

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen auf die Immunantwort *in vitro*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julian N. Röbe

aus Schrobenhausen

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. R. Mocikat
PD. Dr. med. W. Kern

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. A. Eigler
Dr. med. M. Schnurr

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das duktales Pankreaskarzinom	1
1.2	Prinzipien der Immuntherapie mit dendritischen Zellen	1
1.3	Die dendritische Zelle und ihre Rolle im Immunsystem	3
1.3.1	Die Induktion einer Immunantwort durch dendritische Zellen	3
1.3.2	Die Aktivierung von dendritischen Zellen und das Modell der Gefahrensignale	6
1.3.3	Die Induktion einer Th1- oder Th2-gerichteten Immunantwort	9
1.4	Dendritische Zellen in der Immuntherapie.....	11
1.4.1	Antigenaufbereitung und -applikation im Rahmen der Immuntherapie	11
1.4.2	Aktivierung der dendritischen Zelle im Rahmen der Immuntherapie	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Geräte und Chemikalien	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	15
2.1.3	Radioaktive Chemikalien	16
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	16
2.2	Reagenziensätze	16
2.3	Zytokine, Chemokine und ATP	17
2.4	Puffer, Lösungen, Medien und Seren	17
2.5	Antikörper.....	18
2.6	Software.....	19
2.7	Zelllinien.....	19
2.7.1	Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1	19
2.7.2	Magenkarzinomzelllinie Kato-III	19
2.7.3	CD40L-transfizierte Fibroblastenzelllinie BHK256 mit Kontrollzelllinie	20
2.8	Aktivierung dendritischer Zellen mit löslichem CD40Ligand-Trimeren (sCD40L).....	20
2.9	Kultursysteme	20
2.9.1	Kultur der Tumorzelllinien	20

2.9.2	Kultur der Fibroblastenzelllinie	21
2.10	Generierung humaner, Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen und Gewinnung naiver T-Zellen	21
2.10.1	Gewinnen mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	21
2.10.2	Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen	22
2.10.3	Gewinnung von naiven CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten mit Hilfe der Magnetischen Zellseparation (MACS).....	23
2.11	Antigenbeladung und Aktivierung der dendritischen Zellen	24
2.11.1	Apoptoseinduktion der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 und Beladen der dendritischen Zellen mit Tumorzellantigenen.....	24
2.11.2	Die Aktivierung der dendritischen Zellen.....	25
2.12	Kokulturen.....	25
2.12.1	Die halbautologe Kurzzeitkokultur dendritischer Zellen mit PBMC	26
2.12.2	Die halbautologe Langzeitkokultur dendritischer Zellen mit naiven T-Zellen	26
2.13	Kryokonservierung von dendritischen Zellen und Lymphozyten	28
2.14	Analyseverfahren	29
2.14.1	Apoptosebestimmung mit Hilfe von Annexin V und Propidiumiodid.....	29
2.14.2	Phagozytosebestimmung CFSE-gefärbter Tumorzellen	31
2.14.3	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA).....	31
2.14.4	Durchflusszytometrie	32
2.14.5	⁵¹ Chrom-Lyse-Test.....	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Analyse der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen.....	37
3.2	Messung der Phagozytoseaktivität dendritischer Zellen	38
3.3	Einfluss der Stimulationsbedingungen dendritischer Zellen auf die Aktivierung	39
3.3.1	Expression von Aktivierungsmarkern.....	40
3.3.2	Einfluss auf die CCR7-Expression dendritischer Zellen.....	41
3.3.3	Einfluss auf die Produktion von IL-12.....	42
3.3.4	Einfluss auf die stimulatorische Kapazität.....	42
3.3.5	Einfluss auf die Zellvitalität.....	43
3.4	Einfluss der Stimulation dendritischer Zellen auf das T-Zell-Zytokinprofil und die die Induktion einer CTL-vermittelten Immunantwort.....	45

3.4.1	Induktion von IL-4 und IL-10	46
3.4.2	Expression von CD69 und CD45RO auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	47
3.4.3	Lytische Kapazität der CTL gegenüber Panc-1-Tumorzellen.....	49
3.4.4	Spezifität der induzierten Lyse	50
3.4.5	Zelluläre Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen in den Kokulturen	50
4	Diskussion	52
4.1	Ergebnisse	52
4.1.1	Charakterisierung der dendritischen Zellen	52
4.1.2	Evaluation der einzelnen Stimulationsschemata bezüglich der Aktivierung von dendritischen Zellen.....	52
4.1.3	Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen auf die induzierte T- Zellantwort.....	54
4.2	Methodik	57
4.2.1	Die Langzeitkokultur dendritischer Zellen mit autologen T-Zellen.....	57
4.3	Implikationen der Untersuchungsergebnisse für die Entwicklung einer DC-basierten Vakzine gegen das Pankreaskarzinom.....	59
4.4	Klinische Ausblicke	60
5	Zusammenfassung.....	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Verzeichnis der Akronyme und Abkürzungen	82
8	Danksagung	84
9	Veröffentlichungen.....	85
10	Lebenslauf.....	87

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreaskarzinom

Das duktales Pankreaskarzinom ist, nach dem Colon- und Magenkarzinom, der häufigste gastrointestinale Tumor. In den westlichen Industrienationen wird eine stete Zunahme seiner Inzidenz beobachtet. Aufgrund des Umstandes, dass das Pankreaskarzinom sich klinisch erst relativ spät bemerkbar macht, hat es in den meisten Fällen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits metastasiert. Trotz Fortschritten in der Strahlenmedizin und dem Einsatz potenter Zytostatika bleibt die 5-Jahres-Überlebensrate unter 1%^{1,2}. Der durchschnittliche Krankheitsverlauf von Diagnosestellung bis zum Tod beträgt sieben bis acht Monate^{3,4,5}. Die augenscheinliche Insuffizienz der vorhandenen Therapieoptionen rechtfertigt die Evaluierung alternativer Behandlungsformen. Eine neue Therapieoption stellt die Immuntherapie mit dendritischen Zellen (DC) dar, welche bereits in der experimentellen Therapie von verschiedenen Malignomen Einzug hält.

1.2 Prinzipien der Immuntherapie mit dendritischen Zellen

Das Prinzip der Immuntherapie besteht darin, eine gegen das Malignom gerichtete Immunantwort im Patienten zu erzeugen und die entarteten Tumorzellen mit Hilfe zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) zu eliminieren. Diesbezüglich erweisen sich dendritische Zellen, welche zum ersten Mal 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben wurden⁶, als besonders geeignet. Dieser Zelltyp besitzt die einzigartige Fähigkeit, eine antigenspezifische, CTL-getragene Immunantwort einzuleiten und zu regulieren⁷.

Dendritische Zellen lassen sich *in vitro* aus Monozyten durch eine siebentägige Kultur in Anwesenheit von Interleukin (IL-) 4 und GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating-Factor) gewinnen^{8,9}. Alternativ lassen sich dendritische Zellen aus CD34⁺ Vorläuferzellen generieren, die durch die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsstimulatoren wie G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating-Factor) oder Flt3 Ligand aus dem Knochenmark mobilisiert

und dann aus dem Patientenblut isoliert werden können¹⁰. Dendritische Zellen stehen dadurch in großer Anzahl für wissenschaftliche Untersuchungen und einem potentiellen therapeutischen Handeln zur Verfügung.

Eine derzeit von verschiedenen Arbeitsgruppen untersuchte Strategie liegt darin, dendritischen Zellen *ex vivo* mit tumorspezifischen Antigenen zu beladen und diese dem Patienten zu applizieren, um so eine tumorspezifische Immunantwort zu initiieren. Zu dieser Immunantwort wäre das Immunsystem des Patienten prinzipiell auch alleine imstande, denn Tumorzellen exprimieren Proteine, die von CTL in Form von Peptiden, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, erkannt werden können. Damit werden Tumorzellen einer Eliminierung durch CTL zugänglich. Der Grund dafür, dass es trotz dieses Umstandes in den meisten Fällen nicht zu einer effektiven Immunreaktion gegen den Tumor kommt, ist darin zu suchen, dass Tumorzellen über zahlreiche Mechanismen verfügen, einer zytotoxischen Immunantwort zu entgehen. So sind zum Beispiel bestimmte Tumorzellen in der Lage, über die Produktion von Zytokinen dendritische Zellen in ihrer Funktion zu hemmen oder durch eine Minderexpression von MHC-Molekülen und Mutationen in intrazellulären Signalwegen einer Apoptoseinduktion durch CTL zu entgehen^{11,12,13,14}. Eine potente Immunantwort zu initiieren und hemmende Einflüsse von Tumoren darauf zu durchbrechen, sind die Hauptziele der Immuntherapie mit dendritischen Zellen.

Dass eine tumorgerichtete Immuntherapie mit dendritischen Zellen grundsätzlich möglich ist und gefürchtete Autoimmunreaktionen unwahrscheinlich sind, konnte in einer klinischen Studie von Thurner und Mitarbeitern 1999 erstmals demonstriert werden¹⁵. Seither werden klinische Studien zur Tumorvakzinierung mit dendritischen Zellen gegen mannigfache Malignomarten weltweit durchgeführt. Die nun vorliegenden Ergebnisse der Studien geben Anlass zur Hoffnung, wenn auch der klinische Nutzen bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Ein großes Problem stellen die geringen Patientenzahlen, fehlende Kontrollarme innerhalb der Studien und das Fehlen der Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien untereinander dar, aufgrund von Unterschieden bezüglich der therapierten Tumorart, den

klinischen und immunologischen Endpunkten und den Vakzinierungsprotokollen. Es sind derzeit jedoch große Multicenter-Studien im Gange bzw. in Vorbereitung, die den Stellenwert dieser innovativen Therapieform bestimmen sollen. In Tiermodellen ist die Immuntherapie von Tumoren mit dendritischen Zellen erfolgreich. Die Diskrepanz zwischen den Erfolgen in Tiermodellen und klinischen Studien legt nahe, dass es noch Arbeiten grundlegender Natur bedarf, um die biologische Funktion dendritischer Zellen besser zu verstehen und somit die Effektivität von DC-Vakzinen zu optimieren.

Der aktuelle Kenntnisstand der Einbettung dendritischer Zellen in die Funktionsweise des Immunsystems soll im Folgenden detailliert dargelegt werden.

1.3 Die dendritische Zelle und ihre Rolle im Immunsystem

1.3.1 Die Induktion einer Immunantwort durch dendritische Zellen

Dendritische Zellen besitzen die einzigartige Fähigkeit, eine antigenspezifische, durch CTL und T-Helferzellen vermittelte Immunantwort zu initiieren⁷. Zudem sind sie in der Lage, T-Gedächtniszellen zu aktivieren und damit eine bereits bestehende Immunantwort zu verstärken¹⁶. Jedoch kommt ihnen nicht nur eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Immunität zu, sondern auch bei der Toleranzentwicklung des Immunsystems, da sie T-Zellen in einen inaktiven Zustand, die Anergie, versetzen können^{17,18,19}. Somit bilden sie den Dreh- und Angelpunkt des adaptiven Teils des menschlichen Immunsystems.

Anhand von Langerhans-Zellen wurde folgendes Modell zum Lebenszyklus dendritischer Zellen entwickelt: DC-Vorläufer-Zellen wandern aus dem Knochenmark aus und zirkulieren im Blut. Von dort aus gelangen sie in verschiedene Gewebe, wie zum Beispiel in primäre lymphatische Organe oder, als Langerhans-Zellen, in die Haut. Dort angekommen, ortsständige dendritische Zellen zeichnen sich durch eine enorme phagozytotische und pinozytotische Aktivität aus. Im Gewebe vorgefundenes Material wird aufgenommen und im lysosomalen Kompartiment prozessiert. So entstehen aus Proteinen Polypeptide, die später auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentiert und so als antigene Determinanten von T-Zellen erkannt werden

können. Es kommt daher der dendritischen Zelle im Gewebe eine Filter- und Analysefunktion zu, die sie befähigt, ihre Umgebung durch das antigene Potential zu repräsentieren. Im Falle eines Kontaktes von dendritischen Zellen mit Mikroben, wie zum Beispiel Bakterien, Viren oder Helminthen („exogene“ Gefahrensignale) oder mit Substanzen, welche aus einer beschädigten Körperzelle freigesetzt werden („endogene“ Gefahrensignale), tritt die Zelle in einen Prozess ein, der als „Reifung“ bezeichnet wird. Reifeinduzierende Moleküle werden als „Reifestimuli“ bezeichnet. Während der Reifung durchlaufen dendritische Zellen verschiedene funktionelle Veränderungen, die für die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort von wesentlicher Bedeutung sind: Die dendritischen Zellen reduzieren nun ihre Phagozytosefähigkeit. Dadurch werden von den dendritischen Zellen hauptsächlich die zum Zeitpunkt der Aktivierung aufgenommenen Antigene prozessiert, die im Zusammenhang mit einer Veränderung in ihrer Umgebung stehen. Des Weiteren rekrutieren sie an ihre Oberfläche vermehrt peptidbeladene MHC-I- und MHC-II-Moleküle, kostimulatorische Moleküle der B7 Superfamilie, wie CD86 und CD80, und den sog. Reifemarker CD83. Sie synthetisieren Zytokine, ordnen ihr Zytoskelett um und wandern über die Lymphgefäße in die T-Zell-Regionen lokaler Lymphknoten. Bei dieser Migration spielen lymphatische Chemokine (CCL19 und CCL21), die u.a. von Stromazellen der T-Zonen der Lymphknoten gebildet werden, eine entscheidende Rolle: Beide Chemokine binden an den von stimulierten dendritischen Zellen exprimierten Chemokinrezeptor CCR7, der es ihnen ermöglicht, entlang von Chemokingradienten in die T-Zellregionen der Lymphknoten oder der Milz einzuwandern²⁰.

Die dendritischen Zellen können jedoch auch im Zuge der physiologischen Zellerneuerung das Gewebe verlassen und im nicht-, bzw. partiellaktivierten Zustand in den drainierenden Lymphknoten gelangen. Kommt es dort zur Interaktion mit einer für das präsentierte Antigen spezifischen T-Gedächtniszelle, die den CD40-Liganden (CD40L) exprimiert, kann die dendritische Zelle auch im Lymphknoten von der aktivierten T-Gedächtniszelle stimuliert werden und damit zur Reifung gelangen. In Folge initiiert eine reife dendritische Zelle im Lymphknoten einen Selektionsprozess in dessen Verlauf

für das präsentierte Antigen spezifische T-Zellen zur Proliferation und Ausbildung einer Effektorfunktion gebracht werden: T-Zellen, die jeweils für ein Antigen mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) spezifisch sind, befinden sich im Lymphknoten und suchen die Oberfläche dendritischer Zellen nach präsentierten antigenen Epitopen ab. $CD4^+$ T-Helferzellen erkennen antigene Determinanten, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden, CTL hingegen die über MHC-I-Moleküle präsentierten. Je nach Differenzierung können T-Helferzellen sowohl auf die B-Zell-vermittelte humorale Immunantwort (als Th2-Zellen) als auch auf die CTL-vermittelte zelluläre Immunantwort (als Th1-Zellen) Einfluss nehmen. Mit Hilfe der sog. „Kreuzpräsentation“ sind dendritische Zellen in der Lage, Determinanten von aufgenommenem, exogenem Antigen auf MHC-I-Molekülen CTL zu präsentieren und diese zu aktivieren²¹. Diese TCR-MHC-Bindung bildet die Grundvoraussetzung für die Aktivierung einer T-Zelle (Signal 1). Die Aktivierung der T-Zellen durch die dendritische Zelle läuft jedoch über mindestens zwei weitere Signale: Zum einen durch den Kontakt kostimulatorischer Moleküle der dendritischen Zelle (z.B. CD86 oder CD80) mit entsprechenden Rezeptoren auf T-Zellen (z.B. CD28 oder CTLA-4)²², zum anderen über Zytokine, die das funktionelle Profil der T-Zelle beeinflussen. Erkennt eine naive T-Zelle eine antigene Determinante auf einer unreifen dendritischen Zelle, so bleibt das Signal der kostimulatorischen Moleküle aus. Die T-Zelle wird dadurch in Anergie versetzt²³. Dieses vereinfachte Modell wurde jedoch durch neue Untersuchungen in Frage gestellt, in denen gezeigt wurde, dass reife dendritische Zellen sowohl Immunität als auch Toleranz aktiv erzeugen können²⁴.

Die aktivierten T-Zellen wandern dann, auf einer bisher noch nicht im Detail geklärten Weise, in das periphere Gewebe, in dem der die Immunantwort auslösende Prozess stattfindet. Dort kann die aktivierte T-Zelle ihre Effektorfunktion ausüben, zum Beispiel eine virusspezifische CTL eine infizierte Zelle abtöten. Auch kann die reife dendritische Zelle Akteure der unspezifischen Immunantwort, wie zum Beispiel natürliche Killerzellen (NK-Zellen), NK-T-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren²⁵. Da NK-Zellen über von MHC-Molekülen unabhängigen Mechanismen Tumorzellen zerstören können, ist dies besonders bei MHC-I-negativen Tumoren von Bedeutung²⁶. Das weitere Schicksal der

dendritischen Zelle im Lymphknoten ist noch nicht genau geklärt. Aktivierte dendritische Zellen scheinen jedoch auszubrennen und schließlich in die Apoptose zu gehen.

Zwei wesentliche Schritte im Zustandekommen einer T-Zellantwort, nämlich die Aktivierung der dendritischen Zelle und die Frage der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen, den sog. T-Helferzellen (Th-Zellen), in Effektorzellen, werden, da ihr Verständnis die Grundlage für den Zugang zu dieser Arbeit liefert, im Folgenden vertieft.

1.3.2 Die Aktivierung von dendritischen Zellen und das Modell der Gefahrensignale

Wird eine Körperzelle von einem Virus befallen oder entartet sie, so werden oft körperfremde Proteine exprimiert, deren antigene Determinanten von T-Zellen erkannt werden können. Derartig veränderte Zellen können dadurch von CTL getötet werden. Wie aber erhalten die CTL diese „Lizenz zum Töten“?

Das klassische Modell der Fremd-Eigen-Erkennung geht von folgendem aus: T-Helferzellen und CTL erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor gleichzeitig auf einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) antigene Determinanten. Die durch diese Bindung aktivierte T-Helferzelle stimuliert mit Hilfe von Zytokinen oder CD40L eine CTL, welche sich durch die Bindung an derselben APC in unmittelbarer Nachbarschaft befindet. Die so aktivierte CTL proliferiert und übernimmt ihre Effektorfunktion^{27,28}. Dieses Modell gilt inzwischen jedoch als überholt. Denn die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer gleichzeitigen Begegnung von für dasselbe Antigen spezifischen T-Helferzelle und CTL auf derselben APC kommt, ist sehr gering. Spätestens jedoch als es 1987 Buller et al. gelang nachzuweisen, dass eine zytotoxische Immunreaktion auch in Abwesenheit von T-Helferzellen induziert werden kann²⁹, entstanden alternative bzw. ergänzende Modelle. Ins Zentrum der Aufmerksamkeit rückte das sog. "licensing model" oder, frei übersetzt, das Prinzip der Autorisierung. Hiernach übernimmt die dendritische Zelle einen aktiveren Part bei der Induktion einer Immunantwort, indem sie sowohl T-Helferzellen als auch CTL direkt stimuliert. Ein gleichzeitiger Kontakt beider T-Zellarten mit der APC ist hierbei nicht nötig. Um

diese Funktion effizient erfüllen zu können muss die dendritische Zelle ausgereift sein. Diese reife dendritische Zelle bezeichnet Matzinger als „autorisiert“³⁰, und zwar dazu, das Töten infizierter oder entarteter körpereigener Zellen zu veranlassen. Bleibt zu klären, was die dendritische Zelle zur Reifung stimuliert, was sie also autorisiert. Hier taucht nun der Begriff der Gefahrensignale auf³¹. Demnach wird das Immunsystem davon entbunden, alleine zu entscheiden, ob eine Immunantwort gegen ein Antigen eingeleitet wird. Vielmehr obliegt diese Entscheidung nun Vorgängen im Gewebe, für dessen Schutz das Immunsystem letztendlich verantwortlich ist. Kommt es in einem Gewebe zu Entzündungen oder Verletzungen, so wird dies der dendritischen Zelle mit Hilfe von Gefahrensignalen übermittelt. Sie wird dadurch stimuliert, reift aus und löst im drainierenden Lymphknoten eine Immunantwort aus, wozu sie ohne die Stimulation durch ein Gefahrensignal nicht in der Lage wäre.

Eine Theorie, die verständlich wird, betrachtet man die inzwischen identifizierten endogenen und exogenen Gefahrensignale: Exogene Gefahrensignale entstehen durch die Invasion von pathogenen Erregern, wie Bakterien, Viren oder Helminthen. So erfolgt eine Aktivierung dendritischer Zellen zum Beispiel durch die Liganden sogenannter Toll-like-Rezeptoren (TLR), wie bakteriellen Lipopolysacchariden (TLR 4)³², Cytidin-Guanosin-Dinukleotid (CpG)-reicher bakterielle DNA (TLR 9)³³, viraler Doppelstrang-RNA (TLR 3)³⁴ oder für Helminthen spezifischen Glykanen (TLR 4)³⁵.

Im Organismus gebildete Aktivatoren dendritischer Zellen bezeichnet man als endogene Gefahrensignale. Hierzu zählt man intrazelluläre Nukleotide, wie zum Beispiel ATP. Dieses Nukleotid, das sich normalerweise im Zytosol befindet und nur bei Hypoxie, Entzündung oder mechanischem Zellschaden in den Extrazellulärraum gelangen kann, erwies sich als potenter Reifestimulus, gerade in der Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ ^{36,37}. Dadurch ist zu erklären, wieso dendritische Zellen in der Umgebung von nekrotischen Körperzellen aktiviert werden³⁸. Neben ATP sind auch weitere Metabolite des Adenonukleotidstoffwechsels, wie z. B. Adenosin³⁹ und Harnsäurekristalle⁴⁰, oder Produkte des Prostanoidstoffwechsels, wie PGE_2 ⁴¹, PGD_2 ⁴² oder

Thromboxan A_2 ⁴³, wichtige Modulatoren der Aktivierung dendritischer Zellen. Auch können Zytokine, welche von aktivierten T-Zellen produziert werden, wie zu Beispiel $IL-1\beta$ oder $TNF\alpha$, nicht nur als Teil eines positiven „feedback“ Mechanismus zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle wirken. Sie werden auch von Zellen, die sich im Stress befinden, produziert: $TNF\alpha$ zum Beispiel von verletzten Myokardzellen⁴⁴ oder $IL-1\beta$ von Keratinozyten im Rahmen eines entzündlichen Prozesses⁴⁵. Sie übernehmen somit die Rolle echter, endogener Gefahrensignale und können an der Induktion einer Immunantwort wesentlich beteiligt sein.

Sowohl als Teil eines positiven „feedback“ Mechanismus als auch als zellgebundene Gefahrensignale können Moleküle der TNF-Superfamilie bezeichnet werden, wie zum Beispiel CD154. CD154 wird, da es an das Oberflächenmolekül CD40 der dendritischen Zelle bindet, auch CD40-Ligand (CD40L) genannt. CD40 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und wird von allen Antigen präsentierenden Zellen (APC) exprimiert⁴⁶. CD40L wird sowohl von aktivierten Blutplättchen⁴⁷ und entzündlich verändertem Gefäßendothel⁴⁸ als auch von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen exprimiert⁴⁹. Aktivierte Blutplättchen, welche nur nach Gewebeläsionen in Kontakt mit dendritischen Zellen kommen, sowie im Rahmen einer Infektion aktivierte T-Helferzellen sind damit in der Lage, über CD40L die Reifung von dendritischen Zellen zu induzieren⁵⁰. Somit wirkt CD40L - im Gegensatz zu löslichen Zytokinen - als zellgebundenes Gefahrensignal. Eine Interaktion von CD40/CD40L erhöht auf der dendritischen Zelle die Expression kostimulatorischer Moleküle und induziert eine Zytokinsynthese, zum Beispiel von $IL-12$. Auf Seiten der T-Helferzelle führt diese Interaktion zu einer höheren Proliferationsrate und einer vermehrten $IL-2$ Produktion⁵¹.

Zu den induzierbaren, endogenen Gefahrensignalen können zudem die Typ I Interferone (Interferon α und β) gezählt werden³¹. Typ I Interferone werden von virusinfizierten Körperzellen freigesetzt und hemmen die Virenreplikation. Außerdem aktivieren Typ I Interferone NK-Zellen und CTL⁵². Die Wirkung von Typ I Interferonen auf dendritische Zellen ist umstritten. Einerseits gibt es im Mausmodell Hinweise auf einen reifeinduzierenden Effekt von Typ I

Interferonen⁵³, andererseits aber konnte bei Untersuchungen an humanen dendritischen Zellen dieser Effekt nicht nachgewiesen werden⁵⁴. Vielmehr wurde unter IFN α -Einfluss eine gestörte Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten beobachtet⁵⁵.

Die bisher angeführten Gefahrensignale und viele weitere stehen durch die Induktion der Reifung dendritischer Zellen am Anfang einer spezifischen Immunantwort.

1.3.3 Die Induktion einer Th1- oder Th2- gerichteten Immunantwort

T-Helferzellen (Th), können, wie unter 1.3.1 bereits erwähnt, nach dem Kontakt mit dem MHC-II-Molekül einer aktivierten dendritischen Zelle in unterschiedliche Richtungen differenzieren: Mit der Polarisation der naiven T-Helferzelle (Th0) in eine als Th1 oder Th2 bezeichnete Subpopulation, fällt die Entscheidung, ob eine humorale oder zelluläre Immunantwort erfolgt. Die Zusammenhänge, welche zur unterschiedlichen Differenzierung der T-Helferzellen führen sind noch nicht vollständig verstanden. Ausschlaggebend ist das Zytokinmilieu, welches vor allem von dendritischen Zellen und bereits differenzierten T-Helferzellen produziert wird.

IL-12 wird als das Schlüssel-Zytokin zur Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort angesehen^{56,57,58,59}. Das bioaktive IL-12-Molekül ist ein Heterodimer (IL-12p70) und setzt sich aus einer 35-kDa (=IL-12p35) und 40-kDa (=IL-12p40) Untereinheit zusammen^{60,61}. Die IL-12p40 und IL-12p35 Untereinheiten sind alleine nicht bioaktiv. IL12p40 kann als Homodimer, zumindest in der Maus, einen IL-12-antagonistischen Effekt erzeugen⁶². Die IL-12 Expression wird bei dendritischen Zellen zum Beispiel nach Kontakt mit LPS, Bakterien oder viraler Doppelstrang-RNA induziert⁶³. Zwei neue Zytokine, die strukturell mit IL-12 verwandt sind, wurden erst kürzlich beschrieben: IL-27 wirkt auf naive T-Zellen⁶⁴ und IL-23 auf T-Gedächtniszellen⁶⁵. Beide sind, wie auch IL-12, für eine Th1-Differenzierung von T-Helferzellen verantwortlich. Die Th1-Zelle sezerniert vor allem IFN γ , TNF α und IL-2. Dies hemmt auf der einen Seite die Differenzierung von Th0- zu Th2-Zellen und fördert zudem die Aktivierung von CTL. Diese Art der Immunantwort richtet sich gegen Körperzellen, die

entweder entartet oder von bestimmten pathogenen Erregern, wie zum Beispiel Viren, befallen sind. Außerdem können Th1-Zellen über $\text{IFN}\gamma$ Makrophagen zur effektiven Elimination intrazellulärer Erreger, wie z.B. Mykobakterien, aktivieren.

Bestimmte Erreger, wie Helminthen, oder endogene Gefahrensignale, wie das Cholera-toxin oder Prostaglandin E_2 , induzieren jedoch bei dendritischen Zellen kein $\text{IL-12}^{66,67,68}$ und fördern dadurch die Differenzierung von Th0- in Th2-Zellen. Diese verhindern wiederum über die Sekretion von IL-10 und $\text{TGF-}\beta$ das Entstehen von Th1-Zellen und fördern über die Sekretion von IL-4 und IL-5 die weitere Th2-Differenzierung⁶⁹. Th2-Zellen initiieren eine humorale Immunantwort, welche durch eine Erhöhung des Antikörpertiters aller Immunglobulinklassen gekennzeichnet ist. Zudem geht sie mit einer gesteigerten Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen einher. Diese Art der Immunreaktion richtet sich vor allem gegen zahlreiche Bakterien, Protozoen und Helminthen.

Eine dritte Subpopulation von T-Helferzellen sind sog. regulatorische T-Zellen, die sich durch die Produktion von IL-10 und $\text{TGF-}\beta$ auszeichnen und antigenspezifische T-Zellen über diesen Mechanismus hemmen. Dies erzeugt Toleranz und scheint eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von Autoimmunität zu spielen⁷⁰.

Im Rahmen der Tumorthherapie mit dendritischen Zellen ist die Generierung von CTL das Ziel und damit die Schaffung eines Th1-Zytokinmilieus Prämisse. Messen lässt sich eine erfolgte Th1-Immunantwort durch die Bestimmung von $\text{IFN}\gamma$ in der T-Zellkultur. IL-4 und IL-10 im Überstand weisen hingegen auf eine Th2-Immunantwort hin.

Ein Parameter zur Beurteilung der T-Zellaktivierung stellt das Oberflächenmolekül CD45 dar. Im Laufe der Differenzierung sowohl der T-Helferzellen als auch der CTL vollzieht sich ein charakteristischer Wechsel der CD45-Isoformen: Naive T-Zelle exprimieren die Isoform CD45RA, aktivierte T-Zellen, bzw. T-Gedächtniszellen, hingegen die Isoform CD45RO. Die genaue Funktion dieses Oberflächenmoleküls, einer Oberflächenphosphatase, ist bis

dato unklar. Es ist aber für die Differenzierung von naiven und aktivierten Lymphozyten von Nutzen^{71,72}.

1.4 Dendritische Zellen in der Immuntherapie

Durch eine Immuntherapie mit Hilfe dendritischer Zellen beabsichtigt man, wie bereits erläutert, eine Induktion einer tumorgerichteten Immunreaktion. Die gängige Strategie liegt darin, dendritische Zellen *in vitro* zu generieren, mit Antigen zu beladen und zu aktivieren. Die so gewonnene DC-Vakzine wird anschließend dem Patienten appliziert. Neben der Gewinnung der dendritischen Zellen sind Antigenbeladung und Aktivierung die beiden wichtigen Stellgrößen, wenn es darum geht, die Effektivität einer Vakzine zu optimieren.

1.4.1 Antigenaufbereitung und -applikation im Rahmen der Immuntherapie

Im Rahmen einer Immuntherapie mit dendritischen Zellen ist die Wahl des Antigens und die Art und Weise der Antigenaufbereitung eine vieldiskutierte Frage. Zwar ist es möglich, eine tumorantigenspezifische Immunantwort unter Verwendung eines einzelnen Peptides als Antigen zu erzeugen, aber dies birgt die Gefahr, dass sich die Tumorzelle durch eine einzige Mutation in dem das Peptid kodierenden DNA-Abschnitt der Tötung durch CTL entzieht¹⁵. Die Verwendung mehrerer unterschiedlicher Peptide kann zu einer Steigerung der Effektivität der Vakzinierung führen⁷³. Zudem kann die gleichzeitige Verwendung von MHC-I- und MHC-II-restringierten Peptiden die Induktion von CTL erhöhen, da hierdurch antigenspezifische T-Helferzellen passiv auf die CTL-Generierung einwirken können. Es ist jedoch schwierig, für jeden Tumor eine ausreichend große Anzahl an spezifischen, MHC-I- und MHC-II-restringierten Peptiden zu identifizieren, die zudem von den vom Patienten exprimierten MHC-Molekülen präsentiert werden. Diese Nachteile können umgangen werden, indem dendritische Zellen eines Patienten mit aufbereitetem, autologem Tumormaterial *in vitro* inkubiert werden. Dadurch können von der dendritischen Zelle die für den Tumor wesentlichen Antigene aufgenommen werden und potentiell MHC-I- und MHC-II-Epitope generiert werden, die für eine produktive Immunantwort wesentlich sind. Dieses

Vorgehen hat des Weiteren zum Vorteil, dass sich eine so induzierte Immunantwort gegen eine möglichst große Anzahl von antigenen Determinanten richtet, was dem Tumor die Resistenzentwicklung durch Mutation erschweren kann. Allerdings bedeutet der Gebrauch autologen Tumormaterials einen nicht zu unterschätzenden Aufwand. Durch die Asservierung von Tumormaterial während Operationen, die in kurativer oder diagnostischer Absicht durchgeführt werden, lassen sich jedoch durch geeignete Methoden der Tumoraufbereitung Antigene für eine spätere Verwendung gewinnen. Nach Etablierung entsprechender Verfahrensabläufe ist daher eine Gewinnung und Aufbereitung von patienteneigenem Tumorgewebe praktisch gut durchführbar.

Bei der Verwendung von autologem Tumorzellen werden verschiedene Techniken der Gewebeaufbereitung diskutiert und es zeigt sich, dass die Wahl des Antigens und die Art der Aufbereitung eine wichtige Stellgröße in der Immuntherapie darstellt. So stellten Schnurr et al. eine Optimierung der durch dendritische Zellen induzierten Immunantwort fest, wenn diese mit Bestandteilen apoptotischer Tumorzellen anstatt mit Tumorzelllysat zur Antigenbeladung inkubiert wurden²⁵. In der Erprobung befindet sich momentan auch das Beladen der dendritischen Zellen mit Tumorzell-RNA⁷⁴, die Verwendung von MHC-I-restingierten Peptiden⁷⁵ und die Hybridisierung dendritischer Zellen mit Tumorzellen⁷⁶.

1.4.2 Aktivierung der dendritischen Zelle im Rahmen der Immuntherapie

Überblickt man die durchgeführten Studien zur Tumorzellvaksinierung der letzten Jahre, in denen aus Monozyten generierten dendritischen Zellen zur Anwendung kamen (Tabelle 1), so stellt man fest, dass die Notwendigkeit einer Stimulation der mit Antigen beladenen Zellen meist nicht berücksichtigt wurde.

Autoren	Tumorart	Stimulation
Nestle et al. 1998 ⁷⁷	Melanom	Keine Stimulation
Thurner et al. 1998 ⁷⁸	Nierenzellkarzinom	TNF α +PGE ₂
Lim et al. 1999 ⁷⁹	Multiples Myelom	Keine Stimulation
Thurner et al. 1999 ¹⁵	Melanom	TNF α
Titzer et al. 1999 ⁸⁰	Multiples Myelom	TNF α
Murphy et al. 1999 ⁸¹	Adenokarzinom der Prostata	Keine Stimulation
Hörtl et al. 2002 ⁸²	Nierenzellkarzinom	TNF α , PGE ₂ , IL-1, IL-6
Lodge et al. 2000 ⁸³	Adenokarzinom der Prostata	Keine Stimulation
Schuler-Thurner et al. 2000 ⁸⁴	Melanom	Autologes, Monozyten-konditioniertes Medium
Fong et al. 2001 ⁸⁵	CEA-positive Lungen- oder Kolontumore	Keine Stimulation
Kurokawa et al. 2001 ⁸⁶	Nieren Ca	Keine Stimulation
Geiger et al. 2001 ⁸⁷	Solide Tumoren des Kindesalters	Keine Stimulation
Schott et al. 2001 ⁸⁸	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	TNF α
Fong et al. 2001 ⁸⁹	Adenokarzinom der Prostata	Keine Stimulation
Heiser et al. 2001 ⁹⁰	Adenokarzinom der Prostata	Keine Stimulation
Azuma ⁹¹	Nierenzellkarzinom	Keine Stimulation
Hernando et al. 2002 ⁹²	gynäkologische Tumore	TNF α
Gilliet et al. 2003 ⁹³	Melanom	Keine Stimulation
Su et al. 2003 ⁹⁴	Nierenzellkarzinom	Keine Stimulation
Iwashita et al. 2003 ⁹⁵	Hepatozelluläres Karzinom	TNF α
Marten et al. 2003 ⁹⁶	Nierenzellkarzinom	Keine Stimulation

Tabelle 1: Zusammenstellung der klinischen Studien mit aus Monozyten generierten dendritischen Zellen und den angewandten Stimulationsschemata.

Dies mag daran gelegen haben, dass zum Zeitpunkt der Festlegung der Studienprotokolle die wesentlichen funktionellen Unterschiede zwischen reifen und unreifen dendritischen Zellen weitgehend unbekannt waren. Nachdem aber eine Studie von Jonuleit et al. 2001 Hinweise erbrachte, dass reife dendritische Zellen in der Induktion einer Immunantwort *in vivo* unreifen dendritischen Zellen deutlich überlegen sind⁹⁷ und im gleichen Jahr Dhodapkar et al. ebenfalls *in vivo* einen negativen Einfluss unreifer dendritischer Zellen auf die T-Zelleaktivierung entdeckten⁹⁸, fand die Suche nach effektiven Stimulationsschemata wissenschaftliches Interesse. Ein systematischer Vergleich verschiedener DC-aktivierender Stimuli, wie zum Beispiel TCR-Liganden, CD40L und Zytokinen, im Bezug auf die Induktion einer produktiven Immunantwort, steht jedoch weiterhin aus.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit gilt der Verbesserung eines Studienprotokolls, das im Rahmen einer klinischen Studie zur Therapie des metastasierten Pankreaskarzinoms Anwendung finden soll. In vorangegangenen Dissertationen, die in unserer Arbeitsgruppe verfasst wurden, wurde ein Modell zur *in vitro* Generierung von T-Zellen, die Pankreaskarzinomzellen spezifisch erkennen und lysieren, im halbautologen System etabliert⁹⁹. Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die Aufbereitung des Antigens einen wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß der induzierten Immunantwort besitzt²⁵.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, den Einfluss der Stimulation dendritischer Zellen auf die Immunantwort *in vitro* systematisch zu untersuchen. Diese Untersuchungen werden vor dem Hintergrund durchgeführt, dendritische Zellen mit Hilfe geeigneter Stimulation zur Induktion einer möglichst effektiven Immunantwort zu verhelfen und damit die Effektivität einer Vakzinierungsstrategie, die auf dendritischen Zellen basiert, zu optimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Zentrifuge:	„Omnifuge 2.0 RS“ Heraeus (München)
Brutschrank:	„BBD 6220“, Heraeus (München)
Durchflusszytometer (FACS):	„FACSCalibur“ Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISA-Platten-Lesegerät:	“MRX” Dynatech Laboratories (Sullyfield, GB)
γ -Counter:	„1480 Wizard 3“ Gamma Counter“ Wallac Oy (Turku, Finnland)
MACS-Vorrichtung:	„Vario-MACS“ Milteny Biotech (Auburn, USA)
Phasenkontrastmikroskop:	„LSM 410 Invert“ Carl Zeiss (Jena)
Hybridisierungsöfen:	Certomat [®] H, B.Braun (Melsungen)
Kühlschrank:	Bosch (Stuttgart)
Gefrierschrank:	Linde (Wiesbaden)
Elektronische Pipette:	Pipetus [®] -akku, Hirschmann (Eberstadt)
Manuelle Pipetten:	20, 100, 250, 1000 μ l Eppendorf (Hamburg)
Flaschenschaukel:	DE24, Desaga (Berlin)
Neubauer-Zählkammer:	LO-Laboroptik (Friedrichsdorf)
Einfrierkontainer:	Qualilab Bender und Hobein (München)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE):	Molecular Probes Inc. (Eugene, USA)
Trypanblau:	Sigma (St. Louis, USA)
Dimethylsulphoxid (DMSO):	Sigma (St.Louis, USA)
TritonX:	Sigma (St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA):	Sigma (St.Louis, USA)

Na-Heparin:	B.Braun (Melsungen)
TWEEN 20:	Sigma (St. Louis, USA)
Schwefelsäure 2 M:	Apotheke des Klinikums Innenstadt der LMU München
Antibiotikum G418:	Institut für Immunologie der LMU München

2.1.3 Radioaktive Chemikalien

Na ₂ ⁵¹ CrO ₄ (10 mCi/ml):	Amersham (Freiburg)
---	---------------------

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Sterilfiltrationsvorrichtung:	Corning (New York, USA)
50 ml Teströhrchen, steril:	Greiner (Frickenhausen)
50 ml Leukosept Teströhrchen:	Greiner (Frickenhausen)
15 ml Teströhrchen, steril:	Sarstedt (Nümbrecht)
FACS-Röhrchen:	Becton Dickinson (Heidelberg)
γ-Counter-Röhrchen:	Falcon (Heidelberg)
175ml Zellkulturflaschen:	Greiner (Frickenhausen)
6-/12-/24-Well Platten:	Falcon (Heidelberg)
96-Well Rundbodenplatte:	Falcon (Heidelberg)
96-Well Flachbodenplatte:	Falcon (Heidelberg)
96-Well ELISA-Platten:	Corning (New York, USA)
Zellschaber:	Greiner (Frickenhausen)
2/200/1000 µl Pipettenspitzen:	Eppendorf (Hamburg)
10/25 ml Pipetten:	Sterilin (Staffordshire, GB)
Sterilfilter (0,2 µm):	Minisart, Sartorius (Göttingen)
120 ml Perfusor-Spritzen:	Braun (Melsungen)
Braunülen zu Blutentnahme:	Braun (Melsungen)
Kryo-Röhrchen:	Greiner (Frickenhausen)

2.2 Reagenziensätze

IFN _γ -ELISA:	Opteia™, BD Pharmingen (San Jose, USA)
--------------------------	---

IL-10-ELISA:	Opteia™, BD Pharmingen (San Jose, USA)
IL-4-ELISA:	Opteia™, BD Pharmingen (San Jose, USA)
IL12p70- -ELISA:	Opteia™, BD Pharmingen (San Jose, USA)
IL-12p40/p35-ELISA:	Bender MedSystems TM, (Wien, Österreich)
Rh Annexin V/FITC Detektionsset:	Bender MedSystems TM, (Wien, Österreich)
Magnetische Zellseparation:	„MACS untouched T cell kit“, Milteny Biotech (Auburn, USA)

2.3 Zytokine, Chemokine und ATP

GM-CSF:	„Leukomax®“ Novartis (Basel, Schweiz)
TNF α :	R&D Systems (Wiesbaden)
β - γ Methyl ATP:	Sigma (St. Louis, USA)
Prostaglandin E ₂ :	Sigma (St. Louis, USA)
IL-1 β :	Strathmann Biotech (Hannover)
IL-2:	Strathmann Biotech (Hannover)
IL-4:	Promega (Madison, USA)
IL-6:	Strathmann Biotech (Hannover)
IL-7:	Strathmann Biotech (Hannover)
IFN α :	Strathmann Biotech (Hannover)

2.4 Puffer, Lösungen, Medien und Seren

Phosphat gepufferte Salzlösung

(PBS):	Boehringer (Mannheim)
HEPES-Puffer:	Sigma (St. Louis, USA)
MACS-Puffer (entgast):	PBS + 0,02% EDTA + 2% humanes AB Serum
Annexin V Bindungspuffer:	10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl ₂
Ficoll-Hypaque:	Biochrom (Berlin)

Fötale Kälberserum:	Biochrom (Berlin)
Humanes AB Rh+ Serum:	BioWhittaker (St. Louis, USA)
L-Glutamin:	GibcoBRL (Paisley, USA)
Penicillin-Streptomycin:	Sigma (St. Louis)
RPMI 1640-Medium:	Biochrom (Berlin)
Glucose:	Glucosteril 40% TM (Fresenius, Bad Homburg)

Dem RPMI-1640 Medium wurden 1% L-Glutamat, 1% Penicillin und 2% humanes Serum der Blutgruppe AB, Rhesusfaktor positiv zugefügt. Es wird in dieser Zusammensetzung fortan als „AB-Medium“ bezeichnet.

RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 1% L-Glutamat, 1% Penicillin und 10% fötalem Kälberserum (FCS) diente als Medium für die Kultur der Tumorzelllinien und den CD40L-transfizierten Fibroblasten mit der CD40L-negativen Kontrollzelllinie und wird im Folgendem „FCS-Medium“ genannt. Das Medium der Fibroblastenzelllinien (CD40L-transfizierte und Kontrollzelllinie) wurde zusätzlich noch mit dem Aminoglykosid G418 in einer Konzentration von 500 µg/ml supplementiert. Beide Zelllinien waren mit einem Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum transfiziert, so dass ein selektives Wachsen der Fibroblasten gewährleistet war.

Das Medium zum schadlosen Einfrieren und Auftauen von Zellen, ab jetzt als „Einfriermedium“ bezeichnet, bestand aus 85% humanem AB-Serum, 5% RPMI Glucose und 10% DMSO¹⁰⁰.

2.5 Antikörper

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Herkunft
HLA-DR,DQ,DP	MHC-II	Tü39	Maus IgG _{2a,κ}	Pharmingen (San Diego,USA)
W6/32	MHC-I	W6/32	Maus IgG _{2a,κ}	Serotec (Oxford, GB)
CD3	TCR-Komplex	HIT3a	Maus IgG _{2a,κ}	Pharmingen (San Diego,USA)
CD4	D1 Domäne	RPA-T4	Maus IgG _{1,κ}	Pharmingen (San Diego,USA)
CD8	α-UE	M-T701	Maus IgG _{1,κ}	Pharmingen (San Diego,USA)
CD14	CD14	M5E2	Maus IgG _{2a,κ}	Pharmingen (San Diego,USA)
CD19	CD19	B43	Maus IgG _{1,κ}	Pharmingen (San Diego,USA)

CD45RO	180-kDa UE LCA	UCHL-1	Maus IgG _{2a}	Pharmingen (San Diego, USA)
CD45RA	Mr 220-kDa UE LCA	L48	Maus IgG ₁	Pharmingen (San Diego, USA)
CD56	220/135kD Iso.	B159	Maus IgG _{1,κ}	Pharmingen (San Diego, USA)
CD69	CD69	FN50	Maus IgG _{1,κ}	Pharmingen (San Diego, USA)
CD80	B7/BB1	L307.4	Maus IgG _{1,κ}	Pharmingen (San Diego, USA)
CD83	CD83	HB15e	Maus IgG _{1,κ}	Pharmingen (San Diego, USA)
CD86	B70/B7-2	IT2.2	Maus IgG _{2a,κ}	Pharmingen (San Diego, USA)
Pan γ/δ	$\gamma\delta$ TCR (V γ 9)	B3	Maus IgG _{2a,κ}	Pharmingen (San Diego, USA)
CCR7	CCR7	3D12	Ratte IgG ₂	Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-rat IgG _{2a}	Pooled rat Ig ¹	MRK-1	Maus IgG _{2a}	Pharmingen (San Diego, USA)
Streptavidin	-	-	-	Pharmingen (San Diego, USA)

2.6 Software

FACS: CellQuest[®], Version 3.2.1f1, Becton Dickinson (San Jose, USA)

ELISA: ClarisWorks[®], Version 5.0Dv1, Claris Corporation (Santa Clara, USA)

2.7 Zelllinien

2.7.1 Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1

Die HLA-A2 positive Zelllinie Panc-1 hat ihren Ursprung in Zellen eines duktales Pankreaskarzinoms und wurde bezogen von: The European Collection of Animal Cell Cultures. Die Zellen wuchsen in FCS-Medium adhärent in Kulturflaschen und besaßen eine durchschnittliche Verdoppelungszeit von 52 h. Die maligne Natur dieser Zelllinie wird in der Literatur anhand von zwei Phänomenen beschrieben: Sie zeigt zum einen Wachstum auf Softagar und auf einer Fibroblasten-Einzellschicht und zum anderen induziert sie nach Injektion in athymen Nacktmäuse das Wachstum eines progressiv wachsenden aplastischen Karzinoms¹⁰¹.

2.7.2 Magenkarzinomzelllinie Kato-III

Die Magenkarzinomzelllinie Kato-III, ebenfalls HLA-A2 positiv, wurde bezogen von: American Type Culture Collection. Gewonnen wurde diese Zelllinie aus einem Pleurapunktat eines 55-jährigen Patienten, der an einem Siegelringkarzinom erkrankt war. Die Malignität dieses Tumors wurde auf

molekularer Ebene charakterisiert. Sie besitzt eine Deletion im Bereich des Tumorsuppressorgenes p53¹⁰².

2.7.3 CD40L-transfizierte Fibroblastenzelllinie BHK256 mit Kontrollzelllinie

Bezogen wurde diese CD40L-transfizierte Fibroblastenzelllinie von: American Type Culture Collection. Sowohl die CD40L positive als auch die CD40L negative Zelllinie waren mit einem Resistenzgen für das Antibiotikum G418 transfiziert.

2.8 Aktivierung dendritischer Zellen mit löslichem CD40Ligand-Trimeren (sCD40L)

In den Kokulturen wurde die CD40-Ligation nicht durch die CD40L positiven Fibroblasten erreicht, sondern durch einen löslichen, CD40 bindenden, aktivierenden Antikörper in Trimerform (sCD40L). Selbiger hat in der Langzeitkokultur, in der ja eine Immunantwort gegen ein Antigen induziert werden soll, den Vorteil, den Anteil unerwünschten Antigens in der Kultur so gering wie möglich halten zu können. Der CD40L-Trimer wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml verwendet. Diese Konzentration erwies sich in Vorversuchen als optimal bzgl. der Ausreifung dendritischer Zellen. Der CD40L-Trimer wurde uns freundlicherweise von der Immunex Corporation, Seattle (USA), zur Verfügung gestellt.

2.9 Kultursysteme

2.9.1 Kultur der Tumorzelllinien

Die Zellkulturen wurden in einem Kulturschrank der Firma Haereus (München) bei 37°C und einem 5%igen CO₂-Gehalt kultiviert. Die Zellen wuchsen in einer liegenden 175 ml Kulturflasche in FCS-Medium. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium dekantiert und die am Boden der Flasche adhätierenden Zellen für fünf Minuten auf Eis mit 0,01%iger EDTA-Lösung inkubiert. Die nun vom Kulturflaschenboden abgelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen, zentrifugiert und in reduzierter Dichte wieder in Kultur gebracht.

2.9.2 Kultur der Fibroblastenzelllinie

Die Kultivierung der Fibroblastenzelllinien erfolgte analog der Tumorzelllinien. Nur wurde dem Medium noch das Antibiotikum G418 zugesetzt. Vor dem Einsatz in der Kokultur wurden die Fibroblasten zweimal in AB-Medium gewaschen, um das FCS und das Antibiotikum zu entfernen. Vor der Verwendung wurden die Zellen mit 30 Gy bestrahlt, um eine Proliferation in der Kultur zu verhindern.

2.10 Generierung humaner, Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen und Gewinnung naiver T-Zellen

2.10.1 Gewinnen mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Die Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) erfolgte über eine Ficollseparation, der folgendes Prinzip zugrunde gelegt ist: Ficoll ist ein polysaccharidähnliches Makromolekül mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Schichtet man auf Ficoll Vollblut und zentrifugiert dieses bei hoher Umdrehungszahl (angegeben in „g“ als Vielfaches der Zentripetalbeschleunigung der Erde), so trennt sich das Vollblut in charakteristischer Weise auf: Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) befinden sich dann an der Grenzschicht von Serum und Ficoll (sog. Blutserum/Ficoll-Interphase), Granulozyten und Erythrozyten wandern aufgrund ihrer höheren Dichte in, bzw. durch das Ficoll und konzentrieren sich daher am Boden des Zentrifugenbehältnisses (s. Abbildung 1). Thrombozyten hingegen verbleiben größtenteils in der Serumschicht oberhalb des Ficolls. In der Praxis wurde die Ficollseparation in folgender Weise durchgeführt: Jeweils 30 ml heparinisierten Vollblutes gesunder Spender, im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt, wurden in einem 50 ml Teströhrchen über 15 ml Ficoll-Hypaque geschichtet und für 15 min bei 1000 g und 20°C zentrifugiert. Danach wurden Zellen in der Interphase vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und dreimal mit PBS gewaschen (10 min., 300 g, 1x bei 20°C und 2x bei 4°C), um die gewonnenen PBMCs von Plasmabestandteilen und Thrombozyten zu reinigen.

Wurden statt Vollblut Leukapherese-Produkte, sog. „Buffy Coats“ (Bezug: Universität Greifswald, Institut für Transfusionsmedizin), verwendet, so betrug

das Verhältnis Blut:PBS 1:1. Das weitere Vorgehen entsprach der Verarbeitung von Vollblut.

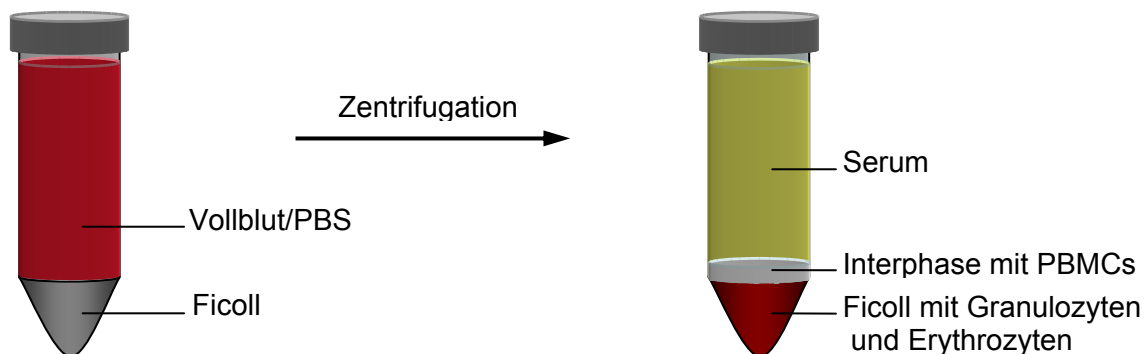


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Ficollseparation zur Gewinnung von mononukleären Zellen. Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) befinden sich nach dem Zentrifugieren an der Grenzschicht von Serum und Ficoll (sog. Blutserum/Ficoll-Interphase), Granulozyten und Erythrozyten wandern aufgrund ihrer höheren Dichte in, bzw. durch das Ficoll und konzentrieren sich daher am Grund des Zentrifugenröhrchens. Thrombozyten verbleiben in der Serumschicht oberhalb des Ficolls.

2.10.2 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Die mit der Ficollseparation gewonnenen mononukleären Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von 2 Mio. Zellen/ml mit vorgewärmtem AB-Medium eingestellt. Jeweils 25 ml dieser Zellsuspension wurden in einer liegenden 175 ml Kulturflasche zwei Stunden lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Fähigkeit zur Adhäsion am Boden der Kulturflasche von Monozyten wurde zu ihrer Anreicherung ausgenutzt. Zunächst wurden das gesamte Medium sowie die nichtadhärenten Zellen aus der Kulturflasche abpipettiert und separat aufbewahrt. Die restlichen nichtadhärenten Zellen, welche sich noch in der Kulturflasche befanden, konnten durch sanftes Schütteln der Flasche nach Zugabe von 20 ml, 20°C warmen PBS ebenfalls entfernt werden. Das PBS wurde dekantiert, verworfen, und derselbe Schritt wiederholt.

Die adhärenente Zellfraktion, die überwiegend aus Monozyten bestand, wurde mit 25 ml AB-Medium überschichtet und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit lösten sich die Monozyten wieder vom Flaschenboden. In einigen Fällen kam zur Erhöhung der Zellausbeute ein Zellschaber zu Einsatz, mit dessen Hilfe Zellen, die nach 24 h immer noch am Flaschenboden

adhärierten, gelöst wurden. Die so gewonnene Monozytensuspension wurde in ein 50 ml Teströhrchen überführt, bei 4°C und 350 g für 10 min zentrifugiert, danach das Medium dekantiert und das verbleibende Zellpelett in AB-Medium resuspendiert, so dass eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml resultierte. Diese Zellen wurden in 6-Well-Platten überführt, das AB-Medium mit 500 IU/ml IL-4 sowie 1000 IU/ml GM-CSF versetzt und für sechs Tage ohne Medienwechsel im Brutschrank inkubiert, analog zu den veröffentlichten Protokollen zur DC-Generierung von Romani und Sallusto^{8,9}. Nach sechs Tagen differenzieren sich die Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen, was durch eine routinemäßige FACS-Analyse bestätigt wurde.

2.10.3 Gewinnung von naiven CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten mit Hilfe der Magnetischen Zellseparation (MACS)

Um aus Mischpopulationen von mononukleären Zellen definierte Subpopulationen zu isolieren, bietet sich das Verfahren der magnetischen Zellseparation an. Dabei werden spezifische monoklonale Antikörper verwendet, an die paramagnetische Zuckerstrukturen (sogenannte „mikrobeads“) gekoppelt sind. Binden derartig präparierte Antikörper an bestimmte Oberflächenmoleküle der Zielzelle, so kann diese beim Durchtritt durch ein starkes Magnetfeld zurückgehalten werden, wohingegen unmarkierte Zellen ungehindert passieren. Bei der sogenannten Positivselektion stellen die im Magnetfeld zurückgehaltenen Zellen die Zielzellen dar. Bei der Negativselektion die Zellen, welche das Magnetfeld passierten. Letzteres Isolationsverfahren besitzt den Vorteil, dass die Zielzellen keinen Kontakt zu möglicherweise aktivierenden Antikörpern hatten. Diese Methode wurde in dieser Arbeit bei der Selektion von naiven Lymphozyten angewandt:

Die nach dem Adhärenzschritt der Monozyten gewonnenen, nichtadhärenten Zellen stellen eine monozytendepletierte und mit Lymphozyten angereicherte Zellfraktion dar. Aus dieser Zellfraktion wurden naive CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten isoliert. Diese zeichnen sich durch Expression von CD4, bzw. CD8 Molekülen auf ihrer Oberfläche aus, sowie durch die Expression von CD45RA. Sie unterscheiden sich damit von bereits aktivierten T-Zellen, die anstatt CD45RA CD45R0 exprimieren. Folgende MACS-Strategie wurde gewählt:

In einem ersten Schritt wurden die nichtadhärenten Zellen mit einem Cocktail, der mit magnetischen „beads“ bestückte Antikörper gegen CD11b (myeloide Zellen und NK-Zellen), CD16 (neutrophile Zellen, NK-Zellen, Makrophagen), CD19 (B-Zellen), CD36 (Monozyten) und CD56 (NK-Zellen) enthielt, markiert. Nach dem Passieren der Magnetsäule blieben somit fast nur CD8⁺ und CD4⁺ Lymphozyten übrig. Im nächsten Schritt wurden diese mit ebenfalls magnetischen Antikörpern gegen CD45R0 markiert, erneut durch eine Magnetsäule geschickt, und somit in der Negativfraktion naive Lymphozyten gewonnen. Durch eine FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD45RA wurde die Reinheit der so separierten, naiven Lymphozyten ermittelt.

2.11 Antigenbeladung und Aktivierung der dendritischen Zellen

2.11.1 Apoptoseinduktion der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 und Beladen der dendritischen Zellen mit Tumorzellantigenen

Um den Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen auf die Immunantwort *in vitro* untersuchen zu können, bedarf es einer Antigenart, welche die dendritische Zelle nicht stimuliert, wie es z.B. bei Zellbestandteile nekrotischer Zellen der Fall wäre³⁸, und auf der anderen Seite effektiv auf MHC-Molekülen den T-Zellen präsentiert wird. Vorausgegangene Studien untersuchten die Verwendung von Überstand apoptotischer Tumorzellen als Antigenquelle²⁵. Ein entsprechendes Protokoll wurde in dieser Arbeit angewendet.

Nach dem Ernten und Zählen der Panc1-Zellen mit 0,01%iger EDTA-Lösung zur Vermeidung von Zellklumpen wurden sie in einer Konzentration von 10 Mio/ml in AB-Medium überführt und in eine 35 ml Kulturflasche pipettiert. Die Apoptoseinduktion erfolgte, indem die Tumorzellen in einem Inkubator zwei Stunden lang einer Temperatur von 43°C ausgesetzt wurden (Hyperthermieverfahren). Um eine erneute Adhärenz der Zellen während der Apoptoseinduktion zu verhindern, fand die Prozedur unter ständiger Bewegung der Flasche mit Hilfe einer Flaschenwippe statt. Der Apoptoseinduktion folgte die Inkubation der Zellen für 24 h in einem Brutschrank, ebenfalls unter ständiger Bewegung der Kulturflasche. Nach 24 h wurden die Zellen in ein Proberöhrchen überführt, bei 350 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand

abpipettiert. Der Zelldebris im Pellet wurde verworfen und der Überstand als Antigenaufbereitung aufbewahrt. Die Abwesenheit intakter Zellen im Überstand bestätigte eine FACS-Analyse.

Das Beladen der dendritische Zellen mit dem so gewonnenen Tumorantigen erfolgte in einem DC:Tumorzellverhältnis von 1:5, d.h. eine Million dendritische Zellen wurden mit dem Überstand von fünf Millionen apoptotischer Tumorzellen inkubiert. Nach dem Ernten der dendritischen Zellen wurden diese in AB-Medium auf eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml eingestellt und in je nach Versuch verschieden große Kulturplatten überführt. Dem Medium wurden erneut 250 IU/ml IL-4 und 500 IU/ml GM-CSF zugefügt und es erfolgte die Antigeninkubation der dendritischen Zellen mit einer Dauer von zwei Stunden, bevor die Zellen je nach Protokoll aktiviert wurden.

2.11.2 Die Aktivierung der dendritischen Zellen

Die Aktivierung der dendritischen Zellen erfolgte auf verschiedene Weise: Zum Einsatz kamen ATP (100 μ M) und TNF α (1000 IU/ml), jeweils einzeln oder in Kombination, eine Kombination der Zytokine TNF α (1000 IU/ml), IL-1 β (1000 IU/ml) und IL-6 (1000 IU/ml) mit PGE $_2$ (1 mM). Sämtliche Stimuli wurden in An- bzw. Abwesenheit von CD40L im Hinblick auf ihre stimulatorische Potenz untersucht. Zudem wurde der Einfluss der Wahl des Zeitpunkts der Zugabe des CD40L untersucht. So erfolgte die Zugabe des CD40L entweder direkt am Beginn der Stimulation mit den anderen Stimuli oder 12 h nach dem initialen Stimulus. Letzteres wird fortan als „sequentielle Stimulation“ bezeichnet. Durch das Waschen der dendritischen Zellen nach initialer Aktivierung bei der sequentiellen Stimulation wurde ein gleichzeitiges Einwirken von CD40L mit den anderen Stimuli vermieden.

2.12 Kokulturen

In dieser Arbeit fanden zwei Modelle von halbautologen Kokulturen Verwendung: Zum einen eine Kurzzeitkokultur, in der die unspezifische stimulatorische Kapazität von mit Antigen beladenen dendritischen Zellen ermittelt wurde, und zum anderen eine Langzeitkokultur, die die Induktion einer

spezifischen Immunantwort gegen Tumorzellen zum Ziel hatte und nach einem in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll erfolgte⁹⁹.

2.12.1 Die halbautologe Kurzzeitkokultur dendritischer Zellen mit PBMC

Die nichtadhärenten Zellen (PBMC), welche bei der Anreicherung von Monozyten anfielen (s. 2.10.1), wurden bei 4°C mit 350 g für 10 min zentrifugiert, das Zellpelett in Gefriermedium aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Sieben Tage später erfolgten das Ernten der aus den Monozyten desselben Spenders generierten dendritischen Zellen und deren Inkubation mit dem Überstand apoptotischer Tumorzellen nach bereits beschriebenem Protokoll. Nachdem die dendritischen Zellen 24 h lang auf verschiedene Arten stimuliert waren, wurden die autologen PBMC aufgetaut und nach zweimaligem Waschen (in PBS und bei 4°C mit 350 g für 10 min) in AB-Medium in einer Zelldichte von 20×10^6 Zellen/ml aufgenommen.

Um die Kokultur frei von nicht aufgenommenen Tumorantigenen und Stimulationssubstanzen zu halten, wurden die antigenbeladenen („gepulsten“) und stimulierten dendritischen Zellen aus ihren Wells in ein Teströhrchen überführt, zweimal mit AB-Medium gewaschen und danach in AB-Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml gebracht. Die Kokultur wurde im Verhältnis DC:PBMC von 1:20 angelegt. Die sequentiell zu stimulierenden dendritischen Zellen wurden 12 h mit der Kombination aus $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 oder mit ATP plus $\text{TNF}\alpha$ stimuliert, gewaschen und in die Kokultur gegeben. Erst in der Kokultur erfolgte die Zugabe des sCD40L. Eine weitere Supplementation mit Zytokinen, sowie eine Erneuerung des Kulturmediums fanden nicht statt. Nach 48 h wurden die Lymphozyten in der Kokultur mittels Durchflusszytometrie auf ihren Aktivierungsgrad hin untersucht. Als Aktivierungsindikator diente das Oberflächenmolekül CD69, welches einen Frühmarker der T-Zellaktivierung darstellt¹⁰³.

2.12.2 Die halbautologe Langzeitkokultur dendritischer Zellen mit naiven T-Zellen

Die mit Hilfe der magnetischen Zellseparation gewonnenen naiven T-Lymphozyten wurden in Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C am Tag der Monozytenpräparation kryopräserviert. Nach Generierung der dendritischen

Zellen am Tag 7 wurden diese mit Tumorantigen inkubiert und danach zum Teil kryopräserviert und zum anderen Teil mit der Kombination aus $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 oder mit ATP plus $\text{TNF}\alpha$ für 24 h stimuliert (bzw. für 12 h, wenn eine sCD40L -Zugabe erfolgen sollte). Anschließend wurden die dendritischen Zellen gewaschen und mit aufgetauten, autologen, naiven Lymphozyten im Verhältnis 1:10 in Kokultur gebracht. Die Zugabe des sCD40L erfolgte in den entsprechenden Ansätzen direkt in die Kokultur. Die Kokultur fand in 12-Well-Platten mit jeweils 3 ml AB-Medium statt. Um einerseits die Proliferation der spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zu unterstützen, wurde der Kokultur am dritten Tag 25 IU/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-7 hinzugefügt. An den Tagen 3, 5 und 7 (=Tag der Restimulation, s.u.) wurde ein Milliliter des Mediums pro Ansatz durch frisches, mit IL-2 und IL-7 entsprechend supplementiertes, Medium ersetzt.

Alle sieben Tage wurde ein weiteres Viertel der eingefrorenen, mit Antigen beladenen dendritischen Zellen aufgetaut und stimuliert. Diese dendritischen Zellen dienten zur Restimulation der T-Lymphozyten in der Kokultur. Drei Tage nach der dritten Restimulation erfolgte die funktionelle Evaluation der T-Lymphozyten im Zytotoxizitäts-Test (^{51}Cr -Lyse-Test). Des Weiteren wurde der Anteil der T-Zellen bestimmt, die die Aktivierungsparameter CD69 und CD45RO exprimierten. Zellfreie Überstände der Kokultur, die jeweils am dritten Tag nach der ersten Stimulation sowie den Restimulationen abgenommen wurden, dienten der Bestimmung von freigesetzten $\text{IFN}\gamma$, IL-4 und IL-10 . Dieses komplexe Modell findet sich in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

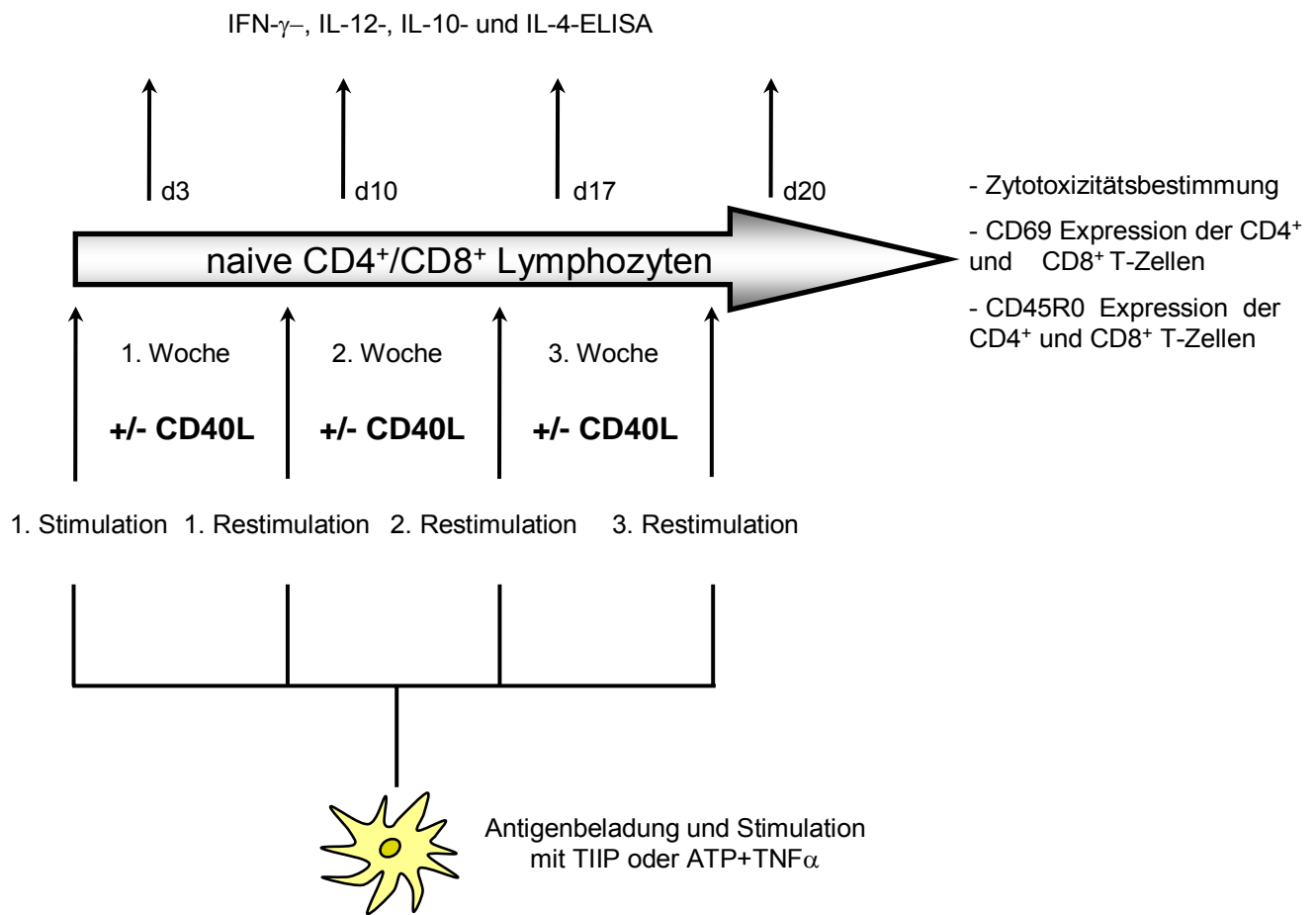


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Langzeitkokultur: Nach der ersten T-Zell-Stimulation erfolgte jede Woche die Restimulation der in der Kokultur befindlichen Lymphozyten mit antigenbeladenen und aktivierten dendritischen Zellen. In einem Teil der Kokulturen erfolgte hierbei die Zugabe des sCD40L (= +/-CD40L). Drei Tage nach der dritten Restimulation erfolgten der ⁵¹Cr-Lyse-Test und die FACS-Analyse der T-Lymphozyten bzgl. der Expression von CD69 und CD45R0. Jeweils am dritten Tag nach den Stimulationen abgenommene Kulturüberstände dienen der Zytokinbestimmung im ELISA. Die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ ist als „TIIP“ abgekürzt.

2.13 Kryokonservierung von dendritischen Zellen und Lymphozyten

Das Aufbewahren von dendritischen Zellen oder T-Lymphozyten erfolgte bei -80°C. Mit Antigen beladene dendritische Zellen oder T-Zellen wurden dazu in AB-Serum mit einer Konzentration von 2x10⁷ Zellen/ml aufgenommen und nach

der Zugabe von Einfriermedium im Verhältnis 1:1 in Kryo-Röhrchen überführt. Es ergab sich somit eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml. Das Einfrieren erfolgte nun in Kryo-Kontainern mit einer Abkühlrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}^{100}$. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen der Zellsuspensionen ging vonstatten, indem die Zellen in den Kryo-Behältnissen, nach kurzem Antauen in einem 56°C warmen Wasserbad, in 20 ml ca. 10°C kaltes AB-Medium überführt wurden. Nach der Zentrifugation (300 g, 20°C , 10 min) wurden die Zellen 24 h in AB-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Den Zellkulturen der dendritischen Zellen wurden noch 500 IU/ml IL-4 sowie 1000 IU/ml GM-CSF zugesetzt. Anschließend erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Überlebensrate mittels Trypanblaufärbung.

2.14 Analyseverfahren

2.14.1 Apoptosebestimmung mit Hilfe von Annexin V und Propidiumiodid

Annexin V ist ein Protein mit der Fähigkeit, in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen an Phospholipide zu binden. Dies kann man sich bei der durchflusszytometrischen Apoptosebestimmung zunutze machen. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, das sich bei intakten Zellen an der Innenseite der Zellmembran befindet. Um dies zu gewährleisten, bedarf es einem funktionierenden Energiehaushalt einer Zelle. Bei fehlender Verfügbarkeit von ATP in der frühen Phase des kontrollierten Zelltodes (Apoptose) wechselt dieses Molekül über einen sog. „flip-flop-Mechanismus“ von der Innenseite der Lipiddoppelschicht der Zellmembran auf die Außenseite. Externalisiertes Phosphatidylserin ist daher bereits in der frühen Phase der Apoptose zu detektieren, indem man es mit Annexin V, das an ein FITC-Molekül gekoppelt ist, markiert^{104,105}. Im weiteren Verlauf der Apoptose kommt es zudem zum Verlust der Integrität der Zellmembran. Propidiumiodid (PI) kann beschädigte Zellmembranen passieren und im Zellkern DNA durch Interkalation anfärben. Es bietet damit die Möglichkeit, Zellen, die sich bereits im fortgeschritteneren Stadium der Apoptose befinden, zu markieren. PI strahlt, wenn durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt, im Wellenbereich zwischen 562 nm und 588 nm und kann daher im LFL3-Kanal durchflusszytometrisch detektiert werden. Es sei jedoch

hinzugefügt, dass sich auch nekrotische Zellen sowohl mit PI als auch AnnexinV anfärben lassen. Entscheidend zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose ist daher der zeitliche Ablauf des Färbeverhaltens (Abbildung 3). Für die Apoptosebestimmung von dendritischen Zellen und Hyperthermie behandelten Tumorzellen wurde folgendermaßen verfahren: Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen und in AnnexinV-Bindungspuffer, der Ca^{2+} -Ionen enthält, resuspendiert. Der Zugabe von AnnexinV-FITC folgte eine zehnmündige Inkubation bei Raumtemperatur. PI wurde in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ eine Minute vor der durchflusszytometrischen Messung hinzugegeben¹⁰⁶.

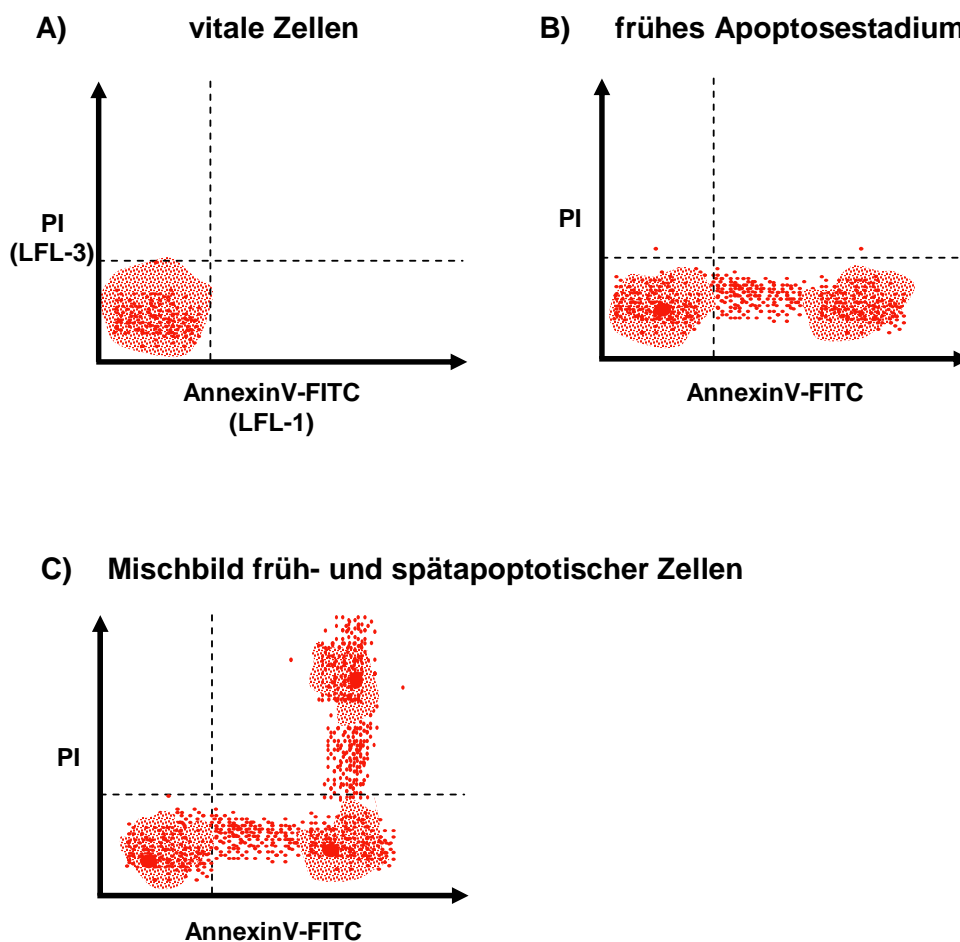


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Färbeverhaltens von früh- und spätapoptotischen Zellen mit der AnnexinV/PI-Färbung: Vitale Zellen sind sowohl AnnexinV-FITC- als auch PI-negativ (A). In der Frühphase der Apoptose werden Zellen zuerst AnnexinV-FITC-positiv (B) und erst später, nach dem Verlust der Integrität der Zellmembran, PI-positiv (C). Damit ergibt sich im FACS-Bild ein für das jeweilige Stadium der Apoptose typisches Bild.

2.14.2 Phagozytosebestimmung CFSE-gefärbter Tumorzellen

Die Aufnahme und Prozessierung von Antigen durch die dendritische Zelle bildet einen unverzichtbaren Schritt in der Einleitung einer spezifischen Immunantwort. Mit einem in dieser Arbeit etablierten Verfahren wurde die Aufnahme von Antigen aus dem Überstand apoptotischer Tumorzellen nachgewiesen. Hierzu wurden Panc-1-Tumorzellen mit CFSE inkubiert. Dabei handelt es sich um einen in der durchflusszytometrischen Analyse detektierbaren Farbstoff, der im Zytosol an freie Aminogruppen von Makromolekülen bindet¹⁰⁷. Nach zehnminütiger Inkubation wurden die Tumorzellen dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundenes CFSE vollständig zu entfernen. Daraufhin fand die Apoptoseinduktion der Tumorzellen und die Gewinnung von zellfreiem Überstand statt. Dies hatte alles in absoluter Dunkelheit zu geschehen, da CFSE unter Lichtzufuhr zerfällt. Es folgte die Inkubation der dendritischen Zellen mit so gewonnenen Tumorzellüberstand. Die Aufnahme von CFSE-gefärbten Tumorpartikeln durch phagozytierende dendritische Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle dienten dendritische Zellen, die auf Eis mit dem Antigen inkubiert wurden, da hierdurch aktive Phagozytose verhindert werden kann. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die mit Antigen beladenen Zellen dreimal in PBS gewaschen, um nicht aufgenommenes Tumorzellmaterial zu entfernen.

2.14.3 „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Die ELISA-Technik kam für die quantitative Bestimmung von Zytokinen im Überstand von Zellkulturen zum Einsatz. Dabei wurden 96-Well-Flachbodenstrips in ELISA-Platten mit einem Antikörper beschickt, der an ein Epitop des zu bestimmenden Zytokins spezifisch bindet. 100 µl des entsprechenden Zellüberstandes wurden dann in Duplikaten auf der ELISA-Platte ausgebracht und dort für 2 h inkubiert. Das zu bestimmende Zytokin, welches nun proportional zu seiner Menge an die im Well fixierten Antikörper bindet, ist somit einer quantitativen Bestimmung zugänglich. Nach mehrmaligem Waschen der ELISA-Platte in PBS mit Tween 20 erfolgte die Zugabe eines zweiten, an ein anderes Epitop des zu bestimmenden Zytokins

bindenden, Antikörpers. Ein an diesem zweiten Antikörper haftendes Enzym, die Streptavidin-Myeloperoxidase, ermöglichte die Nachweisreaktion: Nach mehrfachen Waschen der ELISA-Platte, wurde das Substrat ABTS (3-Ethylbenzothiazol) hinzugegeben, welches mit der Streptavidin-Myeloperoxidase reagiert und eine Farbreaktion verursacht, die je intensiver ausfällt, desto mehr Antikörper im Well gebunden sind. Der Ablauf dieser Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 M Schwefelsäure nach ca. fünf Minuten beendet. Mit einem Photometer wurde die Farbintensität dann bestimmt, die mit der Zytokinmenge korreliert. Anhand einer Eichkurve, die für jede ELISA-Platte mit bekannten Zytokinmengen in aufsteigender Konzentration bestimmt wurde, war es möglich, die Zytokinkonzentration der einzelnen Wells genauestens zu bestimmen.

Verwendet wurden zwei unterschiedliche, kommerzielle ELISA-Sets: IL-12 p40/p35 wurde mit einem Bender-ELISA-System bestimmt, welches bereits mit dem ersten Antikörper beschichtete Platten beinhaltet. Die restlichen Zytokine detektierte ein Opteia™-ELISA-System. Hierbei wurden 96-Well-Strips mit dem ersten Antikörper beschichtet. Durchgeführt wurden die ELISA nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

2.14.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht, Zellen hinsichtlich ihrer Granularität und Größe zu beurteilen, sowie mit Hilfe von Fluorescein-markierten Antikörpern die Expression von Oberflächenmolekülen zu detektieren und zu quantifizieren. Die in einem Flüssigkeitsstrom befindlichen Einzelzellen werden im Durchflusszytometer an einem fokussierten Laserstrahl (Argon, $\lambda=488$ nm) vorbeigeführt. Zelleigenschaften, wie Größe und Granularität, führen zu einer charakteristischen Streuung des Laserlichts. Zwei Linsen, eine in Verlaufsrichtung des Laserstrahls und eine rechtwinklig dazu, sammeln das Streulicht und detektieren es photometrisch. Das Streulicht in Verlaufsrichtung des Laserstrahls wird Vorwärtsstreulicht genannt und im Wesentlichen durch die Zellgröße bestimmt. Das Streulicht im Lot wird als Seitwärtsstreulicht bezeichnet und verdankt seine Charakteristik der Granularität einer Zelle. Werden nun Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht ihrer Intensität

entsprechend in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen, so ergibt sich für bestimmte Zellarten ein ihrer Morphologie nach charakteristisches Areal im Diagramm (Abbildung 4).

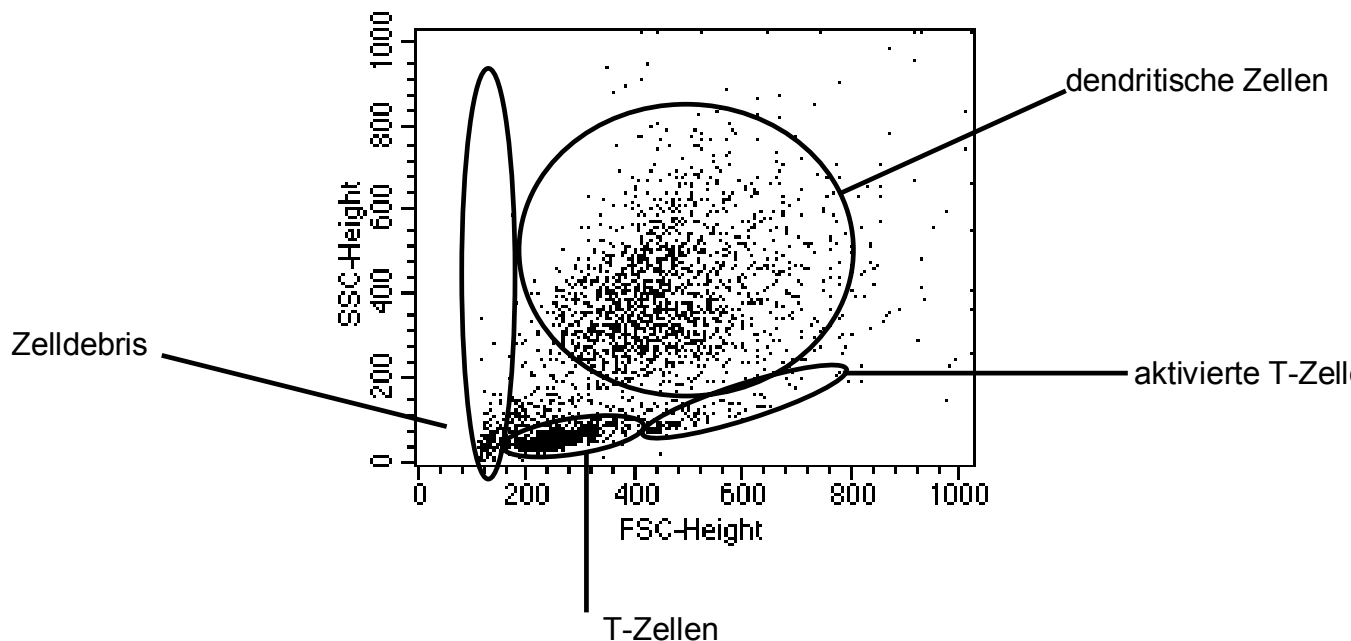


Abbildung 4: Charakteristische Eigenschaften bestimmter Zellarten in der Durchflusszytometrie anhand der Streueigenschaften des Laserstrahls.

Die zu untersuchende Zellpopulation kann so bereits anhand ihrer morphologischen Eigenschaften identifiziert werden. Auf ihre Oberflächeneigenschaften hin untersuchen lassen sich Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die an ein Chromophormolekül gekoppelt sind. Die Antikörper erkennen bestimmte Epitope der interessierenden Oberflächenstrukturen. Die Chromophormoleküle werden durch den Laserstrahl angeregt und emittieren Lichtquanten in einem für die Art des verwendeten gesammelt, von Filtern in Wellenlängenbereiche aufgeteilt und zu unterschiedlichen Detektoren gelenkt. Vier unterschiedliche Chromophore wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet: FITC (Fluoreszein-Isothizyanat), PE (Phycocerythin), PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein) und APC (Allophycocyanin). Da jeder dieser Farbstoffe Licht in einem für ihn charakteristischen Teil des Lichtspektrums emittiert, konnten die Zellen in einer Messung auf vier unterschiedliche Oberflächenmoleküle hin untersucht werden.

Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional zu der an gebundenem Antikörper und damit zur Expressionsdichte der untersuchten Oberflächenstrukturen. Jede Zelle lieferte so maximal sechs Informationen: Die Expression von vier unterschiedlichen Oberflächenmolekülen, Granularität und Größe. Die Antikörper können direkt mit einem Chromophor gekoppelt sein (direkte Fluoreszenz). Um ein besseres Anfärben von Molekülen zu erreichen, welche nur schwach auf der Zelle exprimiert werden, ist auch eine indirekte Anfärbung möglich: Hierbei kommt es zur Bindung eines unmarkierten Antikörpers (Primärantikörper) an das Epitop des zu untersuchenden Moleküls. Beim nächsten Schritt werden Antikörper verwendet, die gegen den ersten Antikörper gerichtet sind (Sekundärantikörper) und mit einem Chromophor gekoppelt sind (indirekte Fluoreszenz). Durch die Bindung von mehreren Chromophor-tragenden Antikörpern an den Primärantikörper kommt es zu einer Verstärkung der Fluoreszenz.

Färbeprotokoll (direkte Fluoreszenz):

Für die Analysen wurden 5×10^5 - 3×10^6 Zellen in Polyesterolröhrchen überführt, abzentrifugiert und, nach dem Verwerfen des Überstandes in 2 ml PBS mit 10% FCS resuspendiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt zum Waschen der Zellen. Die Zellen dann in einem Volumen von 100 μ l resuspendiert und nach der Zugabe von Chromophor-tragenden Antikörpern 30 min bei 0°C und Dunkelheit inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen in PBS und Absaugen des Überstandes, fand die durchflusszytomtrische Messung statt.

Färbeprotokoll (indirekte Fluoreszenz):

In dieser Arbeit erfolgte die Färbung des Oberflächenmoleküls CCR7 indirekt mittels drei unterschiedlichen Antikörpern nach folgendem Prinzip: An den Primärantikörper gegen CCR7, generiert in der Ratte, wurde ein Sekundärantikörper, ein an Rattenantikörper bindendes Immunglobulin geheftet, welches mit Biotin gekoppelt war. In einem dritten Schritt erfolgte die Inkubation mit einem Chromophor-tragendem Streptavidin, welches Biotin bindet. Die einzelnen Inkubationsschritte erfolgten wie oben beschrieben.

2.14.5 ⁵¹Chrom-Lyse-Test

In dem ⁵¹Chrom-Lyse-Test kann die zytolytische Aktivität von CTL (Effektorzellen) gegenüber mit radioaktivem ⁵¹Chrom markierten Zellen (Zielzellen) quantifiziert werden. Dies erfolgt nach folgendem Prinzip: Den Zielzellen wird $\text{Na}^{51}\text{Chromat}^{6+}$ angeboten. Diese reduzieren aufgenommenes Chrom intrazellulär zu Chrom^{3+} , welches die intakte Zellmembran nicht wieder passieren kann und somit intrazellulär verbleibt. Nur nach Zellyse tritt dieses wieder aus. Da das Chrom^{3+} von anderen Zellen nicht wieder aufgenommen werden kann, verbleibt es nach der Lyse im Überstand der Kultur aus Effektor- und Zielzellen. Die von einem γ -Counter gemessene Radioaktivität im Überstand kann nach Bestimmung der Maximallyse und der spontanen Freisetzung mit der Zahl an lysierten Zielzellen korreliert werden. Die Durchführung des Testes ist im Folgenden beschrieben: Der Chrom-Lyse Test wurde zur Ermittlung der Aktivität von CTL nach vier Wochen Langzeitkokultur angewendet. Hierzu wurden Panc-1- oder Kato-III-Tumorzellen als Zielzellen geerntet, in einem 15 ml Teströhrchen abzentrifugiert, in ca. 100 μl AB-Serum resuspendiert und 1 h bei 37°C mit $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (ca. 100 $\mu\text{Ci}/10^6$ Zellen) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit AB-Medium bei 4°C wurden 3000 Zielzellen zu den bereits gewaschenen und ausplattierten Effektorzellen aus der Langzeitkokultur gegeben. Die Effektorzellen waren dabei in Triplikaten so ausplattiert, dass sich ein Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 80:1, 40:1 und 20:1 ergab. Dies alles erfolgte in einer 96-Well-Rundbodenplatte. Um eine CTL-vermittelte Zellyse zu demonstrieren, die über eine Erkennung von MHC-I/Peptid-Komplexen erfolgt, wurde den Zielzellen während der Chrom-Inkubation noch ein MHC-I-blockierender Antikörper hinzugefügt.

Die Inkubation der Kokulturen aus Effektor- und Zielzellen erfolgte für 16 h bei 37°C. Danach wurde jedem Well 50 μl des Überstandes entnommen und in ein Polystyrol-Counterröhrchen überführt. Die Radioaktivität ermittelte ein γ -Counter, welcher jedes Röhrchen für jeweils 60 sec. analysierte. In jedem Versuch wurde auch die Spontan- und Maximalfreisetzung von Chrom^{3+} aus den Zielzellen bestimmt. Zur Ermittlung der Spontanfreisetzung wurden die Zielzellen in Abwesenheit von Effektorzellen inkubiert. Die Radioaktivität des Überstandes dieser Wells stellte die Spontanfreisetzung dar. Die Maximallyse

wurde mit Hilfe des Detergenz TritonX bestimmt, welches sämtliche Zellen eines Wells lysiert. Die Radioaktivität in diesen Überständen entspricht daher der maximal möglichen Lyse. Die Auswertung der Lysetests erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms, welches aus den einzelnen Testlysedaten vor dem Hintergrund der Maximal- und Spontanlyse, die spezifische Lyse in Prozent angab. Diese spezifische Lyse in Prozent entspricht der zytotoxischen Aktivität der CTL. Sie wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = 100 \times \frac{\text{cpm (Testlyse)} - \text{cpm}}{\text{cpm (Totallyse)} - \text{cpm (Spontanlyse)}}$$

Die spezifische Lyse wurde jeweils aus den Mittelwerten der jeweiligen Triplets berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen

Aus 100 ml Blut konnten 5 bis 10×10^6 CD14⁺ Zellen gewonnen werden. Nach einer Woche Inkubation der Monozyten mit IL-4 und GM-CSF erfolgte die Analyse der generierten Zellen mittels Durchflusszytometrie. Diese hatten den noch vor der Inkubation exprimierten LPS-Rezeptor CD14 verloren (Abbildung 5) und wiesen unstimuliert eine schwache bis mittlere Expression von CD80 und CD86 auf, exprimierten jedoch nicht den Oberflächenmarker CD83. Dies entspricht einem unreifen Phänotyp. Nach 48 h Stimulation mit der Kombination aus TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ nahmen die dendritischen Zellen an Größe zu, was die Erhöhung des FSC-Wertes im FACS-Bild verdeutlicht. Sie regulierten den Reifemarker CD83 hoch und erhöhten deutlich die Expression von CD80, CD86 und MHC-II. Somit handelte es sich um dendritische Zellen mit reifem Phänotyp (Abbildung 6).

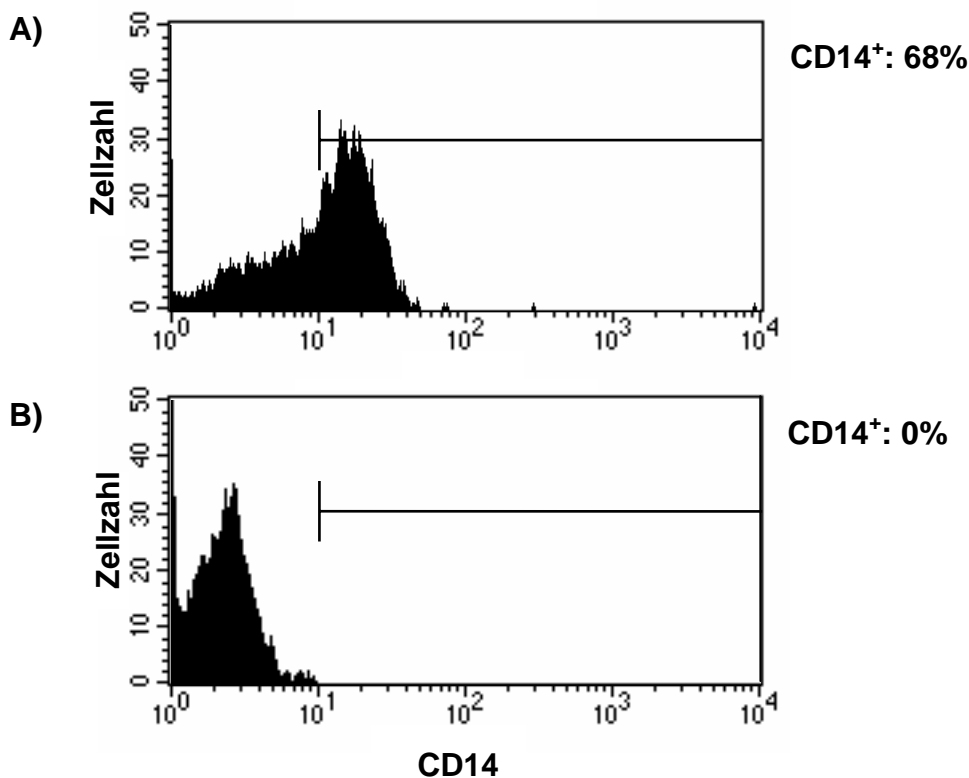


Abbildung 5: Expression von CD14 auf frisch isolierten Monozyten (A) und nach sechstägiger Kultur mit IL-4 und GM-CSF (B).

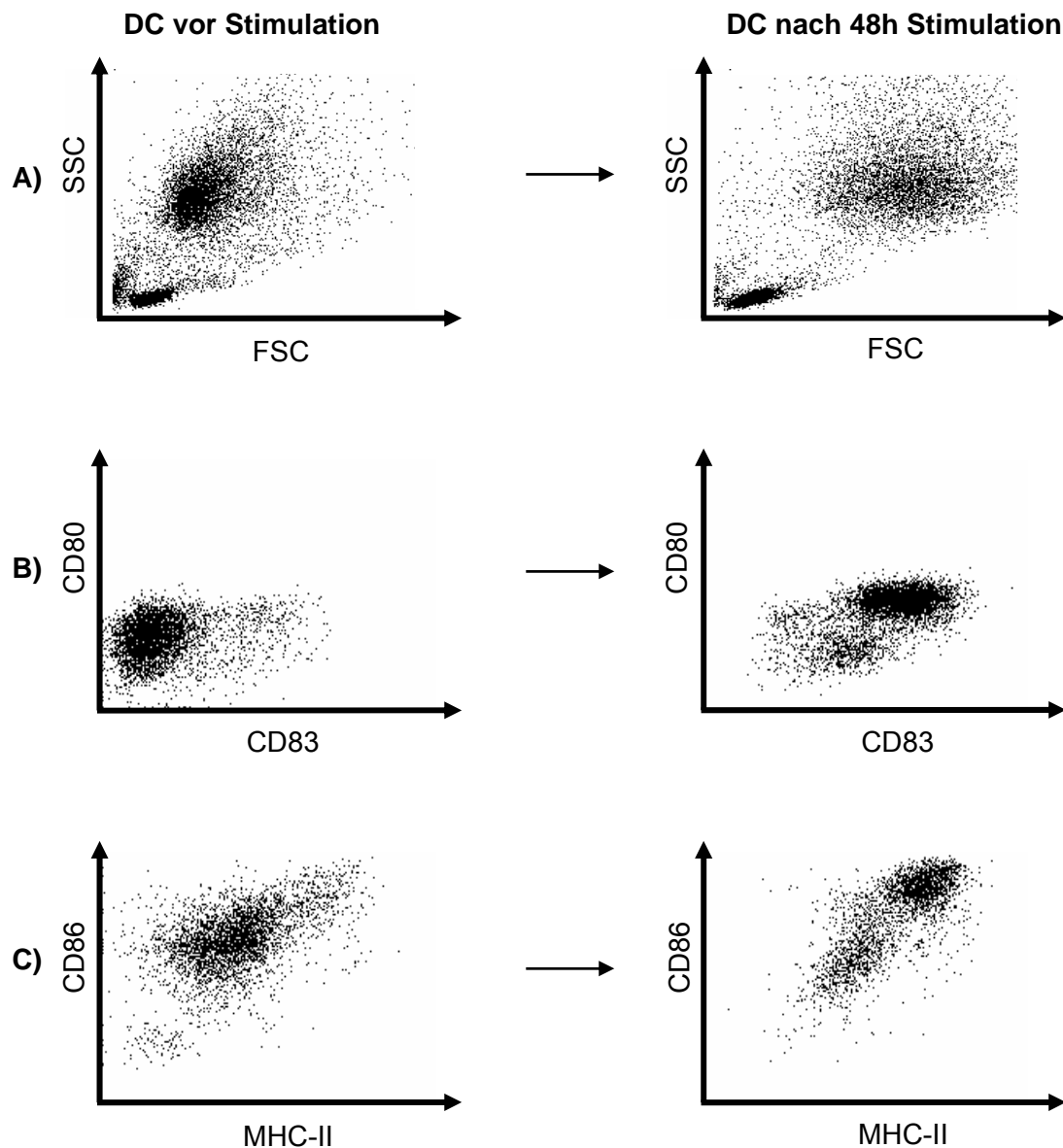


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse von monozytenabgeleiteten dendritischen Zellen vor (linke Spalte) und nach 48-stündiger Ausreifung mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 (rechte Spalte). A: Forwärts- und Seitwärts-, „Scatter“-Eigenschaften, B: Expression der Aktivierungsmarker CD80 und CD83, C: Expression der Aktivierungsmarker CD86 und MHC-II. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus sechs.

3.2 Messung der Phagozytoseaktivität dendritischer Zellen

In vorausgegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Überstände von Tumorzellen nach Apoptoseinduktion antigenes Tumormaterial beinhalten, das von dendritischen Zellen aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden kann²⁵. Um die Aufnahme von apoptotischen

Tumorzellmaterial durch dendritische Zellen zu analysieren, wurden unreife, dendritische Zellen mit dem Überstand apoptotischer, CFSE-gefärbter Tumorzellen bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden dendritische Zellen während der Inkubation auf Eis gehalten, um eine Phagozytose zu inhibieren. Eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität in Kanal 1 (LFL1) bei 37°C weist auf eine effektive Antigenaufnahme durch die dendritische Zelle hin.

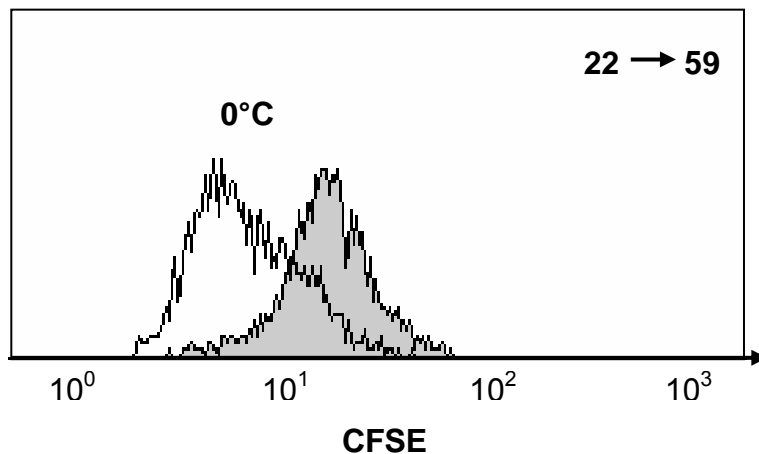


Abbildung 7: Aufnahme von CFSE-gefärbten Tumorpartikeln durch unreife dendritische Zellen. Unreife dendritische Zellen wurden 2 h mit dem Überstand CFSE-gefärbter, apoptotischer Tumorzellen inkubiert und anschließend gewaschen (37°C). Die Inkubation der Negativkontrolle erfolgte bei 0°C, zur Verhinderung der Phagozytose. (gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n=3)

3.3 Einfluss der Stimulationsbedingungen dendritischer Zellen auf die Aktivierung

Nach der Charakterisierung der dendritischen Zellen wurde das Zusammenspiel löslicher Gefahrensignale, hier die Kombination aus $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 oder ATP plus $\text{TNF}\alpha$ mit dem zellgebundenen CD40L evaluiert. Auch wurde der Frage nachgegangen, ob der Zeitpunkt der CD40L -Zugabe Einfluss auf den Aktivierungsgrad der dendritischen Zelle besitzt. Neben der Expression von Oberflächenmarkern wurden die IL-12 -Produktion, die Überlebensdauer dendritischer Zellen, sowie ihre Fähigkeit untersucht, in einer autologen Kokultur den Aktivierungsmarker CD69 auf Lymphozyten zu induzieren.

3.3.1 Expression von Aktivierungsmarkern

Die Expression von Reifungs- bzw. Aktivierungsmarkern auf dendritischen Zellen variierte mit dem Zeitpunkt der Zugabe der CD40L-exprimierenden Fibroblasten. Während bei einer gleichzeitigen Zugabe keine oder nur sehr geringe synergischen Effekte mit anderen Stimuli zu beobachten waren, kam es bei der sequentiellen Stimulation (zuerst die Kombination von $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ und PGE_2 oder ATP plus $TNF\alpha$ und erst nach 12 h die Zugabe von CD40L) zu einer deutlichen Mehrexpression von CD86, MHC-II und CD80 (Abbildung 8).

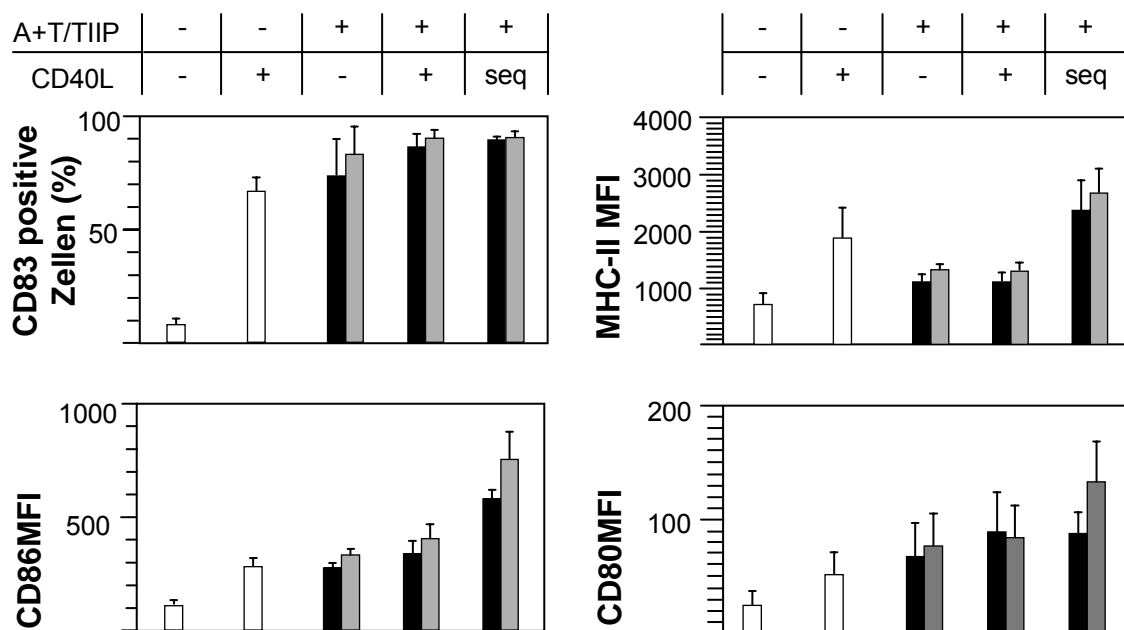


Abbildung 8: Die Expression von Aktivierungsmarkern auf dendritischen Zellen nach 48h in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von CD40L. Die schwarzen Balken symbolisieren die Werte für ATP mit $TNF\alpha$ (A+T), die grauen die für die Kombination von $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ und PGE_2 (TIIP). Angegeben ist jeweils das Mittel von vier Experimenten (+ SEM). Die Zugabe von CD40L zwölf Stunden nach primärer Stimulation ist durch „seq“ symbolisiert.

Nach 12 h Stimulationsdauer zeigten die dendritischen Zellen bereits einen deutlichen Anstieg der Expression von CD40. Die Kombination von $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ und PGE_2 ist hierbei ATP und $TNF\alpha$ überlegen (Abbildung 9). Eine solche Stimulationdauer von 12 h findet bei der sequentiellen Stimulation Verwendung.

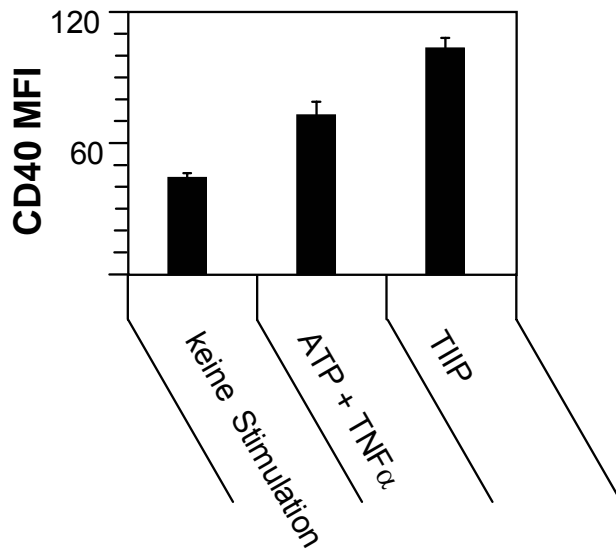


Abbildung 9: Nach 12 h Stimulation dendritischer Zellen mit der Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ (TIIP) oder ATP plus TNF α zeigt sich ein Anstieg der Expression von CD40 im Vergleich zu unstimulierten dendritischen Zellen. Die Balken zeigen den Mittelwert von vier Experimenten (+ SEM).

3.3.2 Einfluss auf die CCR7-Expression dendritischer Zellen

CD40L, ATP plus TNF α , sowie die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ induzierten die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf dendritischen Zellen. Ein geringer synergischer Effekt zwischen den Zytokinkombinationen und CD40L war zu beobachten.

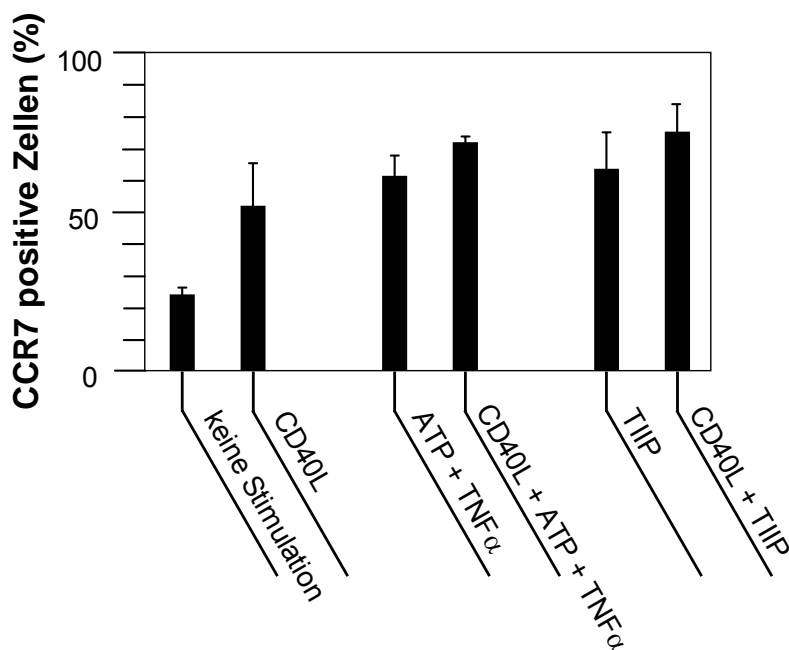


Abbildung 10: CCR7-exprimierende dendritische Zellen in Prozent nach 48 h Stimulation. Die Balken zeigen den Mittelwert von drei Experimenten (+ SEM). Die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ ist als „TIIP“ abgekürzt.

3.3.3 Einfluss auf die Produktion von IL-12

Im Folgenden wurde die Produktion von IL-12 nach 48 h Stimulation in Abhängigkeit von der Art der verwendeten Zytokinkombinationen und von der Anwesenheit von CD40L in Form der CD40L-transfizierten Fibroblasten evaluiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl CD40L alleine, wie auch ATP plus TNF α und die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE $_2$ die Produktion von IL-12p35/p40 induzieren können. Durch eine Aktivierung der dendritischen Zellen mit der Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE $_2$, gerade im Zusammenspiel mit CD40L, konnte ein Maximum der IL-12p35/p40-Produktion erreicht werden. Der Zeitpunkt der CD40L-Zugabe spielte hier, wie auch bei der IL-12p70 Messung keine Rolle (Abbildung 11A). ATP mit TNF α konnten sowohl alleine als auch in Anwesenheit von CD40L keine IL-12p70-Produktion bewirken. Auch CD40L alleine erwies sich als nicht effektiv. Die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE $_2$ induzierte eine geringe Produktion von IL-12p70, welche sich durch die Zugabe von CD40L deutlich steigern ließ (Abbildung 11B).

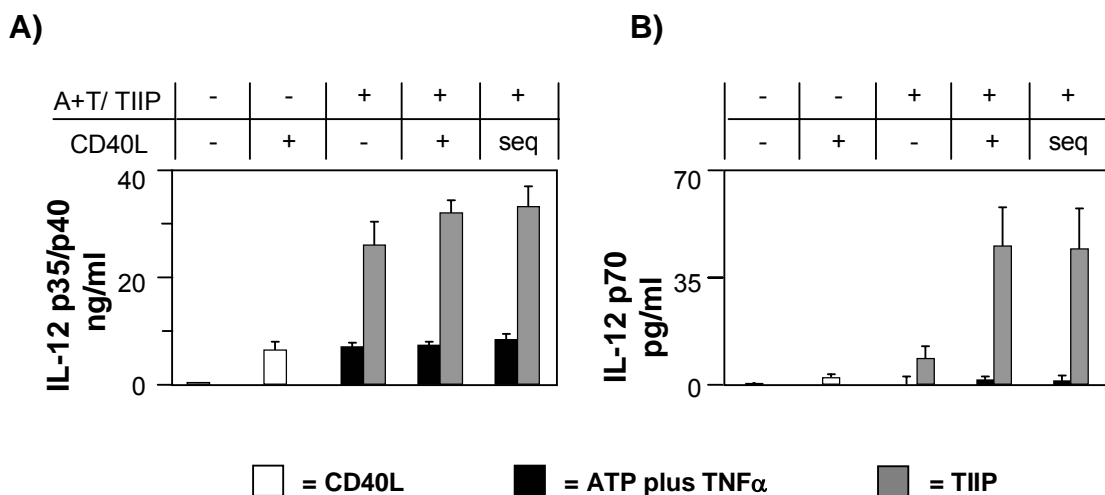


Abbildung 11: Die Konzentrationen von IL-12p35/p40 (A) bzw. IL-12p70 (B) im Überstand stimulierter dendritischer Zellen nach 48 h Stimulation. Die schwarzen Balken zeigen die Werte für ATP mit TNF α (A+T), die grauen die für die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE $_2$ (TIIP). Angegeben ist jeweils das Mittel von vier Experimenten (+ SEM). „Seq“ steht für „sequentielle Stimulation“.

3.3.4 Einfluss auf die stimulatorische Kapazität

Deutliche synergische Effekte zwischen CD40L und der Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE $_2$, bzw. ATP plus TNF α zeigten sich bei der Induktion

des Aktivierungsmarkers CD69 in einer 48-stündigen autologen Kurzzeitkokultur. Weder CD40L noch die Kombination von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und PGE_2 , bzw. ATP plus $\text{TNF}\alpha$ waren in der Lage, den Level der CD69 Expression auf CD4^+ oder CD8^+ Lymphozyten wesentlich zu steigern. Die Stimulation mit CD40L und der Kombination von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und PGE_2 , bzw. mit CD40L und ATP plus $\text{TNF}\alpha$ hingegen steigerte die Expression, verglichen mit der durch unstimulierte dendritische Zellen induzierten, um das 2,5 bis vierfache. Die zeitliche Abfolge der CD40-Ligation hingegen besaß keinen additiven Einfluss. Generell zeigten CD8^+ T-Zellen eine höhere CD69 Expression als CD4^+ T-Zellen (Abbildung 12).

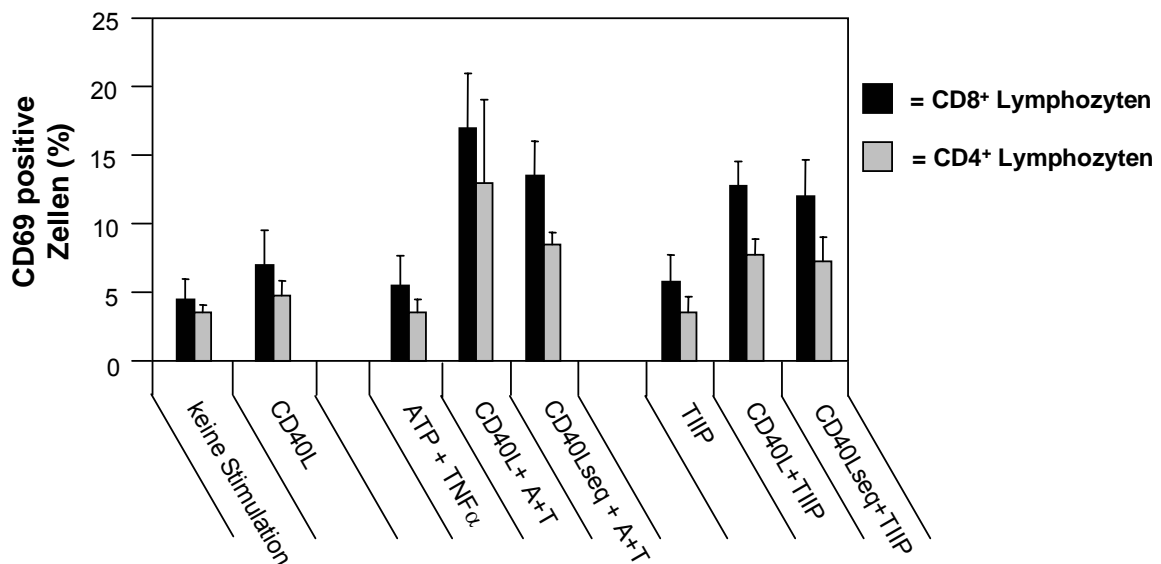


Abbildung 12: Die Induktion des Aktivierungsmarkers CD4^+ und CD8^+ T-Zellen in einer autologen Kurzzeitkokultur in Abhängigkeit zur Aktivierung dendritische Zellen: Die FACS-Analyse erfolgte nach 48 h Kokultur. Die Balken zeigen das Mittel dreier Experimente (+ SEM). ATP plus $\text{TNF}\alpha$ ist als „A+T“ und die Kombination von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und PGE_2 als „TIIP“ abgekürzt. „Seq“ steht für „sequentielle Stimulation“.

3.3.5 Einfluss auf die Zellvitalität

Bei der Betrachtung des Prozentsatzes vitaler im Vergleich zu toten dendritischen Zellen stellte sich heraus, dass die Anwesenheit von CD40L das Überleben der dendritischen Zellen verbesserte. Mithilfe der sequentiellen Stimulation ließ sich der Anteil toter Zellen im Vergleich zu den nur durch Zytokine ausgereiften, dendritischen Zellen um über zwei Drittel reduzieren (Abbildung 13). Als ursächlich hierfür anzunehmen dürfte die Tatsache sein,

dass bei der sequentiellen Stimulation der initiale Stimulus nach bereits 12 h entfernt wurde, bevor der CD40L hinzugegeben wurde.

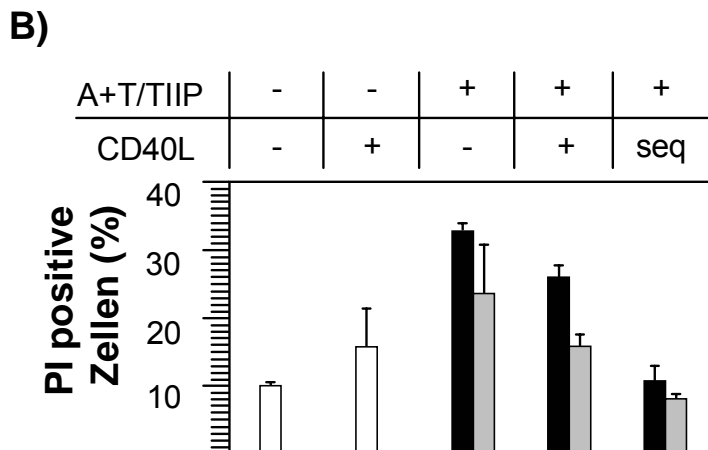
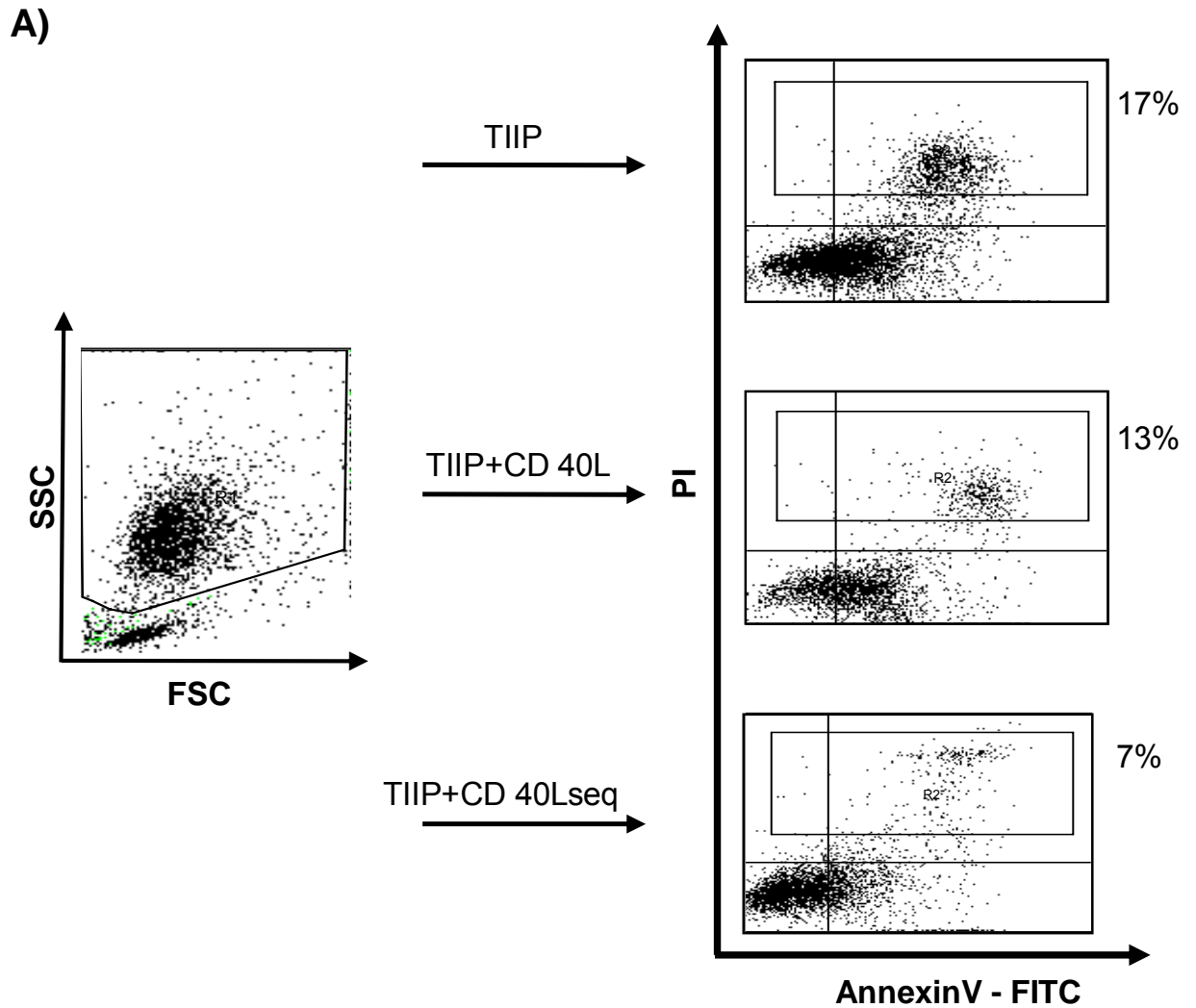


Abbildung 13: Einfluss der Aktivierungsart auf das Überleben dendritischer Zellen. Gemessen wurde der Anteil PI positiver Zellen nach 48 h Stimulation. Ein repräsentativer Versuch als FACS-Analyse (A) und der Mittelwert von zwei Experimenten (+ SEM) (B). ATP plus $TNF\alpha$ ist als „A+T“ und die Kombination von $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6 und PGE_2 als „TIIP“ abgekürzt, „seq“ steht für „sequentielle Stimulation“.

3.4 Einfluss der Stimulation dendritischer Zellen auf das T-Zell-Zytokinprofil und die die Induktion einer CTL-vermittelten Immunantwort

Die Evaluation der T-Zellaktivität in der Langzeitkokultur fand auf mehreren Ebenen statt: Es wurde das durch die dendritischen Zellen induzierte Zytokinmilieu in der Kokultur im wöchentlichen Abstand analysiert. Am Ende der Kokultur wurden die Induktion der CD69- und der CD45RO-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten, sowie die lytischen Kapazität der generierten CTL gemessen. Um den Anteil an unerwünschtem Antigen in der Kokultur möglichst gering zu halten, wurde im Folgenden statt der CD40L-transfizierten Fibroblastenzelllinie ein, uns erst zu diesem Zeitpunkt der Arbeit zugänglicher, CD40L-Antikörper in Trimerform (sCD40L) verwendet.

3.4.1 Induktion von IFN γ

Abbildung 14 zeigt die IFN γ -Produktion in Abhängigkeit der Anzahl der Stimulationen der T-Zellen mit Antigen beladenen und aktivierten dendritischen Zellen. Unmittelbar nach der 1. Stimulation („Priming“) konnten keine signifikanten Mengen an IFN γ im Überstand der Kokulturen nachgewiesen werden. Erst nach mehreren Restimulationen fanden sich zunehmende Mengen an IFN γ im Überstand. Nichtaktivierte, jedoch mit Antigen beladenene dendritische Zellen induzierten kein IFN γ . Auch mit CD40L oder ATP plus TNF α allein ausgereifte dendritische Zellen waren dazu kaum in der Lage. Die größten Mengen an IFN γ fanden sich in Kokulturen, in denen die dendritischen Zellen mit einer Kombination aus CD40L mit entweder ATP plus TNF α oder der Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ aktiviert wurden. Insbesondere die gleichzeitige Verwendung von CD40L und der Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ bedeutete eine optimale IFN γ -Produktion, welche bereits nach der ersten Restimulation zu detektieren war.

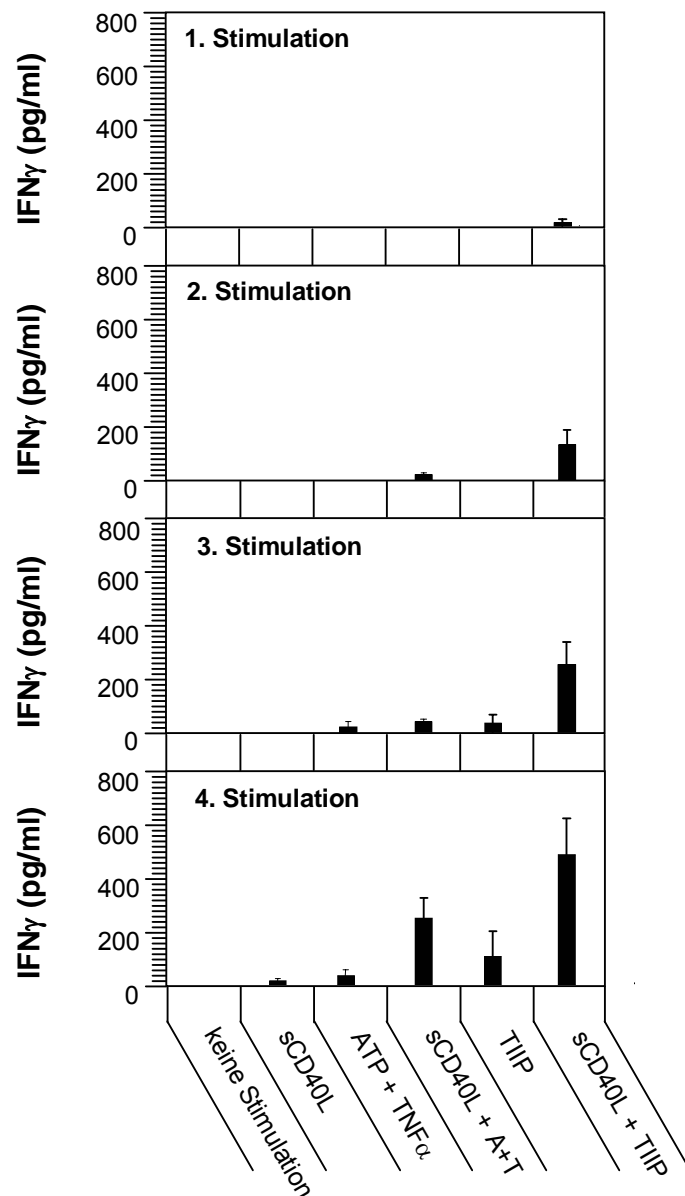


Abbildung 14: IFN γ -Konzentration im Überstand der Kokulturen in Abhängigkeit von der Anzahl der Stimulationen und der Aktivierungsart der dendritischen Zellen. Die Balken zeigen das Mittel von 6 Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen. ATP plus TNF α ist als „A+T“ und die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE $_2$ als „TIIP“ abgekürzt.

3.4.2 Induktion von IL-4 und IL-10

Die Zytokine IL-4 und IL-10 induzieren eine Th2-gerichtete T-Zellantwort. Daher wurden neben IFN γ auch die Konzentrationen von IL-4 (Abbildung 15A) und IL-10 (Abbildung 15B) im Überstand der Kokultur gemessen. Die Produktion dieser beiden Zytokine fiel sehr gering aus. Nur initial fanden sich in den Ansätzen mit dendritischen Zellen, die mit ATP und TNF α stimuliert wurden, geringe Konzentrationen von IL-4 und IL-10, die jedoch durch die Zugabe von CD40L wieder unterdrückt wurden.

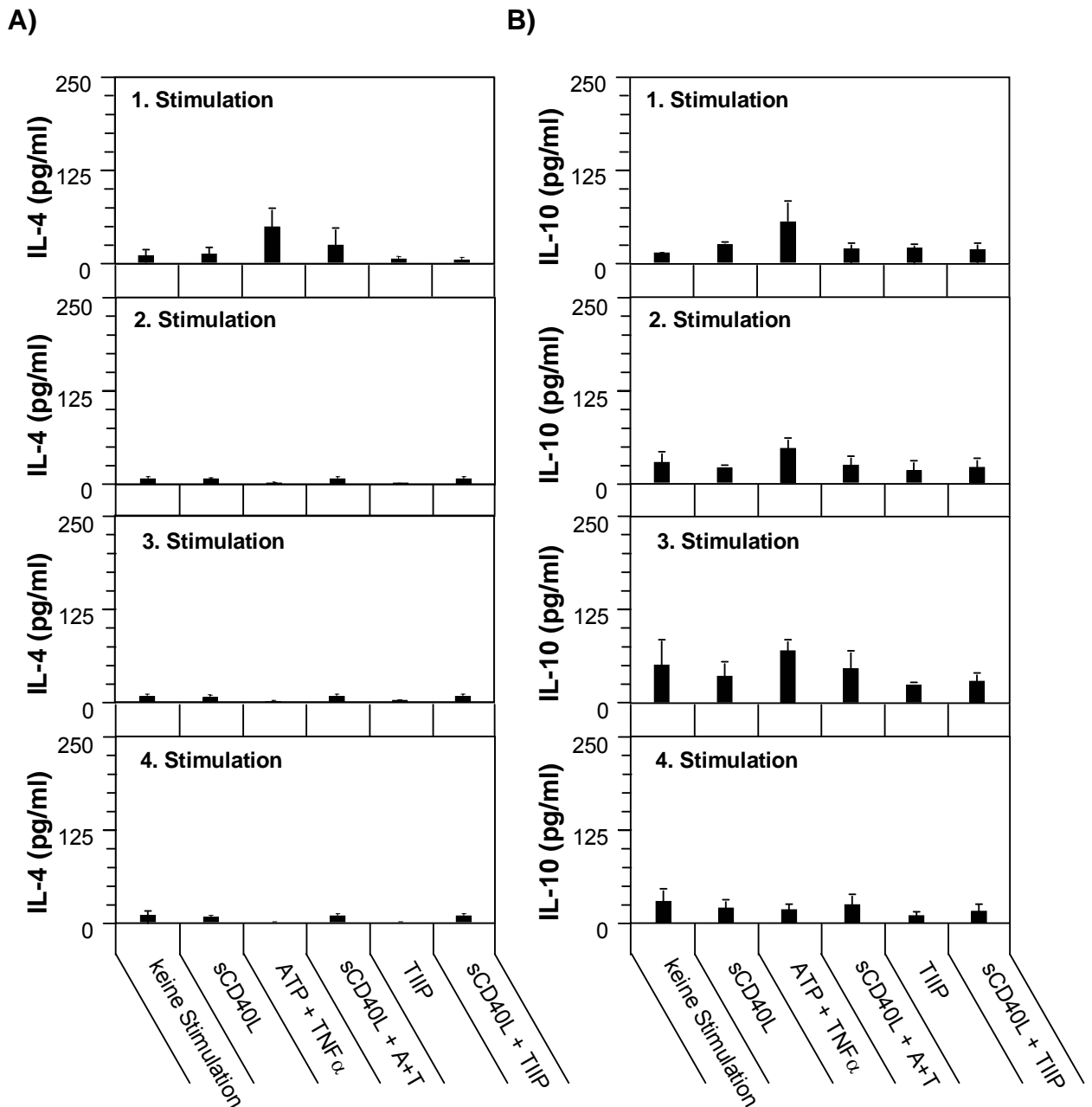


Abbildung 15: IL-4(A)- und IL-10(B)-Konzentration im Überstand der Kokulturen in Abhängigkeit von der Anzahl der Stimulationen und der Aktivierungsart der dendritischen Zellen. Die Balken zeigen das Mittel von 6 Experimenten (+ SEM). ATP plus TNF α ist als „A+T“ und die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE $_2$ als „TIIP“ abgekürzt.

3.4.3 Expression von CD69 und CD45RO auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Nach der 4. Stimulation wurde die T-Zellaktivierung anhand der Aktivierungsmarker CD69 und CD45R0 untersucht. Beide Aktivierungsmarker verhielten sich ähnlich in Abhängigkeit der Stimulation der dendritischen Zellen. Es gelang nicht, in den Ansätzen mit unstimulierten dendritischen Zellen die Expression von CD69 oder CD45R0 auf CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. In den Ansätzen, in denen sich mit CD40L aktivierte dendritische

Zellen befanden, konnte eine leichte Induktion von CD69 und CD45RO detektiert werden. Mit ATP plus $\text{TNF}\alpha$ stimulierte dendritische Zellen zeigten einen deutlichen Synergismus mit CD40L bezüglich der Induktion einer Expression der beiden Aktivierungsmarker. Dendritische Zellen, welche allein mit der Kombination von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und PGE_2 stimuliert wurden, waren ebenfalls hochpotent, was die Induktion von CD69 und CD45RO auf CD4^+ und CD8^+ T-Zellen betraf. Eine weitere Steigerung der Expression dieser Aktivierungsmarker durch die Zugabe von CD40L gelang hier nicht. Insgesamt fand sich in den Ansätzen, in denen sich mit CD40L und ATP plus $\text{TNF}\alpha$ stimulierte dendritische Zellen befanden, der höchste Prozentsatz von CD69^+ Zellen. Die höchste Expression von CD45RO wiesen die T-Zellen in den Kokulturen auf, in denen mit ATP plus $\text{TNF}\alpha$ und CD40L oder mit der Kombination von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und PGE_2 (mit oder ohne CD40L) aktivierte dendritische Zellen vorhanden waren. Signifikante Unterschiede bezüglich der Expression von CD69 oder CD45RO zwischen CD4^+ oder CD8^+ T-Zellen waren nicht festzustellen (Abbildung 16).

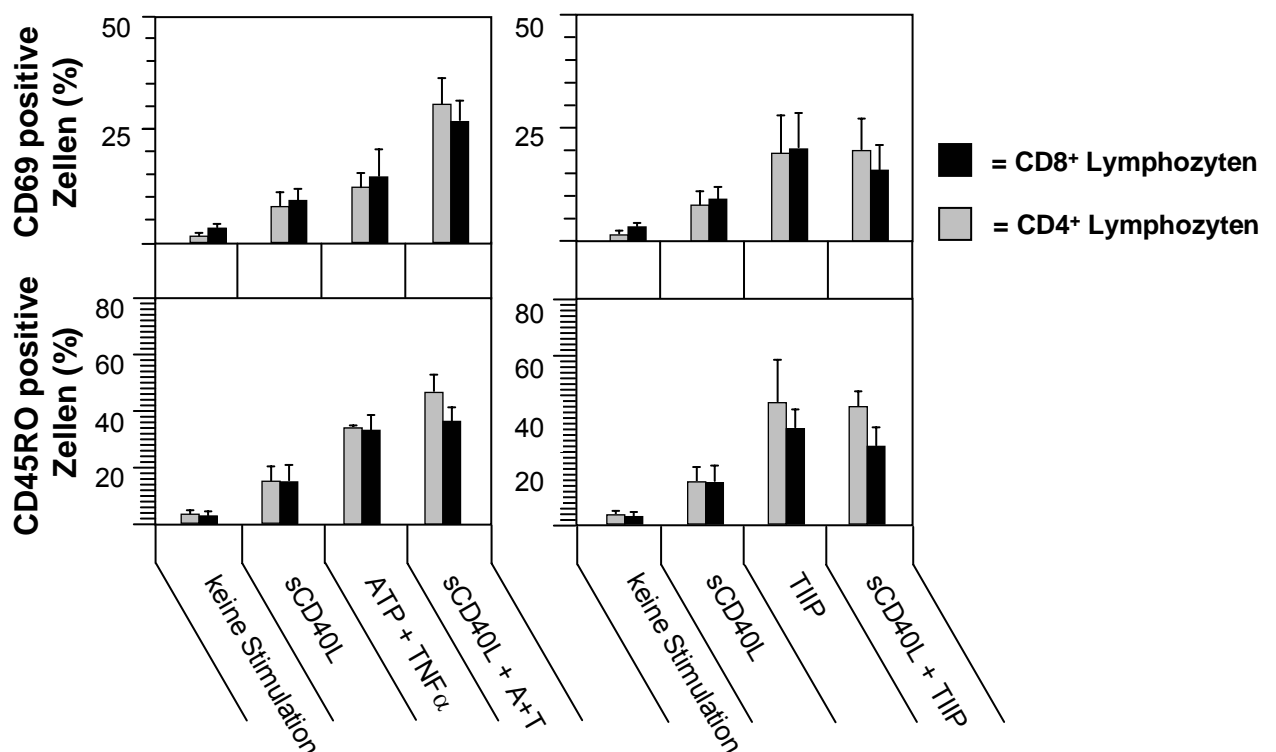


Abbildung 16: Die Induktion der Oberflächenmoleküle CD69 und CD45RO auf CD4^+ (schwarzer Balken) und CD8^+ (grauer Balken) T-Zellen in Abhängigkeit von der Art der Aktivierung dendritischer Zellen. Die FACS-Analyse erfolgte drei Tage nach der 4. Stimulation. Die Balken zeigen das Mittel von 6 Experimenten (+ SEM). ATP plus $\text{TNF}\alpha$ ist als „A+T“ und die Kombination von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und PGE_2 als „TIIP“ abgekürzt.

3.4.4 Lytische Kapazität der CTL gegenüber Panc-1-Tumorzellen

Eine Induktion einer CTL vermittelten Immunantwort erfolgte in allen Kokulturen, in denen sich stimulierte und mit Antigen beladene dendritische Zellen befanden. Hierbei zeigte sich jedoch eine deutlich Abhängigkeit vom Aktivierungsmodus, der in der Kokultur vorhandenen dendritischen Zellen. Nur eine geringe Anzahl von Tumorzellen wurde von CTL lysiert, welche den Ansätzen entstammten, in denen sich nur mit CD40L stimulierte dendritische Zellen befanden. Die CTL aus den Kokulturen mit durch ATP plus $\text{TNF}\alpha$ oder der Kombination von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 aktivierten dendritischen Zellen waren diesbezüglich potenter. Bei diesen drei Aktivierungsmodi kam es jedoch nur zu einem Anstieg des Anteils der Lyse, welcher mit einem MHC-I-Antikörper blockierbar war, und nur zu einer geringen Zunahme der gesamten spezifischen Lyse. Ein deutlicher Synergismus zeigte sich zwischen CD40L und der Kombination von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 bzw. ATP plus $\text{TNF}\alpha$. Durch diesen Synergismus konnte eine Steigerung der induzierten Lyse, verglichen mit den Ansätzen in denen nur einfach stimulierte dendritische Zellen waren, von nahezu bzw. über 100% erreicht werden (Abbildung 17). In den Ansätzen, in denen stimulierte, aber nicht gepulste dendritische Zellen enthalten waren, erfolgte keine Lyseinduktion.

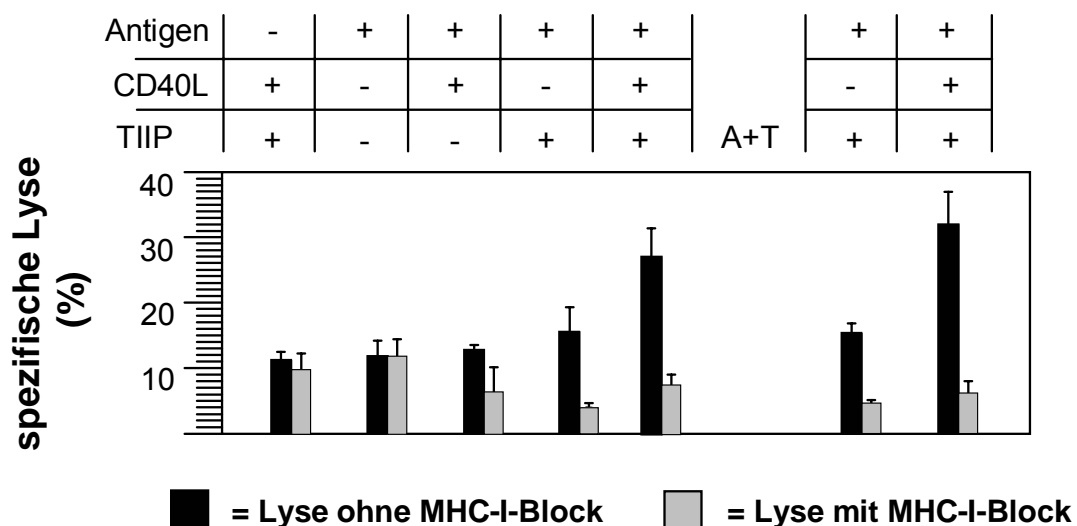


Abbildung 17: Spezifische Lyse der Panc-1-Tumorzellen in Abhängigkeit von Antigenbeladung und Aktivierung der dendritischen Zellen. Dargestellt ist die spezifische Lyse (mit und ohne Blockierung durch einen MHC-I-Antikörper). Die Balken zeigen das Mittel von 6 Experimenten (+ SEM). ATP plus $\text{TNF}\alpha$ ist als „A+T“ und die Kombination von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 als „TIIP“ abgekürzt.

3.4.5 Spezifität der induzierten Lyse

CTL aus Kulturen mit dendritischen Zellen, die mit CD40L und der Kombination von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 oder ATP plus $\text{TNF}\alpha$ stimuliert waren, lysierten effektiv Tumorzellen der Zelllinie Panc-1, jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz Zellen der ebenfalls HLA-A2^+ Zelllinie Kato-III (Abbildung 18). Die induzierte Lyse war damit spezifisch für Panc-1-Tumorzellen. Die ca. zehnpromtente Lyse der Kato-III-Tumorzellen ist als unspezifisch anzusehen, da ein ähnlich großer Prozentsatz von Panc-1-Tumorzellen von CTL lysiert wurden, die aus Kulturen stammten, in denen ungepulste dendritische Zellen enthalten waren (Abbildung 17).

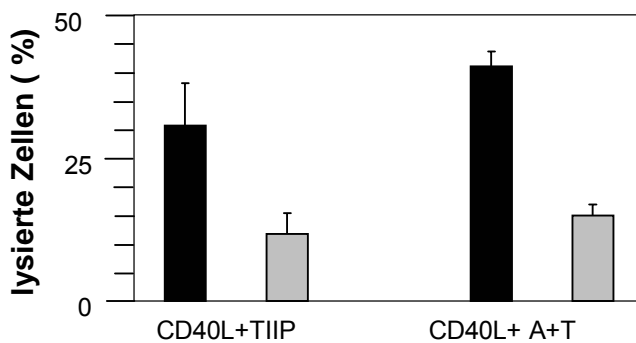


Abbildung 18: CTLs lysierten Panc-1-Zellen (schwarzer Balken), jedoch nicht Kato-III-Zellen (grauer Balken). Dargestellt ist die Lyse ohne MHC-I-Block. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Experimente und die jeweiligen Standardabweichungen. ATP plus $\text{TNF}\alpha$ ist als „A+T“ und die Kombination von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und PGE_2 als „TIIP“ abgekürzt.

3.4.6 Zelluläre Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen in den Kokulturen

Eine Analyse des Verhältnisses von CD4^+ und CD8^+ Lymphozyten am Ende der Langzeitkokultur zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen (Abbildung 19)

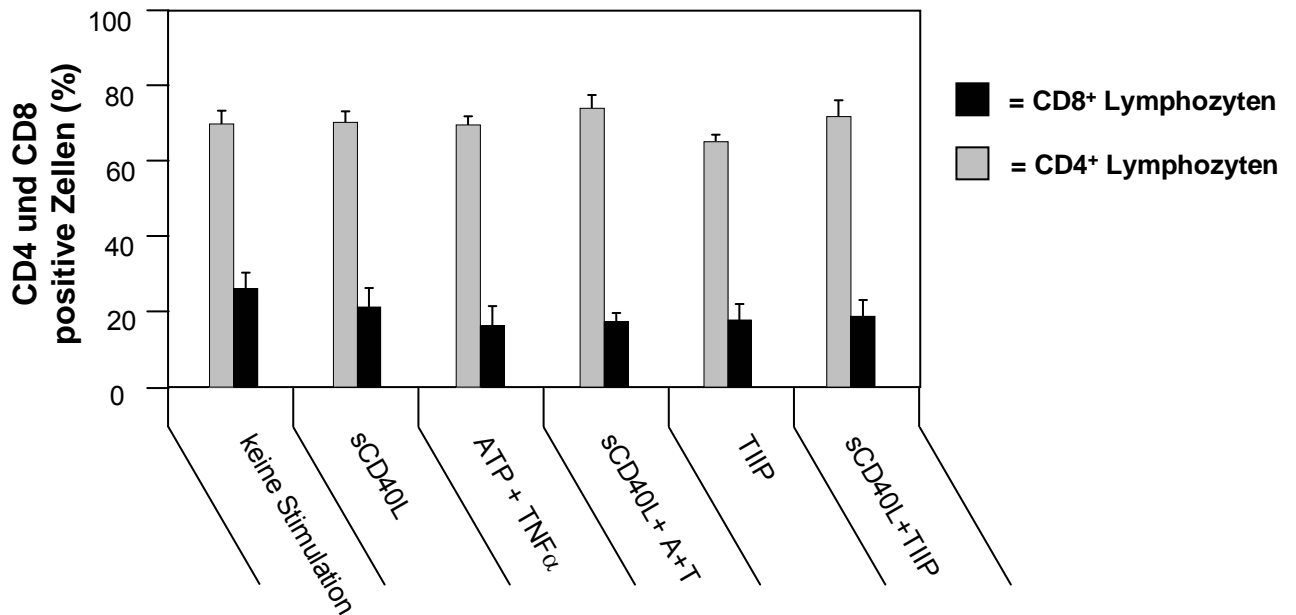


Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten an der Gesamtheit der in den verschiedenen Ansätzen vorhandenen Zellen. Die Balken zeigen das Mittel von 6 Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen. ATP plus TNF α ist als „A+T“ und die Kombination von TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ als „TIIP“ abgekürzt.

Um auszuschließen, dass neben Lymphozyten noch andere Leukozyten Einfluss auf die Ergebnisse der Kokultur nehmen konnten, erfolgte am Ende der Kokultur eine Analyse der weiteren Zusammensetzung der Zellpopulationen anhand des B-Zellmarkers CD19, des NK-Zellmarkers CD56 und des $\gamma\delta$ T-Zellmarkers V γ 9. Neben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen enthielten die Kokulturen nur einen minimalen Anteil von B-Zellen [1,1% (+/- 1,4)], NK-Zellen [0,5% (+/- 0,7)] und $\gamma\delta$ T-Zellen [0,9% (+/- 0,9)].

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Charakterisierung der dendritischen Zellen

Um sicherzustellen, dass es sich bei den in den Experimenten verwendeten Zellen um funktionsfähige dendritische Zellen handelte, wurden die nach dem Protokoll von Sallusto et al.⁹ generierten Zellen phänotypisch charakterisiert und funktionell evaluiert. Die nach sechs Tagen in den Kulturen generierten Zellen hatten den für Monozyten charakteristischen Marker CD14 verloren^{8,9}. Außerdem exprimierten sie weitere Merkmale unreifer dendritischer Zellen, wie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Der Oberflächenmarker CD83, der einen reifen Phänotyp charakterisiert, wurde nicht exprimiert⁵⁰. Nach 48 h Stimulation zeigte sich eine deutliche Expressionszunahme von CD80, CD86 und MHC-II, sowie die Neuexpression des Reifemarkers CD83¹⁰⁸. Die dendritischen Zellen waren im unreifen Zustand zur Phagozytose fähig, wie durch die Inkubation der Zellen mit dem Überstand CFSE-gefärbter, apoptotischer Tumorzellen gezeigt werden konnte. Des Weiteren waren die dendritischen Zellen in der Lage, IL-12p40 und IL12p70 zu produzieren, sowie in einer Kokultur den Aktivierungsmarker CD69 auf Lymphozyten zu induzieren. Morphologisch war nach der Stimulation der charakteristische Wandel weg von der runden Zellform hin zur typischen Zelle mit zahlreichen Zellausläufern und deutlicher Größenzunahme, sowohl im Phasenkontrastmikroskop als auch in der Durchflusszytometrie zu erkennen. Die nach sechs Tagen aus Monozyten generierten dendritischen Zellen erfüllten somit die erforderlichen Kriterien, um als funktionale dendritische Zellen bezeichnet werden zu können⁵⁰.

4.1.2 Evaluation der einzelnen Stimulationsschemata bezüglich der Aktivierung von dendritischen Zellen

Wichtige Eigenschaften dendritischer Zellen für die Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort sind:

1. Antigenaufnahme und Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen
2. eine hohe Expression kostimulatorischer Moleküle

3. die Fähigkeit entlang von Chemokinen (z.B. CCR7-Liganden) den Weg in den Lymphknoten zu finden
4. eine lange Überlebenszeit und
5. die Produktion eines Th1-gerichteten Zytokinmilieus.

Mithilfe eines geeigneten Aktivierungsschemas sollten diese Eigenschaften positiv beeinflusst werden. Die Möglichkeiten, dendritische Zellen zur Ausreifung zu bringen sind vielfältig. Vor dem Hintergrund verschiedener Publikationen, in denen von potenten Synergien zwischen CD40L mit Stimuli, wie z.B. LPS^{109,110,111}, IL-1 β ¹¹² oder IFN γ ¹¹² beschrieben wurden, wurde ein solcher Synergismus auch mit anderen Stimuli untersucht, mit dem Ziel, die Effektivität der Vakzine zu steigern. Der Effekt folgender Stimuli, alleine und in Kombination mit CD40L, auf die Aktivierung dendritischer Zellen wurde untersucht:

- a) Die Kombination von TNF α , PGE₂, IL-6 und IL-1 β . Dies ist ein potenter und oft gebrauchter Stimulus zur Reifeinduktion^{113,114}. Dass IL-1 β mit CD40L die Produktion von IL-12p70 dendritischer Zellen steigert und deren Potenz hinsichtlich der Induktion der IFN γ -Sekretion von Lymphozyten in einer allogenen Kokultur fördert, ist bereits bekannt¹¹². Kritisch zu sehen ist sicherlich die Anwesenheit von PGE₂, das bei der Induktion einer Th2 gerichteten Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen soll⁶⁸. Jonuleit et al. konnten jedoch zeigen, dass dendritische Zellen, welche mit der Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ stimuliert wurden, in der Lage sind, eine effektive Th1-gerichtete Immunantwort zu induzieren¹¹⁴.
- b) ATP und TNF α . Beide sind potente Stimuli dendritischer Zellen³⁶. In Kombination zeigen sie einen synergischen Effekt. ATP und TNF α stellen gerade durch das Fehlen des umstrittenen PGE₂ eine Alternative zu der Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ dar.

Wurde CD40L zu dendritischen Zellen hinzu gegeben, die 12 h mit der Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ oder mit ATP plus TNF α inkubiert waren, so resultierte daraus ein deutlich synergischer Effekt, in Hinblick auf die Expression von CD86 und MHC-II. Der Grund hierfür könnte in der erhöhten CD40-Expression der dendritischen Zellen nach 12 h Stimulation liegen und einer damit gesteigerten Effektivität der CD40-Ligation.

Der bereits bekannte antiapoptotische Effekt des CD40L^{115,116} gewann durch diese sequentielle Stimulation an Effektivität, da sich der Anteil toter Zellen nach der Stimulation mit der Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ oder ATP plus TNF α unter den aktivierten, dendritischen Zellen deutlich reduzierte. Dies könnte bezüglich der T-Zellaktivierung von Vorteil sein¹¹⁷.

Dendritische Zellen wiesen zudem nach der Stimulation mit der Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ oder ATP plus TNF α im Zusammenspiel mit CD40L eine hohe Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf. Die Expression dieses Moleküles erlaubt eine erfolgreiche Migration der dendritischen Zelle in den drainierenden Lymphknoten.

Die Produktion von IL-12gesamt (IL-12p40/p35) und IL-12p70 wurde wesentlich von der Art der kombinierten Stimuli getriggert. So induzierte die Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ bereits ohne CD40L hohe Konzentrationen von IL-12gesamt, nicht jedoch von IL-12p70. Zur Induktion der IL-12p70-Sekretion wurde die Anwesenheit von CD40L und der Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ benötigt. ATP plus TNF α zeigte insgesamt eine niedrigere IL-12gesamt-Produktion bei fehlendem IL-12p70 im Überstand. Dies blieb auch durch die Zugabe von CD40L weitgehend unbeeinflusst.

4.1.3 Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen auf die induzierte T-Zellantwort

Die Evaluation des Einflusses der Art der Aktivierung von dendritischen Zellen auf die induzierte T-Zellantwort erfolgte in einer Kurz- sowie einer Langzeitkokultur. In der Kurzzeitkokultur wurden dendritische Zellen nach unterschiedlichen Schemata stimuliert und dann mit autologen Lymphozyten für 48 h inkubiert. Gemessen wurde danach die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Hierbei zeigte sich, dass zur Induktion der Expression des Reifemarkers CD69 auf T-Zellen nur dendritische Zellen in der Lage waren, welche sowohl mit der Kombination aus TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ oder ATP plus TNF α als auch mit CD40L stimuliert waren. Dies galt sowohl für CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen, wobei die CD8⁺ T-Zellen insgesamt eine höhere CD69-Expression aufwiesen.

Die T-Zellaktivierung wurde in der Langzeitkokultur, auf deren Ablauf bereits ausführlich eingegangen wurde, auf mehreren Ebenen untersucht. Wöchentlich wurde im Überstand der Kultur die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN γ gemessen. Der Aktivierungsgrad der T-Zellen wurde nach der vierten Stimulation anhand der CD69- und CD45RO-Expression bestimmt. Zur funktionellen Evaluation der CTL kam ein ^{51}Cr -Freisetzungssassay zum Einsatz. Die darin gezeigte Tumorzelllyse war MHC-I-restringiert und spezifisch für Panc-1-Zellen. Die ebenfalls HLA-A2-positive Karzinomzelllinie Kato-III wurde nicht spezifisch lysiert. Die MHC-I-Blockierbarkeit der Tumorzelllyse sowie die Tatsache, dass die Kokultur mit naiven Lymphozyten durchgeführt wurde, weist darauf hin, dass die induzierte Lyse von spezifischen CTL vermittelt wurde, die durch dendritische Zellen *in vitro* aus naiven Zellen differenzierten.

Die Ergebnisse der CTL-vermittelten Lyse zeigten zudem, dass die Verwendung von zwei unterschiedlichen Stimulationsklassen zu einer idealen Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort führt. Diese beiden Komponenten bestanden zum einen aus CD40L und zum anderen aus löslichen Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel der Kombination von TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE $_2$ bzw. ATP plus TNF α . Die alleinige Stimulation der dendritischen Zelle durch CD40L genügt nicht, um eine effektive CTL-vermittelte Immunantwort zu induzieren. Ähnliches kann auch in anderen Arbeiten beobachtet werden: Zwar reift eine nur mit CD40L stimulierte dendritische Zelle aus und weist eine höhere Expression kostimulatorischer Moleküle auf, aber eine effektive Produktion von IL-12p70, eine deutliche Erhöhung ihrer allostimulatorischen Kapazität und auch eine effektive Induktion einer Immunantwort bedarf stets dem Zusammenspiel mit löslichen Gefahrensignalen wie z.B. LPS, IL-1 β oder Tachyzoiten-Antigen^{110,111,118}. Durch die Stimulation der dendritischen Zellen mit CD40L gelang auch in dieser Arbeit zwar die Ausreifung der dendritischen Zelle und die Induktion einer höheren Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-II, jedoch nur eine schwache Induktion einer Immunantwort. Ein synergischer Effekt und eine maximale lytische Kapazität der generierten CTL stellten sich ein, stimulierte man die dendritischen Zellen sowohl mit CD40L als auch mit der Kombination von TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE $_2$ bzw. ATP plus TNF α . Optimal also war die Kombination von T-Zell-gebundenen und löslichem Gefahrensignal. Diese

Ergebnisse spiegelten sich auch in den während der Kokultur gemessenen Zytokinkonzentrationen wider. Niedrige Konzentrationen von IL-4 und IL-10, sowie hohe Konzentrationen von IFN γ wiesen auf ein Th1-Milieu hin. Die IFN γ -Konzentration, welche im Verlauf der Kokultur anstieg, korrelierte positiv mit der Lyseeffizienz der CTL.

In allen Ansätzen, in denen eine CTL-getragene Immunantwort induziert werden konnte, kam es zur Induktion einer CD45R0-Expression auf T-Lymphozyten. Bezüglich dieser Induktion war die Kombination von TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE $_2$ und ATP plus TNF α verglichen mit CD40L alleine diesem überlegen. Ein synergischer Effekt konnte nicht beobachtet werden.

Betrachtet man sich die Ergebnisse der Langzeitkokultur vor dem Hintergrund der IL-12-Produktion der unterschiedlich aktivierten dendritischer Zellen, so zeigt sich folgendes: In den Ansätzen, in denen die Kombination von TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE $_2$ zur DC-Aktivierung eingesetzt wurde, zeigte die lytische Aktivität eine Korrelation mit dem von den dendritischen Zellen produzierten IL-12p70. Genauso, wie CD40L und die Kombination von TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE $_2$ in der IL-12-Produktion synergisch wirkten, verhielt es sich auch hinsichtlich der lytischen Aktivität. Betrachtet man jedoch die Produktion von IL-12p70 in den Ansätzen, in denen ATP mit TNF α verwendet wurden, so fällt auf, dass auch die Zugabe von CD40L zu keiner nennenswerten Produktion des bioaktiven IL-12p70 führte. Im Gegensatz hierzu steht die lytische Aktivität der CTL aus der Langzeitkokultur. Hier zeigte sich trotz nur geringen Mengen an IL-12p70 im Überstand ein deutlicher Synergismus von ATP und TNF α mit CD40L. Diese Hemmung der IL-12-Produktion ist auf die Anwesenheit von ATP zurückzuführen. De Sala et al. machten die Beobachtung, dass ATP zwar die CD40L-induzierte Reifung dendritischer Zellen, beurteilt anhand der Oberflächenmerkmale CD86, CD54 und CD83, unterstützt, jedoch zu einer verminderten IL-12-Produktion führt¹¹⁹. Die Autoren nannten die ATP-vermittelte DC-Aktivierung daher „distorted“, was soviel wie „verzerrt“ bedeutet. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich jedoch, dass mit Hilfe von ATP im Zusammenspiel mit TNF α und CD40L eine starke CTL-vermittelte Immunantwort generiert werden kann und so der von de Sala gebrauchte Begriff der durch ATP induzierten „distorted maturation“ nicht zutrifft,

zumindest nicht in der Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ und CD40L. Vielmehr zeugten die niedrigen Konzentrationen von IL-4 und IL-10, sowie die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ in diesen Ansätzen von einem ausgeprägten Th1-Milieu. Dies bedeutet, dass durch ATP mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierte dendritische Zellen eine Th1-gerichtete Immunantwort auf einem IL12p70-unabhängigen Weg induzieren. Die Identifikation dieses Weges wurde in der vorliegenden Arbeit nicht versucht. Dass jedoch solche Wege existieren, zeigten u.a. Wan et al., die in IL12p40-defizienten Mäusen eine antigenspezifische CTL vermittelte Immunantwort induzieren konnten¹²⁰. Auch ist das Immunsystem von Patienten, die an einem Defekt des IL-12 Rezeptors oder der IL-12p40 Untereinheit leiden, in der Lage, effektive, Th1-gerichtete Immunantworten zu initiieren und zeigt lediglich eine Schwäche bezüglich der Abwehr von Mycobakterien¹²¹. Möglicherweise wird dieser IL-12-unabhängigen Weg über IL-15, vermittelt, welches eine wichtige Rolle bei der durch CD40L-Trimer induzierten CTL-Induktion spielt¹²². Andere Kandidaten sind IL-27 bzw. IL-23, welche ebenfalls bei der Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort beteiligt sein können⁶⁴. Kürzlich veröffentlichte Daten von Schnurr et al. zeigen, dass ATP nicht nur die IL-12-Produktion hemmt, sondern zudem die IL-23-Produktion dendritischer Zellen induziert¹²³.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Effektivität der Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort wesentlich durch die Art der Aktivierung der dendritischen Zellen beeinflusst wird.

4.2 Methodik

4.2.1 Die Langzeitkokultur dendritischer Zellen mit autologen T-Zellen

Zur Evaluation der Potenz dendritischer Zellen bezüglich der Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort gegen Tumorzellen kam eine Langzeitkokultur dendritischer Zellen mit naiven, autologen T-Zellen zum Einsatz. Als Tumorantigen diente der zellfreie Überstand apoptotischer Tumorzellen der Zelllinie Panc-1. Dieses *in-vitro*-Modell der Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort wurde in unserer Arbeitsgruppe für das duktales Pankreaskarzinom bereits zuvor etabliert⁹⁹. Hierbei werden die mononukleären Zellen für die T-Zell-Isolation und die Generierung dendritischer Zellen aus dem Blut gesunder, HLA-A2-positiver Spender gewonnen. Die Tumorzelllinie, die von einem HLA-A2-positiven

Tumorpatienten etabliert wurde, stimmt in mindestens einem HLA-Molekül, nämlich HLA-A2, mit den Spenderzellen überein.

Um speziell die Induktion („priming“) einer Pankreaskarzinom-spezifischen, von CTL getragenen Immunantwort zu untersuchen, wurden in der Kokultur mit dendritischen Zellen lediglich T-Zellen mit einem naiven Phänotyp, der durch die Expression von CD45RA charakterisiert ist, verwendet. Dadurch konnten Interaktionen der dendritischen Zellen mit Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen vermieden werden, welche ebenfalls via IL-12 aktiviert werden²⁵ und durch unerwünschte „bystander“-Aktivität das Priming von T-Zellen oder direkt die Lyse der Tumorzellen beeinflussen können. Neben dendritischen Zellen und naiven CD8⁺ T-Zellen befanden sich in der Kokultur naive CD4⁺ T-Zellen. Auch wenn eine Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen via Kreuzpräsentation in Abwesenheit von T-Helferzellen möglich ist^{21,29}, so erleichtern antigenspezifische T-Helferzellen durch die Produktion von IFN γ und die Expression von CD40L die Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort¹²⁴. Auf die Rationale der Aktivierung von dendritischen Zellen, welche für die Vermeidung von Toleranz notwendig ist, wurde bereits in der Einleitung ausführlich eingegangen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der spezifischen Aktivierung dendritischer Zellen auf die Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort untersucht.

Die dendritischen Zellen wurden vor deren Aktivierung mit dem zellfreien Überstand apoptotischer Tumorzellen („apoptotic bodies“) inkubiert. Die Effizienz der Kreuzpräsentation der antigenen Determinanten liegt bei dieser Art der Antigenaufbereitung höher als z.B. bei der Verwendung von Tumorzelllysat²⁵ und erlaubt somit eine effizientere Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort.

Eine Verwendung Pankreaskarzinom spezifischer Antigene, wie z.B. CEA, Ca19.9 oder MUK1, in Proteinform oder als spezifische Peptide, beinhaltet die Gefahr, dass Tumorzellen durch selektiven Antigenverlust, z.B. durch Mutation, der Immunantwort entkommen. Zudem sind Pankreaskarzinome in Bezug auf ihre Antigenexpression sehr heterogen, so dass eine gegen eine möglichst große Anzahl von antigenen Determinanten gerichtete Immunantwort angestrebt werden soll. Dies wird z.B. durch die Verwendung von ganzen apoptotischen Tumorzellen,

bzw. deren Bestandteilen, erreicht. Die Spezifität der daraus resultierenden Immunantwort wurde untersucht, indem Tumorzellen vor der Kokultur mit den generierten CTLs, mit einem MHC-I-blockierenden Antikörper inkubiert wurden. Eine ausbleibende Lyse dieser Tumorzellen nach MHC-I-Blockade beweist den MHC-I-vermittelten Mechanismus der durch spezifische CTL vermittelten Lyse. Die T-Zellaktivierung im Verlauf der Kokultur mit Tumorantigen gepulsten dendritischen Zellen wurde auf mehreren Ebenen untersucht: Anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Verlustes der Expression von CD45RA konnte in der FACS-Analyse der Aktivierungsgrad von CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ CTL getrennt untersucht werden. Die Zytokinkonzentrationen, im Überstand der Kokultur wöchentlich gemessen, gaben Hinweise auf das vorherrschende Zytokinmilieu (Th1 vs. Th2 vs. Th0) und waren, zusammen mit der lytischen Kapazität der generierten CTL gegenüber Tumorzellen, Parameter, die eine funktionelle Evaluation zuließen.

4.3 Implikationen der Untersuchungsergebnisse für die Entwicklung einer DC-basierten Vakzine gegen das Pankreaskarzinom

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass die Stimulationsbedingungen, unter denen eine Aktivierung dendritischer Zellen stattfindet, einen wesentlichen Einfluss auf die Induktion einer CTL-getragenen Immunantwort besitzen. Die Verwendung von zwei Komponenten als DC-Aktivatoren führte zu einer maximalen CTL-vermittelten Lyse der Pankreaskarzinomzellen. Diese beiden Komponenten bestanden zum einen aus proinflammatorischen Mediatoren (z.B. die Kombination von TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂ bzw. ATP plus TNF α) und zum anderen aus CD40L.

Mit dieser Kombination wurde nicht nur eine maximale Tumorzellyse vermittelt, sondern zudem ein hohes Expressionslevel des Chemokinrezeptors CCR7 induziert, der für die Migration der dendritischen Zelle in den Lymphknoten benötigt wird. Die alleinige Stimulation der dendritischen Zellen mit der Kombination von TNF α , IL-6, IL-1 β und PGE₂, welche in vielen klinischen Studien verwendet wird, erwies sich in Bezug auf den Parameter Tumorzellyse als ineffektiv. Die klinischen Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien zur

Immuntherapie mit dendritischen Zellen sind bisher nicht zufrieden stellend und das Erreichen einer höheren immunogenen Potenz der Vakzine stellt einen wichtigen Schritt dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass sich dendritische Zellen, die durch eine sequentielle Stimulation mit Zytokinen und CD40L aktiviert werden, diesbezüglich als effektiver erweisen. Diese *in-vitro*-Daten müssen jedoch bezüglich ihrer klinischen Relevanz noch in *in-vivo*-Modellen überprüft werden.

4.4 Klinische Ausblicke

Die drei Hauptsäulen der Therapie von malignen Tumoren bestehen bis dato aus der chirurgischen Tumorentfernung, der Strahlentherapie und der zytostatischen Therapie. Neben diesen drei Säulen der Krebstherapie beginnt sich eine vierte zu etablieren: die Immuntherapie. Ihre Strategie ist es, durch Manipulation des Immunsystems den Körper zur Abwehr von entarteten Zellen zu stimulieren. Diese Manipulation kann auf mehreren Ebenen vorgenommen werden: So kann durch die Applikation von Zytokinen das Immunsystem zur Abwehr von Tumorzellen angeregt werden. Diese Strategie wurde unter anderem bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms, hier bestehend aus der Gabe von IFN α und IL-2, mit Erfolg angewendet¹²⁵. Ebenfalls von klinischer Bedeutung, wenn auch nicht unumstritten, ist die Applikation eines monoklonalen Antikörpers in der Therapie des Kolonkarzinoms im Stadium III¹²⁶. Dieser Antikörper bindet an ein Oberflächenmolekül der entarteten Zelle und macht diese so der Elimination durch CTL zugänglich. Die Immuntherapie mit dendritischen Zellen befindet sich momentan in der klinischen Erprobung, wobei der Durchbruch aber bisher noch nicht gelungen zu sein scheint. Eine Optimierung der Effektivität einer Vakzinierung mit dendritischen Zellen ist daher notwendig und auf mehreren Ebenen möglich: Die Wahl des Tumorantigens und dessen Aufbereitung besitzt wesentlichen Einfluss auf die Potenz einer Vakzine²⁵. Auch sind, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, die Stimulationsbedingungen, unter denen eine Aktivierung dendritischer Zellen stattfindet, wichtige Stellgrößen.

Daneben kann aber auch durch die Kombination mit systemischen Behandlungsansätzen eine Steigerung der Effektivität der Vakzine erreicht werden: Shimizu et al. konnten durch eine systemische IL-2-Gabe im Mausmodell

die Effektivität einer dendritischen Zell-Vakzine gegen ein schwach immunogenes Fibrosarkom steigern¹²⁷. Ganss et al. erhöhten durch die Gabe von immunostimulatorischen Oligonukleotiden im Mausmodell die CTL-Infiltration eines Inselzelltumors und dessen Lyse¹²⁸, ein Effekt, der bei einer Vakzinierung mit dendritischen Zellen von großer Bedeutung ist¹²⁹.

Eine weitere Erforschung der Physiologie dendritischer Zellen und die Anwendung dieser Erkenntnisse bei der Herstellung einer Vakzine ist also ebenso notwendig, wie die Identifikation systemischer Behandlungsansätze, die die Induktion einer Immunantwort durch dendritische Zellen und deren Effektivität unterstützen. Gelingt dies, so kann die Immuntherapie mit dendritischen Zellen, auch in Kombination mit den bisherigen onkologischen Behandlungsstrategien, eine echte Therapieoption werden.

5 Zusammenfassung

Im Angesicht der augenscheinlichen Insuffizienz vorhandener Optionen in der Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms stellt die Immuntherapie mit dendritischen Zellen einen möglichen neuen Therapieansatz dar. Bei einer Vielzahl von Malignomen wird diese Art der Therapie experimentell bereits klinisch getestet, bisher jedoch nicht mit ausreichendem Erfolg. Ziel dieser Arbeit war es, zu eruieren, welchen Einfluss der Modus der Aktivierung dendritischer Zellen auf eine gegen Pankreaskarzinomzellen gerichtete Immunantwort besitzt. Dabei sollten Wege identifiziert werden, eine aus dendritischen Zellen bestehenden Vakzine durch eine effektive Stimulation der enthaltenen Zellen möglichst potent in der Induktion dieser Immunantwort zu machen.

Zu diesem Zwecke wurden von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen mit dem Überstand apoptotischer Tumorzellen eines duktales Pankreaskarzinoms inkubiert und dann nach verschiedenen Schemata stimuliert. Die Potenz der dendritischen Zellen wurde eruiert über die Expression von Reifemarkern und kostimulatorischen Molekülen, die Zytokinproduktion und die Induktion von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen sowie der CTL-getragenen spezifischen Immunantwort gegen Pankreaskarzinomzellen in einer halbautologen Kokultur von dendritischen Zellen und naiven T-Zellen. Zur Stimulation der dendritischen Zellen kamen ATP mit $\text{TNF}\alpha$ und die Kombination von $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF}\alpha$ und PGE_2 mit und ohne die Zugabe von CD40-Ligand, einem zellgebundenen, DC-aktivierenden Oberflächenmolekül, zur Anwendung.

Die kombinierte Anwendung von CD40L und proinflammatorischen Mediatoren ($\text{TNF}\alpha$, IL-6 , $\text{IL-1}\beta$ und PGE_2 bzw. ATP plus $\text{TNF}\alpha$) besaß, verglichen mit der getrennten Anwendung dieser Stimuli, einen synergischen Effekt bei der Aktivierung dendritischer Zellen. So stimulierte Zellen zeigten eine hohe Expression von Aktivierungsmarkern und des Zytokinrezeptors CCR7, induzierten effektiv ein Th1-gerichtetes Zytokinmilieu und eine CTL-vermittelte spezifische Immunantwort gegen Pankreaskarzinomzellen. Die Zugabe von CD40-Ligand 12 h nach der Stimulation der dendritischen Zellen mit ATP und

TNF α bzw. der Kombination von IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE $_2$ erwies sich dabei als optimal.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Art der Stimulation der dendritischen Zellen im Rahmen der Immuntherapie des duktales Pankreaskarzinoms einen wesentlichen Einflussfaktor in Bezug auf die Potenz der verwendeten Vakzine darstellt. Geht man von einer Übertragbarkeit dieser *in-vitro*-Daten auf das menschliche Immunsystem aus, so kann mit Hilfe einer optimalen Aktivierung dendritischer Zellen die Effektivität einer Vakzine wesentlich gesteigert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B. Duale Reihe Chirurgie. Thieme-Verlag, Stuttgart 2001. 1. Auflage, S.1190f

2. Underwood JCE. General and Systematik Pathology. Churchill Livingstone, London 1999. Second Edition, S.482f

3. Schnall SF, Macdonald JS. Chemotherapy of adenocarcinoma of the pancreas. *Semin Oncol.* 1996; 23:220-8

4. Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hruban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg.* 1997;226:248-57; discussion 257-60

5. Schulz HJ. Preneoplastic conditions and carcinoma of the exocrine pancreas. *Zentralbl Pathol.* 1994;140:201-2

6. Steinmann RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973; 137:1142-62

7. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:767-811

8. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood – An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Meth.* 1996; 196:137

9. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994; 179:1109
10. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A, Lombardi L, Ravagnani F, Parmiani G, Gianni AM. Massive ex vivo generation of dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol.* 1995; 23:1463
11. Gilboa E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol Immunother.* 1999; 48:382-5
12. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Fujimura T, Ninomiya I, Fushida S, Nishimura GI, Shimizu K, Miwa K. Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *Int J Oncol.* 2001; 18:311-6
13. Bonham CA, Lu L, Banas RA, Fontes P, Rao AS, Starzl TE, Zeevi A, Thomson AW. TGF-beta 1 pretreatment impairs the allostimulatory function of human bone marrow-derived antigen-presenting cells for both naive and primed T cells. *Transpl Immunol.* 1996; 4:186-91
14. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Miwa K. Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism for immune escape. *Int J Oncol.* 2001; 18:33-9
15. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and

induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med.* 1999; 190:1669-78

16. Schlienger K, Craighead N, Lee KP, Levine BL, June CH. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2000; 96:3490-8

17. Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 1996; 271:1723-6

18. Matzinger P. Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:991–1045

19. Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:2245-52

20. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin 2002. 5. Auflage, S. 300

21. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994; 264:961-5

22. Mackey MF, Barth RJ Jr, Noelle RJ. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol.* 1998; 63:418-28

23. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin 2002. 5. Auflage, S. 338

24. Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol.* 2001; 2:1010-7

25. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, Robe J, Endres S, Eigler A. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res.* 2002; 62:2347-52
26. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med.* 1999; 5:405-11
27. Keene JA, Forman J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1982; 155:768-82
28. Mitchison NA, O'Malley C. Three-cell-type clusters of T cells with antigen-presenting cells best explain the epitope linkage and noncognate requirements of the in vivo cytolytic response. *Eur J Immunol.* 1987; 17:1579-83
29. Buller RM, Holmes KL, Hugin A, Frederickson TN, Morse HC 3rd. Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* 1987; 328:77-9
30. Guerder S, Matzinger P. A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med.* 1992; 176:553-64
31. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13:114-9
32. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 1995; 182:389-400
33. Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12:35-43

34. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med.* 1999; 189:821-9
35. Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da'Dara AA, Piskorska D, McGuire E, Harn DA. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003; 171:5837-41
36. Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 165:4704-9
37. Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Harden TK. Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem.* 1997; 272:24348-54
38. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2000; 191:423-34
39. Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, la Sala A, Girolomoni G, Norgauer J. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 2003; 101:3985-90
40. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425:516-21
41. Lee JJ, Takei M, Hori S, Inoue Y, Harada Y, Tanosaki R, Kanda Y, Kami M, Makimoto A, Mineishi S, Kawai H, Shimosaka A, Heike Y, Ikarashi Y, Wakasugi H, Takaue Y, Hwang TJ, Kim HJ, Kakizoe T. The role of PGE(2) in the differentiation of dendritic cells: how do dendritic cells influence T-cell polarization and chemokine receptor expression? *Stem Cells* 2002; 20:448-59

42. Gosset P, Bureau F, Angeli V, Pichavant M, Faveeuw C, Tonnel AB, Trottein F. Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J Immunol.* 2003; 170:4943-52
43. Kabashima K, Murata T, Tanaka H, Matsuoka T, Sakata D, Yoshida N, Katagiri K, Kinashi T, Tanaka T, Miyasaka M, Nagai H, Ushikubi F, Narumiya S. Thromboxane A2 modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. *Nat Immunol.* 2003; 4:694-701
44. Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovasc Res.* 1999; 43:850-9
45. Zepter K, Haffner A, Soohoo LF, De Luca D, Tang HP, Fisher P, Chavinson J, Elmets CA. Induction of biologically active IL-1 beta-converting enzyme and mature IL-1 beta in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli. *J Immunol.* 1997; 159:6203-8
46. Stamenkovic I, Clark EA, Seed B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* 1989; 8:1403-10
47. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391:591-4
48. Pober JS. Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res.* 1999; 19:225-32
49. Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol.* 1993; 151:2497-510

50. Czerniecki BJ, Cohen PA, Faries M, Xu S, Roros JG, Bedrosian I. Diverse functional activity of CD83+ monocyte-derived dendritic cells and the implications for cancer vaccines. *Crit Rev Immunol.* 2001; 21:157-78
51. Jenkins MK, Pardoll DM, Mizuguchi J, Chused TM, Schwartz RH. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84:5409-13
52. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin 2002. 5. Auflage, S. 86
53. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 1999; 5:1249-55
54. McRae BL, Nagai T, Semnani RT, van Seventer JM, van Seventer GA. Interferon-alpha and -beta inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14(+) precursors. *Blood* 2000; 96:210-7
55. Dauer M, Pohl K, Obermaier B, Meskendahl T, Robe J, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Interferon- α disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon- α -treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunology* 2003; 110:38-47
56. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260:547-9
57. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993; 177:1199-204
58. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and

diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:10188-92

59. Magram J, Sfarra J, Connaughton S, Faherty D, Warriar R, Carvajal D, Wu CY, Stewart C, Sarmiento U, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 795:60-70

60. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:495-521

61. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* 1998; 70:83-243

62. Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Pan YC, Hakimi J. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol.* 1995; 154:116-27

63. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 1999; 20:561-7

64. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002; 16:779-90

65. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14:361-8

66. Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol.* 2000; 164:6453-60
67. Gagliardi MC, Sallusto F, Marinaro M, Langenkamp A, Lanzavecchia A, De Magistris MT. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur J Immunol.* 2000; 30:2394-403
68. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol.* 1997; 159:28-35
69. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin 2002. 5. Auflage, S. 347
70. Suttmuller RP, Offringa R, Melief CJ. Revival of the regulatory T cell: new targets for drug development. *Drug Discov. Today* 2004; 9:310-6
71. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin 2002. 5. Auflage, S. 426
72. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-12
73. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001; 61:6451-8
74. Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity

against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med.* 2000; 6:966-8

75. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME, Lyerly HK. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:1331-8

76. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. Retraction: Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med.* 2003; 9:1221

77. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998; 4:328-32

78. Thurnher M, Rieser C, Holzl L, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G. Dendritic cell-based immunotherapy of renal cell carcinoma. *Urol Int.* 1998; 61:67-71

79. Lim SH, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer.* 1999;83:215-22

80. Titzer S, Christensen O, Manzke O, Tesch H, Wolf J, Emmerich B, Carsten C, Diehl V, Bohlen H. Vaccination of multiple myeloma patients with idio-type-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol.* 2000; 108:805-16

81. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Jarisch J, Bowes VA, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Cobb OE, Ireton RC, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL. Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial

involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate*. 1999; 38:73-8

82. Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:3369-76

83. Lodge PA, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res*. 2000 Feb 15; 60:829-33

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

85. Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:8809-14

86. Kurokawa T, Oelke M, Mackensen A. Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. *Int J Cancer*. 2001; 91:749-56

87. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, Chang AE, Braun TM, Mule JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res*. 2001; 61:8513-9

88. Schott M, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum WA, Feldkamp J. Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:4965-9
89. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2001; 167:7150-6
90. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Wu NZ, Dahm P, Pruitt SK, Boczkowski D, Nair SK, Ballo MS, Gilboa E, Vieweg J. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol.* 2001; 166:2953-60
91. Azuma T, Horie S, Tomita K, Takahashi T, Tanaka Y, Kashiwase K, Nieda M, Takeuchi T, Ohta N, Shibata Y, Hirai H, Kitamura T. Dendritic cell immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: University of Tokyo experience. *Int J Urol.* 2002; 9:340-6
92. Hernando JJ, Park TW, Kubler K, Offergeld R, Schlebusch H, Bauknecht T. Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol Immunother.* 2002 ; 51:45-52
93. Gilliet M, Kleinhans M, Lantelme E, Schadendorf D, Burg G, Nestle FO. Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 responses to protein neoantigen. *Blood* 2003; 102:36-42
94. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* 2003; 63:2127-33
95. Iwashita Y, Tahara K, Goto S, Sasaki A, Kai S, Seike M, Chen CL, Kawano K, Kitano S. A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy

for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52:155-61

96. 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 Ruecker A, Muller S, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. 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.* 2002; 51:637-44

97. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer.* 2001; 93:243-51

98. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001; 193:233-8

99. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res.* 2001; 61:6445-50

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

101. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer.* 1975; 15:741-7

102. Yokozaki H. Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathol Int.* 2000; 50:767-77

103. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin 2002. 5. Auflage, S. 712

104. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995; 182:1545-56

105. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Bratton DL, Cohen JJ, Noble PW, Riches DW, Henson PM. The ability to recognize phosphatidylserine on apoptotic cells is an inducible function in murine bone marrow-derived macrophages. *Chest.* 1993; 103:102

106. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995; 182:1545-56

107. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods.* 2000; 243:147-54

108. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:2588-92

109. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol.* 1998; 10:1593-8

110. Lapointe R, Toso JF, Butts C, Young HA, Hwu P. Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2000; 30:3291-8
111. Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, Reis e Sousa C. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity.* 2000; 13:453-62
112. Luft T, Jefford M, Luetjens P, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J Immunol.* 2002; 168:713-22
113. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997; 90:3640-6
114. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997; 27:3135-42
115. Bjorck P, Banchereau J, Flores-Romo L. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int Immunol.* 1997; 9:365-72
116. McLellan A, Heldmann M, Terbeck G, Weih F, Linden C, Brocker EB, Leverkus M, Kampgen E. MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival. *Eur J Immunol.* 2000; 30:2612-9
117. Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaya M, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2000; 191:495-502

118. Wurtzen PA, Nissen MH, Claesson MH. Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scand J Immunol.* 2001; 53:579-87
119. La Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol.* 2001; 166:1611-7
120. Wan Y, Lu L, Bramson JL, Baral S, Zhu Q, Pilon A, Dayball K. Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN-gamma-secreting, CD8(+) CTL in vivo. *J Immunol.* 2001;167:5027-33
121. Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Swiss Med Wkly.* 2001;131:445-54
122. Kuniyoshi JS, Kuniyoshi CJ, Lim AM, Wang FY, Bade ER, Lau R, Thomas EK, Weber JS. Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells. *Cell Immunol.* 1999; 193:48-58
123. Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005; 105:1582-9
124. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin 2002. 5. Auflage, S. 422f
125. Huland E, Heinzer H. Renal cell carcinoma - innovative medical treatments. *Curr Opin Urol.* 2004; 14:239-244
126. Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, Figer A, Skovsgaard T, Monson J, Barone C, Fountzilas G, Riess H, Moylan E, Jones D, Dethling J, Colman J, Coward L,

MacGregor S. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet* 2002; 360:671-7

127. Shimizu K, Thomas EK, Giedlin M, Mule JJ. Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. *Cancer Res.* 2001; 61:2618-24

128. Garbi N, Arnold B, Gordon S, Hammerling GJ, Ganss R. CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. *J Immunol.* 2004; 172:5861-9

129. Pockay BA, Sherry RM, Wei JP. Localization of 111indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor in patients receiving adoptive immunotherapy. Augmentation with cyclophosphamide and correlation with response. *Cancer* 1994; 73:1731-7

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CD40L	CD40-Ligand
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
Flt3	<i>Fms-like tyrosine kinase receptor 3</i>
g	Zentripetalbeschleunigung der Erde
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
sCD40L	CD40L in Trimerform
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TCR	T-Zellrezeptor
Th	T-Helfer
TIIP	Kombination von IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE $_2$
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

8 Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stefan Endres für die Möglichkeit, in seiner Abteilung in einer professionellen und kollegialen Atmosphäre zu promovieren, für seine Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragestellungen und der Vorbereitung von Präsentationen, sowie der Möglichkeit, im Ausland die Ergebnisse dieser Arbeit vorzustellen.

Ich bedanke mich bei PD Dr. med. Andreas Eigler, dem Leiter meiner Arbeitsgruppe, für seine Unterstützung in methodischer und wissenschaftlicher Hinsicht. Meinem Betreuer Dr. med. Maximilian Schnurr danke ich für die Begleitung meiner Dissertation, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die Diskussion der experimentellen Fragestellung und seinen Optimismus. Mein Dank gilt Dr. med. Marc Dauer für seine Unterstützung im experimentellen Arbeiten und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke meinen Co-Doktoranden Tobias Meskendahl, Christoph Scholz und Katrin Pohl ebenso wie Rosemarie Kiefl und Christiane Haselberger, für die Einarbeitung, bzw. die Unterstützung in der Durchführung der Experimente.

Für ihre unschätzbare Unterstützung, nicht nur während der Zeit dieser Arbeit, danke ich meinen Eltern, Geschwistern, Adriane Oltmann.

9 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

Röbe J, Schnurr M, Dauer M, Scholz C, Meskendahl T, Endres S, Eigler A.
Dendritische Zellen in der Immuntherapie des Pankreskarzinoms: Einfluss der Zellaktivierung auf die Immunantwort.
Zeitschrift für Gastroenterologie 2001; 39:703.

Dauer M, Meskendahl T, **Röbe J**, Pohl K, Schnurr M, Halfeldt K, Schoenberg S, Endres S, Eigler A.
Immunotherapy of pancreatic carcinoma: effect of primary pancreatic carcinoma cell lysate on the survival of dendritic cell.
Biological Therapy of Cancer 2001, München.

Dauer M, Pohl K, Meskendahl T, **Röbe J**, Schnurr S, Endres S, Eigler A.
Immunotherapy with monocyte-derived dendritic cells: IL-4 versus IFN- α in the generation of potent antigen-presenting cells.
Biological Therapy of Cancer 2001, München.

Röbe J, Schnurr M, Scholz C, Galambos P, Meskendahl T, Dauer M, Endres S, Eigler A.
Dendritic cells as inducers of T cell-mediated immunity against pancreatic cancer cells: influence of antigen preparation and dendritic cell activation.
Digestive Disease Week 2002, San Francisco, U.S.A..

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, **Robe J**, Endres S, Eigler A. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res.* 2002; 62:2347-52

10 Lebenslauf

23. Juli 1976	Geboren in Schrobenhausen als Sohn von Prof. Dr. Edeltraud und Dr. Heinrich Röbe
1983-1987	Besuch der Grundschule in Augsburg
1987-1996	Besuch des humanistischen Gymnasiums bei St. Stephan in Augsburg
1996	Abitur
1996-1997	Zivildienst im Rettungsdienst des bayerischen Roten Kreuzes
1997	Beginn des Medizinstudiums an der LMU in München
August 1999	Ärztliche Vorprüfung
Seit 2000	Doktorarbeit bei Prof. Dr. S. Endres in der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München
August 2000	Erstes Staatsexamen
März 2003	Zweites Staatsexamen
2003-2004	Erstes PJ-Tertial Pädiatrie am Dr. von Haunerschen Kinderspital des Universitätsklinikums der LMU München; Zweites PJ-Tertial Chirurgie am Universitätsklinikum der Universität Bologna, Italien;
April 2004	Drittes PJ-Tertial Innere Medizin an der medizinischen Poliklinik des Universitätsklinikums der LMU München; Drittes Staatsexamen
Seit August 2004	Assistenzarzt in Weiterbildung an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Tübingen