotoxischen Effektorproteinen enthalten. Sie werden nach Stimulierung über den TCR von den CTL synthetisiert und in aktiver Form in den Granula gespeichert. Erst bei Kontakt mit den spezifischen Zielzellen entfalten die zytotoxischen Granula ihre Funktionsfähigkeit. Ein Protein in diesen Granula ist das Perforin. Es kann polymerisieren und ist in der Lage, porenähnliche Strukturen in den Membranen der Zielzellen zu bilden. Die anderen Granula-Komponenten sind die Granzyme. Hierbei handelt es sich um neutrale Serinproteasen (zu dieser Enzymfamilie gehören außerdem Trypsin und Chymotrypsin), welche die apoptotischen Mechanismen der Zielzellen in Gang setzen. Nachdem die CD8^+ Effektorzellen die Zielzellen erkannt haben, kommt es zu einer Konjugation der beiden Zellen, hierbei interagiert das Adhäsionsmolekül LFA-1 auf T-Lymphozyten mit ICAM-1 oder ICAM-2 auf den Zielzellen.

Durch die Bindung des TCR mit dem spezifischen MHC/Peptid-Komplex kommt es zur Polarisierung der Effektorzellen und lytische Granula werden in den extrazellulären Raum zwischen den Ziel- und Effektorzellen sezerniert. In der Gegenwart von Kalzium kann Perforin polymerisieren und formt dabei Poren in der Zielzellenmembran. Diese Poren haben einen Durchmesser von ca. 16nm. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, ob die Poren erst geformt werden und dann in die Zielzellenmembran gelangen, oder ob die Poren direkt in der Membran geformt werden. In vitro Experimente konnten zeigen, daß durch diese transmembranen Poren Wasser und Salz in die Zielzellen gelangen können, so daß es zum raschen Absterben der Zielzellen kommt. Durch diese transmembranen Poren gelangen außerdem Granzyme ins Zytoplasma der Zielzelle. Allerdings gibt es Hinweise von Froelich et al. (1998), daß die Granzyme auch gelegentlich ohne die Perforintunnel in die Zielzellen gelangen können. Dabei gehen die Autoren davon aus, daß sich die Granzyme anschließend in den Zielzellen in einem zytoplasmatischen Kompartiment befinden. Von dort können sie mit Hilfe von Perforin ins Zytoplasma sezernieren. Welche Bedeutung dieser Weg in vivo hat ist bisher ungeklärt. Die Granzyme können sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern auf Substrate wirken, die den Zelltod durch DNA-Fragmentierung herbeiführen (Shresta 1998).

Der zweite Weg, den die CTL zur Lyse von Zielzellen nutzen, führt über das Fas/FasL System. Einige CD8⁺ und CD4⁺ Effektorzellen exprimieren Fas-Ligand auf ihrer Oberfläche. Fas (CD95) gehört zur TNF-Familie und wird auf vielen Zelltypen exprimiert. Die Bindung von Fas auf den Zielzellen durch Fas-Ligand auf den T-Lymphozyten löst ein apoptotisches Signal in den Zielzellen aus (Nagata 1995). Das Auftreten von Lymphoproliferativen- und Autoimmun-Erkrankungen bei Mäusen und Menschen mit Mutationen im Gen für Fas oder Fas-Ligand läßt vermuten, daß es sich hierbei um einen wichtigen Effektormechanismus handelt.

1.1.5 Immunevasions-Mechanismen

Tumorzellen bzw. AML-Blasten können der Überwachung durch das Immunsystem durch verschiedenste Mechanismen entgehen. Körpereigene Proteine werden normalerweise zu Peptiden aus 9-12 Aminosäuren abgebaut. Diese Peptide werden dann über ein Transportsystem (TAP) ins endoplasmatische Retikulum (ER) befördert, um dann auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und an der Zelloberfläche präsentiert zu werden.

Bei manchen bösartigen Erkrankungen sind die Tumorantigene reduziert, es existieren keine Antigene, oder aufgrund defekter Antigenprozessierung, z.B. TAP-Defizienz, können Tumor-Antigene nicht ins ER befördert werden, und deshalb nicht über die MHC-Moleküle auf der Tumoroberfläche präsentiert werden. Studien bei Melanompatienten konnten zeigen, daß die Vakzinierung mit Melan A/MART-1 Peptiden zu einer Regression des metastatischen Wachstums führt, wohingegen es ohne Vakzinierung bzw. ohne die Expression von Tumorantigenen zu einer Progression der Metastasierung kommt (Jager 1996). Die Expression von MHC-Klasse-I/-II-Molekülen auf der Zelloberfläche von vielen Tumoren ist stark reduziert oder die MHC-Moleküle fehlen völlig, so daß die Tumorantigene nicht mehr präsentiert werden können und somit nicht in der Lage sind, CTL zu stimulieren. Die reduzierte Empfänglichkeit von leukämischen Zellen gegenüber CTL, die mit einer verminderten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen einhergeht, wird als eine Möglichkeit für das Wiederauftreten der Leukämie nach allogener KMT in Remission betrachtet (Dermine 1997).

Da Tumorzellen, wie schon erwähnt, nicht oder nur in geringem Maße die wichtigen kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, und somit CTL nicht aktivieren können, kommt keine effektive Immunreaktion zustande. Untersuchungen der AML-Blasten haben gezeigt, daß das kostimulatorische Molekül CD80 so gut wie nicht, und CD86 nur in geringem Maße exprimiert wird (Notter 2001, Hirano 1996). Im Mausmodell stellten Hirano et al. (1997) dar, daß die vorbeugende und therapeutische Immunität gegen Leukämie durch die Gegenwart bestrahlter, mit CD80-transduzierter, leukämischer Zellen erhöht werden konnte. Buggins et al. (1999) konnten zeigen, daß eine optimale CD80-Expression auf den leukämischen Zellen, im Kontext mit allogenen Antigenen, zu einer verstärkten T-Zell-Erkennung und -Proliferation führen kann. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Produktion des anti-apoptischen Proteins bcl-2, so daß das Überleben von aktivierten T-Lymphozyten gesteigert wird. Ohne das kostimulatorische Signal führt die Erkennung des MHC/Peptid-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor zur T-Zell-Anergie (Gimmi 1993). Zur Anergie von T-Lymphozyten kann es außerdem durch eine verhinderte T-Zell-Proliferation kommen, die durch Neutralisierung der autokrinen IL-2 Sekretion hervorgerufen wird (DeSilva 1991).

Es wurde festgestellt, daß der Level an löslichen IL-2 Rezeptoren im Serum von AML-Patienten erhöht ist und experimentelle Studien lassen vermuten, daß dieser erhöhte Level durch die Sezernierung von Rezeptoren durch AML-Blasten zustande kommt (Srivastava 1994). Diese aktiven löslichen IL-2 Rezeptoren können dazu beitragen, daß IL-2 neutralisiert wird und die IL-2-abhängige anti-leukämische Reaktivität somit unterdrückt werden kann (Goodman 1998). Eine weitere Art, durch die Tumore die T-Zell-Antwort behindern können, ist das Fas/FasL System. Hierbei können die Effektor-T-Zellen abgetötet werden, indem Fas-Ligand auf leukämischen Zellen in einem abnormalen Maß und Fas auf den T-Lymphocyten exprimiert wird (Buzyn 1999). Außerdem wurde beschrieben, daß verschiedenste Tumorerkrankungen, wie Nierenzell-, Kolon-Rektum-, Ovarial-, Leber-, Magen-, Pankreas- und Hals-Karzinom, sowie Melanom oder Morbus Hodgkin, bei den Patienten Veränderungen in T-/NK-Zellen auslösen können, hierbei sind besonders die Moleküle der Signaltransduktion, wie die Phosphotyrosin-Kinasen (PTK), p56^{lck} und p59^{fyn}, die CD3 ζ -Kette oder NF- κ B, betroffen (Renner 1996). Eine andere Möglichkeit für das Versagen einer Immunantwort gegen Tumoren stellt die Induktion von Suppressorzellen dar. Von ihr berichteten u.a. Hansen et al. (1994). Hierbei wurden bei Patienten mit T-Zell-Lymphomen über APC (von denen man sagt, daß deren Funktion durch die Tumorzellen beeinflusst wird) autologe CD4⁺ Zellen aktiviert, die anstelle von T-Helferfunktion suppressive Aktivität ausübten. Von Lehmann et al. (2000) wurde über eine weitere Immunevasions-Maßnahme berichtet, bei der AML-Zellen Perforin auf ihrer Oberfläche binden können, um somit den lytischen Mechanismen der CTL zu entgehen.

Um der Immunantwort zu entgehen, können manche Tumorzellen immunsuppressive Substanzen wie IL-10 und TGF- β sezernieren. Zeidler et al. (1997) berichteten, daß IL-10 die Antigenpräsentation und Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen in mit Epstein-Barr-Virus infizierten humanen B-Zellen durch die Reduzierung der TAP-Proteine unterdrückt. Außerdem können AML-Blasten TGF β 1 und TGF β 2 konstitutiv produzieren, so daß sie durch diese Sezernierungen in der Lage sind, die Aktivität von LAK-Zellen zu unterdrücken (Bergmann 1995). Mothy et al. (2001) berichteten, daß "lymphoide" DC von AML-Patienten in vivo wahrscheinlich durch leukämische Zellen in ihrer Funktionalität beeinträchtigt werden, so daß diese nicht mehr in der Lage sind, leukämische Antigene für eine effektive T-Zell-Induktion zu präsentieren.

1.1.6 T-Lymphozyten und der Mechanismus der T-Zell-Aktivierung

Nachdem T-Lymphozyten ihre Entwicklung im Thymus durchlaufen haben, zirkulieren die naiven T-Lymphozyten kontinuierlich vom Blut in die peripheren lymphatischen Organe und wieder zurück. Eine adoptive Immunzellantwort wird induziert, wenn die T-Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen auf spezifische Antigene treffen, die auf der Oberfläche von APC präsentiert werden (Banchereau 1998).

T-Zell-Aktivierung/Signaltransduktion

Wie bereits erwähnt werden T-Lymphozyten aktiviert, indem ihre TCR die MHC-Moleküle, welche die zuvor prozessierten antigenen Peptid-Komplexe präsentieren, erkennen und mit ihnen interagieren. Verstärkt wird diese Bindung durch die Anlagerung der CD4- oder CD8-Ko-Rezeptoren an die MHC-Klasse-II- bzw. Klasse-I-Moleküle. Der TCR ist ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einer α - und β -Kette, welche der Antigenerkennung und -bindung dienen. Bei einigen wenigen T-Lymphozyten setzt er sich aus einer γ - und einer δ -Kette zusammen. Der TCR ist nicht-kovalent assoziiert mit dem CD3-Komplex, der aus den γ -, δ - und ϵ -Ketten und zwei weiteren CD3-unabhängigen Ketten besteht, den intrazytoplasmatischen ζ -Ketten, die als Homodimere vorkommen (Abbildung 1).

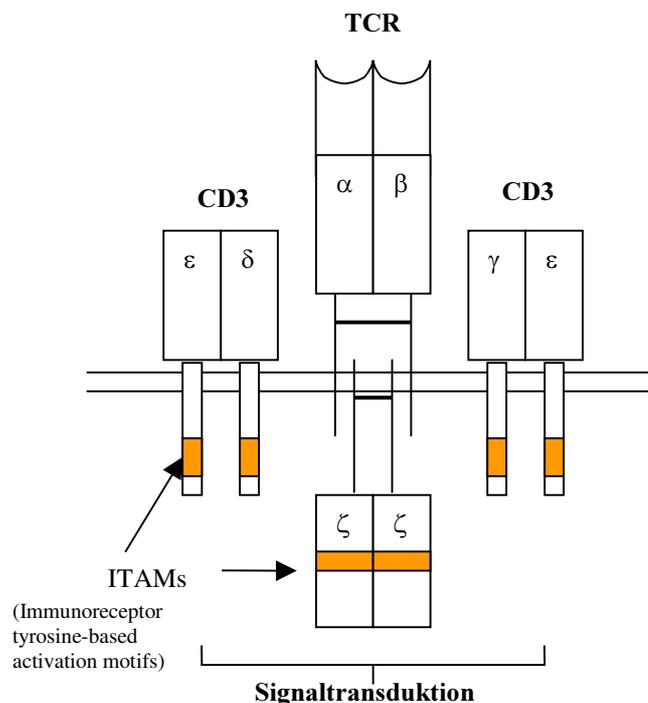


Abbildung 1: Der CD3/TCR-Komplex

Seltener treten diese Ketten als Heterodimere in Form von ζ/η -Ketten auf. Über den CD3-Komplex und den daran assoziierten ζ -bzw. η -Molekülen erfolgt die intrazelluläre Signaltransduktion des TCR. Hierzu besitzt jede CD3-Kette ein sogenanntes "Immunrezeptor tyrosinreiches aktivierendes Motiv" (ITAMs, engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), wobei in jeder zeta-Kette jeweils drei ITAMs vorliegen. Die Phosphorylierungsereignisse dieser ITAMs durch PTK stellen den ersten Schritt der T-Zell-Aktivierung nach der Bindung des MHC/Peptid-Komplexes an den TCR dar. Hierzu wurden vorab Fyn und die PTK der Src-Familie Lck (diese ist mit der zytoplasmatischen Domäne der CD4- bzw. CD8-Ko-Rezeptoren assoziiert), durch CD45 (dem gemeinen Leukozytenantigen, welches intrazelluläre Thyrosinphosphatase-Aktivität aufweist) aktiviert. Dieser Vorgang erlaubt nun Proteinen, die spezifische Tyrosinphosphat-Bindungseigenschaften haben (die sogenannte Src-Homologie-2(SH2)-Domänen besitzen), an die phosphorylierten ITAMs zu binden. Hierbei spielt die ZAP-70-PTK eine wichtige Rolle. Sie bindet an die phosphorylierten ITAMs, wird aber erst aktiviert, wenn der Ko-Rezeptor an das MHC-Molekül bindet, wodurch Lck in der Lage ist, die ZAP-70-Kinase zu phosphorylieren und zu aktivieren. Die aktivierte Kinase unterstützt nun die weiteren intrazellulären Signalgebungsereignisse, indem sie unter anderem Adapter-Proteine wie LAT (eng. linker of activation in T cells) phosphoryliert. Das LAT-Protein, welches mit der Plasmamembran assoziiert ist, stellt eine Brücke bei der Weiterleitung der Aktivierungssignale von der T-Zell-Membran ins Innere der Zelle dar. Dieses Protein fungiert nach der Phosphorylierung als wichtige Bindungsstelle für Proteine mit Src-Homologie-2(SH2)-Domänen, wie zum Beispiel PLC- γ 1 und SLP-76.

Die Aktivierung der ZAP-70-Kinase führt zu drei wichtigen Signaltransduktionswegen. Zwei davon werden durch die Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) initiiert, die dann die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-triphosphat (IP₃) katalysiert. IP₃ bewirkt daraufhin, daß es zu einem erheblichen Anstieg von Kalzium in der Zelle kommt, welches in Membranen gelagerten intrazellulären Kalziumlagern mobilisiert wird. Hierdurch können kalziumabhängige Enzyme, z.B. das Kalziumbindungsprotein Calmodulin, aktiviert werden. Calmodulin wiederum aktiviert die zytoplasmatische Phosphatase Calcineurin.

Sie ermöglicht es dem Transkriptionsfaktor "nuclear factor of activated T cells" NFAT vom Zytoplasma in den Zellkern zu wandern und dort an die spezifische IL-2 Promotor-Region zu binden, um gemeinsam mit einem weiteren Kernbindungsfaktor, dem AP-1 Komplex, die Transkription des IL-2 Gens durch die RNA-Polymerase II zu aktivieren. Durch die Mitwirkung von DAG und dem intrazellulären Kalziumanstieg wird die zweite Signalkaskade in Gang gesetzt, welche die Proteinkinase C (PKC), eine Serin/Threonin-Phosphokinase, aktiviert. PKC wiederum induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB.

Der dritte Signalweg führt über die Aktivierung von Ras, einem kleinen Guanosintriphosphat (GTP)-Bindungsprotein, auch "small G proteins" genannt, welches GTPase-Aktivität aufweist. Ras hat in seiner inaktiven Form Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, welches durch "Guanine-nucleotide exchange factors" (GEFs) durch GTP ersetzt werden kann, so daß Ras in seiner aktivierten Form vorliegt. Ras ist nun in der Lage, eine Kaskade von Proteinkinasen zu aktivieren, die "mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) cascade" genannt werden. Diese MAP-Kinase-Kaskade führt direkt im Zellkern zur Phosphorylierung und Aktivierung der AP-1 Transkriptionsfaktor-Familie. Diese Faktoren sind Dimere, bestehend aus je einem Protein der Transkriptionsregulator-Familien Fos und Jun. Nachdem die T-Lymphozyten durch die Transkriptionsfaktoren aktiviert wurden, wird die Expression von bestimmten Genen, wie IL-2, induziert. Das trägt dazu bei, daß Zellen proliferieren und zu Effektorzellen ausdifferenzieren. Diese Effektorzellen können dann in die B-Zellbereiche oder in die betroffenen Gewebe migrieren (Hermiston 2002, Wange 2000, Viola 1999, Ahmed 1996).

Lymphozyten-Subpopulationen

Man kann bei den T-Lymphozyten zwei Populationen unterscheiden, die CD8⁺ und die CD4⁺ T-Zellen. Bei den CD8⁺ T-Zellen handelt es sich überwiegend um CTL. Sie töten Zielzellen, die Antigenpeptide von Erregern aus dem Zytosol durch MHC-I-Moleküle präsentieren. CD4⁺ T-Zellen erkennen dagegen Peptidantigene, die an MHC-II-Moleküle gebunden sind. Die CD4⁺ T-Zellen sind überwiegend Helfer-Zellen, die Zytokine produzieren. CD4⁺ T-Zellen können in zwei funktionale Gruppen eingeteilt werden: TH1-Zellen, welche unter anderem die Zytokine Interleukin-2 und Interferon-γ sezernieren, und TH2-Zellen, welche Interleukin-4, -5, -6 und -10 bilden.

TH1-Zellen können B-Zellen aktivieren, damit diese bestimmte IgG-Subklassen produzieren. TH2-Zellen hingegen bewirken, daß B-Zellen differenzieren und alle anderen Typen von Immunglobulinen produzieren. Des weiteren aktivieren sie naive B-Zellen zur Proliferation und zur Produktion von IgM, damit eine B-Zell-Antwort initiiert werden kann (Mosmann 1996). Ein geringer prozentualer Anteil an CD4⁺ T-Zellen aus den TH1- und TH2-Populationen kann zytolytische Aktivität ausüben, wenn sie Peptide in Verbindung mit den MHC-Klasse-II-Molekülen erkennen (Hahn 1995, Williams 1997).

Neben CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen verfügen auch noch andere Zellen, wie die NK-Zellen, über ein zytotoxisches Potential, in dem sie allogene Zellen, Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen ohne vorherige Immunisierung lysieren. Ihr klassisches Merkmal ist das Erkennen von MHC-Klasse-I-negativen Zellen. Teilweise exprimieren NK-Zellen das CD8-Antigen und die ζ -Kette des CD3-Komplexes. Die Gene des TCR sind nicht rearrangiert. NK-Zellen tragen aktivierende und inhibierende Rezeptoren, die bei der Effektorfunktion eine Rolle spielen. Normale, gesunde Zellen werden durch die inhibitorischen Rezeptoren, welche MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen, vor der Lyse durch NK-Zellen geschützt. NK-Zellen können durch IFN- α , IFN- β und IL-12 aktiviert werden und setzen selbst Interferon- γ frei. Bei Patienten mit Leukämien ist die NK-Zellaktivität im Blut stark reduziert.

Nach einem Antigenkontakt entstehen neben Effektorzellen auch sogenannte Gedächtnis-T-Zellen, welche langlebig sind und nach erneutem Auftreten des Antigens eine verstärkte Immunantwort hervorrufen. Sie sind durch das Oberflächenantigen CD45RO charakterisiert, eine spezielle Isoform des CD45-Antigens. Auf anderen Leukozyten kommen andere Isoformen vor, z.B. CD45, welches auf naiven T-Lymphozyten und Effektorzellen exprimiert wird (Hamann 1997, Michie 1992). Die Gedächtnis-Zellen können anhand der Expression von CCR7, einem Chemokinrezeptor, welcher das "Homing" der T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe kontrolliert, in zwei funktionale Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in die CCR7 Gedächtnis-Zellen. Sie exprimieren Rezeptoren zur Migration in inflammatorische Gewebe und sind sofort in der Lage, die nötige Effektorfunktion auszuüben (Sallusto 1999).

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den $CCR7^+$ Gedächtnis-Zellen um Zellen, die "Homing"-Rezeptoren für die Lymphknoten exprimieren und die nicht unmittelbar Effektorfunktion ausüben können. Sie können aber DC effektiv stimulieren und in $CCR7^-$ Zellen nach einer zweiten Stimulation differenzieren. Das Abbildungsschema Nr. 4 macht u.a. deutlich, wie Effektorzellen aus Gedächtnis-Zellen differenzieren können.

2-Signale-Modell der T-Zell-Aktivierung/Interaktionspartner

Die Interaktion des MHC/Peptidantigen-Komplexes mit dem TCR liefert das erste Aktivierungssignal für T-Lymphozyten. Das zweite Signal erfolgt über die Verbindung von CD28 auf den T-Lymphozyten mit den kostimulatorischen Molekülen CD80/CD86 (B7-1/B7-2) auf der Zelloberfläche von APC (Abbildung 2).

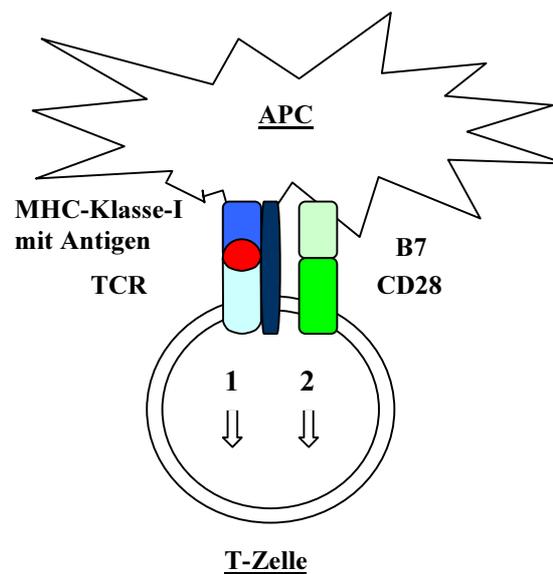


Abbildung 2: Die Stimulierung von naiven T-Zellen benötigt zwei unabhängige Aktivierungssignale

Die B7-Familienmitglieder haben die Spezifität für CD28-Familienmitglieder, für den Stimulationsrezeptor CD28 und für den inhibitorischen Rezeptor, das "cytotoxic T lymphozyten antigen 4" (CTLA-4). B7-2 ist auf den meisten APC-Populationen auf einem niedrigen Niveau konstitutiv exprimiert und wird nach der Aktivierung sofort verstärkt exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die Expression von B7-1 später im Lauf der Aktivierung induziert (Hathcock 1994). Die frühe Expression von B7-2 nach der Aktivierung läßt darauf schließen, daß es sich bei diesem kostimulatorischen Molekül um das für die Induktion einer Immunantwort wichtigere Molekül handeln könnte.

Hierauf weisen auch Versuche mit Knockout-Mäusen hin. Die kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 haben allerdings auch viele gemeinsame Funktionen (McAdam 1998). Es sind noch weitere, B7-ähnliche Moleküle bekannt, wie z. B. das Molekül B7-H1 (B7 homolog 1) (Dong 1999). Das neueste Molekül in der B7-Superfamilie ist B7-H3. Die Interaktion von B7-H3 mit einem Rezeptor, nicht mit CD28, CTLA-4, ICOS (engl. inducible co-stimulator) oder PD-1 (engl. programmed death 1) auf aktivierten T-Lymphozyten, bewirkt die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und verstärkt die Induktion von CTL und stimuliert selektiv die IFN- γ Produktion (Chapoval 2001).

Die Signaltransduktion über CD28 konnte erst zum Teil geklärt werden (Abbildung 3).

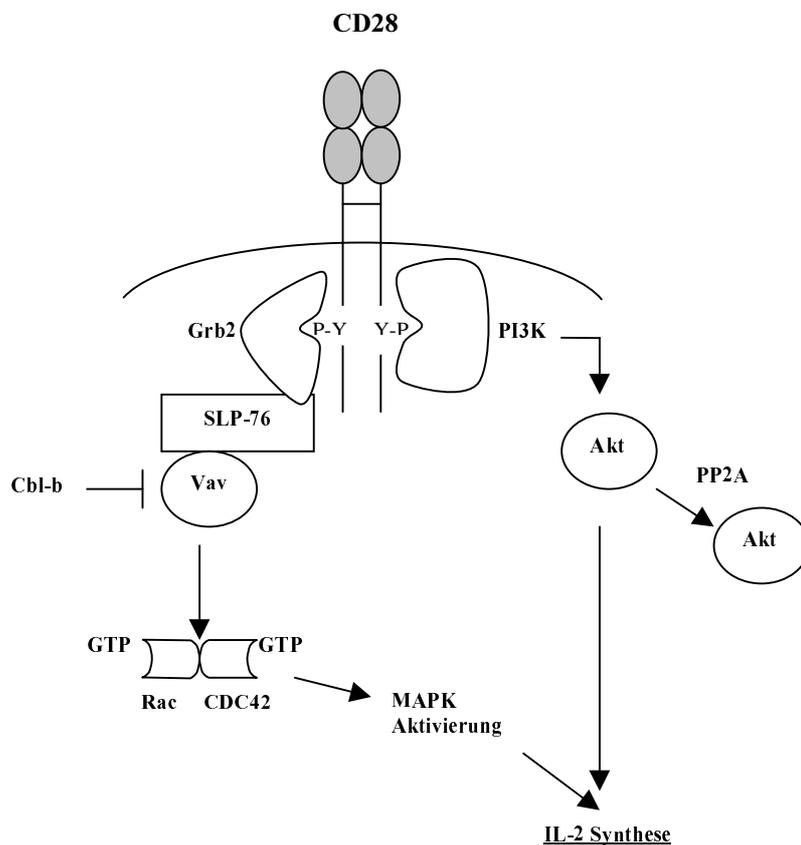


Abbildung 3: Darstellung der CD28-Signaltransduktion (modifiziert nach Frauwirth et al. (2002))

Sie beginnt mit der Kreuzvernetzung von CD28, was über die Tyrosinphosphatase-Aktivität zur Phosphorylierung des zytoplasmatischen Teils von CD28 führt, so daß es zur Interaktion mit Grb2 und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) kommen kann.

Über SLP-76 verbindet sich Grb2 (bei beiden handelt es sich um Adapterproteine) mit Vav. Vav wirkt als ein GEF für Rac und CDC42 (die zur kleinen Rho-Familie gehören), so daß diese von der inaktiven GDP-gebundenen Form in den aktivierten GTP-gebundenen Zustand übergehen können. Über die MAP-Kinase (MAPK) -Kaskade kann es dann zur Induktion der IL-2 Synthese kommen. PI3K kann durch die Rekrutierung von Akt (hierbei handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, auch Protein-Kinase B genannt) die Aktivierung dieser bewirken. Akt wiederum ist in der Lage, die IL-2 Produktion zu stimulieren. Negative Regulatoren für Vav und Akt sind das "Ring-finger" Adapterprotein Cbl-b bzw. die Protein Phosphatase 2A (PP2A) (Frauwirth 2002). Die CD28-Kostimulation unterstützt die Zytokin IL-2 Produktion und den Eintritt in den Zellzyklus, das T-Zell-Überleben, die Expression von CD40L, die Differenzierung von T-Helfer-Zellen und den Immunglobulin-Klassen-Switch sowie die Entwicklung von Effektor-T-Zellen. CD40L, welches an CD40 auf den APC bindet, verstärkt dadurch die B7 Expression auf den APC, die dann wiederum mit CD28 interagieren können.

Außer CD28 kann auch noch ICOS, welches strukturelle Homologien zu CD28 aufweist, mit einem bestimmten Mitglied der B7-Familie interagieren, mit ICOS-Ligand (ICOSL) (Hutloff 1999). Im Gegensatz zu CD28, welches auf der Oberfläche von ruhenden und naiven T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird (McAdam 1998), wird die Expression von ICOS kurz nach der T-Zell-Aktivierung induziert. Die Interaktion von ICOS mit ICOSL unterstützt die Differenzierung von T-Helfer-Zellen, es trägt zur Produktion von Effektorzytokinen wie IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 und IL-10 bei und spielt eine wichtige Rolle beim Immunglobulin-Klassen-Switch. ICOS hat aber eine untergeordnete Rolle bei der T-Zell-Expansion und IL-2 Produktion (McAdam 2001, Dong 2001, Tarufi 2001). In diesem Zusammenhang sind zwei weitere Rezeptoren von Bedeutung: CTLA-4 und PD-1. Sie weisen strukturelle Homologien zu CD28 und ICOS auf und sind ebenfalls fähig, mit B7-Molekülen zu interagieren. Allerdings wird CTLA-4 sehr schnell nach einer Aktivierung hochreguliert und liefert dabei ein negatives Signal, so daß die über den TCR und über CD28 ausgelöste Signaltransduktion inhibiert wird. PD-1 ist ein weiteres inhibitorisches Mitglied der CD28-Familie, seine Liganden PD-L1 und PD-L2 zeigen Ähnlichkeiten zu den B7-Molekülen. PD-1 wird nach Aktivierung von B und T-Lymphozyten sowie von myeloischen Zellen exprimiert (Latchman 2001, Freeman 2000, Agata 1996).

T-Zell-Anergie

Fehlt das zweite Aktivierungssignal für T-Lymphozyten, so können diese weder IL-2 sezernieren noch proliferieren, wenn sie über den TCR-Komplex aktiviert werden. Sie sind daher nicht in der Lage, die frühe G1 Phase des Zellzyklus zu überwinden und sind nicht-aktivierbar, auch wenn zu einem späteren Zeitpunkt die Aktivierung über das zweite Signal erfolgen würde (Harding 1992, DeSilva 1991, Jenkins 1990). Dieser Zustand, in dem sich die Zellen dann befinden, wird wie bereits erwähnt Anergie genannt (Jenkins 1990). Anergie T-Lymphozyten erkennen noch das Antigen, die Fyn-Kinaseaktivität ist erhöht, es kommt zu einem Anstieg von intrazellulärem freiem Ca^{++} und die Phosphorylierung von PLC- γ erhöht PIP2 und aktiviert Rap1, es wird aber kein IL-2 sezerniert (Boussiotis 1997, Boussiotis 1996, Gajewski 1995). Sie sind allerdings unfähig, die Lck und ZAP-70 zu aktivieren, sowie die TCR- ζ und ϵ -Kette zu phosphorylieren. Auch Ras, JNK und ERK werden nicht aktiviert und AP-1 und NF-AT werden nicht transaktiviert (Fields 1996, Mondino 1996, Kang 1992). Einer der möglichen Anergie-Faktoren, der die IL-2 Transkription hemmt, könnte der p27^{kip1} Cyklin abhängige Kinase (cdk) Inhibitor sein (Boussiotis 2000).

Verminderte TCR-zeta-Ketten Expression

Von vielen bösartigen Erkrankungen, wie z.B. den myeloischen Leukämien, wurde berichtet, daß die Zell-vermittelte Immunität der Patienten oft nicht ausreichend initiiert oder ausgeführt wird. Einer der möglichen Mechanismen hierfür könnte die verminderte Expression bzw. die Abwesenheit der intrazellulären CD3-zeta-Kette des TCR in T-Lymphozyten sein, wie schon kurz unter Immunevasions-Mechanismen erwähnt. Die TCR-assoziierte zeta-Kette leitet u.a. das Signal, daß die Bindung des Antigens an den TCR erfolgte, ins Innere der Zelle weiter. Die optimale Expression der zeta-Kette spielt somit eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (Reichert 1998, Ioannides 1993, Mizoguchi 1992). Mizoguchi et al. (1992) stellten nach ihren Studien die Hypothese auf, daß eine verminderte Expression der TCR-zeta-Kette oder der intrazellulären Proteinkinasen in T-Lymphozyten für Immundysfunktionen bei von Krebs befallenen Individuen verantwortlich sein könnte. Sie zeigten, daß die T-Lymphozyten der Milz bei Mäusen, die mit dem MCA-38 Tumor infiziert waren, die zeta-Kette des CD3-Komplexes nicht mehr exprimierten und eine reduzierte Expression der Proteinkinasen p59^{fyn} und p56^{lck} in den T-Lymphozyten aufwiesen.

Diese defekten T-Lymphozyten waren in ihrer zytotoxischen Funktion beeinträchtigt und hatten nicht mehr die Fähigkeit, eine anti-Tumorantwort *in vitro* auszulösen. Ähnliche Veränderungen wurden in Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten (TIL) und Lymphozyten von humanen Patienten mit soliden Tumoren (Kuss 1999, Kono 1996 und Lai 1996), aber auch in T-Lymphozyten von Patienten mit hämatopoetischen Erkrankungen (Buggins 1998, Rossi 1996) gefunden. Nicht nur in CD3⁺ T-Zellen konnte eine verminderte Expression der zeta-Kette nachgewiesen werden, sondern auch in NK-Zellen (Kiessling 1996).

Der für eine verminderte Expression der zeta-Kette in T-Lymphozyten verantwortliche Mechanismus ist bisher ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß Apoptose eine wichtige Rolle spielen könnte. Die Ko-Inkubation von TILs mit Ovarialkarzinomzellen induzierte eine Caspase-Aktivierung und somit die Degradierung der zeta-Kette in diesen T-Lymphozyten (Gastman 1999, Rabinowich 1998).

Verminderte CD28-Expression

Eine verminderte CD28-Expression wurde u.a. bei Patienten mit HIV, multiplen Myelom und CLL nachgewiesen (Moss 1996, Rossi 1996, Saukkonen 1993). Es wurde spekuliert, ob CD28⁻ T-Zellen bei der Immunsuppression oder bei der T-Zell-Anergie beteiligt sind (Linsley 1996, Schwartz 1992). Es wurde aber auch überlegt, ob es sich bei den CD28⁻ T-Zellen um Effektorzellen handeln könnte (Trimble 2000). Hamann et al. (1999) konnten zeigen, daß es sich bei Effektorzellen vermutlich um Zellen handelt, bei denen CD28 auf der Oberfläche vermindert exprimiert wird. Außerdem konnten sie zeigen, daß die gesteigerte zytotoxische Funktion der Zellen mit einer verminderten Proliferation einhergeht (Abbildung 4).

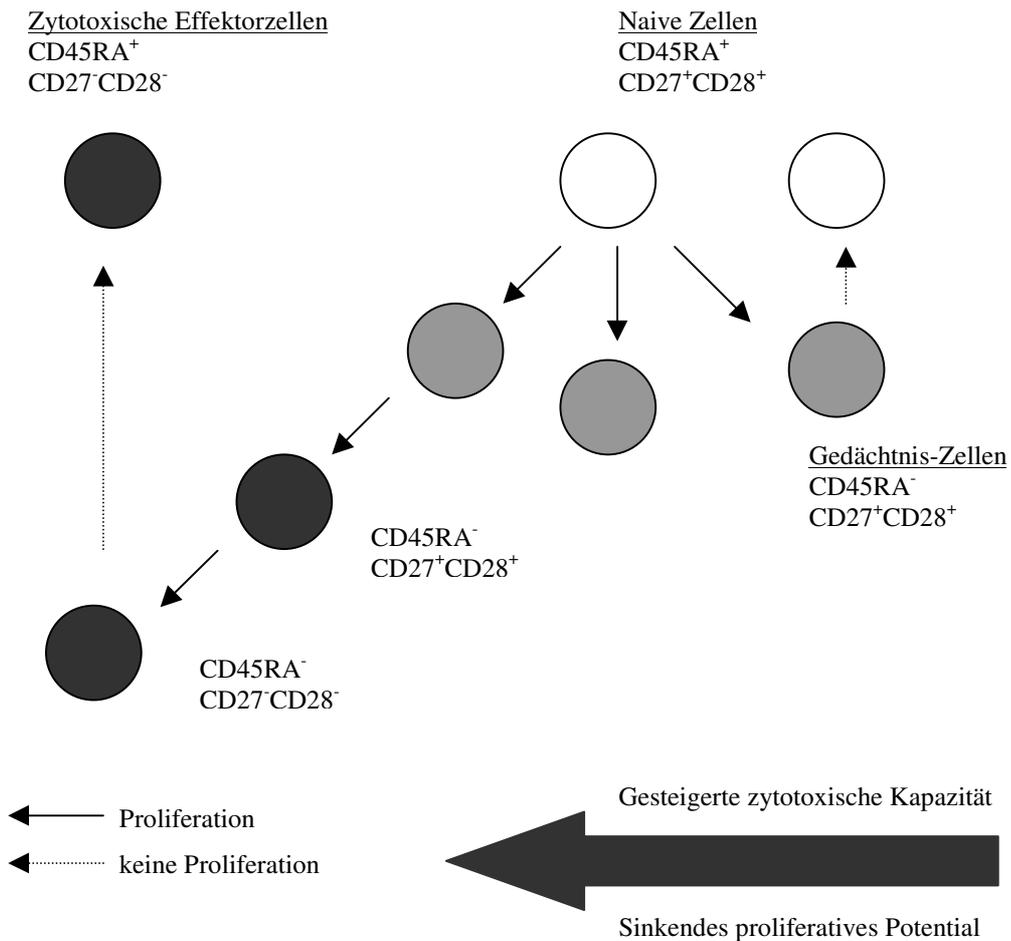


Abbildung 4: Modell der CD8⁺ T-Zell-Differenzierung (modifiziert nach Hamann et al. (1999))

1.1.7 Immuntherapeutische Strategien für die Behandlung der AML

Es gibt eine Reihe von Belegen, daß T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der AML spielen. Zum einen gibt es eine geringere Remissionsrate bei Leukämiepatienten, welche eine GvHD nach erfolgter KMT entwickelten (Weiden 1979). Unbestritten ist der GvL-Effekt durch allo-reaktive T-Lymphozyten. Patienten erleiden häufiger einen Rückfall nach syngener (bei eineiigen Zwillingen) KMT als Patienten nach allogener KMT (Gale 1994). Daß die alloreaktiven T-Lymphozyten hauptverantwortlich für die GvL sind, zeigt auch die Tatsache, daß durch die Depletion von T-Lymphozyten im Transplantat zwar das Risiko einer GvHD sinkt, gleichzeitig das Risiko der Patienten für ein Rezidiv stark ansteigt (Goldman 1995). Weitere Hinweise dafür geben die bereits erwähnten Studien von van Rhee et al. (1995) und Kolb et al. (1990).

Es gibt eine Vielzahl von Ansätzen, welche bei der MHC-restringierten adoptiven T-Zell-Therapie bei AML-Patienten verwendet werden können. Der Erfolg dieser adoptiven Immuntherapien hängt vermutlich davon ab, ob die Leukämiezellen erkannt werden und GvHD vermieden werden kann. Je nachdem, ob Leukämie-spezifische Antigene erkannt werden oder nicht, kann die AML T-Zell-Therapie in zwei Kategorien eingeteilt werden: zum einen in die nicht spezifische T-Zell-Therapie zum anderen in die Leukämie-spezifische CTL-Therapie. Zu den nicht spezifischen T-Zell-Therapien gehört die Gabe von DLI, sie wurde bereits zuvor im Text erwähnt. Diese Methode liefert den Beweis, daß T-Lymphozyten in der Lage sind, gegen leukämische Blasten zu reagieren (Porter 2000, Kolb 1995). Metha et al. (1997) zeigten, daß bei rezidierten Patienten nach allogener KMT die Behandlung mit DLI sowie mit der diskontinuierlichen Gabe von Cyclosporin oder Interferon die Anzahl an AML-Blasten reduzierte. Wie schon beschrieben, besteht immer die Gefahr einer GvHD. Eine Möglichkeit zur Kontrolle einer GvHD könnten genetisch veränderte Spender T-Lymphozyten bieten. Hierbei werden Spender T-Lymphozyten mit einem Suizid-Gen, wie dem Thymidinkinase Gen des Herpes Simplex Virus (HSV-TK), transduziert. Entwickelt der Patient eine GvHD, so kommt es durch die Behandlung mit Ganciclovir zur DNA-Synthese Hemmung und damit zum Tod der transduzierten T-Zelle (Knabel 2000, Bonini 1997). Eine weitere Möglichkeit ist die selektive T-Zelldepletion von Spenderlymphozyten. Diese Methode ist geeignet für Patienten bei allogener KMT. Ergebnisse bei allogener KMT, wo die T-Lymphozyten mittels CD8- (Nimer 1994) und CD6- (Soiffer 1992) Antikörpern depletiert wurden, zeigten geringere GvHD-Raten. Bei CML-Patienten konnte gezeigt werden, daß die CD8-Depletion bei Patienten, die DLI-Transfusionen erhielten, nicht zu einer Verminderung des GvL-Effekts führte (Giralt 1995).

Die zweite Gruppe beinhaltet die Leukämie-spezifischen T-Lymphozyten. Wie am Anfang der Arbeit erwähnt, sind bis jetzt für die meisten AML-Formen keine spezifischen Tumorantigene bekannt, um eine Antigen-spezifische CTL-Antwort zu induzieren. Trotzdem wurden verschiedene Gruppen von TAAs beschrieben, die als Zielzellen für CTL in vitro als auch in vivo fungieren können.

Hierzu zählen virale Proteine (E6, E7 von HPV), Proteine, die in spezifischen Geweben überexprimiert sind (MelanA, Tyrosinase), mutierte Proteine (Kaspase-8, HLA-A2, CDK4), neo-exprimierte Proteine, die in normalen Geweben nicht gefunden werden (CEA, WT-1, MAGE) und Proteine, die in Tumorgeweben überexprimiert sind, aber nur sehr gering in normalen Geweben exprimiert werden (p53, Her2/neu) (Knuth 2000).

CTL, die minor Histokompatibilitätsantigene (mHAG) mit einer restringierten Gewebeverteilung erkennen, wurden bereits mit Erfolg aus dem Blut von transplantierten Patienten gewonnen (Warren 1998). Anhand der Testung mit Fibroblasten, PHA-stimulierten Lymphoblasten und EBV-transformierten lymphoblastischen Zelllinien konnten 12 von 17 T-Zell-Klone gefunden werden, die nur auf hämatopoetischen Zellen mHAG erkennen. Es wurden Reaktionen in vitro von zytotoxischen Zellen gegen mHAG publiziert (van der Harst 1994). Eljaafari et al. (2001) konnten zeigen, daß es möglich ist, CD4⁺ T-Zell-Klone zu generieren, die spezifisch für das mHAG H-Y waren. Diese H-Y spezifischen T-Lymphozyten waren in der Lage, AML-Blasten zu lysieren. Mutis et al. (1999) generierten in vitro CTL gegen die mHAG HA-1 und HA-2, die hämatopoetische Zellen, u.a. auch AML-Blasten, erkannten. Eine Selektivität der T-Zell-Antwort kann auch durch die Immunisierung gegen Fusionsproteine erreicht werden; Beispiele sind bei der CML die von BCR-ABL (Bocchia 1996) und bei der Promyelozytenleukämie die von pml/RAR- α (Gambacorti-Passerini 1993) kodierte Proteine. Allerdings konnten beim Patienten nach der Behandlung bisher keine CTL nachgewiesen werden (Pinilla 1999). Andere Proteine, die als Ziele eines GvL-Effektes dienen könnten, sind normale Proteine, die auch in gesunden Zellen vorkommen, aber in Leukämiezellen übermäßig exprimiert werden. In diese Kategorie gehören die Proteinase 3, das sogenannte ANCA-Protein, wobei es sich um eine neutrale Serinprotease handelt, welche in myeloischen Leukämien überexprimiert ist. Es wurden T-Zell-Reaktionen in vitro gegen die Proteinase 3 (PR-3) beschrieben (Molldrem 1996). Die generierten HLA-A2.1-restringierten CTL-Linien zeigten Zytotoxizität gegen ein Peptid aus der Proteinase 3 auf myeloischen leukämischen Zellen, nicht aber gegen normale Knochenmarkszellen, welche Proteinase 3 exprimierten. Eine andere Möglichkeit könnte die Präsentation dieser übermäßig exprimierten Proteine durch fremde HLA-Antigene sein. Gao et al. (2000) war es möglich, gegen das WT1 Peptid P126, der "Wilm's Tumor Gen" (WT1) Transkriptionsfaktor, spezifische allogen restringierte CTL zu generieren.

Es stellt ein gutes Zielzellenprotein dar, weil es in leukämischen, unreifen CD34⁺ Vorläufer-Zellen überexprimiert wird. Die Ausreifung der Zellen ist hingegen mit einer Abregulierung von WT1 begleitet. WT1 wird zwar verstärkt in der fötalen Leber exprimiert und spielt eine unwichtige Rolle bei der urologischen Entwicklung. Im adulten Gewebe ist die Expression von WT1 allerdings begrenzt, es kommt nur sehr schwach im Milzparenchym, in den Hoden und in den Eierstöcken vor (Park 1993, Pelletier 1991). Schließlich können HLA-differente Transplantationen einen GvL-Effekt durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ausnützen, indem Spender ausgewählt werden, die solche HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, welche die adoptiv transferierten NK-Zellen nicht inhibieren können (Ruggeri 1999).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Aus den in 1.1.2 dargestellten Grundlagen leitet sich die dringende Notwendigkeit für neue therapeutische Ansätze bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) ab. Man geht davon aus, daß bei Patienten mit rezidivierter AML eine adoptive Immuntherapie mit Leukämie-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) sehr hilfreich sein könnte. Denn Antigen-spezifische CTL sollten nur Antigen exprimierende Zellen (d.h. Leukämiezellen) erkennen und gesundes Gewebe nicht angreifen. Somit könnte der Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL-Effekt) gewährleistet sein und die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) vermieden werden. Da die primäre Induktion von CTL auf die zwei Aktivierungssignale, das Antigen-spezifische Signal über den MHC/Peptid-Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und das kostimulatorische Signal, angewiesen ist und naive AML-Blasten in der Regel nicht die benötigten kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, werden in vivo Leukämie-reaktive T-Lymphozyten nicht effektiv aktiviert. Daraus leitete sich das therapeutische Konzept ab, AML-Blasten so zu verändern, daß sie die Funktion von APC übernehmen und die fehlenden kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, um dann in der Lage zu sein, T-Lymphozyten ausreichend zu stimulieren.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, AML-spezifische CTL zu generieren und zu überprüfen, ob eine adoptive Immuntherapie mit Leukämie-spezifischen CTL bei AML-Patienten erfolgsversprechend sein könnte. Einige Studien wiesen bereits darauf hin, daß AML-Blasten durch Zytokine in dendritische Zellen (DC) differenziert werden können, und daß diese "leukämischen" DC die Fähigkeit besitzen, CTL in vitro zu stimulieren. Im Gegensatz zu den Studien, welche GM-CSF, IL-4, TNF- α , IL-6, SCF und löslichen CD40-Liganden zur Differenzierung benutzten, sollte im Rahmen des ersten Teils meiner Doktorarbeit überprüft werden, ob es möglich ist, aus AML-Blasten mittels der Zytokinkombination GM-CSF, IL-4, TNF- α und FLT-3-Ligand DC in vitro zu generieren und ob diese DC dann in der Lage sind, Leukämie-spezifische CTL in vitro zu stimulieren. Zudem sollte durch die Detektion von Gen-Umlagerungen in den generierten DC nachgewiesen werden, daß sie leukämischen Ursprungs sind. Der hämatopoetische Wachstumsfaktor FLT-3-Ligand wurde aus zweierlei Gründen gewählt.

Es war bekannt, daß unabhängig von der FAB-Klassifikation die meisten AML-Blasten FLT-3-Ligand positiv sind und Wachstumstests zeigten, daß FLT-3-Ligand die Kapazität besitzt, AML-Blasten in den meisten Fällen zur Proliferation anzuregen. Außerdem soll FLT-3-Ligand die Generierung von DC mit GM-CSF und TNF- α aus CD34⁺ Zellen in vitro verstärken. Zieht man in Betracht, daß die meisten AML-Blasten CD34⁺ sind, konnte man davon ausgehen, daß man mit FLT-3-Ligand in Kultur signifikant mehr DC in vitro differenzieren könnte als in den Kulturen ohne FLT-3-Ligand und somit die Möglichkeit genutzt werden könnte, größere Mengen an CTL in möglichst kurzer Zeit zu gewinnen.

Eine alternative Methode zur Generierung von Tumor-spezifischen CTL wurde u.a. für Brust- und Eierstockkrebs beschrieben. Hierbei handelt es sich um die Herstellung von Fusionszellen aus Tumorzellen und DC. Es wurde untersucht, ob Fusionszellen, hergestellt aus allogenen DC und AML-Blasten mittels PEG, in der Lage sind, eine Leukämie-reaktive T-Zell-Antwort in vitro zu induzieren.

Damit adoptive immuntherapeutische Maßnahmen mittels Leukämie-spezifischen CTL oder Fusionszellen als Vakzine in vivo bei AML-Patienten zum Einsatz kommen können, ist es wichtig festzustellen, ob die T-Lymphozyten der Patienten noch aktivierbar sind, da die Konfrontation der T-Lymphozyten mit den AML-Blasten ohne Kostimulation zu einer irreversiblen Anergisierung der Patienten-T-Lymphozyten geführt haben könnte. Der zweiten Teil der Doktorarbeit beschäftigte sich daher mit der Fragestellung, ob T-Lymphozyten von AML-Patienten noch funktionell kompetent sind. Hierzu wurde die TCR-zeta-Kette in PBL untersucht, um zu überprüfen, ob ein möglicher T-Lymphozyten-Aktivierungsdefekt vorliegt. Zudem wurde analysiert, ob die Expression von CD28 auf T-Lymphozyten bei AML-Patienten vermindert ist und welche Bedeutung eine Verminderung der CD28-Expression auf CD8⁺ T-Zellen haben könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In der folgenden Liste sind die bei dieser Arbeit regelmäßig verwendeten größeren Geräte aufgeführt.

<u>Geräte</u>	<u>Herstellerfirmen</u>
Brutschrank: BB16	Heraeus Instruments, Hanau
Cäsium-Bestrahlungsanlage: Gammacell 40, bilaterales Cäsium 137	Atomic Energy of Canada Limited, Kanada
β-Counter: Microplate scintillation counter	Packard, Meriden, CT, USA
Cytospinanlage: Cytospin 3	Shandon, Pittsburgh, PA, USA
Durchflußzytometer: FACS Calibur und CellQuest Software	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
ELISA-Reader: SLT SPECTRA, Software Easy Fit	SLT, Crailsheim
Kamera: Wild MPS52	Leica, Bensheim
Magnetic cell sorting (MACS): Separator Vario MACS Separationssäule Typ BS positive Selektionssäulen LS+/VS+ (plus VS+ Adaptor)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrokope: Aristoplan Telaval 31	Leica, Bensheim Carl Zeiss, Göttingen
Sterilbank: HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad: GFL 1002	GFL, Burgwedel
Zellerntegerät: Filter Mate TM Cell Harvester	Canberra, CT, USA
Zentrifugen: Labofuge 400 Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien

2.1.2.1 Zellkulturmedien und Einfrierlösung

Komplettes Zellkulturmedium mit FCS	RPMI-1640 ohne L-Glutamin, mit 2,0 g/L NaHCO ₃ (Biochrom, Berlin) 10% hitzeinaktiviertes FCS 100 IU/ml und 100µg/ml Penicillin/ Streptomycin 2 mM L-Glutamin alle Medienzusätze waren hergestellt von GIBCO-BRL, Gaitersburg, MD, USA
Serumfreies Kulturmedium	X-vivo-15 (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA) 2 mM L-Glutamin (GIBCO-BRL, Gaitersburg, MD, USA) 100 IU/ml and 100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin (GIBCO-BRL, Gaitersburg, MD, USA)
MACS-Separations-Medium	PBS (Biochrom, Berlin) 0,5% Rinder-Serum-Albumin (GIBCO-BRL, Gaitersburg, MD, USA) 2 mM EDTA (Merck, Darmstadt)
Einfrierlösung	10% DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA) 90% FCS (GIBCO-BRL, Gaitersburg, MD, USA)

2.1.2.2 Zellkulturzusätze

ConA	Concanavalin A (Sigma, Deisenhofen)
2-ME	2-Merkaptoethanol (GIBCO-BRL, Gaitersburg, MD, USA)
FLT-3-Ligand	(PeproTech EC, London, England)
GM-CSF	(Essex Pharma, München)
IL-4	(Promocell Bioscience, Heidelberg)
TNF-alpha	(R&D Systems, Wiesbaden)
IL-2	(Chiron Therapeutics, Emeryville, CA, USA)

2.1.2.3 Reagenzien

PBS	Phosphatpuffer (Biochrom, Berlin)
Ficoll-Hypaque	d=1,077 g/ml (Seromed-Biochrom, Berlin)
Heparin	25000IE (B. Braun, Melsungen)
Trypanblau	0,4% (Sigma, St. Louis, MO, USA)
FITC-konjugiertes Dextran	mw 70000 (Sigma, Deisenhofen)
³ H-Thymidin	(Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)
Cr-51 (Chrom)	NaCr-51, 185 mBq (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)
Triton X-100	2% (Sigma, Deisenhofen)
May-Grünwald	(Merck, Darmstadt)
Giemsa	(Merck, Darmstadt)
HEPES	(Seromed-Biochrom, Berlin)
Saponin	(Riedel-de Haen, Seelze)
PEG	Polyethylenglykol (Sigma, Deisenhofen)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Antikörper für die Durchflußzytometrie

FITC oder PE markierte Antikörper:

CD3, CD4, CD8, CD56, CD1a,

CD40, CD80, CD8, HLA-ABC (Pharmlingen, San Diego, CA, USA)

CD33, CD117, CD34, CD14,

HLA-DR, CD28, CD25 und

Isotypenkontrolle (Dako Diagnostika, Hamburg)

CD83, CD16, CD69, CD27,

CD19, CD45 RO und CD45 RA (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich)

TCR-zeta (Serotech, Oxford, England)

2.1.3.2 Antikörper für die Selektion von Zellen

Pan T cell, CD8, CD83, Anti-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

2.1.3.3 Antikörper für die T-Lymphozyten-Aktivierung

CD3 und CD28 unkonjugiert (Diaclone, Besancon, Frankreich)

2.1.3.4 Antikörper zur Untersuchung der MHC-restringierten Lyse

HLA-ABC W6/32 und

HLA-DR, DP und DQ CR3/43 (Dako Diagnostika, Hamburg)

2.1.4 Zellmaterial

Für die Generierung von DC bzw. Fusionszellen *in vitro* sowie für die T-Zellexperimente wurde 20-50 ml Heparin-Blut von AML-Patienten bzw. deren HLA-identischen Spendern (KMT-Einheit von Prof. Kolb, Klinikum Großhadern) sowie von gesunden Normalprobanden verwendet, welche in der Regel HLA-nicht identisch waren (Buffy-Coats, Rotes Kreuz). Die periphere Blutentnahme bei den AML-Patienten erfolgte zum Zeitpunkt der Diagnose oder beim wiederholten Auftreten der Krankheit. Pro 10 ml peripherem Blut wurden 0,1 ml (500 IE) Heparin vorgelegt. Die PBMNC der Proben wurden über eine Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert und entweder sofort in Experimenten verarbeitet oder eingefroren.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes können aufgrund ihrer Dichte von den anderen Bestandteilen des Blutes getrennt werden. Sie wurden unter anderem zur Generierung von DC verwendet.

Heparinisiertes Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und jeweils 25 ml dieses Blutes vorsichtig über 15 ml Ficoll-Hypaque in 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation (bei 2200 rpm für 25 Minuten ohne Bremse) wurden die mononukleären Zellen aus der Interphase zwischen dem Ficoll und dem Plasma mit einer Pasteurpipette abgezogen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS, bei 1500 rpm für jeweils 5 Minuten, wurden die Zellen anschließend in komplettem RPMI-Medium aufgenommen und ausgezählt.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Ermittlung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden diese mit Trypanblau (nur tote Zellen nehmen den Farbstoff auf) verdünnt. 10 µl aus der Zellsuspension wurde mit 90 µl Trypanblau (1:10) in einem Eppendorfgefäß vereinigt und davon 10 µl in einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Durch ein Invertmikroskop wurden die ungefärbten Zellen in den vier Feldern der Kammer gezählt und der Durchschnittswert ermittelt. Dieser, multipliziert mit dem Kammer- und Verdünnungsfaktor, ergab wiederum die Zellkonzentration pro ml.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

2.2.3.1 Einfrieren

Isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden in Konzentrationen von $1 \times 10^7/\text{ml}$ bis $2 \times 10^7/\text{ml}$ in einem Volumen von 1 ml eingefroren. Hierzu wurden die Zellen mit komplettem Medium auf die entsprechende Zellzahl eingestellt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet auf Eis gelegt. Die zuvor auf Eis gekühlte Einfrierlösung wurde nun langsam mit den Zellen versetzt. Anschließend wurden jeweils 1 ml Aliquots in 1,8 ml vorgekühlte Gefrier Röhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) gefüllt und diese wurden dann über Nacht bei -80°C in Einfrierboxen plaziert. Sie gewährleisteten das kontrollierte Einfrieren. Am nächsten Tag wurden die Gefrier Röhrchen in flüssigen Stickstoff transferriert.

2.2.3.2 Auftauen

Die Gefrier Röhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, in einem 37°C Wasserbad fast vollständig aufgetaut, und der Inhalt der Röhrchen sofort in ein 15 ml Röhrchen (Falcon, Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) überführt. Tropfenweise wurden dann 9 ml komplettes Kulturmedium mit FCS unter ständigem Resuspendieren auf die Gefriersuspension gegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und die Zellzahl ermittelt.

2.2.4 Differenzierung von DC in vitro

2.2.4.1 Kultivierung von DC aus Patienten-peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMNC)

Aufgetaute PBMNC oder mittels Ficollgradienten frisch isolierte PBMNC von AML-Patienten wurden zu je $2,5 \times 10^6$ Zellen/Loch in 24 Lochplatten (Peske, Aindling-Pichl) in 2 ml komplettem Zellkulturmedium mit FCS eingesät. Eine monozytäre Zellanreicherung (Plastikadhärenz) war nicht essentiell, da die DC aus den $\text{CD}14^+$ und $\text{CD}34^+$ Zellen (sie stellen meist eine dominante Zellpopulation in den PBMNC der Patienten dar) generiert wurden. Zur Stimulation der Zellen wurden dem Medium jeweils folgende Zytokinkombinationen zugesetzt:

rhGM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml), TNF- α (200 U/ml) und FLT-3-Ligand (200 U/ml) oder
rhGM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml) und TNF- α (200 U/ml).

Alle vier Tage wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig entfernt und frisches mit den entsprechenden Zytokinkombinationen hinzugefügt. Nach 13-14 Tagen konnten die reifen, generierten DC für nachfolgende Experimente geerntet werden.

2.2.4.2 Kultivierung von DC aus gesunden Spender-PBMNC

DC wurden aus der monozytären Zellfraktion von gesunden Spendern generiert. Diese Spender waren entweder HLA-identisch oder in 2 von 6 HLA-Merkmalen bzw. in 3 von 6 HLA-Merkmalen unterschiedlich zu den Gewebemerkmale des Patienten. Zugrunde gelegt wurden dabei die Hauptantigene der HLA-loci -A, -B und -DR. Die PBMNC der Spender wurden wie unter 2.2.1 beschrieben über einen Ficoll-Dichtegradienten isoliert und 5×10^6 Zellen pro Loch in eine 24-Lochplatte (Peske, Aindling-Pichl) mit RPMI-1640 Medium für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit adhärten die Monozyten an die Plastikoberfläche der Zellkulturplatte. Die nicht-adhären Zellen wurden entfernt und die verbleibende Zellfraktion in Serum-freiem Medium, welches rhGM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) enthielt, für sieben Tage kultiviert. Am Tag vier wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig entfernt und neues mit den entsprechenden Zytokinen hinzugefügt. Nach sieben Tagen in Kultur wurden die semi-adhären APC geerntet und in anschließenden Fusionsexperimenten verwendet.

2.2.5 Quantifizierung der dendritischen Zellausbeute

Nach 14 Tagen in Kultur wurde die Gesamtanzahl an DC, die mit den verschiedenen Zytokinkombinationen ausdifferenziert wurden (siehe 2.2.4.1), bestimmt. Von 11 AML-Patienten wurden pro Patient 10 Löcher, jeweils 5 Löcher einer 24-Loch-Platte mit FLT-3-Ligand generierten DC sowie 5 Löcher ohne FLT-3-Ligand differenzierten DC, zur Bewertung herangezogen. Hierzu wurden die generierten DC mit Hilfe eines Lichtmikroskops in einer Neubauer-Zählkammer, wie unter 2.2.2 erläutert, gezählt. Nur die Zellen mit typischer DC-Morphologie, große Zellen mit lobulären Kernen und feinen zytoplasmatischen Ausläufern, wurden als positiv gewertet. Zum anderen wurde die Gesamtprozentzahl an DC im Durchflußzytometer ermittelt. Eingegrenzt wurde die DC-Zellpopulation, definiert über die charakteristischen FSC und SSC im Durchflußzytometer sowie die Expression von CD86, CD80 und CD1a. Die Ausbeute an Zellen kultiviert mit FLT-3-Ligand und ohne FLT-3-Ligand wurde miteinander verglichen.

2.2.6 Morphologische Untersuchung von Zellen

Zytospinpräparationen wurden von frisch isolierten PBMNC und von DC, differenziert für 14 Tage mit GM-CSF, IL-4, TNF- α und FLT-3-Ligand, von AML-Patienten angefertigt. Jeweils 1×10^4 Zellen in einem Endvolumen von 150 μ l, verdünnt mit PBS, wurden für 3 Minuten bei 300 rpm durch eine Zytospinzentrifuge auf einen Objektträger (Cytospin 2, Shandon, Pittsburgh, PA, USA) sedimentiert. Der Objektträger wurde an der Luft getrocknet und 10 Minuten in Methanol fixiert. Die Färbung der Zytospinpräparationen erfolgte nach Pappenheim (Zeile et al., 1983). Hierzu wurden die Objektträger in Färbeküvetten für 3 Minuten in unverdünnter May-Grünwald-Lösung inkubiert, anschließend 5 Minuten in H₂O dest. gespült und 15-20 Minuten in Giemsalösung (1:20 verdünnt) gefärbt. Nach zweimaligem Waschen für 10 Minuten mit H₂O dest. wurden die luftgetrockneten Zellpräparate unter einem Phasenkontrast-Mikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung photographiert.

2.2.7 Phänotypische Analyse von Zellen

Wir untersuchten von AML-Patienten die Oberflächenantigene auf frisch aufgetauten PBMNC und auf DC, die aus AML-Blasten durch 14-tägige Kultur mit den entsprechenden Zytokinen ausdifferenziert wurden, mittels Durchflußzytometrie. Die Zellen wurden hierzu durch eine vibrierende Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen in der Durchflußzytometrie die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärts-Lichtstreuung korreliert mit der Größe der Zellen, die seitliche Lichtstreuung mit der Granularität bzw. dem Plasma/Kern-Verhältnis der Zellen. Durch die Fluoreszenz-Intensität, verursacht durch die Bindung monoklonaler fluoreszenzgekoppelter Antikörper an die Zelle, kann die Anzahl der vorhandenen Oberflächen-Bindungsstellen bzw. die Zugehörigkeit einer Zelle zu einer Zellpopulation bestimmt werden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden jeweils zwei Antikörper eingesetzt, die gegen unterschiedliche Antigene gerichtet und mit verschiedenen Farbstoffen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) konjugiert waren. Zur Erfassung von unspezifischen Bindungen diente die Isotypenkontrolle.

Zu Beginn wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer (1% FCS in PBS) gewaschen und zu 100 µl Zellsuspension, 1×10^6 Zellen je FACS-Röhrchen (Peske, Aindling-Pichl), wurde je Ansatz 2-3 µl mAK zugegeben. Nach kurzer Durchmischung erfolgte die Inkubation der Ansätze für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt und die Zellen wurden anschließend in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflußzytometer analysiert. Folgende Fluoreszenz-markierte Antikörper wurden zur phänotypischen Analyse der Zellen verwendet: CD83, CD1a, CD40, CD80, CD86, HLA-ABC, HLA-DR, CD34, CD33, CD14, CD3, CD19 und CD56.

2.2.8 Nachweis des leukämischen Klons

2.2.8.1 Anreicherung von CD83 positiven Zellen

Um eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchzuführen, wurden vorab die DC mittels indirekter immunmagnetischer Separation angereichert. Zunächst wurden AML-PBMNC für 14 Tage mit GM-CSF, IL-4, TNF- α und FLT-3-Ligand (wie unter 2.2.4.1. beschrieben) zu DC differenziert und mit einem primären, PE-konjugierten Maus-Anti-Human CD83-Antikörper gefärbt (FACS-Färbung wie unter 2.2.7 beschrieben). Im zweiten Schritt wurden die PE-gefärbten Zellen mit sekundären Anti-PE Microbeads (magnetisierte Partikel) für 15 Minuten bei 12°C indirekt markiert. Über den Separator Vario MACS und die Selektionssäulen LS⁺/VS⁺ wurde die positive Selektion der CD83⁺ Zellen vorgenommen. Die Reinheit der Selektion wurde im Durchflußzytometer überprüft.

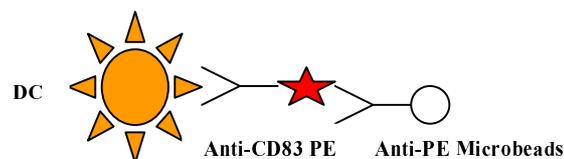


Abbildung 5: Schematische Darstellung der indirekten Markierung der CD83⁺ Zellen

2.2.8.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Um zu bestätigen, daß die in der Gegenwart von FLT-3-Ligand generierten DC auch leukämischen Ursprungs waren und nicht zur normalen Zellpopulation des Patienten gehörten, wurden Patienten ausgewählt, deren leukämische Zellen chromosomale Abnormalitäten aufwiesen, wie die Inversion 16 oder Trisomie 13, die sich im Interphasezellkern durch FISH detektieren ließen.

2.2.9 Herstellung von Fusionszellen in vitro

2.2.9.1 Fusion von DC mit AML-Blasten

Ein Ansatz, um AML-Blasten mit entsprechenden kostimulatorischen Molekülen zu versehen, ist die Fusion von DC mit AML-Blasten. Die fusionierten Zellen können naive und CD8⁺ Gedächtnis-Zellen besonders gut aktivieren, weil sie das Repertoire der Tumorantigene im Kontext mit MHC-I-Molekülen und in Gegenwart der kostimulatorischen Moleküle auf den DC präsentieren. Verwendet man allogene DC zur Fusion mit leukämischen Zellen, so werden zusätzlich zu den anti-leukämischen CD8⁺ T-Zellen über die alloenen MHC-Moleküle auch noch alloreaktive T-Zellen stimuliert.

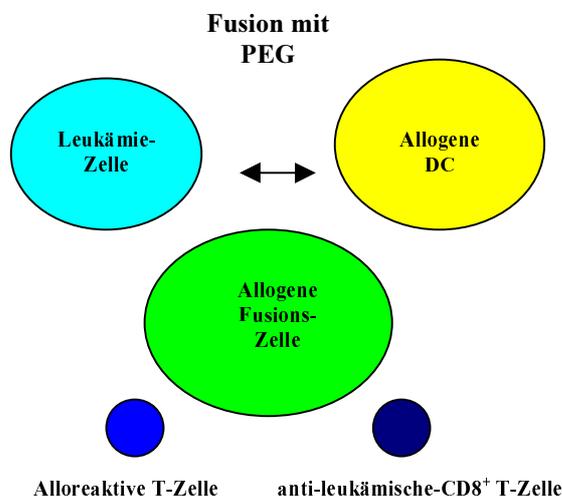


Abbildung 7: Modell zur Erläuterung der Fusion von DC mit Leukämiezellen

DC von gesunden Spendern, generiert wie unter 2.2.4.2 beschrieben, wurden mit AML-Blasten mittels PEG fusioniert. Frisch aufgetaute AML-Zellen und DC wurden zweimal mit 37°C warmem, Serum-freiem Medium gewaschen und gezählt. Jeweils 5×10^5 Spender-DC wurden mit $1,5 \times 10^6$ AML-Blasten in einem 50 ml Röhrchen (Falcon, Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) vereinigt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 2300 rpm abzentrifugiert und anschließend wurde der Rest des Mediums entfernt. Durch leichtes Vortexen wurde das Zellpellet aufgelockert und innerhalb von 2 Minuten unter kreisenden Bewegungen 1 ml 50 % PEG zu den Zellen gegeben. Nachdem 10 ml vorgewärmtes, Serum-freies Medium zur Verdünnung des PEG für 3 Minuten unter Rühren langsam zu den Zellen pipettiert wurde, erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 1150 rpm für 5 Minuten.

Die fusionierten Zellen wurden in komplettem Kulturmedium, welches 10% FCS sowie rhGM-CSF (800 U/ml) und TNF-alpha (200 U/ml) enthielt, in 24 Lochplatten für vier Tage bei 37°C kultiviert. Als Kontrollen wurden außerdem - unter denselben Bedingungen wie oben im Text beschrieben - 5×10^5 Spender-DC mit $1,5 \times 10^6$ AML-Blasten vermischt und in 24-Lochplatten in komplettem Medium für vier Tage bei 37°C kultiviert, ebenso die reinen Spender-DC.

2.2.9.2 Überprüfung der Fusionseffektivität

Um die Fusionseffektivität zu überprüfen, wurden die DC bzw. die AML-Blasten separat mit fluoreszierenden roten/grünen Membranfarbstoffen (PKH26 RED/GREEN FLUORESCENT CELL LINKER KIT, Sigma, Deisenhofen) nach Instruktionen des Herstellers gefärbt. Dazu wurden DC, die sieben Tage in Serum-freien Medium kultiviert wurden (wie unter 2.2.4.2 beschrieben), geerntet und frisch aufgetaute AML-Blasten zweimal mit komplettem RPMI-Medium gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 25°C durchgeführt. Die DC bzw. Blasten wurden mit Serum-freien Medium gewaschen und jeweils mit 2×10^7 Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen (Falcon, Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) vereinigt. Nach der Zentrifugation erfolgte jeweils die Verwerfung des Überstands und 1 ml Verdüner C wurde zu den verbleibenden Pellets, welche zuvor resuspendiert wurden, pipettiert. Gleich danach wurde eine 2-fache Farblösung (4×10^{-6} M) mit den entsprechenden Membranfarbstoffen angefertigt, zu 4 µl Farbstoff wurden 996 µl Verdüner C gegeben. Die 1 ml Farbstofflösungen wurden zügig zu den 1 ml Zellsuspensionen hinzugefügt und unter leichtem Resuspendieren für 2-5 Minuten inkubiert. Um die Reaktionen zu stoppen, wurden je 2 ml FCS für 1 Minute zu den Zellsuspensionen gegeben. Danach wurde die Stopplösung mit 4 ml komplettem Medium verdünnt. Nach erfolgter Zentrifugation der Zellen bei 1150 rpm für 10 Minuten und dreimaligem Waschen der Zellen mit 10 ml komplettem Medium in einem neuen Falconröhrchen konnten die gefärbten Zellen für die Fusion verwendet werden. Die Fusion der Zellen wurde wie unter 2.2.9.1 beschrieben durchgeführt und die Fusionsrate im Durchflußzytometer nach vier Tagen analysiert.

2.2.10 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

2.2.10.1 Allogene MLR

Um die immunstimulatorische Kapazität der in vitro generierten DC zu testen, führten wir sogenannte allogene gemischte Lymphozytenreaktionen (allogene MLR) durch, die auch bei der Spenderauswahl vor Knochenmarkstransplantationen eine Rolle spielen. Dabei wurden allogene T-Lymphozyten als Responderzellen durch zuvor mittels Bestrahlung inaktivierte DC als Stimulatorzellen zur Proliferation angeregt (one-way-reaction). In einem allogenen Ansatz sind nur geringe Mengen an DC erforderlich, damit eine starke T-Lymphozyten-Antwort ausgelöst werden kann.

Die T-Lymphozyten wurden mittels eines "Pan T Cell Isolation Kit" nach den Herstelleranweisungen separiert. Hierbei wurden die CD3-positiven Zellen aus frisch aufgetauten PBMNC durch die magnetische Depletion aller nicht T-Zellen isoliert. PBMNC wurden mit einem Hapten-Antikörper-Cocktail für 10 Minuten bei 6-12°C inkubiert und anschließend erfolgte das zweimalige Waschen der Zellen mit MACS-Puffer. Danach wurden MACS Anti-Hapten Microbeads für 15 Minuten zu den Zellen bei 6-12°C gegeben. Die Zellen wurden erneut gewaschen und auf eine MACS Separationssäule, Typ BS, aufgetragen, die in einem MACS Vario Separator platziert wurde. Die Säule wurde zuvor mit MACS-Puffer equilibriert. Die unmarkierten CD3-Zellen wurden als negative Fraktion gesammelt und ihre Reinheit mit anti-CD3-mAK im FACS analysiert.

Die isolierten allogenen T-Lymphozyten wurden gezählt und in 96-Loch Rundbodenplatten (Peske, Aindling-Pichl) zu jeweils 10^5 Zellen/Loch eingesät. Mit beiden Zytokinkombinationen generierte DC sowie frisch aufgetaute AML-Zellen wurden bestrahlt (3000cGy) und als Triplikate in verschiedenen Zellkonzentrationen (jeweils 200, 1000 und 5000 DC) zu den T-Lymphozyten gegeben. Als Kontrolle dienten Triplikate mit ausschließlich Responderzellen. Das Endvolumen an komplettem Kulturmedium pro Loch betrug 200 µl.

Nach fünf Tagen Ko-Kultivierung wurde die T-Lymphozyten-Proliferationsrate durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen gemessen. Hierzu wurde zu den Zellen pro Loch für 18 Stunden 1mCi radioaktiv markiertes Thymidin gegeben, und diese wurden anschließend mit einem Zellerntegerät (Canberra, CT, USA) aus den Löchern der Kulturplatte herausgespült und auf Uni-Filterplatten (Canberra, CT, USA) übertragen. Die Radioaktivität der Filter wurde in einem Szintillations-Beta-Counter (Packard, Meriden, CT, USA) gemessen und als cpm (counts pro minute) dargestellt.

Die proliferierenden T-Lymphozyten der MLRs wurden phänotypisch durch die mAK gegen CD3, CD4, CD8 und CD56 im Durchflußzytometer analysiert, wie unter 2.2.7 beschrieben.

2.2.10.2 Autologe MLR

Man geht davon aus, daß AML-Blasten genetische Veränderungen tragen, die sie über ihre MHC-I- und MHC-II-Moleküle als Peptide auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, so daß sie für die T-Lymphozyten-Erkennung zur Verfügung stehen. Da die DC aus AML-Blasten generiert wurden, nahmen wir an und zeigten dieses mit FISH, daß auch die DC diese AML-spezifischen Veränderungen beibehalten haben (gezeigt für Inversion 16). Um zu zeigen, ob diese veränderten Selbst-Antigene von T-Lymphozyten erkannt werden, führten wir MLR mit generierten DC und autologen T-Lymphozyten durch.

Sowohl DC aus beiden Zytokingruppen, als auch die frisch aufgetauten AML-Zellen wurden bei 3000 cGy bestrahlt, mit RPMI 1640 Medium gewaschen und zu Triplikaten von jeweils 200, 1000 und 5000 Zellen je Loch in 96-Rundbodenplatten eingesät. Jeweils 10^5 isolierte autologe T-Lymphozyten (Isolierungssystem wie unter 2.2.10.1 beschrieben) wurden pro Loch zu den DC bzw. den undifferenzierten AML-Zellen in 200 μl komplettem Medium gegeben. Als Kontrolle wurden autologe Responderzellen alleine in Triplikaten verwendet. Die Zellen wurden für fünf Tage im Brutschrank kokultiviert. 1mCi ^3H -Thymidin wurden in jedes Loch pipettiert, damit für 18 Stunden die Inkorporation in die proliferierenden Zellen erfolgen konnte. Die Messung des Thymidineinbaus wurde, wie bereits oben (2.2.10.1) beschrieben, durchgeführt.

Auch für die generierten Fusionszellen (siehe 2.2.9.1) wurden autologe MLR durchgeführt. Die fusionierten Zellen, die vermischten Zellen, sowie die Spender DC wurden, wie oben bereits beschrieben, bestrahlt und mit den isolierten autologen T-Lymphozyten (siehe 2.2.10.1) in Triplikaten in 96-Lochplatten mit komplettem Medium für fünf Tage inkubiert. Die Zugabe von ^3H -Thymidin und die Messung des Thymidineinbaus wurde wie unter 2.2.10.1 durchgeführt.

Die proliferierenden T-Lymphozyten der MLR wurden phänotypisch durch die mAK gegen CD3, CD4, CD8 und CD56 im Durchflußzytometer analysiert, wie unter 2.2.7 beschrieben.

2.2.11 Herstellung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) -Linien in vitro

2.2.11.1 Generierung von Leukämie-spezifischen CTL-Linien

Leukämie-spezifische CTL wurden durch die Ko-Kultivierung von autologen PBMNC (Responderzellen) eines AML-Patienten mit den generierten DC (Stimulatorzellen) desselben Patienten aktiviert. 2×10^6 Responderzellen wurden in 24-Lochplatten (Peske, Aindling-Pichl) in 2 ml komplettem Medium mit 5×10^4 Stimulatorzellen gegeben, mit FLT-3-Ligand sowie ohne FLT-3-Ligand generiert und wie unter 2.2.4.1 beschrieben, ko-kultiviert. Die DC wurden zuvor mit 5000 cGy in einer Caesiumanlage bestrahlt. Nach 10 Tagen wurden die Zellen geerntet, gezählt und 1×10^6 pro Loch mit $2,5 \times 10^5$ bestrahlten DC restimuliert. Die Restimulation erfolgte alle sieben Tage. Am Tag 17, und von da an dreimal pro Woche, wurden je Loch 20 U/ml IL-2 zu den Zellen gegeben. Nach 3-4 Wochen in Kultur wurde die antileukämische Aktivität der CTL im Zytotoxizitätstest überprüft.

2.2.11.2 Expansion der T-Lymphozyten von AML-Patienten

PBMNC von AML-Patienten wurden zu 1×10^6 Zellen/ml in 2 ml komplettem Medium, welches 2-Merkaptoethanol in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ beinhaltet, in einer 24-Lochplatte (Peske, Aindling-Pichl) kultiviert. Ins Medium hinzugefügt wurden 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concanavalin A. Nach 72 Stunden in Kultur wurden diese Zellen als autologe, nicht leukämische Zielzellen im Chrom-Freisetzungstest verwendet. Zuvor wurde im Durchflußzytometer die Reinheit der T-Lymphozyten überprüft.

2.2.11.3 Zytotoxizitätstest

Aktiviert CD8⁺ T-Zellen können die Lyse von Zellen bewirken, wenn diese Zellen einen spezifischen Komplex aus Peptid/MHC-Klasse-I-Molekülen exprimieren. Dieser Umstand wird im klassischen Chrom-Freisetzungstest, bei dem die Aktivität von CD8⁺ T-Zellen überprüft wird, genutzt. Bei diesem Test werden Zielzellen mit radioaktivem Na₂⁵¹CrO₄ versetzt, welches an intrazytoplasmatische Proteine bindet. Nur ein sehr geringer Teil des Chroms wird von den Zellen spontan wieder ausgeschieden. Durch die Zugabe in verschiedenen Konzentrationen von Effektorzellen zu den markierten Zielzellen werden diese lysiert, wenn sie den richtigen MHC/Peptid-Komplex exprimieren. Das freigesetzte radioaktive Chrom kann im Überstand gemessen werden.

Im Standard-Chromfreisetzungstest wurde die Zytotoxizität jeder generierten CTL-Linie bei den Effektor- zu Zielzellverhältnissen von 40:1, 20:1, 10:1 und 5:1 analysiert. Die Effektorzellen wurden mit AML-Blasten (vom Zeitpunkt der Diagnose), Patienten T-Zellen (nicht leukämischen Ursprungs), HLA-nicht identischen Spender-PBMNC und der T-Zell-Linie HSB-2 (sensitiv für durch Lymphokine aktivierte Killerzellen), als Zielzellen zu jeweils Triplikaten in 96-Spitzbodenplatten (Peske, Aindling-Pichl) mit komplettem Medium für vier Stunden bei 37°C kultiviert.

Die spezifische Chromfreisetzung, gemessen in einem Gamma-Counter (Packard, Meriden, CT, USA), errechnete sich nach folgender Formel:

$$\% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm experimentell} - \text{cpm spontan}}{\text{cpm maximal} - \text{cpm spontan}} \times 100$$

Die spezifische experimentelle Chromfreisetzung in counts per minute (cpm) repräsentiert die Inkubation der Zielzellen mit den Effektorzellen. Die spontane Chromfreisetzung ergab sich durch die Kultivierung der Zielzellen nur mit Medium und die maximale Chromfreisetzung wurde ermittelt, indem alle Zielzellen mit 2% Triton X-100 lysiert wurden.

2.2.11.4 Antikörperblockierung

Es wurde untersucht, ob HLA-Klasse-I- oder HLA-Klasse-II-Moleküle an der Lyse der Zielzellen beteiligt waren. Die Zielzellen wurden für 30 Minuten mit 20 µg/ml W6/32 und CR3/43 (mAK, die HLA-Klasse-I bzw. HLA-DR, -DP, -DQ erkennen) inkubiert, um das HLA-Klasse-I bzw. HLA-Klasse-II restringierte Abtöten der Zielzellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Zugabe der Effektorzellen zu den Zielzellen.

2.2.11.5 Immunphänotypisierung von generierten CTL

Um die in vitro generierten CTL phänotypisch zu analysieren, wurden diese, wie unter 2.2.7 beschrieben, mit einer Kombination aus FITC- und PE-markierten mAK wie CD3, CD4, CD8, CD56, CD16 und CD19 gefärbt. Die Analyse der Zellen wurde im Durchflußzytometer durchgeführt.

2.2.12 Vergleichende Untersuchungen von peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) bei AML-Patienten und gesunden Spendern

2.2.12.1 Phänotypische Analyse der T-Lymphozyten

Analysiert wurde die Expression von CD28 auf T-Lymphozyten, das mit den kostimulatorischen Molekülen auf den APC interagiert und so zum zweiten T-Zell-Aktivierungssignal beiträgt. Untersucht wurden CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von AML-Patienten und von gesunden Spendern im Durchflußzytometer (wie unter 2.2.7 beschrieben). Die Zellen wurden jeweils mit zwei Antikörpern gefärbt.

Weiterhin wurden die Aktivierungs- bzw. Effektorfunktions-assoziierte Moleküle auf CD8⁺ Zellen von gesunden Spendern und Patienten (wie unter 2.2.7 beschrieben) untersucht. Auch hierbei wurden die Zellen mit jeweils zwei Antikörpern gefärbt, z.B. mit dem T-Lymphozytenmarker CD3 und mit anti-CD69, anti-CD25, anti-CD27 und anti-CD45RA/RO.

Die phänotypischen Untersuchungen fanden vor und nach der α CD3/ α CD28-Stimulation (wie unter 2.2.12.3.1 beschrieben) der isolierten CD8⁺ T-Zellen (Isolierung 2.2.12.3.1) und PBMNC statt.

2.2.12.2 Intrazelluläre Färbung der T-Zell-Rezeptor (TCR) -assoziierten zeta-Kette in PBL

Die prozentuale Verteilung von TCR-zeta-Ketten exprimierenden Zellen in PBMNC von AML-Patienten und gesunden Spendern wurde durch die Kombination von zwei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen: mit jeweils einem der Zellmarker CD3, CD4, CD8 oder CD56 und dem Antikörper, welcher die intrazelluläre Komponente der TCR-zeta-Kette erkennt. Da das Epitop für den AK gegen die TCR-zeta-Kette intrazellulär liegt, mußten die Zellen permeabilisiert werden. Dazu wurden zwei Arbeitslösungen hergestellt.

Lösung 1: 0,24 g HEPES in 96 ml PBS und 4 ml humanem AB-Serum gelöst.

Lösung 2: 0,05 g Saponin wurden in 50 ml Lösung 1 resuspendiert.

PBMNC, 1×10^6 pro FACS-Röhrchen, wurden mit Lösung 2 bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die Saponinlösung bewirkte die Permeabilisierung der Zellen. Die Zellen wurden gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert. 5 μ l des FITC-konjugierten Maus-anti-human TCR-zeta-Antikörpers oder des FITC-konjugierten Isotypkontroll-AK wurden zu den permeabilisierten Zellen pipettiert und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und mit Lösung 1 für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit einem der PE-konjugierten, anti-humanen Antikörper anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 und anti-CD56 oder der PE-Isotypenkontrolle gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen und im Durchflußzytometer (FACS Calibur/CELLQuest Programm) analysiert.

Die Expression der zeta-Kette, beispielhaft an CD3 gezeigt, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Doppelt CD3}^+ \text{ TCR-zeta}^+ \text{ T-Zellen}}{\text{Gesamtzahl an CD3}^+ \text{ T-Zellen}} \times 100\%$$

2.2.12.3 Untersuchungen zur Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten

2.2.12.3.1 Stimulationsexperimente

T-Lymphozyten werden durch spezifischen Antigenkontakt aktiviert und zur Proliferation angeregt. Erfolgt die Präsentation eines Antigens über den MHC-Komplex an den TCR von naiven T-Lymphozyten in Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen, dann kann dies zur Inaktivierung der T-Lymphozyten führen, zur sogenannten T-Zell-Anergie. Die T-Lymphozyten sind dann nicht mehr in der Lage, auf spezifische Antigene zu reagieren. Zur Überprüfung der CD8⁺ T-Zell-Funktion in vitro wurde die Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten überprüft. Antikörper, z.B. gegen den CD3-Komplex des T-Zell-Rezeptors, können eine Stimulation der CD3-Moleküle bewirken und so die physiologische Bindung eines Antigens imitieren.

96-Lochplatten (Flachboden, Peske, Aindling-Pichl) wurden mit 10 µg/ml unkonjugiertem anti-CD3-Antikörper oder 10 µg/ml anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern oder 10 µg/ml anti-CD28-Antikörper für 2 Stunden bei 37°C beschichtet. Die Beschichtung mit mAK erfolgte in einem Volumen von 100 µl PBS pro Loch. Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Platten wurden bei 37°C für 20 Minuten mit RPMI-Medium, welches 10% FCS beinhaltet, gewaschen. Zum Schluß wurde die Lösung dekantiert und die Platten bei Raumtemperatur erneut mit RPMI-Medium und 10% FCS inkubiert.

Jeweils 1×10^5 isolierte CD8⁺ T-Zellen aus PBMNC von AML-Patienten bzw. von gesunden Spendern (die negative MACS-Isolierung erfolgte wie unter 2.2.10.1 für die Pan-T-Zellen beschrieben mit einem "CD8⁺ T Cell Isolation Kit" (die Reinheit der gesammelten negativen Fraktionen wurden zuvor mit anti-CD8-mAK im FACS analysiert)), wurden je Loch in die mit Antikörpern beschichteten 96-Lochplatten pipettiert. Es wurden jeweils Triplikate eingesetzt. Das Endvolumen an komplettem Kulturmedium pro Loch betrug 200 µl. Außerdem wurden Triplikate mit isolierten CD8⁺ T-Zellen in Löchern ohne beschichtete Antikörper gegeben. Nach drei Tagen Stimulation wurde die T-Lymphozyten-Proliferationsrate durch den Einbau von ³H-Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen gemessen (wie unter 2.2.10.1 beschrieben).

2.2.12.4 Untersuchungen zum zytotoxischen Effektorstatus der T-Lymphozyten

Um die zytotoxische Kapazität der CD8⁺ T-Zellen von Patienten mit denen von gesunden Spendern zu vergleichen, wurden Chromfreisetzungstests durchgeführt. Isolierte zytotoxische T-Lymphozyten, aber auch PBMNC, wurden, wie unter 2.2.12.3.1 dargestellt, durch Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern aktiviert und für vier Tage in komplettem Medium mit 40 U/ml IL-2 ruhen gelassen. Unter den selben Bedingungen wurden isolierte T-Lymphozyten bzw. PBMNC ohne Stimulation kultiviert. Alle zwei Tage wurde frisches IL-2 zu den Zellen pipettiert. Am fünften Tag wurde der Standard-Chromfreisetzungstest, wie unter 2.2.11.3 beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurden als Effektorzellen isolierte, autologe CD8⁺ T-Zellen und autologe PBMNC mit/ohne α CD3/ α CD28-Stimulation von AML-Patienten sowie von gesunden Spendern verwendet. Als Zielzellen dienten autologe PBMNC bzw. Blasten, K562-Zellen (sensitiv gegenüber NK/LAK-Lyse) und MT301-Zellen, welche eine "redirected lysis" bewirken. Der CD3-Komplex auf den CTL reagiert hierbei mit dem membranständigen CD3-Immunglobulin auf den MT301-Zellen. Dabei wird die Zytotoxizität der CTL induziert, ohne den TCR direkt zu involvieren.

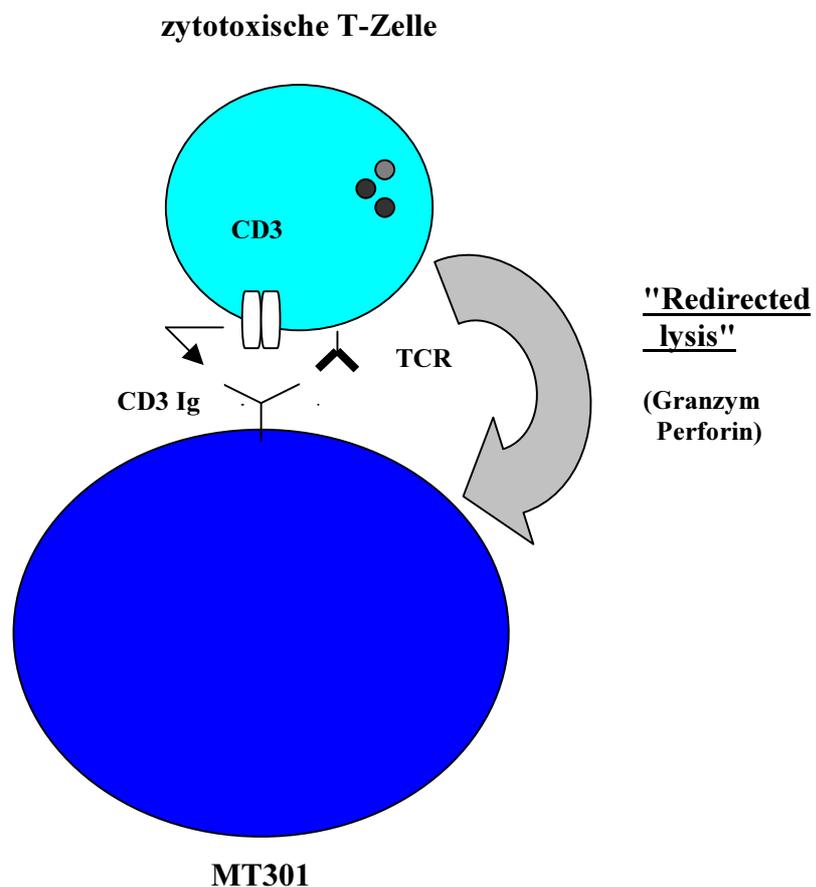


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Induktion des zytolytischen Mechanismus von CTL

2.2.12.5 Zytokinuntersuchungen mittels ELISA

Als Parameter für die T-Lymphozyten-Aktivierung wurden die Zytokine IFN- γ und IL-4 sowie IL-10 von CD8⁺ T-Zellen von AML-Patienten bzw. von gesunden Spendern gemessen. Hierzu wurden 1×10^4 Effektorzellen mit $1,5 \times 10^4$ Zielzellen in 96-Rundbodenplatten (Peske, Aindling-Pichl) vereinigt. Als Effektorzellen wurden isolierte autologe CD8⁺ T-Zellen und autologe PBMNC mit/ohne Stimulation von AML-Patienten sowie von gesunden Spendern verwendet. Die Aktivierung erfolgte mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern wie unter 2.2.12.3.1 beschrieben. Danach wurden die Zellen für fünf Tage in komplettem Medium mit 40 U/ml IL-2 ruhen gelassen. Alle zwei Tage wurde erneut frisches IL-2 zu den Zellen pipettiert. Als Zielzellen dienten autologe PBMNC bzw. AML-Blasten, K562-Zellen und MT301-Zellen.

Am sechsten Tag wurden folgende Ansätze in Triplikaten in die 96-Lochplatten mit komplettem Medium, welches 20 U/ml IL-2 beinhaltet, gegeben:

- Effektoren ohne Stimulantien
- α CD3/ α CD28-stimulierte CD8⁺ T-Zellen mit den entsprechenden Zielzellen
- α CD3/ α CD28-stimulierte PBMNC mit den entsprechenden Zielzellen
- CD8⁺ T-Zellen mit den entsprechenden Zielzellen
- PBMNC mit den entsprechenden Zielzellen
- Zielzellen ohne Effektoren

Die Ansätze wurden jeweils mit AML-Zellen und gesunden Spenderzellen durchgeführt.

Nach 48 Stunden wurde der Überstand geerntet und in einem Sandwich-Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) (Cytimmune, Maryland, USA) nach den Hersteller-Instruktionen ausgewertet. Die Mikrotiterplatten waren mit Maus-mAK, die das gewünschte Zytokin detektieren, beschichtet. Zu den Platten wurden die zu untersuchenden Proben bzw. der Zytokinstandard pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Kaninchen-anti-human polyklonalen AK, der gegen das entsprechende Zytokin gerichtet war. Die Menge des gebundenen Zytokins wurde durch die Zugabe eines enzymmarkierten (Alkalische Phosphatase) Zweitantikörpers (Ziege-anti-Kaninchen), der an den Kaninchen anti-human polyklonalen AK bindet, mit Hilfe einer Substratlösung ermittelt.

Das Substrat wurde hierbei durch das Enzym in der Anwesenheit von H_2O_2 zu einem photometrisch zu messenden Farbstoff reduziert. Die Farbreaktion wurde abgestoppt und anhand des mitgeführten Standards konnte dann, nach Erstellung einer Eichkurve, die Farbreaktion direkt mit der Antikörperkonzentration korreliert werden.

Der IFN- γ ELISA wurde nach dem gleichen Prinzip mit dem Opteia Human IFN- γ Set (Pharmingen, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Nur mußten hierbei zuvor die Mikrotiterplatten mit den entsprechenden Antikörpern über Nacht beschichtet werden.

2.2.13 Statistische Auswertung

Bei den Balkendiagrammen wurden jeweils die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen ermittelt. Die waagerechten Balken bei den phänotypischen T-Lymphozyten-Untersuchungen stellen ebenfalls den Mittelwert dar. Die Daten wurden zuvor auf Normalverteilung getestet (Kologoroff-Smirnoff-Test). Um die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Zytokingruppen (+FLT-3-L/-FLT-3-L), als auch zwischen den verschiedenen T-Lymphozyten-Populationen (AML-Patient/gesunder Spender) zu erfassen, wurde bei normal verteilten Daten der Student's t-Test, bei nicht normal verteilten Daten der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Unterschiede zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen wurden bei einem $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet, ein $p < 0,001$ weist auf einen hoch signifikanten Unterschied hin. Nicht signifikant sind Unterschiede bei einem $p > 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelle Untersuchungen

3.1.1 Generierung von DC aus AML-Blasten in vitro

Zur Differenzierung von DC wurden in der Mehrzahl frisch aufgetaute PBMNC von 22 AML-Patienten eingesetzt.

Tabelle 3: Merkmale von AML-Patienten

Patient	FAB-Typ	Chromosomale Veränderungen	% Blasten	Klinischer Status	DC Generation
1	M2	Komplexer Karyotyp	50	2. Rezidiv vor KMT	Nein
2	M4	48XY +8 +21	77	2. Rezidiv vor KMT	Nein
3	M4	Komplexer Karyotyp	90	Rezidiv nach allo. KMT	Nein
4	M2	46XY	80	2. Rezidiv vor KMT	Nein
5	M5	t (10;11)	75	Rezidiv nach KMT	Nein
6	M4	Trisomie 8	30	Rezidiv, Chemo	Ja
7	M1	46XY	85	Rezidiv nach KMT	Ja
8	M5	46XX	75	Refraktär	Ja
9	M2	46XX	83	Refraktär	Ja
10	sAML	Monosomie 7 & 14,5q-	30	Refraktär vor KMT	Ja
11	M5b	46XX	84	Rezidiv vor KMT	Ja
12	sAML	Komplexer Karyotyp	60	2. Rezidiv, Chemo	Ja
13	M5	46XX	50	Rezidiv	Ja
14	sAML	Komplexer Karyotyp	25	Neu diagnostiziert, unbehandelt	Ja
15	M4	Inv. 16	10	2. Rezidiv vor KMT	Ja
16	sAML	5q-, 7q-, 8+	47	Refraktär vor KMT	Ja
17	M2	Trisomie 13	80	Refraktär vor KMT	Ja
18	sAML	Unbekannt	15	Rezidiv, Chemo	Ja
19	sAML	Inv. 16	38	Neu diagnostiziert, unbehandelt	Ja
20	M2	Unbekannt	70	Neu diagnostiziert, unbehandelt	Ja
21	M5	46XY	83	2. Rezidiv nach KMT	Ja
22	M1	46XY	99	Neu diagnostiziert, unbehandelt	Ja

Klinische Charakteristik und Cytogenetik von 22 AML-Patienten, die bei der Generierung von DC verwendet wurden. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurde die Prozentzahl an Blasten durch eine histologische Untersuchung des Knochenmarks ermittelt.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, war die Heterogenität der Patienten hinsichtlich ihrer FAB-Klassifikation, chromosomalen Veränderungen, klinischen Verläufen und Blastenhäufigkeiten (10% - 99% im KM) beträchtlich.

Die Zellen wurden in komplettem Medium jeweils mit

- GM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml), TNF- α (200 U/ml) und FLT-3-Ligand (200 U/ml) oder
- mit GM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml), TNF- α (200 U/ml) kultiviert (2.2.4.1).

Neben den klassischen Zytokinen wählten wir den potenten DC-Wachstumsfaktor FLT-3-Ligand, um aus den CD34⁺ und CD14⁺ Zellen DC zu generieren. Unabhängig von ihrer FAB-Klassifikation sind die meisten AML-Blasten FLT-3-Ligand positiv und Untersuchungen zur Proliferation in vitro haben gezeigt, daß FLT-3-Ligand die Zellen der meisten AML-Probanden zur Proliferation anregt. Ein weiterer Grund ist die synergistische Wirkung von FLT-3-Ligand mit GM-CSF und TNF- α , die zu einer erhöhten absoluten Anzahl an DC, generiert aus CD34⁺ Zellen, führte (Abbildung 9).

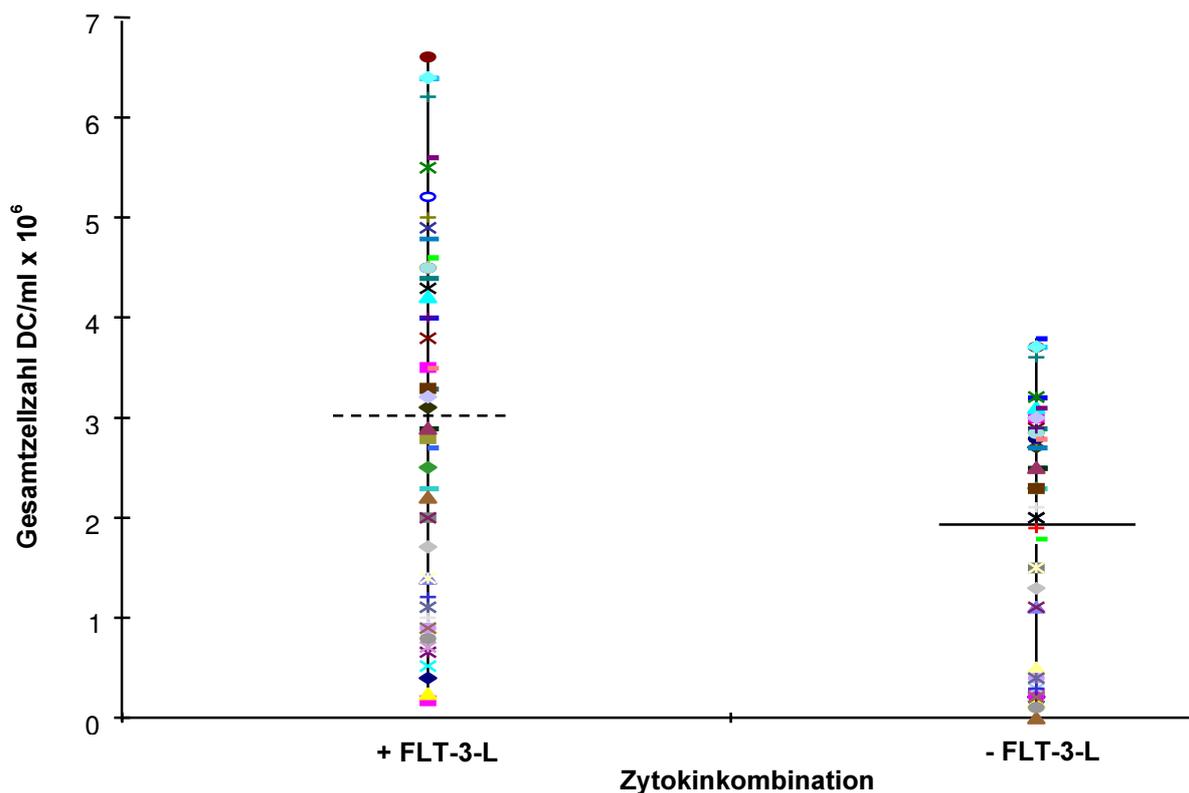


Abbildung 9: Die Gesamtzellzahl an DC, kultiviert mit FLT-3-Ligand (+ FLT-3-L) und in Abwesenheit von FLT-3-Ligand (-FLT-3-L), wurde durch Auszählung im Lichtmikroskop ermittelt (siehe 2.2.5). Von 11 AML-Patienten wurden pro Patient 5 Löcher (einer 24-Lochplatte) mit FLT-3-Ligand generierten DC sowie 5 Löcher mit ohne FLT-3-Ligand differenzierten DC nach 14 Tagen in Kultur analysiert. Die Mittelwerte der maximalen DC-Ausbeute pro Zytokinansatz, dargestellt durch die gestrichelte und die durchgezogene Linie (je nach Kulturbedingung), setzen sich aus jeweils 55 Datenpunkten (5 Auszählungen pro Patient, 11 Patienten) zusammen.

Es zeigte sich, daß bei beiden Kulturbedingungen nach 14 Tagen die durchschnittliche Anzahl an DC, ermittelt über die Auszählung am Lichtmikroskop (Abbildung 9) und die Analyse am Durchflußzytometer, unterschiedlich war.

Die von 11 AML-Patienten durch lichtmikroskopische Auszählung ermittelte Gesamtzahl an Zellen mit typischer DC Morphologie (wie Abbildung 10B zeigt), war in den Kulturen mit dem Zytokin FLT-3-Ligand signifikant höher als in denen ohne FLT-3-Ligand ($p < 0,003$ bei $n = 55$ Datenpunkte pro Zytokinansatz). Allerdings variierte die DC-Ausbeute von Patient zu Patient stark. Mit FLT-3-Ligand in der Zellkultur bewegte sich die Zellausbeute von 0,18 bis $6,6 \times 10^6$ pro ml ($3,05 \pm 1,88 \times 10^6$ /ml). Im Vergleich dazu schwankte die Anzahl an DC in den Kulturen ohne FLT-3-Ligand von 0 bis $3,8 \times 10^6$ pro ml ($1,94 \pm 1,2 \times 10^6$ /ml).

Auswertungen im Durchflußzytometer an 22 Patienten (wie unter 2.2.5 beschrieben) bestätigten die lichtmikroskopischen Auszählungen, wobei die DC-Population über die Expression von CD86, CD80, CD1a und MHC-Klasse-II definiert wurde. In den Kulturen mit FLT-3-Ligand waren signifikant mehr Zellen mit phänotypischen DC-Merkmalen ($39,2 \pm 15,6\%$) vorhanden als in Abwesenheit von FLT-3-Ligand ($30,6 \pm 15,6\%$) ($p < 0,004$, $n = 55$ Datenpunkte von 22 AML-Patienten). Es ergab sich keine Korrelation zwischen der DC-Ausbeute und der Anzahl an AML-Blasten ($CD34^+$) zu Kultivierungsbeginn.

Die Viabilität und Morphologie der differenzierten DC konnte mit den verschiedenen Zytokinkombinationen auch über einen Zeitraum von 21 Tagen aufrechterhalten werden, wenn die Zellen regelmäßig alle 3 bis 4 Tage frisches Medium mit Zytokinen erhielten.

Bei 5 von 22 (22,7%) AML-Patienten war es nicht möglich, aus PBMNC mit den verschiedenen Zytokinkombinationen DC zu generieren. Die Blasten von 3 Patienten starben nach 2-3 Tagen in Zytokinmedium. Zellen von 2 weiteren AML-Patienten überlebten 14 Tage in Kultur. Allerdings glichen sie nicht DC weder phänotypisch noch morphologisch.

Zwei der Patienten, von denen es nicht möglich war, DC zu differenzieren, zeigten die klinischen Merkmale einer M2-Leukämie (akute Myeloblastenleukämie), die anderen drei gehörten der Klassifikation M4 und M5 (akute myelomonozytären/Monoblasten Leukämie) an. Zwei dieser Patienten wiesen komplexe Karyotypen auf. Die Anzahl an Blasten variierte im peripherem Blut von 50 - 90%, und alle fünf Patienten rezidierten nicht zum ersten Mal. Zwei hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine allogene KMT erhalten. Allerdings war es bei anderen Patienten mit ähnlichen FAB-Klassifikationen, chromosomalen Veränderungen, Prozentzahlen an Blasten und klinischen Verläufen möglich, DC zu generieren.

Obwohl nach 10 Tagen in den Kulturen mit FLT-3-Ligand zahlenmäßig deutlich mehr DC vorhanden waren, war morphologisch kein signifikanter Unterschied in den Kulturen mit/ohne FLT-3-Ligand zu erkennen. Beide DC-Gruppen wiesen große Zellen mit lobulären Kernen und feinen cytoplasmatischen Ausläufern auf, wie Abbildung 10B von Patient 17 zeigt. Frisch isolierte AML-Blasten sind in Abbildung 10A vom selben Patienten gezeigt.

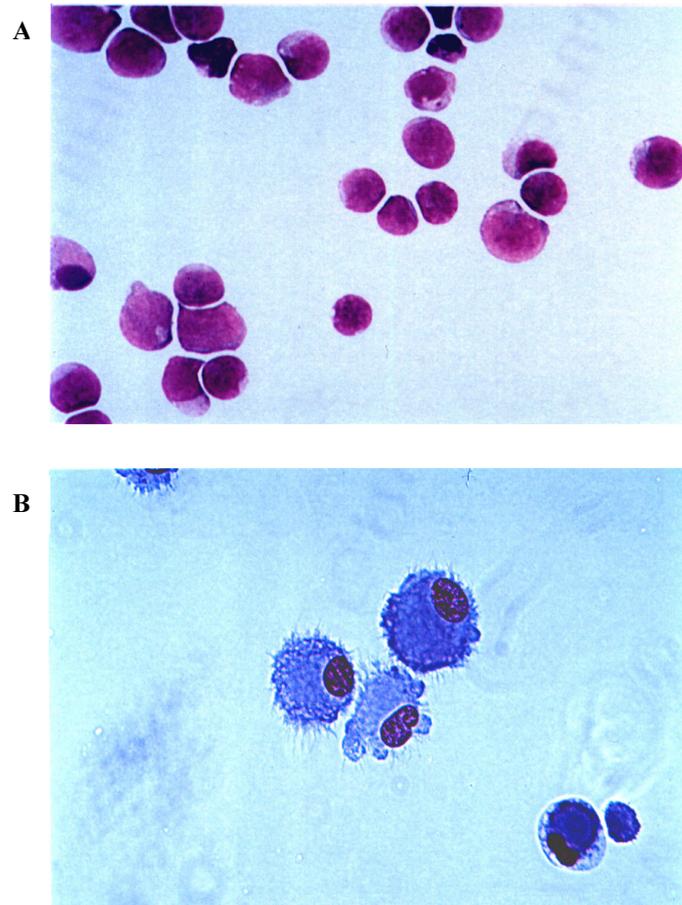


Abbildung 10: Morphologie von frisch isolierten und kultivierten AML-Zellen, gezeigt hier am Beispiel der Zellen des Patienten 17. Bild A zeigt die Morphologie von frisch isolierten AML PBMNC (CD34+ Blasten). In Bild B sieht man die Morphologie der gleichen Zellen nach 14 Tagen Kultur mit den Zytokinen FLT-3-L, GM-CSF, IL-4 und TNF- α . Zytospinpräparationen wurden durchgeführt und die Objektträger mit Giemsa gefärbt (wie unter 2.2.6 beschrieben). Anschließend wurden die Zellen durch ein Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung photographiert.

3.1.2 Phänotypische Analyse von DC

Die AML-Zellpopulation, die als Ausgangsmaterial für die DC-Generierung verwendet wurde, war heterogen und setzte sich aus CD14⁺, CD34⁺, CD33⁺, CD3⁺, CD19⁺ und CD56⁺ Zellen zusammen. In unserem Kultursystem wurden die DC, wie schon erwähnt, aus CD14⁺ (Monozytenmarker) und CD34⁺ (hämatopoetischer Stammzellmarker) Zellen generiert (wie unter 2.2.4.1 beschrieben). Der Effekt der zwei Zytokinkombinationen auf den Phänotyp der sich differenzierenden Zellpopulationen wurde nach 14 Tagen durch FACS-Analysen mit den mAK CD34, CD40, CD80, CD86 und HLA-ABC, HLA-DR und CD1a bestimmt.

Zusätzlich wurden frisch aufgetaute AML-Blasten (Ausgangspopulation) mit den gleichen, fluoreszierenden mAK markiert und im Durchflußzytometer analysiert.

Am Beispiel der Zellen des Patienten 21 (FAB-Klassifikation M5) ist der Phänotyp der gewonnenen DC exemplarisch dargestellt (Abbildung 11a).

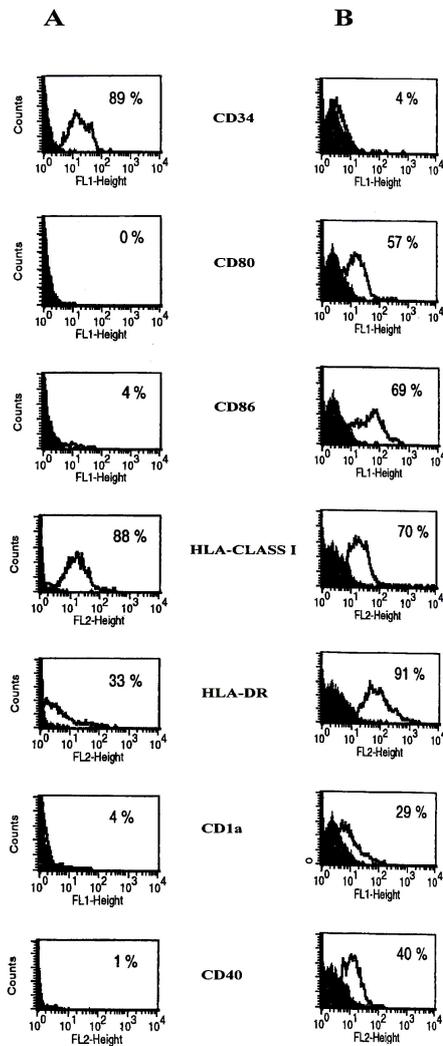


Abbildung 11a: Immunphänotyp von frisch aufgetauten naiven AML-Zellen des Patienten 2 (FAB-Klassifikation M5) (A) sowie dessen DC (B), wie sie nach 14tägiger Kultur mit FLT-3-Ligand, GM-CSF, IL-4 und TNF-alpha erhalten wurden. Die Zellen wurden, wie unter 2.2.7 beschrieben, mit immunfluoreszierenden Antikörpern markiert und im Durchflußzytometer analysiert. Die dunklen Histogramme in der Darstellung zeigen die Zellen nach Färbung mit den Antikörpern der Isotypenkontrolle, wohingegen die hellen Histogramme die Fluoreszenz von Zellen darstellen, die mit entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gewonnen wurden. Die Prozentzahl bezieht sich auf die Anzahl an positiven Zellen, ermittelt über die zuvor eingesetzten Marker. Die Marker CD33, CD11c sowie CD11b wurden bei diesem Beispiel nicht untersucht.

Die kultivierten Zellen waren negativ für CD14, CD19 (B-Zellmarker) und CD3 (T-Zellmarker) (nicht gezeigt). Nach Kultivierung mit den Zytokinen zeigte sich eine verminderte Expression des Oberflächenmoleküles CD34 auf den Zellen. Der Verlust von CD34 ging mit der Differenzierung der Blasten zu DC einher. Gleichzeitig kam es zu einer verstärkten Expression des DC-spezifischen Markers CD1a. Auch die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 wurden hochreguliert, ebenso wie HLA-DR. Zu einer geringen Expression kam es hingegen bei HLA-Klasse-I.

Eine Zusammenfassung der phänotypischen Merkmale bei 15 untersuchten AML-Patienten zeigt Abbildung 11b. CD14-, CD19- und CD3-positive Zellen waren nicht nachweisbar. Es gab einen deutlichen phänotypischen Unterschied zwischen den DC, die mit FLT-3-Ligand und denen, die ohne FLT-3-Ligand generiert worden waren, sowie zwischen DC und frisch aufgetauten AML-Blasten. Ein Vergleich der mit bzw. ohne FLT-3-Ligand kultivierten DC zeigte, daß die mit FLT-3-Ligand generierten DC eine signifikant höhere Oberflächenexpression von CD83 ($p < 0,001$), dem spezifischen Marker für reife DC, zeigten, als die ohne FLT-3-Ligand kultivierten DC. Dies weist auf einen reiferen Phänotyp der mit FLT-3-Ligand generierten DC hin. Auch CD40 ($p < 0,001$) und HLA-ABC ($p < 0,001$) zeigten deutlich höhere Expressionsraten bei mit FLT-3-Ligand differenzierten DC, was eine bessere T-Zellstimulation vermuten läßt. Identisch in ihrer Expression waren die anderen kostimulatorischen Moleküle, CD80 und CD86. Beide Gruppen von DC, differenziert mit und ohne FLT-3-Ligand, zeigten ähnliche Expressionen von HLA-DR, CD80, CD1a und dem myeloischen Marker CD33. Auffällig war die geringe Expression von HLA-Klasse-I bei den generierten DC ohne FLT-3-Ligand in Kultur.

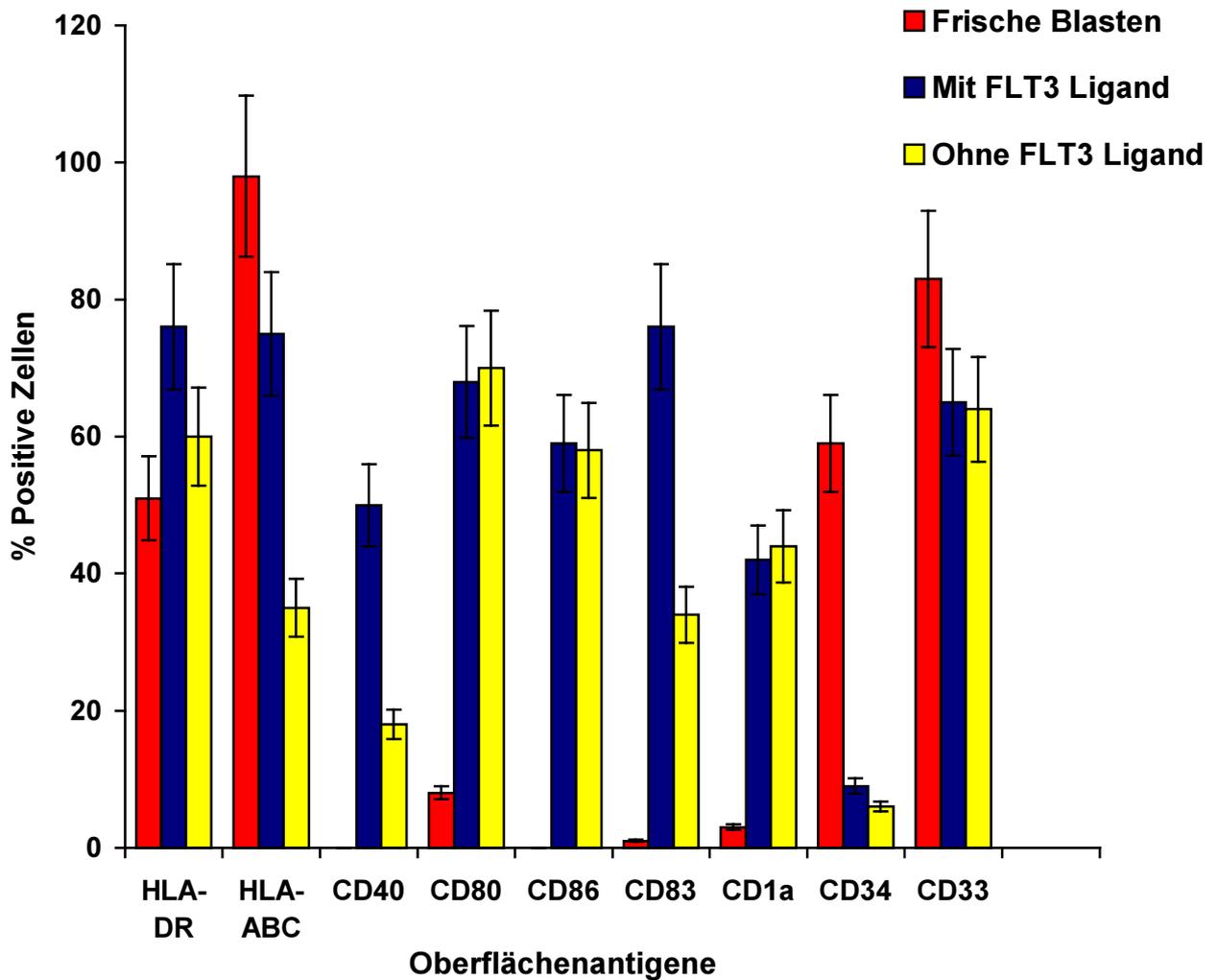


Abbildung 11b: Immunphänotypische Analyse von AML-Blasten und AML-Zellen nach Kultur mit FLT-3-Ligand, GM-CSF, IL-4 und TNF- α bzw. mit GM-CSF, IL-4 und TNF- α . Der prozentuale Anteil an positiven Zellen wurde im Durchflußzytometer bestimmt (Versuchsdurchführung siehe 2.2.7). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus Versuchen von 15 AML-Patienten mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Im Gegensatz zu den frisch aufgetauten AML-Blasten, die keine oder nur eine geringe Expression von CD40, CD80, CD86, CD83 und CD1a auf ihrer Oberfläche zeigten, exprimierten die DC aus beiden Zytokingruppen wesentlich stärker CD40, CD80, CD86, CD83 und CD1a (alle $p < 0,001$). Die Expressionsrate von HLA-ABC ($p < 0,05$) und CD34 ($p < 0,001$) fiel bei den DC signifikant niedriger aus, und der Expressionsgrad von HLA-DR und CD33 veränderte sich nicht wesentlich.

3.1.3 Detektion von Gen-Umlagerungen in DC zum Nachweis ihres leukämischen Ursprungs

Zur Demonstration, daß die mit FLT-3-Ligand generierten DC leukämischer Abstammung waren, wurden FISH-Sonden zum Nachweis von Chromosomenabnormalitäten in Interphasezellkernen eingesetzt. Zellen von Patient 19, mit einer Inversion 16, wurden für 14 Tage in FLT-3-Ligand, GM-CSF, IL-4 und TNF- α kultiviert. Die CD83⁺ DC wurden durch positive Selektion mit Hilfe von magnetischen Beads (wie unter 2.2.8.1 beschrieben) angereichert und Zytospinpräparationen angefertigt (wie unter 2.2.6 beschrieben). Mit einer für den CFBF-Genlocus spezifischen Zweifarben-DNA-FISH-Sonde wurde die Inversion 16 nachgewiesen.

Im abnormalen CFBF-Allel findet man getrennte Signale, ein rotes Signal in der 16p13 Region und ein grünes in der 16q22 Region (wie auch in Abbildung 12 zu erkennen), da die Inversion das Auseinanderbrechen des CFBF-Gens verursacht, während im normalen CFBF-Allel ein rot-grünes Fusionssignal zu beobachten ist. Mehr als 100 Interphasekerne wurden ausgezählt und in über 95% der CD83⁺ DC konnte die Inversion 16 nachgewiesen werden.

Durchgeführt wurde auch eine FISH-Analyse von einem AML-Patienten mit Trisomie 13 (nicht gezeigt). Die Trisomie 13 wurde in den Interphasekernen der DC mit einer Spektrumorange markierten, den Retinoblastom 1 Genlocus (Region 13q14) spezifischen DNA-Sonde detektiert. Auch in diesem Fall wurden mehr als 100 Kerne mit der chromosomalen Abnormalität ausgezählt und in >80% der DC ließen sich drei Hybridisierungssignale, Kennzeichen dieser Aberration, nachweisen.

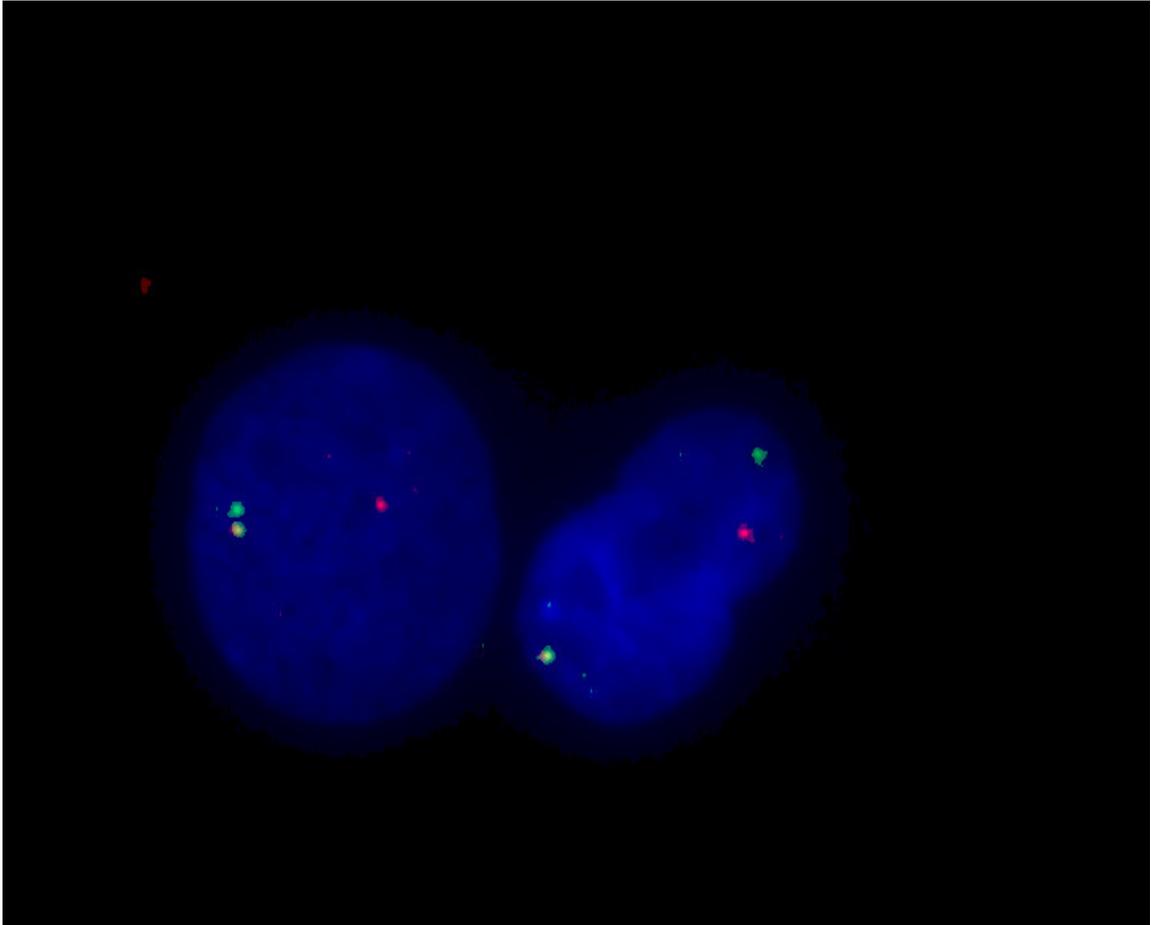


Abbildung 12: Genotyp von CD83⁺ angereicherten DC, die für 20 Tage mit FLT-3-Ligand, GM-CSF, IL-4 und TNF- α kultiviert waren. Diese Abbildung zeigt zwei repräsentative Interphasezellkerne des AML-Patienten 19 mit der Inversion 16. In mehr als 95% der DC ließ sich die Inversion 16 durch zwei unabhängige Signale, ein grünes (Region 16p13) und ein rotes (Region 16q22) Signal durch eine LSI-CBFB-Zweifarbend-DNA-FISH-Sonde detektieren. Im normalen CBFB-Allel ist ein rot-grünes Fusionsignal zu erkennen. Der dargestellte Patient ist heterozygot bezüglich der Inversion 16.

3.1.4 Funktionalität der von AML-Patienten generierten DC

3.1.4.1 Fähigkeit zur allogenen Stimulation

Die immunstimulatorische Kapazität von DC, generiert mit beiden Zytokin-kombinationen (wie unter 2.2.4.1 beschrieben), als auch die von frisch aufgetauten Blasten, wurde in allogenen MLR-Ansätzen untersucht. Als Responderzellen wurden T-Lymphozyten von HLA-A, -B und -DR nicht identischen Spendern durch negative Selektion isoliert. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit FACS gezeigt und lag bei ca. 90%.

Unterschiedliche Mengen an bestrahlten DC, kultiviert mit und ohne FLT-3-Ligand, sowie frische AML-Blasten wurden mit jeweils 1×10^5 isolierten allogenen T-Lymphozyten kokultiviert. Die Proliferation der Responder-T-Lymphozyten wurde nach fünf Tagen durch den Einbau von ^3H -Thymidin analysiert, welches für die verbleibenden 18 Stunden zu den Zellen gegeben wurde (siehe 2.2.10.1).

Die Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte von Versuchen mit acht verschiedenen AML-Patienten (Datenpunkte als Triplikate ermittelt).

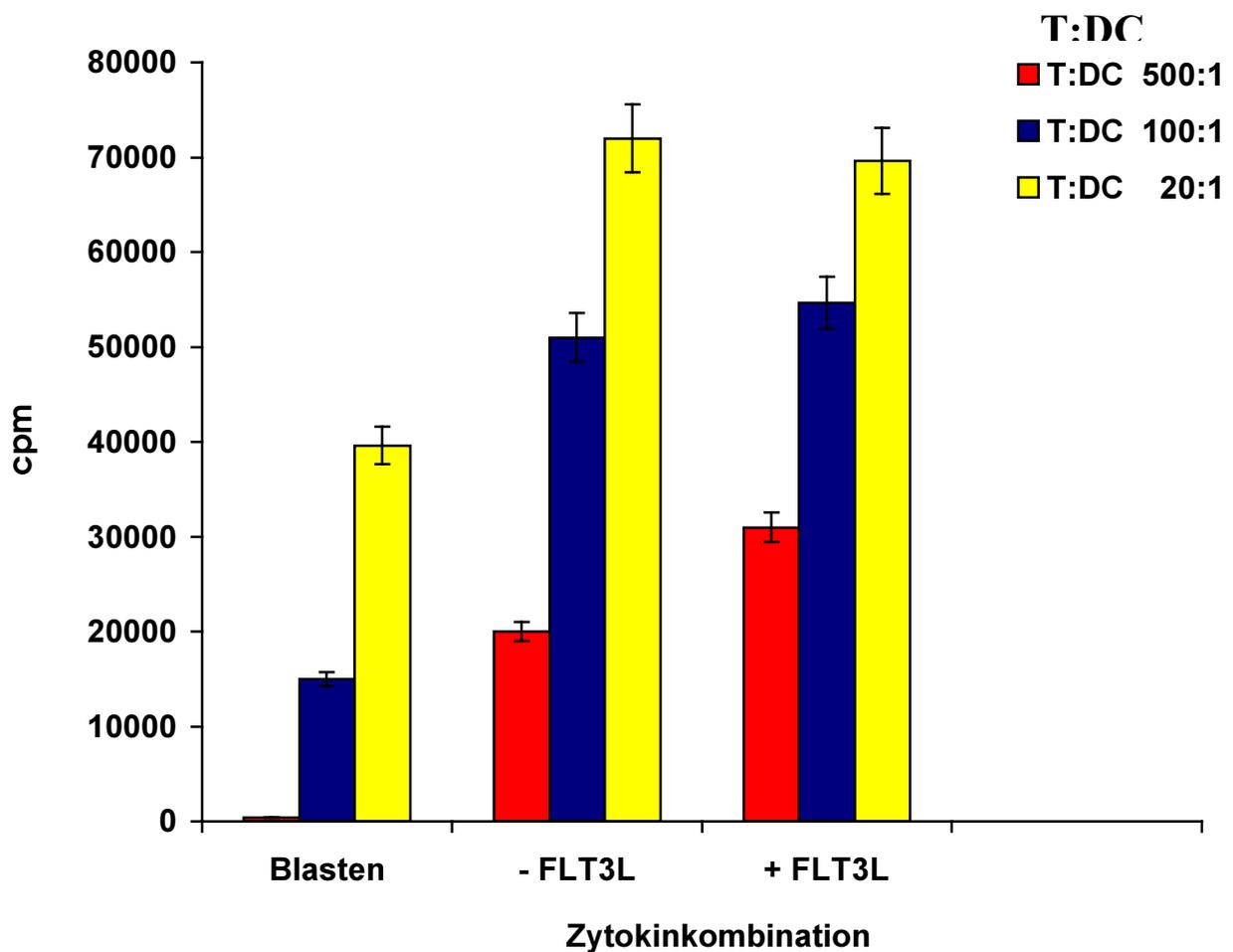


Abbildung 13: Allogene MLR mit Blasten und DC, generiert mit und ohne FLT-3-Ligand, von AML-Patienten. Nach 14 Tagen in Kultur wurden die DC in unterschiedlicher Anzahl (200, 1000 und 5000 DC) zu Triplikaten in 96 Lochplatten pipettiert. Zuvor wurden jeweils 1×10^5 negativ selektierte isolierte allogene T-Lymphozyten als Responderzellen in die Löcher mit komplettem Medium gegeben. Als Kontrolle wurden nur T-Lymphozyten alleine in die Löcher pipettiert. Nach fünf Tagen Kokultivierung erfolgte die Zugabe von ^3H -Thymidin zu den Zellen. Die Zellen wurden nach 18 Stunden geerntet und der Thymidineinbau in die Zellen gemessen (wie unter 2.2.10.1 beschrieben). Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen von acht AML-Patienten. DC, Blasten und T-Lymphozyten alleine zeigten keine deutliche Proliferation (nicht gezeigt).

Stimulationsansätze mit DC, die mit beiden Zytokinkombinationen (\pm FLT-3-Ligand) generiert wurden, waren bei allen getesteten T:DC Ratios deutlich effektivere T-Lymphozyten-Aktivatoren als frisch aufgetaute AML-Blasten ($p < 0,001$). DC, die mit oder ohne \pm FLT-3-Ligand differenziert worden waren, zeigten keinen Unterschied bezüglich ihrer Kapazität, allogene T-Lymphozyten zu stimulieren.

Die beobachteten phänotypischen Unterschiede, z.B. die geringere Expression von HLA-Klasse-I, HLA-DR, CD40 und CD83 bei den ohne FLT-3-Ligand hergestellten DC (wie unter 3.1.2 beschrieben), scheinen daher keine Bedeutung für die Fähigkeit zur Allostimulation zu haben.

Phänotypisch waren die proliferierenden T-Lymphozyten-Kulturen, die mit/ohne FLT-3-Ligand stimuliert wurden, überwiegend proliferierende $CD4^+$ ($52,8 \pm 27,4\%/60 \pm 8,5\%$) und $CD8^+$ T-Zellen ($26,4 \pm 16,9\%/34,5 \pm 13\%$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei DC-Gruppen. Bei beiden DC-Bedingungen waren keine NK-Zellen nachzuweisen (Tabelle 4).

	+ FLT-3-Ligand	- FLT-3-Ligand
<u>Allogene T-Zellen</u>		
CD3⁺/CD4⁺	52,8 \pm 27,4%	60 \pm 8,5%
CD3⁺/CD8⁺	26,4 \pm 16,9%	34,5 \pm 13 %
CD3⁺/CD56⁺	0 %	0 %
<u>Autologe T-Zellen</u>		
CD3⁺/CD4⁺	48,4 \pm 23,7%	47,5 \pm 22,4%
CD3⁺/CD8⁺	36,5 \pm 15,1%	32 \pm 15,6%
CD3⁺/CD56⁺	0 %	0 %

Tabelle 4: Phänotypische Analyse der proliferierenden T-Lymphozyten aus den allogenen und autologen MLRs, stimuliert mit DC, die mit FLT-3-Ligand und ohne FLT-3-Ligand kultiviert wurden. Die T-Zellen wurden mit den entsprechenden immunfluoreszierenden monoklonalen Antikörpern markiert und im Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von acht AML-Patienten.

3.1.4.2 Nachweis der Präsentation von Antigenen durch DC

Eine charakteristische Eigenschaft von DC ist die Fähigkeit, endogene als auch exogene Antigene über MHC-I- bzw. MHC-II-Moleküle an T-Lymphozyten zu präsentieren. Um zu testen, ob die von den AML-Patienten generierten DC leukämische Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, wurde untersucht, ob sie in der Lage sind, autologe T-Lymphozyten zu stimulieren.

In vitro differenzierte leukämische DC (kultiviert mit/ohne FLT-3-Ligand) von acht AML-Patienten, wurden mit frisch aufgetauten AML-Blasten hinsichtlich ihrer Kapazität, autologe T-Lymphozyten zu stimulieren, verglichen (Abbildung 14). Die autologen T-Lymphozyten der AML-Patienten wurden zuvor über den Mechanismus der negativen Selektion gewonnen und als Responderzellen in autologen MLR-Testsystemen verwendet (wie unter 2.2.10.2 beschrieben).

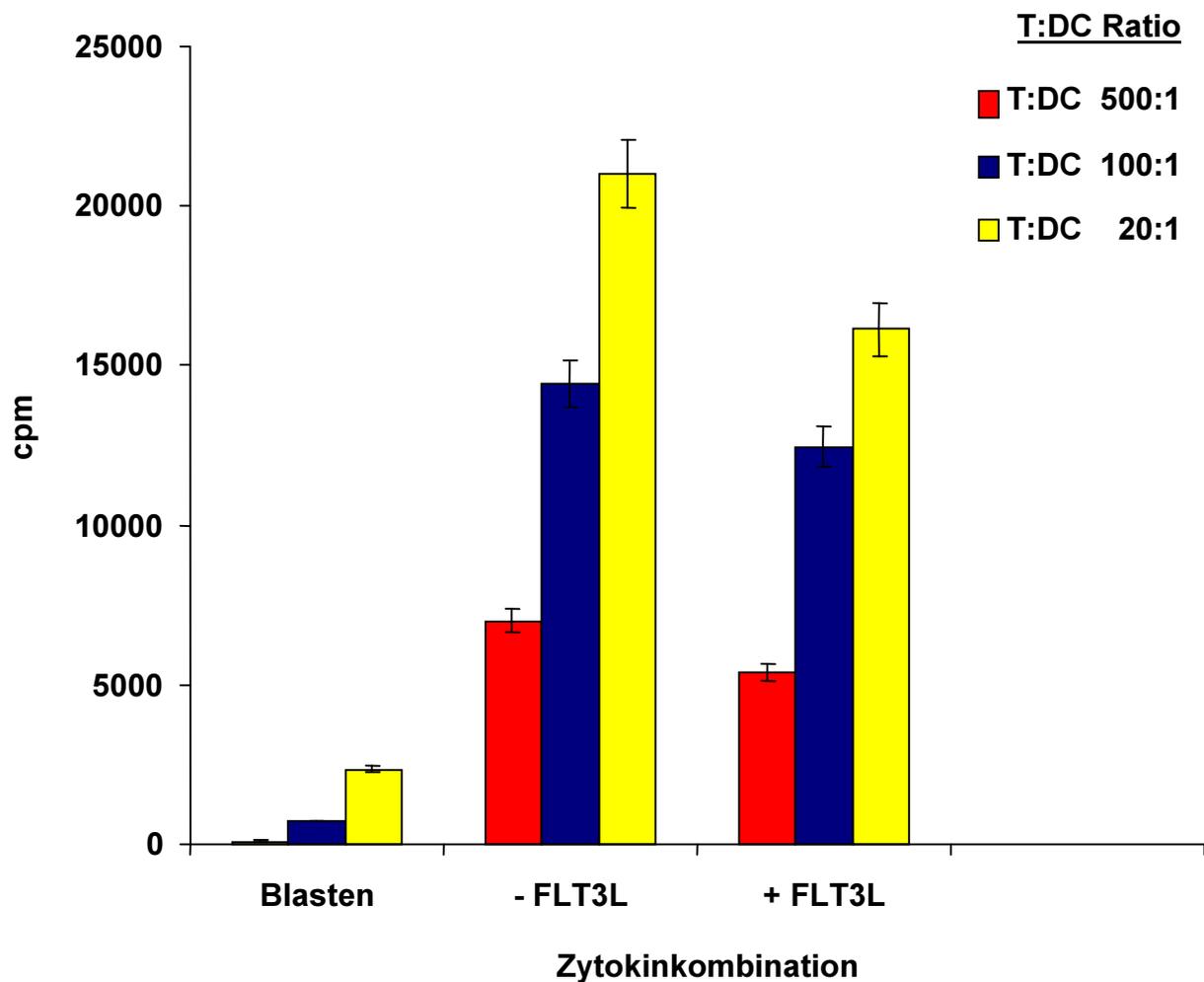


Abbildung 14: DC, die von AML-Zellen mit FLT-3-Ligand und ohne FLT-3-Ligand generiert wurden, konnten autologe T-Lymphozyten stimulieren. Die zuvor bestrahlten DC wurden in unterschiedlicher Anzahl (200, 1000 und 5000 DC) zu jeweils Triplikaten in 96 Lochplatten pipettiert. Zuvor wurden in die Löcher jeweils 1×10^5 isolierte autologe T-Zellen ins komplette Medium gegeben. Als Kontrolle wurden nur T-Lymphozyten alleine pipettiert. Nach fünf Tagen Kokultivierung erfolgte die Zugabe von ^3H -Thymidin für 18 Stunden. Anschließend wurden die Zellen geerntet und der Einbau von Thymidin in die Zellen gemessen. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen von acht Patienten. T-Lymphozyten alleine zeigten keine Proliferation (nicht gezeigt).

Die Abbildung 14 zeigt, daß die aus AML-Blasten generierten DC (von beiden Zytokinkombinationen) autologe T-Lymphozyten stimulieren können. Dabei waren sie bei allen getesteten T:DC Verhältnissen wesentlich effektivere Stimulatoren für T-Lymphozyten als frisch aufgetaute AML-Blasten ($p < 0,0001$). DC, die mit oder ohne FLT-3-Ligand differenziert worden waren, zeigten keinen Unterschied hinsichtlich ihrer T-Lymphozyten-Stimulationskapazität.

Die Proliferationsrate ist geringer als bei allogener MLR (Abbildung 13). Dies erklärt sich dadurch, daß die Stimulierung autologer T-Lymphozyten vermutlich auf die Expression und Präsentation Leukämie-spezifischer Antigene (gezeigt am Beispiel der Inversion 16) durch die DC zurückzuführen ist (siehe auch Zytotoxizitätstest), die zum einen eine wesentlich geringere Dichte bzw. niedrigere Stimulationskapazität haben als die allogenen MHC-Moleküle. Zum anderen dürfte die Frequenz Antigen-spezifischer T-Lymphozyten niedriger sein als die der allo-reaktiven T-Lymphozyten. Die Frequenzen der einzelnen reagierenden T-Zell-Populationen wurden bei diesen Experimenten nicht bestimmt.

Phänotypische Analysen der proliferierenden T-Lymphozyten zeigten, daß die mit FLT-3-Ligand differenzierten DC stimulierten T-Zellen sowohl $CD4^+$ ($48,4 \pm 23,7\%$) als auch $CD8^+$ ($36,5 \pm 15,1\%$) waren. Ähnliche Werte wurden mit DC, die in der Abwesenheit von FLT-3-Ligand kultiviert waren, bestimmt ($47,5 \pm 22,4\%$ $CD4^+$ und $32 \pm 15,6\%$ $CD8^+$ T-Zellen) (siehe Tabelle 4).

3.1.5 Zytotoxizität von T-Lymphozyten, die durch Stimulation mit "leukämischen" DC generiert wurden

Für die Induktion von spezifischen CTL gegen AML-Blasten wurden DC kultiviert mit GM-CSF, IL-4, TNF- α mit oder ohne FLT-3-Ligand als Stimulatorzellen verwendet und autologe PBMNC als Responderzellen eingesetzt. Nach 3-4 wöchiger Kokultivierungszeit und nach drei Stimulationen war es möglich, Patienten-T-Lymphozyten-Linien zu generieren. Diese T-Lymphozyten-Linien wurden auf ihre Fähigkeit getestet, autologe Blasten zu erkennen. Parallel dazu wurden HLA-identische und HLA-nicht-identische PBMNC verwendet, um zu zeigen, ob die Blastenerkennung spezifisch ist. Die HSB-2 Zelllinie wurde getestet, um eine eventuelle Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK) nachzuweisen.

Von 75% der AML-Patienten war es möglich, CTL-Linien zu generieren, welche in der Lage waren, CD34⁺ AML-Blasten spezifisch zu erkennen und minimale Reaktion gegen HLA-identische oder HLA-nicht-identische Zielzellen zu zeigen. Die Abbildung 15a zeigt die lytische Aktivität von fünf AML-Patienten bzw. ihrer generierten CTL-Linien gegenüber autologen CD34⁺ Blasten, mit Concanavalin-A stimulierten autologen T-Lymphozyten (nicht vom leukämische Klon), HLA-nicht identischen PBMNC von gesunden Spendern und gegen HSB-2 Zellen.

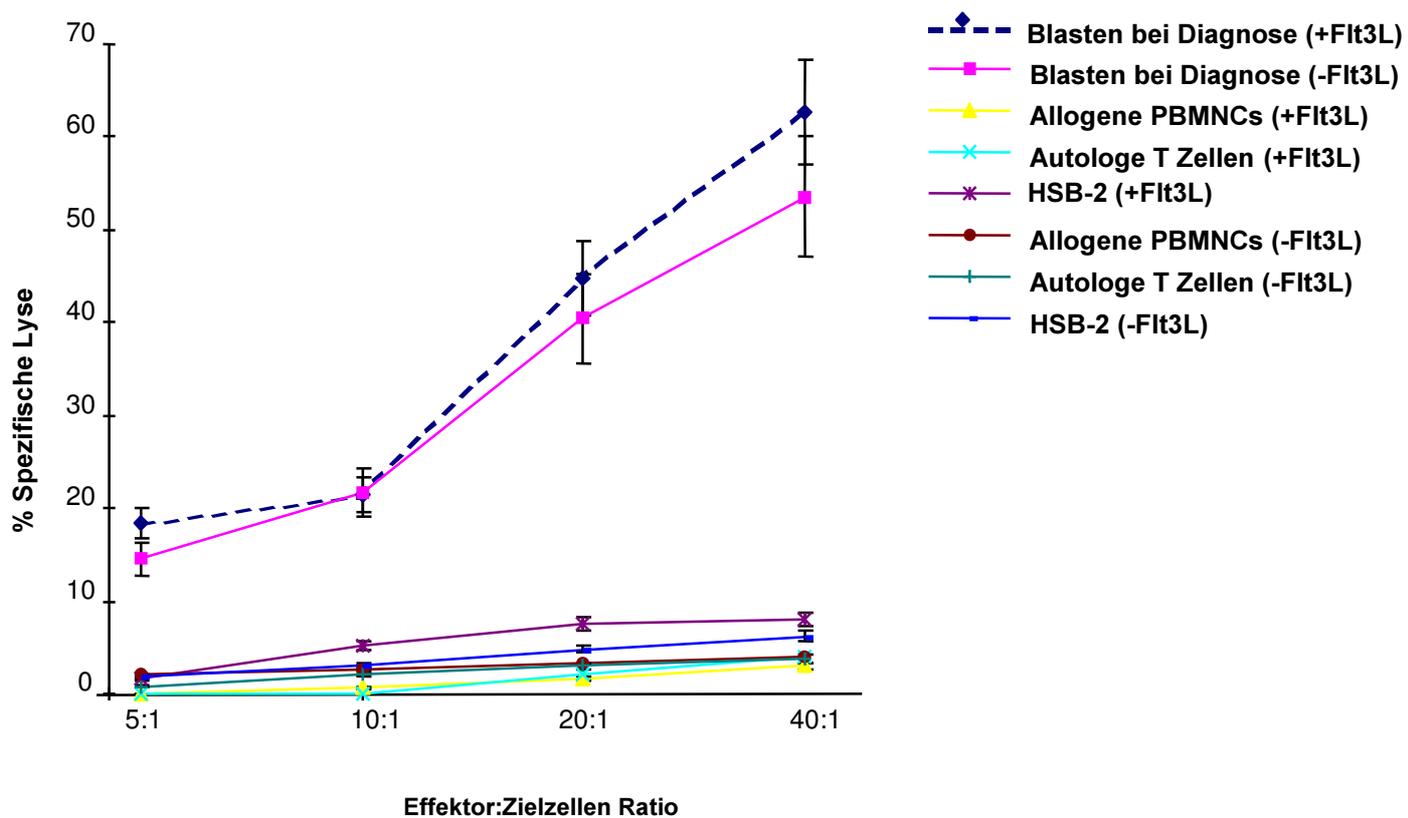


Abbildung 15a: Zytotoxizität von T-Lymphozyten, die durch Stimulanzien mit in vitro differenzierten DC hergestellt wurden. Die DC, generiert mit GM-CSF, IL-4, TNF- α Plus oder Minus FLT-3-Ligand, wurden mit autologen PBMNC, wie unter 2.2.11.1 beschrieben, kokultiviert. In 4 Stunden Standard-Chrom-Freisetzungstests (wie unter 2.2.11.3 beschrieben) wurde die Zytotoxizität der in vitro generierten CTL-Linien gegen autologe Blasten, autologe T-Lymphozyten (die nicht vom leukämischen Klon abstammten), HLA-nicht identische allogene PBMNC und HSB-2 Zellen getestet. Alle Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen aus Experimenten mit fünf AML-Patienten, die zuvor aus den kultivierten Triplikaten der Mittelwerte errechnet wurden.

Die geringe Zytotoxizität der über DC hergestellten T-Lymphozyten gegen alle Zielzellen (<10% Lyse bei einem E:T Verhältniss von 40:1), mit Ausnahme der CD34⁺ AML-Blasten (Durchschnittslyse 62,2% (+FLT3 L) und 51,7% (-FLT3 L) bei einer E:T Ratio von 40:1) zeigte, daß die Lyse der generierten CTL-Linien beschränkt ist auf jene Zielzellen, welche identische MHC-Moleküle exprimierten und leukämischen Ursprungs sind.

Die CTL-Linien, generiert mit DC (differenziert mit oder ohne FLT-3-Ligand), unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Fähigkeit zur spezifischen Lyse von CD34⁺ AML-Blasten hinsichtlich der fünf getesteten AML-Patienten. Die geringe Lyse der HSB-Zelllinie zeigte, daß keine MHC-Klasse-I unabhängige, über NK- oder LAK-Zellen vermittelte lytische Aktivität vorhanden war.

Die Abhängigkeit der Lyse von MHC-I bzw. MHC-II wurde in Blockierungsansätzen gezeigt (Abbildung 15b). Bei Zugabe von HLA-Klasse-I bzw. HLA-II-Antikörpern wurde die Lyse der CD34⁺ AML-Blasten von 60% auf 20% bzw. 40% (E:T Ratio von 40:1) gesenkt. Dieses bestätigt die obige Beobachtung, daß die Lyse MHC-restringiert ist und belegt die Beteiligung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen.

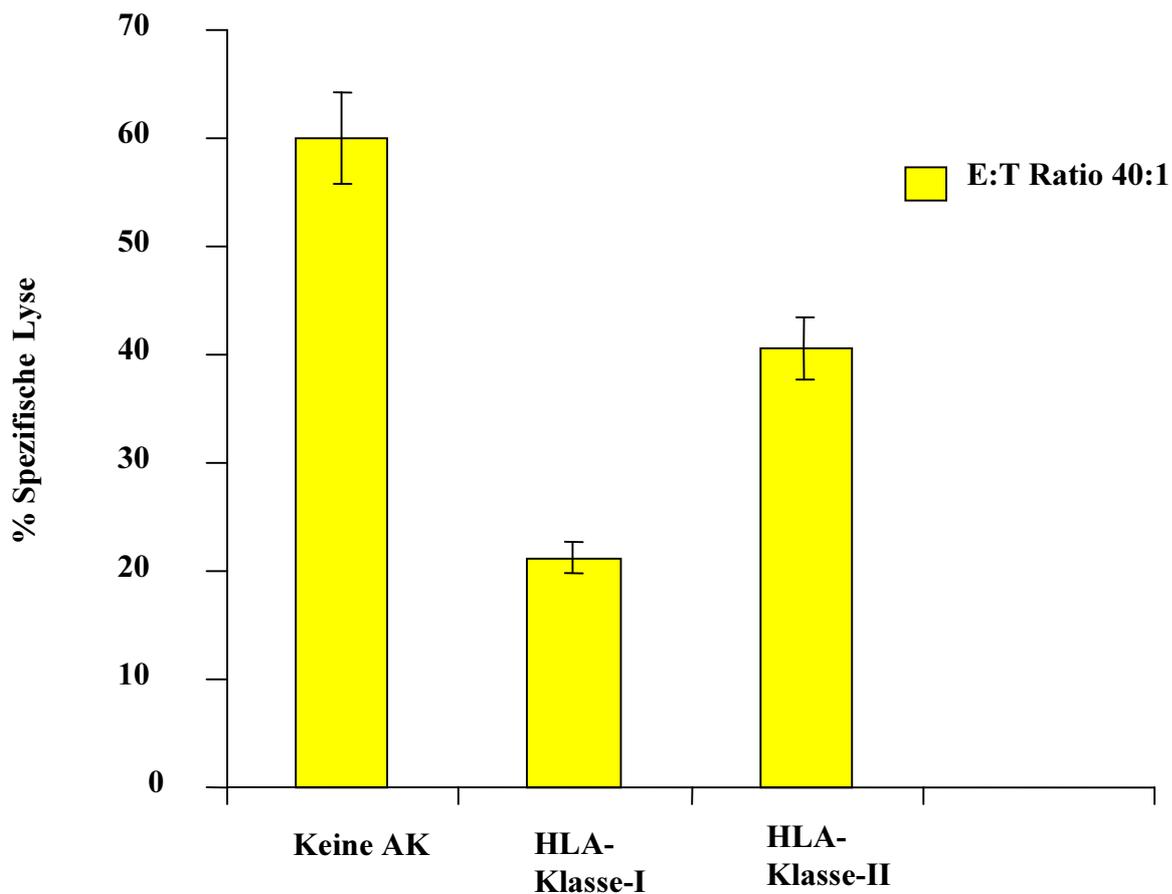


Abbildung 15b: MHC-Klasse-I und -II Abhängigkeit der Leukämie-spezifischen Lyse von autologen AML-Blasten. AML-Blasten wurden mit den monoklonalen Antikörpern W6/32 (HLA-Klasse-I) bzw. CR3/43 (HLA-Klasse-II) für 30 Minuten vorinkubiert. T-Lymphozyten wurden im Verhältnis 40:1 zugegeben (wie unter 2.2.11.4 beschrieben). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen aus Experimenten mit fünf AML-Patienten, die zuvor aus den Triplikaten der Mittelwerte errechnet wurden.

Phänotypische Untersuchungen der CTL-Linien zeigten, daß es sich überwiegend um $CD8^+$ T-Zellen (37,5%) handelte, aber auch $CD4^+$ T-Zellen (17,5%) vorhanden waren. NK-Zellen ($CD3^-CD56^+$) wurden nicht gefunden (Tabelle 5 stellt exemplarisch die phänotypische Zusammensetzung der generierten CTL-Linie eines Patienten dar). Phänotypisch wurden keine Unterschiede beobachtet, unabhängig davon, ob die CTL-Linien mit DC generiert wurden, die aus Kulturen mit oder ohne FLT-3-Ligand stammten.

Tabelle 5: Phänotypische Analyse der T-Zell-Linien

	GM-CSF/ IL-4/TNF- α	GM-CSF/ IL-4/TNF- α /FLT-3-Ligand
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	24,5%	17,5%
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	41,5%	37,5%
CD3 ⁻ /CD56 ⁺	0 %	0 %

AML-Blasten, die ohne Zytokine kultiviert wurden, hatten nicht die Kapazität T-Lymphozyten mit spezifischer zytotoxischer Aktivität in vitro zu stimulieren (Daten nicht dargestellt), dieses wurde bei allen untersuchten Patienten beobachtet.

3.1.6 Generierung von Fusionszellen aus DC und AML-Blasten in vitro

Ein alternativer Ansatz zur zytokininduzierten Reifung von DC aus AML-Blasten ist die Fusion von DC mit AML-Blasten. Gong et al. (2000 b) konnten u.a. beim Brustkrebs zeigen, daß die generierten Fusionszellen Tumor-assoziierte Antigene in Verbindung mit den kostimulatorischen Molekülen der DC auf ihrer Zelloberfläche präsentierten und daß diese Fusionszellen in der Lage waren, CTL zu stimulieren, die wiederum die Fähigkeit besaßen, autologe Tumorzellen zu lysieren.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Methode etabliert, bei der mittels PEG allogene DC von gesunden Spendern mit autologen Leukämiezellen fusioniert werden. Von fünf AML-Patienten, die Blastenzahl lag zwischen 80-99 Prozent, wurden die frisch aufgetauten Blasten verwendet. Von gesunden Spendern, die hinsichtlich der Gewebemerkmale mit den Patienten entweder HLA-identisch waren oder sich in 2 von 6 HLA-Merkmalen bzw. in 3 von 6 HLA-Merkmalen unterschieden, wurden DC differenziert (wie unter 2.2.4.2 beschrieben). Nach sieben Tagen in Serum-freiem-Medium wurden die DC geerntet und mit einem roten Membranfarbstoff gefärbt. Parallel dazu wurden die frisch aufgetauten AML-Blasten mit einem grünen Farbstoff gefärbt (siehe 2.2.9.2). Anschließend wurden die DC mit den AML-Blasten mittels PEG fusioniert oder die DC wurden nur mit den Blasten vermischt (siehe 2.2.9.1). Nach vier Tagen wurde die Fusionseffektivität im Durchflußzytometer analysiert.

In Abbildung 16 dargestellt ist das Experiment, in welchem Spender-DC (HLA-identisch zu den Gewebemerkmale des Patienten) mit den AML-Blasten des Patienten in verschiedenen Ratios mittels PEG fusioniert wurden.

Als Kontrolle wurden DC alleine mit PEG fusioniert.

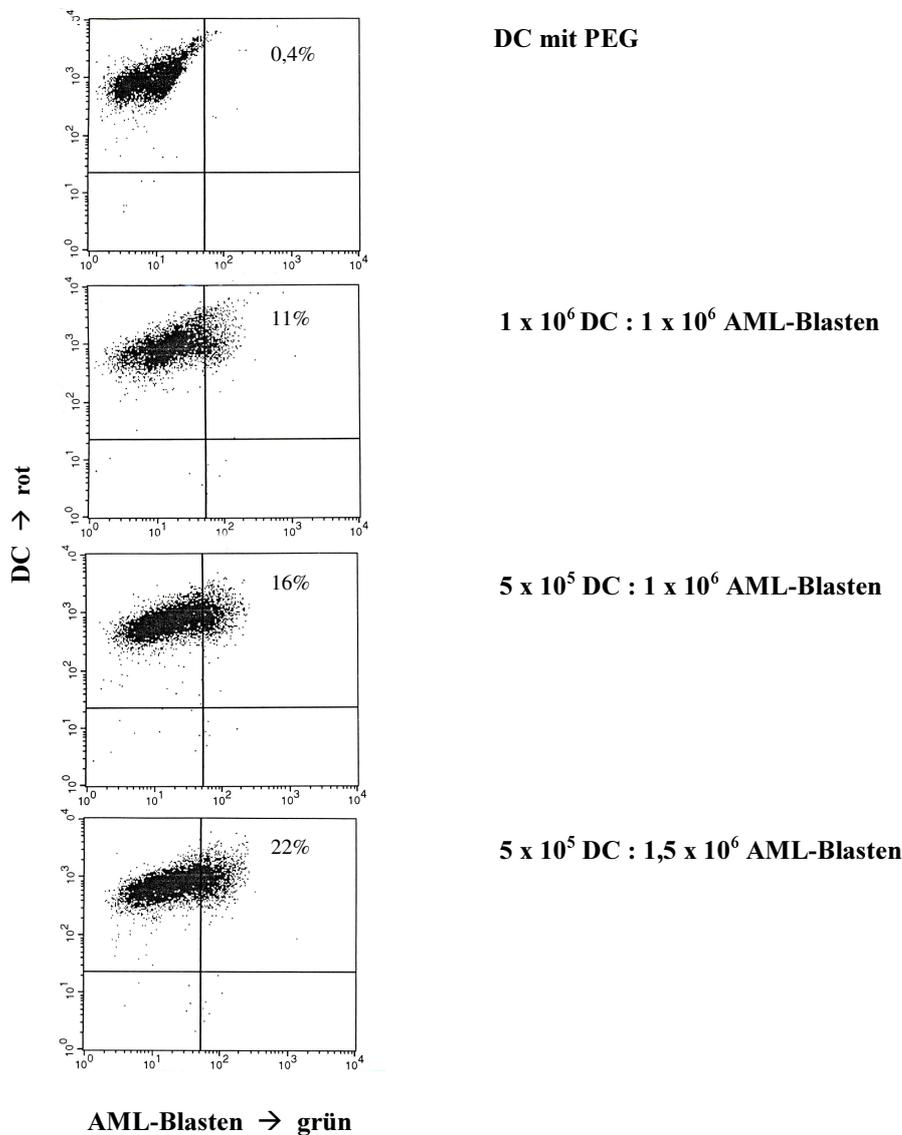


Abbildung 16: Darstellung zur Überprüfung der Fusionseffektivität. Um die Effektivität der Fusion zu analysieren, wurden die beiden Fusionspartner jeweils mit roten (DC) und grünen (Blasten) Farbstoffen gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter verschiedenen Bedingungen fusioniert. 1×10^6 AML-Blasten wurden jeweils mit 1×10^6 und 5×10^5 DC fusioniert und $1,5 \times 10^6$ Patienten-Blasten wurden mit 5×10^5 DC fusioniert, außerdem wurden DC alleine mit PEG inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Fusionszellen im Durchflußzytometer analysiert. Die Prozentzahl gibt die doppelgefärbten Fusionszellen im rechten oberen Quadranten an. Da sich die FSC und SSC-Einstellung an den großen DC bzw. Fusionszellen orientierte, sind die kleineren unfusionierten AML-Zellen in dieser Darstellung nicht zu sehen. Hier gezeigt sind die generierten allogenen Spender-DC (HLA-identisch zu den Gewebemerkmale des Patienten), fusioniert mit den AML-Blasten eines repräsentativen Patienten (AML-Blasten alleine nicht dargestellt).

Wie die Analyse im Durchflußzytometer zeigte, war die Ausbeute an rot/grünen Fusionzellen (21,81 %) am stärksten, wenn 5×10^5 DC mit $1,5 \times 10^6$ AML-Blasten fusioniert wurden. Die FACS-Analysen zeigten generell eine Fusionsrate von 10-20% bei DC, die sieben Tage alt waren. Fusioniert wurden auch reifere DC, die zehn Tage alt waren (generiert mit GM-CSF, IL-4 und mit TNF- α für die letzten drei Tage), allerdings mit wesentlich niedriger Fusionseffizienz (Daten nicht gezeigt).

3.1.7 Funktionsanalyse der Fusionszellen

Um zu überprüfen, ob die generierten Fusionszellen die Fähigkeit besitzen, T-Lymphozyten des AML-Patienten zu stimulieren, wurden MLR durchgeführt (wie unter 2.2.10.2 beschrieben). Autologe T-Lymphozyten wurden in folgenden Ansätzen kokultiviert:

- Spender DC (HLA-identisch zum Patienten) fusioniert mit AML-Blasten
Spender DC (HLA-identisch zum Patienten) vermischt mit AML-Blasten
Spender DC (HLA-identisch zum Patienten) alleine
- Spender DC (in 2/6 Merkmalen verschieden zum Patienten) fusioniert mit AML-Blasten
Spender DC (in 2/6 Merkmalen verschieden zum Patienten) vermischt mit AML-Blasten
Spender DC (in 2/6 Merkmalen verschieden zum Patienten) alleine
- Spender DC (in 3/6 Merkmalen verschieden zum Patienten) fusioniert mit AML-Blasten
Spender DC (in 3/6 Merkmalen verschieden zum Patienten) vermischt mit AML-Blasten
Spender DC (in 3/6 Merkmalen verschieden zum Patienten) alleine
- autologe AML-Blasten.

Nach fünftägiger Ko-Kultivierung wurde zum Nachweis der T-Lymphozyten-Proliferationsrate ^3H -Thymidin zugegeben.

Die Proliferation der T-Lymphozyten nach Stimulation mit den Fusionszellen, dem DC/AML-Blasten Gemisch und den allogenen DC ist in Abbildung 17 dargestellt.

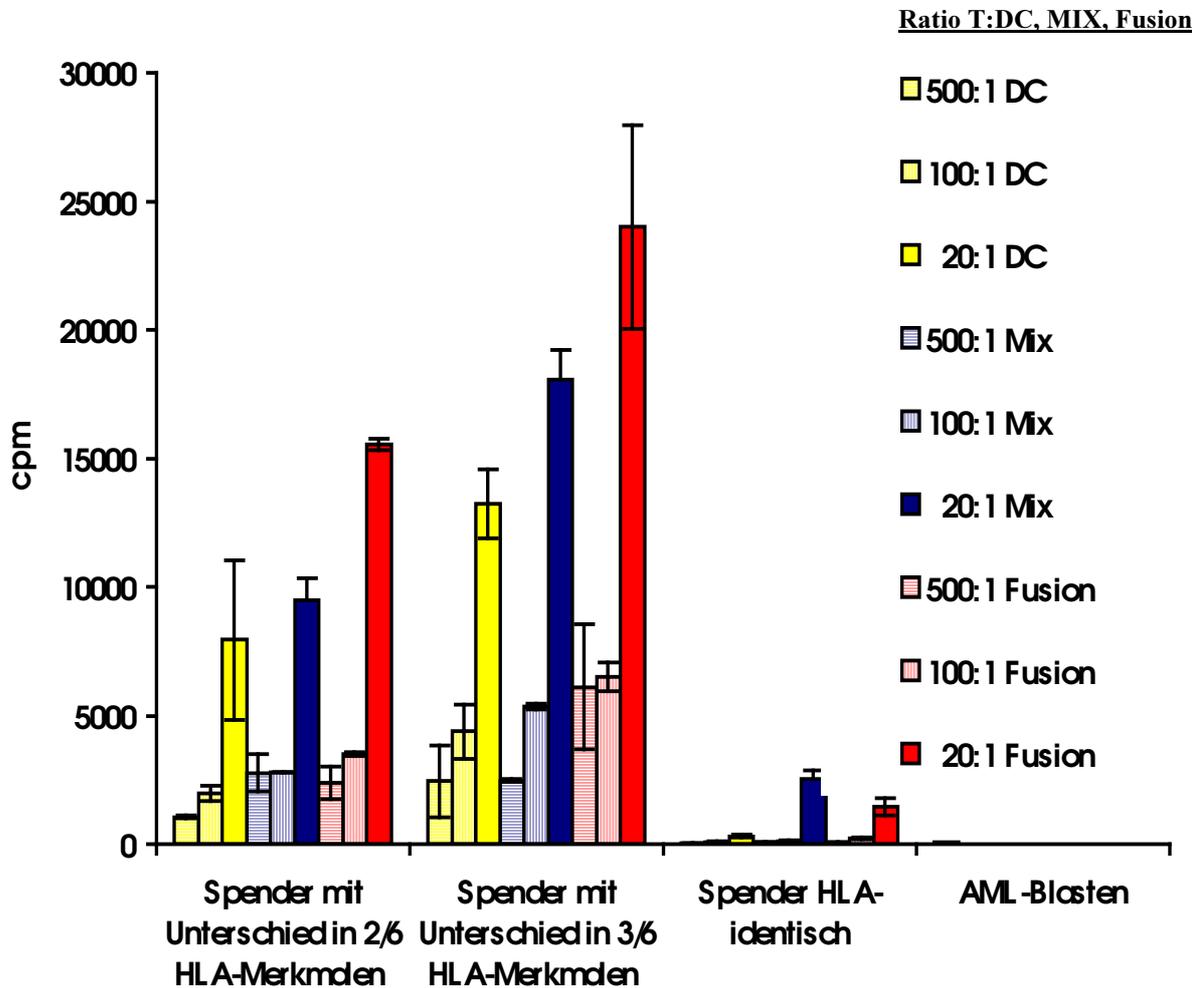


Abbildung 17: Proliferationsrate der AML-T-Lymphozyten nach Stimulation mit Fusionzellen. DC von gesunden Spendern, die im Vergleich zu den Gewebemerkmale des Patienten entweder HLA-identisch oder in 2 von 6 HLA-Merkmalen bzw. in 3 von 6 HLA-Merkmalen unterschiedlich waren, wurden mit AML-Zellen mittels PEG fusioniert, mit AML-Zellen vermischt sowie Spender-DC alleine wurden in 24-Lochplatten in komplettem Medium, welches rhGM-CSF (800 U/ml) und TNF-alpha (200 U/ml) enthielt, für vier Tage bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden bei 3000 cGy bestrahlt und mit den isolierten T-Lymphozyten des AML-Patienten in Triplikaten in 96-Lochplatten mit komplettem Medium für fünf Tage inkubiert. Es wurden auch T-Lymphozyten alleine in die Lochplatten gegeben. Die Zugabe von ³H-Thymidin und die Messung des Thymidineinbaus wurde, wie unter 2.2.10.1 beschrieben, durchgeführt. Diese Darstellung zeigt die Ergebnisse, ausgedrückt als Mittelwerte ± Standardabweichung von drei Replikaten eines repräsentativen AML-Patienten mit seinen entsprechenden Spendern.

Wie in Abbildung 17 anhand eines AML-Patienten exemplarisch gezeigt (insgesamt wurden fünf AML-Patienten getestet), konnten in Ansätzen mit HLA-Unterschieden bereits in Abwesenheit von AML-Blasten T-Lymphozyten mittels DC stimuliert werden (gelbe Balken). Diese Proliferation ist auf HLA-Unterschiede zurückzuführen. Bei HLA-Identität von Spender-DC zum Patienten trat diese Proliferation ohne AML-Blasten nicht auf. In Ansätzen mit HLA-Unterschieden wurde bei Anwesenheit von AML-Blasten eine bessere T-Lymphozyten-Stimulation erreicht, wenn die AML-Blasten mit den DC fusioniert wurden, als wenn die DC mit AML-Blasten vermischt wurden (rote Balken versus blaue Balken). Bei HLA-identischen Spendern konnte, egal ob die DC mit AML-Blasten fusioniert oder vermischt wurden, nur eine geringe Reaktivität von T-Lymphozyten erreicht werden. Die T:DC-Ratio 20:1 war jeweils am effektivsten bei der Stimulation von T-Lymphozyten. Je mehr HLA-Unterschiede vorhanden waren, desto höher war die Proliferationsrate der T-Lymphozyten bei allen getesteten Bedingungen (Fusion, vermischte Zellen und DC alleine). AML-Blasten alleine waren hingegen nicht in der Lage, T-Lymphozyten zu stimulieren.

Phänotypische Untersuchungen zeigten, daß überwiegend CD4⁺ T-Zellen stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt).

3.1.8 Phänotypische Untersuchungen von PBL bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern

3.1.8.1 Expression der TCR-assozierten zeta-Kette in PBL

Um zu überprüfen, ob die CD3-zeta-Kette des TCR, welche für die optimale Expression des TCR und die maximale Signaltransduktion bei der Aktivierung von T-Lymphozyten entscheidend ist, in T-Lymphozyten von AML-Patienten normal exprimiert ist, untersuchte ich 23 AML-Patienten und 23 gesunde Probanden. Die PBL wurden mit zwei verschiedenen Antikörpern gefärbt, mit jeweils einem der T-Zellmarker CD3, CD4, CD8 oder CD56 und dem Antikörper, welcher die intrazelluläre Komponente der TCR-zeta-Kette nachweist (durchgeführt mit permeabilisierten PBL), und im Durchflußzytometer analysiert (wie unter 2.2.12.2 beschrieben).

Bei der Auswertung der T-Lymphozyten-Subpopulation zeigte sich, daß weniger CD4⁺ T-Zellen bei den untersuchten Patienten-PBL vorhanden waren, als bei gesunden Spendern (Tabelle 6).

Tabelle 6: T-Lymphozyten-Subpopulationen von AML-Patienten und gesunden Spendern

		Mittelwerte (% von Gesamtzellen)	Standardabweichung	Ratio CD4/CD8
Gesunder Spender	CD4 ⁺ T-Zellen	40,33	14,83	1,6:1
	CD8 ⁺ T-Zellen	25,00	9,72	
AML-Patient	CD4 ⁺ T-Zellen	21,31	18,54	0,8:1
	CD8 ⁺ T-Zellen	26,44	14,61	

Wie die Abbildungen 18 und 19 deutlich machen, ergab die prozentuale Bewertung der Expression der zeta-Kette bei CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen bzw. CD56⁺ natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) keine signifikanten Unterschiede zwischen AML-Patienten und gesunden Spendern.

In Abbildung 18 wird exemplarisch die Lymphozyten-Doppelfärbung von einem gesunden Spender und einem AML-Patienten gezeigt. Abnormalitäten hinsichtlich der zeta-Ketten-Expression in den untersuchten Zellen ließen sich nicht nachweisen. In der Grafik angegeben ist der berechnete prozentuale Anteil an zeta-Ketten positiven Zellen innerhalb der CD3-, CD4-, CD8- und CD56-Population.

Im linken unteren Quadranten sind die CD3⁻/TCR-zeta⁻ Zellen voraussichtlich beim gesunden Spender B-Lymphozyten und Monozyten, beim AML-Patienten B-Lymphozyten und AML-Blasten. Im rechten unteren Quadranten handelt es sich bei den CD3⁻/TCR-zeta⁺ Zellen im Regelfall um NK-Zellen.

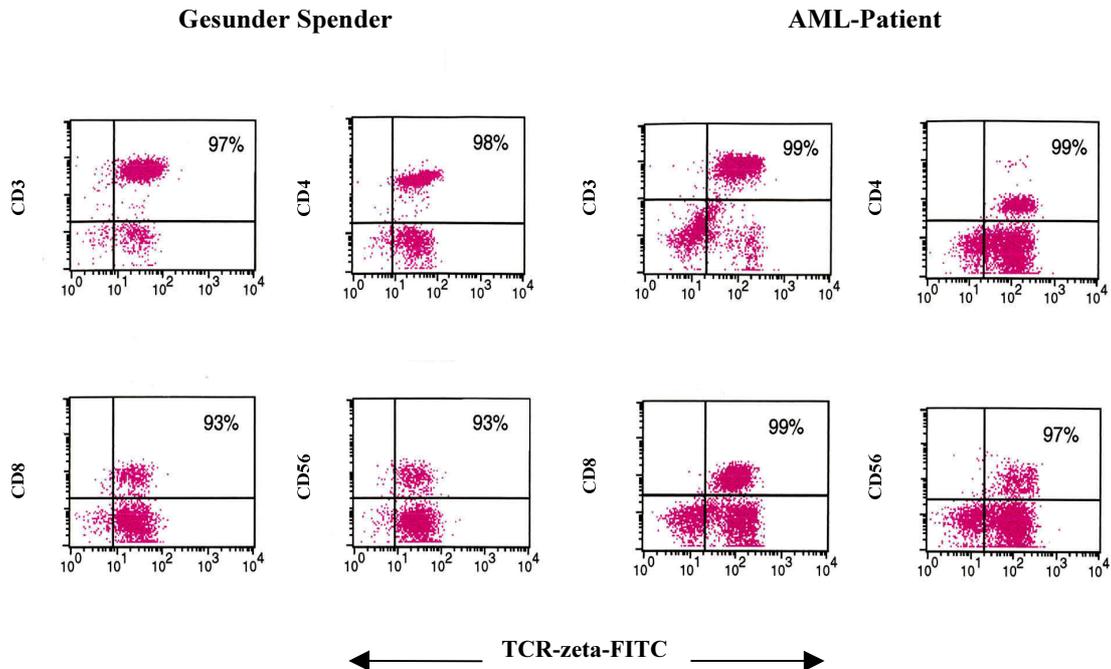


Abbildung 18: Exemplarisch dargestellt ist die Expression der zeta-Kette für einen gesunden Spender (links) und einen AML-Patienten (rechts) bei CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und CD56⁺ NK-Zellen. Angegeben ist die Prozentzahl an zeta-CD3⁺, -CD4⁺, -CD8⁺ T-Zellen bzw. -CD56⁺ NK-Zellen, errechnet nach der unter 2.2.12.2 aufgezeigten Formel.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse von 23 AML-Patienten und von 23 gesunden Spendern. Vereinzelt traten sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten TCR-zeta⁻ Lymphozyten auf. Der maximale Anteil an zeta⁻ Lymphozyten lag bei ca. 40% bei einem Gesunden (x) und einem Patienten (-) im CD8-Kompartiment. Dort zeigten sich auch die stärksten Streuungen bezüglich der zeta-Expression. Im Durchschnitt lag der Anteil an zeta⁺ Lymphozyten bei AML-Patienten geringfügig niedriger als bei Gesunden. TCR-zeta negative Zellen waren bei Patienten, aber auch bei Gesunden vor allem unter den CD8- und CD56-positiven Zellen zu finden, wobei die zeta-Ketten-Expression in den CD56⁺ NK-Zellen gegenüber den CD8⁺ T-Zellen gering erniedrigt war.

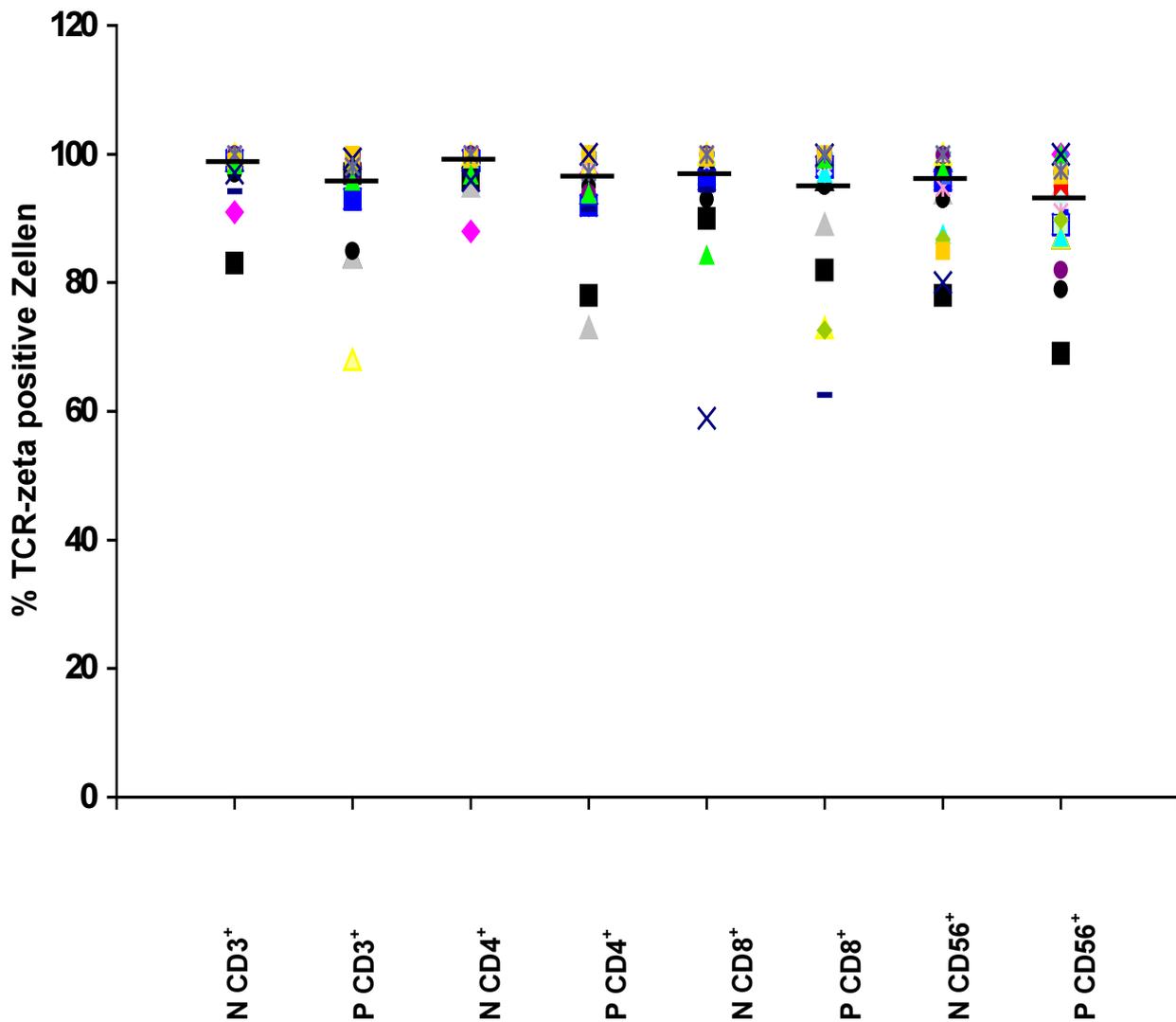


Abbildung 19: Expression der zeta-Kette analysiert mittels Durchflußzytometrie an CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und CD56⁺ NK-Zellen von 23 Normalpersonen (N) und 23 AML-Patienten (P). Die Mittelwerte sind angegeben als waagerechte schwarze Balken. Dargestellt ist die Prozentzahl an zeta-CD3⁺, -CD4⁺, -CD8⁺ T-Zellen und -CD56⁺ NK-Zellen im peripheren Blut von 23 gesunden Spendern und 23 AML-Patienten, errechnet wie unter 2.2.12.2 beschrieben.

Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen Gesunden und Patienten waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei AML-Patienten bzw. gesunden Spendern lagen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der zeta-CD3⁺ T-Zellen: bei $94,7 \pm 7,6\%$ bzw. $97,9 \pm 3,9\%$, der zeta-CD4⁺ T-Zellen: bei $95,4 \pm 6,9\%$ bzw. $98,3 \pm 2,8\%$, der zeta-CD8⁺ T-Zellen: bei $94 \pm 10,6\%$ bzw. $96 \pm 9\%$ und der zeta-CD56⁺ NK-Zellen: bei $92 \pm 7,7\%$ bzw. $95 \pm 6,7\%$.

3.1.8.2 Analyse der CD28-Expression auf PBL

Untersucht wurde die Expression von CD28 auf T-Lymphozyten, welches mit den kostimulatorischen Molekülen auf den APC interagiert und so das zweite Signal darstellt, das zur Aktivierung von T-Lymphozyten benötigt wird. Dabei wurden CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von AML-Patienten und von gesunden Spendern im Durchflußzytometer analysiert (wie unter 2.2.12.1 beschrieben). Die Zellen wurden jeweils mit zwei spezifischen Antikörpern gefärbt, zum einen mit CD28 (FITC markiert) und zum anderen mit CD3, CD4 oder CD8 (PE markiert). Berechnet wurde die Expression wie unter 2.2.12.2 für die TCR-zeta-Kette beschrieben. Verwendet wurden frisch aufgetaute PBMNC von 20 AML-Patienten (Tabelle 7) und von 15 gesunden Spendern.

Tabelle 7: Klinische Charakteristik von 20 AML-Patienten, die bei der phänotypischen Analyse von CD28 auf PBL verwendet wurden

Patient	FAB-Typ	Chromosomale Veränderungen	% Blasten	Klinischer Status	% an CD28 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen
1	sAML	Inversion 16	38	Neu diagnostiziert, unbehandelt	73
2	M2	46XX	60	Neu diagnostiziert, unbehandelt	70
3	M1	46XX	14	Rezidiv nach allo. KMT	66
4	M2	Unbekannt	70	Neu diagnostiziert, unbehandelt	54
5	sAML	Unbekannt	25	Neu diagnostiziert, unbehandelt	53
6	M1	46XX	48	Rezidiv nach 2. allo. KMT	50
7	M5b	46XX	51	Neu diagnostiziert, unbehandelt	48
8	M2	46XY	83	2. Rezidiv nach auto. KMT	46
9	M1	46XY	59	Neu diagnostiziert, unbehandelt	43
10	M1	Trisomie 21	41	Rezidiv nach allo. PBSZT	42
11	sAML	Komplexer Karyotyp	22	Refraktär	40
12	M4	46XX	15	Rezidiv nach 2. auto. KMT	36
13	M2	46XY	83	Refraktär	35
14	M2	Trisomie 13	29	Rezidiv nach 3. KMT	33
15	M4eo	Komplexer Karyotyp	30	Neu diagnostiziert, unbehandelt	31
16	sAML	46XY	22	Refraktär	23
17	sAML	Komplexer Karyotyp	16	2. Rezidiv nach allo. KMT	17
18	M4	46XX	55	Rezidiv nach auto. PBSZT	13
19	M2	46XX	15	Rezidiv nach allo. PBSZT	9
20	M6	46XX	43	Rezidiv, Chemo	9

In Abbildung 20 ist die T-Lymphozyten-Doppelfärbung von einem AML-Patienten (Patient 12 aus Tabelle 7) und einem gesunden Spender dargestellt. Zudem ist der berechnete prozentuale Anteil an CD28-positiven Zellen innerhalb der CD3-, CD4- und CD8-Population angegeben. CD4⁺ T-Zellen sind bei Gesunden und Patienten überwiegend CD28 positiv. CD8⁺ T-Zellen teilen sich in eine CD28⁺ und eine CD28⁻ Population auf. Bei Patienten war die CD28⁻ Population deutlich ausgeprägter als bei Gesunden. Während zum Beispiel, in Abbildung 20 gezeigt, nur 36% der CD8⁺ T-Zellen des Patienten CD28 exprimierten, waren es beim gesunden Spender 80% der CD8⁺ T-Zellen.

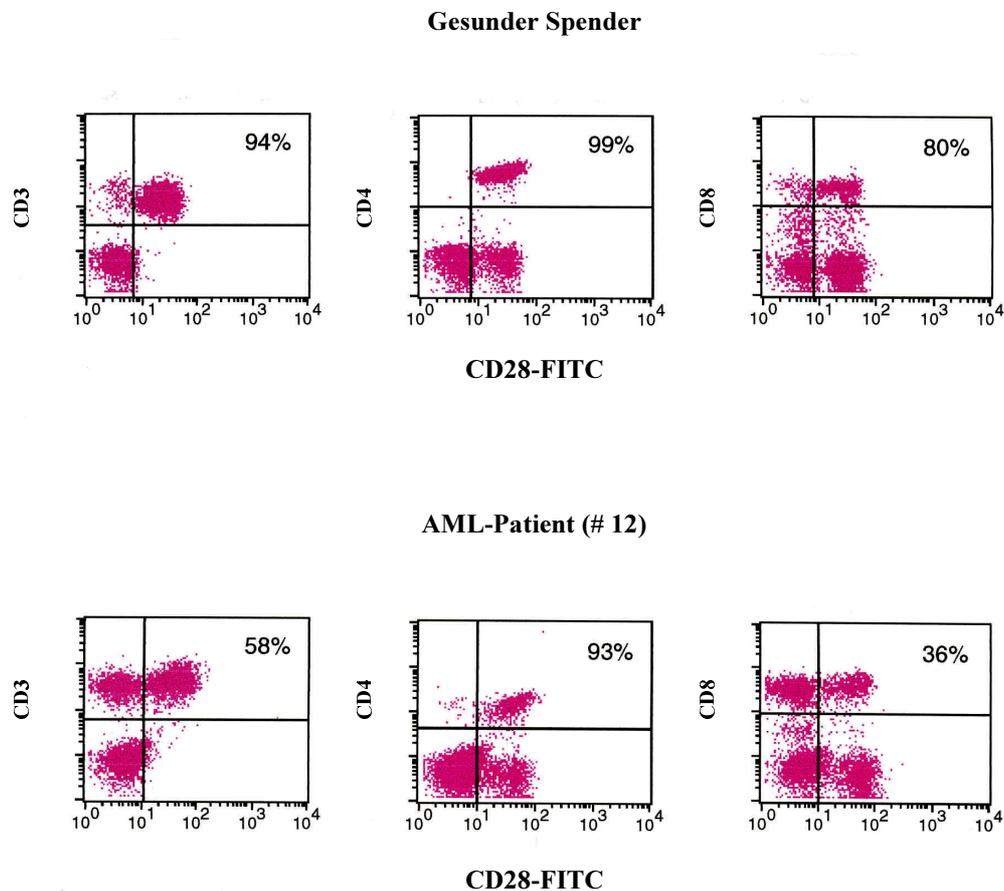


Abbildung 20: CD28-Expression auf CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten bei einem gesunden Spender (oben) und Patient 12 (unten). Die PBL des gesunden Spenders und des AML-Patienten wurden im Durchflußzytometer analysiert und die Prozentzahl an CD28⁺CD3⁺, -CD4⁺ und -CD8⁺ T-Zellen dargestellt.

In einer umfassenden Analyse von 20 AML-Patienten und 15 gesunden Spendern (in Abbildung 21 dargestellt) zeigte sich deutlich, daß AML-Patienten signifikant weniger CD28 in der CD3⁺ Gesamtpopulation und in der CD8⁺ T-Zell-Population aufweisen als gesunde Spender ($p < 0,0001$) bzw. ($p < 0,001$). Bei Patienten zeigte die Expression von CD28 bei den CD3⁺ bzw. den CD8⁺ T-Zellen eine deutliche Streuung. Bei gesunden Spendern war dies nur bei den CD8⁺CD28⁺ T-Zellen zu sehen. Die Bandbreite der CD28-Expression auf den CD3⁺ T-Zellen ergab bei den untersuchten Patienten einen Mittelwert von $61,6 \pm 19\%$, im Gegensatz zu den gesunden Spendern von $86,3 \pm 6,1\%$. Der Mittelwert der CD8⁺CD28⁺ T-Zellen betrug bei AML-Patienten $39,55 \pm 19,11\%$ und bei gesunden Spendern $70,1 \pm 14,4\%$.

Auf den CD4⁺ T-Zellen war weder bei den AML-Patienten noch bei den gesunden Spendern eine deutliche CD28-Negativität auszumachen. Obwohl die Expression des Oberflächenmolekül CD28 bei AML-Patienten, im Gegensatz zu gesunden Spendern, geringfügig erniedrigt war ($p > 0,05$). Die CD28-Expressionsrate auf den CD4⁺ T-Zellen lag für die analysierten Patienten bei $87,9 \pm 9,1\%$, für die gesunden Probanden bei $93 \pm 7,3\%$.

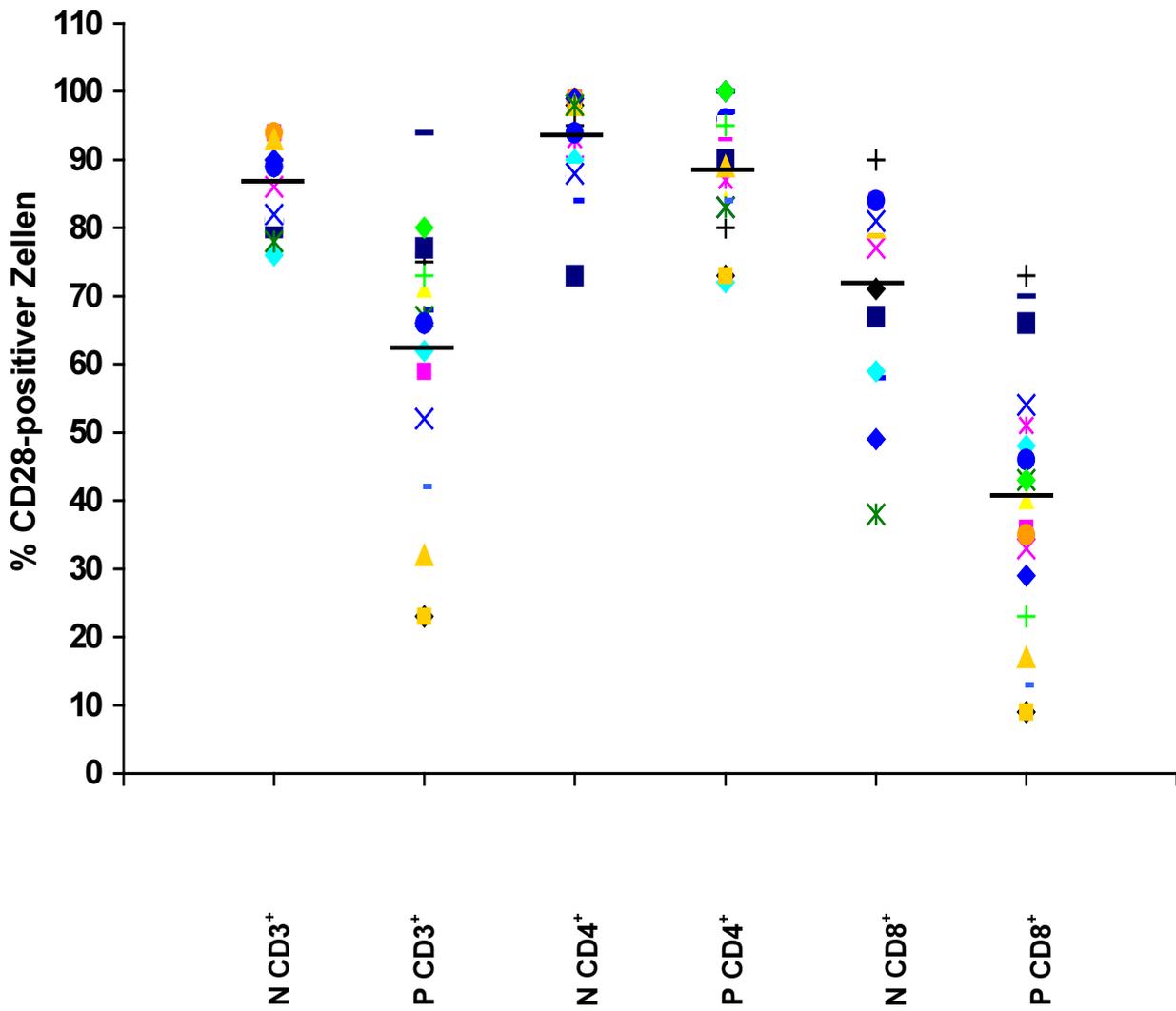


Abbildung 21: CD28-Expression auf CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten. PBL von 15 Normalpersonen (N) und 20 AML-Patienten (P) wurden vergleichend im Durchflußzytometer analysiert und die Prozentzahl an CD28⁺CD3⁺, -CD4⁺ und -CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Die schwarzen waagerechten Balken geben die jeweiligen Mittelwerte an.

Bei dem Versuch, eine Verbindung zwischen der Anzahl an CD28⁺CD8⁺ T-Zellen und den klinischen Merkmalen herzustellen (Tabelle 8) fiel auf, daß die Patienten mit weniger als 40% CD28⁺CD8⁺ T-Zellen refraktär waren, während neudiagnostizierte AML-Patienten mehr als 40% CD28⁺CD8⁺ T-Zellen aufwiesen. Eine Ausnahme stellte Patient 15 dar: Er war neu diagnostiziert, hatte aber weniger als 40% CD28⁺CD8⁺ T-Zellen. Seine Zellen waren nicht funktionell (siehe Tabelle 11).

Tabelle 8: Gegenüberstellung klinischer Merkmale und % an CD28⁺CD8⁺ T-Zellen

% an CD28 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	Klinischer Status	%Blasten	Chromosomale Veränderungen	FAB-Typ	Alter	Patient
≤ 40% CD28⁺CD8⁺ T-Zellen						
40	Refraktär	22	Komplexer Karyotyp	sAML	57	11
35	Refraktär	83	46XY	M2	56	13
33	Refraktär	29	Trisomie 13	M2	29	14
23	Refraktär	22	46XY	sAML	41	16
17	Refraktär	16	Komplexer Karyotyp	sAML	57	17
13	Refraktär	55	46XX	M4	46	18
9	Refraktär	15	46XX	M2	36	19
> 40% CD28⁺CD8⁺ T-Zellen						
73	Neu diagnostiziert, unbehandelt	38	Inversion 16	sAML	22	1
70	Neu diagnostiziert, unbehandelt	60	46XX	M2	56	2
54	Neu diagnostiziert, unbehandelt	70	Unbekannt	M2	22	4
53	Neu diagnostiziert, unbehandelt	25	Unbekannt	sAML	67	5
48	Neu diagnostiziert, unbehandelt	51	46XX	M5b	49	7
43	Neu diagnostiziert, unbehandelt	59	46XY	M1	63	9
31 (CD 8 ⁺ T-Zellen nicht funktionell)	Neu diagnostiziert, unbehandelt	30	Komplexer Karyotyp	M4eo	31	15

AML-Patienten mit fortgeschrittener Leukämie hatten ebenfalls 50% oder weniger als 50% CD28⁺CD8⁺ T-Zellen (Tabelle 9).

Einen Zusammenhang zwischen der CD28-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen und der Blastenzahl, den chromosomalen Veränderungen, der FAB-Klassifikation und den Lebensjahren der Patienten konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Gegenüberstellung klinischer Merkmale und % an CD28⁺CD8⁺ T-Zellen

% an CD28 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	Klinischer Status	% Blasten	Chromosomale Veränderungen	FAB-Typ	Alter	Patient
≤ 50%						
17	2. Rezidiv nach allo. KMT	16	Komplexer Karyotyp	sAML	57	17
42	Rezidiv nach allo. PBSZT	41	Trisomie 21	M1	37	10
9	Rezidiv nach allo. PBSZT	15	46XX	M2	36	19
50	Rezidiv nach 2. allogenen Transplantation (allo. KMT, allo. PBSZT)	48	46XX	M1	32	6
46	2. Rezidiv nach auto. KMT	83	46XY	M2	63	8
36	Rezidiv nach 2. auto. KMT	15	46XX	M4	45	12
13	Rezidiv nach auto. PBSZT	55	46XX	M4	46	18
33	Rezidiv nach der 3. Transplantation (auto. PBSZT, 2 x allo. KMT)	29	Trisomie 13	M2	29	14

3.1.9 Untersuchungen zur Proliferation und Effektorfunktion von CD28⁻ PBL bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern

3.1.9.1 Proliferation der CD28⁻ T-Zellen

Um zu testen, ob eine verminderte CD28-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen mit einer geringeren Proliferationsfähigkeit der Zellen korreliert, wurden T-Lymphozyten-Proliferationstests durchgeführt. Die Fähigkeit der CD28⁻ T-Zellen auf TCR-Stimulus mit Proliferation zu reagieren, wurde durch sogenannte Stimulationsexperimente analysiert. Es wurden zwölf AML-Patienten, deren Prozentzahl an CD3⁺ T-Zellen im peripheren Blut verhältnismäßig normal war und die eine verminderte CD28-Expression auf ihren CD8⁺ T-Zellen aufwiesen, sowie neun gesunde Spender ausgewählt. Isolierte CD8⁺ T-Zellen wurden für 72 Stunden in 96-Lochplatten gegeben, welche mit anti-CD3- bzw. mit anti-CD3/anti-CD28- und anti-CD28-mAK beschichtet waren. Als Kontrollen wurden isolierte CD8⁺ T-Zellen in nicht beschichtete Löcher gegeben. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde durch den Einbau von ³H-Thymidin ermittelt.

Die Abbildung 22 stellt die Proliferationsergebnisse der T-Lymphozyten dar. Eine α CD3- bzw. α CD3/ α CD28-Stimulation führt bei gesunden Spendern zu einer Proliferation der T-Lymphozyten, nicht aber bei den AML-Patienten. Diese besitzen nur ein sehr geringfügiges proliferatives Potential ($p < 0,001$). Eine Stimulation mit anti-CD28-mAK oder ohne mAK löste weder bei den gesunden Spendern noch bei den AML-Patienten eine Proliferation aus. Leichte Proliferationswerte bei den Patienten könnten eventuell auf eine nicht vollständige CD8⁺ T-Zell-Separation (durch residuelle CD4⁺ T-Zellen, die im Regelfall CD28⁺ waren) zurückzuführen sein. Sowohl bei den gesunden Spendern als auch bei den Patienten konnten Unterschiede bei der Stimulation der T-Lymphozyten entweder mit anti-CD3-mAK oder mit anti-CD3/anti-CD28-mAK beobachtet werden. Man hätte erwartet, daß die Stimulation der T-Lymphozyten von gesunden Spender mit anti-CD3/anti-CD28-mAK eine bessere T-Lymphozyten-Proliferation induziert als die Stimulation mit anti-CD3-mAK, allerdings wurde das in diesen Versuchen nicht beobachtet. Da die Stimulation der Patienten T-Lymphozyten mit anti-CD3/anti-CD28-mAK zu einer etwas besseren Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten führte als die Stimulation mit anti-CD3-mAK alleine, wurde diese Kombination bei den nachfolgenden Zytotoxizitätstests (Abbildung 23) zur Aktivierung von PBMNC bzw. isolieren CD8⁺ T-Zellen verwendet.

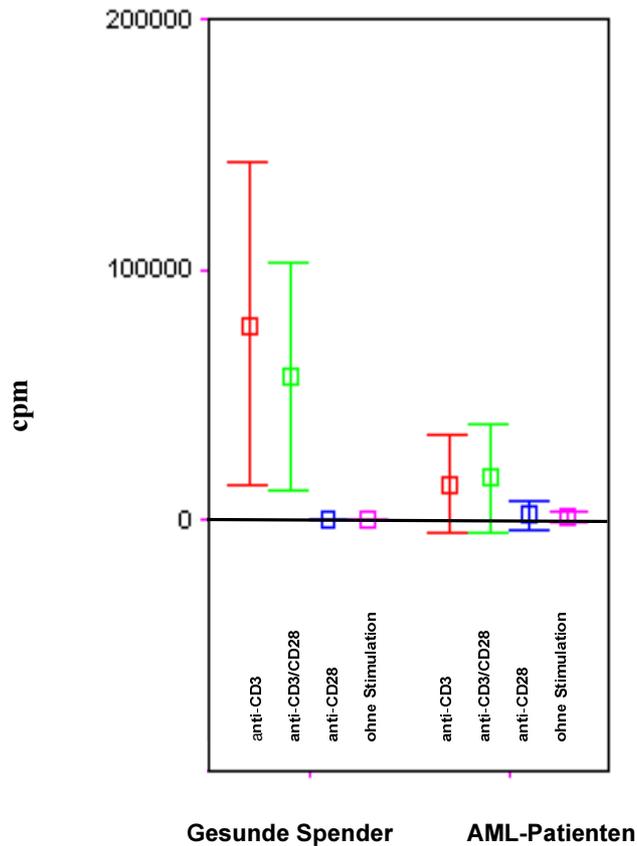


Abbildung 22: Die T-Lymphozyten-Proliferation wurden mit den CD8⁺ T-Zellen von gesunden Spendern und von AML-Patienten durchgeführt. Jeweils 1 x 10⁵ isolierte CD8⁺ T-Zellen wurden pro Loch in 96-Lochplatten gegeben, welche mit anti-CD3-, anti-CD3/anti-CD28- oder anti-CD28-Antikörpern beschichtet worden waren (wie unter 2.2.12.3.1 beschrieben). Die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen auf unbeschichteten Platten diente als negative Kontrolle. Nach drei Tagen Stimulation wurde die T-Lymphozyten-Proliferationsrate durch den Einbau von ³H-Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen gemessen (siehe 2.2.10.1). Die Grafik stellt die gemessenen Radioaktivitätswerte (in cpm) dar, ermittelt aus Triplikaten von Experimenten mit neun gesunden Spendern und 12 AML-Patienten. Gezeigt sind die Mittelwerte (Kästchen) mit ihren Standardabweichungen.

Es wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen der Proliferationsstärke der aktivierten T-Lymphozyten und der CD28-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen herzustellen. Da die Proliferationsraten der T-Lymphozyten sowohl zwischen den einzelnen Patienten als auch zwischen den gesunden Spendern zu sehr schwankten, war dies allerdings nicht möglich (Daten nicht dargestellt). Aufgrund dieser unterschiedlichen Proliferationsraten wurde zur Analyse der ermittelten Daten anstelle des sonst angewandten Student's t-Test, der Mann-Whitney-U-Test für nicht normal verteilte Grundgesamtheiten angewandt.

3.1.9.2 Zytotoxische Funktion und Zytokinsekretion der CD28⁻ T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die erniedrigte Proliferationsfähigkeit der CD8⁺ T-Zellen von AML-Patienten, die auch eine geringe CD28-Expressionsrate aufwiesen, Auswirkungen auf die zytotoxische Kapazität der CD8⁺ T-Zellen hatte, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Untersucht wurden sowohl die Zellen der AML-Patienten als auch die der gesunden Spender (in der Regel CD28⁺).

Außerdem wurde die IFN- γ Produktion der Zellen ermittelt, da IFN- γ von aktivierten T-Lymphozyten produziert wird und möglicherweise mit dem Effektorstatus der Zellen korreliert. Darüberhinaus wurde die Produktion von IL-10 und IL-4 untersucht. IL-10 gilt als immunregulatorisches Zytokin, welches unter anderem die Funktion von CD3⁺ T-Zellen negativ beeinflussen kann. IL-4 wird als TH2-Zytokin angesehen und kann u.a. B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern aktivieren.

Fünf AML-Patienten mit erhöhter Anzahl an CD28⁻CD8⁺ T-Zellen und fünf gesunde Spender wurden auf die zytolytische Aktivität ihrer Zellen bzw. die IFN- γ Produktion ihrer Zellen hin untersucht. Um die zytotoxischen Untersuchungen durchzuführen, wurden zunächst isolierte CD8⁺ T-Zellen, aber auch PBMNC von gesunden Spendern und AML-Patienten mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern für drei Tage aktiviert. Im Anschluß daran ruhten die Zellen für vier Tage, um die Ausreifung zu Effektorzellen zu erlauben. Parallel dazu wurden isolierte CD8⁺ T-Zellen und PBMNC ohne Stimulation kultiviert. Am fünften Tag wurde der Standard-Chromfreisetzungstest durchgeführt. Autologe PBMNC bzw. Blasten, K562-Zellen (sensitiv gegenüber NK/LAK-Lyse) und MT301-Zellen (anti-CD3-"redirected" Zytotoxizität) wurden als Zielzellen verwendet. Die MT301-Zellen dienten als positive Kontrolle für die Zytotoxizität der T-Lymphozyten unabhängig vom antigenen Stimulus.

In Abbildung 23 ist die zytolytische Kapazität der Zellen von Patient # 15 dargestellt. $CD8^+$ T-Zellen und auch PBMNC waren nach $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Stimulation fähig, MT301-Zellen zu lysieren (64% bzw. 58% Lyse), während Zellen ohne Stimulation dazu nicht in der Lage waren. K562-Zellen wurden mit 30% von aktivierten $CD8^+$ T-Zellen erkannt. Die Wahrscheinlichkeit besteht, daß unter den isolierten $CD8^+$ T-Zellen auch $CD8^+$ NK-Zellen waren. Autologe Blasten wurden zu 15% von $CD8^+$ T-Zellen nach $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Stimulation lysiert (die Spezifität der Lyse wurde nicht durch Antikörperblockierung überprüft).

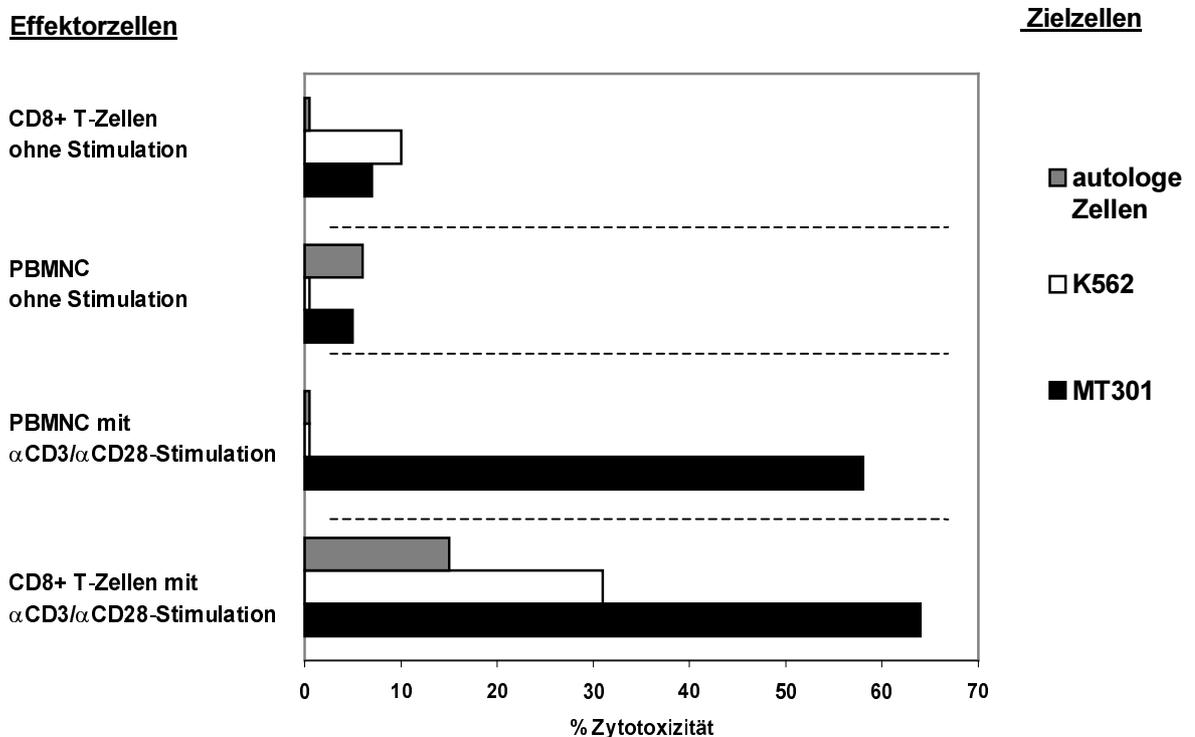


Abbildung 23: Analyse der zytotoxischen Aktivität der T-Lymphozyten von Patient # 15. Isolierte $CD8^+$ T-Zellen und PBMNC wurden durch die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern aktiviert und für vier Tage in komplettem Medium mit 40 U/ml IL-2 ruhen gelassen. Unter denselben Bedingungen wurden isolierte T-Lymphozyten bzw. PBMNC ohne Stimulation kultiviert. Am fünften Tag wurde der Standard-Chromfreisetzungstest durchgeführt (wie unter 2.2.12.4 beschrieben). Als Effektorzellen dienten isolierte autologe $CD8^+$ T-Zellen und autologe PBMNC mit/ohne $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Stimulation, als Zielzellen autologe Blasten, K562-Zellen und MT301-Zellen. Die hier dargestellte E:T Ratio war 20:1.

Die Tabelle 10 stellt die zytotoxische Aktivität der Zellen von vier AML-Patienten im Vergleich zu drei gesunden Spendern dar.

Tabelle 10: Zytotoxizitätstest

Effektorzellen	⁵¹ Cr-markierte Zielzellen	Gesunde Spender			AML-Patienten			
		# 1	# 2	# 3	# 7	# 10	# 15	# 20
		% Lyse			% Lyse			
CD8 ⁺ T-Zellen mit αCD3/αCD28-Stimulation	gegen MT301	43	32	nicht auswertbar	63	22	64	36
	" K562	4	0		47	0	31	0
	" autologe Zellen	0	2		15	0	15	5
PBMNC mit αCD3/αCD28-Stimulation	gegen MT301	44	10	56	46	37	58	60
	" K562	10	6	25	53	6	0	10
	" autologe Zellen	13	4	30	10	0	0	0
CD8 ⁺ T-Zellen ohne Stimulation	gegen MT301	37	8	nicht auswertbar	0	0	5	0
	" K562	50	0		0	0	0	0
	" autologe Zellen	11	11		0	0	6	3
PBMNC ohne Stimulation	gegen MT301	14	3	4	6	4	7	0
	" K562	5	0	0	4	0	12	0
	" autologe Zellen	2	16	16	6	0	0	12

Die Tabelle stellt die zytotoxische Aktivität gegen die autologen PBMNC bzw. AML-Blasten, K562- und MT301-Zellen der isolierten autologen CD8⁺ T-Zellen und autologen PBMNC mit/ohne αCD3/αCD28-Stimulation von Patient # 7, # 10, # 15 und # 20 und von drei gesunden Spendern # 1, # 2 und # 3 dar. Die Zytotoxizität der Zellen wurde in Triplikaten ermittelt und hier dargestellt wurde die E:T Ratio 20:1.

Setzt man die Hintergrundschwankung bei 15% an, dann war eine Lyse nur nach αCD3/αCD28-Stimulation der Zellen deutlich nachzuweisen (mit Ausnahme der nicht aktivierten CD8⁺ T-Zellen des gesunden Spenders # 1). Sowohl aktivierte isolierte CD8⁺ T-Zellen als auch PBMNC zeigten eine lytische Aktivität gegen MT301-Zellen, d.h. das CD3/TCR-Signal ist funktionell an den zytotoxischen Mechanismus gekoppelt. Eine Aussage über Spezifität erlaubt die MT301-gerichtete lytische Aktivität nicht. Erste Hinweise auf Spezifität kann man mit den Zielzellen K562 und autologen Blasten gewinnen. Eine Lyse von K562 (CD8⁺ Zellen der Patienten # 7 und # 15; die PBMNC des Patienten # 7) weist auf NK/LAK-Aktivität hin. Geringe Aktivität gegen autologe Blasten zeigten nur Patienten # 7 und # 15 (15% bei CD8⁺ T-Zellen und 10% bei PBMNC).

Die zwei anderen untersuchten Patienten (# 10 und # 20) konnten keine deutliche Zytotoxizität gegen die autologen Zellen zeigen.

Bei den analysierten Patienten lag die lytische Aktivität der aktivierten CD8⁺ T-Zellen gegen die MT301-Zellen zwischen 22% und 64%, und die der aktivierten PBMNC zwischen 37% und 60%. Die Werte lagen somit mindestens genauso hoch wie bei den gesunden Spendern (die CD8⁺ T-Zellen des gesunden Spenders # 3 waren aufgrund eines methodischen Fehlers nicht in Ordnung und starben schon während der Aktivierung). Ein fundamentaler Defekt in den zytolytischen Mechanismen der untersuchten AML-Zellen konnte mit diesem Test nicht gefunden werden.

Für die Zytokinanalysen wurden Effektorzellen analog den Zytotoxizitätstests mit Zielzellen vereinigt. Als Effektorzellen wurden isolierte autologe CD8⁺ T-Zellen und autologe PBMNC mit/ohne Stimulation von AML-Patienten sowie von gesunden Spendern verwendet, die mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern für sechs Tage aktiviert worden waren. Als Stimulatorzellen für die Zytokinseznernierung dienten autologe PBMNC bzw. AML-Blasten, K562-Zellen und MT301-Zellen.

Am sechsten Tag nach der T-Lymphozyten-Aktivierung wurden folgende Ansätze in 96-Lochplatten vereinigt (jeweils als Triplikate):

- Effektoren ohne Stimulantien
- α CD3/ α CD28-stimulierte CD8⁺ T-Zellen mit den entsprechenden Zielzellen
- α CD3/ α CD28-stimulierte PBMNC mit den entsprechenden Zielzellen
- unstimulierte CD8⁺ T-Zellen mit den entsprechenden Zielzellen
- unstimulierte PBMNC mit den entsprechenden Zielzellen
- Zielzellen ohne Effektoren

Die Ansätze wurden jeweils mit Zellen von AML-Patienten und mit gesunden Spenderzellen durchgeführt.

Nach 48 Stunden wurden die Zytokinüberstände geerntet und im ELISA getestet. Die Zytokinproduktion der Zellen wurde in pg/ml dargestellt. (wie unter 2.2.12.5 beschrieben).

In Tabelle 11 dargestellt ist die IFN- γ Produktion der Zellen von vier AML-Patienten (#7, #10, #15 und #20) und drei gesunden Spendern, die auch bei den Zytotoxizitätstest verwendet wurden. Die IFN- γ Werte der Zielzellen alleine waren unter 5 pg/ml und sind in der Darstellung nicht gezeigt. Einige CD8⁺ T-Zellen bzw. PBMNC produzierten nach α CD3/ α CD28-Stimulation bereits spontan IFN- γ , d.h. ohne Kokultivierung mit den Zielzellen. Diese Werte wurden von den in Kokultur erhaltenen Werten abgezogen.

Tabelle 11: IFN- γ Produktion

Effektorzellen	Zielzellen	Gesunde Spender			AML-Patienten			
		# 1	# 2	# 3	# 7	# 10	# 15	# 20
		pg/ml			pg/ml			
CD8 ⁺ T-Zellen mit α CD3/ α CD28-Stimulation	gegen MT301	112	50	nicht auswertbar	537	60	0	33
	" K562	0	5		0	0	0	0
	" autologe Zellen	0	21		0	0	0	0
PBMNC mit α CD3/ α CD28-Stimulation	gegen MT301	221	59	1088	44	91	331	368
	" K562	0	0	0	76	0	0	0
	" autologe Zellen	0	0	0	0	0	0	5
CD8 ⁺ T-Zellen ohne Stimulation	gegen MT301	681	0	nicht auswertbar	0	0	0	0
	" K562	55	6		0	0	0	0
	" autologe Zellen	95	0		0	0	0	0
PBMNC ohne Stimulation	gegen MT301	0	0	0	0	0	0	0
	" K562	0	4	0	0	0	0	0
	" autologe Zellen	0	0	0	0	0	0	0

Die Tabelle zeigt die IFN- γ Produktion der isolierten autologen CD8⁺ T-Zellen und autologen PBMNC mit/ohne α CD3/ α CD28-Stimulation von Patient # 7, # 10, # 15 und # 20 und von drei gesunden Spendern # 1, # 2 und # 3, die durch die Stimulation mit autologen PBMNC bzw. AML-Blasten, K562- und MT301-Zellen ausgelöst wurde. Die Werte sind die Mittelwerte aus Triplikaten.

Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen und PBMNC sezernierten nach Stimulierung kein IFN- γ (Ausnahme der gesunde Spender # 1). Dieses galt sowohl für die Patienten als auch für die gesunden Spender. Erst nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern konnte mit den MT301 als Zielzellen eine Sezernierung von IFN- γ hervorgerufen werden. Die CD8⁺ T-Zellen des gesunden Spenders # 1 produzierten bereits ohne Stimulation IFN- γ und waren auch zytotoxisch (siehe Tabelle 10).

Dies könnte möglicherweise durch eine bereits in vivo herbeigeführte Aktivierung (Infektion) erklärbar sein. FACS-Daten hinsichtlich Aktivierungsmarker sind nicht vorhanden.

Autologe Zellen lösten nur bei den aktivierten CD8⁺ T-Zellen des gesunden Spender # 2 eine IFN- γ Sezernierung aus. Der Patient # 7 zeigte als einziger eine deutliche Aktivität gegen K562-Zellen; diese reflektiert sich sowohl in der zytotoxischen Aktivität der α CD3/ α CD28-stimulierten CD8⁺ T-Zellen und PBMNC (siehe Tabelle 10), als auch bei der IFN- γ Sezernierung der α CD3/ α CD28-stimulierten PBMNC (Tabelle 11).

Bei Patient # 15 war keine IFN- γ Sezernierung der isolierten CD8⁺ T-Zellen nach Stimulierung auszumachen. Dieser Patient war bereits vorher bei der Untersuchung der CD28-Expression aufgefallen. Er hatte weniger als 40% CD28⁺CD8⁺ T-Zellen und glich damit eher den refraktären Patienten. Die PBMNC Gesamtpopulation konnte mit α CD3/ α CD28 stimuliert werden. Dies ist vermutlich auf die CD4⁺ T-Zellen innerhalb der PBMNC Population zurückzuführen (siehe Tabelle 8).

Parallel zu IFN- γ wurde auch IL-10 und IL-4 in den Kulturüberständen bestimmt. Weder bei Gesunden noch bei Patienten wurde eine Produktion von IL-10 und IL-4 überzeugend nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.1.9.3 Aktivierungszustand der CD28⁻ T-Zellen

Um Aufschluß über den Aktivierungszustand der CD8⁺ T-Zellen von AML-Patienten und gesunden Spendern zu erhalten, wurden sie vor und/oder nach α CD3/ α CD28-Stimulation mit Fluoreszenz-markierten CD69- und CD25-mAK gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert (wie unter 2.2.12.1 beschrieben).

CD69 ist eines der ersten Oberflächenantigene, das nach Aktivierung der T-Lymphozyten auf der Zellmembran hochreguliert wird. CD25, die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, folgt mit verzögerter Kinetik.

Gleichzeitig wurden die PBL auch auf die Expression von CD27 hin untersucht (wie unter 2.2.12.1 beschrieben). CD27 gehört zur TNF-Familie und kann zur Unterscheidung naiver ($CD27^+$) und Gedächtnis-T-Lymphozyten ($CD27^+$) von Effektorzellen ($CD27^-$) benutzt werden.

Aus Tabelle 12 wird ersichtlich, daß das Oberflächenmolekül CD25 auf $\alpha CD3/\alpha CD28$ -stimulierten Zellen sowohl bei AML-Patienten als auch bei gesunden Spendern in ähnlichem Maße exprimiert wird. Dagegen ist das frühe Aktivierungsmolekül CD69 nach $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Stimulation bei Patienten wesentlich stärker exprimiert als bei gesunden Spenderzellen. Dieses könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, daß die CD69-Expression bei gesunden Spendern schon rückläufig war, die bei Patienten aber noch nachweisbar, da ihre CD69-Expression insgesamt stärker ausgefallen war. Eine sehr geringe Prozentzahl an $CD69^+$ T-Zellen wurde bei Patienten schon vor der $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Stimulation gefunden, möglicherweise hervorgerufen durch das Ergebnis einer In vivo-Aktivierung.

Sowohl AML-Patienten als auch gesunde Spender hatten nach Aktivierung weniger an $CD27^+/CD3^+$ T-Zellen als vor Aktivierung, was eine Differenzierung in Effektorzellen durch die Aktivierung bedeuten könnte. Die AML-Patienten hatten bereits vor Aktivierung weniger $CD27^+$ T-Zellen. Dies könnte möglicherweise dadurch bedingt sein, daß durch die Tumorzellen bereits in vivo eine Stimulation und damit Aktivierung der Lymphozyten ausgelöst worden war (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Phänotypische Untersuchung von Aktivierungsmarkern auf isolierten $CD8^+$ T-Zellen

	Gesunde Spender		AML-Patienten	
	vor Aktivierung	nach Aktivierung	vor Aktivierung	nach Aktivierung
$CD3^+/CD69^+$	0%	$12 \pm 5\%$	$6 \pm 0\%$	$47 \pm 19\%$
$CD3^+/CD25^+$	0%	$50 \pm 18\%$	0%	$54 \pm 23\%$
$CD3^+/CD27^+$	$74 \pm 15\%$	$60 \pm 15\%$	$53 \pm 17\%$	$<44 \pm 23\%$

Dargestellt ist die Prozentzahl an positiven Zellen der isolierten $CD8^+$ T-Zell-Population vor und nach $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Stimulation. Die Zellen wurden mit den entsprechenden immunfluoreszierenden monoklonalen Antikörpern anti-CD3 und mit anti-CD69, anti-CD25 und anti-CD27 markiert und im Durchflußzytometer analysiert. Mittelwerte von Analysen mit fünf AML-Patienten (mit erhöhter Anzahl an $CD28^+CD8^+$ T-Zellen) bzw. mit fünf gesunden Spendern (in der Regel mit $CD28^+CD8^+$ T-Zellen).

Betrachtet wurden außerdem die Oberflächenantigene CD45RA und CD45RO (wie unter 2.2.12.1 beschrieben). Das CD45-Antigen (common leukocyte Antigen) kommt in mehreren Isoformen vor. Naive T-Lymphozyten, aber auch Effektorzellen, können das Antigen CD45RA auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, während Gedächtnis-T-Lymphozyten meist das CD45RO-Antigen exprimieren.

In Tabelle 13 ist dargestellt, daß bei AML-Patienten im Durchschnitt mehr CD45RA⁺ T-Zellen in der CD8⁺ T-Zell-Population vorhanden waren als bei gesunden Spendern. Ein Hinweis darauf, daß die Patienten mehr naive T-Lymphozyten oder verstärkt Effektorzellen, eventuell hervorgerufen durch die Gegenwart von antigenen Stimuli in vivo, in ihrer CD8⁺ Population aufweisen als gesunde Spender.

Tabelle 13: Unterscheidung von isolierten CD8⁺ T-Zellen in naive und Gedächtnis-T-Lymphozyten

	Gesunde Spender	AML-Patienten
CD3⁺/CD45RA⁺	40 ± 21%	64 ± 8%
CD45RO⁺	22 ± 14%	16 ± 12%

Phänotypische Analyse von isolierten CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt ist die Prozentzahl an positiven Zellen. Mittelwerte von elf AML-Patienten (mit erhöhter Anzahl an CD28⁻CD8⁺ T-Zellen) bzw. von elf gesunden Spendern (in der Regel mit CD28⁺CD8⁺ T-Zellen) liegen dieser Tabelle zugrunde.

4. Diskussion

4.1 Experimentelle Untersuchungen

4.1.1 Generierung von DC aus AML-Blasten in vitro

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, haben in den letzten Jahren Fortschritte bei der Therapie von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zu einer deutlichen Verbesserung der Remissions- und Überlebensraten geführt. Trotz des Einsatzes intensiver Chemotherapien, die eine Remission bei 60-85% der AML-Patienten bewirken, ist das Langzeitüberleben der Patienten immer noch sehr gering, es liegt nur bei 40% (Löwenberg 1999). Daher ist die Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen, die in der Lage sind, Probleme wie z.B. die Chemoresistenz von Tumorzellen ("Multiplerdrug resistance", MDR) zu umgehen, sehr stark gefragt. Es sind vor allem Therapieansätze notwendig, welche die Heterogenität der AML berücksichtigen und die in der Lage sind, zielgerichtet gegen die Leukämiezellen vorzugehen. Meine Arbeit beschäftigte sich deshalb mit dem Einsatz von Immun-Effektorzellen, wie z.B. den zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). In vivo sind sie bei der Kontrolle der AML involviert, was durch den Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL-Effekt) bei allogener Knochenmarkstransplantation (KMT) veranschaulicht wurde (Antin 1993, Horowitz 1990).

Für die Stimulierung von Leukämie-spezifischen CTL benötigt man antigen-präsentierende Zellen (APC), die nicht nur eine effiziente Antigenpräsentation über MHC-Komplexe gewährleisten, sondern auch kostimulatorische Signale liefern können. Einer der Hauptgründe, warum AML-Blasten in vivo nicht effizient von T-Lymphozyten eliminiert werden, ist die bereits erwähnte Tatsache, daß mehr als 70% der AML-Blasten die wichtigen kostimulatorischen Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 nicht exprimieren (Costello 1998, Hirano 1996, Law 1990). Diese sind für die Auslösung des zweiten Aktivierungssignals für T-Lymphozyten jedoch erforderlich. Ohne dieses Signal kann es zur sogenannten T-Zell-Anergie kommen. Das bedeutet, daß die T-Lymphozyten nicht mehr durch spezifische Antigene aktiviert werden können, selbst wenn diese von dendritischen Zellen (DC) präsentiert werden (Gribben 1996, Boussiotis 1995, Boussiotis 1993).

Eine der Möglichkeiten, dieses Defizit an fehlenden kostimulatorischen Molekülen auszugleichen, ist, AML-Blasten durch Kultivierung mit bestimmten Zytokinen so zu manipulieren, daß diese selbst in der Lage sind, T-Lymphozyten *in vitro* zu stimulieren. Der große Vorteil dieser Methode ist, daß alle möglichen Leukämie-spezifischen Tumorantigene, ohne sie zuvor identifizieren zu müssen, durch die differenzierten AML-Blasten präsentiert werden, und somit die Möglichkeit zur Generierung von Leukämie-spezifischen CTL maximiert wird. Ein wesentliches Ziel dieser Doktorarbeit war es deshalb, zu zeigen, daß aus AML-Blasten funktionale "leukämische" DC generiert werden können. Diese DC sollten dann in der Lage sein, Leukämie-reaktive T-Lymphozyten zu stimulieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es trotz unterschiedlichster FAB-Klassifikationen, Blastenzahlen, chromosomalen Veränderungen und klinischen Verläufen bei 77% der AML-Patienten möglich war, funktionale DC zu generieren. Hierzu wurden die PBMNC (CD34⁺ Zellen/Monozyten) mit GM-CSF, IL-4, TNF- α sowie mit und ohne FLT-3-Ligand kultiviert. Die erfolgreiche Herstellung von DC wurde durch Untersuchungen der Zellmorphologie, Immunophänotypisierung mit klassischen DC-Markern, sowie über die Funktionalität der Zellen nachgewiesen. Hierbei war es besonders interessant, den Einfluß des Zytokins FLT-3-Ligand zu untersuchen. Vor Beginn meiner Arbeit war bekannt, daß FLT-3-Ligand die Kapazität besitzt, diejenigen AML-Blasten zur Proliferation anzuregen, welche den FLT-3-Ligand-Rezeptor tragen. FLT-3-Ligand fördert das Überleben der Zellen und unterdrückt die Apoptose von AML-Blasten *in vitro* (Stacchini 1996, Drexler 1996, Birg 1992). Hinzu kommt, daß FLT-3-Ligand synergistisch mit anderen Zytokinen wie GM-CSF, G-CSF und SCF wirkt, so daß größere Mengen an DC aus CD34⁺ Zellen generiert werden können (Strobl 1996, Szabolcs 1995). Da die meisten AML-Blasten CD34 positiv sind, wurde postuliert, daß durch FLT-3-Ligand in meinem Differenzierungssystem mehr DC generiert werden könnten. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente bestätigten diese Hypothese. Die Ausbeute an DC in den Kulturen mit GM-CSF, IL-4, TNF- α und FLT-3-Ligand war signifikant höher als in den Kulturen ohne FLT-3-Ligand. Die endgültige absolute Anzahl an DC variierte zwischen den einzelnen Patienten stark. Zwischen der Anzahl an AML-Blasten (CD34⁺) oder dem klinischen Status zu Kultivierungsbeginn auf der einen Seite und der Endausbeute an differenzierten DC auf der anderen Seite war keine Korrelation auszumachen.

Diejenigen DC, welche mit FLT-3-Ligand generiert wurden, zeigten eine typische DC-Morphologie und bei 80-95% von ihnen konnte mittels FISH nachgewiesen werden, daß sie leukämischen Ursprungs waren.

Bei 23% der AML-Patienten war es nicht möglich, mit einer der beiden Zytokinkombinationen DC zu generieren. Entweder starben die Zellen ziemlich rasch in Kultur oder sie zeigten sowohl morphologisch als auch phänotypisch keine Merkmale von reifen DC. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Gruppen gemacht (Harrison 2001, van Rhee 1998, Porter 1996). Es gab, sowohl klinisch als auch phänotypisch betrachtet, keine eindeutigen Hinweise, weswegen es nicht möglich war, von diesen AML-Patienten DC zu generieren. Ein möglicher Grund könnte die Produktion von IL-10 oder TGF- β durch die AML-Blasten selbst gewesen sein. Dies könnte eine eventuelle immunsuppressive Wirkung auf die Blasten gehabt haben (Pawelec 1997, Bruserud 1995, Bergmann 1995, Taetle 1993). Der Einfluß dieser Zytokine sollte bei zukünftigen Untersuchungen durch die entsprechenden ELISA überprüft werden.

Der phänotypische Vergleich der gewonnenen "leukämischen" DC mit frisch aufgetauten AML-Zellen zeigte, daß die wichtigen kostimulatorischen Moleküle wie CD86, CD80 und CD40 deutlich stärker auf den DC exprimiert wurden. Auch die Expression von CD83 und CD1a war signifikant erhöht. Die Expression von HLA-ABC auf den DC, die mit oder ohne FLT-3-Ligand generiert worden waren, war im Vergleich zu den naiven AML-Blasten signifikant erniedrigt. Ein Vergleich der DC, die ohne bzw. mit FLT-3-Ligand generiert worden waren, zeigte, daß es mit FLT-3-Ligand zu einer signifikant höheren Expression von HLA-ABC, aber auch von CD40 und CD83 kam. Die Expression von CD80, CD86, CD1a, CD33 und HLA-DR war in beiden DC-Gruppen vergleichbar.

Eine Reduktion der HLA-ABC-Expression bei der Differenzierung von AML-Blasten in "leukämische" DC ist bisher nicht beschrieben worden. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind unbekannt. Arbeiten von Cignetti (1999), Costello (1998) und Hirano (1996) beschreiben die HLA-Klasse-I-Expression bei AML-Patienten. Diese Arbeitsgruppen zeigten eine erhöhte Expression von HLA-ABC auf naiven AML-Blasten.

Eine reduzierte Expression oder gar die Abwesenheit von HLA-ABC, wie sie für viele Tumorformen (Yue 1997) beschrieben ist, scheint bei AML-Patienten kein offensichtliches Problem zu sein. Eine mögliche Erklärung für die hohe Expression von HLA-ABC auf naiven AML-Blasten könnte ein Immunausweichmechanismus gegenüber NK-Zellen sein, da HLA-ABC negative Zellen bekannterweise sensitiv für NK-Lyse sind (Sette 2001, Hicklin 1999). Somit könnte die erniedrigte HLA-ABC-Expression auf umdifferenzierten DC-AML-Blasten eine Rückregulierung auf den "Normalzustand" darstellen. Die interessante Beobachtung, daß die verminderte Expression von HLA-ABC-Molekülen in den Kulturen ohne FLT-3-Ligand ausgeprägter war als in den Kulturen mit FLT-3-Ligand, könnte somit bedeuten, daß es sich bei den mit FLT-3-Ligand generierten DC um reifere Zellen handelt. Denn reifere DC exprimieren verstärkt HLA-ABC auf ihrer Membranoberfläche (Banchereau 1998). Für diese Hypothese spricht, wie bereits erwähnt, die erhöhte Expression von CD83 auf den DC, die mit FLT-3-Ligand generiert wurden, im Gegensatz zu den ohne FLT-3-Ligand generierten DC. Es könnte daher von großer Bedeutung sein, den zugrundeliegenden Mechanismus zu erforschen, der für die erhöhte Expression von HLA-ABC auf leukämischen DC, generiert mit FLT-3-Ligand, verantwortlich ist.

Die mit FLT-3-Ligand generierten DC zeigten phänotypisch signifikante Unterschiede in der Expression von HLA-ABC, CD40 und CD83 zu den DC, die ohne FLT-3-Ligand generiert wurden. Allerdings kamen diese Unterschiede hinsichtlich ihrer immunstimulatorischen Kapazität weder in den autologen noch in den allogenen, gemischten Lymphozyten-Reaktionen (MLR) zum Tragen. Die aus beiden Zytokingruppen generierten DC waren sowohl in den autologen als auch in den allogenen MLR gleichermaßen fähig, eine signifikante T-Zell-Proliferation auszulösen. Frisch aufgetaute Blasten besaßen hingegen so gut wie keine Kapazität, T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen, trotz der hohen HLA-Klasse-I-Expression.

4.1.2 Zytotoxizität von T-Lymphozyten, die durch Stimulation mit "leukämischen" DC generiert wurden

Eine wichtige Frage im Rahmen dieser Doktorarbeit war es nun, ob die generierten DC in der Lage sind, Leukämie-spezifische CTL gegen AML-Blasten *in vitro* zu stimulieren.

Außerdem sollte untersucht werden, ob T-Lymphozyten, die mit DC aus FLT-3-Ligand Kulturen differenziert wurden, andere zytotoxische Eigenschaften aufwiesen als T-Lymphozyten, die mit DC ohne FLT-3-Ligand differenziert wurden. Von mehr als 60% der AML-Patienten war es möglich, CTL mit Hilfe der aus AML-Blasten differenzierten DC als Stimulatoren zu generieren. Diese CTL waren in der Lage, Zielzellen vom leukämischen Klon, wie die AML-Blasten (gewonnen zum Zeitpunkt der Diagnose), zu lysieren. Diese Lyse erfolgte überwiegend durch CD8⁺ T-Zellen, gezeigt durch Blockierungsexperimente mit HLA-Klasse-I-spezifischen Antikörpern. Die CTL zeigten keine lytische Aktivität gegen HLA-identische und HLA-nicht-identische Zielzellen, die nicht leukämischen Ursprungs waren. Es gab keine nennenswerten Unterschiede zwischen den CTL, die mit DC aus Kulturen mit oder ohne FLT-3-Ligand stimuliert wurden, bezüglich ihrer Fähigkeit, AML-Blasten zu lysieren. In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, daß es durch die Kultivierung von peripheren AML-Blasten mit einem Zytokincocktail, welcher FLT-3-Ligand beinhaltete, möglich war, den Defekt an nicht exprimierten kostimulatorischen Molekülen zu korrigieren und CTL in vitro zu generieren, die AML-Blasten erkennen und zerstören können.

Allerdings hatte ich bei den durchgeführten CTL-Studien keinen direkten Beweis, daß die Antigene, die erkannt wurden, AML-spezifisch waren. Aber die Proliferation der autologen T-Lymphozyten nach Stimulation durch die "leukämischen" DC (autologen MLR), die von Harrison et al. (2001) bestätigt wurden, sowie die Induktion der AML-gerichteten zytotoxischen Immunantwort, ließen darauf schließen, daß die "leukämischen" DC konstitutiv AML-spezifische Antigene exprimieren, wie auch die AML-Blasten, die im Chromfreisetzungstest als Zielzellen fungierten. Es wäre daher in weiteren Studien sehr interessant, die Antigene zu charakterisieren, die für die beobachtete T-Zell-Immunität verantwortlich waren. Denn bislang konnten für die Mehrheit der akuten myeloischen Leukämien keine AML-spezifischen Tumorantigene identifiziert werden, die fähig wären, eine Leukämie-spezifische CTL-Antwort zu induzieren. Wie bereits erwähnt wurden bislang in vitro induzierte T-Zell-Reaktionen gegenüber Proteinase 3 beschrieben, welche in einigen myeloischen Leukämien über-exprimiert ist (Molldrem 1996), oder gegen das Fusionsprotein PML/RAR-alpha, welches bei der akuten Promyelozytenleukämie vorkommt (Bocchia 1995).

Eine Alternative zu dem Ansatz in dieser Arbeit, nämlich der Stimulation von Leukämie-reaktiven CTL in vitro durch in Kultur generierte "leukämische" DC, könnte die Generierung von CTL in vivo, durch die Behandlung von AML-Patienten mit FLT-3-Ligand, z.B. in Kombination mit GM-CSF, darstellen. Phänotypische Analysen von DC aus Mäusen, die in vivo mit FLT-3-Ligand behandelt wurden, zeigen, daß es sowohl zur Expansion von "lymphoiden" als auch von myeloischen DC kam (Maraskovsky 1996). Die Behandlung mit GM-CSF hingegen bewirkte nur die Expansion von myeloischen DC in Mäusen (Brasel 1997). Pawlowska et al. (2001) konnten sogar zeigen, daß die Gabe von FLT-3-Ligand in vivo, bei naiven und transplantierten Mäusen einen effektiven Schutz gegen AML bewirkt. Auch bei gesunden Spendern wurde das Zytokin FLT-3-Ligand bereits eingesetzt und resultierte in einer signifikant höheren Anzahl an DC im peripheren Blut (Lebsack 1998). Allerdings könnte FLT-3-Ligand beim Patienten auch zu einer verstärkten Proliferation der AML-Blasten führen, was eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs zur Folge hätte. Vor einem Einsatz von FLT-3-Ligand in vivo sind daher genaue Vortests nötig, um positive und negative Aspekte abwägen zu können.

Auf jeden Fall stellt die adoptive Immuntherapie mit CTL, die relativ spezifisch gegen leukämische Zellen vorgeht, eine alternative Methode dar, um rezidierte AML-Patienten zu behandeln. Sie könnte auch gegen die "minimal residual disease" (MRD) bei Patienten in Remission eingesetzt werden, um auf Dauer eine stabile Remission zu erreichen. In vivo stellt der T-Lymphozyten-vermittelte GvL-Effekt bei allogener KMT ein entscheidendes Kriterium für den Behandlungserfolg bei AML-Patienten dar (Marmont 1991, Poynton 1988, Gale 1984, Truitt 1983). Weitere Hinweise, die aufzeigen, daß T-Lymphozyten bei der Bekämpfung von AML-Blasten eine wichtige Rolle einnehmen, kommen von Studien, in denen allogene T-Lymphozyten erfolgreich eingesetzt wurden. Dort konnten hämatologische Remissionen bei bis zu 25% der AML-Patienten erreicht werden (Kolb 1999). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Verabreichung von Spenderlymphozyten allerdings nicht ohne Risiko, da eine hohe Anzahl der Patienten eine schwere Graft-versus-Host-Disease (GvHD) oder eine Knochenmarkhypoplasie entwickeln.

Für den adoptiven Transfer von Leukämie-spezifischen CTL spricht außerdem, daß die AML-Blasten, unabhängig ihrer FAB-Klassifikationen oder ihrer zytogenetischen Abnormalitäten, zu DC generiert werden konnten. Dieses könnte bedeuten, daß auch bei Patienten mit ungünstigem Karyotyp (wie der Monosomie 7 oder 8) und somit schlechter Prognose, eine erfolgreiche Behandlung mit CTL möglich wäre. Auch die Ergebnisse von Kolb et al. (2003) weisen darauf hin, daß die adoptive Immuntherapie in Form von DLI wahrscheinlich unabhängig von den gängigen Risikofaktoren ist.

Da schon andere Gruppen versuchten, Leukämie-spezifische CTL in vitro zu generieren, war aus Studien von Choudhury et al. (1998) und anderen (Charbonnier 1999, Robinson 1998, Santiago-Schwarz 1994) bereits bekannt, daß es möglich war, aus peripheren Blutzellen oder isolierten CD34⁺ Blasten von AML-Patienten in vitro funktionale DC in Gegenwart von verschiedenen Zytokinen wie GM-CSF, IL-4, TNF- α , SCF und IL-6 zu generieren. In einigen Fällen waren diese "leukämischen" DC in der Lage, ohne zusätzliche exogene Antigene eine anti-leukämische Reaktion in autologen T-Lymphozyten hervorzurufen. Das in meiner Arbeit vorgestellte System zur Generierung von "leukämischen" DC unterscheidet sich von dem anderer Gruppen darin, daß das Zytokin FLT-3-Ligand verwendet wurde. Mit FLT-3-Ligand in Kultur erhielt man aus peripheren Blutzellen von AML-Patienten eine signifikant größere Ausbeute an "leukämischen" DC als in den Kulturen ohne FLT-3-Ligand. Mit dieser Anzahl "leukämischer" DC ist es somit möglich, in kürzester Zeit größere Mengen an CTL zu generieren. Da für Patienten mit rezidivierter AML nach allogener KMT der Zeitraum zum Einsatz adoptiver Immuntherapie aufgrund der sehr rasch und progressiv fortschreitenden Erkrankung sehr gering ist, könnte die schnelle Generierung und Verabreichung von AML-spezifischen CTL einen entscheidenden Vorteil bei der klinischen Anwendung darstellen.

4.1.3 Generierung von Fusionszellen aus DC und AML-Blasten in vitro

Eine weitere Möglichkeit, um Leukämie-spezifische MHC/Peptid-Komplexe und kostimulatorische Moleküle auf einer Zelle zu vereinigen, ist die Fusion von DC mit Leukämiezellen.

Diese generierten Fusionszellen sollten die Fähigkeit besitzen, CTL gegen AML-Blasten *in vitro* zu aktivieren. Ein Vorteil der Fusion von DC mit Tumorzellen ist die Induktion einer polyklonalen Immunantwort, ausgelöst sowohl durch die schon bekannten als auch durch die noch nicht identifizierten Tumorantigene (Gong 1997). Ein anderer positiver Aspekt könnte sein, daß durch die Fusionsmethode die Heterogenität der AML in den Hintergrund tritt. Die Stimulierung von CTL *in vitro*, induziert durch Fusionszellen, wurde u.a. für Patienten mit Brust- und Eierstockkrebs (Gong 2000 a und b) gezeigt.

Um eine Fusion von zwei Zellmembranen zu erreichen, kann man Polyethylenglykol (PEG) verwenden. Die Elektrofusion stellt eine weitere Möglichkeit dar (Lindner 2002). Sowohl autologe als auch allogene DC können fusioniert werden. Beide sind, fusioniert mit Tumorzellen, in der Lage, die Tumorantigene des Patienten über MHC-Klasse-I-Moleküle zu präsentieren und somit $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren. Autologe DC, fusioniert mit den entsprechenden Tumorzellen, können außerdem über MHC-Klasse-II-Moleküle Antigene präsentieren, und somit $CD4^+$ T-Helfer-Zellen aktivieren. Bei der Fusion von Tumorzellen mit allogenen DC erfolgt die anschließende Stimulation von autologen T-Lymphozyten über die Präsentation der Tumor-abhängigen MHC-Moleküle. Im Gegensatz zu den autologen DC sind die allogenen DC nach einer Fusion in der Lage, über allogene MHC-Klasse-I- bzw. über allogene MHC-Klasse-II-Moleküle alloreaktive $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren (Kufe 2000). Schendel et al. (2000) zeigten außerdem, daß sich in Folge einer alloreaktiven T-Zell-Antwort auch Tumor-spezifische CTL *in vitro* entwickeln können. Aktivierte allogene T-Helfer-Zellen tragen durch die Sezernierung von Zytokinen zu einem komplexen Zytokinmilieu und somit zur Aktivierung und Proliferation von CTL bei, die dann in der Lage sind, spezifisch Tumorzellen zu lysieren. Daß die Unterstützung von T-Helfer-Zellen bei der Induktion von CTL unumgänglich ist, wurde auch durch verschiedene Hybridomzellstudien (Gong 1997, Stuhler 1994) belegt. Gong et al. (2000 a) untersuchten die proliferative Kapazität von autologen T-Lymphozyten, die mit Fusionszellen, bestehend aus allogenen DC fusioniert mit Karzinomzellen, stimuliert wurden. Des weiteren fusionierten sie autologe DC mit Karzinomzellen. Dabei zeigte sich eine verstärkte Proliferation der autologen T-Lymphozyten nach der Stimulation mit Fusionszellen, die aus allogenen DC generiert worden waren, im Vergleich zu Fusionszellen mit autologen DC.

Aus diesen Gründen wurden bei den in dieser Arbeit durchgeführten Fusionsexperimenten allogene DC von gesunden Spendern, die monozytären Ursprungs waren, mittels PEG mit autologen Leukämiezellen fusioniert. Um zu testen, ob die in vitro generierten leukämischen Fusionszellen funktionale Zellen sind, wurden sie hinsichtlich ihrer Kapazität, autologe T-Lymphozyten zu stimulieren, untersucht. Nicht untersucht wurde die Spezifität der T-Zell-Antwort. Es wurden DC von HLA-identischen Spendern mit AML-Blasten fusioniert. In den Stimulationsexperimenten mit diesen Fusionszellen wurde kaum eine Proliferation der autologen T-Lymphozyten erreicht. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, daß die Leukämie-spezifischen Antigene nicht ausreichend oder nur teilweise durch die Fusionszellen präsentiert wurden. In Vergleichsansätzen wurden DC zur Fusion verwendet, die sich in 2 von 6 bzw. in 3 von 6 HLA-Merkmalen von den verwendeten AML-Blasten unterschieden. So wurde eine gute (bei 2 von 6 Unterschieden) bzw. eine sehr gute (bei 3 von 6 Unterschieden) Proliferation der T-Lymphozyten erreicht, die autolog zu den AML-Blasten waren. Wahrscheinlich proliferierten die T-Lymphozyten aufgrund der Stimulation durch die allogenen MHC-Moleküle (Alloreaktivität), und nicht oder nur teilweise wegen der über die autologen MHC-Moleküle dargebotenen Antigene. Schui et al. (2002) stimulierten T-Lymphozyten von AML-Patienten sowohl mit generierten DC als auch mit AML-Blasten-Lysat beladenen generierten DC. Analysiert wurde die Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten. Dabei zeigte sich, daß das Beladen von DC mit Blasten-Lysat nicht zu einer gesteigerten Stimulationskapazität der autologen T-Lymphozyten führte. Im Gegenteil: die Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten war am stärksten nach Stimulation mit DC ohne Blasten-Lysat, was die Autoren auf mögliche Immunevasions-Mechanismen von AML-Blasten sezerniertes TGF- β zurückführen (Bergmann 1995). Betrachtet man die immunstimulatorische Kapazität der leukämischen DC in den autologen MLR, so tragen sie zu einer gesteigerten T-Zell-Proliferation bei, im Gegensatz zu den Experimenten, in denen allogene DC von HLA-identischen Spendern fusioniert mit AML-Blasten als Stimulatoren verwendet wurden. Somit könnten eventuell auch bei der Fusion inhibitorische Mechanismen von AML-Blasten eine Rolle spielen.

Ein anderer Nachteil des Fusionssystems könnte sein, daß durch die Fusion der DC mit den AML-Blasten Selbstantigene in Form von DNA, RNA oder nukleären Proteinen von nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen präsentiert werden, die eine eventuelle Autoimmunantwort auslösen könnten. Für diese Hypothese sprechen Hinweise aus Mausstudien (Ludewig 2000). Die allogenen DC sollten nach der Fusion mit den Blasten in der Lage sein, die leukämischen Antigene erfolgreich zu prozessieren und auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Zehn Tage alte DC, generiert mittels Zytokinen im Serum-freien Medium, waren dazu nicht so gut geeignet wie sieben Tage alte DC. Der Reifegrad der DC scheint also für die Fusionseffizienz ein wichtiger Faktor zu sein. Verwendet man für die Fusion sieben Tage alte DC, so lag die Fusionsrate trotzdem nur bei 10, höchstens bei 20%. Kugler et al. (2000) zeigten bei ihren Experimenten ähnliche Fusionsraten von 10-15%. Weitere Experimente sind daher essentiell, um die Parameter zu definieren, welche die Fusionseffizienz erhöhen. Untersucht werden könnte in diesem Zusammenhang, ob die Vitalität der DC durch die Fusion beeinträchtigt wird. Außerdem sollten Untersuchungen erfolgen, die klären, wie die Antigenpräsentation auf den Fusionszellen erhöht, und somit die T-Zell-Stimulationsfähigkeit verbessert werden kann. Bei den DC könnte durch die Fusion ein eventueller Defekt bei der Prozessierung der Antigene ausgelöst worden sein, so daß durch die Fusion kein positiver Effekt erreicht wurde. Denn schon die Kokultivierung von DC mit AML-Blasten ohne Fusion führte zu einer gesteigerten Proliferation der T-Lymphozyten. Auch Soruri et al. (1998) beschrieben, daß schon die Kokultivierung von DC mit Tumorzellen alleine eine T-Zell-Proliferation induziert. Sie vermuteten, daß die T-Zell-Antwort eventuell ausgelöst wurde durch apoptotische Tumorzellen, welche von den DC aufgenommen wurden. Damit die Fusionsmethode durchgeführt werden kann, benötigt man zur Generierung der allogenen DC das periphere Blut von geeigneten Spendern. Zudem braucht man die PBMNC von AML-Patienten mit hoher Blastenzahl im peripheren Blut. Diese beiden Aspekte können limitierende Faktoren bei der Durchführung der Fusion darstellen. Zudem stellt sich die Fusion als eine eher umständliche und schwer zu reproduzierende Methode dar. Daher scheint die Differenzierungsmethode von AML-Blasten in "leukämische" DC mittels Zytokinen eine wesentlich effektivere Methode zu sein, um Leukämie-spezifische CTL in vitro zu generieren.

4.1.4 Vergleichende Untersuchungen von PBL bei AML-Patienten und gesunden Spendern

Der zweite Abschnitt dieser Doktorarbeit befaßte sich mit der Fragestellung, ob T-Lymphozyten von AML-Patienten funktionsfähig sind. Denn, wie bereits erwähnt, exprimieren mehr als 70% der AML-Blasten keine kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, und ohne Kostimulation führt die Präsentation des MHC/Peptidantigen-Komplexes, welcher vom TCR erkannt wird, zur T-Zell-Anergie. Narita et al. (2001) konnten zeigen, daß CD80⁻ AML-Blasten, möglicherweise als Immunevasions-Mechanismen, in vitro T-Zell-Anergie induzieren. Zudem konnte in meiner Arbeit beobachtet werden, daß bei 23% der AML-Patienten die in vitro generierten CTL nach kurzer Zeit apoptotisch wurden. Die mit Zytokinen generierten "leukämischen" DC dieser Patienten schienen hingegen funktionell normal zu sein. Es konnte keine Übereinstimmung zwischen der erfolgreichen Herstellung der CTL in vitro und dem klinischen Status oder der vorausgegangenen Behandlung der Patienten entdeckt werden.

Die intrazelluläre CD3-zeta-Kette, eine Komponente des CD3/TCR-Komplexes, ist an der Weiterleitung von Signalen über den TCR beteiligt und somit ist ihre Expression für die Aktivierung von T-Lymphozyten sehr wichtig. Eine reduzierte Expression, oder die Abwesenheit der TCR-zeta-Kette, beeinträchtigt die Signaltransduktion der T-Lymphozyten, was wiederum zu signifikanten Immunzell dysfunktionen führt (Reichert 1998, Travis 1992, Mizoguchi 1992). Solche defekten T-Lymphozyten zeigten eine reduzierte zytotoxische Funktion und ihre Fähigkeit, eine anti-Tumorantwort in vitro zu induzieren war vermindert. Ähnliche Veränderungen in der TCR-zeta-Kette von PBL wurden bei Patienten mit soliden Tumoren (Kuss 1999, Healy 1998, Finke 1993), aber auch von Patienten mit myeloischen Erkrankungen (Chen 2000, Buggins 1998, Rossi 1996) beschrieben. Außerdem zeigten Studien, daß nicht nur CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen sondern auch CD56⁺ NK-Zellen, isoliert aus dem peripheren Blut von Patienten, Abnormalitäten in der TCR-zeta-Kette aufwiesen (Kuss 1999, Reichert 1998). Um zu klären, ob funktionale Abnormalitäten in den PBL der AML-Patienten eventuell auf eine verminderte Expression der TCR-zeta-Kette zurückzuführen sind, wurde die Expression der TCR-assoziierten zeta-Kette in den PBL von Patienten mit AML im Vergleich zu normalen Spendern untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten die Daten von 23 untersuchten AML-Patienten, daß die intrazelluläre TCR-zeta-Kette in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und in CD56⁺ NK-Zellen im Vergleich zu den normalen Spendern keine signifikanten Unterschiede in der Expression aufwies. Dagegen berichteten Buggins et al. (1998), die sowohl die T-Lymphozyten als auch die NK-Zellen von elf AML-Patienten untersuchten, über eine verminderte TCR-zeta-Ketten Expression in beiden Zellpopulationen. In ihrer Veröffentlichung zeigten sie, daß die Expression der zeta-Kette in den T-Lymphozyten bei 64% der Patienten vermindert war. Auch bei Patienten mit Nierenzellkarzinom kommt es zu unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen in den PBL bezüglich Veränderungen in der TCR-zeta-Kette. So berichten Finke et al. (1993) und Xiaoli et al. (1994) über abnormale Veränderungen, Cardi et al. (1997) hingegen konnten in den PBL keine abnormalen Veränderungen in der TCR-zeta-Kette nachweisen. Es wurde diskutiert, daß methodische Unterschiede für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten. In meiner Doktorarbeit wurde die gleiche Methode verwendet, die in unserer Arbeitsgruppe für CML-Patienten verwendet wurde, und dort zeigten sich in den PBL deutlich abnormale Veränderungen in der TCR-zeta-Ketten Expression. Dieses wurde von Chen et al. (2000) aus unserer Arbeitsgruppe dargestellt. Buggins et al. (1998) untersuchten zudem die zeta-Ketten Expression von drei AML-Patienten vor und nach intensiver Chemotherapie, wobei zwei der Patienten eine reduzierte zeta-Ketten Expression aufwiesen. Bei einem der beiden Patienten kam es zu einer kompletten Remission und zur Wiederherstellung der TCR-zeta-Ketten Expression, beim anderen Patienten in der refraktären Phase konnte keine Wiederherstellung der TCR-zeta-Ketten Expression in den PBL beobachtet werden. Somit schlugen Buggins und seine Kollegen vor, daß eine verminderte zeta-Ketten Expression bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung ausgeprägter ist. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen meiner Doktorarbeit, denn hier konnte keine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Blastenzahlen im peripheren Blut, den verschiedenen Krankheitsstadien und einer signifikanten Verminderung der TCR-zeta-Ketten Expression in den PBL der AML-Patienten festgestellt werden.

Veröffentlichungen über eine reduzierte TCR-zeta-Ketten Expression in den PBL von Patienten mit chronischen Infektionen, Autoimmunerkrankungen und HIV-Infektionen (Liossis 1998, Zea 1998, Stefanova 1996) weisen darauf hin, daß die Degenerierung der zeta-Kette ein verbreitetes Phänomen bei chronischen Erkrankungen sein könnte und nicht auf Tumorerkrankungen begrenzt ist. Vermutet wird, daß es durch permanenten Antigen-Stimulus zu einer Verminderung der zeta-Kette in den PBL kommt. In vivo könnte es eventuell bei AML-Patienten, aufgrund von fehlenden oder reduzierten Leukämieantigenen zu keiner T-Zell-Stimulation und daher auch nicht zu einer verminderten TCR-zeta-Ketten Expression kommen. Da die CD3-zeta-Kette, ein essentielles Molekül des TCR bei der Signaltransduktion, in den PBL der AML-Patienten nicht beeinträchtigt zu sein scheint, sollten die T-Lymphozyten der Patienten über den TCR ausreichend stimulierbar sein. Somit würden sich adoptive immunzelltherapeutische Maßnahmen, die auf die ex-vivo Stimulation von Patienten T-Lymphozyten abzielen, bei AML-Patienten durchaus lohnen. Allerdings erlaubt der alleinige Nachweis der TCR-zeta-Ketten Expression in den PBL von AML-Patienten noch keine Aussage darüber, ob die T-Lymphozyten der Patienten funktionsfähig sind oder nicht.

Im Zuge der TCR-zeta-Ketten Untersuchung zeigte sich bei der phänotypischen Charakterisierung der untersuchten T-Lymphozyten von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern interessanterweise, daß AML-Patienten eine geringere Anzahl an CD4⁺ T-Zellen aufwiesen. Ähnliches wurde auch schon von Kuss et al. (1999) bei Patienten mit Kopf- und Halstumoren beobachtet. Der Grund hierfür ist bisher unbekannt. Zum einen könnten AML-Blasten Zytokine sezernieren, die CD4⁺ T-Zellen eventuell negativ beeinflussen. Buggins et al. (2000, 1999) sowie seine Mitarbeiter Milojkovic et al. (2000) konnten kürzlich zeigen, daß AML-Blasten lösliche Faktoren sezernieren, die T-Lymphozyten hindern, TH1-Zytokine zu produzieren und die deswegen in der G0-Phase der Zellteilung verbleiben. Zum anderen könnten Suppressorzellen zur Unterdrückung von CD4⁺ T-Zellen geführt haben (Pennesi 1999). Von soliden Tumoren wurde berichtet, daß sie fähig sind, Apoptose in T-Lymphozyten zu induzieren. Dies kann zum einen durch Fas-Ligand bei Zell-Zell-Interaktion (Saito 2000), zum anderen durch die Sekretion von löslichem Fas-Ligand (Whiteside 1998) erfolgen. Auch solch ein Mechanismus könnte für die verminderte Anzahl an CD4⁺ T-Zellen bei AML-Patienten verantwortlich sein.

Ein weiterer Grund könnten nicht funktionsfähige DC von AML-Patienten in vivo darstellen (Mothy 2001). Solche DC wären eventuell nicht in der Lage, CD4⁺ T-Zellen mit den benötigten Zytokinen zu unterstützen oder sie präsentieren defekte MHC-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, so daß die CD4⁺ T-Zellen schneller apoptotisch werden oder gar nicht erst aktiviert werden können. Somit könnte die fehlende Unterstützung durch die CD4⁺ T-Zellen dazu führen, daß es nicht zu funktionsfähigen CTL in vivo kommt. Denn CD4⁺ T-Zellen können zum einen IL-2 zur Verfügung stellen, was die CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung benötigen, zum anderem können sie APC zur verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen aktivieren, so daß diese wiederum in der Lage sind, CD8⁺ T-Zellen effektiv zu stimulieren. Zu klären, welche Faktoren für eine verminderte CD4⁺ T-Zell-Population bei AML-Patienten verantwortlich sind, könnte einen interessanten Forschungsaspekt darstellen.

Im letzten Abschnitt meiner Doktorarbeit beschäftigte ich mich mit dem funktionsrelevanten T-Zell-Molekül CD28. Die Interaktion von CD28 mit den B7-Molekülen auf den APC liefert das wichtige kostimulatorische Signal, das zusammen mit dem TCR-Signal die Aktivierung von naiven T-Lymphozyten bewirkt. Erfolgt die CD28-Kostimulation, so werden signifikant weniger TCR zur Aktivierung von T-Lymphozyten benötigt. CD28 hat somit Einfluß auf die T-Zell-Aktivierungsschwelle (Viola 1996). Außerdem trägt CD28 bei zuvor aktivierten T-Lymphozyten zur Aufrechterhaltung der T-Zell-Expansion bei. Die wichtigsten Effekte der CD28-Kostimulation liegen in der Unterstützung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, der m-RNA Produktion des Zytokins IL-2 und beim Übergang in die G1-Phase des Zellzyklus und der verstärkten Produktion von antiapoptischen Proteinen, besonders von BCL-X_L (Sharpe 2002). Eine sichtlich reduzierte Expression von CD28 wurde bei Patienten mit HIV und CMV-Infektionen (Wang 1995, Borthwick 1994), aber auch bei Patienten mit anderen Erkrankungen, wie dem multiplem Myelom (Moss 1996), der Haarzell-Leukämie (van de Corput 1999) und der CLL (Rossi 1996) gezeigt. Es wurde spekuliert, daß es sich bei den CD28⁻ T-Zellen um Suppressorzellen (Liu 1998) handeln könnte, und daß sie bei der T-Zell-Anergie von Bedeutung sein könnten, was u.a. für Melanompatienten (Lee 1999) gezeigt wurde.

Um zu überprüfen, ob die Expression von CD28 bei AML-Patienten relevant vermindert ist, wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Patienten und gesunden Spendern untersucht. Von mir konnte nachgewiesen werden, daß Patienten signifikant mehr CD28⁻ T-Zellen besitzen als gesunde Spender. Diese CD28-Negativität beruhte hauptsächlich auf dem CD28-Verlust auf CD8⁺ T-Zellen. Daß sich die Verminderung von CD28 überwiegend auf CD8⁺ T-Zellen konzentrierte, wurde auch schon von Speiser et al. (1999) und Azuma et al. (1993) berichtet. Die CD28-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen variierte außerdem wesentlich stärker innerhalb der Gruppe der AML-Patienten als zwischen den gesunden Spendern. Diese Beobachtung konnten auch Speiser et al. (1999) bei Melanompatienten machen. Man kann somit aus den Ergebnissen schließen, daß die CD8⁺ T-Zellen der verschiedenen AML-Patienten alle sehr stark in ihrem Aktivierungsstadium variieren.

CD28⁻ T-Zellen wurden verstärkt bei älteren Personen beobachtet, und es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Alter der untersuchten Probanden und ihres prozentualen Anteils an CD28⁻ T-Zellen (Hamann 1997, Fagnoni 1996). Weil bei CD28⁻ T-Zellen auch verkürzte Telomere detektiert wurden, kann angenommen werden, daß es sich bei den CD28⁻ T-Zellen um Lymphozyten handelt, die bereits viele Generationszyklen (Verdoppelungen) durchlaufen haben. Dies ist denkbar für T-Lymphozyten, die wiederholt aufgrund Antigenkontaktes zur Proliferation angeregt wurden und ein Stadium der Seneszenz erreicht haben. Bei den in meiner Doktorarbeit untersuchten Patienten konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der untersuchten Probanden und der Prozentzahl an CD28⁻ T-Zellen festgestellt werden. Auch Untersuchungen bei Melanompatienten von Speiser et al. (1999) konnten keine Verbindung zwischen dem Alter der Patienten und der Expression von CD28 auf CD8⁺ T-Zellen ausmachen. Allerdings konnte in meiner Arbeit eine Korrelation zwischen dem klinischen Status der Patienten und dem prozentualen Anteil an CD28⁺/CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Bei refraktären Patienten war der Anteil an CD28⁺/CD8⁺ T-Zellen kleiner als 40%, während neudiagnostizierte Patienten mehr als 40% CD28-positive CD8 T-Zellen hatten. Somit könnte eine vermehrte Antigen-Stimulation bei fortschreitender Erkrankung mit einer reduzierten CD28-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen einhergehen. Choremi-Papadopoulou et al. (2000) konnten zeigen, daß bei HIV-Patienten im Verlauf der Erkrankung die Zahl an CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen signifikant anstieg.

In funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit wurde beobachtet, daß die CD8⁺ T-Zellen der AML-Patienten im Gegensatz zu den gesunden Spendern nicht in der Lage waren, nach Aktivierung zu proliferieren. Auch van de Corput et al. (1999) berichteten von einer eingeschränkten Proliferationsfähigkeit der CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen bei Patienten mit Haarzell-Leukämie. Bezüglich der Effektorfunktionen zeigte sich, daß die CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen der Patienten ebenso wie die Zellen der gesunden Spender lytische Aktivität und IFN- γ Sekretion nach TCR-Stimulus zeigen. Damit weisen sie Eigenschaften von Effektor-T-Lymphozyten auf. Die Arbeitsgruppe Montagna et al. (1995) identifizierte CD8⁺/CD28⁻ T-Zell-Klone aus AML-Patienten in Remission. Diese Zellen besaßen die Fähigkeit, über einen nicht-HLA restringierten Mechanismus zytolytische Aktivität auf AML-Blasten auszuüben.

Auch die phänotypischen Analysen der PBL von AML-Patienten gaben Hinweise darauf, daß es sich bei den CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen um Effektorzellen handeln könnte. Die Differenzierung zu Effektorzellen geht mit einer verminderten Expression von CD28 und CD27, sowie mit einem Verlust an proliferativem Potential und einer Steigerung der Zytotoxizität der Zellen einher (Hamann 1999). Diese Aspekte korrelierten mit meinen Ergebnissen. Außerdem veröffentlichten Hamann et al. (1999), daß es sich bei zytotoxischen Effektorzellen überwiegend um CD45⁺RA Zellen handelt, was mit den Ergebnissen meiner Arbeit übereinstimmt. Im Durchschnitt wurden, im Gegensatz zur Population der gesunden Spender, mehr CD45RA⁺ Zellen als CD45RO⁺ Zellen in der CD8⁺ T-Zell-Population der AML-Patienten gefunden. Die CD28⁻ T-Zellen exprimieren nach Induktion die wichtigen Aktivierungsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß es sich bei den untersuchten Zellen um gut aktivierbare Zellen handelt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen ergaben den Eindruck, daß die verminderte CD28-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen mit einem bestimmten Aktivierungs- oder Differenzierungsstadium der Zellen einhergeht. Der Verlust der CD28-Expression ist z.B. als normaler Regulationsmechanismus beschrieben, der durch Antigenaktivierung ausgelöst wird (Trimble 2000). Bei refraktären Patienten könnte der dauerhafte Verlust von CD28 durch chronische Aktivierung der Lymphozyten mittels Tumorzellen hervorgerufen worden sein.

Eine reaktive Veränderung der CD8⁺ T-Zellen könnte auch dadurch bedingt sein, daß AML-Blasten unkontrolliert Zytokine, wie z.B. TNF- α , ausschütten (Schulz 2001).

Damit adoptive immuntherapeutische Maßnahmen mittels CTL bei AML-Patienten zum Einsatz kommen können, benötigt man ein funktionelles Immunsystem. Zum einen werden Patienten T-Lymphozyten benötigt, die sich nicht in einem Anergiezustand befinden, zum anderen APC, die Leukämie-spezifische Antigene und kostimulatorische Moleküle in einem Kontext präsentieren, der geeignet ist, das Immunsystem der Patienten gegen Tumorantigene zu aktivieren. Die Ergebnisse meiner Doktorarbeit haben gezeigt, daß T-Lymphozyten von AML-Patienten in vitro zu Effektorzellen aktiviert werden können, die in der Lage sind, lytische Aktivität auszuüben und IFN- γ zu produzieren. Zudem konnten AML-Blasten von unterschiedlichsten Patienten mit einem Zytokincocktail, welcher FLT-3-Ligand beinhaltet, in DC differenziert werden. Diese DC erlaubten eine effektive Antigenpräsentation und die Expression von kostimulatorischen Molekülen zur Stimulation von AML-reaktiven T-Lymphozyten. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hoffnung, daß "leukämische" DC zur Generierung von Leukämie-spezifischen CTL in vitro oder in Vakzinierungsstrategien in vivo erfolgreich bei der Bekämpfung gegen die AML eingesetzt werden können.

5. Zusammenfassung

Trotz stetiger therapeutischer Fortschritte bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) ist die Entwicklung neuer Therapieansätze dringend gefragt. Bei Patienten mit rezidivierender AML könnte eine adoptive Immuntherapie mit Leukämie-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erfolgreich sein. Zur Generierung dieser CTL benötigt man antigenpräsentierende Zellen (APC), die nicht nur effizient Antigene über MHC-Komplexe präsentieren, sondern auch kostimulatorische Signale liefern. Da AML-Blasten nur unzureichend die wichtigen kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86 exprimieren, wurden in dieser Arbeit zwei experimentelle Ansätze entwickelt, um kostimulatorische Moleküle und Leukämie-spezifische Antigene auf einer Zelle zu vereinigen. Zum einen wurden AML-Blasten in dendritische Zellen (DC) differenziert, zum anderen wurden AML-Blasten mit DC fusioniert.

In vitro konnten AML-Blasten von Patienten mit unterschiedlichsten FAB-Klassifikationen, Blastenzahlen, chromosomalen Veränderungen und klinischen Verläufen, mittels GM-CSF, IL-4, TNF- α und FLT-3-Ligand in funktionale "leukämische" DC differenziert werden. Durch morphologische, immunphänotypische und immunstimulatorische Untersuchungen konnte dies bestätigt werden. FISH-Analysen bewiesen, daß die DC leukämischen Ursprungs waren. Mit diesen DC als Stimulatoren konnte der Defekt an nicht exprimierten kostimulatorischen Molekülen auf AML-Blasten korrigiert und AML-spezifische CTL bei der Mehrzahl der Patienten in vitro generiert werden. Durch die zusätzliche Gabe von FLT-3-Ligand zu GM-CSF, IL-4 und TNF- α erhielt man aus AML-Blasten signifikant mehr DC als ohne FLT-3-Ligand im Kulturmedium. Hieraus ergibt sich ein entscheidender Vorteil bei der klinischen Anwendung, weil somit in kürzester Zeit größere Mengen an "leukämischen" DC zur Stimulation von AML-spezifischen CTL generiert werden können.

Auch durch die Fusion von allogenen DC mit AML-Blasten mittels Polyethylenglykol (PEG) konnten "APC" hergestellt werden, welche die T-Lymphozyten zur Proliferation anregen. Diese Proliferation war besonders gut, wenn die verwendeten DC HLA-Unterschiede zum Patienten aufwiesen (wahrscheinlich aufgrund der Stimulation durch allogene MHC-Moleküle), weniger gut bei HLA-identischen DC. Vermutlich sind die über identische MHC-Moleküle angebotenen Antigene weniger immunogen.

Für die Fusion benötigt man geeignete Spender und die PBMNC von AML-Patienten mit sehr hoher Blastenzahl. Beide Aspekte stellen limitierende Faktoren dar, und lassen die Differenzierung von AML-Blasten in DC als wesentlich attraktiveren experimentellen Ansatz erscheinen.

Damit eine adoptive Immuntherapie mittels CTL bei Patienten zum Einsatz kommen kann, muß ein funktionelles Immunsystem vorhanden sein. Daher wurden die Lymphozyten von AML-Patienten hinsichtlich ihrer funktionsrelevanten Moleküle untersucht. Weder bei CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen noch bei CD56⁺ NK-Zellen von AML-Patienten konnte eine abnormale Expression der intrazellulären TCR-zeta-Kette festgestellt werden. Untersuchungen zur Expression von CD28 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von AML-Patienten ergaben, daß Patienten signifikant weniger CD28 auf ihren CD8⁺ T-Zellen exprimierten als gesunde Spender. Die CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen der Patienten wiesen eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit auf, zeigten aber, ebenso wie die PBL der gesunden Spender, lytische Aktivität und IFN- γ Sekretion nach TCR Stimulus. Auch die phänotypischen Analysen ergaben, daß es sich bei den CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen um zytotoxische Effektorzellen handeln könnte. In meiner Arbeit gibt es keine Hinweise dafür, daß die Lymphozyten von AML-Patienten funktionell defekt sind. Eine adoptive Immuntherapie mit Leukämie-spezifischen CTL könnte bei AML-Patienten durchaus erfolgversprechend sein.

Danksagung

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. H.J. Kolb für die Überlassung meiner Doktorarbeit und seiner jederzeit engagierten Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. R. Balling und Herrn Prof. K. Pfeffer für die Übernahme und Hilfe bei meiner Doktorarbeit und die Vorlage zur Promotion.

Frau Prof. D. Schendel danke ich für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit am Institut für klinische Hämatologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit. Mein besonderer Dank gilt hierbei ihrer Mitarbeiterin Frau Dr. E. Nößner, die mir immer mit hervorragenden Ideen während und bei der Beendigung meiner Doktorarbeit zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. M. Roskrow für die interessante Themenstellung und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors von Frau Dr. M. Roskrow und dem Labor für Experimentelle Knochenmarkstransplantation für ihre kompetente Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. C. Schoch bedanke ich mich für die Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

Mein Dank gilt außerdem den Ärzten und Schwestern in der Transplantationsabteilung der Medizinischen Klinik III, die mich bei der Beschaffung von Patientenmaterial tatkräftig unterstützten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinem langjährigen und besten Freund Jochen Teicke für das Verständnis und die großartige Unterstützung ganz herzlich danken.

7. Literaturverzeichnis

McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001; 409: 102-105.

McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 1998; 165: 231-247.

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* 1996; 8:765-772.

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996; 272: 54-60

Albert ML, Sauter B, Bhardway N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-89.

Antin JH. Graft-versus leukemia: no longer an epiphenomenon. *Blood* 1993; 82: 2273-2277.

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

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 2482-2490.

Azuma M, Phillips JH, Lanier LL. CD28⁻ T Lymphocytes. *J. Immunol.* 1993; 150: 1147-1159.

Bakker AB, Marland G, de Boer AJ, Huijbens RJ, Danen EH, Adema GJ, Figdor CG. Generation of antimelanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy donors after presentation of melanoma-associated antigen-derived epitopes by dendritic cells in vitro. *Cancer Res.* 1995; 55: 5330-5334.

Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol. Today* 1989; 10: 299-304.

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

Benyunes MC, Massumoto C, York A, Higuchi CM, Buckner CD, Thompson JA, Petersen FB, Fefer A. Interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells as consolidative immunotherapy after autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1993; 12: 159-163.

Bergmann L, Schui DK, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hölzter D. The inhibition of lymphokine-activated killer cells in acute myeloblastic leukemia is mediated by transforming growth factor-beta 1. *Exp. Hematol.* 1995; 23: 1574-1580.

Birg F, Coucoul MA, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 1992; 80: 2584-2593.

Bishop JF. The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* 1997; 24: 57-69.

Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, Mackinnon S, Yang SY, Sette A, Scheinberg DA. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 1996; 87: 3587-3592.

Bocchia M, Wentworth PR, Southwood S, Sidney J, McGraw K, Scheinberg DA, Sette A. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules. *Blood* 1995; 85: 2680-2684.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 749-795.

Bonini C, Ferrari G, Verzelletti S, Serivada P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; 276: 1719-1724

Boon T, Van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 725-729.

Borthwick NJ, Bofill M, Gombert WM, Akbar AN, Medina E, Sagawa K, Lipman MC, Johnson MA, Janossy G. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II Functional defects of CD28⁻ T cells. *AIDS* 1994; 8: 431-441.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Taylor PA, Berezovskaya A, Grass I, Blazar BR, Nadler LM. p27^{kip1} functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nat. Med.* 2000; 6: 290-297.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM. Maintenance of human T-cell anergy: Blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 1997; 278: 124-128.

Boussiotis VA, Barber DL, Lee BJ, Gribben JG, Freeman GJ, Nadler LM. Differential association of protein tyrosine kinases with T-cell receptor is linked to the induction of anergy and its prevention by B7 family-mediated costimulation. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 365-376.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Nader LM. The critical role of CD28 signaling in the prevention of human T-cell anergy. *Res. Immunol.* 1995; 146: 140-149.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Gray G, Gribben J, Nader LM. B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 1753-1763.

- Brasel K**, Maraskovsky E, Pulendran B. Preferential expansion of myeloid-type dendritic cells in vivo after administration of GM-CSF into mice: a comparative analysis with Flt3 ligand generated dendritic cells. *Blood* 1997; 90: 170a (abstr.).
- Brossart P**, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammersee HG, Kanz L. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 1998; 58: 732-736.
- Bruserud Ø**, Gjertsen BT, Brustugun OT, Bassøe CF, Nesthus I, Akselsen PE, Bühring HJ, Pawelec G. Effects of interleukin 10 on blast cells derived from patients with acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 1910-1920.
- Buchmeier NA**, Schreiber RD. Requirement of endogenous interferon- γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 7404-7408.
- Buggins AGS**, Arno MJ, Milojkovic D. Characterization of an AML-derived immunomodulatory factor(s) that inhibit T cell activation and the signal transduction pathways involved. *Blood* 2000; 96: 501a (abstr.).
- Buggins AGS**, Lea N, Milojkovic D, Paglica A, Mufti GJ, Hirst WJR. AML-derived immunomodulatory factor(s) inhibit T cell cytokine secretion and proliferation via inhibition of NF- κ B Tc activation and failure to upregulate c-myc. *Blood* 1999; 94 (suppl. 1): 596a (abstr.).
- Buggins AGS**, Hirst WJR, Pagliuca A, Mufti GJ. Variable expression of CD3- ζ and associated protein tyrosine kinases in lymphocytes from patients with myeloid malignancies. *Br. J. Haematol.* 1998; 100: 784-792.
- Buzyn A**, Petit F, Ostankovitch M, Figueiredo S, Varet B, Guillet JG, Ameisen JC, Estaquier J. Membrane-bound Fas (Apo-1/Cd95) ligand on leukemic cells: A mechanism of tumor immune escape in leukemia patients. *Blood* 1999; 94: 3135-3140.
- Caligiuri MA**, Strout MP, Gilliland DG. Molecular biology of acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* 1997; 24: 32-44:
- Cardi G**, Heaney JA, Schned AR, Phillips DM, Branda MT, Ernstoff MS. T-cell receptor ζ -chain expression on tumor-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57: 3517-3519.
- Caux C**, Dezutte-Dambuyant C, Schmitt D, Bancherau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cell. *Nature* 1992; 360: 258.
- Cella M**, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization. *Nat. Immunol.* 2000; 192: 305-310.
- Celluzzi CM**, Falo LD Jr. Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. *J. Immunol.* 1998; 160: 3081-3085.

Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 283-287.

Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 269-274.

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.

Chen X, Woiciechowsky A, Raffegerst S, Schendel D, Kolb HJ, Roskrow M. Impaired expression of the CD3-zeta chain in peripheral blood T cells of patients with chronic myeloid leukemia results in an increased susceptibility to apoptosis. *Br. J. Haematol.* 2000; 111: 817-825.

Chen B, Shi Y, Smith JD, Choi D, Geiger JD, Mule JJ. The role of tumor necrosis factor alpha in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4+ T cells in vitro. *Blood* 1998; 91: 4652-4661.

Choremi-Papadopoulou H, Panagiotou E, Samouilidou E, Kotopidou F, Viglis V, Antoniadou A, Kosmidis J, Kordossis T. CD28 costimulation and CD28 expression in T lymphocyte subsets in HIV-1 infection with and without progression to AIDS. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 119: 499-506.

Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, Flores RL, Xie QS, Agusala K, Sutaria 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, Toubert A, Sutaria S, Charron D, Champlin RE, Claxton DF. Human leukemia-derived dendritic cells: ex-vivo development of specific antileukemic cytotoxicity. *Crit. Rev. Immunol.* 1998; 18: 121-131.

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: 2048-2055.

Clavio M, Carrara P, Miglino M, Pierri I, Canepa L, Balleari E, Gatti AM, Cerri R, Celesti L, Vallebella E, Sessarego M, Patrone F, Ghio R, Damasio E, Gobbi M. High efficacy of fludarabine-containing therapy (FLAG-FLANG) in poor risk acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1996; 81: 513-520.

Collart MA, Belin D, Vassalli JD, de Kossodo S, Vassalli P. γ interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J. Exp. Med.* 1986; 164: 2113-2118.

Collins SJ. Acute promyelocytic leukemia: relieving repression induces remission. *Blood* 1998; 91: 2631-2633.

Colombo BM, Lacave R, Pioche-Durien 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. *Immunol.* 2000; 99: 8-15.

van de Corput L, Falkenburg JHF, Kester MGD, Willemze R, Kluin-Nelemans JC. Impaired Expression of CD28 on T Cells in Hairy Cell Leukemia. *Clin. Immunol.* 1999; 93: 256-262.

Costello RT, Mallet F, Sainty D, Maraninchi D, Gastaut JA, Olive D. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 90-103.

Cripe LD. Adult acute leukemia. *Current Problems in Cancer* 1997; 21: 4-64.

Dermine S, Mavroudis D, Jiang YZ, Hensel N, Molldrem J, Barrett AJ. Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 989-999.

Djeu JY, Stocks N, Zoon K, Stanton GJ, Timonen T, Herberman RB. Positive self regulation of cytotoxicity in human natural killer cells by production of interferon upon exposure to influenza and herpes viruses. *J. Exp. Med.* 1982; 156: 1222-1234.

Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001; 409: 97-101.

Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 1999; 5: 1365-1369.

Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996; 10: 588-599.

Eljaafari A, Farre A, Duperrier K, Even J, Vie H, Michallet M, Souillet G, Freidel AC, Gebuhrer L, Rigal D. Generation of helper and cytotoxic CD4⁺ T cell clones specific for the minor histocompatibility Antigen H-Y, after in vitro priming of human T cells by HLA- identical monocyte-derived dendritic cells. *Transplantation* 2001; 71; 1449-1455.

Fagnoni FF, Vescivini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Expansion of CD8⁺ CD28⁻ T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunol. Today* 1996; 11: 203-205.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 571-611.

Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T-cells. *Science* 1996; 271: 1276-1278.

Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltrout RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Kleon E, Bukowski RM, Ochoa AC. Loss of T-cell receptor chain and p56lck in T-cells infiltration human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1993; 53: 5613-5616.

Foa R. Does Interleukin-2 have a role in the management of acute leukemia? *J. Clin. Oncol.* 1993; 11: 1817-1825.

Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 259-299.

Freemann GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1027-1034.

Froelich CJ, Dixit VM, Yang X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol. Today* 1998; 19: 30-36.

Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringden O, Stone JA, Bortin MM. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann. Intern. Med.* 1994; 120: 646-652.

Gale RP, Champlin RE. How does bone-marrow transplantation cure leukemia? *Lancet* 1984; 2: 28-30.

Gambacorti-Passerini C, Gringani F, Arienti F, Pandolfi PP, Pelicci PG, Parmiani G. Human CD4 lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region of the hybrid protein pml/RAR alpha present in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1993; 81: 1369-1375.

Gajewski TF, Fields PF, Fitch FW. Induction of the increased fyn kinase activity in anergic T helper type 1 clones requires calcium and protein synthesis and is sensitive to cyclosporin A. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 1836-1842.

Gao L, Bellantuono L, Elsässer A, Marley SB, Gordon MY, Goldman JM, Stauss HJ. Selective elimination of leukemic CD34+ progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 2000; 95: 2198-2203.

Gastman BR, Jonson DE, Whiteside TL, Rabinowich J. Caspase-mediated degradation of TCR- ζ chain. *Cancer Res.* 1999; 59: 1422-1427.

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.).

Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 6586-6590.

Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirsch-Ginsberg C, Rondon G, Seong D, Lee M, Gajewski J, Van Besien K, Khouri I. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86: 4337-4343.

Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann RG, Jacobsen SJ, Marmont AM, McGlave PB. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann. Intern. Med.* 1995; 108: 806-814.

a. **Gong** J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, Cannistra S, Avigan D, Kufe D. Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J. Immunol.* 2000; 165: 1705-1711.

b. **Gong** J, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, Kufe D. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *PNAS* 2000; 97: 2715-2718.

Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat. Med.* 1997; 3: 558-561.

Goodman M, Cabral L, Cassileth P. Interleukin 2 and leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1671-1675.

Gorin NC. Stem cell transplantation in acute leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995; 770: 262-287.

Gribben JG, Guinan EC, Boussiotis Va, Ke XY, Linslex L, Sieff C, Gray GS, Freeman GJ, Nadler LM. Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific anergy: a method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool. *Blood* 1996; 87: 4887-4893.

Grignani F, De Matteis, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998; 391: 815-818.

Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nader LM. Pivotal role of the B7: CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 1994; 84: 3261-3282.

Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol. Rev.* 1995; 146: 57-79.

Hamann D, Roos MTL, van Lier RAW. Faces and phases of human CD8⁺ T-cell development. *Immunol. Today* 1999; 20: 177-180.

Hamann D, Baars PA, Pep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, van Lier RA. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1407-1418.

Hansen ER, Bang B, Larsen JK, Vehksgaard GL, Baadsgaard O. In cutaneous T-cell lymphoma, class II MHC molecules on CD1+ antigen-presenting cells are upregulated in involved compared with uninvolved epidermis. *Br. J. Dermatol.* 1994; 131: 780-788.

Harding FA, Mc Arthur JG, Gross JA, Raulat DH, Allison JP. CD28-mediated signaling costimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356: 607-609.

Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JAL. 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.

van der Harst D, Goulmy E, Falkenburg JHF, Kooij-Winkelaar YMC, van Luxemburg-Heijs SAP, Goslink HM, Brand A. Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T-cell clones. *Blood* 1994; 4: 1060-1066.

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 631-640.

Healy CG, Simons JW, Carducci MA, DeWeese TL, Bartkowski M, Tong KP, Bolton WE. Impaired expression and function of signal-transducing z chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer. *Cytometry* 1998; 32: 109-119.

Hermiston AL, Xu Z, Majeti R, Weiss A. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 9-14.

Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol. Med. Today* 1999; 5: 178-186.

Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, Azuma M, Yazaki Y, Yagita H, Hirai H. Protective and therapeutic immunity against leukemia induced by irradiated B7-1 (CD80)-transduced leukemic cells. *Hum. Gene. Ther.* 1997; 8: 1375-1381.

Hirano N, Takahashi T, Ohtake S, Hirashima K, Emi N, Saito K, Hirano M, Shinohara K, Takeuchi M, Taketazu F, Tsunoda S, Ogura M, Omine M, Saito T, Yazaki Y, Ueda R, Hirai H. Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia* 1996; 10: 1168-1176.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RC, Zwaan FE, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-562.

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.

Hutloff A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397: 263-266.

Ioannides CG, Whiteside. T cell recognition of human tumors: implications for molecular immunotherapy of cancer. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993; 66: 91-106.

Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int. J. Cancer* 1996; 66: 470-476.

Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans HC. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 577-582.

Jenkins MK, Chen C, Jung G, Mueller DL, Schwartz RH. Inhibition of antigen-specific proliferation of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1990; 144: 16-22.

Kang SM, Beverly B, Tran AC, Brorson K, Schwartz RH, Lenardo MJ. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T-cell clonal anergy. *Science* 1992; 257: 1134-1138.

Karp JE, Smith MA. The molecular pathogenesis of treatment-induced (secondary) leukemias: foundations for treatment and prevention. *Semin. Oncol.* 1997, 24: 103-113.

Kiessling R, Kono K, Petersson M, Wassermann K. Immunosuppression in human tumor-host interaction: role of cytokines and alterations in signal-transducing molecules. *Springer Semin. Immunopathol.* 1996; 18: 227-242.

Knabel M, Weissinger EM, Bonini C, Franz M, Kolb HJ. Transfer of the HSV-Tk gene into canine T lymphocytes: Optimization of transduction and assessment of cell function. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25: 23 (abstr.).

Knuth A, Jäger D, Jäger E. Cancer immunotherapy in clinical oncology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2000; 46 (suppl.): S46-S51.

Kolb HJ, Schmid C, Schleuning M, Stoetzer O, Chen X, Woiciechowsky A, Roskrow M, Weber W, Guenther W, Ledderose G. Adoptive immunotherapy in chimeras. In: Berdel WE, Jürgens H, Büchner T, Ritter J, Kienast J, Vormoor J (eds.). *Transplantation in Hematology and Oncology II.* Springer-Verlag, Heidelberg, 2003; 3-10.

Kolb HJ. Adoptive Immunotherapy in chimeras for the treatment of leukemia. In: Perry MC, Harrington R (eds.). *American Society of Clinical Oncology - 1999 Educational Book*, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Alexandria VA, 1999; 235-249.

Kolb HJ, Holler E. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusion. *Curr. Opin. Oncol.* 1997; 9: 139-145.

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermüller J, de Witte T, Holler E, Ansari H. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 1995; 86: 2041-2050.

Kolb HJ, Mittermueller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmans W. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990; 76: 2462-2465.

Kono K, Rensing ME, Brandt RMP, Melief CJM, Potkul RK, Anderson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing ζ chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2:1825-1828.

Kufe DW. Smallpox, polio and now a cancer vaccine? *Nat. Med.* 2000; 6: 252-253.

Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zöller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Müller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Müller GA, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat. Med.* 2000; 6: 332-336.

Kuss I, Saito T, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical significance of decreased ζ chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 329-334.

Lai P, Rabinowich H, Crowley-Norwick PA, Bell MC, Mantovani G, Whiteside TL. Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associating T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2: 161-173.

Lanzavecchia A. Identifying strategies for immune intervention. *Science* 1993; 260: 937-944.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 261-268.

Law CL, Wormann B, LeBien TW. Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemic human B cell precursors. *Leukemia* 1990; 4: 732-738.

Lebsack ME, Maraskovsky E, Roux E, Teepe M, Hirschstein D, Hoeck J, McKenna HJ, Maliszewski C, Caron D. Increased circulatory dendritic cells in healthy human volunteers following administration of flt3ligand alone or in combination with GM-CSF or G-CSF. *Blood* 1998; 92: 507a (abstr.).

- Lee PE**, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* 1999; 5: 677-685.
- Lehmann C**, Zeis M, Schmitz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood* 2000; 96: 594-600.
- Lespagnard LP**, Mettens AM, Verheyden N, Tasiaux K, Thielemans S, van Meirvenne A, Geldhof P, De Baetselier J, Urbain O, Leo M, Moser M. Dendritic cells fused with mastocytoma cells elicit therapeutic antitumor immunity. *Int. J. Cancer* 1998; 76: 250-258.
- Lindner M**, Schirmacher V. Tumor cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002; 32: 207-217.
- Linsley R**, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 11: 191-212.
- Liossis SN**, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 1448-1457.
- Liu Z**, Tugulea S, Cortesini R, Suciuc-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC-class I restricted CD8⁺CD28⁻ T cells. *Intl. Immunol.* 1998; 10: 775-783.
- Löwenberg B**, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 1051-1062.
- Löwenberg B**, Touw IP. Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* 1993; 81: 281-292.
- Ludewig B**, Ochsenbein AF, Odermatt B, Paulin D, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 795-803.
- Maraskovsky E**, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in the Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell populations identified. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1953-1962.
- Maraskovsky E**, Chen WF, Shortman K. IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. *J. Immunol.* 1989; 143: 1210-1214.
- Marmont AM**, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78: 2120-2130.

- Masurier C**, Pioche-Durien C, Colombo BM, Lacave R, Lemoine FM, Klatzmann D, Guigon M. Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combination: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunol.* 1999; 96: 569-577.
- Metha J**, Powles R, Kulkarni S, Treleaven J, Singhal S. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy of leukemia relapsing after allogeneic transplantation: single-center of 32 adult patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20: 129-135.
- Michie CA**, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocytes subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 1992; 360: 264-265.
- Milojkovic D**, Buggins AGS, Lea NC. Suppression of T cell proliferation by AML cells is an early event in G0 to G1 transition involving inhibition of pRb phosphorylation by cyclin D-cdk6/4. *Blood* 2000; 96: 146a (abstr.).
- Mizoguchi H**, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, Mc Vicar DW, Ochoa AC. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science (Washington DC)* 1992; 258: 1795-1797.
- Mothy M**, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, Zandotti C, Briere F, de Lamballeri XN, Isnardon D, Sainy 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: 3750-3756.
- Moldrem J**, Dermime S, Parker K, Jiang YZ, Mavroudis D, Hensel N, Fukushima P, Barrett AJ. Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cell. *Blood* 1996; 88: 2450-2457.
- Mondino A**, Whaley CD, DeSilva DR, Li W, Jenkins MK, Mueller DL. Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB and JunB in anergic T helper 1 cells. *J. Immunol.* 1996; 157: 2048-2057.
- Montagna D**, Arico M, Montini E, De Benedetti F, Maccario R. Identification of HLA-unrestricted CD8+/CD28- cytotoxic T-cell clones specific for leukemic blasts in children with acute leukemia. *Cancer Res.* 1995; 55: 3835-3839.
- Mosmann TR**, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 1996; 17: 138-146.
- Moss P**, Gillespie G, Frodsham P, Bell J, Reyburn H. Clonal populations of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in patients with multiple myeloma and paraproteinemia. *Blood* 1996; 87: 3297-3306.
- Murphy G**, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996; 29: 371-380.

Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A, Goulmy E. Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood* 1999; 7: 2336-2341.

Mrózek K, Heinonen K, de la Chapele A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* 1997; 24:17-31.

Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 144-1456.

Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cummings RI, Lysterly HK, Gilboa E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16: 364-369.

Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int. J. Cancer* 1997; 70: 706-715.

Nakajima C, Uekusa Y, Iwasaki M, Yamaguchi N, Mukai T, Gao P, Tomura M, Ono S, Tsujimura T, Fujiwara H, Hamaoka T. A role of Interferon-gamma (IFN-gamma) in tumor immunity: T cells with the capacity to reject tumor cells are generated but fail to migrate to tumor sites in IFN-gamma-deficient mice. *Cancer Res.* 2001; 61: 3399-3405.

Narita M, Takahashi M, Liu A, Nikkuni K, Furukawa T, Toba K, Koyama S, Takai K, Sanada M, Aizawa Y. Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia. *Exp. Hematol.* 2001; 29: 709-719.

Nathan CF, Hibbs J Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 1991; 3: 65-70.

Nieda M, Nicol A, Kikuchi A, Kashiwase K, Taylo K, Suzuki K, Tadokoro K, Juji T. Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8⁺ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998; 91: 977-983.

Nimer SD, Giorgi J, Gajewski JL, Ku N, Schiller GJ, Lee K, Territo M, Ho W, Feig S, Selch M. Selective depletion of CD8⁺ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation* 1994; 57: 82-87.

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

Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 317-322.

Pardoll D. Cancer vaccines. *Nat. Med.* 1998; 4: 525-531.

- Park S**, Schalling M, Bernard A, Maheswaran S, Shipley GC, Roberts D, Fletcher J, Shipman R, Rheinwald J, Demetri G. The Wilms tumor gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in human mesothelioma. *Nat. Genet.* 1993; 4: 415-420.
- Pawelec G**, Zeuthen J, Kiessling R. Escape from host-antitumor immunity. *Crit. Rev. Oncogen* 1997; 8: 11-141.
- Pawlowska AB**, Hashino S, McKenna H, Weigel BJ, Taylor PA, Blazar BR. In vitro tumor-pulsed or in vivo Flt3 ligand-generated dendritic cells provide protection against acute myelogenous leukemia in nontransplanted or syngeneic bone marrow-transplanted mice. *Blood* 2001; 97: 1474-1482.
- Pelletier J**, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman DE. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 1991; 5: 1345-1356.
- Pennesi G**, Liu Z, Ciubotariu R, Jiang S, Colovai A, Cortesini R, Suci-Foca N, Harris P. TCR Repertoire of Suppressor CD8⁺CD28⁻ T Cell Populations. *Human Immunol.* 1999; 60: 291-304.
- Peshwa MV**, Shi JD, Ruegg C, Laus R, van Schooten WC. Induction of prostate tumor-specific CD8 cytotoxic T-lymphocytes in vitro using antigen-presenting cells pulsed with prostatic acid phosphatase peptide. *Prostate* 1998; 36: 129-138.
- 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⁺ peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 1996; 157: 3850-3859.
- Pinilla J**, Cathcart KN, Korontsvit T, Soignet S, Caggiano J, Livingston PO, Kolitz J, Bocchia M, Lai JT, Jimerenz J, Scheinberg DA. BCRABL breakpoint derived oncogene fusion peptide vaccines in patients with chronic myelogenous leukemia: a phase I trial. *Haematologica* 1999; 84: 128a (abstr.).
- Porter DL**, Collins RH Jr., Hardy C, Kernan NA, Drobyski WR, Giralt S, Flowers ME, Casper J, Leahey A, Parker P, Mick R, Bate-Boyle B, King R, Antin JH. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood* 2000; 95: 1214-1221.
- Porter DL**, Roth MS, Lee SJ, McGarigle C, Ferrarea JL, Antin JH. Adoptive immunotherapy with donor mononuclear cell infusion to treat relapse of acute leukemia or myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18: 975-980.
- Poynton CH**. T cell depletion in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1988; 3: 265-279.
- van Putten WLJ**, Löwenberg B. Prognostic factors in adult AML. *Blood* 1997; 90 (suppl. 1): 65a (abstr.).

- Rabinowich H**, Reichert TE, Kashii Y, Bell MC, Whiteside TL. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand-expression ovarian carcinoma cells: implications for altered expression of TCR in tumor-associated lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 2579-2588.
- Reeves ME**, Royal RE, Lam JS, Rosenberg SA, Hwu P. Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene. *Cancer Res.* 1996; 56: 5672-5677.
- Reichert T**, Rabinowich H, Johnson JT, Whiteside TL. Human immune cells in the tumor microenvironment: mechanism responsible for signaling and functional defects. *J. Immunother.* 1998; 21: 295-306.
- Reid CDL**, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J. Immunol.* 1992; 154: 2681-2688.
- Renner C**, Ohnesorge S, Held G, Bauer S, Jung W, Pfitzenmeier JP, Pfreundschuh M. T cells from patients with Hodgkin's disease have a defective T-cell receptor zeta chain expression that is reversible by T-cell stimulation with CD3 and CD28. *Blood* 1996; 88: 236-241.
- van Rhee F**, Savage D, Blackwell J, Orchard K, Dazzi F, Lin F, Chase A, Bungey J, Cross NC, Apperley J, Szydlo R, Goldman JM. Adoptive immunotherapy for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: equal efficacy of lymphocytes from sibling and matched unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21: 1055-1061.
- van Rhee F**, Kolb HJ. Donor leukocyte transfusions for leukemic relapse. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 2: 423-426.
- Ribas A**, Bui LA, Butterfield LH, Vollmer CM; Jilani SM, Dissette VB, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. Antitumor protection using murine dendritic cells pulsed with acid-eluted peptides from in vivo grown tumors of different immunogenicities. *Anticancer Res.* 1999; 19: 1165-1170.
- Ries LAG**, Korsary CL, Hankey BF (eds.). *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1994*, National Cancer Institute. NIH Pub. No. 97-2789. Bethesda, MD, 1997.
- Robinson SP**, English N, Jaju R, Kearney L, Knight SC, Reid CD. The in vitro generation of dendritic cells from blast cells in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1998; 103: 763-771.
- Romani N**, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwlinka G, Fritsch PO, Steinmann RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 83-93.
- Rossi E**, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankoma K, Hefferman AM, Catovsky D. Zeta chain and CD28 expression are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 494-497.

Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 1999; 94: 333-339.

Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 1351-1364.

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-712.

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

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; 84: 3054-3062.

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.* 1992; 52: 274-281.

Saukkonen JJ, Kornfeld H, Berman JS. Expansion of a CD8+CD28- cell population in the blood and lung of HIV positive patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1993; 6: 1194-1204.

Saunders D, Lucas K, Ismaili J, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, Shortman K. Dendritic cell development in culture from thymic cells in the absence of granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 2185-2196.

Schendel DJ, Frankenberger B, Jantzer P, Cayeux S, Nobetaner E, Willimsky G, Maget B, Pohla B, Blankenstein T. Expression of B7.1 (CD80) in a renal cell carcinoma line allows expansion of tumor-associated cytotoxic T lymphocytes in the presence of an alloresponse. *Gene Ther.* 2000; 7: 2007-2014.

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

Schulz U, Munker R, Ertl B, Holler E, Kolb HJ. Different types of human leukemias express the message for TNF-alpha and interleukin-10. *Eur. J. Med. Res.* 2001; 6: 359-363.

Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992; 71: 1065-1068.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 116-126.

Shresta S, Pham CTN, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10: 581-587.

Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, Forman SJ, Flowers D, Smith FO, Shannon-Dorcy K, Berger MS, Bernstein ID. Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood* 1999; 93: 3678-3684.

DeSilva DR, Urdahl KB, Jenkins MK. Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J. Immunol.* 1991; 147: 3261-3267.

Speiser DE, Valmor D, Rimoldi D, Pittet MJ, Lienard D, Cerundolo V, MacDonald HR, Cerottini JC, Romero P. CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 1990-1999.

Srivastava MD, Srivastava A, Srivastava BIS. Soluble interleukin 2 receptor, soluble CD8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 levels in hematological malignancies. *Leuk. Lymphoma* 1994; 12: 241-251.

Stacchini A, Fubini L, Severino A, Sanavio F, Aglietta M, Piacibello W. Expression of type III receptor tyrosine kinases FLT3 and KIT and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 1996; 10: 1584-1591.

Sette A, Chesnut R, Fikes J. HLA expression in cancer: implications for T cell-based immunotherapy. *Immunogenetics* 2001; 53: 255-63.

Soiffer RJ, Murray C, Mauch P, Anderson KC, Freedman AS, Rabinowe SN, Takvorian T, Robertson MJ, Spector N, Gonin R. Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD6-positive T lymphocytes from donor bone marrow. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10: 1191-1200.

Soruri A, Fayyazi A, Gieseler R, Schlott T, Runger T, Neumann C, Peters JH. Specific autologous anti-melanoma T cell response in vitro using monocyte-derived cells. *Immunobiol.* 1998; 198: 527-538.

Stefanova I, Saville MW, Peters C, Cleghorn FR, Schartz D, Venzon DJ, Weinhold KJ, Jack N, Bartholomew C, Blattner WA, Yarchoan R, Bolen JB, Horak ID. HIV infection-induced posttranslational modification of T cell signaling molecules associated with disease progression. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 1290-1297.

Stone RM, Berg DT, George SL, Dodge RK, Paciucci PA, Schulman P, Lee EJ, Moore JO, Powell BL, Schiffer CA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after initial chemotherapy for elderly patients with primary acute myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 1671-1677.

Strobl H, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Rappersberger K, Majdic O, Knapp W. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34⁺ hematopoietic progenitors. *J. Immunol.* 1996; 157: 1499-1507.

- Stuhler G**, Walden P. Recruitment of helper T cells for induction of tumor rejection by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 1994; 39: 342-345.
- Szabolcs P**, Feller ED, Moore Ma, Young JW. Progenitor recruitment and in vitro expansion of immunostimulatory dendritic cells from human CD34⁺ bone marrow cells by c-kit-ligand, GM-CSF, and TNF alpha. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 378: 17-20.
- Taetle R**, Payne C, Dos-Santos B, Russell M, Segarini P. Effects of transforming growth factor beta 1 on growth and apoptosis of human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 1993; 53: 3386-3393.
- Tarufi A**, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VS, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horan T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001; 409: 105-109.
- Terpstra WE**, Löwenberg B. Application of myeloid growth factors in the treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 315-327.
- Thurner B**, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, 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.
- Tjoa BA**, Simmons SJ, Bowes VA, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Cobb OE, Ireton RC, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL, Murphy GP. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 1998; 36: 39-44.
- Travis J**. Do tumor-altered T cells depress immune responses? *Science (Washington DC)* 1992; 258: 1732-1733.
- Tricot G**, Boogaerts MA, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe H, Verwilghen RL. The myelodysplastic syndromes: different evolution patterns base on sequential morphological and cytogenetic investigations. *Br. J. Haematol.* 1985; 59: 659-670.
- Trimble LA**, Kam LW, Friedman RS, Xu Z, Liebermann J. CD3 ζ and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood* 2000; 96: 1021-1029.
- Truitt RL**, Shih CY, Lefever AV, Tempelis LD, Andreani M, Bortin MM. Characterization of alloimmunization-induced T-lymphocytes reactive against AKR leukemia in vitro and correlation with graft-vs-leukemia activity in vivo. *J. Immunol.* 1983; 131: 2050-2058.
- Tsai V**, Southwood S, Sidney J, Sakaguchi K, Kawakami Y, Appella E, Sette A, Celis E. Identification of subdominant CTL epitopes of the GP100 melanoma-associated tumor antigen by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *J. Immunol.* 1997; 158: 1796-1802.

Vahdat L, Wong ET, Wile MJ, Rosenblum M, Foley KM, Warrell RP Jr. Therapeutic and neurotoxic effects of 2-chlorodeoxyadenosine in adults with acute myeloid leukemia. *Blood* 1994; 84: 3429-3434.

Viola A, Lanzavecchia A. T-cell activation and the dynamic world of rafts. *APMIS* 1999; 107: 615-623.

Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996; 273: 104-106.

Wang JS, Saffold X, Cao J, Krauss W, Chen W. Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *J. Immunol.* 1998; 161: 5516-5524.

Wang FC, Moss PA, Frodsham P, Lehner PJ, Bell JT, Psorysiewicz LK. CD8 high CD57+ T lymphocytes in normal healthy individual are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J. Immunol.* 1995; 155: 5046-56-.

Wange RL. LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T-cell-specific and general signaling pathways. *Science's stke* 2000; 63: 1-13.

Warren EH, Greenberg PD, Riddell SR. Cytotoxic T-lymphocyte-defined human minor histocompatibility antigens with a restricted tissue distribution. *Blood* 1998; 91: 2197-2207.

Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.* 1979; 300: 1069-1073.

Whiteside TL. Immune cells in the tumor microenvironment. Mechanisms responsible for functional and signaling defects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 451: 167-171.

Williams NS, Engelhard VH. Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4⁺ T-cells are regulated by CD8⁺ T-cells. *J. Immunol.* 1997; 159: 2091-2099.

Willman CL. The prognostic significance of the expression and function of multidrug resistance transporter proteins in acute myeloid leukemia: studies of the Southwest Oncology Group Leukemia Research Program. *Semin. Hematol.* 1997; 34 (4 suppl. 5): 25-33.

Xiaoli L, Jun L, Jeong-Kyu P, Hamilton TA, Rayman P, Klein E, Edinger M, Tubbs R, Bukowski R, Finke J. T cells from renal cell carcinoma patients exhibit an abnormal pattern of κ B-specific DNA-binding activity: a preliminary report. *Cancer Res.* 1994; 54: 5424-5429.

Yue FY, Dummer R, Geertsens R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulate HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int. J. Cancer* 1997; 16: 630-637.

Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, Longo DL, Alvord WG, Valderrama L, Falabella R, Harvey LK, Saravia N, Moreno LH, Ochoa AC. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes in patients with leprosy. *Infect. Immun.* 1998; 66: 499-508.

Zeile GM, Baake G, Henrici (eds.). *Kompendium der praktischen Hämatologie*. GIT Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt, 1983; 179-182.

Zeidler R, Eissner G, Meissner P, Uebel S, Tampe R, Lazis S, Hammerschmidt W. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 1997; 90: 2390-2397.