

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Reincke

Angefertigt unter der Anleitung von
PD Dr. med. habil. A. Eigler

Vorgelegt über das
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. H. Ammer

***In vitro*-Evaluation kombinierter immunologischer und pharmakologischer
Therapiestrategien zur Behandlung des Pankreaskarzinoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
an der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Jan Frederik Renner
aus Pforzheim
München, 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. E.P. Märtlbauer

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. H. Ammer

1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. vet. R.Wanke

Tag der mündlichen Prüfung: 10.II.2006

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Ziele der Arbeit.....	1
1.2 Das Pankreaskarzinom.....	3
1.3 Dendritische Zellen.....	3
1.3.1 Subtypen dendritischer Zellen.....	5
1.3.2 Migration, Reifung und T-Zellaktivierung.....	7
1.3.3 Antigen-Präsentation.....	10
1.3.3.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex I / Major Histocompatibility Complex I.....	10
1.3.3.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex II / Major Histocompatibility Complex II.....	10
1.3.3.3 Kreuz-Präsentation und Klasse-I-Präsentation exogener Antigene.....	11
1.3.4 Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen.....	11
1.3.5 Dendritische Zellen und Toleranz	13
1.3.6 Dendritische Zellen in der Tumorthherapie	14
1.4 Tumorgenese- und progredienz begünstigende Faktoren.....	17
1.4.1 Apoptoseresistenz.....	17
1.4.1.1 Regulation und Induktion der Apoptose.....	17
1.4.2 Tumor-Escape Mechanismen	19
1.5 Cyclooxygenase.....	21
1.5.1 Die Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX-1 / COX-2).....	21
1.5.2 Cyclooxygenase-2-Expression in Tumoren.....	21
1.5.3 Die Rolle der Cyclooxygenase-2 in der Karzinogenese von gastrointestinalen Tumoren.....	22
1.5.3.1 Das Zusammenspiel von Cyclooxygenase-2 und Angiogenese.....	22
1.5.3.2 Cyclooxygenase-medierte Resistenz gegenüber der Apoptose.....	23
1.5.4 Tumorspezifische Wirkung der Cyclooxygenase-2-Inhibitoren	23
1.6 Pharmakologische Strategien in Kombination mit einer dendritischen Zell-basierten Immuntherapie.....	25

2. MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte.....	27
2.1.1 Geräte.....	27
2.1.2 Chemikalien.....	28
2.1.3 Radioaktive Chemikalien.....	28
2.1.4 Pharmaka.....	28
2.1.5 Reagenziensätze.....	29
2.1.6 Materialien für die Zellkultur.....	30
2.1.7 Zytokine, Wachstumsstimulatoren und -stimulanzen.....	31
2.1.8 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....	31
2.1.8.1 Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	31
2.1.8.2 Medien und Puffer für Tumorzellen und dendritische Zellen.....	32
2.1.9 Antikörper.....	33
2.1.10 Zelllinien.....	34
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Zellkultur.....	35
2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen.....	35
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	35
2.2.1.3 Kultivierung von Tumorzelllinien.....	35
2.2.2 Aufreinigung von Zellpopulationen.....	36
2.2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	36
2.2.2.2 Aufreinigung von Monozyten durch Adhärenz.....	37
2.2.2.3 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen.....	38
2.2.2.4 Isolation von T-Zellen.....	38
2.2.3 Stimulation der in Kokultur befindlichen T-Zellen mit Antigen-beladenen dendritischen Zellen.....	39
2.2.3.1 Antigen-Beladung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen.....	39
2.2.3.2 Kokultur von dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen.....	40
2.2.4 Herstellung von Panc-1 Tumorlysat als Antigenquelle.....	41
2.3 Analyseverfahren.....	42
2.3.1 Durchflusszytometrie.....	42
2.3.1.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	42
2.3.1.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen.....	44

2.3.1.3 Lifegate-Analyse.....	44
2.3.1.4 Identifizierung HLA-A2 positiver Zellen.....	44
2.3.1.5 Analyse von Zell-Apoptose.....	45
2.3.2 Zytokinfreie Kultivierung dendritischer Zellen.....	46
2.3.3 Zellvermittelter Zytotoxizitätstest (⁵¹ Chrom-Lyse-Test)	46
2.3.4 Enzyme-linked immunosorbent assay.....	48
2.3.5 Proliferations-Analyse der Tumorzellen	49
2.3.6 [³ H]-Thymidin Proliferationstest.....	49
2.3.7 Mikroskopie.....	51
2.4 Statistische Analyse.....	52
3. ERGEBNISSE	53
3.1 Wirkung von Cyclooxygenase-Inhibitoren und Zytostatika auf Tumorzellen.....	53
3.1.1 Keine Beeinflussung der CD95-Expression durch nichtsteroidale Antiphlogistika und Gemcitabin.....	53
3.1.2 Hemmung der Tumorzellproliferation in Abhängigkeit von Typ und Dosierung der Pharmaka sowie CD95-Antikörper-Präsenz	54
3.1.3 Keine Apoptoseinduktion durch Cyclooxygenase-Hemmer und Zytostatika.....	59
3.2 Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika und Gemcitabin auf dendritische- und T-Zellen.....	64
3.2.1 Keine Beeinflussung von Viabilität und Reifung dendritischer Zellen bei Generierung in Gegenwart von nichtsteroidalen Antirheumatika und Gemcitabin.....	64
3.2.2 Pharmakon-spezifische Effekte auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen	70
3.3 Steigerung der spezifischen zytotoxischen T-Zell-Lyse durch einen Cyclooxygenase-2-Inhibitor.....	74
3.3.1 Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber CD95-abhängiger T-Zell-Zytotoxizität durch einen Cyclooxygenase-2-Inhibitor.....	74
3.3.2 Zytokinproduktion bei Induktion von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen	76

4. DISKUSSION.....	78
4.1 Überblick über die Ergebnisse.....	78
4.2 Methodendiskussion.....	79
4.2.1 Diskussion der verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen... 80	
4.2.1.1 Chemotherapeutika.....	80
4.2.1.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika.....	81
4.2.2 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (<i>FastDC</i>).....	82
4.2.3 Das Pankreaskarzinom <i>in vitro</i> -Modell.....	84
4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich zur Literatur.....	86
4.3.1 Wirkung von Cyclooxygenase-Inhibitoren und Zytostatika auf Pankreaskarzinomzellen.....	86
4.3.1.1 Keine Beeinflussung der Oberflächenmarker-Expression durch nichtsteroidale Antiphlogistika und Gemcitabin.....	86
4.3.1.2 Nichtsteroidale Antirheumatika- und Zytostatika-vermittelte Effekte auf Zellproliferation und Apoptose von Pankreaskarzinomzellen.....	87
4.3.2 Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika und Gemcitabin auf dendritische- und T-Zellen.....	90
4.3.2.1 Keine Beeinflussung der Reifung und Differenzierung dendritischer Zellen durch pharmakologisch aktive Substanzen....	90
4.3.2.2 Pharmakologische Effekte auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen.....	91
4.3.3 Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber CD95-abhängiger T-Zell-Zytotoxizität durch einen Cyclooxygenase-2-Inhibitor.....	92
4.3.3.1 Induktion einer tumorspezifischen zytotoxischen T-Zell-Lyse durch Tumorlysat-gepulste dendritische Zellen.....	92
4.4 Klinische Relevanz.....	94
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	97
6. SUMMARY.....	99
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	101
Danksagung.....	121
Curriculum Vitae.....	122

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ADP	Adenosin Di Phosphat
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosin Tri Phosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serum Albumin
CCR	Chemokinrezeptoren
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
cpm	Counts per minute
CTL	Cytotoxic T-Lymphocytes
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte-associated Antigen 4
COX	Cyclooxygenase
DC	Dendritic Cell
DC-SIGN	DC-specific ICAM-grabbing non-integrin
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dFDC	Difluorodeoxycytidin
dFDCDP	Difluorodeoxycytidin-Diphosphat
dFDCTP	Difluorodeoxycytidin-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
5-FU	5-Fluoruracil
FUTP	5-Fluorouridintriphosphat
FdUMP	5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat
GMCSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HAS	Human Serum Albumin
IC50	Inhibition Concentration 50
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LC	Langerhans Cells
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDC	Myeloid Dendritic Cell
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
MIP	Macrophage inflammatory protein
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
NF- κ B	<i>Nuclear factor- kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSAR	Nicht-Steroidale Antirheumatika
NSAID	Non Steroidal Antiinflammatory Drug
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumiodid
PTZ	Plasmazytoide T-Zelle
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TAA	Tumor associated antigen
TAP	Transporter associated with antigen
TCR	T-Cell Receptor
TGF β	Tumor growth factor
Th	T-Helfer
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α

TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TOPRO-3	To-Pro-3-Iodid
TZR	T-Zellrezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. EINLEITUNG

1.1 Ziele der Arbeit

Die Prognose bei der Diagnose „Pankreaskarzinom“ ist quo ad vitam als ungünstig zu beurteilen. Die Mehrheit der Patienten stirbt 6-12 Monate nach Diagnosestellung an den Folgen der Tumorerkrankung. Die etablierten Strategien zur Therapie bestehen in der chirurgischen Exzision des Primärtumors oder in einer Chemotherapie. Aufgrund der häufig schon vorhandenen Metastasierung ist der Nutzen dieser Maßnahmen oftmals rein palliativer Natur. Folglich wäre die Etablierung alternativer Therapiekonzepte wünschenswert. Einen Ansatz bietet hier die Vakzinierung mit dendritischen Zellen, die in der Lage sind, zytotoxische T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene *in vitro* und *in vivo* zu induzieren. Eine klinisch relevante Tumorregression nach Applikation einer dendritischen Zell-basierten Immuntherapie wurde bisher jedoch bei Patienten mit soliden Tumoren nur selten beobachtet. Eine Kombination der Vakzinetherapie mit anderen Behandlungsmodalitäten, wie beispielsweise Bestrahlung oder pharmakologisch wirksamen antitumoralen Wirkstoffen, könnte die Fähigkeit der Tumorzellen, sich einer Immunantwort zu entziehen, reduzieren und dadurch die Effektivität der dendritischen Zell-basierten Immuntherapie erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem *in vitro*-Modell die Kombination aus dendritischer Zell-basierter Immuntherapie mit dem bei der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms am häufigsten verwendeten Zytostatikum Gemcitabin sowie der Stoffgruppe der Cyclooxygenase (COX)-Inhibitoren, für die in ersten Studien eine antitumorale Wirkung gezeigt wurde, evaluiert. Bei den untersuchten Effekten der pharmakologisch wirksamen Substanzen auf Tumorzellen interessierte neben möglicher proliferationshemmender und apoptoseinduzierender Eigenschaften besonders, ob infolge der Pharmakaeinwirkung die Expression des auf den Tumorzellen befindlichen, für eine Apoptoseinduktion bedeutsamen CD95-Rezeptors aufreguliert würde.

Aber nicht nur die tumorspezifischen Effekte von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und Chemotherapeutika müssen bei der Kombination mit der Immuntherapie bedacht werden, vielmehr muss eine negative Wirkung auf die bei der Vakzinetherapie beteiligten Komponenten des Immunsystems ausgeschlossen werden. Bei einer durch dendritische Zellen induzierten Immunreaktion werden Antigen-spezifische T-Lymphozyten aktiviert. Somit haben die Pharmaka neben den dendritischen Zellen einen weiteren Angriffspunkt, an dem sie unerwünschte immuninhibitorische Wirkungen entfalten könnten. Aus diesem Grunde befasst sich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit intensiv mit der Reifung und Viabilität dendritischer Zellen und der dendritischen Zell-induzierten T-Zellproliferation in Gegenwart des Zytostatikums beziehungsweise der NSAR. Zuletzt wurde der Einfluss einer Pharmakabehandlung von Tumorzellen auf die Effektivität einer dendritischen Zell-induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort untersucht.

Um die Kombination Immuntherapie und Pharmakagabe zu optimieren und ein Maximum der synergistischen Effekte dieser zwei Komponenten zu erzielen, stand neben den bereits erläuterten Zielen speziell die erforderliche Konzentration der pharmakologisch aktiven Substanzen im Vordergrund. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen, die die bereits angesprochene Charakterisierung der Effekte von Gemcitabin und der COX-Inhibitoren auf die dendritischen Zellen, die T-Zellaktivierung und die Tumorzellen sowie die Überprüfung von synergistischen Effekten der Pharmakatherapie mit der auf dendritischen Zellen basierenden Immuntherapie zum Inhalt hatten, dienten dem Ziel, ein *in vitro* wirksames kombiniertes Therapieverfahren zu entwickeln, das auf ein Tiermodell übertragen werden kann.

1.2 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist in der westlichen Welt die fünfthäufigste Todesursache infolge einer Krebserkrankung (Jemal et al., 2003). Nach Diagnosestellung überleben nur 15 bis 20 % der Patienten das erste Jahr, die 5-Jahres Überlebensrate liegt unter einem Prozent (Brand und Tempero, 1998).

Operative Therapie

Die einzig kurative Therapie besteht in der vollständigen Resektion, die in Form einer partiellen Duodenopankreatektomie (Whipple'sche Operation) durchgeführt wird. Die kurative Resektion ist nur bei 10 bis 15 % der dukталen Karzinome möglich (Rosewicz und Wiedenmann, 1997). Auch nach primär kurativer Resektion treten häufig Metastasen oder Lokalrezidive auf (mediane Überlebenszeit nach RO-Resektion zwischen 12 und 18 Monaten (Heidemann und Bokemeyer, 1998). Daher werden adjuvante Therapiekonzepte im Rahmen von Studien untersucht. Bisher liegen keine Daten vor, die den Nutzen einer adjuvanten Therapie belegen. So gibt es für die intraoperative adjuvante Strahlentherapie und die postoperative adjuvante Chemo- oder Radiochemotherapie bisher keine gesicherte Indikation.

Chemotherapie

Palliative Operationen werden zur Herstellung der Magen-Darm-Passage oder des Gallenabflusses vorgenommen. Für eine palliative Chemotherapie stellt Gemcitabin (Remissionsrate 5-14 %) das Zytostatikum der Wahl dar. (Tumorzentrum-München, 2001). Es existieren zurzeit keine einheitlichen Empfehlungen zur Indikation für eine systemische Chemotherapie für das lokal fortgeschrittene, metastasierte Karzinom des exokrinen Pankreas. Die bisher angewandten therapeutischen Strategien sind unzureichend. Die Etablierung einer alternativen, auf immunologischen Ansätzen basierenden Therapieform könnte die dritte Säule neben der Operation und der Chemotherapie darstellen.

Immuntherapie

Da die im Vorfeld bereits angeführten etablierten Therapieformen zur Behandlung des Pankreaskarzinoms zu eher unbefriedigenden Ergebnissen führen, werden zunehmend Hoffnungen in die dendritische Zell-basierte Immuntherapie gesetzt. Dendritische Zellen sind hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen, welche in der Lage sind, antigenspezifische Immunantworten zu initiieren und zu regulieren. Diese Fähigkeit kann genutzt werden, um Immunantworten gegen bestimmte Proteine von Tumorzellen zu generieren und somit das Malignom mit Hilfe des körpereigenen Immunsystems spezifisch anzugreifen. In klinischen Studien wurde die prinzipielle Wirksamkeit einer Vakzinierung mit dendritischen Zellen bezüglich immunologischer und in Einzelfällen klinischer Endpunkte belegt. Bis sich diese Form der Krebsbehandlung als dritte Säule neben Operation und Chemotherapie etablieren kann, ist jedoch weiterhin eine intensive Grundlagenforschung von Nöten.

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen zeichnen sich durch einzigartige Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen, eine effektive und spezifische Immunantwort gegen eindringende Pathogene zu induzieren. Vereinfacht lässt sich die häufig propagierte „Wächterfunktion“ der dendritischen Zellen wie folgt zusammenfassen: Dendritische Zellen liegen in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers in einem dichten Netzwerk vor und analysieren ihre Umgebung, indem sie extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen, diese prozessieren und als Peptide durch Major Histocompatibility Complex- (MHC)-Oberflächenmoleküle zu präsentieren. Potenzielle antigene Bestandteile der Umgebung werden somit „sichtbar“ für T-Zellen gemacht, die erst durch Präsentation prozessierter Peptide im MHC-Kontext in der Lage sind, Antigene zu erkennen. Kontakt mit einem Gefahrensignal veranlasst die dendritischen Zellen, das Gewebe zu verlassen und in den drainierenden Lymphknoten auszuwandern. Dort interagieren sie in sogenannten T-Zell-Arealen mit T-Zellen. In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad sind sie in der Lage, entweder Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen zu induzieren oder eine spezifische T-Zell-Immunantwort zu initiieren. Neben der Fähigkeit eine adaptive Immunantwort zu induzieren sind dendritische Zellen ferner in der Lage, unmittelbar auf einen pathogenen Stimulus durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zu reagieren. So tragen sie auch dazu bei, dass weitere Immunzellen zum Fokus der Infektion rekrutiert und Effektorzellen der angeborenen Immunität aktiviert werden (Mellman et al., 2001).

1.3.1 Subtypen dendritischer Zellen

Seit ihrer Erstbeschreibung durch Steinman et al. hat sich gezeigt, dass dendritische Zellen keine homogene Population von Zellen darstellen, da sie sich in Ursprung und Stadien der Differenzierung unterscheiden und weiterhin durch unterschiedliche spezifische Funktionen und migratorische Profile charakterisiert sind. Im humanen System geht man zurzeit von drei verschiedenen Typen dendritischer Zellen aus, die jedoch alle der pluripotenten

CD34(+) Knochenmarkszelle entstammen (Shortman und Liu, 2002). Unterschieden wird zwischen einem myeloiden Differenzierungsweg zu entweder CD14(+), CD11(+) Monozyten oder zu CD14(-), CD11(+) Zellen und einem lymphoiden Differenzierungsweg zu CD14(-), CD11(-) Vorläuferzellen (Hart, 1997).

Dendritische Zellen myeloiden Ursprungs finden sich im humanen System, neben den CD11c(+) Vorläuferzellen des peripheren Blutes, als gewebsständige Zellen in praktisch allen menschlichen Organen. Es lassen sich aus CD34(+) Stammzellen (Cella et al., 1997), CD14(+) Monozyten (Romani et al., 1994) oder aus CD11c(+) Vorläuferzellen des peripheren Blutes (Bernardi et al., 1999) durch Kultur mit verschiedenen Zytokinzusätzen myeloide dendritische Zellen differenzieren und generieren. Während ihres unreifen Stadiums sind diese dendritischen Zellen äußerst effizient in der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Durch Zugabe eines geeigneten Ausreifestimulus sind diese dendritischen Zellen ferner in der Lage, große Mengen an Interleukin-12 (IL-12) zu produzieren, welches schließlich naive CD4(+) T-Zellen in Interferon- γ (IFN- γ)-produzierende TH1-Zellen polarisiert (Guermontprez et al., 2002). Die Möglichkeit, diese dendritischen Zellen in großen Mengen und in relativ kurzer Zeit *in vitro* zu generieren und ihre grosse immunstimulatorische Fähigkeit, machen sie zu einer interessanten therapeutischen Option als „natürliches Adjuvans“. Myeloide dendritische Zellen werden daher zurzeit in zahlreichen klinischen Studien als zelluläres Impfadjuvans in verschiedenen Strategien der therapeutischen Vakzinierung gegen Tumore eingesetzt (Fong et al., 2000).

Im Jahre 1994 gelang es Steinman, zwei unterschiedliche Subpopulationen CD11c(+) und CD11c(-) von CD4(+) primären dendritischen Zellen im peripheren Blut zu identifizieren (Steinman und Cohn, 1973; O` Doherty et al., 1994). Liu und Mitarbeiter konnten schließlich 1997 zeigen, dass der plasmazytoide Monozyt identisch ist mit dem schon 1994 beschriebenen *lineage*-negativen, CD4(+) und CD11c(-) dendritischen Zell-Vorläufer des peripheren Blutes (Liu et al., 1997; Grouard et al., 1997).

Es stellte sich heraus, dass IL-3 den entscheidenden Überlebens- und Differenzierungsfaktor für diese Zellpopulation darstellt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde schließlich von Olweus gezeigt, dass plasmazytoide Zellen durch die Expression der IL-3-Rezeptorkette α identifiziert werden können (Olweus et al., 1997). Die plasmazytoiden dendritischen Zellen, auch „lymphoide“ dendritische Zellen genannt, nehmen keine antigenpräsentierende Funktion wahr, sondern produzieren nach Stimulation und Ausreifung IFN- α (Cella et al., 1999).

Epidermale dendritische Zellen oder Langerhans-Zellen (LC) entstehen aus den CD14(+) lymphoiden Vorläuferzellen (Ito et al., 1999). Sie bilden im Zusammenspiel mit den dermalen dendritischen Zellen ein Immun-Überwachungsnetzwerk für die Haut. Langerhans-Zellen besitzen eine einzigartige trilaminäre Zytoplasmastruktur, die als Birbeck-Granula bezeichnet wird und exprimieren Langerin, ein Typ II-Lektin, das an Mannose binden kann. Desweiteren ist die Langerhans-Zelle durch die Expression von CD1a, MHC II, CD32, CD11b gekennzeichnet. Die Funktion sowohl der Langerhans-Zelle als auch der dermalen dendritischen Zelle kann indirekt durch eine ganze Reihe von Zytokinen moduliert werden, die von Keratinozyten produziert werden (Luger et al., 1996) oder direkt durch Pathogene.

1.3.2 Migration, Reifung und T-Zellaktivierung

Eine wichtige Eigenschaft dendritischer Zellen ist ihre Mobilität (Austyn et al., 1988). Neu gebildete dendritische Zellen migrieren vermutlich durch das Blut vom Knochenmark zu nicht-lymphatischem Gewebe, wo sie unter Umständen sesshaft werden. Erreichen sie Signale von Chemokinen, so können sie aufgrund bestimmter Chemokinrezeptoren (CCR) reagieren und an der Lokalisation der Antigenerkennung sehr rasch akkumulieren (innerhalb einer Stunde), wie z.B. am Bronchenepithel nach Antigen-Inhalation demonstriert wurde (McWilliam et al., 1994; McWilliam et al., 1996). Die Migration dendritischer Zellen erfolgt stufenweise, wobei jede Stufe durch ein spezifisches Chemokin-Chemokinrezeptor-Paar reguliert wird. So gilt RANTES

(regulated on activation, normal T-expressed and secreted) als Ligand für die auf unreifen dendritischen Zellen exprimierte Chemokinrezeptoren 1 und 5 (CCR 1, CCR 5) und das MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) als Ligand für den Chemokinrezeptor CCR1 sowie das monocyte chemoattractant protein als Ligand für CCR 2. Unreife dendritische Zellen sind im Bezug auf die Antigen-Aufnahme sehr effizient und bedienen sich dazu verschiedener Möglichkeiten: der Macropinozytose, der Rezeptor-medierte Endozytose und der Phagozytose von Partikeln apoptotischer und nekrotischer Zellfragmente, Viren und Bakterien, aber auch intrazellulärer Parasiten, wie *Leishmania major* (Moll, 1993).

Kontakt mit einem Antigen bzw. Pathogen veranlasst die unreife dendritische Zelle, sich phänotypischer und funktioneller Veränderungen zu unterziehen, die in einem kompletten Wandel von der Antigen-aufnehmenden Zelle zur Antigen-präsentierenden Zelle (APC) gipfelt. Die Reifung dendritischer Zellen ist eng verbunden mit ihrer Migration vom peripheren Gewebe zu ihren drainierenden lymphatischen Organen. Es handelt sich dabei um einen kontinuierlichen Prozess, der in der Peripherie durch Kontakt mit Antigen und/oder Zytokinen, wie sie typischerweise bei Entzündungen freigesetzt werden, ausgelöst wird und erst während der dendritische Zell-T-Zell-Interaktion vervollständigt wird. Verschiedene Faktoren induzieren die Reifung dendritischer Zellen. Hierzu gehören pathogen-verwandte Moleküle, wie z. B. Lipopolysaccharide (Rescigno et al., 1999), bakterielle DNA (Hacker et al., 1998; Hartmann et al., 1999), doppelsträngige RNA (Cella et al., 1999) sowie proinflammatorische Signale wie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), IL-1, IL-6, Prostaglandine und zuletzt T-Zell-abgeleitete Signale. Der Reifungsprozess geht mit dem Verlust der Endozytose- bzw. Phagozytose-Rezeptoren, der Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD58, CD80 und CD86), dem Wandel der Morphologie, dem Herunterregulieren von CD68 und dem Hochregulieren von dendritische Zell-Lysosom-assoziierten Membranproteinen sowie dem Wandel der MHC-II-Kompartimente einher.

Nach Aktivierung und der sich anschließenden Reifung verändern die dendritischen Zellen ihre Chemokinrezeptorenexpression (Dieu et al., 1998) und wandern daraufhin über das Lymphsystem zu den drainierenden Lymphknoten (Sozzani et al., 2000). Eine bedeutende Rolle nimmt hierbei der CCR 7 ein, der auf die Chemokine MIP-3 β und das secondary lymphoid-tissue chemokine reagiert, die unter anderem in lymphatischen Gefäßen (Saeki et al., 1999) und den parakortikalen Arealen der Lymphknoten nachgewiesen werden können (Sallusto et al., 1998; Dieu et al., 1998). Hier angelangt präsentieren die dendritischen Zellen die prozessierten Antigene den dort befindlichen T-Zellen.

Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen beinhaltet das Binden der Rezeptoren auf der Zelloberfläche an ihre Liganden welche für die Spezifität, Adhäsion und die Regulation der T-Zellproliferation durch kostimulatorische und inhibierende Moleküle verantwortlich sind. Gelöste Mediatoren stimulieren die Proliferation der T-Zellen. Das Antigen, das als MHC-Peptid-Komplex präsentiert wird, bestimmt die Spezifität der T-Zell-Antwort. Der Kontakt zwischen dendritischer- und T-Zelle wird durch Adhäsionsmoleküle erleichtert, wie zum Beispiel den Integrinen und Teilen der Immunglobulin-Superfamilie (CD54 und CD58). DC-SIGN (DC-specific ICAM-grabbing non-integrin) ist ein Typ-C-Lektin, das reichlich auf dendritischen Zellen exprimiert wird und die Adhäsion an T-Zellen fördert und den dendritischen Zell-T-Zell-Kontakt stabilisiert (Geijtenbeek et al., 2000a und 2000b). Kostimulatorische Moleküle wie das CD86 verstärken die T-Zell-Antwort (Caux et al., 1994; Inaba et al., 1994), welche aber im Gegenzug durch regulatorische Inhibitoren wie das Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4 abreguliert werden können (Egen et al., 2002; Greenwald et al., 2002). Neben den spezifischen Signalen, die durch MHC-Peptid-Komplexe und regulatorische Signale via kostimulatorische Komplexe zustande kommen, haben dendritische Zellen ferner die Möglichkeit ein drittes Signal auszusenden, das eine Information über die unmittelbare Umgebung enthält. Dieses Signal polarisiert die T-Helferzellen in Richtung Th1- oder Th2- Antwort (Liu et al., 2001). Die Th1-Zellproliferation wird durch Präsenz zahlreicher Zytokine begünstigt, wie zum Beispiel IL-12, IFN- α , IL-18, IL-23 und IL-27 (Brombacher et al., 2003).

Zusätzlich kann das Ansprechen der T-Zellen auf Zytokine noch durch den Aktivierungsgrad der dendritischen Zellen, der Menge des Antigens, der Stärke der dendritischen Zell-T-Zell-Interaktion, dem Verhältnis von dendritischen Zellen und T-Zellen sowie dem Typ der dendritischen Zelle beeinflusst werden (Pulendran et al., 2001).

1.3.3 Antigen-Präsentation

1.3.3.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex I / Major Histocompatibility Complex I

Um CD8(+)-zytotoxische T-Killerzellen zu aktivieren, können sich dendritische Zellen zur Antigen-Präsentation auf Haupthistokompatibilitätskomplex I (Major Histocompatibility Complex I (MHC-I))-Molekülen sowohl des endogenen als auch des exogenen Signalweges bedienen (Pamer und Cresswell, 1998; Rock und Goldberg, 1999). Der endogene MHC-I-Signalweg funktioniert über den Abbau zytosolischen Proteins und die Beladung von Peptiden auf neusynthetisierte MHC-I-Moleküle innerhalb des endoplasmatischen Reticulums. Antigen-Prozessierung findet das erste Mal in Zytosol statt, vermittelt durch ein ATP-abhängiges proteolytisches System, das mit der Ubiquitin-Konjugation beginnt. Die ubiquitinilyrten Proteine werden zum Proteosom dirigiert, welches die Proteine in Peptide aufspaltet. Anschließend werden die Peptide ATP-abhängig in das endoplasmatische Reticulum transloziert und in Oktamere bzw. Dimere zerkleinert, welche sich der Bindungsstelle der MHC-I-Moleküle anpassen.

1.3.3.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex II / Major Histocompatibility Complex II

Lösliche und partikuläre Antigene werden auf sehr effiziente Art und Weise von unreifen dendritischen Zellen aufgenommen und zu den Haupthistokompatibilitätskomplex II (Major Histocompatibility Complex II (MHC-II))-Kompartimenten dirigiert (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Engering et al., 1997; Inaba et al., 1997 und 1998; Tan et al., 1997).

Unreife dendritische Zellen häufen konstant MHC-II-Moleküle in Lysosom-verwandten intrazellulären Kompartimenten an, die als MHC-II-reiche Kompartimente bezeichnet werden. Der proteolytische Abbau des Antigens wird durch das Verhältnis zwischen Cathepsin-S und seinem Endogen-Inhibitor Cystatin-C reguliert (Pierre und Mellmann, 1998). Während der Reifung wird Cystatin-C herunterreguliert und die Aktivität von Cathepsin-S nimmt zu, was zu einem verstärkten Antigen-Abbau und der Ausschleusung Peptid-beladener Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche führt, wo diese über Tage hinweg stabil und für die Erkennung durch CD4(+)-T-Zellen verfügbar bleiben (Cella et al., 1997; Inaba et al., 1997; Pierre und Mellmann, 1997; Winzler et al., 1997).

1.3.3.3 Kreuz-Präsentation und Klasse-I-Präsentation exogener Antigene

Antigen-Präsentierende Zellen (APC) präsentieren gewöhnlich exogenes antigenes Peptid auf MHC-II-Molekülen, wohingegen endogenes Antigen (Eigenkomponenten oder Virusmaterial) auf MHC-I-Molekülen präsentiert wird. Über einen bisher nur teilweise bekannten Mechanismus können dendritische Zellen diese Eigenschaften umgehen. Durch Kreuz-Präsentation kann somit exogenes Antigen auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden (Kurts et al., 2001; Belz, 2002). Damit kann beispielsweise eine antivirale, zytotoxische T-Zell-Antwort induziert werden, ohne dass die APC selbst vom Virus infiziert ist.

1.3.4 Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen

Im Lymphknoten interagieren dendritische Zellen mit verschiedenen Lymphozytenpopulationen, die über high endothelial venules in die Lymphbahnen gelangen. Vor allem naive T-Lymphozyten (CD45RA*), die also bisher keinen Antigenkontakt hatten, tasten die Oberfläche des MHC-I-Peptid-Komplexen der dendritischen Zellen ab und werden aktiviert, falls es zu einer Erkennung des präsentierten Antigens durch den T-Zell-Rezeptor kommt und zusätzlich eine ausreichende Kostimulation erfolgt. Dieser für die erworbene

(antigenspezifische) Immunantwort zentrale Vorgang betrifft sowohl CD4(+)-T-Zellen (der Vorstufe von Helferzellen) als auch CD8(+)-T-Zellen und wird als Priming bezeichnet. Die Fähigkeit, naive CD4(+)-T-Zellen zu primen, ist einzigartig, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Im Mausmodell induzierten dendritische Zellen, die mit gelöstem Antigen gepulst wurden eine wirksame Antigen-spezifische T-Helfer-Antwort (Inaba et al., 1990). Die Demonstration der dendritische Zell-T-Helferzell-Interaktion in den periarteriolen lymphatischen Scheiden durch die Immunhistologie legt eine direkte Antigen-Präsentation durch gepulste dendritische Zellen nahe (Ingulli et al., 1997). In Anwesenheit freien Antigens sind durch dendritische Zellen geprimte T-Helferzellen in der Lage, mit B-Zellen zu interagieren und eine Antigen-spezifische Antikörperproduktion zu stimulieren (Somasse et al., 1992). Das Ausmaß der CD4(+)-T-Helferzellproliferation und Antikörperantwort konnte *in vivo* durch Zugabe einer größeren Anzahl dendritischer Zellen dramatisch gesteigert werden (Pulendran et al., 1998). Die starke Immunogenität der dendritischen Zellen kann in einer Aufhebung peripherer T-Zell-Toleranz gegen lösliche Antigene (Pulendran et al., 1998), virale Antigene (Shimizu et al., 1998), Tumoren (Gong et al., 1998) und Transplantations-Antigene (Steptoe et al., 1997) resultieren. Neben dem Priming von CD4(+)-Zellen sind dendritische Zellen ebenso wichtig beim Primen naiver CD8(+)-T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen *in vitro* die Proliferation allogener CD8(+)-T-Zellen (Inaba et al., 1987) stimulieren konnten, auch in der Abwesenheit von T-Helferzellen (Young und Steinman, 1990; McCoy et al., 1999). Obwohl dendritische Zellen in der Lage sind, CD8(+)-T-Zellen direkt zu aktivieren (Young et al., 1990; Bhardwaj et al., 1994; Bohm et al., 1995), benötigen sie häufig die Hilfe von CD4(+)-T-Helferzellen. Laut momentan gängiger Modelle (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998) sind APCs in der Lage, T-Killerzellen durch T-Helferzellen via Hochregulierung des CD40-Liganden auf dendritischen Zellen zu aktivieren. Folglich werden sie zu einer temporären Brücke zwischen CD4(+)-T-Helferzelle und T-Killerzelle. Desweiteren scheinen die dendritischen Zellen essentiell für das Überleben von CD4(+)-T-Helferzellen (Brocker, 1997) und die Aufrechterhaltung eines immunologischen T-Zell-Gedächtnisses (Ludewig et al., 1999) zu sein.

1.3.5 Dendritische Zellen und Toleranz

Dendritische Zellen sind auch befähigt, Immuntoleranz zu induzieren. Hierbei muss die zentrale von der peripheren Toleranz unterschieden werden. Dendritische Zellen im Thymus überprüfen dort gebildete T-Zellen auf ihre Spezifität zur Antigen-Erkennung und leiten bei T-Zellen, die potentiell körpereigenes Antigen erkennen, die Apoptose ein. Dendritische Zellen des Thymus unterscheiden sich von denen der Peripherie. Sie werden aus Vorläuferzellen des Thymus gebildet und reifen und sterben im Thymus. Außerdem ist ihre Fähigkeit zur Migration eingeschränkt, da ihre Aufgabe weniger die Suche und Aufnahme von Fremd-Antigen ist, sondern die Präsentation von Eigen-Antigen. Doch auch dendritischen Zellen der Peripherie müssen befähigt sein, Toleranz zu induzieren, da jede Aufnahme von Fremd-Antigen gleichzeitig mit einer Aufnahme von Eigen-Antigen einhergeht. Ob dendritische Zellen Toleranz oder Immunität induzieren, hängt von ihrem Aktivierungsgrad ab (Steinman et al., 2003). Vollständig aktivierte dendritische Zellen beenden die Antigen-Aufnahme und spezialisieren sich auf die Präsentation des Antigens. Deshalb exprimieren sie hohe Mengen an MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen, auf denen die Peptide gebunden sind. Toleranz-induzierende dendritische Zellen sind ebenfalls reif, aber inaktiv (quiescent DCs). Sie sind in der Lage, Antigen aufzunehmen und exprimieren nur geringe Mengen an MHC-II. Die Induktion einer adaptiven Immunantwort wird erst dadurch erreicht, dass T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen auf den dendritischen Zellen im MHC-Kontext erkennen (Signal I), durch kostimulatorische Moleküle der dendritischen Zellen aktiviert werden (Signal II). Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass die Induktion einer effektiven T-Zell-vermittelten Immunantwort entscheidend durch das kostimulatorische Potential dendritischer Zellen bestimmt wird. Unreife dendritische Zellen liefern den T-Zellen lediglich das spezifische Antigen (Signal I) ohne adäquate Kostimulation (Signal II), sodass Toleranz bzw. Anergie gegenüber diesem Antigen induziert wird (Dhodapkar et al., 2001). Erst durch voll ausgereifte dendritische Zellen, die zusätzlich ein adäquates zweites Signal bieten, kommt es zu einer effektiven T-Zell-vermittelten Immunantwort (Shortman und Heath, 2001).

1.3.6 Dendritische Zellen in der Tumorthherapie

Versuche der unspezifischen Stimulation des Immunsystems mit Bacille Calmette-Guerin, einem schwach virulenten Stamm von *Mycobacterium bovis*, Mistelextrakten, Interferonen oder IL-2, blieben allesamt ohne bzw. ohne durchschlagenden Erfolg (Bröcker et al., 1999). Bei den Strategien, die auf eine spezifische Stimulation des Immunsystems abzielen, setzen einige Arbeitsgruppen auf die "adoptive T-Zell-Therapie". Dabei findet eine *ex vivo*-Selektion und Expansion von Antigen-spezifischen T-Zell-Klonen mit anschließender bis zu viermaliger Applikation statt. Neben der begrenzten therapeutischen Effizienz besteht die Schwierigkeit eine ausreichende Menge spezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTL) *in vitro* herzustellen.

Die einzigartige Fähigkeit der dendritischen Zellen, eine primäre Immunantwort zu induzieren und aufrecht zu erhalten, machen sie zu potentiellen Kandidaten für Tumor-Vakzine Protokolle (Steinman et al., 1997; Nair et al., 1999; Timmermann et al., 1999). Hierbei existiert zum einen die Möglichkeit durch *in vivo*-targeting von dendritischen Zellen das Antigen durch Inkorporation in einen monoklonalen Antikörper für einen auf dendritischen Zellen reichlich vorkommenden Endozytose-Rezeptor „passend“ zu machen und dadurch eine Steigerung der Effizienz bei der Präsentation des Antigens durch die dendritischen Zellen zu bewirken. Zum anderen besteht die Möglichkeit der Applikation von *in vitro*-gezüchteten und mit Antigen beladenen dendritischen Zellen. *In vitro* aus Monozyten generierte dendritische Zellen sind in der Lage, Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und nach ihrer Ausreifung durch mikrobielle Stimulation oder nach Aktivierung mit körpereigenen, entzündungsfördernden Mediatoren (z.B. TNF- α , IFN- γ) das Antigen zu präsentieren. Durch Präsentation antigener Peptide über MHC-I-Moleküle können sie eine spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort und über MHC-II-gebundene Peptide eine T-Helferzell-Antwort induzieren. Die Fähigkeit *in vitro*-generierter dendritischer Zellen, eine spezifische, antitumorale Immunantwort zu induzieren, ist im Tiermodell und in klinischen Studien nachgewiesen worden, ohne dass über schwere Nebenwirkungen berichtet wurde

(Fong et al., 2000; Nestle et al., 1998; Schuler-Thurner et al., 2000; Fong et al., 2001; Banchereau et al., 2001).

Tumor-assoziierte Antigene (TAA) können dendritischen Zellen als Peptide bekannter Sequenz, autologe und allogene Tumorzellpräparationen, Fusionszellen aus allogenen dendritischen Zellen und autologen Tumorzellpräparationen, Tumorzell-RNA, für spezifische Antigene codierende RNA und virale Vektoren dargeboten werden. Nestle berichtete erstmals über die erfolgreiche Tumorthherapie von einzelnen Patienten mit metastasiertem Melanom, denen autologe dendritische Zellen, die mit Tumorzelllysate inkubiert worden waren, appliziert wurden (Nestle et al., 1998). Im Gegensatz zu anderen Malignomen stellt das Pankreaskarzinom keinen hoch immunogenen Tumor dar. Allerdings sind zahlreiche TAAs bekannt (CA19-9, Span-1, Dupan-2, CA50 und andere), ein häufig nachweisbares Onkoprotein (K-ras Mutationen) und onkofetale Antigene (CEA, pankreatisches onkofetales Antigen), die theoretisch alle Angriffspunkte für CTL bieten könnten (Brossart et al., 1999; Gjertsen et al., 1997).

Die Hauptziele von Krebs-Immuntherapien sind die Tumorzellimmunogenität zu erhöhen und das Immunsystem zu stimulieren. Wie bereits Studien am Tiermodell zeigten (Flamand et al., 1994; Specht et al., 1997; Toes et al., 1998), waren mit geeigneten TAA beladene dendritische Zellen in der Lage, eine protektive bzw. Abstoßungsimmunreaktion zu induzieren. Vielversprechende Ansätze liefern auch Studien, die am Menschen durchgeführt wurden (Hsu et al., 1996; Nestle et al., 1998; Dhodapkar et al., 1999; Murphy, 1999). Zunächst erscheint die Frage berechtigt, warum derzeit so grosse Hoffnungen in die Immuntherapie durch *in vitro*-gezüchtete dendritische Zellen gesetzt werden, wenn ein Tumor doch *in vivo* durch die Gewebsschädigung die ortsständigen dendritischen Zellen aktiviert haben sollte. Eben dies scheint jedoch bei vielen Tumoren nicht stattzufinden, da sie in der Lage sind durch verschiedene „Escape-Mechanismen“ das System zu unterlaufen (s. 1.4.). Unter anderem unterbinden verschiedene von den Tumorzellen produzierte Zytokine die Reifung und Differenzierung dendritischer Zellen.

Einmal ausgereifte dendritische Zellen sind allerdings gegenüber Wirkungen bislang bekannter hemmender Zytokine resistent (Steinbrink et al., 1997). Die Hoffnung ist also berechtigt, dass *in vitro*-ausgereifte und mit Tumorantigen beladene dendritische Zellen nach Applikation spezifische Immunantworten induzieren, wozu das dendritische Zell-System des Patienten-Organismus selber nicht oder nicht mehr fähig ist.

In den bisherigen Studien wurden zwischen 100 000 und 100 Mio. dendritische Zellen pro Vakzinierung eingesetzt. Es wurden auch unterschiedliche Applikationsarten gewählt: Subkutan oder intrakutan gespritzte dendritische Zellen müssen für eine Interaktion mit T-Zellen in der Lage sein, einen drainierenden Lymphknoten aufzusuchen; durch die direkte intranodale Injektion, zum Beispiel in einen Leistenlymphknoten, soll die Notwendigkeit der Migration umgangen werden. Intravenös verabreichte dendritische Zellen reichern sich zunächst im Kapillargebiet der Lunge und der Leber an, bevor sie die Gelegenheit haben, lymphatisches Gewebe zu erreichen.

1.4 Tumorgenese- und progredienz begünstigende Faktoren

1.4.1 Apoptoseresistenz

Die Apoptose stellt einen aktiven und wohldefinierten Prozess dar, der an der Regulation und Aufrechterhaltung der Zellpopulationen in Geweben, sowohl bei physiologischen, als auch bei pathologischen Prozessen massgeblich involviert ist und zur Differenzierung und Formung von Geweben und Organen beiträgt. Der entscheidende Unterschied zur Nekrose besteht im Ausbleiben einer Entzündungsreaktion. Insgesamt besitzen apoptotische Prozesse eine weite biologische Signifikanz, die eine wichtige Rolle unter anderem bei Eliminierung mutierter Zellen aufweist. Störungen werden als Ursache vieler pathologischer Zustände diskutiert, u.a. sind Zellakkumulation und Therapieresistenz bei malignen Tumoren durch eine erniedrigte Apoptosetendenz bedingt.

1.4.1.1 Regulation und Induktion der Apoptose

Auslösung der Apoptose kann durch verschiedene Stimuli, die sowohl aus dem extrazellulären, z.B. durch Ligation eines des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche (Ashkenazi, 2002) aber auch aus dem Zytosol, z.B. durch DNA-Schäden infolge des Einwirkens von Zytostatika oder Bestrahlung, durch Apoptosesignale oder das Fehlen von Signalen zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels stammen können, erfolgen. Ein Großteil der Apoptose-induzierenden Faktoren löst einen Zusammenbruch des Membranpotentials und einen Anstieg der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran aus, was zu einer osmotisch bedingten Größenzunahme des Mitochondriums und letztendlich zur Ruptur der Außenmembran führt. Die nachfolgende Freisetzung von proapoptotischen Proteinen (Bernardi et al., 1999; Loeffler und Kroemer, 2000) führt zur Bildung des Apoptosoms, einem Komplex mit zahnradähnlicher Struktur (Acehan et al., 2002), das die Caspasekaskade aktiviert (Slee et al., 1999). Parallel kommt es zu einem Abfall der biochemischen Homeostase der Zelle. Die ATP-Synthese sinkt, Redox-Systeme werden oxidiert, reaktiver Sauerstoff wird frei (Kroemer et al., 1997 und 2000). Die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Fettsäuren stellt die letzte Stufe auf dem Weg zur Apoptose dar.

Eine sehr wichtige Funktion bei der Elimination maligner transformierter Zellen besitzt das p53-Tumorsuppressor-Protein. Ihm wird bei der Tumorgenese (und dem Ansprechen auf Chemotherapie eine Schlüsselrolle zugeschrieben. So liegt in 50% aller Krebsfälle ein inaktiviertes Supressor-Gen vor (Hainaut und Hollstein, 2000). p53, das in gesunden Zellen strikter Kontrolle unterliegt wird durch Onkogen-Aktivierung, Hypoxie, DNA-Schaden und Zytostatika, was zu Zellzyklusarrest und/oder Apoptose durch Stimulation der Expression verschiedener p53 Zielgene wie CD95 (Vousden und Lu, 2002) oder zur Unterdrückung der Expression antiapoptotischer Proteine (Wu et al., 2001), (Hoffman et al., 2002) führt, aktiviert.

Daneben sind die Bcl-2-Proteine von zentraler Bedeutung für die Apoptose. Ihrer Funktion entsprechend lassen sich proapoptotische BH1-BH3, z.B. Bax und Bak, sowie in BH3-only und antiapoptotische BH1-BH4 klassifizieren (Borner, 2003; Cory und Adams, 2002; Mund et al., 2003). Proapoptotische Bax und Bak sind nur in Kombination erfolgreich. Zellen ohne Bax u. Bak zeigen keine Sensitivität gegen Zytostatika und Bestrahlung (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert sowohl antiapoptotische, aber u.U. auch proapoptotische Proteine und Faktoren (CD95L, CD95). Bei Inhibition von NF- κ B parallel zur Chemotherapie konnte ein gesteigerter zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden, d.h. NF- κ B muss ebenfalls als wichtiger Faktor bei der induzierbaren Chemoresistenz angesehen werden. Abschliessend sei noch die Inhibition der Caspasen-Aktivierung als wichtiger Grund für defiziente Chemo-Sensitivität genannt.

1.4.2 Tumor-Escape Mechanismen

Das Immunsystem hat grundsätzlich die Möglichkeit, neoplastische Zellen zu eliminieren, wie durch spontane Remissionen bei Nierenzellkarzinomen und Melanomen bestätigt wird (Bell et al., 1999; Palucka et al., 1999; Timmermann und Levy, 1999). Die Induktion der Tumormunität kann durch die Effektoren des angeborenen Immunsystems eingeleitet und durch Zellen des adaptiven Immunsystems weiterentwickelt werden, wobei dendritischen Zellen eine zentrale Rolle zugeschrieben wird. Verschiedene Mechanismen sind dabei involviert: Die Aufnahme und Kreuz-Präsentation von freigesetzten TAAs durch unreife dendritische Zellen, das direkte und IFN- γ -medierte Abtöten transformierter Zellen durch dendritische Zell-aktivierte NK und NK-T-Zellen, die Selektion und Aktivierung von TAA-spezifischen T-Zellen und zuletzt die zielsuchenden TAA-spezifischen T-Zellen, die sich im Tumor befinden und nach Erkennen der Restriktionselemente die Lyse der Tumorzellen einleiten.

Tumore können auf allen genannten Ebenen dem Immunsystem entkommen (Bell et al., 1999; Palucka et al., 1999). Malignomzellen sind durch das Freisetzen von Zytokinen, wie z. B. IL-6, IL-10, MCSF, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PGE2 (Prostaglandin E2) sowie TGF- β (Tumor Growth Factor β) (Torre-Amione et al., 1990; Tada et al., 1991) in der Lage, die Reifung und Differenzierung dendritischer Zellen und die APC-Funktion zu behindern bzw. gänzlich zu unterbinden (Gabrilovich et al., 1996). Desweiteren ist IL-10 befähigt, die APC-Funktion zu verändern und eine Antigen-spezifische Anergie zu induzieren, die zu einem Toleranzzustand gegen Tumorgewebe führt (Enk et al., 1994 und 1997; Steinbrink et al., 1999). Einige Tumoren können durch Blockierung der IL-2 Produktion T-Zellen an ihrer Proliferation hindern (Rayman et al., 2000).

Eine verminderte MHC-Expression auf Tumorzellen verschlechtert die Eliminierung durch CTL (Alexandroff et al., 2000; Gilboa, 2001). Ein Restbestand an MHC-Molekülen bleibt jedoch meist bestehen, da die

Tumorzellen sonst dem Angriff von NK-Zellen ausgesetzt sind. Daneben kann auch die Prozessierung von Antigen durch Blockade des TAP-Transporters durch Mutationen (Ferrone und Marincola, 1995; Seliger et al., 1997) gestört sein oder das Tumorantigen kann durch die verstärkte Expression von Glykokalix-Molekülen maskiert werden (Abbas et al., 1997). Eine weitere Strategie ist eine veränderte oder fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle auf Tumorzellen, was zur klonalen Anergie sowohl der CD8(+)- als auch der CD4(+)-T-Zellen (Alexandroff et al., 2000; Chambers et al., 2001) führen kann. Schliesslich hat eine verminderte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zur Folge, dass das Immunsystem den Tumor erst wahrnimmt, wenn er bereits ein beträchtliches Ausmaß erreicht hat (Piali et al., 1995; Fenton und Longo, 1997).

1.5 Cyclooxygenase

1.5.1 Die Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX-1 / COX-2)

1988 klonierten drei verschiedene Arbeitsgruppen ein Gen, das die Cyclooxygenase codiert, welche sich später als die konstitutive Isoform COX-1 (DeWitt und Smith, 1988; Merlie et al., 1988; Yokoyama et al., 1988) herausstellen sollte. Etwas später wurde die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase entdeckt und COX-2 genannt (O'Banion et al., 1991 und 1992; Hla und Neilson, 1993; Jones et al., 1993). Trotz vieler Gemeinsamkeiten sind das Expressionsmuster und die Regulation dieser zwei Isoformere verschieden (Gilroy und Colville-Nash, 2000). Neben einigen Ausnahmen könnte man COX-1 als das konstitutiv exprimierte Enzym ansehen, das in nahezu allen Geweben mit konstantem Spiegel und Aktivität zu finden ist, während die COX-2 die induzierbare Form der Cyclooxygenase repräsentiert. Die COX-2-Expression ist niedrig oder negativ in den meisten Geweben. Ausnahmen, welche konstitutiv hohe Spiegel von COX-2 enthalten, bilden lediglich Teile des ZNS beim Schmerzempfinden und Regulation der Körpertemperatur (Khan et al., 2001a und 2001b), die Niere bei der Kaliumregulation und erhöhter Perfusion (Ek et al., 2001) und die Samenblase sowie die Follikel des Ovars während der Implantation (Lim et al., 1997).

1.5.2 Cyclooxygenase-2-Expression in Tumoren

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass unter Einfluss von Zytokinen, wie sie bei Entzündungsreaktionen vorkommen (z. B. TNF, IL-1, IL-6), die COX-2-Expression hochreguliert wird. Jedoch stellte erst im Jahre 1994 Eberhart das erste Mal einen Zusammenhang zwischen COX-2-Überexpression und humanem Kolonkarzinom her. Zwei andere Arbeitsgruppen folgten 1995 (Eberhart et al., 1994; Kargman et al., 1995; Sano et al., 1995). In ihren Studien wird die COX-1-Expression sowohl in normalem als auch in kanzerösem Colongewebe als schwach beschrieben, wohingegen die COX-2-Expression nur in den Tumoren beobachtet wurde. Im Mausmodell konnten diese Befunde reproduziert werden (Oshima et al., 1996; Williams et al., 1996). Auch die

Resultate von Studien über andere Krebsarten wie Brust- (Rolland et al., 1998) Haut-(Buckman et al., 1998; Komhoff et al., 2000), Lungen-(Kagoura et al., 2001), Prostata-(Hasturk et al., 2002) und Pankreastumore (Maitra et al., 2002) legen den Verdacht nahe, dass COX-2-Expression in unverändertem Gewebe eher schwach oder negativ ist, wohingegen in kanzerös verändertem Gewebe stark erhöhte Spiegel von COX-2-Proteinen anzutreffen sind.

1.5.3 Die Rolle der Cyclooxygenase-2 in der Karzinogenese von gastrointestinalen Tumoren

1.5.3.1 Das Zusammenspiel von Cyclooxygenase-2 und Angiogenese

Die Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren, ist charakteristisch für die meisten soliden Tumore, die über einen Durchmesser von 2 bis 3 mm hinauswachsen. Es gibt Hinweise, dass die Angiogenese einen nicht unerheblichen Beitrag zur Metastasierung von Tumoren leisten könnte. Tumorangiogenese beinhaltet, wie andere neovaskuläre Formationen auch, die Destabilisierung von vorbestehenden Blutgefäßen, die Proliferation von Gefäßendothelzellen, die Einwanderung von Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix sowie die Migration und Positionierung der Endothelzellen. In der Literatur werden die Co-Lokalisation der Angiogenesefaktoren, wie z. B. VEGF, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) und TGF- β mit COX-2 durch immunohistochemisches Anfärben der Zellen bei verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht (Fosslien, 2001). Bei Mamma- und Zervix-Karzinomen wurde eine verstärkte COX-2-Expression ferner mit einer erhöhten Micro-Vascular-Density und einer sehr schlechten Prognose assoziiert (Visscher et al., 1993; Hockel et al., 2001). Um den Zusammenhang zwischen COX-2 und Angiogenese weiter zu erforschen, demonstrierte Tsujii in einem *in vitro*-Versuch, bei dem Kolonkarzinom-Zelllinien mit Gefäßendothelzellen koinkubiert wurden, dass COX-2 die Angiogenese auf verschiedenen Stufen sowohl direkt als auch indirekt fördert (Tsujii et al., 1998). Die COX-2-Hochregulierung führt zu einer Prostaglandin-Produktion. PGE₂ ist befähigt, *in vitro* Angiogenese zu induzieren und die Apoptoseresistenz zu verstärken, was wiederum in das gängige Modell für die karzinogene Wirkung von COX-2

passt (Fukuda et al., 2003). Neben der indirekten Wirkung der COX-2 auf die Tumorzellen ist das Enzym weiterhin in der Lage, Tumorzellen direkt zu stimulieren und somit zur Produktion von Angiogenesefaktoren anzuregen. Unter COX-2-Einfluss erhöht sich die Gefäßpermeabilität und die Proliferation und Migration von Endothelzellen wird induziert.

1.5.3.2 Cyclooxygenase-medierte Resistenz gegenüber der Apoptose

Eine erhöhte Resistenz gegenüber der Apoptose wurde als ein anderer Hauptmechanismus für den Effekt der COX-2 in der Tumorgenese postuliert. Erste Hinweise kamen durch die Beobachtung zustande, dass COX-Inhibitoren in Zellkulturen Apoptose auslösen konnte (Lu et al., 1995). Seither unterstützen zahlreiche Studien die Vorstellung von einer COX-2-positiven Wirkung auf das Überleben von Zellen, selbst unter ungünstigen Wachstumsbedingungen. Interessanterweise konnte durch Überexpression von COX-1 oder einfach durch Zugabe von PGE₂ in das Kulturmedium auch eine erhöhte Apoptose-Resistenz beobachtet werden. Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass eine erhöhte Prostaglandinproduktion selber zur Apoptose-Resistenz beiträgt (Narko et al., 1997; Sheng et al., 1998).

1.5.4 Tumorspezifische Wirkung der Cyclooxygenase-2-Inhibitoren

Neben der seit dem 19. Jahrhundert bekannten antiphlogistischen Wirkung der NSAR belegen in letzter Zeit verschiedene epidemiologische und randomisierte klinische Studien die Fähigkeit von Aspirin und anderen nicht-steroidalen Antiphlogistika, das Risiko, an kolorektalen Karzinomen oder familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) zu erkranken, deutlich zu senken (Collet et al., 1999; Rodriguez und Huerta Alvarez, 2000; Marnett und DuBois, 2002; Bertagnolli et al., 2003; Huls et al., 2003). Andere epidemiologische Studien belegen die positive Rolle der NSAR in der Tumorprevention und Tumorthherapie bei Tumoren des Ösophagus, des Magens, der Brust (Badawi und Badr 2002), der Lunge, der Prostata, der Blase und des Ovars (Moran et al., 2002; Thun et al., 2002).

Eine der frühesten Beobachtungen bezüglich COX-2 und Angiogenese datiert aus dem Jahre 1997, als der Antitumoreffekt der bis dato existierenden COX-Inhibitoren genau untersucht werden sollte. Seed beobachtete bei dem im Mausmodell eingesetzten unselektiven COX-Inhibitor Diclofenac eine durch Blockierung der Angiogenese vermittelte Hemmung des Wachstums COX-2-positiver Colon-26-Zellen (Seed et al., 1997). Weitere Studien bestätigten den COX-2-Hemmer-spezifischen inhibitorischen Effekt auf die Neubildung von Blutgefäßen (Daniel et al., 1999). Waddell veröffentlichte eine Studie, bei der die Wirksamkeit des NSAR Sulindac im Bezug auf die Regression von rektalen Polypen bei FAP-Patienten belegt wurde (Wadell et al., 1989). Diese Arbeit zog eine Reihe epidemiologischer und klinischer Studien nach sich. Die Resultate der randomisierten, doppel-blinden, placebo-kontrollierten Versuche bei FAP-Patienten schreiben dem Sulindac und dem Celecoxib eine Adenom-regressive Wirkung bei einem Teil der Patienten zu, in anderen Fällen wurde sogar eine komplette Regression beobachtet (Labayale et al., 1991; Giardello et al., 1993; Nugent et al., 1993; Smalley und DuBois, 1997; Steinbach et al., 2000). Andere klinische Studien gehen im Bezug auf die Reduktion der Adenom-Anzahl und der Adenom-Größe konform, weisen jedoch auch auf die Inkonsistenz der Effekte hin (Ruffin et al., 1997; Calaluce et al., 2000; Chow et al., 2000; Baron et al., 2003; Huls et al., 2003; Sandler et al., 2003).

1.6 Pharmakologische Strategien in Kombination mit einer dendritischen Zell-basierten Immuntherapie

Die bereits angeführten Escape-Mechanismen und Defekte bei der CD95-vermittelten Apoptoseinduktion könnten die Effektivität einer auf dendritischen Zell-basierenden Vakzinierung herabsetzen (Zinkernagel, 2001) und es den Tumorzellen ermöglichen, der Lyse durch Antigen-spezifische, zytotoxische T-Zellen zu entgehen. Die Kombination anderer Therapiestrategien wie zum Beispiel Chemotherapie, COX-2-Inhibition oder Bestrahlung mit dendritischer Zell-Immuntherapie könnte nicht nur dienlich sein, die Tumorlast zu reduzieren, sondern auch die Immunresistenz der Tumorzellen zu durchbrechen.

In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Injektion von dendritischen Zellen kombiniert mit Chemotherapie zu einer vollständigen Regression der Tumore führte, die sich gegen eine Monotherapie mit Zytostatika oder dendritischen Zellen therapieresistent zeigten (Tong et al., 2001; Tanaka et al., 2002; Shin et al., 2003). Ein möglicher Mechanismus, der diesen Beobachtungen zugrunde liegen könnte, ist die Antigen-Aufnahme apoptotischer Zellen durch dendritische Zellen, die den mit Zytostatika behandelten Mäusen intratumoral injiziert wurden. Dies könnte zu einer verstärkten Kreuzpräsentation von Tumor-Antigen via MHC-I-Moleküle durch die dendritischen Zellen und einer verstärkten Aktivierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen führen (Albert et al., 1998; Belz et al., 2002; Schnurr et al., 2002; Nowak et al., 2003). Correale konnte in einem dendritischen Zell-basierten *in vitro*-Modell zeigen, dass die Immunogenität von Kolonkarzinomzelle durch Vorbehandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika bei einer durch autologe dendritische Zellen induzierten spezifischen, CD95-vermittelten, zytotoxischen CTL-Lyse im Vergleich zu bestrahlten und unbehandelten Tumorzellen gesteigert werden konnte (Correale et al., 2005). Auch andere Arbeitsgruppen verbesserten die Effizienz ihrer Krebstherapie indem sie Vakzinen mit Zytostatika kombinierten und dadurch eine gesteigerte Tumorprotein-Expression und eine Immun-sensitivierung gegenüber der zytotoxischen Aktivität der *in vitro*-generierten Antigen-spezifischen CTL-Linien bewirkten (Bergmann-Leitner und

Abrams, 2000; Bergmann-Leitner et al., 2001; Correale et al., 2003). Galetto konnte demonstrieren, dass dendritische Zellen, die unter anderem mit Gemcitabin und 5-Fluoruracil inkubierte Tumorzellen aufgenommen hatten, die IL-12-Produktion aufregulierten und Tumor-assoziiertes Antigen mit höherer Effizienz präsentierten, als dendritische Zellen, die mit unbehandelten Zellen beladen worden waren. Dies konnte anhand der MHC-I-abhängigen IFN- γ -Freisetzung und der zytotoxischen Antwort autologer T-Lymphozyten belegt werden (Galetto et al., 2003). Ob die gleichzeitige Applikation potentiell immunsuppressiver Zytostatika negative Auswirkungen auf die dendritische Zell-vermittelte antitumorale zytotoxische T-Lymphozyten-Antwort bei Krebspatienten hat, ist unklar.

Selektive COX-2-Inhibitoren bieten im Zusammenhang mit einer dendritischen Zell-basierten Tumorthherapie eine interessante Alternative. COX-2-Aktivierung und -Überexpression spielen eine wichtige Rolle bei der gastrointestinalen Karzinogenese (Grover et al., 2003). Es ist bekannt, dass diese mit einer herabgesetzten T-Zell- und dendritischen Zell-Funktion assoziiert ist (Pockaj et al., 2004). Desweiteren sind COX-2-Hemmer nicht nur in der Lage, die Tumorzellproliferation zu blockieren und Apoptose zu induzieren (Elder et al., 1997; Piazza et al., 1997; Eibl et al., 2003), sondern es zeigte sich auch, dass sie Tumorzellen *in vitro* gegen eine CD95-medierte Lyse sensitivieren können. Dies lässt auf eine mögliche Rolle bei der Steigerung T-Zell-abhängiger antitumoraler Immunantworten schließen (Trotzke et al., 2003b). Ergebnisse in Tiermodellen deuten darauf hin, dass sich eine Behandlung mit COX-2-Inhibitoren *in vivo* positiv auf die Effektivität Virus-basierter Vakzinierungsstrategien auswirkt (DeLong et al., 2003; Zeytin et al., 2004). Interessanterweise wurde herausgefunden, dass COX-2-Inhibitoren ihre antiproliferativen und proapoptischen Eigenschaften unabhängig von der Expression des Enzyms durch die Tumorzellen entfalten (Trotzke et al., 2003b).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete technische Geräte und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller
Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Flow (LaminAir HB 2472 S)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
FACStarplus	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop	Fa. Nikon (Tokyo, Japan)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetus	Fa. Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Multistep Pipette	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetten(1-20µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
β-Counter Betaplate Liquid Scintillation β-Counter	Fa. Wallac Oy (Turku, Finnland)
γ-Counter 1480 Wizard 3" γ-Counter	Fa. Wallac Oy (Turku, Finnland)
96-Well-Harvester MicroCell-Harvester	Fa. Skatron (Ismaning, D)

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma (St. Louis, USA)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma (St. Louis, USA)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma (St. Louis, USA)
Ethanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)

2.1.3 Radioaktive Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete radioaktive Stoffe

Bezeichnung	Hersteller
^{51}Cr [Na ₂ ⁵¹ CrO ₄] (10 mCi/ml)	Fa. Perkin Elmer (Wellesley, Boston, Ma, USA)
[³ H]-Thymidin (1 mCi/ml)	Fa. Amersham (Freiburg)

2.1.4 Pharmaka

Tabelle 4: Verwendete NSAID und Zytostatika

Bezeichnung	Hersteller
DC-Lysinmonoacetylsalicylat (Aspisol®)	Fa. Bayer Vital (Leverkusen, D)
Celecoxib (Celebrex®)	Fa. Pfizer (New York, USA)
NS 398	Fa. Sigma RBI (St. Louis, USA)
Gemcitabin (Gemzar®)	Fa. Lilly (Bad Homburg, D)
5-Fluoruracil	Fa. Gry-Pharma (Kirchzarten, D)

2.1.5 Reagenziensätze

Tabelle 5: Verwendete Reagenziensätze

Bezeichnung	Hersteller
<u>Zellisolation mittels MACS-Methode:</u>	
Pan T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD14 MicroBeads, human	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45R0 MicroBeads, human	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
<u>Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:</u>	
human IL-12 p70 ELISA	Fa. Bender Med Systems (Wien, A) Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
human IFN- γ ELISA	Fa. Endogen (Boston, USA) Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
<u>Reagentien zur Kolorimetrischen Bestimmung</u>	
Nitrat, Nitrit Colorimetric Assay K7	Fa. Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA)
<u>Bradford Assay</u>	
Bio Rad Protein Assay	Fa. Bio Rad Laboratories GmbH (München, D)

2.1.6 Materialien für die Zellkultur

Tabelle 6: Zellkulturmedien und -zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Fötale Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
Humanes Serum-Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)1640 Medium	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) VLE 1640 Medium	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) VLE 1640 Medium phenolrotfrei	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Amphotericin B (Fungizone®)	Fa. Gibco™ Invitrogen Corporation (Paisley, UK)

Tabelle 7: Plastikmaterialien, die bei der Durchführung der Versuche verwendet wurden.

Bezeichnung	Firma
175 cm ² / 75 cm ² Kulturflaschen	Fa. Greiner (Frickenhausen, D)
Sterilfilter 0,2 µm	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
6- / 12- / 24- / 48- / 96-Rundboden- Well-Zellkulturplatten	Fa. Greiner (Frickenhausen, D)
96-Well-Flachboden-Zellkulturplatten	Fa. NUNC (Wiesbaden, D)
Zellschaber	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D)
MACS Separation Columns LS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Weitere Einwegplastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

2.1.7 Zytokine, Wachstumsstimulatoren und -stimulanzen

Tabelle 8: Für die Reifung /Differenzierung und Kultivierung von dendritischen und T-Zellen verwendete Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
<i>Granulocyte-macrophage Colony-stimulating factor</i> (GMCSF)	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-1 β	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
Interferon- α	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
Interleukin-2	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-4	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-7	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
TNF- α	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Prostaglandin E ₂	Fa. Sigma (St. Louis, USA)

2.1.8 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

2.1.8.1 Lösungen für molekularbiologische Methoden

Waschpuffer I:

5 M Guanidiniumchlorid

20 mM Tris-HCl

60 Vol % Ethanol

pH 6,6

in Wasser

Waschpuffer II:

20 mM NaCl

2 mM Tris-HCl

80 Vol % Ethanol

pH 7,5

in Wasser

Annexin / PI Puffer:

PBS

10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4

140 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

2.1.8.2 Medien und Puffer für Tumorzellen und dendritische Zellen

RPMI-Vollmedium (Tumor):

100 IU/ ml Penicillin

100 µg/ ml Streptomycin

1,5 mM L-Glutamin

10 Vol % FCS

in RPMI 1640-Medium

VLE RPMI-Vollmedium (DC):

100 IU/ ml Penicillin

100 µg/ ml Streptomycin

1,5 mM L-Glutamin

2 Vol % humanes A/ B-Serum

in VLE RPMI 1640-Medium

VLE RPMI-Vollmedium farblos

100 IU/ ml Penicillin

100 µg/ ml Streptomycin

1,5 mM L-Glutamin

2 Vol % humanes A/ B-Serum

in VLE RPMI 1640-Medium (farblos)

MACS-Puffer:

2 mM EDTA

0,5 Vol % BSA

pH 7,2

in PBS

Erythrozyten-Lysepuffer:

Ortho-mune Lysereagenz

in PBS

Tumor Kryo-Medium:

RPMI-Vollmedium

10 Vol % DMSO

Tumor-Transport-Medium:

DMEM

1% Penicillin/Streptomycin

0,1% Amphotericin B

2.1.10 Antikörper

Tabelle 9: Beschreibung der verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Firma
Anti-HLA-DR, DP,DQ (MHCII)	Tü 39	Maus IgG _{2a} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-HLA-DR	L243	Maus IgG _{2a} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-HLA-A, B, C (MHC I)	G46-2.6	Maus IgG _{2a} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD3	HIT3a	Maus IgG _{2a} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD4	RPA-T4	Maus IgG ₁ ,κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD8	M-T701	Maus IgG ₁ ,κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD14	M5E2	Maus IgG _{2a} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD56	B159	Maus IgG ₁ , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD45RA	HI100	Maus IgG _{2b} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD45R0	UCHL1	Maus IgG _{2a} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD80	L307.4	Maus IgG ₁ , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD83	HB15e	Maus IgG ₁ , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-CD86	2331/FUN-1	Maus IgG ₁ , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Isotyp Maus IgG1	MOPC21	IgG1	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Isotyp Maus IgG2a	G155-178	IgG2a	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-HLA-A2	BB7.2	Maus IgG _{2b} , κ	Fa. BD/Pharmingen (San Diego, USA)
Monoclonal Antibody-CD95 Blocking	ZB4	Maus IgG ₁	Fa. Beckmann Coulter, Immunotech (Fullerton, USA)
Concanamycin A	-	-	Fa. Sigma (St.Louis, USA)

2.1.9 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet: Die drei humanen Pankreaskarzinomzelllinien BxPc-3, MiaPaCa-2 und Panc-1, die von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen wurden. Die Zellen von BxPc-3 und Panc-1 wurden vom Institut für Immungenetik der Ludwigs-Maximilian-Universität München positiv, die Zellen von MiaPaCa-2 negativ für den HLA-Typ A2 (HLA-A2) klassifiziert. Die maligne Natur dieser Pankreaskarzinomzelllinien wird in der Literatur anhand von drei Phänomenen beschrieben: Zum einen wachsen die Tumorzellen der Zelllinien auf Soft-Agar bzw. einer Fibroblasten-Einzelzellschicht und zum anderen induzieren sie nach Injektion in athymen Nacktmäuse das Wachstum eines progressiv wachsenden Karzinoms (Lieber et al., 1975; Yunis et al., 1977; Tan et al., 1986).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO₂/Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.1.3 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 25-75 ml Kulturflaschen in Tumor-Medium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder Verunreinigung beobachtet. Die Pankreaszelllinien BxPc-3, MiaPaCa-2 und Panc-1 zeigten dabei strikt adhärentes und konfluierendes Wachstum am Boden der Kunststoff-Kulturflaschen. Das Medium wurde ihrem Wachstum entsprechend alle 2-3 Tage dekantiert und durch frisches substituiert. Bei voller Konfluenz der Tumorzellen am Flaschenboden wurden die Zellen geerntet und gesplittet. Zur Zellernte wurden die adhärennten Zellen mit 10 ml eiskalter 0,02%iger EDTA-Lösung überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert. EDTA bindet dabei die Calcium-Ionen, die für die Zelladhäsion benötigt werden, und die Zellen lassen sich dann durch einfaches Schütteln der Kulturflasche ablösen. Die so gewonnenen Zellen wurden durch Zentrifugation bei 400 g für 10 min bei 4°C gewaschen, in frischem Tumor-Medium resuspendiert und in 3-5 Fraktionen wieder in Kultur gebracht. Die permanenten Zelllinien wurden ca. zweimal pro Woche gesplittet.

In sämtlichen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen durch regelmässige Analyse in einem unabhängigen Labor ausgeschlossen.

2.2.2 Aufreinigung von Zellpopulationen

2.2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Gesunden Spendern wurde 100 bis 200 ml heparinisiertes Blut abgenommen, wobei pro 10 ml Blut 100 μ l Heparin verwendet wurde. Das Blut stand bei Raumtemperatur maximal 1 h, bevor daraus die Fraktion der mononukleären Zellen (PBMC-peripher blood mononuclear cells) präpariert wurde. Hierzu wurde das Blut auf vier Röhrchen à 50 ml verteilt, die zuvor mit je 15 ml Biocoll-Hypaque gefüllt worden waren. Anschließend wurde auf 50 ml mit sterilem, 0,9 % NaCl vorsichtig aufgefüllt, ohne dass sich dabei die zwei Phasen vermischten. Biocoll besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1,077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichtegradienten-Zentrifugation PBMC (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Biocoll anzureichern. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren wegen ihrer höheren Dichte in bzw. unter die Biocollschicht. Thrombozyten hingegen finden sich wegen ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Biocoll.

Nach Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 20 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem Blue Cap von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen, Ficoll, Erythrozyten. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Blue Cap gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (520 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe, bei denen zunächst der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml NaCl resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen zusammenpipettiert, erneut auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert wurden (400 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschschriff wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren.

Zuletzt wurde das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95 % den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

2.2.2.2 Aufreinigung von Monozyten durch Adhärenz

Bei der weiteren Isolation der Monozyten aus den PBMC wurde deren spezifische Fähigkeit zur Adhärenz genutzt. In der PBMC-Fraktion sind die Monozyten die einzigen Zellen, die sich nach Inkubation bei 37°C im Brutschrank an den Boden der Kulturflasche anheften können. Dazu wurden die in DC-Medium aufgenommenen PBMC in einer Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen pro ml für eine Stunde in einer liegenden 175 cm² Kulturflasche inkubiert, um ihnen die Möglichkeit zur Adhärenz zu geben. Danach wurde das Medium mit der nicht-adhärenen Zellfraktion (hauptsächlich Lymphozyten) abgenommen und für weitere Zellisolationen asserviert.

Die adhärenente Monozytenschicht wurde zweimal durch horizontales Schwenken mit warmen PBS gewaschen um evtl. adhärenente Lymphozyten zu entfernen, sie so weiter aufzureinigen und dann mit frischem DC-Medium über Nacht inkubiert, während dessen sich die adhärenenten Zellen wieder vom Boden der Kulturflasche lösten. Am Folgetag wurden die bereits gelösten Monozyten mit einer Pipette aus der Kulturflasche in ein 50 ml Teströhrchen überführt und die restlichen, noch adhärenenten Zellen in 15 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden gelöst. Nach nochmaligem Ausspülen der Kulturflasche mit PBS wurden die so gewonnenen angereicherten Monozyten gewaschen, in frischem DC-Medium aufgenommen und durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit überprüft.

2.2.2.3 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Für die Versuche mit dendritischen Zellen wurde ein in unserem Labor etabliertes Protokoll zur Generierung von dendritischen Zellen in 48 Stunden verwendet (Dauer et al., 2003). Um aus den unter 2.2.2.2. gewonnenen Monozyten dendritische Zellen zu generieren wurden die Zellen in DC-Medium in 6-Loch-Platten in einer Konzentration von 1 Mio/ml kultiviert. Die Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen wurde dann durch Zugabe von 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 induziert (Romani et al., 1994). Nach 24 h Inkubation wurden die unreifen dendritischen Zellen durch zusätzliche Zugabe von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen stimuliert. Zur Stimulation wurde im Regelfall eine Kombination aus 10 ng/ml IL-1 β , 1000 U/ml TNF- α und 1 μ M PGE₂ eingesetzt (Feuerstein et al., 2000). Nach weiteren 24 h - also insgesamt 48 h - Zellkultur wurden aus den 6-Loch-Platten das Medium abgenommen und für spätere Zytokin-Untersuchungen bei -20°C eingefroren und die jetzt ausdifferenzierten dendritischen Zellen vorsichtig mit einem cell-scraper aus der Kulturplatte abgelöst. Nach zweimaligem Nachspülen der Kulturplatte mit PBS wurden die geernteten Zellen abzentrifugiert und in frischem DC-Medium aufgenommen, um die restlichen Stimulationszytokine zu entfernen.

2.2.2.4 Isolation von T-Zellen

Bei der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an magnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert wurden, werden sie gewaschen und anschließend in MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine magnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht und somit alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule

zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagenssätze der Firma Miltenyi Biotec nach entsprechendem Hersteller-Protokoll verwendet.

2.2.3 Stimulation der in Kokultur befindlichen T-Zellen mit Antigen-beladenen dendritischen Zellen

2.2.3.1 Antigen-Beladung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Für die Induktion Antigen-spezifischer T-Zell Antworten wurden die dendritischen Zellen während ihrer Ausreifung mit den jeweils benötigten Antigenen beladen. Bei der Verwendung von Tumor-Lysat als Antigenquelle wurden dafür 50–100 µg/ml Lysat zu Beginn der 48 h DC-Kultur zugegeben (Schnurr et al., 2001), bei Versuchen mit Tetanus-Toxoid wurde eine Konzentration von 5 µg/ml gewählt. So konnten die Monozyten bzw. später differenzierten unreifen dendritischen Zellen im Laufe ihrer Reifung zu dendritischen Zellen das Tumorantigen aufnehmen. Da das Lysat der Tumorzellen die potentiellen Antigene in Proteinform enthält, muss es von den dendritischen Zellen durch Phagozytose in das Zytoplasma aufgenommen und dort prozessiert, d.h. die Proteine in geeignete Peptide zerlegt werden, die dann an der Zelloberfläche präsentiert werden können. Für die Beladung der dendritischen Zellen mit Peptid-Antigenen ist keine aktive Antigenaufnahme der Zellen nötig. Die spezifisch hergestellten Peptide können sich direkt von Außen in freien MHC-Molekülen der dendritischen Zellen anlagern. Deshalb wurden in den jeweiligen Bedingungen 10 µM Peptid nur für die letzten 4 Stunden der Ausreifung der dendritischen Zellen dazugegeben. Ein eventueller Antigen-Überschuss wurde nach der Ernte der so ausgereiften und Antigen-beladenen dendritischen Zellen durch Waschschriffe entfernt.

2.2.3.2 Kokultur von dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen

Die Kokultur von reifen und Antigen-beladenen dendritischen Zellen mit aufgereinigten autologen T-Zellen fand in 3 ml DC-Medium in 12-Loch-Platten statt. Die dendritischen Zellen wurden dabei sowohl zu Beginn der Kokultur als auch bei jeder Restimulation im Verhältnis von 1:10 zu den T-Zellen eingesetzt, meist etwa $3 - 5 \times 10^5$ dendritischen Zellen zusammen mit $3 - 5 \times 10^6$ autologen T-Zellen. Um die Proliferation der induzierten spezifischen T-Zellen zu unterstützen, wurden 25 U/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-7 als T-Zell-Wachstumsfaktoren zugegeben. Spätestens alle 72 h wurde die Hälfte des Kokultur-Mediums durch frisches DC-Medium mit IL-2 und IL-7 in gleicher Konzentration ersetzt.

Der abgenommene Überstand wurde zur späteren Bestimmung von Zytokinen eingefroren. Die Kokultur wurde außerdem zweimal in wöchentlichem Abstand mit jeweils frisch generierten, ausgereiften und Antigen-beladenen dendritischen Zellen der gleichen Spender restimuliert. So bekamen die T-Zellen insgesamt jeweils dreimal dasselbe Antigen präsentiert.

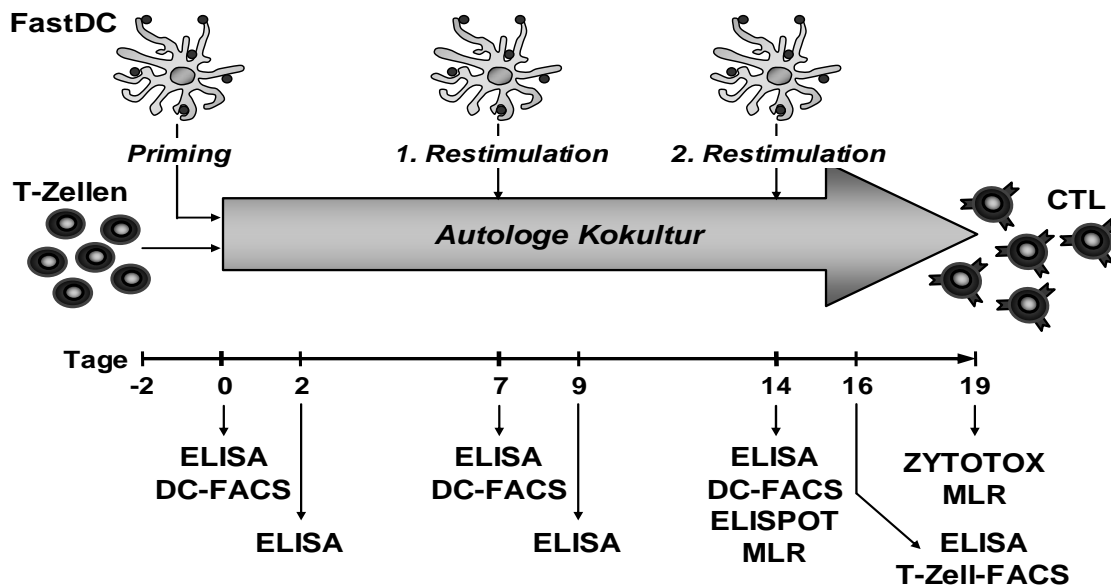


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ansatzes einer Kokultur mit abschliessendem Zytotox-Assay. Dazu werden autologe dendritische- und T-Zellen von drei bis vier Spendern generiert, koinkubiert und in wöchentlichen Abständen zweimal mit Antigen-beladenen dendritischen Zellen restimuliert. Der Zeitansatz für den gesamten Versuch beträgt dreieinhalb Wochen.

2.2.4 Herstellung von Panc-1 Tumorlysate als Antigenquelle

Die Herstellung des Tumorlysates aus Panc-1 Zellen geschah gemäß einer in unserem Labor etablierten Methode (Schnurr et al., 2001). Nach dem Ernten der adhären wachsenden Panc-1 Zellen wie in 2.2.1.3 beschrieben, wurden die Tumorzellen in einer Konzentration von 5 Mio/ml in serumfreiem (ohne FCS) Tumor-Medium aufgenommen und sofort bei -80°C tiefgefroren. Die tiefgefrorene Probe wurde daraufhin bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und diese Frier-Tau-Zyklen insgesamt 5mal hintereinander durchgeführt. Die Kristallbildung innerhalb der Zellen zerstört die Plasmamembran und führt so zur Lyse der Zellen. Der grobe Zelldebris wurde anschließend durch eine Zentrifugation mit 300 g für 10 min pelletiert und der gewonnene Überstand über einen Sterilfilter (0,2 μm Porengröße) filtriert. So erhielt man ein Tumor-Lysat aus reinem Tumor-Protein, aus dem alle größeren Zellfragmente entfernt waren und das dann als Antigenquelle diente. Die enthaltene Proteinkonzentration wurde mittels einer Bradford-Proteinmessung bestimmt.

2.3 Analyseverfahren

2.3.1 Durchflusszytometrie

2.3.1.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated cell sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl 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 wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der Laserstrahl regt das Chromophor, der für die Oberflächenmarkierung 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 einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit

einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Hierbei wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt und ermöglicht so die Kompensation. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Tabelle 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations- Wellenlängen.

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Fluorescein-Isocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
Phycoerithrin (PE)	565 nm	575 nm
Propidiumiodid (PI)	536 nm	617 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
TOPRO-3	642 nm	661 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm

2.3.1.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden 5×10^5 - 3×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wurde anschließend der Inkubationsschritt, diesmal mit einem fluoreszenzgekoppeltem Isotyp-spezifischem Antikörper, wiederholt. Wenn nötig wurde PI oder Annexin zur Anfärbung toter Zellen kurz vor der FACS-Analyse hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der „Cell Quest“-Software analysiert.

2.3.1.3 Lifegate-Analyse

Die so genannte Lifegate-Analyse diente zur rein morphologischen Differenzierung der verschiedenen PBMC-Subpopulationen und der Abschätzung des Überlebens der Zellen. Dazu wurden die unmarkierten Zellen durchflusszytometrisch auf Grund ihrer Größen- und Granularitätseigenschaften analysiert. Monozyten bzw. dendritische Zellen konnten so eindeutig charakterisiert und von den restlichen PBMC bzw. von Zellfragmenten, abgestorbenen Zellen und Erythrozyten abgegrenzt werden. Die Berechnung der prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen ließ so eine Abschätzung der Reinheit und des Überlebens der Zellen zu.

2.3.1.4 Identifizierung HLA-A2 positiver Zellen

Für die Versuche zur Charakterisierung der Immunantwort gegen die HLA-A2+ Pankreaszelllinien wurden geeignete Spender-Zellen derselben HLA-Klasse benötigt. Die Typisierung der freiwilligen Probanden für die Blutspenden erfolgte dabei durchflusszytometrisch mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Antikörpers gegen das HLA-A2 Oberflächenmolekül. Dafür wurden PBMC nach dem unter

2.3.1.2 beschriebenen Verfahren angefärbt und analysiert. Als Kontrolle dienten dabei Spender mit bekanntem HLA-A2-Typus.

2.3.1.5 Analyse von Zell-Apoptose

Die Analyse der Zell-Apoptose wurde mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Zweifach-Färbung der Zellen mit Annexin-V und Propidium-Iodid (PI) durchgeführt. Das Antikoagulans Annexin-V ist ein Protein, das die Fähigkeit besitzt Calcium-abhängig an Phosphatidylserin zu binden. Diese Eigenschaft macht man sich bei der FACS-Analyse der Zell-Apoptose zu Nutze. In normalen lebenden Zellen sind Phosphatidylserin-Reste nur an der Innenseite der Plasmamembran der Zellen lokalisiert. Die Aufrechterhaltung dieser asymmetrischen Verteilung erfordert Energie in Form von ATP. Bei Mangel an ATP und im Rahmen der Apoptose kommt es zu einer Translokation der Phosphatidylserin-Reste an die Außenseite der Plasmamembran („Flip-Flop-Mechanismus“), wo sie sich dann mit Annexin-V-FITC anfärben lassen. Dies geschieht bereits in einer frühen Phase der Apoptose, in der die Zellmembran noch intakt ist. Propidium-Iodid dagegen kann erst in einer späten Phase der Apoptose die Zellen anfärben, da es nur beschädigte Zellmembranen passieren kann. Dort färbt es dann die DNA im Zellkern durch Interkalation.

In der frühen Apoptose erscheinen die Zellen auf Grund der noch intakten Zellmembran lediglich Annexin-V-FITC positiv, wohingegen sie im Verlauf der Apoptose in Richtung Zelluntergang zusätzlich PI positiv werden. Diese charakteristische Kinetik kann mit Hilfe der FACS-Analyse nachvollzogen werden. Dafür wurden die Zellen wie in 2.3.1.2. beschrieben mit Annexin-V gefärbt, wobei hier alle Schritte in *Annexin-V-Binding-Buffer* stattfanden, der ein besonders Calcium-reiches Milieu für die Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserin schafft. Propidium-Iodid wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml unmittelbar vor der FACS-Analyse dazugegeben. (Reutelingsperger und van Heerde, 1997; Martin et al., 1995; Fadok et al., 1993).

2.3.2 Zytokinfreie Kultivierung dendritischer Zellen

Um die ausgereiften dendritischen Zellen in Hinsicht auf die Stabilität und den weiteren Verlauf der erreichten Differenzierung zu untersuchen, wurde ein so genannter *wash-out* Test durchgeführt. Dafür wurden die für 48 h ausgereiften dendritischen Zellen geerntet und intensiv gewaschen, um ihnen alle stimulatorischen Zytokine zu entziehen. Nach diesem *wash-out* wurden die dendritischen Zellen in einer Konzentration von 1 Mio/ml in frischem DC-Medium ohne jeglichen Zusatz von Zytokinen bei 37°C im Brutschrank weiterkultiviert. Die so kultivierten Zellen wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe durchflusszytometrischer Bestimmungen des Phänotyps und Messung des Zytokinprofils mittels ELISA auf ihren Differenzierungsgrad untersucht.

Bei der Untersuchung der Empfindlichkeit des Aktivierungszustandes ausgereifter dendritischer Zellen gegenüber pharmakologischen Therapeutika wurden die jeweiligen Substanzen direkt nach dem Auswaschen der Zellen in den angegebenen Konzentrationen dazugegeben und bis zum Messzeitpunkt in der Kultur belassen.

2.3.3 Zellvermittelter Zytotoxizitätstest (⁵¹Chrom-Lyse-Test)

Der ⁵¹Chrom-Lyse-Test stellt eine quantitative Methode dar, mit der die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen wie z.B. zytotoxischen T-Zellen (CTL) gegenüber mit ⁵¹Chrom-markierten Zielzellen (*targets*) ermittelt wird. Dazu werden Zielzellen in ⁵¹Chromat⁶⁺ inkubiert, wobei die Zielzellen das ⁵¹Chromat⁶⁺ aufnehmen und zu ⁵¹Chromat³⁺ reduzieren. Das reduzierte ⁵¹Chromat³⁺ wird von intakten Zellen kaum wieder freigesetzt und kann von anderen Zellen nicht aufgenommen werden. Werden die Zielzellen dann aber mit den Effektorzellen koinkubiert, wird durch Zytolyse das radioaktive ⁵¹Chrom aus den Zielzellen in den Überstand freigesetzt und kann in diesem mit Hilfe eines γ -Strahlen-Zählers gemessen werden. Da sich die Menge des freigesetzten ⁵¹Chroms proportional zur Zytolyse der Zielzellen verhält, lässt sich so auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen schließen.

Zur Durchführung des Tests wurden die Zielzellen in einem 15 ml Teströhrchen abzentrifugiert, in 100 µl purem AB-Serum resuspendiert und 1 h bei 37 °C mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (100 µCi pro 10^6 Zellen) unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit DC-Medium wurden je $3\text{-}5 \times 10^3$ Zielzellen pro Well in einer 96-Well Rundboden-Platte in Triplikaten in einem Gesamtvolumen von 200 µl auf die vorher ebenfalls gewaschenen Effektorzellen pipettiert. Dabei wurden die Effektorzellen in den jeweils angegebenen Verhältnissen (E:T Ratio) mit den Zielzellen gemischt. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurden jeweils 50 µl Überstand/Well in Szintillationsröhrchen übertragen und in einem γ -Strahlen-Zähler die radioaktiven Zerfälle über 60 sec (cpm, *counts per minutes*) gemessen. Für jede verwendete Zielzelllinie wurde außerdem als Kontrolle durch Inkubation der Zielzellen ohne Effektorzellen die Spontan-Freisetzung und durch Inkubation der Zielzellen mit dem Detergenz Triton-X 0,5%, das die Phospholipidmembran der Zellen auflöst, die Maximal-Freisetzung von ^{51}Cr bestimmt. Die Kontrollbedingungen wurden dabei in jeweils fünf gleichen Wells angesetzt. Alle Lyse-Tests wurden in DC-Medium durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte computergestützt mit Hilfe einer selbst entwickelten Microsoft-Excel Tabellen-Kalkulation. Dabei wurde die Stärke der Zytotoxizität der Effektorzellen in Prozent spezifische Lyse angegeben. Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr -Freisetzung (cpm) - spontane } ^{51}\text{Cr -Freisetzung (cpm)}}{\text{maximale } ^{51}\text{Cr -Freisetzung (cpm) - spontane } ^{51}\text{Cr -Freisetzung (cpm)}}$$

Um die CD95-Abhängigkeit der gemessenen Lyse-Raten zu untersuchen, wurden die Zielzellen in einigen Experimenten vor dem Einsatz im Lyse-Test mit einem blockierenden Anti-CD95-Antikörper in einer Konzentration 10 µl/ml sowie mit Concanamycin A, zum Nachweis einer eventuell Perforin-abhängige Lyse in einer Konzentration von 4 µl/ml für 0,5 h vorinkubiert. Für die Bestimmung von pharmakologischen Effekten auf die Zielzellen wurden die Zellen bereits am Tag vor dem ^{51}Cr -Lyse-Test geerntet und mit den jeweils angegebenen Konzentrationen der pharmakologischen Substanz (NS-398 20µm) in Kultur gebracht und so für 18 h über Nacht vorbehandelt.

Am nächsten Tag wurden diese Zielzellen im Lyse-Test eingesetzt wie oben beschrieben.

2.3.4 Enzyme-linked immunosorbent assay

Zum Nachweis verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein ultrasensitiver *Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Dafür wurden zellfreie Kultur-Überstände abgenommen, bei Bedarf entsprechend vorverdünnt und in 96-Loch-Flachbodenplatten gegeben, die zuvor mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichtet wurden, der fest an der Plastikoberfläche bindet. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an den Antikörper. Nach drei Waschschritten, die alles Nichtgebundene entfernen, wird ein zweiter Biotin-gekoppelter Antikörper zugegeben, der an das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 min folgt ein weiterer Waschschr. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch Ausbildung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des überschüssigen Konjugates durch einen weiteren Waschschr. gibt man die Substratlösung hinzu, die durch die gebundene Meerettich-Peroxidase zu einer Farbreaktion führt. Die Farbintensität ist hierbei proportional zur eingesetzten Protein-Konzentration der Probe und kann photometrisch mittels eines ELISA-Readers abgelesen werden. Durch eine Standardreihe aus bekannten Konzentrationen des gesuchten Proteins besteht die Möglichkeit die genaue in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen. Durch die Verwendung dieses „Sandwich-Systems“ mit zwei Protein-spezifischen Antikörpern, die über verschiedene Epitope an das Protein binden wird das Risiko der Kreuzreaktivität minimiert und damit eine möglichst spezifische Aussage über die Konzentration ermöglicht. Für die Durchführung der ELISAs wurden kommerzielle Reagenziensätze nach dem jeweiligen Hersteller-Protokoll verwendet.

2.3.5 Proliferations-Analyse der Tumorzellen

Um die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde der kolorimetrische Proliferationstest *CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* durchgeführt. Die hierbei verwendete Test-Lösung enthält ein Tetrazolium-Salz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS], das von den Zellen zu einem farbigen Formazan reduziert wird. Diese Reaktion ist von der Konzentration von NADPH und NADH abhängig, die durch die Dehydrogenasen von metabolisch aktiven Zellen erzeugt werden. Die Stärke der entstehenden Farbreaktion ist also proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven, lebenden Zellen. Durch mehrere Messungen an verschiedenen Zeitpunkten lässt sich so eine Veränderung in der Zellzahl, d.h. die Proliferation von Zellen bestimmen.

Dafür wurden die Tumorzellen geerntet, wie in 2.2.1.3. beschrieben, und daraufhin in 96-Well Kulturplatten in einer Konzentration von 10^4 Zellen pro Well in Tumor-Medium ohne Phenol-Rot ausplattiert, da Phenol-Rot mit den Messwerten der Testsubstanz interferieren würde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 20 μ l der CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Test-Lösung zu jedem Well pipettiert und die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 450 nm wurde dann mittels eines ELISA-Readers gemessen. Dabei wurden jeweils die Mittelwerte aus Triplikaten errechnet und die Hintergrund-Absorption abgezogen. Um die gemessenen Absorptionswerte in eine Zellzahl umrechnen zu können, wurde bei jedem Versuch mit den jeweils verwendeten Zelllinien eine Standard-Verdünnungsreihe mit bekannten Zellkonzentrationen angelegt. Mit Hilfe einer mathematischen Näherung, die mit Microsoft Excel durchgeführt wurde, konnten so die absoluten Zellzahlen abgeschätzt werden.

2.3.6 [³H]-Thymidin Proliferationstest

Zum Nachweis der Proliferation von T-Zellen wurde der [³H]-Thymidin Proliferationstest durchgeführt. Dabei wird zu den Zellen, deren Proliferation untersucht werden soll, radioaktives Tritium-markiertes Thymidin gegeben. Die Zellen nehmen dieses auf und bauen es bei der DNS-Neusynthese in gleichem

Maße wie das physiologische unmarkierte Thymidin in die DNS ein. Der Einbau ist dabei abhängig von der DNS-Syntheserate und dient damit als Marker für die Proliferation. Der Vorteil gegenüber anderen Messmethoden besteht hierbei darin, dass mit der Messung der DNS-Synthese die Proliferation in einem sehr frühen Stadium gemessen wird, in dem sich die Zellen noch nicht vollständig dupliziert haben müssen. Um die Abhängigkeit der T-Zellproliferation von der Aktivierung und Stimulation durch dendritische Zellen zu untersuchen, wurde eine sog. *mixed lymphocyte reaction* (MLR), eine Kultur, in der die verschiedenen Lymphozytenpopulationen (dendritischen Zellen und T-Zellen) gemischt werden, angesetzt. Dabei ist die allogene von der autologen MLR zu unterscheiden.

Allogene MLR

Hier finden Monozyten- und T-Zellpopulationen unterschiedlicher Spender Verwendung. Die Monozyten werden isoliert, mit Antigen beladen und zu dendritischen Zellen ausgereift. Erst am Tage des Ansatzes der Kokultur werden die T-Zellen, die von anderen Blutspendern als die dendritischen Zellen stammen, durch MACS gewonnen. Die Verwendung eines zusätzlichen Antigens, wie er bei der autologen MLR nötig ist entfällt, da die unterschiedlichen HLA-Typen der Blutspender als Proliferationsstimulus ausreichend sind.

Autologe MLR

Hier werden Monozyten- und T-Zellpopulationen derselben Spender am gleichen Tag separiert. Die Monozyten werden nach DC-Protokoll isoliert, antigenbeladen (Tetanustoxoid) und zu dendritischen Zellen ausgereift. Die durch MACS isolierten T-Zellen überdauern den Zeitraum der Reifung dendritischer Zellen bis zum Ansatz der Kokultur unter Zytokinzusatz im Brutschrank.

Ab dem Ansatz der Kokultur sind die folgenden Abläufe der allogenen und autologen MLR identisch. Die frisch isolierten, ausgereiften und

antigenbeladenen dendritischen Zellen werden mit den T-Zellen in verschiedenen Verhältnissen von 1:20 bis 1:320 in 200 µl Medium in Quadruplikaten auf einer 96-Well-Rundbodenplatte ausplattiert. Zusätzlich wurde als Kontrolle ein Quadruplikat mit T-Zellen ohne dendritische Zellen angelegt. Die so entstandene MLR wurde für 48 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert, dann wurde in alle Wells 20 µl [³H]-Thymidin (1 µCi pro Well) dazugegeben und eine weitere 18 h Inkubation angeschlossen, in der die Zellen das radioaktive Thymidin in ihre DNS einbauen. Ein Einbau in die Antigen-präsentierenden Zellen, der durch vorherige Bestrahlung der Zellen ausgeschlossen werden kann, spielt hier keine wesentliche Rolle, da die verwendeten dendritischen Zellen ausdifferenzierte Zellen sind, die nicht mehr proliferieren. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkulturen mit Hilfe eines *96-MicroCell-Harvesters* geerntet, auf Filtermatten transferiert und das nicht inkorporierte Thymidin ausgewaschen. Nach einer mehrstündigen Trocknung wurden die Filter in eine Plastiktasche eingeschweißt und mit Szintillationsflüssigkeit imprägniert, die die relativ schwache β-Strahlung in Szintillationen umwandelt und damit messbar macht. Danach konnte die Radioaktivität der Filter in einem Szintillationszähler in Szintillationen pro Minute (*cpm, counts per minute*) bestimmt werden. Die Proliferationsrate der T-Zellen nach Aktivierung durch dendritische Zellen kann so anhand der gemessenen cpm quantifiziert und verglichen werden.

2.3.7 Mikroskopie

Zur routinemäßigen optischen Darstellung von Zellen und Zellkulturen wurde die Phasenkontrastmikroskopie verwandt. Tritt Licht durch ein optisch dichteres Medium (z.B. Plasmamembranen oder Zellkerne), wird die Größe seiner Wellenlänge verändert. Dadurch entstehen Phasenunterschiede zwischen den einzelnen Lichtstrahlen, die durch in den Strahlengang eingebrachte Polarisationsfilter in Helligkeitsunterschiede umgewandelt werden. Das führt zu einer kontrastreicherer Darstellung und einer besseren Auflösung der beobachteten Strukturen.

2.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt wird. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,05$ bzw. $p < 0,01$ angenommen und ist durch Markierung mit einem * bzw. ** angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

3. ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von Cyclooxygenase-Inhibitoren und Zytostatika auf Tumorzellen

3.1.1 Keine Beeinflussung der CD95-Expression durch nichtsteroidale Antiphlogistika und Gemcitabin

Wir gingen von der Hypothese aus, dass eine Vorinkubation der Pankreaskarzinomzellen mit Gemcitabin und NSAR, die durch Tumorlysat-gepulste, dendritische Zell-induzierte T-Zell-medierte Lyse steigern würde. Eine Möglichkeit für eine gesteigerte CTL-Lyse besteht in der Hochregulierung des auf der Tumorzelllinie befindlichen CD95-Liganden, der es den T-Zellen erleichtert, mittels CD95 Apoptose zu induzieren. Um die Rolle der CD95/CD95-Ligand-Interaktion genauer zu bestimmen, musste zuerst analysiert werden, ob die CD95-Expression der Tumorzellen nach Inkubation aufreguliert wird.

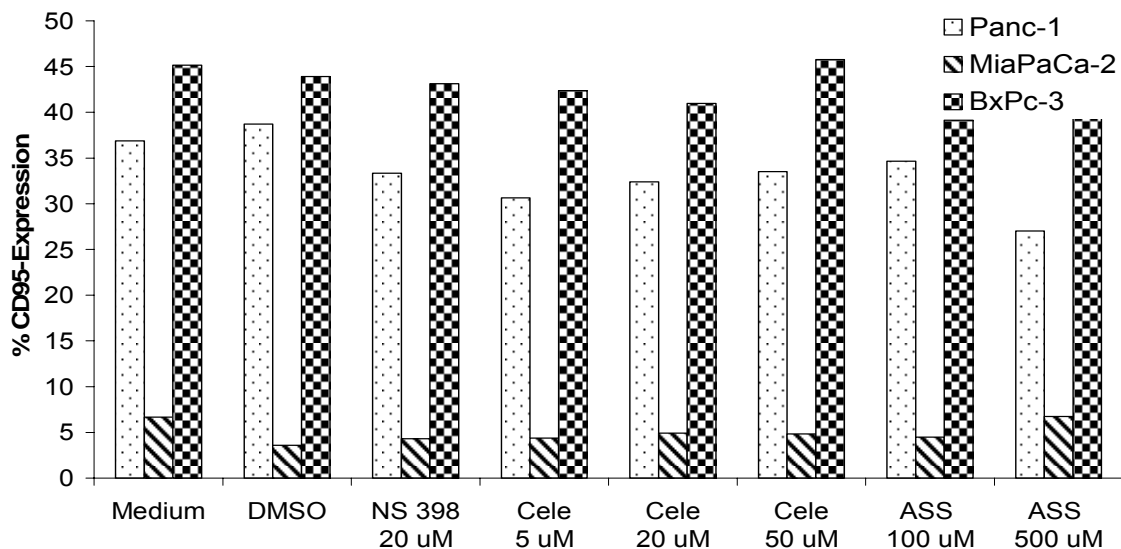


Abb. 2: Durchflusszytometrisch bestimmte CD95-Expression von Tumorzellen nach Inkubation mit NSAR. Weder bei der Acetylsalicylsäure, als Vertreter der unselektiven NSAR, noch bei Celecoxib, als Teil der selektiven COX-2-Inhibitoren-Familie, kam es zu einer Aufregulierung des CD95-Liganden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=3 Versuche.

Dazu fanden drei verschiedene Tumorzelllinien Verwendung: die COX-negativen Panc-1 und MiaPaCa-2 sowie die COX-positive BxPc-3.

Nach Ernte der Zellen wurden sie mit den Pharmaka versetzt. Es wurden für das NS-398 eine Konzentration von 20 μM , für Celecoxib 5- und 20 μM und für die Acetylsalicylsäure 100- und 500 μM gewählt. Um einen verfälschenden Effekt durch das DMSO, das als Lösungsmittel für Celecoxib diente, auszuschliessen, wurde jeweils eine Gruppe jeder Tumorzelllinie mit DMSO inkubiert. Nach 24 Stunden wurde durchflusszytometrisch die CD95-Expression bestimmt.

Die Auswertung der FACS-Ergebnisse ergab keinen Anhaltspunkt für einen Effekt der NSAR auf die Expression des CD95-Liganden (Abb. 2). Die jeweiligen Höchst- und Tiefstwerte jeder Zelllinie lagen sehr eng beieinander und fanden sich stets bei verschiedenen Substanzen und Konzentrationen wieder. Allerdings zeigten die drei Tumorzelllinien eine unterschiedlich starke Expression des CD95, wobei diese bei BxPc-3 am höchsten lag. Somit ist es nicht möglich einen Zusammenhang zwischen Todesligand-Expression und NSAR-Inkubation herzustellen.

3.1.2 Hemmung der Tumorzellproliferation in Abhängigkeit von Typ und Dosierung der Pharmaka sowie CD95-Antikörper-Präsenz

Um die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde der kolorimetrische Proliferationstest durchgeführt. Ziel dieser Studie war es die Konzentration der pharmakologisch aktiven Substanzen zu identifizieren, bei der keine signifikante Hemmung der Tumorzellproliferation mehr zu detektieren war. Parallel wurde eine zweite Versuchsreihe angesetzt, bei der zusätzlich ein aktivierender CD95-Antikörper zugegeben wurde. Ziel der Kombination der Zytostatika (Gemcitabin und 5-Fluoruracil) und des COX-Inhibitors (Celecoxib) mit dem Antikörper war es, eventuelle synergistische Effekte dieser Komponenten zu identifizieren. Um eventuelle COX-unabhängige Effekte aufzuzeigen, fiel die Entscheidung bei der Wahl der zu verwendenden Tumorzelllinien neben der COX-2-positiven BxPc-3 auf die COX-2-negative Panc-1.

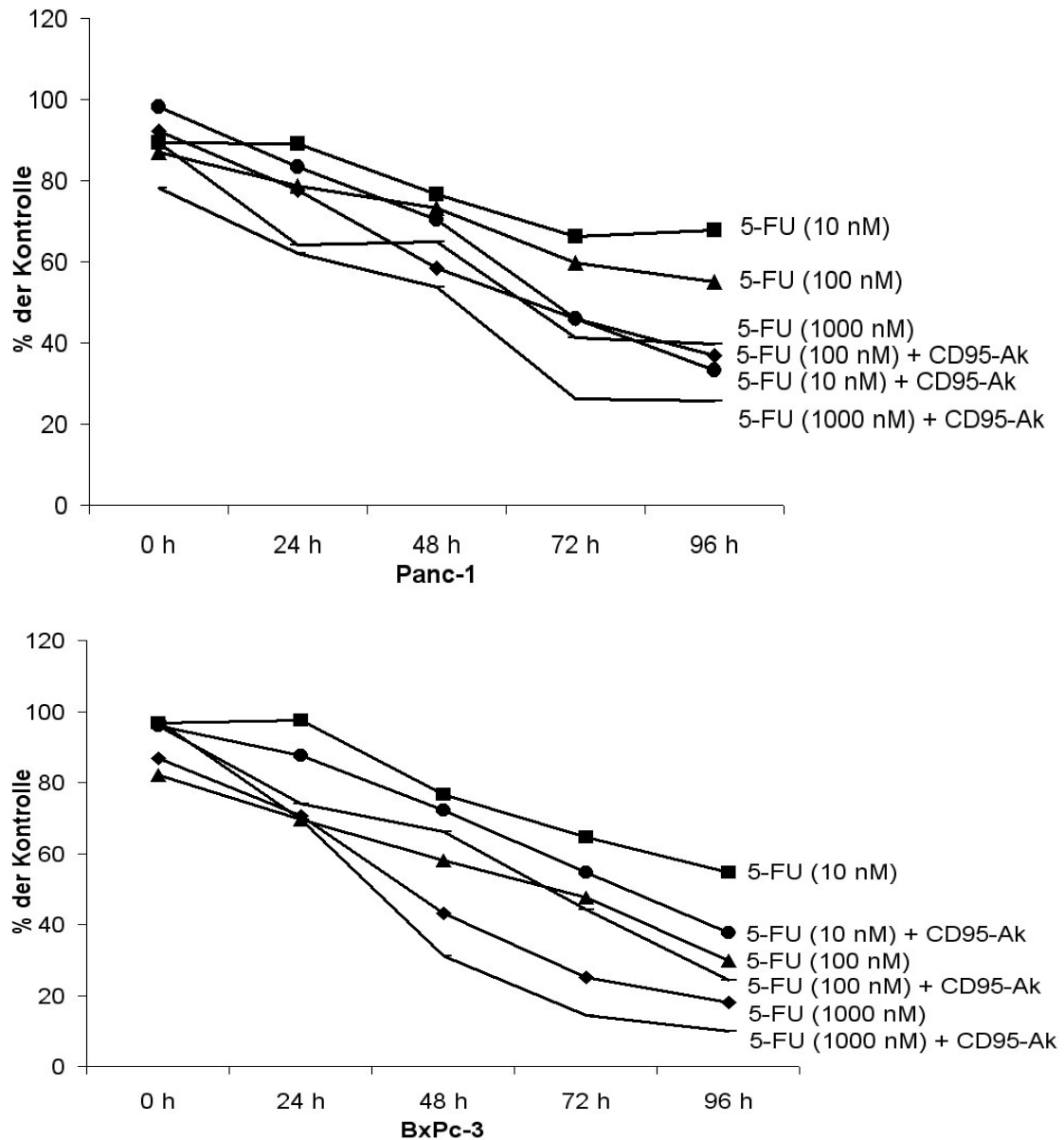


Abb. 3: Die mit dem Proliferationsassay bestimmte Tumorzellproliferation nach Inkubation mit 5-FU, allein bzw. in Kombination mit einem aktivierenden CD95-Antikörper, der zeitgleich mit dem Zytostatikum appliziert wurde, erfolgte in 24-stündigen Intervallen. Angegeben sind die Mittelwerte aus einem Versuch mit n=4 Ansätze pro Tumorzelllinie. Der synergistische Effekt des Antikörpers in Kombination mit dem Pharmakon ist bei beiden Pankreaskarzinomzelllinien deutlich erkennbar.

Bei 5-Fluoruracil (Abb. 3) zeigte sich ein deutlicher proliferationshemmender Effekt in Abhängigkeit von der Konzentration des Zytostatikums und der Inkubationsdauer. Die Zugabe des aktivierenden CD95-Antikörpers hatte eine synergistische Wirkung. Dabei war dieser Effekt bei beiden verwendeten Tumorzelllinien zu beobachten, der aber bei den Panc-1 noch stärker

ausgeprägt schien und zum Zeitpunkt der letzten Messung bei der 10 nM 5-FU plus Antikörper-Gruppe (33 %) zu einer stärkeren Hemmung führte als bei der 100 nM plus Antikörper-Gruppe (36 %), die mit der 1000 nM-Gruppe (39 %) eine annähernd identische Proliferationshemmung herbeiführte. Dies ist besonders bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass das Pharmakon in der niedrigsten Konzentration ohne den Antikörper den geringsten Effekt zeigte. Vergleicht man die Werte des Chemotherapeutikums mit den konzentrationsgleichen Pharmakon-CD95-Antikörper-Kombinationen so sind die Unterschiede bei 5-FU 10 nM mit $p=0,014$ und 5-FU 1000 nM mit $p=0,22$ signifikant. Ein ähnlicher Trend zeichnete sich bei den BxPc-3 ab (Abb. 3). Auch hier war die Proliferationshemmung titrierbar und durch Antikörperzugabe noch zu steigern. Die Maximalhemmung ging vom 5-FU 1000 nM plus Antikörper mit 10 % aus. Der Vergleich der Werte der Pharmakon-Gruppe mit der Pharmakon plus Antikörper-Gruppe bringt bei 5-FU 10 nM mit $p=0,003$, bei 5-FU 100 nM mit $p=0,001$ und bei 5-FU 1000 nM mit $p=0,002$ hochsignifikante Unterschiede hervor.

Bei dem zweiten von uns verwendeten Zytostatikum, dem Gemcitabin, zeichnete sich bezüglich der Zellproliferationshemmung das gleiche nach Konzentration und CD-95-Antikörper-Zugabe gestaffelte, wie bereits bei 5-FU erhaltene Resultat ab. Auch hier erwies sich die Pharmakon-Antikörper-Kombination bei den Panc-1-Zellen als effektiver als bei den BxPc-3 (Abb. 4). Betrachtet man bei Panc-1 die antikörperfreien bzw. antikörperhaltigen Gruppen jeweils getrennt, so korrelieren die Prozentsätze der Proliferationshemmung mit den Dosierungen des Pharmakon. Der Einsatz des CD95-Antikörpers verstärkte die Wirkung des Gemcitabin in einem Ausmass, dass das Gemcitabin 10 nM plus Antikörper nach 96 Stunden zusammen mit dem Gemcitabin 1000 nM in etwa den gleichen Endpunkt von 31 % erreichte. Die Differenzen zwischen Pharmakon- und Pharmakon plus Antikörper-Endergebnissen sind bei der niedrigsten Konzentration mit $p=0,017$ signifikant, bei der höchsten Dosierung mit $p=0,002$ hochsignifikant. Bei BxPc-3 (Abb. 4) ging der maximale Effekt vom Gemcitabin 1000 nM plus Antikörper mit 33 %, der geringste Effekt vom Gemcitabin 10 nM (69 %) aus. Die Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant.

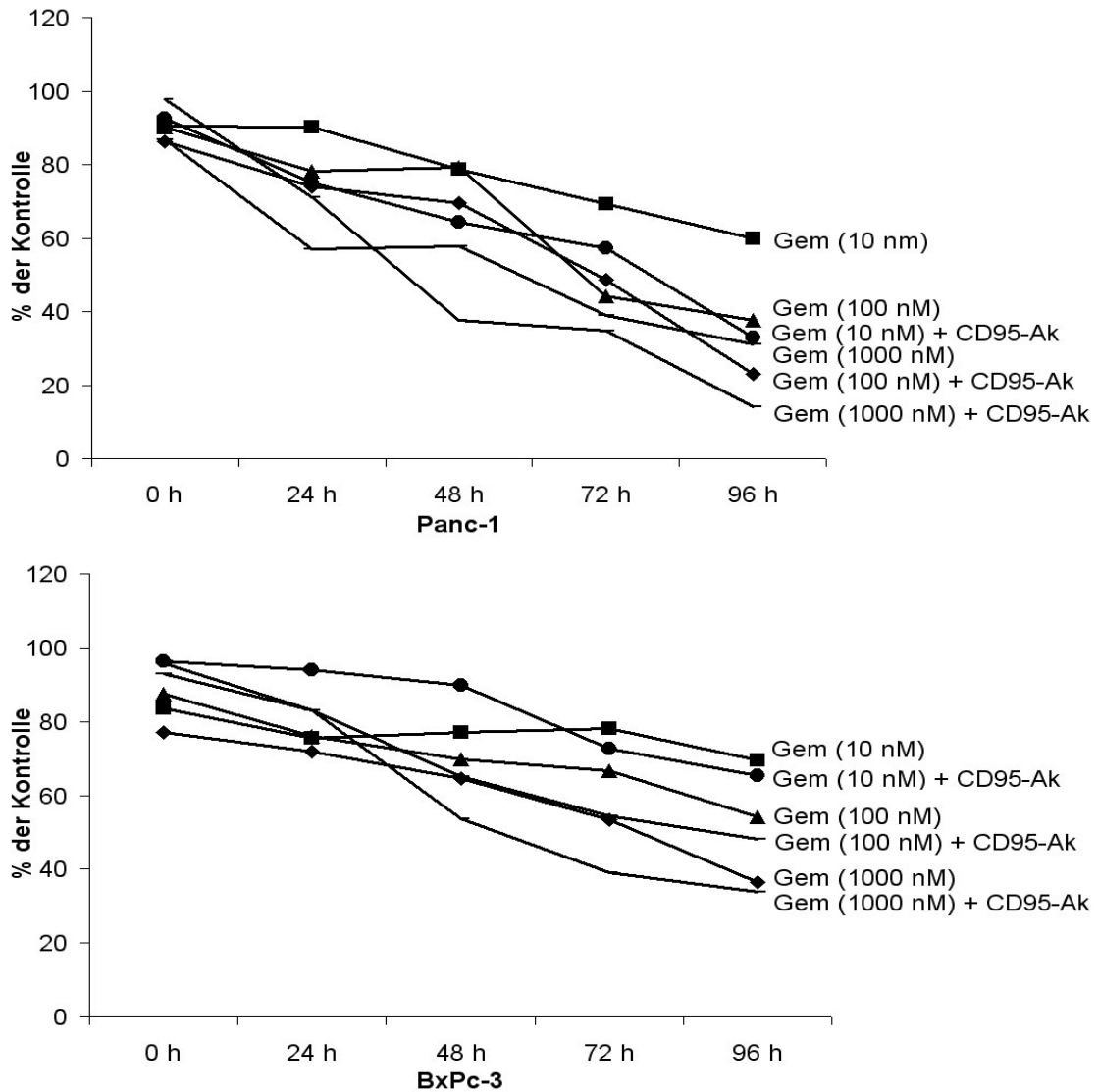


Abb. 4: Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nach Inkubation mit Gemcitabin, alleine oder kombiniert mit einem CD95-Antikörper. Die Mittelwerte errechneten sich aus n=1 Versuch mit n=4 Ansätze für beide Tumorzelllinien. Sowohl bei BxPc-3 als auch bei Panc-1 treten die Titrierbarkeit des Chemotherapeutikums und die durch Zugabe eines CD95-Antikörpers bedingten synergistischen Effekte deutlich hervor. Vergleicht man die Werte der Gruppen ohne Antikörper mit den Gruppen in äquivalenter Dosierung jedoch mit Antikörper, so ergeben sich bei den 10 nM-Konzentrationen signifikante, bei den 1000 nM-Dosierungen sogar hochsignifikante Unterschiede.

Auch bei der letzten verwendeten Substanz, dem Celecoxib, stellte sich eine titrierbare und durch Antikörperzugabe steigerbare Proliferationshemmung ein, wenn auch nicht in dem Umfang wie dies bei den Chemotherapeutika der Fall war (Abb. 5). Die wirkungsvollste Kombination stellte wiederholt die Höchstkonzentration des Celecoxibs mit dem CD95-Antikörper dar (31 %).

Besonders auffällig ist der enorme Unterschied der 10 μM -Werte. Die Antikörper-Zugabe führte zu einer Steigerung der Proliferationshemmung von über 20 % (63 % vs. 42 %) und liegt dabei auch noch vor den beiden 50 μM -Celecoxib-Gruppen. Da diese COX-2-defiziente Tumorzelllinie auf den selektiven COX-2-Inhibitor in ähnlicher Weise wie die COX-2-positive BxPc-3 in Form einer stark verminderten Proliferation anspricht, ist von einer COX-2-unabhängigen Wirkung des Celecoxib auszugehen.

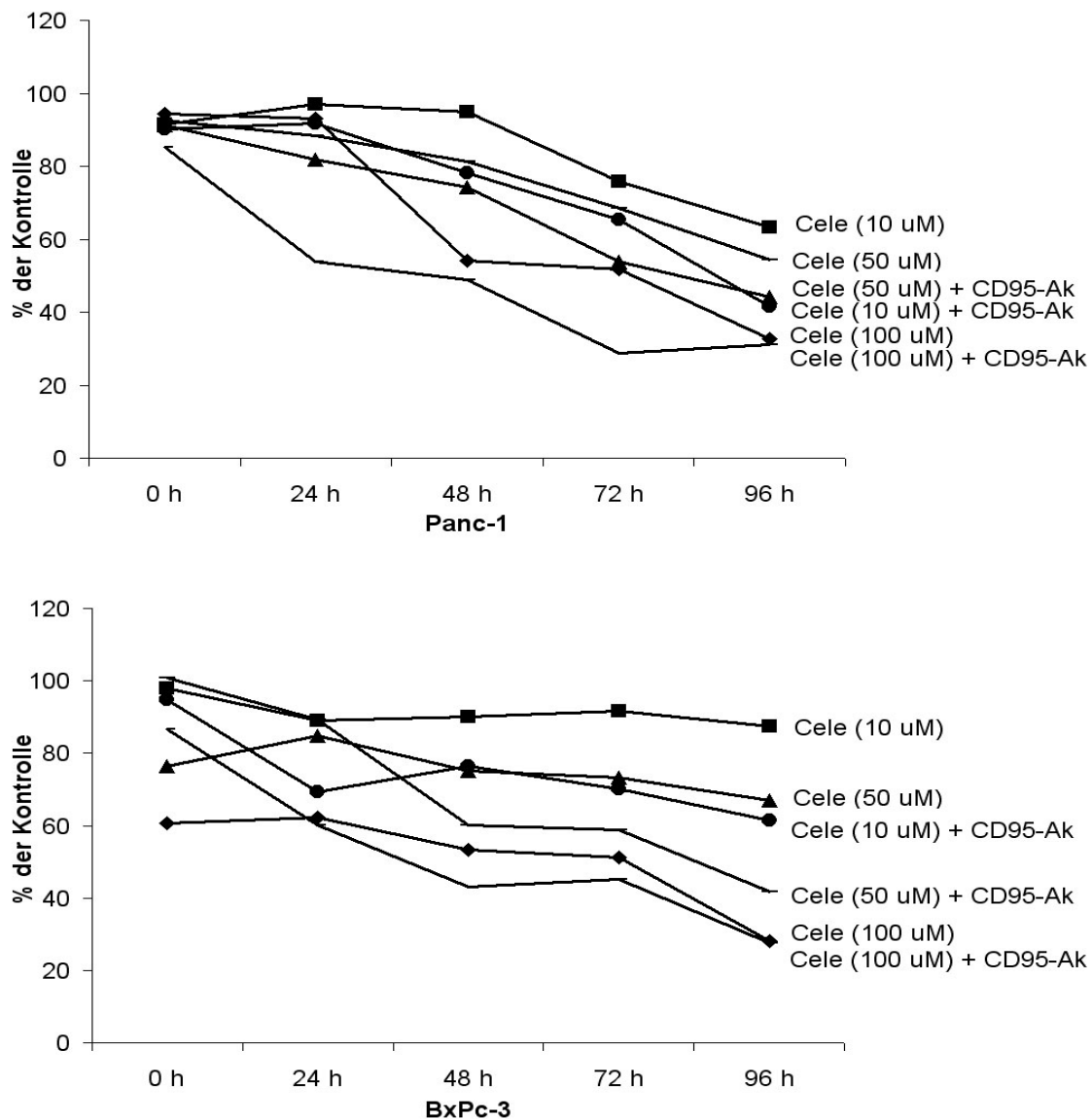


Abb. 5. Tumorzellproliferation (Mittelwert von n=4 Ansätzen pro Tumorzelllinie aus n=1 Versuch) nach Inkubation mit Celecoxib, allein bzw. in Kombination mit einem CD95-Antikörper. Auch hier führte die CD95-Antikörper-Zugabe bei beiden Zelllinien zu einer deutlichen, bei BxPc-3 in allen Konzentrationen signifikanten Steigerung der durch das Pharmakon induzierten zellproliferationshemmenden Wirkung.

Bei den BxPc-3 (Abb. 5) waren die Unterschiede der einzelnen Pharmaka-Gruppen zu den CD95-Pendants sogar noch größer und sind dabei im Gegensatz zu Panc-1 alle signifikant (Celecoxib 10 μ M: $p= 0,022$, Celecoxib 100 μ M: $p= 0,04$, Celecoxib 10 μ M: $p= 0,01$), wobei der Einsatz dieses Antikörpers wiederum bei der niedrigsten Konzentration den grössten Effekt zeigte (Celecoxib 10 μ M: 87 % vs. Celecoxib 100 μ M: 61 %).

Bei allen verwendeten Pharmaka konnte ein sehr deutlicher und zum Großteil signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration der jeweiligen Substanz und dem Ausmaß der Hemmung der Tumorzellproliferation festgestellt werden. Dies gilt bei Celecoxib sowohl für Panc-1 als auch für BxPc-3, die Wirkung des COX-2-Inhibitors ist also COX-unabhängig. Die äquivalenten Konzentrationen der Zytostatika besitzen eine stärker ausgeprägte proliferationssupprimierende Eigenschaft als das Celecoxib. Die Kombination der Pharmaka mit dem CD95-Antikörper resultierte sowohl bei den Zytostatika als auch bei dem COX-2-Hemmer in einer signifikant gesteigerten Hemmung der Zellproliferation. In einigen Fällen war die Kombination Pharmakon plus Antikörper sogar effektiver als die höhere Dosierung der Substanz alleine. Besonders bei den Gruppen, die mit niedrigen Dosierungen der pharmakologisch aktiven Substanz inkubiert wurden, führte die Zugabe des Antikörpers zu einer stark gesteigerten Zellproliferationshemmung. Dieses Phänomen trat bei beiden Pankreaskarzinomzelllinien auf und beruht möglicherweise auf einer Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber anti-CD95, jedoch unabhängig von der Expression des CD95 auf der Tumorzelloberfläche, wie im vorangegangenen Versuch gezeigt wurde.

3.1.3 Keine Apoptoseinduktion durch Cyclooxygenase-Hemmer und Zytostatika.

Nachdem ein Einfluss der pharmakologisch aktiven Substanzen auf die Zellproliferation belegt werden konnte, untersuchten wir, ob diesem zellproliferationshemmenden Effekt eine Apoptoseinduktion zugrunde liegt. Um eine COX-2-unabhängige Wirkung des Celecoxib zu demonstrieren, wählten wir für diesen Versuch die COX-2-defiziente Panc-1-Tumorzelllinie. Die Analyse

der Zell-Apoptose wurde mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Zweifach-Färbung der Zellen mit Annexin-V und Propidium-Iodid (PI) durchgeführt. In der frühen Apoptose erscheinen die Zellen auf Grund der noch intakten Zellmembran lediglich Annexin-V-FITC positiv, wohingegen sie im Verlauf zusätzlich PI positiv werden (Abb. 9), ein Zeichen des folgend nekrotischen Zelluntergangs.

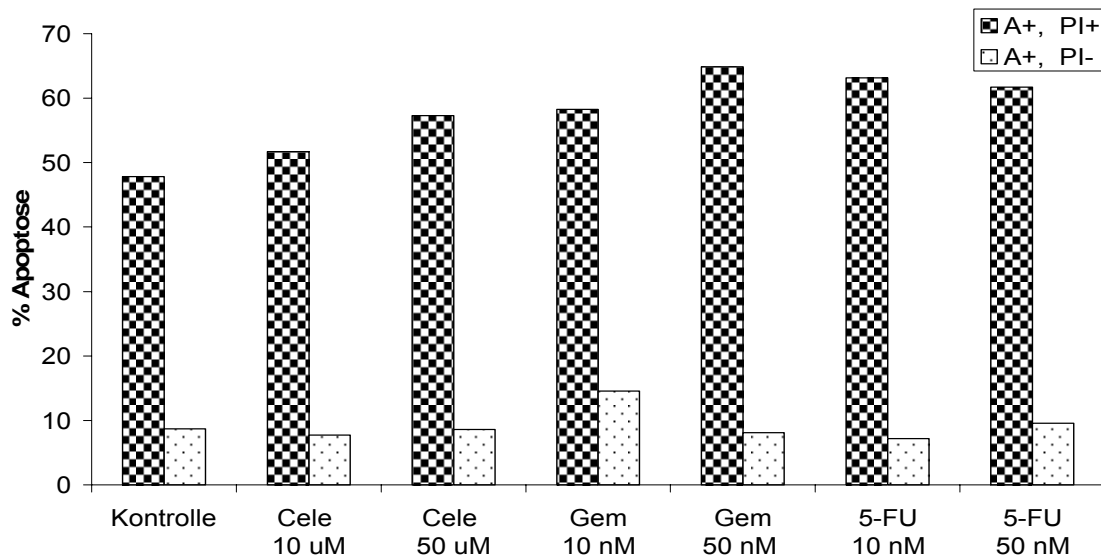


Abb. 6: Prozentsatz der durch Annexin V/PI durchflusszytometrisch ermittelten früh- und spätapoptotischen Panc-1-Zellen die nur mit Pharmaka inkubiert wurden. Lediglich bei Gemcitabin 10 nM war die Apoptoserate in geringem, jedoch nicht signifikantem Maße erhöht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=3 Versuche.

Es konnte gezeigt werden, dass weder der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib und die Zytostatika Gemcitabin und 5-Fluorouracil alleine, noch deren Kombination mit dem aktivierenden CD95-Antikörper in den verwendeten Konzentrationen in der Lage waren, bei der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 Apoptose zu induzieren. Betrachtet man den Prozentsatz frühapoptotischer Zellen der Gruppen, die lediglich mit den pharmakologisch aktiven Substanzen inkubiert wurden (Abb. 6, Abb. 9), so wird der Prozentsatz der unbehandelten Kontrollgruppe (9 %) lediglich von den Werten des 5-FU 50 nM (10 %) und Gemcitabin 10 nM (15 %) geringfügig überboten. Alle anderen Gruppen wiesen eine ähnliche Apoptoserate wie die Kontrolle auf. Auch die Kombination mit einem CD95-Antikörper zeigte keinen zusätzlichen Effekt (Abb. 7, Abb. 9).

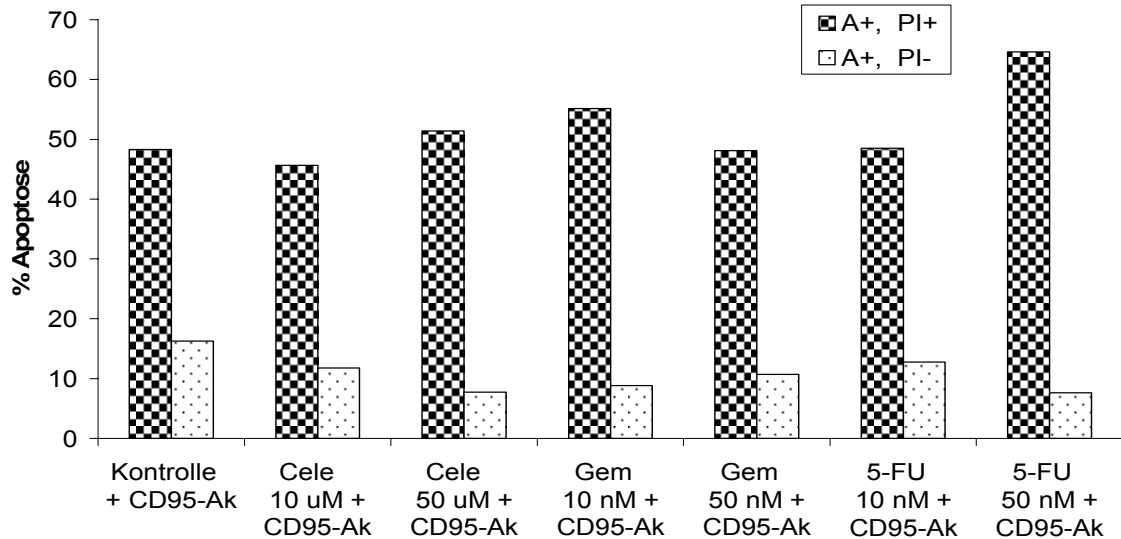


Abb. 7: Prozentsatz früh- und spätapoptotischer Zellen aus einem repräsentativen von n=3 Versuche, bei denen die Pankreaskarzinomzellen mit Pharmaka und CD95-Antikörper inkubiert wurden. Die Kombination der pharmakologisch aktiven Substanzen mit dem CD95-Antikörper hatte keinerlei erkennbaren Effekt auf die Apoptoseinduktion. Eine synergistische Wirkung blieb aus.

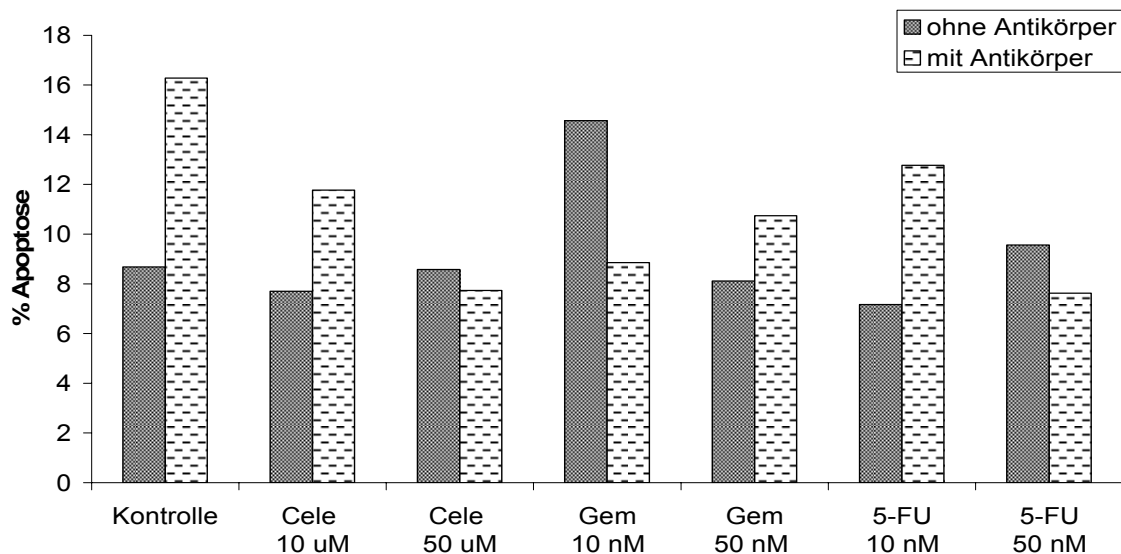


Abb. 8: Der Vergleich des Prozentsatzes (aus einem repräsentativen von n=3 Versuche) frühapoptotischer Tumorzellen, die mit Chemotherapeutika bzw. dem COX-2-Inhibitor inkubiert wurden, mit Zellen, die zusätzlich noch mit dem CD95-Antikörper versetzt wurden, lässt keine synergistischen Effekte der Pharmaka mit dem Antikörper erkennen.

Vergleicht man die Verteilung der frühapoptotischen Zellen der Pharmaka- mit denen der Pharmaka plus Antikörper-Gruppen, so sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb. 8). Die Tumorzellen zeigten sich gänzlich

apoptoseresistent gegenüber den von uns gewählten Konzentrationen der verwendeten Substanzen und Kombinationen.

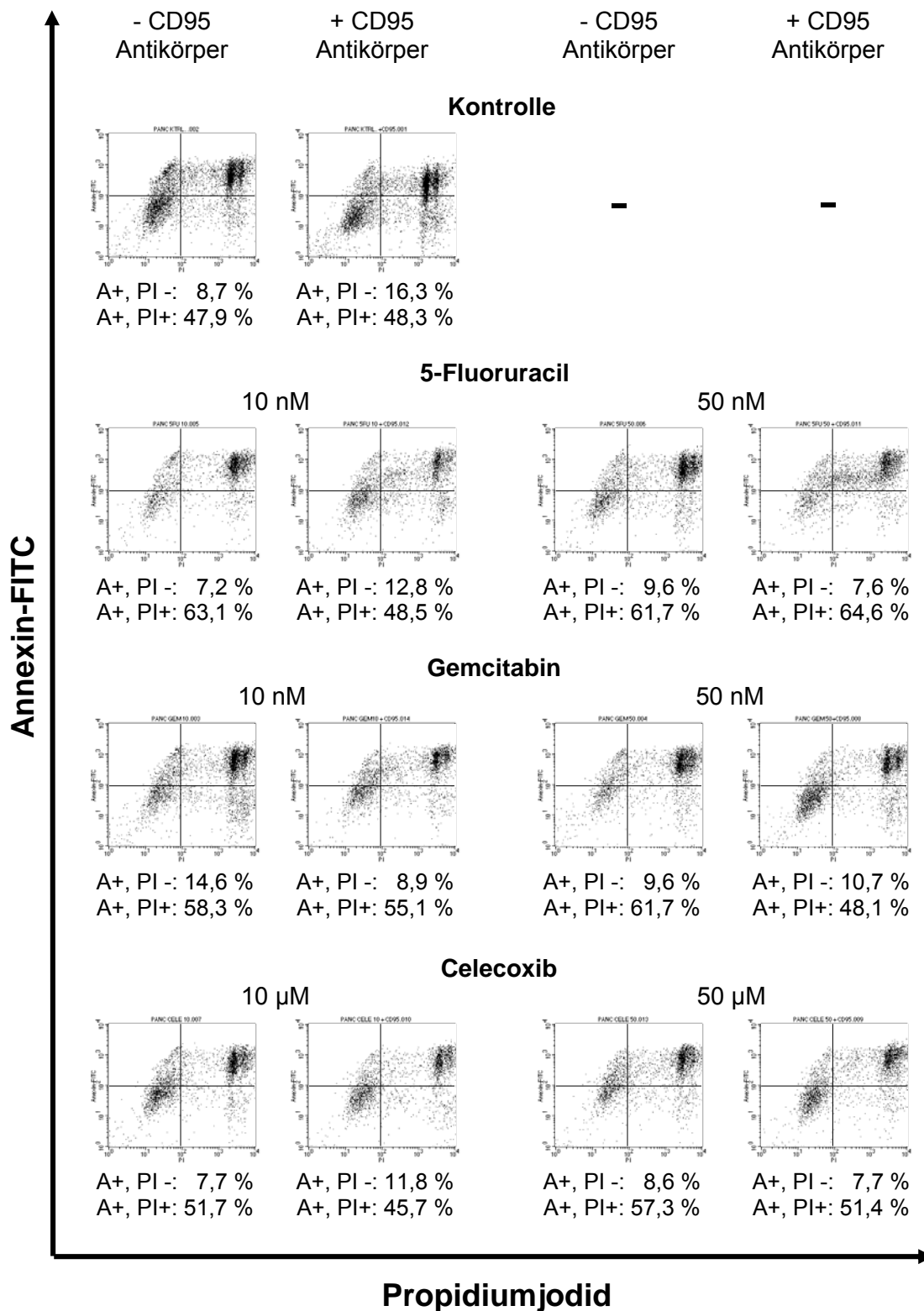


Abb. 9.: FACS-Plots der mit Pharmaka und CD95-Antikörper inkubierten Panc-1-Tumorzellen. Oberer rechter Quadrant: A+ PI+ entsprechen spätapoptotische und nekrotische Zellen, unterer rechter Quadrant: A+PI- entsprechen frühapoptotischen Zellen.

Als Fazit für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit sei vor allem der synergistische Effekt des aktivierenden CD95-Antikörpers mit den pharmakologisch aktiven Substanzen hervorgehoben, der zu einer signifikant höheren Hemmung der Tumorzellproliferation im Vergleich zu den proliferationssupprimierenden Eigenschaften der Pharmaka alleine führte. Jedoch vermochten die Substanzen in den von uns verwendeten Konzentrationen den auf der Zelloberfläche befindlichen CD95-Rezeptor nicht aufzuregulieren und auch keine relevante Apoptose induzieren. Damit scheint der Einsatz in einem *in vitro*-Modell der dendritischen Zell-basierten Immuntherapie möglich, welcher bei einer deutlichen Apoptoseinduktion fraglich gewesen wäre, da es bei den momentan etablierten Analyseverfahren zum Nachweis dendritischen Zell- induzierter antigen-spezifischer T-Zelllyse keine Möglichkeit gibt, die Anteile apoptotischer Zellen, die durch Pharmakainduktion bedingt sind von denen, die durch antigenspezifische T-Zellen lysiert werden, zu unterscheiden.

3.2 Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika und Gemcitabin auf dendritische- und T-Zellen

3.2.1 Keine Beeinflussung von Viabilität und Reifung dendritischer Zellen bei Generierung in Gegenwart von nichtsteroidalen Antirheumatika und Gemcitabin

In diesem Abschnitt untersuchten wir zunächst, ob die Reifung und Differenzierung der dendritischen Zellen, als Hauptkomponente der Immuntherapie, durch das Chemotherapeutikum Gemcitabin und den selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib gehemmt wird. Dazu wurden nach einer von uns etablierten Methode (Dauer et al., 2003) Monozyten von drei Spendern isoliert und daraus dendritische Zellen generiert. 48 Stunden nach der Monozytenisolation wurde ein Teil der Zellen im Durchflusszytometer auf ihre Oberflächenmarkerexpression überprüft. Wie zu erwarten, waren die Zellen CD83 und CD86-negativ, auf CD14 positiv. Zu Beginn der Monozyten-Kultur mit GM-CSF und IL4 erfolgte die Zugabe der von Celecoxib in Konzentration von 5, 20 und 50 μM und Gemcitabin in Konzentrationen von 2, 5 und 20 nM. Als Kontrolle dienten dendritische Zellen, denen während der Reifung keine pharmakologisch aktiven Substanzen zugesetzt wurden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen erneut durchflusszytometrisch untersucht. Dabei standen die Viabilität der Zellen sowie die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD80, CD83, CD86 und MHC II im Vordergrund. Generell liess sich kein negativer Einfluss der Pharmaka auf Reifung und Differenzierung der dendritischen Zellen beobachten. Selbst in den höchsten eingesetzten Konzentrationen der Pharmaka schien die Entwicklung im Vergleich zur Kontrolle nicht oder nur unwesentlich verändert zu sein.

In der Lifegate-Analyse (Abb. 10) wurde der Prozentsatz der Viabilität der reifen dendritischen Zellen bestimmt. Die Ergebnisse liegen so eng beieinander, (Maximum und Minimumwert haben eine Differenz von 6 %), dass von keinem Einfluss der Pharmaka auf das Überleben der Zellen ausgegangen werden kann.

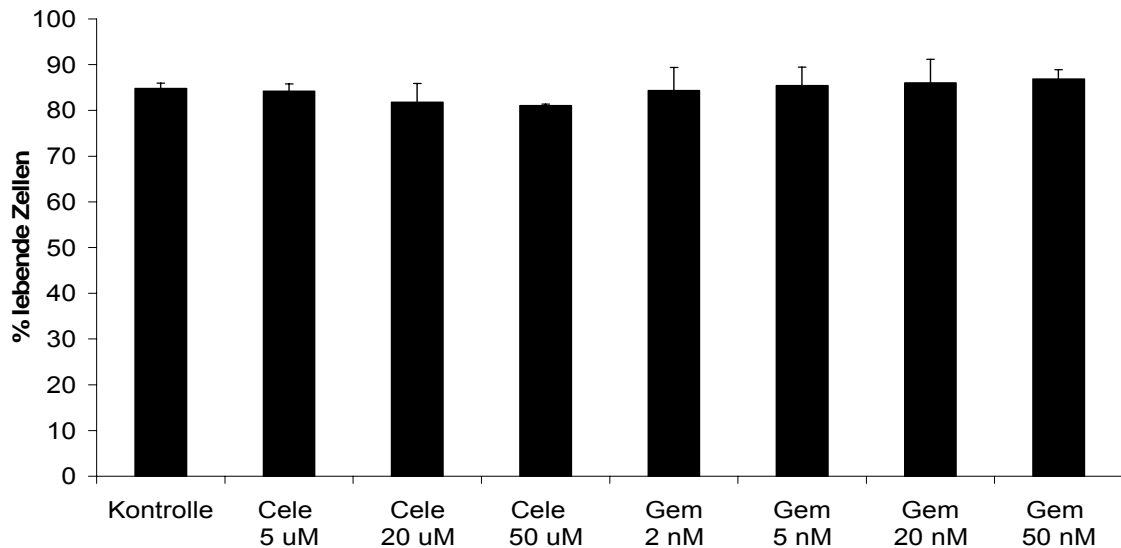


Abb. 10: Prozentsatz lebender dendritischer Zellen, angegeben wie auch bei den folgenden Abbildungen als Mittelwert + SEM aus n=1 Versuch mit n=3 Spender, nach Inkubation mit pharmakologisch aktiven Substanzen. Der Zusatz der Pharmaka während des Generierungsprozesses hatte auf die Viabilität der dendritischen Zellen keinen Einfluss.

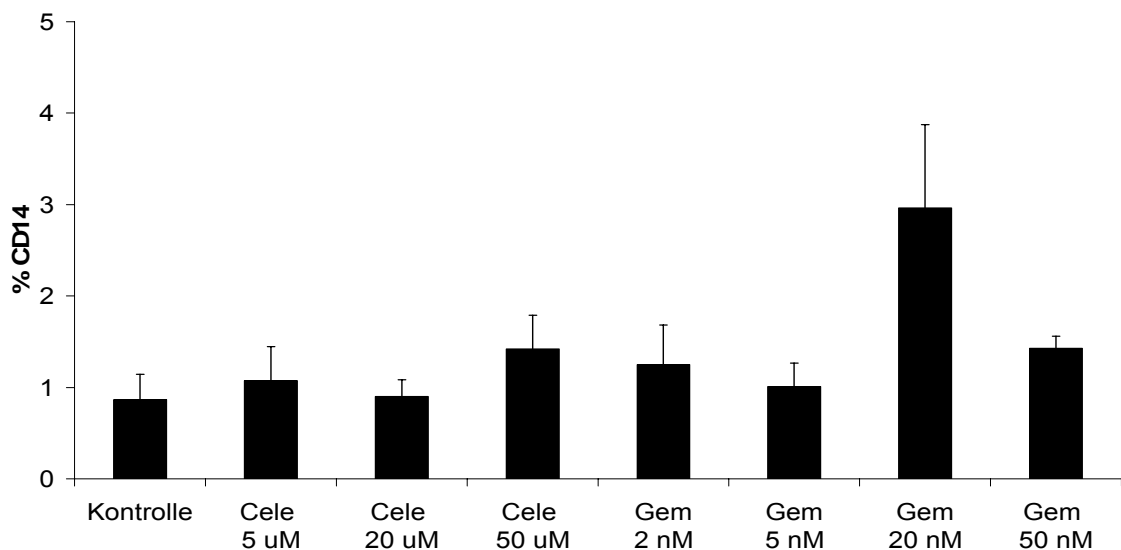


Abb. 11: Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz CD14-positiver Zellen nach abgeschlossener Reifung der dendritischen Zellen von n=3 Spender aus n=1 Versuch in Gegenwart von Pharmaka verschiedenen Typs und Konzentration. Die Oberflächenexpression dieses Markers zeigte sich bei allen Gruppen von der Substanz-Zugabe unbeeinflusst.

Bei CD14 handelt es sich um einen Oberflächenmarker der auf Monozyten exprimiert wird, im Laufe der Reifung zu dendritischen Zellen jedoch stetig abreguliert wird. Wie für reife dendritische Zellen zu erwarten, lag der Anteil der CD14-positiven Zellen nach Abschluss der Reifung unter 3%. Es zeichneten

sich keine Unterschiede für die Pharmaka-inkubierten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle ab. (Abb. 11, Abb.12).

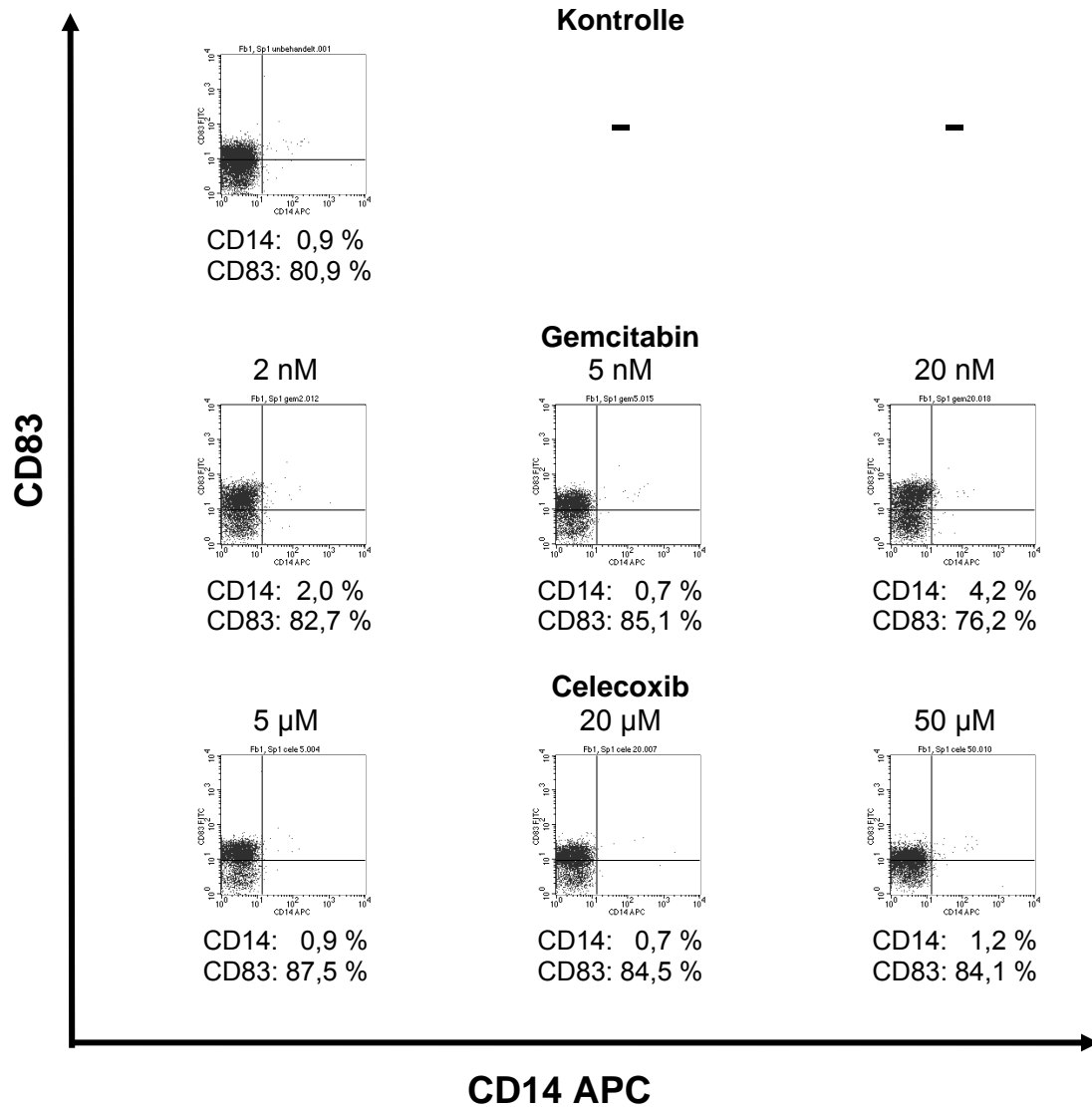


Abb. 12: FACS-Plots reifer dendritischer Zellen die in Pharmaka-Milieu generiert wurden, 48 Stunden nach der Stimulation. Die Plots und angegebenen CD14- und CD83-Werte repräsentieren einen von n= 3 Spender eines Versuchs.

Wie bei den Ergebnissen der anderen Oberflächenmarker bereits demonstriert, sind bei den Prozentsätzen der CD83-positiven Zellen erwartungsgemäß keine relevanten Unterschiede festzustellen (Abb.12, Abb.13). Bis auf eine Ausnahme liegen die Werte aller Gruppen im Bereich der Kontrolle ($76 \pm 6 \%$).

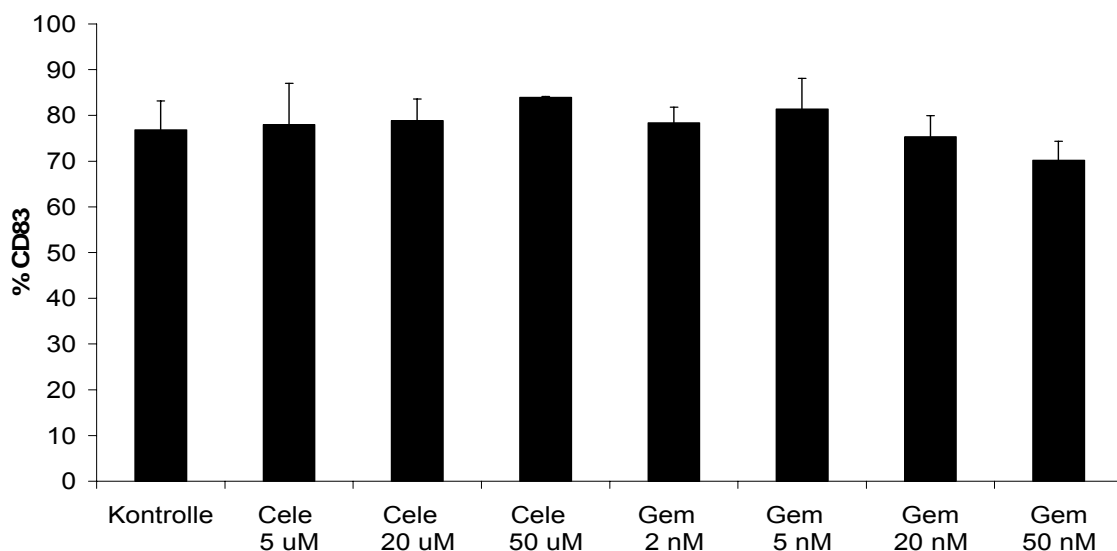


Abb. 13: Prozentsatz CD83-positiver Zellen nach abgeschlossener Reifung der dendritischen Zellen von n=3 Spender aus n=1 Versuch in Gegenwart von Gemcitabin und Celecoxib in verschiedenen Konzentrationen. Die Auswertung der der FACS-Resultate ergab keinen signifikanten Unterschied bei der Oberflächenmarkerexpression der Gruppen.

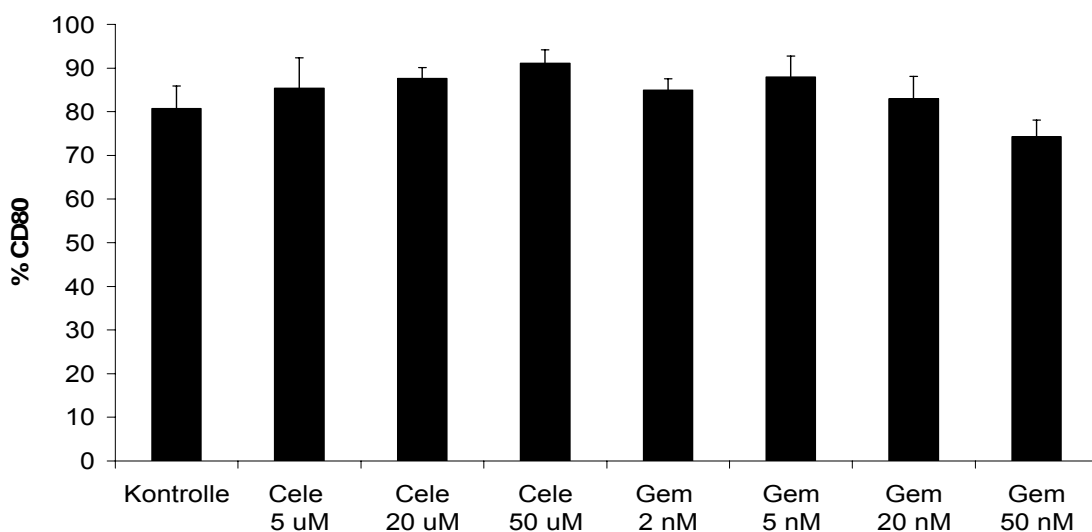


Abb. 14: Prozentsatz CD80-positiver, reifer dendritischer Zellen von n=3 Spender aus n=1 Versuch. Die Generierung erfolgte in Gegenwart eines Zytostatikums (Gemcitabin) und eines selektiven COX-Hemmers (Celecoxib) in verschiedenen Konzentrationen. Die Resultate lassen keinen relevanten Unterschied der Oberflächenmarkerexpression bei dem Vergleich mit der pharmakafreien Kontrollgruppe ($80 \pm 5\%$) erkennen.

Alle dendritischen Zellen waren nach der Ausreifung CD80-positiv (Abb.14), ganz gleich in welchem substanzspezifischen Milieu sie generiert wurden. Alle

Werte lagen nur unwesentlich über, eine Gruppe leicht unter dem Prozentrang der Kontrollgruppe ($80 \pm 5\%$).

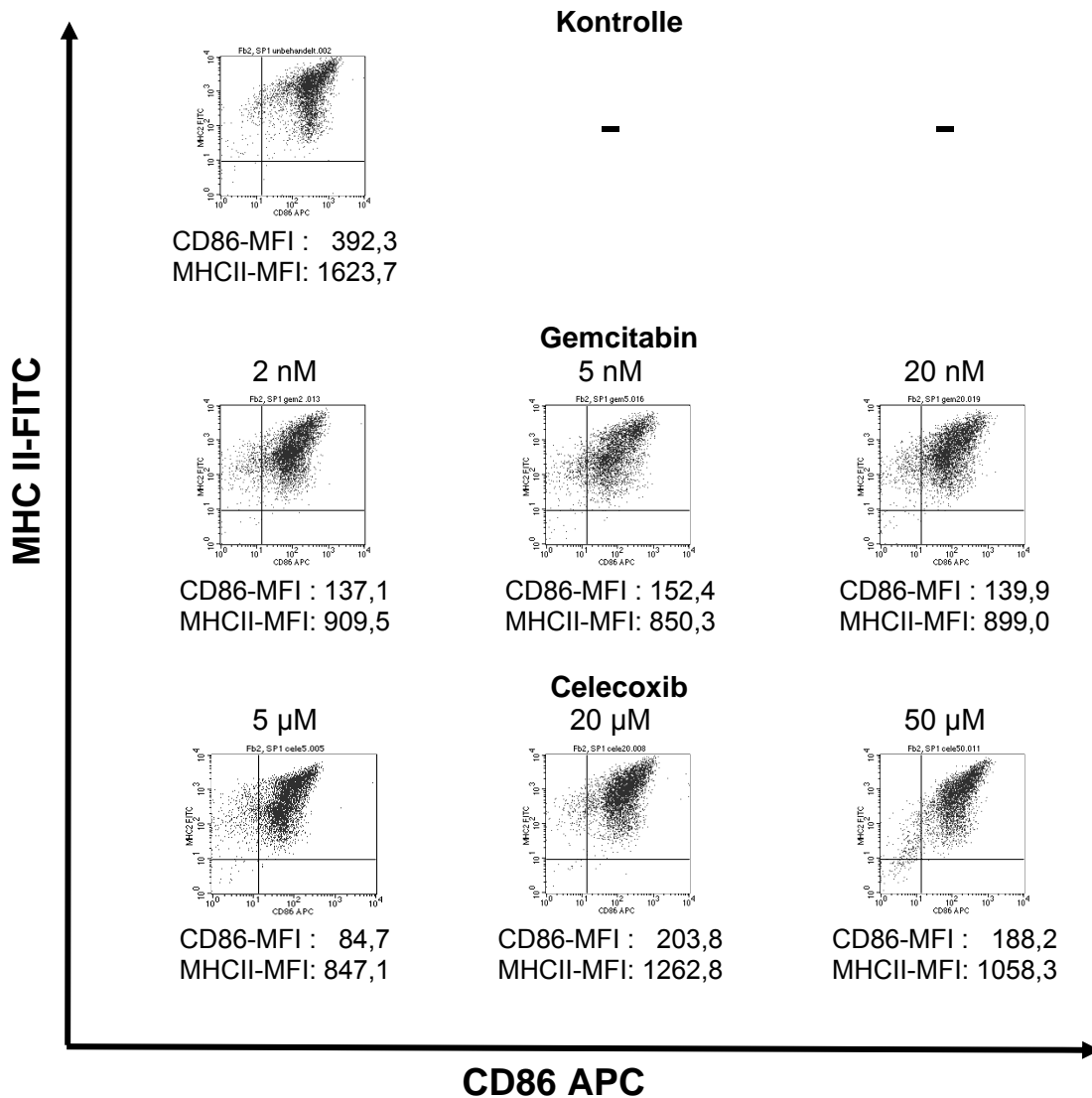


Abb. 15: FACS-Plots reifer dendritischer Zellen die in Pharmaka-Milieu generiert wurden, 48 Stunden nach Stimulation. Die angegebenen CD86- und MHC II-MFI-Werte sind spezifisch für die Zellen eines als repräsentativ erachteten Probanden von $n=3$ Spender.

Auch bei dem neben CD80 wichtigsten kostimulatorischen Oberflächenmolekül CD86 (Abb. 15, Abb. 16) konnten keine eindeutigen Unterschiede, sondern lediglich geringfügige Schwankungen beobachtet werden. Die Gruppe, die mit der Höchstdosierung des Chemotherapeutikums inkubiert worden waren, wies eine höhere MFI als die Kontrollgruppe auf (355 ± 65 vs. 264 ± 78).

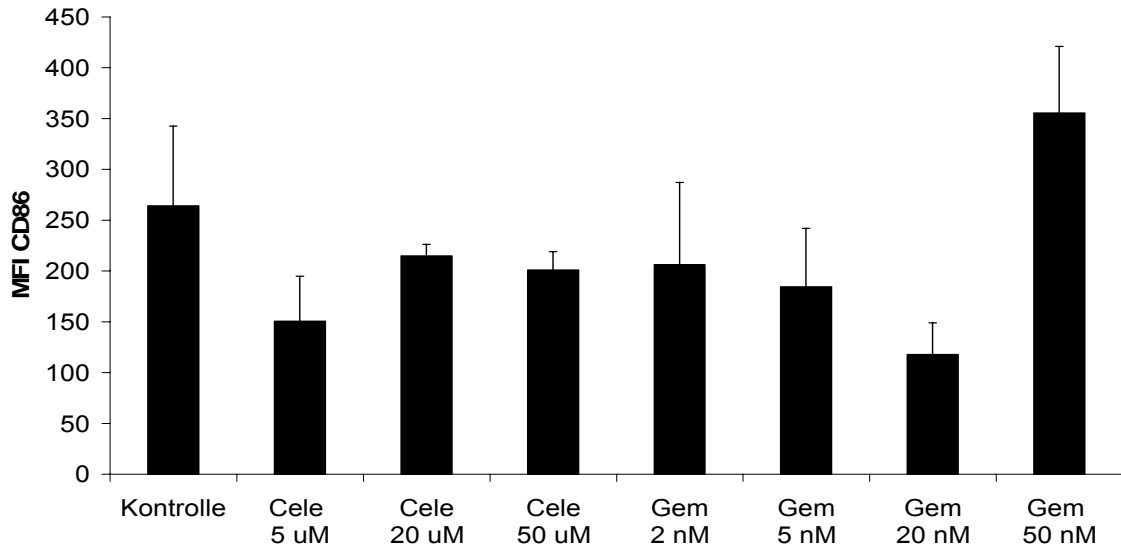


Abb. 16: MFI-Mittelwert + SEM (von n=3 Spender aus n=1 Versuch) des CD86 von dendritischen Zellen, denen zu Beginn des Generierungsprozesses verschiedene pharmakologisch aktive Substanzen zugegeben wurde. Man beachte, dass der Maximalwert (355 ± 65) von der Gruppe mit der höchsten Konzentration des Zytostatikums gestellt wird.

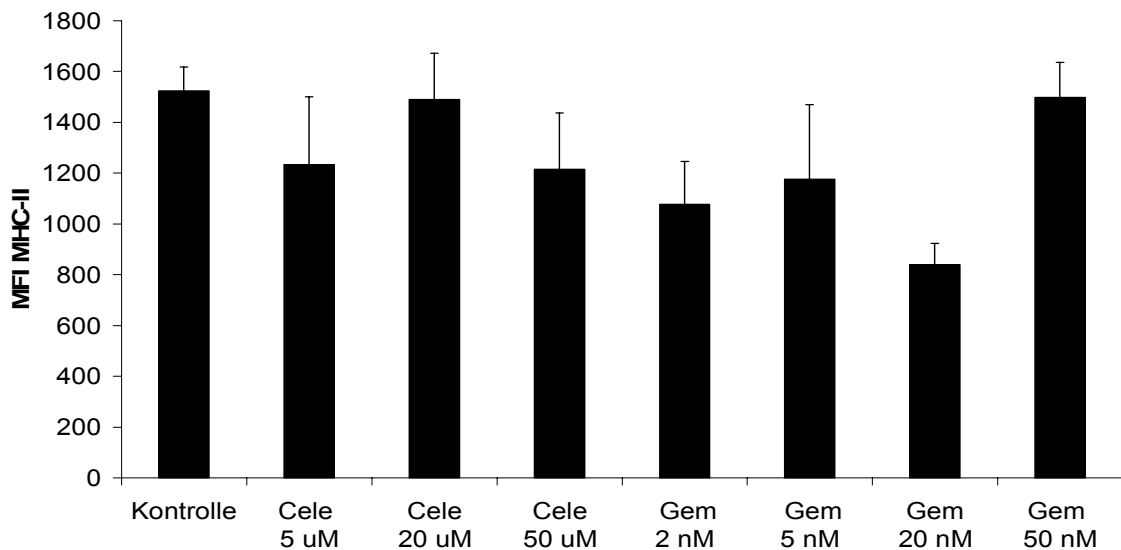


Abb. 17: Die MFI-Mittelwerte+SEM (n=1 Versuch) des MHC II-Moleküls dendritischer Zellen von n=3 Spender, die nach Abschluss der *in vitro*-Reifung in Zytostatikum- bzw. NSAR-angereichertem Medium durchflusszytometrisch bestimmt wurden. Wie bei allen bereits gezeigten Oberflächenmarkern so finden sich auch hier erwartungsgemäß keinerlei Ergebnisse, die auf negative Effekte der Substanzen auf die Reifung der dendritischen Zellen schließen lassen.

MHC II liegt bei unreifen dendritischen Zellen und bei Monozyten intrazellulär vor. Als Folge der Antigenaufnahme durchläuft die APC einige morphologische und funktionelle Veränderungen. Unter anderem wird MHC II auf die

Zelloberfläche transloziert, wo dieser Komplex die Aufgabe der Antigenpräsentation gegenüber den T-Lymphozyten übernimmt. In der vorliegenden Studie konnten bei der Auswertung der MFI-Werte des MHC II wie schon bei allen anderen Oberflächenmarkern keine signifikanten Unterschiede, sondern allenfalls leichte Schwankungen, die jedoch nicht mit dem Pharmakontyp oder der Dosierung in Verbindung gebracht werden können, beobachtet werden. Gemcitabin 50 nM (1498 ± 138) wies beispielsweise den gleichen MFI-Wert wie die Kontrolle (1526 ± 92) auf (Abb. 15, Abb.17).

Abschliessend lässt sich feststellen, dass von den Pharmaka keinerlei Effekte bezüglich Reifung und Differenzierung der dendritischen Zellen ausgingen. Da jedoch die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker lediglich ein phänotypisches Kriterium darstellt, jedoch keine Aussage für die T-Zell-stimulatorische Kapazität treffen kann, wurde dieser Punkt in den darauffolgenden MLRs untersucht.

3.2.2 Pharmakon-spezifische Effekte auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen

Nach der phänotypischen Bestimmung der Expression dendritischer Zelltypischer Oberflächenmarker unter Pharmakaeinfluss, die keinen Effekt der Substanzen auf den Reifungsprozess der Zellen erkennen liessen, wurde darauffolgend die allostimulatorische Kapazität der dendritischen Zellen in der allogenen MLR getestet (Abb. 18). Vor dem Ansatz der Kokultur wurden die nach einem in unserem Labor entwickelten Protokoll (Dauer et al., 2003) generierten reifen dendritischen Zellen auf Oberflächenmarker CD14, CD80, CD83, CD86, HLADR und MHC II, die durch MACS gewonnenen T-Zellen auf Vorhandensein von CD3, CD4 (MHC II-restricted T-Helferzelle) und CD8 (MHC I-restricted T-Killerzellen) durchflusszytometrisch untersucht, um sich vom Reifestatus und dem Zustand der Zellen überzeugen zu können. Die T-Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) mit den dendritischen Zellen in Kokultur gebracht. Zusätzlich wurden die einzelnen Wells mit Gemcitabin (5, 20 und 50 nM) und Celecoxib (5, 20 und 50 μ M) versetzt.

Neben der Kontrollgruppe, wurde eine Gruppe mit DMSO, das als Lösungsmittel für das Celecoxib diente, inkubiert, um einen Effekt von DMSO auf die Proliferation auszuschliessen. Zum Nachweis der Proliferation der T-Zellen wurde radioaktives Tritium-markiertes Thymidin verwendet, das die Zellen bei der DNS-Neusynthese in gleichem Maße wie das physiologische unmarkierte Thymidin aufnehmen. Der Einbau ist dabei abhängig von der DNS-Syntheserate und dient damit als Marker für die Proliferation.

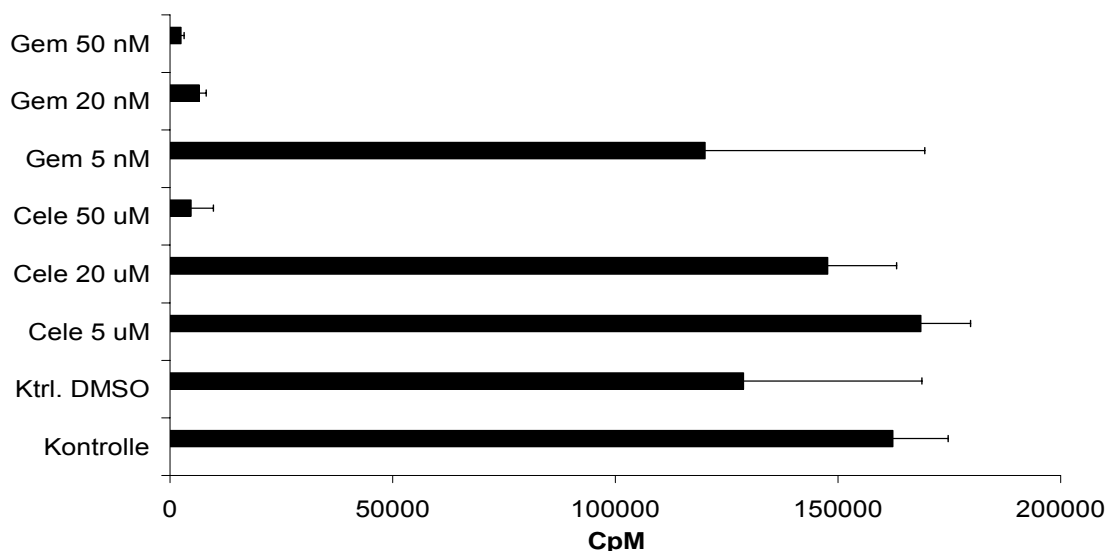


Abb. 18: Allogene MLR mit T- und dendritischen Zellen von n=4 Spender in der Ratio 1:20. Bei dem mit n=4 Ansätze pro Spender durchgeführten Versuch zeigte sich deutlich eine Dosis-Wirkungs- Beziehung der verwendeten Pharmaka auf die dendritische Zell-induzierte T-Zellproliferation. Bei Gemcitabin 20 und 50 nM sowie Celecoxib 50 μ M sind die Unterschiede zu der Kontrolle signifikant. Die Mittelwerte + SEM sind in CpM angegeben.

Das Ergebnis zeigt eine klare Dosis-Wirkung Beziehung (Abb. 18). Je höher das Zytostatikum, bzw. der COX-2-Hemmer dosiert waren, desto eingeschränkter schien das T-Zell-stimulatorische Potential der dendritischen Zellen. Bei Gemcitabin 20 nM (6555 ± 1565 CpM) und Gemcitabin 50 nM (2477 ± 698 CpM) sowie bei der verwendeten Maximalkonzentration des Celecoxibs 50 μ M (5068 ± 4699 CpM) war die T-Zellproliferation hochsignifikant (Gemcitabin 20 nM: $p= 0,0013$, Gemcitabin 50 nM: $p=0,001$ und Celecoxib 50 μ M: $p= 0,003$) gegenüber der pharmakafreien Kontrollgruppe (162269 ± 12527 CpM) reduziert. Erst bei Gemcitabin 5 nM

(120148 ± 49343 CpM) war wieder eine deutliche, jedoch nicht signifikant gesteigerte T-Zellproliferation zu beobachten.

Es bleibt für die allogene MLR festzuhalten, dass das Gemcitabin in all seinen von uns verwendeten Konzentrationen, außer der niedrigsten Dosierung von 5 nM, das Celecoxib erst ab Konzentrationen über 20 µM (147720 ± 15481 CpM) die von dendritischen Zellen abhängige T-Zellproliferation so stark hemmten, dass die erhaltenen Werte weit unter die Werte der Kontrollgruppe absanken.

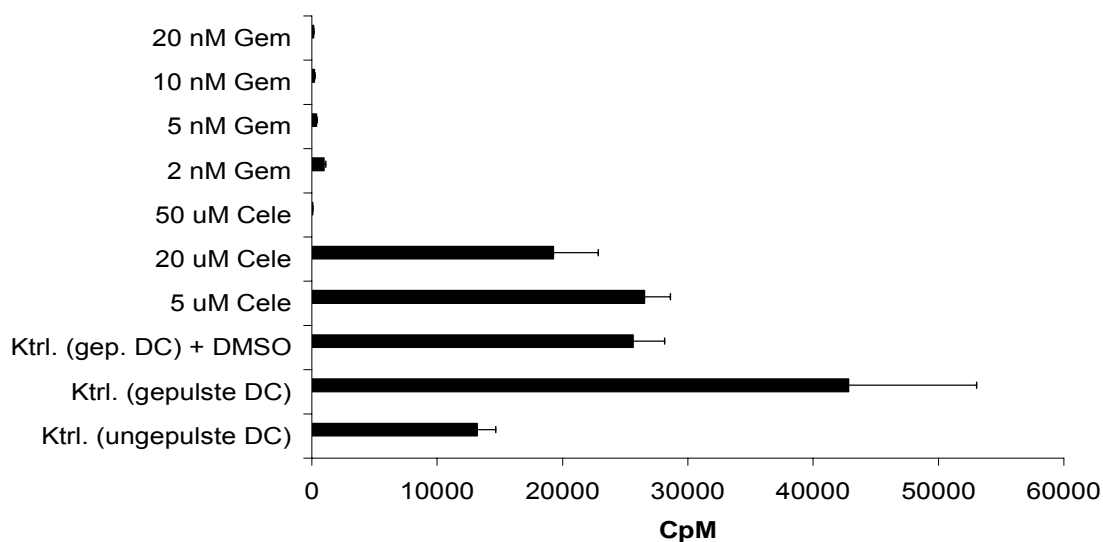


Abb. 19: Autologe MLR mit dendritischen und T-Zellen von n=3 Spender mit n=4 Ansätze. Angabe der Mittelwerte + SEM in CpM. Trotz sehr niedriger Konzentrationen des Zytostatikums Gemcitabin war die dendritische Zell-abhängige T-Zellproliferation kaum noch messbar. Bei den Celecoxib-Gruppen war die Hemmung bis auf die Gruppe mit der Höchstkonzentration dieser Substanz weniger stark ausgeprägt.

Da die Konzentrationen des Gemcitabin von 20- und 50 nM bereits die allogene T-Zellproliferation sehr stark hemmten, wurde in der autologen MLR das Gemcitabin in Konzentration von 50 nM durch 10 nM ersetzt. Es zeigte sich jedoch, dass bereits die niedrigste von uns verwendete Konzentration von 2 nM Gemcitabin (957 ± 162 CpM) die autologe T-Zellproliferation fast gänzlich unterdrückte (Abb. 19). Im Gegensatz dazu war bei den Celecoxib-Gruppen nur bei der Höchstkonzentration von 50 µM (47 ± 29 CpM) eine deutliche Hemmung

zu beobachten. Die niedrigeren Dosierungen ließen eine T-Zellproliferation zu, die zwar unter der mit den Tetanustoxoid-gepulsten dendritischen Zellen inkubierten Kontrollgruppe (42828 ± 10209 CpM), jedoch noch deutlich über Kontrollgruppe mit den ungepulsten dendritischen Zellen (13203 ± 1472 CpM) lagen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Gemcitabin sowohl bei der allogenen als auch bei der autologen MLR in allen Konzentrationen zu einer nahezu kompletten Hemmung der Proliferation durch gepulste dendritische Zellen aktivierten T-Zellen führte. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass COX-2-Inhibitoren für den kombinierten Einsatz mit dendritischen Zellen besser geeignet sind als das Chemotherapeutikum Gemcitabin.

3.3 Steigerung der spezifischen zytotoxischen T-Zell-Lyse durch einen Cyclooxygenase-2-Inhibitor

3.3.1 Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber CD95-abhängiger T-Zell-Zytotoxizität durch einen Cyclooxygenase-2-Inhibitor

Der Zytotox-Assay wurde durchgeführt, um den Einfluss einer Vorbehandlung von Tumorzellen mit Pharmaka auf die Effektivität einer durch dendritische Zellen induzierten spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort zu überprüfen. Der ⁵¹Chrom-Lyse-Test stellt eine quantitative Methode dar, mit der die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen wie z.B. zytotoxischen T-Zellen (CTL) gegenüber mit ⁵¹Chrom-markierten Zielzellen ermittelt wird. Zunächst wurde in einer autologen Kokultur von Lysat-gepulsten dendritischen Zellen und CD3(+)-T-Zellen, wie zuvor beschrieben, Panc-1-spezifische CTL induziert. Zwei Wochen lang erfolgte einmal wöchentlich die Restimulation der Kokultur mit reifen, Tumorlysat-gepulsten dendritischen Zellen. Vor dem Einsatz im Zytotox wurden die COX-2-negativen Panc-1 mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 inkubiert und mit Chrom gelabelt, wobei dieses aufgenommen und reduziert wurde. Chrom kann nur durch Zytolyse wieder freigesetzt werden und ist proportional zur Zytolyse der Zielzellen und somit auch zur zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen. Zum Teil erfolgte zusätzlich eine Inkubation mit dem blockierenden Anti-CD95-Antikörper ZB4, um einen eventuell blockierenden Effekt bei der CD95-vermittelten Lyse der durch Pharmaka sensitivierten Pankreaskarzinomzellen zu zeigen, sowie Concanamycin A, um eine mögliche Perforin-medierte-Lyse zu demonstrieren. Bei Perforin handelt es sich um ein Kanal-bildendes Protein, homolog zu dem C9 Komplement Protein, das als Monomer in den Granulae von CTLs und NK-Zellen vorliegt und das bei einer Freisetzung aus den Granulae aktivierter CTLs und NK-Zellen in der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran der Zielzellen polymerisiert und große, wasserpermeable Kanäle bildet, die eine osmotische Lyse der Zielzelle einleiten. Zusätzlich dienen diese Kanäle für den Einstrom von aus den CTL-Granula stammenden Enzymen.

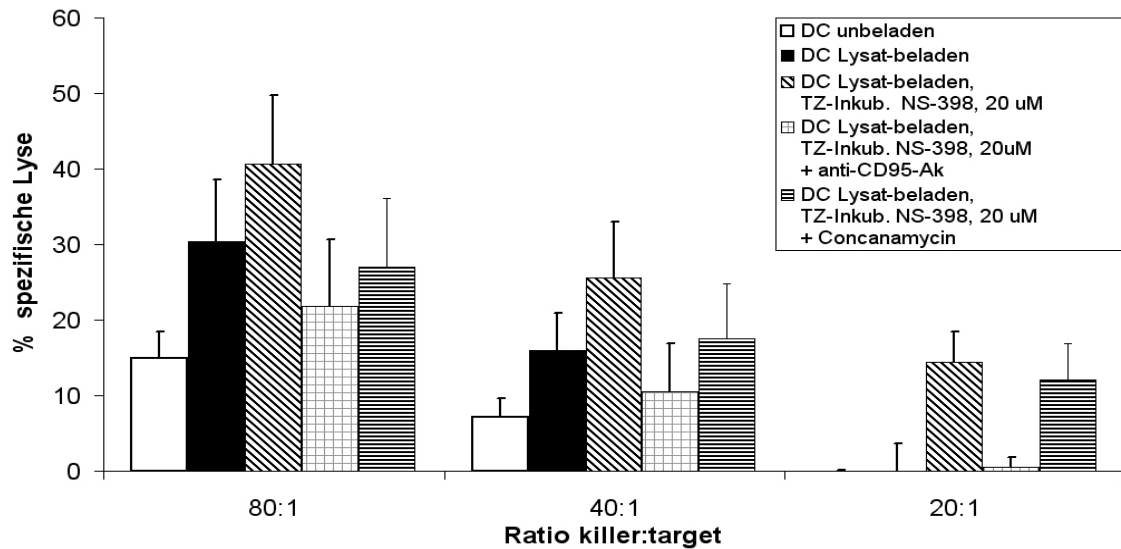


Abb. 20: Prozentuale Mittelwerte + SEM der Lyseraten spezifischer CTL, induziert durch antigen-beladene dendritische Zellen von n=4 Spender mit n=3 Ansätze. Die Gruppe mit NS-398 (20 μ m) vorbehandelten Tumorzellen wies die höchste Lyserate auf, die durch den blockierenden CD95-Antikörper aufgehoben werden konnte. Concanamycin blockierte die CTL nur partiell.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, brachte die Präinkubation der Tumorzellen mit NS-398 im Vergleich zur gepulsten, aber pharmakafreien Gruppe, eine Zuwachsrate von über 10 % Lyserate ($40,7 \pm 7,9$ % vs. $30,4 \pm 8,1$ % bei einem Verhältnis von 80:1). Der Einsatz des blockierenden Antikörpers führte zu einer Lyserate ($21,8 \pm 8,8$ %) der mit NS-398 inkubierten Panc-1-Tumorzellen, die nur unwesentlich über der durch ungepulste dendritischen Zell-vermittelten unspezifischen Lyserate lag ($14,9 \pm 3,6$ % bei einer Ratio von 80:1). Somit fand eine Aufhebung der durch Vorbehandlung mit NS-398 erwirkten Steigerung der Lyserate statt. Dies beweist, dass die Lyse der Zielzellen CD95-mediert erfolgte.

Im Gegensatz dazu konnte durch das Concanamycin, das während der Pharmakainkubationsphase zugegeben wurde, die T-Zell-spezifische Lyse nur zum Teil verhindert werden (27 ± 9 %).

3.3.2 Zytokinproduktion bei Induktion von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen

Die Bestimmung der Zytokinprofile von IFN- γ und IL-12 in den Überständen der Kokultur erfolgte durch ELISA.

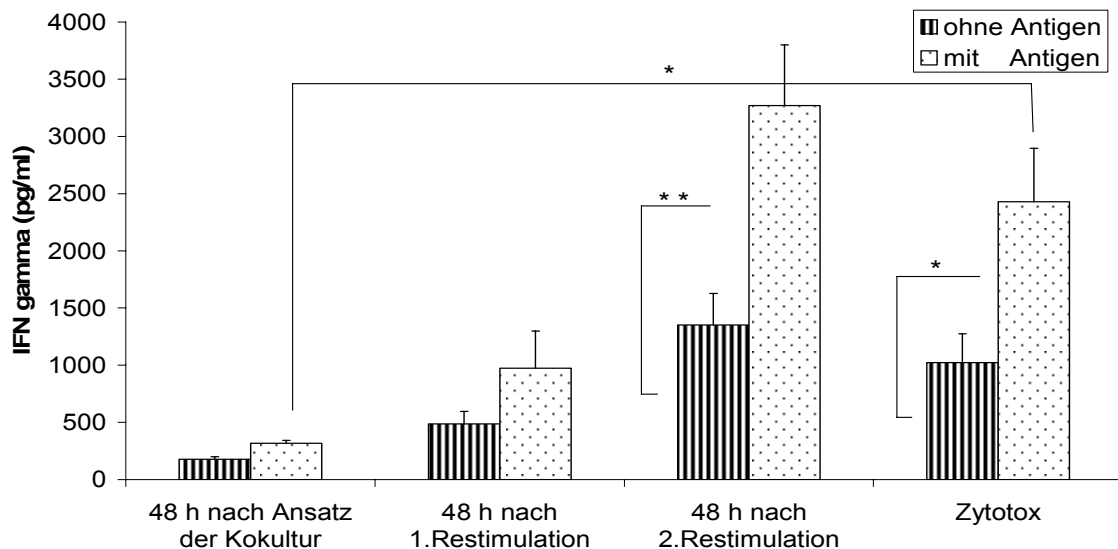


Abb. 21: IFN- γ -Level (pg/ml), angegeben als Mittelwert + SEM von n=4 Spender mit n=2 Ansätze, zu Beginn des Versuchs, nach den Restimulationen und am Tage des Zytotox. Sowohl bei den Antigen-gepulsten, als auch bei den unbeladenen dendritischen Zell-Gruppe steigt der Zytokinspiegel stetig an, jedoch ist die Konzentration dieses Zytokins bei der Antigen-gepulsten Gruppe zum Teil mehr als doppelt so hoch wie bei der Kontrolle.

Anfangs noch auf niedrigem Niveau stiegen die IFN γ -Level sowohl der Antigen-gepulsten als auch ungepulsten Gruppen stetig an, um zum Zeitpunkt 48 h nach der 2. Restimulation ihre Maxima (3270 ± 530 pg/ml und 1349 ± 278 pg/ml) zu erreichen (Abb.21). Vergleicht man die Zytokinspiegel zum gleichen Zeitpunkt so fällt auf, dass von T-Lymphozyten, die von gepulsten dendritischen Zellen das Antigen präsentiert bekamen, eine signifikant höhere Zytokinproduktion zu erwarten ist als von T-Lymphozyten, die mit unbeladenen dendritischen Zellen in Kontakt kamen. Die Unterschiede sind 48 Stunden nach der 2. Restimulation mit $p= 0,009$ als hochsignifikant, am Tage des Zytotox mit $p= 0,012$ als signifikant zu bezeichnen. Die erhöhte Antigen-spezifische IFN- γ -Produktion nach den Restimulationen ist Ausdruck einer Induktion Antigen-spezifischer, IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen.

Die Entwicklung der IL-12-Konzentration (Abb. 22) verlief sowohl bei der gepulsten- als auch bei der ungepulsten Gruppe wie bei IFN- γ . Die Produktion dieses Zytokins in der Kokultur ist assoziiert mit entsprechend gesteigerter IL-12-Produktion durch dendritische Zellen in Gegenwart von Antigen. 48 h nach der 2. Restimulation war der Unterschied der IL-12-Spiegel der gepulsten- (2704 ± 371 pg/ml) im Vergleich zur ungepulsten dendritischen Zell-Gruppe (861 ± 103 pg/ml) mit $p= 0,007$ hochsignifikant, am Tage des Zytotox signifikant ($p= 0,018$).

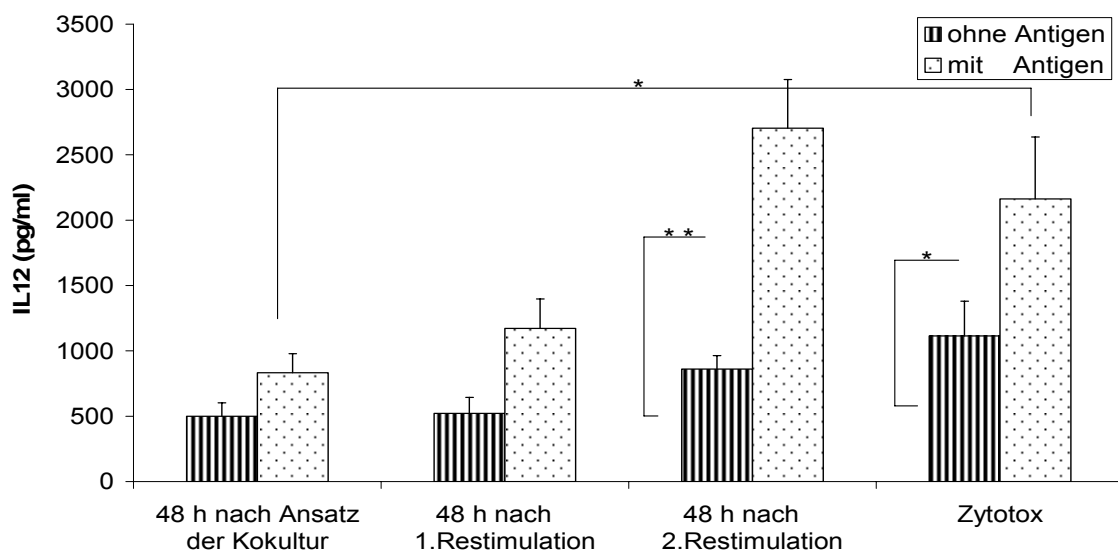


Abb. 22: Durch ELISA bestimmter IL-12-Level (pg/ml) der Kokultur mit Antigen-gepulsten sowie ungepulsten dendritischen Zellen mit $n=2$ Ansätze von $n=4$ Spender jeweils zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Ansatz der Kokultur bzw. den Restimulationen und zum Zeitpunkt des Zytotox. Die teilweise signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind charakteristisch für die Induktion Antigen-spezifischer CTL.

Die Entwicklung der Zytokinprofile von IFN γ und IL-12 im Laufe der Studie, die von einem stetigen Anstieg und von teils signifikanten bis hochsignifikanten Unterschieden zwischen den ungepulsten und den Antigen-gepulsten dendritischen Zellen geprägt war, zeigt, dass die Antigen-spezifische Induktion einer Th1-Antwort in der Kokultur mit den Tumorlysate-gepulsten dendritischen Zellen mit der Induktion Antigen-spezifischer CTL assoziiert ist.

4. DISKUSSION

4.1 Überblick über die Ergebnisse

Der erste Abschnitt dieser Studie befasste sich mit den Effekten der eingesetzten pharmakologischen Substanzen auf Pankreaskarzinomzellen. Die Inkubation von Pankreaskarzinomzellen mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (Celecoxib) und einem unselektiven COX-Hemmer (ASS) in verschiedenen Konzentrationen führte zu keiner Steigerung der CD95-Expression auf der Tumorzelloberfläche. Bei dem im Anschluss durchgeführten Proliferationsassay konnte in Abhängigkeit von der verwendeten Substanz eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung beobachtet werden. Diese fiel bei den Zytostatika Gemcitabin und 5-Fluoruracil in äquivalenter Dosierung höher aus als bei dem verwendeten COX-2-Hemmer Celecoxib, dessen Effekte auf die COX-2-defizienten Panc-1 eine COX-unabhängige Wirkung nahelegt. Die Kombination mit einem aktivierenden CD95-Antikörper führte bei allen Substanzen vor allem in niedriger Konzentration zu Synergismen, die sich in einer noch ausgeprägteren Zellproliferationssuppression bemerkbar machten. Im Gegensatz dazu konnten apoptoseinduzierende Effekte weder durch Inkubation mit den Zytostatika und dem COX-2-Hemmer noch durch deren Kombination mit dem CD95-Antikörper belegt werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Studie waren die Effekte der Chemotherapeutika und COX-Hemmer auf dendritische Zellen und die dendritische Zell-induzierte T-Zellproliferation im Fokus unseres Interesses. Bei der Inkubation dendritischer Zellen mit pharmakologisch aktiven Substanzen konnte bei der durchflusszytometrischen Untersuchung kein Einfluss der Pharmaka auf den Phänotyp, die Reifung und Differenzierung nachgewiesen werden. Ein anderes Resultat ergaben die im Anschluss durchgeführten allogenen und autologen MLRs. Gemcitabin hemmte die dendritische Zell-induzierte T-Zellproliferation bereits in der Minimalkonzentration, wohingegen Celecoxib selbst bei mehrfacher Überdosierung (bezogen auf den Plasmaspiegel) die Proliferation einschränkte, jedoch nicht gänzlich unterdrückte.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit konnte durch den Zytotox-Assay die Induktion von Panc-1-spezifischen CTL durch Lysat-gepulste dendritische Zellen demonstriert werden, deren Lyserate durch Präinkubation der Tumorzellen mit einem COX-2-Hemmer und einer dadurch ausgelösten Sensitivierung gesteigert werden konnte. Es konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Effekt CD95-vermittelt ist, da die durch den COX-2-Inhibitor gesteigerte Lyserate durch einen blockierenden CD95-Antikörper aufgehoben werden konnte.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Diskussion der verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen

4.2.1.1 Chemotherapeutika

Bei 80% der an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten scheidet eine radikalchirurgische Therapieoption aus und macht sie somit zu potentiellen Kandidaten für eine systemische Chemotherapie, obwohl sich ungünstigerweise dieser Tumorzelltyp als äußerst chemoresistent herausgestellt hat (Kornmann et al., 1999). Als Standardzytostatikum für die Chemotherapie von Patienten mit Pankreaskarzinom galt lange Zeit das 5-Fluoruracil, das ein selbst nicht antineoplastisch wirksames, synthetisches, fluoriertes Pyrimidinderivat ist. Die Hemmung der Zellteilung erfolgt nach Metabolisierung durch die aktiven Metaboliten 5-Fluorouridintriphosphat (FUTP), das zur Hemmung der RNA-Synthese (Bildung fehlerhaft strukturierter RNS) führt und 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP), das zum einen eine Blockade der DNS-Synthese (Hemmung der Thymidilat-Synthetase) und zum anderen DNA-Strangbrüche (nach Einbau phosphoryliertem FdUMP in die DNA) bewirkt.

In den den Jahren 1996 und 1998 wurde zuerst in den USA, dann in Europa ein neu entwickeltes Präparat mit der Bezeichnung „Gemcitabin“ zur systemischen Chemotherapie von gastrointestinalen Tumoren zugelassen. Gemcitabin (Difluorodeoxycytidin, dFdC) wird durch Nukleosidkinasen zu dem wirksamen Diphosphat-Nukleosid (dFdCDP) und Triphosphat-Nukleosid (dFdCTP) metabolisiert. Die zytotoxische Wirkung scheint auf den Wirkungen dieser beiden Metabolite zu beruhen. Zum einen blockiert dFdCDP die Ribonukleotidreduktase, die allein die Reaktion katalysiert, welche Deoxynukleosidtriphosphate für die DNS liefert. Die Blockade dieses Enzyms bewirkt eine Reduktion der Konzentration von Deoxynukleotiden und speziell von Deoxycytidintriphosphat (dCTP). Zum zweiten konkurriert dFdCTP mit dCTP um den Einbau in die DNS und in geringerem Maße in die RNS. Durch die Reduktion an intrazellulärem dCTP wird der Einbau von dFdCTP in die DNS verstärkt. Die DNS-Polymerase- ϵ ist in wachsendem Umfang nicht in der Lage, Gemcitabin zu entfernen und die wachsenden DNS-Stränge zu reparieren.

Nachdem dFdCTP in die DNS eingebaut wurde, erfolgt der Einbau eines weiteren Nukleotids; Danach kommt es zu einer sogenannten maskierten Kettenbeendigung, bei der die weitere DNS-Synthese vollständig inhibiert wird.

In klinischen Studien (Burris et al., 1997) mit Patienten, bei denen ein Pankreaskarzinom fortgeschrittenen Stadiums diagnostiziert wurde, führte die Monotherapie mit Gemcitabin mit 24% klinischem Nutzen des Allgemeinzustandes zu einem signifikant besseren Ergebnis als die 5-FU-Therapie mit 5%. Die mittlere Überlebensrate von 12 Monaten wurde von 18% der mit Gemcitabin behandelten Patienten erreicht, im Gegensatz zu den Personen, denen das 5-FU appliziert worden war und die mit 2% nur einen Bruchteil des Gemcitabin-Prozentsatzes erzielten. Bisher erwies sich kein Wirkstoff effektiver als Gemcitabin (Berlin et al., 2002). Auch die Kombination mit anderen antitumoralen Substanzen erhöhte lediglich die Toxizität (Adsay et al., 2001), abgesehen von Oxaliplatin, das in momentan noch laufenden klinischen Studien in Kombinationsgabe mit Gemcitabin zu bislang sehr erfolgversprechenden Resultaten führte. Obwohl das objektive Ansprechen auf diese Substanz unter 10% liegt, gilt Gemcitabin bei der primären Chemotherapie von Patienten mit einem nicht resezierbaren Pankreaskarzinom als Zytostatikum der Wahl (Burris et al., 1997; Shore et al., 2003).

4.2.1.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika

Ende des 19. Jahrhunderts wurde das Aspirin als antipyretisches, anti-inflammatorisches und analgetisches Medikament auf den Markt gebracht. Kurz danach wurde eine Gruppe von Wirkstoffen mit ähnlichen Eigenschaften entdeckt und unter dem Sammelbegriff „nicht steroidale Antirheumatika“ (NSAR) zusammengefasst. In den siebziger Jahren identifizierten Vane und seine Kollegen die Cyclooxygenase als das therapeutische Ziel der NSAR (Vane, 1971). Sowohl die COX-1 als auch die COX-2 werden durch kovalente Bindung des Acetylrests von der Acetylsalicylsäure irreversibel gehemmt, wodurch die Oxidation der Arachidonsäure unterbunden wird (Meade et al., 1993; Lecomte et al., 1994; Mancini et al., 1994). Celecoxib

hingegen ist ein oral wirksamer und innerhalb des therapeutischen Dosierungsbereichs (200 mg - 400 mg pro Tag), selektiver Cyclooxygenase-2-Inhibitor, der somit nur die induzierbare COX-2, nicht jedoch die konstitutive COX-1 hemmt. Als Vorteil dieser Substanzgruppe gegenüber den unselektiven NSAR galt lange Zeit, dass unerwünschte Wirkungen hauptsächlich auf den Gastrointestinaltrakt ausblieben. In jüngster Zeit mehren sich jedoch Hinweise, dass ein Teil der Coxibe im Zusammenhang mit Herz-, Kreislauf- und Gefäßerkrankungen eine nicht unerhebliche Rolle gespielt haben dürften. So wurde das Präperat Vioxx® (Rofecoxib) von dem Hersteller aus dem Handel genommen. Jedoch sind die selektiven COX-2-Inhibitoren weiterhin im Fokus der onkologischen Forschung. Die Resultate von randomisierten, doppelblinden placebo-kontrollierten Studien bei FAP-Patienten schreiben u.a. dem Sulindac und dem Celecoxib eine adenom-regressive Wirkung bei einem Teil der Patienten zu, in manchen Fällen wurde sogar eine komplette Regression der Adenome nach regelmässiger COX-2-Inhibitor-Einnahme beobachtet (Labayale et al., 1991; Giardello et al., 1993; Nugent et al., 1993; Smalley und DuBois, 1997; Steinbach et al., 2000).

4.2.2 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (*FastDC*)

Bei unseren Versuchen fanden dendritische Zellen, die nach *FastDC*-Protokoll generiert wurden, Verwendung (Dauer et al., 2003). Dazu werden Monozyten 24 h lang mit GM-CSF und IL-4 inkubiert, bevor sie mit proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE2 (Feuerstein et al., 2000) weitere 24 h stimuliert werden, um darauffolgend alle Phasen der dendritischen Zell-Differenzierung zu durchlaufen. Dabei zeigen die Zellen zuerst Charakteristika unreifer dendritischer Zellen wie die Herunterregulierung des CD14-Monozytenmarkers sowie eine Zunahme der Endozytose-Aktivität und eine Antwort auf das Inflammations-Chemokin MIP-1 α , bevor sie hohe Level von Molekülen, wie sie für reife dendritische Zellen typisch sind (kostimulatorisches CD83, MHC-II und CCR7) exprimieren.

Mit Tetanus-Toxoid gepulste *FastDC* induzierten eine T-Zellproliferation, die im Vergleich mit Tetanus-Toxoid-gepulsten, nach 7-Tage *StandardDC*-Protokoll generierten *moDCs* in puncto Induktion einer T-Zellproliferation ebenbürtig waren (Dauer et al., 2003), was zeigt, dass sie in der Lage sind, Protein aufzunehmen und für die Präsentation auf MHC-Molekülen zu prozessieren.

Die Proliferation naiver CD45RA⁺ Zellen in großem Umfang lässt darauf schließen, dass Antigen-beladene *FastDC* nicht nur Immunantworten stimulieren, um Antigen wiederzuerkennen, sondern auch um effektive primäre Immunantworten zu induzieren. Desweiteren sind *FastDC* in gleichem Umfang wie *moDCs* in der Lage, Th-1-Immunantworten zu stimulieren, wie aus der IFN γ -Produktion von autologen T-Zellen, die mit Tetanus-Toxoid-beladenen *FastDC* in Kokultur waren, abzuleiten ist.

Ein Grund dafür, dass die schnellere Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten-Vorläufern erst in jüngster Zeit vorangetrieben wurde, ist, dass erst seit kurzem Kenntnis und Möglichkeit zur Bestimmung von Oberflächenmarkern und morphologische Kriterien bestehen, die es erlauben, dendritische Zellen zu identifizieren. Bisher musste man sich mit Langerhans Zell-ähnlicher Morphologie begnügen: Zunahme der Zellgrösse, Bildung von Granulae und Formation zytoplasmatischer Vorsprünge.

In vitro benötigte man dazu 5-7tägige Inkubation unter Zugabe von GM-CSF und IL-4, um dieses morphologische Bild zu erhalten. Daraus entwickelte sich das Standard-Protokoll für die Generierung von dendritische Zellen aus Monozyten (Romani et al., 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Obwohl dieses Protokoll auch weiterhin für die Generierung von dendritischen Zellen zur Induktion antitumorale Immunantworten bei Vakzine-Studien genutzt werden kann (Nestle et al., 1998; Thurnher et al., 1997; Kugler et al., 2000), stellt die dafür benötigte Zeitspanne nicht die Dauer für die Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten unter physiologischen Umständen dar.

Der Vorteil der *FastDC* gegenüber den *StandardDC* liegt deutlich auf der Hand. Die Zeitersparnis, die dieses Verfahren weniger anfällig für mikrobielle Kontamination macht, sowie der reduzierte Arbeits- und Kostenaufwand machen *FastDC* zu einer interessanten Option bei der zellulären Immuntherapie.

4.2.3 Das Pankreaskarzinom *in vitro*-Modell

Das *in vitro*-Modell stellt eine Möglichkeit dar, Tumor-Vakzinen, die auf mit unfraktioniertem Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen basieren, zu überwachen und zu verbessern. Das von uns verwendete Verfahren ermöglicht die Induktion einer effektiven CTL-Antwort gegen Pankreaskarzinomzellen durch wiederholte *in vitro*-Stimulation von T-Zellen mit Tumorlysat-gepulsten dendritischen Zellen. Unreife dendritische Zellen werden aufgrund ihrer hohen Phagozytosekapazität mit Tumorlysat gepulst (Sallusto et al., 1995). Reife dendritische Zellen sind bei der Induktion einer Immunantwort effektiver wenn sie ein Aktivierungssignal wie LPS, bakterielle DNA (Hartmann et al., 1999), oder Entzündungsmediatoren wie TNF α , PGE2, IL1 β (Turner et al., 1999) oder T-Zell-abgeleitet Signale wie den CD40-Liganden erhalten (Cella et al., 1996). Da Tumorlysat von Pankreaskarzinomzellen keinen ausreichenden Ausreifestimulus darstellen, wurde auch im Hinblick auf eine klinische Applikabilität die Kombination aus TNF α , PGE2 und IL-1 β als Aktivator verwendet (Schnurr et al., 2001). Ausgereifte dendritische Zellen regulieren kostimulatorische Moleküle auf, sezernieren den T-Zell-Differenzierungsfaktor IL-12 und präsentieren das Antigen aufgrund gesteigerter phänotypischer Stabilität und erhöhter Halbwertszeit der MHC I- und MHC II-Moleküle effektiver (Cella et al., 1997) und fördern auf diese Weise die Entwicklung von Th1-Zellen, im Gegensatz zu unreifen dendritischen Zellen, die die Gefahr bergen, nichtproliferative IL10-produzierende T-Zellen zu induzieren (Jonuleit et al., 2000). Die Theorie, dass dendritische Zellen, die nekrotischen Zellen exponiert waren, ohne den Zusatz von Aktivatoren ausreifen (Galucci et al., 1999; Sauter et al., 2000) dürfte eher auf eine Kontamination der Zelllinien mit Mycoplasmen zurückzuführen sein (Salio et al., 2000). Um eine klonale Expansion der Tumorantigen-spezifischen T-Zellen zu bewirken, muss die

Kokultur mindestens zweimal mit Lysat-gepulsten dendritischen Zellen restimuliert werden, da erst ab diesem Zeitpunkt eine signifikant erhöhte T-Zellproliferation als Antwort auf das Tumorantigen zu erwarten ist (Dauer et al., 2003). Schnurr konnte zeigen, dass eine dendritische Zellbasierte T-Zellaktivierung und -Proliferation mit der Tumorzelllyse korrelieren. Nach mehrfacher Restimulation wurde ein effektives Abtöten von Panc-1-Zellen beobachtet, wohingegen die Kontrollzelllinie KATO III in keinem nennenswerten Umfang lysiert wurde (Schnurr et al., 2001). Die lytische Aktivität war durch Panc-1 spezifische CTL mediiert, weil die Tumorzelllyse auf MHC I begrenzt war. Das Pankreaskarzinom *in vitro*-Modell beweist, dass CTL, die wiederholt *in vitro* mit Lysat-gepulsten dendritischen Zellen stimuliert wurden, befähigt sind Pankreaskarzinomzellen zu erkennen und abzutöten.

4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

4.3.1 Wirkung von Cyclooxygenase-Inhibitoren und Zytostatika auf Pankreaskarzinomzellen

4.3.1.1 Keine Beeinflussung der Oberflächenmarker-Expression durch nichtsteroidale Antiphlogistika und Gemcitabin

Wir hypothesierten, dass eine Vorinkubation der Pankreaskarzinomzellen mit Gemcitabin und NSAR die durch Tumorlysat-gepulste, dendritische Zell-induzierte T-Zell-medierte Lyse steigern würde. Ein möglicher Mechanismus stellt die Hochregulierung des auf den Tumorzellen exprimierten CD95/Fas-Liganden dar, die es den zytotoxischen T-Zellen ermöglichen, Tumorzell-Apoptose zu induzieren. Bei den von uns verwendeten Zelllinien Panc-1, MiaPaCa-2 und BxPc-3 zeigte sich nach Inkubation mit NS-398, Celecoxib und ASS jedoch keine erhöhte Expression des CD95-Liganden.

Apoptose als Folge der Krebstherapie wird durch die Aktivierung der Hauptapoptose-Signalwege (Rezeptor-vermittelt oder mitochondrial) induziert. Der jeweilige Beitrag dieser Signalwege bei der Pharmaka-induzierten Apoptose wird kontrovers diskutiert (Debatin, 1997; Kaufmann und Earnshaw, 2000; Herr und Debatin, 2001). Während einige Studien zeigen, dass eine Großzahl von Zytostatika und NSAR den Zelltod über den Cytochrom-C/Apaf-1/Caspase-9-abhängigen mitochondrialen Signalweg herbeiführen (Eischen et al., 1997; Landowski et al., 1999), gehen andere von einer CD95-Rezeptor/Ligand-Aktivierung durch die verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen aus (Fulda et al., 1998a und 1998b; Eichhorst et al., 2001). Der relative Anteil des Todesrezeptor- versus mitochondrialen Signalweges bei der Apoptoseinduktion ist ferner abhängig von der Art des Pharmakons, dessen Konzentration und Kinetik sowie den unterschiedlichen, Zelltypus-spezifischen CD95-abhängigen Signalwegen (Scaffidi et al., 1998; Fulda et al., 2001).

Bezogen auf Pankreaskarzinomzellen konnte Glazyrin zeigen, dass eine Aufregulierung des CD95-Ligand nicht zwangsläufig mit einer Sensitivierung gegenüber einer CD95-vermittelten Apoptose einhergehen muss (Glazyrin et al., 2001). Bei den in dieser Studie verwendeten Substanzen wurden bei Koinkubation der Tumorzellen mit IFN- γ eine erhöhte CD95L-Expression beobachtet, die aber nicht in einer erhöhten Sensitivierung gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose resultierte. Taxol® (Paclitaxel) hingegen sensitivierte die Zellen für eine Todesligand-medierte Apoptose, ohne dass es zu einer Aufregulation des CD95-Liganden gekommen wäre. Ähnliches wurde für andere Zelltypen beschrieben (Owen-Schaub et al., 1994; Pohl et al., 1999). Der Basallevel des CD95-Liganden auf der Zelloberfläche reicht demnach für die Aktivierung von Apoptosesignalen im Zellinneren aus.

4.3.1.2 Nichtsteroidale Antirheumatika- und Zytostatika-vermittelte Effekte auf Zellproliferation und Apoptose von Pankreaskarzinomzellen

Wir analysierten zunächst den proliferationshemmenden Effekt des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib und der beiden Zytostatika Gemcitabin und 5-Fluoruracil sowohl alleine als auch in Kombination mit einem aktivierenden CD95-Antikörper auf die COX-2-positiven BxPc-3- und die COX-2-defizienten Panc-1-Pankreaskarzinomzelllinien. Im zweiten Teil untersuchten wir, ob der mit Hilfe des kolorimetrischen Assay bestimmte proliferationshemmende Effekt der verwendeten Pharmaka nur auf Beeinflussung des Zellzyklus beruht oder ob eine Apoptoseinduktion erfolgte. Ferner sollte der oft beschriebene COX-2-unabhängige Effekt des Celecoxib durch Verwendung der COX-2-defizienten Panc-1-Tumorzelllinie verifiziert werden (Grösch et al., 2001).

Bei allen verwendeten Substanzen konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Tumorzellproliferation festgestellt werden, wobei die Zytostatika in äquivalenter Dosis effektiver als das Celecoxib erschienen. Die Kombination der Pharmaka mit dem CD95-Antikörper resultierte sowohl bei den Zytostatika als auch bei dem COX-2-Hemmer in einer signifikant gesteigerten Hemmung

der Zellproliferation im Vergleich zu den Pharmaka alleine. In einigen Fällen war die Kombination Pharmakon plus Antikörper sogar effektiver als die nächst höhere Dosierung der Substanz alleine. Besonders bei den Gruppen, die mit niedrigen Konzentrationen der pharmakologisch aktiven Substanzen inkubiert wurden, führte die Zugabe des Antikörpers im Vergleich zu den Substanzen alleine zu einer stärkeren Zellproliferationshemmung. Das Ansprechen der COX-2-defizienten Panc-1 auf das Celecoxib legt eine COX-unabhängige Wirkung der NSARs auf Tumorzellen nahe, die in der Inhibition alternativer Ziele wie k-Ras, NF- κ B oder der cGMP-Phosphodiesterase bestehen könnte (Shiff und Rigas, 1999).

Bei der im Anschluss an den kolorimetrischen Assay durchgeführten Untersuchung zur Apoptoseinduktion konnte gezeigt werden, dass weder das Celecoxib, als Vertreter der selektiven COX-2-Inhibitoren und die Zytostatika (Gemcitabin und 5-FU) noch deren Kombination mit einem CD95-Antikörper zur Apoptoseinduktion bei der COX-2-negativen Zelllinie Panc-1 befähigt sind. Der ausbleibende Effekt letztgenannter Stoffgruppe ist nicht unerwartet, da sich Pankreaskarzinomzelllinien in Studien aufgrund ihrer hohen konstitutiven NF- κ B-Expression als besonders resistent gegen Zytostatikaeinfluss erwiesen haben (Arlt et al., 2003).

NSAR haben aufgrund ihrer antineoplastischen und antiproliferativen Eigenschaften das Potential für den Gebrauch als chemopräventive und chemotherapeutische Substanzen. Dabei besteht zunehmendes Interesse am genauen Mechanismus, der dem antiproliferativen Effekt der COX-Inhibitoren zugrunde liegt. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bezüglich des zellwachstumshemmenden Effekts von NSAR und Zytostatika decken sich mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Elder et al., 1997; Li et al., 1999; Ding et al., 2000; Yip-Schneider et al., 2001; Eibl et al., 2003), die jedoch alle auf Konzentrationen der Substanzen basieren, die *in vivo* aufgrund ihrer Toxizität nicht erreicht werden können (Insel, 1996). Gemcitabin und NSAR unterscheiden sich hinsichtlich ihres Ansatzpunktes innerhalb des Zellzyklus. Während der COX-2-Inhibitor zu einer Akkumulation der Zellen in der

G0/G1-Phase und G2/M-Phase führt, häufen sich bei Gemcitabin die Zellen in der S-Phase an (Yip-Schneider et al., 2001). Diese Zellzyklusverlagerungen werden mit Änderungen der Expression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen assoziiert, wie zum Beispiel dem Cyclin D1, das eine wichtige Rolle bei dem Übergang der Zelle in die S-Phase (DNA-Synthese) spielt und bei maligner Transformation in erhöhtem Maße vorliegt (Gansauge et al., 1997). Unter NSAR-Einfluss sinkt der Cyclin D1-Level ab, im Gegensatz zu Gemcitabin, das eine erhöhte Expression von Cyclin A, E, B1 induziert, und die Zellen somit, wie schon erwähnt, in der S-Phase akkumulieren lässt (Yip-Schneider et al., 2001). Diese Effekte treten unabhängig von der COX-2-Expression der Tumorzellen auf. Unsere Ergebnisse bezüglich der Apoptoseinduktion durch NSAR und Zytostatika werden in den wesentlichen Punkten durch Yip-Schneider und Mitarbeiter gestützt (Yip-Schneider et al., 2001). Ein Grund, warum andere Arbeitsgruppen in ihren Studien ein apoptoseinduzierendes Potential von NSAR beobachten konnten und sich so von unseren Resultaten unterscheiden, ist die Verwendung anderer Malignomtypen als das Pankreaskarzinom. Diese sind möglicherweise nicht so apoptoseresistent wie Tumorzellen der Bauchspeicheldrüse (Arlt et al., 2003). Es ist davon auszugehen, dass die *in vitro* beobachteten antiproliferativen Effekte von Gemcitabin und Celecoxib in der Hauptsache auf Störung der physiologischen Verteilung des Zellzyklus und nicht auf Apoptose-Induktion beruhen. Trotzdem könnte dieser primäre Effekt zu einer beschleunigten Alterung der Zelle beitragen und somit zu einem „slow cell death“ führen (Blagosklonny, 2000).

Die Möglichkeit zur Übertragung dieser *in vitro*-Modelle auf *in vivo*-Studien ist limitiert. Die signifikant höher gewählten Dosierungen (50-100µM), die zur Herbeiführung dieser COX-unabhängigen Effekte gewählt werden mussten, unterscheiden sich deutlich von der für *in vivo* empfohlenen Konzentration. Hier liegt der Wirkstoffspiegel, der zur Hemmung des Enzyms notwendig ist und der sich ohne Toxizität erreichen lässt, bei 5-10 µm. Studien am Mausmodell, bei denen mit Rofecoxib, Celecoxib und Indometacin in physiologischen Konzentrationen eine Tumorregression und in einem Fall eine Senkung der Anzahl von Lebermetastasen erzielt werden konnte (Eli et al., 2001),

(Yao et al., 2003), lassen jedoch hoffen, dass die positiven Effekte dieser Substanzgruppe bei der Therapie von Tumorpatienten von Nutzen sein könnte.

Die Dosierungen des Gemcitabin orientieren sich mehr an den *in vivo* verwendeten Konzentrationen. Die von uns verwendete Höchstkonzentration von 50 nM ist ein Richtwert, der ungefähr 0,2 % des Peaks der Plasmakonzentration (Grunewald et al., 1992) bei einer „low dose“-Chemotherapie *in vivo* entspricht.

4.3.2 Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika und Gemcitabin auf dendritische- und T-Zellen

4.3.2.1 Keine Beeinflussung der Reifung und Differenzierung dendritischer Zellen durch pharmakologisch aktive Substanzen

Um mögliche negative Effekte von Zytostatika und NSAR auf die Reifung dendritischer Zellen zu erforschen, führten wir die Generierung der dendritischen Zellen aus Monozyten nach *FastDC*-Protokoll (Dauer et al., 2003) unter Zugabe verschiedener pharmakologisch aktiver Substanzen durch. Es konnte gezeigt werden, dass generell keine negativen Einflüsse der Pharmaka auf die durchflusszytometrisch untersuchten Oberflächenmarker im Zusammenhang mit Reifung und Differenzierung der dendritischen Zellen zu erwarten sind. Unsere Ergebnisse sind in Einklang mit einer Studie von Matasic und Mitarbeitern, die den Einfluss von Ketoprofen, Indometacin, NS-398 und Acetylsalicylsäure auf die Kinetik und Reifung von aus PBMC generierten dendritischen Zellen untersuchten (Matasic et al., 2000). Bis auf das ASS, das die Expression von HLA-DR, die kostimulatorischen CD80 und CD86 sowie das CD83 als Marker für reife dendritische Zellen dosisabhängig reduzierte, die Expression von CD14 jedoch noch über das bei unreifen dendritischen Zellen übliche Maß steigerte, wurde bei den übrigen NSAR, obwohl mehrfach überdosiert, keinerlei reifungsbeeinflussende Effekte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gesehen. Die Sonderrolle des ASS wird COX-unabhängigen Effekten zugeschrieben, da auch nicht-acetylierte Salicylate die Differenzierung dendritischer Zellen und deren Reifung inhibierten, was darauf

schließen lässt, dass die Acetylierung von COX durch ASS nicht zu der beobachteten Wirkung beitrug, sondern eher auf unspezifischen Effekten auf Energie-abhängige Zell-Funktionen und der Supprimierung der Aktivierung von NF- κ B p50 beruhte (Hackstein et al., 2001).

4.3.2.2 Pharmakologische Effekte auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen

Um Effekte auf die dendritische Zell-induzierte T-Zellproliferation zu untersuchen, wurden gepulste antigenbeladene dendritische Zellen mit allogenen bzw. autologen T-Zellen mit pharmakologisch aktiven Substanzen verschiedener Konzentrationen koinkubiert. Sowohl bei der allogenen als auch bei der autologen MLR konnte eine deutliche Hemmung der T-Zellproliferation durch Gemcitabin festgestellt werden. Bei der allogenen MLR waren bei den 20-, 50 nM-Konzentrationen dieses Zytostatikums kaum messbare und im Vergleich zu den übrigen Gruppen eine signifikant zu vernachlässigende T-Zellproliferation zu sehen. In der autologen MLR hemmte das Gemcitabin die T-Zellaktivierung selbst bei einem Zehntel der Konzentration, die für eine *in vivo*-Krebstherapie appliziert wird, was weniger als 1% der Plasma-Peak-Konzentration bei Tumorpatienten darstellt (Grunewald et al., 1992). Ob Gemcitabin dieselben adversen Effekte bei der Induktion einer Tumorspezifischen CTL-Immunantwort *in vitro* hervorruft bleibt zu klären.

Im Gegensatz zu Gemcitabin zeigte Celecoxib wesentlich weniger unerwünschte Wirkung im Bezug auf die dendritische Zell-induzierte T-Zellproliferation *in vitro*, was diese Stoffgruppe zu potentiell besser geeigneten Kandidaten für eine Kombination mit einem immuntherapeutischen Ansatz macht. Eine relevante Hemmung war hier nur bei der von uns verwendeten Höchstkonzentration von 50 μ M zu beobachten. Die Plasma-Konzentrationen des Celecoxib, die bei FAP-Patienten benötigt werden (800mg/Tag) um eine Regression der Polypen zu bewirken, bewegen sich jedoch nur zwischen 3 μ m und 5 μ m (Grosch et al., 2001). Bezüglich der Wirkung von NSARs auf die T-Zell-Aktivierung existieren sehr gegensätzliche Auffassungen. In vielen Studien wird von einer eher positiven Wirkung dieser

Substanzgruppe auf die T-Zellproliferation berichtet (Hsia et al., 1989; Flescher et al., 1991; Newberry et al., 1999). Auf der einen Seite hemmen die COX-Inhibitoren die Prostaglandin-Produktion durch Helferzellen (Goodwin et al., 1974; Rappaport et al., 1982; Santoli et al., 1990), auf der anderen Seite entwickeln die NSAR einen direkten Effekt, indem sie einen intrazellulären Calcium-Anstieg bewirken und somit ein T-Zell-Aktivierungssignal aussenden (Flescher et al., 1991). Andere Studien, die sich mit NS-398 und Celecoxib befassten, untermauern unsere Ergebnisse bezüglich des inhibitorischen Effekts dieser Substanzen auf die T-Zell-Aktivierung (Iniguez et al., 1999). Liegen die Konzentrationen der verwendeten NSAR mehrfach über dem COX-2-IC50-Werten für humane Zellen *in vitro*, so ist eine Aktivierung durch verschiedene Stimuli unmöglich. Die Effekte der pharmakologisch aktiven Substanzen auf die T-Zellproliferation sind COX-2-unabhängig (Warner et al., 1999). COX-2-Inhibitoren in Dosierungen wie sie bei der Therapie von Entzündungszuständen beim Menschen eingesetzt werden, um das COX-Enzym zu hemmen, führten jedoch zu keiner Modifikation der T-Zell-Funktion (Rivero et al., 2002).

4.3.3 Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber CD95-abhängiger T-Zell-Zytotoxizität durch einen Cyclooxygenase-2-Inhibitor

4.3.3.1 Induktion einer tumorspezifischen zytotoxischen T-Zell-Lyse durch Tumorlysat-gepulste dendritische Zellen

Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, eine Tumor-spezifische CTL-Antwort *in vitro* und *in vivo* zu induzieren (Mayordorno et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen, die mit Tumor-abgeleiteten Antigenenpräparationen wie Tumorzelllysat, RNA oder apoptotischen Zellen gepulst wurden, Tumor-spezifische Immunantworten auslösen (Fields et al., 1998; Rovere et al., 1998; Schnurr et al., 2001). In einem Tiermodell konnte Akiyama und Mitarbeiter demonstrieren, dass eine Injektion mit Tumorlysat-gepulsten dendritischen Zellen das Tumorstadium in einem größeren Ausmaß hemmte, als eine Impfung mit ungepulsten dendritischen Zellen (Akiyama et al., 2002). Dies konnte anhand der Tumor-spezifischen

CTL-Aktivität nach der auf dendritischen Zellen basierenden Vakzinierung nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die Effektivität einer durch Tumorantigen-gepulsten dendritischen Zell-induzierten CTL-Antwort durch Kombination mit dem selektiven COX-2-Hemmer NS-398 gesteigert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass durch den COX-2-Inhibitor eine Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber einer Tumor-reaktiven CTL-Antwort herbeigeführt werden kann. Tumor-spezifische CTLs wurden dabei durch *in vitro*-Stimulation von CD3(+)-T-Zellen mit Tumorlysat gepulsten dendritischen Zellen induziert, wobei zwei Restimulationen ausreichten, die Tumor-spezifischen, IFN- γ -produzierenden und lytischen T-Zellen zu aktivieren. Da der COX-2-Inhibitor nicht in der Lage war, Apoptose in Pankreaskarzinomzellen zu induzieren, müssen andere Mechanismen in die beobachtete Sensitivierung von Panc-1 Zellen gegenüber der CTL-abhängigen Lyse involviert sein. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass COX-2-Inhibitoren in der Lage sind, Tumorzellen gegenüber CD95-abhängiger Lyse in einer COX-2 unabhängigen Weise zu sensitivieren (Trotzke et al., 2003a). Folglich gingen wir davon aus, dass die CD95/CD95-Ligand-Interaktion zu der beobachteten Zunahme der CTL-medierten Lyse nach der Behandlung der Tumorzellen mit COX-2-Inhibitoren beitrug. Zuerst zeigten wir, dass die CD95-Expression nach Inkubation mit NSAR (ASS und Celecoxib) nicht gesteigert werden konnte. Wurden die Tumorzellen mit einer Kombination aus NS-398 und dem CD95-blockierenden Antikörper ZB4 vorbehandelt, konnten die den CTLs exponierten Tumorzellen komplett von der durch NS-398 gesteigerten Tumorzelllyse bewahrt werden. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine Behandlung der Pankreaskarzinomzellen mit COX-2-Inhibitoren das CD95-abhängige Abtöten durch Tumor-reaktive zytotoxische T-Zellen unabhängig von der COX-2-Expression der Zellen steigert. Diese Ergebnisse werden durch Studien bei verschiedenen Tumorzelllinien anderen Ursprungs bestätigt (Nzeako et al., 2002; Trotzke et al., 2003a), die ebenfalls eine Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter Lyse durch COX-2-Inhibitoren zeigten. Allerdings wird in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass diese

Mechanismen Relevanz für die T-Zell-vermittelte Lyse von Pankreas-karzinomzellen besitzt.

Es gibt verschiedene Mechanismen, die immer wieder angeführt werden, um die positiven Effekte der NSAR bei der Kombination der Pharmaka mit einer zellulären Immuntherapie *in vivo* zu erklären. Ein Modell geht davon aus, dass die COX-2-Hemmung die Tumor-induzierte, PGE₂-abhängige Hemmung der Aktivität dendritischer Zellen verhindern kann (Sharma et al., 2003), (Yang et al., 2003). Ein weiterer Mechanismus, der postuliert wird, basiert auf der Vorstellung, dass die beschriebene COX-2- Inhibition zu einer Veränderung des Zytokinverhältnisses von IL-10 zu IL-12 innerhalb des Tumors und folglich zur Wiederherstellung der zellmedierten Immunität führen könnte (Stolina et al., 2000). Die dritte These besagt, dass durch das COX-Produkt PGE₂ herunterregulierte Level von IL-2, IL-6 und IFN- γ , angehoben werden und folglich die für eine Tumorregression notwendige Aktivierung der CTL wieder erfolgen kann (Harris et al., 2002). Zuletzt führt DeLong an, dass die COX-2-Inhibitoren die immunsupprimierende Umgebung, die sowohl die T-Zell-Migration hemmt als auch die T-Zellen, die sich zur Apoptoseinduktion im Tumorgewebe befinden inaktiviert, so beeinflussen, dass T-Zellen ihre Funktion wieder aufnehmen können (DeLong et al., 2003).

Die Zytokinprofile die aus den Überständen der Kokultur bestimmt wurden, korrelieren mit den Ergebnissen, die aus dem Zytotox-Assay gewonnen wurden. So zeigen die Zytokinlevel in der Kokultur mit den Lysat-gepulsten dendritischen Zellen die Induktion einer Th1-Immunantwort an. Der erhöhte IL-12-Spiegel in der Kultur mit den Antigen-gepulsten dendritischen Zellen kann durch eine positive „Feedback“-Aktivierung der dendritischen Zellen durch Antigen-spezifische T-Zellen via IFN- γ -Sekretion und CD40-CD40L-Interaktion erklärt werden (Cella et al., 1996). Im Vergleich zu den Kokulturen mit den Lysat-gepulsten dendritischen Zellen konnte in den Überständen der ungepulsten nur geringe Mengen an IFN- γ detektiert werden. Folglich reflektiert die IFN- γ -Sekretion die Reaktivität der T-Zellen gegenüber dem Tumorantigen, das von den dendritischen Zellen präsentiert wurde.

4.4 Klinische Relevanz

Die Immuntherapie von Malignomen beabsichtigt, mit Hilfe des körpereigenen Immunsystems Tumoren spezifisch anzugreifen. Dendritische Zellen spielen hierbei als hocheffiziente antigenpräsentierende Zellen und potente Induktoren einer spezifischen zellulären Immunantwort eine herausragende Rolle. Tumorspezifische Antigene, die durch dendritische Zellen präsentiert werden, können von T-Zellen erkannt werden und stellen somit potentielle Ziele dieser neuartigen Therapiestrategie dar. Die Vorteile des Einsatzes von dendritischen Zellen in der klinischen Anwendung liegen auf der Hand. Zum einen ist die Generierung einer grossen Zahl von autologen dendritischen Zellen bei den meisten Tumorpatienten möglich, zum anderen wird die Vakzinetherapie in der Regel gut vertragen. Die ersten klinischen Studien zeigen, dass dieser Weg gangbar ist. Bisher wurden jedoch nur in Einzelfällen klinisch relevante Ergebnisse bei Patienten mit soliden Tumoren erzielt. Der Einsatz der wenig immunsupprimierenden COX-2-Inhibitoren und der Chemotherapeutika stellte sich in der vorliegenden Arbeit als grundsätzlich sinnvoll heraus, da zum einen keinerlei negative Effekte auf die Reifung und Funktion der dendritischen Zellen gesehen werden konnte, sich zum anderen jedoch eine dosisabhängige Tumorzell-proliferationshemmende Wirkung einstellte. Das ermutigendste Ergebnis stellte jedoch die beobachtete Sensitivierung der wenig immunogenen Pankreaskarzinomzellen gegenüber einer spezifischen CTL-Antwort durch Einsatz eines selektiven COX-2-Inhibitors dar. Dabei sprach die stark reduzierte Lyserate, die durch Einsatz eines blockierenden Antikörpers erzielt wurde für eine Steigerung der CD95-vermittelten Elimination der Malignomzellen durch den COX-2-Inhibitor. Als eine wichtige Limitierung bei der *in vivo*-Übertragung der von uns durchgeführten Untersuchungen seien Erfahrungen genannt, bei denen der therapeutische Effekt dieser Therapie komplett verloren ging, wenn Tumore mittlerer oder ausgeprägter Größe behandelt wurden (Davis et al., 2003). Somit liegt es nahe, dass Patienten mit geringer Tumorlast, zum Beispiel nach primär kurativer oder tumorreduzierender Tumorresektion, von einer Immuntherapie am meisten profitieren könnten. Bis sich in der Krebsbehandlung die Vakzinierung mit dendritischen Zellen als Option neben den bestehenden Therapien etabliert haben wird, bedarf es weiterer

Grundlagenforschung und kontrollierter klinischer Studien, die sich insbesondere mit den Modalitäten der Vakzinierung wie beispielsweise der Wahl des Antigens, einem Zeitplan für die Applikationen und der Art der dendritischen Zell-Präparaten beschäftigen werden. Es sei ausserdem angemerkt, dass bei Peptid-basierter Vakzinierung eine gewisse Gefahr für die Erzeugung von Escape-Varianten der Tumore besteht, da aufgrund des Selektionsdrucks Tumorzellen das Antigen verlieren können. Hier könnte der simultane Einsatz mehrerer Tumorantigene, wie im Tumorzelllysate vorhanden, Abhilfe schaffen und die Effektivität verbessern. Ebenfalls noch nicht geklärt ist die Höhe des Risikos, durch eine Vakzinierung mit dendritischen Zellen Autoimmunreaktionen zu induzieren; dies wurde im Tiermodell nachgewiesen (Ludewig et al., 2000). In den veröffentlichten klinischen Studien wurden unter Vakzinierung mit dendritischen Zellen jedoch bisher keine limitierenden Nebenwirkungen beobachtet.

Zuletzt sollte man bedenken, dass aufgrund der hohen Konzentrationen der COX-2-Hemmer, die von uns *in vitro* verwendet wurden und der damit verbundenen Toxizität momentan eine Übertragung auf die *in vivo*-Situation nicht ohne weiteres möglich ist. Ausserdem hat die Applikation dieser Substanzgruppe selbst in wesentlich niedrigeren Konzentrationen, wie sie zum Beispiel für die Therapie von Arthritiden empfohlen wird, unter einer verschärften Risiko-Nutzen-Abwägung zu erfolgen, da jüngst aufgekommene Ergebnisse klinischer Studien einen Zusammenhang der Coxibe mit Herzerkrankungen vermuten lassen. Wünschenswert wäre die Entwicklung pharmakologisch aktiver Substanzen oder sogenannter „small molecules“ mit einem ähnlichen Wirkungsprofil bezüglich Sensitivierung gegenüber CTL-Antwort, Apoptoseinduktion und Supprimierung des Tumorzellwachstums wie die COX-Inhibitoren, deren Toxizität bei der adjuvanten Therapie von Krebspatienten jedoch geringer ist. Hierzu ist jedoch die Identifizierung des Wirkungsmechanismus notwendig, über die die COX-2-Inhibitoren COX-2-unabhängige Effekte auf Tumorzellen ausüben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von verschiedenen Nicht-Steroidalen Antirheumatika (NSAR) und Zytostatika auf dendritische Zellen und Pankreaskarzinomzellen untersucht. Das Ziel der Arbeit war, mögliche positive oder negative Effekte einer Kombinationstherapie *in vitro* zu untersuchen.

Im ersten Teil konnte ein CD95-aufregulierender Effekt der verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen auf Pankreaskarzinomzellen ausgeschlossen werden. Die Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluoruracil sowie der selektive Cyclooxygenase-2-(COX-2)-Inhibitor Celecoxib führten bei den Malignomzellen zwar zu keiner Apoptoseinduktion, jedoch zu einer konzentrationsabhängigen Zellproliferationshemmung, die bei den Zytostatika stärker ausgeprägt war als bei dem COX-2-Inhibitor und die durch Kombination mit einem aktivierenden CD95-Antikörper vor allem bei den Gruppen mit niedriger Substanzkonzentration signifikant gesteigert werden konnte. Desweiteren konnte die COX-unabhängige Wirkungsweise des Celecoxib belegt werden.

Im zweiten Teil wurde demonstriert, dass das Chemotherapeutikum Gemcitabin und der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib die Reifung und Differenzierung dendritischer Zellen nicht beeinflussen; dies wurde durch durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenmarker nachgewiesen. Da jedoch dieser Versuch nur die phänotypische, jedoch keine funktionelle Beurteilung der Zellen zuließ, wurde in der darauffolgenden allogenen und autologen MLR die T-Zell-stimulatorische Kapazität von dendritischen Zellen unter Pharmakaeinfluss bestimmt. Celecoxib ließ im Vergleich mit äquivalenten Konzentrationen des Gemcitabin einen weniger proliferations-supprimierenden Einfluss erkennen. Gemcitabin hemmte die dendritische Zell-induzierte T-Zellproliferation bereits in der Minimalkonzentration, wohingegen Celecoxib im Bezug auf *in vivo*-Richtwerte selbst in fünf bis zehnfacher Überdosierung die Proliferation reduzierte, jedoch nicht gänzlich unterdrückte.

Schließlich konnten in einem Pankreaskarzinom *in vitro*-Modell Tumorzell-spezifische CTL durch Lysat-gepulste dendritische Zellen induziert werden, wobei die Lyserate durch Präinkubation der Tumorzellen mit einem COX-2-Inhibitor gesteigert wurde. Erstmals konnte gezeigt werden, dass der beschriebene sensitivierende Effekt der Pankreaskarzinomzellen CD95-vermittelt ist, da durch einen blockierenden CD95-Antikörper die gesteigerte Lyse aufgehoben werden konnte.

Die beobachtete Sensitivierung der schwach immunogenen Pankreaskarzinomzellen gegenüber der CD95-abhängigen Elimination durch spezifische CTL beschreibt einen neuen Mechanismus für die Verstärkung einer Immunantwort durch COX-Inhibitoren und macht diese Substanzgruppe zu einer idealen Komponente in Verbindung mit einer auf dendritischen Zellen basierenden Vakzine. Obwohl dieses Modell aufgrund der hohen Dosierungen des COX-Inhibitors und der damit verbundenen Toxizität momentan noch eine Übertragung *in vivo* verbietet, verschafft es uns dennoch Einsicht in den potentiellen Mechanismus dieser Substanzen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten mit dazu beitragen, mittelfristig eine alternative Therapieform zu etablieren, die in Kombination mit bereits bestehenden Behandlungsschemata bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom angewendet werden könnte. Vor den ersten klinischen Studien über die kombinierte Immuntherapie muß jedoch weiterhin eine intensive Grundlagenforschung insbesondere unter Einbeziehung des Tiermodelles durchgeführt werden.

6. SUMMARY

”*In vitro*-evaluation of combined immunologic and pharmacologic therapeutic strategies for the treatment of pancreas carcinoma.”

In this study the effects of several nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and cytostatic agents on pancreas carcinoma cells have been analysed. The main goal was to investigate potential negative as well as positive effects of a combined therapeutic strategy *in vitro*.

In the first part of this report a CD95-upregulating effect of pharmacologic active substances could not be confirmed. Neither the chemotherapeutic drugs Gemcitabine and 5-Fluoruracil nor the selective Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Inhibitor Celecoxib induced relevant levels of apoptosis in the tumor cells, but led to a concentration-dependent inhibition of cell-proliferation that was more distinct for the cytostatic drugs than for the COX-Inhibitor. This effect could significantly be enhanced by adding an activating CD95-antibody, especially in tumorcells exposed to a low dosage of the pharmacologic agents. Furthermore a COX-independent mechanism of action could be identified for Celecoxib.

In the second part it could be demonstrated that maturation and differentiation of dendritic cells were not affected by incubation with the chemotherapeutic drug Gemcitabine and the selective COX-2-Inhibitor Celecoxib; this was confirmed by flow-cytometric analysis of the surface markers. Since this experiment was only suitable to judge the phenotypic, but not the functional condition of the cells, the T-cell stimulatory capacity of dendritic cells in presence of pharmacologic agents had to be characterized in the following allogenic and autologous MLR. Celecoxib did not inhibit cell-proliferation to such an extent as Gemcitabine in equivalent concentrations. Gemcitabine suppressed the dendritic cell-induced T-cell proliferation already at the lowest

dosage used in this experiment, whereas Celecoxib only reduced, but did not inhibit the proliferation completely in concentrations 5- to 10-fold higher than recommended for *in vivo*-use.

Although this model is not transferable in an *in vitro*-situation, due to its high COX-2-Inhibitor concentration and the consequent toxicity, it allows an insight into potential mechanisms of action of these substances.

These findings could contribute to the establishment of an alternative therapeutic strategy, which could be combined with current treatment regimes for patients suffering pancreas carcinoma. Before the combined immunotherapy is ready to start in first clinical trials, intensive basic research, including the animal model, has to be carried out.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas AK, Lichtman AS, Pober JS (1997). Cellular and Molecular Immunology, WB Saunders Company.
2. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**: 423-32.
3. Adsay NV, El-Rayes BF, Philip PA (2001). "Pancreatic cancer: The evolving role of systemic therapy." Expert Opin Pharmacother **2**: 1939-1947.
4. Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Hojo T, Cheng JY, Mori T, Wiltrott RH, Yamaguchi K. (2002). "Antitumor effects induced by dendritic cell-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters." Cancer Letters **184**: 37-47.
5. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\beta 5$ and CD36, and cross present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**: 1359-68.
6. Alexandroff AB, Jackson AM, Paterson T, Haley JL, Ross JA, Lango DL, Murphy WJ, James K, Tanto DD (2000). "Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours." Mol Immunol **37**: 515-526.
7. Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, Vorndamm J, Kruse ML, Folsch UR, Schäfer H (2003). "Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine induced cell death." Oncogene **22**: 3243-51.
8. Ashkenazi A (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-30.
9. Austyn JM, Kupiec-Weglinski JW, Hankins DF, Morris PJ (1988). "Migration patterns of dendritic cells in the mouse: homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone." J Exp Med **167**: 646-51.
10. Badawi AF, Badr MZ (2002). "Chemoprevention of breast cancer by targeting cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma." Int J Oncol **20**: 1109-1122.
11. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000). "Immunology of dendritic cells." Ann Rev Immunol **18**: 767-811.
12. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Piniero L, Steinman R, Fay J (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine." Cancer Res **61**: 6451-8.
13. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover JC, Church TR, Allen JL, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibel F, van Stolk, RV (2003).

"A randomized trial of aspirin to prevent colorectal carcinomas." N Engl J Med **348**: 891-899.

14. Bell D, Young JW, Banchereau J (1999). "Dendritic cells." Adv Immunol **72**: 255-324.

15. Belz GT, Carbone FR, Heath WR (2002). "Cross presentation of antigens by dendritic cells." Crit Rev Immunol **22**: 439-48.

16. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**: 478-80.

17. Bergmann-Leitner ES, Abrams SI (2000). "Differential role of Fas/Fas ligand interactions in cytolysis of primary and metastatic colon carcinoma cell lines by human antigen specific CD8+ CTL." J Immunol **164**: 4941-54.

18. Bergmann-Leitner ES, Abrams SI (2001). "Treatment of human colon carcinoma cell lines with anti-neoplastic agents enhances their lytic sensitivity to antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes." Cancer Immunol Immunother **50**: 445-55.

19. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson RB 3rd (2002). "Phase III study of gemcitabine in combination with fluoruracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297." J Clin Oncol **20**: 3270-3275.

20. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." Eur J Biochem **264**(3): 687-701.

21. Bertagnolli MM (2003). "The potential role of NSAIDs for colorectal cancer prevention." J Surg Oncol **84**: 113-119.

22. Bhardwaj N, Bender A, Gonzalez N, Bui LK, Garrett MC, Steinman RM (1994). "Influenza infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8(+) T cells." J Clin Invest **94**: 797-807.

23. Blagosklonny MV (2000). "Cell death beyond apoptosis." Leukemia **14**: 1502-1508.

24. Bohm W, Schirmbech R, Elbe A, Melber K, Diminsky D, Kraal G, van Rooijen N, Barenholz Y, Reimann J (1995). "Exogenous hepatitis B surface antigen particles processed by dendritic cells or macrophages prime murine class I -restricted cytotoxic T lymphocytes in vivo." J Immunol **155**: 3313-21.

25. Borner C (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." Mol Immunol **39**: 615-647.

26. Brand RE, Tempero MA (1998). "Pancreatic cancer." Curr Opin Oncol **10**: 362-6.

27. Bröcker EB, Becker JC, Kämpgen E (1999). Malignes Melanom. Stuttgart, New York, Thieme.

28. Brocker T (1997). "Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells." J Exp Med **186**: 1223-32.

29. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G (2003). "Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses." Trends Immunol **24**: 207-12.

-
30. Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichhardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brügger W (1999). "Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies." Blood **93**: 4309-17.
31. Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP (1998). "COX-2 overexpression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer." Carcinogenesis **19**: 723-729.
32. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Crippes MC, Partenoy RK (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**:2403-13.
33. Calaluca R, Earnest DL, Heddens D, Einspahr JG, Roe D, Bogert CL, Storniolo AM, Tarasoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, von Hoff DD (2000). "Effects of piroxicam on prostaglandin E2 levels in rectal mucosa of adenomatous polyp patients: a randomized phase IIb trial." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**: 1287-1292.
34. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, Banchereau J (1994). "B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells." J Exp Med **180**: 1841-47.
35. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC Class II complexes on dendritic cells." Nature **388**: 782-87.
36. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A (1999). "Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by doublestranded RNA." J Exp Med **189**: 821-29.
37. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, and Alber G (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T-help via APC activation." J Exp Med **184**: 747-752.
38. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP (2001). "CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T-cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy." Annu Rev Immunol **19**: 565-594.
39. Chow HH, Earnest DL, Clark D, Mason-Liddil N, Kramer CB, Einspahr JG, Guillen-Rodriguez JM, Roe DJ, Malone W, Crowell JA, Alberts DS (2000). "Effect of subacute ibuprofen dosing on rectal mucosal prostaglandin E2 levels in healthy subjects with a history of resected polyps." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**: 351-356.
40. Collet JP, Sharpe C, Belzile E, Boivin JF, Hanley J, Abenhaim L (1999). "Colorectal cancer prevention by NSAID: effects of dosage and timing." British Journal of Cancer **81**: 62-68.
41. Correale P, Aquino A, Giuliani A, Pellegrini M, Michelli L, Cusi MG, Nencini C, Petrioli R, Prete SP, de Vecchi L, Tarrizioni M, Giorgi G, Bonmasser E, Francini G (2003). "Treatment of colon and breast carcinoma cells with 5-fluorouracil enhances expression carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-A(*)02.01 restricted, CEA-peptide-specific T cells in vitro." Int J Cancer **104**: 437-45.

-
42. Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT, Aquino A, Prete S, Tsang KY, Micheli L, Nencini G, La Placa M, Montagnani F, Terrosi C, Caraglia M, Formica V, Giorgi G, Bonmasser E, Francini G (2005). "Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon-carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin 5-fluoruracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific ctl response with antitumor activity in vitro." J Immunol **175**: 820-828.
43. Cory S, Adams JM (2002). "The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.
44. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ (1999). "Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2- dependent endothelial migration and angiogenesis." Cancer Research **59**: 4574-4577.
45. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A (2003). "Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors." J Immunol **170**: 4069-76.
46. Davis IA, Jeffords M, Parente P, Cebon J (2003). "Rational approaches to human cancer immunotherapy." J Leukoc Biol **73**: 3-29.
47. Debatin KM (1997). "Anticancer drugs, programmed cell death and the immune system: defining new roles in an old play." J Natl Cancer Inst **89**: 750-3.
48. DeLong P, Tanaka T, Kruklitis R, Henry AC, Kapoor V, Kaiser LR, Serman DH, Albelda SM (2003). "Use of cyclooxygenase-2 inhibition to enhance the efficacy of immunotherapy." Cancer Res **63**: 7845-52.
49. DeWitt DL, Smith WL (1988). "Primary structure of prostaglandin G/h synthase from sheep vesicular gland determined from complementary DNA sequence." Proc Natl Acad Sci **85**: 1412-1416.
50. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardawaj N (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**: 233-238.
51. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, Dhodapkar SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF, Bhardwaj N (1999). "Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after single injection of mature dendritic cells." J Clin Invest **104**: 173-80.
52. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med **188**: 373-86.
53. Ding XZ, Tong WG, Adrian TE (2000). "Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells." Anticancer Res **20**: 2625-31.
54. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." Gastroenterology **107**: 1183-1188.
55. Egen JG, Kuhns MS, Allison JP (2002). "CTLA4: new insights into its biological function and use in tumor therapy." Nat Immunol **3**: 611-18.

-
56. Eibl G, Reber HA, Wente MN, Hines OJ (2003). "The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulfide induces apoptosis in pancreatic cancer cells independent of COX-2." Pancreas **26**: 33-41.
57. Eichhorst ST, Muerkoster S, Weigand MA, Krammer PH (2001). "The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of CD95 (APO/Fas) system." Cancer Res **61**: 243-248.
58. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, Tung JS, Earnshaw WC, Leibson PJ, Kaufmann SH (1997). "Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resitant cells: chemotherapy induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions." Blood **90**: 935-43.
59. Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson PJ, Ericsson-Dahlstrand A (2001). "Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier." Nature **410**: 430-431.
60. Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C (1997). "Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression." Clin Cancer Res **10**: 1679-83.
61. Eli Y, Przedeci F, Levin Galit Kariv N, Raz A (2001). "Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo." Biochem Pharmacol **61**(5): 565-571.
62. Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J (1997). "The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells." Eur J Immunol **27**: 2417-25.
63. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J (1997). "Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma." Int J Cancer **73**: 309-16.
64. Enk AH, Saloga J, Becker D, m.M BP, Knop J (1994). "Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo." J Exp Med **179**: 1397-402.
65. Fenton RG, Longo DL (1997). "Danger versus tolerance: paradigms for future studies of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes." J Natl Cancer Inst **89**: 272-275.
66. Ferrone S, Marincola FM (1995). "Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance." Immunol Today **16**: 487-494.
67. Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Roder C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen PL, Schuler G, Schuler-Thurner B (2000). "A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use." J Immunol Methods **245**: 15-29.
68. Fields RC, Shimizu K, Mule JJ (1998). "Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci USA **95**: 9482-9487.

-
69. Flamand V, Somasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Thielemans F, Leo O, Urbain J, Moser M (1994). "Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo." Eur J Immunol **24**: 605-10.
70. Flescher E, Fossum D, Gray PJ, Fernandes G, Harper MJK, Talal N (1991). "Aspirin-like drugs prime human T-cells. Modulation of intracellular calcium concentrations." J Immunol **146**: 2553-9.
71. Fong L, Engleman EG (2000). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." Annu Rev Immunol **18**: 328-32.
72. Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM; Engleman EG (2001). "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc Natl Acad Sci USA **98**: 8809-14.
73. Fosslie E (2001). "Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer induced angiogenesis." Ann Clin Lab Sci **31**: 325-348.
74. Fukuda R, Kelly B, Semenza GL (2003). "Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1." Cancer Research **63**: 2330-2334.
75. Fulda S, Los M, Friesen C, Debatin KM (1998). "Chemosensitivity of solid tumor cells is associated with activation of the CD95 system." Int J Cancer **76**: 105-114.
76. Fulda S, Meyer E, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM (2001). "Cell type specific activation of death receptor and mitochondrial pathways in drug induced apoptosis." Oncogene **20**: 1063-1075.
77. Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM (1998). "Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells." Cell Death Differ **5**: 884-893.
78. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carrbone DP (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**: 1096-103.
79. Galetto A, Buttiglierei S, Forno S, Moro F, Mussa A, Matera L (2003). "Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells." Anticancer drugs **14**: 833-843.
80. Gallucci S, Lolkema M, and Matzinger P (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med **5**: 1249-1255.
81. Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, Stobbe H, Rau B, Harada N, Berger HG. (1997). "Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis." Cancer Res **57**: 1634-2013
82. Garcia Rodriguez LA, Huerta Alvarez C (2000). "Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users of nonsteroidal antiinflammatory drugs: a pooled analysis of published studies and a new population based study." Epidemiology **11**: 376-381.
83. Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alou R, Figdor GG, van Kooyk Y (2000). "DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking." Nat Immunol **1**: 353-7.

-
84. Geijtenbeek TB, Tarensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor GG (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." Cell **100**: 575-85.
85. Giardello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, Brocker SU, Robinson CR, Offerhaus GJ (1993). "Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis." N Engl J Med **328**: 1313-1316.
86. Gilboa E (2001). "The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy." Nat Immunol **2**: 789-792.
87. Gilroy DW, Colville-Nash PR (2000). "New insights into the role of COX-2 in inflammation." J Mol Med **78**: 121-129.
88. Gjertsen MK, Bjorheim J, Saeterdal I, Myklebust J, Gaudernack G (1997). "Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation." Int J Cancer **72**: 784-90.
89. Glazyrin AL, Adsay VN, Vaitkevicius VK, Sarkar FH (2001). "CD95-Related Apoptotic Machinery is functional in Pancreatic Cancer Cells." Pancreas **22**(4): 357-65.
90. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Li Y, Chen L, Takeuchi H, Qu H, Rowse GJ, Gendler SJ, Kufe D (1998). "Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic cells and carcinoma cells." Proc Natl Acad Sci USA **95**: 6279-83.
91. Goodwin JS, Mesner RP, Peake GT (1974). "Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated leukocytes in culture." J Clin Invest **54**: 378-83.
92. Greenwald RJ, Latchmann YE, Sharpe AH (2002). "Negative co-receptors on lymphocytes." Curr Opin Immunol **14**: 391-6.
93. Grösch S, Tegeder I, Niederberger E, Bräutigam L, Geisslinger G (2001). "COX-2 independent Induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 Inhibitor Celecoxib." FASEB **15**: 2742-2744.
94. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Bancherau J, Liu YJ (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
95. Grover JK, Yadav S, Vats V, Joshi YK (2003). "Cyclooxygenase-2-inhibitors: emerging roles in the gut." Int J Colorectal Dis **18**: 279-91.
96. Grunewald R, Kantarjian H, Du M, Faucher K, Tarassoff P, Plunkett W (1992). "Gemcitabine in leukaemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study." J Clin Oncol **10**: 406-13.
97. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel J, Thery C, Amigorena S (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Ann Rev Immunol **32**(9): 621-67.
98. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H (1998). "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by nonspecific endocytosis and endosomal maturation." EMBO J **17**: 6230-40.

-
99. Hackstein H, Morelli AE, Larregina AT, Ganster RW, Payworth JD, Logar AJ, Watkins SC, Falo LD, Thomson AW (2001). "Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo function of murine myeloid dendritic cells." J Immunol **166**: 7053-7062.
100. Hainaut P, Hollstein M (2000). "p53 and human cancer: the first ten thousand mutations." Adv Cancer Res **77**: 81-137.
101. Harris S, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps R (2002). "Prostaglandins as modulators of immunity." Trends Immunol **23**: 144-150.
102. Hart DN (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**: 3245-87.
103. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM (1999). "CpG DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells." Proc Natl Acad Sci USA **96**: 9305-10.
104. Hasturk S, Kemp B, Kalapurakal SK, Kurie JM, Hong WK, Lee JS (2002). "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma." Cancer: 1023-1031.
105. Heidemann E, Bokemeyer C (1998). "Therapieempfehlungen der Internistischen Onkologie; Solide Tumoren." Zuckerschwerdt Verlag, München 2.Auflage.
106. Herr I, Debatin KM (2001). "Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy." Blood **98**: 2603-2614.
107. Hla T, Neilson K (1993). "Human cyclooxygenase-2 cDNA." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 7384-7388.
108. Hockel S, Schlenger K, Vaupel P, Hockel M (2001). "Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer." Int J Oncol **19**: 827-832.
109. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Muphy M (2002). "Transcriptional repression of the antiapoptotic survivin gene by wild type p53." J Biol Chem **277**(5): 3247-57.
110. Hsia J, Sarin N, Oliver JH, Goldstein AL (1989). "Aspirin and thymosin increase interleukin-2 and interferon-gamma production by human peripheral blood lymphocytes." Immunopharmacology **17**: 167-73.
111. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nat Med **2**: 52-58.
112. Huls G, Koornstra JJ, Kleibeuker JH (2003). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas." Lancet **262**: 230-232.
113. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM (1990). "Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ." J Exp Med **172**: 631-40.
114. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM (1997). "High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T-cells from the T cell areas of lymphnodes." J Exp Med **186**: 665-72.

-
115. Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Shiff D, Albert M, Bhardwaj M, Mellman I, Steinman RM (1998). "Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells." J Exp Med **188**: 2163-73.
116. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Cuisley PS, Ikebara S, Maramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice; abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." J Exp Med **180**: 1849-60.
117. Inaba K, Young JW, Steinman RM (1987). "Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells." J Exp Med **166**: 182-94.
118. Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK (1997). "In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T-cells." J Exp Med **185**: 2133-41.
119. Iniguez MA, Punzon C, Fresno M (1999). "Induction of cyclooxygenase-2 on activated T-lymphocytes: regulation of T-cell activation by cyclooxygenase-2-inhibitors." J Immunol **163**: 111-9.
120. Insel PA (1996). "Analgesic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout". In: J.G. Hardman and L.E. Limbird, Editors, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York. p.617.
121. Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakura R, Valladeau J, Sealand S, Fukukora S, Ikebara S (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." J Immunol **163**: 1409-19.
122. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ (2003). "Cancer Statistics, 2003". CA Cancer J Clin **53**: 5-26.
123. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmermann GA, Prescott SM (1993). "Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokine." J Biol Chem **268**: 9049-9054.
124. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, and Enk AH (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**: 1213-1222.
125. Kagoura M, Toyoda M, Matsui C, Morohashi M (2001). "Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in skin cancers." J Cutan Pathol **28**: 298-302.
126. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S (1995). "Expression of prostaglandin G/H synthase -1 and -2 protein in human colon cancer." Cancer Research **55**: 2556-2559.
127. Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000). "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." Exp Cell Res **256**: 42-49.
128. Khan KN, Stanfield KM, Dannenberg A, Seshan SV, Baergen RN, Baron DA, Soslow RA (2001). "Cyclooxygenase-2 expression in the developing human kidney." Pediatr Dev Pathol **4**: 461-466.

-
129. Khan KN, Stanfield KM, Harris RK, Baron DA (2001). "Expression of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human kidney in hypertension, congestive heart failure, and diabetic nephropathy." Ren Fail **23**: 321-330.
130. Kobbie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, Ramanathapuram LV, Arteaju CL, Ahporiaye ET (2003). "Transforming growth factor beta inhibits the antigen presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines." Cancer Res **63**: 1860-4.
131. Komhoff M, Guan Y, Shapell HW, Davis L, Jack G, Shyr Y, Koch MO, ShabellSB, Breyer MD (2000). "Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade transitional cell bladder carcinomas." J Pathol **157**: 29-35.
132. Kornmann M, Link KH, Butzer U, Blatter J, Berger HG (1999). "In vitro concentration response studies of gemcitabine as experimental base for regional therapeutic studies." Eur J Cancer **35**: 294.
133. Kroemer G, Reed JC (2000). "Mitochondrial control of cell death." Nat Med **6**(5): 513-19.
134. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997). "Mitochondrial control of apoptosis." Immunol Today **18**(1): 44-51.
135. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart B, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becher V, Gross AJ, Hemmerlein Konz L, Müller GA, Ringert RH (2000). "Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids." Nat Med **6**(1): 322-6.
136. Kurts C, Cannarile M, Klebba I, Brocker T (2001). "Dendritic cells are sufficient to cross-present self antigens to CD8 T-cells in vivo." J Immunol **166**: 1439-42.
137. Labayale D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussset M, Altali P (1991). "Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis." Gastroenterology **328**: 635-639.
138. Landowski TH, Shain KH, Oshiro MM, Buyusal I, Painter JS, Dalton WS. (1999). "Myeloma cells selected for resistance to CD95-mediated apoptosis are not cross resistant to cytotoxic drugs: evidence for independent mechanisms of caspase activation." Blood **94**: 265-274.
139. Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL, Smith WL (1994). "Acetylation of human prostaglandinendoperoxide synthase-2 (Cyclooxygenase-2) by aspirin." J Biol Chem **269**: 13207-13215.
140. Li Y, Singh B, Ali N, Sarhar FH (1999). "Induction of growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells by auristatin-PE and gemcitabine." Int J Mol Med **3**: 647-53.
141. Lieber M, Mazetta J, Nelson Rees W, Kaplan M, Todero G (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.
142. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK (1997). "Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice." Cell **91**: 197-208.

-
143. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, MA, A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, McGregor GR, Thompson C (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-99.
144. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M (2001). "Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation." Nat Immunol **2**: 585-9.
145. Loeffler M, Kroemer G (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." Exp Cell Res **256**(1): 19-26.
146. Lu X, Xie W, Bradshaw WS, Simmons DL (1995). "Nonsteroidal anti inflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts." Pro Natl Acad Sci USA **92**: 7961-7965.
147. Ludewig B, Ochsenbein AF, Odermatt B, Paulin D, Hengartner H, Zinkernagel RM (2000). "Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease." J Exp Med **191**: 795-804.
148. Ludewig B, Oehen S, Barchiesi F, Schwendener RA, Hengartner H, Zinkernagel RM (1999). "Protective antiviral cytotoxic T cell memory is most efficiently maintained by restimulation via dendritic cells." J Immunol **163**:1839-44.
149. Luger TA, Bhardwaj RS, Grabbe S, Schwarz T (1996). "Regulation of the immune response by epidermal cytokines and neurohormones." J Dermatol Sci **13**: 5-10.
150. Maitra A, Ashfaq A, Gunn CR, Rahman A, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Wilentz RE (2002). "Cyclooxygenase-2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: an immunohistochemical analysis with automated cellular imaging." Am J Clin Pathol: 194-201.
151. Mancini JA, O'Neill GP, Bayly C, Vickers PJ (1994). "Mutation of serine-516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis." Fed Eur Biochem Soc Lett **342**: 33-37.
152. Marnett LJ, DuBois RN (2002). "COX-2: a target for colon cancer prevention." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **42**: 55-80.
153. Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S (2000). "Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin." Immunology **101**(1): 53.
154. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB (1995). "Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity." Nat Med **1**: 1297-1302.
155. McCoy KD, Hermans IF, Fraser JH, LeGros G, Ronchese F (1999). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8(+) T cells independently of CD4(+) T cell help." J Exp Med **189**: 1157-62.

-
156. McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, Stumbles PA, Wells TN, Holt PJ (1996). "Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli." J Exp Med **184**: 2429-32.
157. McWilliam AS, Nelson DJ, Thomas JA, Holt PG (1994). "Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces." J Exp Med **179**: 1331-36.
158. Meade EA, Smith WL, DeWitt DL (1993). "Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal antiinflammatory drugs." J Biol Chem **268**: 6610-6614.
159. Mellman I, Steinman RM (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.
160. Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P (1988). "Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)." J Biol Chem **263**: 3550-3553.
161. Moll H (1993). "Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis." Immunol Today **14**: 383-87.
162. Moran EM (2002). "Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks." J Environ Pathol Toxicol Oncol **21**: 193-201.
163. Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S (2003). "Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmatic reticulum." Faseb J **17**(6): 696-8.
164. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Jarisch J, Bowes VA, Ragde H, Rogers M, Eljamal A, Kenny GM, Trogehaak MJ, Salgaller ML, Boynten AL (1999). "Infusion with dendritic cells pulsed with HLA-A2 -specific prostate specific membrane antigen peptides : a phase II prostate cancer vaccine trial with hormone-refractory metastatic disease." Prostate **38**: 73-78.
165. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA (1999). "Induction of a carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA." Int J Cancer **82**: 121-24.
166. Narko K, Ristimaki A, MacPhee M, Smith E, Haudenschild CC, Hla T (1997). "Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression." J Biol Chem **272**: 21455-21460.
167. Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate pulsed dendritic cells." Nat Med **4**: 328-32.
168. Newberry RD, Stenson WF, Lorenz RG (1999). "Cyclooxygenase-2-dependant arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen." Nat Med **5**: 900-6.

-
169. Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, Scott B, Heath WR, Collias EJ, Frelinger JA, Robinson BW (2003). "Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor specific CD8 T cells." J Immunol **170**: 4905-13.
170. Nugent KP, Farmer KC, Spigman AD, Williams CB, Phillips RK (1993). "Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis." Br J Surg **80**: 1618-1619.
171. Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, Bronk SF, Gores GJ (2002). "COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells." Hepatology **35**: 552-9.
172. O`Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard W, Betjes M, Bhardawaj N, Steinman RM (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology **82**: 487-493.
173. O`Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA (1991). "A serum and glucocorticoid - regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein." J Biol Chem **266**: 23261-23267.
174. O`Banion MK, Winn V, Young DA (1992). "cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-related inflammatory cyclooxygenase." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 4888-4892.
175. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund Johansen F (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." Proc Natl Acad Sci USA **94**(23): 12551-6.
176. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzakos JM, Evans JF, Taketo MM (1996). "Suppression of intestinal polyps in Apc delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX 2)." Cell **87**: 803-809.
177. Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berry K, Yonehara S (1994). "Anti-Fas on nonhematopoietic tumours: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness." Cancer Res **54**: 1580-6.
178. Palucka K, Fay J, Banchereau J (1999). "Dendritic cells and tumor immunity." Curr Opin Oncol Endocrine Metabolic Invest Drug **1**: 282-90.
179. Pamer E, Cresswell P (1998). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing." Ann Rev Immunol **16**: 323-58.
180. Piali L, Fichtel A, Terpe HJ, Imhof BA, Gisler RH (1995). "Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma." J Exp Med **181**: 811-816.
181. Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, Pamukun R, Ahnen DJ (1997). "Apoptosis primarily accounts for the growth- inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest and p53 induction." Cancer Res **57**: 2452-59.
182. Pierre P, Mellmann I (1998). "Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells." Cell **93**: 1135-45.

-
183. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, Mellmann I (1997). "Developmental regulation of MHC Class II transport in mouse dendritic cells." Nature **388**: 787-92.
184. Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, Gray RJ, Hernandez JL, Gendler SJ, Makherjee P (2004). "Reduced T-Cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E₂ secretion in patients with breast cancer." Ann Surg Oncol **11**: 328-39.
185. Pohl U, Wagenknecht B, Naumann U, Weller M (1999). "p53 enhance BAK and CD95 expression in human malignant glioma cells but does not enhance CD95L-induced apoptosis." Cell Physiol Biochem **9**: 29-37.
186. Pulendran B, Banchereau J, Marasovsky E, Maliszewski C (2001). "Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors." Trends Immunol **22**: 41-7.
187. Pulendran B, Smith JL, Jenkins M, Schoenborn M, Marasovsky E, Maliszewski CR (1998). "Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant." J Exp Med **188**: 2075-82.
188. Rappaport RS, Dodge J (1982). "Prostaglandin E inhibits the production of interleukin 2." J Exp med **155**: 943-8.
189. Rayman P, Uzzo RG, Kolenko V, Bloom T, Catheart MK, Molto L, Novick AC, Bukowski RM, Hamilton T, Finke JH (2000). "Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 signaling: a mechanism of immune escape." Cancer J Sci Am **6 Suppl**: 81-87.
190. Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P (1999). "Coordinated events during bacteria-induced DC maturation." Immunol Today **20**: 200-3.
191. Reutelingsperger CP, van Heerde WC (1997). "Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis." Cell Mol Life Sci **53**(6): 527-32.
192. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell." Nature **393**: 474-78.
193. Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P (1996). "Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells." Science **271**: 1723-26.
194. Rivero M, Santiago B, Galindo M, Brehmer MT, Pablos JL (2002). "Cyclooxygenase-2 inhibition lacks immunomodulatory effects on T cells." Clinical and Experimental Rheumatology **20**: 379-385.
195. Rock KL, Goldberg AL (1999). "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I -presented peptides." Ann Rev Immunol **17**: 739-79.
196. Rolland PH, Martin PM, Jacuemier J, Rolland AM, Toga M (1980). "Prostaglandin in human breast cancer: evidence that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells." J Natl Cancer Inst **64**: 1061-1070.
197. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med **180**: 83.

-
198. Rosewicz S, Wiedenmann B (1997). "Pancreatic Carcinoma." Lancet **349**: 485-9.
199. Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA (1998). "Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen -presenting function." J Immunol **161**: 4467-71.
200. Ruffin MT 4th, Krishnan K, Rock CL, Normolle D, Vaerten MA, Peters-Golden M, Crowell J, Kelloff G, Boland CR, Brenner DE (1997). "Suppression of human colorectal mucosal prostaglandins: determining the lowest effective aspirin dose." J Natl Cancer Inst **89**: 1152-1160.
201. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST (1999). "Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (slc) and cc chemokine 7 (ccr7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from skin to regional lymph nodes." J Immunol **162**: 2472-2475.
202. Sali M, Cerundolo V, and Lanzavecchia A (2000). "Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells." Eur J Immunol **30**: 705-708.
203. Sallusto F, Cella M, Danieli C, and Lanzavecchia A (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**: 389-400.
204. Sallusto F, Lanzavecchia A (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**: 1109-18.
205. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas Jm, Karp DD, Loprinzi CC, Steinbach G, Schilsky R (2003). "A randomized trial of aspirin to prevent colorectal carcinomas in patients with previous colorectal cancer." N Engl J Med **348**: 883-890.
206. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T (1995). "Expression of cyclooxygenase -1 and -2 in human colorectal cancer." Cancer Research **55**: 3785-3789.
207. Santoli D, Phillips PD, Colt TL, Zurier RB (1990). "Suppression of interleukin 2-dependent human T cell growth in vitro by prostaglandin E (PGE) and their precursor fatty acids. Evidence for a PGE-independent mechanism of inhibition by the fatty acids." J Clin Invest **85**: 424-32.
208. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardawaj N (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**: 423-434.
209. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." EMBO J **17**: 1675-1687.

-
210. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A (2001). "Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: in vitro model for the assessment of tumor vaccines." Cancer Res **61**: 6445-50.
211. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, Robe J, Endres S, Eigler A. (2002). "Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and γ 6 T cells." Cancer Res **62**: 2347-52.
212. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**: 1223-32.
213. Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, Roder C, Haendle I, Leisgang W, Dunbar R, Cerundolo V, van den Driesch P, Knop J, Brocker EB, Enk A, Kampgen E, Schuler G (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**: 3492-6.
214. Seed MP, Brown JR, Freemantle CN, Papworth JL, Colville-Nash PR, Willis D, Sommerville KW, Asculai S, Willoughby DA (1997). "The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2,5% Hyaluronan." Cancer Research **57**: 1625-1629.
215. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S (1997). "TAP off-tumors on." Immunol Today **18**: 292-299.
216. Sharma S, Stolina M, Yang S, Baratelli F, Lin JF, Alianzer K, Luo J, Zhu L, Lin Y, Huang M, Dokadwala M, Batra RK, Dubinett SM (2003). "Tumor cyclooxygenase-2-dependent suppression of dendritic cell-function." Cancer Res **9**: 961-968.
217. Sheng H, Morrow JD, Beauchamp RD, Dubois RN (1998). "Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells." Cancer Research **58**: 362-366.
218. Shiff SJ, Rigas B (1999). "The role of the cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs)." J Exp Med **190**: 445-450.
219. Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV (1998). "Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice." J Immunol **161**: 4520-29.
220. Shin JY, Lee SK, Kang CD, Chung JS, Lee EY, Seo SY, Lee SY, Back SY, Kim BS, Kim JB, Yoon S (2003). "Antitumor effect of intratumoral administration of dendritic cell combination with vincristine chemotherapy in a murine fibrosarcoma model." Histol Histopathol **18**: 435-47.
221. Shore S, Raraty MGT, Ghaneh P, Neoptolemos JP (2003). "Chemotherapy for pancreatic cancer." Aliment Pharmacol Therap **18**: 1049-1069.
222. Shortman K, Heath WR (2001). "Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells." Nat Immunol **2**: 988-9.

-
223. Shortman K, Liu YJ (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**: 151-61.
224. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999). "Ordering the cytochrome c- initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and -10 in a caspase-9- dependent manner." J Cell Biol **144**(2): 281-92.
225. Smalley WE, DuBois RN (1997). "Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs." Adv Pharmacol **39**: 1-20.
226. Somasse T, Flamand V, De Becker G, Bazin H, Tielemans F, Thielemans K, Urbain J, Leo O, Moser M (1992). "Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo." J Exp Med **175**: 15-21.
227. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A (2000). "Chemokines and dendritic cell traffic." J Clin Immunol **20**: 151-60.
228. Specht JM, Wang G, Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, Rosenberg SA, Hwu P (1997). "Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases." J Exp Med **186**: 1213-21.
229. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, SU LK, Levin B (2000). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." N Engl J Med **342**: 1946- 1952.
230. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH (1999). "Interleukin -10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells." Blood **93**: 1634-42.
231. Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997). "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells." J Immunol **159**: 4772-4780.
232. Steinman RM, Cohn ZA (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
233. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003). "Toleregenic dendritic cells." Ann Rev Immunol **21**: 685-711.
234. Steinman RM, Pack M, Inaba K (1997). "Dendritic cells in T-cell areas of lymphoid organs." Immunol Rev **156**: 25-37.
235. Steptoe RJ, Fu F, Li W, Drakes ML, Lu L, Demetris AJ, Qian S, McKenna HJ, Thomson AW (1997). "Augmentation of dendritic cells in murine organ donors by Flt3 ligand alters the balance between transplant tolerance and immunity." J Immunol **159**: 5483-91.
236. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Patanova J, Lee JC, Dubinett SM (2000). "Specific inhibition of cyclooxygenase-2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis." J Immunol **164**: 361-370.
237. Tada T, Hu FY, Kishimoto H, Furutani-Seiki M, Asanao Y (1991). "Molecular events in The T-cell mediated suppression of the immune response." Ann N Y Acad Sci **636**: 20-27.

-
238. Tan MC, Mommaas AM, Drijfhout JW, Jordens R, Onderwater JJ, Verwoerd D, Mulder AA, van der Heiden AN, Scheidegger D, Oomen LC, Ottenhoff TH, Tulp A, Neefjes JS, Koning F (1997). "Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells." Eur J Immunol **27**: 2426-35.
239. Tan MH, Nowak NJ, Loo R, Ochi H, Sandbery AA, Lopez C, Pichren ZW (1986). "Characterization of a new primary human pancreatic tumor line." Cancer Invest **4**(1): 15-23.
240. Tanaka F, Yamaguchi H, Ohta M, Mashino K, Sonada H, Sadanaja N, Inoue H, Mori M (2002). "Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor specific antitumor effect in vivo." Int J Cancer **101**: 265-9.
241. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C (2002). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs as anti cancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues." J Natl Cancer Inst **94**: 252-266.
242. Thurnher M, Klocker H, Papesh C, Ramoner R, Radmayr C, Hobisch A, Gastl G, Romani N, Ebner S, Bock G, Bartsch G (1997). "Dendritic cells for the Immunotherapy of renal cell carcinoma." Urol Int **59**: 1.
243. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, and Schuler G (1999). "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application." J Immunol Methods **223**: 1-15.
244. Timmermann JM, Levy R (1999). "Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy." Ann Rev Immunol **50**: 507-29.
245. Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, Melief CJ (1998). "Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells." J Immunol **160**: 4449-56.
246. Tong Y, Song W, Crystal RG (2001). "Combined intratumoral injection of bone marrow-derived dendritic cells and systemic chemotherapy to treat pre-existing murine tumors." Cancer Res **61**: 7530-5.
247. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA (1990). "A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance." Proc Natl Acad Sci USA **87**: 1486-1490.
248. Trotzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2003). "Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition." Oncogene **22**: 8021-30.
249. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, DuBois RN (1998). "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells." Cell **93**: 705-716.
250. Tumorzentrum-München (2001). "Manual Gastrointestinale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge gastrointestinaler Tumoren." **6**: 181-196.

-
251. Vane JR (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol. **231**: 232-235.
252. Visscher DW, Smilanz S, Drozdowicz S, Wykes SM (1993). "Prognostic significance of image morphometric microvessel enumeration in breast carcinoma." Anal Quant Cytol Histol **15**: 88-92.
253. Vousden KH, Lu X (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
254. Wadell WR, Ganser GF, Cerise EJ, Loughry RW (1989). "Sulindac for polyposis of the colon." Am J Surg **157**: 175-179.
255. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR (1999). "Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis." Proc Natl Acad Sci USA **96**: 7563-8.
256. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten TJ, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, McGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001). "Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-30.
257. Williams CS, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps LW, Nanney LB, Beauchamp RD, DuBois RN (1996). "Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas." Gastroenterology **111**: 1134-1140.
258. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli (1997). "Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor dependent long-term cultures." J Exp Med **185**: 317-28.
259. Wu Y, Mehew JW, Heckmann CA, Arcinas M, Boxer LM (2001). "Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in haematopoietic cells." Oncogene **20**(2): 240-51.
260. Yang L, Yamagata N, Yadav R, Brandon S, Courtney RL, Morrow JD, Shyr Y, Boothby M, Joyce S, Carbone DP, Breyer RM (2003). "Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by prostaglandin by prostaglandin EP2-receptor." J Clin Invest **111**: 727-735.
261. Yao Min, Kargman S, Lam E, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM (2003). "Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice." Cancer Res **63**: 586-592.
262. Yip-Schneider MT, Sweeney CJ, Jung SH, Crowell PL, Marshall MS (2001). "Cell cycle effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells." J Pharmacol Exp Ther **298**: 976-85.
263. Yokoyama C, Takai T, Tanabe T (1988). "Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence." Fed Eur Biochem Soc Lett **231**: 347- 351.
264. Young JW, Steinman RM (1990). "Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T-cells." J Exp Med **171**: 1315-32.

-
265. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ (1977). "Human pancreatic carcinoma (Mia-PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase." Biochemistry **16**(9): 1908-13.
266. Zachowski A, Hermann A, Paraf A, Devaux PF (1987). "Phospholipid outside-inside translocation in lymphocyte plasma membrane is a protein-mediated phenomenon." Biochem Biophys Acta **897**: 197.
267. Zeytin HE, Patel AC, Rogers CJ, CanterD, Hursting SD, Schlom J, Greiner JW (2004). "Combination of a poxvirus based vaccine with a cyclooxygenase -2 inhibitor (celecoxib) elicits antitumor immunity and long term survival in CEA Tg/MIN mice." Cancer Res **61**: 6445-50.
268. Zinkernagel RM (2001). "Immunity against solid tumors?" Int J Cancer **93**: 1-5.

Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

- Herrn Prof. Dr. Stefan Endres von der Abteilung für Klinische Pharmakologie des Klinikums der Innenstadt der LMU München für die Überlassung des interessanten Themas, die herzliche Aufnahme in sein Team sowie seine menschliche und fachliche Kompetenz, die zum guten Gelingen der Arbeit geführt haben,
- Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer vom Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München für seine Unterstützung, die speditive Durchsicht der Arbeit und die freundliche Übernahme der Promotion,
- meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Andreas Eigler für die umfassende fachliche und übergreifende Betreuung und die motivierende Tatkraft bei der Anfertigung meiner Arbeit,
- meinem Betreuer Herrn Dr. Marc Dauer für die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die Verbesserungsvorschläge für meine Doktorarbeit,
- Frau Rosemarie Kiefl für die freundliche Einarbeitung und Nutzung des Labors,
- Herrn Christian Bauer für seine Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche sowie seiner ständigen aktiven Hilfe und Unterstützung in allen Phasen der Arbeit,
- Herrn Franz Bauernfeind für viele wertvolle Hinweise, Ratschläge und Denkanstöße, die mir die Arbeit wesentlich erleichterten,
- Herrn Dr. Wolfgang Kelsch und Herrn Dr. Veit Hornung für ihre Geduld und Bereitschaft, mich bei Computer- und Statistik-assoziierten Arbeiten zu unterstützen,
- Frau Monika Rieger für die rasche und sorgfältige Korrektur des englischsprachigen Teils der Arbeit,
- meinen Mitdoktoranden Frau Veronika Jakl, Frau Jana Junkmann, Herrn Martin Orban und Frau Julia Stubenbord für die herzliche Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung,
- meinen Eltern und meinem Bruder Hendrik für die liebevolle Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir all die Jahre boten, ohne die mir die Verwirklichung meiner beruflichen Ziele nur schwer möglich gewesen wäre.

Curriculum Vitae