

**Untersuchungen zur Antitumor-Immunisierung
mittels dendritischer Zellen in einem murinen
Lymphommodell**

vorgelegt von

Christian Adam

2005

Aus dem GSF-Institut für Molekulare Immunologie
Vorstand Prof. Dr. rer. nat. Dolores Schendel

Untersuchungen zur Antitumor-Immunisierung mittels dendritischer Zellen in einem murinen Lymphommodell

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

vorgelegt von

Christian Adam

aus
Bamberg

2005

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Mocikat

2. Berichterstatter Prof. Dr. med. T. Brocker

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Dreyling

Prof. Dr. med. S. Endres

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 2005

für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2000 bis Oktober 2004 am Institut für Molekulare Immunologie der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München erstellt. Prof. Dr. med. Ralph Mocikat hatte die Fachvertretung für die Fakultät für Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München inne.

Teile der Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Nicolas Graf, Christian Adam & Ralph Mocikat (2003): Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo. *Int. J. Cancer* 105: 217-220.

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

Christian Adam, Josef Mysliwietz & Ralph Mocikat: A polyvalent dendritic cell-based vaccine against B-cell lymphoma generated by receptor-mediated antigen internalization. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.

Christian Adam et al.: Mechanisms of CD4⁺ T cell-independent CTL induction. Manuskript in Vorbereitung.

Publizierte Abstrakts und Kongress-Beiträge:

Nicolas Graf, Christian Adam & Ralph Mocikat (2003): The potential role of persisting xenogenized vaccine cells for the induction of antitumor immunity. 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Berlin, 24.-27. Sept. 2003.

Abstrakt in *Immunobiology* 208(1-3): 234.

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

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

Christian Adam, Nicolas Graf & Ralph Mocikat (2004): Trioma cell-pulsed dendritic cells induce protective immunity in mice. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montréal, Canada, 18.-23. Juli 2004.

Abstrakt in Clinical and Investigative Medicine 27(4): 188D.

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

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

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
A EINLEITUNG	1
1 Die Immunologie: eine Erfolgsgeschichte der modernen Medizin.....	1
2 Das Immunsystem: ein Instrument zur Tumorbekämpfung.....	3
2.1 Angeborene und adaptive Immunität.....	3
2.1.1 Dendritische Zellen: die Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität.....	4
2.1.2 T-Zellen: Effektorzellen der adaptiven Immunität.....	4
2.1.3 NK-Zellen: Effektorzellen der angeborenen Immunität.....	6
2.2 Tumorantigene: Erkennungsmerkmale für das Immunsystem.....	7
2.3 Die Immunüberwachung: Tumorzellen entkommen dem Immunsystem.....	9
3 Die Immuntherapie: ein zukunftsweisender Ansatz gegen Krebs.....	10
3.1 Stimulation des angeborenen Immunsystems.....	10
3.2 Humorale Immuntherapie.....	11
3.3 Verbesserung der T-Zell-Aktivierung.....	12
3.4 Blockierung immunologischer Kontrollpunkte.....	13
3.5 Dendritische Zellen in der Immuntherapie.....	13
3.5.1 DC-Wachstumsfaktoren.....	14
3.5.2 Redirektion von Tumorantigenen gegen DC.....	14
3.5.3 Immunisierung mit antigenbeladenen DC.....	15
4 Fragestellungen.....	17
B MATERIAL UND METHODEN	18
1 Methoden der Zellkultur.....	18
1.1 Verwendete Zellen	18
1.2 Zellkulturbedingungen.....	18
1.3 Kryokonservierung.....	19
1.4 Reklonierung von BiV-Zellen.....	19
1.5 Bildung dendritischer Zellen.....	19

1.6	Antigenbeladung dendritischer Zellen.....	20
1.7	Gewinnung von NK Zellen.....	22
2	Immunologische Methoden.....	23
2.1	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA).....	23
2.2	Fluoreszenzaktivierte Zellzählung (FACS).....	23
2.3	Tetramerfärbung.....	23
2.4	Immunmagnetische Zellseparation (MACS).....	24
2.5	Isolierung von Ribonukleinsäure.....	25
2.6	Zytotoxizitätsversuche.....	25
3	Durchführung der <i>In-vivo</i> -Versuche.....	26
3.1	Präimmunisierungsversuche.....	26
3.2	Simultanversuche	28
3.3	Therapieversuche.....	29
3.4	Statistische Auswertung.....	29
C	ERGEBNISSE.....	30
1	Immunisierungsversuche mit unbeladenen DC.....	30
1.1	NK-Zell-vermittelte Immunität gegen das A20-Lymphom nach Immunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen.....	30
1.2	Zytotoxische Aktivität DC-aktivierter NK-Zellen gegen A20-Zellen.....	31
1.3	Die Bedeutung der NKG2D/NKG2D-L-Interaktion für die Tumorabstoßung.....	33
1.4	T-Zell-Gedächtnis nach DC-vermittelter NK-Zell-Aktivierung.....	35
1.5	CD4 ⁺ -Zell-unabhängige CTL-Induktion durch aktivierte NK-Zellen.....	36
1.6	Die Rolle von IFN- γ , IL-12 und endogenen DC bei der CTL-Induktion.....	39
1.7	Der Unterschied zwischen reifen und unreifen DC bei der CTL-Induktion.....	41
1.8	Therapieversuche mit unbeladenen dendritischen Zellen.....	43
2	Immunisierungsversuche mit antigenbeladenen DC.....	44
2.1	Beladung mit Lymphomantigenen.....	44
2.1.1	Beladung mit dem A20-Idiotyp.....	44
2.1.2	Beladung mit A20-Zellen.....	45
2.1.3	Beladung mit A20-RNS.....	46
2.2	Redirektion der A20-Antigene gegen Internalisierungsrezeptoren auf DC.....	47
2.2.1	Prinzip des Triomzellansatzes.....	47
2.2.2	Beladung mit bispezifischen Immunglobulinen.....	48
2.2.3	Beladung mit Triomzellen.....	49
2.3	Beladung mit GM-CSF-transfizierten Zellen.....	51

D DISKUSSION.....	53
1 Die Interaktion zwischen DC und NK-Zellen: ein neuer Weg der Antitumor-CTL-Induktion.....	53
1.1 Die Interaktion zwischen unbeladenen DC und NK-Zellen.....	54
1.2 Die DC/NK-Zell-Interaktion als CD4 ⁺ -Zell-unabhängiger Weg der CTL-Induktion.....	55
1.3 Unzureichende Aktivierung der DC/NK-Zell-Achse durch unreife DC.....	56
1.4 A20-Restriktion des DC-induzierten Tumorschutzes.....	57
1.5 Ausblick.....	59
2 Antigenbeladene dendritische Zellen in der Tumorthapie.....	61
2.1 Therapie mit idiotypbeladenen dendritischen Zellen.....	62
2.2 Therapie mit dendritischen Zellen, die mit multiplen Lymphomantigenen beladen wurden.....	63
2.3 Die Induktion einer Antitumor-Immunität durch triomzellbeladene DC.....	64
2.3.1 Vergleich von dendritischen Zellen, die mit Idiotyp oder bispezifischem Immunglobulin beladen wurden.....	64
2.3.2 Vergleich von dendritischen Zellen, die mit Triomzellen oder A20-Lymphomzellen beladen wurden.....	65
2.4 Mechanismen der Antitumor-Immunität.....	67
2.5 Inhibition der Funktion dendritischer Zellen nach Inkubation mit GM-CSF-produzierenden Triomzellen.....	68
2.6 Ausblick.....	69
E ZUSAMMENFASSUNG.....	71
F ANHANG.....	74
G LITERATURVERZEICHNIS.....	76
H DANKSAGUNG.....	89
LEBENS LAUF.....	90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity= antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle(n)
biot.	biotinyliert
bslg	bispezifisches Immunglobulin
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation = Unterscheidungsmerkmale in der Zellbiologie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CpG-ODN	CpG-Oligonukleotide
CTL	cytotoxic T lymphocytes = zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA	cytotoxic T lymphocytes antigen = zytotoxisches T-Lymphozytenantigen
d	Tag
DC	dendritic cell(s) = dendritische Zelle(n)
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay = enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell scan = Fluoreszenz-aktivierte Zellzählung
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoreszin-Isocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
Gy	Gray
h	Stunde
HBV	Hepatitis B-Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM	intracellular adhesion molecule = intrazelluläres Adhäsionsmolekül
Id	Idiotyp

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LFA	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen
KIR	Killer-inhibierende Rezeptoren
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	magnetic cell sorting = magnetische Zellseparation
MAGE	melanoma-associated antigen = Melanom-assoziiertes Antigen
MART	melanoma antigen recognized by T cells
MHC	major histocompatibility complex = Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
MICA/B	major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A/B
MULT-1	murine ULBP-like transcript 1
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAMP	pathogen-associated molecular patterns = Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
PE	Phycoerythrin
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RAE-1	retinoic acid early inducible-1 gene
RNS	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
STAT	signal transducer and activator for transcription
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transforming growth factor = transformierender Wachstumsfaktor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
U	Unit = Einheit
ULBP	UL16-binding proteins = UL16-bindende Proteine
VEGF	vascular endothelial growth factor = Gefäßendothel-Wachstumsfaktor

A EINLEITUNG

1 Die Immunologie: eine Erfolgsgeschichte der modernen Medizin



Abb. 1: James Gillray, Die Kuhpocken oder der großartige Erfolg der neuen Impfmethode, 1809, aus: Medizin In Literatur und Kunst, 1994.

„Die Krankheitsmaterie verschiedener Gattungen vermag, wenn sie im Organismus absorbiert wird, ähnliche Wirkungen hervorzurufen. Aber es ist eine besondere Eigenschaft des Kuhpockengiftes, dass der Mensch, der von ihm ergriffen ist, späthin gegen die Ansteckung der Menschenblattern geschützt ist.“ (Edward Jenner, 1798)

Forschung ist die systematische Bemühung um wissenschaftliche Erkenntnisse. Das Experiment (abgeleitet vom lateinischen *experiri*: versuchen, prüfen, erfahren) ist die wichtigste empirische Methode der Naturwissenschaften. Es bezeichnet die wissenschaftliche Beobachtung von Tatsachen unter methodisch-planmäßig herbeigeführten, reproduzierbaren Umständen. Während man in der Antike an der Beobachtung der möglichst ungestörten natürlichen Abläufe interessiert war, greift das moderne Experiment gezielt in die Natur ein.

Der Wundarzt Edward Jenner beobachtete 1796 in einem Experiment, dass der Knabe James Phipps, den er mit Kuhpocken geimpft hatte, vor einer Infektion mit Menschenblattern geschützt war. Jenners Experiment bestätigte frühere Berichte über den

Zusammenhang von Kuhpocken und Menschenblattern und führte zur Geschichte der Impfung (Vakzinierung, abgeleitet vom lateinischen *vacca*: die Kuh). Den anfangs nicht unumstrittenen Massenschutzimpfungen (vgl. Abb. 1) ist es zu verdanken, dass mit der Pockenvakzine bis 1979 eine der verheerendsten Seuchen der Menschheit ausgerottet wurde.

Die Impfung mit abgeschwächten oder attentuierten Krankheitserregern stellt auch heute noch die Grundlage für die Prävention von Infektionskrankheiten dar. Louis Pasteur entwickelte Ende des 19. Jahrhunderts ein erstes Konzept der Immuntherapie. Mit seinem Impfstoff konnte er bei einem Patienten, den ein tollwutkranker Hund gebissen hatte, das Auftreten von Krankheitssymptomen verhindern. Die Postexpositionsprophylaxe ist heute ein Bestandteil der Therapie akuter Infektionen wie Tetanus oder Diphtherie. Die Wirksamkeit der therapeutischen Vakzinierung warf die Frage auf, ob dieses Konzept auf andere chronische Infektionen oder auf Krebserkrankungen übertragen werden kann.

William B. Coley entdeckte im Jahr 1893, dass Krebspatienten mit einer Kombination von Bakterienextrakten erfolgreich behandelt werden können (Coley, 1893). Dies erweckte die Hoffnung, Tumoren mit Hilfe des Immunsystems heilen zu können. Nach über hundert Jahren bietet das molekulare Verständnis des Immunsystems die Möglichkeit, Immunisierungsstrategien gegen Krebserkrankungen zu entwickeln, die eine große Wirksamkeit und Spezifität sowie eine geringe Toxizität für das gesunde Gewebe aufweisen könnten.

Ziel einer Immunisierung gegen Tumoren ist die Bildung einer tumorantigenspezifischen T-Zell-Antwort. Im Gegensatz zur prophylaktischen Impfung gegen infektiöse Erreger muss dabei eine Immunantwort gegen Antigene generiert werden, denen das Immunsystem bereits ausgesetzt ist. So müssen Krebsimpfstoffe die Toleranz des Immunsystems gegen Tumorantigene brechen und eine T-Zell-Population aktivieren, die spezifisch Tumorzellen angreift.

Mit Hilfe dendritischer Zellen werden neue Strategien zur Impfung gegen Tumoren untersucht. Zum Beispiel können DC *ex vivo* mit Tumorantigenen beladen werden und nach Re-Injektion im Patienten eine Immunantwort gegen Krebszellen induzieren. Um Erfolg versprechende Therapieansätze zu entwickeln, ist ein vollständiges Verständnis der Funktion dendritischer Zellen im Immunsystem erforderlich.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Beobachtung, dass unbeladene dendritische Zellen das angeborene Immunsystem aktivieren. Es werden die Auswirkungen der angeborenen Immunität auf die adaptive Immunantwort analysiert sowie neue Strategien untersucht, dendritische Zellen mit Tumorantigenen zu beladen, um eine protektive Immunität zu erzeugen.

2 Das Immunsystem: ein Instrument zur Tumorbekämpfung

Das Immunsystem (abgeleitet vom lateinischen *immunis*: frei, unberührt) umfasst alle Organe, Zellen und Proteine, die dem Organismus zur Abwehr von Pathogenen zur Verfügung stehen. Voraussetzung für eine effektive Abwehr ist die Eigenschaft, körpereigene und nicht-pathogene Strukturen von körperfremden bzw. veränderten Formen zu unterscheiden. Das Immunsystem hat im Laufe der Evolution hierfür komplexe Erkennungs- und Abwehrmechanismen entwickelt.

2.1 Angeborene und adaptive Immunität

Das Immunsystem des Menschen lässt sich in ein angeborenes, phylogenetisch altes Abwehrsystem und in einen phylogenetisch neueren Arm, das adaptive Immunsystem, unterteilen.

Das angeborene Immunsystem ist für die frühe Erkennung von Krankheitserregern verantwortlich. Zu den löslichen Abwehrfaktoren zählen zum Beispiel bakterizid wirkende Stoffe wie Lysozyme oder die verschiedenen Faktoren des Komplementsystems. Die Zellen der angeborenen Abwehr, zu denen Granulozyten, Makrophagen, DC und NK-Zellen gehören, erkennen genetisch festgelegte pathogene Strukturen (PAMP). PAMP bestehen aus konservierten Struktur molekülen, die essenziell für die Pathogenität und das Überleben der Mikroorganismen sind und auf normalen eukaryontischen Zellen nicht vorkommen (Medzhinov und Janeway, 2000). Nach Kontakt mit Pathogenen können die Abwehrzellen der angeborenen Immunität diese direkt abtöten oder inflammatorische Mediatoren freisetzen, um die Komponenten der adaptiven Immunität zu aktivieren.

Die adaptive Immunität entwickelt sich im Gegensatz zur angeborenen Abwehr erst im Laufe der Immunantwort und wird deshalb auch als erworbene Immunität bezeichnet. Sie basiert auf der Bildung antigenspezifischer Rezeptoren auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten durch somatische Rekombination von keimbahnkodierten Gensegmenten. Damit wird gewährleistet, dass sich das Immunsystem dem breiten Spektrum aller möglichen infektiösen Agenzien anpassen kann. Ein besonderes Kennzeichen des adaptiven Immunsystems ist neben der Spezifität die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das den Organismus vor einer erneuten Infektion mit Krankheitserregern schützt.

2.1.1 Dendritische Zellen: die Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Die Induktion einer Immunantwort bedarf einer engen Interaktion zwischen den Komponenten der angeborenen und der adaptiven Immunität. Dendritischen Zellen wird hier eine besondere Rolle zugeschrieben: Sie sind als professionelle antigenpräsentierende Zellen Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen die Eigenschaft, Effektorsysteme der adaptiven Immunität zu aktivieren. Außerdem sind sie an der Induktion von Toleranz in den peripheren und zentralen lymphatischen Organen beteiligt (Steinman et al., 2003) und regulieren die Qualität der T-Zell-Antwort, indem sie in naiven T-Zellen unterschiedliche Effektorfunktionen induzieren und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) bewirken (Moser, 2003).

In einem unreifen Stadium sind dendritische Zellen darauf spezialisiert, Antigene aktiv aufzunehmen und zu prozessieren. Mit der Antigeninternalisierung verlieren sie ihre Fähigkeit zu phagozytieren und treten in eine Reifungs- und Migrationsphase ein. Reife dendritische Zellen entfalten reichlich MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche, exprimieren Signale zur Kostimulation naiver T-Zellen und Adhäsionsmoleküle, mit deren Hilfe sie mit T-Lymphozyten interagieren. Während der Reifungsphase wandern die DC in lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten. Dort werden die prozessierten antigenen Peptide, an MHC-Moleküle gekoppelt, gegenüber T-Lymphozyten präsentiert (Banchereau & Steinman, 1998). Diese Fähigkeiten bedingen die herausragende Stellung dendritischer Zellen im Immunsystem: Sie führen Antigene an T-Zellen heran und stimulieren die Induktion einer spezifischen Immunantwort.

2.1.2 T-Zellen: Effektorzellen der adaptiven Immunität

T-Zellen sind die Haupteffektorzellen bei Immunisierungsversuchen gegen Tumoren. Der entscheidende Schritt bei der erworbenen Immunität ist die Aktivierung antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) durch antigenpräsentierende Zellen. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennt tumorassoziierte Proteinfragmente, die an MHC-Moleküle gebunden sind. Extrazelluläre Antigene werden durch Endozytose in die APC eingeschleust, in endosomalen Vesikeln durch Proteasen zu Peptidfragmenten abgebaut und an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden. Nach Transport an die Zelloberfläche werden sie von $CD4^+$ -T-Helferzellen erkannt, die wichtige immunregulatorische Funktionen besitzen. Intrazelluläre Antigene werden im Zytosol in Peptide gespalten und an der Oberfläche durch MHC-Klasse-I-Moleküle gegenüber $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert. Nach Aktivierung durch die APC mit ihren stark kostimulierenden Eigenschaften können naive $CD8^+$ -Zellen zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und direkt antigentragende Zielzellen zerstören. Einen neuen Weg zur Bildung

bewaffneter T-Effektorzellen beschreibt die Kreuzpräsentation von tumorassoziierten Antigenen (Zinkernagel, 2002). So können exogene Proteine, die von dendritischen Zellen aufgenommen wurden, in den endogenen Pfad eingeschleust und gekoppelt an MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Auf diese Weise können Tumorantigene, die selbst keinen Zugang zum Zytosol der APC haben, eine effiziente CTL-Antwort auslösen.

Um aktiviert zu werden, muss eine naive T-Zelle an den MHC-Peptid-Komplex auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle binden. Adhäsionsmoleküle auf professionellen APC wie beispielsweise ICAM-1, das an LFA-3 auf der T-Zelle bindet, ermöglichen eine erste Wechselwirkung, damit T-Zellen den passenden MHC-Peptid-Komplex auf der Oberfläche der DC finden. Für die klonale Vermehrung der T-Zellen sowie die Bildung bewaffneter T-Effektorzellen muss neben der Bindung des TCR an den MHC-Peptid-Komplex ein kostimulierendes Signal übermittelt werden, das z.B. durch die Interaktion zwischen B7-Molekülen auf DC und CD28 auf T-Zellen zustande kommt.

Bewaffnete T-Effektorzellen können ohne weitere Kostimulation antigentragende Tumorzellen zerstören. Dagegen bedarf die Differenzierung naiver $CD8^+$ -T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen zusätzlich der indirekten Stimulation durch $CD4^+$ -T-Helferzellen (Bennett et al., 1998). Es werden zwei Arten von T-Helferzellen unterschieden: Th2-Zellen synthetisieren vor allem IL-4 sowie IL-10, rekrutieren eosinophile Granulozyten und aktivieren die humorale Immunantwort. Th1-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Steuerung und Koordination der zellvermittelten Tumormunität. Sie stimulieren über den Wachstumsfaktor IL-2 und die Produktion von $IFN-\gamma$ die Proliferation und Differenzierung in bewaffnete T-Killerzellen (Abbas et al., 1996). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass $CD4^+$ -Zellen wesentlich zur Tumorphrotektion beitragen und sogar unabhängig von $CD8^+$ -Zellen eine Antitumor-Antwort induzieren können, wenn sie zu Th1-Zellen differenzieren (Egeter et al., 2000).

Entscheidend für die Bildung zytotoxischer T-Effektorzellen ist die Interaktion zwischen CD40 auf APC und CD40-Ligand auf $CD4^+$ -T-Zellen (Schoenberger et al., 1998). Die CD40-CD40-Ligand-Interaktion sendet der dendritischen Zelle Aktivierungssignale für die Expression kostimulierender Moleküle und bewirkt die Produktion von Th1-Zytokinen wie IL-12 (Cella et al., 1996). So wird die dendritische Zellen über das CD40-Signal konditioniert, um direkt $CD8^+$ -T-Zellen zu stimulieren, ohne dass zu diesem Zeitpunkt $CD4^+$ -Zellen benötigt werden (Ridge et al., 1998). Die Expression von CD40 durch DC ist wichtig für die Produktion von Th1-Zytokinen und die Induktion einer Antitumor-Immunität (Mackey et al., 1998).

2.1.3 NK-Zellen: Effektorzellen der angeborenen Immunität

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und Teil der primären Abwehr gegen virale Infektionen und Tumoren. Sie können durch dendritische Zellen aktiviert werden und unmittelbar virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen abtöten (Fernandez et al., 1999). Die Reaktivität natürlicher Killerzellen gegen Tumorzellen wird durch ein Gleichgewicht von stimulierenden und hemmenden Rezeptoren gesteuert (Biassoni et al., 2001; Lanier, 2000, 2001). Killer-inhibierende Rezeptoren (KIR) erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche und hemmen die zytotoxische Funktion der NK-Zellen. An der fehlenden oder geringen Ausprägung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche können NK-Zellen ihre Zielzellen erkennen und selektiv lysieren (Moretta et al., 1996; Long, 1999). Stimulierende Rezeptoren gehören zur Familie der Immunglobulin- oder Lectin-ähnlichen Moleküle. NKG2D ist ein gut charakterisierter aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen, $\gamma\delta^+$ -T-Zellen und $CD8^+$ -T-Zellen (Jamieson et al., 2002). Im Menschen sind die Proteine MICA/MICB und ULBP als NKG2D-Liganden definiert (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001). In der Maus interagiert der NKG2D-Rezeptor mit den Molekülen Rae1, H60 und MULT-1 (Cerwanka et al., 2000; Diefenbach et al., 2000; Carayannopoulos et al., 2002). Adulte Zellen exprimieren in der Regel keine MICA/B- bzw. Rae1-Moleküle; jedoch werden NKG2D-Liganden in vielen Tumorzellen überexprimiert (Cerwanka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). Die hohe Ausprägung der Liganden auf Tumorzellen bewirkt eine NK-Zell-abhängige Tumorzelllyse (Cerwanka et al., 2000; Diefenbach et al., 2000).

Einige Studien mit NKG2D-L-exprimierenden Tumoren zeigten, dass durch die Interaktion zwischen NKG2D und seinen Liganden nicht nur NK-Zellen, sondern auch $CD8^+$ -T-Zellen aktiviert werden (Diefenbach et al., 2001). Nach Aktivierung von NK-Zellen durch NKG2D-Ligand-Bindung wurde eine spezifische CTL-Antwort gegen Tumoren beobachtet (Westwood et al., 2004). Auch die Interaktion zwischen CD70 auf Tumorzellen und CD70-Ligand (CD27) auf NK-Zellen vermittelte eine primäre NK-Zell-abhängige Tumorabstoßung *in vivo* und induzierte eine spezifische T-Zell-Immunität sowie eine Th1-Antwort gegen Tumorzellen (Kelly et al., 2002a). Ebenso wurde gegen Tumorzellen, die CD80-Moleküle exprimieren, eine sekundäre T-Zell-Antwort generiert, die von der NK-Zell-Aktivierung und der IFN- γ -Produktion in der Induktionsphase abhängig war (Kelly et al., 2002b).

Mocikat et al. (2003) beschrieben einen Mechanismus, der angeborene und adaptive Immunität verbindet, um eine tumorprotektive CTL-Antwort zu induzieren: MHC-Klasse-I-supprimierte Tumorzellen initiieren eine Kaskade, beginnend mit der schnellen Aktivierung von NK-Zellen. Aktivierte NK-Zellen produzieren IFN- γ und stimulieren dendritische Zellen zur IL-12-Synthese. Die Aktivierung endogener DC führt zur Bildung zytotoxischer T-Zellen und induziert ein immunologisches Gedächtnis.

Die Bedeutung von CD4⁺-T-Zellen für die NK-Zell-abhängige CTL-Induktion ist noch nicht abschließend geklärt. Geldhof et al. (2002) zeigten, dass NK-Zellen eine CD8⁺-T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen induzieren, indem sie alternativ aktivierte, immunsuppressive Typ2-APC in klassisch aktivierte Typ1-APC umwandeln, die zytotoxische T-Zellen aktivieren. Eine andere Arbeit demonstrierte, dass NK-Zellen neben ihrer zytolytischen auch eine immunstimulierende Funktion besitzen, indem sie die Entwicklung einer Th1-Antwort und einer CTL-dominierten Typ1-Immunität unterstützen (Mailliard et al., 2003). Dagegen wiesen Westwood et al. (2004) darauf hin, dass die NK-Zell-vermittelte Tumorumlyse über einen Th1-unabhängigen CD4⁺-T-Zell-Weg induziert und eine tumorspezifische CTL-Antwort gebildet wird.

2.2 Tumorantigene: Erkennungsmerkmale für das Immunsystem

Tumorantigene sind tumorzellabgeleitete Peptide, die ausschließlich oder vorwiegend in Tumorzellen vorkommen. Peptide von Tumorzellproteinen werden T-Lymphozyten durch MHC-Moleküle auf APC präsentiert. Eine Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene führt zur Zerstörung der Tumorzellen, die diese Proteine exprimieren. Die molekulare Definition von Tumorantigenen ist deshalb eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Antitumor-Vakzinen. Nach Pardoll (1998) können Tumorantigene in folgende Gruppen eingeteilt werden:

1. Individuelle Tumorantigene, die exklusiv von einer Tumorzelle exprimiert werden, sind häufig Produkte einer Gen-Mutation oder einer Gen-Umlagerung. Die Mutation kann eine T-Zell-Antwort auslösen, indem das Genprodukt an MHC-Moleküle bindet und ein für T-Zellen antigenes Epitop entsteht. Ein Beispiel ist die Mutation im Gen der zyklinabhängigen Kinase 4 bei Melanompatienten. Diese Mutation bewirkt, dass die Zelle in die S-Phase des Zellzyklus eintritt. Es handelt sich also um eine Veränderung, die sowohl antigenetisch als auch onkogenetisch ist (Wölfel et al., 1995).

Der Immunglobulin-Idiotyp humaner B-Zell-Lymphome ist ein durch somatische Rekombination entstandener Antikörperklon. Da es sich hierbei um ein absolut tumorspezifisches Antigen handelt, stellt der Idiotyp einen interessanten Angriffspunkt immuntherapeutischer Strategien dar. Er wird membranständig exprimiert oder auch sezerniert, und idiotypabgeleitete Peptide werden MHC-Klasse-I- und -II-restringiert präsentiert (King et al., 1993). Der Idiotyp ist jedoch nur schwach immunogen wirksam, so dass es Ziel einer Immuntherapie gegen B-Zell-Lymphome ist, seine Immunogenität zu steigern.

2. Embryonale Antigene werden in der Regel ausschließlich in männlichen Keimzellen und in der Plazenta exprimiert. Da auf diesen Zellen keine klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle vorkommen, werden keine antigenen Epitope dargeboten (Boon & van den Bruggen, 1996). In Tumorzellen können die Gene aktiviert werden. Ein charakteristisches Beispiel ist die MAGE-Gen-Familie in Melanomzellen. MAGE-Gen-Produkte werden von den Tumorzellen über MHC-Moleküle präsentiert und von melanomspezifischen CD8⁺-T-Zellen erkannt (Huang et al., 1996).
3. Differenzierungsantigene sind gewebespezifisch und werden von gesunden Körperzellen sowie von Tumorzellen exprimiert. Auf den Tumorzellen findet sich eine hohe Dichte an MHC-Peptid-Komplexen, wodurch diese Antigene immunogen wirken. In Melanomzellen stammen Differenzierungsantigene vom Farbstoffpigment Melanin ab. Melan-A/Mart-1, gp100 und gp75 werden MHC-Klasse-I-spezifisch gegenüber CD8⁺-T-Zellen präsentiert; Tyrosinase-Peptide werden MHC-Klasse-II-restringiert von CD4⁺T-Zellen erkannt (Coulie, 1997).
4. Eine weitere Gruppe von Antigenen wird in Tumorzellen anormal exprimiert. In Adenokarzinomen, wie dem Mamma- oder dem Ovarialkarzinom, wird der membranständige Tyrosinkinase-Rezeptor HER2-neu häufig überexprimiert (Slamon et al., 1998). In Kombination mit Chemotherapeutika werden Antikörper, die gegen HER2-neu gerichtet sind, in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt (Pegram et al., 1999).
5. Tumorsuppressor-Genprodukte spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung. p53 ist ein gut untersuchtes verändertes Tumorsuppressorgen in Malignomen. Viele p53-Mutationen kodieren ein Protein, das signifikant stärker in Tumoren als in normalem Gewebe exprimiert wird. In Mausmodellen konnte der Transfer von p53-spezifischen CTL vor p53-überexprimierenden Tumoren schützen (Vierboom et al., 1997).
6. Eine große Anzahl von Tumoren ist mit viralen Infektionen assoziiert. Beim hepatozellulären Karzinom sind die Hepatitisviren der Gruppen B und C als ätiologisches Agens definiert. Auch der Gebärmutterhalskrebs ist mit der Infektion der Zervikalschleimhaut mit humanem Papillomvirus (HPV-16, HPV-18) verbunden. Virus-assoziierte Tumorantigene sind vor allem ein Angriffspunkt für prophylaktische Impfungen. So sinkt die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms in Taiwan seit Einführung der prophylaktischen HBV-Vakzinierung (Chang et al., 1997).

2.3. Die Immunüberwachung: Tumorzellen entkommen dem Immunsystem

Burnet und Thomas beschrieben die Fähigkeit des Immunsystems, transformierte Zellen zu erkennen und zu zerstören, als Immunüberwachung (Burnet, 1967). Das Immunsystem ist wohl prinzipiell in der Lage, maligne Tumoren zu attackieren. Das Aufspüren transformierter Zellen durch das Immunsystem setzt jedoch die Expression immunogener Determinanten auf den Tumorzellen voraus.

Ein Modell, das die Entwicklung resistenter Tumoren, die der Erkennung durch das Immunsystem entgehen, zu erklären versucht, beschreibt drei Phasen (Dunn et al., 2002). In der „Eliminationsphase“ attackiert das Immunsystem den wachsenden Tumor. Die Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen werden in das Gewebe dirigiert (Smyth et al., 2001). NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen können spontan entstandene transformierte Zellen erkennen und zerstören (Street et al., 2004). Außerdem produzieren sie IFN- γ , das die Proliferation maligner Zellen hemmt (Bromberg et al., 1996) und in den Tumorzellen Apoptose auslösen kann (Kumar et al., 1997). Ferner werden Zytokine produziert, die die Neoangiogenese im Tumorgewebe blockieren (Coughlin et al., 1998; Qin & Blankenstein, 2000). Tumorfiltrierende NK-Zellen können über die Produktion von IFN- γ antigenpräsentierende Zellen stimulieren. Diese induzieren über IL-12 eine antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Antwort und verbinden so angeborene Abwehr und adaptive antigenspezifische Immunantwort (Mocikat et al., 2003). Tumorspezifische CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe und zerstören verbliebene Tumorzellen (Shankaran et al., 2001).

In der „Gleichgewichtsphase“ entgehen einige genetisch instabile und schnell mutierende Tumorzellen dem Immunsystem. Es werden gering immunogene Tumorzellen selektiert, die vor einem Angriff durch das Immunsystem geschützt sind. Man bezeichnet diesen Prozess auch als „Immunität“ (Dunn et al., 2002). Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, dem Immunsystem zu entkommen. Manche transformierte Zellen können ihre MHC-Moleküle herunterregulieren oder die Expression kostimulierender Moleküle vermindern, die zur Aktivierung naiver T-Zellen notwendig sind. Viele Tumoren produzieren immunsuppressive Zytokine, um die Entzündungsreaktion zu hemmen. Der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β unterdrückt die zellvermittelte Immunität; IL-10 oder der Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) blockieren die Aktivierung und Differenzierung dendritischer Zellen (Gabrilovich et al., 1996). Tumorzellen können über das STAT3-Signal die Produktion proinflammatorischer Zytokine behindern und die Expression von Faktoren induzieren, die die Reifung dendritischer Zellen stören (Wang et al., 2004). Außerdem können sich maligne Zellen der Erkennung durch NK- und T-Zellen entziehen. NKG2D-Liganden auf Tumorzellen fungieren als Stresssignale und vermitteln eine

Antitumor-Antwort des Immunsystems, indem sie NK-Zellen aktivieren und die Bildung von CD8⁺-T-Effektorzellen stimulieren (Bauer et al., 1999). Die Sekretion von löslichem MICA-Protein, einem NKG2D-Liganden, durch Tumorzellen reduziert die Expression von NKG2D-Molekülen auf zahlreichen tumorinfiltrierenden Lymphozyten und beeinträchtigt die Reaktion antigenspezifischer T-Zellen gegen den Tumor (Groh et al., 2002). Auch nach Aktivierung des Immunsystems können Tumorzellen Abwehrmechanismen entwickeln, um einem Immunangriff zu entgehen. Auf Grund ihrer genetischen Instabilität können Tumorzellen ihre Antigene durch Mutationen verlieren, so dass sie von den spezifischen T-Effektorzellen nicht mehr erkannt werden. Ferner können maligne Zellen tumorreaktive T-Zellen in einen anergischen Zustand zurückführen (Staveley-O'Carroll et al., 1998) oder in Lymphozyten Apoptose auslösen, indem sie Apoptose-induzierende Oberflächenmoleküle wie den Fas-Liganden exprimieren (Walker et al., 1998). Die vielen Möglichkeiten, wie Tumorzellen der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem entgehen können, führen zur Selektion schwach immunogener oder immunresistenter maligner Zellen.

In der dritten Phase, der „Fluchtphase“, expandieren die überlebenden Tumorzellen unkontrolliert, da das Immunsystem nicht mehr in der Lage ist, eine effektive, endogene Immunantwort gegen den Krebs aufrecht zu erhalten.

3. Die Immuntherapie: ein zukunftsweisender Ansatz gegen Krebs

Das Immunsystem könnte im Prinzip vor unkontrolliertem Wachstum neoplastisch transformierter Zellen schützen. Zum Beispiel wurden bei Nierenkarzinomen oder Melanomen spontane Regressionen beobachtet (Papac, 1996). Ziel der Immuntherapie gegen Krebserkrankungen ist deshalb, Tumorzellen für das Immunsystem als fremd erkennbar zu machen oder eine bereits vorhandene Immunreaktion zu verstärken.

3.1 Stimulation des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind in der Lage, Tumoren zu bekämpfen, indem sie Tumorzellen lysieren und Zytokine produzieren, die Tumorstadium inhibieren und die Angiogenese blockieren (Blattman & Greenberg, 2004). Ein Therapieansatz gegen maligne Erkrankungen versucht deshalb, NK-Zellen mit hohen Dosen IL-2 *in vivo* zu expandieren und zu stimulieren. Nach IL-2-Therapie wurden bei einigen Patienten komplette Remissionen erreicht (Rosenberg et al., 1993). Als Nachteil erwiesen sich jedoch die starken unerwünschten Nebenwirkungen, die bei diesen Therapien beobachtet wurden. Vor allem

der von aktivierten NK-Zellen produzierte Tumornekrosefaktor (TNF) wirkte sehr toxisch. In anderen Studien wurden Antitumor-Effekte erzielt, indem NKT-Zellen mit dem Glycolipid α -Galactosyl-Ceramid oder $\gamma\delta$ -T-Zellen mit Bisphosphonaten selektiv aktiviert wurden. (Nieda, 2003; Wilhelm, 2003).

Um die Immunantwort gegen Tumoren zu verbessern, können Stimulantien des angeborenen Immunsystems direkt in solide Malignome appliziert werden. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen, und Effektorzellen des Immunsystems werden gegen den Tumor rekrutiert. Zum Beispiel führt die Gabe von Lipopolysacchariden oder CpG-Oligonukleotiden, die an Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf Zellen des angeborenen Immunsystems binden, zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Dies erleichtert die Interaktion zwischen der angeborenen Abwehr und der adaptiven Immunantwort (Takeda et al., 2003). IFN- α wird in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt. Das Zytokin hemmt unmittelbar das Wachstum der Tumorzellen, verstärkt die Reifung dendritischer Zellen und kann die Bildung einer CD8⁺-T-Zell-Antwort gegen Leukämiezellen induzieren (Blattman & Greenberg, 2004).

3.2 Humorale Immuntherapie

Aktiviert B-Zellen produzieren Antikörper, die an Oberflächenproteine auf Tumorzellen binden können. Durch die Aktivierung des Komplementsystems kann eine komplementvermittelte Zelllyse angeregt werden. Außerdem können NK-Zellen oder Makrophagen an die antikörpermarkierten Zellen binden, um eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) hervorzurufen.

Ein Beispiel für den passiven Transfer von Antikörpern stellt die Therapie maligner B-Zell-Lymphome mit Rituximab, einem Antikörper gegen CD20, dar. Kombiniert mit einer Chemotherapie verbessert Rituximab die Remissionsrate bei Patienten mit B-CLL durch einen ADCC-abhängigen Mechanismus, der durch aktivierende und hemmende Fc-Rezeptoren gesteuert wird (Clynes et al., 2000). Ein weiteres Beispiel für den klinischen Einsatz von Antikörpern gegen Krebserkrankungen ist die Therapie ausgewählter Mammakarzinome mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Tyrosinkinase-Rezeptor HER2/neu (Pegram et al., 1999). Dieser Wachstumsfaktor ist bei einem Viertel der Patientinnen mit Brustkrebs überexprimiert und mit einer schlechten Prognose verbunden. Durch die Bindung des Antikörpers an HER2/neu wird die Interaktion zwischen dem Rezeptor und seinem natürlichen Liganden blockiert und die Expression des Rezeptors verringert.

Die Wirksamkeit der Antikörperbehandlung kann mit bispezifischen Antikörpern verbessert werden, die zwei unterschiedliche Bindungsspezifitäten vereinen. Zum Beispiel verstärken bispezifische Antikörper die Effektoraktivität von Lymphozyten gegen Tumoren, indem sie mit dem einen Bindungsarm an T-Zell-aktivierende Moleküle und mit dem anderen Bindungsarm an spezifische Oberflächenmoleküle auf den Tumorzellen binden. Dadurch werden Immun- und Tumorzelle in einen engen räumlichen Kontakt gebracht, der eine wirksame Tumorbekämpfung ermöglichen soll. Löffler et al. (2000) induzierten mit einem Antikörper, der eine Bindungsspezifität gegen das CD3-Molekül auf T-Zellen und den B-Zell-Marker CD19 besitzt, eine starke zelluläre Zytotoxizität gegen CD19-exprimierende Lymphomzellen.

3.3 Verbesserung der T-Zell-Aktivierung

Die Immunogenität von Tumorzellen oder Tumorproteinen ist häufig zu schwach, um eine adaptive Immunantwort zu induzieren. Einige Verfahren der Krebstherapie konzentrieren sich deshalb darauf, die Immunogenität der Tumoren zu erhöhen, indem die Signale für die T-Zell-Aktivierung verstärkt werden.

Antigenpräsentierende Zellen können mit Tumorantigenen beladen werden, indem sie tumorabgeleitete Peptide internalisieren und gekoppelt an MHC-Moleküle präsentieren. Die Dichte der MHC-Peptid-Moleküle auf der Zelloberfläche und die Affinität des TCR sind die wichtigsten Parameter für eine wirksame Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC-Peptid-Komplex. MHC-Anker von Antigenen, die eine schwache Affinität für MHC-Moleküle besitzen, können so verändert werden, dass die Antigenbindung an den MHC verstärkt wird, ohne die Erkennung durch T-Zellen zu blockieren, die spezifisch für das Wildtyp-Epitop sind (Parkhurst et al., 1996). Das Epitop, dessen MHC-Anker mutiert wurde, induziert auf diese Weise eine verstärkte Immunantwort gegen das Wildtyp-Peptid. Außerdem kann die Affinität des TCR für den MHC-Peptid-Komplex verbessert werden. Zum Beispiel besitzen gp70-abgeleitete Peptide des CT26-Kolonkarzinoms der Maus eine schwache Anziehungskraft für den TCR. Wie Slansky et al. (2000) zeigten, stabilisiert der Austausch einer einzelnen Aminosäure im gp70-Epitop den TCR-MHC-Peptid-Komplex und verbessert die T-Zell-Antwort gegen das Wildtyp-Peptid.

Indem Peptide unmittelbar in den MHC-Antigenprozessierungsweg eingeschleust werden, kann die Dichte des MHC-Peptid-Komplexes auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen verstärkt werden. Hitzeschockproteine (HSP) binden an Rezeptoren auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, so dass das Begleitpeptid in den Antigenprozessierungsweg eingeht und durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert wird. So

wurde beispielsweise durch die Vakzinierung mit einem Antigen-HSP70-Fusionsprotein eine potente antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Antwort induziert (Castellino et al., 2000).

Ein weiterer Ansatz zur Optimierung der Immunogenität von Vakzinen besteht darin, Tumorzellen mit Genen zu transformieren, die kostimulierende Moleküle kodieren. Die Transfektion von Tumorzellen mit B7-Molekülen erlaubt Immunisierungszellen, direkt als antigenpräsentierende Zellen zu fungieren. Wie Townsend und Allison (1993) zeigten, führte die Immunisierung von Mäusen mit B7-transfizierten Melanomzellen zur direkten Kostimulation von CD8⁺-T-Zellen und zur Tumorabstoßung. Allerdings scheint die direkte Antigenpräsentation durch Tumorzellen für die Induktion der Immunantwort nur eine untergeordnete Rolle zu spielen im Vergleich zur indirekten Präsentation durch APC (Huang et al., 1996).

3.4 Blockierung immunologischer Kontrollpunkte

Ein Ansatz, die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen zu verbessern, beruht darauf, negative Kontrollsignale zu blockieren, die die Induktion einer T-Zell-Antwort hemmen. Das zytotoxische T-Lymphozytenantigen 4 (CTLA-4) greift zum Beispiel negativ regulierend in die T-Zell-Aktivierung ein. Nach der TCR-abhängigen T-Zell-Aktivierung wird dieser inhibierende B7-Rezeptor exprimiert. CTLA-4 besitzt eine höhere Affinität für CD80- oder CD86-Moleküle als CD28 und sendet hemmende Signale an die T-Zelle, die dem stimulierenden CD28-Signal entgegenwirken (Pardoll, 2002). Die kombinierte Gabe von GM-CSF-transfizierten Tumorzellen mit einem blockierenden Antikörper gegen CTLA-4 verbesserte die Wirksamkeit der Vakzine *in vivo* und führte zur Abstoßung etablierter Tumoren (van Elsas et al., 1999; Hurwitz et al., 1998). Zwar hatte die Blockierung des CTLA-4-Proteins eine Autoimmunreaktion zur Folge; diese blieb aber auf das Gewebe beschränkt, gegen das die Tumor-Vakzine gerichtet war. So entwickelten Mäuse nach Behandlung mit einer B16-Melanom-GM-CSF-Vakzine und dem CTLA-4-Antikörper eine Vitiligo, jedoch keine generalisierte Autoimmunantwort.

3.5 Dendritische Zellen in der Immuntherapie

Einer der erfolgversprechensten Ansätze in der aktiven Immuntherapie zielt darauf, die Funktionen antigenpräsentierender Zellen zu verstärken oder zu modulieren. Im Vergleich zu Makrophagen oder B-Zellen sind dendritische Zellen die wirksamsten antigenpräsentierenden Zellen, da sie die Fähigkeit besitzen, antigenspezifische

zytotoxische T-Zellen zu aktivieren (Banchereau & Steinman, 1998). Die Immunogenität vieler Tumorantigene kann verstärkt werden, wenn tumorassoziierte Peptide von DC aufgenommen und präsentiert werden. Hierfür stehen mehrere Strategien zur Verfügung. Tumorzellen können mit Zytokinen transfiziert werden, um die Proliferation und die Reifung dendritischer Zellen zu induzieren. Außerdem kann die rezeptorvermittelte Aufnahme von Antigenen durch dendritische Zellen *in vivo* verbessert werden. Ferner können DC isoliert und *ex vivo* mit Tumorantigenen oder Tumorzellanteilen beladen werden, um nach *In-vivo*-Applikation tumorspezifische T-Effektorzellen zu stimulieren. Diese verschiedenen Ansätze sollen im Folgenden näher erklärt werden.

3.5.1 DC-Wachstumsfaktoren

Die Transfektion von Tumorzellen mit dem Zytokin GM-CSF stellt eine wirksame Immunisierungsstrategie gegen Krebserkrankungen dar. Der Wachstumsfaktor GM-CSF induziert die Differenzierung dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und lockt diese in den Bereich der applizierten Vakzine. Der Vergleich von Tumorzellvakzinen, die mit verschiedenen Zytokinen transfiziert wurden, ergab, dass die wirksamste systemische Antitumor-Antwort durch die Immunisierung mit GM-CSF-Gen-veränderten Tumorzellen erzielt wurde (Dranoff et al., 1993). Als Tumormodell diente das murine B16-Melanom. Auch gegen das A20-B-Zell-Lymphom der Maus konnte durch die Immunisierung mit Tumorzellen, die GM-CSF oder ein Idiotyp/GM-CSF-Fusionsprotein produzierten, eine Tumorummunität erzeugt werden (Strehl et al., 1999; Selmayr et al., 1999).

Die Kombination mit einem Reifungsstimulus für DC verbesserte den Effekt einer GM-CSF-Gen-transduzierten Vakzine zusätzlich. Die Transfektion von Tumorzellen mit dem Zytokin GM-CSF und CD40-Ligand steigerte die Anzahl reifer dendritischer Zellen und induzierte eine potente systemische Antitumor-Immunität (Chiodoni et al., 1999). Die Antitumor-Wirkung einer GM-CSF-Gen-transfizierten Tumorzellvakzine konnte auch für das Nierenzellkarzinom (Simons et al., 1997), das Melanom (Soiffer et al., 1998) und das Pankreaskarzinom (Jaffee et al., 2001) demonstriert werden.

3.5.2 Redirektion von Tumorantigenen gegen DC

Antigene können über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche dendritischer Zellen durch Endozytose aufgenommen und in den Antigenprozessierungsweg eingeschleust werden. Eine Grundlage immuntherapeutischer Ansätze ist deshalb, tumorassoziierte Antigene so zu modifizieren, dass sie an internalisierende Rezeptoren von dendritischen Zellen binden können.

Ein Beispiel für die Redirektion tumorassoziierter Antigene gegen DC ist die Vakzinierung mit Antigen/GM-CSF-Fusionsproteinen, die nicht nur die DC-Proliferation stimulieren, sondern auch Antigene über den GM-CSF-Rezeptor in das endosomale Kompartiment führen (Pardoll, 2002). Der Idiotyp maligner B-Zell-Lymphome ist ein Immunglobulin, das von allen Tumorzellen eines Klons produziert und exprimiert wird. Es stellt ein tumorspezifisches, aber schwach immunogenes Antigen dar. Im Mausmodell konnte durch Gabe eines Fusionsproteins, bestehend aus dem Lymphom-Idiotyp und dem GM-CSF-Protein, eine starke Immunantwort ausgelöst werden (Tao & Levy, 1993).

Einen weiteren Ansatz, Tumorantigene spezifisch an antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen, Makrophagen oder Granulozyten, heranzuführen, beschreibt das von Mocikat et al. (1997) entwickelte Triommodell. A20-Lymphomzellen der Maus wurden mit einem Ratte-Hybridom fusioniert, das einen Antikörper gegen den Fc γ -Rezeptor-II auf APC exprimiert. Die entstandene xenogenisierte Triomzelle enthält potenziell alle Antigene der parentalen Lymphomzelle und produziert ein Immunglobulin, das den APC-Bindungsarm darstellt. Die Bindung der Triomzelle an Fc γ -Rezeptor-tragende antigenpräsentierende Zellen leitet eine wirksame Internalisierung des Antigens ein. Nach Prozessierung werden tumorabgeleitete Peptide präsentiert und tumorspezifische T-Zellen aktiviert.

Die Immunisierung mit Triomzellen führte im Mausmodell zu einem 100%igen Tumorschutz und zu einer langdauernden systemischen Immunität (Mocikat et al., 1997). Sogar etablierte Tumoren konnten durch die Triomzellvakzinierung geheilt werden (Strehl et al., 1999).

Die Wirksamkeit des Triomzell-Ansatzes konnte auch im humanen Modell nachgewiesen werden. Es wurden Triome aus humanen Lymphomzellen generiert. Die Stimulation autologer Lymphozyten mit Triomzellen induzierte eine tumorspezifische T-Zell-Antwort (Wahl et al., 2003). Die langfristige Perspektive ist die Entwicklung einer adjuvanten Immuntherapie für Patienten mit malignem Non-Hodgkin-Lymphom. Die Triome enthalten jedoch neben dem humanen Lymphomanteil mit dem Ratte-Hybridom auch eine xenogene Struktur. Um die Injektion xenogener Zellen in der klinischen Situation umgehen zu können, sollte die Triomzell-Vakzinierung in der vorliegenden Arbeit zu einem *Ex-vivo*-Ansatz modifiziert werden.

3.5.3 Immunisierung mit antigenbeladenen DC

Auf Grund ihrer herausragenden Bedeutung für die Induktion einer Immunantwort sind dendritische Zellen ein attraktives zelluläres Adjuvans für Immunisierungsstrategien gegen Krebserkrankungen. Die Möglichkeit, dendritische Zellen *in vitro* aus hämatopoetischen Vorläuferzellen mit GM-CSF zu generieren (Inaba et al., 1992), bildet die Grundlage für

verschiedene Studien, in denen dendritische Zellen als Immunisierungszellen eingesetzt wurden.

Dendritische Zellen zählen zu den potentesten Stimulatoren naiver T-Zellen (Schuler & Steinman, 1997). Sie können *ex vivo* mit Antigenen in Form von intakten Proteinen (Paglia et al., 1996), MHC-Klasse-I-restringierten Peptidfragmenten (Porgador et al., 1995; Zitvogel et al., 1996) oder lysierten Tumorzellen (Fields et al., 1998) beladen werden. Die Injektion antigenbeladener DC führt *in vivo* zu einer Immunantwort gegen das präsentierte Antigen sowie zur Bildung einer Antitumor-Immunität. Rekombinante Viren können sehr effizient Tumorantigen-Sequenzen in dendritische Zellen einführen. DC induzierten zum Beispiel nach *Ex-vivo*-Infektion mit adenoviralen oder retroviralen Vektoren, die Tumorantigene kodieren, eine protektive Antitumor-Immunität (Song et al., 1997; Specht et al., 1997). Außerdem können dendritische Zellen mit Tumor-RNS transfiziert werden, um die verschlüsselten Antigene zu präsentieren (Boczkowski et al., 1996).

Die positiven Ergebnisse im Mausmodell bilden die Basis für erste klinische Studien mit dendritischen Zellen in aktiven Vakzinierungsstrategien gegen humane Tumorantigene (Timmerman & Levy, 1999). Da B-Zell-Lymphome mit dem Immunglobulin-Idiotyp ein tumorspezifisches Antigen besitzen, sind sie für die Forschung auf dem Gebiet der Tumorimmunologie besonders interessant. Eine klinische Pilotstudie über die Vakzinierung von B-Zell-Lymphom-Patienten mit idiotypbeladenen dendritischen Zellen erzielte erste erfolgversprechende Ergebnisse (Hsu et al., 1996).

4. Fragestellungen

Die Immunisierung mit Triomzellen zählt zu den wirksamsten Vakzinierungsstrategien gegen maligne B-Zell-Lymphome im Mausmodell (Mocikat et al., 1997). Der Ansatz basiert auf der Redirektion von Antigenen gegen Internalisierungsrezeptoren auf APC. In der vorliegenden Arbeit sollte die Triomzellvakzinierung in einen *Ex-vivo*-Ansatz überführt werden. Dendritische Zellen wurden *in vitro* mit Triomzellen oder triomzellproduzierten Immunglobulinen beladen und in tumorerkranke Mäuse appliziert. Es wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Können dendritische Zellen *ex vivo* tumorspezifische Antigene internalisieren und präsentieren, um *in vivo* eine protektive Immunantwort gegen das murine A20-Lymphom zu generieren?
- Werden Tumorantigene, die von Triomzellen angeboten werden, durch dendritische Zellen effizienter internalisiert als die parentalen Tumorzellen?

Strehl et al. (1999) demonstrierten, dass die triomzellvermittelte Tumorabstoßung und der GM-CSF-Gentransfer in Triomzellen synergistisch wirken. Jedoch konnte dies nur in Präimmunisierungsversuchen nachgewiesen werden. In Therapieversuchen blieben GM-CSF-Gen-transfizierte Triomzellen wirkungslos. In diesem Zusammenhang stellten sich folgende Fragen:

- Werden durch die gleichzeitige Bindung von GM-CSF und anti-Fc γ -Rezeptor-spezifischen Triomzellen an DC die Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen inhibiert?
- Wird durch den GM-CSF-Gen-Transfer die triomzellvermittelte Antigenaufnahme in dendritische Zellen blockiert?

Um den Antitumor-Effekt antigenbeladener dendritischer Zellen zu überprüfen, musste in einem Vorversuch geklärt werden, ob sich die Injektion unbeladener dendritischer Zellen auf das Tumorwachstum auswirkt. Hier zeigte sich, dass dendritische Zellen 100% der Mäuse vor einer A20-Tumorgabe schützten, auch wenn sie zuvor nicht mit Tumorantigenen beladen wurden. Dieses überraschende Ergebnis warf folgende Fragen auf:

- Welche Zellen vermitteln die Immunantwort, die durch die Immunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen ausgelöst wird?
- Ist die induzierte Immunität auf das A20-Lymphom beschränkt?
- Welcher immunologische Mechanismus schützt die Mäuse vor Tumorwachstum?

B MATERIAL UND METHODEN

1 Methoden der Zellkultur

1.1 Verwendete Zellen

Murine B-Zell-Lymphome:

A20 (IgG2a)	Kim et al., 1979 (ATTC TIB-208)
MPC11 (IgG2b)	Lascov & Scharff, 1970 (ATTC CCL-167)

Murines Kolonkarzinom:

CT26	Brattain et al., 1980
------	-----------------------

Triomzellen:

BiV	Hybridom aus dem murinen Lymphom A20 und dem Hybridom 2.4G2 (Ratte-anti-Maus-Fc γ -RII; Unkeless, 1979; ATTC HB-197), Mocikat et al., 1997
-----	---

GM-CSF-Gen-transfizierte Lymphomzellen:

A20-BNG-1B7	A20-Lymphom, transfiziert mit dem Vektor BCMGSNeo-GM-CSF (BNG); GM-CSF-Produktionsrate 121 ng/ml / 1×10^6 Zellen / 24h, Strehl et al., 1999
BiV-BNG-3A8	BiV-Triom, transfiziert mit dem Vektor BCMGSNeo-GM-CSF (BNG); GM-CSF-Produktionsrate 482 ng/ml / 1×10^6 Zellen / 24h, Strehl et al., 1999

1.2 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco, Eggenstein) bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre und 95%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Kulturmedium wurden 5% fetales Kälberserum (FKS), 2mM Glutamin, 2mM Pyruvat, 100U/ml Penicillin/ Streptomycin, 5ml MEM + nichtessentielle Aminosäuren und 50 μ M β -Mercaptoethanol (alle Gibco) zugegeben.

1.3 Kryokonservierung

Für die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff (N_2) bei minus $196^\circ C$ wurden die Zellen nach Expansion gezählt und abzentrifugiert. Jeweils 2×10^6 bis 5×10^6 Zellen wurden daraufhin in 1ml FKS mit 10%igem DMSO-Zusatz aufgenommen und auf Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) im Eisbett verteilt. In Styropor verpackt erfolgte eine langsame Abkühlung auf minus $80^\circ C$ im Gefrierschrank und am folgenden Tag eine dauerhafte Konservierung in flüssigem Stickstoff bei minus $196^\circ C$.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen rasch in einem $37^\circ C$ warmen Wasserbad erwärmt. Nach Erreichen der flüssigen Phase wurde toxisches Kryokonservierungsmedium langsam mit Kulturmedium ausgewaschen und die Zellen drei Tage in komplettem Medium mit 20%igem FKS-Anteil kultiviert.

1.4 Reklonierung von BiV-Zellen

Um den monoklonalen Charakter der Triomzellen sicherzustellen, wurden Verdünnungsreihen auf einer 96-Loch-Platte mit jeweils 5, 2, 1, 0,5 und 0,1 Zellen pro Loch in je $200 \mu l$ Kulturmedium mit 20%igem FKS-Anteil angefertigt. Wenn nach einer Kultivierung von 2 Wochen weniger als 30% der Kavitäten bewachsen waren, stammten die Zellen statistisch von je einem Klon ab.

Um die Produktion von bispezifischem Immunglobulin zu testen, wurde $100 \mu l$ Kulturüberstand entnommen und im ELISA analysiert. Die Bindung des bispezifischen Immunglobulins an $Fc\gamma$ -Rezeptoren und das Vorhandensein des A20-Idiotyps wurden im FACS untersucht. Der Kulturüberstand der Triomzellen wurde an $Fc\gamma$ -Receptor-II-tragende murine S49.1-Zellen (Thy-1⁻; ATTC TIB36; Hyman, 1973) gebunden und mit folgenden Antikörpern detektiert:

- Maus-anti-Ratte-IgG-FITC (1/300, Pharmingen, San Diego, USA)
- Ratte-anti-Maus-IgG2a-biotinyliert (1/100, Pharmingen, San Diego, USA)
- Ratte-anti-Maus-A20-Idiotyp(6C10)-biotinyliert (1/500, hergestellt von E. Kremmer, GSF-Institut für molekulare Immunologie, München)

1.5 Bildung dendritischer Zellen

Vorläuferzellen des Knochenmarks wurden aus BALB/c-Mäusen oder CD40-defizienten Mäusen isoliert. Hierfür erfolgte eine Präparation der Femurknochen unter sterilen

Bedingungen. Nach Ablösen der Epiphysen wurde mit einer Spritze das Knochenmark aus dem Markraum der Diaphysen herausgespült und eine Einzelzellsuspension durch mehrmaliges Aufziehen des Mediums hergestellt. Nach Erythrozytenlyse und zwei Waschschritten wurden die Knochenmarkzellen in Medium mit 10%igem FKS-Anteil aufgenommen. Unter Zugabe von 100ng/ml murinem Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) wurden aus den Vorläuferzellen nach 8-tägiger Kultivierung dendritische Zellen gebildet. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. In einigen Versuchen erfolgte an Tag 8 ein Reifungsschritt, indem für 16 Stunden 1µg Lipopolysaccharid (LPS) pro ml Kulturmedium hinzugefügt wurde. Wenn nicht anders angezeigt, wurden in Präimmunisierungsversuchen reife unbeladene DC verwendet.

Die dendritischen Zellen wurden im FACS analysiert (Anhang 1.1 und 1.2). Hierfür wurden folgende Antikörper eingesetzt:

1. Ratte-anti-Maus-CD80(B7.1)-FITC (1/50) (hergestellt von E. Kremmer, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München)
2. Ratte-anti-Maus-CD86(B7.2)-FITC (1/300) (hergestellt von E. Kremmer, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München)
3. Ratte-anti-Maus-CD40-FITC (1/50) (Pharmingen, San Diego, USA)
4. Ratte-anti-Maus-CD54(ICAM1)-FITC (1/100) (Pharmingen, San Diego, USA)
5. Hamster-anti-Maus-CD11c-FITC (1/100) (Pharmingen, San Diego, USA)
6. Ratte-anti-Maus-MHCI(HB11)-FITC (1/1000) (hergestellt von E. Kremmer, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München)
7. Ratte-anti-Maus-MHCII(HB3)-Cy5 (1/500) (hergestellt von E. Kremmer, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, München)

Es wurden keine phänotypischen Unterschiede festgestellt, wenn dendritische Zellen in Medium kultiviert wurden, das neben GM-CSF Interleukin 4 (IL-4) enthielt.

1.6 Antigenbeladung dendritischer Zellen

In Therapieversuchen wurde die tumorprotektive Wirkung dendritischer Zellen analysiert, die mit Tumorantigenen beladen wurden. Die Beladung dendritischer Zellen erfolgte jeweils nach 8 Tagen DC-Kultur. Unreife DC wurden für 24 Stunden mit dem entsprechenden Tumorantigen inkubiert. In einigen Versuchen wurden die DC nach der Antigeninternalisierung einem Reifungsschritt unterzogen, indem der Kultur 1µl/ml Lipopolysaccharid zugegeben wurde. Vor der Injektion in tumortragende Mäuse wurden

antigenbeladene DC intensiv gewaschen. In einigen Experimenten wurden DC außerdem immunmagnetisch gereinigt.

In den durchgeführten Versuchen wurden dendritische Zellen mit folgenden Antigenen beladen:

Beladung mit Proteinen

2×10^6 dendritische Zellen wurden in 3ml Medium aufgenommen und bei 37°C mit gereinigtem A20-Idiotyp oder bispezifischem Immunglobulin in einer Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$ bzw. $150\mu\text{g/ml}$ inkubiert. In einigen Experimenten wurden dendritische Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks mit einem Idiotyp/GM-CSF-Fusionsprotein gebildet. Die Zellen wurden 8 Tage mit 500ng/ml Fusionsprotein kultiviert. Für die Beladung mit lysierten Zellen wurden A20-Zellen bzw. Triomzellen in einem Frier-Tau-Verfahren zerstört. 2×10^5 DC wurden anschließend in 3ml Medium mit 2×10^6 lysierten A20- oder Triomzellen inkubiert.

Transfektion mit Tumor-RNS

Für die Transfektion mit A20-RNS wurde das Transfektionsreagenz Transfast (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. $15\mu\text{g}$ RNS wurden in $450\mu\text{l}$ vorgewärmtem OptiMEM-Medium gemischt und anschließend die 2-fache Konzentration an Lipid ($30\mu\text{g}$ Transfast) hinzugefügt. Das Reagenz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dendritische Zellen wurden in OptiMEM-Medium gewaschen, jeweils 1×10^6 Zellen in $0,5\text{ml}$ OptiMEM aufgenommen und in die Kavitäten einer 24-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Anschließend wurden $500\mu\text{l}$ RNA-Lösung dazugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die adhären DC durch mehrmaliges kräftiges Spülen abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen.

Beladung mit intakten Tumor- oder Triomzellen

DC wurden für 24 Stunden mit intakten Tumor- oder Triomzellen sowie mit GM-CSF-Gen-transfizierten Zellen in einem 1:1-Verhältnis kokultiviert, die zuvor mit 100Gy bzw. 20Gy bestrahlt worden waren. Der Internalisierungsphase folgte ein immunmagnetischer Separationsschritt (MACS) mit dem magnetpartikeltragenden monoklonalen Antikörper CD11c. Durch die positive Selektion wurden die antigenbeladenen DC von den übrigen Zellen getrennt. In der FACS-Analyse zeigte sich, dass CD11c^+ dendritische Zellen nach der Separation zu 95% angereichert wurden (Abb. 2).

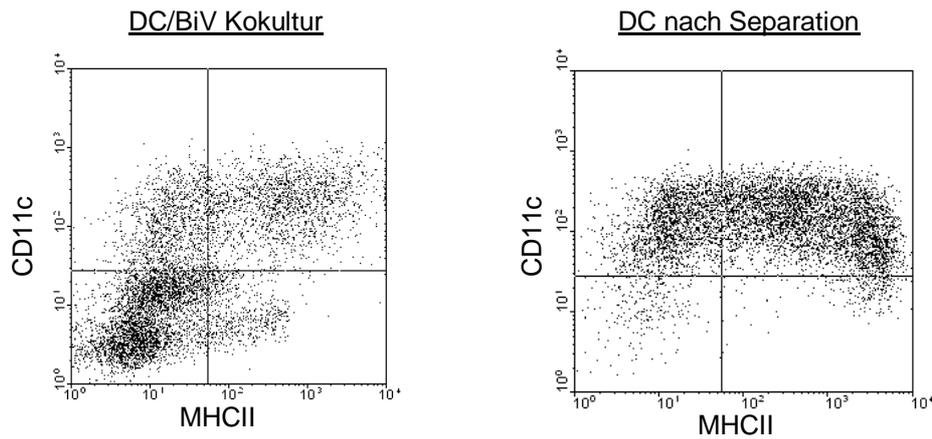


Abb. 2: Positive immunmagnetische Selektion CD11c⁺ DC

1.7 Gewinnung von NK-Zellen

NK-Zellen wurden aus der Milz von naiven oder DC-behandelten BALB/c-Mäusen gewonnen. Hierfür wurde nach Präparation der Milz und Entfernung von perisplenischem Fett das Gewebe in Kulturmedium eingelegt und mit einem Spritzenstempel durch ein Netz gedrückt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Nach Erthrozytenlyse und zwei Waschschritten wurden die Zellen gezählt und in PBS mit 2%igem FKS-Anteil aufgenommen. Die Anreicherung der NK-Zellen erfolgte durch immunmagnetische Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Es wurde eine positive Selektion mit dem magnetpartikeltragenden Ratte-anti-Maus-NK-Zell-Antikörper DX5 oder eine negative Selektion mit dem NK-Zell-Kit (beide Miltenyi Biotec) durchgeführt. Die gewonnenen NK-Zellen wurden in komplettem Medium mit 15%igem FKS-Anteil aufgenommen und als Effektorzellen gegen Tumorzellen im ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuch eingesetzt.

Die Reinheit der NK-Zell-Suspension wurde im FACS mit einem PE-markierten DX5-Antikörper und einem FITC-markierten CD3-Antikörper (beide Pharmingen) ermittelt. Wie Abb. 3 zeigt, wurden CD3⁻DX5⁺ NK-Zellen zu etwa 60% angereichert.

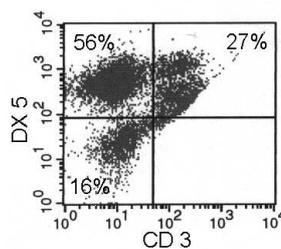


Abb. 3: Zellsuspension nach Positiv-Selektion mit dem Ratte-anti-Maus-AK DX5

2 Immunologische Methoden

2.1 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)

Maxisorp-Platten der Firma Nunc wurden mit 5µg Fänger-Antikörper (Ratte-anti-Maus-IgG2a; Pharmingen) pro ml Carbonatpuffer (pH 9,2) beschichtet und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Platten zwei Stunden lang mit PBS/10% FKS (Gibco) bei 23° C blockiert. Danach wurden die Platten für 30 Minuten mit dem jeweiligen Kulturüberstand, für 45 Minuten mit dem Detektionsantikörper (Maus-anti-Ratte-IgG2b, biotinyliert; TIB174, ATTC, Rockville, MD, USA) und für 30 Minuten mit Avidin-Peroxidase (1:1000 verdünnt in PBS/ 10% FKS, Gibco) inkubiert. Die dazwischen liegenden Waschschriffe erfolgten mit PBS/Tween20 (0,005%, Schuchardt, München).

Für die Farbreaktion wurde eine Tablette o-Phenylendiaminhydrochlorid (10mg, Sigma, Osterode) in 15ml Substratpuffer (Tris-Citrat, pH5) aufgelöst und nach Zugabe von 7µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂) je 100µl in die jeweiligen Löcher gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte im „Easy Reader SFplus“ (SLT Labinstruments, Altdorf).

2.2 Fluoreszenzaktivierte Zellzählung (FACS)

Fluoreszenzaktivierte Zellzählungen (FACS) wurden mit einem Gerät der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, durchgeführt. Pro Ansatz wurden je 5x10⁶ Zellen mit PBS gewaschen und in je 50 µl FACS-Puffer (PBS, 2% FKS, 0,1% Natriumazid) aufgenommen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem jeweiligen PE-, FITC-, Cy5- oder biotinylierten Antikörper. Im letzteren Fall schloss sich eine weitere halbstündige Inkubation mit Avidin-PE an. Für Doppelfärbungen erfolgte die Inkubation mit Cy5- und FITC-markiertem Antikörper gleichzeitig. Nach der Antikörperinkubation wurden die Zellen mit 1ml FACS-Puffer gewaschen. Abgestorbene Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumjodid (1/1000 verdünnt) markiert.

2.3 Tetramerfärbung

NKG2D-Multimere wurden freundlicherweise von Dirk H. Busch, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität, München, zur Verfügung

gestellt (Busch et al. 1998, Wolan et al. 2001). Tumorzellen wurden in einer 1/100-Verdünnung mit PE-markiertem NKG2D-Tetramer gefärbt und im FACS analysiert.

2.4 Immunmagnetische Zellseparation (MACS)

Um NK-Zellen aus der heterogenen Milzzellpopulation zu isolieren oder um dendritische Zellen nach Kokultur mit BiV-Zellen zu separieren, wurde eine immunmagnetische Zellseparation (MACS, mit einem Gerät der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) durchgeführt.

Die uneinheitliche Zellpopulation wurde mit PBS gewaschen, in Pufferlösung (PBS mit 0,5%igem FKS-Anteil) aufgenommen und mit dem magnetpartikeltragenden Antikörper 15 Minuten lang bei 6° C inkubiert.

Die folgenden Antikörper wurden in den durchgeführten Zellseparationen verwendet (alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach):

1. NK-Zellseparation:

Positive Selektion: Ratte-anti-Maus-NK-Zell(DX5)-MicroBeads-Antikörper

Inkubation von je 10^7 Zellen in 90 μ l Pufferlösung mit 10 μ l Antikörper

Negative Selektion: NK cell isolation kit

Inkubation von je 10^7 Zellen in 40 μ l Pufferlösung mit 10 μ l biotinyliertem Antikörper-Cocktail, nach 30 Minuten Zugabe von 30 μ l Pufferlösung und 20 μ l Anti-Biotin-MicroBeads-Antikörper

2. Separation dendritischer Zellen:

Hamster-anti-Maus-CD11c(N418)-MicroBeads-Antikörper

Inkubation von je 10^8 Zellen in 400 μ l Pufferlösung mit 100 μ l Antikörper

Nach zwei Waschschritten wurde die magnetpartikelmarkierte Zellsuspension in 3ml Pufferlösung aufgenommen und im MACS-Separator auf eine zuvor mit 3ml PBS äquilibrierte Selektionssäule (positive selection column type LS⁺, Miltenyi Biotec) gegeben, so dass magnetpartikelbindende Zellen im Magnetfeld haften blieben. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Zellen folgten drei Spülungsschritte mit je 3ml Pufferlösung. Daraufhin wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt; die positiven Zellen wurden mit 5ml Kulturmedium ausgewaschen. Die Homogenität der isolierten Zellpopulation wurde im FACS kontrolliert.

2.5 Isolierung von Ribonukleinsäure

Für die Extraktion von Ribonukleinsäure (RNS) wurden je 10^7 exponentiell wachsende A20-Lymphom-Zellen abzentrifugiert (ca. 170xg, 5 Minuten) und in je 1 ml TRIzol Reagent der Fa. Invitrogen, Karlsruhe, homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation und Zugabe von $20\mu\text{g}$ tRNA wurde das Homogenat in Eppendorf-Röhrchen überführt.

Daraufhin wurden $200\mu\text{l}$ Chloroform hinzugegeben. Nach 10minütiger Inkubation wurde die Suspension 15 Minuten lang zentrifugiert. Daraufhin zeigten sich Proteine in der unteren, roten organischen Phenol-Chloroformphase, DNS in der Interphase und RNS in der oberen, farblosen wässrigen Phase. Letztere wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.

Für die RNS-Präzipitation wurden der Suspension $300\mu\text{l}$ Isopropanol beigefügt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Ansatz für 12 Minuten zentrifugiert und die präzipitierte RNS mit $500\mu\text{l}$ 75%igem Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation (8 Minuten) wurde die isolierte RNS kurz getrocknet, in $50\mu\text{l}$ DEPC-Wasser aufgenommen und bei minus 20°C eingefroren.

Die jeweiligen Zentrifugationsschritte erfolgten bei 12000g und 4°C ; während der Inkubationsphasen wurden die Proben auf Eis gelagert.

Zur Quantifizierung der RNS wurde photometrisch die Extinktion bei 260nm und 280nm bestimmt (mit einem Gerät der Firma Beckman). Die Konzentration errechnete sich nach folgender Formel:

$$C_{\text{RNS}} = \text{Absorption}_{260\text{nm}} \times 50\mu\text{g/ml}$$

2.6 Zytotoxizitätsversuche

Für Zytotoxizitätsversuche wurden NK-Zellen aus naiven oder DC-immunisierten Mäusen gewonnen.

Nach der Milzentnahme wurden die NK-Zellen durch eine immunmagnetische Zellseparation isoliert und als Effektorzellen im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuch eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen in Kulturmedium mit 15%igem FKS-Anteil aufgenommen und Verdünnungsreihen auf einer 96-V-Loch-Platte angefertigt mit jeweils 2×10^5 , 10^5 , 5×10^4 , 25×10^3 , 12×10^3 und 6×10^3 Zellen pro Loch.

Als Zielzellen wurden 2×10^6 YAC-1-, A20-, MPC11- oder CT26-Zellen mit PBS gewaschen und in $100\mu\text{l}$ FKS resuspendiert. Im Isotopenlabor wurden die Zielzellen 60-90 Minuten bei 37°C mit radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ ($^{51}\text{CrO}_4$) der Firma NENDupont inkubiert.

Nachdem das hinzugefügte $^{51}\text{Chrom}$ in die Zielzellen aufgenommen war, wurde überschüssiges Chromat in drei Waschgängen mit Medium/15% FKS entfernt. Die Zielzellen wurden daraufhin in einer Konzentration von 2×10^3 Zellen pro Loch in die Kavitäten der vorbereiteten 96-V-Loch-Platte gegeben (Endvolumen $200 \mu\text{l}$ pro Loch) und mit den enthaltenen Effektorzellen gemischt.

Nach vierstündiger Kokultur bei 37°C wurden pro Loch $50 \mu\text{l}$ Kulturüberstand mit einer Mehrkanalpipette abgenommen und auf eine 96-Loch-Lumaplatte (LumaPlate TM-96 der Firma Packard Canberra, Dreieich) übertragen. Um den Anteil spontaner Chromfreisetzung zu ermitteln, wurde Kulturüberstand aus Kavitäten entnommen, die nur markierte Zielzellen enthielten. Zur Bestimmung der maximalen Chromfreisetzung wurden Zielzellen direkt auf die Lumaplatte aufgebracht.

Die beschichtete Lumaplatte wurde über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Messung der freigesetzten Radioaktivität.

Die spezifische Zytotoxizität wurde nach folgender Formel berechnet:

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

3 Durchführung der *In-vivo*-Versuche

Für alle Tierversuche lag die Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor. Es wurden ca. 10-12 Wochen alte weibliche BALB/c-Inzuchtmausstämme (Bomholtgård, Ry, Dänemark), männliche und weibliche CD40-defiziente Mäuse (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA) sowie SCID-Mäuse (gezüchtet im Institut für Molekulare Immunologie, München) verwendet. Je Versuchsgruppe wurden 4-6 Mäuse in einem Käfig zusammengefasst.

Vor der Injektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, gezählt und in $300 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen. Tumorzellen wurden intravenös, dendritische Zellen subkutan appliziert. Antikörper wurden in einem Volumen von $300 \mu\text{l}$ intraperitoneal verabreicht.

3.1 Präimmunisierungsversuche

Gruppen von sechs Mäusen wurden in einem einwöchigen Intervall subkutan jeweils 5×10^5 dendritische Zellen verabreicht. Nach weiteren sieben Tagen erfolgte die intravenöse

Injektion von Tumorzellen (Abb. 4). Die Zahl der applizierten Zellen schwankte hierbei je nach verwendeter Tumorzelllinie zwischen 8×10^5 Zellen (A20-Lymphom) und 1×10^5 Zellen (MPC11-Lymphom und CT26-Kolonkarzinom). In Langzeitversuchen wurden 8×10^5 A20-Zellen 70, 75 oder 150 Tage nach der letzten DC-Vakzinierung appliziert. Die Mäuse wurden getötet und obduziert, wenn eindeutige Zeichen von Tumorwachstum erkennbar waren.

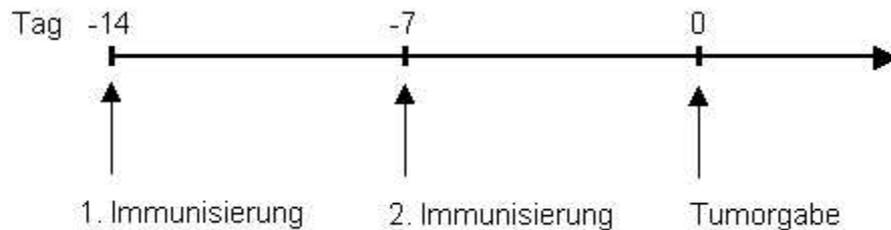


Abb. 4: Applikationsschema bei Präimmunisierungsversuchen

In einigen Experimenten wurden *In-vivo*-Depletionsversuche durchgeführt. Die Antikörper wurden nach folgenden Protokollen eingesetzt:

NK-Zell-Depletion

Für die Depletion von NK-Zellen wurde der monoklonale IL-2-Rezeptor- β -Ketten-spezifische Antikörper Tm β 1 (Mocikat et al., 2003) injiziert. Während der Effektorphase wurde 1mg Tm β 1 4 Tage vor sowie jeweils 0,1mg 2 und 14 Tage nach der Tumorgabe verabreicht. Zur NK-Zell-Depletion während der Immunisierungsphase erfolgte die Tm β 1-Gabe 3 Tage vor (1mg) sowie 2, 6 und 9 Tage (je 0,1mg) nach der ersten DC-Immunisierung. T-Zellen wurden durch den Tm β 1-Antikörper nicht eliminiert, da sie die IL-2-Rezeptor- β -Kette geringer exprimieren als NK-Zellen.

T-Zell-Depletion

T-Zellen, CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zell-Untergruppen wurden *in vivo* mit den monoklonalen Antikörpern MmT1, RmCD4-2 oder RmCD8-2 (alle hergestellt im Institut für Molekulare Immunologie, München) entfernt. Die Antikörpergabe erfolgte 4 Tage vor der ersten DC-Vakzinierung (0,5mg) und wurde jeweils einen Tag vor der Immunisierung sowie vor der Tumorgabe (0,1mg) wiederholt.

Neutralisierung von IFN- γ

IFN- γ wurde *in vivo* neutralisiert, indem der monoklonale Antikörper XMG-1.2 (0,5mg; Egeter et al., 2000) 24 und 4 Stunden vor der DC-Gabe injiziert wurde.

Neutralisierung von IL-12

Um *in vivo* IL-12 zu neutralisieren, wurde der monoklonale Antikörper C17.8 (0,3mg) 4 Stunden vor sowie 1, 3 und 7 Tage nach der DC-Vakzinierung verabreicht. (Der Zellklon C17.8 wurde freundlicherweise von K. Falk, Berlin zur Verfügung gestellt.)

Stimulation von NK-Zellen mit CPG-Oligonukleotiden

Um NK-Zellen in SCID-Mäusen zu stimulieren, wurden 10 nMol CPG-Oligonukleotide 1668 (MWG, München) einen Tag vor und nach DC-Immunisierung intraperitoneal injiziert.

Blockierung der NKG2D-Liganden

In einigen Experimenten wurden A20-Zellen oder DC appliziert, deren NKG2D-Liganden mit NKG2D-Tetramer blockiert wurden. Hierfür wurden die Zellen vor der Injektion mit NKG2D-Tetramer für eine Stunde inkubiert. Der maximale Sättigungsgrad der Moleküle wurde zuvor in der FACS-Analyse bei einer Verdünnung von 1:5 (DC) oder 1:100 (A20-Zellen) bestimmt.

3.2 Simultanversuche

Bei Simultanversuchen wurden 5×10^5 unbeladene dendritische Zellen und 8×10^5 Tumorzellen am selben Tag gespritzt. 8 Tage später erfolgte eine Auffrischung mit 5×10^5 dendritischen Zellen. Die Applikation dendritischer Zellen wurde subkutan, die Tumorgabe intravenös durchgeführt (Abb. 5).

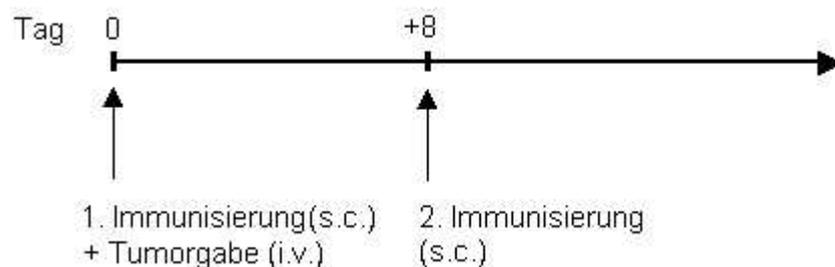


Abb. 5: Applikationsschema bei simultaner Gabe von Tumorzellen und dendritischen Zellen

3.3 Therapieversuche

In Therapieversuchen wurden die Mäuse mit unbeladenen oder mit tumorantigenbeladenen dendritischen Zellen immunisiert. Hierfür wurden den Mäusen jeweils 5×10^5 immunisierende Zellen 3 und 10 Tage nach intravenöser Tumorapplikation subkutan gespritzt (Abb. 6).

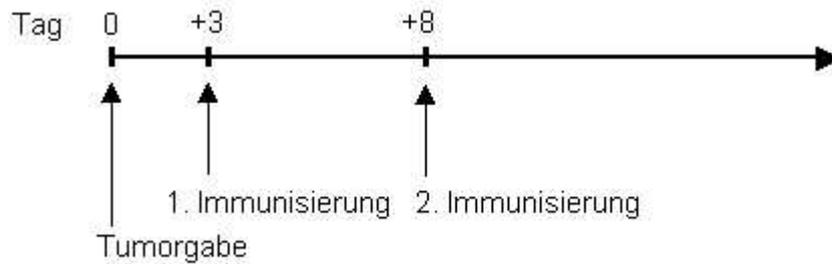


Abb. 6: Applikationsschema bei Therapieversuchen

3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Überlebenskurven wurde der Logranktest verwendet.

C ERGEBNISSE

1 Immunisierungsversuche mit unbeladenen DC

Beim Versuch, mit antigenbeladenen dendritischen Zellen eine Antitumor-Immunität zu induzieren, wurde beobachtet, dass auch die Immunisierung mit *unbeladenen* dendritischen Zellen 100% der Mäuse vor einer nachfolgend verabreichten letalen A20-Tumorgabe schützte. Dieses unerwartete Ergebnis ermöglichte es vorerst nicht, den spezifischen Effekt einer Behandlung mit antigenbeladenen dendritischen Zellen näher zu untersuchen. In ersten Versuchen wurde deshalb der Mechanismus der Antitumor-Immunität nach Immunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen näher analysiert.

1.1 NK-Zell-vermittelte Immunität gegen das A20-Lymphom nach Immunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen

Die Immunisierung mit autologen unbeladenen dendritischen Zellen schützte 100% der Mäuse vor einer letalen A20-Tumorgabe ($P < 0,0001$, Abb. 7). Verwendet wurden dendritische Zellen, die aus Vorläuferzellen des Knochenmarks mit GM-CSF gebildet wurden. Frisch entnommene Knochenmarkszellen generierten keinen Schutz vor Tumorwachstum; die Mäuse starben fast zeitgleich mit der Tumorkontrollgruppe (nicht gezeigt).

Die dendritischen Zellen waren vor der Applikation nicht mit Tumorantigenen in Kontakt gekommen. Dies legte die Hypothese nahe, dass durch die Vakzine keine antigenspezifische Immunität induziert wurde. Natürliche Killerzellen sind Effektorzellen des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Sie können nach Aktivierung durch dendritische Zellen sensitive Tumorzellen abtöten (Fernandez et al., 1999). Während für die Induktion einer adaptiven T-Zell-Antwort spezifische Antigene durch APC präsentiert werden müssen, ist die Reaktivität von NK-Zellen gegen Tumorzellen nicht antigenspezifisch. Ihr Einfluss auf die Tumorabstoßung wurde genauer untersucht. Hierfür wurden NK-Zellen während der Effektorphase mit dem Antikörper Tm β 1 entfernt. Wie Abb. 7 demonstriert, war der DC-induzierte primäre Tumorschutz vollständig von NK-Zellen abhängig; nach NK-Zell-Depletion war keine Maus vor letalem Tumorwachstum geschützt. Dies zeigt, dass durch die transferierten dendritischen Zellen NK-Zellen stimuliert wurden, die *in vivo* A20-Zellen abtöteten.

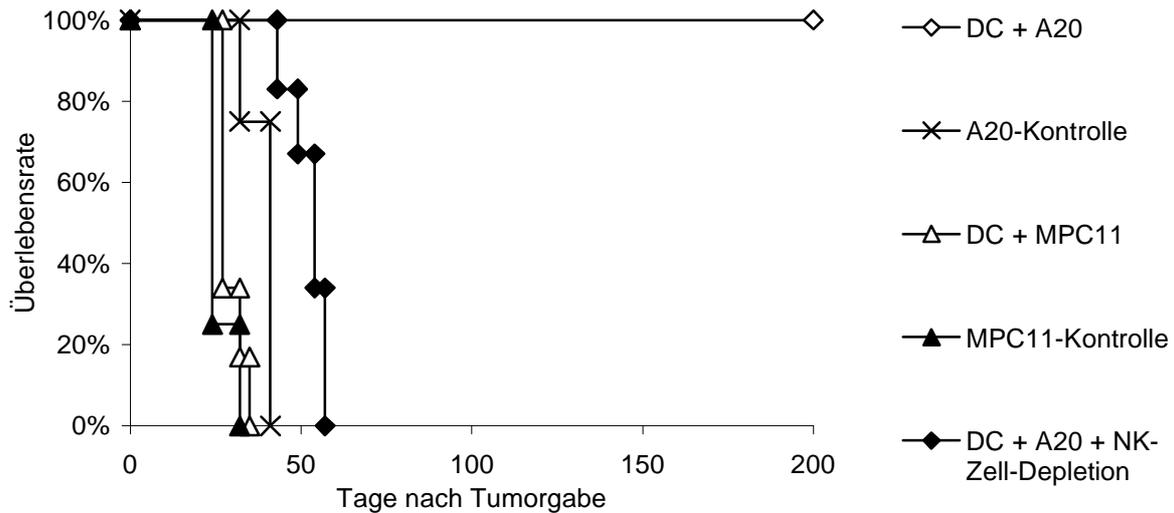


Abb. 7: Schutz vor A20-Lymphomzellen (nicht jedoch vor MPC11-Lymphomzellen) nach Immunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen

Den Mäusen wurden an den Tagen -14 und -7 jeweils 10^5 unbeladene dendritische Zellen subkutan verabreicht. Die Tumorgabe erfolgte intravenös am Tag 0 mit jeweils 8×10^5 A20- bzw. 10^5 MPC11-Zellen. NK-Zellen wurden durch die intraperitoneale Injektion von Tm β 1-Antikörper an den Tagen -4 (1mg), 2 und 12 (jeweils 0,1mg) depletiert.

Es stellte sich die Frage, ob der NK-Zell-abhängige Antitumor-Effekt nach Immunisierung mit unbeladenen DC auch in anderen Tumormodellen nachweisbar ist. Um dies herauszufinden, wurde die Wirkung der DC-Gabe gegen das syngene MPC11-Lymphom und das CT26-Kolonkarzinom untersucht. Während unbeladene dendritische Zellen einen vollständigen und nachhaltigen Schutz vor A20-Zellen erzeugten, wurde gegen MPC11-Zellen kein protektiver Effekt erzielt (Abb. 7). Gegen CT26-Kolonkarzinomzellen bildete die DC-Vakzine nur einen moderaten Schutz von 25% ($P=0,004$, nicht gezeigt). Folglich war der NK-Zell-abhängige Tumorschutz auf das A20-Lymphom begrenzt.

1.2 Zytotoxische Aktivität DC-aktivierter NK-Zellen gegen A20-Zellen

Um die zentrale Bedeutung der NK-Zellen für die DC-vermittelte Antitumor-Immunität zu verifizieren, wurde die zytolytische Aktivität der NK-Zellen gegen die Tumorzellen *in vitro* überprüft. Hierfür wurden aus der Milz von naiven bzw. DC-immunisierten Mäusen mit einer immunmagnetischen Zelltrennung NK-Zellen isoliert und auf ihre Zytotoxizität gegen Tumorzellen im ^{51}Cr -Freisetzungsversuch untersucht. *In vitro* zeigten NK-Zellen aus DC-immunisierten Mäusen eine potente zytotoxische Wirkung gegen A20-Zellen und NK-Zell-sensitive YAC-1-Zellen. Dagegen wiesen NK-Zellen aus naiven Mäusen eine stark

verminderte Zytotoxizität auf (Abb. 8a). Dies beweist, dass *in vivo* nach Applikation unbeladener DC tumorzellschädigende NK-Zell-Funktionen aktiviert wurden.

Im ^{51}Cr -Freisetzungsversuch zeigte sich außerdem, dass aktivierte NK-Zellen weder MPC11- noch CT26-Zellen lysierten (Abb. 8a und nicht gezeigt). Diese Ergebnisse korrelieren exakt mit den *In-vivo*-Versuchen. Offensichtlich handelt es sich nur bei A20-Zellen um NK-sensitive Zielzellen. Deshalb können unbehandelte DC *in vivo* nur gegen das A20-Lymphom, nicht aber gegen MPC11- und CT26-Zellen einen effektiven Tumorschutz generieren.

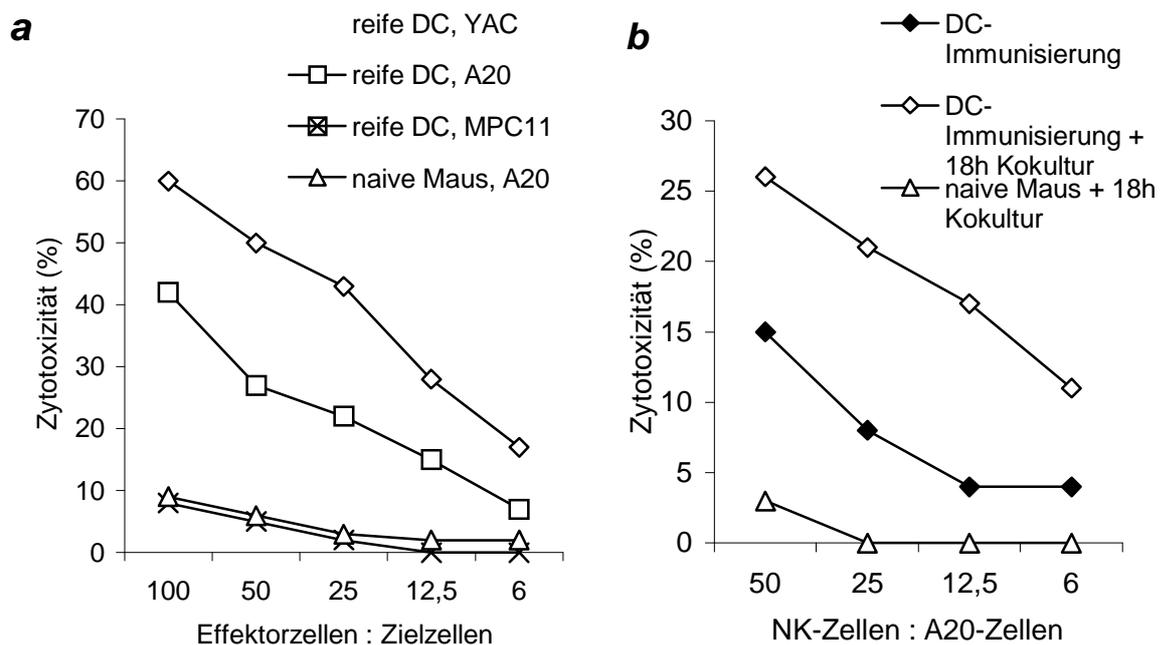


Abb. 8: NK-Zellen aus immunisierten Mäusen mit zytolytischer Aktivität *in vitro*

(a) Nach Gabe von 5×10^5 reifen DC an den Tagen -14 und -7 erfolgte am Tag 0 die Milzentnahme. NK-Zellen wurden durch Magnetseparation isoliert und auf ihre zytolytische Aktivität gegen A20-, YAC-1 bzw. MPC11-Zellen im ^{51}Cr -Freisetzungsversuch getestet. Zur Kontrolle wurden NK-Zellen aus unbehandelten Mäusen isoliert. (b) Zytotoxizität von NK-Zellen gegen A20-Zellen. NK-Zellen wurden aus Mäusen, die mit unreifen DC immunisiert wurden, oder aus naiven Mäusen isoliert. In zwei Gruppen wurden die entnommenen NK-Zellen 18h mit unreifen DC in einem 1:1-Verhältnis kokultiviert.

Der Antitumor-Effekt wurde gegenüber *in vivo* aktivierten NK-Zellen verbessert, wenn diese zusätzlich *in vitro* mit dendritischen Zellen stimuliert wurden (Abb. 8b). Dies warf die Frage auf, ob dendritische Zellen *in vitro* naive NK-Zellen direkt aktivieren können. Hierfür wurden NK-Zellen aus unbehandelten Mäusen isoliert und 18 bis 24 Stunden mit dendritischen Zellen kokultiviert. Wie Abb. 8b zeigt, wurden die NK-Zellen *in vitro* nur unzureichend stimuliert, so dass sie A20- oder YAC-1-Zellen nicht abtöten konnten. Es ist anzunehmen,

dass verschiedene Zytokine die NK-Zell-Aktivierung *in vivo* unterstützen, die *in vitro* nicht vorhanden sind. Die Hilfe von CD4⁺-T-Zellen wurde für die Aktivierung von NK-Zellen nicht benötigt, da NK-Zellen aus DC-immunisierten Mäusen *in vitro* die gleiche Zytotoxizität aufwiesen, wenn CD4⁺-Zellen *in vivo* depletiert wurden (nicht gezeigt).

1.3 Die Bedeutung der NKG2D/NKG2D-L-Interaktion für die Tumorabstoßung

Es blieb unklar, weshalb der NK-Zell-abhängige Tumorschutz *in vivo* wie *in vitro* auf das A20-Tumormodell beschränkt war. Die zytotoxischen Funktionen von NK-Zellen werden durch ein Gleichgewicht von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren gesteuert. Ein aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen ist NKG2D. Die Interaktion zwischen NKG2D und seinen Liganden kann die Zerstörung von Tumorzellen durch NK-Zellen auslösen. Um die unterschiedliche Abstoßung von A20-, MPC11- und CT26-Zellen nach Injektion unbeladener DC näher zu erklären, wurde die Expression der NKG2D-Liganden auf der Oberfläche der eingesetzten Tumorzellen mit einem NKG2D-Tetramer in der FACS-Analyse untersucht. Während die Liganden auf MPC11- und CT26-Zellen nur schwach ausgeprägt waren, wurden die Rezeptoren auf A20-Zellen in einer bis zu achtzehnmal höheren Dichte nachgewiesen (Abb. 9a).

Um die funktionelle Bedeutung dieses Befundes zu analysieren, wurden die NKG2D-Ligand-Oberflächenmoleküle der A20-Zellen mit dem NKG2D-Tetramer blockiert. Wie die FACS-Analyse ergab, waren bei einer 1:100-Verdünnung des Tetramers die NKG2D-Liganden auf den A20-Zellen gesättigt. Um eine mögliche direkte Aktivierung von T-Zellen auszuschließen, wurden in diesem Experiment reife dendritische Zellen aus CD40-defizienten Mäusen verwendet, die wie CD40-positive DC 100%igen Tumorschutz generierten (siehe unten). Wie Abb. 9b zeigt, waren die DC-behandelten Mäuse nicht mehr vor letalem A20-Wachstum geschützt, wenn die NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen mit dem NKG2D-Tetramer außer Funktion gesetzt wurden. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass NKG2D und seine Liganden ein Erkennungssystem darstellen, das aktivierten NK-Zellen ermöglicht, Tumorzellen abzutöten.

Die NK-Zell-Aktivierung durch DC hingegen scheint unabhängig von der Wechselwirkung zwischen NKG2D und seinen Liganden zu sein. Denn die Blockierung der NKG2D-Liganden auf dendritischen Zellen hatte keinen Effekt auf den DC-induzierten Tumorschutz *in vivo* (nicht gezeigt).

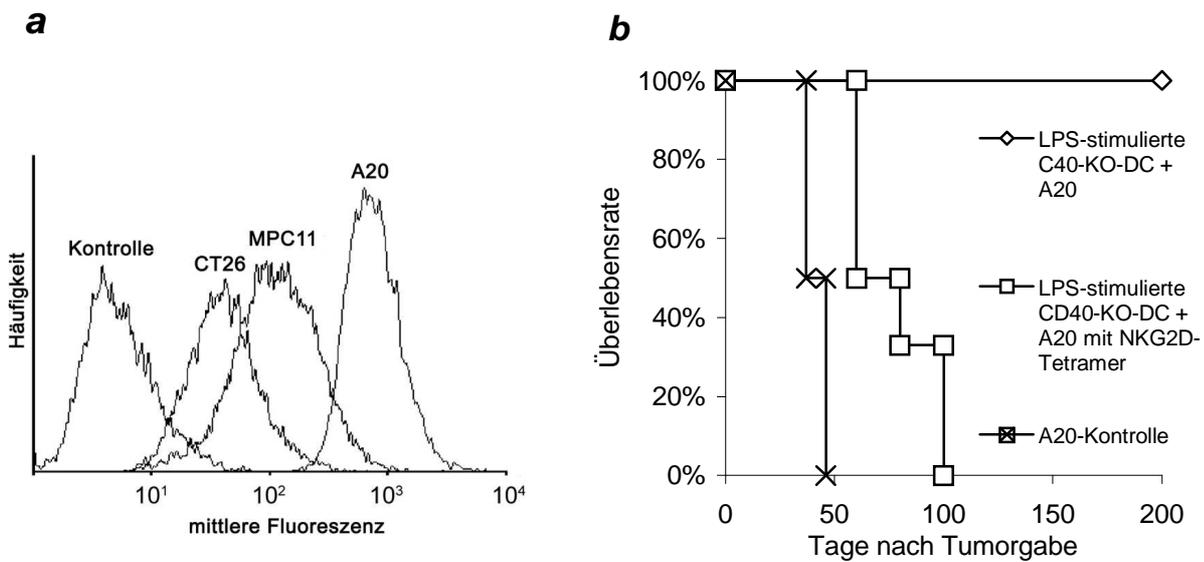


Abb. 9: Die Expression von NKG2D-Liganden auf Tumorzellen und deren Bedeutung für die A20-Tumorabstoßung *in-vivo*

(a) Die Expression der NKG2D-Liganden auf der Oberfläche von A20-, CT26- und MPC11-Zellen. Die Tumorzellen wurden mit PE-markiertem NKG2D-Tetramer gefärbt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PE-konjugiertem Streptavidin inkubiert. (b) Die Blockierung der NKG2D-Liganden auf A20-Zellen beseitigt den Schutz vor A20-Wachstum. Auf die zweifache Immunisierung (Tage -14 und -7) mit je 5×10^5 dendritischen Zellen aus $CD40^{-/-}$ -Mäusen folgte am Tag 0 die Tumorgabe mit 8×10^5 A20-Zellen. Die Tumorzellen wurden unmittelbar vor der Injektion eine Stunde lang mit dem NKG2D-Tetramer in einer Konzentration von 1:100 inkubiert.

Ein weiterer stimulierender Rezeptor auf NK-Zellen ist 2B4 (CD244). Die Bindung von 2B4 an seinen Liganden (CD48) kann die Zytokinproduktion und die Zytotoxizität der NK-Zellen aktivieren (Lanier, 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass CD48-exprimierende Zellen empfindlich für die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität sind (Tangye et al., 2000). Deshalb wurde die CD48-Expression auf den Tumorzellen untersucht. Der 2B4-Ligand wurde auf CT26-Zellen nicht nachgewiesen. Auf der Oberfläche von A20- und MPC11-Zellen wurde CD48 hingegen stark exprimiert (nicht gezeigt). Da jedoch MPC11-Zellen im Gegensatz zu A20-Zellen von NK-Zellen nicht abgetötet werden, ist anzunehmen, dass die CD48-Expression kein unabhängiges Signal für die Reaktivität der NK-Zellen gegen die Tumorzellen darstellt. Der zytotoxische Effekt DC-aktivierter NK-Zellen war auf das A20-Lymphom begrenzt, obwohl die Aktivierung der NK-Zellen durch unbeladene dendritische Zellen ein unspezifisches Ereignis darstellt. Die unterschiedliche Ausprägung der NKG2D-Liganden auf der Oberfläche der Tumorzellen kann diesen Befund erklären. Auf Grund der starken Expression der NKG2D-Liganden können aktivierte NK-Zellen A20-Tumorzellen *in vivo* erkennen und zerstören.

1.4 T-Zell-Gedächtnis nach DC-vermittelter NK-Zell-Aktivierung

Um zu überprüfen, ob das Immunsystem durch die DC-Gabe nur kurzzeitig stimuliert oder ob durch die Immunisierung ein lang anhaltender Schutz erzeugt wird, wurde den Mäusen 150 Tage nach der ersten Tumorgabe eine zweite letale Tumordosis verabreicht. Es überlebten auch nach dem wiederholten Immunitätstest 100% der Mäuse (nicht gezeigt). Das Gedächtnis war A20-spezifisch und konnte durch Depletion von NK-Zellen zum Zeitpunkt der zweiten Tumorgabe nicht aufgehoben werden (nicht gezeigt). Nach T-Zell-Depletion war hingegen kein Langzeitschutz mehr vorhanden (Adam et al., 2005). Daraus wurde die Folgerung gezogen, dass für die primäre Abstoßung der A20-Zellen die Zytotoxizität der NK-Zellen wichtig ist, während für die lang anhaltende Tumorphotektion ausschließlich eine T-Zell-Antwort verantwortlich ist.

Es wäre denkbar, dass über die NK-Zell-abhängige Tumorzelllyse Antigene freigesetzt werden, die von dendritischen Zellen prozessiert und den T-Zellen präsentiert werden. Deshalb war zu untersuchen, ob der Tumorschutz noch vorhanden ist, nachdem die primäre tumorzellschädigende NK-Zell-Antwort abgeklungen ist. Hierfür wurden A20-Zellen 80 bzw. 150 Tage nach der DC-Immunisierung appliziert, ohne dass in der frühen Phase Tumor gegeben wurde. Die Immunität war auch hier lang anhaltend, wie Abb. 10 belegt: Erfolgte die Tumorgabe am Tag 75 nach der DC-Impfung, überlebten 67% ($P=0,0018$), am Tag 150 50% der Mäuse ($P=0,0025$).

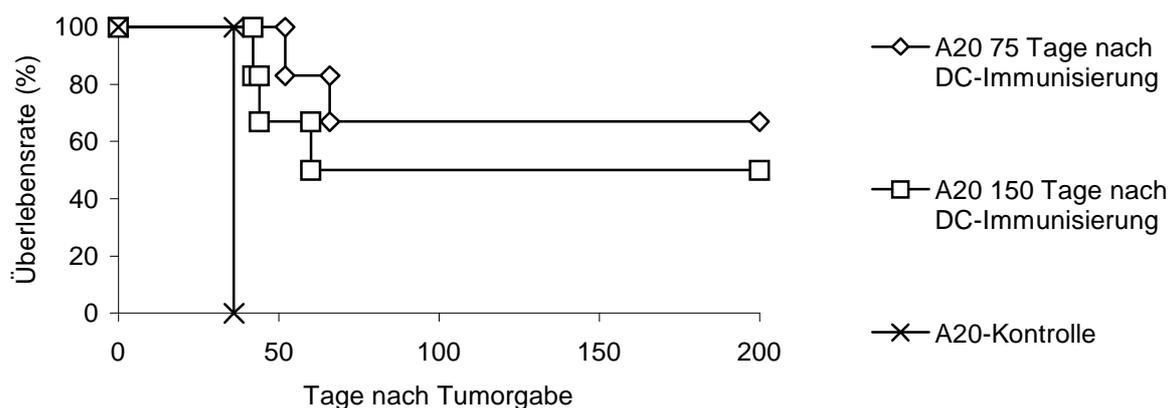


Abb. 10: T-Zell-Gedächtnis nach DC-Immunisierung

Auf die zweifache Präimmunisierung mit jeweils 5×10^5 dendritischen Zellen im Abstand von 8 Tagen folgte 75 Tage bzw. 150 Tage nach der ersten DC-Injektion die Tumorgabe mit 8×10^5 A20-Zellen.

Durch die Behandlung mit unbeladenen dendritischen Zellen wurde ein T-Zell-Gedächtnis gegen das A20-Lymphom gebildet, auch wenn keine Tumorzellen direkt nach der DC-

Immunisierung appliziert wurden. Dies deutete an, dass *in vitro* generierte dendritische Zellen Antigene präsentieren, die mit Oberflächenmolekülen auf A20-Zellen kreuzreagieren. Wenn gemeinsame Antigene existieren, so können dendritische Zellen diese über MHC-Klasse-I- und -II- Moleküle gegenüber CD8⁺- bzw. CD4⁺-T-Zellen präsentieren und durch die CD4⁺-T-Zell-Hilfe eine CTL-Antwort gegen das A20-Lymphom induzieren. Allein über diesen klassischen Weg der T-Zell-Aktivierung waren die Mäuse jedoch nicht vor Tumorstadium geschützt, da NK-Zellen, wie oben beschrieben, für die primäre Abstoßung des Tumors notwendig waren. Auch für das CTL-Gedächtnis war die DC-induzierte NK-Zell-Aktivierung von Bedeutung: Es konnte kein lang anhaltender Tumorschutz erzeugt werden, wenn NK-Zellen während der DC-Immunisierungsphase fehlten (nicht gezeigt). Ein potente antigenspezifische CTL-Antwort wurde nur dann induziert, wenn die Aktivierung über die DC/NK-Zell-Achse erfolgte. Der klassische Weg der T-Zell-Aktivierung scheint zu schwach zu sein, um eine dauerhafte Immunantwort zu induzieren. Daraus kann geschlossen werden, dass die gemeinsamen Antigene auf DC und A20-Zellen nur gering immunogen wirken.

1.5 CD4⁺-Zell-unabhängige CTL-Induktion durch aktivierte NK-Zellen

Das Antitumor-T-Zell-Gedächtnis wird in dem vorgestellten Tumormodell NK-Zell-abhängig gebildet. Dies führte zu der Hypothese, dass tumorspezifische T-Zellen über die DC/NK-Zell-Interaktion und nicht ausschließlich direkt durch die applizierten DC aktiviert werden. Die Bedeutung der zwei Wege für die Immunantwort wurde deshalb genauer untersucht.

Zuerst sollte überprüft werden, ob NK-Zellen allein einen ausreichenden Tumorschutz vermitteln, wenn sie stark genug aktiviert werden. Um eine T-Zell-vermittelte Immunität auszuschließen, wurden in diesem Versuch SCID-Mäuse behandelt, die keine funktionellen T-Zellen besitzen. Die NK-Zellen wurden zusätzlich stimuliert, indem während der DC-Immunisierungsphase CpG-Oligonukleotide verabreicht wurden. Das Überleben der Mäuse verlängerte sich moderat, aber statistisch signifikant ($p < 0,01$; Abb. 11), wenn die Mäuse mit reifen DC und CpG-Oligonukleotiden behandelt wurden. Durch die starke Aktivierung der NK-Zellen verbesserte sich zwar die Überlebensdauer der immundefizienten Mäuse, das letale Tumorstadium wurde aber nicht verhindert. Für den effizienten Tumorschutz scheinen deshalb außer den NK-Zellen auch CD8⁺-T-Zellen notwendig zu sein.

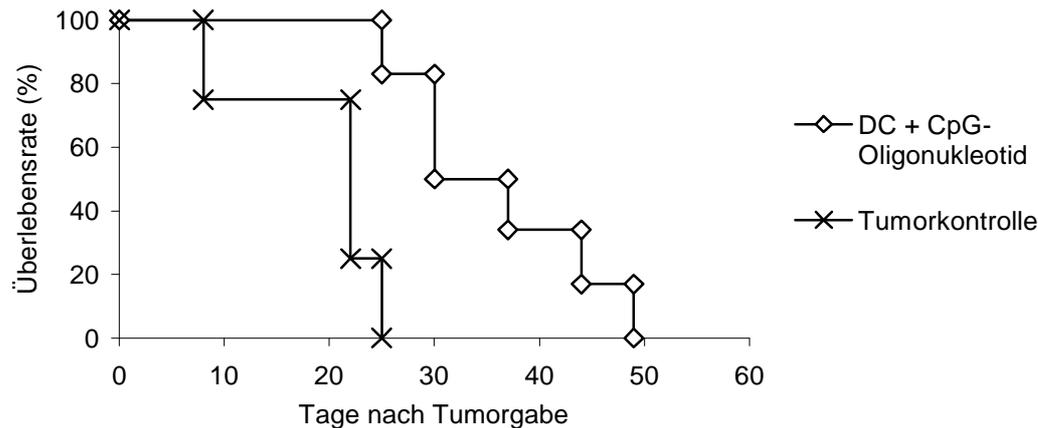


Abb. 11: Antitumor-Wirkung DC-aktivierter NK-Zellen in SCID-Mäusen

SCID-Mäusen wurden an den Tagen -14 und -7 jeweils 5×10^5 reife dendritische Zellen subkutan verabreicht. An den Tagen -15 , -13 , -8 und -6 wurden 10 nMol CpG-Oligonukleotide intraperitoneal injiziert. Am Tag 0 erfolgte die A20-Gabe mit 7×10^5 Zellen.

Um die spezifische Rolle der NK-Zell-Aktivierung bei der Induktion zytotoxischer CD8^+ -Zellen näher zu untersuchen, war es wichtig, einerseits immunkompetente Mäuse zu verwenden und andererseits eine direkte Interaktion zwischen den applizierten DC und den T-Zellen zu verhindern. Dies wurde erreicht, indem dendritische Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen CD40 -defizienter Mäuse gebildet wurden. Denn für die unmittelbare Stimulation zytotoxischer T-Effektorzellen ist die Bindung des CD40 -Liganden auf der CD4^+ -T-Zelle an CD40 auf der dendritischen Zelle erforderlich (Schoenberger et al., 1998). Nach Applikation LPS-stimulierter CD40 -defizienter DC waren 100% der Mäuse vor Tumorstadium geschützt ($P < 0,0001$, Abb. 12). Die an Tag 132 durchgeführte zweite Tumorgabe zeigte, dass bei allen Mäusen eine lang anhaltende, CD8^+ -T-Zell-abhängige Immunität generiert wurde, obwohl die $\text{CD40}^{-/-}$ -DC die T-Zellen nicht unmittelbar stimulieren können.

Indem CD40 -defiziente DC appliziert und während der Effektorphase T-Zellen depletiert wurden, konnte bestätigt werden, dass T-Zellen auch für den primären Tumorschutz eine Rolle spielen. Wie Abb. 12 belegt, überlebten 67% der Mäuse die primäre Tumorgabe nicht. In der Gruppe jedoch, die mit dem NK-Zell-depletierenden Antikörper behandelt wurde, starben alle Mäuse fast zeitgleich mit der Tumorkontrollgruppe.

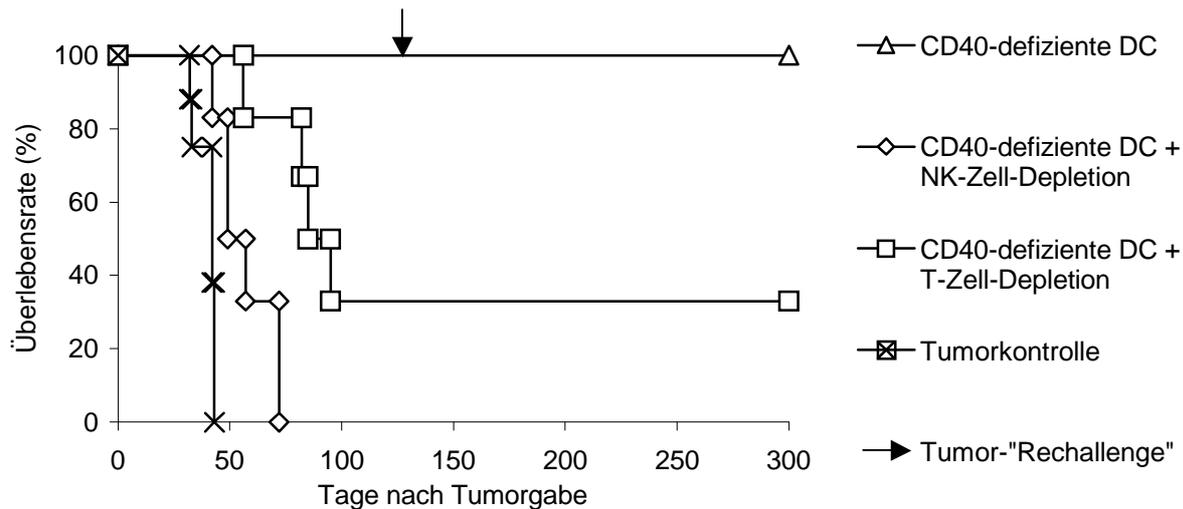


Abb. 12: Tumorschutz nach Immunisierung mit CD40-defizienten DC

Dendritische Zellen wurden aus dem Knochenmark CD40-defizienter-Mäuse gewonnen. Immunkompetenten BALB/c-Mäusen wurden an den Tagen -14 und -7 je 5×10^5 reife CD40^{-/-}-DC appliziert. Die Tumorgabe erfolgte am Tag 0, der Tumor-„Rechallenge“ (Pfeil) am Tag 132 mit jeweils 8×10^5 A20-Zellen. NK-Zellen wurden durch intraperitoneale Injektion von Tm β 1-Antikörper an den Tagen -4 (1mg), 2 und 12 (jeweils 0,1mg) depletiert. Für die T-Zell-Depletion wurde der Antikörper MmT1 an den Tagen -19 (0,5mg), -16, -6 und -1 (jeweils 0,1mg) intraperitoneal appliziert.

Sowohl die Immunisierungsversuche mit CD40-defizienten DC als auch die Experimente mit SCID-Mäusen verdeutlichen, dass für die effiziente primäre Tumorabstoßung zum einen der toxische Effekt aktivierter NK-Zellen, zum anderen bewaffnete CD8⁺-T-Zellen verantwortlich sind. Da durch die NK-Zell-Depletion die DC-induzierte Antitumor-Immunität vollständig aufgehoben wurde, beweisen die Ergebnisse die zentrale Rolle der NK-Zellen: Sie wirken direkt zytotoxisch gegen A20-Zellen und stimulieren die Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten. Die Experimente zeigen außerdem, dass die CTL-Aktivierung nicht auf die Hilfe von CD4⁺-Zellen angewiesen war, weil CD40^{-/-}-DC keine direkte Interaktion zwischen CD4⁺-T-Zellen und dendritischen Zellen zulassen.

Auch für die Bildung des T-Zell-abhängigen Antitumor-Gedächtnisses wurden keine CD4⁺-T-Zellen benötigt. Um dies zu prüfen, erfolgte die Tumorgabe 70 Tage nach der Immunisierung mit CD40^{-/-}-DC; die letale A20-Injektion überlebten alle Mäuse ($P < 0,0001$). Die Depletion von CD4⁺-Zellen hatte keinen Effekt auf den Tumorschutz. Hingegen bildeten die immunisierten Mäuse kein T-Zell-Gedächtnis, wenn während der Vakzinierungsphase NK-Zellen depletiert wurden (Abb. 13a).

Um direkt zu demonstrieren, dass der T-Helfer-Arm des Immunsystems durch aktivierte NK-Zellen ersetzt werden konnte, wurden immunkompetente BALB/c-DC injiziert und während der Immunisierungsphase CD4⁺-Zellen depletiert. Die Tumorgabe erfolgte 10 Wochen

später. Wie Abb. 13b veranschaulicht, waren alle behandelten Mäuse vor Tumorstadium geschützt ($P < 0,0001$).

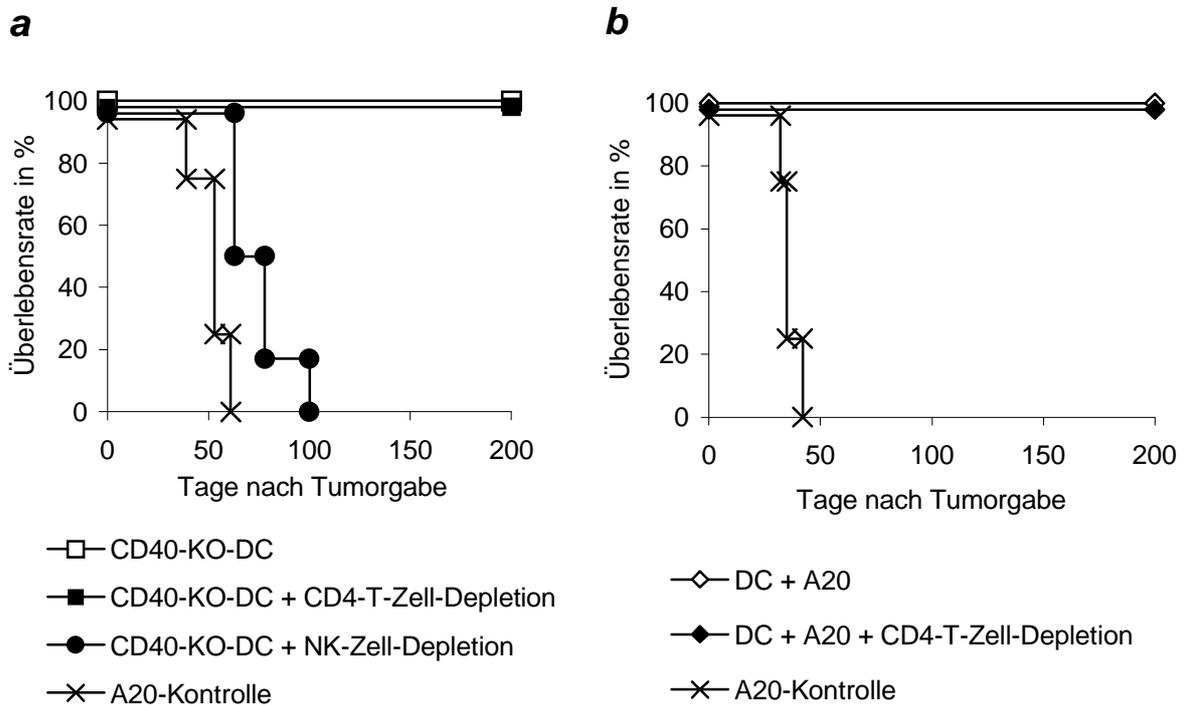


Abb. 13: Die Bildung eines T-Zell-Gedächtnisses ist unabhängig von CD4⁺-Helferzellen.

BALB/c-Mäuse wurden an den Tagen 0 und 7 mit dendritischen Zellen aus CD40^{-/-}-Mäusen (a) oder BALB/c-Mäusen (b) immunisiert. Die Tumorgabe erfolgte 10 Wochen nach der letzten Immunisierung. Zur Depletion von CD4⁺-T-Zellen wurde der Antikörper RmCD4 an den Tagen -6 (0,5mg), -1, 1 und 6 (jeweils 0,1mg) intraperitoneal injiziert. Die NK-Zell-Depletion erfolgte an den Tagen -4 (1mg), 2 und 12 (jeweils 0,1mg) durch intraperitoneale Injektion von Tmβ1-Antikörper.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Aktivierung der NK-Zellen nach Immunisierung mit unbeladenen DC eine CTL-Immunantwort gegen das murine A20-Lymphom gebildet wurde. Für die T-Zell-Stimulation wurde die Hilfestellung von CD4⁺-T-Zellen nicht benötigt. Die stimulierende Wechselwirkung zwischen dendritischen Zellen und NK-Zellen beschreibt einen neuen, alternativen Weg zur CTL-Induktion, der die CD4⁺-Zell-Hilfe umgeht.

1.6 Die Rolle von IFN-γ, IL-12 und endogenen DC bei der CTL-Induktion

Untersucht wurde nun der Mechanismus der CTL-Induktion. Mocikat et al. (2003) beschrieben eine Kaskade, die nach Vakzinierung mit MHC-Klasse-I-supprimierten A20-Zellen zu einer T-Zell-Immunität führt. Die veränderten Tumorzellen stimulieren NK-Zellen zur IFN-γ-Synthese. IFN-γ-produzierende NK-Zellen induzieren die IL-12-Expression in dendritischen Zellen, die daraufhin eine tumorprotektive T-Zell-Antwort bilden.

Eine analoge Kaskade könnte auch für die CTL-Induktion nach DC-vermittelter NK-Zell-Aktivierung verantwortlich sein. Die Bedeutung von IFN- γ und IL-12 für den Tumorschutz wurde deshalb *in vivo* analysiert. Um eine direkte T-Zell-Aktivierung über den klassischen Weg zu vermeiden, wurden auch in diesem Versuch reife CD40-defiziente dendritische Zellen appliziert. Durch die Neutralisierung der Zytokine mit spezifischen anti-IFN- γ - oder anti-IL-12-Antikörpern wurde die Tumorprotektion vollständig aufgehoben (Abb. 14, $P < 0,01$). Die Abhängigkeit von IFN- γ und IL-12 untermauert die Annahme, dass über die IFN- γ -Sekretion aktivierter NK-Zellen und über die IL-12-Produktion dendritischer Zellen, einschließlich endogener DC, eine protektive T-Zell-Immunität induziert wurde.

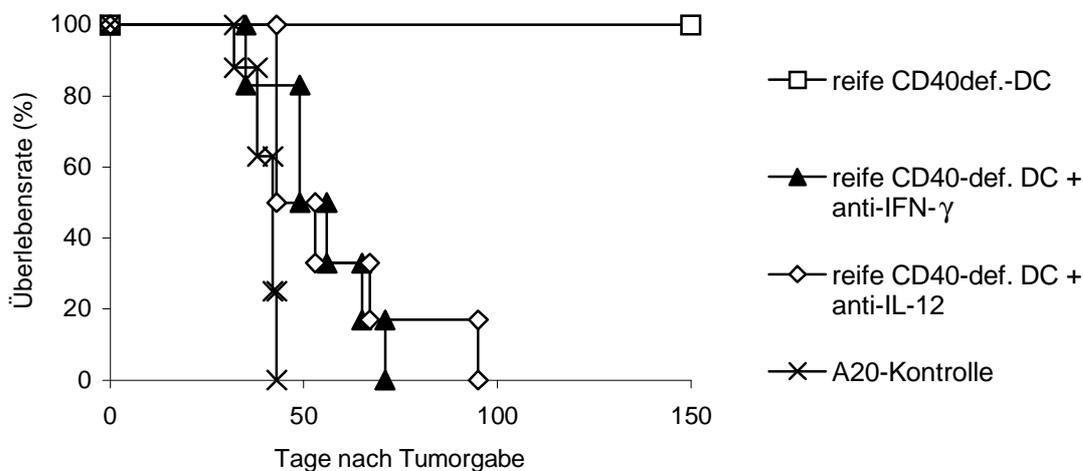


Abb. 14: Die Bedeutung von IFN- γ und IL-12 für den DC-induzierten Tumorschutz

Der Immunisierung mit 5×10^5 CD40-defizienten DC (Tag -14 und -7) folgte an Tag 0 die Tumorgabe (8×10^5 A20-Zellen). IFN- γ wurde an den Tagen -15, -14, -8 und -7 durch intraperitoneale Injektion von XMG-1.2-Antikörper neutralisiert. Zur Neutralisation von IL-12 wurden jeweils 0,3mg C17.8-anti-IL-12-Antikörper an den Tagen -14, -11, -7, -4 und 0 intraperitoneal appliziert.

Um die Bedeutung endogener dendritischer Zellen weiter zu erforschen, wurden CD40^{-/-}-DC in CD40-defiziente Mäuse injiziert. In diesem Tumormodell konnten weder exogene noch endogene DC eine CTL-Antwort hervorrufen. Nach Applikation CD40-defizienter DC wurde in der immuninkompetenten Maus kein tumorspezifisches T-Zell-Gedächtnis gebildet (nicht gezeigt). Folglich ist die Aktivierung endogener DC von entscheidender Bedeutung für die T-Zell-Induktion. Dies erklärt, warum CD40-defiziente DC in immunkompetenten Mäusen eine T-Zell-Antwort induzieren, obwohl die transferierten Zellen *per se* keine T-Zellen aktivieren können.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Mocikat et al. (2003) unterstützen die beschriebenen Experimente die Hypothese, dass DC-aktivierte NK-Zellen eine T-Zell-

Immunität hervorrufen, indem sie durch die IFN- γ -Produktion endogene dendritische Zellen stimulieren. Reife, IL12-sezernierende DC bilden daraufhin die tumorspezifische T-Zell-Immunität.

1.7 Der Unterschied zwischen reifen und unreifen DC bei der CTL-Induktion

Die zuvor beschriebenen Versuche wurden mit LPS-stimulierten, reifen dendritischen Zellen durchgeführt. Es stellte sich die Frage, ob das Differenzierungsstadium der dendritischen Zellen die NK-Zell-Stimulation beeinflusst. Reife DC exprimierten gegenüber unreifen DC deutlich mehr CD80-, CD86-, CD40- und MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche (Anhang). *In vivo* schützte die Vakzinierung sowohl mit unreifen als auch mit reifen dendritischen Zellen 100% der Mäuse vor Tumorwachstum (nicht gezeigt). *In vitro* hingegen wiesen NK-Zellen nach Injektion unreifer DC eine deutlich geringere Zytotoxizität gegen A20-Zellen auf als nach Gabe reifer dendritischer Zellen (Abb. 15a).

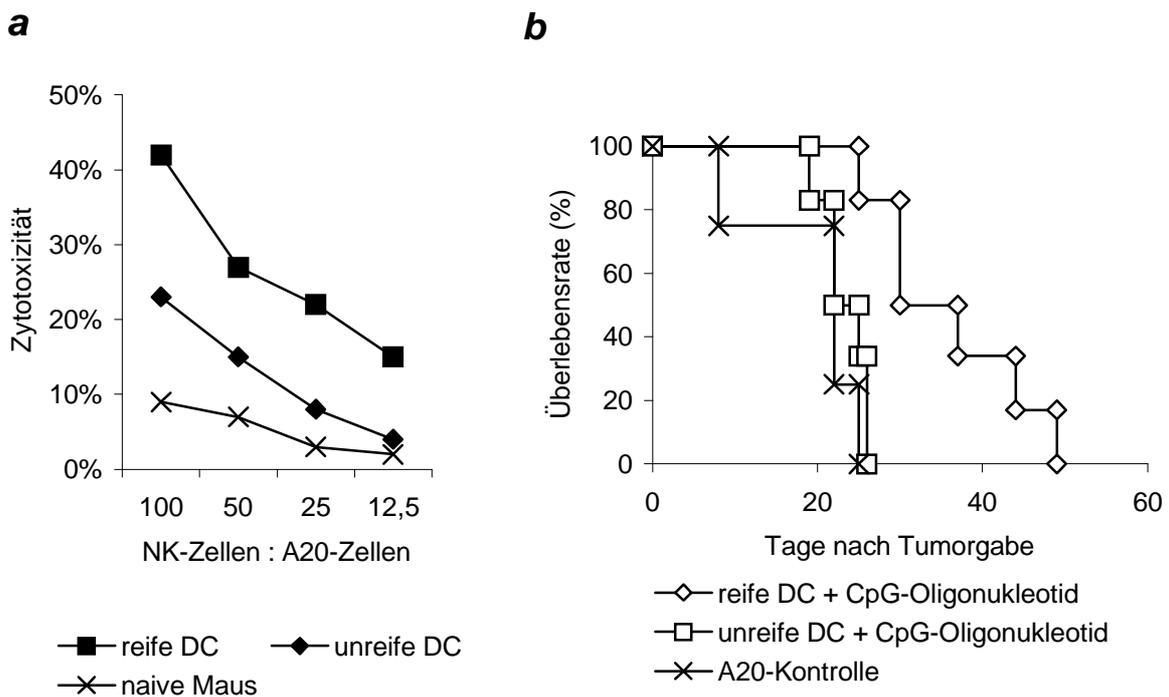


Abb. 15 Vergleich der NK-Zell-Aktivierung nach Gabe reifer und unreifer DC

(a) NK-Zell-Zytotoxizität gegen A20-Zellen: Nach Gabe von 5×10^5 reifen oder unreifen DC an den Tagen -14 und -7 erfolgte am Tag 0 die immunmagnetische NK-Zell-Isolierung. Die zytolytische Aktivität der NK-Zellen gegen A20-Zellen wurde im ^{51}Cr -Freisetzungsversuch getestet. Zur Kontrolle wurden NK-Zellen aus naiven Mäusen isoliert. (b) Antitumor-Effekt reifer versus unreifer DC in SCID-Mäusen: SCID-Mäusen wurden an den Tagen -14 und -7 5×10^5 reife bzw. unreife DC subkutan verabreicht. An den Tagen -15, -13, -8 und -6 wurden jeweils 10nMol CpG-Oligonukleotide intraperitoneal injiziert. Am Tag 0 erfolgte die A20-Gabe mit 8×10^5 Zellen.

Um die unzureichende NK-Zell-Aktivierung durch unreife DC *in vivo* zu prüfen, wurden SCID-Mäusen unreife DC zusammen mit stimulierenden CpG-ODN appliziert. Es zeigte sich kein verlängertes Überleben im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe. Reife DC verbesserten das Überleben der SCID-Mäuse zusammen mit CpG-ODN hingegen signifikant ($P < 0,01$, Abb. 15b). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass NK-Zellen durch Gabe unreifer DC nicht hinreichend aktiviert werden, um eine Antitumor-Wirkung zu entfalten. Die stimulierenden Signale unreifer DC scheinen zu schwach zu sein, um die zytotoxische Funktion der NK-Zellen wirksam zu stimulieren. Denn nach Immunisierung mit reifen DC erzielten die aktivierten NK-Zellen, sofern zusätzlich mit CpG-ODN stimuliert, auch ohne zytotoxische CD8⁺-Zellen ein verbessertes Überleben.

Durch die wechselseitige Interaktion zwischen reifen DC und NK-Zellen wurde eine Antitumor-CTL-Antwort generiert, die unabhängig von der Hilfe durch CD4⁺-T-Zellen war. Denn die Vakzinierung mit reifen CD40^{-/-}-DC schützte alle Mäuse unabhängig von NK- und CD8⁺-Zellen vor letalem Tumorwachstum, obwohl eine direkte T-Zell-Stimulation durch die CD40-defizienten DC unmöglich war (Abb. 12 und 16a). Unreife CD40^{-/-}-DC induzierten hingegen nur eine moderate Antitumor-Immunität (Abb. 16a). Dies weist darauf hin, dass unreife DC im Gegensatz zu reifen DC nur eine unzureichende CTL-Antwort induzieren.

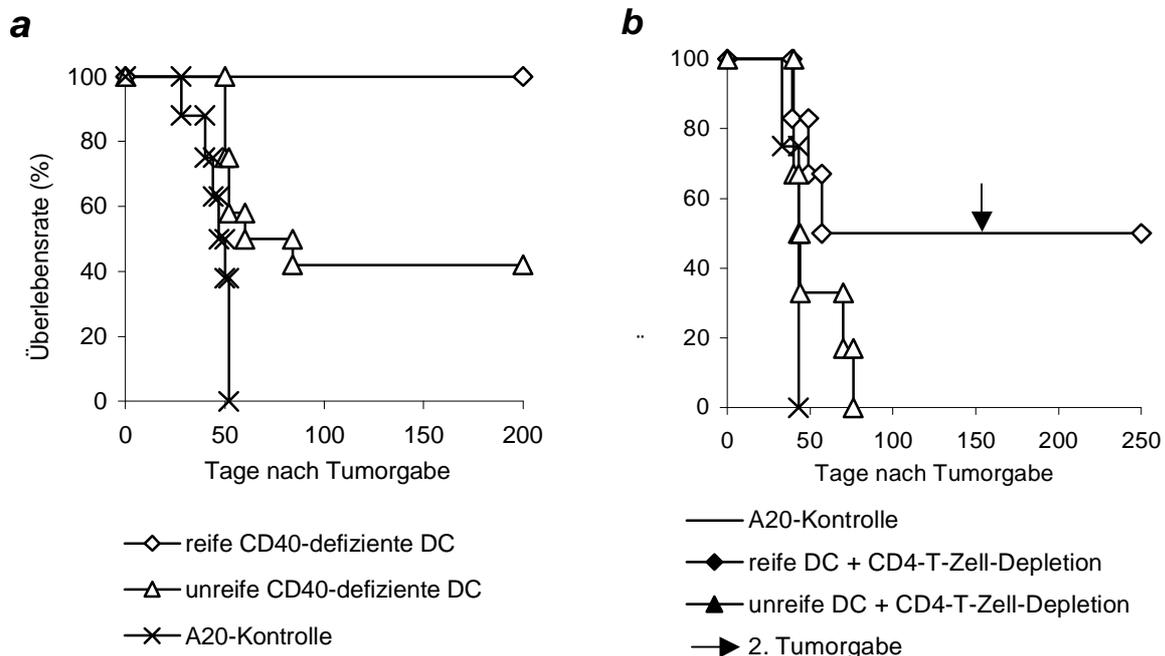


Abb. 16: Unreife DC benötigen CD4⁺-Zell-Hilfe für die primäre Tumorabstoßung

(a) BALB/c Mäusen wurden an den Tagen -14 und -7 5×10^5 reife oder unreife CD40^{-/-}-DC appliziert. (b) BALB/c Mäuse wurden unter CD4⁺-T-Zell-Depletion (RmCD4 Gabe i.p. an den Tagen -19 (0,5mg), -16, -6 und -1 (jeweils 0,1mg)) mit reifen bzw. unreifen DC an den Tagen -14 und -7 immunisiert. Die Tumorgabe erfolgte jeweils am Tag 0.

Es wurde vermutet, dass nur reife DC die Fähigkeit besitzen, über ihre starke NK-Zell-aktivierende Wirkung die CD4⁺-Hilfe für die Induktion einer T-Zell-Immunität zu umgehen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die primäre Tumorbilddung reifer und unreifer DC unter CD4⁺-T-Zell-Depletion verglichen (Abb. 16b). Reife dendritische Zellen zeigten auch in Abwesenheit von CD4⁺-Zellen einen Antitumor-Effekt: 50% der behandelten Mäuse überlebten die letale Tumorgabe (P=0,029) und bildeten ein lang anhaltendes T-Zell-Gedächtnis. Indessen sind unreife DC auf die Hilfe von CD4⁺-Zellen angewiesen, um T-Zellen zu aktivieren: Nach CD4⁺-Depletion starben alle Mäuse an dem applizierten Lymphom. Daraus folgt, dass unreife DC nicht die Fähigkeit besitzen, über die DC-NK-Zell-Achse zytotoxische T-Effektorzellen zu generieren. Die NK-Zell-Aktivierung durch unreife DC ist nicht stark genug, um die CD4⁺-Hilfe für die CTL-Induktion zu umgehen.

1.8 Therapieversuche mit unbeladenen dendritischen Zellen

In den bisher vorgestellten Versuchen wurde demonstriert, dass die Präimmunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen einen wirksamen Schutz vor A20-Tumorwachstum bewirken kann. Den höchsten Anspruch an ein Immunisierungssystem stellt jedoch die Therapiesituation. Es wurde deshalb untersucht, ob unbeladene dendritische Zellen auch im erkrankten Organismus letales Tumorwachstum verhindern können. Nach Gabe unbeladener DC starben jedoch alle tumor Erkrankten Mäuse (Abb. 17). Auch nach Simultanapplikation von Tumorzellen und unbeladenen DC wurde kein Schutz vor letalem Tumorwachstum erreicht. Die Immunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen ist nicht wirksam genug, um in einem labileren Versuchssystem wie der Therapiesituation tumorprotektiv zu wirken.

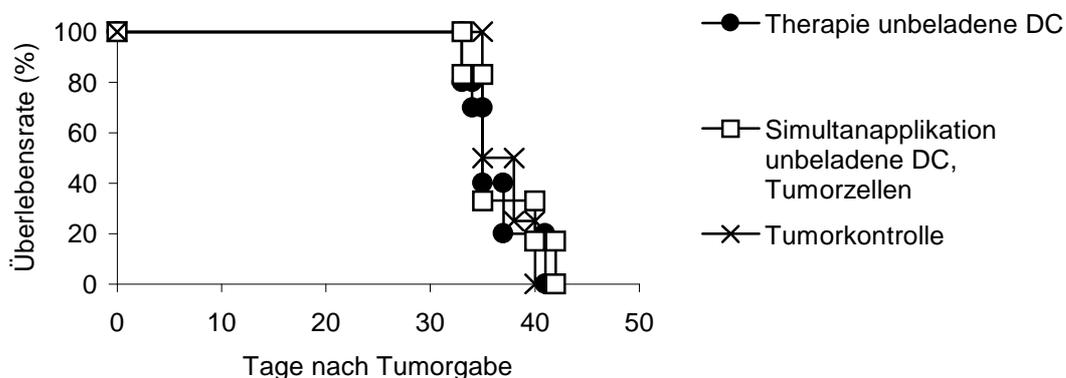


Abb. 17 Therapie etablierter A20-Lymphome mit unbeladenen dendritischen Zellen

Die Gabe 5×10^5 unbeladener DC erfolgte in der Therapiegruppe 4 und 10 Tage nach der i.v. Applikation von 7×10^5 A20-Zellen, in der anderen Gruppe am Tag der Tumorgabe und 7 Tage später.

2. Immunisierungsversuche mit antigenbeladenen DC

Nach den Experimenten mit unbeladenen DC wurden Immunisierungsversuche mit antigenbeladenen dendritischen Zellen durchgeführt. Als problematisch erwies sich dabei, dass der Effekt der Antigenbeladung im Präimmunisierungsmodell nicht untersucht werden konnte, weil unbeladene dendritische Zellen hier vor A20-Tumorwachstum optimal schützten. Deshalb musste auf ein labileres Versuchsmodell zurückgegriffen werden; die Therapie etablierter Tumoren erfüllt diese Forderung. Da unbeladene dendritische Zellen im erkrankten Organismus keinen Tumorschutz erzeugten, wurde dieser Ansatz gewählt, um die Wirkung antigenbeladener DC zu evaluieren.

2.1 Beladung mit Lymphomantigenen

2.1.1 Beladung mit dem A20-Idiotyp

Maligne B-Zell-Lymphome besitzen mit dem Immunglobulin-Idiotyp (Id) eine geeignete Zielstruktur für immuntherapeutische Ansätze. Es handelt sich dabei um ein absolut tumorspezifisches, jedoch schwach immunogenes Antigen. In einem ersten Versuch sollte die unzureichende Präsentation tumorabgeleiteter Peptide durch die maligne B-Zelle umgangen werden, indem dendritische Zellen *in vitro* mit dem A20-spezifischen Immunglobulin IgG2a beladen und in tumortragende Mäuse appliziert wurden.

Für die Internalisierung des Antigens wurden unreife dendritische Zellen 24 Stunden lang in Medium kultiviert, das 50 µg/ml gereinigten A20-Idiotyp enthielt. Durch die Immunisierung mit idiotypbeladenen DC wurde jedoch bei den behandelten Mäusen kein Überlebensvorteil erzielt: Alle Mäuse starben fast zeitgleich mit der Tumorkontrollgruppe (Abb. 18).

Die Aufnahme des Idiotyps durch die dendritische Zelle musste verbessert werden. Deshalb wurden die DC mit einem Fusionsprotein beladen, das den A20-Idiotyp und das Zytokin GM-CSF vereinte (Selmayr et al., 1999). *In vivo* war die Immunisierung mit dem Fusionsprotein deutlich effektiver als die Gabe einer äquivalenten Idiotyp-Dosis. Um den protektiven Effekt im *Ex-vivo*-Ansatz zu überprüfen, wurden Vorläuferzellen des Knochenmarks 8 Tage lang mit dem Id/GM-CSF-Fusionsprotein (5C12) stimuliert. Die Bildung dendritischer Zellen wurde in der FACS-Analyse nachgewiesen: Die mit dem Fusionsprotein generierten DC exprimierten CD80, CD86 und hohe Konzentrationen an MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen sowie große Mengen der ICAM-1-Adhäsionsmoleküle; nach Stimulation mit LPS wurden reife, CD40-exprimierende dendritische Zellen differenziert.

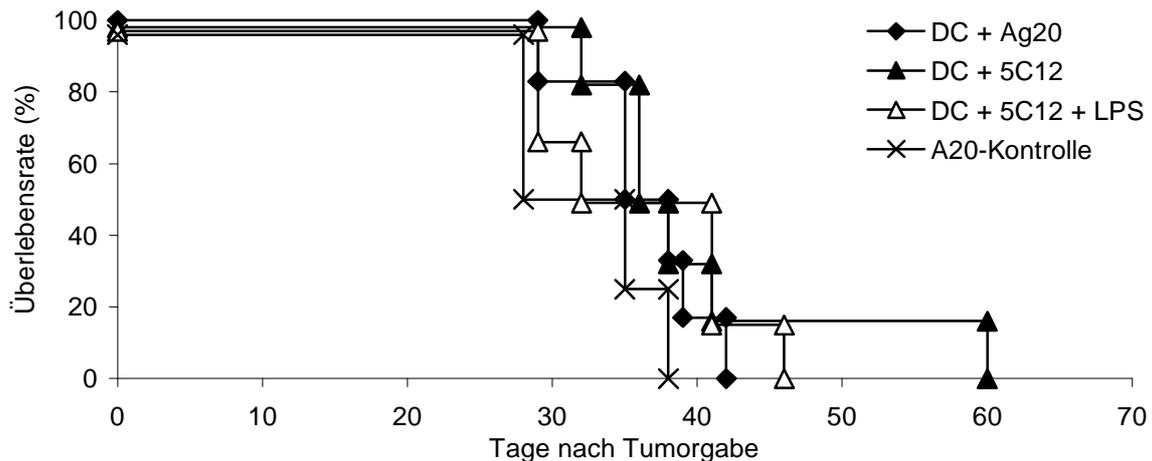


Abb. 18: Therapieversuche mit dendritischen Zellen, die mit A20-Idiotyp beladen wurden

Um DC nach 8tägiger Kultivierung in GM-CSF-haltigem Medium mit dem A20-Idiotyp zu beladen, wurden dem Kulturmedium für 24 Stunden 50µg/ml gereinigtes A20-Antigen (Ag20) hinzugefügt. In einer weiteren Gruppe wurden DC aus Vorläuferzellen des Knochenmarks durch Stimulation mit 500ng/ml Id/GM-CSF-Fusionsprotein (5C12) gebildet. 5×10^5 Immunisierungszellen wurden 4 und 10 Tage nach der intravenösen Gabe von 7×10^5 A20-Zellen subkutan appliziert.

Nach Präimmunisierung mit Id/GM-CSF-stimulierten dendritischen Zellen waren alle Mäuse vor einer letalen A20-Tumorgabe geschützt (nicht gezeigt). Da GM-CSF-generierte DC bereits 100%igen Schutz vermitteln, musste die tumorprotektive Wirkung in der Therapiesituation nachgewiesen werden. Nach der therapeutischen Gabe Id/GM-CSF-differenzierter DC konnte in zwei Versuchen bei keiner Maus letales Tumorwachstum verhindert werden (Abb. 18). Auch nach Reifung der Immunisierungszellen mit LPS wurde keine signifikante Verlängerung des Überlebens festgestellt.

2.1.2 Beladung mit A20-Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob die zusätzliche Immunisierung gegen weitere Antigene die Überlebensrate der Mäuse verbessern würde. Deshalb wurden die DC mit lysierten oder intakten A20-Zellen inkubiert, die alle tumorassoziierten Antigene beinhalten.

Zur Beladung mit lysierten A20-Zellen wurden die intakten Tumorzellen in einem Frier-Tau-Verfahren zerstört und mit unreifen DC in einem 1:1-Verhältnis für 24 Stunden kokultiviert. Wie in Abb. 19 dargestellt, ergab die Vakzinierung mit zelllysatzbeladenen DC keinen Überlebensvorteil im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe.

Daraufhin wurden die DC für 24 Stunden mit apoptotischen A20-Tumorzellen in einem 1:1-Verhältnis kokultiviert. Nach der Kokultivierung wurden die DC von den Lymphomzellen mit Hilfe einer immunmagnetischen Positivselektion getrennt, um den spezifischen Effekt antigenbeladener DC nicht durch die Injektion inaktiver Tumorzellen zu verfälschen. Die Immunisierung der Mäuse mit den antigenpräsentierenden Zellen führte zu den in Abb. 19 gezeigten Überlebensraten.

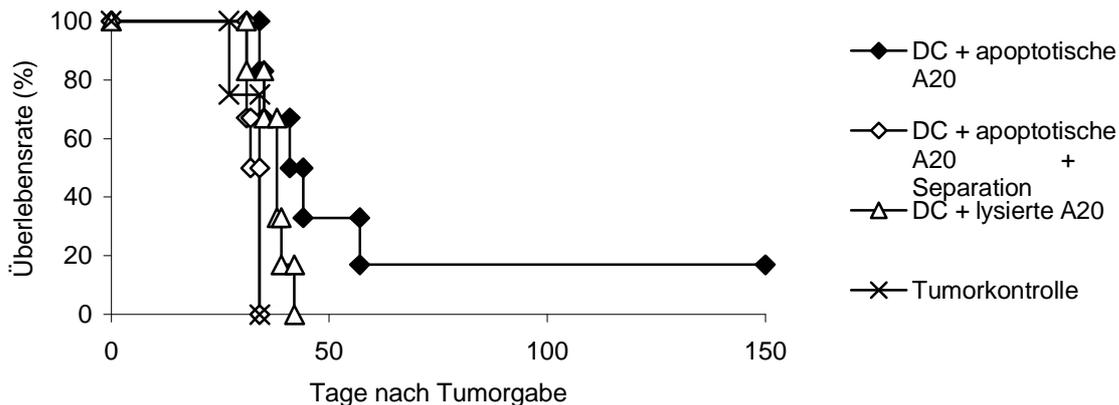


Abb. 19: Therapieversuche mit dendritischen Zellen, die mit lysierten oder apoptotischen A20-Zellen beladen wurden

DC wurden mit apoptotischen bzw. lysierten A20-Zellen für 24 Stunden kokultiviert. In einer Gruppe wurden die APC nach der Inkubationsphase mit einem magnetpartikeltragendem CD11c-Antikörper separiert. 4 und 10 Tage nach der intravenösen Tumorgabe wurden 5×10^5 DC subkutan verabreicht. Die DC/A20-Zellsuspension enthielt 5×10^5 DC und 5×10^5 apoptotische A20-Zellen.

Die Applikation dendritischer Zellen, die mit apoptotischen Tumorzellen beladen und separiert wurden, schützte keine Maus erkennbar vor Tumorwachstum. Ebenso wenig Erfolg hatte die Behandlung mit der ungetrennten DC/A20-Zellsuspension. Obwohl eine Maus überlebte, war dieser Schutz statistisch nicht signifikant ($P > 0,05$).

2.1.3 Beladung mit A20-RNS

Auch die Transfektion dendritischer Zellen mit Tumor-RNS bietet den Vorteil der Präsentation multipler tumorassoziierter Epitope durch die DC. Die protektive Wirkung Tumor-RNS-beladener DC wurde deshalb untersucht. Da intakte RNS beliebig amplifiziert werden kann, ist es möglich, große Mengen Antigene aus einer kleinen Tumormasse zu gewinnen.

Gesamt-Tumor-RNS wurde aus exponentiell wachsenden Lymphomzellen isoliert. Für den Transfer in DC wurden jeweils 10^6 unreife dendritische Zellen mit $15\mu\text{g}$ A20-RNS und dem Lipidtransfektionsreagenz *TransFast* 90 Minuten lang inkubiert. In einer Gruppe wurden die Zellen nach der Transfektionsphase zusätzlich einem Reifungsschritt unterzogen. Die durchgeführten Versuche sind in Abb. 20 dargestellt.

Auch in diesem Tumormodell änderte sich durch die DC-Vakzine die Überlebensdauer im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe nicht signifikant; lediglich eine Maus konnte durch die Injektion reifer RNS-transfizierter DC geheilt werden ($P>0,05$).

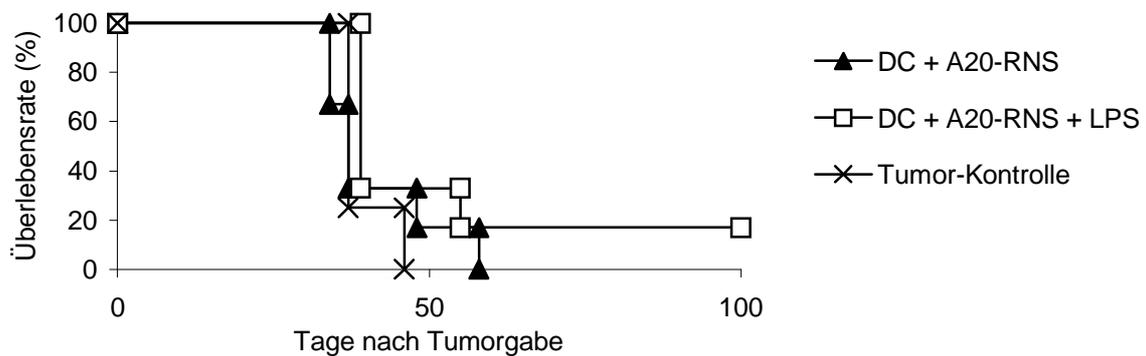


Abb. 20 Therapieversuche mit A20-RNS-transfizierten dendritischen Zellen

10^6 unreife DC wurden mit $15\mu\text{g}$ A20-RNS transfiziert. Am Tag 0 wurden 7×10^6 A20-Zellen appliziert. 4 und 10 Tage später folgte die Immunisierung mit 5×10^5 reifen bzw. unreifen antigenbeladenen DC.

2.2 Redirektion der A20-Antigene gegen Internalisierungsrezeptoren auf DC

2.2.1 Prinzip des Triomzellansatzes

Mit dem Triomzellansatz wurde ein neues Konzept der Vakzinierung gegen B-Zell-Lymphome etabliert, das auf der Redirektion von Tumorantigenen gegen antigenpräsentierende Zellen beruht. A20-Lymphomzellen wurden mit einem Ratte-Hybridom fusioniert, das einen Antikörper gegen Fc γ -Rezeptoren auf der Oberfläche dendritischer Zellen exprimiert. Die zelluläre Vakzine enthält neben dem APC-Bindungsarm alle potenziellen Antigene der parentalen Lymphomzelle und induziert eine polyvalente Immunantwort gegen multiple Tumorantigene. Es erscheint auch eine Immunantwort gegen den Lymphom-Idiotyp denkbar, der von der entstandenen Triomzelle produziert wird. Auf Grund der Speziesdifferenz der beteiligten Immunglobuline kommt es zu einer präferenziellen Paarung zwischen den schweren und leichten Ketten derselben Spezifität, so dass ein

bispezifisches Immunglobulin mit hoher Ausbeute exprimiert wird (Lindhofer et al. 1995). Dieses besteht einerseits aus der IgG2a-Kette des murinen A20-Lymphoms und enthält somit den Idiotyp. Andererseits besitzt es eine Ratte-IgG2b-Kette mit der Bindungsspezifität gegen den murinen Fc γ -Rezeptor-II auf APC. Über den APC-Bindungsarm können dendritische Zellen Tumorantigene aufnehmen und prozessieren. Auf diese Weise werden tumorabgeleitete Peptide den T-Zellen präsentiert.

Wie Mocikat et al. (1997) zeigten, induziert die Immunisierung syngener Mäuse mit Triomzellen einen 100%igen Schutz vor einem letalen A20-Inokulum und eine lang anhaltende systemische Immunität. Sogar Mäuse mit etablierten A20-Tumoren wurden durch die Injektion von Triomzellen geheilt (Strehl et al., 1999).

Die Triomzellvakzinierung weist jedoch das Problem auf, dass die Immunisierungszelle mit dem Ratte-Hybridom einen xenogenen Anteil besitzt. Um die Injektion xenogener Zellen zu umgehen, wurden in dieser Arbeit syngene dendritische Zellen *ex vivo* mit Triomzellen oder bispezifischen Immunglobulinen beladen und nach der Internalisierungsphase selektiv appliziert.

2.2.2 Beladung mit bispezifischen Immunglobulinen

In einem ersten Versuch wurde der Frage nachgegangen, ob DC nach Internalisierung des bispezifischen Immunglobulins tumorprotektiv wirken. Für die Antigenaufnahme wurden unreife DC 24 Stunden lang mit dem gereinigten Immunglobulin-Heterodimer (BiV-Protein) in einer Konzentration von 100 μ g/ml inkubiert.

Wie Abb. 21 demonstriert, überlebten die Mäuse nach Vakzinierung mit BiV-Protein-beladenen dendritischen Zellen statistisch signifikant länger ($P=0,015$). Mit reifen antigenpräsentierenden DC wurde ein ähnliches Ergebnis erzielt ($P<0,01$). Die Überprüfung der Antikörpertiter ergab, dass außerdem eine starke humorale Immunantwort gegen den A20-Idiotyp induziert wurde (nicht gezeigt).

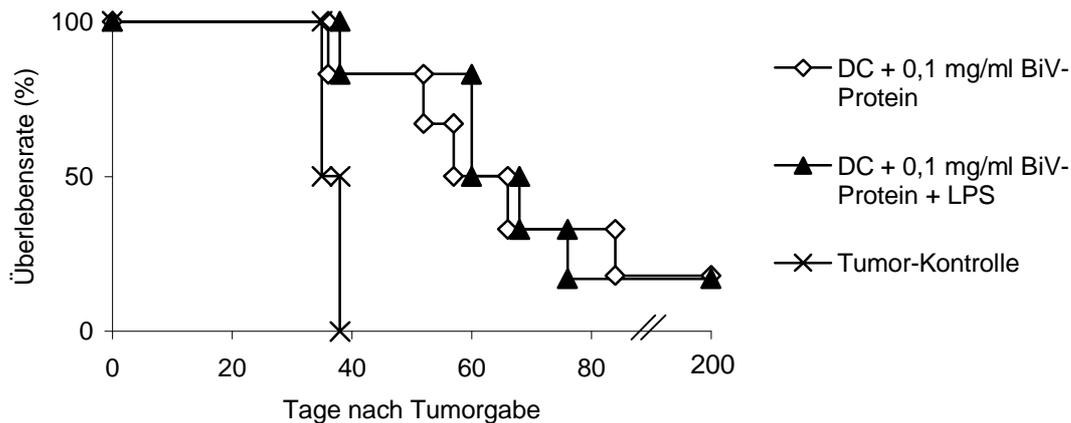


Abb. 21 Therapieversuche mit dendritischen Zellen, die mit bispezifischem Immunglobulin beladen wurden

Dendritische Zellen wurden 24 Stunden lang mit gereinigtem BiV-Protein in einer Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Verabreicht wurden 7×10^5 Tumorzellen am Tag 0 und jeweils 5×10^5 antigenbeladene DC an den Tagen 4 und 10.

Während idiotypbeladene DC keine tumorprotektive Wirkung entfalteten (Abb. 18), verbesserte sich das Überleben der Mäuse nach Inkubation der APC mit dem Immunglobulin-Heterodimer. Diese Experimente zeigen, dass dendritische Zellen nach Fc γ -Rezeptor-vermittelter Internalisierung des Triomproteins effizient tumorabgeleitete Peptide präsentieren und eine Antitumor-Immunantwort generieren.

2.2.3 Beladung mit Triomzellen

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurden dendritische Zellen mit Triomzellen inkubiert, die alle tumorassoziierten Antigene der parentalen Lymphomzelle beinhalten. Internalisierungsversuche wurden mit lysierten und intakten BiV-Zellen durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde die tumorprotektive Wirkung dendritischer Zellen untersucht, die mit lysierten Triomzellen beladen wurden. Unreife DC wurden in einem 1:1-Verhältnis für 24 Stunden mit BiV-Zellen inkubiert, die in einem Frier-Tau-Verfahren zerstört worden waren. Wie Abb. 22 zeigt, konnte kein signifikanter Schutz vor Tumorwachstum erreicht werden; lediglich eine von zwölf Mäusen überlebte ($P > 0,05$).

Daraufhin wurde überprüft, ob eine potente Antitumor-Immunität generiert werden kann, wenn Antigene durch die intakte Triomzelle Fc γ -Rezeptor-spezifisch an die APC herangeführt werden. Um Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, wurden unreife dendritische Zellen mit bestrahlten (20Gy) Triomzellen in einem 1:1-Verhältnis für 24

Stunden kokultiviert. Der Internalisierungsphase folgte eine Positivselektion der DC mit einem magnetpartikeltragenden CD11c-Antikörper, um die dendritischen Zellen von den Triomzellen zu trennen. Der tumorprotektive Effekt der DC-Immunisierung konnte nur untersucht werden, wenn keine Triomzellen appliziert wurden, da unveränderte BiV-Zellen *per se* vor Tumorwachstum schützen. Die FACS-Analyse bestätigte, dass nach der Separation die dendritischen Zellen zu 96% angereichert wurden (Material & Methoden). Die Überlebensraten sind in Abb. 22 dokumentiert.

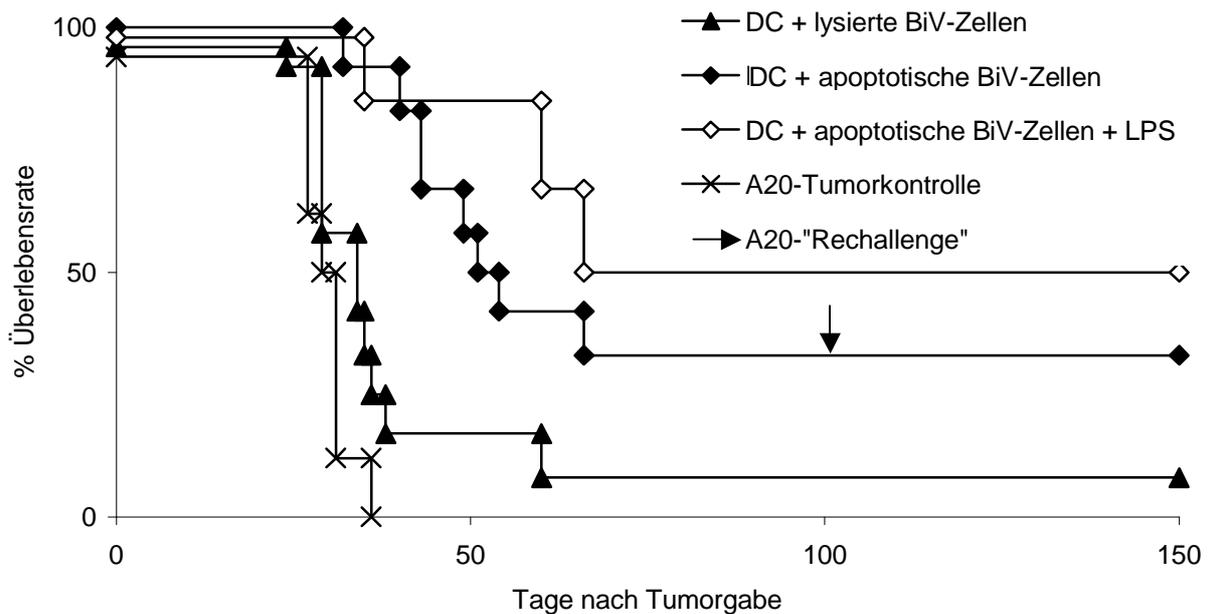


Abb. 22 Therapieversuche mit dendritischen Zellen, die mit lysierten oder apoptotischen BiV-Zellen beladen wurden

Dendritische Zellen wurden 24 Stunden mit apoptotischen oder lysierten BiV-Zellen in einem 1:1-Verhältnis inkubiert. Nach Kokultivierung mit apoptotischen Triomzellen wurden die DC mit einer immunmagnetischen Zellseparation isoliert. Verabreicht wurden 7×10^5 Tumorzellen am Tag 0 und jeweils 5×10^5 beladene DC an den Tagen 4 und 10.

Durch die Beladung mit BiV-Zellen ließ sich die Überlebenschance der Mäuse signifikant verbessern ($P < 0,03$). Die Tiere starben mit zeitlicher Verzögerung im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe; bei 4 von 12 Mäusen konnte ein letales Tumorwachstum verhindert werden. Ein zweiter Immunitätstest zeigte, dass die induzierte Antitumor-Immunität bei allen Mäusen lang anhaltend war. Mit reifen triomzellbeladenen DC konnte die tumorprotektive Wirkung zusätzlich verstärkt werden; 50% der behandelten Mäuse wurden von dem Tumor geheilt ($P < 0,03$). Die im Zell-ELISA ermittelten anti-A20-Antikörpertiter ergaben jedoch eine kaum messbare humorale Immunantwort.

Im Gegensatz zu DC, die mit A20-Zellen inkubiert wurden, induzierten triomzellbeladene dendritische Zellen im erkrankten Organismus eine lang anhaltende, systemische Antitumor-Immunität. Dies zeigt, dass die Lymphomantigene durch die anti-Fc γ -Rezeptor-Spezifität der Triomzelle *ex vivo* effizient in die DC internalisiert werden konnten.

2.3 Beladung mit GM-CSF-transfizierten Zellen

Die Vakzinierung mit GM-CSF-produzierenden Tumorzellen bildet eine wirksame Immunisierungsstrategie gegen maligne B-Zell-Lymphome. Wie Strehl et al. (1999) zeigten, wirken sich die Antigen-Redirektion durch die Triomzelle gegen APC und GM-CSF-vermittelte Effekte synergistisch auf den Tumorschutz aus. In Präimmunisierungsversuchen war die Behandlung mit GM-CSF-Gen-transfizierten Triomzellen der Impfung mit Zytokin-produzierenden Lymphomzellen oder unveränderten BiV-Zellen überlegen. Ein abweichendes Bild zeigte sich jedoch in der Therapiesituation: Hier konnte durch die Immunisierung mit GM-CSF-modifizierten Triomzellen kein signifikanter Tumorschutz generiert werden. Nach der therapeutischen Gabe von BiV-Zellen oder GM-CSF-produzierenden A20-Zellen war hingegen ein Heilungserfolg zu beobachten.

Das Zytokin GM-CSF stimuliert das Wachstum und die Reifung dendritischer Zellen *in vivo*. Dies warf die Frage auf, ob die Differenzierung dendritischer Zellen durch den GM-CSF-Gen-Transfer in Triomzellen gehemmt wird. Um dies zu überprüfen, wurden dendritische Zellen durch Kultivierung mit GM-CSF-produzierenden Triomzellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet. Auf diese Weise entstanden MHC-Klasse-II-exprimierende DC, die reichlich kostimulierende B7-Proteine, das ICAM-1-Adhäsionsmolekül und Klasse-I-MH-Komplexe auf der Oberfläche entfalteteten. Die so gewonnenen DC unterschieden sich nicht von den dendritischen Zellen, die mit löslichem GM-CSF in An- oder Abwesenheit von unveränderten BiV-Zellen generiert wurden (Anhang).

Eine Ursache für die fehlende Tumorabwehr durch GM-CSF-produzierende Triomzellen könnte sein, dass die GM-CSF-Expression in Triomzellen mit der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Antigenaufnahme interferiert. Deshalb wurde untersucht, ob dendritische Zellen nach *Ex vivo*-Inkubation mit GM-CSF-Gen-transfizierten Triomzellen Tumorantigene internalisieren und abgeleitete Peptide präsentieren, um *in vivo* eine Antitumor-Immunität zu induzieren.

Um Antigene aufzunehmen, wurden *ex vivo* generierte DC mit den GM-CSF-Gen-transfizierten Zellklonen in einem 1:1-Verhältnis koinkubiert. Verwendet wurden die Zelllinien A20-BNG-1B7 und BiV-BNG-3A8, die mit dem Vektor BCMGSNeo-GM-CSF (BNG) transfiziert sind (Strehl et al., 1999). Sie produzieren 121ng/ml (A20-BNG) bzw. 482ng/ml

(BiV-BNG) GM-CSF. Auch in diesem Versuch folgte auf die 24-stündige Internalisierungsphase ein DC-Separationsschritt. Die gereinigten antigenpräsentierenden Zellen wurden schließlich subkutan 4 bzw. 10 Tage nach der intravenösen Tumorgabe injiziert. Die *In-vivo*-Ergebnisse sind in Abb. 23 dokumentiert.

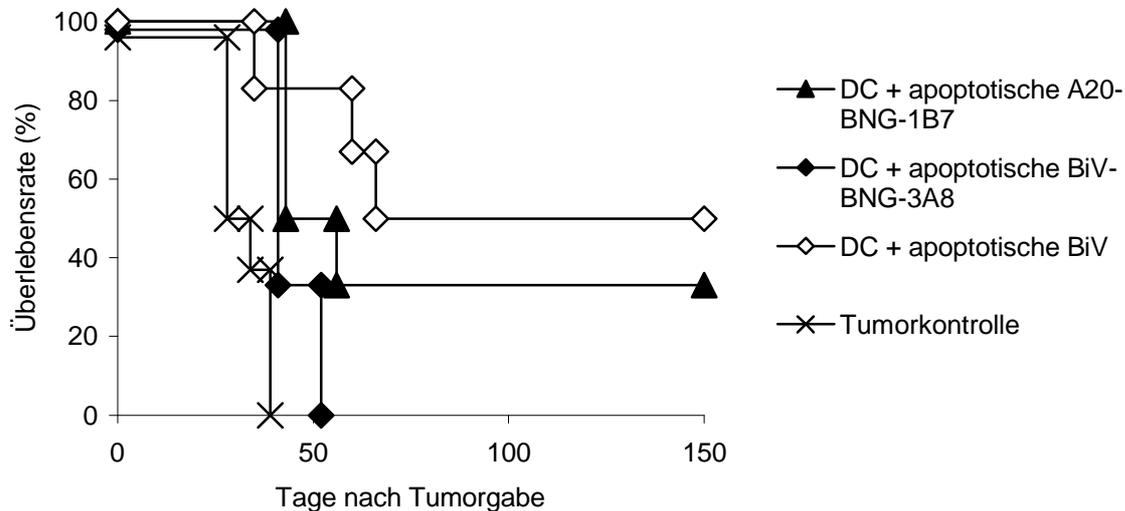


Abb. 23 Therapievorsuche mit dendritischen Zellen, die mit GM-CSF-produzierenden Zelllinien beladen wurden

Dendritische Zellen wurden 24 Stunden mit apoptotischen GM-CSF-Gen-transfizierten BiV- (BiV-BNG-3A8, 482 ng/ml) oder A20-Zellen (A20-BNG-1B7, 121ng/ml) in einem 1:1-Verhältnis inkubiert. Nach der Kokultivierung wurden die DC mit LPS stimuliert und mit einer MACS-Separation isoliert. Verabreicht wurden 7×10^5 Tumorzellen am Tag 0 und jeweils 5×10^5 beladene DC an den Tagen 4 und 10.

Nach Vakzinierung mit DC, die mit Zytokin-Gen-transfizierten A20-Zellen inkubiert wurden, waren 33% der Mäuse vor Tumorwachstum geschützt. Dies bedeutet eine Verbesserung des Überlebens im Vergleich zur Beladung mit unveränderten A20-Zellen ($P < 0,05$). Die protektive Wirkung triomzellbeladener DC wurde hingegen beseitigt, wenn die DC mit GM-CSF-Gen-modifizierten Triomzellen beladen wurden: Nach Behandlung mit BiV-BNG-3A8-inkubierten dendritischen Zellen entwickelten alle Mäuse einen letalen Tumor. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der GM-CSF-Gen-Transfer in Triomzellen mit der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Antigeninternalisierung interferiert.

D DISKUSSION

1 Die Interaktion zwischen DC und NK-Zellen: ein neuer Weg der Antitumor-CTL-Induktion

Die Induktion einer effizienten Immunantwort erfordert die Erkennung von Pathogenen durch das Immunsystem sowie die schnelle Aktivierung von Immunzellen und die Produktion von löslichen Mediatoren der Immunität. Das angeborene Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle in der ersten Phase der Immunantwort, indem es die Ausbreitung von Krankheitserregern limitiert und die Effektorzellen der antigenspezifischen Immunität „bewaffnet“, um Pathogene zu zerstören. Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen sind zwei spezialisierte Komponenten des angeborenen Immunsystems. NK-Zellen vermitteln durch die Produktion von Zytokinen und durch zytotoxische Effekte eine Immunantwort gegen transformierte Zellen. Dendritische Zellen sind als professionelle antigenpräsentierende Zellen Modulatoren und potente Aktivatoren der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunität.

Die wechselseitige Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen besitzt auch eine herausragende Bedeutung für die Bildung einer Immunantwort gegen Tumoren. Dendritische Zellen können natürliche Killerzellen aktivieren, so dass diese sensitive Tumorzellen abtöten (Fernandez et al., 1999). Außerdem treten dendritische Zellen und NK-Zellen in einen stimulierenden Dialog, der zur Aktivierung und Zytokinproduktion beider Zelllinien führt (Gerosa et al., 2002). Mocikat et al. (2003) zeigten, dass aktivierte NK-Zellen nach Gabe MHC-Klasse-I-supprimierter Tumorzellen auch als Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort fungieren, indem sie eine tumorprotektive CD8⁺-T-Zell-Antwort induzieren. NK-Zellen besitzen außerdem eine regulierende Funktion während der Immunantwort, da sie unreife DC selektiv lysieren können (Ferlazzo et al., 2002). So wird zum einen durch die Beseitigung der Vorläuferzellen die Anzahl reifer dendritischer Zellen limitiert, zum anderen während der frühen Phase der Immunantwort eine immunogene DC-Population selektiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Weg beschrieben, der adaptive und angeborene Immunität verbindet, um eine potente protektive Immunantwort gegen das A20-Lymphom der Maus zu bilden. Durch die Interaktion zwischen unbeladenen dendritischen Zellen und NK-Zellen wird die für die Induktion einer CTL-Antwort erforderliche CD4⁺-T-Zell-Hilfe ersetzt. Unbeladene dendritische Zellen induzieren durch die Aktivierung von NK-Zellen ein

tumorspezifisches CD8⁺-T-Zell-Gedächtnis, das unabhängig vom T-Helfer-Arm des Immunsystems ist.

1.1 Die Interaktion zwischen unbeladenen DC und NK-Zellen

Um die Bedeutung der DC/NK-Zell-Interaktion für die Induktion einer protektiven Immunität gegen das A20-B-Zell-Lymphom der Maus zu untersuchen, wurde ein Modellsystem benutzt, in dem unbeladene dendritische Zellen 100% der behandelten Mäuse vor einem darauf folgenden A20-Tumorinokulum schützten. In Depletionsversuchen wurde gezeigt, dass für die primäre Abstoßung der A20-Zellen nach Immunisierung mit unbeladenen DC NK-Zellen sowie CD8⁺-T-Zellen verantwortlich sind. Die Aktivierung zytotoxischer NK-Zell-Funktionen nach DC-Vakzinierung wurde in ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuchen bestätigt. NK-Zellen aus DC-behandelten Mäusen töteten im Gegensatz zu naiven NK-Zellen A20-Zellen und NK-sensitive YAC-Zellen ab.

Die wechselseitige Stimulation von dendritischen Zellen und NK-Zellen wurde bereits gut untersucht und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der angeborenen und der adaptiven Immunität (Cooper et al., 2004). Der stimulierende Dialog zwischen DC und NK-Zellen kann die Zellaktivierung, die Zellreifung oder den Zelltod bewirken. DC-aktivierte NK-Zellen produzieren IFN- γ und besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen zu zerstören. So erzeugten Fernandez et al. (1999) im AK7-Mesotheliom-Modell der Maus nach Flt3-L-induzierter *In-vivo*-Expansion dendritischer Zellen einen NK-Zell-abhängigen Antitumor-Effekt. Der wechselseitige Dialog stimuliert die Aktivierung und Zytokinproduktion beider Zellarten (Gerosa et al., 2002), die Proliferation und Zytotoxizität der NK-Zellen (Fernandez et al., 1999) und die Reifung der DC (Piccioli et al., 2002). Aktivierende Signale werden über IL-12 und IFN- γ (Yu et al., 2001) sowie über den direkten Zellkontakt zwischen DC und NK-Zellen (Gerosa et al., 2002) übermittelt.

In dieser Arbeit wurde nach Neutralisierung von IL-12 oder IFN- γ der DC-induzierte Schutz vor A20-Tumorwachstum vollständig aufgehoben. So ist anzunehmen, dass für die wechselseitige Interaktion zwischen DC und NK-Zellen IFN- γ und IL-12 entscheidend sind. Reife DC bilden große Mengen IL-12, das die Zytotoxizität und die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen verstärkt (Trinchieri, 2003). Außerdem erzeugen DC weitere Zytokine, wie beispielsweise IL-1 und IL-18, die den Effekt von IL-12 unterstützen und die Expression des IL-12-Rezeptors auf NK-Zellen induzieren (Cooper et al., 2004).

Auch CD4⁺-T-Zellen können die NK-Zell-Aktivierung beeinflussen. So zeigten Fehniger et al. (2003) *in vitro*, dass dendritische Zellen NK-Zellen über die Stimulation IL-2-sezernierender CD4⁺-T-Zellen indirekt aktivieren können. In der vorliegenden Arbeit war die NK-Zell-

Aktivierung aber nicht von T-Helferzellen abhängig. Denn NK-Zellen aus DC-immunisierten Mäusen wirkten unverändert zytotoxisch gegen Tumorzellen, wenn CD4⁺-T-Zellen während der Immunisierungsphase depletiert wurden.

1.2 Die DC/NK-Zell-Interaktion als CD4⁺-Zell-unabhängiger Weg der CTL-Induktion

Durch die DC-aktivierten NK-Zellen allein konnte kein ausreichender Tumorschutz erzeugt werden. Für die primäre Abstoßung der Tumorzellen wurden sowohl NK-Zellen als auch CD8⁺-T-Zellen benötigt. Ferner induzierten unbeladene dendritische Zellen ein tumorspezifisches CD8⁺-Langzeitgedächtnis. Für die effiziente Induktion zytotoxischer CD8⁺-T-Lymphozyten sowie für das protektive Langzeitgedächtnis waren keine CD4⁺-T-Helferzellen nötig. Die CTL-Aktivierung wurde über die wechselseitige Interaktion zwischen dendritischen Zellen und NK-Zellen erreicht. Denn nach Depletion natürlicher Killerzellen in der Induktionsphase wurden sowohl der primäre als auch der lang anhaltende CD8⁺-T-Zell-vermittelte Tumorschutz beseitigt.

Die Rolle der CD4⁺-T-Zellen wurde mit CD40-defizienten DC näher untersucht. Auch nach Vakzinierung mit CD40^{-/-}-DC wurde eine tumorprotektive CTL-Antwort generiert und ein immunologisches Gedächtnis gebildet. Die Interaktion zwischen dem CD40-Liganden auf CD4⁺-T-Zellen und dem CD40-Rezeptor auf DC wird für die direkte Aktivierung naiver CD8⁺-T-Zellen auf dem „klassischen Weg“ benötigt (Schoenberger et al., 1998). Die Ergebnisse zeigen deshalb, dass über die DC/NK-Zell-Achse die CD4⁺-T-Zell-Hilfe für die Induktion der CTL-Antwort umgangen wurde. Durch die zusätzliche Depletion von CD4⁺-T-Zellen wurde außerdem ausgeschlossen, dass die Aktivierung der NK-Zellen oder die CTL-Induktion von der Zytokinproduktion der CD4⁺-Zellen abhängig war.

Aktivierte NK-Zellen können über die Produktion von Zytokinen (Kelly et al., 2002) eine antigenspezifische CTL-Antwort gegen Tumorzellen fördern. Es blieb jedoch unklar, welchen Beitrag CD4⁺-T-Zellen für die NK-Zell-abhängige Entwicklung der adaptiven Immunität leisten. In einer Studie stimulierten NK-Zellen indirekt zytotoxische T-Zellen gegen NKG2D-L-exprimierende Tumorzellen, indem Typ2-antigenpräsentierende Zellen in Typ1-APC umgewandelt wurden (Geldhof et al., 2002). Mailliard et al. (2003) demonstrierten, dass durch die Interaktion von NK-Zellen mit dendritischen Zellen Typ1-polarisierte DC gebildet werden, die Th1-Zellen und antigenspezifische IFN- γ -produzierende CD8⁺-Zellen stimulieren. Indessen wiesen Westwood et al. (2003) darauf hin, dass Th1-unabhängige CD4⁺-T-Zellen für die NK-Zell-abhängige Induktion einer tumorspezifischen CTL-Antwort von Bedeutung sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den stimulierenden Dialog zwischen dendritischen Zellen und NK-Zellen die CD4⁺-Hilfe ersetzt und eine tumorprotektive CTL-Antwort sowie ein lang anhaltendes immunologisches Gedächtnis gebildet. Die DC/NK-Zell-Interaktion stellt in dem vorgestellten Modell einen alternativen, CD4⁺-Zell-unabhängigen Weg der CTL-Induktion dar.

Mocikat et al. (2003) beschrieben eine Kaskade, die angeborene und adaptive Immunantwort verbindet: NK-Zellen, die durch MHC-Klasse-I-supprimierte A20-Tumorzellen aktiviert wurden, produzierten IFN- γ und induzierten die IL-12-Expression in dendritischen Zellen. Dies führte zu einer potenten CTL-Antwort gegen A20-Wildtyp-Zellen. Ein ähnlicher Mechanismus könnte für die T-Zell-Immunität nach DC-induzierter NK-Zell-Aktivierung verantwortlich sein. Auch nach Vakzinierung mit unbeladenen DC sind IFN- γ und IL-12 von entscheidender Bedeutung für die NK-Zell-abhängige Induktion der T-Zell-Immunität. DC-aktivierte NK-Zellen könnten eine CTL-Antwort auslösen, indem sie über IFN- γ *endogene* DC stimulieren. Dies könnte erklären, weshalb CD40^{-/-}-DC zytotoxische T-Zellen aktivieren, ohne selbst dafür die Fähigkeit zu besitzen. Die Tatsache, dass CD40^{-/-}-DC in CD40-defizienten Mäusen keine T-Zell-Antwort induzierten, unterstreicht die Rolle endogener DC für die Induktion der T-Zell-Immunität. Durch die Untersuchung der Zellpopulationen in den Lymphknoten DC-Immunisierter Mäuse konnte dieses Konzept bestätigt werden (Adam et al., 2005)

Die Immunisierung mit unbeladenen DC bewirkt eine rasche NK-Zell-Aktivierung. Die IFN- γ -Freisetzung aus aktivierten NK-Zellen führt zur IL-12-Expression in endogenen DC und zur Induktion einer tumorprotektiven T-Zell-Immunität. Dieser Weg ist dem von Mocikat et al. (2003) beschriebenen Mechanismus ähnlich und unabhängig vom T-Helfer-Arm des Immunsystems.

1.3 Unzureichende Aktivierung der DC/NK-Zell-Achse durch unreife DC

Die Aktivierung von NK-Zellen und die Induktion zytotoxischer T-Zellen durch DC-aktivierte NK-Zellen waren abhängig vom Differenzierungsstadium dendritischer Zellen. Obwohl unreife wie reife DC *in vivo* 100% der Mäuse vor Tumorwachstum schützten, waren ausschließlich reife DC in der Lage, die CD4⁺-Hilfe für die Induktion einer tumorprotektiven CTL-Antwort zu umgehen. Es ist anzunehmen, dass der Tumorschutz unreifer DC durch die direkte Aktivierung von CD8⁺-Zellen und mit Hilfe von CD4⁺-Zellen gebildet wird. Die stimulierenden Signale, die NK-Zellen von unreifen DC erhalten, scheinen zu schwach zu sein, um über die DC-NK-Zell-Achse eine protektive Immunität zu erzeugen und den „klassischen Weg“ der T-Zell-Aktivierung zu ersetzen.

Unreife DC bewirkten gegenüber reifen DC eine deutlich geringere NK-Zell-Aktivierung. Ebenso erzeugten NK-Zellen nach Injektion unreifer DC in SCID-Mäusen keinen Antitumor-Effekt. Die kostimulierenden Moleküle und die Zytokinproduktion reifer DC scheinen also bei der NK-Zell-Aktivierung eine entscheidende Rolle zu spielen. Reife DC exprimieren im Vergleich zu unreifen DC deutlich mehr CD80-, CD86-, ICAM- und CD40-Moleküle. Die Interaktion zwischen B7-Molekülen und ihrem Liganden CD28 könnte stimulierende Signale für die NK-Zell-Aktivierung liefern. So wurde bereits *in vitro* demonstriert, dass über die Bindung von CD80 bzw. CD86 an den Liganden NK-Zellen direkt aktiviert werden (Chambers et al., 1996; Martin-Fontecha et al., 1999). Auch ICAM- oder CD70-Moleküle wirken kostimulierend auf die Aktivierung von NK-Zellen (Poggi et al., 2002; Tekeda et al., 2000).

Die Expression von CD40-Molekülen auf der DC-Oberfläche war nicht obligatorisch für die NK-Zell-Aktivierung, da reife CD40-defiziente dendritische Zellen *in vivo* ebenso wirksam waren wie immunkompetente CD40-exprimierende DC. Das Signal, das durch die Bindung der CD40-Moleküle auf DC an ihren Liganden auf NK-Zellen übermittelt wird (Carbone et al., 1997), könnte über die verstärkte Expression anderer kostimulierender Moleküle und über die vermehrte Produktion stimulierender Zytokine nach der DC-Reifungsphase umgangen werden. Eine direkte CD40/CD40-L-Interaktion war für die Aktivierung der NK-Zellen und die NK-Zell-abhängige T-Zell-Induktion nicht erforderlich. Turner et al. (2001) zeigten, dass NK-Zellen *in vivo* indirekt durch stimulierende CD40-Antikörper aktiviert werden können, indem endogene DC stimuliert werden. Eine direkte Interaktion zwischen CD40 auf DC und CD40-Ligand auf NK-Zellen war auch in dieser Studie nicht nötig, um NK-Zellen zu aktivieren.

1.4 Die A20-Restriktion des DC-induzierten Tumorschutzes

Nach Immunisierung mit unbeladenen dendritischen Zellen waren die Mäuse vor dem A20-Lymphom, nicht jedoch vor dem MPC11-Lymphom oder dem CT26-Kolonkarzinom geschützt. *In vitro* wirkten DC-aktivierte NK-Zellen nur gegen A20-Zellen, nicht aber gegen MPC11- oder CT26-Zellen zytotoxisch. Während alle untersuchten Zelllinien MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten, unterschieden sie sich in der Expression der NKG2D-Liganden. NKG2D interagiert mit aktivierenden NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen, CD8⁺-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen (Bauer et al., 1999). Auf der Oberfläche der A20-Zellen waren die NKG2D-Liganden bis zu 18mal stärker nachweisbar als auf MPC11- oder CT26-Zellen. Letztere exprimierten zwar die aktivierenden Liganden, jedoch in einem viel schwächeren Maße. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass für die Expression der NKG2D-Liganden eine

Schwelle existiert, unter der Tumorzellen nicht mehr von NK-Zellen abgetötet werden können.

Die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen NKG2D und seinen Liganden für die NK-Zell-Reaktivität gegen A20-Zellen konnte *in vivo* bestätigt werden. Denn dendritische Zellen induzierten keine tumorprotektive Immunität, wenn die NKG2D-Liganden auf der Oberfläche der A20-Zellen mit dem NKG2D-Tetramer besetzt wurden. Die Ergebnisse zeigen *in vivo*, dass NKG2D und seine Liganden ein Erkennungssystem darstellen, das aktivierten NK-Zellen erlaubt, Tumorzellen abzutöten. Hingegen scheint die NK-Zell-Aktivierung durch dendritische Zellen unabhängig von der NKG2D/NKG2D-Ligand-Interaktion zu sein, da die Blockade der NKG2D-Liganden auf der DC-Oberfläche keinen Effekt auf den Tumorschutz *in vivo* hatte.

Es existieren verschiedene Liganden für den NKG2D-Rezeptor. In der Maus interagieren H60-, RAE1- und MULT1-Moleküle mit NKG2D (Diefenbach et al., 2000; Cerwenka et al., 2000; Carayannopoulos et al., 2002). Jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit die für die NK-Zell-Reaktivität verantwortlichen Liganden nicht näher definiert. Weitere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Mocikat werden sich damit beschäftigen.

2B4 (CD244) ist ein weiterer Rezeptor auf NK-Zellen, der durch die Bindung an seinen Liganden die Zytokinproduktion und die Zytotoxizität natürlicher Killerzellen aktivieren kann (Lanier, 2001). CD48 ist als Ligand für das 2B4-Molekül bekannt. Zellen, die CD48 vermehrt exprimieren, reagieren empfindlicher auf die zytotoxische Funktion von NK-Zellen (Tangye et al., 2000). Die CD48-Expression ist bei EBV-infizierten B-Zellen signifikant erhöht (Klaman et al., 1995). Auch die in dieser Arbeit untersuchten B-Zell-Lymphome exprimierten im Gegensatz zu CT26-Kolonkarzinomzellen eine große Anzahl von CD48-Molekülen. Da MPC11-Lymphomzellen von NK-Zellen jedoch nicht lysiert wurden, ist anzunehmen, dass die Bindung von 2B4 an seinen Liganden kein unabhängiges Signal für die NK-Zell-Zytotoxizität darstellt. Es ist möglich, dass 2B4 auf NK-Zellen als kostimulierendes Molekül fungiert, das weitere primäre aktivierende Signale, wie NKG2D, benötigt (Nakajima et al., 1999).

Die Vakzinierung mit unbeladenen dendritischen Zellen führte nicht nur zur primären NK-Zell-abhängigen Abstoßung des A20-Lymphoms, sondern induzierte auch ein lang anhaltendes T-Zell-Gedächtnis. Offensichtlich tragen neben der NKG2D-vermittelten Erkennung der A20-Zellen durch aktivierte NK-Zellen auch spezifische Antigene dazu bei, dass der Tumorschutz nach Immunisierung mit unbeladenen DC auf das A20-Lymphom beschränkt ist. Die Freisetzung von tumorassoziierten Antigenen durch die NK-Zell-abhängige Tumorlyse könnte die Induktion einer frühen T-Zell-Antwort nach A20-Applikation erklären. Allerdings war selbst 150 Tage nach DC-Immunisierung ein tumorprotektives T-Zell-Gedächtnis noch nachweisbar. Unbeladene dendritische Zellen konnten auch in

Abwesenheit von A20-Zellen tumorspezifische zytotoxische T-Zellen bilden. Daraus folgte, dass unbeladene DC Antigene exprimieren, die mit A20-Zellen kreuzreagieren.

Die Behandlung mit unbeladenen DC erzeugte eine antigenspezifische Antitumor-Immunität. Die involvierten Antigene schienen jedoch nur schwach immunogen wirksam zu sein. Denn die therapeutische Vakzinierung mit unbeladenen DC, die höhere Anforderungen an das Immunisierungssystem stellt, war nicht erfolgreich. Der Ursprung und die Art der tumorassoziierten Antigene bleibt ungeklärt. Obwohl sich die DC-induzierte Immunität gegen das A20-B-Zell-Lymphom richtete, war sie nicht B-Zell-spezifisch, da die behandelten Mäuse nicht vor dem MPC11-B-Zell-Lymphom geschützt waren. Es ist denkbar, dass *in vitro* gebildete dendritische Zellen eine atypische Auswahl an Peptiden präsentieren, die als TAA fungieren. Auch könnte die Interaktion zwischen DC und NK-Zellen *in vivo* zur Überexpression von Selbst-Antigenen führen, die auf der Oberfläche von A20-Zellen als TAA ebenfalls vermehrt exprimiert werden. Diese Antigene, kombiniert mit der hier beschriebenen potenten Stimulation des Immunsystems, könnten einen Mechanismus in Gang setzen, durch den die Toleranz gegen Selbst-Antigene umgangen wird.

Eine frühere Studie berichtete über den protektiven Effekt unbeladener dendritischer Zellen gegen das C57BL/6-LL/2-Lungenkarzinom und das BALB/c-CT26-Kolonkarzinom (van den Broeke et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass unbeladene DC eine breitere Wirksamkeit gegen Tumoren besitzen. Jedoch gibt es einige Unterschiede im experimentellen Vorgehen: In der vorliegenden Arbeit wurde das Überleben der Mäuse als harter Endpunkt gemessen. Van den Broeke et al. zogen hingegen nur die Anzahl der Lungenmetastasen als Nachweis für verzögertes Tumorstadium heran. Außerdem wurden die CT26-Tumorzellen mit einem xenogenen Anteil versehen, der zusätzlich immunstimulierend wirkt. Auch beim Mechanismus der DC-induzierten Immunantwort ergeben sich entscheidende Differenzen. In der zitierten Studie wurde die zentrale Bedeutung von CD4⁺-T-Zellen für die NK-Zell-Aktivierung betont. Die primäre Tumorabstoßung und das Langzeitgedächtnis waren abhängig von NK-Zellen und CD4⁺-T-Zellen und unabhängig von CD8⁺-T-Zellen. Dagegen werden in der vorliegenden Arbeit NK-Zellen und CD8⁺-T-Zellen, aber keine CD4⁺-Zellen für den Tumorschutz benötigt.

1.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit schreibt der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und NK-Zellen eine neue Rolle in der Tumormunität zu. Der aktivierende Dialog zwischen reifen unbeladenen dendritischen Zellen und NK-Zellen ersetzt die Hilfe von CD4⁺-T-Zellen und führt zu einer protektiven CTL-Antwort gegen das murine A20-Lymphom.

Über zwei Wege können tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten generiert werden (Abb. 24): Der „klassische Weg“ umfasst die Aktivierung tumorspezifischer CD4⁺-T-Zellen nach Präsentation von Peptiden durch DC (a), die Hilfestellung von CD4⁺-Zellen (b) und die Kreuzpräsentation tumorassoziierter Antigene gegenüber CD8⁺-Lymphozyten (c).

Der in dieser Arbeit beschriebene neue Mechanismus (d) wird von NK-Zellen eingeleitet, die nach Transfer unbelasteter dendritischer Zellen aktiviert werden. Aktivierte NK-Zellen produzieren IFN- γ und stimulieren DC, insbesondere endogene DC, zur IL-12-Produktion. Die Bildung von IL-12 bewirkt die Induktion tumorspezifischer CD8⁺-Lymphozyten.

Nach Immunisierung mit dendritischen Zellen können das angeborene und das erworbene Immunsystem effizient aktiviert werden, um eine Antitumor-Immunantwort zu generieren. Die vorgestellten Versuche zeigen, dass die CD4⁺-T-Zell-Hilfe für die Induktion einer Antitumor-CTL-Antwort über die alternative DC-NK-Zell-Achse umgangen werden kann. Die Eigenschaft dendritischer Zellen, über unabhängige Wege eine T-Zell-Antwort zu bilden, unterstreicht ihre herausragende Bedeutung für die Entwicklung von Vakzinierungsstrategien gegen maligne Erkrankungen. Dendritische Zellen verfügen über die Fähigkeit, unterschiedliche Komponenten des Immunsystems einzubeziehen, um eine tumorprotektive T-Zell-Immunität zu induzieren.

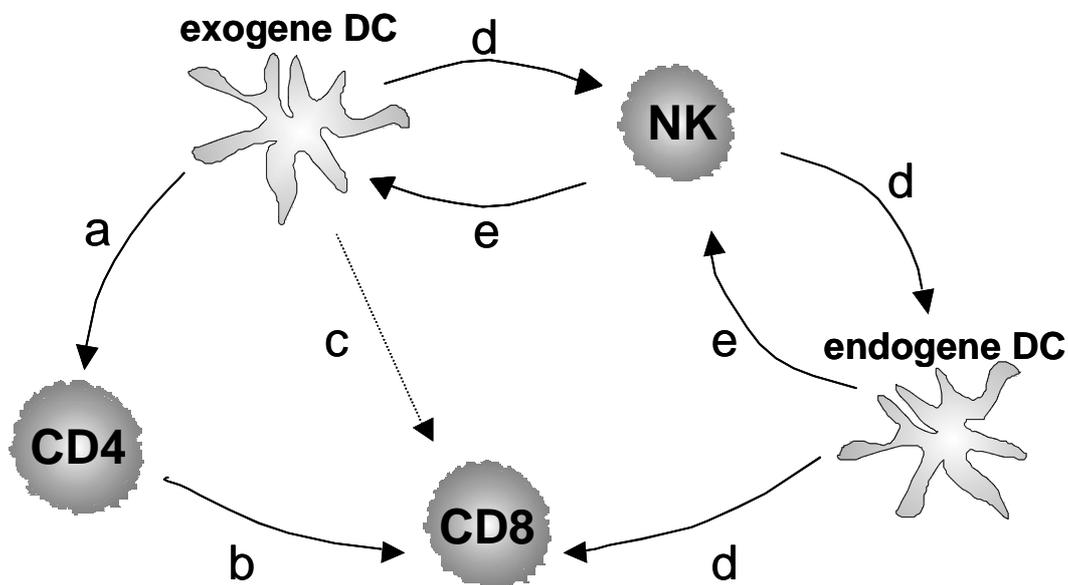


Abb. 24: Mechanismus der T-Zell-Induktion

2 Antigenbeladene dendritische Zellen in der Tumortherapie

Dendritische Zellen sind ein wichtiger Angriffspunkt immuntherapeutischer Strategien gegen maligne Tumoren. Sie zählen als professionelle antigenpräsentierende Zellen zu den potentesten Stimulatoren naiver T-Zellen *in vitro* und *in vivo* (Banchereau & Steinman, 1998). DC können *in vitro* mit exogenen Antigenen in Form von intakten Proteinen oder Peptidfragmenten beladen werden. Proteine werden von den DC aufgenommen, intrazellulär prozessiert und über MHC-Moleküle präsentiert. Kurze Peptidfragmente können direkt an MHC-Moleküle auf der DC-Oberfläche binden. Bisher veröffentlichte Ergebnisse belegen die Wirksamkeit antigenbeladener dendritischer Zellen in der Tumortherapie. Nach Immunisierung mit DC, die mit Proteinen oder MHC-Klasse-I-restringierten Peptiden beladen wurden, konnten in der Maus antigenspezifische T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen generiert werden (Zitvogel et al., 1996; Paglia et al., 1996; Porgador und Gilboa, 1995). Ebenso bildeten dendritische Zellen eine Immunantwort gegen Tumorantigene, wenn sie mit lysierten Tumorzellen beladen (Fields et al., 1998) oder mit Tumor-RNS transfiziert wurden (Boczowski et al., 1996). Auch durch die Fusion von dendritischen Zellen und Karzinomzellen wurden tumorspezifische CTL *in vivo* induziert (Gong et al., 1997).

Das Ziel einer Immuntherapie ist es, Tumorzellen dem Immunsystem als fremd erkennbar zu machen. Die Kenntnis tumorassoziierter Antigene ermöglicht es, tumorabgeleitete Peptide durch DC zu präsentieren, um eine spezifische T-Zell-Reaktion gegen transformierte Zellen zu bilden, ohne gesundes Gewebe anzugreifen. Da B-Zell-Lymphome mit dem Idiotyp-Immunglobulin ein absolut tumorspezifisches Antigen besitzen, sind sie für die Entwicklung DC-basierter Vakzinierungsstrategien besonders interessant. In einer ersten klinischen Studie konnte bei B-Zell-Lymphom-Patienten eine Antitumor-Immunantwort mit idiotypbeladenen DC induziert werden (Timmerman et al., 2002). Es wurden sowohl eine idiotypspezifische T-Zell- als auch eine humorale Anti-Idiotyp-Antwort generiert. Vier von zehn Patienten mit residuellen Tumoren nach Chemotherapie zeigten eine klinische Tumor-Regression.

Präklinische Studien beschäftigen sich vor allem mit der Suche nach einer wirksamen Strategie für die Beladung mit Antigenen. Flamand et al. (1994) induzierten im BCL₁-Lymphom-Modell der Maus nach Vakzinierung mit idiotypbeladenen DC Anti-Idiotyp-Antikörper und erzeugten eine protektive Immunität. Idiotypbeladene dendritische Zellen schützten auch vor dem 38C13-Lymphom, allerdings nur, wenn das Tumorprotein mit einem xenogenen Anteil versehen, an GM-CSF gekoppelt oder mit dem Trägerprotein KLH verbunden wurde (Timmerman et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Ansätze untersucht, dendritische Zellen *ex vivo* mit Antigenen zu beladen, um *in vivo* eine Immunantwort gegen das murine A20-

Lymphom zu induzieren. Da bei Präimmunisierung unbeladene dendritische Zellen bereits 100% der Mäuse vor Tumorwachstum schützten, wurden die Versuche mit antigenbeladenen DC in der Therapiesituation durchgeführt. Hier ließ sich mit unbeladenen DC keine Tumorprotektion erzielen. Die Therapie etablierter Tumoren ist zwar bedeutend schwieriger als die Prävention von Tumorwachstum, sie stellt aber ein besseres Modell für die klinische Situation dar, in der krebserkrankte Patienten mit der Immuntherapie behandelt werden sollen.

2.1 Therapie mit idiotypbeladenen dendritischen Zellen

Proteinbeladene DC wurden in verschiedenen Tumormodellen der Maus untersucht. Im immunogenen C3-Tumormodell konnten Zitvogel et al. (1996) alle Mäuse durch die Gabe tumorpeptidbeladener DC 14 Tage nach Tumorgabe heilen. Der Idiotyp maligner B-Zell-Lymphome ist hingegen ein schwach immunogenes Antigen. Durch die Präimmunisierung mit idiotypbeladenen DC induzierten Flaman et al. (1994) eine Antitumor-Immunität gegen das B-Zell-Lymphom BCL₁ der Maus.

Die vorliegende Arbeit zeigte am B-Zell-Lymphom A20, dass letales Tumorwachstum durch die Therapie tumor erkrankter Mäuse mit idiotypbeladenen DC nicht verhindert werden konnte. Auch Timmerman et al. (2000) gelang es nicht, eine Antitumor-Antwort gegen das B-Zell-Lymphom 38C13 nach Beladung dendritischer Zellen mit dem naiven Idiotyp zu erzeugen. Erst durch die Bindung des Idiotyps an das immunogene Trägerprotein KLH (Id/KLH) generierten die beladenen DC eine potente Antitumor-Immunität, die der Immunisierung mit Id-KLH zusammen mit einem chemischen Adjuvans überlegen war. Allerdings wurde die Tumorprotektion nur in der Präimmunisierungssituation gezeigt.

Um die Internalisierung des Tumor-Immunglobulins in DC zu verbessern, wurden dendritische Zellen in Gegenwart eines Idiotyp/GM-CSF-Fusionsproteins (5C12) gebildet. GM-CSF stimuliert das Wachstum und die Reifung dendritischer Zellen. Außerdem kann das kovalent fusionierte Idiotyp-Immunglobulin durch die Bindung an den GM-CSF-Rezeptor von den DC aufgenommen und prozessiert werden (Pardoll, 2002). Die Immunisierung mit dem Fusionsprotein war *in vivo* deutlich effektiver als die Gabe des naiven Idiotyps (Selmayr et al., 1999). Auch die Vakzinierung mit fusionsproteinbeladenen DC schützte vor einer darauf folgenden Tumorgabe. In der Therapiesituation erzeugten dendritische Zellen aber keine Antitumor-Immunität, wenn sie mit dem Idiotyp/GM-CSF-Fusionsprotein kultiviert wurden. Timmerman et al. (2000) zeigten hingegen, dass nach Immunisierung mit DC, die mit einem chimären Idiotyp/GM-CSF-Fusionsprotein beladen wurden, eine humorale Antiidiotyp-Antwort induziert wurde. Jedoch wurde der Idiotyp mit einem xenogenen Anteil versehen, der

zusätzlich immunstimulierend wirkt. Außerdem wurde die tumorprotektive Wirkung der Vakzine nicht überprüft.

2.2 Therapie mit dendritischen Zellen, die mit multiplen Lymphomantigenen beladen wurden

Durch die Immunisierung gegen multiple tumorspezifische Antigene kann die Effizienz einer DC-basierten Immuntherapie verbessert werden. Mit tumorlysatzbeladenen DC generierten Wen et al. (2002) *in vitro* tumorspezifische zytotoxische T-Zellen gegen ein Plasmozytom. Gatza et al. (2002) zeigten an C6VL-T-Zell-Lymphomen der Maus, dass tumorlysatzbeladene DC einen Schutz vor Tumorwachstum erzeugen können. Auch am MCA-207-Sarkom- und MT-901-Brustkarzinommodell der Maus wurde der tumorprotektive Effekt tumorlysatzbeladener DC demonstriert (Fields et al., 1998).

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie dendritische Zellen mit lysierten oder intakten Lymphomzellen beladen. Durch Vakzinierung mit A20-Lysatz-beladenen DC wurde die Überlebensrate der tumortragenden Mäuse nicht verbessert. Ähnliche Ergebnisse ergab die Beladung mit intakten apoptotischen A20-Zellen. Zwar überlebte eine Maus in der Gruppe, die ein 1:1-Gemisch aus apoptotischen A20-Zellen und DC erhielt; jedoch war die Überlebenszeit im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe nicht statistisch signifikant verlängert. Ein möglicher Grund für den fehlenden Tumorschutz könnte in der ineffizienten Aufnahme der Tumorantigene durch die dendritischen Zellen liegen. In früheren Studien wurde die Wirksamkeit tumorlysatzbeladener DC außerdem nur in der Präimmunisierungssituation gezeigt, so dass die Ergebnisse schwer mit der therapeutischen Gabe verglichen werden können.

Ein weiteres Verfahren, Tumorantigene in dendritische Zellen zu internalisieren, beruht auf der Transfektion mit Tumor-RNS. Auch diese Strategie bietet den Vorteil einer Immunisierung gegen eine Vielzahl tumorassoziierter Antigene. In der vorliegenden Arbeit wurde Gesamt-A20-Tumor-RNS mittels Lipidtransfektion in dendritische Zellen eingeführt. Durch die Vakzinierung mit A20-RNS-beladenen DC konnte jedoch kein signifikanter Tumorschutz erreicht werden. Lediglich in der Gruppe, die mit LPS-stimulierten A20-RNS-beladenen DC behandelt wurde, überlebte eine Maus. Boczkowski et al. (1996) erreichten hingegen im B16-Melanom-Modell der Maus nach Immunisierung mit Tumor-RNS-transfizierten DC eine signifikante Reduktion der Lungenmetastasierung. Ashley et al. (1997) zeigten, dass dendritische Zellen, die mit Tumor-RNS oder unfraktionierten Tumorextrakten beladen wurden, sowie GM-CSF-Gen-transfizierte Tumorzellen hinsichtlich ihrer tumorprotektiven Wirkung gegen B16-ZNS-Metastasen der Maus gleichwertig waren. Jedoch

fiel der beobachtete Antitumor-Effekt gering aus: 40% der Mäuse überlebten eine darauf folgende Tumorgabe. In der Therapiesituation wurde mit RNS-transfizierten DC kein verlängertes Überleben erreicht.

Um die Antitumor-Wirkung RNS-transfizierter dendritischer Zellen zu verbessern, sind weitere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Mocikat in Vorbereitung. So wird zum Beispiel versucht, durch Elektroporation die Aufnahme der Tumor-RNS in DC zu optimieren.

2.3 Die Induktion einer Antitumor-Immunität durch triomzellbeladene DC

Die Vakzinierung mit Triomzellen ist ein potenter neuer immunologischer Ansatz für die Therapie maligner B-Zell-Lymphome, der auf der Redirektion von Tumorantigenen gegen professionelle antigenpräsentierende Zellen beruht. Triomzellen enthalten alle potenziellen Antigene der parentalen Lymphomzelle und exprimieren neben dem Lymphom-Idiotyp eine Spezifität gegen den Fc γ -Rezeptor-II auf DC. Über membranständige Immunglobuline können Triomzellen spezifisch an antigenpräsentierende Zellen binden und eine rezeptorvermittelte Antigeninternalisierung einleiten. Außerdem produzieren sie ein bispezifisches Immunglobulin, welches den Idiotyp und den APC-Bindungsarm vereint. Das Immunglobulin-Heterodimer kann nicht nur über seinen Fc-Teil Kontakt zu Fc-Rezeptor-tragenden Zellen herstellen; die anti-Fc γ -Rezeptor-Spezifität ermöglicht auch eine rezeptorvermittelte Internalisierung des Immunglobulins in APC.

Die Immunisierung mit Triomzellen führte bei 100% der behandelten Mäuse zu einem spezifischen und lang anhaltenden Tumorschutz, der sowohl von CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen abhängig war (Mocikat et al., 1997). Sogar etablierte Tumoren konnten durch eine einzige Triomzellinjektion geheilt werden (Strehl et al., 1999).

In dieser Arbeit sollte der Triomzellansatz zu einer *Ex-vivo*-Strategie modifiziert werden. Dendritische Zellen wurden *in vitro* mit Triomzellen inkubiert, und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, *in vivo* eine Antitumor-Immunität gegen das A20-Lymphom zu induzieren.

2.3.1 Vergleich von dendritischen Zellen, die mit Idiotyp oder bispezifischem Immunglobulin beladen wurden

Die Redirektion von Tumorantigenen gegen Internalisierungsrezeptoren auf dendritischen Zellen stellt einen wirksamen Ansatz dar, Antigene in DC zu internalisieren. Das ursprüngliche Ziel des Triomzellansatzes war es, den Lymphom-Idiotyp an APC

heranzuführen, indem ein bispezifisches Immunglobulin produziert wird, das den Idiotyp und den Fc γ -Rezeptor-Bindungsarm vereint. Die Immunisierung syngener Mäuse mit gereinigtem Triomzellprotein führte zu einer humoralen Reaktion gegen den Idiotyp (Kronenberger et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden DC mit gereinigtem bispezifischen Immunglobulin inkubiert. Während idiotypbeladene DC keine Antitumor-Immunität erzeugten, bewirkten dendritische Zellen, die mit dem bispezifischen Immunglobulin beladen wurden, eine geringe, aber signifikante Verlängerung der Überlebensdauer: 17% der behandelten Mäuse waren vor letalem Tumorwachstum geschützt. Zudem wurde durch die Vakzinierung eine humorale Immunantwort gegen den Idiotyp induziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Fc γ -Rezeptor-spezifische Redirektion des tumorspezifischen Idiotyps die Immunogenität der DC-Vakzine verbessert wurde. Dennoch spiegelte die humorale Antiidiotyp-Antwort nicht die Wirksamkeit der Tumorprotektion wider. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Beobachtung von Mocikat et al. (1997): Auch durch die direkte Immunisierung der Mäuse mit bispezifischem Immunglobulin ließ sich nur ein geringer Überlebensvorteil erzielen, obwohl in den behandelten Mäusen idiotypspezifische Antikörper nachweisbar waren.

2.3.2 Vergleich von dendritischen Zellen, die mit Triomzellen oder A20-Lymphomzellen beladen wurden

Durch die Applikation intakter BiV-Zellen konnte *in vivo* ein 100%iger Tumorschutz erzielt werden (Mocikat et al., 1997). Kronenberger et al. (2002) erklärten das verbesserte Überleben gegenüber der Vakzinierung mit löslichem bispezifischen Immunglobulin mit der zusätzlichen Immunisierung gegen weitere Tumorantigene. Denn die Triomzellen, die aus einer Fusion von A20-Tumorzellen mit dem anti-FcR-Hybridom hervorgegangen waren, sollten potenziell alle Antigene der naiven Lymphomzelle enthalten.

Um dendritische Zellen mit Antigenen zu beladen, wurden DC und Triomzellen in einem 1:1-Verhältnis kokultiviert. Da Triomzellen selbst einen Tumorschutz generieren können, wurden die APC nach der Kokultur separiert und die gereinigte DC-Vakzine subkutan appliziert. Die Vakzinierung tumorerekrankter Mäuse mit triomzellbeladenen DC bewirkte eine signifikant verlängerte Überlebensdauer: 33% der Mäuse entwickelten einen systemischen, lang anhaltenden Tumorschutz. Wurde den DC nach der Internalisierungsphase ein Reifungsstimulus durch Zugabe von Lipopolysacchariden angeboten, konnte die Überlebensrate zusätzlich leicht verbessert werden.

Triomzellbeladene dendritische Zellen verlängerten gegenüber lymphomzellbeladenen DC die Überlebensdauer signifikant und induzierten bei einem Teil der Mäuse eine schützende Antitumor-Immunität. Das Ergebnis zeigt, dass die Redirektion von Tumorantigenen, einschließlich des Idiotyps, gegen Fc-Rezeptor-tragende dendritische Zellen die Internalisierung von Antigenen *ex vivo* entscheidend verbessert und eine Voraussetzung für die tumorprotektive Wirkung der DC-Vakzine darstellt. Dennoch konnte das von Strehl et al. (1999) beschriebene Protektionsniveau von 100%, das nach direkter Applikation von Triomzellen in tumortragende Mäuse erzielt wurde, nicht erreicht werden.

Für die effektive Antigenaufnahme scheint die direkte Interaktion zwischen der intakten Triomzelle, die die anti-FcR-Spezifität auf ihrer Oberfläche exprimiert, und FcR-positiven DC nötig zu sein. Denn dendritische Zellen, die mit lysierten BiV-Zellen beladen wurden, bewirkten nur einen marginalen Tumorschutz. Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigen diese Hypothese: Kronenberger et al. (2002) zeigten, dass der unmittelbare Fc-Rezeptor-vermittelte Kontakt zwischen intakter Triomzelle und antigenpräsentierender Zelle *in vivo* entscheidend für einen optimalen Tumorschutz ist.

Gegenüber DC, die mit gereinigtem bispezifischen Immunglobulin beladen wurden, zeigten triomzellbeladene DC eine verbesserte Wirksamkeit in der Therapie maligner B-Zell-Lymphome. Die Beladung mit Triomzellen bietet den Vorteil einer Vakzinierung gegen eine Vielzahl tumorrelevanter Antigene, die durch die Triomzelle an die APC herangeführt werden. Die breite T-Zell-Antwort gegen tumorassoziierte Antigene verhindert, dass sich der Tumor durch eine einzelne Antigenmutation der Immunantwort entziehen kann. Es werden nach Prozessierung verschiedene Epitope MHC-Klasse-I- und -II-restringiert gegenüber CD8⁺- bzw. CD4⁺-T-Zellen präsentiert.

Die Triomzellen enthalten neben tumorspezifischen Antigenen auch Strukturen, die von normalen hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Die Gefahr, dass antigenbeladene DC eine Autoimmunreaktion auslösen, die sich gegen das normale Gewebe richtet, aus dem der Tumor hervorgegangen ist, wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Die Immuntherapie mit dendritischen Zellen, die gegen gewebespezifische Antigene gerichtet waren, löste in einer Studie in den behandelten Mäusen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes oder eine Myokarditis aus (Ludewig et al., 2000). Dagegen zeigten Vierboom et al. (1997), dass Selbst-Antigene in Tumoren als Zielstrukturen für zytotoxische T-Lymphozyten dienen können, ohne dass gesundes Gewebe angegriffen wird. Auch in einer weiteren Studie führten tumorlysatsbeladene DC zu keiner Autoimmunreaktion gegen Selbst-Antigene (Fields et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden bei den therapierten Mäusen keine Anzeichen einer Autoreaktivität gefunden.

Das *in vitro* induzierte Differenzierungsstadium beeinflusst die Funktion applizierter antigenbeladener dendritischer Zellen *in vivo* (Banchereau et al. 2001). CD4⁺-T-Zellen

können nach wiederholter Stimulation mit unreifen DC zu IL-10-produzierenden, nicht-proliferierenden regulatorischen T-Zellen differenzieren. So führte die Gabe unreifer, nicht jedoch reifer peptidbeladener DC in gesunden Patienten zu einer antigenspezifischen Inhibition der T-Zell-Effektorfunktion (Dhodapkar et al., 2001). Diese Daten rechtfertigen den Einsatz reifer DC in der Immuntherapie. Allerdings können reife DC gegenüber unreifen APC exogene Antigene schlechter aufnehmen. Regnault et al. (1999) zeigten zum Beispiel, dass die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigenen in reifen DC blockiert ist. In unreifen dendritischen Zellen hingegen induziert die Antigeninternalisierung über Fc γ -Rezeptoren die DC-Reifung und die wirksame MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation exogen aufgenommener Peptide. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb unreife DC mit Tumorantigenen beladen. Gegenüber reifen DC bieten diese den Vorteil einer verbesserten Antigeninternalisierung. Die Zugabe eines Reifungsstimulus nach der Internalisierungsphase lässt die DC von einer antigenaufnehmenden zu einer antigenpräsentierenden Zelle werden. Durch die Maturierung wird die Zahl an MHC-I- und -II-Molekülen erhöht, und kostimulierende sowie T-Zell-interagierende Moleküle wie CD80, CD86, CD40, LFA-3 und ICAM-1 werden vermehrt exprimiert. Auch setzt die Produktion bestimmter Zytokine (z.B. IL-12, IL-10, IL-18) ein, die naive T-Zellen anlocken und zu einer T-Zell-Polarisierung führen (Banchereau et al. 2000). Die Applikation reifer DC ist deshalb für die Aktivierung von T-Effektorzellen wichtig und verhindert die Induktion regulatorischer T-Zellen, welche die T-Zell-Antwort inhibieren.

2.4 Mechanismen der Antitumor-Immunität

Die Wirksamkeit dendritischer Zellen bei der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen bildet die Grundlage der DC-basierten Immuntherapie gegen maligne Tumoren. Der Idiotyp maligner B-Zell-Lymphome enthält Epitope, die von Antikörpern (Campbell et al., 1987), CD4⁺- (Lauritzsen et al., 1994) und CD8⁺-T-Zellen (Chakrabarti et al., 1992) erkannt werden. Timmerman et al. (2000) zeigten, dass dendritische Zellen, die mit dem Idiotyp und dem KLH-Trägerprotein beladen wurden, eine tumorprotektive Immunität auslösten. Der erzeugte Schutz war mit einer starken humoralen Antwort gegen den Idiotyp assoziiert und nicht von T-Effektorzellen abhängig. In der vorliegenden Arbeit induzierten triomzellbeladene DC nur niedrige Antiidiotyp-Titer verglichen mit dendritischen Zellen, die mit dem bispezifischen Immunglobulin inkubiert wurden. Bezogen auf den Tumorschutz zeigte sich indessen eine umgekehrte Rangfolge: Obwohl nur niedrige Antikörper-Titer nachweisbar waren, führte die Immunisierung mit triomzellbeladenen DC zu einem signifikanten Antitumor-Effekt. Daraus

kann die Folgerung gezogen werden, dass zytotoxische Antikörper nur eine untergeordnete Bedeutung für die Tumorphrotektion haben.

Im Triomzellansatz sind sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺-T-Zellen für die Induktion der Antitumor-Immunität nötig (Mocikat et al., 1997). Aus der Milz BiV-immunisierter Mäuse ließen sich zudem nach *In-vitro*-Stimulation A20-spezifische Effektorzellen isolieren (Kronenberger et al., 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in Depletionsversuchen festgestellt, dass für die Tumorabstoßung nach Vakzinierung mit triomzellbeladenen DC sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Lymphozyten absolut erforderlich sind (nicht gezeigt). Offensichtlich werden nach Antigenaufnahme MHC-Klasse-I- und -II-restringierte Epitopsequenzen präsentiert. Wie Regnault et al. (1999) zeigten, können über die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme in DC exogene Peptide sehr effizient über MHC-Klasse-I-Moleküle gegenüber CD8⁺-T-Zellen kreuzpräsentiert werden. Die aufgenommenen Antigene finden im Zytosol aber auch Zugang zum MHC-Klasse-II-Weg, so dass CD4⁺-Zellen gegen spezifische Antigene stimuliert werden können. CD4⁺-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Tumormunität. In Anwesenheit spezifischer CD4⁺-T-Helferzellen zeigen CD8⁺-T-Effektorzellen *in vivo* eine verbesserte Proliferation und Persistenz (Rooney et al., 1998). Typ1-Helferzellen steigern über die Zytokin-Produktion und die APC-Aktivierung Qualität und Quantität der CTL-Antwort. Th1-Zellen können außerdem selbst zytotoxische Effektorfunktionen gegen Tumorzellen wahrnehmen (Egeter et al., 2000).

2.5 Inhibition der Funktion dendritischer Zellen nach Inkubation mit GM-CSF-produzierenden Triomzellen

Strehl et al. (1999) zeigten in Präimmunisierungsversuchen, dass die Antigen-Redirektion durch die Triomzelle gegen APC und GM-CSF-vermittelte Effekte synergistisch auf den Tumorschutz wirken. Für die Therapie etablierter Tumoren gilt dies jedoch nicht. Während BiV-Zellen 100% der behandelten Mäuse vor Tumorwachstum schützten, bildeten GM-CSF-Gen-transfizierte Triomzellen keine Antitumor-Immunität.

GM-CSF fördert das Wachstum und die Reifung dendritischer Zellen. Außerdem besitzt das Zytokin eine immunstimulierende Funktion, indem es die Expression kostimulierender Moleküle auf der DC-Oberfläche induziert. Durch die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Bindung der Triomzellen an dendritische Zellen könnte der stimulierende GM-CSF-Effekt gehemmt werden. Diese Hypothese bestätigte sich jedoch nicht. Denn es war möglich, durch die Kultivierung mit GM-CSF-produzierenden Triomzellen aus hämatologischen Vorläuferzellen dendritische Zellen zu bilden. Diese MHC-Klasse-II-positiven Zellen exprimierten im Vergleich

zu DC, die mit löslichem GM-CSF-Protein generiert wurden, eine ähnliche Dichte an kostimulierenden Molekülen.

Allerdings induzierten dendritische Zellen, die mit GM-CSF-Gen-transfizierten Triomzellen beladen wurden, keinen Tumorschutz. Nach Beladung mit GM-CSF-produzierenden A20-Zellen konnten die DC dagegen eine Immunantwort bilden. Der GM-CSF-Transfer in A20-Zellen bewirkt also eine verbesserte Antigenaufnahme gegenüber unveränderten Lymphomzellen. Der Tumorschutz triomzellbeladener DC wird hingegen durch die Expression von GM-CSF in den Triomzellen beseitigt. Es ist deshalb anzunehmen, dass es zu einer hemmenden Wechselwirkung zwischen dem GM-CSF-Signal und der Fc γ -Rezeptor-Bindung kommt.

Zum einen könnte durch den GM-CSF-Transfer in die Triomzellen die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Antigeninternalisierung blockiert werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass durch die gleichzeitige Bindung von GM-CSF und intaktem bispezifischen Immunglobulin an verschiedene Rezeptoren der dendritischen Zelle ein inhibierendes Signal gesendet wird.

2.6 Ausblick

Viele neue immunologische Therapieansätze benutzen die antigenpräsentierenden Funktionen dendritischer Zellen, um eine Immunantwort gegen Tumoren zu induzieren. Die Ergebnisse zahlreicher Tierversuche bilden die Grundlage für erste klinische Studien mit antigenbeladenen DC. Die Vakzinierung mit Idiotyp-beladenen DC zeigte in Patienten mit malignen B-Zell-Lymphomen erste Erfolge (Timmerman et al., 2002). Die optimale Methode, um Antigene *ex vivo* wirksam in DC zu internalisieren, ist aber noch nicht gefunden.

Die Triomzellvakzinierung zählt zu den potentesten immuntherapeutischen Ansätzen gegen maligne Lymphome, die in einem Tiermodell beschrieben wurden (Mocikat et al., 1997; Strehl et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Triomzellbehandlung zu einem *Ex-vivo*-Ansatz modifizieren lässt. Die Vakzinierung tumorerkrankter Mäuse mit triomzellbeladenen dendritischen Zellen führte zu einem signifikant verzögerten Tumorwachstum und in bis zu 50% der Fälle zu einem lang anhaltenden Tumorschutz.

Wahl et al (2003) zeigten in einer präklinischen Studie, dass der Triomzellansatz auf das humane System übertragen werden kann. *In vitro* konnte eine spezifische T-Zell-Antwort gegen B-CLL-Zellen generiert werden. Die Inkubation dendritischer Zellen mit Triomzellen *ex vivo* hätte den Vorteil, dass der Patient keine xenogenen Triomzellen erhalten würde, weil gereinigte autologe antigenpräsentierende DC als Immunisierungszellen verabreicht würden.

So könnte die Behandlung mit triomzellbeladenen DC eine wirksame adjuvante Immuntherapie von B-CLL-Patienten darstellen.

Die Therapie großer Tumoren würde jedoch die Möglichkeiten einer DC-basierten Vakzinierung übersteigen. Zukünftige klinische Studien müssten sich auf Patienten mit minimaler Resterkrankung, also auf Patienten in Remission oder mit Mikrometastasierung, konzentrieren. Um größere Tumormassen zu bekämpfen, sind konventionelle Therapieformen, wie Operation, Chemotherapie oder Bestrahlung, weiterhin unverzichtbar.

E ZUSAMMENFASSUNG

Krebs zählt neben den Herz-Kreislaferkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Auf Grund der zunehmenden Lebenserwartung wird die Zahl der onkologischen Erkrankungen in den Industrienationen voraussichtlich weiter zunehmen. Obwohl bei der Behandlung maligner Tumoren in den letzten Jahrzehnten beachtliche Erfolge erzielt wurden, können viele Krebserkrankungen bis heute nicht geheilt werden. Zukunftsweisende Therapiekonzepte zielen darauf ab, das Immunsystem in die Lage zu versetzen, Krebszellen zu erkennen und zu zerstören.

Die vorliegende Arbeit untersucht Vakzinierungsstrategien mittels dendritischer Zellen zur Bildung einer Immunantwort gegen das A20-B-Zell-Lymphom der Maus. Dendritische Zellen internalisieren und prozessieren Antigene, präsentieren den T-Lymphozyten tumorabgeleitete Peptide und liefern wichtige kostimulierende Signale für die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen. Die Immunisierung mit DC stellt deshalb ein interessantes Therapiekonzept dar, um die ineffiziente Induktion einer Immunantwort durch die maligne B-Zelle zu umgehen.

Bei dem Versuch, mit antigenbeladenen dendritischen Zellen eine Antitumor-Immunität zu induzieren, wurde beobachtet, dass die Immunisierung mit *unbeladenen* dendritischen Zellen 100% der Mäuse vor einem nachfolgend verabreichten letalen A20-Tumorinokulum schützte. Dabei wurden syngene reife DC verwendet, welche aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks durch Kultivierung in Gegenwart von GM-CSF gebildet wurden. Obwohl die dendritischen Zellen nicht mit Tumorantigenen in Kontakt gekommen waren, induzierten sie eine primäre Abstoßung des A20-Lymphoms sowie ein lang anhaltendes tumorspezifisches T-Zell-Gedächtnis. Experimente mit CD40-defizienten Mäusen und Zelldepletionsversuche zeigten, dass für die CTL-Induktion keine CD4⁺-T-Zellen erforderlich waren. Sowohl die primäre Tumorabstoßung als auch das lang anhaltende CTL-Gedächtnis waren die Folge einer Aktivierung natürlicher Killerzellen durch die transferierten DC. Die aktivierten NK-Zellen besaßen neben der zytotoxischen Antitumor-Aktivität, die für die primäre Abstoßung wichtig war, auch eine stimulierende Funktion für die CTL-Induktion. Die Interaktion zwischen unbeladenen dendritischen Zellen und NK-Zellen induzierte tumorzellspezifische zytotoxische T-Lymphozyten, ohne den T-Helferarm des Immunsystems zu benötigen.

An der CD4⁺-Zell-unabhängigen CTL-Induktion waren die Zytokine IFN- γ und IL-12 sowie *endogene* DC maßgeblich beteiligt. Es wurde eine Kaskade beschrieben, die nach DC-vermittelter NK-Zell-Aktivierung die Bildung zytotoxischer T-Lymphozyten bewirkt: Aktivierte

NK-Zellen produzieren IFN- γ und stimulieren endogene DC zur IL-12-Synthese. Die Sekretion von IL-12 führt zur Induktion der tumorspezifischen CTL-Antwort.

Die Aktivierung der DC/NK-Zell-Achse war abhängig vom Differenzierungsstadium der applizierten DC. Die stimulierenden Signale, die NK-Zellen von unreifen DC erhielten, erwiesen sich als zu schwach, um die CD4⁺-Hilfe für die CTL-Induktion zu umgehen. Sowohl die kostimulierenden Oberflächenmoleküle als auch die Zytokinproduktion reifer DC schienen für die effiziente NK-Zell-Aktivierung wichtig zu sein.

Der NK-Zell-abhängige Tumorschutz war auf das A20-Lymphom beschränkt. Die Vakzinierung mit unbeladenen DC schützte weder vor dem MPC11-B-Zell-Lymphom noch vor dem CT-26-Kolonkarzinom. Auch *in vitro* zeigten DC-aktivierte NK-Zellen nur gegen A20-Zellen eine zytotoxische Aktivität, nicht aber gegen MPC11- oder CT26-Zellen. Die unterschiedliche Expression der NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen erklärte die selektive NK-Zell-Reaktivität gegen A20-Zellen. Der Antitumoreffekt wurde *in vivo* vollständig aufgehoben, wenn die NKG2D-Liganden auf den A20-Lymphomzellen mit einem NKG2D-Tetramer blockiert wurden.

Die Tumorspezifität der T-Zell-Immunität nach Vakzinierung mit unbeladenen dendritischen Zellen resultierte aus der Existenz gemeinsamer Antigene von A20-Zellen und *ex vivo* differenzierten DC. Diese Antigene waren allerdings nur schwach immunogen wirksam, da unbeladene DC in tumortragenden Mäusen keine protektive Wirkung erzeugten.

Da unbeladene DC in der Therapiesituation nicht schützten, konnte dieses Versuchssystem benutzt werden, um etablierte A20-Lymphome mit dendritischen Zellen zu behandeln, die *ex vivo* mit Tumorantigenen beladen wurden. Die Therapie einer bereits bestehenden Neoplasie stellt zwar ein labileres Versuchssystem dar, entspricht aber der klinischen Situation, in der ein erkrankter Organismus behandelt werden soll.

Maligne B-Zell-Lymphome besitzen mit dem Immunglobulin-Idiotyp eine tumorspezifische, aber schwach immunogene Zielstruktur für immuntherapeutische Ansätze. Deshalb wurden in der vorliegenden Studie dendritische Zellen *ex vivo* unter anderem mit gereinigtem A20-Idiotyp inkubiert, um *in vivo* idiotypabgeleitete Peptide zu präsentieren und eine antigenspezifische Immunantwort zu induzieren. Die Immunisierung mit idiotypbeladenen DC ergab jedoch keinen Überlebensvorteil für die behandelten Mäuse. Auch nach Inkubation mit einem Fusionsprotein, das den Idiotyp und das Zytokin GM-CSF enthielt, schützte die DC-Vakzine nicht vor Tumorwachstum. Um eine Immunantwort gegen multiple Antigene zu ermöglichen, wurden DC mit lysierten und intakten A20-Zellen oder A20-RNS beladen. Auch in diesen Therapieversuchen bildeten die tumorantigenbeladenen DC keine schützende Immunität.

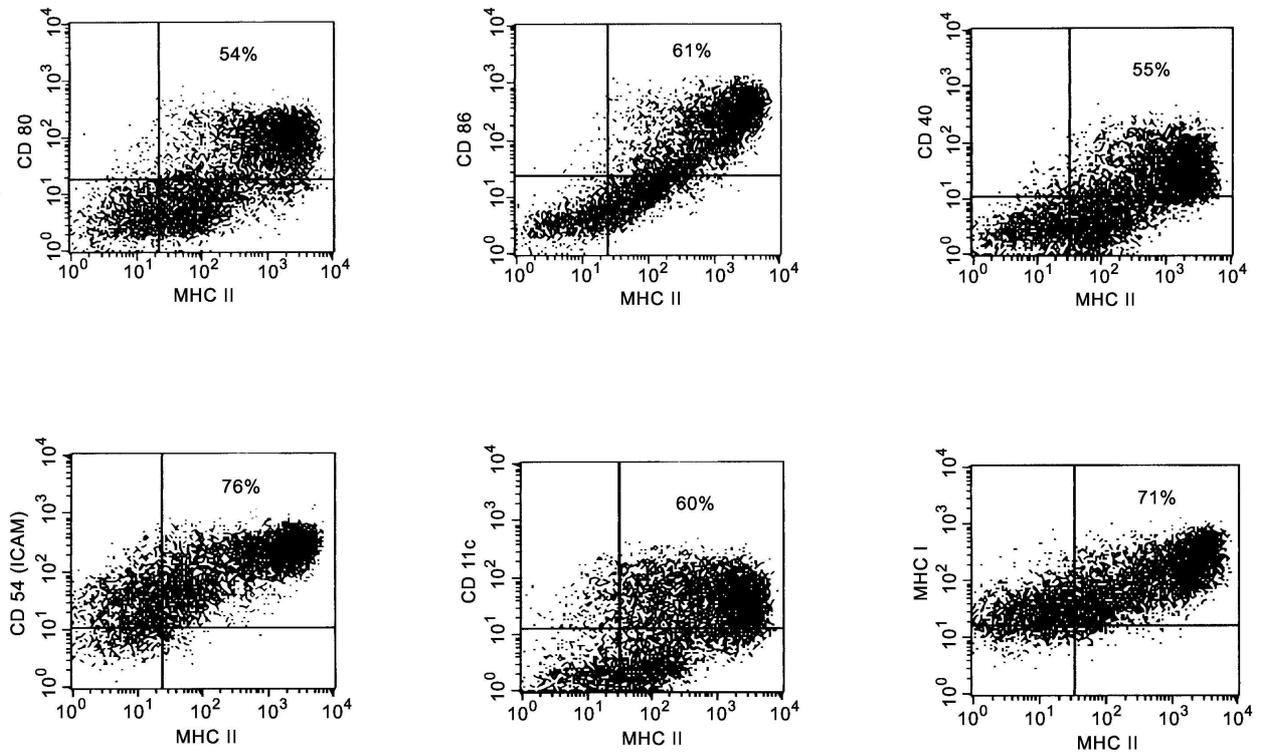
Die Triomzellvakzinierung zählt zu den potentesten immuntherapeutischen Ansätzen gegen maligne Lymphome. Dieser Ansatz beruht darauf, Tumorantigene spezifisch an antigenpräsentierende Zellen heranzuführen. Murine A20-Lymphome wurden mit der Hybridomzelllinie 2.4G2 fusioniert, die einen Antikörper gegen den Fc γ -Rezeptor-II auf der Oberfläche dendritischer Zellen exprimieren. Die entstandenen Triomzellen enthalten einerseits potenziell alle Antigene der parentalen Lymphomzelle und exprimieren andererseits eine anti-Fc γ -Rezeptor-Spezifität. Mit dem anti-Fc γ -Rezeptor-Anteil wird die gesamte Triomzelle durch membranständig exprimierte Antikörper in Kontakt mit der DC gebracht. Triomzellen produzieren zum Teil auch ein bispezifisches Immunglobulin, das den Lymphom-Idiotyp und den APC-Bindungsarm umfasst. Das bispezifische Immunglobulin ermöglicht eine Fc γ -Rezeptor-spezifische Redirektion gegen DC. Dies führt zur Antigenaufnahme durch die DC, zur Prozessierung und zur Präsentation tumorabgeleiteter Peptide. Die Immunisierung mit Triomzellen konnte selbst in einem erkrankten Organismus eine lang anhaltende tumorprotektive Immunantwort generieren.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, die Triomzellvakzinierung in einen *Ex-vivo*-Ansatz umzuwandeln. So wurde die Antigeninternalisierung der DC durch die spezifische Redirektion gegen Fc γ -Rezeptoren entscheidend verbessert. Dendritische Zellen, die mit bispezifischem Immunglobulin beladen wurden, induzierten eine starke humorale Immunantwort gegen das A20-Lymphom und verlängerten das Überleben der Mäuse signifikant. Nach Inkubation mit intakten Triomzellen konnten durch die Gabe antigenpräsentierender DC bis zu 50% der Mäuse geheilt werden. Die Bildung einer Immunantwort gegen multiple tumorrelevante Antigene, die durch die Triomzelle an die APC herangeführt werden, erklärte die verbesserte Überlebensrate gegenüber der Beladung mit bispezifischem Immunglobulin.

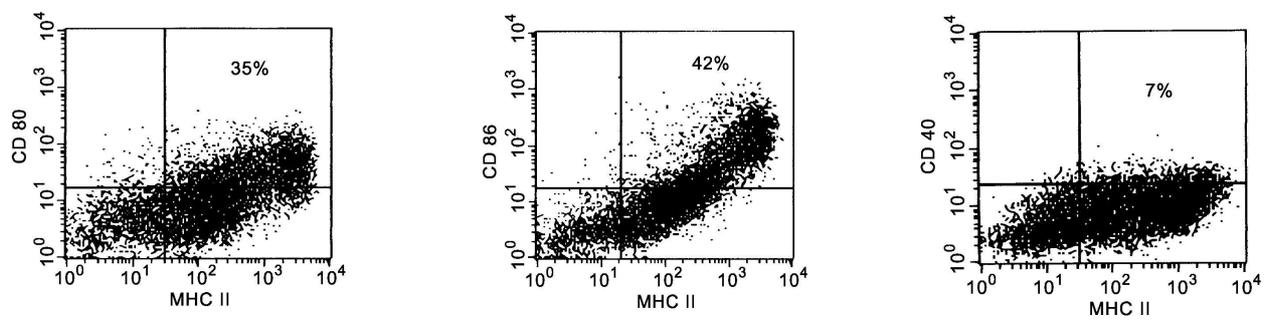
Auch die Gabe GM-CSF-produzierender Lymphomzellen hat sich in einigen Studien als wirksam erwiesen. Allerdings lässt sich ein bestehender Tumor mit GM-CSF-Gen-transfizierten Triomzellen nicht heilen. Deshalb wurden GM-CSF-Gen-veränderte A20- und Triomzellen im *Ex-vivo*-Ansatz untersucht. Tumortragende Mäuse konnten mit DC nach Inkubation mit GM-CSF-produzierenden A20-Zellen erfolgreich therapiert werden. Die Beladung mit GM-CSF-exprimierenden Triomzellen hatte hingegen keinen Erfolg. Es ist denkbar, dass die GM-CSF-Expression in den Triomzellen mit der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Antigeninternalisierung interferiert. Diese Hypothese unterliegt derzeit weiteren intensiven Untersuchungen.

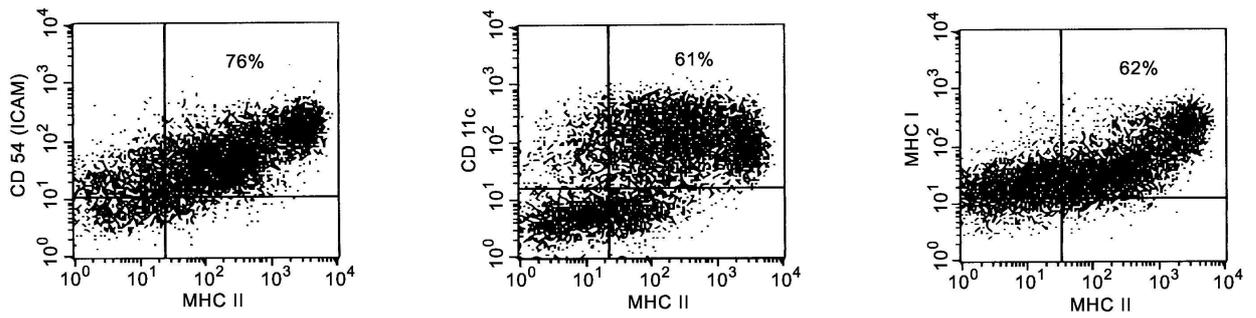
F ANHANG

1 FACS-Analyse reifer dendritischer Zellen

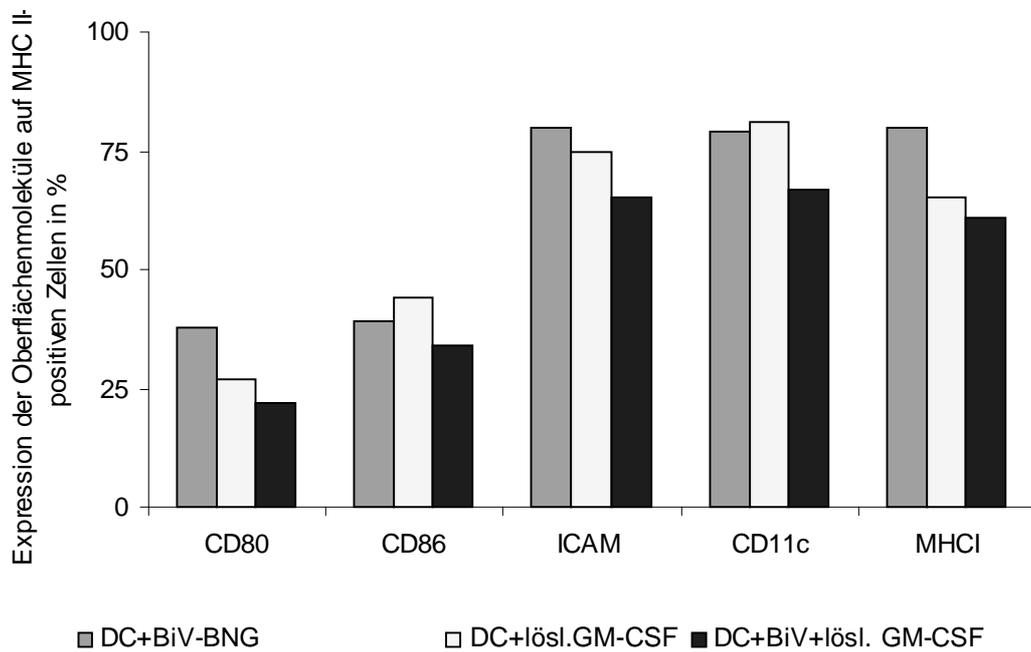


2 FACS-Analyse unreifer dendritischer Zellen





3 Vergleich dendritischer Zellen, die mit GM-CSF-transfizierten Triomzellen inkubiert wurden, mit DC, die mit löslichem GM-CSF generiert wurden.



G LITERATURVERZEICHNIS

Abbas A.K., Murphy K.M. & Sher A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.

Adam C., King S., Allgeier T., Braumüller H., Lücking C., Mysliwietz J., Kriegeskorte A., Busch D.H., Röcken M. & Mocikat R. (2005): DC-NK cell cross-talk as a novel CD4⁺ T cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106: 338-344.

Ashley D.M., Faiola B., Nair S., Hale L.P., Bigner D.D. & Gilboa E. (1997): Bone Marrow-generated Dendritic Cells Pulsed with Tumor Extracts or Tumor RNA Induce Antitumor Immunity against Central Nervous System Tumors. *J. Exp. Med.* 186: 1177-1182.

Banchereau J. & Steinman R.M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.

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

Banchereau J., Schuler-Thurner B., Palucka A.K. & Schuler G. (2001): Dendritic Cells as Vectors for Therapy. *Cell* 106: 271-274.

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L. & Spies T. (1999): Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729.

Bennett S.R.M., Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J.F.A.P. & Heath W.R. (1998): Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393: 478-480.

Biassoni R., Cantoni C., Pende D., Sivori S., Parolini S., Vitale M., Bottino C. & Moretta A. (2001): Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.* 181, 203-214.

Blattmann J.N. & Greenberg P.D. (2004): Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science* 305: 200-205.

Boczkowski D., Nair S.K., Snyder D. & Gilboa E. (1996): Dendritic Cells Pulsed with RNA are Potent Antigen-presenting Cells In Vitro and In Vivo. *J. Exp. Med.* 184: 465-472.

Boon T. & van der Bruggen P. (1996): Human Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 725-729.

Brattain M.G., Strobel-Stevens J., Fine D., Webb M. & Sarrlf A.M. (1980): Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res.* 40: 2142-2146.

Bromberg J.F., Horvath C.M., Wen Z., Schreiber R.D. & Darnell J.E. Jr. (1996): Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 7673-7678.

Brossart P., Wirths S., Brugger W. & Kanz L. (2001): Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp. Hematol.* 29: 1247-1255.

Burnet F. M. (1967): Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1(7501): 1171-1174.

Busch D.H., Pilip I.M., Vijn S. & Pamer E.G. (1998): Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8: 353-362.

Campbell M.J., Carroll W., Kon S., Thielemans K., Rothbard J.B., Levy S. & Levy R. (1987): Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular responses elicited by tumor-derived immunoglobulin M and its molecular subunits. *J Immunol.* 139: 2825-2833.

Carayannopoulos L.N., Naidenko O.V., Fremont D.H. & Yokoyama W.M. (2002): Murine IUL16-Binding Protein-Like Transcript 1: A Newly Described Transcript Encoding a High-Affinity Ligand for Murine NKG2D. *J. Immunol.* 169: 4079-4083.

Carbone E., Ruggiero G., Terrazzano G., Palomba C., Manco C., Fantana S., Spits H., Karre K. & Zappacosta S. (1997): A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.* 185: 2053-2060.

Carmichael A.G. & Ratzan R.M. (Hrsg.) (1994): *Medizin In Literatur und Kunst.* Könenmann Verlagsgesellschaft.

Castellino F., Boucher P.E., Eichelberg K., Mayhew M., Rothman J.E., Houghton A.N. & Germain R.N. (2000): Receptor-mediated uptake of antigen/heat-shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J. Exp. Med.* 191: 1957-1964.

Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A. & Alber G. (1996): Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184: 747-752.

Cerwenka A., Bakker A.B., McClanahan T., Wagner J., Wu J., Phillips J.H. & Lanier L.L. (2000): Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12: 721-727.

Cerwenka A., Baron J.L. & Lanier L.L. (2001): Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *PNAS* 98: 11521-11526.

Chakrabarti D. & Ghosh S.K. (1992): Induction of syngeneic cytotoxic T lymphocytes against a B cell tumor. II. Characterization of anti-idiotypic CTL lines and clones. *Cell Immunol.* 144: 443-454.

Chambers B.J., Salcedo M. & Ljunggren H.G. (1996): Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* 5: 311-317.

Chang M.H., Chen C.J., Lai M.S., Hsu H.M., Wu T.C., Kong M.S., Liang D.C., Shau W.Y. & Chen D.S. (1997): Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *New Engl. J. Med.* 336: 1855-1859.

Chiodoni C., Paglia P., Stoppacciaro A., Rodolfo M., Parenza M. & Colombo M.P. (1999): Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40-ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naïve mice for a cytotoxic T-lymphocyte response. *J. Exp. Med.* 190: 125-133.

Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G. & Ravetch J.V. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6: 443-446.

Coley W. B. (1893): The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 105: 487-511.

Cooper M.A., Fehninger T.A. & Caligiuri M.A. (2001): The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunol.* 22: 633-640.

Cooper M.A., Fehninger T.A., Fuchs A., Colonna M. & Caligiuri M.A. (2004): NK cell and DC interactions. *Trends in Immunol.* 25: 47-52.

Cosman D., Müllberg J., Sutherland C.L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M. & Chalupny N.J. (2001): ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14: 123-133.

Coughlin C.M., Salhany K.E., Gee M.S., LaTemple D.C., Kotenko S., Ma X., Gri G., Wysocka M., Kim J.E., Liu L., Liao F., Farber J.M., Pestka S., Trinchieri G. & Lee W.M. (1998): Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 9: 25-34.

Coughlin C.M., Salhany K.E., Wysocka M., Aruga E., Kurzawa H., Chang A.E., Hunter C.A., Fox J.C., Trinchieri G. & Lee W.M. (1998): Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 101: 441-452.

Coulie P. (1997): Human tumor antigens recognized by T cells: new perspectives for anti-cancer vaccines. *Mol. Med. Today* 3: 261-268.

Dhodapkar M.V., Steinman R.M., Krasovsky J., Munz C. & Bhardwaj N. (2001): Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193: 233-238.

Diefenbach A., Jamieson A.M., Liu S.D., Shastri N. & Raulet D.H. (2000): Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.* 1: 119-126.

Diefenbach A., Jensen E.R., Jamieson A.M. & Raulet D.H. (2001): Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumor immunity. *Nature* 413: 165-171.

Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D.M. & Mulligan R.C. (1993): Vaccination with irradiated tumour cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3539-3545.

Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J. & Schreiber R.D. (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3: 991-998.

Egeter O., Mocikat R., Ghoreschi K., Dieckmann A. & Röcken R. (2000): Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type I cells from nontransgenic mice. *Cancer Res.* 60: 1515-1520.

Espinoza-Delgado I. (2002): Cancer Vaccines. *The Oncologist* 7: 20-33.

Fehniger T.A., Cooper M.A., Nuovo G.J., Cella M., Facchetti F., Colonna M. & Caligiuri M.A. (2003): CD56^{bright} natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T-cell derived IL-2 : a potential link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101: 3052-3057.

Ferlazzo G. & Münz C. (2004): NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells. *J. Immunol.* 172: 1333-1339.

Ferlazzo G., Tsang M.L., Moretta L., Melioli G., Steinman R.M. & Münz C. (2002): Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 195: 343-351.

Fernandez N.C., Lozier A., Flament C., Ricciardi-Castagnoli P., Bellet D., Suter M., Perricaudet M., Tursz T., Marakovsky E. & Zitvogel L. (1999): Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5: 405-411.

Fields R.C., Shimizu K. & Mulé J.J. (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.

Flamand V., Sornasse 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: 605-610.

Fong L. & Engleman E. (2000): Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 245-273.

Gatza E. & Okada C.Y. (2002): Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells are more effective than TCR Id protein vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma. *J. Immunol.* 169: 5227-5235.

Geldhof A.B., Van Ginderachter J., Liu Y., Noël W., Raes G. & De Baetselier P. (2002): Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation. *Blood* 100: 4049-4058.

Gerosa F., Baldani-Guerra B., Nisii C., Marchesini V., Carra G. & Trinchieri G. (2002): Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195: 327-333.

Glas R., Franksson L., Une C., Eloranta M.L., Ohlen C., Orn A. & Karre K. (2000): Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J. Exp. Med.* 191: 129-138.

Gabrilovich D.I., Chen H.L., Girgis K.R., Cunningham H.T., Meny G.M., Nadaf S., Kavanaugh D. & Carbone D.P. (1996): Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2: 1096-1103.

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

Graf N., Adam C. & Mocikat R. (2003): Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo. *Int. J. Cancer* 105: 217-220.

Groh V., Wu J., Yee C. & Spies T. (2002): Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734-738.

Huang L.Q., Brasseur F., Serrano A., De Plean E., van der Bruggen P., Boon T. & van Pel A. (1996): Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on human melanoma. *J. Immunol.* 162: 6849-6854.

Huang A.Y., Bruce A.T., Pardoll D.M. & Levitsky H.I. (1996): Does B7-1 expression confer antigen-presenting cell capacity to tumors in vivo? *J. Exp. Med.* 183: 769-776.

Hsu F.J., Benike C., Fagnoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E.G. & Levy R. (1996): Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2: 52-58.

Hyman R. (1973): Studies of surface antigen variants. Isolation of two complementary variants for Thy-1.2. *J. Natl. Cancer Inst.* 50: 415-422.

Hurwitz A., Yu T.F., Leach D.R. & Allison J.P. (1998): CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 10067-10071.

Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S. & Steinman R.M. (1992): Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693-1702.

Jaffee E.M., Hruban R.H., Biedrzycki B., Laheru D., Schepers K., Sauter P.R., Goemann M., Coleman J., Grochow L., Donehower R.C., Lillemoe K.D., O' Reilly S., Abrams R.A., Pardoll D.M., Cameron J.L. & Yeo C.J. (2001): Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J. Clin. Oncol.* 19: 145-156.

Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C.W., Xiong N., Carlyle J.R. & Raulet D.H. (2002): The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing. *Immunity* 17: 19-29.

Janeway C.A., Travers P., Walport M. & Shlomchik M. (2002): *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

Kelly J.M., Darcy P.K., Markby J.L., Godfrey D.I., Takeda K., Yagita H. & Smyth M.J. (2002a): Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat. Immunol.* 3: 83-90.

Kelly J.M., Takeda K., Darcy P.K., Yagita H. & Smyth M.J. (2002b): A role for IFN- γ in primary and secondary immunity generated by NK cell-sensitive tumor-expressing CD80 in vivo. *J. Immunol.* 168: 4472-4479.

Kim K.J., Kanellopuolos-Langevin C., Merwin R.M., Sachs D.H. & Askofsky R. (1979): Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J. Immunol.* 122: 549-555.

King C.A., Wills M.R., Hamblin T.J. & Stevenson F.K. (1993): Idiotypic IgM on a B-cell surface requires processing for recognition by anti-idiotypic T-cells. *Cell Immunol.* 147: 411-424.

Klaman L.D. & Thorley D.A. (1995): Characterization of the CD48 gene demonstrated a positive element that is specific to Epstein-Barr virus-immortalized B-cell lines and contains an essential NK- κ B site. *J. Virol.* 69: 871-881.

Kronenberger K., Dieckmann A., Selmayr M., Strehl J., Wahl U., Lindhofer H., Kraal G. & Mocikat R. (2002): Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells. *Blood* 99: 1327-1331.

Kumar A., Commane M., Flickinger T.W., Horvath C.M. & Stark G.R. (1997): Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278: 1630-1632.

Lanier L.L. (2000): Turning On Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* 191: 1259-1262.

Lanier L.L. (2001): On guard – activating NK cell receptors. *Nat. Immunol.* 2: 23-27.

Lascov R. & Scharff M.D. (1970): Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. I. Adaption of the Merwin plasma cell tumor-11 to culture, cloning and characterization of gamma globulin subunits. *J. Exp. Med.* 131: 515-541.

Lauritzsen G.F., Weiss S., Dembic Z. & Bogen B. (1994): Naive idiotype-specific CD4⁺ T cells and immunosurveillance of B-cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5700-5704.

Lindhofer H., Mocikat R., Steipe B. & Thierfelder S. (1995): Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J. Immunol.* 155: 219-225.

Löffler A., Kufer P., Lutterbüse R., Zettl F., Daniel P.T., Schwenkenbecher J.M., Riethmüller G., Dörken B. & Bargou R.C. (2000): A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19xCD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95: 2098-2103.

Long E.O. (1999): Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 875-904.

Ludewig B., Ochsenbein A.F., Odermatt B., Paulin D., Hengartner H. & Zinkernagel R.M. (2000): Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 191: 795-803.

Mackey M.F., Gunn J.R., Maliszewski C., Kikutani H., Noelle R.J. & Barth R.J. (1998): Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J. Immunol.* 161: 2094-2098.

Mailliard R.B., Son Y.-I., Redlinger R., Coates P.T., Giermasz A., Morel P.A., Storkus W.J. & Kalinski P. (2003): Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J. Immunol.* 171: 2366-2373.

Martin-Fontecha A., Assarsson E., Carbone E., Karre K. & Ljunggren H.G. (1999): Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2). *J. Immunol.* 162: 5910-5916.

Medzhitov R. & Janeway C. Jr. (2000): The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 8: 452-456.

Mocikat R., Selmayr M., Thierfelder S. & Lindhofer H. (1997): Trioma-based Vaccination against B-Cell Lymphoma Confers Long-Lasting Tumor Immunity. *Cancer Research* 57: 2346-2349.

Mocikat R., Braumüller H., Gumy A., Egeter O., Ziegler H., Reusch U., Bubeck A. Louis J., Mailhammer R., Riethmüller G., Koszinowski U. & Röcken M. (2003): Natural Killer Cells Activated by MHC Class I^{low} Targets Prime Dendritic Cells to Induce Protective CD8 T cell Responses. *Immunity* 19: 561-569.

Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Biassoni R., Mingari M.C. & Moretta L. (1996): Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 619-648 .

Moser M. (2003): Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity* 19: 5-8.

Nakajima H., Cella M., Langen H., Friedlein A. & Colonna M. (1999): Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur. J. Immunol.* 29: 1676-1683.

Nieda M., Okai M., Tazbirkova A., Lin H., Yamaura A., Ide K., Abraham R., Juji T., Macfarlane D.J. & Nicol A.J. (2004): Therapeutic activation of V α 24⁺ V β 11⁺ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 103: 383-389.

Paglia P., Chiodoni C., Rodolfo M. & Colombo M.P. (1996): Murine Dendritic Cells Loaded In Vitro with Soluble Protein Prime Cytotoxic T Lymphocytes against Tumor Antigen In Vivo. *J. Exp. Med.* 183: 317-322.

Papac R.J. (1996): Spontaneous regression of cancer. *Cancer. Treat. Rev.* 22: 395-423.

Pardoll D.M. (1998): Cancer vaccines. *Nature Medicine Vaccine Supplement* 4: 525-531.

Pardoll D.M. (2000): Therapeutic Vaccination for Cancer. *Clin. Immunol.* 95: 44-62.

Pardoll D.M. (2002): Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat. Rev.* 2: 227-238.

Parkhurst M.R., Salgaller M.L., Southwood S., Robbins P.F., Sette A., Rosenberg S.A. & Kawakami Y. (1996): Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.* 157: 2539-2548.

Pegram M., Hsu S., Lewis G., Pietras R., Beryt M., Sliwskowski M., Coombs D., Baly D., Kabbinavar F. & Slamon D. (1999): Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancer. *Oncogene* 18: 2241-2251.

Piccioli D., Sbrana S., Melandri E. & Valiante N.M. (2002): Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 195: 335-341.

Poggi A., Carosio R., Spaggiari G.M., Fortis C., Tambussi G., Dell'Antonio G., Cin E.D., Rubartelli A. & Zocchi M.R. (2002): NK cell activation by dendritic cells is dependent on LFA-1-mediated induction of calcium-calmodulin kinase II: Inhibition by HIV-1 Tat C-terminal domain. *J. Immunol.* 168: 95-101.

Porgador A. & Gilboa E. (1995): Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182: 255-260.

Qin Z. & Blankenstein T. (2000): CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12: 677-686.

Regnault A., Lankar D., Lacabanne V., Rodriguez A., Théry C., Rescigno M., Saito T., Verbeek S., Bonnerot C., Ricciardi-Castagnoli P. & Amigorena S. (1999): Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189: 371-380.

Ridge J.P., 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: 474-478.

Rooney C.M., Smith C.A., Ng C.Y., Loftin S.K., Sixbey J.W., Gan Y., Srivastava D.K., Bowman L.C., Krance R.A., Brenner M.K. & Heslop H.E. (1998): Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92: 1549-1555.

Rosenberg S.A., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L., Chang A.E., Schwartzentruber D.J., Aebersold P., Leitman S., Linehan W.M., Seipp C.A., et al. (1993): Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 622-632.

Schoenberger S.P., Toes R.E., van der Voort E.I., Offringa R. & Melief C.J. (1998): T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393: 480-483.

Schuler G. & Steinman R.M. (1997): Dendritic Cells as Adjuvants for Immune-mediated Resistance to Tumors. *J. Exp. Med.* 186: 1183-1187.

Selmayr M., Strehl J., Kremer J.-P., Kremmer E., Doenecke A., Hallek M., Menzel H., Thielemans K., Thierfelder S. & Mocikat R. (1999): Induction of tumor immunity by autologous B lymphoma cells expressing a genetically engineered idiotype. *Gene Therapy* 6: 778-784.

Selmayr M., Menzel H., Kremer J.-P., Thierfelder S. & Mocikat R. (2000): B-cell lymphoma idiotypes chimerized by gene targeting can induce tumor immunity. *Cancer Gene Therapy* 7: 501-506.

Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J. & Schreiber R.D. (2001): IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111.

Simons J.W., Jaffee E.M., Weber C.E., Levitsky H.I., Nelson W.G., Carducci M.A., Lazenby A.J., Cohen L.K., Finn C.C., Clift S.M., Hauda K.M., Beck L.A., Leiferman K.M., Owens A.H. Jr., Piantadosi S., Dranoff G., Mulligan R.C., Pardoll D.M. & Marshall F.F. (1997): Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex-vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res.* 57: 1537-1546.

Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712.

Slansky J.E., Rattis F.M., Boyd L.F., Fahmy T., Jaffee E.M., Schneck J.P., Margulies D.H. & Pardoll D.M. (2000): Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex. *Immunity* 13: 529-538.

Smyth M.J., Godfrey D.I. & Trapani J.A. (2001): A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2: 293-299.

Soiffer R., Lynch T., Mihm M., Jung K., Rhuda C., Schmollinger J.C., Hodi F.S., Liebster L., Lam P., Mentzer S., Singer S., Tanabe K.K., Cosimi A.B., Duda R., Sober A., Bhan A., Daley J., Neuberg D., Parry G., Rokovich J., Richards L., Drayer J., Berns A., Clift S., Dranoff G., et al. (1998): Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13141-13146.

Song W., Kong H.L., Carpenter H., Torii H., Granstein R., Rafii S., Moore M.A. & Crystal R.G. (1997): Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model tumor antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J. Exp. Med.* 186: 1247-1256.

Specht J.M., Wang G., Do M.T., Lam J.S., Royal R.E., Reeves M.E., Rosenberg S.A. & Hwu P. (1997): Dendritic cells retrovirally transduced with a model tumor antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J. Exp. Med.* 186: 1213-1221.

Staveley-O'Carroll K., Sotomayor E., Montgomery J., Borrello I., Hwang L., Fein S., Pardoll D. & Levitsky H. (1998): Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1178-1183.

Steinman R.M. & Mellman I. (2004): Immunotherapy: Bewitched, Bothered, and Bewildered No More. *Science* 305: 197-200.

Street S.E., Hayakawa Y., Zhan Y., Lew A.M., MacGregor D., Jamieson A.M., Diefenbach A., Yagita H., Godfrey D.I. & Smyth M.J. (2004): Innate Immune Surveillance of Spontaneous B Cell Lymphomas by Natural Killer Cells and $\gamma\delta$ T Cells. *J. Exp. Med.* 199: 879-884.

Strehl J., Selmayr M., Kremer J.-P., Hültner L., Lindhofer H. & Mocikat R. (1999): Gene therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified trioma cells. *Int. J. Cancer* 83: 133-120.

Takeda K., Oshima H., Hyakawa Y., Akiba H., Atsuta M., Kobata T., Kobayashi K., Ito M., Yagita H. & Okumara K. (2000): CD27-mediated activation of murine NK cells. *J. Immunol.* 164, 1741-1745.

Takeda K., Kaisho T. & Akira S. (2003): Toll like receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 335-376.

Tangye S.G., Phillips J.H., Lanier L.L. & Nichols K.E. (2000): Cutting edge: Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunol.* 165: 2932-2936.

Tao H. & Levy R. (1993): Idiotype/ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature* 362: 755-758.

Timmerman J.M. & Levy R. (1999): Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Med.* 50: 507-529.

Timmerman J.M. & Levy R. (2000): Linkage of Foreign Carrier Protein to a Self-Tumor Antigen Enhances the Immunogenicity of a Pulsed Dendritic Cell Vaccine. *J. Immunol.* 164: 4797-4803.

Timmerman J.M., Czerwinski D.K., Davis T.A., Hsu F.J., Benike C., Mei Hao Z., Taidi B., Rajapaksa R., Caspar C.B., Okada C.Y., van Beckhoven A., Liles T.M., Engleman E.G. & Levy R. (2002): Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99: 1517-1526.

Townsend S. E. & Allison J. P. (1993): Tumor rejection after direct costimulation of CD8 + T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259: 368–370.

Trinchieri G. (2003): Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 133-146.

Turner J.G., Rakhmievich A.L., Burdelya L., Neal Z., Imboden M., Sondel P.M. & Yu H. (2001): Anti-CD40 Antibody Induces Antitumor and Antimetastatic Effects: The Role of NK Cells. *J. Immunol.* 166: 89-94.

Unkeless J.C. (1979): Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* 150: 580-596.

van den Broeke L.T., Daschbach E., Thomas E.K., Andringa G. & Berzofsky J.A. (2003): Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J. Immunol.* 171: 5842-5852.

van Elsas A., Hurwitz A.A. & Allison J.P. (1999): Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-CTLA-4 and GM-CSF producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J. Exp. Med.* 190: 355–366.

Vierboom M.P., Nijman H.W., Offringa R., van der Voort E.I., van Hall T., van der Broek L., Fleuren G.J., Kenemans P., Kast W.M. & Melief C.J. (1997): Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 186: 695-704.

Wahl U., Nößner E., Kronenberger K., Gangnus R., Pohla H., Staeger M.S., Kolb H.-J., Hallek M. & Mocikat R. (2003): Vaccination against B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia with Trioma Cells: Preclinical Evaluation. *Clinical Cancer Research* 9: 4240-4246.

Walker P.R., Saas P. & Dietrich P.Y. (1998): Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 564-572.

Wilhelm M., Kunzmann V., Eckstein S., Reimer P., Weissinger F., Ruediger T. & Tony H.-P. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 102: 200-206.

Wang T., Niu G., Kortylewski M., Burdelya L., Shain K., Zhang S., Bhattacharya R., Gabilovich D., Heller R., Coppola D., Dalton W.W., Jove R., Pardoll D. & Yu H. (2004): Regulation of the innate and adaptive immune responses by STAT-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.* 10: 48-54.

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

Wolan D.W., Teyton L., Rudolph M.G., Villmow B., Bauer S., Busch D.H. & Wilson I.A. (2001): Crystal structure of the murine NK cell-activating receptor NKG2D at 1.95 Å. *Nat. Immunol.* 2: 248-254.

Wolfel T., Hauer M., Schneider J., Serrano M., Wolfel C., Klehmann-Hieb E., De Plaen E., Hankeln T., Meyer zum Buschenfelde K. H. & Beach D. (1995): A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281-1284.

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

Zinkernagel R.M. (2002): On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur. J. Immunol.* 32: 2385-2392.

Zitvogel L., Mayordomo J.I., Tjandrawan T., DeLeao A.B., Clarke M.R., Lotze M.T. & Storkus W.J. (1996): Therapy of Murine Tumors with Tumor Peptide-pulsed Dendritic Cells: Dependence on T Cells, B7 Costimulation, and T Helper Cell 1-associated Cytokines. *J. Exp. Med.* 183: 87-97.

Zitvogel L. (2002): Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J. Exp. Med.* 195: F9-F14.

H DANKSAGUNG

Mein Dank gilt im Besonderen Prof. Dr. med. Ralph Mocikat, der mir die Arbeit an diesem Thema ermöglicht hat. Er stand mir mit seinem ausgiebigen wissenschaftlichen Rat, hilfreichen Diskussionen und intensiver Betreuung jederzeit zu Seite. In den vielen Gesprächen durfte ich von ihm nicht nur die Grundlagen der wissenschaftlichen Theorie erlernen, auch die philosophischen Hintergründe haben meinen Horizont erweitert.

Der Institutsleitung unter Frau Prof. Dr. Dolores Schendel danke ich für das Überlassen des Arbeitsplatzes im Institut für Molekulare Immunologie der GSF.

Meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen Dr. Susan King, Carolin Lüking, Dr. Konrad Kronenberger, Thomas Allgeier, Dr. Ulrich Wahl sowie Dr. Bernhard Frankenberger gilt mein großer Dank für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Laborarbeit, für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und für das freundliche, offene Arbeitsklima.

Ohne die hervorragende technische Assistenz und Hilfestellung bei den Tierexperimenten wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Hierfür bedanke ich mich sehr herzlich bei Julika Jasny, Nicola Dierkes, Michael Hagemann und den Tierpflegerinnen des Tierstalls des GSF-Hämatologikums.

Schließlich möchte ich noch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danken, stellvertretend Dr. Josef Mysliwietz, Dr. Christine Falk sowie PD. Dr. Elfriede Nössner, die mir Anregungen und wissenschaftlichen Rat gegeben haben.

LEBENS LAUF

Name: Christian Erich Johannes Adam
 Geboren: 28.10.1976 in Bamberg
 Anschrift: Hans-Sachs-Str.15, 80469 München
 Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 - 1987 Grundschole, Bamberg
 1987 - 1996 Kaiser-Heinrich-Gymnasium, Bamberg
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,3

Zivildienst

Juli 96 - Aug. 97 Bayerisches Rotes Kreuz, Kreisverband Bamberg,
 Rettungsdienst

Hochschulbildung

Okt. 1997 - März 2004 Studiengang Humanmedizin
 an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Sept. 1999 Ärztliche Vorprüfung
 Sept. 2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 März 2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 22. April 2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 (Gesamtnote „sehr gut“; 1,49)

Famulaturen

März 2000 Steigerwaldklinik Burgebrach
 Abteilung für Chirurgie
 Sept. 2000 Städtisches Krankenhaus München Bogenhausen
 Abteilung für Kardiologie und Pneumologie
 März 2001 Dr. med. Bernhard Lux
 Facharzt für Urologie, Bamberg
 März 2002 Klinikum der Universität München – Großhadern
 Medizinische Klinik II - Gastroenterologie und Hepatologie
 Aug. 2002 Mount Sinai School of Medicine, New York
 Department of Paediatric Nephrology

Praktisches Jahr

April - Mai 2003 Klinikum der Universität München – Großhadern
 Medizinische Klinik III - Hämatologie und Onkologie
 Juni - Juli 2003 Klinikum der Universität München – Großhadern
 Medizinische Klinik II - Gastroenterologie und Hepatologie
 Aug. - Nov. 2003 Klinikum der Universität München – Großhadern
 Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin
 Dez. - März 2004 Klinikum der Universität München – Großhadern
 Chirurgische Klinik

Beruflicher Werdegang

seit Nov. 2004 Assistenzarzt an der Medizinischen Poliklinik der Universität
 München – Klinikum Innenstadt