

AUS DER ABTEILUNG FÜR KLINISCHE PHARMAKOLOGIE

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

der Medizinischen Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Dendritische Zellen in der Immuntherapie des
Pankreaskarzinoms:
Einfluss der Antigenaufbereitung aus vitalen
Tumorzellen auf die Immunantwort *in vitro***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christoph Scholz

aus Augsburg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. M. Diepolder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Mocikat
Priv. Doz. Dr. Ch. Klein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. 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	Hintergrund	1
1.2	Modulation angeborener sowie erworbener Effektor-Mechanismen des Immunsystems	5
1.2.1	Antigenaufnahme	6
1.2.2	Induktion einer Immunantwort	6
1.2.3	Die „2-Signal-Hypothese“	7
1.2.4	Interaktionen im Lymphknoten	8
1.2.5	Steuerung der Immunantwort	8
1.2.6	Effektorzellen der angeborenen Immunantwort	10
1.2.7	Effektorzellen der adaptiven Immunantwort	13
1.2.8	Das „Gefahr-Modell“ der Immunantwort	16
1.3	Anti-Tumor-Vakzine mit dendritischen Zellen	19
1.3.1	Generierung dendritischer Zellen	20
1.3.2	Kreuzpräsentation von Antigenen durch dendritische Zellen	20
1.3.3	Aktivierung dendritischer Zellen	22
1.3.4	Vakzinierung mit dendritischen Zellen	22
1.3.5	Art und Ausmaß der durch dendritische Zellen induzierten Immunantwort	23
1.4	Die Wahl des Antigens als entscheidende Determinante der Anti-Tumor-Vakzine mit dendritischen Zellen	24
1.4.1	Spezifische Peptide als Zielstrukturen von Immuntherapie	24
1.4.2	Antigenpräparation aus ganzen Tumorzellen	25
1.4.3	Fragestellung	26

2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Geräte und Reagenzien	28
2.1.1	Geräte	28
2.1.2	Chemikalien & Verbrauchsmaterial	28
2.1.3	Radioaktive Chemikalien	29
2.1.4	Reagenziensätze	29
2.1.5	Materialien für die Zellkultur	30
2.1.6	Zytokine und Chemokine	30
2.1.7	Puffer, Lösungen, Medien und Seren	31
2.1.8	Antikörper	32
2.2	Zelllinien	33
2.2.1	Pankreaskarzinomzelllinie <i>Panc-1</i>	33
2.2.2	NK-sensitive myeloide Blastenzelllinie <i>K562</i>	33
2.2.3	Magenkarzinomzelllinie <i>Kato-III</i>	33
2.3	Kultur der Zelllinien	34
2.4	Generierung und Kultur der benötigten Zellpopulationen	35
2.4.1	Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	35
2.4.2	Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen	35
2.4.3	Lymphozytenanreicherung	36
2.4.4	Reifeinduktion dendritischer Zellen	36
2.5	Antigenpräparation aus Tumorzellen der Zelllinie <i>Panc-1</i>	37
2.5.1	Lysatherstellung	37
2.5.2	Apoptoseinduktion	38
2.5.3	Gewinnung apoptotischer Tumorzellen und Körperchen	38
2.5.4	Antigen-Pulsung	39
2.6	Identifizierung von HLA-A2 ⁺ Blutspendern	39

2.7	Kokultur gepulster dendritischer Zellen mit autologen PBMC	39
2.7.1	Langzeitkokultur gepulster dendritischer Zellen mit autologen Lymphozyten	39
2.7.2	Kurzzeitkokultur gepulster dendritischer Zellen mit autologen NK-Zellen	41
2.7.3	Kurzzeitkokultur in „Transwell“-Kulturplatten	41
2.8	Analyseverfahren	42
2.8.1	Durchflusszytometrie	42
2.8.2	Durchflusszytometrische Messung der Apoptose von Tumorzellen	44
2.8.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Endozytosefähigkeit dendritischer Zellen	45
2.8.4	Durchflusszytometrische Messung der Aufnahme von Tumormaterial durch dendritische Zellen	45
2.8.5	Mikroskopie	47
2.8.6	Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	48
2.8.7	Proliferationsbestimmung mit [³ H]-Thymidin	49
2.8.8	Magnetische Zellseparation von NK-Zellen	49
2.8.9	Zytotoxizitätsbestimmung im Chrom-Lyse-Test	50
2.9	Statistik	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Phagozytose apoptotischen Tumormaterials durch dendritische Zellen	52
3.1.1	Charakterisierung dendritischer Zellen	52
3.1.2	Apoptoseinduktion der Pankreaskarzinomzelllinie <i>Panc-1</i>	57
3.1.3	Nachweis der Phagozytose apoptotischen Tumormaterials durch dendritische Zellen	58
3.2	Charakterisierung des Einflusses der Antigenaufbereitung auf die Immunantwort	63
3.2.1	Einfluss der Antigenaufbereitung auf die IFN- γ -Sekretion	64

3.2.2	Einfluss der Antigenaufbereitung auf die Tumorzelllyse von <i>Panc-1</i>	65
3.2.3	Charakterisierung der Immunantwort	66
3.2.4	Lyse der Magenkarzinomzelllinie <i>Kato-III</i>	67
3.2.5	Tumorzelllyse in Anwesenheit MHC-I-blockierender Antikörper	68
3.2.6	Lyse der NK-sensitiven Zelllinie <i>K562</i>	68
3.2.7	Unterschiede des Aktivierungszustandes einzelner Zellpopulationen	69
3.3	Einflussgrößen der NK-Zell-vermittelten Immunantwort	73
3.3.1	Einfluss der Antigenaufbereitung	74
3.3.2	Einfluss der Zytokine IL-12 und IL-15	74
3.3.3	Einfluss des direkten Zellkontaktes	74
4	DISKUSSION	76
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4.2	Beurteilung des <i>in-vitro</i> -Modells	77
4.2.1	Halbautologe Kokultur	77
4.2.2	Charakterisierung der dendritischen Zellen	79
4.2.3	Gewinnung von Tumorantigenen	82
4.2.4	Tumorantigenaufnahme und -präsentation	85
4.2.5	Parameter der Immunantwort	86
4.3	Immunologische Reaktionsmuster	87
4.3.1	Überstand apoptotischer Tumorzellen als Antigenquelle	87
4.3.2	Vergleich Hyperthermie- gegenüber UV-Licht-induziert apoptotischen Tumorzellen als Antigenquelle	88
4.3.3	Vergleich ganzer apoptotischer Tumorzellen gegenüber löslichem Antigen	89
4.3.4	Bedingungen der unspezifischen Immunantwort	91
4.4	Spezifische und unspezifische Effektoren in der Immuntherapie	95
4.4.1	Tumor-immunologische Bedeutung der einzelnen Lymphozytensubpopulationen	95

4.4.2	Modell für das Zusammenspiel angeborener und adaptiver Immuneffektoren	98
4.5	Klinische Relevanz und Ausblick	101
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	LITERATURVERZEICHNIS	105
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	123
8	DANKSAGUNG	124
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	125
10	LEBENS LAUF	126

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Krebs tötet. Zwar haben Fortschritte der Tumorchirurgie, der Strahlen- und Chemotherapie in den letzten Jahren die Überlebensraten vieler maligner Erkrankungen deutlich verbessert, dennoch sind Tumore, die bereits ein metastasiertes Stadium erreicht haben, nach wie vor mit einer schlechten Prognose behaftet. Insbesondere gilt dies für das duktales Pankreaskarzinom, das oftmals erst erkannt wird, wenn es bereits metastasiert ist (Ahlgren 1996). Die durchschnittliche Krankheitsdauer von Stellung der Diagnose bis zum Tod durch Metastasierung (v.a. in die Leber), Leberinsuffizienz, Duodenalstenose, Pfortadertrombose oder Arrosion der großen Abdominalgefäße beträgt 7 bis 8 Monate (Ahlgren 1996; Rosewicz und Wiedenmann 1997). Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms macht die Suche nach alternativen Therapieformen, wie z.B. der Nutzung des körpereigenen Immunsystems zur Behandlung von Tumoren, zu einer medizinischen Notwendigkeit.

In den vergangenen hundert Jahren haben Fortschritte im Verständnis der Tumorummunologie und der genetischen Veränderungen, die einer malignen Entartung vorausgehen neue Möglichkeiten eröffnet, gegen Malignome vorzugehen (Ben-Efraim 1999). Die ersten Aufzeichnungen von „Spontanremissionen“ maligner Erkrankungen während einer Infektionskrankheit gehen bis in das 17. Jahrhundert zurück. Der New Yorker Chirurg William Coley griff Ende des 19. Jahrhunderts diese Beobachtung auf und verabreichte Sarkompatienten einen Bakteriencocktail, der -in der Nähe des Tumors injiziert- zu erstaunlichen Heilungserfolgen führte (Wiemann und Starnes 1994). Die Erfolge waren damals vergleichbar mit der etwa zeitgleich von James Ewing propagierten Strahlentherapie. Die Zeit war jedoch noch nicht reif, die naturwissenschaftlichen Grundlagen noch nicht gelegt, um diesen immunologischen Ansatz der Krebstherapie weiterführen zu können. Dies sollte sich im 20. Jahrhundert ändern. Das Immunsystem in seinen Komponenten kam nun in den Fokus forschenden Interesses und wurde in

seinen Grundkomponenten erkannt. So keimt am Beginn des 21. Jahrhunderts die Hoffnung, dass durch die Identifizierung von Tumorantigenen und Induktion einer gegen diese gerichteten Immunantwort eine Wiederholung der beschriebenen „Spontanremissionen“ auf rationaler Grundlage zu erzielen wäre (Boon, Cerottini et al. 1994; Van den Eynde und Boon 1997; Davis, Jefford et al. 2003). Einer der Hoffnungsträger sind dabei dendritische Zellen (DC) -als professionelle antigenpräsentierende Zellen- im Rahmen einer zellgestützten Immuntherapie. Die von Steinman und Cohn 1973 –mehr als 100 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung in der Epidermis durch Langerhans 1868-erstmalig funktional charakterisierten DC sind als einziger Zelltyp in der Lage zytotoxische T-Zellen (CTL) *de novo* zu aktivieren (i.e. *primen*) und diese zur spezifischen Tumorzelllyse anzuregen (Steinman und Cohn 1973). So wurden verschiedenste Vakzinierungsstrategien entwickelt, bei denen mit Antigen beladene DC als Initiatoren einer gegen Tumorzellen gerichteten Immunantwort fungierten (Jefford, Maraskovsky et al. 2001).

Klinische Studien, die Tumorantigen-präsentierende DC als Mittel der Tumorstimmung benutzen, werden zur Zeit weltweit in vielen Arbeitsgruppen durchgeführt. Insgesamt liegen für das maligne Melanom die meisten klinischen Daten vor (Nestle, Alijagic et al. 1998; Thurner, Haendle et al. 1999; Banchereau, Palucka et al. 2001; Nestle 2002; Schuler-Thurner, Schultz et al. 2002). Bei weiteren soliden Tumoren werden DC-Vakzine geprüft. So z.B. auch beim Nierenzellkarzinom (Holtl, Rieser et al. 1999; Marten, Flieger et al. 2002), beim Prostatakarzinom (Burch, Breen et al. 2000; Fong, Brockstedt et al. 2001), bei Brustkrebs und anderen gynäkologischen Tumoren (Vidovic, Graddis et al. 2002; Hernando, Park et al. 2003). Eine Übersicht über die Vielfalt klinischer Tumorstimmungsstudien mit dendritischen Zellen gibt auch Tabelle 1.

Tab. 1: Klinische Tumorzellvaksinierungsstudien mit dendritischen Zellen

-Institution -Forschergruppe -Jahr der Veröffentlichung	Tumor	Antigen	Dendritische Zellen	-Patientenzahl -Klinischer Verlauf ¹ -Immunol. Antwort ²
Stanford University Hsu, Benike et al. 1996	B-Zell Lymphom	Immunglobulin- Idiotyp	DC aus dem peripheren Blut; Unreif	4 Patienten 1 CR, 1 MR, 2 SD 4 von 4 Patienten
Universitätsklinik Zürich Nestle, Alijagic et al. 1998	Melanom	gp100, MART 1, MAGE-1 u.-3, Tyrosinase Peptide; autologes Tumorlysat	Monozyten- abgeleitete DC; Unreif	16 Patienten 2 CR, 3 PR, 1 MR 7 von 16 Patienten
Universitätsklinik Innsbruck Hörtl, Rieser et al. 1999	Nierenzell-CA	Autologes Tumorzelllysat	Monozyten- abgeleitete DC; Ausgereift	4 Patienten 1 PR 4 von 4 Patienten
University of Wales Lim und Bailey-Wood 1999	Multipl. Myelom	Immunglobulin- Idiotyp	Monozyten- abgeleitete DC; Unreif	6 Patienten 5 SD 5 von 6 Patienten
Northwest Hospital Seattle Murphy, Tjoa et al. 1999	Prostata-CA	PSMA Peptide	Monozyten- abgeleitete DC; Unreif	37 Patienten 1 CR, 10 PR, 8 SD 6 von 37 Patienten
Stanford University Reichardt, Okada et al. 1999	Multipl. Myelom	Immunglobulin- Idiotyp	DC aus venösem Blut; Unreif	12 Patienten nicht bewertbar 2 von 12 Patienten
Universitätsklinik Erlangen Thurner, Haendle et al. 1999	Melanom	MAGE-3 Peptid	Monozyten- abgeleitete DC; Ausgereift	11 Patienten 6 MR 8 von 11 Patienten
Mayo Clinic Burch, Breen et al. 2000	Prostata-CA	PAP-GM-CSF Fusions-Peptid	DC aus venösem Blut; Unreif	12 Patienten 3 Abfall PSA >50% 9 von 9 Patienten
Universitätsklinik Freiburg Mackensen, Herbst et al. 2000	Melanom	MAGE-1, Melan-A, gp100, Tyrosinase	CD34+ Stammzellen- abgel. DC; Ausgereift	14 Patienten 1 MR, 7 SD 5 von 14 Patienten
Universitätsklinik Erlangen Schuler-Thurner, Dieckmann et al. 2000	Melanom	MAGE-3	Monozyten- abgeleitete DC; Ausgereift	8 Patienten 1 SD 8 von 8 Patienten

Tab 1: Fortsetzung

Institution	Tumor	Antigen	DC	Ergebnisse
Universitätsklinik Köln Titze, Christensen et al. 2000	Multiples Myelom	Immunglobulin Idiotyp	CD34+ Stammzellen- abgel. DC; Unreif	11 Patienten 1 S 4 von 11 Patienten
Baylor Institute Dallas Banchereau, Palucka et al. 2001	Melanom	gp100, MART-1, Mage-3, Tyrosinase	CD34+ Stammzellen- abgel. DC; Unreif	18 Patienten 3 CR, 1 PR, 3MR, 3SD 16 von 18 Patienten
Stanford University Fong, Hou et al. 2001	Colon-Ca Lungen-Ca	CEA- Peptid	Flt3-ligand- expandierte DC	12 Patienten 2 CR, 2 SD, 1 MX 7 von 12 Patienten
Stanford University Fong, Brockstedt et al. 2001	Prostata-Ca	Xenogen. PAP- Peptid	DC aus dem peripheren Blut; Unreif	21 Patienten 7 SD 21 von 21 Patienten
University of Michigan Geiger, Hutchinson et al. 2001	Solide pädiatrische Tumoren	Autologes Tumorzell- lysate	Monozyten- abgeleitete DC; Unreif	15 Patienten 1 PR, 5 SD 4 von 8 Patienten
Universität Düsseldorf Schott, Seissler et al. 2001	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	Calcitonin und CEA- Peptide	Monozyten- abgeleitete DC; Ausgereift	7 Patienten 1 PR, 3 SD, 2 MX 7 von 7 Patienten
Duke University Heiser, Coleman et al. 2002	Prostata-Ca	PSA- codierte mRNA	Monozyten- abgeleitete DC;	13 Patienten 1 MR 9 von 9 Patienten
Universität Bonn Hernando, Park et al. 2002	Uterus-sarkom, Ovarial-Ca	Autologes Tumorzell- lysate	Monozyten- abgeleitete DC; Ausgereift	8 Patienten 3 SD 2 von 8 Patienten
Universität Wien Stift, Friedl et al. 2003	Solide Tumore	Autologes Tumorzell- lysate	Monozyten- abgeleitete DC; Ausgereift	20 Patienten 7 MR 18 von 20 Patienten

¹ Klinischer Verlauf:

CR= komplette Remission (100 % Rückbildung aller Tumormanifestationen); PR= partielle Remission (>50% Tumorrückbildung länger 1 Monat); MR= geringe (minor) Remission (>25% -50% Tumorrückbildung länger 1 Monat oder >50% Tumorrückbildung kürzer 1 Monat); MX= „mixed response“ (Regression einiger Metastasen, bei gleichzeitiger Progression anderer Metastasen)

² Immunologische Antwort:

-Zellulär: Antigen-spezifische T-Zellproliferation, Antigen-spezifische DTH-Reaktion, Antigen-spezifische Zytokinfreisetzung, Frequenz Antigen-spezifischer T-Effektorzellen, spezifische lytische Aktivität gegen Tumorzellen
-Humoral: Antigen-spezifische Antikörperproduktion

(siehe auch Abb. 2)

1.2 Modulation angeborener sowie erworbener Effektor-Mechanismen des Immunsystems

Als R. Steinman und Z. Cohn dendritische Zellen 1973 erstmals in den sekundären lymphoiden Organen der Maus charakterisierten, taten sie dies primär nach morphologischen Gesichtspunkten (Steinman und Cohn 1973). Die zentrale Rolle, die DC in der Physiologie der Immunantwort spielen wurde jedoch schon bald erahnt (Steinman und Cohn 1974). Eine Übersicht über die Physiologie dendritischer Zellen gibt Abb. 1.

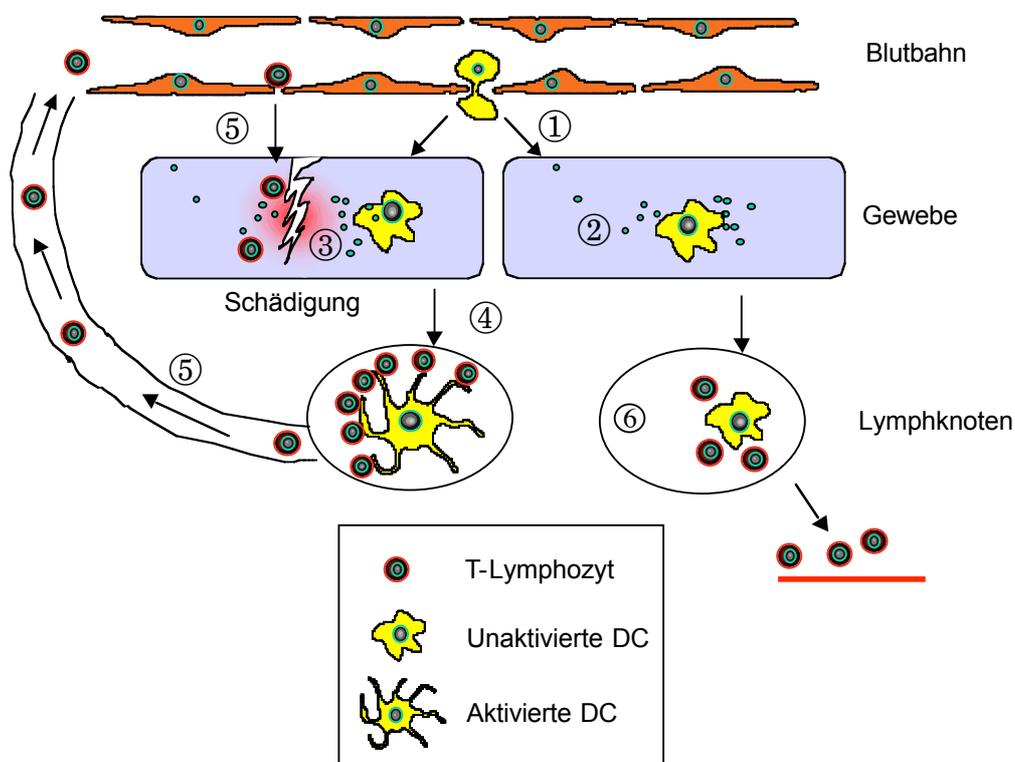


Abb. 1: Funktionszustände dendritischen Zellen

Eine dendritische Vorläuferzelle wandert aus dem Blut in peripheres Gewebe ein (1). Dort nimmt sie lösliche Partikel in ihr Zytosol auf, zerlegt Proteine in Peptide und transportiert diese gebunden an MHC-Moleküle, an die Zelloberfläche (2) und (3). Bei Aktivierung der DC durch Gefahren-Signale (z.B. im Rahmen von Zellschädigung (3)) wandern DC in regionale Lymphknoten (4). Im Lymphknoten aktivieren DC antigenspezifische T-Lymphozyten, die daraufhin über die Blutbahn zum Ort der Gewebeschädigung gelangen, um ihre Funktion als Effektoren der Immunantwort zu erfüllen (5). Anergie Lymphozyten entstehen durch Interaktion im Lymphknoten mit nicht aktivierten DC (6).

1.2.1 Antigenaufnahme

Dendritische Zellen kommen in ruhender Form in nahezu allen Geweben des Körpers vor und bilden damit ein dichtes Netzwerk von sogenannten Wächterzellen. Charakteristische Eigenschaften von ruhenden DC sind vor allem ihre durch fingerförmige Zytoplasmaausläufer vergrößerte Oberfläche sowie die konstitutive Mikro- und Makropinozytose (Norbury, Chambers et al. 1997). Sie stehen damit in engem Kontakt mit ihrer Umgebung. Die aufgenommenen Proteinstrukturen werden in Phagolysosomen enzymatisch abgebaut und mit Präsentationsmolekülen (MHC-Molekülen) in spezifischer Weise gekoppelt. Erst durch diese gekoppelte Präsentation werden die antigenen Determinanten für das Immunsystem „sichtbar“. Ihren Ursprung haben DC in CD34⁺ Stammzellen im Knochenmark, die sich zu DC-Vorläuferzellen des peripheren Blutes entwickeln können (Ferrero, Bondanza et al. 1998). Diese migrieren in die verschiedenen Gewebe, wo sie dann als unreife bzw. nicht-aktivierte DC mit hoher phagozytotischer Aktivität ortsständig werden (Nguyen, Ebner et al. 2002).

1.2.2 Induktion einer Immunantwort

Jedes funktionierende Überwachungssystem zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, die Abwesenheit von Bedrohung durch Ruheaktivität zu kennzeichnen aber gleichzeitig Gefahr schnell und spezifisch zu erkennen, und geeignete Gegenmaßnahmen einzuleiten. Als Wächterzellen des Immunsystems tragen DC zu diesem Zweck auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für viele Pathogenspezifische Strukturen, wie zum Beispiel das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, bakterielle DNS aber auch Rezeptoren für obligat intrazelluläre Moleküle, wie z.B. ATP (Schnurr, Then et al. 2000; Krieg 2002; Kaisho und Akira 2003). Aktivierung dieser Rezeptoren durch Infektion oder Gewebsschädigung, mit Austritt intrazellulärer Strukturen, induziert eine nachhaltige Zustandsänderung der DC.

DC können, im Rahmen einer Aktivierung, Antigen phagozytieren, intrazellulär prozessieren und auf der Oberfläche als immunologisch erkennbare

Eiweißfragmente (Peptide) in MHC-Molekülen präsentieren. Der Begriff Peptid bezeichnet hierbei eine ca. 9 Aminosäuren lange Sequenz, die im Kontext eines MHC-I-Moleküls präsentiert wird und gegen die eine spezifische adaptive Immunantwort gerichtet ist. Diese Präsentation findet jedoch nun in wesentlich höherer Dichte und mit größerer Stabilität statt (Sallusto, Nicolo et al. 1996; Inaba, Turley et al. 1998; Mitchell, Nair et al. 1998). Auch verlieren aktivierte DC diejenigen Rezeptoren, die sie an das geschädigte Gewebe binden und organisieren ihre Zytoskelettstruktur neu. Sie werden so mobil, verlassen umgehend das gefährliche und gefährdete Gewebsareal und gelangen auf schnellstem Wege in den drainierenden Lymphknoten. Zeitnah erscheinen sogenannte kostimulatorische Moleküle (v.a. CD80; CD86), die in ebenso dichter und stabiler Form wie die MHC-Moleküle die Oberfläche bedecken. Nicht mehr benötigte Zellaktivitäten wie die Phagozytose werden nun eingestellt. Stattdessen kommt die Produktion löslicher proinflammatorischer Botenstoffe wie z.B. Interleukin-1, -6 und -12 in Gang (Banchereau und Steinman 1998; Banchereau 2002).

1.2.3 Die „2-Signal-Hypothese“

Zwei unterschiedliche und voneinander unabhängige Signale, werden durch DC in aktiviertem Zustand im Lymphknoten übermittelt. „Signal 1“ beschreibt die molekulare Identität des Antigens anhand seiner an MHC-Moleküle gebundenen Peptide. „Signal 2“ vermittelt als Zusatzinformation die Gefährlichkeit des Antigens. Dies geschieht durch die oben erwähnten kostimulatorischen Moleküle sowie eine Vielzahl proinflammatorischer Oberflächenproteine und sezernierter Botenstoffe. In diesem Aktivierungszustand ist eine DC in der Lage, für eine der Art der Schädigung angemessene und für das betreffende Antigen spezifische Immunantwort zu sorgen.*

* Obwohl wichtige Details der Initialphase einer Immunantwort aufgeklärt werden konnten, bleiben mehrere Aspekte dieser Modellvorstellung Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Darauf kann im Rahmen dieser Arbeit nicht im Einzelnen eingegangen werden. Im Folgenden werden Modellvorstellungen, wie sie im Rahmen des „Infektiösen Nicht-Selbst Modells“ von C. Janeway (Janeway, C.A. Jr., (1992)) und des „Gefahr-Modells“ von P. Matzinger (Matzinger, P. (1994)) vertreten werden, übernommen.

1.2.4 Interaktionen im Lymphknoten

Im Lymphknoten kommt es zur Interaktion zwischen den aktivierten DC und den Effektorzellen des Immunsystems. Vor allem T-Lymphozyten werden von aktivierten DC in spezifischer Weise für ihre Aufgaben im Rahmen einer Immunantwort vorbereitet (sog. *priming*). DC sind in der Lage sowohl mit zytotoxischen T-Zellen (CTL) als auch mit T-Helferzellen zu interagieren (Steinman, Inaba et al. 1999; Mempel, Henrickson et al. 2004). DC präsentieren dabei auf MHC-II gebundenes Antigen den CD4⁺ T-Helferzellen und beeinflussen somit diese Regulatoren der B-Zell-vermittelten humoralen und der CTL-vermittelten zellulären Immunantwort (Germain 1994).

Andererseits können DC jedoch auch aufgenommene Proteinstrukturen als Peptide auf MHC-I präsentieren und so CTL antigenspezifisch zu klonaler Expansion anregen. Dieser Prozess wird *cross-priming* genannt (Heath und Carbone 2001). CTL können spezifisch und effektiv diejenigen Zellen durch Perforation der Membran oder Apoptoseinduktion zerstören, deren molekulare Identität sie mit ihren Rezeptoren erkennen (Berke 1994). Dass ein Pathogen mit eben jenem molekularen Oberflächenmuster zum jeweiligen Zeitpunkt eine Gefahr für den Organismus darstellt, wird den zytotoxischen T-Zellen von aktivierten DC übermittelt.

DC sind also in der Lage unter primärer Umgehung von regulatorischen Einheiten wie T-Helferzellen und ohne Rückgriff auf T-Gedächtniszellen eine CTL-Immunantwort (=Th1-Immunantwort) gegen ein neues Antigen, wie zum Beispiel ein Virus, zu generieren.

1.2.5 Steuerung der Immunantwort

Für eine effektive Abwehr eines Pathogens bedarf es einer Koordination der immunologischen Mechanismen. Die Art der Immunantwort muss für die Abwehr des Pathogens geeignet sein, sie muss das betroffene Gewebe schützen, ohne es in unverhältnismäßig großem Ausmaß zu schädigen. Schließlich sollte ein immunologisches Gedächtnis induziert werden, um für

das neuerliche Auftreten eines Pathogens besser gerüstet zu sein. Für diesen Typ einer immunologischen Reaktion wurde der Begriff „adaptive Immunantwort“ geprägt und DC spielen dabei eine entscheidende Rolle.

Die Polarisation der CD4⁺ T-Helferzellen in zwei, als „Th1“ und „Th2“ bezeichnete, Subpopulationen ist dabei entscheidend für die Richtung, die eine Immunantwort einschlägt. Dabei gibt das von T-Helferzellen sezernierte Zytokinmuster den Ausschlag. Die Sekretion von IL-4 durch Th2-Zellen fördert z.B. die Entwicklung der Th2-Immunantwort. Diese Form der immunologischen Reaktion ist gekennzeichnet durch hohe Antikörpertiter aller Immunglobulinklassen durch aktivierte B-Lymphozyten, eine Aktivierung eosinophiler Granulozyten sowie Mastzellen. Eine Th2-Immunantwort gewährleistet dadurch Schutz gegen Protozoen, Würmer und verschiedene Bakterien. Sie kann jedoch auch die Entstehung atopischer Erkrankungen und eine verminderte Abwehr gegenüber intrazellulären Erregern bedingen.

Eine Th1-Immunantwort hingegen wird geprägt durch die Anwesenheit der Zytokine IL-12 und IFN- γ . Im Zuge einer Th1-Reaktion kommt es zur Produktion opsonierender Antikörper (v.a. IgG und IgM), zur Aktivierung von Makrophagen und zu einer Steigerung der CTL-Aktivität durch die weitere Sekretion von IFN- γ und IL-2. Diese Form der Immunantwort ist besonders geeignet, gegen intrazelluläre Erreger vorzugehen. Sie ist allerdings auch verantwortlich für die akute Transplantatabstoßung und für organspezifische Autoimmun-Erkrankungen. Th1- und Th2-CD4⁺ T-Helferzellen hemmen sich gegenseitig. Ein Th2-Zytokinmuster verhindert die Sekretion der Th1-Zytokine und umgekehrt (Übersicht in (Romagnani 1999)).

Zwischen diesen beiden Polen der Immunantwort bestehen fließende Übergänge, die es dem Immunsystem erlauben, seine Reaktion organ- und erregerspezifisch anzupassen. Einmal gebahnte Immunantworten induzieren nach Beseitigung des Pathogens ein teilweise lebenslangliches immunologisches Gedächtnis, das sowohl Spezifität wie auch Art der zur Abwehr benötigten Mechanismen enthält. DC sind Ausgangspunkt und

wahrscheinlich wichtigstes steuerndes Element einer in all ihren Komponenten maßgeschneiderten immunologischen Reaktion (Banchereau, Briere et al. 2000; Pulendran, Banchereau et al. 2001).

Die außerordentliche Fähigkeit dendritischer Zellen, eine effektive Immunantwort in Gang zu bringen und zu unterhalten, konnte im Mausmodell eindrucksvoll demonstriert werden. DC waren in der Lage, potente Immunantworten gegenüber Antigenen zu induzieren, die vorher vom Immunsystem derselben Maus toleriert worden waren (Citterio, Rescigno et al. 1999). Maligne Tumore entgehen den Effektoren des Immunsystems durch eine Vielzahl von Mechanismen (Fuchs und Matzinger 1996; von Bernstorff, Spanjaard et al. 1999; Oxsenbein 2002). Trotzdem konnte im Hamstermodell sogar die immunologische Toleranz gegen das Pankreaskarzinom, das allgemein als wenig immunogen gilt, mit Hilfe einer DC-Vakzine durchbrochen werden (Akiyama, Maruyama et al. 2002). Zu dieser Immunreaktion, tragen sowohl angeborene als auch erworbene Immuneffektormechanismen bei.

1.2.6 Effektorzellen der angeborenen Immunantwort

Eine erste Phase der Immunantwort erfolgt durch die Vermittlung von Effektorzellen mit nichtklonalen oder wenig diversifizierten Rezeptoren. Im Unterschied zum adaptiven Teil des Immunsystems sind diese Mechanismen jedoch nicht in der Lage ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen.

Natürliche Killer (NK)-Zellen

Der Begriff „Natürliche Killerzelle“ wurde durch die Beobachtung geprägt, dass diese Zellen in der Lage waren, ohne vorausgegangene Aktivierung bestimmte Tumorzellen zu lysieren (Trinchieri 1989). NK-Zellen besitzen als Effektoren der unspezifischen Immunantwort keinen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor, und ihre Aktivierung ist nicht MHC-restringiert. NK-Zellen werden durch verschiedene Rezeptoren, die weitverbreitete Liganden binden, zur lytischen Aktivität angeregt (Lanier 1998). Eine zweite Gruppe von Rezeptoren, sog. *killer inhibitory receptors* (KIR), erkennen jedoch autologe MHC-I-Moleküle und hemmen die Aktivierung (Bakker, Phillips et al. 1998). So werden Zellen, die

autologe MHC-I-Moleküle in ausreichendem Maß und in nicht veränderter Form exprimieren, als körpereigen erkannt und entgehen der NK-Zell-vermittelten Lyse. Körperzellen jedoch, die z.B. im Rahmen einer malignen Entartung, keinen MHC-I-Komplex auf ihrer Oberfläche mehr zeigen, entgehen dem antigenspezifischen Erkennungsmechanismus von CTL. NK-Zellen werden jedoch durch gerade dieses Fehlen eines MHC-I-Komplexes nicht mehr an ihrer lytischen Aktivität gehindert und zerstören die betroffene Zelle. Diese inzwischen vielfältig empirisch gestützte Theorie hat als *missing self*-Theorie Eingang in die Literatur gefunden (Ljunggren und Karre 1990).

Ein aktivierendes Signal stellt z.B. der NKG2D-DAP10-Rezeptor-Komplex dar, der auf der Oberfläche von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird. Dessen bisher bekannte Liganden (MICA und Rae-1) sind z.B. auf „gestressten“ Tumorzellen zu finden (Bauer, Groh et al. 1999; Cerwenka, Bakker et al. 2000; Diefenbach, Jamieson et al. 2000; Diefenbach, Jensen et al. 2001). Eine Stimulation via NKG2D kann hemmende Signale der Zielzelle, wie z.B. die oben erwähnte Expression von MHC-I, überspielen.

Ein weiteres Konzept der NK-Zell Aktivierung favorisiert eine direkte Interaktion zwischen DC und NK-Zellen auch *licence to kill*-Theorie genannt (Fernandez, Lozier et al. 1999). In den dazu von Fernandez et al. veröffentlichten Versuchen, stellt die Anwesenheit von DC einen notwendigen auslösenden Faktor bei einer NK-Zell-abhängigen Immunantwort dar. DC stellen in diesem Modell durch noch nicht näher bekannte Mechanismen NK-Zellen durch direkten Zellkontakt eine *licence to kill* aus. Eine Beteiligung der Zytokine IL-12 und IL-15 an dieser Interaktion zwischen DC und NK-Zellen konnte dabei experimentell ausgeschlossen werden.

Aktivierete NK-Zellen lysieren ihre Zielzelle durch die Ca^{++} -abhängige Freisetzung lytischer Granula in den intrazellulären Spalt. Diese Granula enthalten Perforin-Monomere und Granzyme genannte Serinproteasen. Perforin-Monomere polymerisieren in der Plasmamembran der Zielzelle und bilden dadurch eine 16 nm große Pore. Diese Pore wird *in vivo* wohl vor allem

dazu benutzt den Zugang zum Zellinneren für Granzyme zu öffnen (Squier und Cohen 1994). Innerhalb der Zelle entfalten Granzyme ihre Wirkung indirekt, durch Aktivierung einer Enzymkaskade, an deren Ende die Caspase-Aktivierte-Desoxyribonuklease (CAD) steht. Dieses Enzym gilt als das entscheidende Effektorenzym bei der DNS-Fragmentation im Rahmen der Apoptose. NK-Zellen zerstören also ihre Zielzelle durch Apoptose-Induktion.

Zusätzlich dazu ist eine zytotoxische Wirkung von NK-Zellen über den Weg der Zytokinfreisetzung (z.B. TNF- α) beschrieben. Neben der direkten zytotoxischen Wirkung auf Zielzellen wird den NK-Zellen auch eine Rolle als Modulatoren des Immunsystems zugeschrieben, die durch die frühzeitige Produktion von IFN- γ eine entstehende Immunantwort in Richtung Th1 polarisiert (Hill und Sarvetnick 2002).

CD3⁺ T-Zellen

CD3⁺ T-Zellen stellen eine erst seit 1987 beschriebene Untergruppe der CD3⁺ T-Zellen dar (Chien, Iwashima et al. 1987 A; Chien, Iwashima et al. 1987 B). Sie besitzen als Charakteristikum einen rearrangierten T-Zell-Rezeptor bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Sie wurden mehr oder weniger zufällig bei der Suche nach der genetischen Grundlage des T-Zell-Rezeptors entdeckt (Saito, Kranz et al. 1984). Ihre physiologische Funktion ist noch weitgehend ungeklärt. Sie erkennen ihr Antigen nicht-MHC-restringiert als native Antigenstruktur. Dies ist in etwa vergleichbar mit einer Antikörper-Antigen-Bindung. Ähnlichkeiten zu NK-Zellen bestehen in der Expression inhibierender und evtl. aktivierender Rezeptoren (Chien, Jores et al. 1996).

Mit ihrem T-Zell-Rezeptor können sie nicht-MHC-restringiert Liganden erkennen, die eine Veränderung der betreffenden Zellen (z.B. durch Infektion oder andere Stressoren) anzeigen. Als solche Liganden werden Hitze-Schock-Proteine, nicht-klassische MHC-Moleküle, und vor allem nichtpeptidische Antigene, sog. Phosphoantigene beschrieben (Kaur, Voss et al. 1993). Gründe für die Ausbildung genau dieses Antigen-Rezeptor Repertoires sind bislang nur spekulativer Natur. Ein intrinsisch (u.U. genetisch) determiniertes Antigen-

Rezeptor-Repertoire, scheint jedoch im Laufe des Lebens durch extrinsische Einflüsse modulierbar zu sein. $\gamma\delta$ -T-Zellen kommen in zwei Hauptgruppen vor: als intraepitheliale $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren sie einen durch die variable Region V δ 1 gekennzeichneten T-Zell-Rezeptor, im peripheren Blut hingegen meist einen V δ 2⁺ T-Zell-Rezeptor (Fisch, Oettel et al. 1992). Zusätzlich zu ihrer zytotoxischen Funktion kommt ihnen auch eine Rolle als Produzenten einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen zu. Dazu zählen IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-2 und die Chemokine MIP1- α , MIP1- β und RANTES (Poccia, Battistini et al. 1999).

Die zytotoxischen Effektormechanismen der $\gamma\delta$ -T-Zellen ähneln den für NK-Zellen beschriebenen und entsprechen damit denen aller T-Zellen (Haas, Pereira et al. 1993; Chien, Jores et al. 1996; Cipriani, Borsellino et al. 2000). Auch $\gamma\delta$ -T-Zellen zerstören also ihre Zielzelle durch Apoptose-Induktion.

1.2.7 Effektorzellen der adaptiven Immunantwort

Das Charakteristikum der adaptiven Immunantwort ist eine durch somatische Rekombination entstandene (d.h. nicht im Genom kodierte) Spezifität. Während NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen ein unterschiedlich großes Spektrum an Antigenen bzw. Oberflächenstrukturen erkennen und mit den ihnen eigenen Effektormechanismen beantworten, erkennen die Rezeptoren der $\alpha\beta$ -T-Zellen spezifisch ein von MHC-Molekülen präsentiertes Peptid. Solcherart selektierte T-Zell Klone müssen klonal expandieren (mit einer damit verbundenen längeren Latenzzeit), bekämpfen dann aber das betreffende Antigen mit äußerst wirksamen Effektormechanismen. Die durch die MHC-Restriktion bedingte Selektivität ist dabei Bedingung für eine zielgerichtete Immunantwort, die einen Schaden an nicht erkranktem Gewebe begrenzt. Eine adaptive Immunantwort ist zudem Bedingung für die Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses.

T-Helfer-Zellen

Die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellen für die Polarisierung der adaptiven Immunantwort (Th1 oder Th2), wurde in Abschnitt 1.1.5 näher erläutert. Hier soll lediglich auf die Bedeutung der Th1-CD4⁺ T-Zellen auf die CTL vermittelte Immunantwort eingegangen werden.

Aktivierte Th1-CD4⁺ T-Zellen sezernieren IFN- γ , GM-CSF, IL-2 und TNF- α . Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie dabei CD40-Ligand. IFN- γ inhibiert die Proliferation von Th2-CD4⁺ T-Zellen, aktiviert NK-Zellen und Monozyten und führt zusätzlich zu einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen in epithelialen Zellen und APCs. Es polarisiert damit die Immunantwort in Richtung für die Abwehr intrazellulärer Erreger geeigneter Effektor-mechanismen (Heufler, Koch et al. 1996). CD40-Ligand bindet z.B. an DC und führt dort zur vermehrten Expression kostimulatorischer Moleküle und damit zu einem effektiveren T-Zell-*priming* (Schoenberger, Toes et al. 1998). GM-CSF ist ein entscheidender Faktor für die Rekrutierung neuer DC an den Ort der Immunreaktion. Dieser Effekt im Zusammenhang mit TNF- α führt dann zu einer stabilen und anhaltenden Antigenpräsentation im Kontext kostimulatorischer Moleküle (Ossendorp, Mengede et al. 1998)

IL-2 wird, als T-Zell proliferierender Faktor, von aktivierten CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen gleichermaßen sezerniert. Bei Erkennung eines spezifischen Antigens von CD4⁺ T-Zellen auf DC im Kontext von MHC-II und gleichzeitiger Kostimulation können CD4⁺ T-Zellen IL-2 in größerer Menge sezernieren und damit die Aktivierung und Proliferation von CTL unterstützen (Bennett, Carbone et al. 1998).

Die Wechselwirkung von CD4⁺ T-Zellen und DC bei Erkennung des Antigens über MHC-II führt aber auch, über die oben beschriebenen Mechanismen wie CD40-Ligand und IFN- γ , zur Aktivierung der betreffenden DC (Bennett, Carbone et al. 1997). Dies bedingt eine vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der DC und bedeutet damit für eine gleichzeitig auf derselben DC ihr Antigen im Kontext von MHC-I

erkennende CTL ein Aktivierungssignal, das diese ihrerseits mit der Sekretion von IL-2 und der Expression des IL-2-Rezeptors beantwortet. Diese autokrine Schleife führt dann zur Proliferation der antigenspezifischen CTL (Ridge, Di Rosa et al. 1998).

Die vielen verschiedenen Einflussmöglichkeiten, die CD4⁺ T-Zellen auf CTL haben, zeigen, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen wahrscheinlich einen notwendigen Bestandteil einer spezifische CTL-getragenen Immunantwort darstellen (Altfeld und Rosenberg 2000).

Zytotoxische T-Zellen (CTL)

Wie bereits oben beschrieben, benötigen naive CTL zur Aktivierung und Proliferation, zwei unabhängige Signale. „Signal 1“ stellt dabei die Erkennung eines spezifischen immunogenen Peptids im Kontext eines MHC-I-Moleküls dar. Das zusätzlich benötigte „Signal 2“ bildet die Kostimulation, die im Falle einer CTL-Aktivierung deutlich intensiver sein muß, als dies für eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen notwendig ist. Die einzigen Zellen, die in der Lage sind, eine derartige, CTL-aktivierende, kostimulatorische Hilfe anzubieten, sind aktivierte DC (Young und Steinman 1990; Mehta-Damani, Markowicz et al. 1994). Aktivierte CTL sind dann in der Lage, peptidspezifisch und in schneller Folge Zielzellen, die das jeweilige Peptid über MHC-I-Moleküle präsentieren, durch die lokale Freisetzung lytischer Granula zu zerstören (Nakajima und Henkart 1994; Yasukawa, Ohminami et al. 2000).

Damit eignen sich CTL ausgezeichnet für eine wirksame und spezifische Immunantwort gegen Zellen, die im Rahmen einer Virusinfektion oder malignen Wachstums ihr Antigenrepertoire ändern und damit neue immunogene, infektiöse- oder tumorspezifische Peptide auf den MHC-I-Molekülen ihrer Oberfläche präsentieren. CTL bedienen sich dabei derselben Effektormechanismen, wie sie bereits bei NK-Zellen beschrieben wurden. Ihre Regulation ist jedoch durch die Notwendigkeit des DC abhängigen *primings* sehr streng. *Priming* bezeichnet dabei jenen Vorgang, der eine ruhende naive CTL zur Proliferation und spezifischer lytischer Aktivität befähigt. Die

Manipulation dieser Regulierung, zum Zweck der Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort stellt das Ziel einer T-Zell-gestützten Anti-Tumor-Immuntherapie dar.

1.2.8 Das „Gefahr-Modell“ der Immunantwort

Die Fragen, die das Immunsystem zu beantworten hat, wenn es sich mit einem Antigen konfrontiert sieht, sind:

- a) Soll reagiert werden?
- b) Wenn ja, in welchem Ausmaß?
- c) Mit welchen Effektormechanismen?
- d) Wo?
- e) Wie wird der Schaden am Gewebe begrenzt, das es zu schützen gilt?

Gemäß der klassischen Theorie der Unterscheidung zwischen Selbst und Nichtselbst wird die Entscheidung über Reaktion oder Toleranz durch die Effektorzellen getroffen. Im Gegensatz dazu entlässt das „Gefahr-Modell“ die Effektorzellen des Immunsystems im Prinzip aus der Verpflichtung zur Beantwortung dieser Frage und setzt an diese entscheidende Stelle die Gewebe, die des Schutzes der Effektorzellen bedürfen (Anderson und Matzinger 2000). Das „Gefahr-Modell“ geht davon aus, dass das Immunsystem eher auf das Erkennen von Gefahr reagiert als auf das Erkennen von Nichtselbst (Matzinger 1994). Im Zusammenhang mit Gefahrensignalen richtet sich dabei eine Immunantwort gegen das erkannte Antigen, wohingegen als „harmlos“ (d.h. ohne Gefahrensignale) erkanntes Antigen tolerogen wirkt. Die Signalisierung von Gefahr fällt dem betroffenen Gewebe zu (Matzinger 1998). Die Menge, Art und räumliche Verteilung der vom betroffenen Gewebe freigesetzten Gefahrensignale bestimmen dabei Ausmaß, Effektor-mechanismen und Art der immunologischen Reaktion. Das Veranlassen von Hilfe ist dann Aufgabe der antigenpräsentierenden Zellen, z.B. der DC (Matzinger 2001).

Dieses Modell stellt den konzeptionellen Hintergrund der vorliegenden Versuche dar. Sie machen sich die Fähigkeit des Immunsystems zunutze, zwischen physiologischem (=apoptotischem) Zelluntergang und verletzungsbedingtem (=nekrotischem) Zelltod zu unterscheiden. Apoptose, als der Normalfall physiologischer Zellmauserung, ruft keine Immunreaktion hervor, sondern wirkt im Gegenteil tolerogen (Heath, Kurts et al. 1998). Nekrotisches Zellmaterial bewirkt hingegen eine immunologische Antwort. Eine Ursache, dieser Unterscheidung liegt in der unterschiedlichen Präsentation des Antigens durch APC und im Besonderen durch DC.

Im Falle des nekrotischen, also ungeordneten Zelltodes, werden Zellinhalte, die im Normalfall das Innere der Zelle nicht verlassen, freigesetzt und wirken als „vorgefertigte“ Gefahrensignale. So konnte eine stimulierende Wirkung von LPS, DNS, RNS und ATP nachgewiesen werden (Cella, Salio et al. 1999; Hartmann und Krieg 1999; Schnurr, Then et al. 2000). Bei Infektion oder anderer Zellschädigung werden zusätzlich „induzierbare“ Gefahrensignale wie TNF- α oder IFN- γ freigesetzt. Das antigene Material wird zunächst von unreifen DC phagozytiert, prozessiert und über MHC-I und MHC-II präsentiert. Durch die Ausreifung resultiert aber nun eine stabile Präsentation des Antigens und eine zusätzliche vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle. Die Kombination dieser beiden Signale („Signal 1“=Präsentation und „Signal 2“=Kostimulation) führt zur immunologischen Reaktion (Gallucci, Lolkema et al. 1999; Gallucci und Matzinger 2001).

Anders ist dies im Falle eines geordneten (=apoptotischen) Zelluntergangs. In diesem Fall findet lediglich eine vorübergehende Präsentation des Antigens auf der Oberfläche einer unreifen DC statt (Steinman, Inaba et al. 1999; Sauter, Albert et al. 2000). In Ermangelung von Gefahrensignalen kommt es zu keiner Ausreifung der DC und damit zu einer Präsentation des Antigens ohne gleichzeitige Kostimulation. CTL, die zwar das präsentierte Peptid erkennen, jedoch kein kostimulatorisches Signal erhalten, werden anerg oder gehen zu Grunde. Anerg bezeichnet dabei einen Zustand, in dem eine T-Zelle nicht mehr in der Lage ist, IL-2 zu produzieren (Steinbrink, Graulich et al. 2002). Dies

verhindert eine Proliferation, selbst wenn sie in der Folgezeit ihr spezifisches Antigen in kostimulatorischem Kontext erkennen sollte. Über diesen Mechanismus könnte periphere immunologische Toleranz gegenüber apoptotisch untergegangenem Gewebe entstehen (Hugues, Mougneau et al. 2002).

Auf Grund bisher nicht gänzlich geklärter Mechanismen führt die Aufnahme apoptotischen Zellmaterials in DC zusätzlich zu einer vermehrten Präsentation des prozessierten Peptids über MHC-I (Steinman, Inaba et al. 1999; Delneste, Magistrelli et al. 2002). Dies erscheint im Sinne einer effektiven Toleranzinduktion sinnvoll, widerspricht aber dem Dogma, wonach phagozytierte Proteine auf MHC-II und zytosolische Proteine auf MHC-I präsentiert werden (Germain 1994). Wenn jedoch tatsächlich apoptotisches Zellmaterial auf MHC-I präsentiert wird und zusätzlich ein exogener, in diesem Zusammenhang eigentlich unphysiologischer, Reifestimulus für eine stabile Präsentation in kostimulatorischem Kontext sorgt, so sollte eine verstärkte Th1-Immunantwort die Folge sein. Dies war die Arbeitshypothese der vorliegenden Experimente.

1.3 Anti-Tumor-Vakzine mit dendritischen Zellen

Die Immuntherapie von Tumoren unter Verwendung von DC ist erst in den letzten Jahren in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. So sind noch viele Fragen in Bezug auf eine optimale DC-Vakzinierungsstrategie Gegenstand der Diskussion.

(Siehe auch Abb. 2)

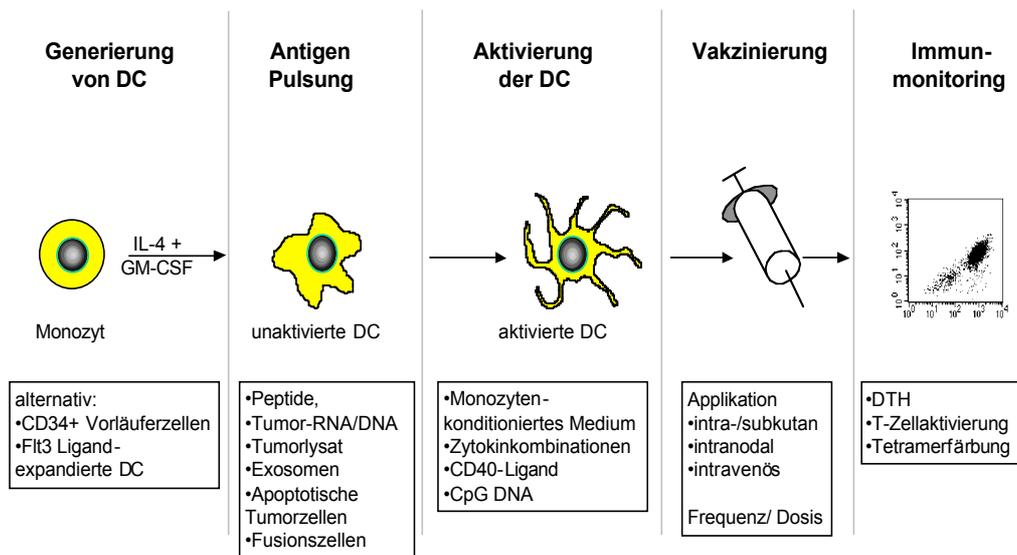


Abb.2: Schritte zur Herstellung einer DC-Vakzine und offene Fragen

DC können durch Kultur von Monozyten aus Vollblut bzw. Leukaphereseprodukten in Anwesenheit der Zytokine Interleukin (IL)-4 und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) generiert werden. Es folgt eine Beladung der DC mit Tumorantigenen sowie deren Aktivierung, damit die DC ihre T-Zell-stimulatorische Fähigkeit erlangen. Aus diesen Zellen besteht schließlich die Vakzine. Der Erfolg wird am klinischen Ansprechen und der Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort gemessen. Methoden, die beim „Immunmonitoring“ (=Charakterisierung der induzierten Immunantwort) zur Anwendung kommen, sind Hautreaktionen nach intradermaler Antigenexposition (DTH), die Bestimmung von Frequenz und Phänotyp antigenspezifischer T-Lymphozyten, sowie die Erfassung der Funktionalität der T-Zellen anhand der Zytokinsynthese und lytischen Aktivität (siehe auch Tab. 1).

1.3.1 Generierung dendritischer Zellen

Drei verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen mit jeweils charakteristischen Merkmalen und Funktionen sind beim Menschen beschrieben: myeloide DC, plasmazytoide DC und Langerhans-Zellen der Haut (Hochrein, O'Keeffe et al. 2002; Osugi, Vuckovic et al. 2002; Romani, Holzmann et al. 2003). Für Tumorstimmulierung sind vor allem myeloide DC interessant, da diese besonders zur Antigenaufnahme und -präsentation befähigt sind (Sallusto, Cella et al. 1995). Dendritische Zellen mit myeloiden Charakteristika können durch eine *in vitro*-Kultur von Monozyten in Anwesenheit der Zytokine IL-4 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) gewonnen werden (Sallusto, Cella et al. 1995). Alternativ lassen sich dendritische Zellen aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen des peripheren Bluts generieren. Durch die systemische Verabreichung von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Flt3-Ligand, können dendritische Zellen im Blut, die normalerweise nur etwa 0,1% bis 0,5% der mononukleären Zellen ausmachen, um ein Vielfaches expandiert werden (Maraskovsky, Brasel et al. 1996; Citterio, Rescigno et al. 1999; Jefford, Schnurr et al. 2003).

1.3.2 Kreuzpräsentation von Antigenen durch dendritische Zellen

Die Art der Präsentation eines Peptids hängt vom intrazellulären Prozessierungsmechanismus des Proteins ab, dem es entstammt. Durch Phagozytose aufgenommene Proteine werden im Phagosom nach Ansäuerung durch Proteasen zu Peptiden degradiert. Die so entstandenen Peptide werden an MHC-II-Molekülen angelagert und als MHC-II-Peptid-Komplex an die Oberfläche transportiert. Im Gegensatz dazu werden zytosolische Proteine im Proteasom degradiert und gelangen über TAP-Moleküle (*transporters associated with antigen processing*) in das endoplasmatische Retikulum, wo sie zusammen mit β_2 -Mikroglobulin an MHC-I-Moleküle binden und an die Zelloberfläche gelangen. Diese beiden Wege der Antigenprozessierung und -präsentation sind im physiologischen Regelfall getrennt (Germain 1994).

Im Rahmen früherer Versuche, die die Natur der MHC-Restriktion beleuchten sollten, erbrachte Bevan jedoch 1976 den Beweis, dass bestimmte Antigene einer Spendermaus, auf Antigen-präsentierende Zellen einer syngenen Empfängermaus gelangen konnten, von wo aus sie eine antigenspezifische CTL-Immunreaktion auslösten (Bevan 1976). Diese Antigene mussten also einerseits phagozytiert und andererseits auf MHC-I-Molekülen präsentiert worden sein. Für dieses Phänomen prägte Bevan den Begriff „*crosspriming*“ (Kreuzprägung). Seitdem wurde in vielen Experimenten gezeigt, dass es unter verschiedenen Bedingungen Möglichkeiten für exogen aufgenommenes Antigen gibt, Zugang zum MHC-I-Präsentationsweg zu erhalten (Heath und Carbone 2001).

Da die Präsentation auf MHC-I CTL nicht notwendigerweise aktiviert, ein *priming* somit ausbleiben kann, bevorzugt man jedoch heute den Ausdruck „*crosspresentation*“ (Kreuzpräsentation). Will man Proteine gezielt in den MHC-I-Präsentationsweg einschleusen, so bleiben prinzipiell zwei Möglichkeiten. Entweder man transferriert antigenes Material direkt in das Zytosol, z.B. durch Liposomen, RNS-Transfer oder Membranporation, damit ein Teil dieses Materials auf MHC-I präsentiert wird. Oder man nutzt in ihren molekularen Mechanismen noch nicht verstandene Wege, die exogen aufgenommenes Material auf MHC-I erscheinen lassen (Rock und Goldberg 1999).

Die Gruppe um Srivastava konnte zeigen, dass diese zweite Möglichkeit in besonderem Maße für an Hitze-Schock-Proteine (hsp) gebundenes Peptid besteht (Udono und Srivastava 1993; Udono, Levey et al. 1994; Arnold, Faath et al. 1995; Janetzki, Blachere et al. 1998). Hitze-Schock-Proteine, eine im Laufe der Evolution hochkonservierte Molekülklasse, stellen wahrscheinlich einen phylogenetischen Vorläufer der MHC-Moleküle dar. Bedingt durch diese enge Verwandtschaft scheint es für hsp möglich zu sein, das unter Zellstress gebundene Peptid direkt auf MHC-Moleküle zu übertragen. Aus bisher ungeklärten Gründen, findet dabei eine vornehmliche Übertragung auf MHC-I statt (Srivastava, Menoret et al. 1998).

Wie bereits oben angedeutet, stellen phagozytierte, ganze apoptotische Zellen ebenfalls eine Antigenquelle dar, deren Peptide vornehmlich auf MHC-I präsentiert werden. Auch hier sind die beteiligten Mechanismen weitgehend unbekannt (Carbone und Bevan 1990; Kovacsovics-Bankowski und Rock 1995; Albert, Sauter et al. 1998).

1.3.3 Aktivierung dendritischer Zellen

DC erlangen erst nach Aktivierung ihre volle Kapazität zur T-Zell-Stimulation. Zu diesem Zweck sind verschiedene *in vitro* Stimuli in Erprobung. Makrophagen-konditioniertes Medium wurde in frühen Studien verwandt. Die in diesem Cocktail identifizierten Zytokine, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 und IL-15 wurden daraufhin in verschiedenen Kombinationen als Reifestimuli untersucht (Bender, Sapp et al. 1996).

In laufenden Studien wird ein löslicher CD40-Ligand erprobt, der ebenfalls eine Ausreifung der DC induziert (Morse, Lysterly et al. 1998; Moghaddami, Swart et al. 2002). Ebenso konnte für DNS, die Cytosin und Guanin in einem bestimmten Sequenzmuster enthält, sog. CpG-Oligonukleotide, eine stimulatorische Wirkung auf DC nachgewiesen werden (Sparwasser, Koch et al. 1998; Krug, Rothenfusser et al. 2001). Bakterielle Stimuli wie z.B. LPS sind ebenfalls potente Aktivatoren von DC (Brossart und Bevan 1997). Die Identifizierung von Stimuli, die eine optimale Ausreifung der DC bei erhaltener Fähigkeit zur Migration in lymphatisches Gewebe gewährleisten, bleibt jedoch Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.3.4 Vakzinierung mit dendritischen Zellen

Bei der Vakzinierung mit *in vitro* generierten DC, stellt sich die Frage der Applikationsroute der DC-Vakzine. Hier gibt es folgende Möglichkeiten: Eine intranodale Gabe unter Ultraschallkontrolle in einen vom Tumor entfernten Lymphknoten, um die DC direkt an den Ort der DC-T-Zell-Interaktion zu bringen (Nestle, Alijagic et al. 1998); eine intravenöse Verabreichung (Holtl, Rieser et al. 1999) oder die intrakutane Injektion (Thurner, Haendle et al. 1999). Der kutane Applikationsweg scheint sich in der Annahme durchzusetzen, dass

man so lokale DC der Haut in die Initiierung der Immunantwort mit einbinden könne. In der konkreten Ausführung bleibt das Spektrum der Applikationsweisen jedoch breit. Es reicht von der streng intrakutanen Gabe an einer definierten Stelle bis zur Infiltration eines großen Hautareals mit einer Spinalanästhesie-Nadel an beiden Oberschenkeln und einem Oberarm (Panelli, Wunderlich et al. 2000).

1.3.5 Art und Ausmaß der durch dendritische Zellen induzierten Immunantwort

Für die Immuntherapie von Malignomen wird eine möglichst weitgehende Polarisation der Immunantwort in Richtung Th1 angestrebt. So sollen die Effektormechanismen, die für die Bekämpfung durch intrazelluläre Infektionen geeignet sind, auch gegen maligne entartete Zellen eingesetzt werden. Die entscheidenden Effektorzellen sind daher gegen Tumorzellen gerichtete CTL, die durch DC generiert werden sollen, um im Rahmen einer Th1-Immunantwort ihre lytische Wirkung gegen Tumorzellen zu entfalten (Shurin 1996; Shurin, Lu et al. 1999). Art und Ausmaß der durch die Vakzinierung angestoßenen Immunreaktion kann an Hand verschiedener Tests beim Patienten ermittelt werden. Als Surrogat-Marker *in vivo* bietet sich dabei vor allem eine spezifische Typ-IV Hautreaktion oder *delayed-type hypersensitivity*-Reaktion (DTH) an. *In vitro* kann auf verschiedene, in 2.8 erläuterte Verfahren zur Bestimmung von T-Zell-Frequenz, -Spezifität und -Aktivierung zurückgegriffen werden.

1.4 Die Wahl des Antigens als entscheidende Determinante der Anti-Tumor-Vakzine mit dendritischen Zellen

Bei der Immuntherapie mit *ex vivo* generierten, Antigen-gepulsten und ausgereiften dendritischen Zellen, ist das Ausmaß der Immunantwort wesentlich von zwei Determinanten abhängig. Der Art des Antigens und dessen Aufnahme durch die DC.

1.4.1 Spezifische Peptide als Zielstrukturen von Immuntherapie

Grundsätzlich können bei der Immuntherapie von Tumoren zwei verschiedene Zielstrukturen, gegen die eine Immuntherapie gerichtet werden soll, definiert werden. Es kann das gesamte Antigenrepertoire der Tumorzelle genutzt werden und zum anderen können definierte tumorspezifische oder im Tumorgewebe überexprimierte Antigene als Ausgangspunkt einer Tumor-Vakzine verwendet werden. Jeder dieser Ansätze hat spezifische Vor- und Nachteile. Im Falle des Pankreaskarzinoms bieten sich als definierte tumorspezifische Zielstrukturen an: z.B. das Carcino-Embryonale-Antigen (CEA) (Nukaya, Yasumoto et al. 1999), HER-2/neu (Peiper, Goedegebuure et al. 1997), MUC-1 (Brossart, Heinrich et al. 1999), mutiertes ras-Protein (Gjertsen, Bakka et al. 1995), p53 (McCarty, Liu et al. 1998) und Ganglioside (Chu, Ravindranath et al. 2000). Der Vorteil dieses Vorgehens bei der Tumor-Immuntherapie besteht vor allem in der schon durch die Wahl des Antigens gewährleisteten Spezifität. Sie minimiert das Risiko der Autoimmunität, das bei jeder Immuntherapie gefürchtet wird, und ermöglicht ein antigenspezifisches Immunmonitoring.

Eine Impfung gegen ein solitäres Antigen hat jedoch auch Nachteile. Es ist bislang unbekannt, welches der definierten Antigene überhaupt in der Lage ist, eine effektive, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu induzieren. Die bei Tumoren oftmals beobachtete genetische Instabilität und Heterogenität der

Zellpopulation läßt zudem die Wahrscheinlichkeit gering erscheinen, mit einem einzelnen Antigen eine für eine Eradikation des Tumors ausreichende Immunantwort zu erzielen. Sollte eine gänzliche Beseitigung eines, in seinen antigenen Strukturen heterogenen, Tumors nicht erzielt werden können, so besteht die Gefahr von sog. *escape*-Mutationen, welche das immunogene Peptid verloren haben (Thurner, Haendle et al. 1999). In klinischen Studien jüngerer Datums wurde gezeigt, dass erst die Generierung von CTL gegen drei oder mehr Peptide mit einem klinischen Ansprechen auf die Immuntherapie korrelierte (Banchereau, Palucka et al. 2001). Außerdem ist ein peptidspezifischer therapeutischer Ansatz prinzipiell auf Patienten mit jenem HLA-Typ, für den die spezifischen Peptide definiert wurden, beschränkt.

1.4.2 Antigenpräparation aus ganzen Tumorzellen

Durch die genetische Instabilität, die mit maligner Entartung verbunden ist, müssen in einer Tumorzelle viele verschiedene Tumor-assoziierte Antigene vorhanden sein, gegen die theoretisch eine spezifische Immunantwort gerichtet werden kann (Kufe 2000). Dieser Überlegung tragen Ansätze Rechnung, die ganze Tumorzellen als Antigenquelle nutzen, da diese eine Vielzahl bekannter wie auch unbekannter Antigene enthalten. Die Verwendung von unfraktioniertem Tumormaterial in Form von Tumorzelllysat oder ganzen Tumorzellen ermöglicht es, das gesamte Antigen-Spektrum des Tumors für die Immuntherapie nutzbar zu machen. Tumorzelllysate enthält Antigene, die sowohl via MHC-II als auch über MHC-I präsentiert werden (Brossart und Bevan 1997; Shen, Reznikoff et al. 1997; Fields, Shimizu et al. 1998). Die gleichzeitige Präsentation von Tumorantigenen via MHC-II ermöglicht dabei die Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen, die eine unabdingbare Rolle in einer effektiven Immuntherapie spielen (Bennett, Carbone et al. 1997). Durch den Einsatz von autologem Tumormaterial zur Immuntherapie kann bei Patienten jeglichen HLA-Typs eine polyklonale Immunantwort induziert werden, die gerade bei genetisch heterogenen Tumoren von Vorteil sein könnte und das Risiko für *escape*-Mutationen begrenzen könnte.

Einen gravierenden Nachteil der Antigengewinnung aus ganzen Tumorzellen stellt jedoch die theoretische Möglichkeit dar, autoimmunologische Reaktionen gegen Antigene zu induzieren, die nicht entartetes Gewebe mit dem Tumor gemeinsam haben. Obwohl diese Gefahr im Mausmodell eindrucksvoll beschrieben werden konnte (Ludewig, Odermatt et al. 1998; Ludewig, Odermatt et al. 1999; Ludewig, Ochsenbein et al. 2000), zeigten sich in den bislang mit Tumorzelllysat oder ganzen Tumorzellen als Antigenquelle durchgeführten klinischen Studien am Menschen keine klinisch relevanten autoimmunologischen Reaktionen (Nestle, Alijagic et al. 1998; Holtl, Rieser et al. 1999).

1.4.3 Fragestellung

Bei der Verwendung von polyvalentem antigenem Tumormaterial stellt sich, im Unterschied zu tumorspezifischen Peptiden, die Frage nach der Art der Antigenaufbereitung und der daraus folgenden Antigenbeladung der DC. Verschiedene Versuche zur Gewinnung von polyvalentem Antigen aus ganzen Tumorzellen wurden bereits unternommen. Für Tumorexosomen, Hitzeschockproteine, nekrotisches sowie apoptotisches Zellmaterial konnte die Generierung einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort nachgewiesen werden.

Es scheint ein grundsätzlicher immunologischer Unterschied zwischen nekrotischem Zellmaterial (z.B. Tumorzelllysat) und apoptotischem Zellmaterial zu bestehen. Ein Vergleich dieser beiden Formen der Antigenaufbereitung unter kontrollierten und gleichen Rahmenbedingungen wurde bislang jedoch nicht unternommen. Dies zu tun, ist das Anliegen der vorliegenden Arbeit. Im Rahmen dieser Fragestellung galt es mehrere Punkte experimentell zu klären:

- a.) Gelingt eine Apoptoseinduktion von Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie *Panc-1* durch physiologischen Zellstress?
- b.) Kann die Aufnahme des apoptotischen Zellmaterials durch DC gewährleistet werden?
- c.) Können tumorspezifische CTL in der autologen Kokultur generiert werden?
- d.) Zeigen sich Unterschiede im zellulären Aktivationsmuster und Zytokinprofil der durch verschiedene Antigenformen induzierten Immunantwort?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Geräte

Zentrifugen:	„Omnifuge 2.0 RS“ Heraeus (München)
Brutschrank:	„BBD 6220“ Heraeus (München)
FACS:	„FACSCalibur“ Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISA Reader:	„MRX“ Dynatech Lab. (Burlington, USA) „MicroCell Harvester“ Skatron (Ismaning)
96 Well Harvester:	„Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter“
□-Counter:	Wallac Oy (Turku, Finnland) „1480 Wizard 3“ Gamma Counter“ Wallac Oy
□-Counter:	(Turku, Finnland)
MACS Gerät:	„Vario-MACS“ Miltenyi Biotech (Auburn, USA)
Konfokal-Lasermikroskop:	„LSM 410 Invert“ Carl Zeiss (Jena)
Phasenkontrastmikroskop:	„Axiovert“ Carl Zeiss (Jena)
Fluoreszenzmikroskop:	„Diaphot TMD“ Nikon (Tokio, Japan)
UV Lampe:	„Transilluminator“ LKB Brama (München)
Hybridisierungsofen:	„Certomat® H“ B.Braun (Melsungen)

2.1.2 Chemikalien & Verbrauchsmaterial

5,6-Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE):	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PKH26-green (FITC-konjugiert):	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PKH26-red (PE-konjugiert):	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulphoxid (DMSO):	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Formalin 34 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Trypsin:	Boehringer (Mannheim)
TritonX:	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Saponin:	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumlonophor:	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phorbolacetat-Myristat (PMA):	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Na-Heparin:	Braun (Melsungen)
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA):	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypanblau:	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Propidium-Iodid (PI):	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Brefeldin A:	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lipopolysaccharid (LPS):	Boehringer (Mannheim)
FITC Dextran:	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Szintillationsflüssigkeit für β -Counter:	„Betaplate Scint“ Wallac (Cambridge, UK)
Eindeckmedium:	„Permafluor“ Immunotech (Marseille, Frankreich)

2.1.3 Radioaktive Chemikalien

$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (10 mCi/ ml):	Amersham (Freiburg)
$[^3\text{H}]$ -Thymidin (1 mCi/ ml):	NEN Life Sciences (Zaventem, Belgien)

2.1.4 Reagenziensätze

Enzyme Linked Immuno

Sorbent Assay (ELISA) für:

hIFN- γ	„Human IFN- γ “ Endogen (Woburn, USA)
hIL-4	„OptEia IL-4“ B&D (San Diego, USA)
hIL-10	„OptEia IL-10“ B&D (San Diego, USA)
Annexin-V-Detektionsset:	„Annexin V-FITC“ Bender Med Systems (Wien, Österreich)
Magnetische Zellseparation: (negative Selektion)	„MACS NK Cell Isolation Kit“ Miltenyi Biotech (Auburn, USA)

2.1.5 Materialien für die Zellkultur

Zellkulturflaschen

175 cm ² ; 80 cm ² ; 25 cm ² :	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflasche 500 cm ² :	NUNC (Wiesbaden)
Sterilfilter (0,2 µm):	Sartorius (Göttingen)
6-/ 12-/ 24-Well Platten:	Greiner (Frickenhausen)
96-Well-Rundbodenplatte:	Greiner (Frickenhausen)
96-Well-Flachbodenplatte:	NUNC (Wiesbaden)
Zellschaber:	Eppendorf (Hamburg)
Transwell-Systeme:	„TC Inserts Anapore“ NUNC (Wiesbaden)
2 µl-; 200 µl-; 1000 µl-	
Pipettenspitzen:	Sarstedt (Nümbrecht)
Objekträger-Kulturschalen:	NUNC (Wiesbaden)

2.1.6 Zytokine und Chemokine

GM-CSF:	Leukomax [®] Novartis (Basel)
TNF- α :	R&D Systems (Wiesbaden)
Prostaglandin E ₂ :	Sigma-Aldrich (Steinheim)
IL-1 α :	Strathmann Biotech (Hannover)
IL-2:	Strathmann Biotech (Hannover)
IL-4:	Promega (Mannheim)
IL-6:	Strathmann Biotech (Hannover)
IL-7:	Strathmann Biotech (Hannover)
IL-12:	R&D Systems (Wiesbaden)
IL-15:	R&D Systems (Wiesbaden)

2.1.7 Puffer, Lösungen, Medien und Seren

Phosphat gepufferte

physiologische Salzlösung

(PBS): Boehringer (Mannheim)

MACS Puffer (entgast): PBS + 0,02% EDTA + 2% humanes AB-Serum

Annexin V Bindungspuffer: 10 mM Hepes/ NaOH, pH7,4;

140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂

Ficoll Hypaque: Biochrom (Berlin)

Fetales Kälberserum (FCS):

Humanes ABRh+ Serum: Biochrom (Berlin)

L-Glutamin:

Penicillin-Streptomycin: BioWhittaker (St.Louis, USA)

RPMI 1640-Medium: Gibco BRL (Karlsruhe)

Sigma-Aldrich (Steinheim)

Biochrom (Berlin)

Verwendet wurden RPMI-Medien, die mit 1% L-Gutamat sowie 1% Penicillin-Streptomycin supplementiert wurden. Sie werden im Folgenden als Vollmedium bezeichnet. Zusätzlich wurde diesem Medium entweder 2% oder 5% humanes AB Rh+ Serum oder 10% fetales Kälberserum zugesetzt.

2.1.8 Antikörper

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Herkunft
HLA-DR,DP,DQ	MHC II	Tü 39	Maus IgG _{2a} , \square	1
CD3	TCR-Komplex	HIT3a	Maus IgG _{2a} , \square	1
CD4	D1 Domäne	RPA- T4	Maus IgG ₁ , \square	1
CD8	\square \square Untereinheit	M-T701	Maus IgG ₁ , \square	1
CD14	CD14	M5E2	Maus IgG _{2a} , \square	1
CD19	CD19	B43	Maus IgG ₁ , \square	1
CD28	CD28	CD28.2	Maus IgG ₁ , \square	1
CD54	CD54	HI29	Maus IgG ₁ , \square	1
CD56	220/135 kD Isotyp	B159	Maus IgG ₁ , \square	1
CD69	CD69	FN50	Maus IgG ₁ , \square	1
CD80	B7/BB1	L307.4	Maus IgG ₁ , \square	1
CD83	CD83	HB15e	Maus IgG ₁ , \square	1
CD86	(B70/B7-2)	IT2.2	Maus IgG _{2b} , \square	1
Pan \square \square	\square \square TCR (V \square 9)	B3	Maus IgG ₁	2
IFN- \square	hIFN- \square	4S.B3	Maus IgG ₁	3
Blockierende Antikörper				
W6/32	MHC I	W6/32	Maus IgG ₁	4
\square -human IL-12	hIL-12 (p40/p70)	C11.5	Maus IgG ₁	3
\square -human IL-15	h IL-15	34505.11	Maus IgG ₁	3
Isotyp Kontrollen				
Maus IgG ₁	Maus IgG ₁	MOPC21	Maus IgG ₁	3
Maus IgG _{2a}	Maus IgG _{2a}	G155-178	Maus IgG _{2a}	3

1:Pharmingen (San Diego), USA

2:Immunotech (Marseille), Frankreich

3:Becton Dickinson (San Diego), USA

4:Serotec (Oxford), UK

2.2 Zelllinien

2.2.1 Pankreaskarzinomzelllinie **Panc-1**

Die Zelllinie wurde von „American Type Culture Collection (ATCC)“ (Manassas, USA) bezogen. Diese Zelllinie eines Pankreaskarzinoms duktales Ursprungs konnte in Vollmedium plus 10% FCS in Kultur gehalten werden und zeigte strikt adhärentes Wachstum mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 52 h. Die Zelllinie ist in der Literatur als HLA-A2⁺ klassifiziert (McCarty, Liu et al. 1998). Dies wurde vom Labor für Immungenetik der Kinderpoliklinik der LMU München (Prof. E. Albert) bestätigt. Die maligne Natur dieser Zelllinie wird in der Literatur anhand von drei Phänomenen beschrieben: Sie zeigt zum einen Wachstum auf Softagar sowie auf einer Fibroblasten-Einzelzellschicht, und zum anderen induziert sie nach Injektion in athymen Nacktmäuse das Wachstum eines progressiv wachsenden aplastischen Karzinoms (Lieber, Mazzetta et al. 1975). Die Kultur der Zelllinie wurde am Institut für Mikrobiologie der LMU (Prof. J. Heesemann) wiederholt negativ auf Mycoplasmenkontamination getestet.

2.2.2 NK-sensitive myeloide Blastenzelllinie **K562**

Die für die Untersuchung von NK-Zellaktivierung vielfach verwendete Zelllinie *K562* wurde aus einer Pleurainfiltration einer 53-jährigen CML Patientin im Blastenschub gewonnen (Gahmberg und Andersson 1981). Die Zellen wurden nicht adhärent in Vollmedium plus 10 % FCS, das alle 3 Tage erneuert wurde, kultiviert. Charakteristisch für *K562* ist eine hohe Sensibilität gegenüber NK-Zellen. Eine *K562*-Zelllyse läßt eine Abschätzung und Quantifizierung einer NK-Zellaktivierung zu. Die Zelllinie wurde von der „European Cell Culture Collection (ECACC)“ (Salisbury; UK) bezogen.

2.2.3 Magenkarzinomzelllinie **Kato-III**

Die Zelllinie *Kato-III*, wurde aus der axillären Lymphknotenmetastase eines metastasierten Magenkarzinoms gewonnen und zeigt adhärentes Wachstum in

Kollagen-beschichteten Kulturschalen und Vollmedium plus 10 % FCS (Yamamoto, Tatsuta et al. 1988). In unbeschichteten Kulturschalen war das Adhärenzverhalten deutlich geringer ausgeprägt, so dass beim Ernten der Zellen in diesem Fall auf Hilfsmittel zur Ablösung der Zellen verzichtet werden konnte. Die Zelllinie wurde vom Labor für Immungenetik der Kinderpoliklinik der LMU München (Prof. E. Albert) als HLA-A2⁺ klassifiziert. Sie wurde von Dr. R. Lutherbüse (Institut für Immunologie der LMU München, Kommissarischer Vorstand: Prof. T. Brocker) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.3 Kultur der Zelllinien

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank der Firma HAEREUS (Hanau) bzw. KENDRO (Hanau) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % CO₂/Luft Gemisch. Es wurde durchgehend Vollmedium plus 10 % FCS verwandt. Die nicht-adhärent wachsende Zelllinie *K562* wurde in einer stehenden 35 ml Kulturflasche in Vollmedium plus 10 % FCS kultiviert und alle 2-3 Tage nicht höher als im Verhältnis 1:10 verdünnt und dabei mit frischem Medium versetzt.

Adhärent wachsende Zelllinien wie *Panc-1* oder *Kato-III* wurden liegend inkubiert. Zum Ablösen dieser Zellen vom Kulturschalenboden wurde das verbrauchte Medium dekantiert und die Zellen mit eisgekühlter 0,01-prozentiger EDTA-Lösung überschichtet, bis sich ein Großteil der Zellen unter Schwenken vom Boden ablöste. Bei der Kultur der Zelllinie *Kato-III* in unbeschichteten Kulturschalen konnte auf eine EDTA-vermittelte Ablösung verzichtet werden, da das Ablösen der Zellen bereits durch energisches Pipettieren erreicht werden konnte. Sollten die Zellen in Kulturbedingungen überführt werden, bei denen ein mit humanem AB-Serum supplementiertes RPMI-Vollmedium verwendet wurde, wurden die Zellen in zwei Zentrifugations- und Resuspendierungsschritten in dieses Medium überführt.

2.4 Generierung und Kultur der benötigten Zellpopulationen

2.4.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Zur Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBMC) wurde heparinisiertes (20 IU/ ml) Vollblut gesunder Spender im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und über eine Ficollpräparation aufgetrennt.[†] Maximal 30 ml des verdünnten Blutes wurden dazu in einem 50 ml Leucosep-Teströhrchen über 15 ml Ficoll-Hypaque geschichtet, 15 min bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert, die Zellen in der Interphase vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen, dreimal mit PBS gewaschen, um die gewonnenen PBMC von Plasmabestandteilen und Thrombozyten zu reinigen, sowie anschließend die Zellzahl bestimmt. Im Anschluß wurden die so generierten PBMC in Vollmedium plus 2 % AB-Serum resuspendiert.

2.4.2 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

PBMC wurden mit oben beschriebener Methode isoliert, gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ ml mit vorgewärmtem Vollmedium plus 2 % AB-Serum verdünnt. 25 ml dieser PBMC-Suspension wurden in eine 175 ml Kulturflasche überführt und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das gesamte Medium aus der Zellkulturflasche entnommen und durch 50 ml PBS ersetzt. Die Eigenschaft von Monozyten am Kulturflaschenboden zu adhären wurde genutzt, um Monozyten anzureichern. Im entnommenen Medium befanden sich vornehmlich Lymphozyten, die in den 2 h der Inkubationszeit nicht an den Flaschenboden adhärirt hatten. Am Boden der

[†] Ficoll ist ein polysaccharidähnliches Makromolekül mit einer Dichte von 1.077 g/ml, das die Eigenschaft besitzt, in einer Dichte-Zentrifugation PBMC an der Blutserum/Ficoll-Interphase zu konzentrieren. Granulozyten und Erythrozyten finden sich aufgrund ihrer höheren spezifischen Dichte in der Ficoll-Schicht bzw. am Boden sedimentiert, Thrombozyten ihrer geringeren Dichte wegen in der Serumschicht oberhalb des Ficoll.

Kulturflasche befanden sich vorwiegend adhärenente Monozyten, aber auch einige adhärenente Lymphozyten. Um die Reinheit der Monozytenpräparation zu erhöhen, wurden die adhärenenten Zellen zusätzlich Scherkräften ausgesetzt, indem das zugegebene PBS horizontal geschwenkt wurde. Die PBS-Lösung wurde hierauf wieder entnommen und verworfen.

Die so gewonnene adhärenente Monozytenfraktion wurde mit 25 ml Vollmedium plus 2 % AB-Serum überschichtet und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert, während sich die adhärenenten Monozyten wieder vom Kulturflaschenboden lösten. Anschließend wurden die angereicherten Monozyten in ein 50 ml Teströhrchen überführt. In einigen Fällen wurde zur Erhöhung der Zellausbeute mit Hilfe eines Zellschabers auch die nach 24 h immer noch adhärenenten Monozyten geerntet. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 4 °C und 300 g für 10 min zentrifugiert, das Medium dekantiert und das verbliebene Zell-Pelett so in Vollmedium plus 2 % AB-Serum resuspendiert, dass eine Konzentration von $0,75-1,0 \times 10^6$ Zellen/ ml erzielt wurde. Die so gewonnene Monozyten-suspension wurde in 2 ml Portionen in 6-Well-Platten überführt, mit 500 IU/ ml IL-4 sowie 1000 IU/ ml GM-CSF versetzt und für sechs Tage ohne Medienwechsel im Brutschrank inkubiert.

2.4.3 Lymphozytenanreicherung

PBMC, die nach beschriebener zweistündiger Inkubation in 175 ml Kulturflaschen nicht adhärenierten, wurden entnommen, durchflusszytometrisch charakterisiert und als Lymphozyten-angereicherte Zellfraktion weiterverwendet.

2.4.4 Reifeinduktion dendritischer Zellen

Nach sechstägiger Inkubation in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF wurden die unreifen Monozyten-abgeleiteten DC zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Vollmedium plus 2 % AB-Serum ohne Zusatz von IL-4 oder GM-CSF resuspendiert und mit den für den Versuch verwendeten Reife-stimulatoren in der angegebenen Konzentration versetzt. Von Vorversuchen abgesehen, wurde die Kombination aus 1000 IU/ ml TNF- α und 1 μ M PGE₂ zur

Reifeinduktion verwandt. Zur Reifeinduktion wurden die DC über 24 h in diesem Zytokinkocktail belassen, bevor sie im Rahmen der jeweiligen Fragestellung weiterverarbeitet wurden. Maturationsmarker, die als Qualitätskontrolle der Reifeinduktion betrachtet wurden, waren vor allem der durchflusszytometrisch bestimmte Oberflächenmarker CD83, aber auch morphologische Kriterien, die lichtmikroskopisch bestimmt wurden. Zu Letzteren zählte vor allem die bei Reife beobachtete Adhärenz in der Zellkultur.

2.5 Antigenpräparation aus Tumorzellen der Zelllinie Panc-1

In den vorliegenden Versuchen sollte der Einfluss von Apoptose und Nekrose auf eine DC vermittelte tumorspezifische Immunantwort untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Verfahren zur Aufbereitung von Tumorzellen verwandt.

2.5.1 Lysatherstellung

Nekrose, definiert als der ungeordnete Verlust der Zellintegrität, wurde durch dreimaliges Einfrieren der Zellsuspension bei -80 °C und anschließendes Auftauen bei Raumtemperatur erzielt. Die Kristallbildung innerhalb der gefrorenen Zellen zerstört deren Plasmamembran und führt dadurch zur Zellyse (DeMatos, Abdel et al. 1998). Der grobe Zelldebris wurde anschließend durch eine Zentrifugation mit 300 g für 10 min pelletiert und der gewonnene Überstand durch einen Filter ($0,2\ \mu\text{m}$ Porengröße) filtriert. Die Proteinkonzentration des filtrierten Zelllysates wurde photometrisch bestimmt und auf $750\ \mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Das so gewonnene Tumorzelllysate, das in seinem Proteingehalt etwa 5×10^6 Tumorzellen/ ml entsprach, wurde anschließend bei -20 °C eingefroren. Im Gegensatz dazu wurde das apoptotische Tumormaterial für jede Restimulation neu hergestellt, um den Einfluss des Einfriervorgangs auf den Prozess der Apoptose zu vermeiden.

2.5.2 Apoptoseinduktion

Apoptose von *Panc-1* Pankreaskarzinomzellen wurde durch thermischen und strahlungsbedingten Zellstress induziert. Nach dem Ernten der adhären wachsenden *Panc-1* Zelllinie mit 0,01 % EDTA-Lösung wurden die Zellen in einer Konzentration von ca. 3×10^6 Zellen/ ml in Vollmedium plus 2 % AB-Serum aufgenommen und 7 ml dieser Zellsuspension in 35 ml Kulturflaschen überführt. Die so gewonnenen nichtadhären *Panc-1* Zellen wurden daraufhin Zellstress in Form von 150 mJ/ cm² UV-B-Licht bzw. Hyperthermie (43°C) für 2h ausgesetzt. Die Behandlung der Zellen mit Hyperthermie erfolgte in einem vorgewärmten Inkubator für 2 h, wobei die Kulturflasche mit einer Frequenz von 30 Umdrehungen/ min auf einem Rotationstisch bewegt wurde, um während der Apoptoseinduktion eine Adhärenz der *Panc-1* Zellen zu verhindern.

2.5.3 Gewinnung apoptotischer Tumorzellen und Körperchen

Im Anschluß wurden die UV-bestrahlten bzw. hitzebehandelten Zellen für 24 h auf einem Rotationstisch im Brutschrank inkubiert. Dies war notwendig, um die zu Beginn des Apoptoseprozesses noch zu beobachtende Adhärenz zu verhindern und damit bei der weiteren Verwendung der Zellen auf eine Ablösung mit EDTA oder Trypsin verzichten zu können. Nach Ablauf der 24 h wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und auf die Expression des apoptotischen Markers „Annexin V“ durchflusszytometrisch untersucht. Die Tumorzellsuspension wurde daraufhin durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 300 g in zwei Fraktionen getrennt. Das Pellet wurde daraufhin in Vollmedium plus 2 % AB-Serum resuspendiert und als „Ganze apoptotische Tumorzellen“ zum Pulsen der DC verwandt. Der durch diesen Zentrifugationsschritt bei relativ geringer g-Zahl gewonnene Überstand enthielt Zellfragmente niedriger Dichte (z.B. apoptotische Körperchen), *remnants* oder andere abgesonderte Tumorbestandteile.

2.5.4 Antigen-Pulsung

Nicht aktivierte DC wurden mit den verschiedenen Antigenpräparationen für jeweils 4 h inkubiert bevor die Reifestimulatoren TNF- α und PGE₂ zugegeben wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei allen Antigenpräparationen ein Verhältnis (präparierte Tumorzelle)/ (DC) von 1:1 eingehalten wurde.

2.6 Identifizierung von HLA-A2⁺ Blutspendern

Zur Charakterisierung der Immunantwort gegen Tumorzellen der HLA-A2⁺ Zelllinie *Panc-1* wurden freiwillige gesunde Spender ausgewählt, die ebenfalls diesen HLA-Typ besitzen. Die HLA-Typisierung erfolgte dabei im Labor für Immungenetik der Kinderpoliklinik der LMU München (Prof. E. Albert)

2.7 Kokultur gepulster dendritischer Zellen mit autologen PBMC

2.7.1 Langzeitkokultur gepulster dendritischer Zellen mit autologen Lymphozyten

Die Kokultivierung der reifeinduzierten und antigenbeladenen (=gepulsten) DC mit autologen PBMC fand in 4 ml Vollmedium plus 5 % AB-Serum in 12-Well Platten statt. Das Verhältnis DC:PBMC betrug sowohl initial als auch bei den Restimulationen 1:20. Um einerseits die Proliferation der spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zu unterstützen und auf der anderen Seite keine unspezifische Proliferation von T-Lymphozyten zu induzieren, wurde erst am dritten Tag der Kokultur 25 IU/ ml IL-2 sowie 10 ng/ ml IL-7 zugegeben. Alle 72 h wurde 1 ml des Mediums zur Zytokinbestimmung im Supernat entfernt und durch frisches, mit IL-2 und IL-7 supplementiertes, Vollmedium plus 5% AB-Serum ersetzt. In wöchentlichem Abstand wurde die Kokultur mit jeweils neu generierten, gepulsten und reifeinduzierten DC restimuliert. Ein Tag nach der jeweiligen Restimulation mit DC wurde ein 50 μ l großes Aliquot aus der Kokultur entfernt und der Aktivierungsmarker CD69 sowie die intrazelluläre

IFN- γ -Produktion in den verschiedenen Lymphozytenpopulationen (T-Helferzellen, CTL, NK-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen) durchflußzytometrisch bestimmt. Zwei Tage nach der dritten Reifestimulation mit DC wurde die lytische Aktivität der T-Zellen aus der Kokultur in einem Zytotoxizitätsassay bestimmt. Abb. 3 zeigt eine Zusammenfassung des Ablaufs der Langzeitkokultur sowie der angewandten Analyseverfahren.

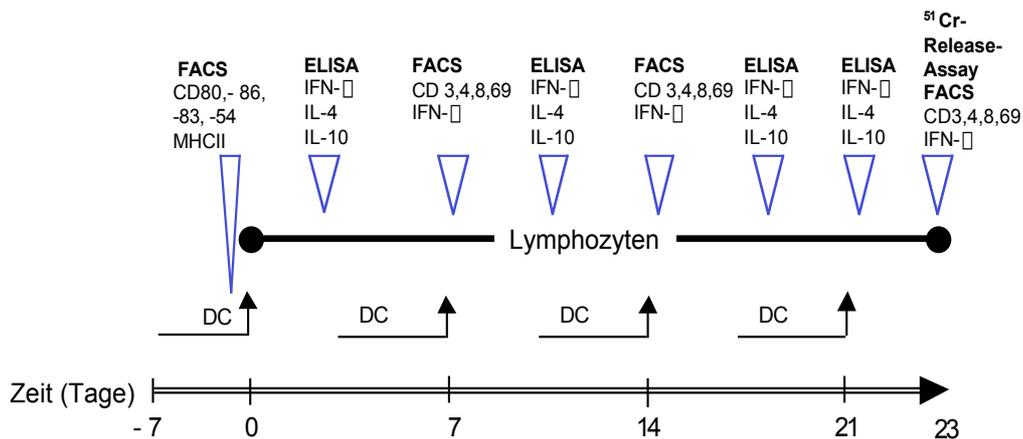


Abb.3: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Langzeitkokultur gepulster dendritischer Zellen mit autologen PBMC und T-Zell-Monitoring

Eine Kokultur antigengepulster und reifestimulierter dendritischer Zellen und autologer PBMC wird an Tag 0 angelegt. Dabei wurden am Tag zuvor die zum *priming* verwendeten DC auf die Expression der erwarteten Oberflächenmerkmale überprüft. In wöchentlichem Abstand wurde die angelegte Kokultur mit frisch generierten, antigengepulsten und ausgereiften DC restimuliert. 24 h nach jeder Restimulation wurde ein Aliquot der Kokultur entnommen und die verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen auf die intrazelluläre IFN- γ -Produktion hin getestet. 72 h nach jeder Stimulation wurde 1/4 des Mediums entfernt, auf die Konzentration charakteristischer Zytokine hin untersucht und durch frisches Medium (plus 25 IU IL-2 und 10 ng IL-7) ersetzt.

2.7.2 Kurzzeitkokultur gepulster dendritischer Zellen mit autologen NK-Zellen

NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung einen erheblich kürzeren Zeitrahmen als T-Lymphozyten. Insbesondere besteht kein Bedarf für eine Restimulation. Daher konnte ein erheblich verkürztes Kokulturprotokoll angewandt werden. Die 48-stündige Kokultur von DC mit NK-Zellen wurde in 12 Well Platten in 4 ml Medium durchgeführt. Änderungen im Vergleich zur Langzeitkokultur bestanden darin, dass Vollmedium plus 2% AB-Serum verwandt wurde und auf Medienwechsel und Zytokinsupplementierung verzichtet wurde.

2.7.3 Kurzzeitkokultur in „Transwell“-Kulturplatten

Eine Trennung von Zellpopulationen in der Zellkultur wurde mittels eines sogenannten „Transwell“-Systems durchgeführt. Hierbei wurde eine Nylonmembran mit der Maschenweite 0,2 μm hängend in eine 24-Well Platte eingefügt. Dieses Verfahren wird angewandt, um bei beobachteten Effekten eine Unterscheidung vornehmen zu können zwischen einer Verursachung durch direkten Zellkontakt, der durch die Nylonmembran verhindert wird, und löslichen Mediatoren, die die Nylonmembran ungehindert passieren können. Die Membran wurde vor dem Auflegen der Zellen mit 200 μl PBS benetzt, um Blasenbildung zu verhindern und ungehinderte Diffusion zu ermöglichen. Auch in dieser Form der Kurzzeitkokultur wurde Vollmedium plus 2% AB-Serum verwandt und auf Medienwechsel und Zytokinsupplementierung verzichtet. Als Aktivierungsmarker nach einer 48-stündigen Kokultur diente die intrazelluläre Produktion von IFN- γ .

2.8 Analyseverfahren

2.8.1 Durchflusszytometrie

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen das interessierende Oberflächenantigen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen fokussierten Laserstrahl (Argon, $\lambda=488$ nm) geführt. Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität und Membraneigenschaften bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation kann bereits anhand dieser morphologischen Kriterien ausgewählt und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden.

Der Laserstrahl regt das Chromophor der zur Markierung der Zielstruktur verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle bzw. gebundener intrazellulärer Strukturen.

Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern

Für die Analysen wurden 5×10^5 - 3×10^6 Zellen in Polystyrol-Teströhrchen abzentrifugiert, der Überstand bis auf ein etwa 100 μ l großes Restvolumen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen im verbliebenen Volumen resuspendiert. Zur spezifischen Färbung wurden die Zellen daraufhin 30 min bei 0°C unter Lichtausschluss mit FITC- (Fluoreszein-Isothiozyanat), PE- (Phycoerythrin), CyChrome™-(Konjugat aus Phycoerythrin und einem 1,5kD Zyanid), PerCP™-(Peridinin Chlorophyll Protein) oder APC-(Allophycozyanid)[‡] gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS + 3 % FCS einmal gewaschen. In einigen Versuchen wurde zusätzlich unmittelbar vor der Messung zur Anfärbung toter Zellen PI (Propidiumjodid) zugegeben. Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden mit Hilfe des Gerätes „FACScalibur“ der Firma Becton Dickinson gemessen und die Daten mit FlowJo- (Tree Star Inc.) bzw. CellQuest™-(Becton Dickinson) Software analysiert.

Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Strukturen

Zur Markierung intrazellulärer Strukturen ist es notwendig, die Zellmembran zum Durchtritt der Antikörper zu permeabilisieren. Um die Zellintegrität während des Permeabilisierungsvorgangs zu erhalten, werden die Zellen zunächst unter Zugabe von 4 prozentiger Formalinlösung (Lösung A, Fix&Perm Reagenz) fixiert. Nach 15 min wurde die Formalinlösung im Verhältnis 1:50 mit PBS verdünnt und die fixierten Zellen durch Zentrifugation bei 400 g pelletiert. Der Überstand wurde daraufhin weitestgehend entfernt, die Zellen unter Zugabe von 100 μ l 0,1%-iger Saponin Detergenzlösung (Lösung B, Fix&Perm Reagenz) fixiert permeabilisiert und gleichzeitig mit den Chromophor-markierten Antikörpern für 15 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Bei der Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurden die Zellen mit (1 μ g/ ml) Brefeldin A für 4h vorinkubiert. Brefeldin A blockiert

· Die Anregung von APC benötigt einen zweiten Laser mit der Wellenlänge (λ)=600-640 nm). Z.B. He-Ne-Laser (λ)=633 nm)

intrazelluläre Transportmechanismen, verhindert die Sekretion der zu bestimmenden Zytokine führt damit zu einer Anreicherung des Zytokins im Golgi-Apparat. Als Zeitpunkt für den Beginn der Brefeldin A Zugabe wurde der Zeitpunkt 24 h nach Restimulation gewählt. Dieser Zeitpunkt hatte sich in Vorversuchen als ideal herausgestellt.

2.8.2 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose von Tumorzellen

Das Antikoagulans Annexin V ist in der Lage Ca^{++} -abhängig das Zellmembran-Phospholipid Phosphatidylserin hochaffin zu binden. Diese Eigenschaft macht man sich bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose zu Nutze. In vitalen Zellen ist Phosphatidylserin an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Die Aufrechterhaltung dieser asymmetrischen Verteilung erfordert Energie in Form von ATP. Im Rahmen der Apoptose kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins an die Außenseite der Plasmamembran (sog. „flip-flop Mechanismus“). Dies geschieht bereits in der Frühphase der Apoptose, während der die Zellmembran noch intakt ist. Mit einer Doppelfärbung der Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI), das nur beschädigte Zellmembranen passieren kann und sich im Zellkern an DNS bindet, ergibt sich die Möglichkeit, verschiedene Phasen des Apoptoseprozesses abzubilden. In einer frühen Phase, in der die Zellen lediglich Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche zeigen, jedoch noch eine intakte Plasmamembran besitzen, strahlen die Zellen auf Grund der Bindung von Annexin V (und dem daran gekoppelten Fluoreszeins) im FITC-charakteristischen Spektrum. Im Laufe des weiteren Apoptoseprozesses wird die Zellmembran auch für PI durchlässig. Somit strahlen die Zellen bei Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda=488$ nm zusätzlich in einem Bereich zwischen 562 nm und 588 nm. Diese charakteristische Kinetik kann mit Hilfe der FACS Analyse nachvollzogen werden. UV-bestrahlte bzw. Hyperthermie-behandelte Tumorzellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und in „Annexin V-Bindungspuffer“ resuspendiert ($2-5 \times 10^5$ / ml). Nach Zugabe von Annexin V-FITC wurde die Suspension für 10min bei Raumtemperatur inkubiert, in „Annexin V-Bindungspuffer“ gewaschen und resuspendiert. Unmittelbar vor

der FACS Analyse wurde 1 µg/ ml PI zugegeben (Fadok, Voelker et al. 1993; Martin, Reutelingsperger et al. 1995; Reutelingsperger und van Heerde 1997).

2.8.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Endozytosefähigkeit dendritischer Zellen

Die endozytotische Aktivität der DC wurde bestimmt durch die Aufnahme von FITC-Dextran. Bei der hier verwendeten Konzentration von 0,5 mg/ ml FITC-Dextran liegt die Aufnahme über den Mannose-Rezeptor im Sättigungsbereich, sodass die FITC-Dextran Aufnahme Veränderungen in der Makropinozytosefähigkeit widerspiegelt. Während die Testkultur bei 37 °C im Brutschrank für 30 min inkubiert wurde, erfolgte die Inkubation der Kontrollkultur bei 0 °C. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde die DC Zellpopulation durchflusszytometrisch auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die Inkubation bei 0 °C verhindert dabei den aktiven Endozytosevorgang und diente damit als Negativkontrolle.

2.8.4 Durchflusszytometrische Messung der Aufnahme von Tumormaterial durch dendritische Zellen

Phagozytose beschreibt die intrazelluläre Aufnahme fester Partikel mit anschließendem oxidativem bzw. enzymatischem Abbau. Für die Induktion einer DC-vermittelten Immunantwort ist die intrazelluläre Aufnahme und Prozessierung der Tumorantigene von entscheidender Bedeutung. Zum Nachweis der intrazellulären Aufnahme des Tumormaterials wurde ein vorbeschriebenes Färbeprotokoll für DC und *Panc-1* neu etabliert (Hess, Babcock et al. 1997; Savill 1997). Dabei wurden die membranösen Strukturen der DC mit *PKH-26-red*, einem Intravitalfarbstoff mit hoher Leuchtintensität und Halbwertszeit, gefärbt, wohingegen Tumorzellen mit CFSE-gefärbt wurden, welches an Protein bindet. Nach CFSE-Färben und viermaligem Waschen der Tumorzellen bei 300 g für 10 min, erfolgte eine UV-Bestrahlung mit 150 mJ/ cm². Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden die apoptotischen Tumorzellen mit den zwischenzeitlich *PKH-26-red*-gefärbten unreifen DC im Verhältnis 1:1 in Kokultur gebracht. Dabei wurde

darauf geachtet, eine der Oberfläche des Kulturschalenbodens entsprechende Zelldichte einzuhalten. Für die 8,8 cm² der verwendeten Zellkulturschale stellte sich eine gesamt Zellzahl von 10⁶ für Tumorzellen und DC als optimal heraus. Durchflusszytometrisch konnte durch Bestimmung der doppelt-positiv gefärbten Zellen die Aufnahme von Tumorzellmaterial in der gesamten DC Population bestimmt werden.

Probleme dieser Methode sind jedoch, dass bloße Anlagerung der Tumorzellen an die DC sowie eine unerwünschte Anfärbung der DC mit frei gewordenen CFSE nicht sicher auszuschließen sind. Letzterem Problem konnte durch Reduzierung der CFSE-Konzentration in Kombination mit intensivem Waschen begegnet werden. Außerdem wurde lediglich eine deutlich doppelt-positive Zellpopulation, entsprechend der Fluoreszenzintensität ganzer, nicht phagozytierter Tumorzellen, als Phagozytoseereignis in die Auswertung einbezogen. Das Problem des sicheren Ausschlusses einer bloßen Anlagerung wurde durch die Verwendung der konfokalen Mikroskopiertechnik (KLSM) begegnet. Der Phagozytosevorgang selbst konnte an den unfixierten Zellen in speziellen, für ein inverses 100x Ölimmersionsobjektiv geeigneten Objektträgerkulturschalen fluoreszenzmikroskopisch beobachtet und photographiert werden. Die intrazelluläre Aufnahme und Prozessierung des Antigens wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Phagozytosebeginn durch konfokale Lasermikroskopie veranschaulicht. (siehe auch 2.13.5) Dabei wurden die Zellen zum Nachweis der intrazellulären Aufnahme in 4% Formalinlösung fixiert und in „Permafluor“ Eindeckmedium auf konventionellen Glasobjektträgern haltbar gemacht. So konnte eine große Anzahl Zellen im Hinblick auf die Phagozytose apoptotischen Tumormaterials untersucht und dargestellt werden.

2.8.5 Mikroskopie

Phasenkontrastmikroskopie

Dieses Mikroskopieverfahren wurde zur routinemäßigen optischen Darstellung von Zellkulturen verwandt. Tritt Licht durch ein optisch dichteres Medium (z.B. Plasmamembranen, Zellkerne) wird es in seiner Ausbreitungsgeschwindigkeit gehemmt. Dadurch entstehen Gang- und Phasenunterschiede zwischen den einzelnen Lichtwellen. In den Strahlengang eingebrachte Polarisationsfilter wandeln diese Gangunterschiede in Helligkeitsdifferenzen um und führen damit zu einer kontrastreichen Darstellung der beobachteten Strukturen.

Fluoreszenzmikroskopie

In der Fluoreszenzmikroskopie werden zelluläre Zielstrukturen mit Chromophor antikörperabhängig oder -unabhängig markiert. Das Chromophor wird in der mikroskopischen Untersuchung mittels einer monochromatischen Lichtquelle angeregt. Das vom angeregten Chromophor emittierte Licht einer charakteristischen Wellenlänge bedingt das optische Bild. In den hier beschriebenen Versuchen wurde mit PKH-26 ein Molekül verwandt, das spezifisch an zelluläre, membranöse Strukturen bindet ohne die Vitalität der Zellen zu beeinträchtigen. Die Konjugation dieses Moleküls mit FITC oder PE führt unter Anregung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge $\lambda=488$ nm zur charakteristischen Emission grünen bzw. gelben Lichts. CFSE als unspezifischer Proteinfarbstoff hat in seinen Emissionseigenschaften Ähnlichkeiten mit FITC und färbt demnach Zellen für das menschliche Auge grün an.

Konfokale Laser Mikroskopie (KLSM)

Bei der Konfokalen Laser Mikroskopie (KLSM) wird ein Laserstrahl punktförmig gebündelt und in einer bestimmten Ebene des Präparats fokussiert. Nur die innerhalb dieser Ebene durch Laseranregung entstehende Fluoreszenz, durch z.B. an PKH-26 gekoppeltes FITC oder PE, wird von einem Detektor registriert und digitalisiert. So erhält man ein Bild aus der gewählten Ebene, ohne

Überlagerung durch außerhalb der Fokusebene entstehende Fluoreszenz. Die registrierte Ebene weist dabei eine Schichtdicke von etwa 1 nm auf. Das digitale Gesichtsfeld wird durch die Größe desjenigen Gebietes definiert, das der Laserstrahl zeilenweise abtastet. In den vorliegenden Experimenten wurde ein Argonionenlaser der Wellenlänge $\lambda=488$ nm zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe verwendet und die registrierten Signale der Farbstoffe CFSE sowie PKH-26 PE digital definiert und zur Präsentation mit der Software „Photoshop 3.0“ (Adobe Systems, San Jose, USA) nachbearbeitet.

2.8.6 Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Diese modifizierte ELISA Technik wurde mit kommerziell erhältlichen Reagenziensätzen zum spezifischen Zytokinnachweis verwandt. Dabei werden 96 Well-Flachbodenstrips mit einem zytokin-spezifischen Antikörper beschickt, der an der Plastikoberfläche bindet. Der zu untersuchende Überstand wird nun in 100 μ l Einheiten und in Duplikaten zu den gebundenen Antikörpern gegeben, wobei das zu untersuchende Zytokin proportional zu seiner Konzentration an die Antikörper bindet. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit und dreimaligem Waschen wird ein enzymmarkierter, ebenfalls zytokinspezifischer jedoch an einem anderen Epitop bindender Antikörper zugegeben. Das gebundene Enzym (Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase) vermittelt in Abhängigkeit seiner Konzentration und damit in Abhängigkeit der Zytokinkonzentration mit dem Substrat ABTS (3-Ethylbenzothiazol-6-Schwefelsäure) eine Farbreaktion, die photometrisch bestimmt werden kann.

Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher spezifischer Antikörper wird das Risiko der Kreuzreaktivität minimiert und damit eine möglichst spezifische Aussage über die Konzentration des untersuchten Zytokins ermöglicht. Die Quantifizierung der Zytokinkonzentration gelingt durch Definieren einer Standardkurve. Dabei wird ein vom Hersteller mitgeliefertes rekombinantes Zytokin einer definierten Konzentration, in 6 Verdünnungsschritten so ausgetragen, dass sich in der Auswertung durch die sechs definierten Zytokinkonzentrationen mit ihren zugehörigen definierten Farbintensitäten eine

Standardkurve ergibt. Die Farbintensität der gemessenen Proben wird anhand dieser Standardkurve in die jeweilige Zytokinkonzentration umgerechnet.

2.8.7 Proliferationsbestimmung mit [³H]-Thymidin

Zum Nachweis der Proliferation von mit DC stimulierten Lymphozyten wurde das tritiummarkierte Nukleosid [³H]-Thymidin am 4. Tag einer Kokultur mit allogenen DC zum Medium zugegeben. Der Einbau von radioaktivem Thymidin in die DNS der Zellen ist dabei abhängig von der DNS-Neusynthese und dient somit als Marker der Zellproliferation. 18-24h nach der Zugabe von 1 µCi [³H]-Thymidin wurden die Zellkulturen mit Hilfe eines „96 MicroCell Harvesters“ auf eine Filtermatte transferiert und das nicht inkorporierte, radioaktive Thymidin abgewaschen. Nach Trocknen der Filtermatte in einem Wärmeschrank und Überführen in eine Szintilationsflüssigkeit wurde die inkorporierte Radioaktivität in einem Szintilationszähler als Szintilationsereignisse/ min (cpm) bestimmt.

2.8.8 Magnetische Zellseparation von NK-Zellen

Um aus Mischpopulation von Lymphozyten eine Subpopulation zu isolieren, bietet sich das Verfahren der magnetischen Zellseparation an. Dabei werden spezifische monoklonale Antikörper verwendet, an die paramagnetische Zuckerstrukturen – sogenannte *microbeads* gekoppelt sind. Derart markierte Zellen werden beim Durchtritt durch ein starkes Magnetfeld zurückgehalten, wohingegen unmarkierte Zellen ungehindert passieren können. Bei der sogenannten Positivselektion stellen die markierten und im Magnetfeld zurückgehaltenen Zellen die Zielzellen der Selektion dar, wohingegen bei der sogenannten Negativselektion die unmarkierten Zellen gesammelt werden. Bei der Negativselektion erhält man somit Zellen, die nicht mit einem Antikörper markiert wurden und demnach in der folgenden Kultur keine durch die Antikörperbindung veränderten Eigenschaften aufweisen sollten.

Nach dieser Methode wurden in der vorliegenden Arbeit unmarkierte NK-Zellen isoliert. Die zur Depletion von T- und B-Zellen sowie Zellen der myeloiden Zellreihe verwendeten Antikörper waren dabei α CD3, α CD19, α CD14 und

□CD36. Dabei wurde ein kommerzieller Reagenziensatz verwendet und nach den Herstellerangaben vorgegangen. Das Ergebnis der Zellseparation wurde durchflusszytometrisch überprüft und entsprach mit einer Reinheit größer als 97 % den Herstellerangaben.

2.8.9 Zytotoxizitätsbestimmung im Chrom-Lyse-Test

Der Chrom-Lyse-Test stellt einen quantitativen Test dar, mit dem die zytolytische Aktivität zytotoxischer T-Zellen bzw. NK-Zellen (Effektorzellen) gegenüber den mit dem radioaktiven Isotop $^{51}\text{Chrom}$ markierten Zellen (Zielzellen) ermittelt wird. Das Prinzip besteht darin, einer Zielzelle sechswertiges $^{51}\text{Chrom}$ anzubieten, welches in das Zytoplasma aufgenommen und intrazellulär zu dreiwertigem Chrom reduziert wird. Das reduzierte Chrom kann durch intakte Zellmembranen nicht mehr diffundieren und wird daher nur von toten Zellen abgegeben. Einmal freigesetztes Chrom^{3+} kann von anderen Zellen nicht wieder aufgenommen werden. Daher korreliert das freigesetzte radioaktive Chrom^{3+} mit der Anzahl toter Zielzellen. Die freigesetzte Radioaktivität kann in einem β -Counter gemessen werden.

Zur Durchführung des Tests wurden die Zielzellen in einem 15ml Teströhrchen abzentrifugiert, in ca. 100 μl Medium resuspendiert und 1 h bei 37 °C mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (ca. 100 $\mu\text{Ci}/10^6$ Zellen) unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Medium bei 4 °C wurden je 4000 Zielzellen (sog. „*targets*“) zu den vorher ebenfalls gewaschenen und im angegebenen Zahlenverhältnis (E:T Verhältnis) ausgetragenen Effektorzellen (sog. „*effectors*“) in einer 96 Well Rundbodenplatte zu einem Endvolumen von 200 μl ausplattiert. Bei den MHC-I-Blockierungs-Experimenten wurden die Zielzellen nach der Inkubation mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ mit MHC-I-Blockierendem Antikörper für 1 h präinkubiert. Ansätze mit gleichen E:T Ratios wurden in Triplikaten ausgetragen. Anschließend wurden die Platten 16 h (bei K562 als Zielzelllinie 4 h) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Diese Inkubationszeiten wurden in Vorversuchen im Hinblick auf einen möglichst großen Unterschied von Spontanfreisetzung zu Maximallyse optimiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 50 μl Überstand in Polystyrol-Counterröhrchen überführt und die radioaktiven

Zerfälle in einem β -Counter für jeweils 1 min gemessen (cpm). Für jede radioaktiv markierte Zielzelllinie wurde die Spontanfreisetzung von ^{51}Cr in Abwesenheit von Effektorzellen und die Maximalfreisetzung durch Inkubation mit einem Detergenz (TritonX) bestimmt. Die Lysetests wurden in Vollmedium plus 2% AB-Serum durchgeführt. Die Auswertung erfolgte computergestützt. Dabei wurde die Stärke der Zytotoxizität der Effektorzellen in Prozent spezifische Lyse angegeben, die sich dabei wie folgt berechnet:

$$\% \text{spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)}}{\text{Maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)}}$$

Dabei entspricht cpm (Testlyse) der in Gegenwart zytotoxischer Effektorzellen bestimmten Radioaktivität. Cpm (Spontanlyse) bezeichnet die aus Zielzellen freigesetzte Radioaktivität in Abwesenheit von zytotoxischen Effektorzellen und cpm (Maximallyse) die in Gegenwart von Detergenz freigesetzte Radioaktivität. Angegeben wurden jeweils die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

2.9 Statistik

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwerte plus die jeweilige „*standard error of mean*“ (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels des zweiseitigen gepaarten Student t-Tests ermittelt. Unterschiede wurden bei p-Werten <0.05 als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Phagozytose apoptotischen Tumormaterials durch dendritische Zellen

DC prozessieren Antigen, das in Form von Zellfragmenten aufgenommen wurde und präsentieren es mit großer Effizienz im Kontext mit MHC-II (Inaba, Turley et al. 1998). Auch wird in der Literatur die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von apoptotischen Zellen in DC beschrieben. Dieser Aufnahmemodus resultiert in der Induktion spezifischer CTL und ist damit eine Möglichkeit das Phänomen des Kreuz-*primings* („*cross priming*“) experimentell nachzuvollziehen (Albert, Pearce et al. 1998; Albert, Sauter et al. 1998; Heath und Carbone 2001). In unseren Experimenten wurden daher in einem ersten Schritt dendritische Zellen generiert und charakterisiert sowie ein Protokoll zur Induktion von Apoptose in der Pankreaskarzinom Zelllinie *Panc-1* etabliert. Mit Hilfe mikroskopischer und durchflusszytometrischer Methoden wurde daraufhin die Aufnahme von apoptotischen Zellbestandteilen von *Panc-1* Tumorzellen untersucht (Hess, Babcock et al. 1997; Savill 1997; Sauter, Albert et al. 2000).

3.1.1 Charakterisierung dendritischer Zellen

Unreife Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen

Die Generierung einer weitgehend reinen und unstimulierten DC-Population stellt die Grundvoraussetzung der vorliegenden Experimente dar. Zunächst wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Reinheit der durch Adhärenz-Selektion gewonnenen Monozytenpopulation bestimmt. In sechs unabhängigen Experimenten konnte eine im Durchschnitt 77-prozentige CD14-exprimierende Monozytenpopulation gewonnen werden (siehe Abb. 4). Spenderabhängig war eine Variabilität dieses Wertes von 67 % bis 91 % festzustellen. Die verbleibenden 23 % der PBMC waren Lymphozyten und zeigten im Durchschnitt folgendes Verteilungsmuster: 14 % T-Zellen (CD3⁺), 6 % B Zellen (CD19⁺) sowie 3 % NK-Zellen (CD56⁺/CD3⁻) (Daten nicht gezeigt).

Nach sechstägiger Inkubation dieser Zellpopulation mit IL-4 (500 IU/ ml) und GM-CSF (1000 IU/ ml) wurde die Expression des Monozyten-Markers CD14, die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 sowie die Expression des Oberflächenmarkers CD83, der von Stimulation und Ausreifung der DC abhängig ist, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Expression von CD14 nahm bis auf den Nullwert der Isotypkontrolle ab. Gleichzeitig nahm die Expression der kostimulatorischen Moleküle etwa um den Faktor 10 zu und zeigte eine Leuchtintensität im dritten und vierten Logbereich der logarithmischen FACS-Skala. Für CD83 konnte zu diesem Zeitpunkt lediglich eine Leuchtstärke im Bereich der Isotypkontrolle nachgewiesen werden (siehe Abb. 4).

Mit Hilfe der FITC-Dextran Aufnahme wurde eine hohe endozytische Aktivität nachgewiesen (siehe Abb. 4). Dieses Expressionsmuster der Oberflächenantigene sowie die hohe endozytische Aktivität und der typische morphologische Aspekt im phasenkontrastmikroskopischen Bild sind definierend für nicht aktivierte DC (Romani, Gruner et al. 1994; Sallusto und Lanzavecchia 1994).

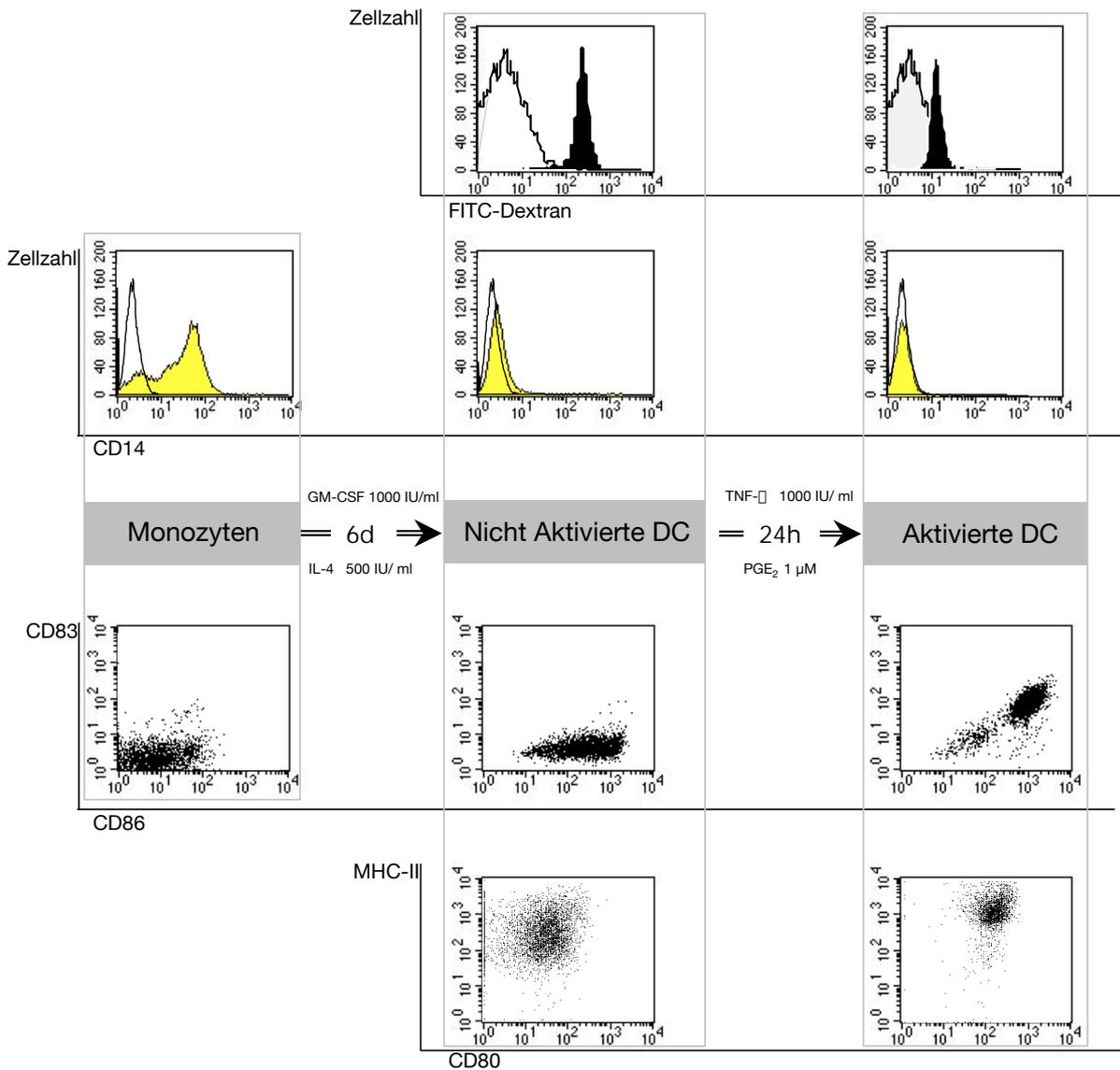


Abb. 4: Oberflächenmarker-Expression und Nachweis der Phagozytose von FITC-Dextran von Monozyten, nicht-aktivierten- und aktivierten DC.

Die Oberflächenexpression der Marker CD14, CD86 und CD83 wurde auf Monozyten bestimmt. Nach 6d Inkubation mit GM-CSF und IL-4 wurden FITC-Dextran Aufnahme (Erste Zeile der Abb.) und die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD80, CD83, CD86, MHC-II bestimmt (unterer Teil der Abb.). Die so generierten nicht-aktivierten DC wurden für 24h mit TNF- α und PGE₂ aktiviert und wiederum FITC-Dextran Aufnahme und die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD80, CD83, CD86, MHC-II bestimmt. Nicht-gefüllte Histogramme representieren die Isotypenkontrollen. Ein representatives von 6 unabhängigen (n=6) Experimenten ist dargestellt.

Ausreifung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Die Reifung oder Aktivierung der unreifen DC ist charakterisiert durch die Neu-Expression von CD83 (Zhou und Tedder 1996), durch die verstärkte Expression der oben erwähnten kostimulatorischen Moleküle und anderer Moleküle, die mit der Antigenpräsentation in Verbindung stehen, wie zum Beispiel MHC-II, sowie einer deutlichen Reduzierung der endozytotischen Aktivität (Sallusto, Cella et al. 1995). Diese morphologischen Veränderungen, die zusätzlich mit einer Sekretion des Th1-Zytokins IL-12 einhergehen (Rieser, Bock et al. 1997), ließen sich durch die Zugabe der Reifestimuli TNF- α (1000 IU/ml) und PGE₂ (1 μ M) erzielen (siehe Abb. 4) .

Erhalt der Reife nach Zytokinentzug

Von entscheidender Bedeutung für die Induktion einer Immunantwort ist die Stabilität der ausgereiften DC. Denn nur in diesem Zustand ist die DC zum T-Zell-*priming* und damit zur Induktion einer primären spezifischen Immunantwort in der Lage. Während unreife DC nach Entzug von IL-4 und GM-CSF erneut den Makrophagen-Marker CD14 exprimieren, sollte bei vollständiger Ausreifung Erscheinungsbild und Funktion einer reifen DC auch nach Entzug aller Zytokine erhalten bleiben. Die Stabilität der Antigen-Präsentation als auch der Kostimulation auf der Oberfläche der DC ist entscheidend für Fähigkeit der DC, eine Immunantwort auszulösen (Steinman, Inaba et al. 1999; Steinman, Turley et al. 2000). Da in den nachfolgenden *in vitro* Versuchen in den ersten 48h, also in der ersten Phase des T-Zell-*primings*, keine Zytokinzugabe erfolgen sollte, wurde in Vorversuchen die Stabilität der Expression der Marker CD80, CD86, CD83 und MHC-II nach Zytokinentzug bestimmt. In erwähntem Zeitraum zeigte sich keine Veränderung gegenüber einer mit TNF- α und PGE₂ weiterhin supplementierten Kultur. Erst nach viertägiger Kultur in zytokinfreiem Medium konnte eine verminderte Expression der genannten Oberflächenmarker beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Kostimulatorische Potenz ausgereifter DC

Als erster Anhaltspunkt für die T-Zell-stimulierende Potenz der reifeinduzierten DC wurde mittels des [³H]-Thymidin-Proliferationsassays in einer allogenen Kokultur von PBMC und DC, die mit verschiedenen Reifestimuli aktiviert wurden, die Proliferationsrate der PBMC bestimmt (siehe Abb. 5). Es wurden drei in der Literatur beschriebene Stimuli bestehend aus entweder LPS, TNF- α + PGE₂ oder TNF- α + IL-1 α + IL-6 verglichen (Rieser, Bock et al. 1997; Thurner, Röder et al. 1999). Dabei konnte mit LPS-stimulierten DC bei einem DC/T-Zell-Verhältnis von nur 1:320 eine bis zu 10-fach gesteigerte Lymphozytenproliferation im Vergleich zu unstimulierten DC induziert werden. Auch bei einem DC/T-Zell-Verhältnis von 1:10 war noch eine um den Faktor 3 gesteigerte Lymphozytenproliferation nachweisbar. Die Ergebnisse für TNF- α + PGE₂ waren denen mit LPS vergleichbar und lagen, wenn auch nicht signifikant, über denen, die mit der Kombination aus TNF- α + IL-1 α + IL-6 erzielt werden konnten. (Siehe Abb. 5)

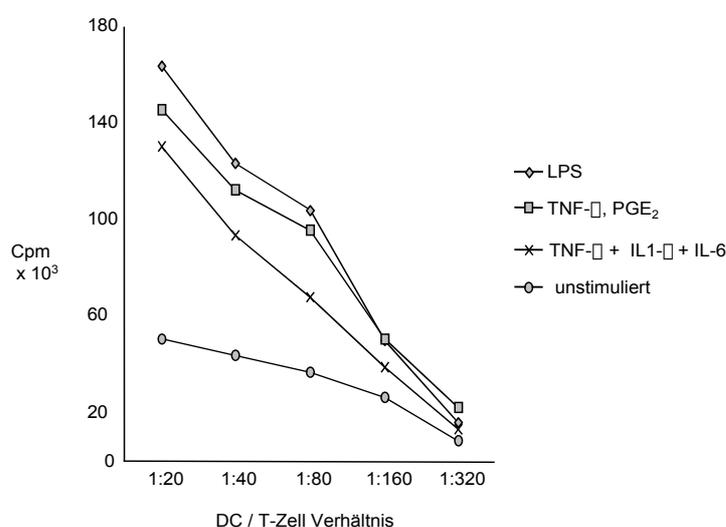


Abb.5: T-Zell-stimulierende Potenz unstimulierter und reifeinduzierter DC

Nach 5-tägiger Kokultur von PBMC mit allogenen DC, die unter verschiedenen Bedingungen ausgereift worden waren, wurde die Proliferation der Lymphozyten mit dem [³H]-Thymidin-Test gemessen. In *counts per minute* (cpm) gemessene [³H]-Thymidin Aufnahme in proliferierenden Lymphozyten unter verschiedenen Reifebedingungen und Zahlenverhältnissen (DC/T-Lymphozyten). Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=10).

3.1.2 Apoptoseinduktion der Pankreaskarzinomzelllinie ***Panc-1***

Bestrahlung mit UV-B-Licht und Behandlung mit Hyperthermie

Apoptose von *Panc-1* Tumorzellen wurde auf zweifache Weise induziert. *Panc-1* Tumorzellen wurden entweder mit 150mJ/ cm² UV-B-Licht bestrahlt oder einer Temperatur von 43°C für 2 h ausgesetzt. Frühe Apoptose wurde definiert durch die Markierung der Zellen mit Annexin V-FITC (AnnV) und Ausschluss von Propidiumiodid (PI) aus dem Zytoplasma. Zusätzlich wurde ein Aliquot der Probe im Phasenkontrastmikroskop auf die Fähigkeit untersucht, Trypanblau auszuschließen. Um festzustellen, ob *Panc-1* Tumorzellen sich durch strahlungsbedingten bzw. thermischen Stress in den apoptotischen Zelltod treiben lassen, wurde eine Kinetik der Apoptose zu 5 Zeitpunkten bestimmt.

Nach 24h betrug der prozentuale Anteil der AnnV⁺/ PI⁻ Zellen 32%, und lediglich in 1% der Zellen wurde die Aufnahme von Trypanblau in das Zytoplasma nachgewiesen. Nach 48h nahm mit den oben angegebenen Induktionsstimuli die Anzahl der AnnV⁺/PI⁻-positiven Zellen auf etwa 40% der Zellen zu, wobei jedoch etwa 10% der Gesamtzellzahl Trypanblau in das Zytoplasma aufnahmen. 96h nach Apoptoseinduktion war annähernd die gesamte Zellpopulation AnnV/PI und Trypanblau-positiv. Im Bezug auf Kinetik und Ausmaß der Apoptoseinduktion zeigten sich in diesen Versuchen keine Unterschiede zwischen der Behandlung mit Hyperthermie und der Bestrahlung mit UV-B-Licht bei angegebener Dosierung. Auf Grund dieser Daten wurden zur Pulsung der DC *Panc-1* Zellen verwendet, die nach Apoptoseinduktion durch Hyperthermie oder UV-Bestrahlung für ca. 24 h in Vollmedium inkubiert wurden, da zu diesem Zeitpunkt ein Drittel der Tumorzellpopulation den oben genannten Kriterien entsprach und nur ein sehr geringer Prozentsatz der Tumorzellen bereits nekrotisch war.

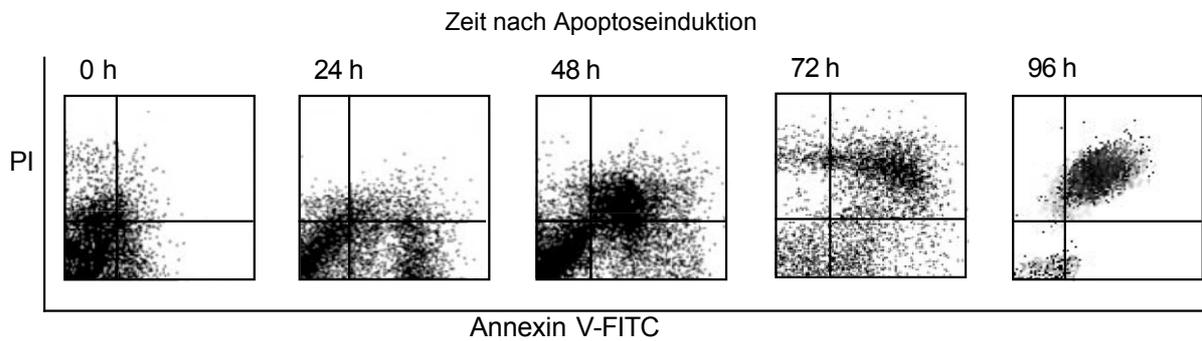


Abb.6: Kinetik der Apoptose von *Panc-1*

DC wurden mit 150 mJ/cm^2 UV-B-Strahlung behandelt und bis zu den angegebenen Zeitpunkten in Kultur gehalten. Gezeigt sind die durchflusszytometrische Bestimmung der Annexin V Bindungsfähigkeit und PI Aufnahme eines repräsentativen Experiments. (n=9)

3.1.3 Nachweis der Phagozytose apoptotischen Tumormaterials durch dendritische Zellen

Nach Färben mit PKH-26-PE (DC) sowie CFSE (*Panc-1*) konnten bei Einzelmessungen in der Durchflusszytometrie die beiden Zellpopulationen deutlich voneinander getrennt dargestellt werden. Nach vierstündiger Koinkubation der DC mit apoptotischen Tumorzellen bei 37°C zeigte sich eine Zunahme der doppelt-positiven Zellen von 37% im Vergleich zu 5,6% in der Kontrolle, die bei 0°C inkubiert wurde (siehe Abb. 7). Die die DC-Präparation verunreinigenden Lymphozyten zeigten keine phagozytotische Aktivität und konnten somit als versuchsinterne Kontrolle einer etwaigen unspezifischen CFSE-Färbung der DC angesehen werden (Hess, Babcock et al. 1997). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist die Unterscheidung einer bloßen Anlagerung von CFSE-markiertem Material nicht vom aktiven Prozess der Phagozytose und damit von der intrazellulären Aufnahme zu unterscheiden. Sowohl die Tatsache der Aufnahme als auch die zeitlichen Abläufe dieses Prozesses wurden daher im Folgenden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

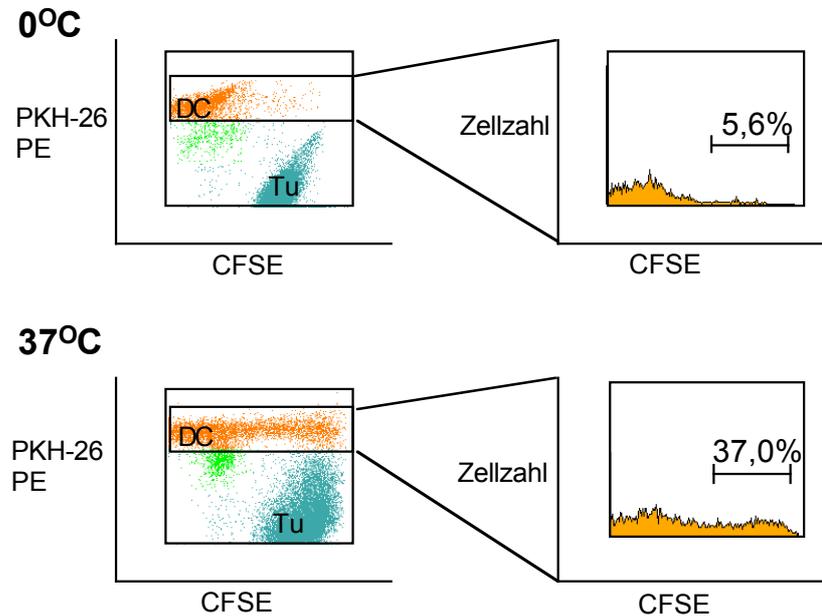


Abb.7: FACS-Analyse der phagozytotischen Aktivität der DC.

CFSE-gefärbte apoptotische Tumorzellen (Tu) wurden mit *PKH-26-red*-gefärbten dendritischen Zellen (DC) in einem Verhältnis von 1:1 für 4h bei 37°C inkubiert und daraufhin die doppelgefärbte Zellpopulation prozentual quantifiziert. Als Negativkontrolle fungierte eine Kokultur bei 0°C. Hellgrün markierte Zellen entsprechen verunreinigenden Lymphozyten. Diese sind auch bei 37°C nicht in der Lage zu phagozytieren.

In Zellkulturschalen, die ein direktes Betrachten des Phagozytoseprozesses mit einem inversen 100x Ölimmersionsobjektiv zulassen, konnte der zeitliche Verlauf der Aufnahme von Teilen apoptotischer *Panc-1* Tumorzellen beobachtet werden. Eine Anlagerung des Tumormaterials an die DC war nach ca. 2 h zu beobachten. Ein Umschließen bzw. die intrazelluläre Aufnahme erfolgte nach weiteren 1-2 h (siehe Abb. 8).

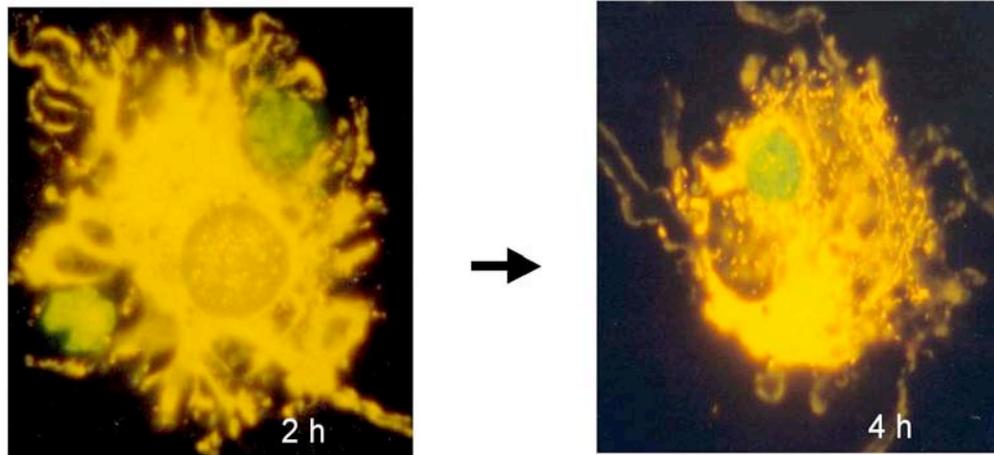


Abb.8: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Phagozytoseprozesses.

In Zellkulturschalen wurde die Kokultur dendritischer Zellen und apoptotischer Tumorzellen floureszenzmikroskopisch zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Einer Anlagerung des apoptotischen Tumormaterials (CFSE-gefärbt) nach etwa 2 h, folgt die intrazelluläre Aufnahme in die DC (*PKH-26-red*-gefärbt) nach etwa 4 h.

Die Tatsache, dass die Fluoreszenzmikroskopie Strukturen abbildet, die sowohl unter als auch über der eingestellten Brennebene liegen, bedingt für das Auge den detaillreichen räumlichen Aspekt. Die Frage nach der Aufnahme des Tumormaterials in das Zytoplasma läßt sich aber nur mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie (KLSM) klären. Zu diesem Zweck wurden in einem konfokalen Lasermikroskop Schnitte in 1 µm Abstand durch den Zellkörper von DC gelegt, die die intrazelluläre Aufnahme von Tumormaterial belegen sollten. Bei hoher Verstärkung des Fluoreszenzsignals war es zudem möglich den intrazellulären Degradierungsprozess des Tumormaterials zu beobachten, da auch kleinste Fragmente des CFSE-markierten Tumormaterials durch die elektronische Verstärkung sichtbar gemacht werden konnten. In einem Zeitfenster von 8 h, nach Reifeinduktion (also 12 h nach Beginn der Phagozytose) zeigte sich eine vom Ort der Tumormaterialaufnahme ausgehende diffuse Verteilung des CFSE Signals im Zytoplasma (siehe Abb. 10).

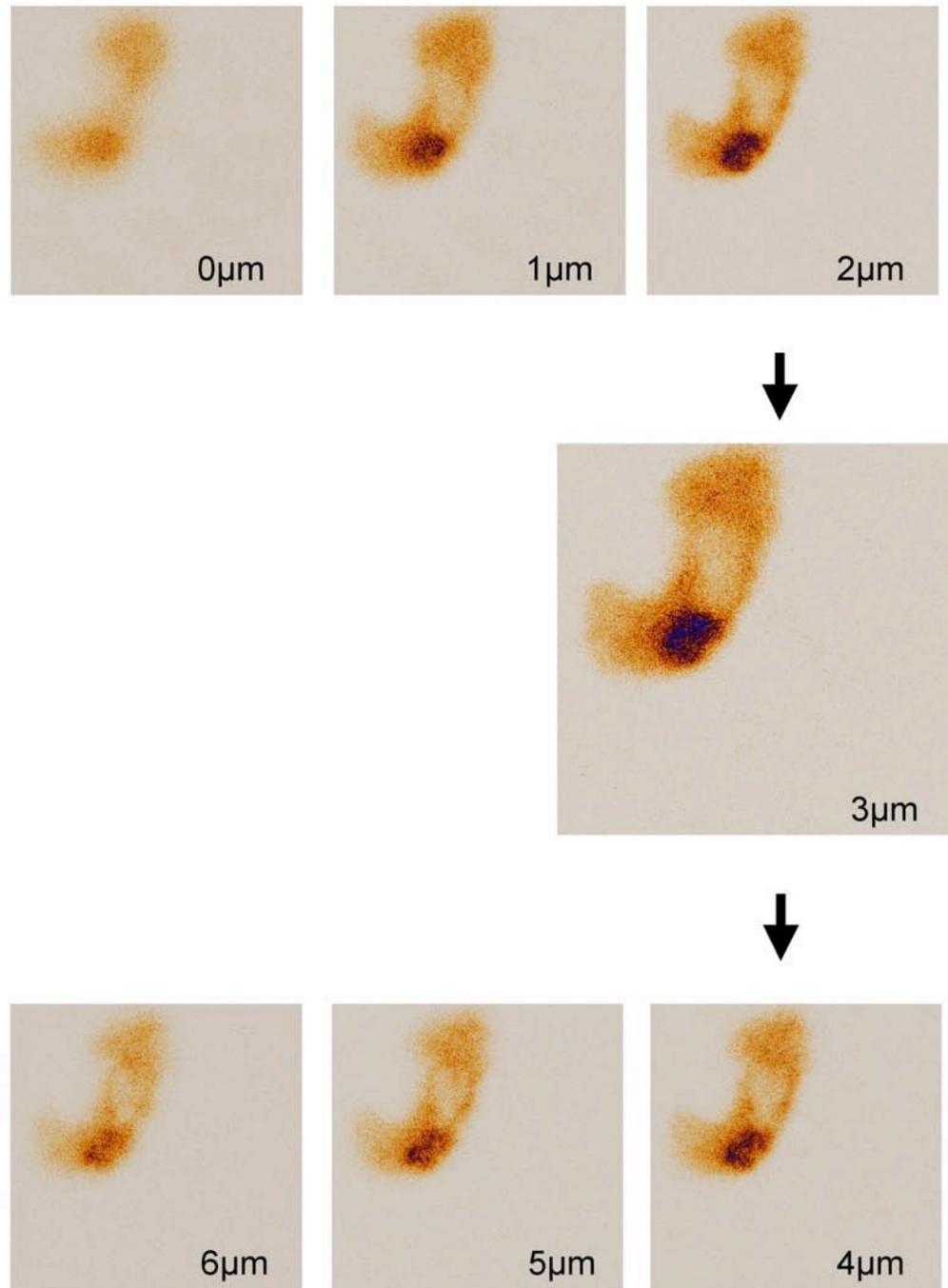


Abb.9: Konfokalmikroskopische Analyse der intrazellulären Lage des apoptotischen Tumormaterials

Gezeigt sind 7 mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie in 1 μm Abstand gelegte, Schnitte durch eine DC (PKH-26-red-gefärbt) mit Tumorzellfragment (CFSE-gefärbt). Farben zum Druck nachträglich invers dargestellt.

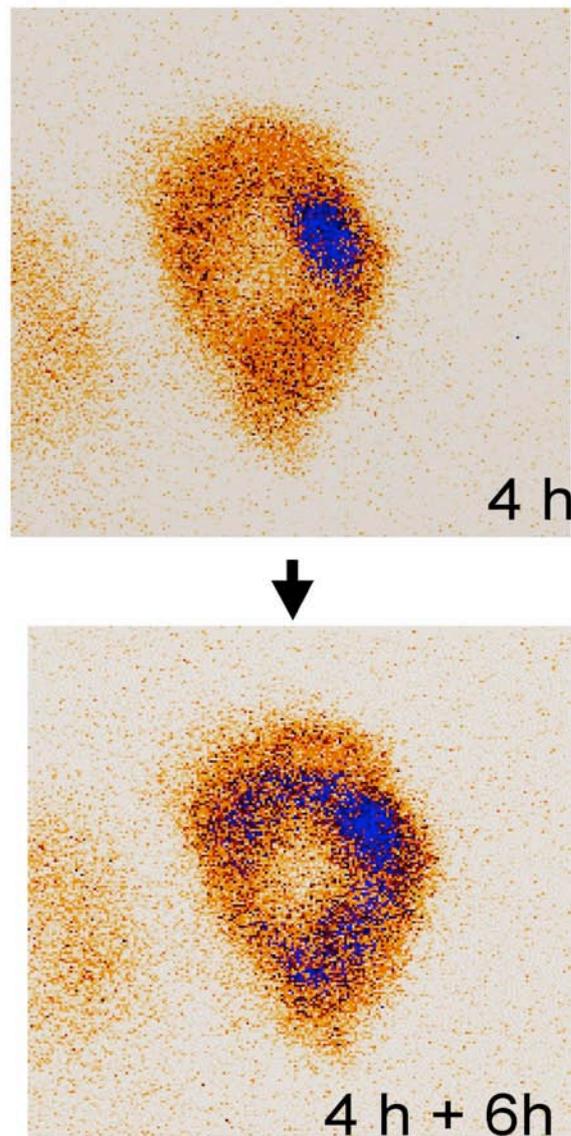


Abb.10: Konfokalmikroskopische Analyse des zeitlichen Verlaufs der Tumormaterial-Aufnahme

Gezeigt ist ein Schnitt durch eine DC (*PKH-26-red*-gefärbt) 4 h nach Phagozytosebeginn. Zu diesem Zeitpunkt wurde dem Medium TNF- α und PGE₂ zugegeben und dieselbe Zelle 6 Stunden später erneut beobachtet. Es zeigt sich zu diesem Zeitpunkt eine deutlich diffusere Verteilung des Tumormaterials (CFSE-gefärbt). Farben zum Druck nachträglich invers dargestellt.

3.2 Charakterisierung des Einflusses der Antigenaufbereitung auf die Immunantwort

Es wurden fünf Antigenpräparations-Konditionen und zwei Negativkontrollen im Hinblick auf die Induktion einer Th1-Immunantwort gegen *Panc-1* Tumorzellen untersucht. Im Rahmen einer autologen Kokultur wurden hierbei PBMC viermal - alle 7 Tage - mit frisch generierten mit den zu testenden Antigenpräparationen gepulsten und reifestimulierten DC stimuliert.

Von den fünf Konditionen der Antigenpräparation bildete Tumorzellysat das Modell für nekrotisches Tumormaterial. Bei den verbleibenden vier Bedingungen der Herstellung apoptotischen Tumormaterials sollte zum einen ein möglicher Unterschied der Apoptoseinduktion mit Hitze oder UV-Strahlung und zum anderen die Auswirkungen der Anwesenheit ganzer apoptotischer Tumorzellen vs. apoptotischer Körperchen untersucht werden. Die DC, die zur Induktion der Immunantwort verwandt werden sollten, wurden demnach mit Tumorzellysat („TuLy“), dem zentrifugierten Überstand von entweder bestrahlten („UVÜS“) bzw. hitzebehandelten („43ÜS“) Tumorzellen oder mit ganzen bestrahlten („UVGZ“) bzw. hitzebehandelten („43GZ“) Tumorzellen gepulst. Als Negativkontrollen fungierten sowohl autologe Lymphozyten[§], die mit ungepulsten DC, dh. in Abwesenheit von Tumorantigen, stimuliert wurden als auch Lymphozyten, die lediglich mit niedrig dosiertem IL-2 und IL-7 („ohne Antigen“), dh. in Abwesenheit von DC, erhalten wurden. Die Abkürzungen in Klammern bezeichnen die jeweiligen Antigenaufbereitungsverfahren und Konditionen der Kokultur und werden im folgenden in dieser Bedeutung verwandt.

· Die Daten der Kultur mit lediglich autologen Lymphozyten sind der besseren Übersicht wegen in den Abbildungen nicht dargestellt, da die Messwerte unter allen Bedingungen denen von „ohne Antigen“ entsprachen und damit als eine zweite Negativkontrolle fungierten.

3.2.1 Einfluss der Antigenaufbereitung auf die IFN- γ -Sekretion

Ein Aliquot des Überstandes der Kokultur wurde in wöchentlichem Abstand abgenommen und die Gesamtkonzentration von IFN- γ als Globalparameter einer Th1-Immunantwort bestimmt. Im Mittel von sechs durchgeführten Kokulturen mit jeweils einem unterschiedlichen Spender konnte in denjenigen Ansätzen, bei denen mit apoptotischem Tumormaterial gearbeitet wurde, eine signifikant ($p=0,017$) höhere IFN- γ -Konzentration im Überstand nachgewiesen werden als in Ansätzen mit lysatgepulsten DC (siehe Abb. 11). Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der gemittelten IFN- γ -Konzentration zwischen den Ansätzen 43GZ vs. UVGZ bzw. 43ÜS vs. UVÜS bestimmt werden. Mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p<0,01$ ergaben sich Unterschiede zwischen den Antigenpräparationen: Ganze behandelte Tumorzellen (43GZ und UVGZ) > Überstand behandelte Tumorzellen (43ÜS und UVÜS) > Tumorzelllysate (TuLy) > ungepulste DC (ohne Antigen). Zwischen Ansätzen mit der Apoptoseinduktion durch Hyperthermie und UV-Licht konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (siehe Abb. 11). In allen Ansätzen wurde nach jeder Restimulation eine Steigerung der IFN- γ -Konzentration im Vergleich zur vorausgegangenen Stimulation festgestellt (Daten nicht gezeigt).

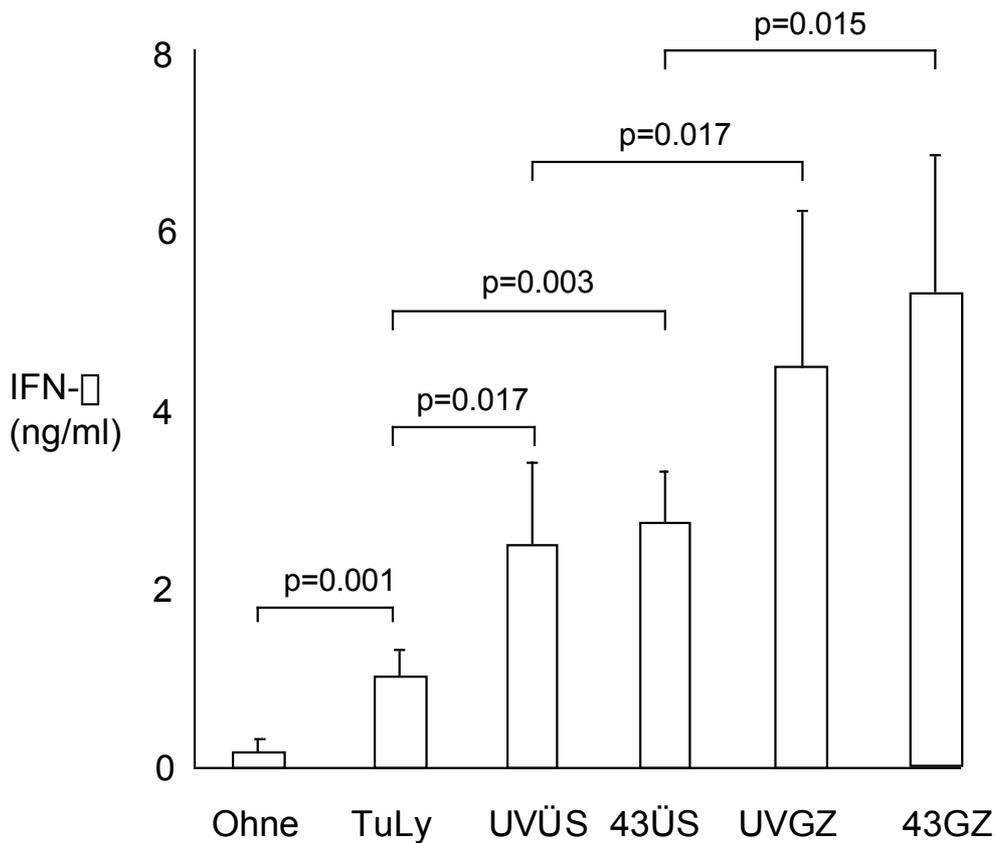


Abb.11: IFN- γ -Produktion von PBMC, die mit gepulsten DC koinkubiert wurden.

Die DC wurden mit Tumorzellysat (TuLy), ganzen apoptotischen Tumorzellen (...GZ) oder im Überstand vorhandenen apoptotischen Körperchen (...ÜS) gepulst und reifestimuliert oder aber sie wurden ohne Antigen reifestimuliert (Ohne). Eine weitere Unterscheidung wurde hinsichtlich der Apoptoseinduktion eingeführt: UV-B-Bestrahlung (UV...) bzw. Hyperthermie-Behandlung bei 43°C (43...). Nach der Ausreifung mit TNF- α und PGE₂, wurden die DC mit autologen PBMC kokultiviert. Die Abbildung zeigt die IFN- γ -Konzentration im Überstand der Kokultur nach 4-wöchentlichen Stimulationszyklen. Angegeben sind die Mittelwerte von 6 unterschiedlichen Spendern und der *standard error of mean* (SEM).

3.2.2 Einfluss der Antigenaufbereitung auf die Tumorzellyse von

Panc-1

Der Nachweis der Zytotoxizität der generierten T-Zellen wurde im ⁵¹Cr-Lyse-Test geführt. Dabei wurden die PBMC der Kokultur nach der 3. Restimulation in unterschiedlichen Effektor/Target Verhältnissen (E/T Verhältnis) mit ⁵¹Cr enthaltenden *Panc-1* Zellen koinkubiert und das aus der Targetzelle

freigesetzte ^{51}Cr im Überstand gemessen. Die Ansätze, in denen DC mit ganzen apoptotischen Tumorzellen gepulst wurden, führten unabhängig von der verwendeten Apoptoseinduktion zur höchsten prozentualen Lyse der Targetzelllinie *Panc-1* bei einem E/T Verhältnis von 80:1. Ansätze bei denen mit Überstand apoptotischer Tumorzellen bzw. Lysat gearbeitet wurde zeigten demgegenüber deutlich geringere lytische Aktivität. Die Messwerte des Ansatzes „ohne Antigen“ waren durchwegs unabhängig von der eingesetzten Effektorzellzahl und bewegten sich stets unterhalb von 15% (siehe Abb. 12).

3.2.3 Charakterisierung der Immunantwort

Die festgestellte prozentuale Lyse gegenüber *Panc-1*, die nach dreimaliger Restimulation erzielt wurde, korrelierte zwar mit der zeitgleich gemessenen IFN- γ -Konzentration im Überstand, ließ aber dennoch die Frage nach dem zellulären Ursprung dieser lytischen Aktivität sowie der IFN- γ -Produktion unbeantwortet. Zusätzlich zu spezifischen CTL kamen als mögliche Effektorzellen einer unspezifischen Immunantwort vor allem natürliche Killerzellen aber auch $\gamma\delta$ -T-Zellen in Frage. Um zwischen einer spezifischen und einer etwaigen unspezifischen Immunantwort zu unterscheiden, wurde zum einen eine andere Zelllinie, gegenüber der *Panc-1*-spezifische CTL keine lytische Aktivität zeigen sollten, eingeführt. In den vorliegenden Experimenten wurde zu diesem Zweck die HLA-A2⁺ Magenkarzinomzelllinie *Kato-III* als Kontroll-Zielzellen im ^{51}Cr -Lyse Test verwandt (Siehe Abb. 13). Zusätzlich wurden die Experimente in Anwesenheit von MHC-I-blockierenden Antikörpern durchgeführt, um CTL-Tumorzell-Interaktionen über den T-Zell-Rezeptor, und damit die Tumorzell-Erkennung, zu verhindern (siehe Abschnitt 3.3.2).

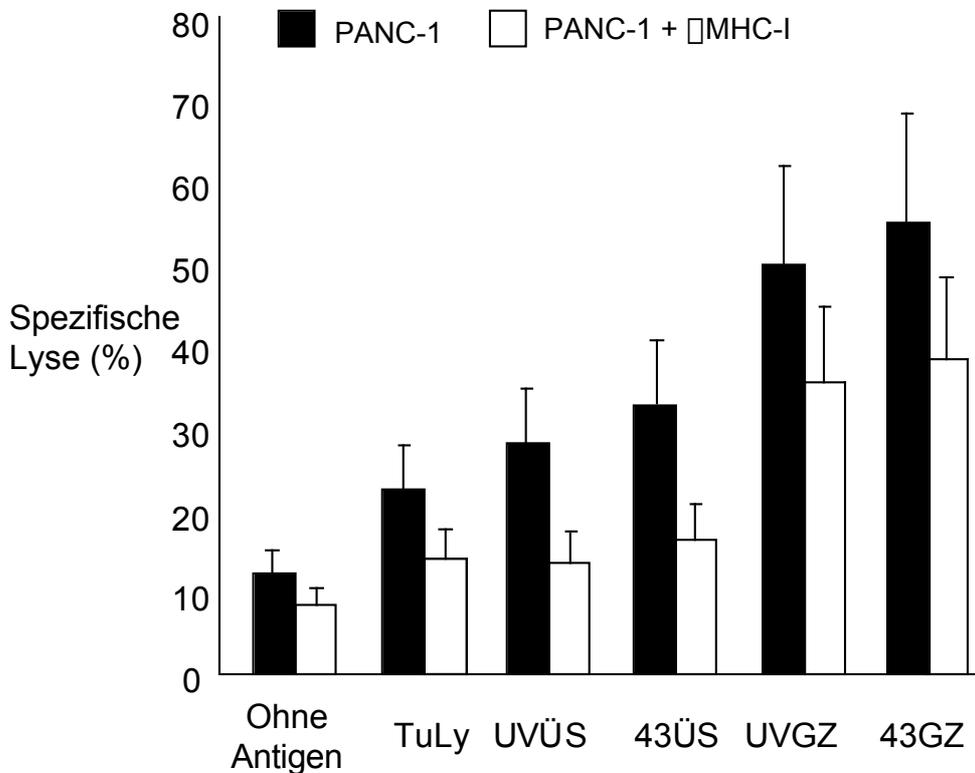


Abb.12: Lytische Aktivität generierter PBMC gegen *Panc-1* Tumorzellen

Die DC wurden mit Tumorzelllysate oder dem Überstand oder den ganzen Zellen der UV-bestrahlten bzw. hitzebehandelten *Panc-1* Tumorzelllinie gepulst, danach mit TNF- α und PGE₂ aktiviert und zur wöchentlichen Stimulation einer Kokultur mit autologen PBMC verwendet. Zwei Tage nach der 4. Stimulation wurde die lytische Aktivität gegenüber ⁵¹Cr-markierten *Panc-1* Tumorzellen im ⁵¹Cr-Lyse-Test bestimmt (gefüllte Balken). Das Ausmaß der MHC-I-Restriktion der generierten Immunantwort wurde nach Präinkubation der *Panc-1 targets* mit dem MHC-I-Blockierendem Antikörper W6/32 bestimmt (leere Balken). Gezeigt sind jeweils Werte für ein E/T Verhältnis von 80:1. Mittelwerte und SEM aus sechs unabhängigen Experimenten. (n=6)

3.2.4 Lyse der Magenkarzinomzelllinie ***Kato-III***

Beide Ansätze, bei denen die DC mit ganzen Tumorzellen gepulst worden waren zeigten deutliche lytische Aktivität gegenüber *Kato-III*. Die festgestellte Lyse war abhängig von der eingesetzten Effektorzellzahl und in ihrem Ausmaß

ähnlich der gegenüber *Panc-1*. In allen anderen Ansätzen (43ÜS, UVÜS, TuLy, ohne Antigen) lag die Zelllyse durchschnittlich unter 15% und war außerdem nicht titrierbar (Siehe Abb. 13).

3.2.5 Tumorzelllyse in Anwesenheit MHC-I-blockierender Antikörper

Bei einer Blockierung der MHC-I-Moleküle der relevanten Zielzelle kann eine spezifische CTL-Tumorzell-Interaktion und damit eine CTL-vermittelte Lyse verhindert werden, wohingegen eine unspezifische lytische Aktivität weitgehend unbeeinträchtigt bleiben sollte. Auch in diesem Versuch zeigte sich in denjenigen Ansätzen, die mit ganzen apoptotischen Tumorzellen gepulst worden waren eine deutliche Lyse nach MHC-I-Blockierung. Bemerkenswert war jedoch die Tatsache, dass auch in denjenigen Ansätzen, die gegenüber der Kontrollzelllinie *Kato-III* eine deutliche Aktivität gezeigt hatten, eine Abnahme dieser Aktivität durch die Zugabe MHC-I-blockierender Antikörper festzustellen war.

3.2.6 Lyse der NK-sensitiven Zelllinie **K562**

Um das Ausmaß der NK-Zell vermittelten Lyse zu verdeutlichen, wurde zusätzlich die lytische Aktivität gegenüber der NK-Zell-sensitiven Zelllinie *K562* ermittelt. Hier konnte wiederum in jenen Ansätzen, die mit ganzen Tumorzellen gepulst wurden, eine sehr hohe Zelllyse nachgewiesen werden, wohingegen in allen anderen Ansätzen nur eine geringe Lyse von durchschnittlich 10-15% gezeigt werden konnte (siehe Abb. 13).

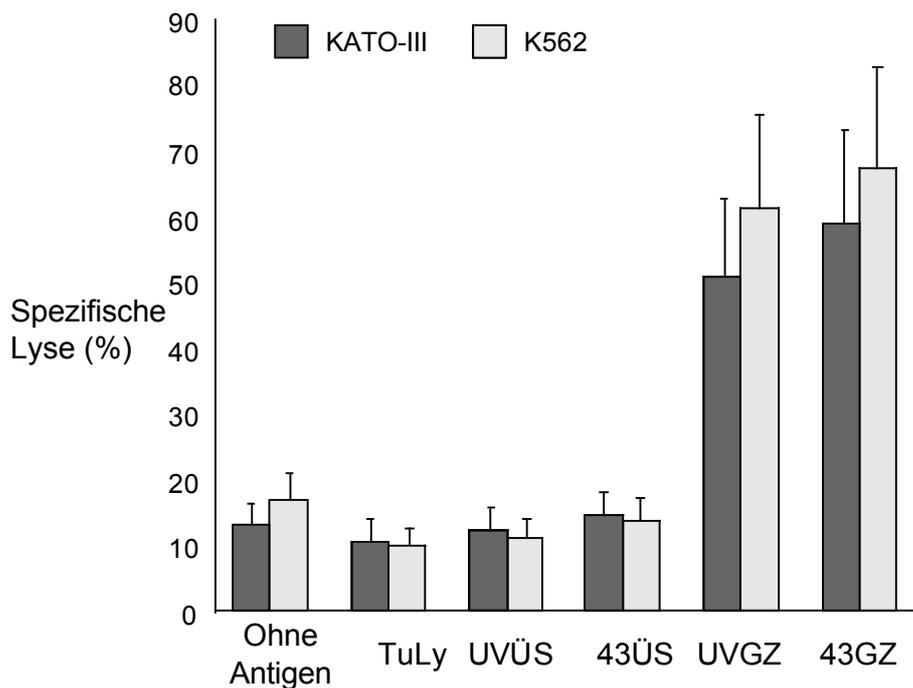


Abb.13: Lytische Aktivität von PBMC einer Kokultur mit ganzen Tumorzellen gegen K562 und Kato-III

Nach 4 wöchentlichen Stimulationen auf verschiedene Weise gepulsten DC, wurde die lytische Aktivität der PBMC gegenüber der NK-Zell-sensitiven Kontrollzelllinie *K562* sowie der Magenkarzinomzelllinie *Kato-III* im ^{51}Cr -Lyse Test bestimmt. Gezeigt sind jeweils Werte für ein E/T Verhältnis von 80:1. Mittelwerte und SEM aus sechs (*Kato-III*) bzw. fünf (*K562*) unabhängigen Experimenten.

3.2.7 Unterschiede des Aktivierungszustandes einzelner Zellpopulationen

Im Gegensatz zur globalen IFN- γ -Bestimmung mit Hilfe des ELISA, ist in der Durchflusszytometrie eine Messung der intrazellulären IFN- γ -Produktion auf Einzelzellebene möglich. Hierzu wurden die PBMC aus der Kokultur 24 h nach der letzten Stimulation mit DC mit Brefeldin A für 4 weitere Stunden inkubiert, um eine Zytokinfreisetzung zu verhindern. Es folgte eine Anfärbung der interessierenden Oberflächenmarker, Fixierung, Permeabilisierung und Färbung von intrazellulärem IFN- γ . Abb. 14 zeigt exemplarisch eine durchflusszytometrische Auswertung mit der Wahl der entsprechenden Gates.

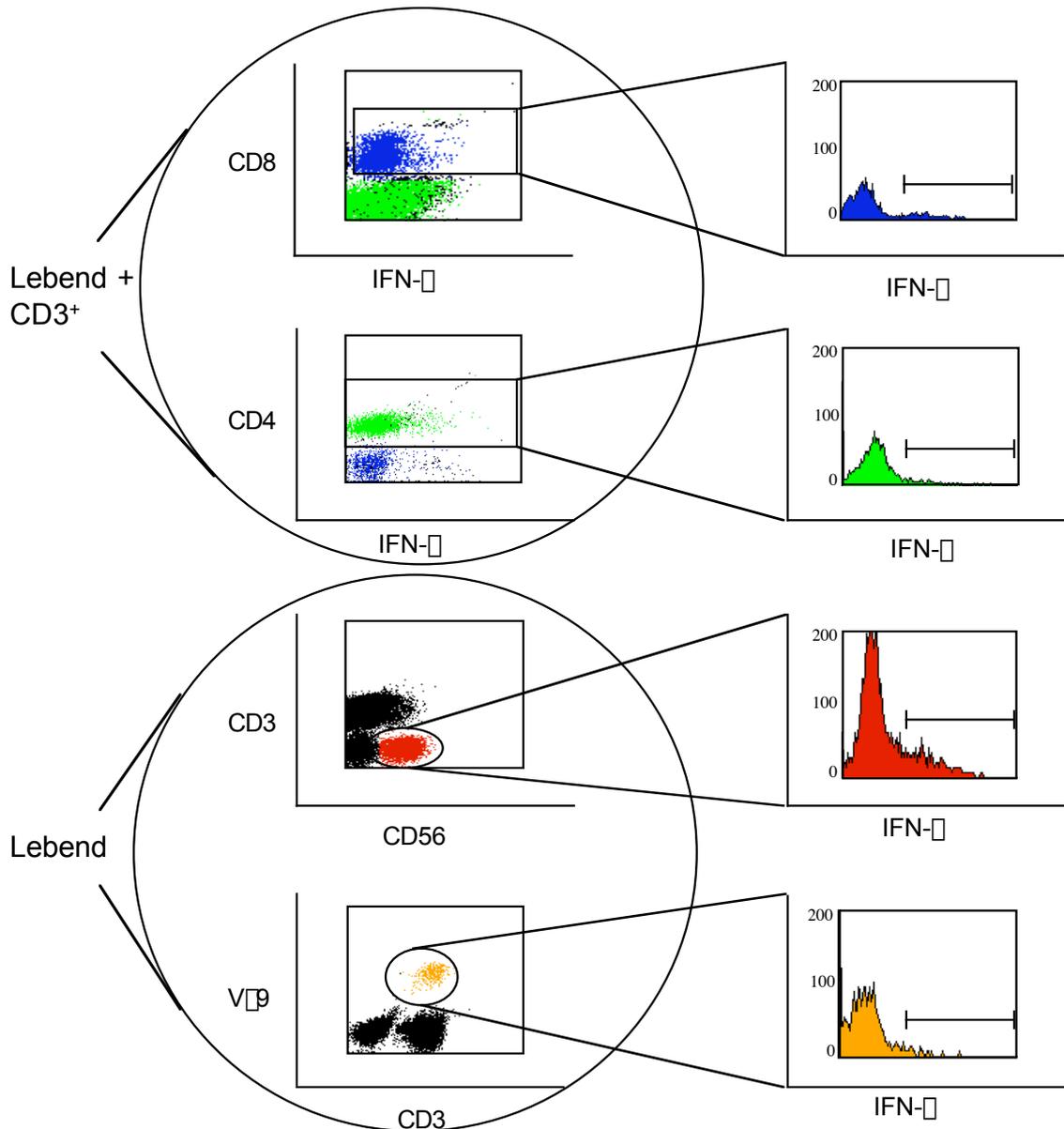


Abb.14: Auswahl von Subpopulation zur Bestimmung von intrazellulärem IFN- γ in der Durchflusszytometrie.

Dargestellt ist die FACS-Analyse der PBMC hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zellpopulation und deren IFN- γ -Produktion. Von links nach rechts: Aus der Gesamtpopulation der generierten PBMC werden in einem ersten Schritt, diejenigen Zellen herausgegriffen, die im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht als lebende Zellen eingestuft werden. Sollten T-Lymphozyten untersucht werden, wurde zusätzlich die Eigenschaft CD3⁺ in diese Grundausswahl mit einbezogen. Die intrazelluläre Fluoreszenzintensität für IFN- γ -spezifische Antikörper wurde dann in einer durch jeweils ein Antikörperpaar bestimmte Zellpopulation ermittelt.

Zytotoxische T Lymphozyten (CD3⁺ / CD8⁺)

Die Zellzahl IFN- γ -produzierender CTL konnte nach der dritten Restimulation in den Ansätzen „43GZ“ und „UVGZ“ von einem durch den Isotyp definierten Nullwert auf ca. 8% gesteigert werden. Eine nur unwesentlich geringere Induktion IFN- γ -produzierender CD8⁺ CTL konnte auch mit den Ansätzen „43ÜS“ und „UVÜS“ erzielt werden. Mit Tumorlysat „TuLy“ wurden ca. 4% CTL zur IFN- γ -Produktion veranlasst, wohingegen dies „ohne Antigen“ nur in 2% der Fall war. Eine signifikante ($p < 0,01$) Steigerung war bei der Wahl der Kondition „ohne Antigen“ als Bezugswert in allen Ansätzen nachweisbar (siehe Abb. 15).

T-Helferzellen (CD3⁺ / CD4⁺)

CD4⁺ T-Helferzellen zeichneten sich ebenfalls durch erhöhte IFN- γ -Produktion aus. Wiederum war diese in jenen Ansätzen, bei denen ganze Tumorzellen zur Pulsung der DC verwandt wurden, mit ca. 24% am ausgeprägtesten. Ansätze mit apoptotischen Körperchen generierten ca. 18% IFN- γ -positive T-Helferzellen, wohingegen bei Verwendung von Tumorzelllysate lediglich in 7% der Fälle IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden konnte. In der Kondition „Ohne Antigen“ zeigten nun 4% der Zellen intrazelluläre IFN- γ -Produktion (siehe Abb. 15).

Natürliche Killer Zellen (CD 3⁻ / CD56⁺)

Die intrazelluläre IFN- γ -Produktion in CD3⁻ / CD56⁺ NK-Zellen wurde im Verlauf der Kokultur als auch an ihrem Abschluß nach drei Restimulationen bestimmt. Es zeigte sich in den Ansätzen „43GZ“ und „UVGZ“ eine um den Faktor zehn höhere Zahl IFN- γ -produzierender NK-Zellen, während sich der Aktivierungszustand in allen anderen Konditionen auf gleich niedrigem Niveau bewegte (siehe Abb. 15). Bemerkenswerterweise entsprach der Gesamtanteil an NK-Zellen in den Ansätzen „43GZ“ und „UVGZ“ mit 2,5% in etwa dem der Ausgangspopulation, während die NK-Zellzahl in den übrigen Ansätzen im Verlauf der dreiwöchigen Kokultur auf 0,8-1,0% abgenommen hatte (Daten nicht gezeigt).

IFN- γ T-Zellen (CD3⁺ / V β 9⁺)

Nach dreiwöchiger Kokultur war in den Ansätzen „43GZ“ und „UVGZ“ eine deutliche Zunahme der Zahl IFN- γ -produzierender IFN- γ T-Zellen festzustellen (Siehe Abb. 15). Wie im Falle der NK-Zellen nahm im Verlauf der Kokultur die Zellzahl der Ausgangspopulation in jenen Ansätzen, in denen es zu keiner unspezifischen Immunantwort gekommen war auf etwa 1/5 der Ausgangspopulation ab (Daten nicht gezeigt).

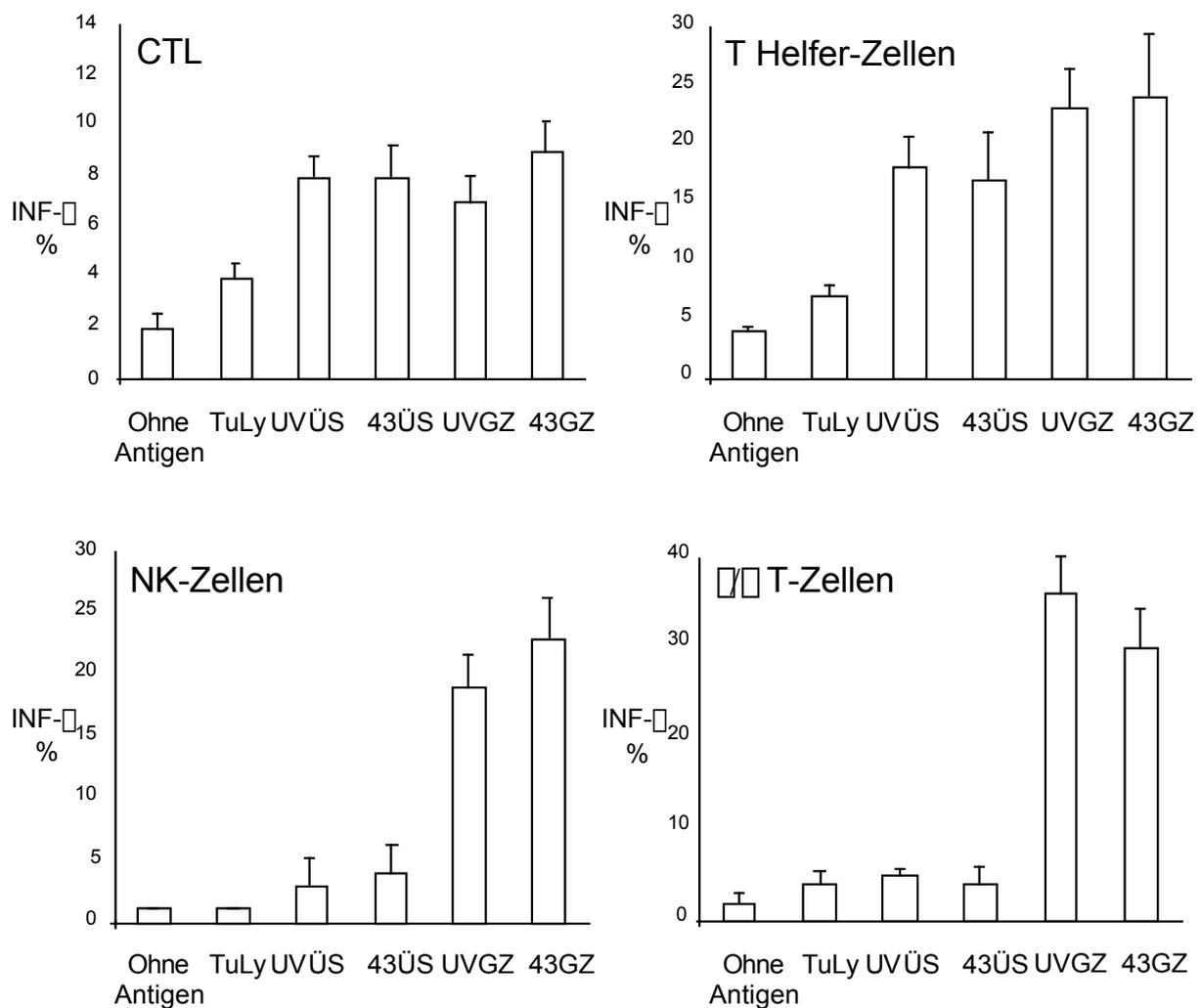


Abb.15: Aktivierungsmuster verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen nach der 3. Restimulation mit antigenbeladenen autologen DC. 12 h nach der 3. Restimulation wurden die PBMC mit Brefeldin A für 4 h inkubiert und anschließend in einer 4-Farben FACS Analyse (siehe Abb. 14) auf ihre intrazelluläre IFN- γ -Produktion hin bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte und SEM von 6 verschiedenen Spendern.

3.3 Einflussgrößen der NK-Zell-vermittelten Immunantwort

In jenen Kokulturbedingungen, in denen ganze Tumorzellen anwesend waren, konnten wir eine Aktivierung von NK-Zellen feststellen. Daher stellte sich die Frage, ob direkter Zellkontakt oder lösliche Mediatoren für diese Aktivierung notwendig war. Beide Einflussgrößen wurden in autologen 24-stündigen Kurzzeitkokulturen untersucht, wobei wiederum der intrazelluläre Nachweis von IFN- γ als Indikator der NK-Zell-Aktivierung bestimmt wurde.

Tab 2: Einfluss der Antigenpräparation und des Zytokinmilieus auf die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen

	UVGZ	TuLy	Ohne Antigen
DC	18,7% (+/- 4,2)	4,1% (+/- 0,9)	6,3% (+/- 1,2)
DC + γ IL12	4,3% (+/- 1,2)	3,0% (+/- 1,0)	2,9% (+/- 0,5)
DC+ γ IL-15	16,9% (+/- 12,3)	4,1% (+/- 2,5)	3,7% (+/- 2,3)
rh-IL-12	15,0% (+/- 3,9)	5,4% (+/- 1,3)	4,8% (+/- 1,3)
rh-IL-15	9,8% (+/- 4,6)	6,9% (+/- 2,2)	5,7% (+/- 2,5)

Isolierte NK-Zellen wurden mit DC für 48 h koinkubiert, die zuvor mit den in den Spalten angegebenen Antigenpräparationen gepulst worden waren. Zusätzlich wurden die Koinkubationsbedingungen während dieser 48 h in der in den Zeilen angegebenen Weise variiert. Die Kokultur wurde entweder ohne zusätzliche Zytokine (DC) oder mit Zytokin-blockierenden Antikörpern (γ IL-15; γ IL-12) versetzt. Bei alleiniger Zugabe der Antigenpräparation zu NK-Zellen –ohne DC– wurde der Kultur rekombinantes humanes Zytokin zugegeben (rh-IL-12; rh-IL-15). Angeben sind Mittelwerte aus 10 unabhängigen Experimenten. In Klammern +/- SEM.

3.3.1 Einfluss der Antigenaufbereitung

Eine Zunahme der Zellzahl IFN- γ -produzierender NK-Zellen ließ sich auch nach 24 h ausschließlich in denjenigen Ansätzen nachweisen, die ganze apoptotische Tumorzellen enthielten. Ungepulste oder aber mit Tumorzellysate gepulste DC, die zum *priming* der Lymphozyten verwandt wurden, erzeugten keine Erhöhung der Zellzahl IFN- γ -produzierender NK-Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Einfluss der Zytokine IL-12 und IL-15

Eine Möglichkeit der Einflussnahme dendritischer Zellen auf die Induktion einer NK-Zell-vermittelten Immunantwort besteht in der Schaffung eines Zytokinmilieus, das die Aktivierung von NK-Zellen fördert bzw. ermöglicht. Zwei mögliche Zytokine stellen IL-12 und IL-15 dar. Beide Zytokine wurden in der Kokultur mit gegen sie gerichteten monoklonalen Antikörpern, allein oder in Kombination, neutralisiert und der Effekt auf die intrazelluläre IFN- γ -Produktion in NK-Zellen bestimmt. In diesen Versuchen konnte eine Abhängigkeit der NK-Zell-Aktivierung in Anwesenheit apoptotischer Tumorzellen für IL-12 nachgewiesen werden. Bei Entzug von IL-12 durch Zugabe neutralisierender Antikörper konnte eine Hemmung der Anzahl IFN- γ -produzierender NK-Zellen bei Kokultur mit DC und apoptotischen Tumorzellen erzielt werden. Exogenes IL-12 konnte DC ersetzen, während IL-15 bzw. α IL-15 im Mittel keinen signifikanten Unterschied bewirkten.

3.3.3 Einfluss des direkten Zellkontaktes

In der *in vitro* Kultur kann durch Einfügen einer Nylonmembran mit einer Porengröße von 0,2 μ m der direkte Zellkontakt verhindert werden, wohingegen lösliche Mediatoren -wie zum Beispiel Zytokine- frei passieren können. Es entstehen so innerhalb einer Zellkulturschale zwei Kompartimente, in die einzelne Zellpopulationen eingebracht werden können. Zur Untersuchung des Einflusses eines direkten Zellkontaktes von Tumorzellen oder DC vs. von DC sezernierte Zytokine auf die Aktivierung von NK-Zellen wurden drei Bedingungen untersucht.

Im vorgestellten experimentellen Ansatz wurde direkter Zellkontakt lediglich zwischen zwei der drei Zellpopulationen zugelassen. Lediglich in den Kulturbedingungen, in denen ein direkter Zellkontakt zwischen NK-Zellen und Tumorzellen möglich war, konnten wir eine Aktivierung der NK-Zellen feststellen (siehe Abb. 16). Wenn keine DC in der Transwell-Kultur anwesend waren, zeigte sich auch keine Aktivierung der NK-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Daher stellte sich in einem nächsten Schritt die Frage ob dieser Effekt durch die Zugabe eines Zytokin-blockierenden Antikörpers zu jener Kulturbedingung, die Aktivierung gezeigt hatte, blockierbar war. Dies war für \square IL-12 der Fall, nicht jedoch für \square IL-15.

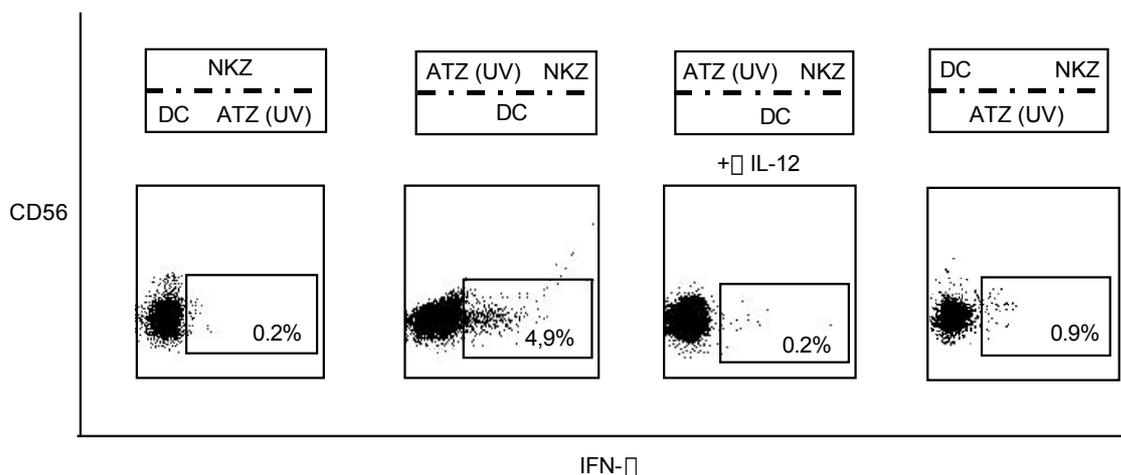


Abb.16: IFN- \square -Produktion von NK-Zellen in Abhängigkeit von direktem Zellkontakt mit apoptotischen Tumorzellen und Anwesenheit von IL-12

Aufgereinigte NK-Zellen (NKZ) wurden mit DC und durch UV-Bestrahlung apoptotischen *Panc-1* Tumorzellen (ATZ (UV)) in einem Transwell Kultursystem koinkubiert. Nach 48h Inkubation wurde der Aktivierungszustand der NK-Zellen mit Hilfe der intrazellulären Messung von IFN- \square bestimmt. Die jeweiligen Kulturbedingungen sind in den oberen Kästen grafisch aufgetragen. Der blockierende Antikörper \square IL-12 wurde einer Kulturbedingung während der Koinkubation zugegeben. Repräsentatives von 6 unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Beobachtungen von Albert et al. (Albert, Pearce et al. 1998; Albert, Sauter et al. 1998), die in ihren Experimenten nachweisen konnten, dass DC apoptotische Zellen phagozytieren, ihre Antigene prozessieren und vermehrt auf MHC-I-Molekülen präsentieren und damit eine CTL-Antwort induzieren.

In dieser Arbeit sollte daher überprüft werden, ob apoptotische Tumorzellen für die Entwicklung einer dendritischen Zellvakzine gegen das Pankreaskarzinom nutzbar gemacht werden können, und zu einer verstärkten Induktion einer gegen die Tumorzellen gerichteten CTL-Antwort führen. In einem halbautologen *in vitro* Modell wurden dazu aus Monozyten gesunder HLA-A2⁺ Spender DC generiert und charakterisiert. Diese wurden in unstimuliertem Zustand mit unterschiedlich aufbereitetem Antigen aus Tumorzellen der ebenfalls HLA-A2⁺ Pankreaskarzinomzelllinie *Panc-1* gepulst und die intrazelluläre Aufnahme des Tumormaterials nachgewiesen.

In einer anschließenden *in vitro* Kultur wurden die unterschiedlich beladenen DC auf ihre Fähigkeit getestet, eine *Panc-1*-spezifische Immunantwort zu induzieren. Verglichen wurden dabei auf Nekrose bzw. Apoptose basierende Tumormaterialaufbereitungen.

Apoptotisches Tumormaterial wurde durch Behandlung der Tumorzellen mit UV-B-Licht oder Hyperthermie gewonnen und entweder als Zellsuspension oder als zellfreier Überstand (apoptotische Körperchen) zur Pulsung der DC verwandt. Als Modell für nekrotisches Tumormaterial diente durch Frier-Tau-Zyklen gewonnenes Tumorzelllysate. Wurden DC mit Zelllysate oder apoptotischen Körperchen gepulst, zeigten autologe Lymphozyten nach drei Restimulationen eine deutliche spezifische Lyse

von *Panc-1* Zellen. Die durch eine Beladung mit apoptotischem Tumormaterial erzielte spezifische Lyse war dabei unter allen Versuchsbedingungen, die apoptotisches Tumormaterial zur Pulsung verwendeten, höher als bei Verwendung von Tumorzelllysate.

Diese lytische Aktivität war MHC-I-restringiert und korrelierte mit der IFN- γ -Sekretion von CTL. Wurden die DC dagegen mit ganzen UV- bzw. hitzebehandelten Tumorzellen gepulst, erzielten die Lymphozyten eine deutlich höhere *Panc-1*-Zelllyse. Diese lytische Aktivität war jedoch zum größeren Teil nicht MHC-I-restringiert und korrelierte mit einer Aktivierung von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen. Bedingung für die Aktivierung dieser unspezifischen Immunantwort war die Kombination von direktem Zellkontakt von NK-Zellen mit apoptotischen Tumorzellen und die gleichzeitige Anwesenheit von DC sezerniertem IL-12.

4.2 Beurteilung des *in-vitro*-Modells

4.2.1 Halbautologe Kokultur

Tumor-immunologisch betrachtet wirft die Lyse einer HLA-A2⁺ Tumorzelllinie durch die Zellen eines ebenfalls HLA-A2⁺ gesunden Spenders einige Fragen auf. Ist ein solcher experimenteller Ansatz, insbesondere die Verwendung von Blut eines gesunden Spenders, in der Lage, die Situation eines von Tumor und etwaiger therapeutischer Intervention veränderten Immunsystems adäquat abzubilden? Es gibt zahlreiche *in vivo* Daten, die belegen, dass Tumorgewebe durch verschiedene Mechanismen (z.B. Sekretion von IL-10, MHC-I-Verlust, Defekte in Apoptose Signal-Transduktionswegen) in der Lage ist, sich vor Angriffen des Immunsystems zu schützen (Caux, Favre et al. 1997; Ganss und Hanahan 1998; Gilboa 1999; Jaattela 1999; Algarra, Cabrera et al. 2000). Inwiefern eine über lange Zeit kultivierte Zelllinie noch über diese Schutzmechanismen verfügt, bleibt fraglich. Jedoch konnte für die

ursprünglich isolierte *Panc-1* Tumorzelllinie die maligne Potenz auch *in vivo* gezeigt werden (Lieber, Mazzetta et al. 1975).

Die PBMC der Kokultur und die Tumorzellen stimmen zwar in ihren HLA-A2-Molekülen überein, andere HLA-*loci* finden hingegen im verwendeten Modell keine Berücksichtigung. Die komplizierte Vorgehensweise, die eine Verwendung von Patientenblut und autologem Tumormaterial mit sich gebracht hätte, schien jedoch im Rahmen der hier beschriebenen Fragestellung nicht angemessen. Die Generierung von Tumorzelllinien ist im Fall des Pankreaskarzinoms schwierig und nur in wenigen Fällen erfolgreich, wodurch vollautologe Systeme mit erheblichen experimentellen Risiken verbunden sind (Lieber, Mazzetta et al. 1975). Ein Modell, das in allen *major-histocompatibility-complexes* übereinstimmt, hätte daher eine fraglich höhere Aussagekraft *in vivo*, mit einem deutlich erhöhten Risiko des Scheiterns der Experimente erkaufte. Dies schien auch deswegen verzichtbar, da Unterschiede und nicht absolute Größen die Messwerte der vorliegenden Arbeit darstellten. Daher wurde die immunologische Reaktion von DC und Lymphozyten sowie der HLA-teilidentischen (HLA-A2⁺) Zelllinie *Panc-1* untersucht. HLA-A2 ist ein in der kaukasischen Bevölkerung mit etwa 30% häufiges Allel (Longmate, York et al. 2001).

Ein Problem dieses halbautologen Systems ist die Tatsache, dass etwa 30% aller T-Zellen zumindest schwach kreuzreaktiv im Bezug auf allogene HLA-Moleküle sind. Daher ist es möglich, dass ein Teil der beobachteten „tumorspezifischen“ Lyse der *Panc-1* Zellen über Bindung und Erkennung eines nicht übereinstimmenden HLA-Moleküls vermittelt sein könnte. Besonders in jenen Ansätzen, in denen ganze Tumorzellen mit ihrer antigenen Struktur auch in der Kokultur vorhanden waren, scheint ein solcher Mechanismus möglich. Sollte das betreffende fremde HLA-Molekül der MHC-Klasse I angehören so suggeriert die Kreuzreaktivität durch ihre MHC-I-Blockierbarkeit zusätzlich Spezifität.

Dieser Einwand wird durch die Überlegung gemildert, dass das betreffende, nicht übereinstimmende HLA-Molekül auf der Tumorzelle in Abwesenheit kostimulatorischer Moleküle präsentiert wird. Diese Präsentationsform sollte in der Phase des T-Zell-*primings* eher zu Deletion als zur Proliferation der T-Zelle Anlass geben (Inaba, Turley et al. 1998). Im Fall der Restimulation ist eine Aktivierung bereits geprimter kreuzreaktiver T-Zell-Klone durch ganze Tumorzellen allerdings denkbar. Zusätzlich sind die nicht übereinstimmenden HLA B- und C- *loci* möglicherweise an der festgestellten Aktivierung von NK-Zellen beteiligt. Mögliche Mechanismen werden in Abschnitt 4.3.3 näher erläutert.

4.2.2 Charakterisierung der dendritischen Zellen

DC sind als einzige Zellen des Immunsystems in der Lage, eine primäre, spezifische Immunantwort *de novo* zu induzieren und in der Folge davon ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen (Banchereau, Briere et al. 2000).

Die möglichst genaue Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten DC stellt also eine wichtige Voraussetzung für die daran anknüpfenden Experimente dar. Diese erlauben nur dann Aussagen über eine durch DC induzierte Immunantwort, wenn die Antigen-präsentierenden Zellen eindeutig als DC zu bestimmen sind.

Die Zellen, die durch eine 5-tägige Kultur von Monozyten in Anwesenheit von 500 IU/ ml IL-4 und 1000 IU/ ml GM-CSF generiert wurden, zeigten die für DC typischen Merkmale (Romani, Gruner et al. 1994; Sallusto und Lanzavecchia 1994). Als Charakteristika dendritischer Zellen gelten der Verlust des hochaffinen LPS-Rezeptors CD14, der charakteristisch für Monozyten bzw. Makrophagen ist, die deutliche Expression kostimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD80 und CD86 (Koulova, Clark et al. 1991; Azuma, Yssel et al. 1993), eine große endozytotische Aktivität (Sallusto, Cella et al. 1995) sowie der morphologische Aspekt von großen

granulären Zellen mit langen Zytoplasmaausläufern (Steinman und Cohn 1973). Dies wurde von den in dieser Arbeit generierten DC erfüllt.

Die so generierten unreifen DC benötigen zur vollen Funktion als Antigen-präsentierende Zellen einen Reifestimulus (Steinman, Inaba et al. 1999). *In vivo* ist die Reifung der DC ein kontinuierlicher Prozess, der im peripheren Gewebe vermittelt durch Antigenaufnahme und/oder Entzündungsmediatoren eingeleitet wird und in der Interaktion mit T-Zellen im Lymphknoten seinen Abschluß findet (Bai, Beckhove et al. 2003). Diesen Prozess galt es *in vitro* zu imitieren. Aus der großen Anzahl möglicher Reifeinduktoren kommen mikrobielle Stimuli (z.B. LPS, doppelsträngige RNS, CpG-Nukleotide, Bakterien), Entzündungsmediatoren (z.B. TNF- α , PGE₂, IL-1 α , IL-6, ATP) oder T-Zell-Signale (CD40L, TRANCE) in Frage (Übersicht in (Banchereau, Briere et al. 2000)).

Es wurde die Kombination aus TNF- α und PGE₂ als Reifestimulation verwendet, da dieser Stimulus sich in Vorversuchen bezüglich der generierten IL-12 Menge und in der Aktivierung von allogenen Lymphozyten gegenüber den anderen getesteten Reifestimuli als überlegen erwiesen hatte. Andere Experimente unserer Arbeitsgruppe verwendeten ebenfalls TNF- α und PGE₂, so dass damit ein Vergleich der generierten Daten möglich wurde (Schnurr, Galambos et al. 2001). Auch andere Arbeitsgruppen konnten die Wirksamkeit der Kombination aus TNF- α und PGE₂ auf Reifeinduktion, aber auch auf die, für eine Th1-Immunantwort entscheidende, IL-12-Sekretion nachweisen (Jonuleit, Kuhn et al. 1997; Rieser, Bock et al. 1997). Obwohl bei der Verwendung von LPS eine noch höhere Expression von Reifemarkern erzielt werden konnte, wurde dieser Reifestimulus im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit nicht verwandt.

Während der Durchführung dieser Versuche mehrten sich jedoch Hinweise, die PGE₂ eine nicht unbedeutende Rolle bei der Polarisation einer Immunantwort in Richtung Th2 zuschrieben. Zum einen sei das

sezernierte IL-12 zu großen Teilen IL-12 (p40), dem dimerisiert Th1-inhibitorische Potenz zugeschrieben wird. Zum anderen führe IL-12 (p40) zur Sekretion von IL-10, einem Th2-Zytokin (Kalinski, Schuitemaker et al. 1998). Die Arbeitsgruppe um E. Maraskovsky konnte jedoch *in vivo* im murinen Modell zeigen, dass durch PGE₂ die Migration von Monozyten-abgeleiteten DC in regionäre Lymphknoten via cAMP/Protein-Kinase A ermöglicht wird (Luft, Jefford et al. 2002). Die so generierten ausgereiften monozyten-abgeleiteten DC entsprechen damit in ihren Charakteristika CD1c⁺ DC des peripheren Blutes (i.e.: hohe migratorische Potenz, geringe IL-12 (p70)-Produktion und IL-2-Induktion durch T-Helferzellen). Diese Befunde wurden auch *in vitro* mit humanen Zellen als auch bei Krebspatienten in einem vortgeschrittenen Stadium ihrer Erkrankung bestätigt (Sato, Takayama et al. 2003).

Festzuhalten bleibt, dass die Reifestimulation sicher eine der entscheidenden Determinanten einer DC-Vakzine darstellt. Daher wurde ein großer Teil der Vorarbeiten in dieser Richtung unternommen. Da jedoch in diesem Punkt die Bedingungen in allen Ansätzen gleich gewählt wurden, sind auf die ermittelten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen keine Auswirkungen zu erwarten.

Als Zeichen der Reife wurde die beschriebene Neoexpression des Oberflächenmoleküls CD83 betrachtet (Zhou und Tedder 1995). Die Verwendung der Kombination von TNF- α und PGE₂ als Reifestimulus führte zu einer CD83⁺ Population. Desweiteren konnte eine erhöhte Expression kostimulatorischer sowie MHC-I- und MHC-II-Moleküle durchflusszytometrisch bestimmt werden sowie ein nahezu vollständiger Verlust der phagozytotischen Aktivität. Dies ist in Übereinstimmung mit den für ausgereifte DC geforderten Kriterien (Steinman, Pack et al. 1997; De Saint Vis, Fugier et al. 1998).

Zahlreiche Publikationen unterstreichen sowohl die Relevanz der DC-Ausreifung *in vivo* als auch die Bedeutung des verwendeten Markers

CD83. Bei 9 gesunden Probanden war eine einmalige Injektion ausgereifter DC in der Lage eine langanhaltende Immunität gegen ein Neoantigen zu verursachen, wohingegen nicht ausgereifte DC eine T-Zell Toleranz gegen das betreffende Neoantigen zur Folge hatten (Dhodapkar, Steinman et al. 1999). Bei 130 Brustkrebs Patientinnen konnte die Expression von CD83 auf Tumor-infiltrierenden DC als unabhängiger und für das Überleben prognostischer Faktor beschrieben werden (Iwamoto, Shinohara et al. 2003).

4.2.3 Gewinnung von Tumorantigenen

In den vorliegenden Experimenten wurde versucht, in einem *in vitro* Modell Aussagen über eine DC-vermittelte Immunantwort in Abhängigkeit verschiedener Antigenpräparationen zu treffen. Die Art und Weise, wie Tumorzellen vom Immunsystem erkannt werden, scheint dem in 1.2.8 beschriebenen „Gefahr-Modell“ zufolge, die darauf folgende Immunantwort entscheidend zu beeinflussen (Matzinger 1994; Gallucci, Lolkema et al. 1999). Die Immunogenität eines Tumors hängt wesentlich davon ab, in welchem Kontext und in welcher Form seine Antigene für das Immunsystem in Erscheinung treten. Eine grundsätzliche Unterscheidung besteht in der immunologischen Reaktion auf apoptotisches und nekrotisches Zellmaterial (Sauter, Albert et al. 2000).

Der nekrotische Zelltod führt durch die Freisetzung von Gefahrensignalen zur Induktion einer Immunantwort, wohingegen der apoptotische Untergang einer Zelle in Abwesenheit zusätzlicher Gefahrensignale zur immunologischen Toleranz gegenüber den betreffenden antigenen Strukturen führt (Steinman, Turley et al. 2000). Als Modell für nekrotischen Zelltod wurde die Zellmembran der Tumorzellen durch Kristallbildung in wiederholten Frier-Tau-Zyklen gesprengt und die Zellen damit lysiert. Als Modell für apoptotischen Zelltod wurde die Bestrahlung mit UV-Licht und die Behandlung mit 43°C angewendet.

Im Prozess der Apoptoseinduktion wurde bewußt auf die Verwendung von EDTA oder Trypsin zum Ablösen der adhärenen Zelllinie *Panc-1* verzichtet und diese stattdessen auf einem Rotationstisch im Brutschrank inkubiert. EDTA komplexiert Ca^{++} und greift damit in diverse intrazelluläre Signalwege (auch die des Apoptoseprozesses) ein, die Protease Trypsin verändert die Oberflächen-struktur der Zellen, indem sie Oberflächenproteine (unter anderem auch Zelladhäsionsmoleküle) spaltet. Beides galt es zu vermeiden. Denn zum einen sollte in den Prozess der Apoptoseinduktion nicht eingegriffen werden, und zum anderen scheint die Expression eines bestimmten Musters an Oberflächenmolekülen, wie z.B. membranständiger Hitze-Schock-Proteine wie hsp-70 für die immunologische Antwort von entscheidender Bedeutung zu sein (Todryk, Melcher et al. 1999).

UV-Bestrahlung stellt neben der Verwendung von Chemotherapeutika ein gängiges experimentelles Verfahren um Apoptose zu induzieren (Casciola-Rosen und Rosen 1997). Attraktiv war für unsere Experimente dabei vor allem, dass eine etwaige Übertragung von Chemotherapeutika in die Langzeitkokultur entfiel.

Im Gegensatz zur UV-Bestrahlung stellt die Hitzebehandlung ein *in vitro* selten angewendetes Verfahren dar. Hyperthermie als Mittel der Apoptoseinduktion wurde aus zwei Gründen zusätzlich zur gängigen Behandlung mit UV-Licht gewählt. Die Hyperthermiebehandlung stellt ein in klinischer Erprobung befindliches neues Verfahren auch für die Behandlung des Pankreaskarzinoms dar (Falk und Issels 2001). Aus immunologischer Sicht interessant ist die Tatsache, dass für die Hyperthermie die Neoexpression der induzierbaren Formen des hsp70 Hitze-Schock-Proteins (hsp72 bzw. hsc73) auf Tumorzellen beschrieben ist (Multhoff, Botzler et al. 1995; Multhoff 1997). Vielfältige immunologische Effekte verknüpfen sich mit diesem Protein. Für hsp70 ist, wie für andere Hitze-Schock-Proteine auch, die Möglichkeit beschrieben, dass an sie gebundenes Peptid auf MHC-I übertragen

werden kann. Als besondere Eigenschaft dieses Hitze-Schock-Proteins tritt hsp70 im Rahmen von Zellstress vornehmlich membranständig auf. Dort dient es als Erkennungsmolekül sowohl für die CD3⁻ NK-Zellen als auch die CD3⁺ T-Zellen und führt zu deren Aktivierung (Haas, Pereira et al. 1993; Multhoff, Mizzen et al. 1999). Zusätzlich konnte von Todryk und Mitarbeitern gezeigt werden, dass die Induktion von hsp70 in murinen Tumoren die Infiltration des Tumors mit T-Zellen, Makrophagen und vor allem DC sowie ein, innerhalb des Tumors gemessenes, Th1-Zytokinprofil (TNF- α , IL-12, IFN- γ) nach sich zieht (Todryk, Melcher et al. 1999). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass besonders hsp70 und das an dieses Protein gebundene Peptid von DC kreuzpräsentiert wird (Noessner, Gastpar et al. 2002).

Feng und Mitarbeiter unterstützen in einer kürzlich veröffentlichten Serie von Publikationen die hier vorgestellten Daten (Feng, Zeng et al. 2001). Sie konnten zeigen, dass sich murine hitzebehandelte apoptotische Leukämiezellen als Antigenquelle für DC in besonderem Maße eignen, da sie hsp72 und hsp60 exprimieren. Die so generierte Immunantwort war antigenspezifisch, Th-1 gerichtet, langanhaltend und tumorprotektiv. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Membranexpression von hsp72 und hsp60 an sich zu einer Ausreifung der DC führte (Feng, Zeng et al. 2002; Feng, Zeng et al. 2003). Der von uns verwendete Reifestimulus könnte demnach ergänzt worden sein durch die Reifestimulation durch das Antigen selbst.

Die Verwendung des Überstandes einer mit Hitze oder UV-Licht vorbehandelten Tumorzellkultur gründete sich auf die Annahme, dass in diesem Überstand Tumormaterial in Form von Exosomen bzw. apoptotischen Körperchen zu finden sein sollte. Exosomen und apoptotische Körperchen sind membran-umschlossene Vesikel, die konstitutiv bzw. apoptoseinduziert von maligne veränderten Zellen abgestoßen werden und für deren Antigene nach Aufnahme in DC eine präferentielle Präsentation über MHC-I postuliert wird. Mit dieser

Antigenquelle konnten *in vitro* und in präklinischen Versuchen *in vivo* messbare Tumor-Immunantworten induziert werden (Andre, Andersen et al. 2001; Wolfers, Lozier et al. 2001).

In den Arbeiten von Thery et al. und Zitvogel et al. wurden Tumor-Exosomen molekularbiologisch charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass in den Exosomen, die durch Zentrifugation des zellfreien Überstands von Tumorzellen gewonnen wurden, das Hitzeschockprotein hsc73 in hoher Konzentration nachgewiesen werden konnte (Zitvogel, Regnault et al. 1998; Thery, Regnault et al. 1999). Der dort beschriebene Zentrifugationsschritt wurde an unsere Experimente adaptiert. Mit diesem einfachen Zentrifugationsschritt sollten Tumorbestandteile niedriger Dichte angereichert werden. In dieser Fraktion waren auch die oben erwähnten Exosomen, apoptotische Körperchen sowie Hitze-Schock-Proteine zu erwarten. Auf eine genauere Charakterisierung des durch die Zentrifugation erhaltenen Überstandes mußte verzichtet werden, da diese nicht den Fokus dieser Arbeit bildeten.

4.2.4 Tumorantigenaufnahme und -präsentation

Wie oben beschrieben, scheint die Vorbehandlung des Tumormaterials Auswirkungen auf den eingeschlagenen Präsentationsweg (MHC-I oder MHC-II) zu haben. Die intrazellulären Prozesse, die zur Degradierung des Antigens, zur Kopplung an MHC-I oder MHC-II und zur Präsentation auf der Oberfläche der DC führen, waren nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Alle diese intrazellulären Verarbeitungsprozesse haben jedoch als gemeinsame Voraussetzung die intrazelluläre Aufnahme des Antigens (Übersicht in (Rock und Goldberg 1999)). Daher wurde größtmöglicher Wert auf den Nachweis der intrazellulären Aufnahme des Tumormaterials gelegt.

Mit dem Nachweis phagozytotischer Aktivität war zudem eine weitere indirekte Charakterisierung der generierten DC möglich. Die Aufnahme von größeren nekrotischen oder apoptotischen Zellfragmenten in DC stellt

einen über die Rezeptoren CD36 und $\alpha\mu_3$ oder $\alpha\mu_5$ vermittelten Prozess dar (Rubartelli, Poggi et al. 1997). Nachdem die Endozytose von FITC-Dextran in DC bereits nachgewiesen wurde, bildete daher die Phagozytose von Tumorzellfragmenten einen Hinweis auf die Funktionalität der CD36 und $\alpha\mu_3$ oder $\alpha\mu_5$ rezeptorvermittelten Aufnahme in die von uns generierten DC.

4.2.5 Parameter der Immunantwort

Ein Ziel dieser Arbeit war es durch Vorbehandlung der Tumorzellen eine Einschleusung des antigenen Materials in den MHC-I-Prozessierungsmechanismus und damit eine Steigerung der CTL-vermittelten Immunantwort herbeizuführen. Diesen, als Kreuzpriming bezeichneten, Effekt galt es zu beurteilen. In Ermangelung definierter tumorspezifischer Antigene konnten Verfahren wie z.B Tetramerfärbung zum Nachweis peptid-spezifischer CTL-Klone nicht zur Anwendung gebracht werden. So dienten andere phänotypische und funktionelle Parameter der Lymphozyten gegenüber der zur Pulsung verwandten Tumorzelllinie als Endpunkte der Experimente.

Die Messung der intrazellulären IFN- γ -Produktion diente zum einen als Verlaufskontrolle im Rahmen der wöchentlichen Restimulationen. Zum anderen konnte mit diesem Verfahren, parallel zum ^{51}Cr -Lyse Test, die gemessene lytische Aktivität der Aktivierung einzelner Zellpopulationen zugeordnet werden. Die gemessene Lyse korrelierte dabei mit der durch die IFN- γ -Produktion repräsentierten Funktionalität aktivierter T-Zellen. Durch die zusätzliche Verwendung MHC-I-blockierender Antikörper ließ sich zudem indirekt der Anteil der CTL-vermittelten Lyse funktional bestimmen. Die Einführung der Kontrollzelllinien *Kato-III* sowie *K562* erbrachten Hinweise auf eine unspezifische Immunantwort und auf deren NK-Zell Vermittlung.

Die Messung der Gesamtkonzentration an IFN- γ , IL-4 und IL-10 im Überstand der Kokultur wurde als zusätzlicher Globalparameter für die Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th1 vs. Th2 eingeführt.

4.3 Immunologische Reaktionsmuster

4.3.1 Überstand apoptotischer Tumorzellen als Antigenquelle

Bei der Verwendung des Überstands apoptotischer Tumorzellen als Antigenquelle lag die IFN- γ -Konzentration im Überstand in einem Bereich von 1–3 ng/ml und damit unter derjenigen, die in den Ansätzen festgestellt wurde, bei denen ganze Tumorzellen vorhanden waren. Die Lyse der relevanten Zelllinie *Panc-1* war deutlich geringer als in den Ansätzen 43GZ und UVGZ. Es konnte keine titrierbare Lyse der Kontrollzelllinien *Kato-III* und *K562* nachgewiesen werden. Die im Überstand gemessene hohe IFN- γ -Konzentration, bei gleichzeitig nicht vorhandenem Nachweis von IL-4 und IL-10, zeigte eine Th1-polarisierte Immunantwort.

Für die Induktion einer MHC-I-restringierten lytischen Aktivität erwies sich die Verwendung des Überstandes vorbehandelter Zellen gegenüber Tumorzelllysate als überlegen. Diese MHC-I-restringierte Lyse konnte mit Hilfe der intrazellulären IFN- γ -Messung auf die lytische Aktivität von CTL zurückgeführt werden. Bei der Verwendung von apoptotischem Zellmaterial, unabhängig vom verwendeten Verfahren der Apoptoseinduktion, konnte eine Steigerung der Prozentzahl IFN- γ -produzierender CTL um den Faktor 2 im Verhältnis zu Tumorzelllysate festgestellt werden. Auch der Prozentsatz IFN- γ -produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten war deutlich erhöht. Dies spricht für eine gesteigerte Antigenprozessierung sowohl über den MHC-I-Prozessierungsweg als auch über MHC-II.

Eine wesentliche Aktivierung unspezifischer Mechanismen war in den Bedingungen, die Tumorzelllysate oder zellfreien Überstände apoptotischer Tumorzellen als Antigenquelle verwendeten, nicht zu verzeichnen. Insbesondere zeigte sich in diesen Bedingungen keine intrazelluläre IFN- γ -Produktion in NK- und $\alpha\beta$ T-Zellen. Bei der Applikation apoptotischen Tumormaterials in Form des Überstandes vorbehandelter Tumorzellen bietet sich damit offensichtlich die Möglichkeit eine gesteigerte Aktivierung spezifischer Immuneffektormechanismen herbeizuführen, ohne eine gleichzeitige Aktivierung des unspezifischen Immunsystems. Diese Art der Antigenaufbereitung ist in der Charakteristik der initiierten Immunantwort damit Tumorzelllysate vergleichbar, erweist sich ihm dabei aber in der Quantität der Antwort als deutlich überlegen. Auch dieser Befund wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie *in vivo* bestätigt. Die Arbeitsgruppe um T. Greten konnte zeigen, dass lediglich apoptotische und nicht nekrotische Tumorzell-Aufbereitungen zu einer messbaren Immunantwort *in vivo* führen (Scheffer, Nave et al. 2003).

4.3.2 Vergleich Hyperthermie- gegenüber UV-Licht-induziert apoptotischen Tumorzellen als Antigenquelle

Hyperthermie und UV-Bestrahlung stellen in unseren Experimenten zwei beispielhaft ausgewählte Apoptoseinduktions-Verfahren dar, um festzustellen, ob die Art des Zellstress eine durch DC generierte Immunantwort beeinflussen könnte. In allen unseren Versuchen sehen wir keinen signifikanten Unterschied zwischen der Apoptoseinduktion durch UV-Licht und Hyperthermie. Ein solcher Vergleich zweier Apoptose-Induktionswege wurde unseres Wissens nach bislang in der Literatur nicht unternommen. Feng et al. beschreiben zwar eine Immunantwort lediglich bei Verwendung von hitzevorbehandelten im Gegensatz zu nichtvorbehandelten apoptotischen Tumorzellen (Feng, Zeng et al. 2002). In dieser Studie werden DC nach der Antigenaufnahme von hitzevorbehandelten bzw. unbehandelten apoptotischen Tumorzellen (i.e. „*stressed vs. nonstressed apoptotic tumor cells*“) nicht mehr reifestimuliert. Dies führt zu ausgereiften bzw. nicht ausgereiften DC. In

dieser Beobachtung, und nicht in der Art der Apoptoseinduktion, scheint der Grund für die unterschiedliche Immunogenität zu liegen.

4.3.3 Vergleich ganzer apoptotischer Tumorzellen gegenüber löslichem Antigen

Im Vergleich zu tumorzellfreien Ansätzen (TuLy, UVÜS, 43ÜS) konnte nach drei Restimulationen eine höhere lytische Aktivität der Lymphozyten immer dann nachgewiesen werden, wenn die Ansätze zusätzlich zu den gepulsten und ausgereiften DC ganze Tumorzellen enthielten (UVGZ und 43GZ). Dies korrelierte mit einer ebenfalls erhöhten IFN- γ -Konzentration im Überstand. Da gleichzeitig IL-4 und IL-10 im Überstand nicht nachweisbar war, konnte man von einer in hohem Maße Th1-polarisierten Immunantwort ausgehen.

Interessanterweise konnte die im Zytotoxizitäts-Assay nachgewiesene hohe Tumorzellyse in den tumorzellhaltigen Ansätzen nur zum Teil durch MHC-I-Blockierende Antikörper verringert werden. Jedoch wurde auch in diesen Ansätzen ein MHC-I-vermittelter und damit als spezifisch zu bezeichnender Anteil gemessen, der dem Anteil entsprach wie er auch bei der Verwendung von apoptotischen Körperchen zu verzeichnen war. Die gleichzeitig gemessene lytische Aktivität der Lymphozyten gegen die Kontrollzelllinien *Kato-III* und *K562* erbrachte starke Hinweise auf eine zusätzliche unspezifische Aktivierung insbesondere von NK-Zellen. Auf zellulärer Ebene zeigte sich eine sehr deutlich erhöhte intrazelluläre IFN- γ Produktion von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen. Zudem konnte eine im Vergleich zu den Ansätzen 43ÜS und UVÜS nochmals gesteigerte Aktivierung von CD4⁺ T- Zellen registriert werden, bei gleichzeitig ähnlich hoher CTL-Aktivierung.

Ein möglicher Grund für die so deutlich gesteigerte NK-Zell-Aktivität könnte in den in der Kokultur noch anwesenden ganzen Tumorzellen zu suchen sein. Z.B. kann der auf NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen zu findende NKG2D-DAP10-Rezeptor Komplex mit auf gestressten Tumorzellen exprimierten

Liganden wie MICA und Rae-1 interagieren und so zu einer Aktivierung der genannten Zellen beitragen (Diefenbach, Jensen et al. 2001). Bedenkt man die vielfältigen immunologischen Wirkungen von IFN- γ (Übersicht in (Farrar und Schreiber 1993)), so ergibt sich bei gleichzeitiger Betrachtung der mit 4-6 ng/ml sehr hohen und auch nach der dritten Restimulation noch steigerbaren IFN- γ -Konzentration, ein interessantes Gesamtbild.

Das von CTL und von NK-Zellen sezerniertes IFN- γ inhibiert die Proliferation von CD4⁺-Th2 Zellen, aktiviert weitere NK-Zellen und führt zusätzlich zu einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen in somatischen Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen. Eine deutliche Steigerung der IFN- γ -Produktion konnte bei T-Helferzellen beobachtet werden. Unter Umständen führt hier die höhere IFN- γ -Konzentration zu einer allgemein höheren MHC-Expression der Antigen-präsentierenden Zellen und damit zu einer höheren MHC-II-Präsentation, ohne dabei zusätzlich den MHC-I-Präsentationsweg zu begünstigen.

Auch hier bestätigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um T. Greten unsere Daten *in vivo*. Sie konnten immunhistochemisch zeigen, dass bei Injektion apoptotischer Tumorzellen eine starke Infiltration der Injektionsstelle mit CD4⁺-T Helferzellen und CTL zu verzeichnen war (Scheffer, Nave et al. 2003). Wohingegen bei Injektion nekrotischen Tumormaterials lediglich eine starke Makrophagen-Infiltration zu sehen war. Eine etwaige Aktivierung von NK- oder $\gamma\delta$ T-Zellen wurde in diesen Experimenten nicht untersucht. Auch Feng et al. gehen auf eine etwaige Aktivierung unspezifischer Mechanismen z.B. an der Vakzinierungsstelle nicht ein (Feng, Zeng et al. 2003). Park und Mitarbeiter unterstreichen in einer kürzlich veröffentlichten Studie deutlich die Bedeutung unspezifischer Immun-Effektormechanismen für eine erfolgreiche Tumorabstoßung im murinen B16-Melanom Modell (Park, Kyin et al. 2003). Um näher auf die Mediation der in unseren Versuchen festgestellten NK- und $\gamma\delta$ Zell-Aktivierung eingehen zu können, unternamen wir weitere Experimente.

4.3.4 Bedingungen der unspezifischen Immunantwort

Von Interesse waren die Mechanismen, die unter den Kokulturbedingungen von ganzen Tumorzellen, PBMC und DC, zusätzlich zu einer Aktivierung von NK- und $\gamma\gamma$ T-Zellen geführt hatten. Fraglich war insbesondere die Rolle der DC in dieser „Dreiecksbeziehung“.

Drei Möglichkeiten der Einflussnahme bestehen (siehe Abb. 17). DC können entweder direkt, über noch nicht geklärte Mechanismen (z.B. *licence to kill*-Theorie (Fernandez, Lozier et al. 1999)) oder aber indirekt, über die Sekretion von Zytokinen wie z.B. IL-12 und IL-15, Einfluss auf die Aktivierung von NK-Zellen nehmen. Es ist aber auch durchaus denkbar, dass DC, Initiatoren einer spezifischen Immunantwort, keinerlei Relevanz für eine NK-Zell-vermittelte Lyse haben und ein Mangel an *killer-inhibitor-receptors* (KIRs) für eine Aktivierung der NK-Zellen ausreicht (s.B. *missing self*-Theorie (Ljunggren und Karre 1990)).

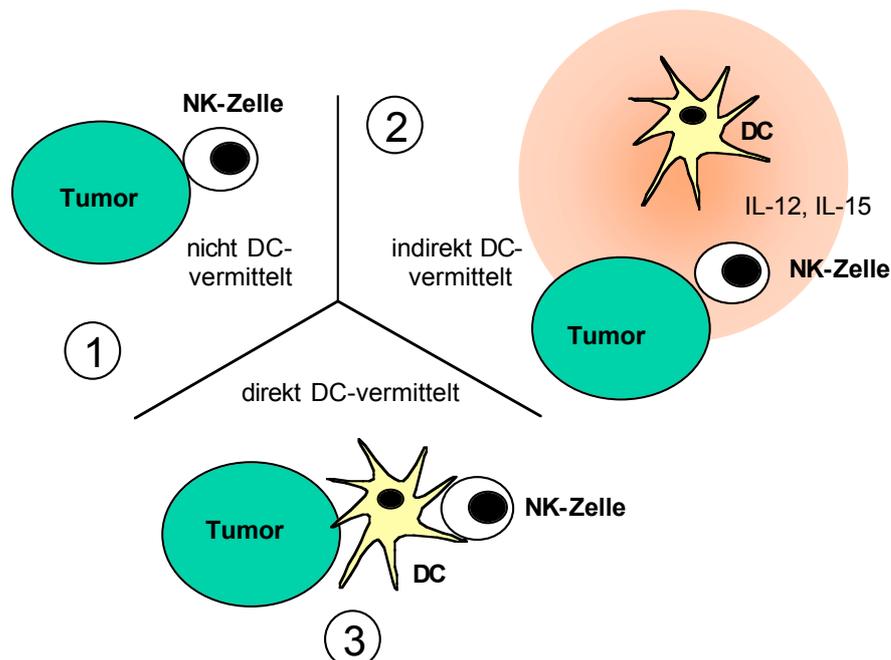


Abb.17: Möglichkeiten der Einflussnahme der DC auf die Induktion einer unspezifischen, NK-Zell vermittelten Immunantwort

(1) DC sind nicht notwendig für NK-Zell Aktivierung bei direktem Zellkontakt durch apoptotische Tumorzellen. (2) Die Sekretion von löslichen Faktoren (z.B. Zytokine) führt zur NK-Zell-Aktivierung (3) Erst der direkte Zellkontakt zwischen DC und NK-Zellen führt zu deren Aktivierung.

Direkte DC-vermittelte Beeinflussung

Einen direkt vermittelnden Effekt schreiben Fernandez et al. der DC bei der Aktivierung von NK-Zellen zu (Fernandez, Lozier et al. 1999). Diese Gruppe konnte im murinen Modell sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigen, dass die Anwesenheit von DC in Flt3-Ligand behandelten Mäusen ein notwendiger auslösender Faktor bei einer NK-Zell-abhängigen Tumor-Immunantwort ist. DC stellen in dieser Arbeit durch noch nicht näher bekannte Mechanismen NK-Zellen durch direkten Zellkontakt eine „Lizenz zum Töten“ aus. Eine Beteiligung der Zytokine IL-12 und IL-15 an der Interaktion zwischen DC und NK-Zellen konnte in diesem Modell ausgeschlossen werden.

Indirekt DC-vermittelte Beeinflussung

Die Sekretion von Zytokinen wie IL-12 und IL-15 stellt jedoch eine weitere in der Literatur vielfach belegte Möglichkeit dar, wie DC in die Interaktion zwischen Tumor und NK-Zelle eingreifen können. Von IL-12 ist bekannt, dass es die Aktivierungsschwelle der NK-Zelle um ein Vielfaches senkt (Geldhof, Moser et al. 1998; Geldhof, Moser et al. 1998). Auch von IL-15, das große Homologien mit IL-2 aufweist, gibt es derartige Daten. Hierbei scheint IL-15 in einer früheren Phase der NK-Zell-Aktivierung eine Rolle zu spielen, wohingegen IL-12 für eine endgültige Aktivierung sorgt (Liu, Perussia et al. 2000).

Nicht DC-vermittelte Beeinflussung

Zellschädigung, sei es durch virale Infektion oder durch subletale äußere Einflüsse, führt zur Expression stress-induzierter Moleküle, wie z.B. Hitze-Schock-Proteine und u.U. zur Verminderung der MHC-I-Expression. Die Neoexpression von NK- und CD28 T-Zell-Liganden, wie sie für „gestresste“ Tumorzellen beschrieben ist, führt zu einem NK-Zellen aktivierenden, rezeptorvermittelten Signal. Bei mangelnder Aktivierung von KIRs, einer Gruppe von NK-Zell-Rezeptoren, die Aktivierung verhindert, wird die lytische Maschinerie der NK-Zellen in Gang gesetzt, welche die geschädigten Zellen lysieren (Farag, Fehniger et al. 2002). In diesem

empirisch vielfach belegten Modell der NK-Zell-Aktivierung finden die Interaktionen ausschließlich zwischen vorbehandelter –und damit veränderter– Tumorzelle und NK-Zelle statt. Eine Vermittlung der DC wird nicht benötigt (Ljunggren und Karre 1990; Moretta, Bottino et al. 1996; Borrego, Ulbrecht et al. 1998).

Eigene Daten

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte der von Fernandez et al. beschriebene Einfluss des direkten Zellkontaktes zwischen DC und NK-Zellen nicht nachvollzogen werden. Bei Isolation der apoptotischen Tumorzellen unter Belassung des direkten Zellkontaktes zwischen DC und NK-Zellen konnte in den vorliegenden Experimenten kein NK-Zell aktivierender Effekt mehr festgestellt werden. Eine alleinige Koinkubation zwischen NK-Zellen und vorbehandelten Tumorzellen reichte jedoch ebenfalls nicht aus, um eine NK-Zell-Aktivierung herbeizuführen. Erst die Kombination von IL-12 und gleichzeitigem Zell-zu-Zell Kontakt mit apoptotischen Tumorzellen führte zu einer Aktivierung der NK-Zellen.

In unseren Experimenten war jedoch IL-12 nicht nur notwendige, sondern auch hinreichende Bedingung der gemessenen NK-Zell-Aktivierung. Durch Zugabe von rekombinantem IL-12 (p40/p70) konnte nämlich bei Kontakt zu apoptotischen Tumorzellen eine ebenso große NK-Zell-Aktivierung festgestellt werden wie in der Anwesenheit aktivierter DC. Die von DC produzierte Menge an IL-12, die mit TNF- α und PGE₂ erzielt werden konnte, wurde in unserem Labor mit durchschnittlich 2,5 ng/ ml bestimmt (Schnurr, Then et al. 2000). Daran angepasst wurde sowohl die Blockierung durch Antikörper als auch die Zugabe von rekombinantem IL-12 (p70).

Bei IL-15 zeigte sich ein sehr uneinheitliches Bild. In einigen Versuchen war eine Aktivierungshemmung durch die Zugabe von IL-15-blockierendem Antikörper durchaus zu verzeichnen. In anderen zeigte sich jedoch eine leichte zusätzliche Aktivierung. Insgesamt scheint der

große SEM einen nicht-signifikanten, spenderabhängigen Effekt von IL-15 in unserem Modell nahezu legen.

Eine Vermittlung des beobachteten Effektes durch andere indirekte Mechanismen innerhalb der Lymphozyten-Mischpopulation konnte durch Versuche mit aufgereinigten NK-Zellen ausgeschlossen werden.

Die in diesem Modell erhobenen Daten sprechen für eine vornehmlich IL-12-vermittelte Sensibilisierung von NK-Zellen, die diese in die Lage versetzt, die veränderte Zelloberfläche der vorbehandelten Tumorzellen zu erkennen und lytisch gegen die betreffende Zelle vorzugehen. DC haben damit in unseren Experimenten eine durch IL-12 indirekt vermittelnde Funktion.

Zusätzlich hat zur Aktivierung von NK-Zellen jedoch sicherlich auch die Tatsache beigetragen, dass in der halbautologen Kokultur lediglich auf die Übereinstimmung eines HLA-A *locus* geachtet wurde, wohingegen HLA-B und -C *loci* keine Berücksichtigung fanden. Jene HLA-B und -C-Moleküle stellen jedoch, im Gegensatz zu HLA-A, die für KIRs relevanten Liganden dar. Obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass Liganden, die NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren, durch Hitze und andere Formen des Zellstress vermehrt induzierbar sind, ist der von uns gesehene aktivierende Effekt demnach wohl zusätzlich auf eine *mismatch*-bedingte (dh. auf fehlender Übereinstimmung von HLA-Merkmalen beruhende) mangelnde Hemmung durch KIRs zurückzuführen (Kaur, Voss et al. 1993; Bakker, Phillips et al. 1998). In der humanen *in vivo* Situation einer Tumorstimulation mit autologem Tumormaterial könnte daher der Aktivierungszustand von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich geringer ausfallen. Neuere *in vivo* Daten zeigen jedoch auch im humanen, vollautologen Modell eine initiale unspezifische Immunantwort an der Stelle des Inokulats, die für eine nachfolgende spezifische Immunantwort unabdingbar zu sein scheint (Shingu, Helfritz et al. 2002).

4.4 Spezifische und unspezifische Effektoren in der Immuntherapie

In unseren *in vitro* Experimenten waren unterschiedliche Reaktionsmuster der einzelnen Lymphozytenpopulationen auf die verschiedenen Antigenpräparationen beobachtet worden. Im klinischen Kontext stellt die Anti-Tumor-Immunantwort, die durch eine DC-Tumorvakzine ausgelöst werden soll, ein Zusammenspiel einzelner zellulärer Effektoren dar. Welche Rolle die einzelnen Subpopulationen dabei spielen und wie ein mögliches Zusammenwirken beschaffen sein könnte, soll im folgenden kurz erläutert werden.

4.4.1 Tumor-immunologische Bedeutung der einzelnen Lymphozytensubpopulationen

NK-Zellen

Die intrazelluläre IFN- γ -Messung in NK-Zellen ergab eine Aktivierung in jenen Ansätzen, in denen ein direkter Zellkontakt mit ganzen vorbehandelten Tumorzellen möglich und zusätzlich IL-12 in ausreichender Menge vorhanden war. *In vivo* konnte für NK-Zellen oder die mit ihnen eng verwandten LAK Zellen (*lymphokine activated killer cells*), die unter der systemischen Gabe von IL-2 generiert wurden, eine therapeutische Wirkung gegenüber bestimmten Tumoren nachgewiesen werden (Brittenden, Heys et al. 1996). Eine NK-Zell-vermittelte Immunantwort an der Stelle des Tumors ist also durchaus wünschenswert. Vor allem wenn Tumore auf Grund maligner Mutationen keine MHC-I-Moleküle mehr exprimieren, könnten aktivierte NK-Zellen eine wirksame Antitumor-Aktivität entfalten (Algarra, Cabrera et al. 2000). Für eine intrakutane Vakzinierungsstrategie mit DC und vorbehandeltem autologen Tumorzellen könnte diese Tatsache von Bedeutung sein. In diesem Setting stellen aktivierte NK-Zellen apoptotisches Tumormaterial für lokale DC bereit und könnten daher eine spezifische Immunantwort

unterstützen. Gleichzeitig führt das von NK-Zellen sezernierte IFN- γ zu einer vermehrten Antigenpräsentation auf DC und einer Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th1. Beide Effekte könnten eine gegen Tumorgewebe gerichtete Immunreaktion effektiver gestalten.

CD4⁺ T-Zellen

Die in den Langzeitkokulturen nachgewiesene Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen könnte ebenso, wie die der NK-Zellen durch die auf gestressten Tumorzellen exprimierte Rezeptoren MIC und Rea-1 bedingt sein. Die Funktion von CD4⁺ T-Zellen ist weitgehend unbekannt. Trotzdem könnte die Bedeutung aktivierter CD4⁺ T-Zellen für eine effektive Tumor-Immunantwort vor allem in den von ihnen sezernierten Zytokinen und Chemokinen begründet sein. Versuche in „knock-out“ Mäusen, die CD4⁺ T-Zell defizient waren, legen jedenfalls eine unterstützende Funktion für eine CD4⁺ T-Zell getragene Immunantwort nahe (Moris, Rothenfusser et al. 1999).

CD4⁺ T-Zellen

Im Rahmen der hier dargestellten Versuche kommt den T-Helferzellen eine wichtige Rolle zu. Das breite Antigenpektrum von ganzem Tumorzellmaterial bedingt, dass auch T-Helferzellen passende MHC-II-Epitope vorfinden sollten. Dies scheint in den Versuchen nachvollziehbar zu sein. Die Unterstützung aktivierter T-Helferzellen durch Interaktion mit DC und Sekretion von Zytokinen stellt eine Bedingung für die effiziente Generierung tumorspezifischer CTL dar (Wang, Fu et al. 2002; Wang 2002). T-Helferzellen fördern weiterhin das Überleben von CTL *in vitro* und unterhalten eine effektive Immunantwort *in vivo*. Vor diesem Hintergrund ist die festgestellte Aktivitätssteigerung der T-Helferzellen für die gleichzeitig gesteigerte CTL-Aktivierung unter Umständen mitverantwortlich.

Die Anzahl IFN- γ -produzierender T-Helferzellen korrelierte mit der festgestellten IFN- γ -Konzentration im Überstand der Kokultur. Die Aktivierung von T-Helferzellen scheint somit bei der Verwendung

autologen Tumormaterials möglich, während dies bei definierten MHC-I-restringierten tumorspezifischen Peptiden nicht der Fall ist. Auf Grund der Bedeutung der T-Helferzellen für die Initiierung und Erhaltung einer effizienten Immunantwort könnte sich diese Beobachtung als vorteilhaft erweisen. Bei der Verwendung von tumorassoziierten Proteinen (z.B. MAGE; MART), die nach intrazellulärer Prozessierung ebenfalls als MHC-II-Epitope erscheinen sollten, wäre eine Aktivierung der T-Helferzell-Population ebenfalls zu erwarten. Für das Pankreaskarzinom sind jedoch bislang keine derartigen Proteine bekannt (Bennett, Carbone et al. 1997; Altfeld und Rosenberg 2000).

Auch für T-Helferzellen konnte *in vitro* lytische Aktivität nachgewiesen werden. Aktivierte T-Helferzellen könnten also auch in unserem System für einen Teil der als nicht MHC-I-restringiert und damit als unspezifisch klassifizierten Lyse verantwortlich sein (Yasukawa, Ohnami et al. 2000). In Kulturen von tumorinfiltrierenden T-Zellen konnte außerdem für T-Helferzellen gezeigt werden, dass diese spezifisch hsp70 auf der Oberfläche hitzebehandelter Tumorzellen erkennen und darauf sowohl mit der Produktion von IFN- γ als auch mit MHC-I-restringierter lytischer Aktivität reagieren (Yoshino, Goedegebuure et al. 1994). Auch auf Grund dieses letzten Aspektes könnte die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen bei der Anti-Tumor-Immuntherapie von großer Bedeutung sein.

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) stellen diejenige Zellpopulation dar, die für eine spezifische Tumorlyse und damit für den gewünschten immunologischen Effekt hauptsächlich verantwortlich ist. Eine spezifische Aktivierung von CTL stellt das Ziel des hier beschriebenen zellulären immuntherapeutischen Ansatzes dar. Vor diesem Hintergrund ist die in den vorliegenden Versuchen ermittelte Steigerung der Anzahl IFN- γ -produzierender CTL um den Faktor 2 im Vergleich zu Tumorzelllysate, bei der Verwendung von apoptotischem Tumormaterial

als Antigenquelle, zu sehen. Diese Steigerung stellt damit eines der zentralen Ergebnisse dieser Versuche dar.

Bemerkenswert ist, dass sowohl die Art der Apoptoseinduktion (Hitze oder UV-Bestrahlung) als auch die Form der Aufbereitung dieses Materials (ganze Zellen oder Überstand) für diesen Effekt unerheblich war.

Obwohl auf molekularer Ebene eine vermehrte Präsentation des phagozytierten apoptotischen Antigens auf MHC-I nicht nachgewiesen wurde, so legt die ermittelte Steigerung der Anzahl IFN- γ -produzierender CTL einen solchen Effekt doch nahe. Inwiefern dabei das veränderte Zytokinmilieu mit der z.B. stark erhöhten IFN- γ -Konzentration ebenfalls eine Rolle spielte, kann jedoch nicht endgültig beantwortet werden. Gegen eine herausragende Stellung des Zytokinmilieus spricht die Tatsache, dass zwischen denjenigen Ansätzen, die mit ganzen apoptotischen Zellen und jenen die mit deren zellfreiem Überstand gepulst waren, kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl IFN- γ -produzierender CTL festzustellen war, obwohl die ermittelte IFN- γ -Konzentration sich deutlich unterschied.

4.4.2 Modell für das Zusammenspiel angeborener und adaptiver Immuneffektoren

Bei der erfolgreichen immunologischen Bekämpfung eines Pathogens müssen angeborene und adaptive Immunantwort zusammenspielen und eng aufeinander abgestimmt sein. Diese Abstimmung muss sowohl räumlich als auch zeitlich erfolgen. DC scheinen dabei eine zentrale Rolle zu spielen (Kadowaki, Antonenko et al. 2000). Im Folgenden soll versucht werden, dieses Zusammenspiel modellhaft nachzuzeichnen und dabei insbesondere die Relevanz im Hinblick auf Anwendung und Wirkungsweise einer DC-Tumorvakzine zu erörtern.

Bei einer Vakzinierung mit zellhaltigem Tumormaterial, das z.B. subkutan injiziert wird, sind zunächst die Effektormechanismen der angeborenen Immunantwort mit dem Antigen konfrontiert. Eine gleichzeitige Injektion von DC könnte dann neben der Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort auch Effekte auf den angeborenen Arm des Immunsystems haben. Zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Differenzierung greifen DC in die Prozesse der angeborenen Immunität ein. Myeloide DC können die Aktivität von NK-Zellen lokal, z.B. durch die Sekretion von IL-12, positiv beeinflussen. Aktivierte NK-Zellen tragen ihrerseits zur DC-abhängigen Induktion einer spezifischen CTL-Immunantwort bei, da sie Tumormaterial durch die Induktion eines apoptotischen Prozesses in Tumorzellen zur Verfügung stellen. Dieses apoptotische Tumormaterial kann dann von DC phagozytiert und vornehmlich auf MHC-I präsentiert werden. Die Sekretion von IFN- γ führt zudem zu einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen auf DC und epithelialen Zellen (wie z.B. *Panc-1* Tumorzellen) sowie zusätzlich zu gesteigerter Antigenprozessierung über den MHC-I-Präsentationsweg. IFN- γ trägt im Zusammenspiel mit anderen Gefahrensignalen (z.B. von $\gamma\delta$ T-Zellen sezernierte Zytokine) zur Ausreifung der DC bei. Dies löst die charakteristischen morphologischen Veränderungen der DC aus, führt zu einer stabilen Kostimulation und Migration in regionäre Lymphknoten (durch z.B. Expression von CCR7). Diese Migration ermöglicht das *priming* spezifischer CTL im Lymphknoten.

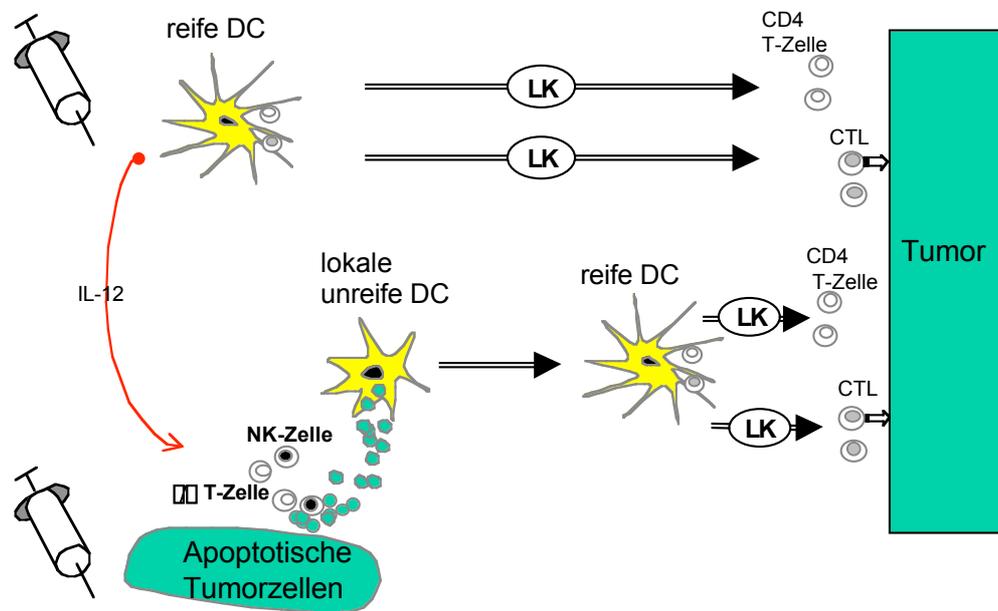


Abb.18: Modell eines Zusammenspiels spezifischer und unspezifischer Immuneffektormechanismen bei der Vakzinierung mit DC und apoptotischen Tumorzellen

Die gleichzeitige Gabe von Antigen-gepulsten und ausgereiften DC und abgetötetem bzw. apoptotischem Tumormaterial führt, nach Wanderung der DC in regionäre Lymphknoten (LK), zur Induktion einer spezifischen Immunantwort, vermittelt über CTL und CD4⁺ T-Helferzellen. Vermittelt durch IL-12 kommt es außerdem zu einer Aktivierung von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen am Ort der Vakzinierung. Diese verstärken über das Bereitstellen von apoptotischem Tumorantigen für lokale DC und durch die Sekretion von Zytokinen die spezifische Immunantwort.

4.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Die Daten der vorliegenden Experimente fügen sich in das skizzierte Modell ein. Bezogen auf die DC-abhängigen Immunisierungsstrategien maligner Tumore ergeben sich daraus einige Implikationen.

Es erscheint sinnvoll, im Rahmen von Vakzinierungsstrategien, die nicht auf definierte tumorspezifische Peptide zurückgreifen können, ganze Tumorzellen als Antigenquelle zu nutzen. Nur die Applikation abgetöteter ganzer Tumorzellen ermöglicht die Nutzung einer lokalen unspezifischen Immunantwort im Sinne einer immunogenen Vorbereitung des Tumormaterials an der Stelle der Vakzinierung. Wenn man einen intrakutanen Applikationsweg wählt, so verstärkt diese lokale unspezifische Immunantwort durch die zusätzliche Rekrutierung von DC der Haut die Monozyten-DC-initiierte spezifische Immunantwort.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Kombination aus dem aufwändigeren intranodalen Applikationsweg zur direkten Initiierung einer spezifischen Immunantwort mit der zusätzlichen intrakutanen Gabe von DC und ganzen Tumorzellen, um die im Lymphknoten initiierte Immunreaktion zu unterstützen.

Eine weitere Ausnutzung der physiologischen Prozesse könnte auch durch die lokale Applikation von GM-CSF an der Stelle der Vakzinierung mit gepulsten DC und ganzen Tumorzellen erfolgen. GM-CSF wäre dann in der Lage, an den Ort der unspezifischen Immunantwort, mit seiner hohen Konzentration an apoptotischem Tumormaterial und seinem immunogenen Zytokinmilieu, zusätzliche DC zu locken (Trinchieri 1995). Die systemische Gabe von Flt-3-Ligand würde zusätzlich die DC Precursorfrequenz erhöhen und seltene DC Subtypen wie plasmazytoide DC *in vivo* expandieren (Maraskovsky, Daro et al. 2000). Auch dies könnte zu einer Steigerung der spezifischen Immunreaktion führen. Die Applikation klinisch anwendbarer Adjuvantien wie z.B. CpG-

Oligonukleotide wäre eine weitere Möglichkeit, an der Stelle der Vakzine für ein immunogeneres Milieu und ein effizienteres T-Zell-*priming* zu sorgen (Krieg 2002).

Ein mögliches multimodales immuntherapeutisches Konzept könnte sich demnach folgendermaßen darstellen:

- a) Wenn möglich: Vorbehandlung des Tumors z.B. durch Hyperthermie
in vivo;
- b) Applikation einer Vakzine bestehend aus vorbehandelten und abgetöteten ganzen Tumorzellen und gepulsten DC intrakutan;
- c) Zusätzliche Gabe von GM-CSF und CpG an der Stelle der Vakzinierung;
- d) Evtl. systemische Gabe von Flt-3-Ligand.

Bei Betrachtung der bis heute veröffentlichten klinischen Studien zeigt sich eine bemerkenswerte Vielfalt an Verfahren und Modellvorstellungen, die ihnen zugrundeliegen. Von der Auswahl des Differenzierungsgrades der DC bis hin zu Fragen des Immunmonitorings herrscht Uneinigkeit. Die vorliegende Arbeit fügt dem an Details reichen Bild der Immuntherapie einen weiteren Mosaikstein hinzu. Es bleibt zu hoffen, dass sich die Immuntherapie maligner Tumore durch ein besseres Verständnis der physiologischen Zusammenhänge, durch Experimente *in vitro* und *in vivo* und durch sorgfältig geplante und durchgeführte klinische Studien als weitere Säule neben Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie im Kampf gegen Krebs etabliert und den Patienten zugute kommt.

5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen können in ihrer Eigenschaft als antigen-präsentierende Zellen adaptive Immunantworten induzieren. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass DC im Menschen eine durch zytotoxische T-Zellen getragene Anti-Tumor-Immunantwort induzieren können. Im Rahmen dieser klinischen Studien ist die Frage nach der wirksamsten Tumor-Antigen-Präparation noch unbeantwortet.

In der vorliegenden Arbeit wurden DC mit unterschiedlichen Antigenpräparationen der HLA-A2⁺ Pankreaskarzinom-Zelllinie *Panc-1* gepulst und hinsichtlich ihrer Kapazität verglichen, T-Zellen zu aktivieren. Unterschiedliche Antigenpräparationen aus apoptotischem Tumormaterial wurden mit nekrotischem Tumormaterial verglichen, da für phagozytiertes apoptotisches Zellmaterial eine Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen der DC beschrieben wird. Eine solche Kreuzpräsentation könnte, so war das Ziel, zu einer gesteigerten tumorspezifischen zellulären Immunantwort führen.

Apoptotisches Tumormaterial wurde durch die Behandlung der Tumorzellen mit UV-B-Licht oder Hyperthermie gewonnen und entweder als Zellsuspension oder als zellfreier Überstand (apoptotische Körperchen) zur Pulsung der DC verwandt. Als Modell für nekrotisches Tumormaterial diente durch Frier-Tau-Zyklen gewonnenes Tumorzelllysat. Monozyten-abgeleitete DC von HLA-A2⁺ Spendern wurden mit Tumorantigen gepulst, danach ausgereift und mit autologen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) kokultiviert. Nach drei Restimulationen im Abstand von jeweils einer Woche, wurde die T-Zell-Aktivierung mittels einer intrazellulären IFN- γ -Messung sowie Zytotoxizitätsassays bestimmt.

Im Vergleich mit Lysat induzierte das Pulsen der DC mit apoptotischen Tumorzellen eine höhere Frequenz aktivierter zytotoxischer T-Zellen und T-Helferzellen sowie eine größere MHC-I-restringierte Tumorzellyse. Es konnte dabei keine Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) oder $\gamma\delta$ Zellen festgestellt werden. Wurden die DC mit ganzen apoptotischen Tumorzellen gepulst zeigte sich eine noch ausgeprägtere Tumorzellyse. In diesem Fall jedoch konnte die lytische Aktivität nur zum Teil durch MHC-I-blockierende Antikörper unterbunden werden. Außerdem wurden die Kontrollzelllinien *Kato-III* und *K562* ebenfalls lysiert. Beides sind Hinweise auf eine Beteiligung von NK-Zellen an der Tumorzellyse. In der Tat konnten intrazelluläre IFN- γ -Färbungen neben einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen auch eine Aktivierung von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen. Transwell-Kultivierungsexperimente erbrachten daraufhin den Nachweis, dass die festgestellte NK-Zell-Aktivierung abhängig war von direktem Zell-zu-Zell Kontakt mit Tumorzellen und gleichzeitiger Anwesenheit von DC-produziertem IL-12.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wahl der Antigenpräparation eine entscheidende Determinante in der therapeutischen Initiation einer Anti-Tumor-Immunantwort ist. Anti-Tumor-Vakzine, die aus DC und apoptotischen Tumorzellen bestehen, könnten *in vivo* sowohl Effektorzellen des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems aktivieren.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlgren, J. D. (1996). "Chemotherapy for pancreatic carcinoma." Cancer. 234(3): 234-237
- Akiyama, Y., K. Maruyama, et al. (2002). "Antitumor effects induced by dendritic cell-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters." Cancer Lett 184(1): 37-47.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med 188(7): 1359-68.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." Nature 392(6671): 86-9.
- Algarra, I., T. Cabrera, et al. (2000). "The HLA crossroad in tumor immunology." Hum Immunol 61(1): 65-73.
- Altfeld, M. und E. S. Rosenberg (2000). "The role of CD4(+) T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1." Curr Opin Immunol 12(4): 375-80.
- Anderson, C. C. und P. Matzinger (2000). "Danger: the view from the bottom of the cliff." Semin Immunol 12(3): 231-8.
- Andre, F., M. Andersen, et al. (2001). "Exosomes in cancer immunotherapy: preclinical data." Adv Exp Med Biol 495: 349-54.
- Arnold, D., S. Faath, et al. (1995). "Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96." J Exp Med 182(3): 885-9.
- Azuma, M., H. Yssel, et al. (1993). "Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes." J Exp Med 177(3): 845-50.
- Bai, L., P. Beckhove, et al. (2003). "Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo." Int J Cancer 103(1): 73-83.

-
- Bakker, A. B., J. H. Phillips, et al. (1998). "Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL." J Immunol 160(11): 5239-45.
- Banchereau, J. (2002). "The long arm of the immune system." Sci Am 287(5): 52-9.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol 18: 767-811.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, et al. (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine." Cancer Res 61(17): 6451-8.
- Banchereau, J. und R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature 392(6673): 245-52.
- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress- inducible MICA." Science 285(5428): 727-9.
- Ben-Efraim, S. (1999). "One hundred years of cancer immunotherapy: a critical appraisal." Tumour Biol 20(1): 1-24.
- Bender, A., M. Sapp, et al. (1996). "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." J Immunol Methods 196(2): 121-35.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature 393(6684): 478-80.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." J Exp Med 186(1): 65-70.
- Berke, G. (1994). "The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects." Annu Rev Immunol 12: 735-73.
- Bevan, M. J. (1976). "Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming." J Immunol 117(6): 2233-8.
- Boon, T., J. C. Cerottini, et al. (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." Annu Rev Immunol 12: 337-65.

-
- Borrego, F., M. Ulbrecht, et al. (1998). "Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis." J Exp Med 187(5): 813-8.
- Brittenden, J., S. D. Heys, et al. (1996). "Natural killer cells and cancer." Cancer 77(7): 1226-43.
- Brossart, P. und M. J. Bevan (1997). "Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines." Blood 90(4): 1594-9.
- Brossart, P., K. S. Heinrich, et al. (1999). "Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies." Blood 93(12): 4309-17.
- Burch, P. A., J. K. Breen, et al. (2000). "Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer." Clin Cancer Res 6(6): 2175-82.
- Carbone, F. R. und M. J. Bevan (1990). "Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo." J Exp Med 171(2): 377-87.
- Casciola-Rosen, L. und A. Rosen (1997). "Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE." Lupus 6(2): 175-80.
- Caux, P., N. Favre, et al. (1997). "Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats." Int J Cancer 72: 619-24.
- Cella, M., M. Salio, et al. (1999). "Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA." J Exp Med 189(5): 821-29.
- Cerwenka, A., A. B. Bakker, et al. (2000). "Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice." Immunity 12(6): 721-7.
- Chien, Y. H., M. Iwashima, et al. (1987). "A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation." Nature 327(6124): 677-82.

-
- Chien, Y. H., M. Iwashima, et al. (1987). B "T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes." Nature 330(6150): 722-7.
- Chien, Y. H., R. Jores, et al. (1996). "Recognition by gamma/delta T cells." Annu Rev Immunol 14: 511-32.
- Chu, K. U., M. H. Ravindranath, et al. (2000). "Gangliosides as targets for immunotherapy for pancreatic adenocarcinoma." Cancer 88(8): 1828-36.
- Cipriani, B., G. Borsellino, et al. (2000). "Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines." Blood 95(1): 39-47.
- Citterio, S., M. Rescigno, et al. (1999). "Dendritic cells as natural adjuvants." Methods 19(1): 142-7.
- Davis, I. D., M. Jefford, et al. (2003). "Rational approaches to human cancer immunotherapy." J Leukoc Biol 73(1): 3-29.
- De Saint Vis, B., V. I. Fugier, et al. (1998). "The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation." J Immunol 160(4): 1666-76.
- Delneste, Y., G. Magistrelli, et al. (2002). "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation." Immunity 17(3): 353-62.
- DeMatos, P., W. Z. Abdel, et al. (1998). "Pulsing of dendritic cells with cell lysates from either B16 melanoma or MCA-106 fibrosarcoma yields equally effective vaccines against B16 tumors in mice." J Surg Oncol 68(2): 79-91.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (1999). "Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells." J Clin Invest 104(2): 173-80.
- Diefenbach, A., A. M. Jamieson, et al. (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." Nat Immunol 1(2): 119-26.
- Diefenbach, A., E. R. Jensen, et al. (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." Nature 413(6852): 165-71.

-
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1993). "The ability to recognize phosphatidylserine on apoptotic cells is an inducible function in murine bone marrow-derived macrophages." Chest 103(2 Suppl): 102S.
- Falk, M. H. und R. D. Issels (2001). "Hyperthermia in oncology." Int J Hyperthermia 17(1): 1-18.
- Farag, S. S., T. A. Fehniger, et al. (2002). "Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect." Blood 100(6): 1935-47.
- Farrar, M. A. und R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." Annu Rev Immunol 11: 571-611.
- Feng, H., Y. Zeng, et al. (2002). "Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells." Blood 100(12): 4108-15.
- Feng, H., Y. Zeng, et al. (2003). "Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity." Blood 101(1): 245-52.
- Feng, H., Y. Zeng, et al. (2001). "Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity." Blood 97(11): 3505-12.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, et al. (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." Nat Med 5(4): 405-11.
- Ferrero, E., A. Bondanza, et al. (1998). "CD14+ CD34+ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells." J Immunol 160(6): 2675-83.
- Fields, R. C., K. Shimizu, et al. (1998). "Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 95(16): 9482-7.
- Fisch, P., K. Oettel, et al. (1992). "MHC-unrestricted cytotoxic and proliferative responses of two distinct human gamma/delta T cell subsets to Daudi cells." J Immunol 148(8): 2315-23.
- Fong, L., D. Brockstedt, et al. (2001). "Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy." J Immunol 167(12): 7150-6.

-
- Fong, L., Y. Hou, et al. (2001). "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8809-14.
- Fuchs, E. J. und P. Matzinger (1996). "Is cancer dangerous to the immune system?" Semin Immunol 8(5): 271-80.
- Gahmberg, C. G. und L. C. Andersson (1981). "K562--a human leukemia cell line with erythroid features." Semin Hematol 18(1): 72-7.
- Gallucci, S., M. Lolkema, et al. (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med 5(11): 1249-55.
- Gallucci, S. und P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol 13(1): 114-9.
- Ganss, R. und D. Hanahan (1998). "Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes." Cancer Res 58(20): 4673-81.
- Geiger, J. D., R. J. Hutchinson, et al. (2001). "Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression." Cancer Res 61(23): 8513-9.
- Geldhof, A. B., M. Moser, et al. (1998). "IL-12-activated NK cells recognize B7 costimulatory molecules on tumor cells and autologous dendritic cells." Adv Exp Med Biol 451: 203-10.
- Geldhof, A. B., M. Moser, et al. (1998). "Interleukin-12-activated natural killer cells recognize B7 costimulatory molecules on tumor cells and autologous dendritic cells." Blood 91(1): 196-206.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell 76(2): 287-99.
- Gilboa, E. (1999). "How tumors escape immune destruction and what we can do about it." Cancer Immunol Immunother 48(7): 382-5.
- Gjertsen, M. K., A. Bakka, et al. (1995). "Vaccination with mutant ras peptides and induction of T-cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding RAS mutation." Lancet 346(8987): 1399-400.
- Haas, W., P. Pereira, et al. (1993). "Gamma/delta cells." Annu Rev Immunol 11: 637-85.

-
- Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood 90(9): 3245-87.
- Hartmann, G. und A. M. Krieg (1999). "CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes." Gene Therapy 6: 23-28.
- Heath, W. R. und F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." Annu Rev Immunol 19: 47-64.
- Heath, W. R., C. Kurts, et al. (1998). "Cross-tolerance: a pathway for inducing tolerance to peripheral tissue antigens." J Exp Med 187(10): 1549-53.
- Heiser, A., D. Coleman, et al. (2002). "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors." J Clin Invest 109(3): 409-17.
- Hernando, J. J., T. W. Park, et al. (2002). "Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial." Cancer Immunol Immunother 51(1): 45-52.
- Hernando, J. J., T. W. Park, et al. (2003). "Dendritic cell-based vaccines in breast and gynaecologic cancer." Anticancer Res 23(5b): 4293-303.
- Hess, K. L., G. F. Babcock, et al. (1997). "A novel flow cytometric method for quantifying phagocytosis of apoptotic cells." Cytometry 27(2): 145-52.
- Heufler, C., F. Koch, et al. (1996). "Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells." Eur J Immunol 26(3): 659-68.
- Hill, N. und N. Sarvetnick (2002). "Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity." Curr Opin Immunol 14(6): 791-7.
- Hochrein, H., M. O'Keeffe, et al. (2002). "Human and mouse plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol 63(12): 1103-10.
- Holti, L., C. Rieser, et al. (1999). "Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells." J Urol 161(3): 777-82.

-
- Hsu, F. J., C. Benike, et al. (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen- pulsed dendritic cells." Nat Med 2(1): 52-8.
- Hugues, S., E. Mougneau, et al. (2002). "Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells." Immunity 16(2): 169-81.
- Inaba, K., S. Turley, et al. (1998). "Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells." J Exp Med 188(11): 2163-73.
- Iwamoto, M., H. Shinohara, et al. (2003). "Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas." Int J Cancer 104(1): 92-7.
- Jaattela, M. (1999). "Escaping cell death: survival proteins in cancer." Exp Cell Res 248(1): 30-43.
- Janetzki, S., N. E. Blachere, et al. (1998). "Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and memory T cells by immunization with tumor-derived heat shock protein gp96." J Immunother 21(4): 269-76.
- Jefford, M., E. Maraskovsky, et al. (2001). "The use of dendritic cells in cancer therapy." Lancet Oncol 2(6): 343-53.
- Jefford, M., M. Schnurr, et al. (2003). "Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli." Blood 102(5): 1753-63.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, et al. (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." Eur J Immunol 27(12): 3135-42.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, et al. (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med 192(2): 219-26.
- Kaisho, T. und S. Akira (2003). "Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors." Curr Mol Med 3(4): 373-85.
- Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, et al. (1998). "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." J Immunol 161(6): 2804-9.

-
- Kaur, I., S. D. Voss, et al. (1993). "Human peripheral gamma delta T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells." J Immunol 150(5): 2046-55.
- Koulova, L., E. A. Clark, et al. (1991). "The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells." J Exp Med 173(3): 759-62.
- Kovacsovics-Bankowski, M. und K. L. Rock (1995). "A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules." Science 267(5195): 243-6.
- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol 20: 709-60.
- Krug, A., S. Rothenfusser, et al. (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol 31(7): 2154-63.
- Kufe, D. W. (2000). "Smallpox, polio and now a cancer vaccine? [news; comment]." Nat Med 6(3): 252-3.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol 16: 359-93.
- Lieber, M., J. Mazzetta, et al. (1975). "Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas." Int J Cancer 15(5): 741-7.
- Lim, S. H. und R. Bailey-Wood (1999). "Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma." Int J Cancer 83(2): 215-22.
- Liu, C. C., B. Perussia, et al. (2000). "The emerging role of IL-15 in NK-cell development." Immunol Today 21(3): 113-6.
- Ljunggren, H. G. und K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today 11(7): 237-44.
- Longmate, J., J. York, et al. (2001). "Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes." Immunogenetics 52(3-4): 165-73.
- Ludewig, B., A. F. Ochsenbein, et al. (2000). "Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease." J Exp Med 191(5): 795-804.

-
- Ludewig, B., B. Odermatt, et al. (1998). "Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue." J Exp Med 188(8): 1493-501.
- Ludewig, B., B. Odermatt, et al. (1999). "Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases." Immunol Rev 169: 45-54.
- Luft, T., M. Jefford, et al. (2002). "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets." Blood 100(4): 1362-72.
- Mackensen, A., B. Herbst, et al. (2000). "Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells." Int J Cancer 86(3): 385-92.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, et al. (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice:multiple dendritic cell subpopulations identified." J. Exp. Med. 184: 1953-1962.
- Maraskovsky, E., E. Daro, et al. (2000). "In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand." Blood 96(3): 878-84.
- Marten, A., D. Flieger, et al. (2002). "Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial." Cancer Immunol Immunother 51(11-12): 637-44.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, et al. (1995). "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 182(5): 1545-56.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol 12: 991-1045.
- Matzinger, P. (1998). "An innate sense of danger." Semin Immunol 10(5): 399-415.
- Matzinger, P. (2001). "Introduction to the series. Danger model of immunity." Scand J Immunol 54(1-2): 2-3.
- McCarty, T. M., X. Liu, et al. (1998). "Targeting p53 for adoptive T-cell immunotherapy." Cancer Res 58(12): 2601-5.

-
- Mehta-Damani, A., S. Markowicz, et al. (1994). "Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors." J Immunol 153(3): 996-1003.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." Nature 427(6970): 154-9.
- Mitchell, D. A., S. K. Nair, et al. (1998). "Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells." Eur J Immunol 28(6): 1923-33.
- Moghaddami, M., B. Swart, et al. (2002). "Flt3 ligand expands dendritic cell numbers in normal and malignant murine prostate." Immunol Cell Biol 80(4): 370-81.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." Annu Rev Immunol 14: 619-48.
- Moris, A., S. Rothenfusser, et al. (1999). "Role of gammadelta T cells in tumor immunity and their control by NK receptors." Microbes Infect 1(3): 227-34.
- Morse, M. A., H. K. Lyerly, et al. (1998). "Optimization of the sequence of antigen loading and CD40-ligand-induced maturation of dendritic cells." Cancer Res 58(14): 2965-8.
- Multhoff, G. (1997). "Heat shock protein 72 (HSP72), a hyperthermia-inducible immunogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's sarcoma cells." Int J Hyperthermia 13(1): 39-48.
- Multhoff, G., C. Botzler, et al. (1995). "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells." Int J Cancer 61(2): 272-9.
- Multhoff, G., L. Mizzen, et al. (1999). "Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells." Exp Hematol 27(11): 1627-36.
- Murphy, G. P., B. A. Tjoa, et al. (1999). "Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment." Prostate 39(1): 54-9.
- Nakajima, H. und P. A. Henkart (1994). "Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal disintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown." J Immunol 152(3): 1057-63.
- Nestle, F. O. (2002). "Vaccines and melanoma." Clin Exp Dermatol 27(7): 597-601.

-
- Nestle, F. O., S. Alijagic, et al. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat Med 4(3): 328-32.
- Nguyen, V. A., S. Ebner, et al. (2002). "Adhesion of dendritic cells derived from CD34+ progenitors to resting human dermal microvascular endothelial cells is down-regulated upon maturation and partially depends on CD11a-CD18, CD11b-CD18 and CD36." Eur J Immunol 32(12): 3638-50.
- Noessner, E., R. Gastpar, et al. (2002). "Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells." J Immunol 169(10): 5424-32.
- Norbury, C. C., B. J. Chambers, et al. (1997). "Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells." Eur J Immunol 27(1): 280-8.
- Nukaya, I., M. Yasumoto, et al. (1999). "Identification of HLA-A24 epitope peptides of carcinoembryonic antigen which induce tumor-reactive cytotoxic T lymphocyte." Int J Cancer 80(1): 92-7.
- Ochsenbein, A. F. (2002). "Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy." Cancer Gene Ther 9(12): 1043-55.
- Ossendorp, F., E. Mengede, et al. (1998). "Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors." J Exp Med 187(5): 693-702.
- Osugi, Y., S. Vuckovic, et al. (2002). "Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes." Blood 100(8): 2858-66.
- Panelli, M. C., J. Wunderlich, et al. (2000). "Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100." J Immunother 23(4): 487-98.
- Park, S. H., T. Kyin, et al. (2003). "The Contribution of NKT Cells, NK Cells, and Other gamma-Chain-Dependent Non-T Non-B Cells to IL-12-Mediated Rejection of Tumors." J Immunol 170(3): 1197-201.
- Peiper, M., P. S. Goedegebuure, et al. (1997). "The HER2/neu-derived peptide p654-662 is a tumor-associated antigen in human pancreatic cancer recognized by cytotoxic T lymphocytes." Eur J Immunol 27(5): 1115-23.

-
- Poccia, F., L. Battistini, et al. (1999). "Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines." J Infect Dis 180(3): 858-61.
- Pulendran, B., J. Banchereau, et al. (2001). "Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors." Trends Immunol 22(1): 41-7.
- Reichardt, V. L., C. Y. Okada, et al. (1999). "Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study." Blood 93(7): 2411-9.
- Reutelingsperger, C. P. und W. L. van Heerde (1997). "Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis." Cell Mol Life Sci 53(6): 527-32.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, et al. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T-killer cell." Nature 393(6684): 474-8.
- Rieser, C., G. Bock, et al. (1997). "Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production." J Exp Med 186(9): 1603-8.
- Rock, K. L. und A. L. Goldberg (1999). "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I- presented peptides." Annu Rev Immunol 17: 739-79.
- Romagnani, S. (1999). "Th1/Th2 cells." Inflamm Bowel Dis 5(4): 285-94.
- Romani, N., S. Gruner, et al. (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med 180(1): 83-93.
- Romani, N., S. Holzmann, et al. (2003). "Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis." Apmis 111(7-8): 725-40.
- Rosewicz, S. und B. Wiedenmann (1997). "Pancreatic carcinoma." Lancet 349(9050): 485-9.
- Rubartelli, A., A. Poggi, et al. (1997). "The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium." Eur J Immunol 27(8): 1893-900.

-
- Saito, H., D. M. Kranz, et al. (1984). "Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences." Nature 309(5971): 757-62.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "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 182(2): 389-400.
- Sallusto, F. und A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med 179(4): 1109-18.
- Sallusto, F., C. Nicolo, et al. (1996). "Ceramide inhibits antigen uptake and presentation by dendritic cells." J Exp Med 184(6): 2411-6.
- Sato, M., T. Takayama, et al. (2003). "Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2)." Cancer Sci 94(12): 1091-8.
- Sauter, B., M. L. Albert, et al. (2000). "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 191(3): 423-34.
- Savill, J. (1997). "Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Br Med Bull 53(3): 491-508.
- Scheffer, S. R., H. Nave, et al. (2003). "Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo." Int J Cancer 103(2): 205-11.
- Schnurr, M., P. Galambos, et al. (2001). "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 61(17): 6445-50.
- Schnurr, M., F. Then, et al. (2000). "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells." J Immunol 165(8): 4704-9.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, et al. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature 393(6684): 480-3.

-
- Schott, M., J. Seissler, et al. (2001). "Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination." J Clin Endocrinol Metab 86(10): 4965-9.
- Schuler-Thurner, B., D. Dieckmann, et al. (2000). "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 165(6): 3492-6.
- Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, et al. (2002). "Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells." J Exp Med 195(10): 1279-88.
- Shen, Z., G. Reznikoff, et al. (1997). "Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules." J Immunol 158(6): 2723-30.
- Shingu, K., A. Helfritz, et al. (2002). "Kinetics of the early recruitment of leukocyte subsets at the sites of tumor cells in the lungs: natural killer (NK) cells rapidly attract monocytes but not lymphocytes in the surveillance of micrometastasis." Int J Cancer 99(1): 74-81.
- Shurin, M. R. (1996). "Dendritic cells presenting tumor antigen." Cancer Immunol Immunother 43(3): 158-64.
- Shurin, M. R., L. Lu, et al. (1999). "Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy." Springer Semin Immunopathol 21(3): 339-59.
- Sparwasser, T., E. S. Koch, et al. (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." Eur J Immunol 28(6): 2045-54.
- Squier, M. K. und J. J. Cohen (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." Curr Opin Immunol 6(3): 447-52.
- Srivastava, P. K., A. Menoret, et al. (1998). "Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world." Immunity 8(6): 657-65.
- Steinbrink, K., E. Graulich, et al. (2002). "CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity." Blood 99(7): 2468-76.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol 9(271): 271-96.

-
- Steinman, R. M. und Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice."
J. Exp. Med. 137: 1142-1162.
- Steinman, R. M. und Z. A. Cohn (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." J Exp Med 139(2): 380-97.
- Steinman, R. M., K. Inaba, et al. (1999). "Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies." Hum Immunol 60(7): 562-7.
- Steinman, R. M., M. Pack, et al. (1997). "Dendritic cell development and maturation." Adv Exp Med Biol 417(1): 1-6.
- Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells [comment]." J Exp Med 191(3): 411-6.
- Stift, A., J. Friedl, et al. (2003). "Dendritic cell-based vaccination in solid cancer." J Clin Oncol 21(1): 135-42.
- They, C., A. Regnault, et al. (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J Cell Biol 147(3): 599-610.
- Thurner, B., I. Haendle, et al. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med 190(11): 1669-78.
- Thurner, B., C. Röder, et al. (1999). "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application." J Immunol Methods 223: 1-15.
- Titzer, S., O. Christensen, et al. (2000). "Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects." Br J Haematol 108(4): 805-16.
- Todryk, S., A. A. Melcher, et al. (1999). "Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake." J Immunol 163(3): 1398-408.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol 47: 187-376.

-
- Trinchieri, G. (1995). "The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells." Ciba Found Symp 195: 203-14.
- Udono, H., D. L. Levey, et al. (1994). "Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 91(8): 3077-81.
- Udono, H. und P. K. Srivastava (1993). "Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity." J Exp Med 178(4): 1391-6.
- Van den Eynde, B. J. und T. Boon (1997). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." Int J Clin Lab Res 27(2): 81-6.
- Vidovic, D., T. Graddis, et al. (2002). "Antitumor vaccination with HER-2-derived recombinant antigens." Int J Cancer 102(6): 660-4.
- von Bernstorff, W., R. A. Spanjaard, et al. (1999). "Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand." Surgery 125(1): 73-84.
- Wang, H. Y., T. Fu, et al. (2002). "Induction of CD4(+) T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells." J Clin Invest 109(11): 1463-70.
- Wang, R. F. (2002). "Enhancing antitumor immune responses: intracellular peptide delivery and identification of MHC class II-restricted tumor antigens." Immunol Rev 188(1): 65-80.
- Wiemann, B. und C. O. Starnes (1994). "Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective." Pharmacol Ther 64(3): 529-64.
- Wolfers, J., A. Lozier, et al. (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." Nat Med 7(3): 297-303.
- Yamamoto, R., M. Tatsuta, et al. (1988). "Morphological changes in a human scirrhous gastric carcinoma cell line (KATO-III) when cultured in collagen-coated dishes." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 55(4): 247-53.
- Yasukawa, M., H. Ohminami, et al. (2000). "Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans." Blood 95(7): 2352-5.

Yoshino, I., P. S. Goedegebuure, et al. (1994). "Human tumor-infiltrating CD4+ T cells react to B cell lines expressing heat shock protein 70." J Immunol 153(9): 4149-58.

Young, J. W. und R. M. Steinman (1990). "Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells." J Exp Med 171(4): 1315-32.

Zhou, L. J. und T. F. Tedder (1995). "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily." J Immunol 154(8): 3821-35.

Zhou, L. J. und T. F. Tedder (1996). "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A 93(6): 2588-92.

Zitvogel, L., A. Regnault, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med 4(5): 594-600.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'triphosphat
Ca ⁺⁺	Kalziumionen
cAMP	Zyklisches Adenosin-5' monophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD(x) ⁺	Positiv für einen Oberflächenmolekül x
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DTH-Reaktion	<i>Delayed-type hypersensitivity</i> -Reaktion
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
flt3-Ligand	<i>flms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
g	Einheit der Schwerkraft auf der Erde (9,8 m/s ²)
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
hsp	Hitze-Schock-Protein
IU	Internationale Einheit
IL	Interleukin
KIR	<i>Killer inhibitory receptor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
MNC	Mononukleäre Zelle
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerithrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumiodid
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TNF-□	Tumornekrosefaktor-□

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Stefan Endres, meinem Doktorvater, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. In diesem von ihm geprägten gleichwohl professionellen und familiären Umfeld durfte ich leben, lernen und arbeiten. Meine tief empfundene Bewunderung gilt seiner behutsamen aber bestimmten Art der Menschenführung und beruflichen Förderung.

Herrn PD Dr. Andreas Eigler und Dr. Maximilian Schnurr danke ich für die kontinuierliche Begleitung meiner Doktorarbeit. Ich danke für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die regelmäßigen Diskussionen bezüglich des weiteren Vorgehens und das stete Bemühen Dinge an Grenzen zu führen, jenseits derer das Abenteuer des Neulands beginnt.

Ganz besonderer Dank gilt meinem „Adoptiv“-Doktorarbeitsbetreuer Dr. Simon Rothenfußer. Ein Dank an dieser Stelle ist ebenso notwendig wie unzureichend. Diese Arbeit trägt in allen Belangen die Handschrift deiner Kompetenz und Hingabe. Dafür schulde ich dir Dank. Jenseits dieser professionellen Mentorenschaft empfinde ich tiefe Verbundenheit im Geschenk deiner Freundschaft.

Meinen Mit-Doktoranden Dr. Peter Galambos und Dr. Florian Then danke ich für die praktische Einführung in die Methoden für anregende Diskussionen, kollegiale Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. G. Riethmüller, dem emeritierten Vorstand des Instituts für Immunologie der LMU-München, und vor allem seinem Mitarbeiter Dr. R. Lutherbüse für die Überlassung des Radioaktivarbeitsplatzes und die freundliche Überlassung der Magenkarzinomzelllinie *Kato-III*.

Herrn S. Thalmeier vom Institut für Mineralogie der LMU-München gilt mein Dank für die Einführung in die Techniken der konfokalen Lasermikroskopie und die vertrauensvolle Überlassung des Arbeitsplatzes.

9 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind, mit Genehmigung der Fakultät in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

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 Research 2001; 61:6445-6450.

Schnurr M,¹ Scholz C,¹ 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 $\gamma\delta$ T cells.

Cancer Research 2002; 62:2347-2352.

¹ M.S. and C.S. contributed equally to this manuscript

Autorenschaft bei weiterer Originalarbeit:

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.

Journal of Immunology 2000; 165:4704-4709.

Autorenschaft bei Übersichtsarbeit

M. Schnurr, P. Galambos, C. Scholz, M. Dauer, A. Krug, G. Hartmann, A. Eigler, S. Endres

Dendritische Zellen: Träger tumorgerichteter Immuntherapie.

Deutsches Ärzteblatt 2002; 99: A 2408–2416

10 Lebenslauf

Geboren, am 23. Februar 1976 in Augsburg als zweites Kind von Dr. Maria Scholz-Neuner und Dietrich-Eckhard Scholz

Schulbildung:

1982-86 Grundschule Westheim

1986-95 Humanistisches Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg

1993 Ampleforth College, Großbritannien

1995 Abitur

Zivildienst:

1995-96 Rettungsdienst des Bayerisches Roten Kreuzes, Augsburg mit Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium:

1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität, München

1997 Beginn des Studiums der Philosophie an der Hochschule für Philosophie, München

1997 Drei Monate als Rettungssanitäter im Flüchtlingslager *Oruchinga* (Uganda); Internationale Föderation vom Roten Kreuz (IFRC)

1998-03 Stipendiat des Cusanuswerkes

1998 Ärztliche Vorprüfung

1999 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung

2001 Bakkalaureat (BA) der Philosophie

2000-01 Klinisches Studienjahr an der *Imperial College School of Medicine*, London (UK); Jahresstipendium des DAAD

2001 Aufenthalt an den *National Institutes of Health*, „*The Ghost Lab*“, *NIAID*, Bethesda (USA); P. Matzinger Ph.D.

2002 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung

2002-03 Praktisches Jahr an der LMU-München und *Harvard Medical School*, Boston (USA) ermöglicht durch ein Stipendium der *Munich-Harvard-Alliance for Medical Education*

2003 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

2004 AiP und ab 1.10. Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt, Klinikum der Universität; Direktor: Prof. Dr. K. Friese