

**Untersuchungen über Tumor-Hybridzellen zur
Vakzinierung bei chronischer lymphatischer B-Zell-
Leukämie**

vorgelegt von

Thomas Allgeier

2007

Aus dem GSF-Institut für Molekulare Immunologie
Direktorin: Prof. Dr. Ph. D. Dolores Schendel

Untersuchungen über Tumor-Hybridzellen zur Vakzinierung bei chronischer lymphatischer B-Zell- Leukämie

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

vorgelegt von
Thomas Allgeier
aus
Passau
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ralph Mocikat
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. R. Rupp Prof. Dr. H. Schmetzer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	26.07.2007

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2002 bis Dezember 2004 am Institut für Molekulare Immunologie der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München erstellt. Prof. Dr. med. Ralph Mocikat hatte die Fachvertretung für die Fakultät für Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München inne.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Thomas Allgeier, Silke Garhammer, Elfriede Nößner, Ulrich Wahl, Konrad Kronenberger, Michael Hallek and Ralph Mocikat (2007): Vaccination against B-cell chronic lymphocytic leukemia with dendritic cell / tumor cell hybrids. *Cancer Letters*: 2007, Jan 8; 245(1-2): 275-283.

Christian Adam, Susan King, Thomas Allgeier, Heidi Braumüller, Josef Mysliwietz, Anja Kriegeskorte, Dirk H. Busch, Martin Röcken & Ralph Mocikat (2005): DC-NK cell cross-talk as a novel CD4+ T cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood*: 106, 338-344.

Publizierte Abstrakts und Kongress-Beiträge:

Thomas Allgeier, Christian Adam, Anja Kriegeskorte, Heidi Braumüller, Elisabeth Kremmer, Martin Röcken, Dirk H. Busch & Ralph Mocikat (2004): Alternative T-cell activation against tumour cells depending on innate immune effectors. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montréal, Canada, 18.-23. Juli 2004.

Abstrakt in *Clinical and Investigative Medicine* 27(4): 1B.

Christian Adam, Thomas Allgeier & Ralph Mocikat (2003): Priming of NK cells by dendritic cells generates an antitumor T-cell response. 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Berlin, 24.-27. Sept. 2003.

Abstrakt in *Immunobiology* 208(1-3): 14.

Susan King, Christian Adam, Caroline Lücking, Thomas Allgeier & Ralph Mocikat (2005): The DC-NK cell axis in CTL stimulation: an investigation into cytokines involved. 36th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Kiel, 21.-24. Sept. 2005

Abstrakt in *Immunobiology* 210: 474

Susan King, Christian Adam, Caroline Lücking, Thomas Allgeier & Ralph Mocikat (2005): The cytokine requirements for CTL induction through reciprocal DC-NK activation. Annual Conference of the British Society for Immunology, Harrogate. 06.-09. Dez. 2005.

Abstrakt in Immunology 116: 98

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
A Einleitung	1
1. Die Bedeutung der Immunologie in der modernen Medizin.....	1
1.1 Die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems.....	2
1.1.1 Das angeborene Immunsystem: ein Stützpfiler der primären Abwehr	2
1.1.2 NK-Zellen – wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems.....	3
1.2 Die Abwehrmechanismen des erworbenen Immunsystems.....	5
1.2.1 Die Bedeutung der B-Zellen	5
1.2.2 Die T-Zellen - ein hochspezifischer Schutzmechanismus	6
1.3 Die Schlüsselrolle der DZ	7
2. Die Wächterfunktion des Immunsystems	8
2.1 Die Klassifikation der Tumorantigene	9
2.2 Die Immunüberwachungshypothese	11
2.3 Die Mechanismen der Tumor-Immunevasion	13
3. Das Immunsystem und der Tumor– Möglichkeiten der Immuntherapie	14
3.1 Die Manipulation immunologischer Kontrollpunkte.....	14
3.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems	15
3.3 Der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Tumoren.....	16
3.4 Adoptiver Transfer tumorspezifischer T-Zellen	16
3.5 Das therapeutische Potenzial der DZ	17
3.5.1 Wichtige Eigenschaften Dendritischer Zellen	17
3.5.2 Die Präsentation von Tumorantigenen auf DZ	18
3.5.3 Die Immuntherapie mit DZ bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL).....	19
4. Fragestellungen	21
B Material und Methoden:	23
1. Generierung humaner DZ:	23
1.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur.....	23
1.1.1 Zählen der Zellen	23
1.1.2 Kryokonservierung von Zellen	23
1.1.3 Auftauen von Zellen.....	23
1.2 Gewinnung verschiedener Zellarten	24

1.2.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL) aus Gesamtblut	24
1.2.2 Anreicherung monozytärer Zellen durch magnetische Zellseparation	24
1.2.3 Negative Isolierung von NK-Zellen.....	25
1.3 Kultivierung humaner DZ.....	26
1.3.1 Generierung von unreifen DZ aus PBL	26
1.3.2 Erzeugen eines muren Phänotyps bei DZ	26
1.4 B-CLL-Zellen.....	26
1.5 Erzeugung von Fusionszellen mit Polyethylenglycol (PEG).....	26
1.6 Stimulationsansatz im humanen System.....	27
1.7 Messung der Zytokinkonzentration	28
1.7.1 Bestimmung der TNF- α -Konzentration mit WEHI-Zellen.....	28
1.7.2 Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels IFN- γ -ELISA	29
1.8 Die Durchflusszytometrie	29
1.8.1 Generelle Prinzipien der Zellfärbung in der Durchflusszytometrie.....	29
1.8.2 Phänotypische Analyse der DZ.....	30
1.8.3 Darstellung von Hybridzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	31
1.9 Anfertigen von Objektträgern	31
1.9.1 Vorbereiten der Objektträger	31
1.9.2 Zellfärbung mit monoklonalen Antikörpern	32
1.9.3 Zellfärbung mittels Cell-Tracker	33
1.10 Inaktivierung von DZ im Stimulationsansatz	34
1.11 Aufreinigung von Zellen mittels Zellsortierung	34
2. Material & Methoden muriner Teil.....	35
2.1 Kulturbedingungen der Tumorzelllinien.....	35
2.2 Gewinnung muriner DZ.....	35
2.3 Separation von murinen NK-Zellen.....	36
2.4 Verwendung eines Tetramers für NKG2D	36
2.5 Zytotoxizitätsversuche mit NK-Zellen.....	37
2.6 Tierexperimente	37
2.6.1 Allgemeine Versuchsbedingungen	37
2.6.2 Impfprotokoll zu Generierung von Immunität gegenüber A20	38
2.6.3 Depletion von T-Zellen und NK-Zellen <i>in vivo</i>	38

C Ergebnisse	40
1. Das therapeutische Potenzial von fusionierten Hybridzellen.....	40
1.1 Die Generierung von Hybridzellen	40
1.2 Etablierung eines Nachweissystems für Hybridzellen.....	41
1.2.2 Nachweis von Hybridzellen auf Objektträgern.....	43
1.2.2.1 Markierung der Zellen mit Cell-Tracker.....	44
1.2.2.2 Detektion der Hybridzellen mit spezifischen Antikörpern	44
1.3 Der Einfluss verschiedener Variablen auf die Fusionsrate	46
1.3.2 Die Abhängigkeit der Fusionsrate vom Reifungszustand der DZ	47
1.3.3 Der Einfluss des Verhältnisses von Tumorzellen zu DZ	48
1.3.4 Evaluierung der Fusionsfrequenz.....	50
1.4. Der Einsatz von Hybridzellen in Stimulationsansätzen	51
1.4.1 Messung der IFN- γ -Konzentration im Stimulationsansatz	51
1.4.2 Die Beziehung zwischen stimulatorischem Potenzial und der Fusionsrate.....	54
1.4.3 Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei der Zellmischung.....	55
2. Die Rolle der NK-Zellen bei der Antitumorantwort	57
2.1 Bedeutung der DZ-NK-Zell-Achse.....	57
2.2 CD4 ⁺ -unabhängige Generierung zytotoxischer T-Zellen	60
2.3 NKG2D – ein NK-Zell-aktivierender Rezeptor.....	61
D Diskussion	63
1. Die Rolle des Immunsystems in der Antitumor-Antwort	63
1.1 Das Potenzial von Hybridzellen.....	64
1.2 Der Einsatz allogener DZ bei der Generierung von Hybridzellen.....	65
1.3 Einfluss des Reifungszustands von DZ.....	66
1.4. Die Wahl des richtigen Nachweissystems für Hybridzellen.....	68
1.5 Die Abhängigkeit des Stimulationserfolgs von der Fusionsrate	69
1.6 Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort durch die Zellmischung.....	70
1.7 Ausblick	71
2. Angeborenes und erworbenes Immunsystem sind für die effiziente Immunantwort wichtig...	72
2.1 Die Bedeutung von NK-Zellen für die Protektion gegen das A20-Lymphom	73
2.2 Die Generierung zytotoxischer T-Zellen ohne CD4 ⁺ -Hilfe	74
2.3 NKG2D – ein Schlüssel zur NK-Zell-Aktivierung.....	76
2.4 Ausblick	78

E Zusammenfassung	79
F Referenzen	82
F Danksagung	97
G Lebenslauf	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Antigen Presenting Cell =Antigen-präsentierende Zelle
biot.	biotinyliert
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation = Differenzierungsantigen
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CTL	cytotoxic T lymphocytes = zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA	cytotoxic T lymphocytes antigen = zytotoxisches T-Lymphozytenantigen
d	Tag
DZ	dendritische Zelle(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay = enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell scan = Fluoreszenz-aktivierte Zellzählung
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoreszin-Isocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
Gy	Gray
h	Stunde
HPV	Humanes Papillomvirus
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM	intracellular adhesion molecule = intrazelluläres Adhäsionsmolekül
Id	Idiotyp
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LFA	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen
KIR	Killer-inhibierende Rezeptoren
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	magnetic cell sorting = magnetische Zellseparation
MAGE	melanoma-associated antigen = Melanom-assoziiertes Antigen
MART	melanoma antigen recognized by T cells
MHC	major histocompatibility complex = Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
MICA/B	major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A/B
MULT-1	murine ULBP-like transcript 1
NKT- Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

PAMP	pathogen-associated molecular patterns = Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
PE	Phycoerythrin
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RAE-1	retinoic acid early inducible-1 gene
RNS	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
STAT	signal transducer and activator for transcription
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transforming growth factor = transformierender Wachstumsfaktor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
U	Unit = Einheit
ULBP	UL16-binding proteins = UL16-bindende Proteine
VEGF	vascular endothelial growth factor = Gefäßendothel-Wachstumsfaktor

Maße und Einheiten

IU	International Units = Internationale Einheiten
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
nm	Nanometer

A Einleitung

1. Die Bedeutung der Immunologie in der modernen Medizin

Die Immunologie ist die Lehre von den biologischen und biochemischen Grundlagen der körpereigenen Abwehr von Krankheitserregern und körperfremden Stoffen sowie Störungen und Fehlfunktionen dieser Abwehrmechanismen. Zentraler Forschungsgegenstand ist das Immunsystem, welches durch eine Reihe von zellulären und humoralen Reaktionen die Erkennung und Inaktivierung von für den Körper schädlichen Vorgängen realisiert. Diese Reaktionen werden unter dem Begriff Immunantwort zusammengefasst. Die zentrale Funktion des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor schädlichen äußeren und inneren Noxen zu bewahren, und somit unsere physische Individualität aufrecht zu erhalten. Ein wichtiger Fortschritt auf diesem Gebiet gelang dem Landarzt Edward Jenner, der 1796 erstmals einen Jungen mit harmlosen Kuhpocken impfte und ihm damit Schutz vor der verheerenden Pockenerkrankung verlieh. Durch weitere entscheidende Entdeckungen, wie die Entwicklung eines Choleraimpfstoffes durch Louis Pasteur oder den Einsatz von Antiseren gegen Diphtherie durch Emil von Behring, kristallisierte sich im Laufe der Zeit unser heutiges Verständnis der Immunologie heraus. Diese wegweisenden Erkenntnisse eröffneten neue Möglichkeiten im Bereich der Prävention und kurativen Behandlung von Krankheiten und etablierten das Prinzip der Vakzinierung fest in unserer modernen Medizin. Erfolgreiche Beispiele dafür sind die Ausrottung der Pocken 1980 durch ein konsequentes Impfprogramm durch die WHO sowie die Eindämmung der Poliomyelitis durch flächendeckende Massenschutzimpfungen. Dieser prophylaktische Ansatz eröffnete der Medizin neue Perspektiven im Bereich der Infektionskrankheiten und führte auch zur Frage, inwieweit das Prinzip der Vakzinierung nicht auch auf andere Leiden, wie etwa Krebserkrankungen, übertragen werden könnte. Trotz großer Fortschritte der modernen Medizin bei der Behandlung der verschiedenartigen Tumoren in der Chirurgie, der Radiotherapie oder Chemotherapie, sind die kurativen therapeutischen Möglichkeiten, insbesondere bei bereits disseminierten Erkrankungen, sehr begrenzt. Viele Behandlungen werden zudem mit sehr toxischen Substanzen durchgeführt, die für die durch ihre Krankheit bereits geschwächten Patienten noch zu einem zusätzlichen Verlust an Lebensqualität führen. In den letzten Jahren zeichnete sich jedoch immer klarer ab, welche Mechanismen bei einer gegen einen Tumor gerichteten Immunantwort eine Rolle spielen und welche genetischen Alterationen letztendlich zur Entstehung einer malignen Erkrankung beitragen. So eröffneten sich neue Einsatzmöglichkeiten in der Immuntherapie, welche nebenwirkungsärmere und selektivere therapeutische Ansätze im Bereich der Tumorbehandlung ermöglichen. Einer dieser

Ansätze zur Generierung einer Antitumorantwort ist die Verwendung von Dendritischen Zellen (DZ), professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Trotz der Entdeckung der Langerhanszellen bereits im Jahre 1868, einer Untergruppe von DZ in der Haut (Avigan, 2004), wurden lange Zeit die Möglichkeiten dieser Zellart unterschätzt. Erst in den letzten Jahren zeichnete sich ihr therapeutisches Potenzial, durch die reichhaltige Expression von kostimulatorischen Molekülen und ihre Fähigkeit, sowohl mit $CD4^+$, als auch $CD8^+$ -T-Lymphozyten zu interagieren, immer stärker ab (Kufe, 2000). Um eine gegen den Tumor gerichtete spezifische Immunantwort zu erzeugen, wird durch verschiedene Herangehensweisen versucht, DZ zur Expression von tumorassoziierten Antigenen zu bringen. Diese vorbehandelten immunmodulatorischen Zellen werden dann, analog dem Vorgehen bei einer Impfung, wie eine „Tumorvakzinierung“ verabreicht, um Effektorzellen der Immunabwehr gezielt gegen maligne Zellen zu dirigieren. Erste Erfolg versprechende Ergebnisse auf diesem Gebiet zeigten sich sowohl bei Tiermodellen als auch im humanen System. So wurde bei einem Teil von Patienten, die an fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom oder Mammakarzinom (Avigan *et al.*, 2004) litten, nach einer Behandlung mit derartig modifizierten DZ eine Regression der Tumormasse oder zumindest eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs beobachtet (Marten *et al.*, 2002; Oosterwijk-Wakka *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003). Eine weitere Erkrankung, die Möglichkeiten für die Immuntherapie bietet, ist die chronische lymphatische Leukämie der B-Zellen (B-CLL). Diese Erkrankung ist charakterisiert durch eine Anhäufung von malignen B-Zellen im lymphatischen Gewebe, im Knochenmark sowie im peripheren Blut. Obwohl durch Chemotherapie Remissionen induziert werden können, ist eine definitive Heilung ausgeschlossen. Jedoch bietet die CLL, als ein von Immunzellen ausgehender Tumor, die Möglichkeit durch Modifikationen am Immunsystem, wie etwa durch Tumorvakzinierung, therapeutisch einzugreifen (Goddard *et al.*, 2001). Um dieses sich bietende Potenzial zu benützen, muss man sich zuerst den Grundlagen der Immunantwort zuwenden, um die dahinter stehenden Mechanismen zu verstehen.

1.1 Die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems

1.1.1 Das angeborene Immunsystem: ein Stützpfiler der primären Abwehr

Bei der Abwehr von Pathogenen sind zwei Mechanismen zu unterscheiden, die *angeborene* oder *nicht-adaptive* und die *erworbene* oder *adaptive* Immunantwort (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000). Die angeborene Immunantwort ist die erste und äußerst wirksame Abwehrreaktion, die unspezifisch Infektionen unter Kontrolle halten oder sogar beseitigen kann, bevor das erworbene Immunsystem

aktiv wird. Bei der nicht-adaptiven Immunantwort spielen als Effektorzellen Makrophagen und Granulozyten eine große Rolle (Aderem & Underhill, 1999). Beide Zellarten können Krankheitserreger mithilfe von Rezeptoren der Zelloberfläche erkennen, die zwischen körpereigenen Zellen und Pathogenen differenzieren können. Infizierte Zellen können von Makrophagen phagozytiert und durch lytische Enzyme anschließend unschädlich gemacht werden. Bei der Abwehr von Krankheitserregern werden Chemokine wie IL-8 freigesetzt, die weitere Abwehrzellen zum Infektionsort locken (Larsson *et al.*, 1999). Des Weiteren werden Akutphasenproteine wie TNF- α , IL-1 oder IL-6 gebildet, die den Körper längerfristig optimal zur Bekämpfung der Pathogene etwa durch Fieber und Leukozytose vorbereiten. Durch die Ausschüttung dieser und anderer Chemokine werden auch Antigen-präsentierende Zellen mobilisiert, die bei Persistenz der Pathogene die adaptive Immunantwort einleiten können.

1.1.2 NK-Zellen – wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems

Zum angeborenen Immunsystem zählen auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), welche eine bedeutende Funktion in der primären Immunantwort besitzen. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphatischen CD34⁺-Vorläuferzelle (Yu *et al.*, 1998) und zirkulieren im Blut. Es sind zwei Unterarten zu differenzieren (Cooper *et al.*, 2001): die erste, etwa 90% der NK-Population, besteht aus schwach CD56⁺-Zellen, die hochaffine IL-2 Rezeptoren exprimieren und nach Gabe von IL-2 oder IL-12 eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber den Zielzellen zeigen (Baume *et al.*, 1992). Die zweite Unterart besteht aus stark CD56⁺-Zellen mit immunregulatorischer Funktion, die große Mengen an Zytokinen wie dem Th1-Interferon IFN- γ produzieren können. Natürliche Killerzellen besitzen zytotoxische Granula, die nach Freisetzung Zielzellen apoptotisch werden lassen können. Ihre Aktivierung kann auf vielfältige Weise geschehen, etwa als Reaktion auf von Makrophagen freigesetzte Chemokine oder durch Interaktion mit DZ (Zitvogel, 2002). Die Aktivierung kann durch lösliche Faktoren wie IFN- α und IFN- β , die durch von Viren befallene Zellen produziert werden, oder durch IL-12 um ein Vielfaches gesteigert werden (Routes, 1992). Um zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen zu differenzieren, sind auf NK-Zellen eine Reihe von Rezeptoren auf der Oberfläche exprimiert, die über inhibierende oder aktivierende Signale die Aktivität der NK-Zellen regulieren (Moretta *et al.*, 2002). Ein Mechanismus zur Inhibition von Natürlichen Killerzellen beruht auf der Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Zielzellen. Die verschiedenen MHC-Klasse-I-Moleküle sind ein guter Anhaltspunkt für die Integrität einer Zelle, da sie bei viralen Infektionen oder tumorösen Veränderungen herunterreguliert werden können (Garrido *et al.*, 1997; Ljunggren & Karre, 1990). Ein Teil dieser inhibierenden Rezeptoren besteht aus so genannten KIR (Killer-inhibitorische Rezeptoren)

(Yokoyama & Seaman, 1993), die gemeinsame Bereiche der Allele der MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen, ein Teil ist höchst spezifisch für bestimmte HLA-Moleküle der Klasse I, ein weiterer Rezeptor, CD94-NKG2A (Moretta *et al.*, 1996; Lanier, 1998), erkennt HLA-E-Moleküle. Da die verschiedenen Rezeptorgattungen jeweils nur auf bestimmten Unterarten der NK-Zellen exprimiert werden, kann bereits der Verlust eines einzigen HLA-Allels durch Natürliche Killerzellen erkannt und darauf folgend die betreffende Zelle lysiert und proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden. Sobald MHC-Klasse-I-Moleküle auf Zellen niedriger exprimiert werden, werden weniger inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen stimuliert und es überwiegen aktivierende Rezeptoren (Lanier, 1998; Ravetch & Lanier, 2000; Long, 1999). Eine der am besten untersuchten Rezeptoren ist NKG2D, ein C-Typ-Lectin, das auf allen NK-Zellen und CD8⁺-T-Zellen sowie den meisten $\gamma\delta$ -T-Zellen vorkommt. Als Liganden von NKG2D beim Menschen wurden „MHC class I chain related antigens“ (MICA) und UL16-bindende-Proteine (ULBP), bei der Maus H60, Rae1 und MULT identifiziert (Raulet, 2003). Die Expression dieser Liganden tritt nur bei zellulärem Stress oder neoplastischer Transformation auf, was deren Bedeutung als Warnsignal für maligne Prozesse unterstreicht (Farag *et al.*, 2002; Cosman *et al.*, 2001). Weitere aktivierende Rezeptoren sind die nur auf NK-Zellen vorkommenden NKp30, NKp44 und NKp46, die unter dem Gruppennamen Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren („natural cytotoxicity receptors“, NCR) zusammengefasst werden (Moretta & Moretta, 2004). Ebenso wirken weitere Membranrezeptoren, wie CD40-Ligand, CD69, 2B4 oder CD16, das die Bindung von NK-Zellen an den F_c-Teil der Antikörper ermöglicht (Carbone *et al.*, 1997; Borrego *et al.*, 1999; Sivori *et al.*, 2000), modulierend auf die Aktivierung der NK-Zellen ein, so dass die Immunantwort durch die Balance einer Vielzahl von Rezeptoren reguliert wird. Bei Eintritt von Pathogenen können NK-Zellen durch diese Mechanismen bereits in einem frühen Stadium noch vor den Antigen-spezifischen T-Zellen aktiviert werden. Sie beeinflussen damit auch den adaptiven Arm des Immunsystems durch verschiedene Stimuli, wie die Sekretion von verschiedenen Zytokinen, die Bereitstellung von Antigenen aus lysierten Zellresten sowie direkte zelluläre Interaktion. DZ werden dadurch zu vermehrter Reifung und Antigenaufnahme angeregt. Eine weitere Möglichkeit, wie das angeborene Immunsystem mit dem erworbenen interagiert, zeigten Mocikat *et al.* (Mocikat *et al.*, 2003) auf, als sie nachwiesen, dass Tumoren mit niedriger MHC-Klasse-I-Expression NK-Zellen zur IFN- γ - Ausschüttung stimulieren. Dies bewirkt eine Signalkaskade, die über die Ausbildung von IL-12- produzierenden DC1 letztendlich eine stark protektive CD8⁺-T-Zellantwort induziert (Zitvogel, 2002; Glas *et al.*, 2000).

1.2 Die Abwehrmechanismen des erworbenen Immunsystems

Neben dem nicht-adaptiven Immunsystem, ist ein weiterer Mechanismus zur Abwehr von Pathogenen das erworbene Immunsystem (Janeway *et al.*, 2002). Das erworbene Immunsystem entwickelt sich erst aus der Präsenz und dem Erkennen von Krankheitserregern durch Zellen der Immunabwehr und zeigt eine klare Spezifität für ein bestimmtes Pathogen. Durch das daraus entstehende immunologische Gedächtnis kann das erworbene Immunsystem effektiver auf wiederholte Pathogenexposition reagieren. Zwei Arten von Lymphozyten sind dabei die Hauptakteure: B-Zellen tragen an ihrer Zelloberfläche Immunglobuline als Antigenrezeptoren und sezernieren nach ihrer Aktivierung und Differenzierung diese Moleküle als lösliche Antikörper. T-Zellen besitzen spezifische T-Zell-Rezeptoren, die auf MHC-Moleküle präsentierte pathogene Peptidfragmente erkennen können. Je nach Wechselwirkung des MHC/Peptid-Komplexes reagieren die verschiedenen Untergruppen der T-Zellen mit der betroffenen Wirtszelle und modulieren durch Interaktion mit diversen Zellen die nachfolgende Immunantwort.

1.2.1 Die Bedeutung der B-Zellen

Die humorale Immunantwort ist ein Teil der adaptiven Immunantwort und wird von B-Zellen bewerkstelligt. Naive B-Lymphozyten, die sich in lymphoiden sekundären Immunorganen befinden, erkennen mittels ihres B-Zell-Rezeptors (BCR) Antigene in ihrer nativen Form. Die Bindung von Antigenen an den jeweiligen B-Zell-Rezeptor-Typ bewirkt eine verstärkte Expression von MHC-Klasse-II- und B7-Molekülen auf den B-Zellen (Janeway *et al.*, 2002). Nach Antigenerkennung wandern die B-Zellen aus ihrem ursprünglichen Sitz, den Follikeln, aus und treten in Kontakt mit den korrespondierenden T-Zellen. B-Zellen induzieren die Expression von CD40-Liganden auf den T-Zellen, die B-Zell-stimulierende Zytokine produzieren (Jaiswal & Croft, 1997). Dies führt zur Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Welche Klasse von Antikörpern sezerniert wird, wird durch die Interaktion CD40/CD40L sowie durch das Zytokinmilieu bestimmt (Croft & Swain, 1991): T-Helfer-Zellen vom Th1- Typ führen via $\text{IFN-}\gamma$ zur Produktion von opsonierenden IgG1- und IgG3-Subklassen, die die Phagozytose erleichtern. Das von Th2-Zellen sezernierte IL4 bewirkt eine Umschaltung zum IgE-Isotyp, dem vor allem bei der Beseitigung von Parasiten eine wichtige Rolle zukommt. Ein kleiner Teil der aktivierten B-Zellen differenziert jedoch nicht zu Plasmazellen, sondern zu Gedächtniszellen. Diese zirkulieren frei im Blut oder überleben im Knochenmark und können bei erneutem Auftreten eines spezifischen Pathogens schnell zu Antikörper-produzierenden Zellen differenzieren. Dadurch kann im Wiederholungsfall ein Krankheitserreger schnell und wirksam bekämpft werden.

1.2.2 Die T-Zellen - ein hochspezifischer Schutzmechanismus

Die zweite für die adaptive Immunantwort wichtige Zellart sind die ebenfalls zu den Lymphozyten zählenden T-Zellen. T-Zellen lassen sich funktionell und durch Oberflächenmarker in verschiedene Untergruppen einteilen. Eine große Gruppe sind die $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen, die nach Differenzierung zu Effektorzellen Makrophagen, B-Zellen und weitere Zellarten in ihrer Funktion unterstützen. Helferzellen können sich unter dem Einfluss von verschiedenen Stimuli zu zwei Arten von Effektorzellen entwickeln: unter Wirkung von IL-12 und Präsenz eines Antigens werden aktivierte naive $CD4^+$ -Th0-Zellen zu Th1-Helferzellen, die Faktoren, wie $IFN-\gamma$ oder $TNF-\beta$ sezernieren und damit Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aktivieren können. Dadurch wird eine zelluläre Immunantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen initiiert und eine Entzündungsreaktion induziert. Unter Einwirkung von IL-4 differenzieren T-Zellen zu Th2-Helferzellen, die durch Sekretion von IL4, IL5 und IL-10 die B-Zell-Proliferation und die Produktion von Eosinophilen fördern (Mosmann & Coffman, 1989; Bottomly, 1988). Sie stärken somit die humorale Immunantwort und wirken daher vor allem als Schutz gegen extrazelluläre Mikroorganismen (Fitch *et al.*, 1993). Die Botenstoffe für die Entwicklung einer Th1- oder Th2-Antwort beeinflussen und hemmen die Entwicklung in die jeweils andere Richtung, so dass es zu einer Polarisierung der Immunantwort in nur eine einzige Richtung kommt (Fitch *et al.*, 1993). Ein weiteres Kennzeichen von T-Helferzellen ist die Expression von CD40-Ligand (CD40L) auf ihrer Oberfläche, einem Rezeptor aus der TNF-Familie. Die Interaktion von CD40 mit seinem Liganden CD40L spielt eine wichtige Rolle bei der Polarisierung von Th1-Antworten, der Induktion von T-Zell-Antworten gegen Viren und Bakterien sowie bei der Erzielung einer protektiven Antitumorantwort nach Gabe einer Tumorstoffimpfung. Durch Bindung an CD40 bei T-Helferzellen werden Monozyten zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen gebracht, bei DZ wird die Sekretion von IL-12 (Koch *et al.*, 1996) gefördert sowie die Expression von stimulierenden Molekülen aus der B7-Gruppe wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) verstärkt (Cella *et al.*, 1996), so dass zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen besser aktiviert werden können. Diese Interaktion von CD40/CD40L bietet auch Vorteile bei der Immuntherapie von Tumoren durch Erleichterung der Aufnahme von tumorassoziierten Antigenen und deren Präsentation durch stimulierte DZ. Derart stimulierte DZ können leichter zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und deren klonale Expansion beitragen und dadurch eine effektive Antitumorantwort generieren (Toes *et al.*, 1998). Eine andere Gruppe, die zytotoxischen $CD8^+$ -T-Zellen, sind darauf spezialisiert, MHC-Klasse-I-assoziierte Peptide auf Zellen zu erkennen. Diese auch T_C -Zellen genannten Lymphozyten können, sobald spezifische Antigene erkannt worden sind, sich durch Integrine fest mit den Zielzellen

verbinden und sie durch Exozytose von vorgefertigten Peforinen und Granzymen töten. Ein weiterer, von der Exozytose toxischer Substanzen unabhängiger Mechanismus zur Eliminierung von Zellen ist die Expression des Fas-Liganden (CD95L) auf T_C-Zellen, der an den Fas-Rezeptor (CD95) auf Zielzellen bindet. Wenn CD95 auf den Zielzellen aktiviert wird, bewirkt dies durch Freisetzung von Caspasen die Apoptose der Zielzelle (Medana *et al.*, 2000). Des Weiteren können T_C-Zellen Zytokine wie TNF- α , TNF- β oder INF- γ ausschütten, um weitere Zellen der Immunabwehr zu aktivieren. INF- γ führt zur verstärkten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Zielzellen und erhöht auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit, dass pathologische Zellen von zytotoxischen Zellen erkannt werden (Callan *et al.*, 2000). Das Erkennen von tumorassoziierten Antigenen und die konsekutive Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, ist einer der wichtigsten Mechanismen in der Antitumorantwort, dem auch bei Vakzinierungsansätzen eine große Rolle zukommt. Diese Aktivierung zu bewaffneten T-Effektorzellen erfolgt durch stimulierte Antigen-präsentierende Zellen sowie über T-Helferzellen.

1.3 Die Schlüsselrolle der DZ

Eine entscheidende Rolle bei der Induktion, Regulation und Koordination der angeborenen und adaptiven Immunantwort haben DZ (Banchereau & Steinman, 1998). DZ sind in peripherem Gewebe weit verbreitet, um dort potenzielle Antigene zu sammeln und aufzunehmen. Die Aufnahme und Prozessierung dieser Antigene bewirkt eine Reifung der DZ, die im Anschluss in lymphoides Gewebe einwandern, um mit anderen Zellen, wie B-Zellen, T-Zellen oder NK-Zellen zu interagieren. Auf Grund dieser Fähigkeit, alle Elemente der nicht-adaptiven und adaptiven Immunantwort zusammenzubringen, sind DZ Gegenstand von vielfältigen Untersuchungen und Ansätzen, um sich dieses Potenzial auch bei der Immuntherapie von Tumoren zunutze zu machen (Banchereau & Palucka, 2005). DZ stammen aus zwei Vorläufern (Shortman & Liu, 2002): aus der myeloischen Linie entwickeln sich zwei Unterarten von DZ, einerseits Langerhanszellen, die vor allem in der Haut zu finden sind, und andererseits interstitielle DZ, die in allen anderen Geweben vorkommen. Aus der lymphoiden Linie entstehen plasmazytoide DZ (pDZ), die nach viralen Infektionen große Mengen an Typ-I-Interferonen wie IFN- α oder IFN- β ausschütten können. Zytokine haben großen Einfluss auf die Generierung von DZ aus den unterschiedlichen Vorläuferzellen. Unter GM-CSF und IL-4 differenzieren Monozyten zu IL-4-DZ, einer Art von interstitiellen DZ (Sallusto & Lanzavecchia, 1994), während unter IL-15 sich IL-15-DZ (Mohamadzadeh *et al.*, 2001) oder unter IFN- α sich IFN- α -DZ entwickeln (Gabriele *et al.*, 2004). Die einzelnen Unterarten unterscheiden sich in ihrem jeweiligen stimulatorischen Potenzial. So

können IL-15-DZ im Vergleich zu IL-4-DZ bei weitem effizienter zytotoxische T-Zellen aktivieren, während beide Unterarten dasselbe Potenzial haben, CD4⁺-T-Zellen zu stimulieren (Mohamadzadeh *et al.*, 2001). Die Hauptaufgabe unreifer DZ ist es, Antigene zu sammeln, während bei reifen DZ die Antigenpräsentation in den Vordergrund tritt (Banchereau & Steinman, 1998). Die Maturation von DZ kann gefördert werden durch eine Reihe verschiedener Stimuli, wie etwa Lipopolysaccharid (LPS), das auf gramnegativen Bakterien vorkommt. Es zählt zu einer Gruppe von konservierten, relativ unveränderlichen mikrobiellen Strukturen, die unter dem Namen „pathogen-associated-molecular-patterns“ (PAMP) zusammengefasst werden. Derartige Reize werden auf DZ von einer Familie spezieller Rezeptoren, den Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt und unterstützen die Maturation der DZ (Reis e Sousa, 2001). Die Reifung bewirkt mehrere koordinierte Vorgänge in den Zellen: Rezeptoren zur Phagozytose und Endozytose werden abgebaut, es werden mehr MHC-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert, kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 werden verstärkt exprimiert und ihre Migrationsfähigkeit in lymphatisches Gewebe durch spezielle Oberflächenmoleküle erhöht (Banchereau *et al.*, 2000). Diese Veränderungen durch die Reifung bewirken auch eine erhöhte Sekretion von immunstimulatorischen Chemokinen wie IL-2 und IL-18 durch DZ, die die Entstehung einer Th1-Antwort fördern (Brossart *et al.*, 2001). Sobald DZ in die lymphatischen Organe eingewandert sind, treten sie in Kontakt mit anderen Immunzellen. Dort unterstützen sie durch Interaktion mit CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen die Entstehung einer spezifischen zytotoxischen Antwort und wirken auf die Differenzierung von Immuntoleranz fördernden CD4⁺/CD25⁺-T-Zellen (T_{reg}) (Steitz *et al.*, 2001; Suttmüller *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 2003). Durch diese Eigenschaften sind DZ sehr interessant für die Vakzinierung gegen Tumoren, denn sie bieten die Möglichkeit, ansonsten ungenügend stark ausgeprägte antitumorale Immunantworten durch ihr immunmodulatorisches Potenzial zu verstärken.

2. Die Wächterfunktion des Immunsystems

Damit das Immunsystem erkennen kann, ob krankhafte Prozesse in Zellen vorliegen, exprimiert jede Zelle spezialisierte Glykoproteine, die MHC-Moleküle, die einer ständigen Kontrolle durch Zellen des Immunsystems unterliegen. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. MHC-Klasse-I-Moleküle werden praktisch auf jeder Zelle exprimiert. Sie werden nach ihrer Synthese im Zytosol der Zelle ins Endoplasmatische Retikulum verlagert, wo von TAP („Transporters Associated with Antigen Processing-1/-2“) bereitgestellte endogene Peptide die Möglichkeit haben, sich an der Peptidbindungsstelle der MHC-Moleküle festzusetzen. Nach

Bindung dieser Peptide werden die MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche gebracht. T-Zellen erkennen und kontrollieren mittels des CD8⁺-Rezeptors die auf den MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten endogenen Peptide und können bei pathologischen Abweichungen die Apoptose der Zielzelle induzieren (Uebel & Tampe, 1999). MHC-Klasse-II-Moleküle werden nur von speziellen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert, wie B-Zellen, Makrophagen und vor allem von DZ. Die auf den Molekülen der MHC-Klasse-II präsentierten Peptide sind extrazelluläre fremde Antigene, die von Endosomen aufgenommen und in Proteasomen prozessiert werden. MHC-Klasse-II-Moleküle binden die prozessierten Antigene und präsentieren sie auf der Zelloberfläche (Chapman, 1998). T-Zellen überwachen diese auf den MHC-Klasse-II-Moleküle gebundenen exogenen Peptide durch ihren CD4⁺-Rezeptor und können, wenn notwendig, die adaptive Immunantwort einleiten. Eine Abweichung von dieser klassischen dichotomen Einteilung der Präsentation von endogenen Peptiden auf MHC-Klasse-I-Molekülen und exogenen Peptiden auf MHC-Klasse-II-Molekülen stellt der Mechanismus der Kreuzpräsentation („Cross-Presentation“) dar. Vor allem professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie DZ haben die Fähigkeit, exogene Proteine durch Endozytose zu internalisieren. Nach Prozessierung werden die Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche präsentiert. Damit die durch Kreuzpräsentation präsentierten Peptide im Immunsystem nicht Toleranz induzieren, sondern eine zytotoxische Antwort durch CD8⁺-T-Zellen auslösen, ist die gleichzeitige Kostimulation entscheidend (Rock & Shen, 2005). Diese Möglichkeit DZ, durch Kreuzpräsentation exogene Peptide sowohl auf Molekülen der Klasse MHC-I als auch der Klasse MHC-II dem Immunsystem zu präsentieren, ist auch für die Anwendung von Vakzinen gegen Tumoren interessant. So kann das therapeutische Potenzial von Tumorkvakzinen erhöht werden, indem die zur Kreuzpräsentation fähigen DZ mit tumorassoziierten Antigenen beladen werden, wodurch sowohl eine CD4⁺-, als auch CD8⁺-T-Zell-Antwort gegen diese Antigene initiiert werden kann (Freigang *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003).

2.1 Die Klassifikation der Tumorantigene

Immuntherapeutische Ansätze gegen Tumoren beruhen vor allem auf der Erkennung von tumorassoziierten Antigenen durch Immunzellen, die es dem Immunsystem ermöglichen, maligne Zellen zu eliminieren. Derartige Tumorantigene können nach Pardoll in vier Kategorien eingeteilt werden (Pardoll, 2002).

- Eine wichtige Gruppe sind Tumorantigene viralen Ursprungs, wie die beim Zervixkarzinom in Verbindung mit einer HPV16- oder HPV18-Infektion auftretenden Protoonkogene E6 und E7

(Scheffner *et al.*, 1990). E6 führt zu einer gesteigerten Degradation des Tumorsuppressorgens p53, E7 interagiert mit den S-Phase-Genen Cyclin-A und Cyclin-E und bewirkt durch eine Vervielfältigung der Zentriolen eine Aneuploidie. Beide Protoonkogene können unabhängig voneinander menschliche Zellen immortalisieren und zu einer gesteigerten Entartungsrate beitragen. Da sie im Gegensatz zu den meisten Tumorantigenen nicht aus normalen oder mutierten Proteinen stammen, sondern ihr Ursprung viraler Natur ist und sie von einem Großteil der Tumoren konstant exprimiert werden, aber nicht im gesunden Gewebe vorkommen, bieten sie sich als Antigen-Epitope zur Immuntherapie an (Zur Hausen, 2002).

- In der zweiten Gruppe werden Differenzierungsantigene zusammengefasst, die von Genen kodiert werden, die nur in bestimmten Gewebearten vorkommen und sowohl in gesunden als auch auf malignen Zellen exprimiert werden. Melan-A/MART1, gp100, gp75 sind derartige Differenzierungsantigene (Boon & Old, 1997; Robbins & Kawakami, 1996), die auf gesunden, normalen Melanozyten und bei Melanomen sehr hoch exprimiert zu finden sind. Sie stammen aus der Biosynthese des Farbstoffpigments Melanin. Die Differenzierungsantigene sind schwach immunogen und lösen ohne äußere Manipulation nur höchst selten zytotoxische T-Zell-Antworten aus (Boon *et al.*, 2006). In klinischen Studien konnte bei Melanom-Patienten, denen MART1 spezifische CD8⁺-T-Lymphozyten zusammen mit IL-2 infundiert wurden, eine T-Zellantwort beobachtet werden (Yee *et al.*, 2000).

- Die dritte Gruppe sind Tumorantigene, die im Vergleich zu normalen Zellen auf Tumorzellen stark überexprimiert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Protein HER-2/neu, eine zum Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor homologe Rezeptortyrosinkinase (Baxevanis *et al.*, 2004; Slamon *et al.*, 1989). HER-2/neu ist ein nicht mutiertes Protein, das in einer Vielzahl von Geweben epithelialen Ursprungs vorkommt und eine Schlüsselrolle während der Zellproliferation und Zelldifferenzierung im Embryonalstadium einnimmt. In normalen Zellen jenseits des Embryonalstadiums ist es nur als einzelne Kopie vorhanden. Bei unterschiedlichen Tumorarten wie dem Kolonkarzinom, dem Ovarialkarzinom oder dem Adenokarzinom der Lunge, wird jedoch eine starke Amplifikation des Gens und seines Proteins beobachtet. Auch beim Mammakarzinom spielt HER-2/neu eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation, und seine starke Überexpression geht mit einer schlechten Prognose der Patienten einher. Bei einigen Patienten kommt es auf Grund der, wenn auch schwachen, Immunogenität von HER-2/neu bereits ohne äußere Manipulation zur Generierung von zytotoxischen T-Zellen, welche aber meist die Progression der Krankheit wenig beeinflussen. Um dieses Potenzial bei einer Vakzinierung gegen den Tumor zu nützen, ist es nötig, die schwache Immunogenität des Tumorantigens HER-2/neu zu verstärken und eine T-Zell-Toleranz zu vermeiden, um eine effektive gegen den Tumor gerichtete

Antwort hervorzurufen (Bernhard *et al.*, 2002). So deuten klinische Studien darauf hin, dass sich durch Vakzinierung gegen HER-2/neu die Rezidivrate des Mammakarzinoms bei Hochrisiko-Patienten reduzieren lässt (Peoples *et al.*, 2005).

- Die vierte Gruppe umfasst Antigene, die streng tumorspezifisch sind. Sie entstehen durch Punktmutationen oder Genumlagerungen, welche oft Teil der Onkogenese sind. Eine T-Zell-Antwort kann bei Punktmutationen dadurch ausgelöst werden, dass sie entweder die Präsentation eines Peptids auf MHC-Klasse-I-Molekülen bewirken, das vorher nicht gebunden werden konnte, oder dass sie ein bereits bestehendes Peptid so verändern, dass ein von den T-Zellen auf MHC-Klasse-I-Molekülen erkanntes neues Epitop entsteht (Janeway *et al.*, 2002). Ein Beispiel dafür ist der für jeden Patienten spezifische Tumoriidiotyp (Id) bei klonalen Tumorerkrankungen von B-Zellen (Kwak *et al.*, 1992; Bendandi, 2004). Durch die klonale Expansion von malignen B-Zellen besitzt jede dieser B-Zellen denselben spezifischen Idiotyp, der nur auf den Tumorzellen exprimiert wird. Der Idiotyp kann membrangebunden präsentiert werden, wie etwa bei der chronischen lymphatischen Leukämie (Mocikat *et al.*, 1997; Wahl *et al.*, 2003), oder wie beim Multiplen Myelom (Yi *et al.*, 2002) löslich sezerniert werden. Die konstante Expression und absolute Tumorspezifität macht den Tumoriidiotyp von malignen klonalen B-Zellen für immuntherapeutische Vakzinierungsansätze interessant und führte bereits zu klinischen Studien der Phase III (Bendandi, 2001; Bendandi, 2004).

2.2 Die Immunüberwachungshypothese

Angesichts der Vielzahl an Veränderungen auf genetischer und epigenetischer Ebene, die im Lauf der Karziogenese auftreten, muss davon ausgegangen werden, dass Tumorzellen eine große Anzahl von tumorassoziierten Antigenen exprimieren, die sie von gesunden Zellen unterscheiden, und die, sobald sie vom Immunsystem erkannt werden, zu einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort führen sollten. Bereits 1959 postulierte Thomas eine Rolle des Immunsystems bei der Tumorabwehr, und 1970 formulierte Burnet diesen Gedanken in der Immunüberwachungshypothese (Thomas, 1959; Burnet, 1970). Die grundlegende Aussage dieser Hypothese war, dass Tumoren durch Pathogene in einer ähnlich hohen Frequenz wie Infektionen induziert werden und dass das Immunsystem diese neu auftretenden Tumoren durch ihre tumorassoziierten Antigene immer wieder aufs Neue erkennt und eliminiert, noch bevor sie klinisch manifest werden. Diese Hypothese wurde allerdings durch fehlende Beweise in den darauf folgenden Jahren verworfen. Erst auf Grund neuer Erkenntnisse durch verschiedene Studien wurde die Immunüberwachungshypothese im Laufe der 90er Jahre wieder aufgegriffen (Dunn *et al.*, 2002;

Kaplan *et al.*, 1998). Eine Reihe von Studien in den letzten Jahren bestätigten diese in der ursprünglichen Immunüberwachungshypothese postulierten Kontrollmechanismen des Immunsystems zur Tumorüberwachung. So zeigten Shankaran *et al.*, dass bei Mäusen, denen das für die Bildung von Immunglobulinen und für die Umlagerung des T-Zell-Rezeptors verantwortliche RAG-1-Gen fehlte, durch den Ausfall von funktionsfähigen B- und T-Zellen eine signifikant erhöhte Rate an Neoplasien, vor allem im höheren Lebensalter, auftrat (Shankaran *et al.*, 2001). Ebenso unterstrich eine erhöhte Inzidenz an Tumoren, nach dem Ausschalten des Gens für den IFN- γ -Rezeptor oder des für seine Signaltransduktion verantwortlichen STAT-1-Gens, die Bedeutung von IFN- γ als Teil der Signalkaskade des Immunsystems bei der Überwachung der Entstehung von Neoplasien (Pardoll, 2003). Tumorzellen sind generell durch eine hypoxische Umgebung zellulärem Stress ausgesetzt. Dies führt bei einer signifikanten Anzahl von Tumoren zu einer erhöhten Expression der Liganden von NKG2D, MICA und MICB beim Menschen sowie RAE-1 und H60 bei der Maus (Raulet, 2003). Dadurch können Tumoren leichter durch NK-Zellen und NKG2D-positive CD8⁺-T-Zellen lysiert werden. Diefenbach *et al.* konnten im murinen System zeigen, dass durch die Transfektion mit RAE-1 und H60 in Tumoren, die diese Liganden normalerweise nicht exprimieren, eine NK-Zell-abhängige Tumorabstoßung *in vivo* induziert werden kann, die in einigen Fällen auch zur Aktivierung von CD8⁺- $\alpha\beta$ -T-Zellen führt (Diefenbach *et al.*, 2001; Groh *et al.*, 2001). Dennoch unterbleibt bei vielen Tumoren eine derartige Immunantwort. So kommt es in den meisten Fällen anstatt zu einer gegen den Tumor gerichteten zytotoxischen Immunantwort zu einer Induktion von Toleranz gegenüber den tumorassoziierten Antigenen oder zu einer Immunevasion („Tumorescape“) genannten Maskierung von potenziell immunogenen Tumorantigenen (Dunn *et al.*, 2002). Dunn *et al.* formulierten deshalb einen weiter gefassten Ansatz über die Rolle des Immunsystems bei der Tumorbekämpfung, den sie Immuneditionshypothese nannten. Diese beruht auf der ursprünglichen Immunüberwachungshypothese, wurde jedoch dahingehend modifiziert, dass nicht nur die tumorprotektive Rolle des Immunsystems beachtet wird, sondern auch seine tumormodifizierende, seligierende Rolle bei der Entstehung neuer Tumorvarianten mit einbezogen wird. Dunn teilte den Prozess der Entstehung von Tumoren in drei Phasen ein. Die erste Phase, die Eliminationsphase, entspricht der ursprünglichen Immunüberwachungshypothese, in der das Immunsystem die immunogenen Bestandteile eines Tumors erkennt und den Tumor durch seine Effektorzellen eliminiert. Die meisten der Tumoren kommen über dieses Stadium nicht hinaus. Überstehen sie jedoch diese Phase, treten in der darauf folgenden zweiten Phase, der Äquilibriumphase, der Tumor und das Immunsystem in ein dynamisches Gleichgewicht. In dieser Phase übt das Immunsystem einen großen Selektionsdruck auf den Tumor aus, der zwar ausreicht, den Tumor

einздämmen, aber nicht genügt, ihn vollständig zu eliminieren. Dadurch werden viele Evasions-Varianten des Tumors zwar zerstört, genauso jedoch Varianten selektioniert, die gegenüber den Angriffen des Immunsystems immer resistenter werden. In die dritte und letzte Phase, der Evasions-Phase, treten diejenigen Tumorvarianten, die durch Selektion wenig oder überhaupt nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden und somit der Elimination entgehen können. Dies führt zur Tumorexpansion mit unkontrolliertem Wachstum und letztendlich zum Tod des Wirtsorganismus.

2.3 Die Mechanismen der Tumor-Immunevasion

Durch den starken Selektionsdruck und die hohe Mutationsfrequenz der Tumoren dominieren nach einer gewissen Zeit diejenigen Tumorvarianten, die am wenigsten vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. So verfügen Tumoren über verschiedene Möglichkeiten, der Immunüberwachung zu entgehen (Ahmad *et al.*, 2004). Ein Weg ist die veränderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Tumorzellen (Algarra *et al.*, 1997; Restifo, 1996). Durch Mutation im β_2 -Mikroglobulin, eines integralen Bestandteils des MHC-Klasse-I-Moleküls, Veränderungen in der Antigenprozessierung oder Mutation der HLA-Klasse-I-Gene und ihrer Transkriptionsfaktoren, werden MHC-Klasse-I-Moleküle entweder in geringerer Zahl oder in veränderter Form auf der Zelloberfläche präsentiert, wodurch eine Erkennung und Lyse durch $CD8^+$ -T-Zellen erschwert wird. Obwohl gerade die verringerte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen diese Tumorzellen für die Lyse durch NK-Zellen empfänglich macht, bedeutet dies in der Regel einen Selektionsvorteil für den Tumor, da oftmals durch andere immuninhibierende Faktoren die NK-Zellen an der Tumorlyse gehindert werden. Ein weiterer Mechanismus ist die Herabregulation, Mutation oder der Verlust von tumorassoziierten Antigenen, was die Erkennung durch das Immunsystem weiter erschwert (de Vries *et al.*, 1997; Hofbauer *et al.*, 1998). Dies kann unabhängig von Veränderungen der MHC-Moleküle der Klasse I auftreten. Ebenso können Tumorzellen über Veränderungen an Todesrezeptoren wie dem TNF-Rezeptor, dem „TNF-related apoptosis-inducing ligand“-Rezeptor (TRAIL-R) oder dem Fas-Rezeptor dem induzierten Zelltod entgehen (Hersey & Zhang, 2001; Davidson *et al.*, 1998). Fas wird als Todesrezeptor auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert und ist ein wichtiger Regulator bei gesunden, wie auch bei malignen Zellen, der über Freisetzung von Caspasen die Apoptose der Zelle induzieren kann. Eine Möglichkeit, der über den Fas-Liganden CD95 vermittelten Apoptose zu entgehen, ist die Herabregulation oder der Verlust von Fas auf der Oberfläche von Tumorzellen. Andererseits können viele Tumoren durch zelluläres FLICE-Inhibitor-Protein (cFLIP) (Irmeler *et al.*, 1997), das die Caspasen hemmt, den Zelltod vermeiden. Umgekehrt haben manche Tumoren die Fähigkeit entwickelt, durch membranboundene oder

lösliche Fas-Liganden die Immunzellen selbst in die Apoptose zu treiben und dadurch der Elimination zu entgehen (Song *et al.*, 2001). Auch durch Sekretion immuninhibierender Zytokine wie IL-10, TGF- β und TNF können Tumorzellen dem Immunsystem entkommen (Maeda & Shiraishi, 1996). Durch derartige Zytokine wird die direkte Effektorfunktion der Immunzellen inhibiert. Ein weiterer Grund für die verringerte Immunogenität von Tumoren ist das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen (Schwartz, 1990), die nötig sind als Signale für T-Zellen, wie CD80 und CD86, oder zur Aktivierung von Antigen-präsentierenden-Zellen wie etwa dem Liganden für CD40. Durch das Fehlen von derartigen stimulierenden Molekülen können Tumorzellen durch Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I Molekülen Toleranz oder Anergie von Immunzellen induzieren.

3. Das Immunsystem und der Tumor– Möglichkeiten der Immuntherapie

Die Immuntherapie versucht, die effizienten und spezifischen Möglichkeiten des Immunsystems als Instrumentarium gegen maligne Erkrankungen zu nutzen. Obwohl Tumorzellen eine geringere Immunogenität besitzen als andere Pathogene, ist das Immunsystem dennoch im Stande, diese zu erkennen und erfolgreich zu bekämpfen. Wie oben bereits beschrieben, haben Tumoren oft selbst die Fähigkeit, das Immunsystem derart zu beeinflussen, dass eine effektive und zielgerichtete Immunantwort verhindert wird. Die große Herausforderung der Immuntherapie ist es deshalb, sich das Potenzial, welches das Immunsystem bietet, zunutze zu machen und Strategien und Methoden zu entwickeln, die gegen Tumoren gerichtete Immunantwort zu verstärken.

3.1 Die Manipulation immunologischer Kontrollpunkte

Ein Ansatzpunkt zur Verbesserung einer Anti-Tumor-Antwort ist die therapeutische Beeinflussung von Regulatoren an wichtigen immunologischen Kontrollpunkten, die die T-Zellantwort limitieren. CTLA-4 ist ein derartiger Regulator, der eine wirkungsvolle T-Zell-Aktivierung abschwächt oder ganz verhindert (Chambers *et al.*, 2001). Naive T-Zellen exprimieren den kostimulatorischen B7-Rezeptor CD28, der die vom T-Zell-Rezeptor abhängigen Immunantworten verstärkt. Nach Aktivierung der T-Zelle wird ein zweiter B7-Rezeptor exprimiert, der eine zehnfach höhere Affinität zu den Rezeptoren CD80 und CD86 hat als CD28. CTLA-4 bindet daran und inhibiert dadurch die T-Zell-Aktivierung und die Sekretion von Lymphokinen. Durch Verabreichen von CTLA-4-blockierenden Antikörpern zeigten sich in klinischen Studien bereits erfolgversprechende Ergebnisse: es kam zu einem Anstieg tumorinfiltrierender Lymphozyten, verbunden mit einer

verstärkten Antitumorantwort, die sogar bei einem Teil der Patienten die Regression bereits fortgeschrittener Tumorerkrankungen hervorrief (van Elsas *et al.*, 2001; Phan *et al.*, 2003a; Hodi *et al.*, 2003). Dennoch muss die Verabreichung von CTLA-4-blockierenden Antikörpern mit großer Vorsicht erfolgen, da die Gefahr besteht, dass es neben der erwünschten Anti-Tumor-Antwort zur Induktion einer lebensbedrohlichen Autoimmunitätsreaktion kommt. Ein anderer Mechanismus, der Toleranz gegen Tumoren induzieren kann, wird von CD4⁺- und CD25⁺-regulatorischen T-Zellen vermittelt (Shimizu *et al.*, 1999). Sie entstehen besonders in Gegenwart des von Tumoren produzierten TGF- β , in Folge kontinuierlicher Antigenstimulation in Abwesenheit von proinflammatorischen Signalen. Durch Antikörper-vermittelte selektive Depletion von T_{reg}-Zellen über spezifische Oberflächenmarker wie den Glukokortikoid-induzierten-TNF-verwandten-Rezeptor (GITR), können diese immuninhibitorischen Zellen eliminiert werden und dadurch die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort verstärkt werden. Für die praktische Umsetzung muss allerdings noch die selektive Depletion von T_{reg}-Zellen weiter verfeinert werden, um nicht ungewollt andere, für die Immunantwort nützliche T-Zellen, zu depletieren.

3.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems

Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen, überwachen nicht nur andere Zellen auf pathologische Veränderungen, sondern sie können auch Effektorfunktionen übernehmen, wie die Lyse von Tumorzellen oder die Sekretion von Zytokinen, die das Tumorwachstum hemmen und die Angiogenese bei Tumoren blockieren. Eine Möglichkeit, dieses Potenzial therapeutisch auszunutzen, ist die Gewinnung von NK-Zellen, mit anschließender Kultivierung *in vitro* unter Zugabe von IL-2, um sie zu expandieren und zu aktivieren. Durch Reinfusion von NK-Zellen alleine oder zusammen mit hohen Dosen von IL-2 konnte eine verstärkte Immunantwort gegen Tumoren hervorgerufen werden, und es wurden sogar bei einem Teil der Patienten komplette klinische Remissionen beobachtet (Rosenberg *et al.*, 1993). Dieser Ansatz ist jedoch oft mit einer lebensbedrohlichen Toxizität, meist auf Grund einer unphysiologischen Ausschüttung von Tumornekrose-Faktor (TNF) durch aktivierte NK-Zellen, verbunden, was seine Anwendung auf Tumoren wie das gut darauf ansprechende Nierenzellkarzinom beschränkt. Ein anderer Ansatz ist die direkte Injektion von Adjuvantien wie Lipopolysaccharid (LPS) oder CpG-Motive enthaltende Oligodesoxynukleotide, die von Toll-like-Rezeptoren erkannt werden, in tumoröses Gewebe, um durch das Ausschütten von proinflammatorischen Zytokinen die Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem zu fördern (Takeda *et al.*, 2003). Ein Teil der Tumoren kann jedoch durch Sekretion immuninhibierender Faktoren, wie TGF- β eine direkte Aktivierung der

Immunantwort verhindern oder zumindest abschwächen (Gorelik & Flavell, 2001).

3.3 Der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Tumoren

Die von B-Zellen produzierten Antikörper greifen an einer Vielzahl von Stellen in das Immunsystem ein. Durch Bindung an Proteine auf der Oberfläche von Tumorzellen können sie durch Komplementaktivierung Zellen lysieren, über Makrophagen und NK-Zellen Antikörper-vermittelte Zytotoxizität verursachen, Tumorwachstum durch Induktion von Apoptosesignalen beeinflussen sowie die Aufnahme von tumorassoziierten Antigenen durch DZ fördern. Therapeutisch lässt sich dieses Potenzial durch das passive Übertragen von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern ausnützen. Klinisch wird bereits Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD20, bei der Behandlung von Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphomen eingesetzt (Clynes *et al.*, 2000). Rituximab wird alleine oder mit Chemotherapie verabreicht und bewirkt bei vielen Patienten klinische Remissionen. Seine Bindung bewirkt vor allem durch Antikörper-vermittelte Zytotoxizität ein Zugrundegehen der Tumorzelle. Die klinische Wirksamkeit von tumorspezifischen Antikörpern kann weiter gesteigert werden durch Kopplung mit Toxinen, wie der Ricin-A-Kette und dem Pseudomonas-Toxin oder durch Konjugation des Antikörpers mit einem Radionuklid (Weiner, 1999). Eine weitere Option ist die Konjugation von Antikörpern mit Chemotherapeutika wie Adriamycin, das spezifisch an den Tumorzellen eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung hervorruft (Houghton & Scheinberg, 2000). Es bleibt jedoch eine Herausforderung, die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörper so zu verbessern, dass eine unerwünschte Zytotoxizität über unspezifische Bindung der Antikörper an normales Gewebe vermieden wird.

3.4 Adoptiver Transfer tumorspezifischer T-Zellen

Bei vielen Tumoren entwickeln sich durch Prozessierung von Tumorantigenen bereits tumorspezifische T-Lymphozyten ohne äußere Manipulation, die verschiedene, auf den Tumoren exprimierte Antigene erkennen. Dennoch kommt es im Regelfall nicht zu einer ausgeprägten Immunantwort gegen den Tumor, was verschiedene Ursachen, wie eine schwache Immunogenität der Antigene, eine durch den Tumor erzeugte Induktion von Toleranz oder eine Dysfunktion der T-Zellen als Ursache haben kann. Tumorspezifische T-Lymphozyten können aus dem Blutkreislauf, aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten oder den Lymphknoten von Patienten gewonnen werden (Walter *et al.*, 1995). Durch klonale Expansion und Kultivierung *in vitro* sowie zusätzliche

Stimulierung durch Zytokine wie IL-2, können diese Lymphozyten immunkompetent gemacht und dem Patienten reinfundiert werden (Yee *et al.*, 2002). So werden gegen das bei Melanomerkrankungen vorkommende Antigen Melan-A/Mart-1 spezifische T-Zellen in hoher Frequenz bei unbehandelten Patienten gefunden, wenngleich das Vorkommen von derart spezifischen T-Zellen in fortgeschrittenen Krankheitsstadien keine Auswirkung auf das Überleben hat (Boon *et al.*, 2006). Dagegen konnten Rosenberg und Kollegen durch Reinfusion einer großen Anzahl von über 10^{11} melanomspezifischen T-Zellen, nach deren klonaler Expansion und Stimulation *in vitro*, bei Melanompatienten in über 50% der Fälle klinische Antworten beobachten, wenn zuvor die immunmodulierenden regulatorischen T-Zellen eliminiert worden waren (Rosenberg & Dudley, 2004). Trotz einiger klinischer Erfolge hat diese Strategie jedoch verschiedene Nachteile (Michalek *et al.*, 2004). Das Erkennen von Tumorantigenen durch T-Zellen kann durch Mutationen oder Deletionen bei Tumoren erschwert sein. T-Zellen, die nur wenige Antigene spezifisch erkennen, können das Wachstum von Tumormutanten begünstigen, die diese Antigene verloren haben. Auch können Tumoren die Aktivierung der T-Zellen etwa durch Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10, TGF- β beeinflussen, so dass es zur Induktion von Anergie, Apoptose und Elimination der infundierten tumorreaktiven T-Zellen kommen kann.

3.5 Das therapeutische Potenzial der DZ

Durch die sehr gute Präsentation von Antigenen auf DZ und die Fähigkeit, sowohl naive, ruhende T-Zellen zu stimulieren, wie auch andere Immunzellen wie B-Zellen, NK-Zellen oder NKT-Zellen zu aktivieren, bieten DZ ein großes therapeutisches Potenzial, um eine Antigen-spezifische aktive Immuntherapie durchzuführen. Um das Potenzial von DZ für einen Einsatz in der Immuntherapie gegen Tumoren optimal einzusetzen, bedürfen verschiedene Variablen besonderer Beachtung.

3.5.1 Wichtige Eigenschaften Dendritischer Zellen

Bei der Verwendung von DZ als Vakzine gegen Tumoren ist es wichtig, die unterschiedlichen Stammreihen der DZ zu beachten, da die jeweiligen Unterarten die Art und Polarisierung der Immunantwort unterschiedlich beeinflussen (Shortman & Liu, 2002). Beim Menschen bewirkt die Stimulierung von aus Monozyten stammenden DZ durch CD40-Ligand über einen IL-12-abhängigen Mechanismus die Entwicklung einer Th1-Immunantwort, während plasmazytoide DZ unter IL-3 und Stimulation mit CD40-Ligand eine Th2-Antwort auslösen (Rissoan *et al.*, 1999). Dies ist bei der Vakzinierung gegen Tumoren von großer Wichtigkeit, da eine Th1-Antwort wünschenswert ist, während eine Th2-Antwort eher von Nachteil ist.

Ein anderer wichtiger Aspekt ist der Reifungszustand der DZ bei der Vakzinierung. Unreife DZ können leichter neue Antigene verarbeiten und präsentieren, was bei der Beladung von DZ *in vitro* mit tumorassoziierten Antigenen von Vorteil ist (Banchereau & Steinman, 1998). Es besteht jedoch die Gefahr, dass durch Verabreichung von immaturren DZ durch fehlende kostimulatorische Reize nicht eine Anti-Tumor-Antwort erfolgt, sondern Toleranz induziert wird. Im Gegensatz dazu besitzen mature DZ nicht mehr die Fähigkeit, neue Antigene im selben Umfang zu prozessieren, exprimieren aber eine größere Anzahl an kostimulatorischen Molekülen, wodurch Toleranzinduktion weniger wahrscheinlich ist.

3.5.2 Die Präsentation von Tumorantigenen auf DZ

Ein weiterer wichtiger Parameter, der den Erfolg der Immunantwort beeinflusst, ist die Art der Beladung der DZ mit Tumorantigenen. Damit DZ eine gegen einen Tumor gerichtete Immunantwort initiieren können, müssen sie mit spezifischen Antigenen beladen werden, die im Idealfall ein breites Spektrum an Antigen-spezifischen T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aktivieren, die eine hohe Affinität für die vom Tumor präsentierten Antigene aufweisen. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze.

- Eine Strategie ist, DZ mit synthetischen Peptiden zu beladen (Nestle *et al.*, 1998; Celluzzi *et al.*, 1996). Eine entscheidende Limitation der Beladung von DZ mit Peptiden ist jedoch, dass durch Beschränkung auf wenige MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II bindende Peptide nur ein relativ kleines Spektrum an tumorspezifischen T-Zellen induziert wird (Farris *et al.*, 2000). Somit ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass der Tumor sich der Immunantwort entzieht, indem Tumorzellen selektioniert werden, die diese Peptide nicht exprimieren.

- DZ können auch mit ganzen Proteinen beladen werden (Paglia *et al.*, 1996). Dadurch kann ein größeres Spektrum an Tumorantigenen von den DZ präsentiert werden als durch einzelne Peptide, was eine breitere T-Zell-Antwort hervorruft. Es gestaltet sich allerdings schwierig, alle tumorassoziierten Antigenepitope auf MHC-Molekülen zu präsentieren, da nicht alle Proteine so zu Peptiden prozessiert werden, dass sie auf MHC-Molekülen binden.

- Eine andere Methode ist die Beladung von DZ mit RNA durch Transfektion oder durch Elektroporation (Muller *et al.*, 2003; van Tendeloo *et al.*, 2001). Dafür kann entweder mRNA, die für ein einzelnes tumorassoziiertes Antigen kodiert, oder auch aus Tumorzellen extrahierte Gesamt-RNA benützt werden, wenn eine für ein tumorassoziiertes Antigen spezifische Sequenz nicht bekannt ist. Technisch ist es leicht möglich, diese RNA durch Amplifikation in großen Mengen herzustellen, so dass selbst kleinste Mengen gewonnener RNA für eine Immuntherapie mit DZ ausreichen. Diese Methode bietet den Vorteil, dass über RNA ein großes Spektrum an

Tumorepitopen auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden kann.

- Durch Kokultur mit Tumorzellysaten, apoptotischen oder inaktivierten Tumorzellen können DZ über Mikropinozytose tumorassoziierte Antigene aufnehmen, prozessieren und diese auf MHC-Klasse-II-Molekülen sowie durch Kreuzpräsentation auch auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren (Celluzzi & Falò, Jr., 1998). Hierbei kann jedoch die Wahl der prozessierten Antigene nicht spezifisch beeinflusst werden, sondern es werden zufällig Antigene aufgenommen und prozessiert.

- Ein anderer Ansatz zur Induktion einer primären Antitumor-Immunität ist die Fusion von Tumorzellen mit DZ (Gong *et al.*, 1997; Shu & Cohen, 2001; Lindner & Schirmacher, 2002). Diese durch Fusion erzeugten Heterokaryonten bieten den Vorteil, dass die zur Immunstimulation benötigte Maschinerie der DZ mit der Präsentation eines großen Antigenrepertoires kombiniert wird. Peptide, Proteine und mRNA aus Tumorzellen werden durch die Fusion direkt in das Zytoplasma von DZ gebracht, welches das physiologisch korrekte Kompartiment ist, um Antigenstrukturen zur Prozessierung weiterzuleiten. Dabei werden nicht nur wenige, vorher bekannte Antigene, sondern eine große Anzahl unbekannter Tumorantigene mit übertragen. Durch die Vielzahl an tumorassoziierten Antigenen, die nicht nur auf MHC-Klasse-II-, sondern auch auf MHC-Klasse-I-Molekülen im Kontext mit kostimulatorischen Molekülen dem Immunsystem präsentiert werden, ist es möglich, eine breitgefächerte T-Zell-Antwort zu induzieren, die sowohl Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen umfasst. Eine Schwierigkeit besteht allerdings darin, dass Fusionsprodukte nicht leicht zu standardisieren und relativ kurzlebig sind.

3.5.3 Die Immuntherapie mit DZ bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL)

Eine Krankheit, die Einsatzmöglichkeiten für die Immuntherapie bietet, ist die chronische lymphatische Leukämie (CLL), eine typischerweise schmerzlose, monoklonale B-Zell-Erkrankung, die vor allem ältere Menschen befällt. B-Zell-Erkrankungen bieten durch ihren höchst spezifischen B-Zell-Rezeptor mit dem Tumoridiotyp, der von den hypervariablen Regionen der schweren und leichten Ketten der Immunglobuline gebildet wird, sowie weiteren tumorassoziierten Antigenen verschiedene potenzielle Ansatzpunkte für eine Immuntherapie. Wie oben beschrieben, ist eine Möglichkeit, eine Antitumorantwort zu induzieren, das passive Übertragen monoklonaler Antikörper. So zeigte etwa Rituximab, ein gegen CD20 gerichteter Antikörper, vor allem in Kombination mit Chemotherapie bei der Behandlung der CLL gewisse klinische Erfolge (Cheson *et al.*, 2006). Oftmals lässt sich jedoch die Wirkung solcher Antikörper, bedingt durch mögliche unspezifische Bindungen, nur schwer steuern, so dass häufig unerwünschte, mitunter gravierende Nebenwirkungen auftreten können (Clynes *et al.*, 2000; Cheson *et al.*, 2006).

Vakzine auf der Grundlage von DZ bieten den Vorteil, sehr spezifisch immuntherapeutische Potenzial auszunützen. Vuillier *et al.* konnten durch Übertragen von für den Tumoridiotyp spezifischen Peptiden der CLL auf DZ eine Tumoridiotyp-spezifische T-Zell-Antwort generieren (Vuillier *et al.*, 2003). Bei diesem Ansatz wird jedoch nur gegen die wenigen übertragenen Peptide eine Immunantwort hervorgerufen und andere für die Immuntherapie potenziell nützliche Tumorantigene bleiben unberücksichtigt. Eine Möglichkeit, diese Limitationen zu umgehen, ist die Generierung von Hybridzellen aus DZ und Tumorzellen durch Zellfusion. Bei diesem Ansatz wird eine Vielzahl nicht nur bekannter, sondern auch unbekannter tumorspezifischer Antigene der CLL übertragen und zusammen mit dem nötigen Repertoire an kostimulatorischen Molekülen sowohl durch MHCI- sowie durch MHCII-Molekülen auf DZ präsentiert (Shu & Cohen, 2001). Anhand verschiedener Tumormodelle, wie etwa des Ovarialkarzinoms, sowie auch bei Leukämien konnte die Arbeitsgruppe um Gong zeigen, dass sich durch Fusion von DZ mit Tumorzellen erfolgreich eine gegen den Tumor gerichtete autologe T-Zell-Antwort induzieren ließ (Gong *et al.*, 2000a; Gong *et al.*, 2004).

Basierend auf diesen positiven Ergebnissen sollte im Rahmen dieser Arbeit das immuntherapeutische Potenzial der Vakzinierung mit Hybridzellen bei diesem malignem B-Zell-Lymphom untersucht werden sowie die Rolle der an der Immunantwort beteiligten Zellen genauer evaluiert werden.

4. Fragestellungen

1. Die Generierung von Hybridzellen aus DZ und CLL

- Können durch die Fusion mittels Polyethylenglykol erfolgreich Hybridzellen aus DZ und CLL-Zellen generiert werden? Wenn ja, wie hoch ist der Anteil an fusionierten Zellen?
- Durch welche Färbemethode lassen sich Hybridzellen am besten detektieren? Ist es durch Verwendung einer entsprechenden Färbung möglich, Hybridzellen sowohl in der Durchflusszytomtrie als auch auf Objektträgern am Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen?
- Ist die Detektion von fusionierten Zellen in der Durchflusszytometrie verglichen mit dem Nachweis am Objektträger gleich verlässlich?
- Hat der Reifungszustand der DZ einen Einfluss auf die Höhe der Fusionsrate?
- Wie wirkt sich eine Veränderung des Verhältnisses von Tumorzellen zu DZ bei der Zellfusion aus?

2. Der Einsatz von Hybridzellen im Stimulationsansatz

Nach Etablierung eines validen Nachweissystems für Hybridzellen wurde deren Potenzial in Stimulationsansätzen untersucht, eine tumorspezifische Immunantwort zu induzieren. Es wurde folgenden Fragen nachgegangen:

- Kann durch Hybridzellen aus allogenen DZ und CLL im Stimulationsansatz eine tumorspezifische IFN- γ -Ausschüttung induziert werden? Wenn ja, ist diese höher als die durch eine Zellmischung aus DZ und CLL hervorgerufene IFN- γ -Sekretion?
- Bewirkt eine Erhöhung der Zahl an Hybridzellen durch Zellsortierung eine gesteigerte Immunantwort?
- Welchen Einfluss hat der Reifungszustand der DZ bei der Stimulation?
- Auf welchem Mechanismus beruht die durch eine Zellmischung ohne Fusion ausgelöste Immunantwort? Besitzt diese neben der allogenen auch eine tumorspezifische Komponente?

3. Die Rolle der NK-Zellen bei der Immunantwort

Für eine effiziente Antitumorantwort bei der Vakzinierung mit DZ ist, neben der Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen von großer Wichtigkeit (Fernandez *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurden zuerst im Humansystem Untersuchungen über die Rolle der NK-Zellen durchgeführt. Für weitergehende Aussagen über die Interaktion zwischen NK-Zellen und DZ wurde ein bereits etabliertes murines System aus unserer Arbeitsgruppe gewählt. In diesem wurde durch Vakzinierung mit DZ eine Immunantwort gegen das murine B-

Zell-Lymphom A20 hervorgerufen (Adam *et al.*, 2005). Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Gibt es eine Interaktion zwischen NK-Zellen und DZ bei der Stimulation im humanen System?
- Sind NK-Zellen für den Schutz vor dem A20-Lymphom nach Vakzinierung mit allogenen DZ essenziell?
- Worin liegt das unterschiedliche Abstoßungsverhalten zwischen dem A20-Lymphom gegenüber dem MPC11-Lymphom sowie des CT26-Tumors begründet?
- Wird durch Blockade des NKG2D-Rezeptors auf dem A20-Lymphom die Effizienz der Tumorprotektion nach Vakzinierung mit DZ beeinflusst?
- Sind CD4⁺-T-Zellen bei der Induktion der NK-Zell-vermittelten Tumorantwort entbehrlich?

B Material und Methoden:

1. Generierung humaner DZ:

1.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

1.1.1 Zählen der Zellen

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde durch Anfärben mit Trypanblau (Trypan Blue Solution 0,4 %, Sigma Chemicals, Deisenhofen) bestimmt. Lebende Zellen nahmen dabei den Farbstoff nicht auf, während tote Zellen sich dunkelblau anfärbten. Dazu wurden 10 µl der zu bestimmenden Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Nachdem die Suspension gut durchmischt worden war, wurden 10 µl vorsichtig in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Für die Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter wurden 4 große Quadrate ausgezählt und der Mittelwert mit dem Faktor 1×10^4 und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

1.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 1×10^7 Zellen / ml in 1 ml Einfriermedium pro Kryoröhrchen eingefroren. Das Einfriermedium bestand aus FKS (Fetales Kälberserum, Sigma, Deisenhofen) mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma, Deisenhofen), um die Ausbildung von intrazellulären Eiskristallen zu vermeiden. Wichtig war während des Arbeitens eine ausreichende Kühlung der Zellen auf Eis, damit toxische Schäden durch DMSO möglichst gering blieben. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen gewaschen und gezählt. Nach erneuter Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und entsprechend der Zellzahl kaltes Einfriermedium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde zügig auf die Einfrierröhrchen verteilt und abschließend bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Die Zellen wurden am nächsten Tag in den Stickstoffbehälter überführt.

1.1.3 Auftauen von Zellen

Zuerst wurden 10 ml warmes FKS in ein 50-ml-Röhrchen pipettiert. Die eingefrorenen Zellen wurden auf Eis ins Labor transportiert und in einem Wasserbad bei 37°C zum Auftauen gebracht. Wenn nur noch ein kleiner Eisklumpen im Einfrierröhrchen sichtbar war, wurde vorsichtig warmes FKS zugegeben und die Zellsuspension in das Röhrchen mit FKS überführt. Nach Zentrifugation bei 400 g für 5 min, wurden nach Abnahme des Überstandes die Zellen in das gewünschte Kulturmedium gegeben und die Zellzahl bestimmt.

1.2 Gewinnung verschiedener Zellarten

1.2.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL) aus Gesamtblut

PBL wurden aus dem heparinisierten Vollblut von gesunden Spendern durch Isolierung der PBL-Fraktion mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten (spez. Dichte = 1,078 g/ml, Biocoll, Biochrom, Berlin) gewonnen. Das Vollblut wurde aus den Armvenen gesunder, freiwilliger Spender mit sterilen Einmalspritzen abgenommen und mit 0,1 ml (500 IU) Heparin Novo (Heparin 25000 IE, Essex Pharma) pro 10 ml versetzt. Das heparinisierte Vollblut wurde hierauf 1:1 mit PBS verdünnt und in eine entsprechende Anzahl von 50-ml-Röhrchen verteilt, in denen jeweils 20 ml Ficoll vorgelegt wurde. Nach Zentrifugation bei 840 g für 25 min ohne Bremse wurden die mononukleären Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen, wobei durch die Schicht des Serums hindurchgestochen wurde und der Interphasenanteil vorsichtig abgesaugt wurde. Nach Überführung der Interphase in ein neues 50-ml-Röhrchen wurde mit PBS bei 260 g für 20 min mit Bremse gewaschen, der Überstand jeweils verworfen, das Sediment erneut in PBS resuspendiert und bei 400 g für 10 min zentrifugiert. Nach anschließender Bestimmung der Zellzahl konnten die PBL sofort weiter verarbeitet oder eingefroren werden.

1.2.2 Anreicherung monozytärer Zellen durch magnetische Zellseparation

Damit mit einer möglichst reinen Population von monozytären Zellen gearbeitet werden konnte, wurden CD14⁺-Zellen aus den PBL durch magnetische Zellseparation mit Hilfe einer MACS-Säule (positive selection column type LS⁺, MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) angereichert. Durch die Aufreinigung mittels einer MACS-Säule konnte eine homogene Zellpopulation mit über 95% Reinheit erzielt werden. Um die Zahl von Zellaggregationen zu reduzieren, wurden die PBL zunächst über einen 40 µm-Membranporenfilter filtriert und in PBS-Puffer mit 2 mM EDTA (Sigma, Deisenhofen) und 2% HS (Humanserum (PAN Systems)) resuspendiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden pro 10⁷ Zellen 80 µl Puffer und 20 µl CD14⁺-markierter Magnetkügelchen (CD14⁺-MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 20 min. Nach erneutem Waschen wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in einer Konzentration von 500 µl Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert. In der Zwischenzeit wurde die MACS-Säule mit 6 ml Pufferlösung äquilibriert und, kurz bevor der Puffer vollständig durchgelaufen war, die Zellsuspension im Magnetseparator aufgetragen. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml Puffer gewaschen, um Zelltrümmer und nicht markierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die MACS-Säule aus dem Separator herausgenommen und auf ein 15-ml-Röhrchen gegeben. Dann

wurden zügig nach Auftragen von 5 ml X-Vivo Kulturmedium (X-Vivo-15, Serumfreies Medium, BioWhittaker, Maryland, USA) die in der Säule befindlichen CD14⁺-Zellen mit Hilfe eines Kolbens herausgespült und das Eluat aufgefangen. Die eluierten CD14⁺-Zellen wurden gezählt und konnten jetzt zur Generierung von DZ weiter verwendet werden.

1.2.3 Negative Isolierung von NK-Zellen

Um NK-Zellen für Versuche zu erhalten, wurden diese durch negative Isolierung nach Zugabe von Magnetkügelchen (NK Negative Isolation Kit, Dynal Biotech) aus PBL gewonnen. Bei dieser Methode wurden alle anderen Zellarten außer NK-Zellen mit magnetischen Partikeln markiert und konnten dann mittels magnetischer Separation entfernt werden, so dass eine unmarkierte aufgereinigte NK-Zell-Population übrig blieb. Der Vorteil dieser Vorgehensweise bestand darin, dass NK-Zellen nicht direkt markiert wurden, wodurch eine unerwünschte unspezifische Aktivierung der NK-Zellen vermieden wurde. Zunächst wurde die benötigte Menge an magnetischen Kügelchen (Dynabeads) gewaschen, um unerwünschte Beimengungen zu entfernen. Dies geschah mit PBS und 0,1% FKS. Das Röhrchen wurde für eine Minute in den Magnetseparator gestellt und der Überstand anschließend vorsichtig abgesaugt. Nach einem zweiten Waschschrift mit PBS konnten die magnetischen Kügelchen für die Zellseparation verwendet werden. Die vorher, wie oben beschrieben, aus peripherem Blut gewonnenen PBL wurden pro 1×10^7 Zellen in 200 μ l PBS mit 0,1% FKS resuspendiert. Nach Zugabe von 20 μ l FKS und 20 μ l einer Antikörpermischung gegen CD3, CD14, CD36, CDw123, HLA Class II DR/DP und Glycophorin A, wurde die Zellsuspension unter ständiger Rotation für 10 min bei 4°C inkubiert. Es erfolgte ein Waschschrift mit PBS in der Zentrifuge bei 500 g für 8 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen, die PBL in 0,95 ml PBS pro 10^7 Zellen resuspendiert und anschließend wurden je 50 μ l der, in einem von Dynal vorgefertigten Puffer suspendierten, magnetischen Depletionskügelchen zugegeben. Nach Inkubation unter ständiger Rotation für 10 min bei 4°C und Zugabe von 2 ml PBS, wurde das Röhrchen in den Magnetseparator gestellt. Sobald die Flüssigkeit klar geworden war und alle magnetischen Kügelchen als Rosetten an der Wand hafteten, wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt, ohne die Rosetten aufzuwirbeln. Dem Überstand wurden nun erneut 50 μ l Depletionskügelchen zugegeben und wie oben beschrieben für 10 min inkubiert, um abschließend ein zweites Mal im Magnetseparator vorsichtig die Zellsuspension abzunehmen. Die derart gewonnene Zellsuspension enthielt nicht aktivierte NK-Zellen mit über 99% Reinheit und konnte für weitere Versuche verwendet werden.

1.3 Kultivierung humaner DZ

1.3.1 Generierung von unreifen DZ aus PBL

Für die Generierung humaner DZ wurden monozytäre CD14⁺-Vorläuferzellen auf 6-Loch-Platten in jeweils 2 ml Kulturmedium pro Loch überführt und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium eingestellt. Das Kulturmedium bestand aus X-Vivo Medium, welches 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, GM-CSF (1000 U/ml) sowie IL-4 (800 U/ml) enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5% und 95% Luftfeuchte im Brutschrank für 8 Tage inkubiert. Am vierten Tag wurden 1000 U/ml GM-CSF zur Restimulation der Zellen zugegeben.

1.3.2 Erzeugen eines muren Phänotyps bei DZ

Um bei DZ einen muren Phänotyp zu erzielen, wurden am 8. Tag GM-CSF (800 U/ml) (Leukomax, Essex Pharma GmbH, München), IL-4 (500 U/ml) (Interleukin-4, Hölzel Diagnostika, Köln), TNF- α (250 U/ml) (Tumor necrosis factor alpha, Hölzel Diagnostika, Köln), PGE-2 (1 μ M/ml) (Prostaglandin E-2, Hölzel Diagnostika, Köln), IL-6 (5 μ l/ml) (Interleukin-6, Hölzel Diagnostika, Köln) und IL-1 β (20 ng/ml) (PAN Systems) zugegeben und die Zellen für 36 h im Brutschrank inkubiert. Danach konnten die muren DZ weiter verwendet werden.

1.4 B-CLL-Zellen

Die in den Versuchen benützten CLL-Zellen stammten von Patienten der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern und wurden mit Zustimmung der verschiedenen Patienten verwendet. Die Proben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. Hallek und PD Dr. M. Dreyling zur Verfügung gestellt. Auf Grund des sehr hohen Anteils von CLL-Tumorzellen im peripheren Blut dieser Patienten wurde auf eine weitere Aufreinigung der CLL verzichtet. Die CLL wurden nach Erhalt gemäß der oben beschriebenen Vorgehensweise eingefroren und bei Bedarf aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden sie über Nacht im Brutschrank in RPMI 1640 (Gibco, Eggenstein, Deutschland) mit 2% HS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (alle Gibco) inkubiert, um am darauffolgenden Tag mit lebensfähigen Zellen zu arbeiten.

1.5 Erzeugung von Fusionszellen mit Polyethylenglycol (PEG)

Die für verschiedene Experimente benötigten Fusionszellen aus DZ und CLL-Zellen wurden mittels Zellfusion durch Polyethylenglycol generiert. Dazu wurden die Tumorzellen, welche nach dem Auftauen für eine Nacht im Brutschrank inkubiert wurden, und die DZ aus ihren Kulturplatten

jeweils separat geerntet und gezählt. Von beiden wurden Aliquots für weitere Untersuchungen abgenommen. Die jeweils gewünschte Anzahl an DZ und Tumorzellen wurde nun getrennt in 50-ml-Röhrchen in PBS-Puffer mit 2 % HS, bei 200 g für 5 min mit Bremse, zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellsedimente in jeweils 10 ml warmen PBS resuspendiert und in einem 50-ml-Röhrchen vereinigt. Von dieser Zellmischung wurde ebenfalls ein Aliquot genommen und daraufhin der Rest bei 450 g für 7 min mit Bremse erneut zentrifugiert. Während des folgenden Fusionsvorgangs war immer aus Gründen der Fusionseffizienz auf ausreichend Wärme zu achten. Der Überstand wurde nun äußerst gründlich abgenommen und vorsichtig 0,5 ml warmes PEG (50% PEG w/v in 75 mM HEPES, Boehringer) hinzugegeben, ohne das Zellsediment aufzuwirbeln, während das Röhrchen für 1 min leicht geschwenkt wurde. Mit Hilfe einer 5-ml-Multipipette erfolgte nun unter kontinuierlichem leichtem Schwenken die Zugabe von je 100 µl PBS alle 20, 15, 10 und 5 sec für jeweils eine Minute. Zum Schluss wurden dann 2,5 ml PBS zugegeben. Die Fusionszellen wurden sofort für 6 min bei 90 g zentrifugiert und anschließend im gewünschten Medium aufgenommen. Nach Bestimmen der Zellzahl konnten die Fusionszellen für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

1.6 Stimulationsansatz im humanen System

Die Stimulationsansätze wurden alle in 96-Loch-Platten mit V-Form durchgeführt, um bei einer geringen Zellzahl einen möglichst optimalen Zellkontakt während der Stimulation zu gewährleisten. Als zu stimulierende Zellen wurden die im peripheren Blut von CLL-Patienten enthaltenen T-Lymphozyten gewählt. Im peripheren Blut von diesen Patienten waren trotz der CLL-Erkrankung etwa 0,5-2% T-Lymphozyten enthalten (eigene Messung). Diese T-Lymphozyten wurden ohne weitere Anreicherung für die Stimulationsansätze verwendet, wodurch mit sehr geringen Zellzahlen gearbeitet wurde.

Die PBL von CLL-Patienten wurden einen Tag vorher aufgetaut und dann über Nacht in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert, um am nächsten Tag mit vitalen Zellen arbeiten zu können. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 15% HS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin verwendet. Für die Stimulation wurden diese zu stimulierenden PBL-Zellen dann aus ihren Kulturplatten abgenommen und in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte jeweils 1×10^5 Zellen in 100 µl Kulturmedium gegeben. An Fusionszellen wurden dann, je nach Ansatz 5×10^4 , 1×10^5 oder 2×10^5 in 100 µl Volumen zugegeben, nachdem sie mit 100 Gy bestrahlt wurden. Diese Zellzahlen beziehen sich auf alle im Fusionsansatz enthaltene Zellen, also auch unfusionierte DZ und CLL-Zellen. Als Kontrollen mit jeweils derselben Zellzahl wurden DZ, Tumor (PBL der

Patienten), eine unfusionierte Mixtur aus beiden sowie Medium verwendet. Abhängig von der Fragestellung wurden diese Kontrollen verschiedenen Modifikationen unterzogen und vor Zugabe zum Stimulationsansatz ebenfalls mit 100 Gy bestrahlt. Das Endvolumen betrug pro Vertiefung der 96-Loch-Platte 200 µl Kulturmedium. Um den T-Lymphozyten optimale Kulturbedingungen zu bieten, wurden am ersten und vierten Tag IL-2 (50 U/ml) und IL-4 (50 U/ml) ins Medium gegeben. Nach acht Tagen erfolgte die Restimulation mit Tumorzellen, die mit 100 Gy bestrahlt worden waren. Hierbei handelte es sich ebenfalls um PBL von CLL-Patienten, die am Tag der Restimulation aufgetaut wurden und von denen nach Bestrahlung ohne weitere Aufreinigung jeweils pro Vertiefung 1×10^5 in den Stimulationsansatz gegeben wurden. Für die Zytokinbestimmung wurden nach 13 Tagen vorsichtig 150 µl Überstand ohne Zellen abgenommen und in eine neue 96-Loch-Platte überführt. Diese wurde mit einem Parafilm versiegelt und konnte bis zur Konzentrationsbestimmung der Zytokine bei -80°C gelagert werden.

1.7 Messung der Zytokinkonzentration

1.7.1 Bestimmung der TNF- α -Konzentration mit WEHI-Zellen

Die TNF- α -Konzentration wurde bestimmt, indem die Zytotoxizität des Überstandes aus den Stimulationsansatz gegen den Überstand aus der Maus-Fibrosarkom-Zelllinie WEHI 164-Klon 13 (Herkunft Klinikum der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) gemessen wurde. WEHI Zellen wurden hierzu in einer Konzentration von $2,4 \times 10^4$ Zellen pro Loch in 40 µl RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10% FKS sowie 2 µg/ml Actinomycin D in einer 96-Loch-Platte mit flachem Boden suspendiert. 40 µl des Stimulationsansatzes wurden in je eine Vertiefung der WEHI-Suspension pipettiert. Zur Quantifizierung der Werte wurde eine Standard-Titration von TNF- α auf der Platte mit durchgeführt. Nach 20 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C (6,5% CO_2) wurden 20 µl einer MTS/PMS-Lösung ((4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfonyl)-2H-Tetrazolium/Phenacin Methosulfat) (Promega) in einer Konzentration von 10 mg/ml in PBS pro Loch zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 4 h erfolgte die Zugabe von 10% wässriger SDS-Lösung (Sigma). Zur Bestimmung der TNF- α -Konzentration wurde jetzt in einem Photometer bei 492 nm die Farbkonzentration gemessen, die von der durch TNF- α beeinflussten Lebensfähigkeit der WEHI-Zellen abhing.

1.7.2 Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels IFN- γ -ELISA

Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels eines sehr sensitiven Nachweissystems, einem ELISA (Human-IFN- γ -Kit, Pharmingen) bestimmt. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden die Ansätze bei Raumtemperatur durchgeführt. Ein unmarkierter Fänger-Antikörper wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ auf dem Boden einer ELISA-Platte in 50 μl Carbonat-Puffer (pH=9,5) pro Vertiefung für 16 h bei 4°C im Kühlschrank immobilisiert. Danach wurde die Platte dreimal mit einem Waschpuffer, bestehend aus PBS mit 1% Tween 20 (Merck), gewaschen und alle Löcher mit jeweils 400 μl Puffer, bestehend aus PBS mit 10% FKS, unter ständigem Schütteln für 2 h abgedeckt. Nach weiterem dreimaligen Waschen wurden die zu untersuchenden Proben und eine Standardtitration von IFN- γ in Konzentrationen von 1000, 333, 166, 83,2 und 41,6 pg IFN- γ pro ml aufgetragen und für eine Stunde unter ständigem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden zur Detektion nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer 24 μl mit einem murinen anti-humanen-IFN- γ -Antikörper (Pharmingen) für 45 min inkubiert sowie nach einem weiteren Waschschriff 24 μl eines mit POX-markierten Detektionsantikörpers (Pharmingen) in 6 ml PBS mit 10% FKS vermischt und dann jeweils 50 μl pro Loch aus dieser Lösung auf die ELISA-Platte hinzugegeben. Unter ständigem Schütteln wurden die Platten dann für 1 h im Dunkeln damit inkubiert. Währenddessen wurde im Substratansatz eine Tablette 1,2-Benzoldiamindihydrochlorid (10 mg) in 15 ml Substratpuffer (Pharmingen) im Dunkeln gelöst. Kurz vor Zugabe zur ELISA-Platte wurden 7 μl H₂O₂ hinzugegeben. Nachdem die ELISA-Platte mindestens siebenmal gewaschen und sorgfältig trockengeklopft wurde, wurden aus dem Substratansatz je 100 μl pro Vertiefung in die Platte gegeben und für 15 min im Dunkeln unter ständigem Schütteln inkubiert. Zum Stoppen der Enzymreaktion wurde 50 μl 3M HCl Puffer verwendet. Direkt im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Farbstoffkonzentration im ELISA-Messgerät bei einer Wellenlänge von 405 nm.

1.8 Die Durchflusszytometrie

1.8.1 Generelle Prinzipien der Zellfärbung in der Durchflusszytometrie

Die zu färbenden Zellen wurden aus ihrem jeweiligen Medium abgenommen, mit einem PBS-Waschpuffer gewaschen und anschließend in einem FACS-Puffer, bestehend aus PBS mit 2% FKS und 15 mM EDTA, resuspendiert. Diese EDTA-Konzentration wurde gewählt, da sich hierdurch unspezifische Färbungen und Zellaggregationen auf ein Mindestmaß reduzieren ließen, ohne dass die Zellen durch das zytotoxische EDTA Schaden nahmen. Die zu untersuchenden Zellen wurden

dann in einer Zellzahl von 2×10^5 in 100 μl FACS-Puffer pro FACS-Röhrchen verteilt und auf Eis gelagert. Zu den Zellen wurden die Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration zugegeben und diese nach gutem Durchmischen für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Wurden unmarkierte Antikörper verwendet oder weitere Färbungen benötigt, erfolgte nach einem Waschschrift die Inkubation mit dem sekundären Nachweisantikörper oder anderen monoklonalen, direkt markierten Antikörpern. Nach einem weiteren Waschschrift mit einem PBS-Puffer erfolgte die Resuspension in 200 μl FACS-Puffer. Die Zellen wurden auf Eis aufbewahrt und es wurde erst unmittelbar vor der Messung am FACS-Gerät Propidium-Jodid hinzugefügt, um während der Analyse tote Zellen auszugrenzen. Pro ml Zellsuspension wurde 1 μl Propidium-Jodid eingesetzt.

1.8.2 Phänotypische Analyse der DZ

Um Aussagen über den Maturationstatus der DZ zu treffen, wurden bestimmte Oberflächenmarker der Zellen in der Durchflusszytometrie untersucht. Zur Charakterisierung der DZ wurden folgende monoklonale Antikörper verwendet:

<i>Marker</i>	<i>Färbung</i>	<i>Firma</i>	<i>Nummer</i>
CD1a	PE	Immunotech	1942
CD11c	PE	Pharmlingen	555392
CD11c	Biotin	Leinco Technology	C146
CD14	PE	Immunotech	IM0650
CD40	PE	Pharmlingen	555589
CD54	PE	Pharmlingen	555511
CD80	PE	Pharmlingen	557227
CD83	PE	Pharmlingen	556855
CD86	PE	Pharmlingen	555658
HLA-DR	PE	Pharmlingen	555812
MNR	PE	Pharmlingen	555954

1.8.3 Darstellung von Hybridzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Für einen eindeutigen Nachweis von Fusionszellen in der FACS-Analyse war es wichtig, dass die einzelnen Komponenten einer Hybridzelle, bestehend aus B-Lymphozyten-Anteilen und Anteilen von DZ, jeweils mit spezifischen Antikörpern markiert wurden. Hierzu wurden der B-Lymphozyten-Anteil mit CD5 (Immunotech) und CD19 (Pharmingen), beide PE-markiert, und der DZ-Anteil mit CD11c (Leinco Technology), FITC-konjugiert, detektiert. Somit entsprachen doppelt markierte Zellen in der Durchflusszytometrie Fusionszellen, die Anteile beider Zellarten enthielten. Zur Darstellung derartiger Zellen wurde im Koordinatensystem das Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen, um die Zellpopulationen auf Grund ihrer Größe und Granularität zu unterscheiden. Tote Zellen wurden in einem weiteren Koordinatensystem anhand ihres Propidium-Jodid-Signals gegen das Vorwärtsstreulicht identifiziert (Fluoreszenz 3), um sie bei der Analyse ausschließen zu können. Fluoreszenz 1 (FITC) wurde gegen Fluoreszenz 2 (PE) in einem dritten Koordinatensystem aufgetragen. Das FACS-Gerät wurde so eingestellt, dass unmarkierte Zellen in diesem Koordinatensystem im linken unteren Quadranten lagen. Die zur Zellmarkierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PE emittierten im Wellenlängenbereich von 504 nm bis 541 nm (FITC), respektive 568 nm bis 590 nm (PE). Es fand jedoch auf Grund physikalischer Gegebenheiten eine Überlappung im Bereich von 550 nm statt, so dass auf eine sorgfältige Kompensation der Einstellungen beim Messen geachtet werden musste, damit keine falsch-positiven Ereignisse das Ergebnis verfälschten. Um dies zu erreichen, wurden die Kompensationsparameter so gewählt, dass sich die mit FITC-markierten DZ ausschließlich im unteren rechten Quadranten und die PE-markierten CLL-Zellen sich ausschließlich im oberen linken Quadranten befanden. Mit diesen Einstellungen wurden schließlich die Fusionszellen gemessen, wobei sich nur doppelt mit FITC und PE markierte Hybridzellen als doppelt-positive Ereignisse im oberen rechten Quadranten darstellten.

1.9 Anfertigen von Objektträgern

1.9.1 Vorbereiten der Objektträger

Während des Arbeitens mit Objektträgern war darauf zu achten, die Inkubation der Zellen auf den Objektträgern in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchzuführen sowie möglichst im Dunkeln zu arbeiten, damit die empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe nicht durch ein Übermaß an Licht ausbleichen. Um ein ungewolltes Abwaschen von Zellen bei den diversen Bearbeitungsschritten zu vermeiden, wurde der Objektträger zuerst in einem mit einem Fettstift

markierten Areal mit 20 µl Poly-L-Lysin beschichtet und für 15 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurde die Flüssigkeit gründlich abgesaugt und der Objektträger für 30 min luftgetrocknet. Kurz bevor die Zellen auf die Objektträger aufgetragen wurden, wurden für 5 min 100 µl TBS-Puffer auf den Objektträger gegeben, um die Poly-L-Lysin-Schicht zum Quellen zu bringen. In Anschluss daran wurden die vorbereiteten Zellen aufgetragen.

1.9.2 Zellfärbung mit monoklonalen Antikörpern

Da bei der Analyse von Fusionszellen in der Durchflusszytometrie nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ein Teil der sich als doppelt-positiv darstellenden Ereignisse bedingt war durch unspezifische Zellaggregation von Tumorzellen mit DZ, wurden zur genaueren Untersuchung Hybridzellen auf Objektträgern aufgetragen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Hierbei lag besonderes Augenmerk darauf, eine Färbung von Hybridzellen mit jenen monoklonalen Antikörpern zu etablieren, die ebenso in der FACS-Analyse verwendet werden konnten, um beide Messmethoden zu korrelieren und quantitative Aussagen treffen zu können. Hierzu wurden nach einem Waschschrift mit PBS die zu untersuchenden Zellen in 100 µl eines FACS-Puffers mit 2% FKS und 15 mM EDTA in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml resuspendiert. Um den CLL-Anteil von Hybridzellen zu markieren, wurde als erster Färbeschritt 2 µl eines murinen PE-markierten anti-human-CD5-Antikörpers (CD5 PE, Becton Dickenson) hinzugegeben und auf Eis für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 100 µl PBS auf die Objektträger aufgetragen, für 30 min im Dunkeln inkubiert und nach einmaligem Waschen mit einem TBS-Puffer in einer Aceton-Lösung für 10 min fixiert. Hierauf erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS ein weiterer Färbeschritt, um das PE-Fluoreszenzsignal des murinen anti-humanen Antikörpers, der Licht bei 565 nm emittierte, mit einem Cy3-markierten anti-murinen Antikörper (Cy 3, Ziege-anti-Maus, Jackson Immuno Research), dessen Emissionsmaximum bei 570 nm lag, zu verstärken. Damit konnte ein für die Auswertung ausreichend starkes Signal im Mikroskop erhalten werden. Der Cy3-konjugierte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1/800 aufgetragen und für 40 min im Dunkeln inkubiert. Für die Markierung der DZ-Anteile von Hybridzellen wurde nach einmaligem Waschen mit TBS ein monoklonaler, Biotin-konjugierter anti-human-CD11c-Antikörper (CD11c Biotin, Leinco Technology), in einer Verdünnung von 1/10 für 40 min aufgetragen. Zur Detektion des CD11c-Antikörpers wurde nach erneutem Waschen Streptavidin-FITC (Streptavidin-FITC, DAKO) in einer Verdünnung von 1/350 für 40 min zugegeben und anschließend mit TBS-Puffer gewaschen. Um das schwache, für eine genaue Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop nicht ausreichende FITC-Signal weiter zu verstärken,

wurde mit einem biotinyliertem Anti-Avidin-Antikörper (Ziege, Anti-Avidin Biotin, Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1/50 für 40 min inkubiert. Dieses wurde im Anschluss wiederum, wie oben beschrieben, mit Streptavidin-FITC detektiert. Die derart behandelten Zellen wurden nun mittels einer 4% Paraformaldehyd-Lösung erneut für 10 min fixiert und abschließend durch einen Tropfen Antibleichmittel (Vectashield[®], Mounting Medium, H-1000, Vectar Laboratories) mit einem Deckglas versiegelt. Die Objektträger wurden bei 4°C im Kühlschrank bis zu ihrer Auswertung aufbewahrt.

1.9.3 Zellfärbung mittels Cell-Tracker

Neben der Färbung mit monoklonalen Antikörpern wurde auch eine Färbung der Zellen mit Cell-Tracker etabliert, welche Zellen unspezifisch anfärben und eine hohe Leuchtkraft besitzen. Cell-Tracker-Reagenzien sind Farbstoffe, welche unspezifisch die Zellmembran permeieren können, um Anschluß daran im Zellinneren, durch eine über die Glutathion-S-Transferase vermittelte Reaktion, zu einem für die Zellmembran impermeablen Farbstoff zu werden. Dieser Farbstoff der Cell-Tracker besitzt eine hohe Persistenz und Leuchtkraft in den Zellen, wodurch er sich besonders für das Anfärben von Zellen mit anschließender Fusion und Detektion von Fusionszellen eignet. Cell-Tracker hatten bei der Detektion von Hybridzellen auf den Objektträgern den Vorteil, dass sie im Vergleich zur Antikörperfärbung im Fluoreszenzmikroskop ein um ein Vielfaches stärkeres Signal aufwiesen, was die quantitative Auswertung von Objektträgern hinsichtlich der Fusionsfrequenz von Zellhybriden ermöglichte. Bei der Verwendung von Cell-Tracker-Farbstoffen musste man darauf achten, die zu untersuchenden Zellarten jeweils getrennt voneinander zu färben und sie erst danach zu mischen, da Cell-Tracker unspezifisch jede Zelle mit einem Signal versehen. Für eine Färbung mit Cell-Tracker wurde ein Aliquot von 4×10^6 der zu färbenden Zellen genommen und in 2 ml PBS resuspendiert. CLL-Zellen wurden mit einem orangen Farbstoff (Cell-Tracker[®] Orange CMTMR, Molecular Probes) gefärbt, der ein intensives Signal bei 566 nm emittierte, während DZ mit einem grünen Farbstoff (Cell-Tracker[®] Green BODIFY, Molecular Probes) angefärbt wurden, welcher bei 528 nm Licht emittierte. Vom Cell-Tracker[®] Orange CMTMR wurden 1,5 µl zu den Tumorzellen, vom Cell-Tracker[®] Green BODIFY 0,5 µl zu den DZ gegeben und für 40 min im Brutschrank jeweils separat in einem 50-ml-Röhrchen inkubiert. Danach erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Nach erfolgter Markierung mit Cell-Tracker konnten die Zellen weiter verarbeitet und fusioniert werden, um sie dann auf einem mit Poly-L-Lysin vorbereiteten Objektträger zu geben. Die Zellen wurden mit einer 4% Paraformaldehydlösung für 10 min fixiert und abschließend mit einem Tropfen Vectashield[®] als Schutz gegen unerwünschtes Ausbleichen und einem Deckglas versiegelt. Die Objektträger wurden

bei 4°C bis zu ihrer Auswertung am Mikroskop aufbewahrt.

1.10 Inaktivierung von DZ im Stimulationsansatz

Um die Antigenaufnahme zu verhindern, wurden DZ bei einem Teil der Versuche mit Paraformaldehyd inaktiviert. Dazu wurden DZ kurz aus ihrem Kulturmedium entnommen und einmal mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden sie in PBS mit 1% Paraformaldehyd resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS wurden die inaktivierten Zellen in der gewünschten Konzentration in ihr Medium gegeben und konnten für weitere Stimulationsansätze verwendet werden.

1.11 Aufreinigung von Zellen mittels Zellsortierung

Um Hybridzellen anzureichern, wurden die Fusionsansätze einer Zellsortierung unterzogen. Dies wurde an der Zellsortierungsanlage am Institut für Molekulare Immunologie bei Herrn Dr. J. Ellwart durchgeführt. In einem Ansatz wurden die Zellen nur nach deren Größe sortiert, so dass die erheblich größeren DZ und Hybridzellen von den kleinen CLL-Zellen separiert wurden, was zu einer hohen prozentualen Aufreinigung der DZ und Hybridzellen führte. Die Zellen wurden ohne weitere Zellmarkierung in ein für die Messung im Zellsortierer geeignetes Gefäß überführt, und es wurde mit der Sortierung begonnen. Die sich im Zellsortierer darstellenden Zellpopulationen von DZ und Hybridzellen grenzten sich deutlich durch ihre Größe von den kleinen Tumorzellen ab. Anhand dieser Größenunterschiede wurde ein Fenster für die Sortierung festgelegt und es wurden unter Berücksichtigung der Zellgröße die Tumorzellen entfernt.

Ein weiterer Ansatz war die Sortierung von Hybridzellen nach Größe und Vorhandensein eines positiven Signals für einen mit Phycoerythrin konjugierten CD5-Antikörper. Um die Zellen mit dem Antikörper zu färben, wurde nach Mischung oder Fusion einmal mit PBS gewaschen und es wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro ml in PBS gegeben. Unter sterilen Bedingung wurden dann pro 2×10^5 Zellen je 2 μ l des Antikörpers hinzugefügt und für 40 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschritt erfolgte die Überführung in ein für die Verwendung am Zellsortierer geeignetes Gefäß. Bei der Zellsortierung wurde, wie im ersten Ansatz beschrieben, vorgegangen, zusätzlich jedoch zur Größe das CD5-PE-Signal als weiteres Sortierkriterium berücksichtigt. Nach Sortierung konnten die Zellen für weitere Untersuchungen oder Stimulationsansätze verwendet werden.

2. Material & Methoden muriner Teil

2.1 Kulturbedingungen der Tumorzelllinien

Als Tumormodelle für das murine System wurde auf bereits im Labor etablierte Tumorzelllinien zurückgegriffen. Es wurden die murinen B-Zell-Lymphome A20 (IgG2a, ATTC TIB-208) (Kim *et al.*, 1979) und MPC11 (IgG2b, ATTC CCL-167) (Lascov & Scharff, 1970) sowie CT26 (Brattain *et al.*, 1980), dessen Ursprung ein murines Kolonkarzinom war, verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5% und 95% Luftfeuchte im Brutschrank in RPMI 1640 mit 5% FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 50 µM β-MA kultiviert. Um gleichbleibend gute Kulturbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen alle zwei Tage geteilt und mit frischem Medium versorgt.

2.2 Gewinnung muriner DZ

Murine Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark von BALB/c-, C57BL/6- oder CD40^{-/-}-Mäusen gewonnen. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen den Mäusen der Femur und die Tibia aus den Hinterläufen entnommen, das Knochenmark mittels sterilen MEM-Mediums herausgespült und anschließend nach Überführung in ein steriles 50-ml-Röhrchen die Zellsuspension bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde, um unerwünschte rote Blutkörperchen zu entfernen, 2 ml Erythrozytenlysepuffer zugegeben und die Zellsuspension für 1 min auf Eis inkubiert. Um ungewollte Zytotoxizität zu vermeiden, wurde zügig zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 6 ml Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640 mit 20% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin, aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde auf 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt und es wurden jeweils 3 ml pro Loch in eine 6-Loch-Platte gegeben. Damit die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark sich zu DZ entwickeln, wurden pro Loch 300 µl eines Überstandes hinzugefügt, der rekombinantes murines GM-CSF enthielt, und die Zellen für acht Tage im Brutschrank inkubiert. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gefüttert, es erfolgte ein Mediumwechsel sowie eine erneute Zugabe von 300 µl GM-CSF pro Loch. Nach acht Tagen Zellkultur lagen unreife DZ vor, die für Experimente verwendet werden konnten. Wurden reife DZ benötigt, wurde nach einem Mediumwechsel mit gleichzeitiger GM-CSF-Gabe am achten Tag LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben und die Zellen für 16 h im Brutschrank inkubiert.

2.3 Separation von murinen NK-Zellen

Bei verschiedenen Untersuchungen waren aufgereinigte Populationen von NK-Zellen nötig, welche aus der Milz von unbehandelten oder behandelten Mäusen gewonnen wurden. Nach einem ventralen Schnitt durch die Bauchdecke der Tiere mit Extraktion der Milz, wurde die Milz in sterilem MEM-Medium (Gibco, Eggenstein) durch ein Sieb gedrückt und die entstandene Zellsuspension in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Sobald sich die größeren Gewebeklumpen im Röhrchen abgesetzt hatten, wurde der Überstand in ein neues Röhrchen gegeben und für 5 min bei 400 g zentrifugiert, während die sedimentierten Klumpen verworfen wurden. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abgesaugt, und es wurde einmal mit PBS gewaschen. Zum Entfernen unerwünschter Erythrozyten wurde nach dem Waschschrift der Überstand sorgfältig abgenommen und das Zellsediment in 2 ml Erythrozytenlysepuffer für 1 min auf Eis inkubiert. Noch vorhandene Verklumpungen wurden nach einem weiteren Waschschrift mit PBS durch Filtration über ein 30- μ m-Nylonnetz entfernt. Die Zellen wurden gezählt und in je 90 μ l PBS mit 2% FKS und 2 mM EDTA pro 10^7 Zellen aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von für NK-Zellen spezifischen Anti-DX5-Mikrokügelchen (DX5-MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in einer Konzentration von je 10 μ l pro 10^7 Zellen mit anschließender Inkubation für 15 min bei 4°C im Kühlschrank. Nach Zugabe von PBS und Zentrifugieren für 5 min bei 400 g wurde der Überstand abgesaugt und es wurden pro 10^8 Zellen je 500 μ l PBS mit 2% FKS und 2 mM EDTA zugegeben. Diese Zellsuspension wurde, nachdem das MACS-Gerät mit 6 ml PBS äquilibriert wurde, über eine Magnetsäule gegeben und dreimal mit 3 ml PBS nachgespült. Nach Entnahme der MACS-Säule aus dem Magneten wurden die NK-Zellen mit 6 ml des gewünschten Mediums durch einen Kolben aus der Säule herausgespült und die Zellzahl bestimmt. Durchgeführte FACS-Analysen zeigten einen Reinheitsgrad von über 90% von CD3⁻DX5⁺-Zellen.

2.4 Verwendung eines Tetramers für NKG2D

Das Oberflächenmolekül NKG2D-Ligand ist auf verschiedenen Zelltypen exprimiert und hat eine aktivierende Funktion auf NK-Zellen. Um genauere Aussagen über seine Funktion und Expression treffen zu können, wurde ein NKG2D Tetramer zur Färbung und Blockade des Oberflächenmoleküls benützt (Busch *et al.*, 1998). Dieses Tetramer wurde freundlicherweise von Prof. D. H. Busch, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt. Tumorzellen wurden mit einem mit PE konjugierten Tetramer in einer 1/100-Verdünnung gefärbt und im FACS-Gerät analysiert. Zur Blockade von NKG2D auf Zellen bei *In-vitro*-Versuchen wurde ein unkonjugiertes Tetramer in einer 1/100-

Verdünnung für Tumorzellen eingesetzt. Für die NKG2D-Blockade auf DZ wurde das Tetramer in einer 1/20-Verdünnung zugegeben.

2.5 Zytotoxizitätsversuche mit NK-Zellen

NK-Zellen wurden, wie oben beschrieben, aus Milzen von unbehandelten oder behandelten Mäusen gewonnen und eine definierte Zellzahl davon als Effektorzellen in RPMI 1640 mit 15% FKS als Kulturmedium in 96-Loch-Platten (V-Form) vorgelegt. Es wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt mit 2×10^5 , 10^5 , 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$, $1,25 \times 10^4$ und 6×10^3 NK-Zellen pro Loch in 50 μ l Medium. Als Zielzellen wurden A20-, CT26-, MPC11- und YAC-1-Zellen gewählt und nach einem Waschschrift mit PBS in 100 μ l FKS resuspendiert. Im Isotopenlabor wurden die Zielzellen mit radioaktivem ^{51}Cr (NaCr-51, 185 mBq, NEN Life Science, Niederlande) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nachdem durch zweimaliges Waschen mit RPMI 1640 (10% FKS) das überschüssige, von den Tumorzellen nicht aufgenommene Chrom entfernt wurde, erfolgte die Bestimmung der Zahl der Zielzellen. Von den radioaktiv markierten Tumorzellen wurden jeweils 2000 Zellen pro Kavität in 50 μ l Kulturmedium in die 96-Loch-Platte zugegeben und mit den vorgelegten Effektorzellen gemischt. Ziel- und Effektorzellen wurden gemeinsam bei 37°C im Brutschrank für 4 h inkubiert. Im Anschluss daran wurden aus den Kavitäten vorsichtig 50 μ l Überstand ohne Mitnahme von Zellen abgenommen und auf eine Lumaplatte überführt, um die spontane Chromfreisetzung zu messen. Zur Bestimmung der maximalen Radioaktivität in den Zielzellen wurden je 50 μ l der markierten Tumorzellen direkt auf die Lumaplatte pipettiert. Die Lumaplatte wurde über Nacht getrocknet und am nächsten Tag wurde im Messgerät die enthaltene Radioaktivität ermittelt.

Die spezifische Zytotoxizität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm}_{\text{Experiment}} - \text{cpm}_{\text{spontan}}}{\text{cpm}_{\text{maximal}} - \text{cpm}_{\text{spontan}}} \times 100$$

2.6 Tierexperimente

2.6.1 Allgemeine Versuchsbedingungen

Es wurden bei allen Versuchen weibliche Mäuse verwendet. Für Versuche im autologen System wurde der BALB/c-Mäusestamm benützt. Um Fragen in diesem System vor einem allogenen Hintergrund zu untersuchen, wurde ein von BALB/c verschiedener Mäusestamm, C57BL/6

gewählt. Ein weiterer Ansatz war die Verwendung von zu BALB/c syngen CD40^{-/-}-Mäusen, denen es durch den fehlenden CD40-Rezeptor unmöglich ist, direkt die tumorspezifischen T-Zellen zu aktivieren. Damit durch eine genügend große Anzahl an Tieren pro Gruppe eindeutige Aussagen möglich waren, wurden in den Versuchsgruppen je 6 Mäuse verwendet. Für die Tumorkontrollgruppen waren für eindeutige Ergebnisse jeweils 4 weibliche Mäuse pro Gruppe ausreichend. Sobald sich bei den Tieren nach Tumorgabe Anzeichen auf Tumorstadium zeigten, wurden sie, um den Tieren unnötiges Leid zu ersparen, durch Stickstoff euthanisiert.

2.6.2 Impfprotokoll zu Generierung von Immunität gegenüber A20

Da es sich zeigte, dass durch zweimaliges subkutanes Impfen von Mäusen mit murinen DZ eine Immunität gegenüber dem B-Zell-Lymphom A20 erzielt werden konnte, wurde dieses Impfprotokoll als Grundlage für alle weitergehenden Fragestellungen genommen. Die für die Impfung der Mäuse nötigen murinen DZ wurden, wie oben beschrieben, kultiviert und falls gewünscht, einem Reifungsschritt unterzogen. Nach Entnahme der DZ aus der Zellkultur und zweimaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen in einer reinen PBS-Lösung aufgenommen und auf eine Zellzahl von $1,66 \times 10^6$ pro ml eingestellt. Den Mäusen wurde zuerst (Tag -14) subkutan in ihre Flanke eine Zellzahl von 5×10^5 DZ injiziert, nach 7 Tagen (Tag -7) erfolgte eine erneute subkutane Immunisierung mit derselben Anzahl von murinen DZ. Am Tag 0 wurden die Mäuse mit Tumor inokuliert (*siehe Abb. 1*). Abhängig vom Versuchsansatz wurden A20, MPC11 oder CT26 als Tumorzellen gewählt. Die Tumorzellen wurden aus ihrer Kultur abgenommen und nach zweimaligem Waschen in einer Konzentration von $2,66 \times 10^6$ pro ml in PBS resuspendiert und den Mäusen jeweils eine letale Dosis von 8×10^5 Zellen in die Schwanzvene gespritzt. Sollten Aussagen über die Langzeitimmunität gegenüber A20 getroffen werden, erhielten die Tiere nach einem Intervall von 75 bis 150 Tagen eine erneute intravenöse Tumoringektion.

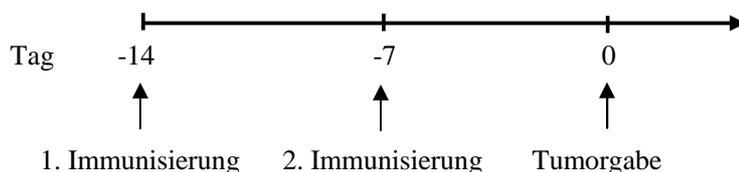


Abb. 1 Applikationsschema

2.6.3 Depletion von T-Zellen und NK-Zellen *in vivo*

Um den Einfluss der verschiedenen Zellarten bei der Generierung der Immunantwort genauer zu untersuchen, wurden bei den Mäusen *in vivo* jeweils bestimmte Zelltypen durch Gabe von

monoklonalen Antikörpern eliminiert. Für die Depletion von NK-Zellen wurde TM β -1 (Mocikat *et al.*, 2003) verabreicht, ein für die β -Kette des IL-2 Rezeptors spezifischer monoklonaler Antikörper. Hierzu wurden vier Tage vor Tumorgabe 1 mg TM β -1 sowie zwei und zwölf Tage nach Tumorinokulation je 0,1 mg TM β -1 intraperitoneal gespritzt. Zur Elimination der verschiedenen T-Zell-Arten wurde als monoklonaler Antikörper MmT1 verwendet (Kremmer *et al.*, 1993). Es wurden vier Tage vor der Tumorgabe 0,5 mg MmT1, einen Tag vorher 0,1 mg sowie sechs und zwölf Tage nach der Inokulation des Tumors je 0,1 mg MmT1 intraperitoneal verabreicht.

C Ergebnisse

Ziel der hier durchgeführten Arbeit war es, DZ als Vakzine gegen B-Zell-Lymphome zu benützen, um eine gegen einen Tumor gerichtete Immunantwort zu induzieren. Im ersten Teil der Arbeit wurden hierfür humane DZ von allogenen Spendern verwendet, die mit den B-Lymphozyten von an chronischer lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten fusioniert wurden. Untersucht wurden die Effizienz, mit der solche Hybridzellen generiert werden können, sowie deren Potenzial, in *In-vitro*-Stimulationsversuchen eine Immunantwort zu induzieren. Um genauere Aussagen über die durch Vakzinierung mit DZ initiierte Immunantwort sowie über die daran beteiligten Immunzellen treffen zu können, wurde auf das bereits im Labor etablierte murine B-Zell-Lymphom A20 zurückgegriffen. Dies eröffnete die Möglichkeit, sowohl durch *In-vitro*-, als auch durch *In-vivo*-Untersuchungen die Rolle der bei der Immunantwort beteiligten Zellen genauer zu analysieren.

1. Das therapeutische Potenzial von fusionierten Hybridzellen

1.1 Die Generierung von Hybridzellen

Für die Generierung von Fusionszellen im humanen System wurden DZ aus monozytären CD14⁺-Vorläuferzellen verwendet. Da diese bei an chronischer lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten nur in geringer Zahl im peripheren Blut zirkulieren, wurde, um genügend Zellen zu erhalten, zur Gewinnung von DZ das Blut allogener, gesunder Spender verwendet. Trotz unterschiedlicher MHC-Typen von allogenen DZ und Tumorzellen können Hybridzellen Tumorpeptide effizient den T-Zellen des Patienten präsentieren, da Hybridzellen die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle sowohl von Leukämiezellen als auch von DZ auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die monozytären Vorläuferzellen der DZ wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut isoliert und nach Markierung mit einem gegen das Oberflächenmolekül CD14 gerichteten Antikörper durch Magnetseparation weiter angereichert. Im Laufe einer achttägigen Zellkultur mit GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) differenzierten diese Vorläuferzellen zu DZ, die je nach Fragestellung unreif oder nach Durchführung eines zusätzlichen Reifungsschrittes verwendet wurden.

Als Tumorzellen wurden Blutlymphozyten aus dem peripheren Blut von an chronischer lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten verwendet, welche über die Medizinische Klinik III des Universitätsklinikums Großhadern bezogen wurden. Für die Zellfusion wurden die Leukämiezellen aus dem peripheren Blut nicht weiter aufgereinigt und in ihrer Gesamtheit für die

Fusion eingesetzt, da die Leukämiezellen den größten Teil der peripheren Blutzellen dieser Patienten ausmachten.

Beide Fusionspartner wurden, wie im Methodenteil beschrieben, einer Fusion mittels Polyethylenglycol unterzogen. Nach jeder Fusion wurden Aliquots entnommen, um weitergehende Untersuchungen am FACS-Gerät oder auf Objektträgern durchzuführen. Der größte Teil der fusionierten Zellen wurde für anschließende Stimulationsexperimente verwendet.

1.2 Etablierung eines Nachweissystems für Hybridzellen

Da der Erfolg der Zellfusion auf dem zufälligen Zusammentreffen der Fusionspartner zum Fusionszeitpunkt beruht, kann das Ergebnis einer Fusion stark variieren. Deshalb ist es nötig, für die erfolgreiche Induktion einer Immunantwort, jede einzelne Zellfusion hinsichtlich wichtiger Parameter, wie Fusionsfrequenz und Lebensfähigkeit der Hybridzellen, genau zu untersuchen. Dafür stehen verschiedene Nachweis- und Untersuchungsmethoden zur Verfügung.

1.2.1 Darstellung von Zellfusionen am FACS-Gerät

Eine Möglichkeit, Hybridzellen aus DZ und Tumorzellen nachzuweisen, war die Darstellung von Fusionsereignissen am FACS-Gerät. Gegenüber dem Fluoreszenzmikroskop bot diese Methode den Vorteil, leicht und in kurzer Zeit quantitative Aussagen über die Anzahl an Fusionsereignissen, bezogen auf die Gesamtzellzahl, zu erhalten. Überdies konnte durch Ausschluss von toten Zellen durch Propidium-Jodid der Anteil an lebensfähigen Hybridzellen genau festgelegt werden. Die Möglichkeit, schnell eine Aussage über die Fusionsfrequenz und die Vitalität der Hybridzellen zu treffen, sowie die leichte Handhabbarkeit der Messung am FACS-Gerät sind auch entscheidende Vorteile für einen eventuellen späteren klinischen Einsatz.

Damit fusionierte Zellen mit großer Genauigkeit detektiert werden konnten, war es notwendig, eine Färbung zu etablieren, bei der die einzelnen Zellarten jeweils mit einem nur für sie spezifischen Antikörper detektiert wurden. Die verwendeten monoklonalen Antikörper sollten ein unterschiedliches Emissionsspektrum aufweisen, das sich nur in einem möglichst kleinen Bereich überschneidet, um für die Unterscheidung der Zellen eindeutig voneinander differenzierbare Signale zu erhalten. Ziel dieser Nachweismethode war es, unfusionierte leukämische Lymphozyten und DZ als jeweils einfach gefärbte Zellen darzustellen, während fusionierte Hybridzellen, die Anteile beider Zellarten enthalten, als doppelt markierte Zellen gut abgrenzbar sein sollten. Wurden derart markierte Zellen in einem Punktwolkendiagramm (Dot-Plot) dargestellt, konnten die unterschiedlichen Fluoreszenzen in einem Koordinatensystem miteinander korreliert werden. In

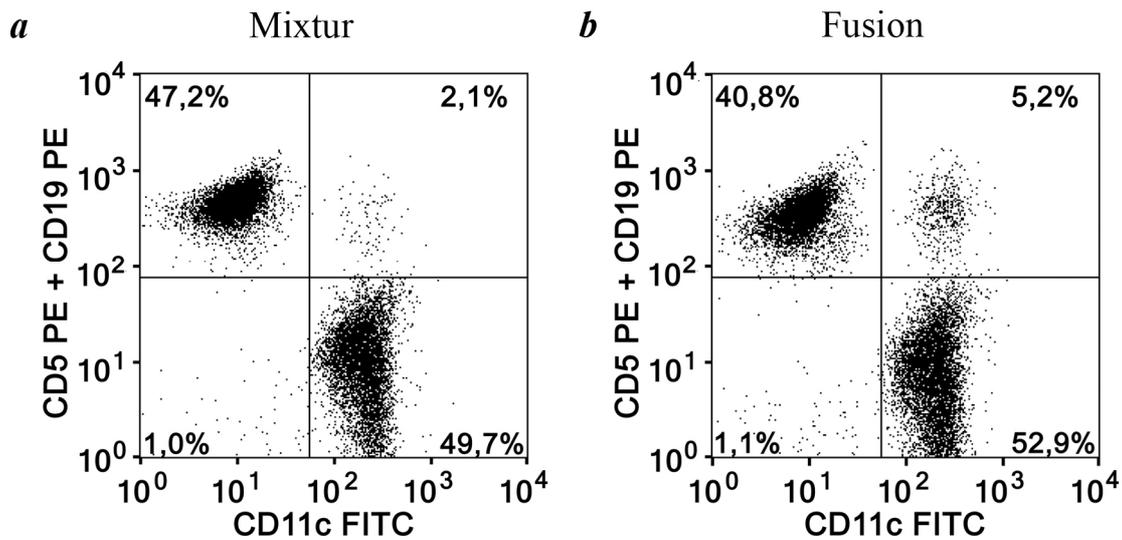


Abb. 2: Exemplarische Darstellung einer Zellmischung aus DZ und CLL (a) und einer Zellfusion (b) mittels FACS-Analyse

Die B-Lymphozyten wurden mit CD5 und CD19 (jeweils PE-konjugiert) markiert, die DZ mit CD11c (FITC-konjugiert). Das Fadenkreuz des „Dot Plots“ wurde so eingestellt, dass unmarkierte Zellen im linken unteren Quadranten lagen. Nur CD5- und CD19-markierte Zellen kommen im oberen linken Quadranten zum Liegen, nur CD11c markierte Zellen im unteren rechten. Als Kontrolle wurde bei jeder Fusion jeweils auch eine Zellmischung mitgeführt (a). Nach Durchführung der Fusion stellten sich Hybridzellen im rechten oberen Quadranten als doppelt markierte Zellen dar (b). Bei den Zellmixturen fand sich meist auch ein geringer Prozentsatz an doppelt positiven Ereignissen, die auf unspezifischen Zelladhäsionen von DZ und CLL beruhen.

diesem Fall wurden, wie im Methodenteil beschrieben, Fluoreszenz 1 (FITC) auf der x-Achse gegen Fluoreszenz 2 (PE) auf der y-Achse aufgetragen (Abb. 2). Das Koordinatensystem wurde in vier Quadranten eingeteilt. Die nicht gefärbten und unfusionierten Zellen beider Zellarten mussten hierbei im unteren linken Quadranten liegen, während mit FITC gefärbte DZ im unteren rechten und mit Phycoerythrin markierte CLL-Zellen im oberen linken Quadranten liegen sollten. Tote Zellen wurden durch Zugabe von Propidium-Jodid ausgeschlossen. Fusionierte Hybridzellen wiesen ein FITC-Signal an ihrem Dendritischen Anteil auf, während der aus den Leukämiezellen stammende Anteil mit Phycoerythrin markiert war, so dass sich Hybridzellen als doppelt gefärbte Zellen in den oberen rechten Quadranten projizierten.

Damit die unterschiedlichen Zellarten und die Hybridzellen exakt voneinander unterschieden werden konnten, mussten für die jeweiligen Zellen spezifische Oberflächenmarker gefunden werden, die mit Antikörpern detektiert werden konnten. Hierzu konnte auf bereits durchgeführte Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden (Garhammer, 2001), in denen als nur für DZ spezifischer Marker CD11c, ein Stammmarker für Zellen der myeloischen Reihe, bestimmt worden war. Als nur für CLL-Zellen spezifische Oberflächenmoleküle, die nicht auf DZ

vorhanden waren, fanden sich CD5 und CD19. Auf Grund dieser Daten etablierte Garhammer ein Nachweissystem, bei dem DZ mit einem PE-konjugierten anti-CD11c-Antikörper und die Leukämiezellen mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD5 und CD19 detektiert wurden. Ein Nachteil dieses Nachweissystems bestand jedoch darin, dass zwar beide Zellarten spezifisch markiert werden konnten, aber die Signalintensität des Tumoranteils von Hybridzellen nicht ausreichend war, um die Fusionszellen eindeutig von der Dendritischen Zellpopulation abzugrenzen. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem die Oberflächenmarker CD5 und CD19 der Leukämiezellen, anstatt sie durch FITC zu detektieren, mit durch PE-konjugierte Antikörper markiert wurden, welche eine größere Signalintensität aufwiesen. Die DZ wurden mit einem für CD11c spezifischen FITC-konjugierten Antikörper detektiert.

Diese Modifikation des Nachweissystems ermöglichte es, die fusionierten Hybridzellen von den unfusionierten Zellen eindeutig zu unterscheiden. Ein Nachteil dieser Nachweismethode war jedoch, dass die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden konnte, dass DZ und CLL, die nicht fusioniert waren, sondern nur adhärent aneinander hafteten, ebenso als ein einzelnes, doppelt positives Ereignis im FACS-Gerät gezählt werden konnten. Um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer derartigen unerwünschten Verfälschung des Messergebnisses zu verringern, wurde dem bei der Messung am FACS-Gerät verwendeten FACS-Puffer eine hohe Konzentration des Chelatbildners EDTA in Höhe von 15 mMol zugegeben. Dies reduzierte unerwünschte Zellaggregationen auf ein Minimum, erforderte jedoch ein schnelles Verarbeiten der Proben, um nicht gewollte Zytotoxizität zu vermeiden.

1.2.2 Nachweis von Hybridzellen auf Objektträgern

Ein weitere Methode, Hybridzellen nachzuweisen, war die Färbung und Fixierung der Zellen auf Objektträgern mit anschließender Auswertung im Fluoreszenzmikroskop. Der Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskop bot den Vorteil, eine qualitative Aussage über die fusionierten Zellen zu treffen, da es hier möglich war, jede fusionierte Zelle einzeln im Mikroskop zu analysieren und auszuwerten. Hierbei konnte jede einzelne Zelle auf das Genaueste untersucht werden, um zwischen einer unspezifisch erfolgten Zellaggregation und einer realen Fusion zu unterscheiden. Ebenso waren quantitative Aussagen über die Anzahl an fusionierten Hybridzellen, sowohl bezogen auf die Zahl der DZ, wie auch bezogen auf die Gesamtzellzahl möglich. Jedoch erfordert dies einen großen Zeit- und Arbeitsaufwand, so dass diese Methode weniger für einen eventuellen klinischen Einsatz geeignet ist, sondern speziellen Fragestellungen vorbehalten bleiben sollte.

1.2.2.1 Markierung der Zellen mit Cell-Tracker

Eine Möglichkeit, Zellen am Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen, war die Markierung mittels Cell-Tracker. Cell-Tracker sind Farbstoffe, welche Zellen unspezifisch anfärben und mit einem sehr leuchtintensiven Signal versehen. Wie im Methodenteil beschrieben, mussten die Zellen vor der Fusion separat mit Cell-Tracker markiert werden. DZ wurden hierzu mit einem Cell-Tracker Green BODIFY angefärbt, der grünes Licht bei 528 nm emittierte, während leukämische B-Lymphozyten mit einem Cell-Tracker Orange CMTMR markiert wurden, der Licht bei 566 nm emittierte (*Abb. 3*). Die gefärbten Zellen wurden einer Fusion mittels Polyethylenglycol unterzogen und auf einem Objektträger aufgebracht. Die sehr leuchtstarke Färbung der Zellen durch Cell-Tracker ermöglichte es, gut zwischen intensiv grün leuchtenden DZ, intensiv orange gefärbten Tumorzellen und fusionierten Hybridzellen, die beide Signale aufwiesen, zu unterscheiden. Dadurch konnten große Zellzahlen auf Objektträgern ausgewertet und eine valide quantitative Aussage über die Höhe der Fusionsfrequenz getroffen werden. Da allerdings die verwendeten Cell-Tracker nicht für einen Einsatz im FACS-Gerät geeignet waren, war es nicht möglich, mit dieser Methode direkt die Fusionsraten einer einzelnen Fusion gleichzeitig am Objektträger und durch Messung am FACS-Gerät zu evaluieren.

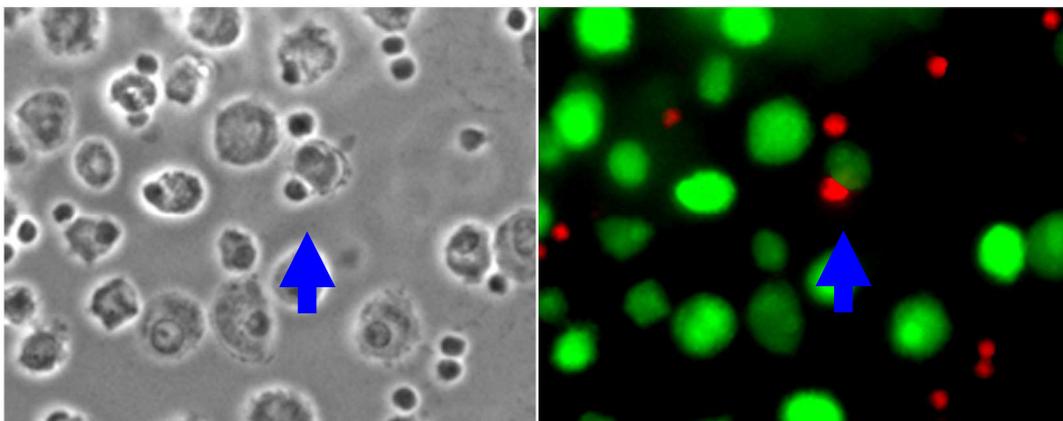


Abb. 3: Darstellung einer Fusion nach Färbung der Zellen mit Cell-Tracker

DZ wurden grün mit Cell-Tracker Green BODIFY angefärbt, CLL-Zellen rot mit Cell-Tracker Orange CMTMR. Mittig ist eine Zellfusion sichtbar (Pfeil)

1.2.2.2 Detektion der Hybridzellen mit spezifischen Antikörpern

Beim Nachweis von Hybridzellen am FACS-Gerät konnte, wie oben bereits ausgeführt, nicht mit Sicherheit das Vorhandensein von unspezifischen Zellaggregaten ausgeschlossen werden. Deshalb war es nötig, einen Ansatz zu etablieren, bei dem es möglich war, die am FACS-Gerät erhaltenen Werte mit der genaueren Messung am Fluoreszenzmikroskop zu korrelieren. Dadurch konnten die

am FACS-Gerät erhaltenen Werte daraufhin überprüft werden, ob nicht doppelt-positive Ereignisse fälschlicherweise als fusionierte Hybridzellen gewertet wurden, welche aber in Wirklichkeit unspezifische, nicht fusionierte Zellaggregate waren. Basierend auf den für die Detektion am FACS-Gerät verwendeten, monoklonalen Antikörpern wurde deswegen versucht, eine Färbung zu etablieren, die einen Nachweis von Hybridzellen mit derselben Antikörperkombination auf Objektträgern am Fluoreszenzmikroskop ermöglichte (Abb. 4). Zuerst wurde untersucht, ob die für die Detektion der Zellen am FACS-Gerät verwendeten monoklonalen Antikörper alleine ausreichten,

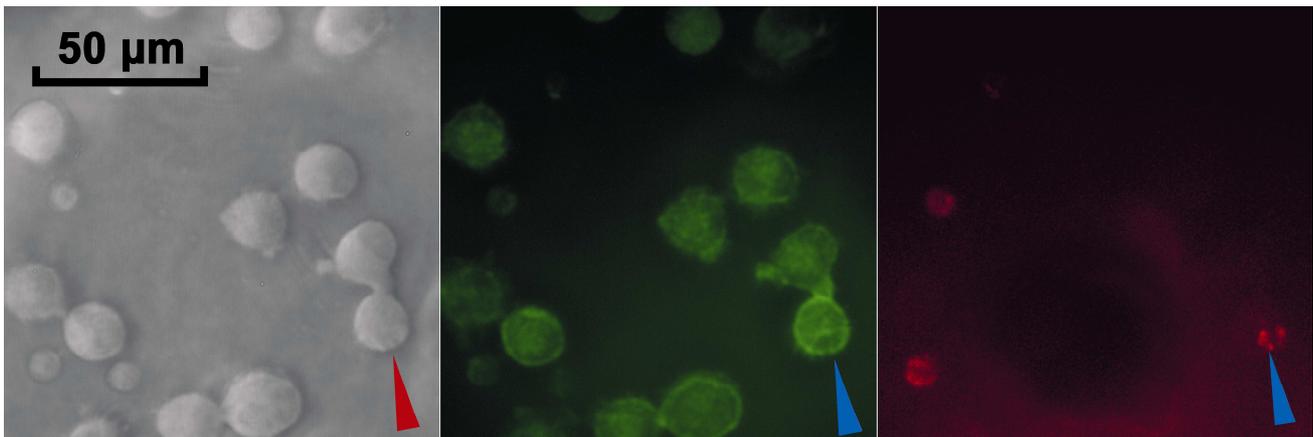


Abb. 4: Darstellung einer Zellfusion im Fluoreszenzmikroskop nach Färbung mit spezifischen Antikörpern

Die Färbung der Zellen war analog der Färbung für das FACS-Gerät: DZ wurden mit biotinylierten CD11c (detektiert mit Streptavidin-FITC) primär markiert. In einem weiteren Schritt wurde dieses Signal mit einem biotinylierten Anti-Avidin-Antikörper, welcher wiederum mit Streptavidin-FITC detektiert wurde, weiter verstärkt. CLL-Zellen wurden mit CD5 und CD19 (jeweils PE-konjugiert) primär markiert und anschließend mit einem Cy3-konjugierten Antikörper, der gegen den murinen F_c-Teil gerichtet war, verstärkt. Hier sichtbar, zwei fusionierte Hybridzellen, mit Pfeilen markiert.

um nach Fixierung am Objektträger ein für eine Auswertung am Fluoreszenzmikroskop ausreichend starkes Signal zu liefern. Das von den mit FITC und PE markierten Zellen ausgehende Signal war jedoch alleine zu schwach für eine Auswertung, so dass eine Möglichkeit gefunden werden musste, dieses Signal weiter zu verstärken. Hierzu wurde das Signal der mit Streptavidin-FITC markierten DZ durch Bindung eines gegen den Avidin-Anteil gerichteten Antikörpers weiter intensiviert. Diese Methode hatte den Vorteil, dass Proben sowohl am FACS-Gerät gemessen werden konnten, als auch Aliquots derselben Fusion zu einem späteren Zeitpunkt, nach Fixierung auf Objektträgern, am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden konnten. Damit war es möglich, einerseits quantitative Aussagen über große Zellmengen durch Messung am FACS-Gerät zu machen und andererseits durch die Auswertung am Mikroskop quantitativ die reale Fusionsfrequenz unter Ausschluss von Zellaggregaten zu bestimmen. Des Weiteren war durch die Etablierung dieser Färbung mit

Antikörpern die Möglichkeit gegeben, die Zellmixturen und Fusionen auch am konfokalen Mikroskop zu untersuchen. Weitergehende Untersuchungen am konfokalen Mikroskop belegten die erfolgreiche Generierung von fusionierten Hybridzellen.

1.3 Der Einfluss verschiedener Variablen auf die Fusionsrate

Nachdem die oben beschriebenen Methoden zum Nachweis von Fusionszellen etabliert waren, war es möglich, die Effizienz von Fusionen genauer zu untersuchen. Die für die Fusion eingesetzten DZ und leukämischen B-Lymphozyten wurden, wie im Methodenteil beschrieben, einer Fusion mit Hilfe von Polyethylenglycol unterzogen. Je nach Fragestellung wurden dafür immature DZ oder mature DZ verwendet. Nach jeder Fusion wurden Aliquots für weitergehende Untersuchungen abgenommen.

Ziel der folgenden Versuche war es, die Fusionsfrequenz von Fusionen zu bestimmen und weitere Parameter zu identifizieren, die Einfluss auf die Effizienz von Fusionen haben. Diese Informationen waren wichtig, um später erfolgreich Stimulationsversuche durchzuführen.

1.3.1 Phänotypische Analyse der Reifungsmarker auf DZ

Wie in verschiedenen Studien dargelegt, hat der Reifungszustand von DZ großen Einfluss auf ihre stimulatorische Kapazität (Banchereau & Steinman, 1998; Steinman & Swanson, 1995). Deswegen war es wichtig, den Maturationszustand der DZ genau zu charakterisieren. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden immature DZ aus monozytären Vorläuferzellen nach acht Tagen Zellkultur in serumfreiem Medium mit GM-CSF und IL-4 generiert. Mature DZ wurden erzeugt, indem unreife DZ mit einem Zytokincocktail, bestehend aus GM-CSF, IL-4, TNF- α , PGE-2, IL-6 und IL-1 β für 36 h im Brutschrank inkubiert wurden. Zur Analyse des Reifungszustands wurden bestimmte Oberflächenmarker mit monoklonalen Antikörpern auf DZ detektiert und im FACS-Gerät gemessen (*Abb. 5*). Unreife und reife DZ exprimierten wenig CD1a, in geringer bis mittlerer Konzentration CD14 sowie in hoher Konzentration den myeloischen Stammmarker CD11c. Mature DZ wiesen, verglichen mit immaturen, eine stärkere Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD83 und CD86 auf. Die für leukämische B-Lymphozyten typischen Oberflächenmarker CD5 und CD19 wurden weder auf immaturen noch auf maturen DZ exprimiert (*Daten hier nicht gezeigt*).

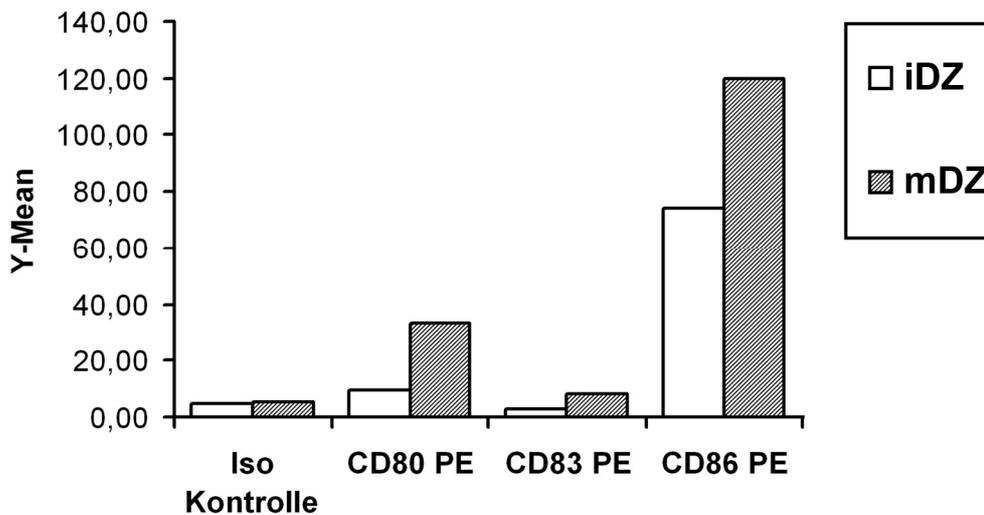


Abb. 5: Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern bei immaturren und maturateden DZ

Der weiße Balken zeigt die Expression auf immaturren DZ (iDZ) nach 8 d Kultur im serumfreien Medium. Die Expression der Oberflächenmoleküle auf maturateden DZ (grauer Balken) wurde 36 h nach Zugabe des Maturationscocktails am 10. Tag bestimmt (mDZ). Die abgebildeten Daten sind das Ergebnis mehrerer unabhängiger Versuche.

1.3.2 Die Abhängigkeit der Fusionsrate vom Reifungszustand der DZ

Im Zuge der Reifung kommt es bei DZ zu einer Änderung vieler grundlegender Parameter: es werden mehr MHC-Moleküle auf der Oberfläche exprimiert, es kommt zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle sowie zu Erhöhung der Migrationskapazität (Banchereau & Steinman, 1998). Durch diese tiefgreifenden Veränderungen der Zellstruktur beim Reifungsprozess erschien es möglich, dass dies auch eine Auswirkung auf die Höhe der Fusionsraten der Hybridzellen und somit auf die Effizienz einer Fusion haben könnte. Um eine Aussage darüber zu treffen, wurden mehrfach Fusionen bei einem festen Verhältnis von DZ zu Tumorzellen von 1:1 ausgeführt und die Fusionsfrequenz bestimmt. Für eine möglichst exakte Bestimmung der Zahl von Hybridzellen wurden für diese Fragestellung die Fusionsraten am Fluoreszenzmikroskop evaluiert. Dabei wurde auf eine Färbung mit Cell-Tracker zurückgegriffen, die durch ihre hohe Leuchtintensität das Auswerten von großen Zellzahlen auf Objektträgern ermöglichte. In einem ersten Schritt wurde sichergestellt, dass die Fusion mit Polyethylenglycol selbst keine Auswirkung auf den Phänotyp der DZ hatte. Bei der Überprüfung des Reifungszustandes von DZ am FACS-Gerät, vor und nach Behandlung mit Polyethylenglycol, fand sich keine Änderung der Expression von kostimulatorischen Molekülen (*Daten nicht gezeigt*). Bei der Auswertung der Objektträger am Fluoreszenzmikroskop zeigte sich folgendes Ergebnis (*Abb. 6*): Wurden immature DZ für die

Fusion mit CLL-Zellen eingesetzt, so ließ sich eine durchschnittliche Fusionsrate von 2,84% erzielen, wurden dagegen mature DZ verwendet, steigerte sich die Fusionsrate auf 3,95%. Beim Auswerten der Fusionsfrequenzen am FACS-Gerät bestätigte es sich wiederum, dass bei Verwendung maturer DZ eine höhere Fusionsrate verglichen mit unreifen DZ erreicht wurde. Dort zeigte sich eine Erhöhung der durchschnittlichen Fusionsrate von 4,6% bei Einsatz von unreifen auf 5,95% bei Verwendung von muren DZ. Eine Erklärungsmöglichkeit für die höhere gemessene Fusionsrate am FACS-Gerät ist das Vorhandensein unspezifischer Zellaggregate.

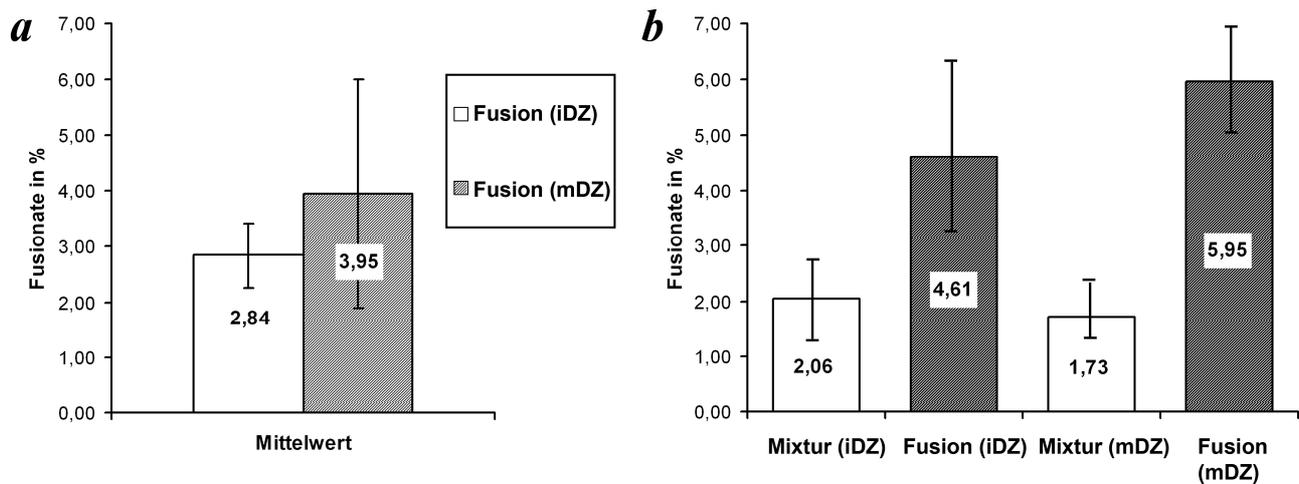


Abb. 6: Auswertung der gemessenen Fusionsraten auf Objektträgern (a) und bei Messung am FACS-Gerät (b)

(a) Nach der PEG-Fusion betrug bei der Auswertung von Zellfusionen auf Objektträgern am Fluoreszenzmikroskop die durchschnittliche Rate an fusionierten Hybridzellen 2,84% bei Verwendung unreifer DZ und 3,95% bei muren DZ. Bei der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden in der Zellmischung keine Zellen gefunden, die den Kriterien einer fusionierten Hybridzelle entsprochen hätten. (b) Bei der Bestimmung der fusionierten Hybridzellen am FACS-Gerät ergab sich nach PEG-Fusion eine durchschnittliche Rate an doppelt-positiven Fusionsereignissen von 4,61% bei unreifen DZ und 5,95% bei muren DZ. In der Kontrollgruppe mit den Zellmischturen wurden 2,06% bei unreifen DZ und 1,73% bei muren DZ als doppelt-positivereignisse gemessen. Diese waren auf unspezifische Zellaggregationen aus DZ und CLL zurückzuführen.

1.3.3 Der Einfluss des Verhältnisses von Tumorzellen zu DZ

Eine weitere Frage war, welche Auswirkung eine Änderung des Verhältnisses von DZ zu leukämischen B-Lymphozyten auf die Fusionsfrequenz von Hybridzellen hatte. Wurden mehr Tumorzellen im Verhältnis zu den DZ zugegeben, so sollte die Wahrscheinlichkeit steigen, dass sich eine Tumorzelle zum Zeitpunkt der Fusion an eine DZ anlagerte, und damit auch die Zahl der generierten Hybridzellen zunehmen. Um dies genauer zu untersuchen, wurden DZ mit leukämischen B-Lymphozyten im Verhältnis 1:1, 1:3, 1:5 und 1:10 zusammengegeben und einer

Fusion mittels Polyethylenglycol unterzogen. Alle Versuche wurden sowohl mit immaturren als auch maturaen DZ durchgefuehrt.

Zuvor wurden beide Fusionspartner gemaeß dem Färbeprotokoll für Cell-Tracker markiert, die DZ mit einem grünen Farbstoff, die Tumorzellen mit einem roten. Nach Durchfuehrung der Fusion wurden die Zellen auf Objekttraeger aufgetragen und fixiert, um am Fluoreszenzmikroskop die exakte Fusionsfrequenz zu bestimmen. Bei der Auswertung zeigte sich bei immaturren DZ, bezogen auf die Anzahl DZ, eine Steigerung der Fusionsrate mit zunehmenden Tumor/DZ-Verhaeltnis (Abb. 7). Durch Verwendung von maturaen DZ konnte die Fusionsfrequenz noch einmal erhöht werden. Dies ließ den Schluss zu, dass es offenbar durch die Erhöhung des Verhaeltnisses von CLL zu DZ zu besseren Kontaktmoeglichkeiten zwischen DZ und Tumorzellen bei der Fusion kam, was eine gesteigerte Fusionsfrequenz bewirkte. Damit aber die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Versuche untereinander gewaehrleistet wurde, wurde bei allen weiteren Untersuchungen dennoch weiterhin ein Verhaeltnis der DZ zu den Tumorzellen von 1:1 beibehalten.

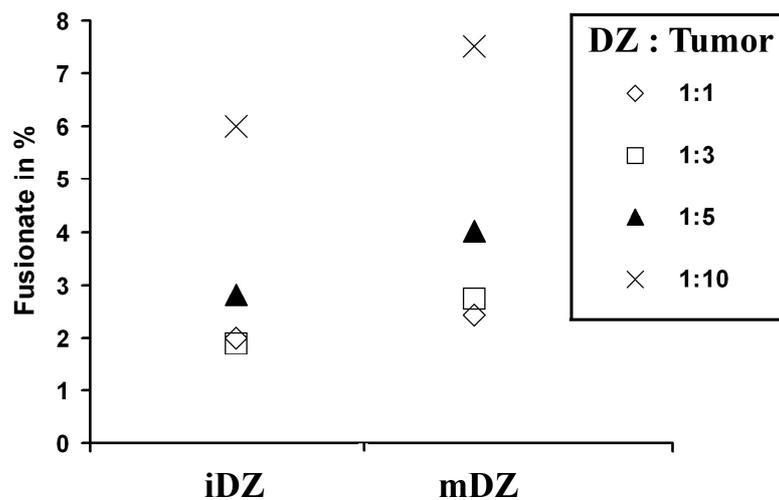


Abb. 7: Gesteigerte Fusionsrate bei Erhöhung des Verhaeltnisses CLL:DZ

Die Erhöhung des Verhaeltnisses von CLL zu DZ führte zu einer gesteigerten Frequenz von Hybridzellen (auf Objekttraegern am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet). Die Verwendung immaturren DZ (iDZ) ergab eine Frequenz an Hybridzellen von 2% (1:1), 1,9% (1:3), 2,8% (1:5) und 6% (1:10). Der Einsatz maturaen DZ (mDZ), bei der PEG-Fusion, führte verglichen mit dem Einsatz von iDZ zu einer höheren Rate an Fusionszellen: 2,5% (1:1), 2,8% (1:3), 4,1% (1:5) und 7,6% (1:10). Bei allen Ansätzen wurden CLL des gleichen Patienten sowie DZ eines einzigen Spenders eingesetzt.

1.3.4 Evaluierung der Fusionsfrequenz

Wurden Fusionen am FACS-Gerät unter Verwendung einer Färbung mit monoklonalen Antikörpern detektiert, kamen als Kontrollen Zellmixturen aus DZ und Tumorzellen zum Einsatz, die keinem Fusionsschritt unterzogen worden sein sollten. Obwohl in dieser Kontrollgruppe keine Hybridzellen vorhanden waren, fanden sich in der FACS-Analyse dennoch durchschnittlich 3% doppelt-positive Ereignisse. Deren Zustandekommen in der unfusionierten Zellmischung erklärte sich durch unspezifische Zellaggregationen von DZ und Tumorzellen, die während der gemeinsamen Inkubation auftraten. Es war also anzunehmen, dass derselbe Effekt auch bei fusionierten Hybridzellen auftrat und somit die bei Fusionen am FACS-Gerät gemessenen Werte fälschlicherweise zu hoch waren. Deshalb war es für die Bestimmung der Fusionsfrequenz nötig, dass die am FACS-Gerät gemessenen Werte mit der qualitativ genaueren Auswertung auf Objektträgern verglichen wurden. Dafür wurden die Zellen, wie oben beschrieben, nach der Fusion mit monoklonalen Antikörpern markiert. Ein Teil der Zellen wurde mit dieser Färbung am FACS-Gerät analysiert, ein weiterer Teil wurde auf Objektträgern fixiert. Damit die Zellen auf den Objektträgern ein für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop genügend starkes Signal hatten, wurde dieses Signal, wie oben beschrieben, durch Zugabe sekundärer Detektionsantikörper weiter intensiviert. Die Untersuchung auf Objektträgern ermöglichte es, zuverlässig Zellaggregationen zu

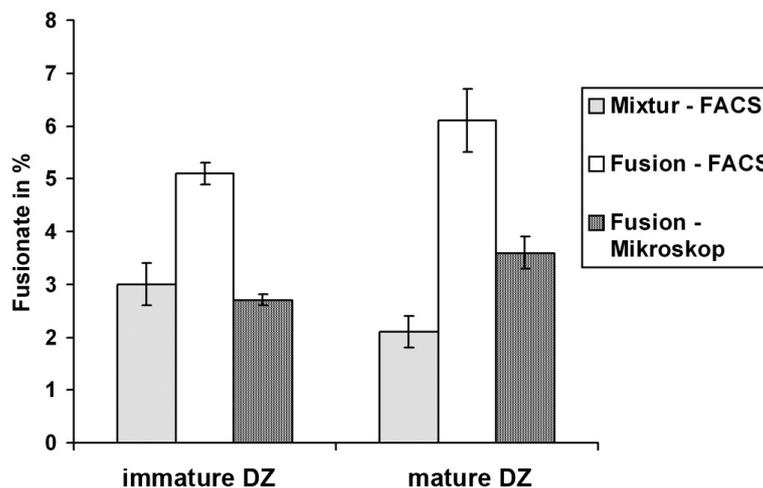


Abb. 8: Vergleich der gemessenen Fusionsrate im FACS bzw. Fluoreszenzmikroskop

Bei der Untersuchung der Zellen am FACS-Gerät wurden neben der Fusion auch doppelt-positive Ereignisse in der Zellmixturen, sowohl bei immaturren als auch bei maturateden DZ, gemessen. Die Überprüfung am Fluoreszenzmikroskop bewies, dass dies durch unspezifische Zellaggregationen verursacht wurde, die als doppelt-positive Ereignisse vom FACS-Gerät gewertet wurden. Dieselben unspezifischen Zellaggregationen waren die Ursache für die Erhöhung bei der Messung der Fusionsrate am FACS-Gerät verglichen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Am Mikroskop konnten in der Mixtur keine Fusionsprodukte ähnliche Ereignisse nachgewiesen werden.

identifizieren und von fusionierten Hybridzellen zu unterscheiden. Nach dem Auszählen von Hybridzellen am Fluoreszenzmikroskop (*Abb. 3*) und dem Vergleich mit den am FACS-Gerät erhaltenen Daten, stellte sich heraus, dass die Zahl der tatsächlichen Fusionsereignisse etwa um die Hälfte niedriger war als die am FACS-Gerät gemessenen Werte (*Abb. 8*).

1.4. Der Einsatz von Hybridzellen in Stimulationsansätzen

Nach dem erfolgreichen Nachweis von fusionierten Hybridzellen wurde untersucht, welches Potenzial diese hatten, durch Stimulation von naiven T-Lymphozyten eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu induzieren. Für diese Fragestellung wurden T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von an chronischer lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten als Zielzellen benutzt. Wie in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe durch intrazelluläre FACS-Messungen nachgewiesen werden konnte, wurde in diesen Stimulationsansätzen IFN- γ nur von T-Zellen und nicht von Tumorzellen ausgeschüttet (Wahl *et al.*, 2003). Somit konnte über die Messung der IFN- γ -Konzentration eine Aussage über die Aktivierung von T-Zellen getroffen werden. Da sich jedoch unter den Lymphozyten im peripheren Blut von an CLL erkrankten Patienten nur 0,5 – 2 % T-Lymphozyten (eigene Messung) befanden, konnte nur mit sehr geringen Zellzahlen bei Stimulationsversuchen gearbeitet werden. Eine definierte Anzahl dieser Lymphozyten wurde im Stimulationsansatz mit den nach der PEG-Methode generierten Hybridzellen stimuliert. Für die hier durchgeführten Stimulationsversuche wurden sowohl für die Zellmischung als auch für die Zellfusion DZ und leukämische B-Lymphozyten im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Kontrollgruppen, bestehend aus unfusionierten DZ, Tumorzellen und einer Zellmischung aus beiden Zellarten sowie reinem Medium, wurden ebenfalls angesetzt. Um unerwünschte unspezifische Stimulationsreize durch Zellproliferation auszuschließen, wurden alle Stimulatorzellen mit 100 Gy bestrahlt. Die Durchführung der Stimulationsansätze erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Nach acht Tagen wurden die Stimulationsansätze mit unbehandelten bestrahlten Tumorzellen der jeweiligen Patienten restimuliert und nach weiteren fünf Tagen Überstände aus den Stimulationsversuchen für weiterführende Messungen abgenommen.

1.4.1 Messung der IFN- γ -Konzentration im Stimulationsansatz

Bei der erfolgreichen Induktion einer Immunantwort werden T-Zellen dazu angeregt, bestimmte Botenstoffe, wie etwa IFN- γ , zu sezernieren, um weitere Immunzellen wie NK-Zellen oder Makrophagen zu aktivieren. Eine Möglichkeit, eine Aussage über die durch die Stimulation bewirkte Aktivierung von Immunzellen zu treffen, war deshalb die Bestimmung der Sekretion von

IFN- γ im Stimulationsansatz.

Zur Bestimmung der durch die Stimulation bewirkten IFN- γ -Ausschüttung wurde ein sehr sensitiver IFN- γ -ELISA verwendet. In den durchgeführten Stimulationsversuchen zeigte sich je nach Ansatz eine signifikante IFN- γ -Sekretion. Mit den gemessenen IFN- γ -Werten wurden die Stimulationsindices ermittelt. Für deren Berechnung wurde die gemessene Zytokinsekretion nach Gabe der verschiedenen Gruppen von Stimulatorzellen, mit anschließender Restimulation durch Tumorzellen, ins Verhältnis gesetzt zu der gemessenen Zytokinsekretion bei Stimulation und Restimulation von autologen PBL mit autologen Tumorzellen. Der Stimulationsindex nach Verabreichung von Tumorzellen und Restimulation mit CLL-Zellen wurde als 1 definiert. Bei jedem durchgeführten Stimulationsansatz wurde jeweils auch die Höhe der Fusionsfrequenz bestimmt.

Da der Stimulationsansatz mit allogenen DZ durchgeführt wurde, war es wichtig zu wissen, wie groß der allogene Anteil in der Immunantwort war und inwieweit eine tumorspezifische Komponente der Immunantwort vorlag. Damit darüber eine Aussage getroffen werden konnte, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: Periphere Blutlymphozyten eines Patienten wurden mit einer definierten Anzahl von Stimulatorzellen, wie im Methodenteil beschrieben, stimuliert. In einer Versuchsgruppe wurden die PBL mit allogenen DZ alleine stimuliert und erhielten nach einer Woche statt einer Restimulation mit Tumor eine Zugabe von Medium, um die allogene

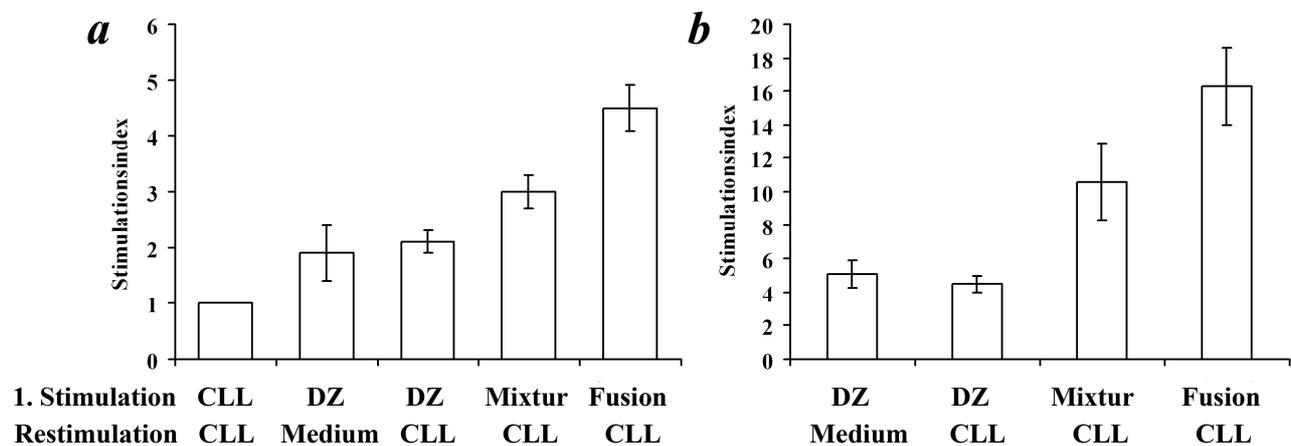


Abb. 9: Stimulationsansatz unter Verwendung von (a) immaturren DZ und (b) maturateden DZ

Die bei der PEG-Fusion aus Tumorzellen und DZ generierten Hybride wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, autologe T-Zellen der CLL-Patienten zu stimulieren. Als weitere Kontrollgruppen wurden allogene DZ alleine, CLL sowie Zellmixturen aus DZ und CLL verwendet. Nach erstmaliger Stimulation mit der entsprechenden Untersuchungsgruppe erhielten die PBL nach 8 Tagen eine Restimulation mit CLL-Zellen. Die Stimulatorzellen wurden jeweils mit 100 Gy bestrahlt. Die Zytokinsekretion wurde mit einem IFN- γ -ELISA bestimmt. Die IFN- γ -Ausschüttung von PBL, die mit CLL stimuliert wurden, wurde als Stimulationsindex berechnet und mit 1 definiert. Für alle oben gezeigten Stimulationsansätze wurden bei der Generierung von Hybridzellen die DZ in einem Verhältnis von 1:1 mit den Tumorzellen fusioniert.

Komponente der Immunantwort zu messen. Bei einer anderen Gruppe wurden die PBL auch mit allogenen DZ stimuliert, aber nach einer Woche erfolgte eine Restimulation mit Tumor (*Abb.9a, dritte Säule*). Als Kontrolle wurden die PBL von CLL-Patienten mit Tumor stimuliert und erhielten ebenso nach einer Woche eine erneute Restimulation mit Tumor. Nach weiteren fünf Tagen wurde der Überstand aus dem Stimulationsversuch in allen Gruppen abgenommen und die Zytokinkonzentration darin bestimmt. In der Gruppe der PBL, welche nach Gabe der allogenen DZ mit Medium statt Tumor restimuliert wurden (*Abb.9a, zweite Säule*), wurde eine signifikant höhere IFN- γ -Sekretion beobachtet, als in der Kontrollgruppe der mit Tumor stimulierten autologen PBL (*Abb.9a, erste Säule*). Diese im Vergleich höhere IFN- γ -Sekretion entsprach der allogenen Komponente in der Immunantwort.

In der Gruppe, in der nach Gabe der allogenen DZ nach einer Woche mit Tumor restimuliert wurde (*Abb.9a, dritte Säule*), konnte, verglichen mit der Gruppe, die nach Gabe der allogenen DZ bei der Restimulation Medium erhielt, keine weitere Steigerung der Immunantwort erzielt werden. Dies deutete darauf hin, dass auch in dieser Gruppe die im Vergleich zu den autologen PBL gesteigerte IFN- γ -Sekretion nur durch allogene Effekte bedingt war. Da hier die Restimulation mit dem Tumor zu keiner Steigerung mehr führte, konnte eine tumorspezifische Komponente bei der Gabe von allogenen DZ alleine ausgeschlossen werden. Hingegen konnte bei Stimulation der PBL mit einer Zellmischung oder Fusion und anschließender Restimulation mit dem Tumor eine Steigerung der Immunantwort, verglichen mit der nicht restimulierten Kontrollgruppe, erzielt werden (*Abb. 9a 4. und 5. Säule*). Die durch Mischung oder Fusion hervorgerufene IFN- γ -Sekretion ging über das durch allogene Zellen erzielte Niveau hinaus und konnte durch Restimulation mit Tumor weiter gesteigert werden, so dass neben der allogenen Stimulation auch eine tumorspezifische Komponente der Immunantwort vorliegen musste.

Nachdem die Rolle der allogenen Komponente bei der Generierung bestimmt worden war, wurde die unterschiedliche Potenz von immaturren und maturaen DZ bei der Induktion einer Immunantwort untersucht. Da matura DZ eine höhere Expression an kostimulatorischen Molekülen aufweisen (Banchereau & Steinman, 1998), wurden in einer weiteren Untersuchungsreihe matura DZ für alle Untersuchungsgruppen verwendet, um deren stimulatorisches Potenzial zu untersuchen. Bei Verwendung maturaer DZ in den Versuchen wurde, verglichen mit den immaturren DZ, ein analoges Ergebnis erzielt: die höchste stimulatorische Kapazität hatten fusionierte Hybridzellen, gefolgt von der Zellmischung. Die niedrigste stimulatorische Kapazität hatten matura DZ alleine. Jedoch lag bei Verwendung von maturaen DZ das Niveau der gemessenen IFN- γ -Werte zwei- bis dreifach über bei den mit immaturren DZ erzielten Werten. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte stimulatorische Kapazität von Hybridzellen aus maturaen DZ war einerseits die erhöhte Fusionsfrequenz bei

Verwendung von maturen DZ, andererseits die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle. Da aber nicht nur bei fusionierten Hybridzellen, sondern auch in den anderen Kontrollgruppen eine erhöhte IFN- γ - Sekretion auftrat, konnte die erhöhte Fusionsfrequenz von maturen DZ bei der Zellfusion nicht der alleinige Grund sein. So ließ sich dieses erhöhte stimulatorische Potenzial am ehesten auf die verbesserte Expression von kostimulatorischen Molekülen bei maturen DZ zurückführen.

1.4.2 Die Beziehung zwischen stimulatorischem Potenzial und der Fusionsrate

Eine weiterer wichtiger Aspekt war, inwieweit die Fusionsrate der Hybridzellen im Stimulationsansatz die Höhe der Ausschüttung an IFN- γ beeinflusste. Da bei jedem Stimulationsversuch die Rate an fusionierten Hybridzellen bestimmt worden war, konnte diese mit dem im Stimulationsansatz gemessenen Stimulationsindex korreliert werden. Entgegen den Erwartungen zeigte sich jedoch, dass zwischen den gemessenen Fusionsraten und dem Stimulationsindex keine Korrelation bestand. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde versucht, fusionierte Hybridzellen durch Zellsortierung weiter anzureichern. Ziel war es zu untersuchen, ob in einem Stimulationsansatz durch Zugabe von angereicherten Hybridzellen eine stärkere Immunantwort induziert wurde, als bei Zugabe von nichtangereicherten Hybridzellen. Für die

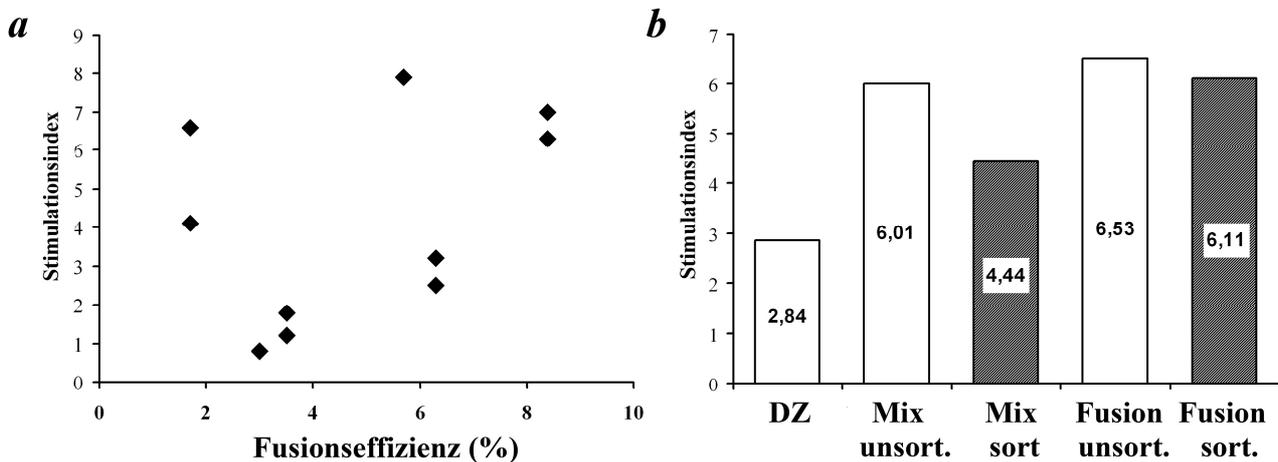


Abb. 10: (a) Korrelation der Fusionsrate (%) mit dem Stimulationsindex; (b) Anreicherung von Hybridzellen mittels Zellsortierung.

(a) Beim Vergleich zwischen der Fusionsrate und dem Stimulationsindex konnte keine Korrelation etabliert werden. (b) Die fehlende Korrelation bestätigte sich bei der Anreicherung von Hybridzellen mittels Zellsortierung. Diese wurden nach Anreicherung, wie im Methodenteil beschrieben, in einen Stimulationsansatz gegeben. Durch die Anreicherung konnte keine weitere Steigerung des Stimulationsindex erzielt werden.

Anreicherung wurden, wie im Methodenteil beschrieben, die viel größeren unfusionierten DZ und fusionierten Hybridzellen von den kleineren leukämischen B-Lymphozyten im Zellsortierer abgetrennt. Da ohne Sortieren nach einer Fusion sowohl fusionierte Hybridzellen als auch unfusionierte DZ und Tumorzellen gemeinsam im Stimulationsansatz enthalten waren, wurde durch Aussortieren der Tumorzellen eine Anreicherung der Hybridzellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl, erreicht. Auch wenn nach Sortierung nicht mit einer reinen Population aus Hybridzellen stimuliert wurde und sich weiterhin unfusionierte DZ im Ansatz befanden, so wurde dadurch dennoch die Rate an fusionierten Hybridzellen erhöht. Als Ergebnis zeigte sich im Stimulationsansatz, dass durch weiteres Anreichern der fusionierten Hybridzellen keine weitere Steigerung der Immunantwort mehr möglich war (*Abb. 10*). Eine mögliche Erklärung hierfür war, dass die zu stimulierenden Lymphozyten aus dem peripheren Blut von in ihrer Immunkompetenz eingeschränkten Patienten stammten und somit die Immunzellen mit einer niedrigen Frequenz an Hybridzellen bereits maximal stimuliert waren. Dass der Zustand des Immunsystems die Höhe der Immunantwort mit beeinflusste, zeigte sich, als die verwendeten peripheren Blutlymphozyten mit den klinischen Krankheitsstadien der Patienten korreliert wurden. So war bei Stimulation von Immunzellen, die aus dem peripheren Blut von Patienten im Stadium Binet B oder C gewonnen wurden, die ausgeschüttete IFN- γ -Menge niedriger als bei Immunzellen von Patienten im Stadium Binet A.

1.4.3 Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei der Zellmixture

Bei Verwendung von Zellmixturen aus DZ und leukämischen B-Lymphozyten im Stimulationsansatz zeigte sich durch die Stärke der induzierten Immunantwort, dass über den allogenen Effekt hinaus eine tumorspezifische Komponente vorliegen musste. Da die Zellen keinem Fusionsschritt unterworfen worden waren, mussten sie auf einem anderen Weg tumorassoziierte Antigene erkannt haben. Eine Möglichkeit war, dass durch die räumliche Nähe leukämische B-Lymphozyten tumorassoziierte Peptide den T-Zellen präsentierten, während die DZ gleichzeitig die für eine erfolgreiche Induktion einer Immunantwort nötigen kostimulatorischen Oberflächenmoleküle bereitstellten. Andererseits war es vorstellbar, dass DZ während der Kokultur mit den Tumorzellen tumorassoziierte Antigene aufnahmen und prozessierten. Diese wurden anschließend T-Zellen im Stimulationsansatz präsentiert. Um dies genauer zu untersuchen, wurden DZ in Paraformaldehyd fixiert, bevor sie in einer Fusion oder Mixture verwendet wurden (Noessner *et al.*, 2002). Dadurch konnten DZ zwar weiterhin kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche

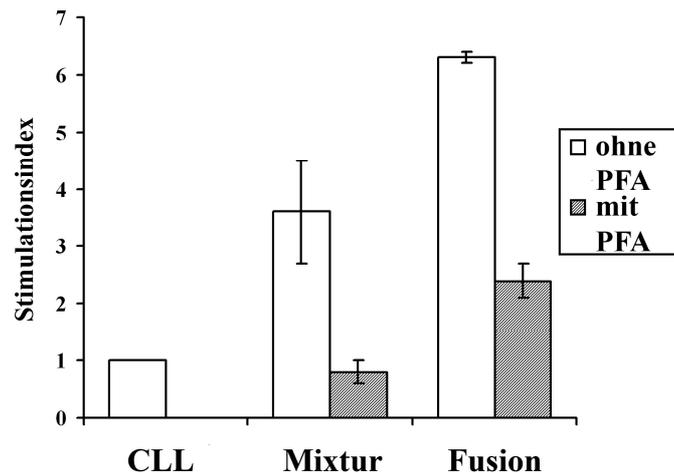


Abb. 11: Fixierung von DZ mit Paraformaldehyd

Um die Ursache für die erhöhte stimulatorische Kapazität der Zellmischung zu untersuchen, wurden DZ mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend in die Zellmischung gegeben oder fusioniert. Durch die Fixierung konnten von den DZ keine neuen Antigene mehr aufgenommen und prozessiert werden. Diese PFA-behandelten DZ wurden dann für eine Zellmischung und eine Zellfusion verwendet und, wie im Methodenteil beschrieben, in einen Stimulationsansatz gegeben. Die nach Fixierung auf Hintergrundniveau reduzierte stimulatorische Kapazität der Zellmischung bewies die Antigenaufnahme und -prozessierung durch DZ während der Kokultur mit den CLL-Zellen

präsentieren, sie waren jedoch nicht in der Lage, neue Peptide und Proteine aus Zellfragmenten oder toten Zellen aufzunehmen und diese an ihrer Oberfläche zu exprimieren. Hierbei zeigte sich, dass bei Verwendung von mit Paraformaldehyd fixierten DZ in einer Zellmischung der Stimulationsindex im Stimulationsansatz auf das Niveau der Tumorkontrolle reduziert wurde (Abb. 11). Das bedeutet, dass Mischturen aus DZ und Tumorzellen dadurch eine tumorspezifische Immunantwort induzieren können, indem die DZ während der Kokultur Peptide und Proteine aufnehmen und diese nach Prozessierung den T-Zellen präsentieren. Wurden mit PFA-fixierte DZ für die Fusion verwendet, kam es jedoch auch zu einer Reduktion der Immunantwort im Stimulationsansatz. Deren Niveau lag aber immer noch über der Immunantwort, die durch eine aus PFA-DZ und CLL bestehende Mischung induziert wurde. Dies könnte damit erklärt werden, dass Hybridzellen einen intakten Mechanismus besitzen sollten, um die durch die Fusion übertragenen Antigene weiter zu verarbeiten, damit diese zur Induktion einer optimalen Immunantwort adäquat präsentiert werden können. Durch die Fixierung mit Paraformaldehyd war dies nach der Fusion nicht mehr möglich, wodurch es zu einer Reduktion der ausgelösten Immunantwort kam. Es ist dennoch vorstellbar, dass durch die Fusion MHC-Moleküle von CLL-Zellen, die bereits mit tumorassoziierten Antigenen beladen waren, selbst direkt in die Membran der DZ integriert wurden, wodurch die Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort möglich war. Dies würde erklären, warum die Immunantwort von Hybriden, die mit PFA-fixierten DZ erzeugt wurden, nicht auf das Niveau der Tumorkontrolle reduziert wurde.

2. Die Rolle der NK-Zellen bei der Antitumorantwort

Wie viele Untersuchungen über den Einsatz von Hybridzellen als Vakzine gegen Tumoren bewiesen haben, beruht die Initiierung einer erfolgreichen Immunantwort vor allem auf der Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Mehrere Studien belegen jedoch auch, wie wichtig die Interaktion von DZ und NK-Zellen ist, um die angeborene und adaptive Immunantwort für eine effiziente Immunantwort zu koordinieren. Fernandez *et al.* zeigten bereits 1999, dass die wechselseitige Stimulierung von DZ und NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Generierung einer Antitumorantwort spielt (Fernandez *et al.*, 1999). Durch direkten Zellkontakt können NK-Zellen den Reifungszustand von DZ beeinflussen, während im Gegenzug NK-Zellen durch DZ zu lytischer Aktivität angeregt werden und IFN- γ produzieren (Gerosa *et al.*, 2002). Nach Stimulierung können NK-Zellen direkt Tumorzellen lysieren und weitere Immunzellen aktivieren, während im Gegensatz dazu T-Zellen nicht direkt den Tumor attackieren können. Für eine effiziente Aktivierung von T-Zellen müssen diesen zuerst Antigene durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) präsentiert werden, bevor sie eine spezifische Reaktivität gegen einen Tumor entwickeln können. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, wie groß in dem Vakzinierungsansatz mit Hybridzellen der Beitrag der NK-Zellen für die Generierung einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort ist.

2.1 Bedeutung der DZ-NK-Zell-Achse

Um Aussagen über das stimulatorische Potenzial von DZ gegenüber NK-Zellen im humanen System zu treffen, wurde versucht, die Interaktion zwischen den beiden Zellarten genauer zu untersuchen. Dazu sollten DZ und NK-Zellen in eine Kokultur gegeben werden, in der ein direkter Zellkontakt zwischen den einzelnen Zellarten möglich war. Auf Grund der äußerst geringen Zahl an nicht-tumorösen Zellen im peripheren Blut von an chronischer lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten konnten jedoch nicht ausreichend NK-Zellen gewonnen werden. Damit genügend große Zellzahlen in den Versuchen zur Verfügung standen, wurden deswegen NK-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern isoliert. Es wurden hierzu NK-Zellen und autologe DZ eines HLA-A2-positiven Spenders sowie allogene NK-Zellen eines HLA-A2- negativen Spenders gewonnen. Die DZ wurden unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen kultiviert. Um das stimulatorische Potenzial der DZ zu überprüfen, wurden nach Isolierung der NK-Zellen DZ mit autologen oder allogenen NK-Zellen in Kokultur gegeben. Beide Zellarten wurden in einem definierten Verhältnis zueinander gemischt und 18 h in Kokultur gehalten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und auf IFN- γ -Ausschüttung untersucht. Bei der Auswertung der

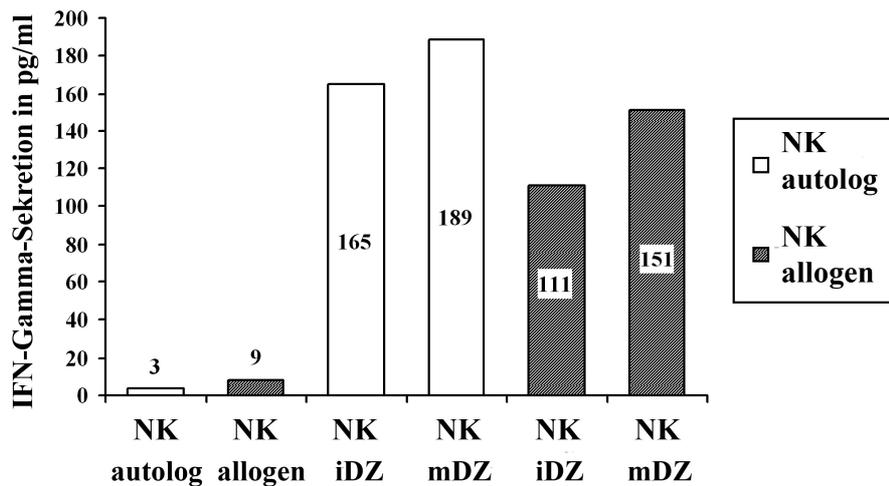


Abb. 12: Aktivierung von NK-Zellen nach Kokultur mit DZ

Immature und mature DZ eines HLA-A2-positiven Spenders wurden, wie im Methodenteil beschrieben, kultiviert; NK-Zellen desselben Spenders sowie NK-Zellen eines HLA-A2-negativen Spenders wurden durch Magnetseparation isoliert. HLA-A2-positive und HLA-A2-negative NK-Zellen wurden zu den DZ des HLA-A2-positiven Spenders in Kokultur gegeben. Nach 18 h wurde der Überstand abgenommen und auf IFN- γ -Sekretion im ELISA untersucht.

Ergebnisse zeigte sich, dass DZ sowohl autologe als auch allogene NK-Zellen zu stimulieren vermochten (Abb. 12). Diese Stimulierung war am stärksten im autologen Ansatz ausgeprägt. NK-Zellen oder DZ alleine schütteten kein IFN- γ aus. FACS Analysen bestätigten, dass IFN- γ durch NK-Zellen in der Kokultur sezerniert wurde und nicht von DZ (Daten nicht gezeigt). Dies ließ den Schluss zu, dass im humanen System durch direkte Zell-Zell-Interaktion von DZ mit NK-Zellen eine Aktivierung der NK-Zellen möglich war. Auf Grund dieser Ergebnisse war es auch vorstellbar, dass aus DZ generierte Hybridzellen im Stimulationsansatz die Fähigkeit besaßen, durch Aktivierung der im peripheren Blut enthaltenen NK-Zellen die Antitumor-Antwort zu verstärken. Die durch allogene wie autologe DZ in der Kokultur bewirkte Aktivierung von NK-Zellen ließ den Rückschluss zu, dass die im Stimulationsansatz gemessene Immunantwort nicht nur auf der Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen beruhte, sondern auch die DZ-NK-Zell-Achse im humanen System einen Beitrag zur Induktion einer effizienten Immunantwort zu leisten im Stande war.

Auf Grund der begrenzten Zellzahl waren jedoch weitergehende Untersuchungen zur Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen im Humansystem nicht durchführbar. Um diese Restriktionen zu umgehen, wurde für weitergehende Untersuchungen ein vergleichbares B-Zell-Lymphom im murinen System gewählt, bei dem diese Limitationen nicht bestanden. Da bereits ein Vakzinierungsansatz mit DZ gegen das murine B-Zell-Lymphom A20 im Labor erfolgreich etabliert worden war, wurde auf diesen zurückgegriffen. In diesem Ansatz wurden aus dem

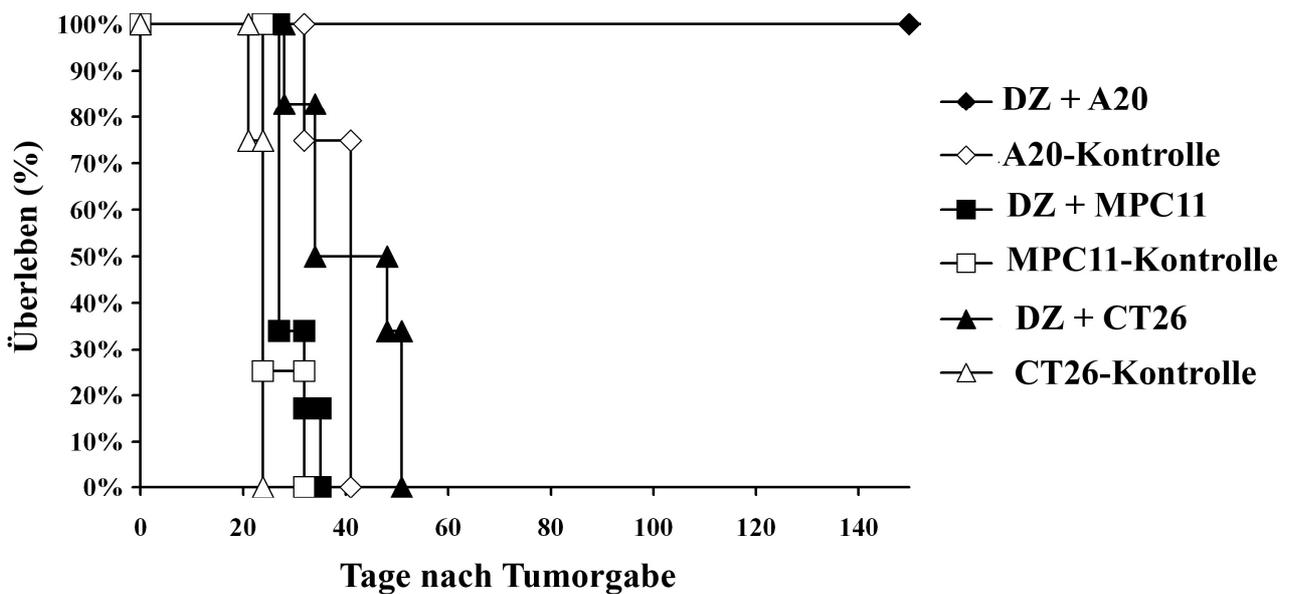


Abb. 13: Immunisierung mit naiven DZ bewirkt Protektion gegen das A20-Lymphom, nicht jedoch gegen MPC11 und CT26

Am Tag -14 und -7 wurden den Mäusen jeweils 10^5 naive DZ subkutan injiziert. Als Tumor wurden 8×10^5 A20- bzw. 10^5 MPC11- oder 10^5 CT26-Zellen am Tag 0 intravenös verabreicht.

Knochenmark von BALB/c-Mäusen Vorläuferzellen von DZ gewonnen und diese dann *in vitro* unter Zugabe von GM-CSF zu DZ differenziert. Injizierte man BALB/c-Mäusen auf diese Weise generierte autologe DZ in unbeladenem Zustand zweimal subkutan, so waren diese vor einer nachfolgenden Inokulation mit dem murinen B-Zell-Lymphom A20 in einer normalerweise letalen Dosis geschützt (Abb. 13). Wurde jedoch den mit unbeladenen DZ geimpften Mäusen das syngene murine B-Zell-Lymphom MPC11 injiziert, bestand überhaupt kein Schutz. Wurde die Kolonkarzinomlinie CT26 verabreicht, war nur ein geringer Anteil der Mäuse dagegen geschützt. Frisch aus dem Knochenmark entnommene Vorläuferzellen der DZ bewirkten keinen Schutz bei Tumorinokulation. Wie Versuche in unserer Arbeitsgruppe demonstrierten (Adam *et al.*, 2005), beruhte dieser Schutz auf gemeinsamen Antigenen von DZ und dem A20-Lymphom, die jedoch nur schwach immunogen waren. Bestand eine intakte DZ-NK-Zell-Achse, bei der die einzelnen Zellarten untereinander ungehindert interagierten, konnte dadurch eine effiziente Antigen-spezifische Immunantwort induziert werden, die zu einer Abstoßung des A20-Lymphoms führte. Der Reifungszustand der DZ spielte für den Schutz nur eine untergeordnete Rolle, sowohl nach Vakzinierung mit autologen unreifen wie auch mit autologen reifen DZ wurde der Tumor abgestoßen. Wurden aber während der Effektorphase nach Verabreichung des Tumors die NK-Zellen depletiert, bestand keinerlei Schutz mehr gegen die Tumorinokulation, und die mit DZ geimpften Tiere starben genauso schnell wie die ungeimpfte Vergleichsgruppe.

2.2 CD4⁺-unabhängige Generierung zytotoxischer T-Zellen

Damit die Rolle der NK-Zellen bei der Generierung der Antitumor-Antwort in diesem Ansatz genauer analysiert werden konnte, wurden verschiedene Depletionsversuche durchgeführt. Um die bei den Depletionsversuchen gefundenen Ergebnisse besser auf den humanen Teil der Arbeit übertragen zu können, wurden wie bei den humanen Hybridzellen allogene DZ für die Vakzinierung der Mäuse verwendet. Die allogenen DZ stammten aus Mäusen des C57BL/6-Stamms und wurden wie im Methodenteil beschrieben generiert und BALB/c-Mäusen subkutan injiziert. Allogene DZ hatten, ebenso wie CD40^{-/-}-DZ, den Vorteil, dass sie nicht direkt mit autologen T-Zellen interagieren konnten und somit eine direkte Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen durch allogene DZ bei der Initiierung der Immunantwort ausgeschlossen werden konnte (Abb. 14). Bei Mäusen, die mit immaturren allogenen DZ vakziniert worden waren, wurde eine moderate Verlängerung der Überlebenszeit erzielt, die aber statistisch signifikant war. Waren Mäuse mit maturaen DZ vakziniert worden, erwies sich ein Teil der Mäuse als immun gegen die Tumorgabe, während im anderen Teil der Versuchsgruppe zumindest eine Überlebenszeitverlängerung bewirkt wurde. Durch Depletion der NK-Zellen vor Tumorgabe starben fast alle Mäuse zeitgleich wie in der Tumorkontrollgruppe. Dies deutete darauf hin, dass mature allogene DZ genügend kostimulatorisches Potenzial besitzen, um eine Tumorabstoßung zu initiieren. NK-Zellen waren, wie die Depletionsversuche belegen, essenziell für einen effektiven Schutz. Durch die allogenen DZ

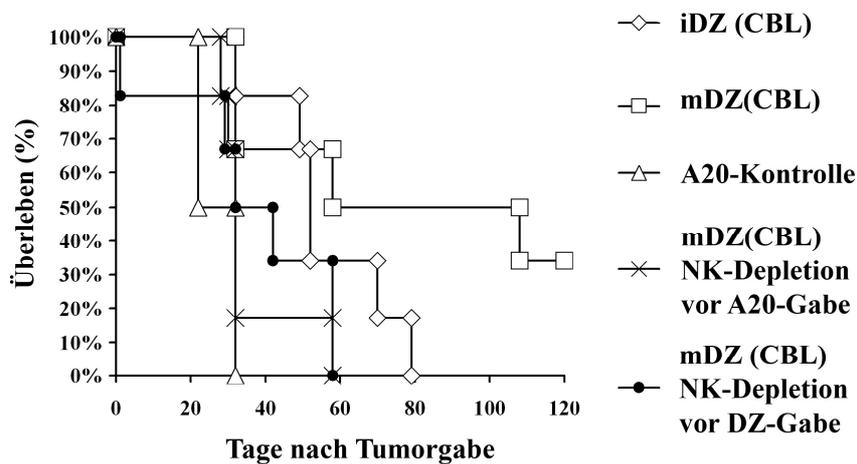


Abb. 14: Mature allogene DZ induzieren Schutz vor A20

BALB/c-Mäuse wurden am Tag -14 und -7 mit jeweils 5×10^5 maturaen oder immaturren allogenen CBL-DZ subkutan vakziniert. In einer Gruppe wurden die NK-Zellen vor Gabe der DZ depletiert, durch intraperitoneale Injektion eines Tm β 1-Antikörpers am Tag -18 (1 mg), Tag -11 (0,1 mg) und Tag -4 (0,1 mg); in einer anderen Gruppe wurden die NK-Zellen vor Verabreichung von A20 depletiert, durch intraperitoneale Injektion eines Tm β 1-Antikörpers am Tag -4 (1 mg), Tag 2 (0,1 mg) und Tag 12 (0,1 mg). Das A20-Lymphom wurde am Tag 0 durch intravenöse Injektion von 8×10^5 Zellen appliziert.

war eine direkte Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen ausgeschlossen, und NK-Zellen mussten direkt durch allogene DZ aktiviert worden sein. Dieses Ergebnis stand im Einklang mit weiterführenden Versuchen in unserer Arbeitsgruppe. (Adam *et al.*, 2005), bei denen sich zeigte, dass durch Impfung von Mäusen mit maturen CD40^{-/-}-DZ erfolgreich ein Schutz gegen das A20-Lymphom etabliert werden konnte. Wurden bei diesen Tieren CD4⁺-T-Zellen in der Induktionsphase depletiert, hatte dies keine Auswirkung auf die Tumorprotektion. Die Depletion von CD8⁺-T-Zellen jedoch führte zu einer Reduktion des Schutzes, während nach Depletion der NK-Zellen die Mäuse wiederum ähnlich schnell wie die Tumorkontrollgruppe starben. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass sowohl durch mature allogene DZ wie auch durch mature CD40^{-/-}-DZ NK-Zellen genügend stark aktivierende Signale erhielten, um erfolgreich eine effiziente Immunantwort zu initiieren, bei der auch tumorspezifische zytotoxische T-Zellen aktiviert wurden, ohne dass hierfür die Hilfe von CD4⁺-T-Zellen nötig gewesen wäre. Für einen optimalen Schutz gegen das A20-Lymphom waren jedoch neben den NK-Zellen auch bewaffnete zytotoxische T-Zellen notwendig.

2.3 NKG2D – ein NK-Zell-aktivierender Rezeptor

Es stellte sich jedoch die Frage, auf welchem Mechanismus der NK-Zell-abhängige Schutz vor dem A20-Lymphom beruhte, während das syngene MPC11 oder CT26 nicht abgestoßen wurden. Die Aktivität von NK-Zellen wird über eine Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Faktoren reguliert, die letztendlich über Abstoßung oder Toleranz eines Tumors durch NK-Zellen entscheiden. Ein wichtiger aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen, der zur Lyse von Zielzellen führen kann, ist NKG2D, dessen Liganden vor allem auf tumorös transformierten Zellen exprimiert werden (Westwood *et al.*, 2004). Um über die Rolle von NKG2D bei den verschiedenen Tumoren eine Aussage zu treffen, wurden in unserer Arbeitsgruppe Versuche angesetzt, in denen A20, MPC11 und CT26 mit einem für NKG2D-L-spezifischen Tetramer markiert wurden und die Expression der Liganden von NKG2D anschließend im FACS analysiert wurden.

Dabei zeigte sich die höchste Intensität von Liganden für den NKG2D-Rezeptor auf dem A20-Lymphom, während diese um bis zu 18fach schwächer auf MPC11 und CT26 exprimiert wurden (Adam *et al.*, 2005). Um die funktionelle Bedeutung dieses Ergebnisses für die Aktivierung von NK-Zellen einzuordnen, wurden aus mit DZ immunisierten Mäusen die Milzen entnommen und daraus die NK-Zellen mittels immunmagnetischer Zellsortierung isoliert. In einem *In-vitro*-Test wurde nun die Zytotoxizität dieser NK-Zellen gegenüber A20-Zellen analysiert, deren aktivierende Liganden für NKG2D durch ein Tetramer blockiert worden waren (*Abb. 15*). In der FACS-Analyse

zeigte sich, dass die Zugabe des Tetramers im Verhältnis 1:100 ausreichte, um alle auf der Oberfläche von A20 exprimierten Liganden vollständig abzusättigen. Im Zytotoxizitätstest wiesen NK-Zellen aus immunisierten Mäusen gegen das naive, nicht blockierte A20-Lymphom eine starke Zytotoxizität auf, während gegen MPC11 keinerlei Zytotoxizität festgestellt wurde. Wurden dagegen die Liganden für NKG2D auf A20 durch ein Tetramer blockiert, reduzierte sich die Zytotoxizität nahezu auf Hintergrundniveau. Bei NK-Zellen aus nicht geimpften Mäusen bestand keinerlei Reaktivität gegen das A20-Lymphom. Die Blockierung von Liganden für NKG2D auf DZ hatte keinen Einfluss auf die Generierung von Schutz gegen das A20-Lymphom. Somit konnte die Möglichkeit, dass NK-Zellen durch die verabreichten DZ über Interaktion zwischen NKG2D und seinen Liganden aktiviert wurden, ausgeschlossen werden (Daten hier nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Höhe der Expression von Liganden für NKG2D auf Tumorzellen entscheidend dafür ist, ob Tumorzellen von aktivierten NK-Zellen erkannt und abgestoßen werden oder nicht. Obwohl auf MPC11 und CT26 Liganden für NKG2D vorhanden sind, werden diese nicht genügend stark exprimiert, um NK-Zellen zu einer effizienten Lyse dieser Tumorzellen zu veranlassen.

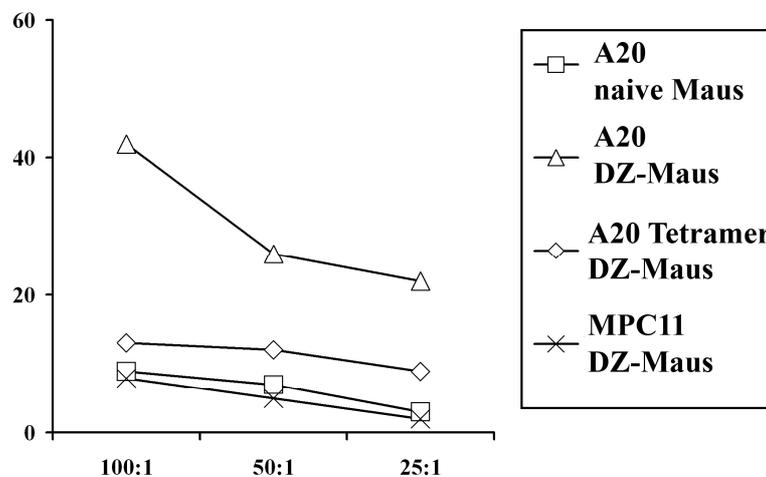


Abb. 15: NKG2D-Liganden auf A20 für effektive Lyse durch NK-Zellen entscheidend

BALB/c-Mäuse wurden mit 5×10^5 immaturren DZ am Tag -14 und Tag -7 subkutan geimpft, am Tag 0 erfolgte die Milzentnahme. Die NK-Zellen aus geimpften Mäusen wurden durch Magnetseparation isoliert und auf ihre zytolytische Aktivität gegen ein natives A20-Lymphom, ein mit einem Tetramer NKG2D blockiertem A20-Lymphom sowie gegen ein MPC11-Lymphom im ^{51}Cr -Freisetzungsversuch getestet. Als Kontrolle wurden NK-Zellen aus unbehandelten Mäusen isoliert und auf ihre zytolytische Aktivität gegen das naive A20-Lymphom untersucht.

D Diskussion

1. Die Rolle des Immunsystems in der Antitumor-Antwort

Das häufige Fehlen einer effektiven Immunantwort gegen einen Tumor beruht bei vielen Patienten auf der ineffizienten Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch Tumorzellen. Oftmals weisen neoplastische Zellen eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, wie auch eine gestörte Prozessierung von Antigenen auf (Marincola *et al.*, 1994; Restifo *et al.*, 1996). Zusätzlich fehlen oft kostimulatorische Moleküle auf Tumorzellen, die notwendig sind, um eine primäre Immunantwort zu induzieren (Townsend & Allison, 1993). Deshalb ist es eine der großen Herausforderungen der Immuntherapie, Strategien zu entwickeln, die diese Hemmnisse überwinden und eine effektive und zielgerichtete Antitumor-Antwort ermöglichen. DZ eignen sich hierfür besonders deswegen, weil sie die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen sind, mit einer einzigartigen Fähigkeit, Immunantworten zu initiieren. Ein Weg zur Initiierung einer Antitumorantwort ist die Fusion von DZ mit Tumorzellen zu Hybridzellen durch Polyethylenglykol (Hart & Colaco, 1997). Derartige Hybride sind von Vorteil, da sie theoretisch eine polyklonale Immunantwort von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen induzieren, die gegen eine Vielzahl von tumorassoziierten Antigenen gerichtet ist.

Wie neuere Studien bestätigen, ist für eine wirkungsvolle Immunantwort allerdings nicht nur die Induktion spezifischer T-Zellen entscheidend, vielmehr muss für eine optimale Immunstimulation das koordinierte Zusammenspiel verschiedener Zellarten, sowohl des adaptiven, wie auch des angeborenen Immunsystems, berücksichtigt werden. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei der Dialog zwischen DZ und NK-Zellen ein (Ferlazzo *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2002). Dabei birgt vor allem der erfolgreiche therapeutische Einsatz von NK-Zellen bei der Tumortherapie ein großes Potenzial. So konnte in mehreren Studien nach erfolgter NK-Zell-Aktivierung eine erfolgreiche Tumorabstoßung nachgewiesen werden (Cerwenka *et al.*, 2001; Hayakawa *et al.*, 2002).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, Hybridzellen aus DZ und Tumorzellen auf einen möglichen Einsatz als Vakzine gegen die chronische lymphatische Leukämie zu untersuchen. Untersucht wurde die Effizienz, mit der Hybridzellen generiert werden konnten, sowie ihre Fähigkeit, Effektorzellen des Immunsystems zu einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort zu stimulieren. Daneben wurde die Rolle der an der Immunantwort beteiligten Zellen, sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems genauer untersucht. Um insbesondere die Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen bei der Generierung einer Antitumor-Antwort zu analysieren, wurde auf einen dem humanem System analogen Ansatz im murinen System

zurückgegriffen, bei dem durch Vakzinierung mit DZ Immunität gegen ein murines B-Zell-Lymphom induziert wurde.

1.1 Das Potenzial von Hybridzellen

Bereits 1997 bewiesen Gong *et al.* (Gong *et al.*, 1997), dass sich durch fusionierte Hybridzellen aus DZ und Tumorzellen erfolgreich eine gegen einen Tumor gerichtete Immunantwort induzieren lässt. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass durch Zellfusion nicht nur bekannte Tumorantigene übertragen werden, sondern auch bisher noch nicht identifizierte Tumorantigene von DZ prozessiert und präsentiert werden können. Dadurch kann die schwierige Identifizierung und Klonierung von geeigneten Tumorantigenen umgangen werden. Durch Präsentation der Antigene sowie durch die Anwesenheit der notwendigen kostimulatorischen Moleküle auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen auf DZ, kann eine polyklonale T-Zell-Antwort induziert werden. Durch die polyklonale Antwort wird verhindert, dass sich Tumorzellen durch die verringerte Expression einzelner Antigene der Immunantwort entziehen. Dies reduziert die Wahrscheinlichkeit einer Tumor-Immunevasion, wie es bei der selektiven Übertragung nur einzelner tumorassoziierter Peptide auf DZ der Fall sein kann. Die Effizienz dieses Ansatzes wurde mehrfach bei unterschiedlichen Tumoren, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei murinen Modellen (Celluzzi & Falo, Jr., 1998; Gong *et al.*, 1998; Lespagnard *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2002) als auch im klinischen Einsatz bewiesen. So konnten Gong *et al.* die Wirksamkeit derartiger Hybride gegen ein humanes Mamma- und Ovarialkarzinom *in vitro* belegen (Gong *et al.*, 2000). Weitere Studien bestätigten die Wirksamkeit gegen die akute myeloische Leukämie (Gong *et al.*, 2004) sowie das maligne Melanom (Parkhurst *et al.*, 2003). Wie groß der Einfluss einzelner Parameter auf den Erfolg einer Therapie mit Hybridzellen ist, demonstrierten zwei klinische Studien von Kikuchi *et al.* an Glioblastom-Patienten. In einer ersten Studie 2001 wurde nach Vakzinierung mit Hybriden aus DZ und Glioblastomzellen alleine kein statistisch gesicherter Therapievorteil erreicht (Kikuchi *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie 2004 wurde zusätzlich zu den Hybridzellen das immunstimulatorische Zytokin IL-12 verabreicht, woraufhin vier von 15 Patienten eine Reduktion von über 50% der Tumormasse zeigten (Kikuchi *et al.*, 2004). Dies unterstrich, wie wichtig die sorgfältige Evaluierung einzelner Faktoren beim Einsatz von Hybridzellen ist, um die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs zu erhöhen.

1.2 Der Einsatz allogener DZ bei der Generierung von Hybridzellen

Zur Erzeugung von Hybridzellen aus Tumorzellen und DZ können sowohl autologe als auch allogene DZ verwendet werden. Autologe DZ haben den Vorteil, dass sie einen identischen MHC-Typ aufweisen und dadurch direkt mit den anderen Immunzellen interagieren können, um eine Immunantwort zu initiieren. Allerdings bereitet die Isolierung genügender Mengen autologer DZ aus meist ohnehin immunsupprimierten Patienten nicht unerhebliche Schwierigkeiten. Des Weiteren sind DZ von Tumorpatienten in ihrer Fähigkeit, andere Immunzellen zu aktivieren, oftmals eingeschränkt (Avigan, 2004; Scrivener *et al.*, 2001; Satthaporn *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2003). Durch Verwendung allogener DZ aus gesunden Spendern können diese Limitationen umgangen werden. Sie sind leicht zu isolieren und stehen in ausreichender Menge zur Verfügung. Auch ist ihre immunstimulatorische Kapazität verglichen mit autologen DZ aus Tumorpatienten nicht vermindert. Die direkte Interaktion zwischen Hybridzellen und autologen Immunzellen ist nicht eingeschränkt, da durch die Fusion auch Tumoranteile übertragen werden, die autologe MHC-Klasse-I-Moleküle sowie bei der B-CLL zusätzlich auch MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren. Aus diesen Gründen wurden für die Generierung von Hybridzellen in dieser Arbeit allogene DZ mit leukämischen Tumorzellen fusioniert. Ob die Verwendung autologer oder allogener DZ einen größeren therapeutischen Vorteil bringt, wurde unterschiedlich beurteilt. Gong *et al.* fanden bei der Fusion von allogenen DZ mit humanen Ovarialkarzinomzellen zwar eine erhöhte Proliferationsrate von T-Zellen, die durch Hybridzellen bewirkte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen war jedoch bei autologen, wie auch allogenen DZ gleich (Gong *et al.*, 2000b). Suzuki *et al.* wiesen nach, dass die Verwendung allogener DZ das induzierte Zytokinmuster vorteilhaft beeinflusste (Suzuki *et al.*, 2005). Wurden autologe DZ verwendet, fanden sich zu gleichen Teilen Th1-, wie auch Th2-Zytokine. Allogene DZ bewirkten hingegen eine höhere Produktion von Th1-Zytokinen, wie IFN- γ , während die sich eher inhibierend auf die Immunantwort auswirkenden Th2-Zytokine, wie IL-4 und IL-10, vermindert ausgeschüttet wurden. Dies führt zu einer Verstärkung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Siders *et al.* wiederum kamen zu dem Ergebnis, dass autologe und allogene DZ bei weniger aggressiven Tumoren eine gleichwertige Immunantwort hervorriefen, während allogene DZ bei aggressiveren Tumoren, wie dem B16-Melanom bei Mäusen, einen therapeutischen Vorteil brachten (Siders *et al.*, 2003). Sie begründeten dies damit, dass es durch die alloreaktive Komponente zu einer verstärkten CD4⁺-T-Zell-Aktivierung kam, die die Induktion einer zytolytischen T-Zell-Antwort stärker unterstützte. Hier in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass allogene DZ erfolgreich für die Generierung von Hybridzellen verwendet werden können, um eine gegen die chronische lymphatische Leukämie gerichtete Immunantwort

auszulösen. Die von ihnen im Stimulationsansatz induzierte Immunantwort besaß neben einem alloreaktiven Anteil eine tumorspezifische Komponente, die über die durch reine Alloreaktivität verursachte Stimulation hinausging. Auf Grund der begrenzten Menge an Zellen von CLL-Patienten gelang eine Isolierung autologer DZ in dieser Arbeit nicht. Auch wenn deshalb ein direkter Vergleich zwischen autologen und allogenen DZ nicht möglich war, erwiesen sich in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Siders *et al.* und Suzuki *et al.* allogene DZ als gut geeignet, um eine gegen die CLL gerichtete Immunantwort zu induzieren, bei der Th1-Zytokine, wie IFN- γ , ausgeschüttet wurden. Dass allogene DZ auch ein großes therapeutisches Potenzial für einen klinischen Einsatz aufweisen, wurde in mehreren klinischen Studien durch die erfolgreiche Vakzinierung mit Hybridzellen aus allogenen DZ bewiesen. So wurde beispielsweise bei an Melanom im Stadium III und IV erkrankten Patienten durch Vakzinierung mit Hybridzellen, bestehend aus allogenen DZ und Melanomzellen, eine Überlebenszeitverlängerung erreicht (Trefzer *et al.*, 2004). Einer dieser Patienten wies sogar eine komplette Remission auf, während ein weiterer eine partielle Remission erreichte.

1.3 Einfluss des Reifungszustands von DZ

Um eine wirkungsvolle Immunantwort zu erzeugen, sollte eine aus DZ generierte Vakzine die Möglichkeit haben, Tumorantigene zu prozessieren und zu präsentieren, einen stabilen Phänotyp auch nach *In-vivo*-Verabreichung aufweisen sowie die Fähigkeit besitzen zu migrieren, um mit T-Zellen in Kontakt treten zu können. Diese Fähigkeiten hängen entscheidend vom Reifungszustand der DZ ab. Immature DZ haben eine große phagozytische Kapazität, die sie sehr gut zur Antigenaufnahme befähigt. Da sie aber nur wenig an kostimulatorischen Molekülen, wie CD80 oder CD86, exprimieren, können sie nur in begrenztem Maße T-Zellen stimulieren (Steinman & Swanson, 1995). Sie sezernieren des Weiteren IL-10, ein Zytokin, das Toleranz induzieren kann und eine Th2-Polarisierung der Immunantwort fördert (de Smedt *et al.*, 1997). Nach Antigenaufnahme kommt es zur Reifung der DZ, wodurch infolge einer verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle und Ausschüttung immunstimulatorischer Zytokine sich ihre Fähigkeit erhöht, T-Zellen zu stimulieren, während sie schlechter neue Antigene prozessieren und präsentieren können (Zhou & Tedder, 1995; Kelsall *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 1996; Dieu *et al.*, 1998; Brunner *et al.*, 2000). Nach Maturation ändert sich ebenfalls das Muster der sezernierten Zytokine. Es werden vermehrt Th1-Zytokine, wie IL-12, ausgeschüttet, wodurch die Entstehung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort unterstützt wird (Macatonia *et al.*, 1995). Mature DZ exprimieren auch verstärkt den Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7), der für eine Migration in

abführenden Lymphwegen nötig ist, um zu Orten der T-Zell-Aktivierung zu gelangen (Scandella *et al.*, 2002). Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit sowohl immature als auch mature DZ zur Generierung von Hybridzellen verwendet, um ihre stimulatorischen Fähigkeiten zu untersuchen. Zunächst wurde ausgeschlossen, dass die Fusion mit Polyethylenglykol den Reifungszustand der DZ beeinflusste. Die nach Fusion durchgeführte FACS-Analyse bestätigte, dass fusionierte Zellen denselben Maturationsgrad aufwiesen wie unfusionierte Zellen. Dies entsprach den Ergebnissen von Vasir (Vasir *et al.*, 2005).

Wurden T-Zellen mit den Hybriden stimuliert, so erzielten Hybridzellen aus murenen DZ eine zwei- bis dreifach höhere IFN- γ -Ausschüttung als Hybridzellen mit immaturen DZ. Da sich offenbar durch die Maturation auch die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran der DZ änderten, ergab die Verwendung von murenen DZ, verglichen mit immaturen, bei der Zellfusion auch eine höhere Fusionsfrequenz. Daher könnte sowohl die erhöhte Fusionsrate als auch die verbesserte Präsentation von tumorassoziierten Antigenen zusammen mit kostimulatorischen Molekülen die Ursache für die beobachteten höheren Stimulationsindices sein. Da aber die Anreicherung von Fusionszellen durch Zellsortierung keine weitere Steigerung des Stimulationsindex erbrachte, war die erhöhte stimulatorische Kapazität von aus murenen DZ generierten Hybridzellen eher in den besseren kostimulatorischen Fähigkeiten begründet. Die Ergebnisse anderer Studien waren diesbezüglich heterogen. Liu *et al.* konnten in Übereinstimmung mit den hier gefundenen Resultaten in einem murinen Modell nachweisen, dass aus murenen DZ generierte Hybridzellen eine stärkere Anti-Tumor-Antwort hervorriefen als Hybride aus immaturen DZ (Liu *et al.*, 2002). Für Hybridzellen aus immaturen DZ konnten sie in Zytotoxizitätstest nur einen unzureichenden Schutz demonstrieren. Eine Arbeitsgruppe um Dhodapkar wies nach, dass immature DZ, die tumorassoziierte Antigene präsentieren, unter gewissen Voraussetzungen sogar Toleranz gegen diese induzieren können, anstatt eine zytotoxische Antwort zu bewirken (Dhodapkar *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu standen die Resultate von Phan *et al.*, die darlegten, dass die Fusion mit immaturen DZ zu einer besseren Prozessierung von Antigenen führte und dadurch Antigene effektiver präsentiert werden konnten (Phan *et al.*, 2003b). Nach Fusion mit dem Tumor kam es zu einer Reifung der DZ, was deren stimulatorische Kapazität erhöhte. Phan *et al.* modifizierten allerdings das Fusionsprotokoll und verwendeten ein anderes Fusionsagens, was die Diskrepanz mit den hier gefundenen Ergebnissen erklären könnte. Diese unterschiedlichen Resultate belegen, wie groß die Auswirkung des Reifungszustandes von DZ auf die induzierte Immunantwort sein kann. Deswegen muss bei der Vakzinierung mit Hybridzellen der Maturationsgrad sorgfältig bedacht werden. Hier in dieser Arbeit wurde nur die ausgeschüttete Zytokinmenge als Anhaltspunkt für die

Aktivierung von Immunzellen gemessen, es wurden keine Zytotoxizitätstests mit Hybridzellen durchgeführt oder eine etwaige Toleranzinduktion überprüft. Auch wenn sich bei den hier durchgeführten Versuchen mature DZ bei der Induktion einer Immunantwort als effizienter erwiesen, sind weitergehende Untersuchungen nötig, um den optimalen Maturationsgrad von DZ bei der Generierung von Hybridzellen zu bestimmen.

1.4. Die Wahl des richtigen Nachweissystems für Hybridzellen

Wie viele Studien belegen, kann die Häufigkeit, mit der Hybridzellen nach Zellfusion auftreten, variieren. Deshalb ist es wichtig, nach Durchführung jeder Fusion die Rate an Hybridzellen zu bestimmen, um Aussagen über die durch sie induzierte Immunantwort treffen zu können. Hier in dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt ein Nachweissystem am FACS-Gerät etabliert, das auf der Färbung der Hybridzellen mit monoklonalen Antikörpern beruhte. Der aus DZ stammende Teil von Hybridzellen wurde separat markiert, ebenso die aus den Tumorzellen kommenden Anteile, so dass sich fusionierte Hybridzellen als doppelt gefärbte Zellen im FACS darstellten. Dabei zeigte sich, dass bei Mixturen, die mit diesem Protokoll gefärbt wurden, ebenfalls doppelt positive Ereignisse gefunden wurden. Offenbar aggregierten DZ mit Tumorzellen in der Zeit, die zwischen Mischung der beiden Zellarten und Messung am FACS-Gerät verstrich, wodurch diese Zellaggregate nun als ein einzelnes doppelt-positives Ereignis am FACS-Gerät gemessen wurden. Infolgedessen konnte nach PEG-Fusion genauso wenig ausgeschlossen werden, dass nicht ein gewisser Prozentsatz der doppelt positiven Ereignisse in gleicher Weise durch Zellaggregationen verursacht wurde. Deswegen musste, um die tatsächliche Fusionsfrequenz zu verifizieren, ein anderes Nachweissystem gewählt werden, in dem sich Zellaggregationen und fusionierte Zellhybride exakt voneinander unterscheiden ließen. Als sehr gut dafür geeignet erwies sich der Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskop. Nach Etablierung einer entsprechenden Färbung mit monoklonalen Antikörpern konnten bei der Auswertung am Mikroskop Hybridzellen eindeutig von Zellaggregaten differenziert werden. Beim direkten Vergleich der am FACS-Gerät gemessenen Werte mit der Auszählung am Mikroskop stellte sich heraus, dass die Rate an Fusionsereignissen am FACS-Gerät als zu hoch eingeschätzt wurde. Die Zahl der tatsächlichen Fusionsereignisse war etwa um die Hälfte geringer als die am FACS erhaltenen Werte und lag bei durchschnittlich 2-3% Fusionsfrequenz. Bei den Zellmixturen wurden im Fluoreszenzmikroskop keine doppelt positiven Zellen festgestellt. Wurden die hier gefundenen Ergebnisse mit anderen Studien verglichen, so variierte die Zahl der gemessenen Fusionsfrequenz sehr stark. Gong *et al.* stellten am FACS-Gerät eine durchschnittliche Fusionsrate von 30% fest, wenn sie DZ und Zellen eines Ovarialkarzinoms

mittels PEG fusionierten. Das Vorhandensein von Hybridzellen wurde zwar am Mikroskop überprüft, allerdings ohne die Zahl von Fusionsereignissen zu bestimmen (Gong *et al.*, 2000b). In einer anderen Studie erbrachte die Fusion von DZ mit Melanomzellen durch PEG eine Fusionsrate zwischen 0,5% und 4,5%, (Jantscheff *et al.*, 2002). Hier wurde die Zahl der Fusionsereignisse sowohl am FACS-Gerät als auch durch Auszählen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Diese stark variierenden Ergebnisse können theoretisch auf Unterschieden in der Durchführung des Fusionsprotokolls beruhen oder auch durch heterogene physikalische Eigenschaften der Zellmembran der einzelnen Tumorarten bedingt sein, die die Fusionsfrequenz beeinflussen. Dennoch lässt sich auch im Hinblick auf die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sagen, dass für eine valide Aussage über die tatsächliche Rate an Hybridzellen geeignete Nachweissysteme wie das Fluoreszenzmikroskop verwendet werden müssen. Die im FACS-Gerät gemessenen Werte sind alleine nicht aussagekräftig, da Zellaggregate, Ungenauigkeiten beim Anfärben der Zellen oder von DZ durch Phagozytose aufgenommene Zellreste das Ergebnis verfälschen können. Da aber der Nachweis von Hybridzellen am Fluoreszenzmikroskop sehr arbeits- und zeitintensiv ist, muss bei jeder Fragestellung genau abgewogen werden, welche Nachweismethode gewählt wird. So erwies sich der Nachweis von Hybridzellen am FACS-Gerät für viele Untersuchungen in dieser Arbeit als ausreichend gut geeignet, wenn nicht nach der exakten Rate an Hybridzellen gesucht wurde, sondern nur der Nachweis der Existenz von Hybridzellen geführt werden sollte.

1.5 Die Abhängigkeit des Stimulationserfolgs von der Fusionsrate

Nachdem eine Methode gefunden war, die eine zuverlässige Aussage über die Anzahl an erzeugten Hybridzellen ermöglichte, wurde untersucht, inwieweit die Fusionsfrequenz die Immunantwort beeinflusste. Vergleich man die bei jeder Fusion bestimmte Rate an Hybridzellen mit dem im Stimulationsansatz erzielten Stimulationsindex, so konnte keine direkte Korrelation zwischen der Fusionsfrequenz und dem Erfolg der Immunantwort etabliert werden. Dieses anfangs unerwartete Resultat überraschte weniger, wenn man es mit der Immunsituation von Patienten verglich, die an chronischer lymphatischer Leukämie leiden. Das Immunsystem dieser Patienten ist aus mehreren Gründen häufig immunkompromittiert. So ist durch die hohe Zahl leukämischer Tumorzellen die Zahl der immunkompetenten Abwehrzellen im peripheren Blut, bezogen auf die Gesamtzahl, gering. Des Weiteren werden von den leukämischen B-Zellen immunsuppressive Faktoren sezerniert, die auch die autologen DZ in ihrer immunstimulatorischen Kapazität einschränken (Goddard *et al.*, 2003). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Dysregulation des T-Zell-Repertoires kommt, die die Induktion effizienter Immunantworten beeinträchtigt (Scrivener *et*

al., 2001). Dies ließ es plausibel erscheinen, dass die im Stimulationsansatz vorhandenen Immunzellen bereits mit einer geringen Anzahl an fusionierten Hybridzellen maximal stimuliert wurden. Dieses Resultat bestätigte sich, als im Zellsortierer angereicherte Hybridzellen in den Stimulationsansatz gegeben wurden und keine weitere Steigerung des Stimulationsindex erzielt werden konnte.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass es für eine spätere klinische Anwendung derartiger Hybridzellen wichtig sein wird, nicht nur optimale *In-vitro*-Bedingungen für die Generierung von Hybridzellen zu schaffen, sondern darüber hinaus die Immunsituation dieser Patienten zu verbessern, damit die Hybridzellen therapeutisch auch die Möglichkeit haben, effizient wirken zu können.

1.6 Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort durch die Zellmixture

Wie in mehreren Studien nachgewiesen wurde (Guo *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1997; Celluzzi & Falo, Jr., 1998), kann bereits durch Kokultur von DZ mit Tumorzellen eine tumorspezifische Immunantwort generiert werden, ohne dass die Zellen einer Fusion unterworfen werden. Dies ließ sich auch in der hier durchgeführten Arbeit belegen. Wurden im Stimulationsansatz Mixturen aus DZ und leukämischen B-Zellen eingesetzt, die keiner Fusion unterzogen wurden, sondern nur eine bestimmte Zeit in Kokultur gewesen waren, so bewirkte dies eine IFN- γ -Ausschüttung, die über der Kontrolle mit allogenen DZ alleine lag. Das ließ den Schluss zu, dass eine über die allogene Komponente hinausgehende, tumorspezifische Immunantwort induziert worden sein musste. Theoretisch waren für die Entstehung der tumorspezifischen Immunantwort verschiedene Mechanismen denkbar. In der Arbeit von Celluzzi *et al.*, in der nachgewiesen werden konnte, dass DZ und Tumorzellen, die voneinander durch eine semipermeable Membran getrennt waren, nicht dazu im Stande waren, eine tumorspezifische Immunität zu generieren, konnte eine physikalische Interaktion zwischen den DZ und Tumorzellen für die Generierung der Immunantwort verantwortlich gemacht werden (Celluzzi & Falo, Jr., 1998). Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargelegt, konnte durch Fixierung von DZ mittels Paraformaldehyd gezeigt werden, dass DZ aus Tumorzellen stammende exogene Peptide aufnahmen und prozessierten. Diese Peptide enthielten tumorassoziierte Antigene, die von den DZ nach Prozessierung gegenüber T-Zellen präsentiert wurden und die tumorspezifische Immunantwort bewirkten.

Über die stimulatorische Potenz einer auf diese Weise generierten Immunantwort wird in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert. Gong *et al.* verglichen Fusionen und Mixturen aus DZ und Tumorzellen eines humanen Mammakarzinoms hinsichtlich ihrer Fähigkeiten, eine gegen den

Tumor gerichtete Antwort zu initiieren (Gong *et al.*, 2000a). Auch wenn DZ und Tumorzellen für eine bestimmte Zeit als Zellmischung in Kokultur waren, konnten im Stimulationsansatz dadurch keine zytotoxischen T-Zellen gegen den Tumor generiert werden, während fusionierte Hybridzellen dagegen zu einem hohen Prozentsatz zytotoxische T-Zellen induzierten. Diese von Gong *et al.* beschriebene Unfähigkeit von DZ-Tumor-Mixturen, eine tumorspezifische Immunantwort zu generieren, könnte in den verschiedenen Tumormodellen ihre Ursache haben und auf Unterschiede zwischen soliden Tumoren wie dem Mammakarzinom und der B-CLL zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse von Kokhaei *et al.*, der in Übereinstimmung mit dieser Arbeit für die CLL zeigte, dass DZ, die zusammen mit leukämischen B-Zellen in Kokultur gegeben wurden, durch Phagozytose apoptotische Zellen und Zellfragmente aufnahmen und diese nach Prozessierung T-Zellen präsentierten, wodurch eine zytotoxische T-Zell-Antwort bewirkt wurde, die teilweise sogar stärker war als die von Hybridzellen hervorgerufene Antwort (Kokhaei *et al.*, 2003). Im Unterschied zu den hier gefundenen Ergebnissen war jedoch die in einem ELISPOT gemessene IFN- γ -Ausschüttung uneinheitlich: sowohl fusionierte Hybridzellen, wie auch unfusionierte Mixturen induzierten eine hohe IFN- γ -Produktion, die aber teils bei Fusionen, teils bei Zellmixturen höher war. Darüber hinausgehend wurde in einem T-Zell-Proliferationstest durch DZ, die Tumorfragmente phagozytiert hatten, sogar eine höhere Proliferationsrate bewirkt als durch fusionierte Hybridzellen. Die von Kokhaei *et al.* dargelegte höhere stimulatorische Kapazität von Zellmixturen im Vergleich zu fusionierten Hybridzellen könnte im unterschiedlichen Versuchsaufbau begründet sein. Kokhaei *et al.* setzten für ihre Versuche autologe DZ ein, während hier allogene DZ für Zellmixturen und Zellfusion verwendet wurden. Auch überprüften Kokhaei *et al.* die immunstimulatorische Potenz nur an autologen T-Zellen im ELISPOT, während hier das ganze periphere Blut stimuliert wurde, das weitere zur Generierung einer Immunantwort wichtige Zellarten wie NK-Zellen und autologe DZ enthielt. Insgesamt gesehen, lässt sich aus den hier gefundenen Ergebnissen der Schluss ziehen, dass man durch Kokultur von DZ und CLL-Zellen eine tumorspezifische Antwort generieren kann. Bei Verwendung allogener DZ und Stimulation des gesamten peripheren Blutes war jedoch die durch fusionierte Hybridzellen erzeugte Immunantwort der unfusionierten Zellmischung überlegen.

1.7 Ausblick

Die Fusion von DZ mit Tumorzellen zu Hybridzellen ist eine vielversprechende neue Methode, die auch für einen therapeutischen Einsatz bei der chronischen lymphatischen Leukämie geeignet ist. In Tiermodellen führte die Vakzinierung mit derartigen Hybridzellen zur Regression bereits etablierter

Tumoren und zur Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort (Gong *et al.*, 1997). Erste klinische Studien zeigten die Wirksamkeit dieses Ansatzes bei anderen Tumoren wie dem metastasierenden Mamma- und Nierenkarzinom, bei denen eine immunologische Antwort und Tumorregression erreicht werden konnte (Avigan *et al.*, 2004). Eine optimale Methode, dieses therapeutische Potenzial auszunützen, ist jedoch noch nicht gefunden. Die hier gefundenen Daten geben Hinweise darauf, dass allogene DZ in einem murenen Reifungszustand dazu geeignet sind, nach Fusion zu Hybridzellen eine gegen die chronische lymphatische Leukämie gerichtete Immunantwort zu initiieren. Um eine valide Einschätzung für einen erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Hybridzellen zu erhalten, müssen jedoch noch eine Reihe von Parametern genauer abgeklärt werden. Die Vorteile und Nachteile der Verwendung autologer oder allogener DZ müssen in weiteren Untersuchungen genau gegeneinander abgewogen werden, der für eine Vakzinierung optimale Maturationsgrad DZ sollte weiter evaluiert werden. Um effektive Therapieansätze zur Behandlung der CLL zu entwickeln, sollten auch andere Behandlungsstrategien nicht aus den Augen verloren werden. Der Ansatz von Kokhaei (Kokhaei *et al.*, 2003), der besagt, dass DZ nach Phagozytose von Tumormaterial effektiv eine T-Zell-Antwort induzieren können, verdient Beachtung und sollte auf sein Potenzial für einen klinischen Einsatz überprüft werden.

2. Angeborenes und erworbenes Immunsystem sind für die effiziente Immunantwort wichtig

Eine wichtige, noch nicht vollständig beantwortete Frage ist, wie das Potenzial des Immunsystems therapeutisch für die Generierung einer gegen einen Tumor gerichtete Immunantwort optimal eingesetzt werden kann. Die meisten Strategien für die Vakzinierung gegen Tumoren zielen auf die Induktion einer tumorspezifischen CD8⁺-T-Zell-Antwort ab. Durch die Präsentation von tumorassoziierten Antigenen auf DZ, zusammen mit der nötigen Kostimulation, können tumorspezifische zytotoxische T-Zellen aktiviert werden. Dennoch zeichnet sich immer stärker ab, dass für eine effiziente Immunantwort *in vivo* das Zusammenspiel der unterschiedlichen Zellarten, sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems von entscheidender Wichtigkeit ist. Auf der Seite des adaptiven Immunsystems spielen hierfür neben den CD8⁺-T-Zellen die CD4⁺-T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Generierung einer Antitumorantwort. CD4⁺-Helfer-Zellen können über die Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ eine Th1-Polarisierung der Immunantwort bewirken und dadurch sogar unabhängig von CD8⁺-T-Zellen Schutz vor Tumoren induzieren (Egeter *et al.*, 2000). Sie fördern die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, können über eine erhöhte MHC-Klasse-I-Expression auf Tumorzellen bewirken, dass diese für die Lyse durch Effektorzellen empfindlicher werden (Mumberg *et al.*, 1999; Kaplan *et al.*, 1998), und sie leisten einen zentralen

Beitrag für die Persistenz einer induzierten Immunantwort (Shedlock & Shen, 2003; Kalams & Walker, 1998; Janssen *et al.*, 2003).

Neuere Ergebnisse belegen darüber hinaus, wie wichtig der Beitrag des angeborenen Immunsystems für eine wirkungsvolle Antitumorantwort ist. Dabei spielt insbesondere der Dialog zwischen NK-Zellen und DZ eine entscheidende Rolle. In einer grundlegenden Arbeit konnten Fernandez *et al.* zeigen, dass DZ über direkte Zell-Zell-Interaktion ruhende NK-Zellen gegen MHC-Klasse-I-positive und -negative Tumorzellen aktivieren und zur IFN- γ -Produktion anregen können (Fernandez *et al.*, 1999). Dies führt zur Lyse von tumorösen Zellen und zur Freisetzung von Tumorfragmenten, welche anschließend von DZ aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden können. Darüber hinaus können autologe NK-Zellen, durch ihre Fähigkeit, unreife DZ zu eliminieren, regulierend in die Immunantwort eingreifen (Ferlazzo *et al.*, 2002). Durch dies wird wirkungsvoll die Homöostase der DZ beeinflusst, die über Toleranz oder Abstoßung von Zellen entscheidet. Weitere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass für eine optimale Aktivierung von DZ NK-Zellen von essenzieller Bedeutung sind. So kann der Dialog von NK-Zellen mit DZ die Zytokinproduktion DZ erhöhen (Piccioli *et al.*, 2002; Spaggiari *et al.*, 2001), und aktivierte NK-Zellen können direkt oder synergetisch mit mikrobiellen Stimuli den Reifungsprozess von DZ verstärken (Terme *et al.*, 2004).

Diese Ergebnisse führen vor Augen, dass für die Induktion einer effektiven, gegen einen Tumor gerichteten Immunantwort nicht nur tumorspezifische zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten aktiviert werden sollten, sondern auch die Möglichkeiten des angeborenen Immunsystems bei therapeutischen Strategien berücksichtigt werden müssen. Deswegen wurde in der hier durchgeführten Arbeit untersucht, inwieweit durch die Vakzinierung mit DZ das angeborene Immunsystem aktiviert wird und wie groß sein Beitrag bei der hervorgerufenen Immunantwort ist.

2.1 Die Bedeutung von NK-Zellen für die Protektion gegen das A20-Lymphom

Um Aussagen über die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der Tumorantwort zu treffen und den Einfluss der Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen zu untersuchen, wurde versucht NK-Zellen aus dem peripheren Blut von CLL-Patienten zu isolieren. Da aber daraus nicht genügend Zellen für Untersuchungen gewonnen werden konnten, musste auf die NK-Zellen von gesunden Spendern zurückgegriffen werden. Wurden diese NK-Zellen gesunder Spender in Kokultur mit humanen DZ gegeben, so konnten NK-Zellen aktiviert und zur IFN- γ -Produktion angeregt werden. Weitergehende Aussagen über den Dialog zwischen DZ und NK-Zellen im

humanen System waren jedoch, auf Grund des nur begrenzt zu Verfügung stehenden Materials und der Beschränkung auf *In-vitro*-Versuche, schlecht zu treffen. Um diese Restriktion zu umgehen und um die Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen genauer an einem Tumormodell untersuchen zu können, wurde auf das bereits im Labor etablierte murine A20-Lymphom zurückgegriffen. Dort bewirkte die subkutane Vakzinierung mit syngenem DZ bei Mäusen eine protektive Immunantwort gegenüber dem A20-Lymphom. Für die primäre Abstoßung waren, wie durch Depletionsversuche nachgewiesen wurde, NK-Zellen unerlässlich. Jedoch war für eine umfassende Tumorprotektion auch die Hilfe von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen nötig. Wurden NK-Zellen während der Induktionsphase depletiert, so konnte keine primäre Abstoßung des Tumors erreicht werden und es wurde kein immunologisches T-Zell-Gedächtnis induziert. Die CTL-Aktivierung wurde offenbar durch eine Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen erreicht. Damit dieser wechselseitige Dialog zwischen NK-Zellen und DZ zustande kommt, waren, wie mehrere Studien belegen, die Zytokine IFN- γ , IL-12 sowie die Möglichkeit zum direkten Zellkontakt unabdingbar (Fernandez *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001; Gerosa *et al.*, 2002). Die Bildung zytotoxischer T-Zellen beruhte in der hier durchgeführten Arbeit auf dem von Mocikat *et al.* (2003) beschriebenen Mechanismus, der eine Aktivierung von NK-Zellen als Ausgangspunkt hatte. Dort wurde ein Mechanismus beschrieben, durch den angeborenes und adaptives Immunsystem miteinander verbunden sind und der zur Induktion tumorspezifischer, zytotoxischer T-Zellen führt. Die Verabreichung von MHC-Klasse-I-supprimierten Tumorzellen initiierte eine Kaskade, bei der NK-Zellen durch die Tumorzellen aktiviert wurden (Lanier, 1998; Long, 1999; Ravetch & Lanier, 2000) und daraufhin IFN- γ sezernierten. Infolgedessen wurden endogene DZ durch die aktivierten NK-Zellen zur Synthese von IL-12 angeregt, wodurch zytotoxische T-Zellen gebildet und ein immunologisches Langzeitgedächtnis induziert wurde. Im Vergleich dazu wurde hier in dieser Arbeit die NK-Zell-Aktivierung nicht durch MHC-Klasse-I-supprimierte Tumoren, sondern durch die Vakzinierung mit exogenen DZ erreicht, wodurch die oben beschriebene Kaskade zur Induktion von zytotoxischen T-Zellen ausgelöst wurde.

Inwieweit die alleinige Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen für die Bildung zytotoxischer T-Zellen ausreichte oder ob darüber hinaus auch weitere Immunzellen, wie die T-Helferzellen, beteiligt waren, war Gegenstand weitergehender Untersuchungen.

2.2 Die Generierung zytotoxischer T-Zellen ohne CD4⁺-Hilfe

Welche Rolle CD4⁺-T-Zellen in der durch NK-Zellen vermittelten Induktion von CTL spielen, wird

in verschiedenen Untersuchungen kontrovers diskutiert. Geldhof *et al.* zeigten, dass eine über NK-Zellen bewirkte und von $CD8^+$ -T-Zellen abhängige Tumorabstoßung nach einer Th1-Polarisierung von APC erfolgte. Jedoch blieb in dieser Studie der Einfluss von $CD4^+$ -T-Zellen im Unklaren (Geldhof *et al.*, 2002). Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass Typ1-DZ alleine durch Interaktion mit NK-Zellen zu einer Th1-Polarisierung und CTL-Induktion beitragen (Mailliard *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu beschrieben Westwood *et al.*, dass die NK-Zell-vermittelte Tumorabstoßung und die Induktion einer spezifischen CTL-Antwort, unabhängig von einer Th1-Polarisierung, auf die Hilfe von $CD4^+$ -T-Zellen angewiesen war (Westwood *et al.*, 2004). Damit in dieser Arbeit überprüft werden konnte, inwieweit $CD4^+$ -T-Zellen für die Generierung von CTL über die DZ-NK-Zellachse nötig waren oder ob deren Hilfe für die Initiierung dieser Kaskade entbehrlich war, waren weitere Versuche notwendig. Hierzu wurden für die Vakzinierung, anstelle von autologen, allogene DZ verwendet, die auf Grund unterschiedlicher MHC-Moleküle nicht direkt mit endogenen $CD4^+$ -T-Zellen interagieren konnten. Wurden allogene DZ verwendet, konnte ebenfalls ein Schutz vor dem A20-Lymphom bewirkt werden, ohne dass die Hilfe endogener T-Helferzellen nötig gewesen wäre. Voraussetzung hierfür war jedoch, dass die allogenen DZ in einem muren Reifungszustand vorlagen. Immature allogene DZ waren dazu nicht im Stande. Durch weiterführende Experimente in der Arbeitsgruppe (Adam *et al.*, 2005), bei denen *in vivo* bestimmte Zytokine blockiert wurden, konnte gezeigt werden, dass neben dem klassischen Weg

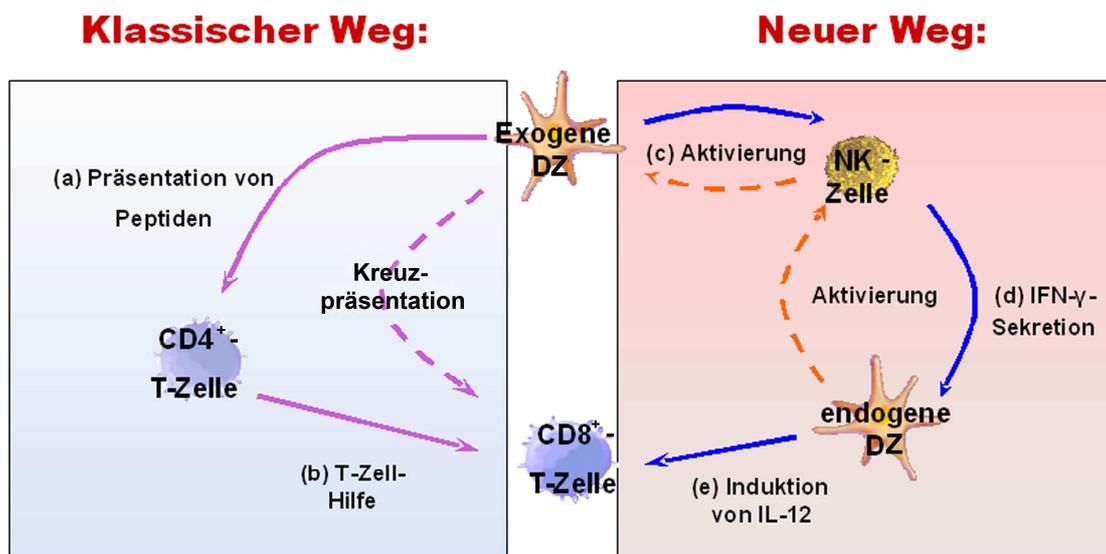


Abb. 16: Mechanismus der Aktivierung von $CD8^+$ -T-Zellen ohne $CD4^+$ -T-Zell-Hilfe

über die Präsentation von Peptiden (Abb. 16a) und unter Zuhilfenahme von $CD4^+$ -T-Zellen (Abb. 16b), ein weiterer Weg für die Induktion von CTL existiert (Adam *et al.*, 2005): durch die Vakzinierung mit exogenen DZ wurden direkt endogene NK-Zellen aktiviert (Abb. 16c), die

daraufhin IFN- γ sezernierten (*Abb. 16d*). Infolgedessen wurden endogene DZ zur IL-12-Synthese (*Abb. 16e*) stimuliert. Die Ausschüttung von IL-12 wiederum förderte die Induktion tumorspezifischer CD8⁺-T-Zellen (*Abb. 16*). Dies belegte, dass die CD4⁺-T-Zell-Hilfe nicht nötig war und für die Induktion einer effizienten Antitumor-CTL-Antwort die alternative DZ-NK-Zell-Achse ausreichte.

2.3 NKG2D – ein Schlüssel zur NK-Zell-Aktivierung

Durch die Vakzinierung von Mäusen mit syngenem DZ erfolgte eine Aktivierung von NK-Zellen, wodurch das A20-Lymphom abgestoßen werden konnte. Gegenüber dem B-Zell-Lymphom MPC11 und dem Kolonkarzinom CT26 bestand keine Immunität. NK-Zellen sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, deren Aktivität über eine genau ausgewogene Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert wird. Um die Gründe für das unterschiedliche Abstoßungsverhalten zu finden, wurden die verschiedenen Tumoren auf die unterschiedliche Expression derartiger Rezeptoren untersucht. MHC-Klasse-I-Moleküle beeinflussen den Aktivierungszustand von NK-Zellen: ihre Expression wirkt inhibierend, sie verringert die lytische Aktivität und Zytokinproduktion (Biassoni *et al.*, 2001; Lanier, 2000), während der Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen eine Aktivierung der NK-Zellen bewirkt (Moretta *et al.*, 1996; Mocikat *et al.*, 2003). Da aber auf allen Tumorarten MHC-Klasse-I-Moleküle gleichmäßig stark exprimiert wurden, konnte dies nicht die unterschiedliche Tumorprotektion erklären. Zu den NK-Zell-aktivierenden Rezeptoren gehört NKG2D, ein aktivierender Rezeptor aus der Familie der Lectin-ähnlichen Rezeptoren (Raulet, 2003). In der FACS-Auswertung zeigte sich, dass NKG2D-Liganden auf A20 bis zu 18fach höher exprimiert waren als auf MPC11 und CT26, wodurch offensichtlich NK-Zellen aktiviert wurden und das A20-Lymphom abstoßen konnten. Dies lässt den Schluss zu, dass erst eine gewisse Schwelle bei der Expression von NKG2D-Liganden überschritten werden muss, damit NK-Zellen in einem für die Protektion ausreichenden Maße aktiviert werden. Diese Schwelle wurde offenbar auf MPC11 und CT26 nicht erreicht, so dass kein effektiver Tumorschutz induziert wurde. Um die Rolle von NKG2D genauer zu ergründen, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt, in denen die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber einem unbehandelten A20-Lymphom untersucht wurde. Als Vergleich dienten ein A20-Lymphom, dessen NKG2D-Liganden durch ein Tetramer blockiert worden waren, sowie ein unbehandeltes MPC11-Lymphom. NK-Zellen erzielten eine hohe Zytotoxizität gegenüber dem unbehandelten A20-Lymphom, während NK-Zellen bei dem mit dem NKG2D-Tetramer blockierten A20-Lymphom eine dem MPC11 vergleichbare Zytotoxizität aufwiesen, die dem Hintergrundniveau entsprach. Die Aktivierung von

NK-Zellen nach der Vakzinierung durch eventuell auf DZ vorhandene NKG2D-Liganden konnte ausgeschlossen werden, da die Blockade dieser Liganden auf den DZ mit dem Tetramer keine Auswirkung auf die Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* hatte. Welcher der im murinen System exprimierten Liganden H60, RAE1 und MULT1 für NKG2D (Diefenbach *et al.*, 2000; Cerwenka *et al.*, 2000; Carayannopoulos *et al.*, 2002) hier an der Aktivierung der NK-Zellen beteiligt war, ist aktuell Gegenstand weiterer Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Mocikat.

Wie weitere Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigten, wurde nach der primären Abstoßung des A20-Tumors durch NK-Zellen auch ein spezifisches T-Zell-Gedächtnis angelegt (Adam *et al.*, 2005). Die Depletion von T-Zellen nach 150 Tagen führte zu einem Verlust des Schutzes, während die Depletion von NK-Zellen keine Auswirkung hatte. Dies zeigte, dass NK-Zellen nur für die primäre Abstoßung des Tumors essenziell waren, jedoch keine Funktion für die Protektion nach Induktion des Langzeitgedächtnisses hatten. Nach Etablierung eines T-Zell-Gedächtnisses waren spezifische zytotoxische T-Zellen, unabhängig von NK-Zellen, für die Immunität gegenüber dem A20-Lymphom verantwortlich. Es war vorstellbar, dass während der primären Abstoßungsphase infolge der Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen tumorassoziierte Antigene freigesetzt wurden und dadurch zur Etablierung des T-Zell-Gedächtnisses beitrugen. Jedoch wurde auch ein T-Zell-Gedächtnis induziert, wenn Mäuse nur mit DZ vakziniert wurden, ohne eine darauffolgende Tumorgabe zu erhalten. Um die Bedeutung der DZ für die Induktion der Immunität genauer zu evaluieren, wurden T-Zellen aus den Milzen von nur mit DZ behandelten Tieren isoliert und auf ihre Spezifität hin untersucht. Aus diesen T-Zellen konnten spezifische T-Zell-Linien generiert werden, die eine Zytotoxizität, sowohl gegenüber dem A20-Lymphom, als auch gegen DZ aufwiesen, nicht jedoch gegen MPC11 oder CT26 (Adam *et al.*, 2005). Vergleichbare T-Zell-Linien konnten aus den Milzen unbehandelter Mäuse nicht gewonnen werden. Dies ließ den Schluss zu, dass *in vitro* mit GM-CSF generierte DZ gemeinsame Antigene mit dem A20-Lymphom besaßen, welche zur Induktion spezifischer T-Zellen beitrugen. Sie waren jedoch nicht B-Zell-spezifisch, da keine Immunität gegenüber dem B-Zell-Lymphom MPC11 hervorgerufen wurde (Adam *et al.*, 2005). Theoretisch sollten derartige, auf den DZ vorhandene, gemeinsame Antigene während der Induktionsphase über ihre Präsentation auf MHC-Molekülen ausreichend CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen stimulieren, um eine Protektion gegen A20 zu erzielen. Dieser klassische Weg für die Induktion von T-Zellen war jedoch alleine nicht ausreichend, da, sobald NK-Zellen während der Induktionsphase depletiert wurden, auch kein spezifisches T-Zell-Gedächtnis initiiert wurde. Dies deutete darauf hin, dass diese gemeinsamen Antigene offensichtlich nur schwach immunogen waren (Adam *et al.*, 2005). Dennoch konnte eine potente CTL-Antwort erreicht und ein spezifisches T-Zell-Gedächtnis etabliert werden, wenn NK-Zellen ausreichend durch den aktivierenden Rezeptor

NKG2D stimuliert wurden und infolgedessen eine weitere Aktivierung von Immunzellen über die DZ-NK-Zell-Achse erfolgte.

2.4 Ausblick

Wie hier in dieser Arbeit am murinen B-Zell-Lymphom A20 dargelegt, sind für eine therapeutisch wirksame Immunantwort, neben der Induktion einer CTL-Antwort gegen einen Tumor, auch die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen, von größter Wichtigkeit. Dabei spielt die wechselseitige Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen, sowohl im murinen, wie auch im humanen System, eine zentrale Rolle. Das Wissen darüber, wie daraus in therapeutischer Hinsicht Nutzen gezogen werden kann, ist noch begrenzt. Erste Untersuchungen hierzu weisen auf den therapeutischen Nutzen bei verschiedenen Tumorarten hin (Kalinski *et al.*, 2005; Ramnath *et al.*, 2006; Roda *et al.*, 2006). Die im humanen Teil dieser Arbeit nachgewiesene Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen, verbunden mit den Erkenntnissen über die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen über die DZ-NK-Zell-Achse aus dem murinen Teil, weisen auf die Möglichkeiten dieses Ansatzes auch bei der Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie hin. Damit allerdings dieses Potenzial sinnvoll genutzt werden kann, sind weitere Untersuchungen notwendig. Ein zentraler Punkt für eine therapeutische Anwendung wäre es, die stimulatorische Kapazität von Hybridzellen bei der Aktivierung von NK-Zellen *in vitro* zu untersuchen. Dies wäre ein wichtiger Schritt, um weitere Aussagen über die Möglichkeiten des angeborenen Immunsystems bei der Therapie mit Hybridzellen zu treffen.

E Zusammenfassung

Trotz eines breiten Spektrums an konventionellen Therapieoptionen stößt die Behandlung von Krebserkrankungen in der modernen Medizin oftmals an ihre Grenzen. Eine Möglichkeit, diese Limitationen zu überwinden, bietet der Einsatz innovativer therapeutischer Ansätze, wie etwa der Immuntherapie. Vielversprechendes Potenzial auf diesem Gebiet bieten Dendritische Zellen (DZ), welche auf Grund ihrer zentralen Rolle als „Wächter des Immunsystems“ eine Schlüsselstellung in der Modulation der Immunantwort einnehmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob durch Vakzinierung mit dendritischen Zellen Immunantworten gegen Zellen der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-CLL) erzeugt werden können. Ein Teil der Arbeit bestand darin, Tumorzellen mit humanen DZ zu fusionieren und das immuntherapeutische Potential dieser Strategie *in vitro* zu evaluieren. Darüber hinaus wurde anhand eines murinen B-Zell-Lymphoms *in vivo* und *in vitro* untersucht, welche weiteren Immunzellen durch die Vakzinierung mit DZ aktiviert werden und wie das Zusammenspiel dieser Zellen mit den DZ zu einer effizienten Antitumorantwort beiträgt.

In einem ersten Schritt wurden B-CLL-Zellen mit allogenen humanen DZ fusioniert. Um Aussagen über die Effizienz der Fusion zu treffen, musste zunächst ein valides Nachweissystem etabliert werden. Dazu wurden verschiedene Färbeprotokolle evaluiert. Eine Möglichkeit war die Markierung von Zellen vor der Fusion mittels „Cell-Tracker“ und der Nachweis von Fusionsereignissen im Fluoreszenzmikroskop. Als aussagekräftiger erwies sich jedoch die Färbung der leukämischen Anteile der fusionierten Zellen mit PE-konjugierten anti-CD5- und anti-CD19-Antikörpern, während die dendritischen Anteile der Hybridzellen mittels einer für CD11c spezifischen FITC-Färbung detektiert wurden. Die Etablierung eines Färbeprotokolls mit spezifischen Antikörpern ermöglichte sowohl die Detektion von Hybridzellen am FACS-Gerät als auch, nach Fixierung der Zellen auf Objektträgern, die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei erwies sich der Nachweis von Hybridzellen im Fluoreszenzmikroskop als sehr gut geeignet, um zwischen unspezifischen Zellaggregaten und realen Fusionsereignissen zu unterscheiden.

Nach Etablierung eines validen Nachweissystems für Hybridzellen war es möglich, den Einfluss verschiedener Variablen auf die Effizienz einer Fusion zu untersuchen. Als eine Einflussgröße erwies sich der Maturationsgrad der DZ zum Zeitpunkt der Fusion. So konnten durch Verwendung von muren DZ, verglichen mit immaturren DZ, höhere Fusionsraten erzielt werden. Ebenso zeigte

sich, dass eine Variation des Verhältnisses der DZ zu Tumorzellen zugunsten der Tumorzellen eine höhere Zahl an Hybridzellen hervorbrachte.

Um das immunstimulatorische Potenzial von Hybridzellen zu evaluieren, wurden diese nach Bestrahlung in einen *In-vitro*-Stimulationsansatz mit autologen T-Lymphozyten von Patienten gegeben und auf die Sekretion von IFN- γ hin untersucht. Bei Hybridzellen konnte hierbei die Induktion einer tumorspezifischen Komponente in der Immunantwort nachgewiesen werden. Infolge der Verwendung allogener DZ beinhaltete jedoch die durch Hybridzellen induzierte Immunantwort daneben auch eine zusätzliche, alloreaktive Komponente, welche auch bei anderen Kontrollgruppen, wie DZ alleine oder einer Zellmischung, auftrat. Wurden mature DZ für die Generierung von Hybridzellen verwendet, war die erzielte IFN- γ -Sekretion im Vergleich mit immaturren DZ etwa doppelt so hoch.

Wie durch Anreicherungsversuche von Hybridzellen in einer Zellsortieranlage belegt werden konnte, ließ sich durch eine Erhöhung der Rate an Fusionszellen im Stimulationsansatz keine weitere Steigerung der Immunantwort mehr induzieren, da offenbar die darin enthaltenen Immunzellen bereits maximal stimuliert wurden.

Unerwarteterweise zeigte sich jedoch auch bei Zellmischturen, die keinem Fusionsprozess unterzogen worden waren, ebenfalls eine tumorspezifische Immunantwort. Diese war jedoch schwächer ausgeprägt als die durch Hybridzellen erzielte Antitumorantwort und konnte auf die Prozessierung tumorassoziierter Peptide durch DZ während der Kokultur mit den Tumorzellen zurückgeführt werden.

Bei der genaueren Untersuchung der an der Immunantwort beteiligten Zellen, die durch die Vakzinierung mit DZ hervorgerufen wurde, zeigte sich, dass die Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen eine wichtige Rolle spielte. Humane, HLA-2-positive DZ konnten in Kokultur sowohl autologe, HLA-2-positive, wie auch allogene, HLA-2-negative NK-Zellen zur Sekretion von IFN- γ in *In-vitro*-Stimulationsansätzen anregen.

Auf Grund limitierter Zellzahlen im Humansystem wurde für weitergehende Untersuchungen ein analoges murines Modell verwendet. Dort konnte durch Vakzinierung mit allogenen maturaen DZ aus Mäusen des C57BL/6-Stamms eine protektive Immunantwort gegen das murine B-Zell-Lymphom A20 *in vivo* und *in vitro* induziert werden. Immature DZ bewirkten eine Überlebenszeitverlängerung *in vivo*. Wie Depletionsversuche zeigten, wurde der Tumorschutz durch NK-Zellen vermittelt, welche durch die transferierten DZ aktiviert wurden. Nach Vakzinierung bestand jedoch kein Schutz gegenüber MPC11 und CT26. Das unterschiedliche

Abstoßungsverhalten der verschiedenen Tumorarten konnte mit der Expression von NKG2D-Liganden erklärt werden, welche mit dem NK-Zell-aktivierenden Rezeptor NKG2D interagieren. NKG2D-Liganden waren am höchsten auf A20 exprimiert und um ein Vielfaches schwächer auf MPC11 und CT26. Wurde dieser Rezeptor auf dem A20-Lymphom blockiert, konnte nach Vakzinierung mit DZ *in vitro* und auch *in vivo* auf Grund fehlender NK-Zell-Aktivierung kein ausreichender Schutz mehr induziert werden. Interessanterweise hatte die Depletion von CD4⁺-T-Helferzellen keine Auswirkung auf den primären Schutz.

F Referenzen

- Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumüller, H., Lüking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D.H., Röcken, M. & Mocikat, R. (2005) DC-NK cell cross talk as a novel CD4-T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* **106**, 338-344.
- Aderem, A. & Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623.
- Ahmad, M., Rees, R.C. & Ali, S.A. (2004) Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 844-854.
- Algarra, I., Collado, A. & Garrido, F. (1997) Altered MHC class I antigens in tumors. *Int. J. Clin. Lab Res.* **27**, 95-102.
- Avigan, D. (2004) Dendritic cell-tumor fusion vaccines for renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6347S-6352S.
- Avigan, D., Vasir, B., Gong, J., Borges, V., Wu, Z., Uhl, L., Atkins, M., Mier, J., McDermott, D., Smith, T., Giallambardo, N., Stone, C., Schadt, K., Dolgoff, J., Tetreault, J.C., Villarroel, M. & Kufe, D. (2004) Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4699-4708.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767-811.
- Banchereau, J. & Palucka, A.K. (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 296-306.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Baume, D.M., Robertson, M.J., Levine, H., Manley, T.J., Schow, P.W. & Ritz, J. (1992) Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1-6.
- Baxevanis, C.N., Sotiropoulou, P.A., Sotiriadou, N.N. & Papamichail, M. (2004) Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 166-175.
- Bendandi, M. (2001) Role of anti-idiotypic vaccines in the modern treatment of human follicular lymphoma. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* **1**, 65-72.
- Bendandi, M. (2004) The role of idiotype vaccines in the treatment of human B-cell malignancies. *Expert. Rev. Vaccines* **3**, 163-170.
- Bernhard, H., Salazar, L., Schiffman, K., Smorlesi, A., Schmidt, B., Knutson, K.L. & Disis, M.L. (2002) Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein. *Endocr. Relat. Cancer* **9**, 33-44.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C. & Moretta, A. (2001) Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.* **181**, 203-214.

- Boon, T., Coulie, P.G., van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. (2006) Human T Cell Responses Against Melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; **24**, 175-208.
- Boon, T. & Old, L.J. (1997) Cancer Tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 681-683.
- Borrego, F., Robertson, M.J., Ritz, J., Pena, J. & Solana, R. (1999) CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* **97**, 159-165.
- Bottomly, K. (1988) A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes. *Immunol. Today* **9**, 268-274.
- Brattain M.G., Strobel-Stevens J., Fine D., Webb M. & Sarraf A.M. (1980): Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res.* **40**, 2142-2146.
- Brossart, P., Wirths, S., Brugger, W. & Kanz, L. (2001) Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp. Hematol.* **29**, 1247-1255.
- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H.A., Krieg, A.M., Hartmann, G. & Endres, S. (2000) Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J. Immunol.* **165**, 6278-6286.
- Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B & Hallek M. (1999) CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood* Mar 15; **93**(6), 1992-2002.
- Burnet, F.M. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor. Res.* **13**, 1-27
- Busch D.H., Pilip I.M., Vijn S. & Pamer E.G. (1998): Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* **8**, 353-362.
- Callan, M.F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., Poon, K., Hatton, C. & McMichael, A.J. (2000) CD8⁺ T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J. Clin. Invest* **106**, 1251-1261.
- Carayannopoulos, L.N., Naidenko, O.V., Fremont, D.H. & Yokoyama, W.M. (2002) Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J. Immunol.* **169**, 4079-4083.
- Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Karre, K. & Zappacosta, S. (1997) A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.* **185**, 2053-2060.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. & Alber, G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747-752.
- Celluzzi, C.M. & Falo, L.D., Jr. (1998) Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. *J. Immunol.* **160**, 3081-3085.
- Celluzzi, C.M., Mayordomo, J.I., Storkus, W.J., Lotze, M.T. & Falo, L.D., Jr. (1996) Peptide-

- pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* **183**, 283-287.
- Cerwenka, A., Bakker, A.B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J.H. & Lanier, L.L. (2000) Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* **12**, 721-727.
- Cerwenka, A., Baron, J.L. & Lanier, L.L. (2001) Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 11521-11526.
- Chambers, B.J., Salcedo, M. & Ljunggren, H.G. (1996) Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* **5**, 311-317.
- Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G. & Allison, J.P. (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 565-594.
- Chapman, H.A. (1998) Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 93-102.
- Cheson, BD. (2006) Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* Feb; **55**(2),188-96. Epub 2005 Sep 27.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G. & Ravetch, J.V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* **6**, 443-446.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E. & Caligiuri, M.A. (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-3151.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. & Chalupny, N.J. (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123-133.
- Croft, M. & Swain, S.L. (1991) B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J. Immunol.* **146**, 4055-4064.
- Davidson, W.F., Giese, T. & Fredrickson, T.N. (1998) Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J. Exp. Med.* **187**, 1825-1838.
- De Vries, T.J., Fourkour, A., Wobbes, T., Verkroost, G., Ruiter, D.J. & van Muijen, G.N. (1997) Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res.* **57**, 3223-3229.
- De Smedt, T., van Moulin, M., de Baetselier, G., Urbain, J., Leo, O. & Moser, M. (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1229-1235.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 233-238.

- Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N. & Raulet, D.H. (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.* **1**, 119-126.
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M. & Raulet, D.H. (2001) Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* **413**, 165-171.
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., it-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S. & Caux, C. (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**, 373-386.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991-998.
- Egeter, O., Mocikat, R., Ghoreschi, K., Dieckmann, A. & Röcken, M. (2000) Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Res.* **60**, 1515-1520.
- Farag, S.S., Fehniger, T.A., Ruggeri, L., Velardi, A. & Caligiuri, M.A. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* **100**, 1935-1947.
- Farris, A.D., Keech, C.L., Gordon, T.P. & McCluskey, J. (2000) Epitope mimics and determinant spreading: pathways to autoimmunity. *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 569-578.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M. & Munz, C. (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* **195**, 343-351.
- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E. & Zitvogel, L. (1999) Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **5**, 405-411.
- Ferrari, S., Rovati, B., Porta, C., Alessandrino, P.E., Bertolini, A., Collova, E., Riccardi, A. & Danova, M. (2003) Lack of dendritic cell mobilization into the peripheral blood of cancer patients following standard- or high-dose chemotherapy plus granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Immunol. Immunother.* **52**, 359-366.
- Fitch, F.W., McKisic, M.D., Lancki, D.W. & Gajewski, T.F. (1993) Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 29-48.
- Freigang, S., Egger, D., Bienz, K., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. (2003) Endogenous neosynthesis vs. cross-presentation of viral antigens for cytotoxic T cell priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13477-13482.
- Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M. & Steinman, R.M. (2002) Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat. Immunol.* **3**, 867-874.
- Gabriele, L., Borghi, P., Rozera, C., Sestili, P., Andreotti, M., Guarini, A., Montefusco, E., Foa, R. & Belardelli, F. (2004) IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. *Blood* **103**, 980-987.

- Garhammer, S. (2001) In-vitro Immunisierung gegen B-CLL-Zellen mittels DC-Tumor-Hybride
Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J.J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M. & Stern, P.L. (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* **18**, 89-95.
- Geldhof, A.B., van Ginderachter, J.A., Liu, Y., Noel, W., Raes, G. & de Baetselier, P. (2002) Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation. *Blood* **100**, 4049-4058.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. & Trinchieri, G. (2002) Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**, 327-333.
- Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M.L., Ohlen, C., Orn, A. & Karre, K. (2000) Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J. Exp. Med.* **191**, 129-138.
- Goddard, R.V., Prentice, A.G., Copplestone, J.A. & Kaminski, E.R. (2003) In vitro dendritic cell-induced T cell responses to B cell chronic lymphocytic leukaemia enhanced by IL-15 and dendritic cell-B-CLL electrofusion hybrids. *Clin. Exp. Immunol.* **131**, 82-89.
- Goddard, R.V., Prentice, A.G., Copplestone, J.A. & Kaminski, E.R. (2001) Generation in vitro of B-cell chronic lymphocytic leukaemia-proliferative and specific HLA class-II-restricted cytotoxic T-cell responses using autologous dendritic cells pulsed with tumour cell lysate. *Clin. Exp. Immunol.* **126**, 16-28.
- Gong, J., Avigan, D., Chen, D., Wu, Z., Koido, S., Kashiwaba, M. & Kufe, D. (2000a) Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2715-2718.
- Gong, J., Chen, D., Kashiwaba, M. & Kufe, D. (1997) Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat. Med.* **3**, 558-561.
- Gong, J., Chen, D., Kashiwaba, M., Li, Y., Chen, L., Takeuchi, H., Qu, H., Rowse, G.J., Gendler, S.J. & Kufe, D. (1998) Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6279-6283.
- Gong, J., Koido, S., Chen, D., Tanaka, Y., Huang, L., Avigan, D., Anderson, K., Ohno, T. & Kufe, D. (2002) Immunization against murine multiple myeloma with fusions of dendritic and plasmacytoma cells is potentiated by interleukin 12. *Blood* **99**, 2512-2517.
- Gong, J., Koido, S., Kato, Y., Tanaka, Y., Chen, D., Jonas, A., Galinsky, I., DeAngelo, D., Avigan, D., Kufe, D. & Stone, R. (2004) Induction of anti-leukemic cytotoxic T lymphocytes by fusion of patient-derived dendritic cells with autologous myeloblasts. *Leuk. Res.* **28**, 1303-1312.
- Gong, J., Nikrui, N., Chen, D., Koido, S., Wu, Z., Tanaka, Y., Cannistra, S., Avigan, D. & Kufe, D. (2000b) Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J. Immunol.* **165**, 1705-1711.

- Gorelik, L. & Flavell, R.A. (2001) Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat. Med.* **7**, 1118-1122.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R. & Spies, T. (2001) Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* **2**, 255-260.
- Guermonez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P. & Amigorena, S. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402.
- Guo, Y., Wu, M., Chen, H., Wang, X., Liu, G., Li, G., Ma, J. & Sy, M.S. (1994) Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* **263**, 518-520.
- Hart, I. & Colaco, C. (1997) Immunotherapy. Fusion induces tumour rejection. *Nature* **388**, 626-627.
- Hayakawa, Y., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Darcy, P.K., Diefenbach, A., Raulet, D. & Smyth, M.J. (2002) Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J. Immunol.* **169**, 5377-5381.
- Hersey, P. & Zhang, X.D. (2001) How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 142-150.
- Hodi, F.S., Mihm, M.C., Soiffer, R.J., Haluska, F.G., Butler, M., Seiden, M.V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., Padera, R., Jaklitsch, M.T., Shankar, S., Chen, T.C., Korman, A., Allison, J.P. & Dranoff, G. (2003) Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4712-4717.
- Hofbauer, G.F., Kamarashev, J., Geertsen, R., Boni, R. & Dummer, R. (1998) Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res.* **8**, 337-343.
- Holmes, L.M., Li, J., Sticca, R.P., Wagner, T.E. & Wei, Y. (2001) A rapid, novel strategy to induce tumor cell-specific cytotoxic T lymphocyte responses using instant dendritomas. *J. Immunother.* **24**, 122-129.
- Houghton, A.N. & Scheinberg, D.A. (2000) Monoclonal antibody therapies-a 'constant' threat to cancer. *Nat. Med.* **6**, 373-374.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. & Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195.
- Jaiswal, A.I. & Croft, M. (1997) CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cells: implications for development of the primary T and B cell response. *J. Immunol.* **159**, 2282-2291.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. (2002) Immunologie. In *Spektrum, Akad. Verlag*, Heidelberg.

- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G. & Schoenberger, S.P. (2003) CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-856.
- Jantscheff, P., Spagnoli, G., Zajac, P. & Rochlitz, C.F. (2002) Cell fusion: an approach to generating constitutively proliferating human tumor antigen-presenting cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 367-375.
- Kalams, S.A. & Walker, B.D. (1998) The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **188**, 2199-2204.
- Kalinski, P., Mailliard, R.B., Giermasz, A., Zeh, H.J., Basse, P., Bartlett, D.L., Kirkwood, J.M., Lotze, M.T. & Herberman, R.B. (2005) Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **5**, 1303-1315.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7556-7561.
- Kelsall, B.L., Stuber, E., Neurath, M. & Strober, W. (1996) Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **795**, 116-126.
- Kim K.J., Kanellopoulos-Langevin C., Merwin R.M., Sachs D.H. & Askofsky R. (1979): Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J. Immunol.* **122**, 549-555.
- Kikuchi T, Akasaki Y, Irie M, Homma S, Abe T & Ohno T. (2001) Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother.* Sep; **50**(7), 337-44.
- Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, Fukuda T, Saotome H, Ryan JL, Kufe DW & Ohno T. (2004) Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J. Immunother.* Nov-Dec; **27**(6), 452-9.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N. & Schuler, G. (1996) High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* **184**, 741-746.
- Kokhaei, P., Rezvany, M.R., Virving, L., Choudhury, A., Rabbani, H., Osterborg, A. & Mellstedt, H. (2003) Dendritic cells loaded with apoptotic tumour cells induce a stronger T-cell response than dendritic cell-tumour hybrids in B-CLL. *Leukemia* **17**, 894-899.
- Kremmer, E., Mysliwicz, J., Lederer, R., Thierfelder, S. (1993) Murine anti-mouse T cell monoclonal antibodies elicit anti-antibodies in mice: intra-species immunization model for estimating potential patient sensitization against humanized anti-T cell antibodies. *Eur. J. Immunol.* **23** 1017-22.
- Kufe, D.W. (2000) Smallpox, polio and now a cancer vaccine? *Nat. Med* **6**, 252-253.
- Kwak, L.W., Campbell, M.J., Czerwinski, D.K., Hart, S., Miller, R.A. & Levy, R. (1992) Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin

- idiotype expressed by their tumors. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1209-1215.
- Lanier, L.L. (2000) Turning on natural killer cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1259-1262.
- Lanier, L.L. (1998) NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 359-393.
- Larsson, B.M., Larsson, K., Malmberg, P. & Palmberg, L. (1999) Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* **23**, 217-230.
- Lascov R. & Scharff M.D. (1970): Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. I. Adaption of the Merwin plasma cell tumor-11 to culture, cloning and characterization of gamma globulin subunits. *J. Exp. Med.* **131**, 515-541.
- Lespagnard, L., Mettens, P., Verheyden, A.M., Tasiaux, N., Thielemans, K., van Meirvenne, S., Geldhof, A., de Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O. & Moser, M. (1998) Dendritic cells fused with mastocytoma cells elicit therapeutic antitumor immunity. *Int. J. Cancer* **76**, 250-258.
- Lindner, M. & Schirmacher, V. (2002) Tumour cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols. *Eur. J. Clin. Invest* **32**, 207-217.
- Liu, Y., Zhang, W., Chan, T., Saxena, A. & Xiang, J. (2002) Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk. Res.*, **26**, 757-763.
- Ljunggren, H.G. & Karre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**, 237-244.
- Long, E.O. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 875-904.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M. & O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071-5079.
- Maeda, H. & Shiraishi, A. (1996) TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* **156**, 73-78.
- Mailliard, R.B., Son, Y.I., Redlinger, R., Coates, P.T., Giermasz, A., Morel, P.A., Storkus, W.J. & Kalinski, P. (2003) Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J. Immunol.* **171**, 2366-2373.
- Marincola, F.M., Shamamian, P., Alexander, R.B., Gnarr, J.R., Turetskaya, R.L., Nedospasov, S.A., Simonis, T.B., Taubenberger, J.K., Yannelli, J. & Mixon, A. (1994) Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J. Immunol.* **153**, 1225-1237.
- Marten, A., Flieger, D., Renoth, S., Weineck, S., Albers, P., Compes, M., Schottker, B., Ziske, C., Engelhart, S., Hanfland, P., Krizek, L., Faber, C., Von, R.A., Muller, S., Sauerbruch, T. & Schmidt-Wolf, I.G. (2002) Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 637-644.

- Martin-Fontecha, A., Assarsson, E., Carbone, E., Karre, K. & Ljunggren, H.G. (1999) Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2). *J. Immunol.* **162**, 5910-5916.
- Medana, I.M., Gallimore, A., Oxenius, A., Martinic, M.M., Wekerle, H. & Neumann, H. (2000) MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3623-3633.
- Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. (2000) Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* **343**, 338-344.
- Michalek, J., Buchler, T. & Hajek, R. (2004) T lymphocyte therapy of cancer. *Physiol. Res.* **53**, 463-469.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., Koszinowski, U. & Röcken, M. (2003) Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* **19**, 561-569.
- Mocikat, R., Selmayr, M., Thierfelder, S. & Lindhofer, H. (1997) Trioma-based vaccination against B-cell lymphoma confers long-lasting tumor immunity. *Cancer Res.* **57**, 2346-2349.
- Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A.K. & Banchereau, J. (2001) Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1013-1020.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M.C. & Moretta, L. (1996) Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 619-648.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M.C., Biassoni, R. & Moretta, A. (2002) Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1205-1211.
- Moretta, L. & Moretta, A. (2004) Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* **23**, 255-259.
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145-173.
- Muller, M.R., Grunebach, F., Nencioni, A. & Brossart, P. (2003) Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J. Immunol.* **170**, 5892-5896.
- Mumberg, D., Monach, P.A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A.Y., Schreiber, R.D. & Schreiber, H. (1999) CD4⁺ T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 8633-8638.
- Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. & Schadendorf, D. (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* **4**, 328-332.
- Noessner, E., Gastpar, R., Milani, V., Brandl, A., Hutzler, P.J., Kuppner, M.C., Roos, M., Kremmer, E., Asea, A., Calderwood, S.K. & Issels, R.D. (2002) Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J. Immunol.* **169**, 5424-5432.

- Oosterwijk-Wakka, J.C., Tiemessen, D.M., Bleumer, I., de Vries, I., Jongmans, W., Adema, G.J., Debruyne, F.M., de Mulder, P.H., Oosterwijk, E. & Mulders, P.F. (2002) Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study. *J. Immunother.* **25**, 500-508.
- Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M. & Colombo, M.P. (1996) Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J. Exp. Med.* **183**, 317-322.
- Pardoll, D. (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 807-839.
- Pardoll, D.M. (2002) Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 227-238.
- Parkhurst, M.R., DePan, C., Riley, J.P., Rosenberg, S.A. & Shu, S. (2003) Hybrids of dendritic cells and tumor cells generated by electrofusion simultaneously present immunodominant epitopes from multiple human tumor-associated antigens in the context of MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* **170**, 5317-5325.
- Peoples, G.E., Gurney, J.M., Hueman, M.T., Woll, M.M., Ryan, G.B., Storrer, C.E., Fisher, C., Shriver, C.D., Ioannides, C.G. & Ponniah, S. (2005) Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7536-7545.
- Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., Duray, P.H., Steinberg, S.M., Allison, J.P., Davis, T.A. & Rosenberg, S.A. (2003a) Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8372-8377.
- Phan, V., Errington, F., Cheong, S.C., Kottke, T., Gough, M., Altmann, S., Brandenburger, A., Emery, S., Strome, S., Bateman, A., Bonnotte, B., Melcher, A. & Vile, R. (2003b) A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat. Med.* **9**, 1215-1219.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. & Valiante, N.M. (2002) Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* **195**, 335-341.
- Ramnath, N., Tan, D., Li, Q., Hylander, B.L., Bogner, P., Ryes, L. & Ferrone, S. (2006) Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival? *Cancer Immunol Immunother.* **55** (8), 891-9.
- Raulet, D.H. (2003) Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 781-790.
- Ravetch, J.V. & Lanier, L.L. (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-89.
- Reis e Sousa (2001) Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* **14**, 495-498.
- Restifo, N.P. (1996) The new vaccines: building viruses that elicit antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 658-663.

- Restifo, N.P., Marincola, F.M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J.R. & Rosenberg, S.A. (1996) Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 100-108.
- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal, M.R. & Liu, Y.J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186.
- Robbins, P.F. & Kawakami, Y. (1996) Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 628-636.
- Rock, K.L. & Shen, L. (2005) Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* **207**, 166-183.
- Roda, J.M., Parihar, R., Magro, C., Nuovo, G.J., Tridandapani, S. & Carson, W.E., III (2006) Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res.* **66**, 517-526.
- Rosenberg, S.A. & Dudley, M.E. (2004) Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **101** Suppl 2, 14639-14645.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., Chang, A.E., Schwartzentruber, D.J., Aebersold, P., Leitman, S., Linehan, W.M. & Seipp, C.A. (1993) Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 622-632.
- Routes, J.M. (1992) IFN increases class I MHC antigen expression on adenovirus-infected human cells without inducing resistance to natural killer cell killing. *J. Immunol.* **149**, 2372-2377.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109-1118.
- Satthaporn, S., Robins, A., Vassanasiri, W., El-Sheemy, M., Jibril, J.A., Clark, D., Valerio, D. & Eremin, O. (2004) Dendritic cells are dysfunctional in patients with operable breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 510-518.
- Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R. & Groettrup, M. (2002) Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354-1361.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. & Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R. & Melief, C.J. (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-483.
- Schwartz, R.H. (1990) A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**, 1349-1356.

- Scrivener, S., Kaminski, E.R., Demaine, A. & Prentice, A.G. (2001) Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of immune dysregulation. *Br. J. Haematol.* **112**, 959-964.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2001) IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111.
- Shedlock, D.J. & Shen, H. (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-339.
- Shimizu, J., Yamazaki, S. & Sakaguchi, S. (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* **163**, 5211-5218.
- Shortman, K. & Liu, Y.J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161.
- Shu, S. & Cohen, P. (2001) Tumor-Dendritic Cell Fusion Technology and Immunotherapy Strategies. *J. Immunother.* **24**, 99-100.
- Siders, W.M., Vergilis, K.L., Johnson, C., Shields, J. & Kaplan, J.M. (2003) Induction of specific antitumor immunity in the mouse with the electrofusion product of tumor cells and dendritic cells. *Mol. Ther.* **7**, 498-505.
- Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. (2000) 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur. J. Immunol.* **30**, 787-793.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J. & Ullrich, A. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-712.
- Song, E., Chen, J., Ouyang, N., Su, F., Wang, M. & Heemann, U. (2001) Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br. J. Cancer* **85**, 1047-1054.
- Spaggiari, G.M., Carosio, R., Pende, D., Marcenaro, S., Rivera, P., Zocchi, M.R., Moretta, L. & Poggi, A. (2001) NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1656-1665.
- Steinman, R.M. & Swanson, J. (1995) The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**, 283-288.
- Steitz, J., Bruck, J., Lenz, J., Knop, J. & Tuting, T. (2001) Depletion of CD25⁺ CD4⁺ T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8⁺ T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res.* **61**, 8643-8646.
- Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E. & Vieweg, J. (2003) Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* **63**, 2127-2133.

- Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R. & Melief, C.J. (2001) Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25⁺ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **194**, 823-832.
- Suzuki, T., Fukuhara, T., Tanaka, M., Nakamura, A., Akiyama, K., Sakakibara, T., Koinuma, D., Kikuchi, T., Tazawa, R., Maemondo, M., Hagiwara, K., Saijo, Y. & Nukiwa, T. (2005) Vaccination of dendritic cells loaded with interleukin-12-secreting cancer cells augments in vivo antitumor immunity: characteristics of syngeneic and allogeneic antigen-presenting cell cancer hybrid cells. *Clin. Cancer Res.* **11**, 58-66.
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376.
- Takeda, K., Oshima, H., Hayakawa, Y., Akiba, H., Atsuta, M., Kobata, T., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H. & Okumura, K. (2000) CD27-mediated activation of murine NK cells. *J. Immunol.* **164**, 1741-1745.
- Terme, M., Tomasello, E., Maruyama, K., Crepineau, F., Chaput, N., Flament, C., Marolleau, J.P., Angevin, E., Wagner, E.F., Salomon, B., Lemonnier, F.A., Wakasugi, H., Colonna, M., Vivier, E. & Zitvogel, L. (2004) IL-4 confers NK stimulatory capacity to murine dendritic cells: a signaling pathway involving KARAP/DAP12-triggering receptor expressed on myeloid cell 2 molecules. *J. Immunol.* **172**, 5957-5966.
- Thomas, L. (1959) Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. (ed. Lawrence, H.S.), Hoeber-Harper, New York, 529-532,
- Toes, R.E., Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Offringa, R. & Melief, C.J. (1998) CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Semin. Immunol.* **10**, 443-448.
- Townsend, S.E. & Allison, J.P. (1993) Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* **259**, 368-370.
- Trefzer, U., Herberth, G., Wohlan, K., Milling, A., Thiemann, M., Sherev, T., Sparbier K., Sterry, W. & Walden, P. (2004) Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. *Int. J. Cancer* **110**, 730-740.
- Uebel, S. & Tampe, R. (1999) Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 203-208.
- Van Elsas, A., Sutmuller, R.P., Hurwitz, A.A., Ziskin, J., Villasenor, J., Medema, J.P., Overwijk, W.W., Restifo, N.P., Melief, C.J., Offringa, R. & Allison, J.P. (2001) Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J. Exp. Med.* **194**, 481-489.
- Van Tendeloo, T., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., van Broekhoven, C., van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. (2001) Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*

98, 49-56.

Vasir, B., Borges, V., Wu, Z., Grosman, D., Rosenblatt, J., Irie, M., Anderson, K., Kufe, D. & Avigan, D. (2005) Fusion of dendritic cells with multiple myeloma cells results in maturation and enhanced antigen presentation. *Br. J. Haematol.* **129**, 687-700.

Vuillier F, Maloum K, Thomas EK, Magnac C, Dumas G, Payelle-Brogard B, Opezzo P, Dighiero G & Scott-Algara D. (2003) Idiotype-pulsed dendritic cells are able to induce antitumoral cytotoxic CD8 cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* Jan;**120** (2), 243-50.

Wahl, U., Noessner, E., Kronenberger, K., Gangnus, R., Pohla, H., Staeger, M.S., Kolb, H.J., Hallek, M. & Mocikat, R. (2003) Vaccination against B-cell chronic lymphocytic leukemia with trioma cells: preclinical evaluation. *Clin. Cancer Res.* **9**, 4240-4246.

Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D. & Riddell, S.R. (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1038-1044.

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

Weiner, L.M. (1999) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin. Oncol.* **26**, 43-51.

Westwood, J.A., Kelly, J.M., Tanner, J.E., Kershaw, M.H., Smyth, M.J. & Hayakawa, Y. (2004) Cutting edge: novel priming of tumor-specific immunity by NKG2D-triggered NK cell-mediated tumor rejection and Th1-independent CD4⁺ T cell pathway. *J. Immunol.* **172**, 757-761.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K. & Steinman, R.M. (2003) Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 235-247.

Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E. & Greenberg, P.D. (2002) Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16168-16173.

Yee, C., Thompson, J.A., Roche, P., Byrd, D.R., Lee, P.P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M.M., Riddell, S.R. & Greenberg, P.D. (2000) Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J. Exp. Med.* **192**, 1637-1644.

Yi, Q., Desikan, R., Barlogie, B. & Munshi, N. (2002) Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **117**, 297-305.

Yokoyama, W.M. & Seaman, W.E. (1993) The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 613-635.

Yu, H., Fehniger, T.A., Fuchshuber, P., Thiel, K.S., Vivier, E., Carson, W.E. & Caligiuri, M.A. (1998) Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34⁺ human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* **92**, 3647-3657.

Yu, Y., Hagihara, M., Ando, K., Gansuud, B., Matsuzawa, H., Tsuchiya, T., Ueda, Y., Inoue, H., Hotta, T. & Kato, S. (2001) Enhancement of human cord blood CD34⁺ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 1590-1600.

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

Zitvogel, L. (2002) Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J. Exp. Med.* **195**, F9-14.

Zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342-350.

F Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt und ermöglicht haben.

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ralph Mocikat danken, der jederzeit mit exzellentem fachlichen Rat und intensiver Unterstützung zur Seite stand. Er ermöglichte mir nicht nur Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten, sondern vermittelte auch darüber hinaus mit seiner fundierten Allgemeinbildung Wissen jenseits des medizinischen Forschungsbetriebs. Insbesondere seine Reflexionen über unser linguistisches Selbstverständnis haben mir neue, konstruktive Perspektiven eröffnet.

Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. Ph. D. Dolores Schendel, die die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF ermöglichte.

Ohne technische Assistenz und Hilfestellung bei den Tierexperimenten und im Labor wäre diese Dissertation in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Hierfür bedanke ich mich sehr herzlich bei Nicola Dierkes, Julika Jasny, Michael Hagemann sowie Gerardo Alvarez.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen Dr. rer. nat. Carolin Lücking, Dr. rer. nat. Susan King, Dr. rer. nat. Konrad Kronenberger, Dr. med. Christian Adam, Dr. rer. nat. Bernhard Frankenberger für die Hilfsbereitschaft und die kollegiale, lockere Arbeitsatmosphäre bedanken.

G Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Martin Anton Allgeier
Geboren: 15. November 1976 in Passau
Anschrift: Schreinerbauerweg 11 in 94036 Passau
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 - 1987 Grundschole Neustift, Passau
1987 - 1996 Adalbert-Stifter-Gymnasium, Passau

Hochschulbildung

Mai 1998 bis Oktober 2005 Studiengang Humanmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Ärztliche Vorprüfung
Aug. 2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Aug. 2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2005

Famulaturen

März 2001: Krankenhaus Obernzell, Chirurgie
Aug. 2002: Krankenhaus München-Neuperlach, Kardiologie
Aug. 2003: Allgemeinärztliche Praxis, Passau
Sept. 2003: Centre Hospitalier Universitaire Toulouse, Frankreich,
Radiologie

Praktisches Jahr

Okt. 2004 - Feb. 2005: Universitätsklinikum Großhadern München, Neurologie
Februar - Mai 2005: Städtisches Krankenhaus München-Neuperlach,
Innere Medizin (Gastroenterologie)
Mai - Juni 2005: Städtisches Krankenhaus München-Neuperlach, Chirurgie
Juni - Aug. 2005: O&A Institute at the Sunnybrook College Toronto, Kanada,
Chirurgie

Beruflicher Werdegang:

seit März 2006 Assistenzarzt in der 1. Medizinischen Klinik, Klinikum
Ingolstadt