

**Immuntherapie des Pankreaskarzinoms:
Etablierung eines *in vitro* – Modells für die Entwicklung einer
Tumorvakzine auf der Basis von Tumorzelllysat-gepulsten
dendritischen Zellen**

vorgelegt von
Peter Galambos
aus München
2003

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
(Leiter Prof. Dr. med. S. Endres)

der Medizinischen Klinik Innenstadt
Klinikum der Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Immuntherapie des Pankreaskarzinoms:
Etablierung eines *in vitro* – Modells für die Entwicklung einer
Tumorvakzine auf der Basis von Tumorzelllysat-gepulsten
dendritischen Zellen**

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

vorgelegt von
Peter Galambos
aus München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. B. Göke
Prof. Dr. med. R. Wank

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

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2003

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Einführung in das Thema und Ziele der Arbeit.....	1
1.2. Charakterisierung dendritischer Zellen.....	4
1.2.1. Differenzierung und Immunphänotypisierung dendritischer Zellen.....	4
1.2.2. Physiologie dendritischer Zellen.....	7
1.3. Dendritische Zellen als Tumorstoffe.....	10
1.3.1. Vakzinierungsstrategien.....	11
1.3.2. Klinische Tumorstoffungs-Studien mit dendritischen Zellen.....	15
2. <u>Material und Methoden</u>	17
2.1. Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen.....	17
2.1.1. Isolierung von Monozyten.....	17
2.1.2. Kultur dendritischer Zellen.....	18
2.2. Aktivierung dendritischer Zellen.....	18
2.3. Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Rasterelektronen-mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie.....	18
2.4. Beladung dendritischer Zellen mit Antigenen aus Tumorstoffe.....	19
2.4.1. Tumorstoffelinien.....	19
2.4.2. Kultur der Tumorstoffelinien.....	19
2.4.3. Herstellung eines Stoffe aus vitalen Tumorstoffen.....	19
2.4.4. Beladung dendritischer Zellen mit Tumorstoffe.....	20
2.5. Isolation von T-Zellen.....	20
2.6. Kokultur von Tumorstoffe-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen.....	21
2.6.1. HLA-Typisierung der Spender.....	21
2.6.2. Kryopräservierung von dendritischen Zellen.....	22
2.6.3. Stimulation autologer T-Zellen mit Tumorstoffe-gepulsten dendritischen Zellen.....	22
2.7. Durchflusszytometrie.....	24
2.7.1. Technische Beschreibung.....	24
2.7.2. Antikörper.....	25
2.7.3. Immunphänotypisierung dendritischer Zellen.....	25
2.7.4. Endozytose von FITC-Dextran.....	26
2.7.5. Immunphänotypisierung von T-Zellen.....	26

2.8. Zytokinnachweis (ELISA).....	26
2.8.1. IL-12-Produktion dendritischer Zellen.....	26
2.8.2. Nachweis von IL-12, IFN- γ und IL-4 in der autologen Kokultur....	27
2.9. Proliferationsbestimmung.....	27
2.9.1. „Gemischte Lymphozytenkultur“ (Allogene MLR).....	27
2.9.2. Tumorzelllysate-induzierte T-Zell-Proliferation.....	27
2.10. Zytotoxische T-Zell-Aktivität.....	28
3. Ergebnisse	30
3.1. Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen.....	30
3.1.1. Isolierung von Monozyten.....	30
3.1.2. Kultur dendritischer Zellen.....	31
3.1.3. Vergleich verschiedener Kulturbedingungen.....	33
3.2. Aktivierung dendritischer Zellen.....	35
3.2.1. Zellmorphologie.....	36
3.2.2. Oberflächenmarkerexpression.....	38
3.2.3. Endozytose-Aktivität dendritischer Zellen.....	41
3.2.4. Induktion der T-Zell-Proliferation.....	42
3.2.5. IL-12-Produktion.....	43
3.3. Beladung dendritischer Zellen mit Antigenen aus Tumorzelllysate.....	44
3.3.1. Dosisfindung.....	44
3.3.2. Einfluss von Tumorzelllysate auf die Aktivierung und Aktivierbarkeit dendritischer Zellen.....	46
3.4. Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen durch Kokultur von Tumorzell- lysate-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen.....	48
3.4.1. T-Zell-Zahl im Verlauf der Kokultur.....	48
3.4.2. Einfluss der Kokultur auf das Verhältnis CD4+ zu CD8+ T-Zellen und den Anteil CD3+ T-Zellen und CD16+ NK-Zellen.....	49
3.4.3. Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen.....	50
3.4.4. Messung der Zytokin-Freisetzung im Überstand der Kokulturen.....	52
3.4.5. Tumorzelllysate-induzierte T-Zell-Proliferation.....	53
3.5. Nachweis zytotoxischer T-Zell-Aktivität.....	55
3.5.1. Spezifische Tumorzell-Lyse.....	55

4. <u>Diskussion</u>	58
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	58
4.2. Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen.....	60
4.3. Aktivierung dendritischer Zellen.....	62
4.4. Beladung dendritischer Zellen mit Antigenen aus Tumorzelllysate.....	64
4.5. Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen durch Kokultur von Tumorzell- lysate-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen.....	70
4.6. Nachweis zytotoxischer T-Zell-Aktivität.....	75
4.7. Klinische Relevanz.....	79
4.7.1. Klinischer Einsatz Tumorzelllysate-gepulster dendritischer Zellen als Tumorstoffe.....	79
4.7.2. Klinischer Ausblick.....	80
5. <u>Zusammenfassung</u>	85
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	87
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	106
Danksagung.....	108
Veröffentlichungen.....	109
Lebenslauf.....	112

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema und Ziele der Arbeit

Nach Diagnosestellung eines Pankreaskarzinoms überleben nur 15 bis 20 % der Patienten das erste Jahr und die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 5 %. Die einzige kurative Therapie des Pankreaskarzinoms besteht in der vollständigen Resektion (Whipple'sche Operation) und ist aufgrund der frühen regionalen Ausbreitung und Fernmetastasierung nur in 10 bis 30 % der Fälle möglich (Rocha Lima und Centeno 2002). Die bisherigen adjuvanten Therapieansätze in Form von Strahlen- oder Chemotherapie haben sich als unzureichend herausgestellt und stellen nur einen palliativen Therapieansatz dar. Angesichts der schlechten Prognose erscheint das Pankreaskarzinom ein geeigneter Kandidatentumor um nach alternativen Therapieansätzen zu suchen (Rosenberg 2000). Das zunehmende Verständnis über die Potenz und Spezifität des Immunsystems bei der Abwehr maligner Erkrankungen hat zu einem großen Interesse und rasch expandierendem Wissen auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumoren geführt (Armstrong et al. 2001).

Vielversprechende Ansätze bei der zellgestützten Immuntherapie von Malignomen basieren auf dem Einsatz von dendritischen Zellen. Dendritische Zellen sind hocheffiziente Antigen-präsentierende Zellen und spielen als potente Stimulatoren naiver T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Initiierung spezifischer Immunantworten (Banchereau und Steinmann 1998). Im peripheren Gewebe lokalisierte dendritische Zellen sind in der Lage Antigene zu phagozytieren und zu immunogenen MHC-Peptid-Komplexen zu prozessieren (Sallusto et al. 1994). In Gegenwart von Entzündungsmediatoren ("danger signals") findet eine Aktivierung der dendritischen Zellen statt, die mit der Hochregulierung von MHC-, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen (Cella et al. 1997) und der Migration in die T-Zell-reichen Zonen regionaler Lymphknoten (Dieu et al. 1998) verbunden ist. Dort interagieren die dendritischen Zellen mit den Effektor-Zellen des Immunsystems und induzieren u.a. deren Differenzierung zu Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL; Young und Steinmann 1990). Die CTL spielen bei der effektiven Abwehr von Tumoren im Rahmen Th1-gerichteter Immunantworten eine besondere Rolle, da sie über ihren T-Zell-Rezeptor die Zielzellen mit Expression eines spezifischen Antigens erkennen und lysieren können.

Maligne Tumoren leiten sich von normalen Körperzellen ab, die eine maligne Transformation durchlaufen haben. Tumorzellen exprimieren oft mutierte oder dysregulierte Gene, die die Translation abnormer Proteine zur Folge haben. Diese als Tumor-assoziierte Antigene bezeichneten Proteine können vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden (Boon et al. 1994). Sowohl tierexperimentelle als auch klinische Daten weisen darauf hin, dass durch die Induktion einer Tumor-spezifischen Immunantwort selbst fortgeschrittene maligne Erkrankungen geheilt werden können (Pardoll 1998). Aufgrund der oben erwähnten Eigenschaften der dendritischen Zellen ist diese Leukozytenpopulation besonders geeignet, dem körpereigenen Immunsystem Tumor-assoziierte Antigene in einem immunogenen Kontext zu präsentieren und somit die Generierung Tumor-spezifischer CTL zu induzieren (Timmerman und Levy 1999). Potentielle Zielantigene bei der Immuntherapie des Pankreaskarzinoms sind das carcinoembryonale Antigen (CEA; Nair et al. 1999), Her-2/neu (Peiper et al. 1999), MUC-1 (Mukerjee et al. 2000), mutant ras (Kubuschok et al. 2002), p53 (McCarty et al. 1998) und Ganglioside (Chu et al. 2000).

Die Möglichkeit dendritische Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen zu generieren (Romani et al. 1994) und die Ergebnisse der ersten klinischen Studien (siehe 1.3.2, Tabelle 1) lassen eine auf dendritischen Zellen basierende Tumorthherapie vielversprechend erscheinen.

Um eine Tumorzelle mit dendritischen Zellen im Hinblick auf eine effiziente Antitumor-Aktivität zu optimieren, müssen eine Reihe von Fragen beantwortet werden. Bisher ist ungeklärt, inwieweit die Generierung von dendritischen Zellen aus verschiedenen Vorläuferzellen die Immunantwort gegen Tumoren beeinflusst. Es muss ferner geklärt werden, in welcher Form Tumor-assoziierte Antigene am wirksamsten aufbereitet werden und ob die Wirksamkeit der Vakzine durch die Aktivierung der dendritischen Zellen verbessert werden kann. Ebenfalls intensiv beforscht wird die Verwendung von immunstimulatorischen Substanzen wie KLH (keyhole limpet hemocyanin) oder bakteriellen DNS-Motiven (CpG-ODN), die als Adjuvantien die Induktion einer spezifischen Immunantwort steigern können (Fong und Engleman 2000, Steinman und Dhodapkar 2001).

Zur Beantwortung dieser Fragen sind bei der Entwicklung einer Tumorstoffimpfung neben Tiermodellen auch geeignete *in vitro*-Modelle notwendig, mit denen im humanen System eine gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort qualitativ und quantitativ beurteilt werden kann. Folgende Zielsetzungen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation formuliert:

- 1) Optimierung der Isolation und Kultur humaner dendritischer Zellen aus dem peripheren Blut im Hinblick auf eine reproduzierbare Zellzahl und Zellreinheit, sowie die Charakterisierung der dendritischen Zellen nach Morphologie, Immunphänotyp und funktionellen Eigenschaften
- 2) Systematischer Vergleich verschiedener Aktivatoren dendritischer Zellen im Bezug auf die Expression von Adhäsions-, Antigen-präsentierenden und kostimulatorischen Molekülen, der Endozytose-Aktivität, der T-Zell-stimulierenden Potenz, sowie der IL-12-Produktion
- 3) Erstellen eines Protokolls zur Beladung dendritischer Zellen mit Tumor-Antigenen aus einem Zelllysate von Pankreaskarzinomzelllinien
- 4) Etablierung eines *in vitro*-Modells zum quantitativen und qualitativen Nachweis der Induktion zytotoxischer T-Zellen durch Tumorzelllysate-gepulste dendritische Zellen

1.2 Charakterisierung dendritischer Zellen

1.2.1 Differenzierung und Immunphänotypisierung dendritischer Zellen

Der ersten Beschreibung dendritischer Zellen in der Haut im Jahre 1868 durch Langerhans folgte eine lange Zeit währende Spekulation über ihre Funktion. Erst als Steinmann und Cohn (1973) dendritische Zellen in der Mäusemilz als eine adhärente Zellpopulation mit einer distinkten sternförmigen Morphologie und langen Zytoplasmaausläufern identifizierten, wurden diese Zellen einer genaueren Charakterisierung zugänglich. In der Folgezeit wurden dendritische Zellen als ein neuer Zelltyp in den peripheren lymphatischen Organen bei Mäusen nachgewiesen (Steinmann et al. 1974) und später ähnliche Zellen auch im nicht-lymphatischen Gewebe beim Menschen und anderen Säugern identifiziert. Die gemeinsame Eigenschaft der aus verschiedenen Geweben isolierten dendritischen Zellen war ihre Fähigkeit zur Induktion Antigen-spezifischer Immunantworten (Steinmann et al. 1978). Diese These wurde durch frühe Hinweise gefestigt, dass dendritische Zellen eine wichtige Rolle in der zellulären Abstoßungsreaktion gegen Herz- und Nierentransplantate spielen (Hart et al. 1983, McKenzie et al. 1984).

Seit einigen Jahren ist es möglich dendritische Zellen aus Mäusen (Inaba et al. 1992) und Menschen (Romani et al. 1994) in großer Zahl zu generieren, was ihre Charakterisierung deutlich beschleunigt hat. Heute weiß man, dass es sich bei dendritischen Zellen um eine distinkte Leukozyten-Population handelt, die mit den Effektor-Zellen des angeborenen (Natürliche Killer [NK]- und NKT-Zellen) und adaptiven (T- und B-Lymphozyten) Immunsystems interagieren. Als hochspezialisierte Antigen-präsentierende Zellen spielen sie eine zentrale Rolle bei der Regulation von Immunantworten und der Induktion eines immunologischen Gedächtnisses. Dendritische Zellen sind einzigartig in ihrer Fähigkeit naive T-Zellen *de novo* zu Antigen-spezifischen Effektorzellen aktivieren zu können. Dieser Prozess wird als Priming bezeichnet (van Schooten et al. 1997).

Von anderen Leukozytenpopulationen lassen sich dendritische Zellen durch das Fehlen von Lineage-spezifischen Oberflächenmarker wie CD3 (T-Lymphozyten), CD14 (Monozyten/Makrophagen), CD19 (B-Lymphozyten) und CD16 (NK-Zellen) abgrenzen. Die immunphänotypische Charakterisierung dendritischer Zellen erfolgt über ihre Oberflächenexpression von Antigen-präsentierenden Molekülen (CD1, MHC I und II), Adhäsionsmolekülen (CD11,

CD54, CD58) und T-Zell-stimulierenden Molekülen (CD40, CD80, CD86). Als spezifische dendritische Zellmarker gelten DC-LAMP und CD83, die jedoch nur bei aktivierten dendritischen Zellen nachweisbar sind („Reifemarker“; de Saint-Vis et al. 1998, Zhou et al. 1995).

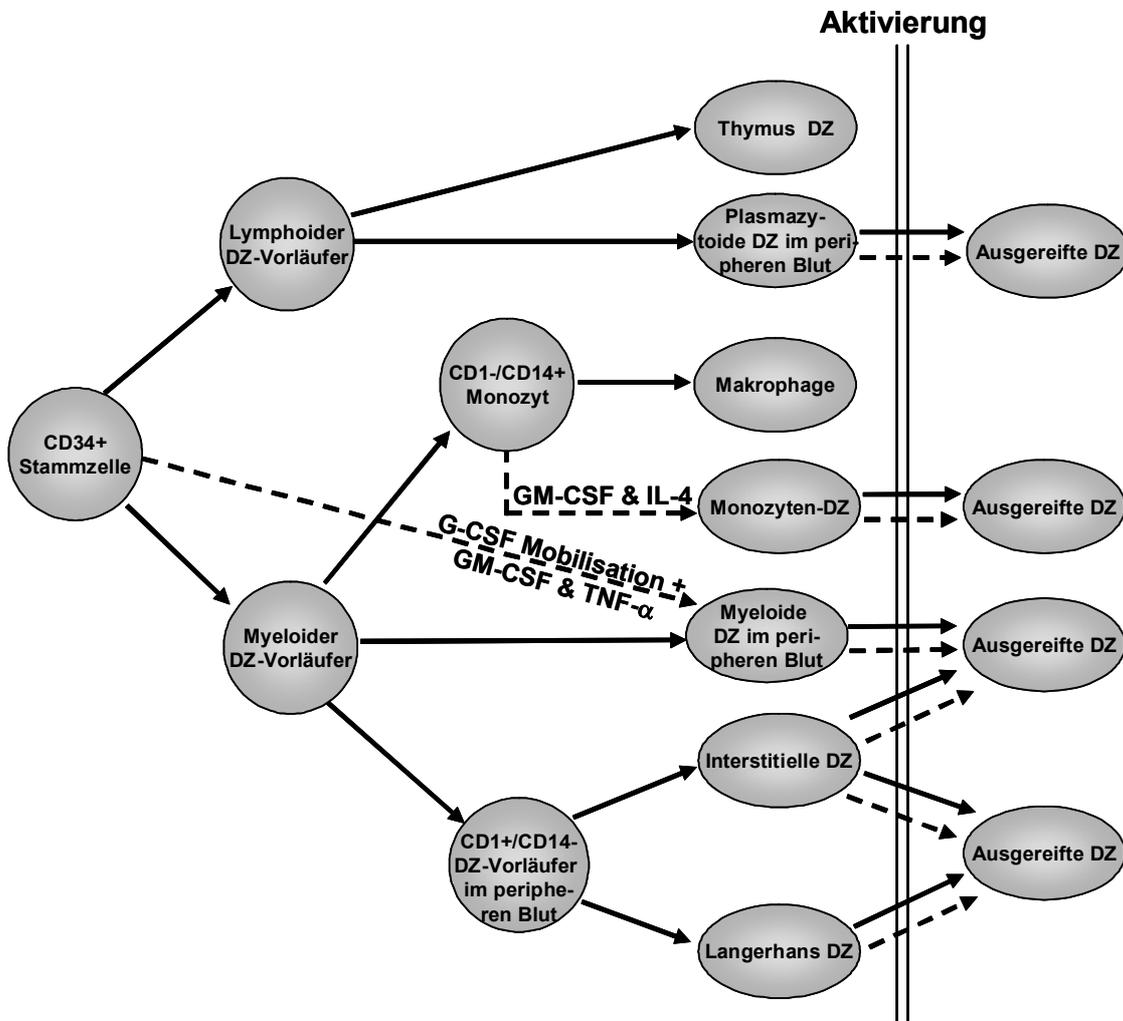


Abbildung 1 Hämatopoetischer Differenzierungsweg lymphoider und myeloider humaner dendritischer Zellen aus CD34+ Stammzellen *in vivo* (—) und *in vitro* (---; modifiziert nach Hart 1997 und Banchereau et al. 2000).

Dendritische Zellen entwickeln sich *in vivo* aus pluripotenten CD34+ Stammzellen des Knochenmarks. Je nach Differenzierung unterscheidet man lymphoide und myeloide dendritische Zellen (Abbildung 1). Aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich zum einen die Thymus-ständigen dendritischen Zellen, denen man tolerogene Eigenschaften zuschreibt. Sie sind in der Lage autoreaktive T-Zellen zu deletieren und verhindern somit unkontrollierte Immunreaktionen gegen gesundes Gewebe (Ardavín 1997). Zum anderen kommt es zur Differenzierung der plasmazytoiden dendritischen Zellen, denen

aufgrund ihrer Kapazität große Mengen IFN- α nach Aktivierung zu sezernieren, eine wichtige Rolle in der Abwehr viraler Erkrankungen zugeschrieben wird (Siegal et al. 1999, Cella et al. 1999).

Myeloide dendritische Zellen sind vor allem darauf spezialisiert eine Aktivierung und Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen zu induzieren und spielen in der Immunabwehr von als „fremd“ erkannten Strukturen eine entscheidende Rolle (Steinmann et al. 1991). Innerhalb der myeloiden Differenzierungsreihe entwickeln sich die CD34+ Stammzellen über eine myeloide Vorläuferzelle einerseits zu CD14+ Monozyten, die entweder im Blut verweilen oder bei Auswanderung in peripheres Gewebe zu Makrophagen differenzieren können. Zum anderen können aus der Vorläuferzelle auch direkt myeloide dendritische Zellen entstehen, die im Blut zirkulieren. Myeloide dendritische Zellen im peripheren Gewebe entwickeln sich über eine CD1+ Vorläuferzelle. Sie können als Langerhans-Zellen der Haut, sowie als gewebsständige dendritische Zellen in den Schleimhäuten und im Interstitium nachgewiesen werden (Hart 1997).

Die *in vitro* Gewinnung dendritischer Zellen ist über die direkte Isolation myeloider und lymphoider dendritischer Zellen aus dem peripheren Blut möglich. Die Zellausbeute ist aufgrund der geringen Frequenz der dendritischen Vorläuferzellen von 0,1-0,5 % der mononukleären Zellen (MNC) im peripheren Blut allerdings sehr gering. Wesentlich effizienter lassen sich größere Mengen an dendritischen Zellen durch die *in vitro* Kultur von Monozyten oder CD34+ Stammzellen generieren. Die fünftägige Kultur von Monozyten unter Zugabe der Zytokine GM-CSF und IL-4 resultiert in einer hohen Ausbeute an dendritischen Zellen, die alle Charakteristika *in vivo* beschriebener dendritischer Zellen zeigen (Romani et al. 1994). Alternativ können nach Mobilisierung mit GM-CSF die CD34+ hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripheren Blut isoliert werden, die *in vitro* in Gegenwart von GM-CSF und TNF- α um den Faktor 10-30 expandiert werden können und nach siebentägiger Kultur vergleichbare Eigenschaften wie dendritische Zellen zeigen (Siena et al. 1995). Über einen Aktivierungsschritt, auf den im Kapitel 1.2.2 genauer eingegangen wird, kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Ausreifung der dendritischen Zellen zu CD83+ Zellen induziert werden.

Trotz umfassender Grundlagenforschung ist ein genauer Differenzierungsweg der dendritischen Subpopulationen noch nicht abschließend geklärt. *In vitro* wurde wiederholt gezeigt, dass dendritische Zellen mit myeloider Differenzierung aus lymphoiden Vorläuferzellen generiert werden konnten,

sowie auch umgekehrt (Martín et al. 2000, Traver et al. 2000). Diese Befunde werfen zum einen die Frage nach der Existenz einer gemeinsamen dendritischen Vorläuferzelle auf, die in Abhängigkeit des gegebenen Zytokin-Profiles das Potential zur lymphoiden oder myeloiden Differenzierung hat. Zum anderen ist nach wie vor unklar, inwieweit die physiologische dendritische Zellentwicklung mit den verwendeten *in vitro* Modellen adequat nachgebildet werden kann (Ardavín et al. 2001).

1.2.2 Physiologie dendritischer Zellen

Für die Funktionsfähigkeit des Immunsystems ist die Differenzierung von harmloser oder gefährlicher Schädigung von essentieller Bedeutung. Hierfür haben die dendritischen Zellen eine wichtige regulatorische Funktion. Je nachdem in welchem Kontext ein Antigen von den dendritischen Zellen aufgenommen wird, entscheidet der daraus resultierende Aktivierungszustand über die Induktion einer tolerogenen oder abwehrenden Immunreaktion gegen das betreffende Antigen (Abbildung 2).

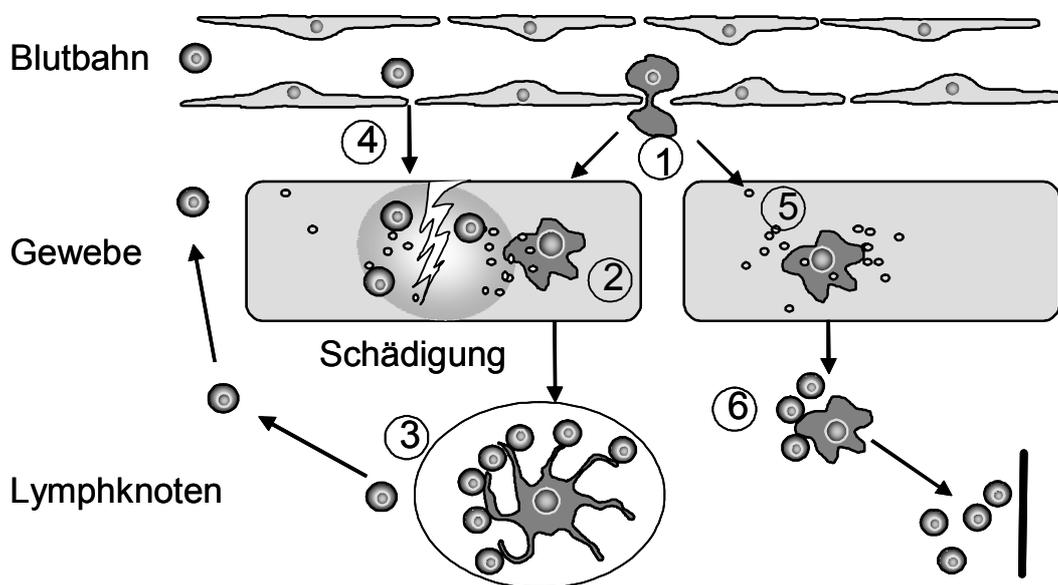


Abbildung 2 Dendritische Vorläuferzellen wandern aus den Blutgefäßen in das periphere Gewebe ein (1) und sind in der Lage als unreife dendritische Zellen Antigene aufzunehmen und zu prozessieren (2). In Gegenwart von Gefahrensignalen findet eine Aktivierung dendritischer Zellen und deren Migration in lymphatisches Gewebe statt. Dort kommt es u.a. zur Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen (3), die als Effektorzellen an den Ort der Gewebeschädigung einwandern (4). Fehlt am Ort der Antigenaufnahme das zusätzliche Gefahrensignal (5), kommt es durch die fehlende Aktivierung der dendritischen Zellen zur Induktion anergischer T-Zellen (6).

Dendritische Vorläuferzellen verlassen den Blutstrom und sind als „unreife“ dendritische Zellen im peripheren Gewebe nachweisbar. Die gewebständigen dendritischen Zellen verfügen über verschiedene Mechanismen der Antigenaufnahme durch Phagozytose, Makropinozytose mittels Mannose-, DEC 205- und Fc γ -Rezeptoren (Inaba et al. 1993, Sallusto et al. 1994, Steinmann et al. 1995) und Rezeptor-vermittelte Endozytose von apoptotischen Zellen (Albert et al. 1998). Nach intrazellulärer Zerkleinerung und Prozessierung der aufgenommenen Antigene werden kurze immunogene Peptid-Sequenzen auf MHC I- und II-Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert.

Erfolgt die Antigenaufnahme ohne weiteren Stimulus, verweilt die dendritische Zelle in ihrer „unreifen“ Zustandsform und hat tolerogene Eigenschaften. Regulatorische T-Zellen produzieren nach Interaktion mit unreifen dendritischen Zellen IL-10 und führen zur Anergie von Antigen-spezifischen T-Effektor-Zellen (Jonuleit et al. 2000, Dhodapkar et al. 2001). Dieser Mechanismus der peripheren Toleranz-Induktion schützt den Organismus vor Autoaggression gegen körpereigene Antigene (Hawiger et al. 2001).

Kommt es jedoch z.B. durch mikrobielle Pathogene zu einer lokalen Gewebeschädigung, führt die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und Prostaglandinen zur Aktivierung und der damit verbundenen Ausreifung dendritischer Zellen (Banchereau et al. 2000). Mikrobielle Produkte wie LPS und bakterieller DNS nachempfundene CpG-Motive (Hartmann et al. 1999), aus geschädigtem Gewebe freigesetztes ATP (Schnurr et al. 2000) und die Interaktion mit aktivierten T-Zellen über den CD40-Ligand (Cella et al. 1996) stellen weitere potente Gefahrensignale dar und aktivieren dendritische Zellen direkt über die Bindung an Oberflächenrezeptoren.

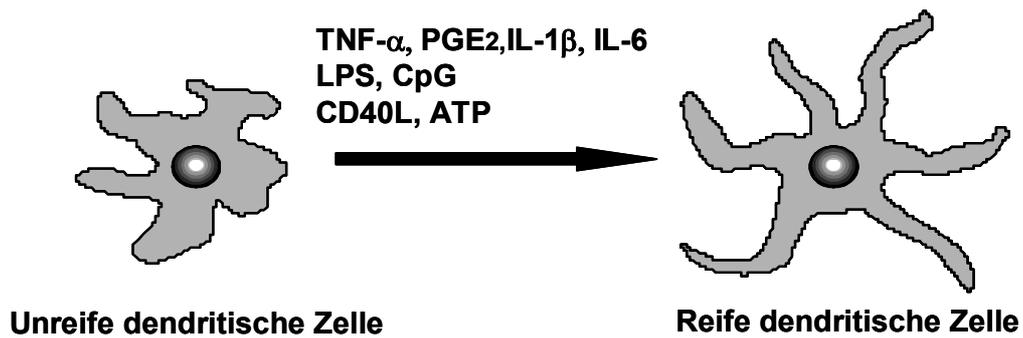
Wie in Abbildung 3 dargestellt, ist dieser Aktivierungsprozess verbunden mit einer reduzierten Antigenaufnahme und der Expression des „Reifemarkers“ CD83. Es kommt zu einer Hochregulierung von Adhäsions-, kostimulatorischen Molekülen und MHC-Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche mit einer bis zu 100-fach höheren Dichte im Vergleich zu anderen Antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen und B-Zellen (Inaba et al. 1997). Durch die Aktivierung und den Reifungsprozeß verlängert sich zudem die Halbwertszeit der MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche um den Faktor 10 (Cella et al. 1997). Die Kombination aus gesteigerter Expressionsdichte und -dauer gewährleistet eine hocheffiziente Präsentation der Antigene.

Die Expression von Chemokinrezeptoren wie CCR7 während des Reifungsprozesses bewirkt die Migration dendritischer Zellen über das efferente Lymphsystem in die T-Zell-reichen Zonen sekundärer lymphatischer Organe (Saeki et al. 1999). Die Sekretion weiterer Chemokine wie MIP-3 β und 6CKine fördert die Interaktion mit naiven T-Zellen (Ngo et al. 1998). T-Zellen mit dem Antigen-spezifischen Rezeptor werden aktiviert und differenzieren zu Antigen-spezifischen T-Effektor-Zellen. Die Interaktion mit aktivierten T-Zellen bedingt via der Rückkoppelung über deren CD40-Liganden eine Verstärkung der dendritischen Zell-Aktivierung und die Produktion von IL-12, welches die Ausprägung Th1-gerichteter Immunantworten fördert (Cella et al. 1996).

Die potentesten Effektor-Zellen einer Th1-gerichteten Immunantwort sind CD8+ CTL, die ihre Antigen-Epitope über die Präsentation auf MHC I-Molekülen erkennen. Von den bekannten Antigen-präsentierenden Zellen zeigen vor allem die dendritischen Zellen die Fähigkeit zur Präsentation extrazellulär aufgenommenen Antigen-Epitope über MHC I-Moleküle. Dieser Prozeß wird als „Cross-Priming“ bezeichnet und ermöglicht die Induktion zytotoxischer Immunantworten gegen extrazelluläre Antigene (Brossart et al. 1997).

Ein effektives „Cross-Priming“ wird durch das gleichzeitige Erkennen von MHC II-präsentierten Antigen-Epitopen durch die CD4+ T-Helfer (Th)-Zellen nachhaltig unterstützt. Die aktivierten CD4+ Th-Zellen produzieren Zytokine wie IL-2 und IFN- γ und schaffen ein optimales Milieu für die Expansion von CD8+ CTL (Bennett et al. 1997). Somit ermöglicht die gleichzeitige Präsentation relevanter Antigen-Epitope über MHC I- und II-Moleküle auf der Oberfläche aktivierter dendritischer Zellen die Induktion breitgefächerter und potenter Immunantworten.

Dendritische Zellen können als „Wächter des Immunsystems“ bezeichnet werden, die bei der Abwehr infektiöser und maligner Erkrankungen eine Schlüsselrolle spielen. Nach Aktivierung zeigen sie eine einzigartige Fähigkeit den T-Effektor-Zellen Antigene in einer stark immunogenen Form zu präsentieren und sind ein entscheidender Faktor für die Induktion einer effektiven Immunantwort (Banchereau et al. 2000). Ihre außerordentliche Potenz findet Ausdruck darin, dass eine einzige aktivierte dendritische Zelle in der Lage ist bis zu 3000 naive T-Zellen zu primen (Banchereau und Steinman 1998).



Oberflächenmarker:		
+	Adhäsionsmoleküle CD11, CD54, CD58	+ + +
+	Antigen-präsentierende Moleküle MHC I, MHC II	+ + +
+	Kostimulatorische Moleküle CD40, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2)	+ + +
-	Reifemarker CD83	+ +

Funktionelle Marker:		
+ +	Antigen-Aufnahme über Mannose-, Fcγ-, DEC-205-Rezeptoren Endozytose-Aktivität	- / +
- / +	Motilität	+ +
-	IL-12-Produktion, Chemokine (z.B. MIP-3β, 6CKine),	+ + +
+	T-Zell-stimulatorische Kapazität	+ + +

Abbildung 3 Charakteristika unreifer und reifer dendritischer Zellen
(modifiziert nach Timmerman und Levy 1999 und Banchereau et al. 2000)

1.3 Dendritische Zellen als Tumorstoffe

Tumoren exprimieren eine Reihe von Tumor-spezifischen Antigenen, die von T-Zellen erkannt werden können und somit potentielle Ziele für die Immuntherapie maligner Erkrankungen darstellen. Diese Tumor-assoziierten Antigene umfassen aufgrund von Genmutationen veränderte Proteine, reaktivierte embryonale Genprodukte, gewebespezifische Differenzierungsantigene und virale Proteine, die von normalen Körperzellen nur in geringen Maßen oder gar

nicht exprimiert werden (Boon et al. 1994, Rosenberg 1997). Trotz der Expression einer Reihe von potentiellen Ziel-Antigenen gelingt es dem Immunsystem in der Regel jedoch nicht, gegen diese oft nur gering immunogenen Antigene eine effektive Immunantwort zu induzieren.

Das Verständnis der zentralen Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem als hocheffiziente Antigen-präsentierende Zellen und potente Induktoren zellulärer Immunantworten hat die Hoffnung geweckt, durch ihren Einsatz als zelluläre Tumorstoffe eine wirksame Immunantwort gegen Malignome erzielen zu können. Im Tiermodell konnte nach Applikation von Tumor-Antigen-beladenen dendritischen Zellen die Induktion einer protektiven und therapeutischen Antitumor-Immunität nachgewiesen werden (Mayodormo et al. 1995, Zitvogel et al. 1996). Erste klinische Studien haben die Umsetzbarkeit dieses Konzeptes auch beim Mensch gezeigt. In den klinischen Phase I und II Studien wurden dendritische Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten isoliert, *ex vivo* mit Tumor-Antigenen beladen und den Patienten verabreicht. Nach dendritischer Zell-Vakzinierung konnte bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen die Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort, sowie in Einzelfällen ein klinisches Ansprechen beobachtet werden (siehe 1.3.2, Tabelle 1). In künftigen Studien muss nun untersucht werden, ob die Effizienz einer auf dendritischen Zellen basierenden Tumorstoffe durch neue Strategien verbessert und auch auf andere Malignome übertragen werden kann.

1.3.1 Vakzinierungsstrategien

Antigen-Aufbereitung zur *ex vivo* Beladung dendritischer Zellen

Im Hinblick auf eine effiziente Antigenpräsentation über die MHC-Moleküle existieren derzeit drei verschiedene Hauptstrategien die dendritischen Zellen mit Tumor-assoziierten Antigenen zu beladen. Zum einen können dendritische Zellen direkt mit definierten Tumor-Peptid-Epitopen gepulst werden. Zum anderen können dendritische Zellen mit vollständigen Proteinen aus Tumoren bzw. der Protein-kodierenden DNS und RNS beladen werden. Als dritte Alternative kann die Antigen-Herstellung aus unfraktioniertem Tumormaterial erfolgen.

Beim ersten Ansatz werden die MHC-Komplexe der dendritischen Zellen mit 8 bis 10 Aminosäuren langen Peptiden bekannter Sequenz in Abhängigkeit von der Antigen-Expression des Tumors und dem HLA-Haplotyp des Patienten von außen beladen (Turner et al. 1999, Banchereau et al. 2001, Fong et al. 2001). Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass die Peptidsequenzen in großer Menge synthetisiert werden können und keine Notwendigkeit mehr besteht die Tumor-Antigene des individuellen Patienten zu isolieren (Boon et al. 1996). Zudem wird wahrscheinlich durch die hohe Reinheit der Antigen-Aufbereitung die Wirksamkeit der Vakzine gegen diese Epitope gesteigert und zugleich die Gefahr der Induktion von Autoimmunreaktionen gegen gesundes Gewebe vermindert. Demgegenüber stehen die Nachteile der sehr aufwendigen Identifikation Tumor-assoziiertes Antigene und die Unklarheit, ob diese auch die effektivsten Epitope für die Tumorabstoßung darstellen. Zudem besteht das Risiko, dass durch die Entstehung von Tumor-Escape-Mutanten, die das entsprechende Antigen nicht mehr exprimieren, die Vakzine ihre Wirksamkeit verliert (Turner et al. 1999). Desweiteren sind die relevanten Peptide aufgrund der HLA-Restriktion nur bei HLA-gematchten Patienten einsetzbar, was bei seltenen HLA-Haplotypen eine Einschränkung der Anwendbarkeit darstellt.

Der zweite Ansatz der Antigen-Beladung mit Tumor-assoziierten Proteinen (Timmerman et al. 2002) bzw. der Transfektion der dendritischen Zellen mit deren kodierender DNS (Tuting et al. 1998) oder RNS (Heiser et al. 2002) ermöglicht die Generierung eines größeren immunogenen Peptid-Spektrums. Die Prozessierung der aufgenommenen bzw. translatierten Proteine zu immunogenen MHC-gebundenen Peptidsequenzen erfolgt intrazellulär, wodurch eine potentielle Immunantwort gegen mehrere Peptid-Epitope induziert wird, ohne die Limitationen durch eine HLA-Restriktion. Eine effektive Immunantwort kann aber nach wie vor nur gegen jene Tumorzellen induziert werden, die das betreffende Protein auch exprimieren, wodurch wieder Escape-Mutanten begünstigt werden (Timmerman und Levy 1999).

Der dritte Ansatz der Beladung dendritischer Zellen mit unfraktioniertem Tumormaterial aus Tumorzelllysate (Nestle et al. 1998, Geiger et al. 2001, Hernando et al. 2002), totaler zellulärer RNS (Nair et al. 2002), apoptotischen Tumorzellen (Albert et al. 1998), apoptotischen Körperchen (Exosomen; Wolfers et al. 2001) oder durch Fusion dendritischer Zellen mit Tumorzellen (Gong et al. 1998, Kugler et al. 2000) bietet den potentiellen Vorteil, dass durch die Präsentation multipler Epitope CTL gegen eine Vielzahl bekannter als auch noch unbekannter Tumor-assoziiertes Antigene induziert werden können. Die

Beladung mit dem gesamten antigenen Material aus Tumorzellen ist in der Therapie schwach immunogener Tumoren, für die noch keine effektiven Abstoßungsantigene identifiziert wurden, von großer Bedeutung und reduziert gleichzeitig das Risiko der Selektion von Antigen-Escape-Mutanten in den Tumoren bzw. deren Metastasen. Nachteile sind in der Notwendigkeit zu sehen, genügend Tumormaterial vom jeweiligen Patienten gewinnen zu müssen, sowie der potentiellen Gefahr der Induktion von Autoimmunreaktionen aufgrund der Vielzahl von Eigen-Antigenen im unfraktionierten Tumormaterial (Parmiani et al. 1993, Ludewig et al. 2000). Diese Befürchtung hat sich jedoch in bisherigen klinischen Studien nicht bestätigt. Desweiteren muss untersucht werden, ob bei der Verwendung von unfraktioniertem Tumormaterial die geringere Konzentration der einzelnen Tumor-Antigene in der Aufbereitung zu einer weniger effektiven Immunantwort gegen die relevanten Tumor-Epitope führt.

Verwendung von Adjuvantien

Neben der Optimierung der Antigen-Beladung stellt sich die Frage, ob sich die Effizienz der Immunantwort durch den Zusatz von Adjuvantien bei der Vakzineaufbereitung steigern lässt. Stark immunogene Proteine wie KLH fördern als Helferantigene die Aktivierung von CD4⁺ Th-Zellen und könnten eine Tumor-spezifische Immunantwort verstärken (Kwak et al. 1992, Nestle et al. 1998, Hörtl et al. 1999, Fong et al. 2001, Timmerman et al. 2002).

Generierung der dendritischen Zellen

Eine weiterer Parameter, der die Vakzinierungsstrategie beeinflusst, ist die Wahl der Vorläuferzellen aus denen die dendritischen Zellen generiert werden (siehe 1.2.1). Sowohl dendritische Zellen aus dem peripheren Blut, Monozyten-abgeleitete, als auch von CD34⁺ Stammzellen abgeleitete dendritische Zellen sind effektive Induktoren zytotoxischer T-Zellen *in vitro* und haben ihre Wirksamkeit in klinischen Studien gezeigt. *In vitro* Daten deuten allerdings darauf hin, dass CD34⁺ abgeleitete dendritische Zellen in ihrer Fähigkeit überlegen sein könnten Tumor-spezifische T-Zellen in Tumorpatienten zu aktivieren (Mortarini et al. 1997). Bisher fehlen Studien, die die Antigen-präsentierenden Eigenschaften der verschiedenen humanen dendritischen Zellpopulationen *in vivo* direkt miteinander vergleichen. Aufgrund der relativ einfachen Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes finden heute überwiegend diese Zellen klinische Verwendung (siehe Tabelle 1.3.2).

Zudem stellt sich bei der Generierung der Zellen die Frage, ob aktivierte und somit reifeinduzierte dendritische Zellen in ihrer Wirksamkeit den unreifen dendritischen Zellen überlegen sind. Neben der verstärkten Expression charakteristischer Oberflächenmarker, der Produktion von IL-12 und der gesteigerten T-Zell-stimulatorischen Potenz führt die Reifeinduktion zu einem stabilen Phänotyp der Zellen, der von einer weiteren exogenen Zugabe von Zytokinen unabhängig ist (Bender et al. 1996). Gerade nach der *in vivo* Applikation ist die anhaltende Immunogenität der dendritischen Zell-Vakzine für die Induktion effektiver Immunantworten von großer Bedeutung (Steinman und Dhodapkar 2001).

Die bisherigen Vakzinierungsstrategien lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen. Für die Entwicklung einer effektiven Tumorstoffvakzine ist entscheidend, den Einfluss verschiedener experimenteller Parameter auf die Immunantwort untersuchen zu können. Da es sehr aufwendig ist, diese Parameter in klinischen Studien zu optimieren, besteht ein Bedarf an *in vitro*-Modellen, in denen unterschiedliche Strategien bei der Vakzine-Entwicklung im Hinblick auf ihre potentielle klinische Wirksamkeit systematisch miteinander verglichen werden können.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, im Hinblick auf eine geplante klinische Phase II-Studie zur Vakzinierung von Patienten mit metastatischem Pankreaskarzinom mit Monozyten-abgeleiteten, Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen ein *in vitro*-Modell zu etablieren, mit dem sich qualitative und quantitative Aussagen zu verschiedenen Impfstrategien in einem präklinischen Kontext treffen lassen.

1.3.2 Klinische Tumorstimmungs-Studien mit dendritischen Zellen

	Tumor	Antigen (+Adjuvans)	Dendri-tische Zellen	Ergebnisse - Patientenzahl - Klinisch. Ansprechen ¹ - Immunol. Ansprechen ²
Hsu et al. <i>Nat Med</i> 1996 Stanford University	B-Zell-Lymphom	Immunglobulin-Idiotyp (+KLH)	PBDC; unreif	4 Pat. 1 CR, 1 MR, 2 SD 4 von 4 Pat.
Nestle et al. <i>Nat Med</i> 1998 Universität Zürich	Melanom	gp100, MART-1, MAGE-1 und -3, Tyrosinase-Peptide; autologes Tumorzellsat (+KLH)	Mo-DC; unreif	16 Pat. 2 CR, 3 PR, 1 MX 7 von 16 Pat.
Murphy et al. <i>Prostate</i> 1999 NW Hospital Seattle	Prostata-Karzinom	PSMA Peptid	Mo-DC; unreif	37 Pat. 1 CR, 10 PR, 8 SD 6 von 37 Pat.
Hörtl et al. <i>J Urol</i> 1999 Universität Innsbruck	Nierenzell-Karzinom	Autologes Tumorzellsat (+KLH)	Mo-DC; ausgereift	4 Pat. 1 PR 4 von 4 Pat.
Lim et al. <i>Int J Cancer</i> 1999 University of Wales	Multiples Myelom	Immunglobulin-Idiotyp (+KLH)	Mo-DC; unreif	6 Pat. 5 SD 5 von 6 Pat.
Reichhardt et al. <i>Blood</i> 1999 Stanford University	Multiples Myelom	Immunglobulin-Idiotyp	PBDC; unreif	12 Pat. nicht bewertbar 2 von 12 Pat.
Thurner et al. <i>J Exp Med</i> 1999 Universität Erlangen	Melanom	MAGE-3-Peptid	Mo-DC; ausgereift	11 Pat. 6 MX 8 von 11 Pat.
Burch et al. <i>Clin Cancer Res</i> 2000 Mayo Clinic	Prostata-Karzinom	PAP-GM-CSF-Fusions-Peptid	PBDC; unreif	12 Pat. 3 Abfall PSA >50% 9 von 9 Pat.
Kugler et al. <i>Nat Med</i> 2000 Universität Göttingen	Nierenzell-Karzinom	Fusion autologer Tumorzellen mit allogenen Mo-DC	Mo-DC; ausgereift	17 Pat. 4 CR, 2 PR, 1 MX 11 von 17 Pat.
Mackensen et al. <i>Int J Cancer</i> 2000 Universität Freiburg	Melanom	MAGE-1, Melan-A, gp100, Tyrosinase-Peptide	CD34-DC; ausgereift	14 Pat. 1 MR, 7 SD 5 von 14 Pat.
Schuler-Thurner et al. <i>J Immunol</i> 2000 Universität Erlangen	Melanom	MAGE-3-Peptid	Mo-DC; ausgereift	8 Pat. 1 SD 8 von 8 Pat.
Titzer et al. <i>Br J Haematol</i> 2000 Universität Köln	Multiples Myelom	Immunglobulin-Idiotyp	CD34-DC; unreif	11 Pat. 1 SD 4 von 11 Pat.
Banchereau et al. <i>Cancer Res</i> 2001 Baylor Institute Dallas	Melanom	gp100, MART-1, Mage-3, Tyrosinase-Peptide (+KLH)	CD34-DC; unreif	18 Pat. 3 CR, 1 PR, 3 MR, 3 SD 16 von 18 Pat.
Fong et al. <i>PNAS</i> 2001 Stanford University	Kolon- und Bronchial-Karzinom	CEA-Peptid (+KLH)	flt3 Ligand-expandierte PBDC	12 Pat. 2 CR, 2 SD, 1 MX 7 von 12 Pat.
Fong et al. <i>J Immunol</i> 2001 Stanford University	Prostata-Karzinom	Xenogenes PAP-Peptid	PBDC; unreif	21 Pat. 7 SD 21 von 21 Pat.
Geiger et al. <i>Cancer Res</i> 2001 University of Michigan	Solide pädiatrische Tumoren ³	Autologes Tumorzellsat (+KLH)	Mo-DC; unreif	15 Pat. 1 PR, 5 SD 4 von 8 Pat.
Schott et al. <i>J Clin Endocrin Metab</i> 2001 Universität Düsseldorf	Medulläres Schilddrüsen-Karzinom	Calcitonin und CEA-Peptide (+KLH)	Mo-DC; ausgereift	7 Pat. 1 PR, 3 SD, 2 MX 7 von 7 Pat.

Chang et al. <i>Clin Cancer Res</i> 2002 University of Michigan	Melanom Neuroblastom Kolon-Karzinom	Autologes Tumorsat (+KLH)	Mo-DC; unreif	14 Pat. 1 PR, 1 MR, 4 SD 4 von 10 Pat.
Heiser et al. <i>J Clin Invest</i> 2002 Duke University	Prostata- karzinom	PSA-codierende mRNA	Mo-DC; unreif	13 Pat. 1 MR 9 von 9 Pat.
Hernando et al. <i>Canc Imm Immunther</i> 2002 Universität Bonn	Uterussarkom, Ovarial- karzinom	Autologes Tumorsat (+KLH)	Mo-DC; ausgereift	8 Pat. 3 SD 2 von 8 Pat.
Timmerman et al. <i>Blood</i> 2002 Stanford University	B-Zell- Lymphom	Immunglobulin- Idiotyp (+KLH)	PBDC; unreif	10 Pat. 2 CR, 1 PR 8 von 10 Pat.

¹ Klinisches Ansprechen:

CR = komplette Remission (100 % Rückbildung aller Tumormanifestationen)

PR = partielle Remission (> 50 % Tumorrückbildung länger 1 Monat)

MR = geringe Remission (> 25-50 % Tumorrückbildung > 1 Monat oder > 50 % Tumorrückbildung < 1 Monat)

MX = *mixed response* (Regression einiger Metastasen, bei gleichzeitiger Progression anderer Metastasen)

SD = *stable disease*

² Immunologisches Ansprechen:

Zellulär: Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation, Antigen-spezifische DTH-Reaktion, Antigen-spezifische Zytokin-Freisetzung, erhöhte Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen, spezifische lytische Aktivität gegen Tumorzellen

Humoral: Antigen-spezifische Antikörperproduktion

³ Solide pädiatrische Tumoren: Ewing Sarkom, neuroektodermale Tumoren, Neuroblastom, Sarkom, Wilms-Tumor

Dendritische Zellen:

PBDC = dendritische Zellen des peripheren Bluts,

Mo-DC = Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen,

CD34-DC = CD34⁺-Stammzell-abgeleitete dendritische Zellen

Tabelle 1 : Übersicht klinischer Tumorstudien mit dendritischen Zellen (modifiziert nach Kämpgen et al. 2001)

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

2.1.1 Isolierung von Monozyten

Mononukleäre Zellen wurden aus dem Vollblut gesunder Probanden oder Buffy Coats (Bayerisches Rotes Kreuz, München) nach Böyum (Böyum 1968) isoliert. Das Blut wurde unter sterilen Bedingungen abgenommen und mit 50 I.E. Na-Heparin (Boehringer, Mannheim) zur Antikoagulation versetzt. Die mononukleäre Zellfraktion wurde durch Standard-Dichtezentrifugation (1000 g, 20°C, 15 Minuten) in einer Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, München) über Ficoll-Hypaque-Lösung (spezifische Dichte 1,077 g/ml, Biochrom, Berlin) in vorgefertigten Leukosep-Trennröhrchen (Greiner, Frickenhausen) gewonnen. In drei Waschschritten mit physiologischer Kochsalzlösung (Boehringer, Mannheim) wurden die Zellen von Thrombozyten und Plasmabestandteilen gereinigt (400 g, 4°C, 10 Minuten).

Die Zellviabilität und Zellzahl wurde nach Trypanblau-Färbung durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt und die Zellen in dem Bikarbonat-gepufferten Kulturmedium bestehend aus RPMI 1640-Medium (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälber-Serum (Biochrom, Berlin) oder 2 % humanen AB Rh+- Serum (BioWhittaker, St. Louis, USA), sowie 1 % L-Glutamin (GibcoBRL, Paisley, USA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA) resuspendiert.

Unter Nutzung ihrer Adhärenz auf Plastikoberflächen wurden die Monozyten angereichert. Hierfür wurde die mononukleäre Zellfraktion in einer Konzentration von 5.0×10^6 /ml in Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, New Jersey, USA) bei 37°C in Kulturmedium im Brutschrank für einen einstündigen Adhärenzschritt inkubiert. Danach wurde die nicht-adhärente Zellfraktion mit einer sterilen Pipette abgenommen und die Zellkulturflaschen mit adhärenen dendritischen Zellen zweimal mit PBS (Boehringer, Mannheim) gespült. Anschließend wurden die Kulturflaschen mit der adhärenen Zellfraktion mit 25 ml Kulturmedium gefüllt und über Nacht im Brutschrank inkubiert, um ein spontanes Ablösen der adhärenen Zellen zu ermöglichen.

2.1.2 Kultur dendritischer Zellen

Die initial adhärenenten Zellen wurden am nächsten Tag geerntet und für die anschließende Kultur in einer Konzentration von $0,75 \times 10^6$ /ml Zellen in Kulturmedium unter Zusatz von 1000 U/ml rhGM-CSF (Bachem, Heidelberg bzw. Novartis, Basel, Schweiz) und 500 U/ml rhIL-4 (Promega, Madison, USA) in 6-Loch Zellkulturschalen (Becton Dickinson, New Jersey, USA) in je 2 ml Kulturmedium ausgetragen.

2.2 Aktivierung dendritischer Zellen

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden nach fünftägiger Kultur unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 unter Beibehaltung der Zelldichte von $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml für weitere 48 Stunden in Gegenwart von 10 ng/ml LPS (Sigma, St. Louis, USA), 1000 U/ml TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden), 1000 U/ml TNF- α in Kombination mit 1 μ M PGE₂ (Sigma, St. Louis, USA) oder 1000 U/ml TNF- α in Kombination mit 10 ng/ml IL-1 β (Strathmann Biotech, Hannover) und 10 ng/ml IL-6 (Strathmann Biotech, Hannover) kultiviert.

2.3 Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie

Zur Kontrolle des Kulturverlaufes wurde die Morphologie der dendritischen Zellen täglich im Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena) bei 10- bis 50-facher Vergrößerung beurteilt. Zur besseren Darstellung der dendritischen Zellausläufer wurde ein Teil der Zellen einer Standard-Hämatoxylin-Eosin Färbung unterzogen und bei 100-facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Die Färbung mit dem Chromophorhaltigen, unspezifischen Proteinfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester; Sigma, St. Louis, USA) ermöglicht die Darstellung der Zellmembranstruktur unter dem Fluoreszenzmikroskop (Diaphot TMD, Nikon, Tokio, Japan) bei 250-facher Vergrößerung.

Für Rasterelektronen-mikroskopische Aufnahmen wurden dendritische Zellen mit niedriger Umdrehungszahl auf gläserne Objektträger zentrifugiert und mit Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 % - 70 % - 90 % - 100 %) für jeweils 20 Minuten entwässert. In

einer CO₂-Druckkammer wurden die Zellen am kritischen Punkt getrocknet, mit Goldpartikeln bedampft und anschließend im Rasterelektronenmikroskop ISM-35CF (JEOL, Heidelberg) in 1000- bis 10.000-facher Vergrößerung dargestellt (Anatomische Anstalt der LMU München, Kooperation mit Prof. Welsch).

2.4 Beladung dendritischer Zellen mit Antigenen aus Tumorzelllysate

2.4.1 Tumorzelllinien

Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, BxPC-3, Panc-1 und Capan-1 und die humane Magenkarzinomzelllinie Kato III wurden von den internationalen Zellkultursammlungen (ATCC, ECACC und DMSZ) bezogen und der HLA-A,-B,-C Haplotyp bestimmt (Labor für Immungenetik, Dr. von Haunersches Kinderspital der Universität München, Prof. Albert). Die Zelllinien BxPC-3, Panc-1, Capan-1 und Kato III erwiesen sich als HLA-A2 positiv (+), AsPC-1 als HLA-A2 negativ (-).

2.4.2 Kultur der Tumorzelllinien

Die Tumorzellen der oben genannten Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälber-Serum, sowie 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Alle 48 Stunden erfolgte eine komplette Erneuerung des Kulturmediums. Bei lichtmikroskopischer Konfluenz wurden die adhärennten Zellkulturen mit einer Enzymlösung bestehend aus 0,5 % Trypsin und 0,02 % EDTA (Boehringer, Mannheim) vom Kulturflaschenboden abgelöst, in einem Waschschrift von der Enzymlösung befreit und im Verhältnis 1:4 in Kulturmedium neu ausgetragen.

2.4.3 Herstellung eines Zelllysates aus vitalen Tumorzellen

Konfluente Pankreaskarzinomzellkulturen wurden gründlich mit PBS gespült und für 10 Minuten mit einer 0,01 % EDTA-Lösung (Boehringer, Mannheim) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Greiner, Frickenhausen) vom Boden der Zellkulturflaschen vorsichtig abgelöst und durch das Ausüben von Scherkräften eine Einzelzellsuspension hergestellt. Durch Zugabe von PBS und Zentrifugation (400 g, 4°C,

10 Minuten) wurden die Zellen von der EDTA-Lösung gereinigt, in einer Zählkammer gezählt und mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 resuspendiert. Anschließend wurden die Tumorzellen in vier Gefrier-Tau-Zyklen (Einfrieren bei -80°C und langsamen Auftauen bei Raumtemperatur) lysiert und die Zell-Lyse durch Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch bestätigt. Der grobe Zelldebris wurde bei 300 g für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand durch einen Filter mit der Porengröße $0,2 \mu\text{m}$ sterilfiltriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels einer Standard-Bradford-Proteinbestimmung (Bio-Rad, München) wurde die Proteinkonzentration im Überstand auf $600 \mu\text{g/ml}$ (entspricht ca. 5×10^6 Tumorzellen pro ml) eingestellt und der Überstand für die spätere Antigen-Beladung bei -30°C eingefroren.

2.4.4 Beladung dendritischer Zellen mit Tumorzelllysate

In Vorversuchen zur Dosisfindung des Zelllysates wurden dendritische Zellen nach fünftägiger Kultur in GM-CSF und IL-4 in einer Zelldichte von $0,75 \times 10^6/\text{ml}$ mit Tumorzelllysate bei einer Proteinkonzentration von $7,5 \mu\text{g}$, $30 \mu\text{g}$, $120 \mu\text{g}$, $240 \mu\text{g}$ und $480 \mu\text{g}$ pro ml bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Ein Teil der Zellkulturen wurde anschließend mit $\text{TNF-}\alpha$ (1000 U/ml) in Kombination mit PGE_2 ($1 \mu\text{M}$) für weitere 48 Stunden aktiviert.

Im Rahmen der Kokultur von Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen wurden die dendritischen Zellkulturen mit dem Zelllysate der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 bei einem Proteingehalt von $120 \mu\text{g/ml}$ wie oben beschrieben inkubiert. In einigen Versuchen wurde gleichzeitig $25 \mu\text{g/ml}$ des immunogenen Proteins KLH (Keyhole Limpet [Megathura crenulata] Hemocyanin, Sigma, St.Louis, USA) zum Tumorzelllysate zugegeben. Nach dreistündiger Inkubationszeit erfolgte die Aktivierung der dendritischen Zellen mit $\text{TNF-}\alpha$ (1000 U/ml) in Kombination mit PGE_2 ($1 \mu\text{M}$) für weitere 24 Stunden.

2.5 Isolation von T-Zellen

Mononukleäre Zellen wurden wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben generiert und für einen Adhärenzschritt in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Die nicht-adhärenzte Zellfraktion wurde nach 60 Minuten abpipettiert und der Anteil von T-Zellen durchflusszytometrisch über die Expression des T-Zellmarkers CD3

bestimmt. Mit dieser Methode betrug der Anteil der T-Zellen an der Gesamtpopulation 70-80 %.

Für eine weitere Aufreinigung der T-Zell-Fraktion wurden die mononukleären Zellen mit dem Pan-T-Zell-Isolations-Kit (MACS-System, Miltenyi Biotec, Auburn, USA) von CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 positiven Zellen depletiert (Negativselektion). Die Zellen wurden zuerst in einem Puffer (PBS mit 0,02 % EDTA und 2 % humanen AB Rh+ -Serum) mit einem Hapten-Antikörper-Cocktail gegen die oben genannten Antigene für 10 Minuten inkubiert und anschließend gewaschen. In einem zweiten Inkubationsschritt wurden die Zellen für weitere 15 Minuten mit monoklonalen Anti-Hapten-Antikörper inkubiert, die an magnetische MicroBeads gekoppelt sind. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in eine MACS-Säule gefüllt und in ein starkes magnetisches Feld überführt (Vario-MACS Zellseparator). Unter Depletion der Antikörper-markierten Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und B-Lymphozyten durchliefen die unmarkierten T-Zellen ungehindert das Magnetfeld und wurden in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach mehrmaligen Nachspülen der Säule mit 5 ml Puffer wurde die angereicherte T-Zell-Fraktion auf die Expression von CD3 überprüft, bevor sie für weitere Experimente eingesetzt wurden. Mit dieser Methode ließ sich die Reinheit der T-Zellen auf 97-99 % steigern.

2.6 Kokultur von Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen

2.6.1 HLA-Typisierung der Spender

Gesunde Probanden wurden hinsichtlich ihres HLA-A,-B,-C Haplotyp typisiert (Labor für Immungenetik, Dr. von Haunersches Kinderspital der Universität München, Prof. Albert). Im Sinne eines HLA-Matchings wurden für die autologen Kokultur dendritische Zellen und T-Zellen von HLA-A2+ Spendern generiert und die HLA-A2+ Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 für die Tumorzelllysat-Herstellung und als Zielzellen verwendet.

2.6.2 Kryopräservierung von dendritischen Zellen

Tumorzelllysate-gepulste und mit TNF- α und PGE₂ aktivierte dendritische Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingefroren. Das Einfriermedium und die Gefrierrohre (Greiner, Frickenhausen) wurden auf Eis vorgekühlt und die pelletierten dendritischen Zellen zuerst in 0,5 ml Einfriermedium A (30 % FKS in PBS) resuspendiert. Anschließend wurde tropfenweise Einfriermedium B (30 % FKS und 24 % DMSO [Dimethylsulphoxid; Sigma, St. Louis, USA]) in PBS unter ständigen Durchmischen auf Eis hinzugefügt. Dieses Protokoll erwies sich im Hinblick auf die Zellvitalität (> 90 % nach Auftauen) der Kryopräservierung in 90 % FKS und 10 % DMSO (Vitalität 60-70 % nach Auftauen) als deutlich überlegen. Die Zellen wurden anschließend stufenweise für 30 Minuten bei -20°C, 2 Stunden bei -40°C und über Nacht bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigen Stickstoff bei -220°C gelagert.

2.6.3 Stimulation autologer T-Zellen mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen

Dendritische Zellen HLA-A2+ Spender wurden nach fünftägiger Kultur in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 in drei parallele Ansätze aufgeteilt. Im ersten Ansatz wurden dendritische Zellen mit Tumorzelllysate der HLA-A2+ Zelllinie Panc-1 bei einer Proteinkonzentration von 120 $\mu\text{g/ml}$ gepulst, was in etwa dem aufbereiteten Zelllysate von 1×10^6 Pankreaskarzinomzellen entsprach (Verhältnis Dendritische Zellen : Tumorzellen ca. 1:1). Im zweiten Ansatz wurden dendritische Zellen gleichzeitig mit Tumorzelllysate aus Panc-1 (Proteinkonzentration 120 $\mu\text{g/ml}$) und 25 $\mu\text{g/ml}$ KLH gepulst. Im dritten Ansatz wurden dendritische Zellen ohne Antigenzugabe kultiviert (Negativkontrolle). Nach 3 Stunden wurden die dendritischen Zellen aus allen drei Ansätzen mit TNF- α und PGE₂ für weitere 24 Stunden aktiviert.

T-Zellen wurden vom selben Spender mit dem in Abschnitt 2.5 beschriebenen Protokoll zur Isolation nicht-adhärenter mononukleärer Zellen ohne weitere Aufreinigung durch Negativselektion generiert und durchflusszytometrisch auf den Anteil an CD3 (>75 %) bzw. CD16 (6-10 %) positiven Zellen untersucht.

Die autologen T-Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^6 /ml Zellen in 4 ml Kulturmedium in 12-Loch Kulturplatten (Becton Dickinson, New Jersey, USA) ausgetragen und mit dendritischen Zellen im Verhältnis 1:20 kokultiviert. Das

Kulturmedium wurde zum Zeitpunkt der Stimulation mit 10 U/ml IL-2 (Strathmann Biotech, Hannover) und 10 ng/ml IL-7 (Strathmann Biotech, Hannover) supplementiert. Im weiteren wurde alle 48 Stunden die Hälfte des Mediums gewechselt und die Zytokinkonzentration auf 20 U/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-7 erhöht. An den Tagen 7, 14 und 21 wurden die Kokulturen mit dendritischen Zellen gemäß der drei Ansätze im Verhältnis 1:20 restimuliert. Das Schema zum experimentellen Ablauf zeigt Abbildung 4.

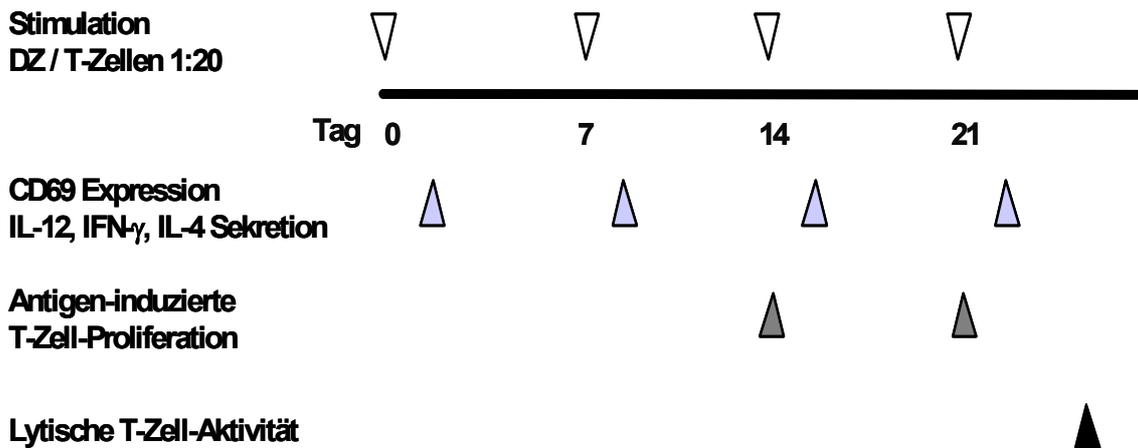


Abbildung 4 Schema zum Ablauf der Kokultur von Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen und der Bestimmung von T-Zell-Aktivierungsmarkern.

Im Verlauf der Kokultur wurden jeweils 48 Stunden nach Stimulation mit dendritischen Zellen die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (siehe Abschnitt 2.7.5) und die Sekretion von IL-12, IFN- γ und IL-4 im Überstand der Kokulturen (siehe Abschnitt 2.8.2) als Indikatoren für eine T-Zell-Aktivierung untersucht. Neben einer T-Zell-Zählung vor jeder weiteren Stimulation wurde die Induktion einer Tumorzelllysat-induzierten T-Zell-Proliferation zum Zeitpunkt der dritten und vierten Stimulation nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.9.2).

Nach der vierten Stimulationen wurde die lytische Aktivität der T-Zellen gegen Panc-1 Tumorzellen in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest gemessen (siehe Abschnitt 2.10). Zu Beginn und am Ende der Kokulturen wurde der Anteil an CD16+ NK-Zellen und das Verhältnis von CD4+ T-Helferzellen zu CD8+ zytotoxischen T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.5).

2.7 Durchflusszytometrie

2.7.1 Technische Beschreibung

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Differenzierung suspendierter Einzelzellen nach den morphologischen Eigenschaften der Zellgröße und Granularität, sowie nach der spezifischen Bindung von Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern (AK) gegen definierte Zell-assoziierte Antigene.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer EPICS PROFILE II (Coulter, Hialeah, USA) durchgeführt. Nach Ansaugen der Zellsuspension durchlaufen die Zellen einzeln einen Messpunkt, an dem sie im 90° Winkel von einem fokussierten Argon-Ionen-Laser (488 nm) bestrahlt werden. Die Zellen streuen in Abhängigkeit von Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) den Laserstrahl. Zusätzlich werden von dem Laserstrahl die Fluorochrome der Zell-gebundenen Antikörper zur Emission definierter Fluoreszenzstrahlung angeregt, die über einen Bandpassfilter in drei Farben aufgetrennt wird. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert Licht im grünen Wellenlängenbereich (Bandpassfilter 525 nm), R-Phycoerythrin (PE) im orangen (Bandpassfilter 575 nm) und PE-Cychrom im roten Wellenlängenbereich (Bandpassfilter 650 nm). Somit kann unter Verwendung von mehreren Antikörpern, an die unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind, die Koexpression mehrerer Antigene auf den zu untersuchenden Zellen bestimmt werden.

Zu Beginn der Messungen erfolgte die Kalibrierung der Lasereinstellung mittels einer Lösung von Partikeln mit definierter Größe und Fluoreszenzintensität (Immuno Check, Coulter, Hialeah, USA). Die untersuchten Zellen wurden anhand ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht-Eigenschaften in einem Punkthistogramm zur Darstellung gebracht. Aufgrund der charakteristischen morphologischen Auftrennung der Zellen konnte die zu analysierende Zielpopulation durch die Festlegung eines Zielbereiches eingegrenzt und avitale Zellen durch eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) ausgeschlossen werden.

Für jede Messung wurden mindestens 5000 Ereignisse in dem entsprechenden Zielbereich aufgezeichnet und anschließend mit Hilfe der EPICS ELITE und FlowJo Software (Version 2.7.8) quantitativ ausgewertet.

2.7.2 Antikörper

Negativ-Kontrollen (Isotypen)

Fluoresceinisothiocyanate-konjugierte monoklonale Maus Antikörper (FITC-AK)
IgG1, IgG2a (Pharmingen, San Diego, USA)

Phycoerythrin-konjugierte monoklonale Maus Antikörper (PE-AK)
IgG1, IgG2a (Pharmingen, San Diego, USA)

Dendritische Zell-Marker

FITC-AK: HLA-A,B,C (MHC I), CD1a, CD11b, CD40, CD58, CD80, CD83
(Pharmingen, San Diego, USA)

PE-AK : HLA-DR (MHC II), CD54, CD86 (Pharmingen, San Diego, USA)

Lineagemarker

FITC-AK: CD3, CD14, CD16 (Pharmingen, San Diego, USA)

PE-AK : CD4, CD8, CD20 (Pharmingen, San Diego, USA)

T-Zell-Aktivierungsmarker

Cychrom-AK: CD3 (Becton Dickinson, San Jose, USA)

FITC-AK: CD69, HLA-DR (Pharmingen, San Diego, USA)

PE-AK: CD4, CD8 (Pharmingen, San Diego, USA)

2.7.3 Immunphänotypisierung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen wurden nach fünftägiger Kultur in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 mit oder ohne 48-stündiger Aktivierung auf die Expression charakteristischer Oberflächenmarker untersucht. Für jede Färbung wurden 10^5 Zellen in 100 μ l PBS gelöst und für 30 Minuten abgedunkelt bei 0°C mit 10 μ l Fluorochrom-konjugierten spezifischen Antikörpern bzw. den entsprechenden Isotypen (siehe Abschnitt 2.7.2) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 250 μ l PBS resuspendiert, bevor sie der Analyse zugeführt wurden.

Für die Zweifarbenanalysen wurden die Zellen mit zwei spezifischen, mit unterschiedlichen Fluorochromen markierten Antikörpern gleichzeitig inkubiert.

2.7.4 Endozytose von FITC-Dextran

Um die Endozytose-Aktivität dendritischer Zellen in den unterschiedlichen Reifestadien zu untersuchen, wurden die Zellen bei 37°C für 30 Minuten mit 0,5 mg/ml FITC-markierten Dextranmolekülen (Sigma, St. Louis, USA) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 40.000 Dalton inkubiert. Als Kontrollen dienten dendritische Zellen, die mit FITC-Dextran bei 0°C im Eisbad inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und im Durchflusszytometer auf die intrazellulären FITC-Dextran-Aufnahme analysiert.

2.7.5 Immunphänotypisierung von T-Zellen

In einer Dreifarbenanalyse wurden die autologen T-Lymphozyten aus der Kokultur auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 untersucht. Um eine genaue Analyse der Expression von CD69 auf den T-Zell-Subpopulationen zu ermöglichen, wurden die Zellen in einer Dreifarbenanalyse gleichzeitig mit Cychrom-konjugierten CD3-, PE-konjugierten CD4- oder CD8- und FITC-konjugierten CD69-Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Zu Beginn und am Ende der Kokulturen wurde der Anteil an CD16+ NK-Zellen und das Verhältnis von CD4+ T-Helferzellen zu CD8+ zytotoxischen T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.8 Zytokinnachweis (ELISA)

2.8.1 IL-12-Produktion dendritischer Zellen

Die IL-12-Produktion dendritischer Zellen wurde im Überstand der Zellkulturen nach fünftägiger Kultur mit GM-CSF und IL-4 und darauffolgender 48-stündiger Inkubation in An- bzw. Abwesenheit von TNF- α oder TNF- α in Kombination mit PGE₂ gemessen. Im zellfreien Überstand wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers mit einem kommerziellen humanen IL-12 ELISA-Kit (Endogen, Woburn, USA) der Gehalt an den IL-12 Untereinheiten p40 und p70 in Doppelbestimmungen quantifiziert und die absolute Zytokinmenge über Eichkurven (Zytokinstandards des Herstellers) ermittelt.

2.8.2 Nachweis von IL-12, IFN- γ und IL-4 in der autologen Kokultur

Aus den autologen Kokulturen wurde 48 Stunden nach Restimulation mit dendritischen Zellen ein Teil des Überstandes abgenommen und mit kommerziellen ELISA-Kits (Endogen, Woburn, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers der Gehalt an IL-12, IFN- γ und IL-4 quantifiziert (siehe Abschnitt 2.8.1).

2.9 Proliferationsbestimmung

2.9.1 „Gemischte Lymphozytenkultur“ (Allogene MLR)

Der Einfluss dendritischer Zellen auf die Proliferation von T-Zellen wurde mittels eines [^3H]-Thymidin-Proliferationsassays bestimmt. 2×10^5 T-Zellen (nicht-adhärenente MNC bzw. über MACS-Säulen angereicherte T-Zellen) pro Loch wurden in 96-Loch Rundbodenplatten (Becton Dickinson, New Jersey, USA) ausgetragen und im Verhältnis 20:1 bis 320:1 mit allogenen dendritischen Zellen für fünf Tage in 200 μl Kulturmedium kokultiviert. Um eine Eigenproliferation der dendritischen Zellen auszuschließen, wurden diese vor Kulturbeginn mit 30 Gy in einer Caesiumquelle bestrahlt (Institut für Immunologie der LMU München). Am vierten Tag wurde 1 μCi [^3H]-Thymidin (Amersham, Freiburg) pro Loch zugegeben und 24 Stunden später wurden die Zellen mittels eines MicroCell Harvesters (Skatron, Transby, Dänemark) auf Filtermatten gefällt und getrocknet. Nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit wurde die in den Zellen inkorporierte Radioaktivität in einem 1205 Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter (Wallac Oy, Turku, Finnland) gemessen.

2.9.2 Tumorzelllysat-induzierte T-Zell-Proliferation

Um eine im Verlauf der Kokultur erhöhte Frequenz an Tumorzelllysatspezifischen T-Zellen nachzuweisen, wurden T-Zellen zum Zeitpunkt der dritten und vierten Restimulation aus den Kokulturen entnommen und in einem autologen [^3H]-Thymidin-Proliferationsassay (siehe 2.9.1) mit Tumorzelllysat-gepulsten oder ungepulsten dendritischen Zellen inkubiert. Nach viertägiger Kokultur wurde anhand der inkorporierten Radioaktivität die T-Zell-Proliferationsrate bestimmt. Die Differenz der inkorporierten Radioaktivität zwischen der Restimulation mit ungepulsten und Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen wurde als Tumorzelllysat-induzierte Proliferation gewertet.

2.10 Zytotoxische T-Zell-Aktivität

Endpunkt der Kokultur Tumorzelllysate-gepulster dendritischer Zellen mit autologen T-Zellen war der Nachweis der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen (Effektorzellen) gegenüber Tumorzellen (Zielzellen). Der Zytotoxizitätsnachweis mit dem ^{51}Cr (Cr)-Freisetzungstest basiert auf der Aufnahme von radioaktiv markierten Na-Cr^{6+} in die Zielzellen, wo es intrazellulär zu Cr^{3+} reduziert wird. Cr^{3+} wird erst nach Zerstörung der Zellmembranintegrität wieder freigesetzt und kann dann von vitalen Zellen nicht mehr aufgenommen werden. Das nach einer Zell-Lyse freigesetzte Cr^{3+} wird im Überstand der Zellkultur mit einem Gamma Counter nachgewiesen.

Die Panc-1 Tumorzellen wurden mit einer Dichte von $10\text{-}20 \times 10^6/\text{ml}$ Zellen FKS gelöst und mit $100 \mu\text{Ci/ml}$ ^{51}Cr -Lösung (NEN Life Sciences, Zaventem, Belgien) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung des nicht aufgenommenen ^{51}Cr fünfmal gewaschen. Um die spontane Freisetzung von ^{51}Cr zu ermitteln, wurden die Zellen für 18 Stunden ohne Effektorzellen inkubiert und anschließend der Überstand auf freigesetztes ^{51}Cr untersucht. Zusätzlich wurde die maximale Freisetzung durch die Zugabe des Detergens Triton X (NEN Life Sciences, Zaventem, Belgien) ermittelt, welches zu einer vollständigen Lyse der ^{51}Cr -markierten Zellen führte. Die Auswertung der Experimente erfolgte nur wenn die spontane Freisetzung unter 20 % lag.

Die % spontane Freisetzung errechnet sich nach folgender Formel:

$$\% \text{ Spontane Freisetzung} = 100 \times \frac{\text{Spontane Freisetzung} - \text{Background}}{\text{Maximale Freisetzung} - \text{Background}}$$

Zur Bestimmung der zytotoxischen T-Zell-Aktivität wurden ^{51}Cr -markierte Panc-1 Tumorzellen (Zielzellen) in einer Dichte von 5000 Zellen/Loch in 96-Loch Rundbodenplatten in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium ausgetragen. T-Zellen wurden aus den verschiedenen Kokulturansätzen nach der dritten und vierten Stimulation entnommen und im Verhältnis 100:1 bis 12:1 in $100 \mu\text{l}$ Kulturmedium mit den Zielzellen bei 37°C in Triplikaten inkubiert. Nach 18 Stunden wurden jeweils $75 \mu\text{l}$ des Überstandes der verschiedenen Ansätzen entnommen und durch

Messung des experimentell freigesetzten ^{51}Cr und der spontanen bzw. maximalen ^{51}Cr -Freisetzung in einem 1480 Wizard Gamma Counter (Wallac Oy, Turku, Finnland) die spezifische Tumorzell-Lyse nach folgender Formel errechnet:

$$\% \text{ Spezifische Freisetzung} = 100 \times \frac{\text{Experimentelle - Spontane Freisetzung}}{\text{Maximale - Spontane Freisetzung}}$$

Zum Nachweis einer MHC-Restriktion der Tumorzell-Lyse wurden die ^{51}Cr -markierten Panc-1 Tumorzellen mit dem MHC I-blockierenden Antikörper W6/32 (Serotec, Oxford, GB) für eine Stunde vor Beginn der Zytotoxizitätsmessung präinkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Das Ziel der Versuche war es, die Methodik der Isolierung von Monozyten aus dem peripheren Blut in ausreichender Zahl und Reinheit für die Kultur dendritischer Zellen zu optimieren. Desweiteren sollten die Isolierungs- und Kulturbedingungen den Kriterien für eine klinische Anwendbarkeit entsprechen.

3.1.1 Isolierung von Monozyten

Über eine Ficoll-Dichte-Zentrifugation ließen sich mononukleäre Zellen (MNC) in reproduzierbarer Zahl von $100-150 \times 10^6$ Zellen pro 100 ml Blut sowohl aus Vollblut als auch Buffy Coats gesunder Spender generieren. Die Isolation aus Vollblut zeigte sich nur dahingehend von Vorteil, dass es seltener zu Verklumpung der Zellen auf Grund der hohen Zelldichte in den Buffy Coats kam. Die MNC hatten einen Anteil CD14+ Monozyten von etwa 15-20 %.

MNC wurden in Zellkulturflaschen im Kulturmedium (RPMI-Medium 1640 mit Zusatz von 10 % fetalem Kälber-Serum und 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin) bei 37°C ausgetragen und nach 60, 120 bzw. 180 Minuten unter Ausübung von Scherkräften (kreisende Schüttelbewegungen der Kulturflaschen) die nicht-adhärenente Zellfraktion entfernt. Die initial adhärenente Zellen wurden am nächsten Tag geerntet und durchflusszytometrisch auf den Anteil von CD14+ Monozyten untersucht.

Hierbei erwies sich eine Adhärenzzeit von 60 Minuten als optimal, da die Reinheit an CD14+ Monozyten mit über 60 % vergleichbar war mit längeren Adhärenzzeiten, jedoch die Zellzahl mit $0,9 \times 10^6$ Zellen pro 5×10^6 MNC (Ausbeute von 18 %) deutlich über der Zellausbeute bei längeren Adhärenzzeiten lag (Tabelle 2).

Neben Monozyten fanden sich in der initial adhärenente Zellfraktion 15-25 % CD3+ T-Zellen, 5-15 % CD19+ B-Lymphozyten und 5-10 % CD16+ NK-Zellen.

Tabelle 2 Einfluss der Adhärenzzeit auf die Ausbeute und Reinheit CD14+ Monozyten. Humane MNC ($5,0 \times 10^6/\text{ml}$) wurden bei 37°C in Zellkulturflaschen inkubiert. Nach 60, 120 bzw. 180 Minuten wurde die nicht-adhärenente Zellfraktion entfernt. Die initial adhärenenten Zellen wurden am nächsten Tag geerntet, gezählt und durchflusszytometrisch auf den prozentualen Anteil an Monozyten (CD14+) und T-Zellen (CD3+) untersucht. Die Tabelle zeigt den Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten.

Adhärenzzeit (Minuten)	CD14+ Zellen (%)	CD3+ Zellen (%)	Ausbeute in % (CD14+/MNC)
60	62 %	20 %	18 %
120	65 %	18 %	12 %
180	64 %	19 %	10 %

CD14+ Monozyten ließen sich auch durch magnetische Anreicherungsverfahren (CD14+ Miltenyi Kit, Miltenyi Biotec, Auburn, USA) mit einer sehr hohen Reinheit von 90 % gewinnen, jedoch war die Zellausbeute mit 1-3 % der MNC relativ gering. Das Anreicherungsverfahren wirkte sich auch negativ auf die Zellfunktion aus, denn nach fünftägiger Kultur waren nur noch 20-50 % der Zellen vital. Im Rahmen dieser Arbeit entschieden wir uns daher, für die Gewinnung der Monozyten deren physiologische Eigenschaft temporär an Plastikoberflächen zu adhärenieren, zu nützen.

3.1.2 Kultur dendritischer Zellen

Die initial adhärenenten Zellen wurden mit einer Dichte von $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml in 2 ml Kulturmedium in 6-Loch Kulturschalen ausgetragen und für fünf Tage unter Zugabe von GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (250-1000 U/ml) inkubiert. Im Verlauf der Kultur erfolgte täglich eine Kontrolle der Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop. Nach ein bis zwei Tagen Kultur entwickelten sich eine Vielzahl kleiner Zellaggregate, die sich im Verlauf der Kultur vergrößerten und sich vom Boden der Kulturschalen lösten. Ab Tag 4 hatten die meisten Zellen ihre ursprüngliche Monozytenmorphologie (große, gleichförmig runde Zellen) verloren und zeigten die für dendritische Zellen typische sternförmige Gestalt mit bereits phasenkontrastmikroskopisch erkennbaren, groben Zytoplasmaausläufern (siehe Abbildung 6 und 7).

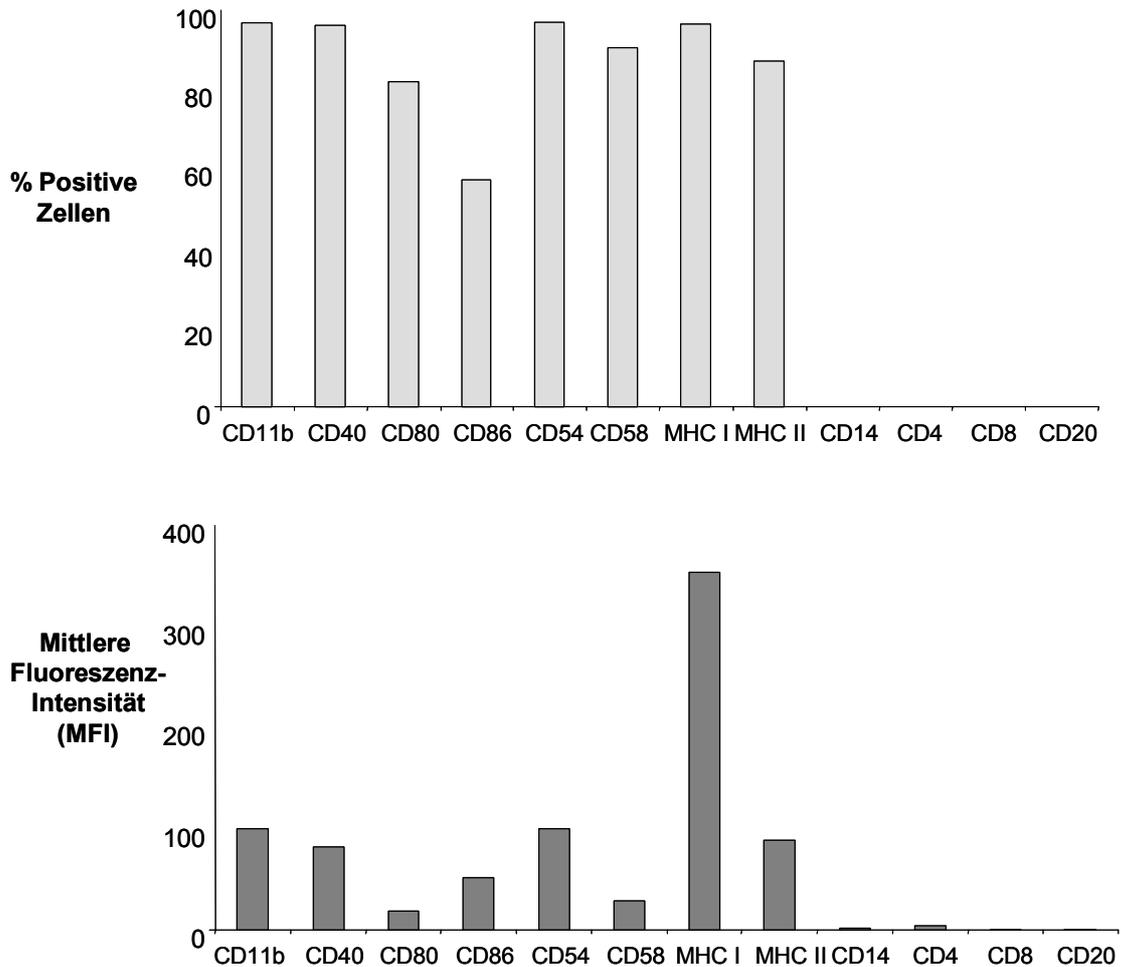


Abbildung 5 Expression charakteristischer Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen. $1,5 \times 10^6$ adhärenente MNC wurden in FKS-haltigem Kulturmedium in Gegenwart von GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) inkubiert. Nach fünf Tagen wurde die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression der Adhäsionsmoleküle (CD11b, CD54, CD58), kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD86, CD40) und Antigen-präsentierenden Moleküle (MHC I, MHC II), sowie auf die Expression des Monozytenmarkers (CD14), der T-Zell-Marker (CD4, CD8) und des B-Zell-Markers (CD20) untersucht. Im oberen Teil der Graphik ist die Expression der entsprechenden Oberflächenmarker als prozentualer Anteil auf den Zellen angegeben, die morphologisch als dendritische Zellpopulation eingegrenzt wurden. Der untere Teil der Graphik zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Oberflächenmarker, die der mittleren Expressionsdichte des Markers auf der Zelloberfläche entspricht. Ein repräsentatives Ergebnis von acht Experimenten ist gezeigt.

Am Tag 5 erfolgte die Charakterisierung der Zellen in einer durchflusszytometrischen Analyse ausgewählter Oberflächenmarker. Die dendritische Zellpopulation ließ sich bereits morphologisch durch ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreu-Eigenschaften des Laserstrahls eindeutig von den anderen Zellen abgrenzen. Ihr Anteil betrug 50-70 % der untersuchten Zellen. Die bei der Auswertung der Daten morphologisch eingegrenzte dendritische Zellpopulation exprimierte Adhäsionsmoleküle (CD 11c, CD54, CD58), Antigen-präsentierende Moleküle (MHC I und II) und kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86). Die prozentuale Expression der entsprechenden Oberflächenmarker, sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) sind in Abbildung 5 dargestellt. Der Monozyten-Marker CD14, die T-Zell-Marker CD4 und CD8 und der B-Zell-Marker CD19 wurde von den dendritischen Zellen nicht exprimiert.

Die Ausbeute an dendritischen Zellen nach der fünftägigen Kultur in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 betrug reproduzierbar 5-10 % der ursprünglich isolierten MNC, unabhängig davon, ob sie aus Vollblut oder Buffy Coats gewonnen wurden.

3.1.3 Vergleich verschiedener Kulturbedingungen

Für immunologische Untersuchungen sind Endotoxin-freie Kulturbedingungen, sowie ein Minimum an xenogenen Antigenen, wie sie z.B. im fetalen Kälberserum (FKS) enthalten sind, eine wichtige Voraussetzung. Daher wurde versucht dendritische Zellen unter FKS-freien Bedingungen zu generieren. Tabelle 3 zeigt den Vergleich dendritischer Zellen nach fünftägiger Kultur mit GM-CSF und IL-4 in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FKS bzw. 2 % gepooltem humanen AB Rh+-Serum. Es zeigten sich nur geringfügige Unterschiede bezüglich Phänotyp, Vitalität und Zellzahl zwischen den beiden Kulturbedingungen.

Tabelle 3 Einfluss verschiedener Serumzusätze auf die Oberflächenmarker-expression und Ausbeute dendritischer Zellen nach fünftägiger Kultur. $1,5 \times 10^6$ adhärenente MNC wurden in FKS-haltigen bzw. AB Rh+-Serum-haltigen Kulturmedium in Gegenwart von GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) kultiviert und nach fünf Tagen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD54, CD80, CD86, MHC II, sowie des Reifemarkers CD83 untersucht. Die linke Zahl in den einzelnen Kästchen bezieht sich jeweils auf den Anteil der für den Marker positiven Zellen (morphologisches Gate), die rechte Zahl auf die mittlere Expressionsdichte (MFI) für den Marker. Die Zellausbeute wurde am Ende der Kultur durch Zellzählung ermittelt. Die Tabelle zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Serum	CD54	CD80	CD86	MHC II	CD83	Zellzahl
	%pos MFI	%pos MFI	%pos MFI	%pos MFI	%pos MFI	
10 % FKS	97 % 128	81 % 10	70 % 14	84 % 122	7 % 4	920.000
2 % humanes AB Rh+	97 % 88	86 % 6	82 % 20	97 % 155	5 % 3	950.000

GM-CSF spielt eine wichtige Rolle als Wachstums- und Differenzierungsfaktor dendritischer Zellen. Beim Vergleich der GM-CSF Produkte der Firmen Bachem (Heidelberg) und Novartis (Basel, Schweiz) konnten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich Phänotyp und Ausbeute der dendritischen Zellen festgestellt werden. Die weiteren Experimente wurden mit dem klinisch zugelassenen Produkt Leukomax[®] der Firma Novartis durchgeführt.

Das Zytokin Interleukin-4 (IL-4) ist für die Differenzierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen notwendig und blockiert deren Entwicklung zu Makrophagen. In der Literatur finden IL-4 Konzentrationen von 250-1000 U/ml bei der Kultur dendritischer Zellen Verwendung. Da die biologische Aktivität zwischen den Produkten verschiedener Hersteller starke Schwankungen aufweisen können, wurde IL-4 der Firma Promega in einer Konzentration von 250, 500, 750 und 1000 U/ml eingesetzt und die Kulturergebnisse verglichen. Mit einer IL-4 Dosis von 250 U/ml konnte bereits eine phänotypisch homogene Population dendritischer Zellen generiert werden. Bei der Betrachtung der Zellmorphologien zeigte sich allerdings am Ende der Kultur ein deutlich erhöhter Anteil an adhärenenten, Makrophagen-ähnlichen Zellen. Die Zellausbeute war um 25 % niedriger als bei IL-4 Konzentrationen von 500-1000 U/ml (Tabelle 4). Wurde auf eine Zugabe von IL-4 verzichtet, entwickelte sich ein Großteil der Zellen zu stark adhärenenten Zellen mit Makrophagenmorphologie, die der durchflusszytometrischen Analyse nicht zugänglich waren.

Tabelle 4 Einfluss unterschiedlicher IL-4 Konzentrationen auf die Oberflächenmarkerexpression und Zellausbeute dendritischer Zellen. $1,5 \times 10^6$ adhärenente MNC wurden in AB Rh+ Serum-haltigem Kulturmedium in Gegenwart von GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (250 U/ml, 500 U/ml, 750 U/ml bzw. 1000 U/ml) kultiviert und nach fünf Tagen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD54, CD80, CD86 und MHC II untersucht. Die linke Zahl in den einzelnen Kästchen bezieht sich jeweils auf den Anteil der für den Marker positiven Zellen (morphologisches Gate), die rechte Zahl auf die mittlere Expressionsdichte (MFI) für den Marker. Die Zellausbeute wurde am Ende der Kultur durch Zellzählung ermittelt. Die Tabelle zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

IL-4	CD54		CD80		CD86		MHC II		Zellzahl
	%pos	MFI	%pos	MFI	%pos	MFI	%pos	MFI	
250 U/ml	99 %	222	97 %	21	97 %	109	98 %	228	700.000
500 U/ml	98 %	208	96 %	24	96 %	122	97 %	240	950.000
750 U/ml	96 %	187	99 %	25	95 %	112	95 %	210	900.000
1000 U/ml	97 %	219	98 %	21	92 %	96	91 %	180	1.000.000

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Experimente ein Kulturmedium mit RPMI 1640 unter Zusatz von 2 % humanem AB Rh+-Serum, 1000 U/ml GM-CSF der Firma Novartis und 500 U/ml IL-4 der Firma Promega gewählt.

3.2 Aktivierung dendritischer Zellen

Die *in vitro* unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 aus Monozyten generierten dendritischen Zellen entsprechen in ihrem Phänotyp den gewebständigen „unreifen“ dendritischen Zellen. Nach Aktivierung mit proinflammatorischen Mediatoren durchlaufen sie einen Reifungsprozeß, der durch die veränderte Morphologie, die gesteigerte Expression von Oberflächenmarkern, den Verlust der Endozytose-Aktivität, die erhöhte T-Zell-stimulatorische Kapazität und die Produktion von IL-12 charakterisiert ist (Banchereau et al. 2000). Ziel der Untersuchungen war es, verschiedene Reifestimuli bezüglich morphologischer, phänotypischer und funktioneller Charakteristika miteinander zu vergleichen.

Hierzu wurden dendritische Zellen nach fünftägiger Kultur unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 für weitere 48 Stunden mit oder ohne Reifestimulus kultiviert. Als Reifestimuli dienten LPS (10 ng/ml), TNF- α (1000 U/ml), TNF- α in Kombination mit PGE₂ (1 μ M) oder TNF- α in Kombination mit IL-1 β (10 ng/ml) und IL-6 (10 ng/ml).

3.2.1 Zellmorphologie

Im Verlauf der 48-stündigen Aktivierung konnte bei der Betrachtung unter dem Mikroskop eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden. Aus den polymorphen Zellen mit groben zytoplasmatischen Ausläufern (Abbildung 7) entwickelte sich eine homogene Population rundlicher Zellen mit einer Vielzahl feiner, sternförmig ausgerichteter Zellausläufer (Abbildung 9). Zudem lösten sich die großen Zellaggregate aus unausgereiften dendritischen Zellen (Abbildung 6) zunehmend zu kleinen Aggregaten mit vielen nicht-adhären Einzelzellen auf (Abbildung 8).

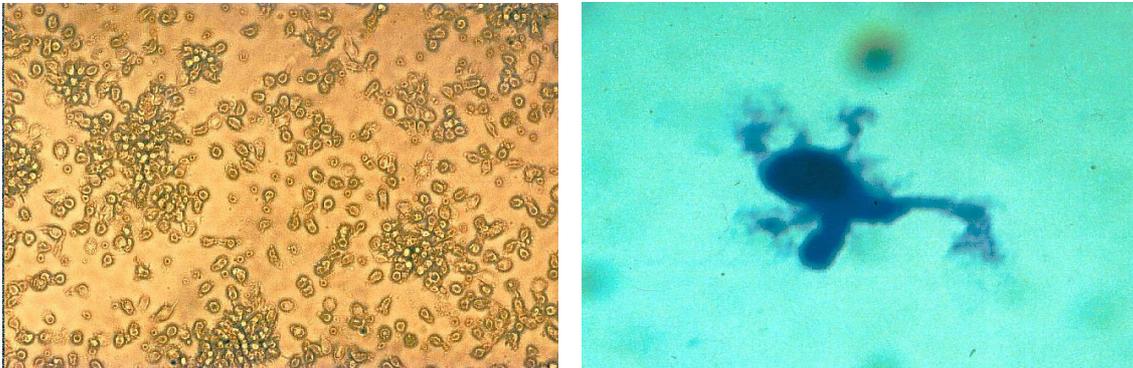


Abbildung 6 und 7 Unreife dendritische Zellen. Phasenkontrastmikroskopische Darstellung in einer Vergrößerung 1:20 (Abbildung 6) und Hämatoxylin-Eosin-Färbung in einer Vergrößerung 1:100 (Abbildung 7)

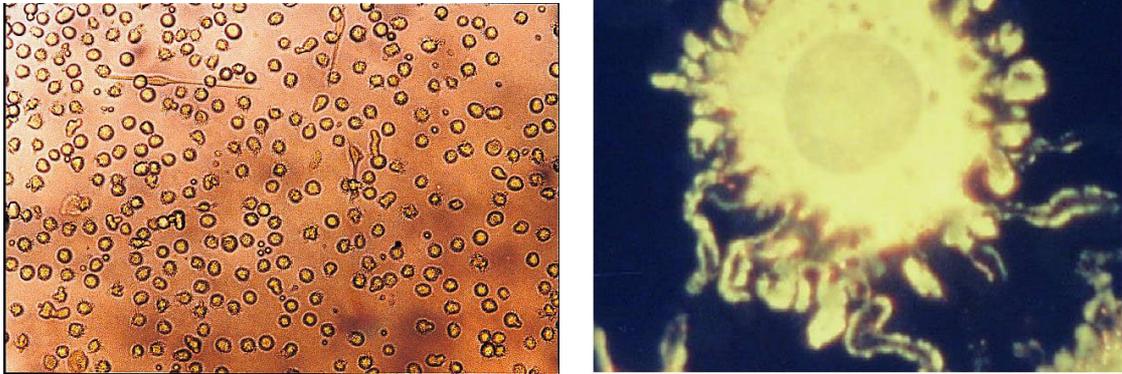


Abbildung 8 und 9 Mit $\text{TNF-}\alpha$ und PGE_2 aktivierte dendritische Zellen. Phasenkontrast-mikroskopische Darstellung in einer Vergrößerung 1:20 (Abbildung 8) und Fluoreszenzfärbung mit dem Membranfarbstoff CFSE in einer Vergrößerung 1:250 (Abbildung 9)

Eine plastische Darstellung der dreidimensionalen Oberflächenbeschaffenheit aktivierter dendritischer Zellen ermöglichte das Rasterelektronenmikroskop. Die langen zytoplasmatischen Ausläufer sind in der 2200-fachen Vergrößerung gut zu erkennen (Abbildung 10), während die 4400-fache Vergrößerung die Feinheit der einzelnen Ausläufer zur Darstellung bringt (Abbildung 11).

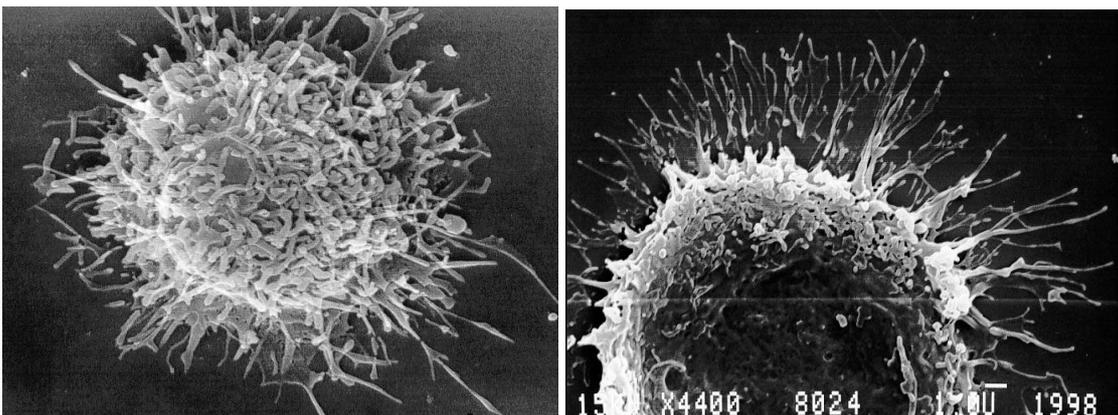


Abbildung 10 und 11 Mit $\text{TNF-}\alpha$ und PGE_2 aktivierte dendritische Zellen. Rasterelektronen-mikroskopische Darstellung der Oberflächenstruktur in der Vergrößerung 1:2200 (Abbildung 10) und der zytoplasmatischen Zellausläufer in der Vergrößerung 1:4400 (Abbildung 11)

3.2.2 Oberflächenmarkerexpression

Eine durchflusszytometrische Analyse charakteristischer Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen erfolgte nach fünftägiger Kultur und anschließender 48-stündiger Aktivierung mit den verschiedenen Reifestimuli.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, hatten dendritische Zellen, die ohne Reifestimulus kultiviert wurden, eine niedrige bis mittlere Expressiondichte für die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, das Antigen-präsentierende Molekül MHC II und das Adhäsionsmolekül CD54 (mittlere Expressionsdichte [MFI] für die untersuchten Marker seitlich der Punkthistogramme angegeben). Dementsprechend zeigte nur ein Teil der Zellen eine Koexpression der Marker (Anteil der doppelt positiven Zellen in den Punkthistogrammen in Prozent angegeben).

Bei allen untersuchten Reifestimuli konnte eine deutliche Expressionszunahme der untersuchten Oberflächenmarker gezeigt werden. LPS erwies sich im Bezug auf die Expressiondichte von CD80 und CD86, sowie CD54 als sehr potenter Stimulus und führte zu einer homogenen Koexpression der Marker auf den dendritischen Zellen. TNF- α alleine war von den untersuchten Stimuli der schwächste, induzierte jedoch eine hohe Expression von CD54. Durch die Zugabe von IL-1 β und IL-6 bzw. PGE₂ wurde ein synergistischer Effekt erzielt. Insbesondere die Kombination von TNF- α und PGE₂ zeichnete sich durch eine hohe Expression von MHC II, CD80 und CD86 aus. Interessanterweise korrelierte die relativ geringe Expression von CD54 nach Aktivierung mit TNF- α und PGE₂ mit dem Überwiegen von morphologisch homogenen Einzelzellen mit besonders langen zytoplasmatischen Ausläufern (siehe Abbildung 9).

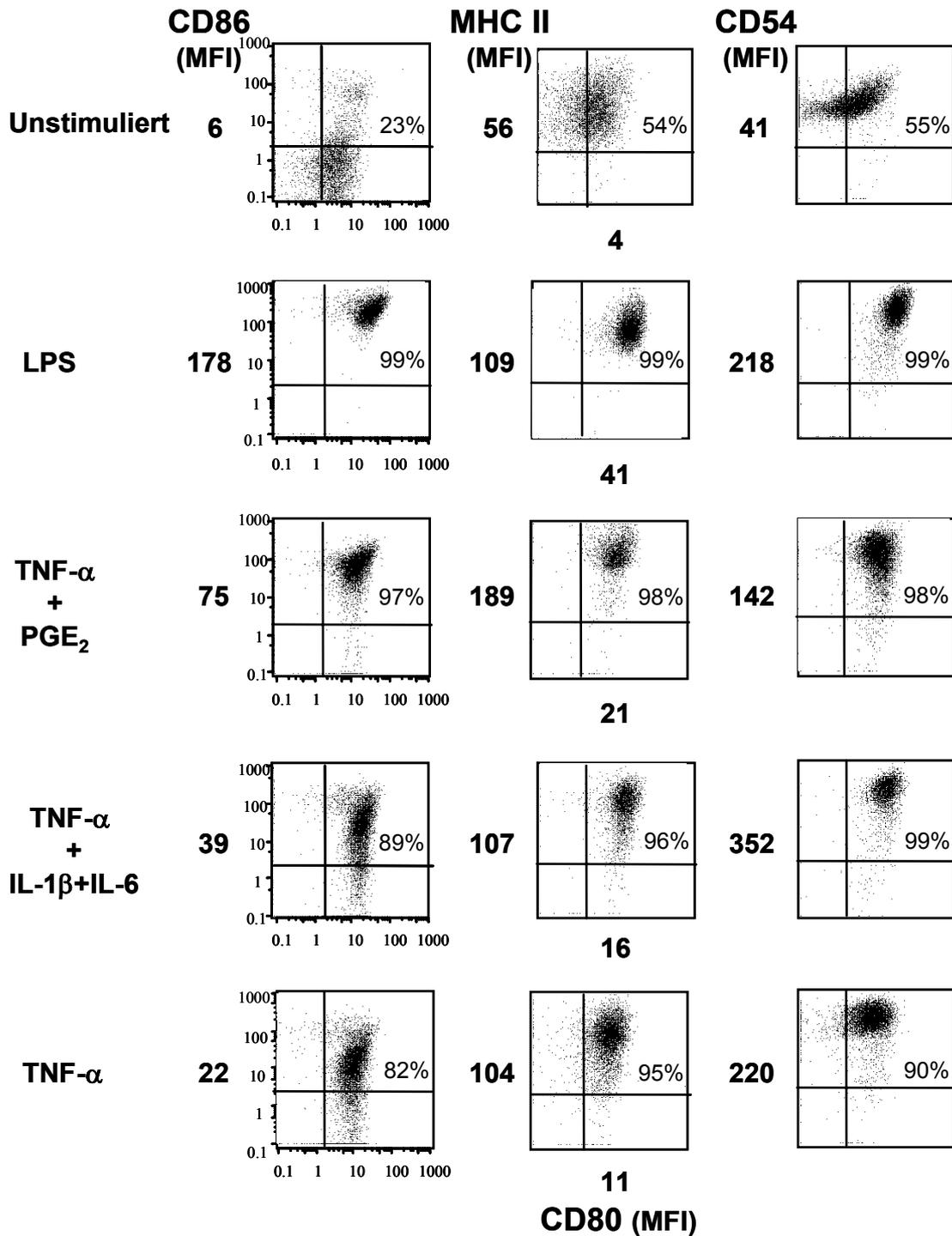


Abbildung 12 Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen mit verschiedenen Reifestimuli auf deren Oberflächenmarker. An Tag 5 wurden dendritische Zellen unter Zugabe o.g. Reifestimuli aktiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Koexpression von CD80 (Darstellung auf der X-Achse) und CD54, CD86 und MHC II (Darstellung auf der Y-Achse) untersucht. Die mittlere Expressionsdichte (MFI) für die untersuchten Marker ist seitlich der Punkthistogramme angegeben. Der Anteil doppelt positiver Zellen ist in den Punkthistogrammen in Prozent angegeben. Ein repräsentatives Ergebnis aus sechs Experimenten ist gezeigt.

Zur Differenzierung zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen eignet sich die Bestimmung des Oberflächenmarkers CD83, der ausschließlich von reifen dendritischen Zellen exprimiert wird. Abbildung 13 zeigt, dass unstimulierte dendritische Zellen den Reifemarker CD83 nicht exprimierten, während alle untersuchten Reifestimuli zu einer deutlichen CD83-Expression führten. Die Reifeinduktion mit LPS bzw. mit der Kombination aus TNF- α und PGE₂ führte zu der stärksten CD83-Expression mit einer mittleren Expressionsdichte (MFI) von 70 bzw. 46. Der Marker wurde auf über 97 % der untersuchten Zellen exprimiert. Die Reifeinduktion mit TNF- α oder der Dreier-Kombination aus TNF- α und IL-1 β und IL-6 führte zu einer schwächeren CD83-Expression (MFI 37 bzw. 31) und ca. 20 % der dendritischen Zellen blieben CD83 negativ.

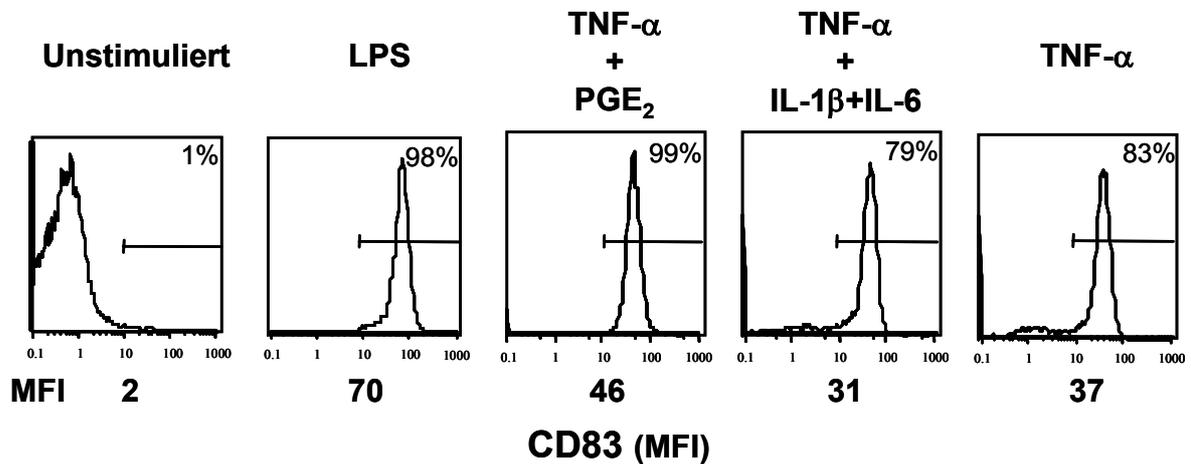


Abbildung 13 Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen mit verschiedenen Reifestimuli auf die Expression von CD83. An Tag 5 wurden dendritische Zellen unter Zugabe von o.g. Reifestimuli aktiviert. Nach 48-Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD83 untersucht. Die mittlere Expressionsdichte (MFI) von CD83 ist unter den Histogrammen angegeben. Der Anteil CD83-positiver Zellen ist in den Histogrammen in Prozent angegeben. Ein repräsentatives Ergebnis aus sechs Experimenten ist gezeigt.

3.2.3 Endozytose-Aktivität dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind in der Lage u.a. durch Endozytose lösliche Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Durchflusszytometrisch lässt sich die Endozytose-Aktivität dendritischer Zellen durch die Aufnahme von Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-markierten Dextranmolekülen nachweisen und quantifizieren. Dendritische Zellen wurden nach fünftägiger Kultur mit oder ohne anschließender 48-stündiger Reifeinduktion auf die Aufnahme von FITC-Dextran (durchschnittliches Molekulargewicht 40.000 Dalton) untersucht. Als Kontrollgruppe wurden dendritische Zellen bei 0°C mit FITC-Dextran inkubiert (Ausschluss unspezifischer Oberflächenbindung).

Wie in Abbildung 14 dargestellt, zeichneten sich nur die unstimulierten dendritischen Zellen durch eine ausgeprägte Endozytose-Aktivität (MFI 30) aus, während nach Aktivierung mit den verschiedenen Reifestimuli die Aufnahme von FITC-Dextran deutlich nachließ. Dieser Effekt war am stärksten ausgeprägt bei den Reifestimuli LPS (MFI 3) bzw. der Kombination aus TNF- α und PGE₂ (MFI 4). Auch die Aktivierung mit TNF- α alleine (MFI 14) oder der Dreier-Kombination aus TNF- α und IL-1 β und IL-6 (MFI 9) führte zu einem deutlichen Rückgang der Endozytose-Aktivität.

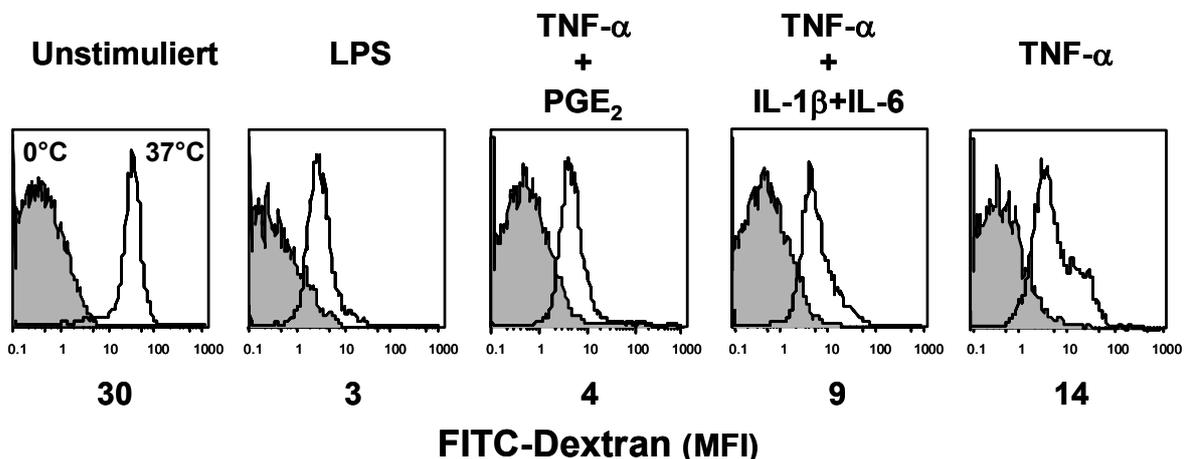


Abbildung 14 Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen mit verschiedenen Reifestimuli auf deren Endozytose-Aktivität. An Tag 5 wurden dendritische Zellen unter Zugabe von o.g. Reifestimuli aktiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Fähigkeit zur Aufnahme FITC-markierter Dextranmoleküle untersucht. Die grauen Histogramme stellen die Kontrolle (Inkubation bei 0°C) dar, die weißen Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität bei 37°C (MFI unter den Histogrammen angegeben). Ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten ist gezeigt.

3.2.4 Induktion der T-Zell-Proliferation

Der Einfluss einer Aktivierung dendritischer Zellen auf die T-Zell-stimulierende Wirkung der dendritischen Zellen wurde mittels eines [^3H]-Thymidin-Proliferationsassays in der gemischten Lymphozytenkultur (allogene MLR) untersucht. Hierbei wurden dendritische Zellen nach einer fünftägiger Kultur mit oder ohne anschließender 48-stündiger Aktivierung mit verschiedenen Reifestimuli in einer Caesiumquelle mit 30 Gy bestrahlt und mit allogenen T-Zellen im Verhältnis von 1:20 bis 1:320 in 96-Loch Kulturplatten für 5 Tage kokultiviert. In den letzten 24 Stunden erfolgte durch Zugabe von [^3H]-Thymidin die Bestimmung der T-Zell-Proliferation anhand des Einbaus des Radionukleotids in die DNS proliferierender T-Zellen. Zum Vergleich wurden dendritische Zellen durch bestrahlte MNC desselben Spenders ersetzt.

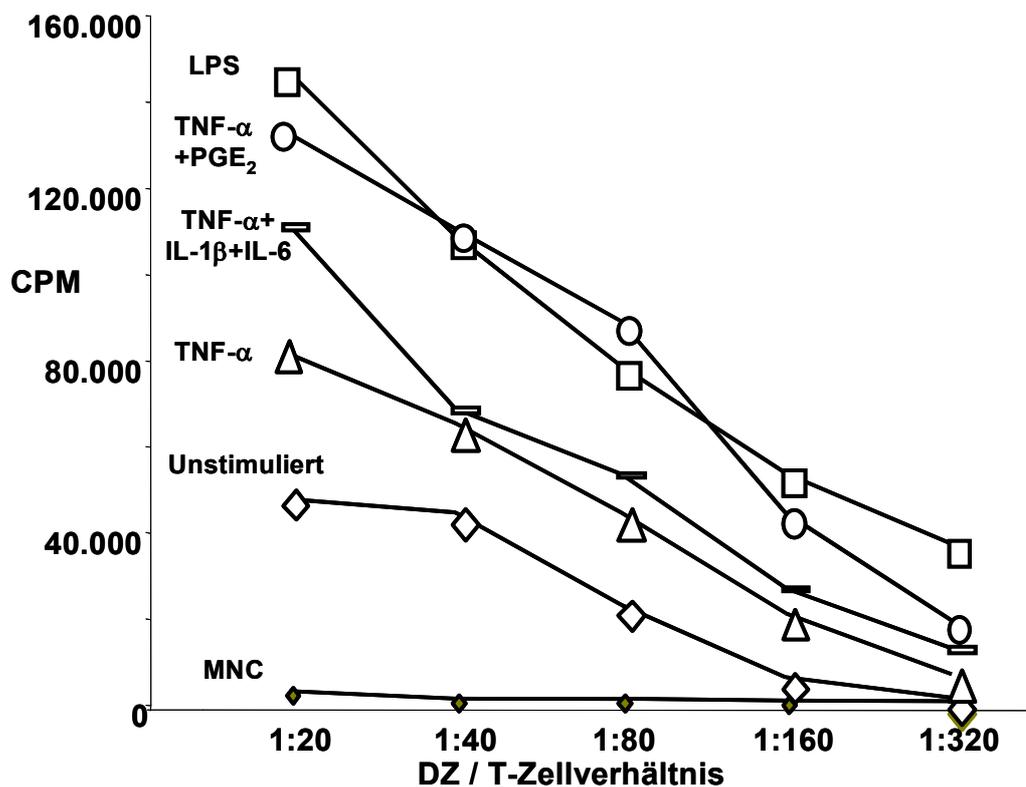


Abbildung 15 Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen mit verschiedenen Reifestimuli auf deren T-Zell-stimulatorische Kapazität. An Tag 5 wurden die dendritischen Zellen unter Zugabe von o.g. Reifestimuli für 48 Stunden aktiviert und anschließend mit 2×10^5 allogenen T-Zellen im Verhältnis 1:20 bis 1:320 kokultiviert. An Tag 4 wurden die Kokulturen mit [^3H]-Thymidin gepulst ($1 \mu\text{Ci/Loch}$) und nach weiteren 24 Stunden wurde die in den Zellen inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis von sechs Experimenten ist gezeigt.

Abbildung 15 zeigt den Einfluss einer Aktivierung dendritischer Zellen mit verschiedenen Reifestimuli auf deren Kapazität zur Induktion einer allogenen T-Zell-Proliferation. Unstimulierte dendritische Zellen induzieren bereits bei einem Verhältnis von einer dendritischen Zelle auf 80 T-Zellen eine deutliche T-Zell-Proliferation, während MNC auch bei einem Verhältnis von 1:20 nur eine geringe Proliferation allogener T-Zellen bewirken. LPS und die Kombination aus TNF- α und PGE₂ erwiesen sich als die potentesten Aktivatoren der T-Zell-stimulatorischen Kapazität. Selbst bei einem Verhältnis von nur einer entsprechend aktivierten dendritischen Zelle auf 320 T-Zellen konnte noch eine ausgeprägte T-Zell-Proliferation gemessen werden, die in etwa derjenigen von unreifen dendritischen Zellen im Verhältnis 1:20 entsprach.

3.2.5 IL-12-Produktion

IL-12 gilt als zentrales Zytokin bei der Induktion Th1-gerichteter Immunantworten und wird von aktivierten dendritischen Zellen sezerniert. Um die Induktion der IL-12-Produktion in Abhängigkeit des Reifestimulus zu untersuchen, wurden dendritische Zellen nach fünftägiger Kultur mit TNF- α bzw. der Kombination aus TNF- α und PGE₂ für weitere 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurde der Überstand der Kulturen abgenommen, zentrifugiert und die Konzentration an IL-12 p40 und p70 mit einem ELISA bestimmt.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, sezernierten unstimulierte dendritische Zellen kaum IL-12 (11 ± 4 pg/ml). Die Reifeinduktion mit der Kombination aus TNF- α mit PGE₂ führt zu einer ausgeprägten IL-12-Produktion (1311 ± 76 pg/ml). TNF- α alleine hingegen führt zu einer geringen Freisetzung von IL-12 (36 ± 23 pg/ml).

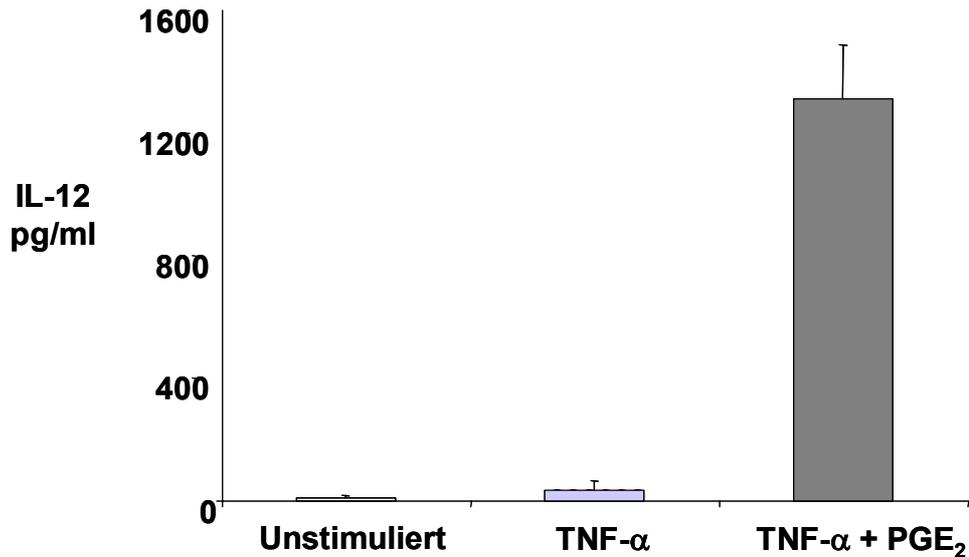


Abbildung 16 Einfluss der Aktivierung dendritischer Zellen auf die Freisetzung von IL-12. An Tag 5 wurden dendritische Zellen unter Zugabe von TNF- α oder der Kombination aus TNF- α mit PGE₂ aktiviert. Nach 48 Stunden wurde IL-12 in den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

3.3 Beladung dendritischer Zellen mit Antigenen aus Tumorzelllysats

3.3.1 Dosisfindung

Nach Herstellung eines Tumorzelllysats aus der Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen wurde dessen Proteingehalt mit der Methode nach Bradford bestimmt und in einer Endkonzentration von 480, 240, 120, 30 bzw. 7,5 μg pro ml zu den dendritischen Zellkulturen pipettiert. Nach drei Stunden wurde nicht-phagozytiertes Zellmaterial entfernt und die dendritischen Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die dendritischen Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die T-Zell-stimulierende Wirkung in einem [³H]-Thymidin-Proliferationsassay untersucht.

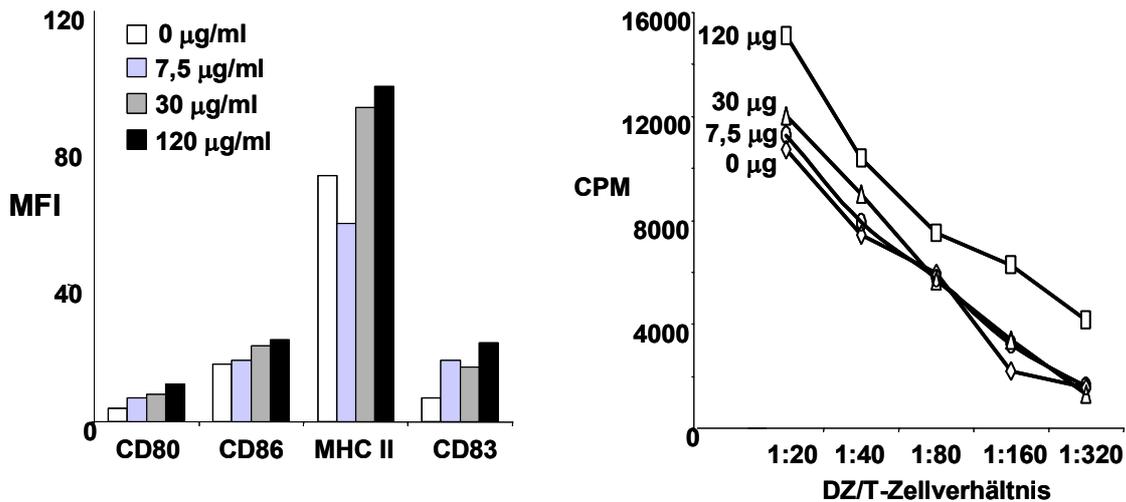


Abbildung 17 Einfluss der Inkubation mit Tumorzelllysate der Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 auf die Expressionsdichte dendritischer Oberflächenmarker (linke Graphik) und die T-Zell-stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen (rechte Graphik). An Tag 5 wurden dendritische Zellen mit Tumorzelllysate in Konzentrationen von 0 µg, 7,5 µg, 30 µg und 120 µg pro ml Protein inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD80, CD86, MHC II und CD83 untersucht. Zusätzlich wurden dendritische Zellen mit 2×10^5 allogenen T-Zellen im Verhältnis 1:20 bis 1:320 kokultiviert. An Tag 4 wurden die Kokulturen mit [3 H]-Thymidin gepulst (1 µCi/Loch) und nach weiteren 24 Stunden die T-Zell-Proliferation anhand der zellulär inkorporierten Radioaktivität bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten ist gezeigt.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, führte die Inkubation mit Tumorzelllysate der Zelllinie AsPC-1 zu einer konzentrationsabhängigen Hochregulierung der Expression von CD80, CD86, MHC II und CD83, als Zeichen einer Aktivierung der dendritischen Zellen. Die erhöhte Expression der o.g. Oberflächenmarker korrelierte mit einer verstärkten T-Zell-aktivierenden Potenz. In Vitalitätsuntersuchungen (Trypanblau-Färbung avitaler Zellen) erwiesen sich die Tumorzelllysate-Konzentrationen von 480 µg/ml bzw. 240 µg/ml Protein als toxisch. Tumorzelllysate-Konzentrationen von 120 µg/ml Protein hatten keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen und wurden in den folgenden Versuchen verwendet.

3.3.2 Einfluss von Tumorzelllysate auf die Aktivierung und Aktivierbarkeit dendritischer Zellen

Es wurde untersucht, ob Unterschiede zwischen den Tumorzelllysaten verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien bezüglich ihrer Auswirkung auf den Aktivierungszustand und Aktivierbarkeit dendritischer Zellen bestehen. Hierfür wurden dendritische Zellen nach fünftägiger Kultur unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 für 3 Stunden mit Tumorzelllysate der Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, Panc-1 und Capan-1 in einer Protein-Konzentration von 120 µg/ml inkubiert und anschließend ein Teil der Zellen mit TNF- α und PGE₂ für 48 Stunden aktiviert. Als Kontrollen dienten unstimulierte bzw. TNF- α und PGE₂ aktivierte dendritische Zellen, die ohne Tumorzelllysate kultiviert wurden.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte die alleinige Zugabe von Tumorzelllysate der Zelllinien Panc-1 und Capan-1 zu den dendritischen Zellkulturen keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker CD86, MHC II und CD83 (Abbildung 18). Das Tumorzelllysate der Zelllinie AsPC-1 hingegen hatte eine aktivierende Wirkung auf die dendritischen Zellen. 48 Stunden nach AsPC-1 Pulsung war die Expression von CD86 und MHC II erhöht, was von einer gesteigerten Kapazität zur T-Zell-Aktivierung begleitet war. Im Gegensatz dazu verloren dendritische Zellen nach Inkubation mit dem Tumorzelllysate der Zelllinie Capan-1 ihre T-Zell-stimulatorische Wirkung bei erhaltener Vitalität (Trypanblau-Ausschluss) fast vollständig (Abbildung 18). Wurden dendritische Zellen nach Tumorzelllysate-Pulsung mit TNF- α und PGE₂ aktiviert, steigerte sich die T-Zell-stimulatorische Kapazität der mit AsPC-1 und Panc-1 gepulsten dendritischen Zellen wie erwartet. Der inhibitorische Effekt des Tumorzelllysate von Capan-1 konnte selbst durch eine Aktivierung nicht aufgehoben werden.

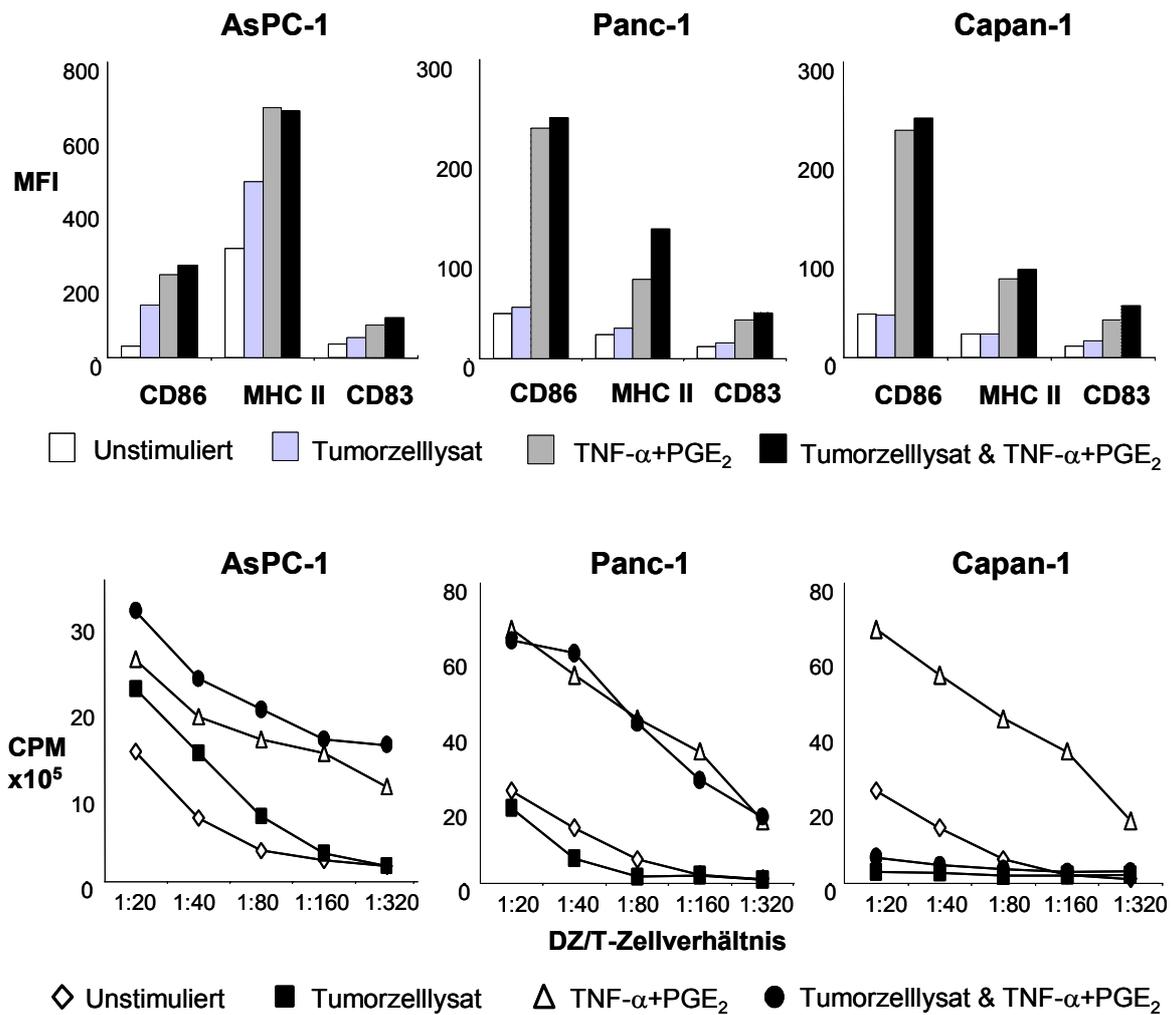


Abbildung 18 Einfluss von Tumorzelllysate der drei Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, Panc-1 und Capan-1 auf die Expression von CD86, MHC II und CD83, sowie der T-Zell-stimulatorischen Kapazität dendritischer Zellen. An Tag 5 wurden dendritische Zellen mit Tumorzelllysate gepulst und zum Teil mit TNF- α und PGE₂ aktiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression (MFI) von CD86, MHC II und CD83 untersucht (obere Zeile) und mit einem [³H]-Thymidin-Proliferations-Assay die Proliferation allogener T-Zellen nach fünftägiger Kokultur bestimmt (untere Zeile). Ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten ist gezeigt.

3.4 Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen durch Kokultur von Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen

In einer vierwöchigen Kokultur wurden autologer T-Zellen eines HLA-A2+ Spenders wöchentlich mit Tumorzelllysat-gepulsten und mit TNF- α und PGE₂ aktivierten dendritischen Zellen im Verhältnis 1:20 stimuliert. Das Zelllysate wurde aus der HLA-A2+ Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 gewonnen. Die dendritischen Zellen waren nach fünftägiger Kultur entweder nur mit Tumorzelllysate (TuLy) in einer Konzentration von 120 μ g/ml Protein oder gleichzeitig mit Tumorzelllysate in einer Konzentration von 120 μ g/ml Protein und 25 μ g/ml KLH (TuLy + KLH) gepulst worden. In einem dritten Ansatz wurden die dendritischen Zellen ohne Antigenzugabe kultiviert (Negativkontrolle). Die Kokultur fand in Gegenwart niedriger Konzentrationen der Zytokine IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) statt, um die Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen zu unterstützen. Im Verlauf der Kokultur wurden Indikatoren für eine T-Zell-Aktivierung und die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Aktivität gemessen.

3.4.1 T-Zell-Zahl im Verlauf der Kokultur

Im Verlauf der Kokultur wurde in wöchentlichen Abständen die Anzahl der T-Zellen in den Kokulturen jeweils zum Zeitpunkt der Restimulation mit dendritischen Zellen bestimmt.

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, nahm die Zellzahl in den Kokulturen mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen bis zum Ende der Kokultur auf durchschnittlich 88 % der initialen Zellzahl leicht ab, während die Zellzahl in der Kokultur mit Tumorzelllysate plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen um ca. 10 % zunahm. In den Kokulturen mit ungepulsten dendritischen Zellen zeigte sich ein Verlust der T-Zellen auf 20 % der initialen Zellpopulation.

Lichtmikroskopisch zeigten nur die Kokulturen mit Tumorzelllysate- bzw. Tumorzelllysate plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen eine deutliche Zell-Clusterbildung als Zeichen einer verstärkten proliferativen Aktivität. Zudem konnte anhand der Abnahme des pH-Wertes im Kulturmedium auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität in diesen Kokulturen geschlossen werden.

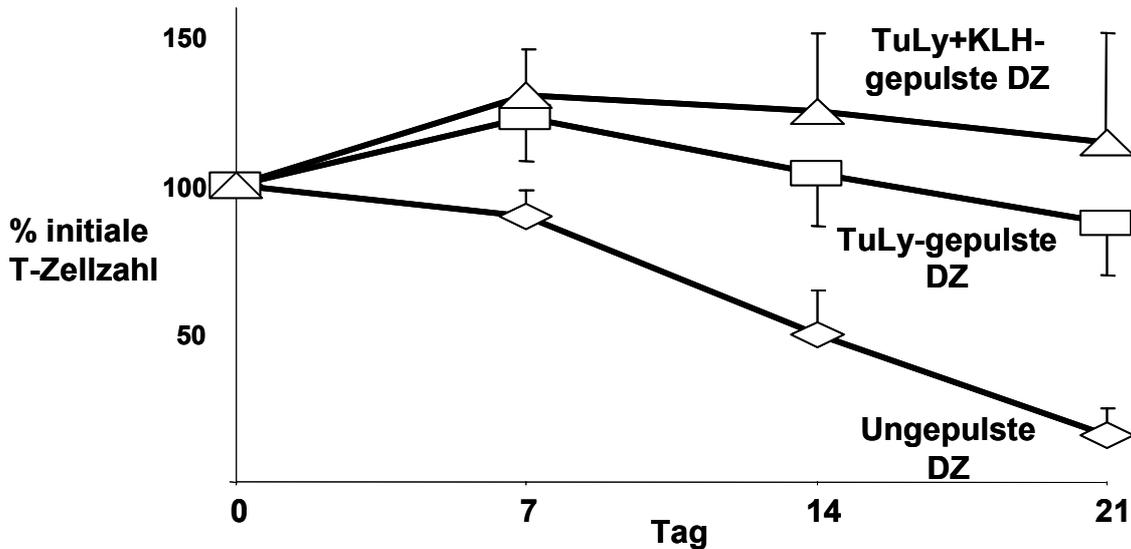


Abbildung 19 Einfluss der Antigen-Beladung dendritischer Zellen auf die Anzahl der T-Zellen in den verschiedenen Kokulturansätzen. T-Zellen wurden mit ungepulsten, Tumorzelllysate (TuLy)-gepulsten und Tumorzelllysate plus KLH (TuLy+KLH)-gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert. Die Anzahl der T-Zellen zu Beginn der Kokultur (Tag 0) wurde auf 100 % festgesetzt und Veränderungen der Zellzahl im zeitlichen Verlauf auf den initialen Wert bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Experimenten +/- der Standardabweichung.

3.4.2 Einfluss der Kokultur auf das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen und den Anteil CD3+ T-Zellen und CD16+ NK-Zellen

Zu Beginn und am Ende der Kokultur wurde das Verhältnis von CD4+ Th-Zellen zu CD8+ CTL bestimmt. In allen drei Kokultur-Ansätzen konnte ein leichter Anstieg des CD4/CD8 Verhältnisses gemessen werden, es zeigten sich jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Kokulturbedingungen (Tabelle 5).

Tabelle 5 Durchflusszytometrische Analyse des CD4/CD8-Verhältnisses im Verlauf der Kokultur mit dendritischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Experimenten \pm der Standardabweichung.

T-Zell-Kokultur mit	CD4/CD8 zu Beginn der Kokultur	CD4/CD8 am Ende der Kokultur
ungepulsten DZ	$1,8 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,5$
TuLy-gepulsten DZ	$1,8 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$
TuLy+KLH-gepulsten DZ	$1,8 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,3$

Zudem wurde der prozentuale Anteil an CD3+ T-Zellen und CD16+ NK-Zellen zu Beginn und am Ende der Kokultur durchflusszytometrisch bestimmt. In allen drei Kokulturansätzen erhöhte sich der Anteil CD3+ T-Zellen im Verlauf der Kokultur auf über 85 % der gesamten Leukozytenpopulation, während sich der Anteil an CD16+ NK-Zellen auf unter 3 % verringerte. Beim Vergleich der Kokulturen waren keine Unterschiede hinsichtlich des Anteils CD3+ und CD16+ Zellen feststellbar.

3.4.3 Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen

Der Oberflächenmarker CD69 wird von T-Zellen nicht konstitutiv exprimiert, kann aber im Rahmen der frühen T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden. Um den Einfluss einer Kokultur mit Tumorzelllysat-präsentierenden dendritischen Zellen auf den T-Zell-Aktivierungszustand zu untersuchen, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD69 auf CD4+ Th-Zellen und CD8+ CTL im Verlauf der Kokultur 48 Stunden nach erneuter Stimulation mit dendritischen Zellen.

Frisch isolierte CD3+ T-Zellen zeigten mit 0,3 % eine sehr geringe Expression des Markers CD69. 48 Stunden nach der dritten Stimulation exprimierten 2,9 % der CD8+ Zellen in der Kokultur mit ungepulsten dendritischen Zellen den Marker CD69. Die CD69-Expression erhöhte sich deutlich auf 8,3 % der CD8+ Zellen, wenn Tumorzelllysat-gepulste dendritische Zellen als Stimulatoren verwendet wurden. In der Kokultur mit Tumorzelllysat+KLH-gepulsten dendritischen Zellen war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt. Hier exprimierten 17,1 % der CD8+ Zellen den Aktivierungsmarker CD69 (Abbildung 20).

Die Analyse der CD69-Expression auf CD4+ Zellen zeigte eine vergleichbare Tendenz. Der Anteil CD69+ T-Helfer-Zellen war in der Kokultur mit ungepulsten dendritischen Zellen 3,9 %, mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen 9,4 % und mit Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen 17,8 % (Abbildung 20).

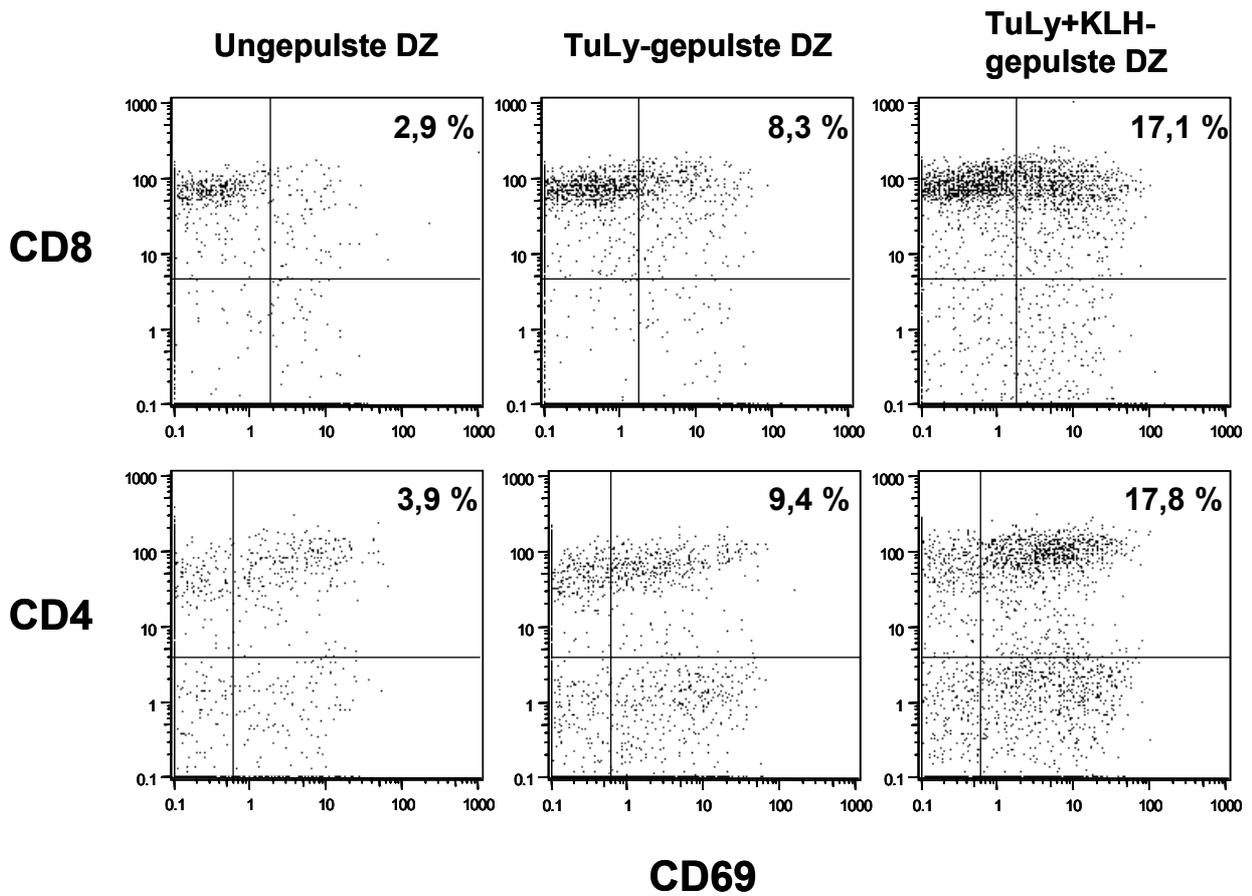


Abbildung 20 Durchflusszytometrische Analyse der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD8+ CTL und CD4+ Th-Zellen 48 Stunden nach der dritten Stimulation mit ungepulsten, Tumorzelllysate (TuLy)-gepulsten und Tumorzelllysate plus KLH (TuLy+KLH)-gepulsten dendritischen Zellen. Der prozentuale Anteil CD69-positiver CD8+ bzw. CD4+ Zellen ist in den Punkthistogrammen angegeben. Ein repräsentatives Ergebnis aus vier Experimenten ist gezeigt.

3.4.4 Messung der Zytokin-Freisetzung im Überstand der Kokulturen

Immunreaktionen können anhand des Zytokin-Profiles am Ort des Immungeschehens in zwei Kategorien eingeteilt werden. Eine Th1-Immunantwort zeichnet sich durch das Vorhandensein von Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ aus, Th2-Immunantworten hingegen finden in Gegenwart von IL-4 und IL-5 statt. Im Rahmen von Vakzinierungsstrategien zur Bekämpfung von Tumoren wird eine Th1-Immunantwort angestrebt, um eine effektive Induktion tumor-spezifischer CTL zu gewährleisten. Um das Zytokin-Profil in den Kokulturen zu bestimmen, wurde 48 Stunden nach Stimulation mit dendritischen Zellen die Sekretion von IL-12, IFN- γ , sowie IL-4 im Überstand der Kokulturen im ELISA gemessen.

Bei der Kultur von T-Zellen in Abwesenheit von dendritischen Zellen und Tumor-Antigenen lag die sezernierte Menge an IL-12, IFN- γ und IL-4 unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA. Wurden die T-Zellen mit ungepulsten dendritischen Zellen kokultiviert, fand sich IL-12 (738 ± 68 pg/ml) im Überstand, aber nur geringe Mengen an IFN- γ (102 ± 26 pg/ml). Durch die Pulsung der dendritischen Zellen mit Tumorzelllysat konnten nach der dritten Stimulation eine starke Zunahme der IL-12-Produktion (1242 ± 56 pg/ml) und große Mengen an IFN- γ (1090 ± 92 pg/ml) nachgewiesen werden. Die Kokultur der T-Zellen mit dendritischen Zellen, die mit Tumorzelllysat und KLH gepulst wurden, steigerte sowohl die IL-12- (1818 ± 136 pg/ml) als auch die IFN- γ - (1822 ± 38 pg/ml) Produktion weiter. In keiner der Kokulturansätze konnte IL-4 in größeren Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 21). Das Zytokin-Profil in den Kokulturen von T-Zellen mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen entsprach demnach einer Th1-Immunantwort.

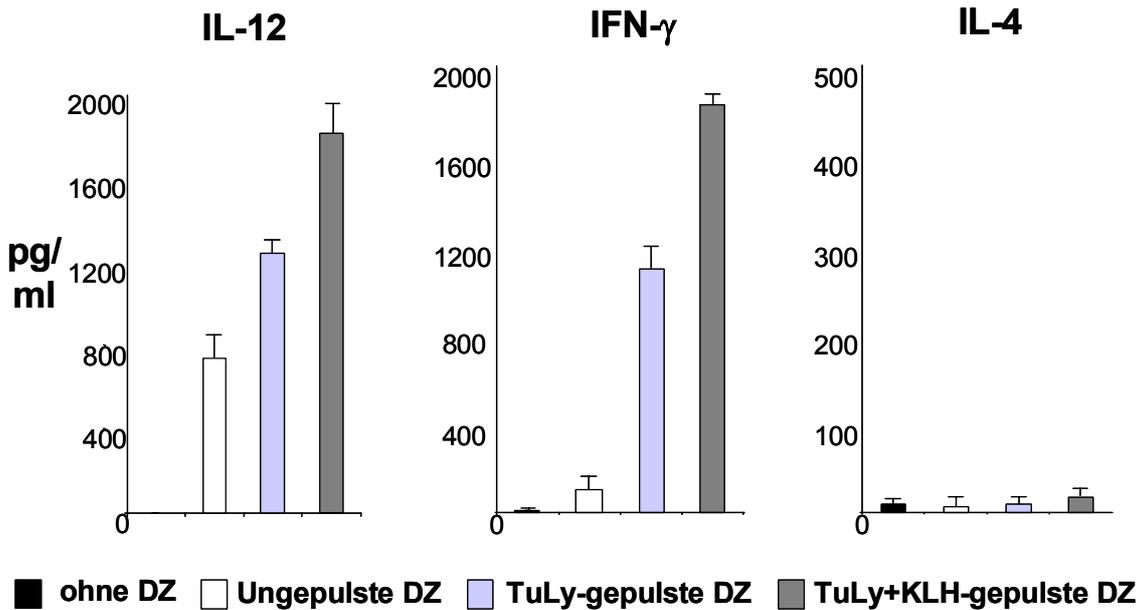


Abbildung 21 Zytokin-Profil im Überstand der Kokulturen. 48 Stunden nach der dritten Stimulation wurde der Gehalt an IL-12, IFN- γ und IL-4 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm der Standardabweichung.

3.4.5 Tumorzelllysate-induzierte T-Zell-Proliferation

Basierend auf der Annahme, dass Tumorzelllysate-gepulste dendritische Zellen naive T-Zellen zu Tumor-Antigen-spezifischen T-Zellen primen und dass vor allem die spezifischen T-Zellen bei erneutem Antigenkontakt proliferieren, wurde durch die Messung der Tumorzelllysate-induzierten T-Zell-Proliferation die Expansion der spezifischen T-Zellen in den Kokulturansätzen gemessen. Durch das Fehlen eines definierten Antigens im Tumorzelllysate ist eine exakte quantitative Bestimmung der Frequenz Tumor-spezifischer T-Zellen nicht möglich. Jedoch kann durch eine Proliferationsmessung (Einbau von [^3H]-Thymidin in die DNS proliferierender T-Zellen) die Abhängigkeit der T-Zell-Proliferation von der Anwesenheit von Tumor-Antigenen gemessen und so auf die Anzahl Antigen-reaktiver T-Zellen geschlossen werden.

Hierzu wurden die T-Zellen nach wiederholten Stimulationen aus den Kokulturansätzen entfernt und mit Tumorzelllysate-gepulsten oder ungepulsten dendritischen Zellen für vier Tage restimuliert. Wie aus Abbildung 22 ersichtlich, fand bei erneutem Antigenkontakt der T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen eine um den Faktor 2,0 (\pm 0,4) gesteigerte Proliferation im Vergleich zur Restimulation mit ungepulsten dendri-

tischen Zellen statt. Die T-Zell-Proliferation wurde auf den Faktor 3,5 ($\pm 0,5$) gesteigert, wenn T-Zellen vor der Restimulation mit Tumorzelllysatz plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert worden waren.

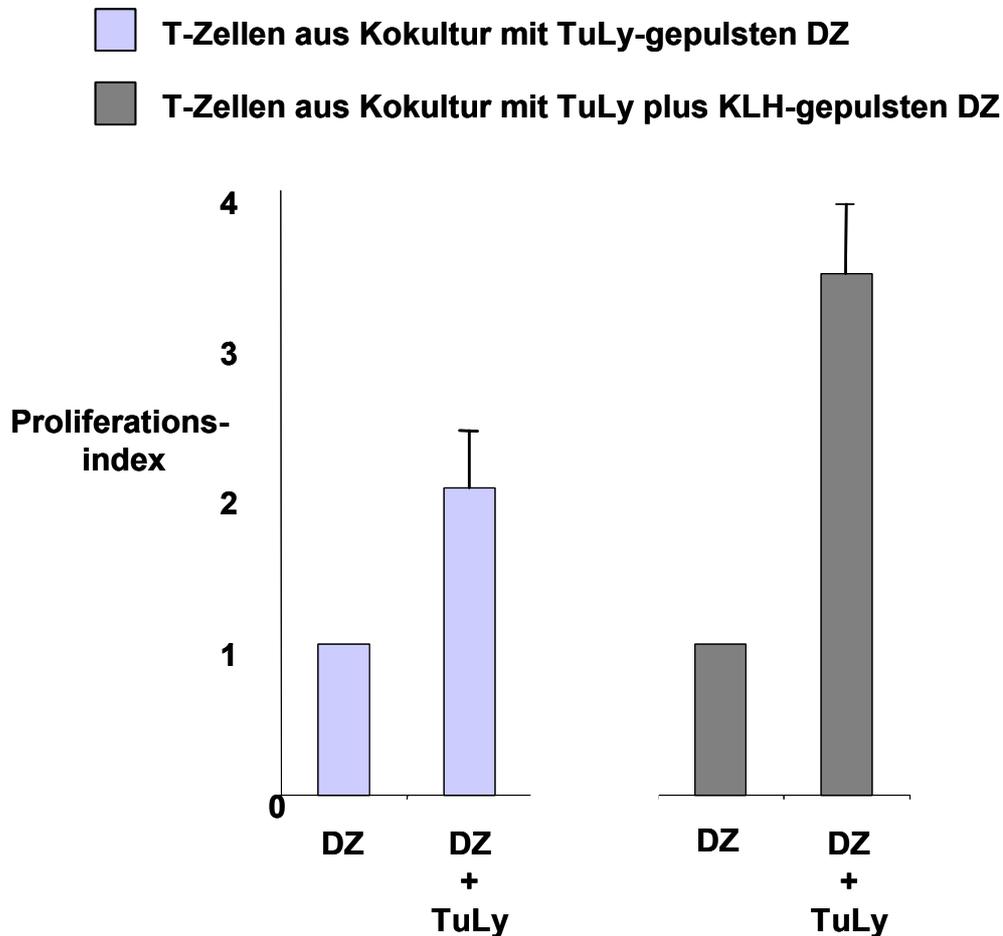


Abbildung 22 T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit von erneutem Antigen-Kontakt. Zum Zeitpunkt der dritten Stimulation wurden T-Zellen aus den Antigen-gepulsten Kokulturen entnommen, mit Tumorzelllysatz-gepulsten oder ungepulsten autologen dendritischen Zellen restimuliert und die Induktion einer T-Zell-Proliferation nach vier Tagen in einem [^3H]-Thymidin-Proliferationsassay gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten \pm der Standardabweichung.

3.5 Nachweis zytotoxischer T-Zell-Aktivität

Der Endpunkt der Kokulturen war der Nachweis Tumor-spezifischer zytotoxischer Aktivität der T-Zellen gegen Panc-1 Tumorzellen nach wiederholter Stimulation mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen. Tumor-spezifische CTL erkennen ihre Zielzellen durch Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors mit tumoreigenen MHC I-/Peptid-Komplexen und können diese abtöten. Die zytotoxische T-Zell-Aktivität kann durch die Freisetzung von ^{51}Cr aus lysierten Tumorzellen bestimmt werden. Vorversuche ergaben, dass 24 Stunden nach ^{51}Cr -Markierung weniger als 20 % der in den Tumorzellen aufgenommenen Radioaktivität spontan freigesetzt worden war. Die Stabilität der ^{51}Cr -Markierung der Tumorzellen ermöglichte es einen verlängerten ^{51}Cr -Freisetzung-Test durchzuführen. Eine Testzeit von 18 Stunden erwies sich hinsichtlich der Signalstärke und Testsensitivität als optimal.

3.5.1 Spezifische Tumorzell-Lyse

Nach vier Stimulationen mit Tumorzelllysat-gepulsten bzw. Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen wurden die T-Zellen (Effektorzellen) in einem 18-stündigem ^{51}Cr -Freisetzung-Test mit Panc-1 Tumorzellen (Zielzellen) inkubiert. Wie in Abbildung 23 dargestellt zeigten T-Zellen aus der Kokultur mit ungepulsten dendritischen Zellen eine geringe lytische Aktivität, während T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen bei einem Effektor-/Ziel-Zellverhältnis von 100:1 durchschnittlich 24 % der Panc-1 Zellen lysierten. Die höchste lytische Aktivität zeigten T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen beobachtet, mit 32 % Lyse der Panc-1 Zellen bei gleichem Effektor-/Ziel-Zellverhältnis. Als Negativkontrolle diente die Magenkarzinomzelllinie Kato III, die kaum lysiert wurde.

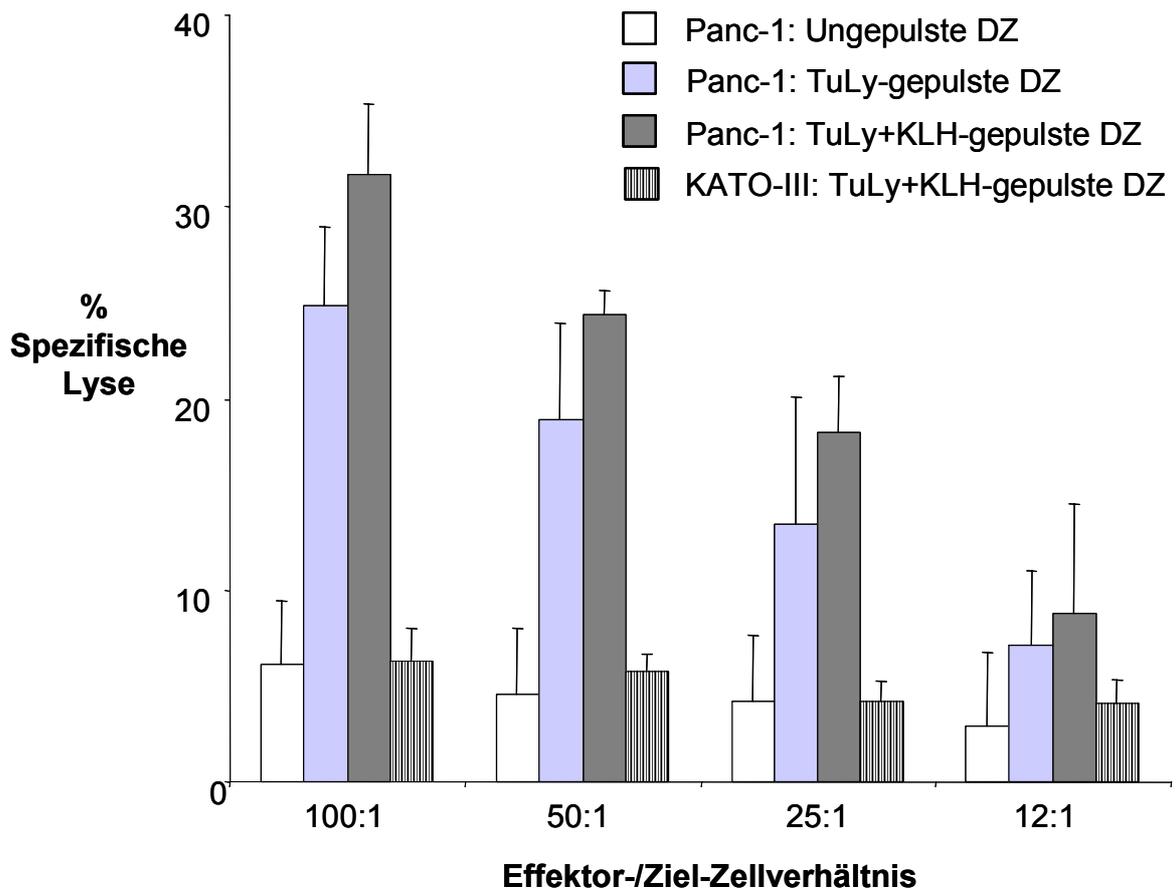


Abbildung 23 Spezifische Lyse von Panc-1 Tumorzellen durch T-Effektor-Zellen aus den Kokulturen mit dendritischen Zellen. Die T-Zellen wurden nach der vierten Stimulation aus der Kokultur mit ungepulsten, Tumorzelllysat-gepulsten bzw. Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen entfernt und mit ^{51}Cr -markierten Panc-1 Tumorzellen (weißer, hellgrauer und dunkelgrauer Balken) in den angegebenen Verhältnissen inkubiert. ^{51}Cr -markierte Kato III-Zellen dienen als Kontrolle (längstgestreifte Balken). Nach 18 Stunden wurden das freigesetzte ^{51}Cr im Überstand bestimmt und die spezifische Lyse der Zielzellen errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten \pm der Standardabweichung.

Im Folgenden wurde untersucht, ob bezüglich der Tumorzell-Lyse eine MHC-Restriktion besteht. Hierzu wurden die Tumorzellen mit einem MHC I-blockierenden Antikörper (W6/32) für eine Stunde vor Beginn des ^{51}Cr -Freisetzungstests präinkubiert. Durch die MHC I-Blockade wurde die Tumorzellyse durch die T-Effektor-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen im Vergleich zu Experimenten ohne Präinkubation mit W6/32 um über 50 % reduziert (Abbildung 24).

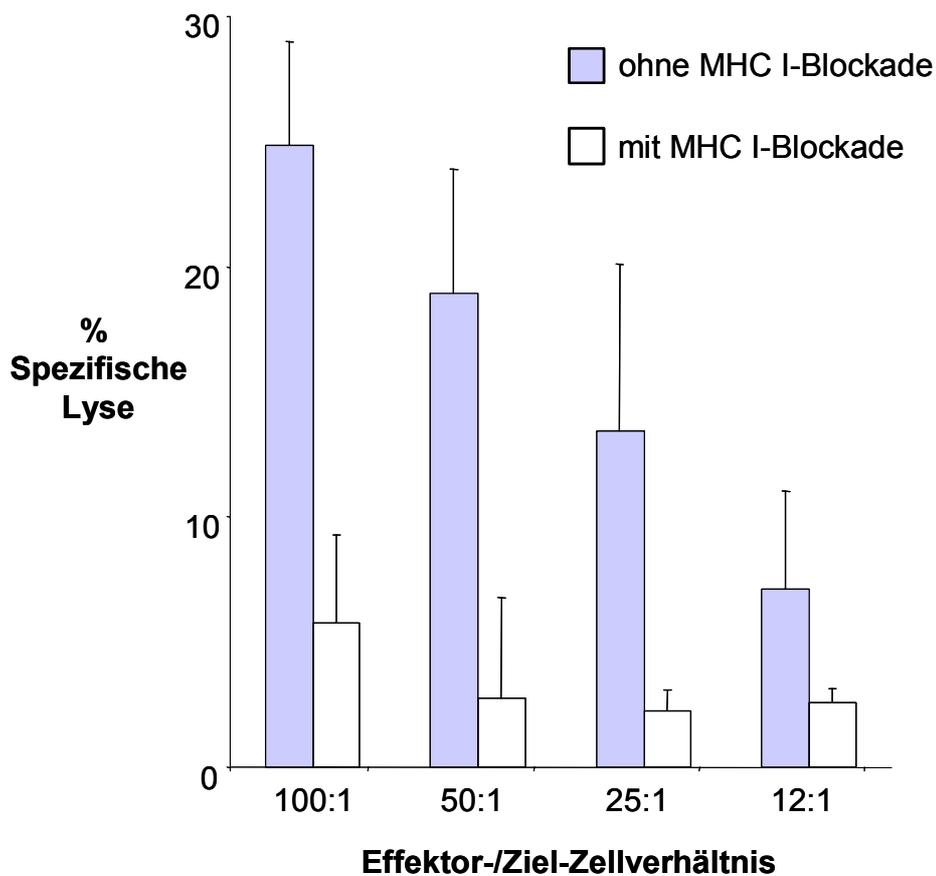


Abbildung 24 MHC I-Restriktion der Panc-1 Tumorzell-Lyse. T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen wurden mit ^{51}Cr -markierten Panc-1 Zellen in den angegebenen Verhältnissen inkubiert. Um eine Interaktion der CTL mit den Tumorzellen zu inhibieren wurden die Panc-1 Zellen für eine Stunde mit den MHC I-blockierenden Antikörpern (W6/32) präinkubiert und anschließend die spezifische Lyse der Zielzellen im Vergleich zur Lyse ohne Präinkubation mit W6/32 in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten \pm der Standardabweichung.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Entwicklung einer dendritischen Zell-Vakzine wurde die Kultur von dendritischen Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes optimiert und ein Protokoll für deren Beladung mit Tumor-Antigenen aus dem Zelllysat von Pankreaskarzinomzelllinien erarbeitet. Zur Steigerung der potentiellen Wirksamkeit wurde die Auswirkung einer anschließenden Aktivierung auf die Fähigkeit dendritischer Zellen zur T-Zell-Aktivierung anhand phänotypischer und funktioneller Parameter erforscht. Um die Induktion einer Tumor-spezifischen Immunreaktion durch eine dendritische Zell-Vakzine *in vitro* zu untersuchen, wurde in vierwöchigen Kokulturansätzen Tumorzelllysat-gepulster und aktivierter dendritischer Zellen mit autologen T-Zellen die Induktion Tumor-Antigen-abhängiger T-Zell-Aktivierungsmarker und die spezifische lytische Aktivität gegen Tumorzellen nachgewiesen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich dendritische Zellen aus mononukleären Zellen (MNC) des peripheren Blutes über einen 60-minütigen Adhärenzschritt und anschließender fünftägiger Kultur unter Zugabe von GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) reproduzierbar mit 40-70 % Reinheit und einer Ausbeute von 5-10 % der eingesetzten MNC generieren lassen. Die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen entsprachen nach morphologischen Kriterien, gemäß der Expression von Adhäsions-, kostimulatorischen und Antigen-präsentierenden Molekülen, sowie durch ihre Kapazität zur Stimulation allogener T-Zellen den *in vivo* beschriebenen unreifen, gewebständigen dendritischen Zellen. Aufgrund ihrer hohen Endozytose-Aktivität eigneten sie sich für die Beladung mit den löslichen Antigenen aus einem Tumorzelllysat.

Das Tumorzelllysat wurde durch vier Gefrier-Tau-Zyklen aus einer Einzellsuspension der Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, Panc-1 und Capan-1 und anschließender Entfernung des groben Zelldebris durch Zentrifugation und Sterilfiltration des Überstandes gewonnen. Der Effekt der Antigen-Beladung auf die dendritische Zellfunktion konnte in drei verschiedene Muster eingeteilt werden: Tumorzelllysat der Zelllinie Panc-1 zeigte keinen wesentlichen Effekt, Tumorzelllysat der Zelllinie AsPC-1 hingegen hatte einen leicht aktivierenden Effekt auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität der dendritischen Zellen. Durch Tumorzelllysat der Zelllinie Capan-1 wurde die Fähigkeit der dendritischen Zellen, T-Zellen zur Proliferation anzuregen, vollständig aufgehoben.

Eine Inkubation dendritischer Zellen mit proinflammatorischen Stimuli wie LPS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ führte zu deren Aktivierung, die mit einer verstärkten Expression der oben genannten Oberflächenmarker, sowie mit der Neu-Expression des Reifemarkers CD83 verbunden war. Morphologisch zeichneten sich die aktivierten dendritischen Zellen durch die Ausbildung multipler, sternförmiger zytoplasmatischer Zellausläufer aus. Im aktivierten Zustand waren sie zudem die potenteren T-Zell-Stimulatoren in Proliferationsassays. Von den getesteten, auch für den klinischen Einsatz geeigneten Reifestimuli erwies sich die Kombination aus TNF- α (1000 U/ml) und PGE₂ (1 μ M) im Hinblick auf die Zellausbeute und die Induktion einer homogen ausgereiften Zellpopulationen als geeignet. Nach Aktivierung mit TNF- α und PGE₂ zeigten dendritische Zellen eine hohe Expressionsdichte von CD54, CD80, CD86 und MHC II und des Reifemarkers CD83, induzierten eine ausgeprägte T-Zell-Proliferation und produzierten große Mengen an IL-12.

Nach wöchentlicher Restimulation autologer T-Zellen mit Tumorzelllysat-gepulsten und anschließend mit TNF- α und PGE₂ aktivierten dendritischen Zellen waren in der Kokultur die Freisetzung von IFN- γ und IL-12 als Zeichen einer Th1-gerichteten Immunantwort nachweisbar. Zudem zeigten die CD4+ und CD8+ T-Zell-Subpopulationen eine gesteigerte Expression des Aktivierungsmarkers CD69. Der Nachweis einer Tumorzelllysat-induzierten T-Zell-Proliferation deutete auf eine erhöhte Frequenz an Tumor-Antigen-spezifischen T-Zellen in den Kokulturansätzen nach mehrmaliger Stimulation hin.

Nach vier Stimulationen der T-Zellen mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen (Lysat der Zelllinie Panc-1) konnte eine Tumor-spezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität gegen Panc-1 Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Inhibition der Zell-Lyse um über 50 % durch MHC I-blockierende Antikörper wies auf eine vorwiegend CD8+ CTL-vermittelte Tumor-Lyse hin. Die Magenkarzinomzelllinie KATO-III diente als Kontrolle und wurde kaum lysiert.

Die oben beschriebenen Indikatoren einer T-Zell-Aktivierung und die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Aktivität konnten durch die Restimulation autologer T-Zellen mit dendritischen Zellen, die gleichzeitig mit Tumorzelllysat und dem immunogenen Adjuvans KLH beladen wurden, weiter verstärkt werden.

4.2 Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Dendritische Zellen lassen sich aus einer Vielzahl verschiedener Vorläuferzellen und Subtypen generieren (siehe Abschnitt 1.2.1). In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für die Kultur dendritischer Zellen aus Monozyten, da Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen gerade im Hinblick auf den klinischen Einsatz zahlreiche Vorteile bieten. Sie lassen sich aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes auch ohne vorherige Mobilisation mit G-CSF oder flt3-Ligand in großer Zahl innerhalb von 5-7 Tagen generieren. Sie sind eine gut charakterisierte Subpopulation dendritischer Zellen und es konnte gezeigt werden, dass sie auch bei Tumorpatienten mit fortgeschrittener Erkrankung generiert werden können (Romani et al. 1994). Beim klinischen Einsatz Tumor-Antigen-beladener, Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen zur Behandlung von Malignomen konnte in ersten klinischen Studien bei einem Teil der Patienten ein immunologisches Ansprechen und klinische Besserung in Form von Tumorregression erzielt werden (siehe 1.3.2, Tabelle 1).

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen entsprach im Wesentlichen den bereits von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Kulturprotokollen (Romani et al. 1994, Bender et al. 1996, Thurner et al. 1999). Die dendritischen Zellen ließen sich reproduzierbar aus adhärennten MNC des peripheren Blutes in einer fünftägigen Kultur unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 mit einer Ausbeute von 5-10 % der eingesetzten Zellen generieren. GM-CSF ist ein Wachstumsfaktor für alle dendritischen Zellen der immunstimulatorischen, myeloiden Abstammungsreihe (Reid et al. 1992) und IL-4 inhibiert die Entwicklung der Monozyten zu Makrophagen (Jansen et al. 1989). Dementsprechend führte die Reduktion der eingesetzten Menge an GM-CSF und IL-4 zur Entwicklung stark adhärenter Zellen mit Makrophagen-ähnlicher Morphologie.

Ein Kritikpunkt über die Verwendung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen ist das Fehlen eines hinreichend erforschten physiologischen Differenzierungsweges der Monozyten zu dendritischen Zellen. Es ist unklar, ob Monozyten *in vivo* je nach Zytokinmilieu entweder in Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren oder nur eine Subpopulation der Monozyten die dendritischen Vorläuferzellen darstellt (Crawford et al. 1999). Ein weiteres Modell postuliert, dass sich Monozyten *in vivo* erst nach transendothelialer Migration zu dendritischen Zellen differenzieren, während sich Monozyten, die in die subendotheliale Matrix einwandern, zu Makrophagen entwickeln

(Randolph et al. 1998). Somit ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschliessend geklärt, ob es sich bei der Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten um ein *in vitro* induziertes Phänomen handelt und ob dies Nachteile für deren klinischen Einsatz birgt.

Andererseits entsprachen die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen dieser Arbeit in ihren phänotypischen und funktionellen Eigenschaften den *in vivo* beschriebenen unreifen dendritischen Zellen. Die Zellen hatten die kennzeichnende Morphologie mit multiplen Zytoplasmaausläufern und den charakteristischen Immunphänotyp mit einer hohen Expression von Adhäsionsmolekülen (CD11c, CD54, CD58), kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) und Antigen-präsentierenden Molekülen (MHC I und II). Zudem zeigten sie im Vergleich zu MNC eine hohe Endozytose-Aktivität für FITC-Dextran und eine deutlich gesteigerte Kapazität zur Induktion der Proliferation allogener T-Zellen. Die ausgeprägte Phagozytosekapazität unreifer dendritischer Zellen für lösliche Antigene ist über rezeptorvermittelte Endozytose (z.B. Mannoserezeptoren) und Flüssigphase-Macropinozytose vermittelt (Sallusto et al. 1995). Hierdurch sind dendritische Zellen in der Lage lösliche Antigene in kleinsten Konzentrationen von 10^{-10} M aufzunehmen und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Unreife dendritische Zellen zeigen bei Entzug der Zytokine IL-4 und GM-CSF allerdings einen instabilen Phänotyp (Sallusto et al. 1994) und entwickeln durch Kontakt mit hemmenden Zytokinen wie IL-10 Toleranz-induzierende Eigenschaften für die präsentierten Antigene. Dies führt zu einer verringerten T-Zell-Proliferation und der Anergie spezifischer T-Zellen (Steinbrink et al. 1997).

Unreife Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen eignen sich somit aufgrund ihrer hohen Endozytose-Aktivität für die Beladung mit Antigenen, die nach Aufnahme und intrazellulärer Prozessierung über immunogene MHC-Peptid-Komplexe den T-Effektor-Zellen präsentiert werden. Für einen immuntherapeutischen Einsatz ohne weitere Reifeinduktion sind sie aber aufgrund ihres instabilen Phänotyps und potentiell tolerogenen Eigenschaften nur bedingt geeignet (Jonuleit et al. 2001).

4.3 Aktivierung dendritischer Zellen

Für die Induktion einer potenten Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen ist eine Aktivierung der Antigen-präsentierenden dendritischen Zelle erforderlich (Banchereau et al. 2000). Dendritische Zellen werden durch eine Vielzahl von Gefahrensignalen aktiviert, die beim Eindringen von Mikroorganismen, entzündlichen Gewebsreaktionen und ungeordneten Zellerfall freigesetzt werden. Dieser Prozess, auch Ausreifung genannt, ist gekennzeichnet durch die Veränderung der dendritischen Zellfunktionen von der Antigen-Aufnahme zur effektiven Antigen-Präsentation, verbunden mit der Ausprägung eines stabilen, stark immunstimulatorischen Phänotyps. Dhodapkar und Mitarbeiter (1999) wiesen die Bedeutung der Ausreifung *in vivo* nach. Die einmalige Vakzinierung gesunder Probanden mit $2-4 \times 10^6$ aktivierten dendritischen Zellen führte zur Induktion einer langanhaltenden T-Zell-vermittelten Immunität gegen das Neo-Antigen KLH und die Recall-Antigene Tetanustoxoid und Influenza-Matrixprotein (> 90 Tage). Die Injektion unausgereifter dendritischer Zellen hingegen hatte die Antigen-spezifische Inhibition der T-Zell-Effektorfunktion zur Folge (Dhodapkar et al. 2001).

In unseren Experimenten führte die 48-stündige Inkubation dendritischer Zellen mit den inflammatorischen Stimuli LPS, TNF- α , TNF- α in Kombination mit PGE₂ und TNF- α in Kombination mit IL-1 β und IL-6 zu einer deutlichen Aktivierung der dendritischen Zellen hinsichtlich phänotypischer und funktioneller Eigenschaften, was den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen entspricht. Es kam zu einer starken Hochregulierung der Adhäsions-, kostimulatorischen und MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche (Romani et al. 1996, Thurner et al. 1999), sowie die Neu-Expression des Reifemarkers CD83 (Zhou et al. 1996). Aktivierte dendritische Zellen zeigten eine verringerte Endozytose-Aktivität für FITC-Dextran (Sallusto et al. 1994), die Sekretion des immunmodulatorischen Zytokins IL-12 (Rieser et al. 1997) und eine gesteigerte Potenz zur Induktion einer allogenen T-Zell-Proliferation (Bender et al. 1996).

Andere Arbeitsgruppen konnten bei aktivierten im Vergleich zu unaktivierten dendritischen Zellen eine gesteigerte Motilität (Gunzer et al. 2000), eine Resistenz gegen inhibierende Faktoren wie IL-10 und einen stabilen Phänotyp nachweisen, der trotz Entzugs von GM-CSF und IL-4 für mehr als 96 Stunden eine T-Zell-stimulatorische Wirkung zeigte (Thurner et al. 1999). Hinsichtlich einer effektiven Antigen-Beladung konnten ausgereifte dendritische Zellen aufgrund ihrer geringeren Phagozytoseaktivität nur von außen mit kurzen

antigenen Peptidsequenzen beladen werden, die sich direkt an die freien Peptid-Bindungsstellen der hochregulierten MHC I-Moleküle anlagerten (Thurner et al. 1999).

Von den in dieser Arbeit eingesetzten Reifestimuli erwies sich neben LPS (10 ng/ml) die Kombination aus TNF- α (1000 U/ml) und PGE₂ (1 μ M) im Hinblick auf die phänotypischen und funktionellen Parameter als der potenteste Reifestimulus. Für klinische Studien wurden bisher TNF- α (Kugler et al. 2000, Schott et al. 2001), die Kombination aus TNF- α und PGE₂ (Hörtl et al. 1999), die Kombination aus TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ (Thurner et al. 1999) und ein von aktivierten Monozyten konditioniertes Medium mit ähnlicher Zytokinzusammensetzung (Dhodapkar et al. 1999) als Reifestimuli verwendet.

Die Aktivierung mit TNF- α mit PGE₂ ist im Hinblick auf den klinischen Einsatz eine attraktive Kombination (Hörtl et al. 1999). Diese beiden Zytokine werden während entzündlicher Prozesse im lokalen Gewebe freigesetzt (Portanova et al. 1996) und es wurde ein synergistischer Effekt auf die Steigerung der IL-12-Produktion und die Expressionsdichte immunogener Oberflächenmarker der dendritischen Zellen nachgewiesen (Rieser et al. 1997). Hohe Konzentrationen an IL-12 führen zu einer Aktivierung von NK-Zellen (Trinchieri 1995) und fördern die Induktion Th1-gerichteter Immunantworten (Cella et al. 1996). TNF- α alleine erwies sich im Bezug auf die Induktion der IL-12-Produktion, aber auch der anderen Reife-Parameter als weniger potenter Aktivator dendritischer Zellen, so daß wir uns in weiteren Experimenten für die Aktivierung der Tumor-Antigen-beladenen dendritischen Zellen mit TNF- α und PGE₂ entschieden.

Inzwischen ist eine Diskussion über die Rolle von PGE₂ bei der Reifeinduktion entfacht worden. Steinbrink und Mitarbeiter (2000) identifizierten beim Vergleich verschiedener Prostaglandine in Kombination mit TNF- α , IL-1 und IL-6 das PGE₂ als potentestes Prostaglandin für eine vollständige Ausreifung der dendritischen Zellen und die Freisetzung der Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ . Kalinski und Mitarbeiter (2001) hingegen zeigten, dass die Aktivierung mit PGE₂ nur die Freisetzung der IL-12 p40 Untereinheit induzierte und zur Ausprägung einer Th2-gerichteten Immunantwort führte, während das für eine Th1-Polarisation benötigte bioaktive IL-12 p70 nicht nachweisbar war. Luft und Mitarbeiter (2002) sehen die Bedeutung von PGE₂ in der Steigerung der migratorischen Eigenschaften der dendritischen Zellen nach Kontakt mit einem Gefahrensignal. Auch sie stellten eine geringere Zytokinproduktion fest.

Es ist heute noch nicht abschließend geklärt, welche Kombination der möglichen Reifestimuli die für die Induktion einer effektiven Immunantwort gewünschten Eigenschaften der dendritischen Zellen optimiert. Auch der Zeitpunkt und die Intensität der Aktivierung sind entscheidend, da eine übermäßige Stimulation zu einer Überaktivierung und in der Folge zur „Erschöpfung“ der dendritischen Zellen führt (Langenkamp et al. 2000), während eine zu geringe Aktivierung die Zellen für inhibitorische Einflüsse wie IL-10 anfällig macht (Romani et al. 1996).

4.4 Beladung dendritischer Zellen mit Antigenen aus Tumorzelllysat

Wenn rasch wachsende Tumoren aufgrund einer unzureichenden Blutversorgung nekrotische Areale entwickeln, kann es *in vivo* zur Übertragung von löslichen Antigenen aus zerfallenden Tumorzellen auf lokale gewebsständige dendritische Zellen kommen. Wird der nekrotische Tumorzerfall von einer lokalen Entzündungsreaktion begleitet, kann dies zur Aktivierung der Antigen-beladenen dendritischen Zellen führen und eine Immunantwort gegen den Tumor induziert werden (Matzinger 1998, Fields et al. 1998). Dieser Mechanismus könnte das Phänomen spontaner Tumorregressionen bei Patienten erklären.

Polly Matzinger (1994) postuliert in ihrem „Danger-Modell“, dass der ungeordnete, nekrotische Zelluntergang ein endogenes Gefahrensignal für das Immunsystem darstellt und unreife dendritische Zellen durch alleinige Inkubation mit nekrotischen Tumorzellen aktiviert werden können (Gallucci et al. 1999). Das beim nekrotischen Zelluntergang freigesetzte Signal konnte bislang nicht identifiziert werden. Als mögliche Mechanismen werden die Freisetzung von Hitzeschockproteinen gp96 und hsp70 (Arnold-Schild et al. 1999, Todryk et al. 1999) und ATP (Schnurr et al. 2000) aus ihren intrazellulären Kompartimenten diskutiert, deren aktivierende Wirkung auf unreife dendritische Zellen nachgewiesen worden sind. Somit stellt sich die interessante Frage, ob durch die Verwendung von Tumorzelllysat dieser endogene Aktivierungsweg des Immunsystems nachvollzogen und für den klinischen Einsatz genützt werden kann.

Einfluss von Tumorzelllysate auf Aktivierung und Aktivierbarkeit dendritischer Zellen

Wir beobachteten nach der Inkubation unstimulierter dendritischer Zellen mit dem Tumorzelllysate der Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, Panc-1 und Capan-1 unterschiedliche Auswirkungen auf die dendritische Zellfunktion in Form einer gesteigerten, unveränderten und stark verringerten T-Zell-stimulatorischen Kapazität. Die gesteigerte T-Zell-stimulatorische Kapazität der AsPC-1-gepulsten dendritischen Zellen korrelierte mit einer verstärkten Expression von MHC II- und kostimulatorischen Molekülen. Auch Sauter und Mitarbeiter (2000) hatten eine Reifeinduktion nach Lysatepulsung beobachtet. Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf eine Mykoplasmen-Infektion der Zelllinien zurückzuführen war (Salio et al. 2000), wurden die verwendeten Zelllinien auf bakterielle Kontamination getestet (Institut für Mikrobiologie der LMU München, Prof. Heesemann). Die Inkubation dendritischer Zellen mit dem Tumorzelllysate von Panc-1 hatte weder Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker noch die T-Zell-stimulatorische Kapazität, während das Tumorzelllysate von Capan-1 zu einer völligen Inhibition der T-Zell-Proliferation führte. Dieser Effekt korrelierte nicht mit einer Veränderung der Oberflächenmarker und konnte auch durch die Aktivierung mit $\text{TNF-}\alpha$ und PGE_2 nicht aufgehoben werden. Da die Vitalität und der Phänotyp der mit dem Tumorzelllysate von Capan-1 gepulsten dendritischen Zellen unverändert war, könnten vom Tumor produzierte lösliche Faktoren für diesen hemmenden Effekt verantwortlich sein.

Für eine Reihe von Tumor-abgeleiteten Faktoren wurde eine hemmende Wirkung auf die dendritische Zellen identifiziert: Transforming growth factor β (TGF- β) hemmt die Antigen-Prozessierung und die allostimulatorische Kapazität der dendritischen Zellen, ohne die Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen zu beeinflussen (Bonham et al. 1996). Auch IL-10 reduziert die allostimulatorische Kapazität der dendritischen Zellen und induziert eine Antigen-spezifische Anergie der T-Zellen (Steinbrink et al. 1999), während Vascular endothelial growth factor (VEGF) die Ausreifung dendritischer Zellen inhibiert (Gabrilovich et al. 1996). Da in ihrer Funktion beeinträchtigte dendritische Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit weniger effektive Induktoren einer Immunantwort sind, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Tumorzelllysate-gepulste dendritische Zellen auf ihre T-Zell-stimulatorische Kapazität überprüft werden sollten, bevor sie als Vakzine in klinischen Studien eingesetzt werden (Schnurr et al. 2001).

Beladung der dendritischen Zellen mit löslichen Antigenen

In der vorliegenden Dissertation wurden lösliche Antigene aus dem Zelllysat ganzer Tumorzellen als Antigenquelle eingesetzt. Die Verwendung von aufgereinigtem Tumorzelllysat ist für den klinischen Einsatz ein praktikabler Ansatz, da nach Disruption der Zellmembranen durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen, der Abzentrifugation von Debris und anschließender Sterilfiltration, das Vorhandensein von lebensfähigen Tumorzellen in der Vakzineaufbereitung ausgeschlossen werden kann. Auch im Hinblick auf die Induktion effektiver Antitumor-Immunität scheint die Verwendung von Tumorzelllysat ein attraktives Konzept, weil im Lysat das gesamte antigene Spektrum der Tumorzellen enthalten ist. Werden diese nach Aufnahme sowohl über MHC I- als auch MHC II-Moleküle präsentiert führt dies potentiell zur Induktion von CD8+ CTL und CD4+ Th-Zellen gegen eine Vielzahl antigenen Epitope (Mule 2000). Gerade bei der Immuntherapie heterogener solider Tumoren, wie dem Pankreaskarzinom, wird die Induktion einer polyklonalen Immunantwort angestrebt.

Die MHC-Präsentation antigenen Peptide hängt von deren Ursprung und intrazellulärer Prozessierung ab (Germain 1994). Als klassischer Prozessierungsweg extrazellulärer Antigene durch Antigen-präsentierende Zellen gilt die Aufnahme über Endo-, Macropino- und Phagozytose und der Abbau der Antigene in kurze Peptidsequenzen in den vesikulären Phagosomen. Die antigenen Peptidsequenzen werden im post-Golgi Kompartiment an vorsynthetisierte MHC II-Moleküle komplexiert und anschließend an der Zelloberfläche u.a zur Induktion von CD4+ Th-Zellen präsentiert (Sallusto et al. 1995). Die T-Helferzellen haben eine wichtige unterstützende Funktion bei der Induktion einer zytotoxischen Immunantwort (Bennett et al. 1997).

Die primären Effektorzellen zur Abwehr von Tumoren sind aber CD8+ CTL, für deren spezifische Induktion die relevanten Tumor-Epitope über MHC I-Moleküle präsentiert werden müssen. Klassische MHC I-Epitope stammen von intrazellulären Antigen-Strukturen ab. Diese werden im Zytosol von Proteasomen in antigene Peptidsequenzen degradiert, über TAP (transporters associated with antigen processing) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) eingeschleust, im ER-Lumen an MHC I-Moleküle gekoppelt und an die Zelloberfläche transportiert (Shen et al. 1997).

Um das Phänomen des "Cross-Priming" bei der Transplantatabstoßung zu erklären, wo Antigene der Spenderzellen von Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers aufgenommen werden und zur Induktion zytotoxischer Abstoßungsreaktionen führen, wurde nach alternativen Wegen für die Prozessierung extrazellulärer Antigene auf MHC I-Moleküle gesucht. Sowohl für Makrophagen als auch dendritische Zellen konnte die Übertragung aufgenommener Antigene aus den Phagosomen ins Zytosol nachgewiesen werden, von wo aus diese Antigene entsprechend dem klassischen Prozessierungsweg für intrazelluläre Antigene auf MHC I-Moleküle geladen wurden (Toujas et al. 1997). Auch ein nicht-zytosolischer Prozessierungsweg extrazellulärer Proteine auf MHC I-Moleküle dendritischer Zellen ist beschrieben. Nach Antigenaufnahme wurden die MHC I-Epitope in den Phagosomen generiert, dort TAP-unabhängig an vorgefertigte MHC I-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert (Bachmann et al. 1995).

Bei Untersuchungen an dendritischen Zellen wiesen Shen und Mitarbeiter (1997) nach, dass frei lösliche Peptid-Antigene nach Aufnahme auf MHC I-Moleküle prozessiert wurden und CD8⁺ T-Zellklone aktivierten. Es zeigte sich jedoch, dass nach Inkubation mit den gleichen, diesmal an Latexkügelchen gebundenen Peptid-Antigenen eine 100-fach niedrigere Antigenkonzentration für eine effektive MHC I-Präsentation ausreichte. Diese Arbeit warf die Frage auf, ob die Aufbereitung der relevanten Antigene in Form kleiner Partikel für deren Präsentation über die MHC I-Moleküle der dendritischen Zellen effektiver ist. Ein möglicher Mechanismus für die effektivere Prozessierung partikulärer Antigene war der Nachweis von spezifischen Oberflächenrezeptoren für Hitzeschockproteine (hsp) auf unreifen dendritischen Zellen (Arnold-Schild et al. 1999). Hsp sind in Zellen ubiquitär nachweisbar, werden bei Zellstress verstärkt exprimiert und haben eine Helferfunktion bei der Prozessierung von Proteinstrukturen. Durch Koppelung relevanter Antigene an hsp konnten Antigen-spezifische CD8⁺ CTL induziert werden (Todryk et al. 1999).

Die Antigen-Aufbereitung in Form noch größerer Partikel scheint die Effektivität der MHC I-Präsentation zu steigern. Albert und Mitarbeiter (1998) konnten nach Inkubation unreifer dendritischer Zellen mit apoptotischen Tumorzellen eine CD8⁺ CTL-Antwort induzieren, während die Inkubation mit nekrotischen und somit löslichem Tumormaterial nicht zur Induktion der CTL führte. In eigenen Nachfolgearbeiten zeigte sich die Antigen-Beladung dendritischer Zellen mit apoptotischen Pankreaskarzinomzellen der Beladung mit Tumorzelllysat im Hinblick auf das „Cross-Priming“ zytotoxischer T-Zellen überlegen (Schnurr et

al. 2002). Interessant ist die Frage, inwieweit eine erhöhte Expression von hsp in den apoptotischen Tumorzellen für diesen Effekt verantwortlich war, die durch den Zellstress bei der UV-Bestrahlung oder der Hyperthermiebehandlung während der Apoptose-Induktion bewirkt wurde (Feng et al. 2001).

Um die direkte Einschleusung der löslichen Antigene aus dem Tumorzelllysate in den zytosolischen MHC I-Prozessierungsweg sicherzustellen, verwendeten einige Arbeitsgruppen liposomale Überträgersysteme (Mulders et al. 1998, Osman et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde auf artifizielle Übertragungswege verzichtet, um eine optimale Vitalität der Zellen sicherzustellen. Abdel-Wahab und Mitarbeiter (1998) konnten zudem durch Anfärbung des Tumorzelllysate mit Biotin dessen intrazelluläre Aufnahme nach vierstündiger Inkubation mit unreifen dendritischen Zellen zeigen und *in vitro* mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen CD8⁺ CTL gegen autologer Melanomzellen aus Biopsiematerial und Melanomzelllinien induzieren.

Dosierung der Tumorzelllysate-Konzentration

Die bislang bei der Antigenpulsung *in vivo* und *in vitro* eingesetzten Lysatekonzentrationen weisen große Varianzen auf, da die Konzentration der, für die Tumorabstoßung relevanten Antigene im Tumorzelllysate schwer zu bestimmen ist. Um die Bedingungen für die Antigenpulsung mit Tumorzelllysate in den eigenen Versuchsansätzen soweit wie möglich zu standardisieren, wurden die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate mittels einer Bradford-Proteinbestimmung quantifiziert. Somit konnte für die verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien die optimale Lysatekonzentration für die Beladung der dendritischen Zellen anhand der Parameter Zellvitalität, aktivierter Phänotyp und T-Zell-stimulatorische Kapazität ermittelt werden.

Einsatz von KLH als Adjuvans

Adjuvantien sind Substanzen mit immunstimulatorischer Wirkung, durch deren gleichzeitige Gabe oder Koppelung mit den relevanten Antigenen die Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort verstärkt werden soll. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) ist ein xenogenes Protein und hat eine stark aktivierende Wirkung auf CD4⁺ Th-Zellen. Die adjuvanten Eigenschaften von KLH führten in einer Reihe von Peptid-Vakzinierungsstudien (Kwak et al. 1992, Timmerman et al. 2000) zu einem verbesserten immunologischen und klinischen Ansprechen gegen die Tumoren und machen KLH zu einem vielversprechenden Adjuvans

bei der Immuntherapie mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen (Nestle et al. 1998, Shimizu et al. 2001, Chang et al. 2002).

Die Beladung dendritischer Zellen mit Tumorzelllysate plus KLH basiert auf der Vorstellung, dass die simultane Präsentation von Tumor-Antigenen und KLH zu einer starken Aktivierung von CD4⁺ Th-Zellen führt, was die Induktion der für die Tumorabwehr benötigten CD8⁺ CTL nachhaltig unterstützt (Bennett et al. 1997). Das hoch immunogene KLH bewirkt u.a. die Freisetzung des T-Zell-Proliferationsfaktors IL-2 durch CD4⁺ Th-Zellen, die zudem über ihr Oberflächenmolekül CD40-Ligand mit den dendritischen Zellen interagieren. Über diesen Feedback-Mechanismus aktivierte dendritische Zellen induzieren durch ihre gesteigerte T-Zell-stimulatorische Kapazität und die Freisetzung von IL-12 die Ausprägung Th1-gerichteter Immunantworten (Cella et al. 1996). CD40-Ligand aktivierte dendritische Zellen gelten zudem als besonders potente Induktoren spezifischer CD8⁺ CTL (Lanzavecchia 1998, Ridge et al. 1998). Durch die gleichzeitige Präsentation der Tumor-Antigene auf den jetzt voll aktivierten dendritischen Zellen wird die Immunogenität der Tumor-Epitope deutlich gesteigert. Die Kombination mit dem Proliferations-fördernden Zytokinmilieu optimiert die Bedingungen für die Aktivierung und Expansion der schwächer reaktiven Tumor-Antigen-spezifischen CD8⁺ CTL (Höftl et al. 1999).

Basierend auf ähnlichen Überlegungen wird in klinischen Vakzineprotokollen versucht, die natürliche Immunreaktion gegen xenogene und allogene Epitope zu nützen, um die gegen die Tumor-Antigene gerichtete Immunantwort zu verstärken. Die Beladung dendritischer Zellen mit xenogenen Tumor-Antigenen induzierte eine Immunreaktion gegen gemeinsame Antigen-Epitope und konnte eine bestehende Immuntoleranz gegen das autologe Antigen durchbrechen (Fong et al. 2001). Die Fusion allogener dendritischer Zellen mit autologen Tumorzellen zielte darauf ab, durch die erhöhte Immunogenität der Vakzine-Aufbereitung die spezifische Immunantwort gegen den Tumor zu steigern (Kugler et al. 2000).

4.5 Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen durch Kokultur von Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen

Nach Vakzinierung gegen ein definiertes Antigen stehen *in vitro* mehrere Messmethoden für die Beurteilung der Immunreaktion, insbesondere der spezifischen T-Zell-Antwort, zur Verfügung (Immunmonitoring). Aktivierte T-Zellen produzieren nach erneutem Antigenkontakt IFN- γ und können mittels der ELISPOT-Färbetechnik gezählt werden (Larsson et al. 1999). Um gezielt die Aktivierung von Effektorzell-Subpopulationen nachzuweisen, kann in einer durchflusszytometrischen Untersuchung der Nachweis spezifischer Oberflächenmarker mit einer intrazellulären IFN- γ Messung kombiniert werden (Welsh et al. 2001). Durch die Bindung von Tetramer-Antikörpern an die Antigen-spezifische Peptidsequenz des T-Zell-Rezeptor kann die Frequenz der spezifischen T-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Klenerman et al. 2002). Ein funktioneller Test für die Bestimmung der zytotoxischen Effektorfunktion ist die „Limiting Dilution Analysis“, bei der die Frequenz der CTL durch spezifische Lyse Antigen-beladener Zielzellen bestimmt wird (Koehne et al. 2002). *In vivo* kann die Immunantwort mittels der DTH-Reaktion beurteilt werden. Dem Patienten wird vor und nach der Vakzinierung lösliches Tumor-Antigen intrakutan gespritzt und anhand der Größe der nach 48 Stunden auftretenden Induration auf eine effektive Immunisierung rückgeschlossen.

Die Verwendung von Tumorzelllysat birgt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* den Nachteil, dass durch den Mangel an definierten Antigen-Epitopen der direkte Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen erschwert ist (Timmermann und Levy 1999). Um die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen durch Tumorzelllysat-gepulste dendritische Zellen dennoch beurteilen zu können, haben wir in unserem *in vitro*-Modell mehrere Indikatoren für die T-Zell-Aktivierung, wie die Induktion einer Tumorzelllysat-induzierten T-Zell-Proliferation, Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern und das Zytokin-Profil in den Kokulturen untersucht und mit der Induktion der zytotoxischen T-Zell-Aktivität gegen Tumorzellen korreliert. Anhand der untersuchten Parameter besteht die Möglichkeit, die potentielle Wirksamkeit einer dendritischen Zell-Vakzine auf der Basis von Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen *in vitro* besser evaluieren zu können.

T-Zell-Zahl und T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Kokultur

Im Verlauf der Kokulturen mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen konnte eine nahezu konstante T-Zellzahl im Vergleich zur stark sinkenden T-Zellzahl in der Negativkontrolle mit ungepulsten dendritischen Zellen gemessen werden. Mulders und Mitarbeiter (1998) erklärten eine ähnliche Beobachtung durch eine selektive Aktivierung und Proliferation von Tumorzelllysatspezifischen T-Zellen, wodurch die Zellverluste aufgrund der zunehmenden Apoptose unspezifischer und somit nicht-aktivierter T-Zellen ausgeglichen wurden. Die erhöhte Proliferationsrate der T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen lässt den Schluss zu, dass das Neoantigen eine zusätzliche Proliferation KLH-spezifischer T-Zellen induzierte. Spekulativ bleibt die Annahme, dass es aufgrund eines positiven Feedbackmechanismus zu einer verstärkten Proliferation Tumorzelllysat-aktivierter T-Zellen kam. Lichtmikroskopisch konnten wir sowohl in den Tumorzelllysat- als auch Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten Kokulturen eine ausgeprägte Cluster-Bildung von dendritischen Zellen und T-Zellen im Sinne einer proliferativen Aktivität, sowie einen Abfall des pH-Wertes als Zeichen erhöhter Stoffwechselaktivität beobachten.

Im Vergleich zur Beladung dendritischer Zellen mit einem einzelnen Peptidantigen führte die Lysatbeladung zu einer deutlich niedrigeren T-Zell-Proliferationsrate (Peiper et al. 1997). Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich darauf, dass es aufgrund der großen Zahl an antigenen Epitopen im Tumorzelllysat und der dadurch bedingten geringeren Präsentationsdichte der einzelnen Epitope auf der dendritischen Zelloberfläche zu einem geringeren Proliferationsstimulus für die jeweiligen T-Zellklone kam.

Hinsichtlich einer selektiven Wirkung der Tumorzelllysat-Präsentation auf die Proliferation der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen konnte bei der wöchentlichen Bestimmung des CD4 zu CD8-Verhältnisses kein Unterschied zwischen den Kokulturansätzen festgestellt werden (CD4/CD8-Verhältnis 2,3-3,1). Abdel-Wahab und Mitarbeiter (1998) unterschieden in autologen Kokulturen mit Melanomlysat-gepulsten dendritischen Zellen am Ende der dreiwöchigen Kokulturen drei Tendenzen im Bezug auf das CD4/CD8-Verhältnis bei den verschiedenen Spender: Kokulturen mit vorwiegend CD8⁺ T-Zellen (CD4/CD8 - Verhältnis < 0,25), Kokulturen mit einem gemischten CD4/CD8 - Phänotyp (CD4/CD8 - Verhältnis = 1,5-3) und Kokulturen mit überwiegend CD4⁺ T-Zellen (CD4/CD8 - Verhältnis > 4). Es ist unklar, wodurch

diese Unterschiede bedingt waren, da die Kokulturbedingungen in allen Ansätzen gleich waren.

Obwohl eine aktivierende Wirkung dendritischer Zellen auf NK-Zellen beschrieben ist (Fernandez et al. 1999), konnten wir in allen Kokulturanisätzen eine Abnahme des Anteils an CD16⁺ NK-Zellen feststellen. Im Gegensatz zu T-Zellen schienen die NK-Zellen durch die Kokultur mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen nicht zur Proliferation angeregt zu werden.

Expression des Aktivierungsmarkers CD69

CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker auf T-Zellen und seine Expression wird nach Aktivierung der T-Zellen durch die spezifische Interaktion des CD3-/T-Zell-Rezeptor-Komplexes mit einem Antigen-präsentierenden MHC-Komplex induziert (Testi et al. 1994). Die Expressionsdichte von CD69 in Reaktion auf antigene Stimuli korreliert mit der Induktion einer T-Zell-Proliferation (Maino et al. 1995) und kann *in vivo* und *in vitro* für den Nachweis einer Aktivierbarkeit von T-Zellen auf Antigen-spezifische Stimulation eingesetzt werden. Nach Stimulation der MNC CMV-positiver Testpersonen mit CMV-Antigenen konnte gezeigt werden, dass eine Antigen-spezifische IFN- γ - und TNF- α -Produktion nur in der CD69⁺ Zellpopulation nachweisbar ist und mit deren zytotoxischer Effektorfunktion korreliert (Waldrop et al. 1997). Somit kann anhand der CD69-Expression die durch Antigenkontakt aktivierte T-Zellpopulation identifiziert und genauer charakterisiert werden (Suni et al. 1998).

Nach wiederholter Stimulation mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen konnte eine gesteigerte Expression von CD69 sowohl auf CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Die Aktivierung beider T-Zell-Subpopulationen deutet darauf hin, dass die Tumor-Antigene aus dem Lysat sowohl über den MHC I- als auch MHC II-Prozessierungsweg präsentiert wurden. Die Aktivierung war abhängig von der Präsentation der Tumorzelllysat-Antigene, wie der Vergleich zur geringen CD69-Expression in der Kokultur mit ungepulsten dendritischen Zellen zeigte. Die höchste CD69-Expressionsdichte zeigten T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen als Zeichen einer zusätzlichen Aktivierung KLH-spezifischer und eventuell auch Tumorzelllysat-aktivierter T-Zellen.

Zytokin-Profil in den Kokulturen

Bei der Induktion spezifischer Immunreaktionen ist die Unterscheidung in Th1- und Th2-gerichtete Immunantworten von Bedeutung. Th1-gerichtete Immunantworten sind durch die Produktion von Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ charakterisiert, führen zu einer zellulären, zytotoxischen Immunantwort und dienen der Elimination von Zellen, die virale oder mutierte Antigen-Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren (Macatonia et al. 1995). Th2-gerichtete Immunantworten sind durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-4 und IL-5 gekennzeichnet, es kommt primär zur Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen und sie schützen vor Infektionen mit Würmern, Protozoen und bestimmten Bakterien (Paul et al. 1994). Bei der Vakzinierung gegen Tumoren wird die Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort mit der Expansion Tumor-spezifischer CTL angestrebt (Timmerman und Levy 1999, Schuler-Thurner et al. 2002).

Bei der Bestimmung des Zytokin-Profiles im Überstand der Kokulturen konnten 48 Stunden nach Restimulation mit Antigen-gepulsten dendritischen Zellen große Mengen an IL-12 und IFN- γ nachgewiesen werden. IL-12 ist ein zentrales Zytokin bei der Induktion Th1-gerichteter, zellulärer Immunantworten. Die Gegenwart von IL-12 in der Antigen-Priming-Phase führt über eine Aktivierung IFN- γ -produzierender T-Zellen zur gesteigerten zytotoxischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen (Paul et al. 1994, Heufler et al. 1996). Die IL-12-Produktion dendritischer Zellen unterliegt einem positiven Feedbackmechanismus, der für die Induktion einer effektiven Immunantwort von großer Bedeutung ist (siehe auch Kapitel 4.4). Nach Erkennung der Antigene über den T-Zell-Rezeptor interagieren aktivierte T-Zellen über ihren CD40-Liganden mit der Antigen-präsentierenden dendritischen Zelle und stellen den potentesten Stimulus für die Induktion einer IL-12-Produktion durch die dendritischen Zellen dar (Ria et al. 1998). Durch die Aktivierung der dendritischen Zellen kommt es zur verstärkten Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen und der Stimulation spezifischer T-Zellen, die sich in Clustern um die dendritischen Zellen gruppieren (Cella et al. 1996).

Der Nachweis von IL-12 in den Kokulturen mit ungepulsten dendritischen Zellen war T-Zell-unabhängig auf die Reifeinduktion mit TNF- α und PGE₂ zurückzuführen (siehe Kapitel 4.3). Die deutlich erhöhte Sekretion von IL-12 in den Tumorzelllysat-gepulsten Kokulturen hingegen deutete auf die Interaktion Tumorzelllysat-spezifischer T-Zellen mit den Antigen-präsentierenden dendri-

tischen Zellen hin. Die zusätzliche Induktion KLH-spezifischer T-Zellen führte zu einer gesteigerten IL-12-Produktion und ist ein starker Indiz für die Korrelation zwischen der Frequenz aktivierter T-Zellen und der IL-12-Ausschüttung durch die dendritischen Zellen.

Aktivierte Th1-Zellen reagieren auf erneuten Antigen-Kontakt mit der Sekretion von IFN- γ . Die Bedeutung der IFN- γ -Freisetzung für die Effektorfunktion zeigte sich in Untersuchungen an expandierten Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, deren IFN- γ -Sekretion nach Antigen-Stimulation *in vitro* ihre therapeutischen Wirksamkeit nach Transfer *in vivo* widerspiegelt (Barth et al. 1991). Die Erhöhung der IFN- γ -Produktion durch die T-Zellen nach wiederholter Stimulation mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen korrelierte mit einer deutlichen Steigerung deren zytotoxischer Aktivität (Mulders et al. 1998, Shimizu et al. 1999). Im Überstand der Tumorzelllysat-gepulsten Kokulturen war eine deutlich gesteigerte IFN- γ -Produktion nachweisbar, am ausgeprägtesten in der Kokultur mit Tumorzelllysat plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen (Shimizu et al. 2001). Als Hinweis für eine fehlende Induktion spezifischer T-Zellen konnte in den ungepulsten Kokulturen nur eine geringe IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden.

In allen untersuchten Kokulturansätzen war IL-4 nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Die fehlende IL-4 Produktion kann als weiteres Indiz für die Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort in den Tumorzelllysat-gepulsten Kokulturen gewertet werden, da IL-4 in höherer Konzentration die Ausprägung einer Th1-gerichteten Immunantwort supprimiert (Macatonia et al. 1995). IFN- γ hingegen wirkt hemmend auf die Entwicklung einer Th2-gerichteten Immunantwort (Constant et al. 1997).

Tumorzelllysat-induzierte T-Zell-Proliferation

Fields und Mitarbeiter (1998) wiesen im murinen Modell anhand der Antigen-induzierten T-Zell-Proliferation eine erhöhte Zahl reaktiver T-Zellen in einer Kokultur von Fibrosarkomlysat-gepulsten dendritischen Zellen und syngenen T-Zellen nach. Die Stärke der proliferativen Antwort korrelierte mit der zytotoxischen Aktivität der Zellen. In eigenen Experimenten wurde nach dreiwöchiger Kokultur mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen eine verstärkte Proliferation der T-Zellen auf erneute Antigenstimulation gemessen, die auf eine erhöhte Frequenz Tumorzelllysat-spezifischer T-Zellen hinweist. Aus der noch stärker ausgeprägten Proliferation der T-Zellen aus der Kokultur

mit Tumorzelllysate plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen nach alleiniger Restimulation mit Tumorzelllysate-Antigenen kann gefolgert werden, dass durch das Adjuvans KLH nicht nur KLH-spezifische T-Zellen, sondern auch eine erhöhte Frequenz an Tumorzelllysate-spezifischen T-Zellen induziert wurde.

Für den Verlauf der Kokultur lässt sich zusammenfassend sagen, dass die T-Zellen aus den Tumorzelllysate-gepulsten Kokulturen anhand der Parameter Expression von Aktivierungsmarkern, Zytokin-Profil und Antigen-induzierte T-Zell-Proliferation eine deutlich stärkere T-Zell-Aktivierung als die T-Zellen aus den ungepulsten Negativkontrollen zeigten. Obwohl die Antigen-Beladung mit Tumorzelllysate den direkten Nachweis spezifischer T-Zellen nicht ermöglicht, konnte durch die Untersuchung mehrerer Indikatoren für die T-Zell-Aktivierung auf die Immunogenität der Vakzineaufbereitung geschlossen werden. Die T-Zell-Aktivierung wurde durch die Zugabe von KLH im Hinblick auf alle untersuchten Parameter gesteigert worden, was auf eine Verstärkung der Immunantwort durch dieses Adjuvans hindeutet.

4.6 Nachweis zytotoxischer T-Zell-Aktivität

Zytotoxische T-Zellen erkennen Tumorzellen anhand Tumor-spezifischer Peptide, die die Tumorzellen über MHC I-Moleküle an ihrer Oberfläche präsentieren. Der MHC/Peptid-Komplex der Tumorzelle wird von dem Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor der zytotoxischen T-Zelle gebunden, die durch Freisetzung von Perforinen und Granzymen die Zellmembran der Tumorzellen perforieren kann. Um die Tumorzell-Lyse zu quantifizieren, können die Tumorzellen mit Substanzen markiert werden, die von intakten Zellen intrazellulär aufgenommen werden und erst bei Zerstörung der Membranintegrität wieder freigesetzt werden. In Vorversuchen zeigte die Markierung mit radioaktiven ^{51}Cr die höchste Sensitivität in den Lyse-Untersuchungen. Aufgrund der stabilen Aufnahme von ^{51}Cr in die Pankreaskarzinomzellen konnte die Sensitivität des ^{51}Cr -Freisetzungstests durch die Inkubation der Zielzellen mit Effektorzellen über 18 Stunden verbessert werden (Konomi et al. 1995, Mulders et al. 1998).

Als Endpunkt der Kokultur wurde nach vier Stimulationen mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen die spezifische zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen Panc-1 Tumorzellen gemessen. Die T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen lysierten durchschnittlich ein

Viertel der Zielzellen bei einem Effektor-/Zielzellen-Verhältnis von 100:1, während die höchste Lyserate mit T-Zellen aus der Kokultur mit Tumorzelllysate plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen mit Lyse von einem Drittel der Zielzellen gemessen wurde. Dagegen zeigten die T-Zellen aus der Kokultur mit ungepulsten dendritischen Zellen eine geringe lytische Aktivität. Diese Unterschiede in der lytischen Aktivität spiegelten die Ausprägung der vorherigen T-Zell-Aktivierung wider, so dass eine Korrelation zwischen den Indikatoren der T-Zell-Aktivierung im Verlauf der Kokultur und der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen angenommen werden kann (Fields et al. 1998, Shimizu et al. 2001).

Der Nachweis der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen am Ende der Kokultur erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit einem auf 18 Stunden verlängerten ⁵¹Cr-Freisetzungstest und einem Effektor-/Zielzell-Verhältnis von 100:1. Das hohe Effektor/Zielzell-Verhältnis wird relativiert, wenn man bedenkt, dass von den eingesetzten Effektorzellen nur ca. 30 % CD8+ zytotoxischen T-Zellen entsprachen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch spezifische CD4+ Th-Zellen zur Tumorzell-Lyse beigetragen haben. Allerdings lysieren CD4+ Th-Zellen ihre Zielzellen nach Erkennung ihrer Antigene auf MHC II-Molekülen, die von Panc-1 Zellen konstitutiv nicht exprimiert werden.

Dennoch fällt auf, dass im Verhältnis zur einer *in vitro* Stimulation zytotoxischer T-Zellen mit einem einzelnen, definierten Antigen-Peptid eine geringere lytische Aktivität induziert wird. Dies kann zum Teil durch die Verwendung von unfraktioniertem Tumormaterial als Antigenquelle erklärt werden. In dem Zelllysate ist die Konzentration der für die Tumorabstoßung relevanten Antigene im Verhältnis zu irrelevanten und Selbst-Antigenen gering. Somit werden nur auf einem Teil der immunogenen MHC-Peptid-Komplexe für die Tumorabwehr wirksame Antigene präsentiert. Da die Antigen-Präsentationsdichte für die effektive Induktion der CTL eine große Rolle spielt (Constant et al. 1997), muss davon ausgegangen werden, dass durch die Tumorzelllysate-Pulsung zwar eine größere Zahl spezifischer T-Zellklone zur Proliferation angeregt wurde, aber für die Tumorzell-Lyse relevante Klone in geringerer Frequenz vorkommen und eine schwächere lytische Aktivität aufweisen (Gilboa et al. 1998).

Auch das Fehlen einer verstärkten Proliferation der CD8+ CTL im Verhältnis zu den CD4+ Th-Zellen führt zu einer schwächeren Lyse. Abdel-Wahab und Mitarbeiter (1998) teilten die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen am Ende einer dreiwöchigen Kokultur mit Melanomzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen je nach CD4+/CD8+ Phänotyp in drei Kategorien: Effektorzellen aus

einer Kokultur mit einem vorwiegend CD8+ Phänotyp (CD4/CD8- Verhältnis < 0,25) zeigten eine starke lytische Aktivität von > 60 % Lyse der Zielzellen, Effektorzellen aus einer Kokultur mit einem gemischten CD4/CD8 Phänotyp (CD4/CD8- Verhältnis 1,5-3,0) zeigten eine geringere lytische Aktivität mit 13-17 % Lyse der Zielzellen und Effektorzellen aus einer Kokultur mit einem vorwiegend CD4+ Phänotyp (CD4/CD8- Verhältnis > 4,0) zeigten keine lytische Aktivität (0-5% Lyse der Zielzellen). Die T-Zellen in der vorliegenden Arbeit zeigten einen gemischten CD4/CD8 Phänotyp (CD4/CD8- Verhältnis 2,3-3,1) und eine entsprechende lytische Aktivität von 24 - 32 %.

Ein mögliches Problem der *in vitro*-Kokulturen mit Antigen-gepulsten dendritischen Zellen liegt in einer Überstimulation der reaktiven T-Zellen. Reeves und Mitarbeiter (1996) postulieren nach Untersuchungen mit Peptid-beladenen dendritischen Zellen stimulierter Lymphozyten, dass durch wiederholte Restimulation die Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen inhibiert und deren lytische Aktivität verringert wird. Die Interaktion der in hoher Dichte auf dendritischen Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküle mit dem CTLA 4-Molekül der T-Zellen führt zur Suppression der spezifischen T-Zellen (Allison et al. 1995). Iezzi und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass eine verlängerten Antigen-Stimulation mit einer hohen Dichte an kostimulatorischen Signalen eine Apoptose-induzierende Wirkung auf spezifische Effektor-T-Zellen hat, während naive T-Zellen für ihre Aktivierung auf eben diese Signalintensität angewiesen sind. Dieser physiologische Mechanismus zur Vermeidung von überschießenden Immunantworten kann sich *in vitro* im Verlauf der Kokultur negativ auf die Funktion der spezifischen T-Zellen auswirken, da sie bei jeder Restimulation für mehrere Tage mit Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen mit einer hohen Dichte an kostimulatorischen Molekülen inkubiert waren. Um die Anergie spezifischer T-Zellen zu vermeiden, könnten nach der initialen Stimulation der T-Zellen mit Antigen-gepulsten dendritischen Zellen die anschließenden Restimulationen mit Antigen-gepulsten Monozyten durchgeführt werden (van Tsai et al. 1997) oder die Zahl der Restimulationen verringert werden. In eigenen Untersuchungen fanden sich anhand der untersuchten Parameter keine Hinweise für eine Überstimulation der T-Zellen in den vierwöchigen Antigen-gepulsten Kokulturen.

Nachweis einer spezifischen Tumorzell-Lyse

Um eine unspezifische Tumorzell-Lyse durch NK-Zellen und NKT-Zellen von der spezifischen, HLA-restringierten Lyse-Reaktion durch CD8+ CTL abgrenzen zu können, wurde die Magenkarzinomzelllinie Kato III als Zielzelle eingesetzt. Durch die Tatsache, dass Kato III-Zellen von den T-Zellen mit der stärksten lytischen Aktivität aus der Kokultur mit Tumorzelllysate plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen kaum lysiert wurden, kann geschlossen werden, dass die Tumorzell-Lyse der Panc-1 Zellen nicht durch unspezifische Mechanismen erhöht wurde. Als weitere Bestätigung konnte durch Antikörperblockade-Experimente die MHC-Restriktion der Lyse-Reaktion nachgewiesen werden. Durch die Präinkubation der Zielzellen mit einem MHC I-blockierenden Antikörper wurde die Lyse um mehr als 50 % vermindert. Daraus kann gefolgert werden, dass auch nach Stimulation mit Tumorzelllysate-Antigenen die zytotoxische Aktivität primär von MHC I-restringierten, CD8+ Effektorzellen vermittelt wird (Mulders et al. 1998). NK-Zellen und NKT-Zellen lysieren primär Zielzellen mit verminderter MHC-Expression (Phillips et al. 1986), während sich auf den Panc-1 Zellen eine hohe MHC I-Expression nachweisen ließ. Zudem nahm der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil der CD16+ NK-Zellen an den Effektorzellen am Ende der Kokultur auf unter 3 % ab.

In dem vorliegenden *in vitro*-Modell wurden die Panc-1 Tumorzellen und die Spenderzellen in den autologen Kokulturen nur hinsichtlich ihres HLA-A2 Locus gematcht, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei der Tumorzell-Lyse die natürliche Kreuzreaktivität gegen andere HLA-Moleküle bzw. nicht-Tumor-assoziierte Antigene eine Rolle gespielt haben. Diese mögliche Ungenauigkeit hätte nur durch die Etablierung eines vollautologen *in vitro*-Systems vermieden werden können. Für die Verwendung von Patientenblut wären wiederholte Blutabnahmen über mehrere Wochen und die Generierung von Zelllinien aus Biopsiematerial erforderlich gewesen, die im Falle des Pankreaskarzinoms nur in ca. 30 % der Fälle erfolgreich sind (Jaffee et al. 1998). Die geringe Lyse der Kato III Zellen durch die T-Zellen mit der höchsten lytischen Aktivität gegen Panc-1 Zellen und die schwache Panc-1 Zell-Lyse in den Negativkontrollen mit T-Zellen aus den ungepulsten Kokulturen machen einen größeren Auswirkung kreuzreaktiver Lysemechanismen auf die gemessene Panc-1 Lyse unwahrscheinlich.

4.7 Klinische Relevanz

4.7.1 Klinischer Einsatz Tumorzellysat-gepulster dendritischer Zellen als Tumorstoffimpfung

In klinischen Phase I- und II-Pilotstudien wurde die generelle Sicherheit und Durchführbarkeit einer dendritischen Zell-Vakzinierung für die Immuntherapie von Malignomen nachgewiesen. Zusätzlich konnte bei einer Reihe von Patienten ein immunologisches und klinisches Ansprechen ohne schwerwiegende Nebenwirkungen gezeigt werden (siehe 1.3.2, Tabelle 1). In einer Mehrzahl dieser ersten Studien wurde gegen definierte antigene Peptide vakziniert. Die Peptidvakzinierung führte zwar zur Induktion zellulärer Immunantworten, bei den meisten Patienten konnte aber entweder initial nur ein geringes klinisches Ansprechen nachgewiesen werden oder wurde durch die Progression von Tumor-Escape-Mutanten, insbesondere in den Tumormetastasen, eingeschränkt (Hsu et al. 1996, Thurner et al. 1999).

Mit der Beladung dendritischer Zellen mit Tumorzellysat als Antigenquelle hofft man, diese Limitation durch die Induktion von Effektorzellen gegen eine Vielzahl von Antigenen umgehen zu können. Dies spielt insbesondere in der Therapie von schwach immunogenen Tumoren ohne identifizierte Tumor-Abstoßungsantigene eine große Rolle, die heute einen Großteil der zu behandelnden Tumoren darstellen (Mule 2000). Die Wirksamkeit Tumorzellysat-gepulster dendritischer Zellen konnte bei der prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierung gegen schwach immunogene Fibrosarkome (Fields et al. 1998), gastrointestinale Tumoren (Nair et al. 1997) und das Pankreaskarzinom (Akiyama et al. 2002) im Tiermodell eindrucksvoll gezeigt werden. Auch in den ersten mit Tumorzellysat-gepulsten dendritischen Zellen durchgeführten Studien an Patienten mit fortgeschrittenem Melanom (Nestle et al. 1998, Chang et al. 2002), Nierenzellkarzinom (Höftl et al. 1999), soliden pädiatrischen Tumoren (Geiger et al. 2001) und gynäkologischen Tumoren (Hernando et al. 2002) konnte neben der Induktion einer zellulären Immunreaktion, eine klinische Verbesserung in bis zu einem Drittel der Patienten festgestellt werden. Es zeigte sich auch eine positive Korrelation zwischen dem immunologischen Ansprechen und der klinischen Wirksamkeit.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zeigen, dass die potentielle Wirksamkeit einer Tumorstoffimpfung auf Basis Tumorzellysat-gepulster dendritischer Zellen trotz fehlender definierter Antigene mit dem Nachweis von CD69+

und IFN- γ -produzierenden T-Zellen, sowie einer Tumorzelllysate-induzierten T-Zell-Proliferation beurteilt und mit der zytotoxischen Aktivität gegen die Tumorzellen korreliert werden kann. Insbesondere bei der Weiterentwicklung von Vakzinierungsstrategien, die auf der Beladung dendritischer Zellen mit unfraktioniertem Tumormaterial beruhen, kann dieses *in vitro*-Modell eingesetzt werden. Es ermöglicht den Einfluss verschiedener experimenteller Parameter wie dem Reifestatus der dendritischen Zellen, der Antigen-Aufbereitung und dem Einsatz von Adjuvantien auf die Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort systematisch zu untersuchen. In Fortführung der hier beschriebenen Experimente konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass die Antigen-Beladung mit apoptotischen Tumorzellen der Lysatpulsung hinsichtlich der Induktion CD8⁺ CTL, sowie der Aktivierung von NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen überlegen war (Schnurr et al. 2002).

4.7.2 Klinischer Ausblick

Mit dem systematischen Vergleich verschiedener Strategien zur Verbesserung der dendritischen Zell-Vakzine-Studien ist gerade erst begonnen worden und es gibt eine Reihe experimenteller Ansätze die *in vivo* auf ihre Wirksamkeit getestet werden müssen (Fong und Engelman 2000). Das Ziel weiterer Studien muss es sein, die außergewöhnliche Potenz dendritischer Zellen bei der Regulation von Immunantworten für die Induktion einer effektiven Antitumor-Immunität optimal zu nutzen (Steinmann und Dhondakar 2001).

Ausnutzung der dendritischen Zell-Physiologie

Hinsichtlich der Wahl der verwendeten dendritischen Zellpopulation wurde bislang ein Großteil der klinischen Studien aus Gründen der Praktikabilität und der hohen Zellausbeute mit Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen durchgeführt. Seit Maraskovsky und Mitarbeiter (1996) durch die systemische Applikation von flt3-Ligand eine 30-fache Erhöhung der CD34⁺ Stammzellen, sowie myeloider und plasmazytoider dendritischer Zellen im peripheren Blut nachweisen konnten, besteht die Möglichkeit in klinischen Studien direkt miteinander zu vergleichen, welche der dendritischen Zellpopulation bei der Vakzinierung *in vivo* die größte Wirksamkeit zeigt. Fong und Mitarbeiter (2001) führten eine erste klinische Studie mit flt3-Ligand-expandierten dendritische Zellen durch, die ein klinisches Ansprechen in fünf von zwölf Patienten zeigte. Auch CD34⁺-Stammzellen-abgeleitete dendritische Zellen wurden in der

Immuntherapie des Multiplen Myeloms (Titzer et al. 2000) und des Melanoms (Banchereau et al. 2001) erfolgreich eingesetzt. Von dem *in vivo* Einsatz plasmazytoider dendritischer Zellen erhofft man sich eine unterstützende Funktion bei Induktion von Immunantworten. Ihre Fähigkeit zur Freisetzung großer Mengen an IFN- α führt einerseits zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems in Form von NK-Zellen (Trinchieri 1995) und andererseits zur verstärkten Ausreifung myeloider dendritischer Zellen (Santini et al. 2000).

Weiterhin offen ist der optimale Applikationsweg und -ort für die dendritischen Zell-Vakzine, um eine effektive Migration der Antigen-beladenen Zellen in regionale Lymphknoten zur Induktion der spezifischen T-Zellen sicherzustellen. Thurner und Mitarbeiter (1999) stellten in ihrer Melanom-Studie fest, dass die intradermale Applikation der mit Mage 3-Peptid-gepulsten dendritischen Zellen zu einer deutlich stärkeren Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort führte, als die intravenöse Applikation. Intravenös verabreichte dendritische Zellen reichert sich zunächst in der Lunge und Leber an, bevor sie das lymphatische Gewebe erreichen, während die intradermale und intralymphatische Applikation zur direkten Migration in regionale Lymphknoten und der Induktion Th1-gerichteter Immunantworten führte (Fong et al. 2001). Durch die direkte intranodale Injektion kann die Migration umgangen werden (Nestle et al. 1998).

Chang und Mitarbeiter (2002) sahen in ihrer Phase I-Studie bei der Behandlung fortgeschrittener Malignome Hinweise auf eine positive Korrelation zwischen der Zahl an verabreichten dendritischen Zellen und der resultierenden Immunantwort. Die genauere Untersuchung der Dosis-Wirkungskurven ist insbesondere deshalb interessant geworden, da durch die systemische Applikation von G-CSF oder flt3-Ligand die Zahl der generierbaren dendritischen Zellen deutlich angestiegen ist. Eine zu geringe Dosis an Antigen-beladenen dendritischen Zellen birgt die Gefahr einer Th2-gerichteten Polarisation der Immunantwort (Tanaka et al. 2000).

Die Langlebigkeit der dendritischen Zellen nach erfolgter *in vivo* Applikation ist ein weiterer Schlüsselfaktor für den Vakzine-Erfolg. Nach Reifeinduktion mit CD40-Ligand konnte eine deutlich größere Zahl der injizierten dendritischen Zellen in regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden, die darüber hinaus einen stabilen und stark immunogenen Phänotyp hatten (Moodycliffe et al. 2000). Trotzdem sind bislang nur wenige der Tumor-Vakzinierungs-Studien mit ausgereiften dendritischen Zellen durchgeführt worden und zeigten eine große Varianz in den verwendeten Reifestimuli (Hötl et al. 1999, Thurner et al. 2000,

Kugler et al. 2000, Mackensen et al. 2000, Schott et al. 2001, Hernando et al. 2002). Brunner und Mitarbeiter (2000) erzielten in einem murinen Kolonkarzinom-Modell nach prophylaktischer und therapeutischer Vakzinierung mit CpG-ODN oder TNF- α aktivierten dendritischen Zellen eine deutlich verlängerte Überlebenszeit und verstärkte Tumorabstoßung im Vergleich zur Vakzinierung mit unreifen dendritischen Zellen. Somit besteht die berechtigte Hoffnung, dass die Optimierung der eingesetzten Reifestimuli zur stark immunogenen Präsentation der Tumor-Antigene auf den voll ausgereiften dendritischen Zellen führt und für die Durchbrechung der im Rahmen des Tumorwachstums entstandenen Immuntoleranz ausreicht. Bislang fehlen vergleichende Studien der Reifestimuli im Hinblick auf ihre klinische Wirksamkeit.

Dendritische Zell-Vakzine müssen auch hinsichtlich der Breite der induzierten Immun-Effektor-Mechanismen weiterentwickelt werden. CD8⁺ CTL und CD4⁺ Th-Zellen expandieren als adaptiver Arm des Immunsystems durch eine Antigen-spezifische Aktivierung und ihre lytische Aktivität basiert auf der MHC-restringierten Erkennung der Antigene auf Zielzellen. NK- und NKT-Zellen haben als Teil des angeborenen Armes des Immunsystems die natürliche Kapazität zur Abtötung von Zielzellen mit einer erniedrigten Expression von MHC-I-Molekülen (NK-Zellen) und Oberflächenglykolipiden (NKT-Zellen). Für viele Tumoren stellt die Runterregulierung dieser Oberflächenmarker einen erfolgreichen Escape-Mechanismus gegen adaptive Immunantworten dar. Vor allem über die Freisetzung von Zytokinen wie IL-12 und IFN- α und - γ haben dendritische Zellen die Möglichkeit, die adaptiven und angeborenen Komponenten der Immunantwort zu orchestrieren (Trinchieri 1995, Siegal et al. 1999) und das gesamte Spektrum an zellulären Tumorabwehr-Mechanismen zu induzieren.

Beladung dendritischer Zellen mit einem breiten Spektrum an Antigenen

Um den klinischen Erfolg einer dendritischen Zell-Vakzine steigern zu können, setzt sich die Ansicht durch, dass die alleinige Beladung mit Peptid-Antigenen nicht ausreichend sein wird (Steinman und Dhondakar 2001). Die synthetischen Peptide repräsentieren nur einen kleinen Teil der antigenen Zusammensetzung eines Tumors und ihr Einsatz wird aufgrund der HLA-Restriktion für die einzelnen Patienten weiter limitiert. Zudem führt die Beladung der MHC-Komplexe mit einem Peptid von außen zu einer weniger immunogenen Präsentation, da nur die intrazelluläre Prozessierung der Antigene zur Ausbildung der „immunologischen Synapsen“ führt. Die Synapsen stellen die

Zusammenlagerung der Antigen-präsentierenden MHC-Moleküle mit wichtigen kostimulatorischen Molekülen wie CD86 auf der dendritischen Zelloberfläche dar und steigern die Signalstärke in den T-Zell-Kontaktregionen für das T-Zell-Priming nachhaltig (Turley et al. 2000).

In Zukunft muss systematisch untersucht werden, durch welche Aufbereitung von unfraktioniertem Tumormaterial in Form von apoptotischen Tumorzellen, Exosomen, nekrotischen Tumorzellen, aufgereinigten Tumorzelllysate, isolierten Hitzeschockprotein-Peptidkomplexen, RNS ganzer Tumorzellen oder der Fusion von Tumor- und dendritischen Zellen eine effektive Antigenpräsentation und Induktion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen gegen eine Vielzahl von Tumor-Abstoßungsantigenen am ehesten gewährleistet ist. Die Induktion von Zellstress mittels UV-Bestrahlung oder Hyperthermie (40 - 44°C) vor der Antigen-Aufbereitung aus unfraktioniertem Tumormaterial scheint dessen Immunogenität zu erhöhen (Feng et al. 2001). Die Ergebnisse der ersten Studien deuten auch darauf hin, dass die Zugabe von Adjuvantien wie KLH gerade bei der Aufbereitung aus unfraktioniertem Tumormaterial die effektive Induktion spezifischer Immunantworten fördert (Shimizu et al. 2001).

Auch die *in situ* Beladung der dendritischen Zellen mit Tumor-Antigenen ist ein attraktives Konzept und umgeht die Notwendigkeit zur *in vitro* Manipulation der Zellen. Bestrahlte Tumorzellen, die gentherapeutisch zur Produktion von GM-CSF modifiziert wurden, rekrutieren lokale dendritische Zellen, die die Antigene der Tumorzellen aufnehmen und für die Induktion einer Immunantwort präsentieren (Pardoll 1998). Die peritumorale Gabe von Reifestimuli wie CpG-ODN führt zur Aktivierung der lokalen dendritischen Zellen und kann die Tumor-induzierte Toleranz durchbrechen (Kawarada et al. 2001). Allein die Akkumulation einer großen Zahl an dendritischen Zellen im peripheren Gewebe nach systemischer Applikation von flt3-Ligand führte in der Maus zur Abwehr einer nachfolgenden Inokulation mit einer letalen Dosis an Tumorzellen und Regression bestehender Tumoren (Lynch et al. 1997) und zeigt das Potential der gezielten *in situ* Manipulation der dendritischen Zellen.

Kombination mit systemischen Behandlungsansätzen

Die Kombination der auf dendritischen Zellen basierenden Immuntherapien mit systemischen Behandlungskonzepten birgt vielversprechende Ansätze. Shimizu und Mitarbeiter (1999) konnten durch systemische IL-2-Applikation die therapeutische Wirksamkeit einer dendritischen Zell-Vakzine auf der Basis von

Tumorzellysat-gepulsten Zellen bei der Behandlung schwach immunogener muriner Fibrosarkome steigern. Rosenberg und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass die systemische Applikation von IL-2 die klinische Wirksamkeit von Peptid-Vakzinierungen verbessert.

Die Vakzinierung mit Tumorzellysat-gepulsten dendritischen Zellen unmittelbar nach einer Knochenmarkstransplantation scheint besonders effektiv zu sein und könnte somit bei ausgewählten Tumoren mit den onkologischen Standardverfahren der Chemo- und Strahlentherapie sinnvoll kombiniert werden. Während der frühen lymphoiden Rekonstitutionsphase konnten die naiven T-Zellen mit einer erhöhten Sensitivität gegen Antigene geprimt werden und zeigten eine spezifische, langanhaltende Immunantwort gegen ein schwach immunogenes Mammakarzinom (Asaveroengchai et al. 2002).

Die Hyperthermiebehandlung hat sich als adjuvantes Therapieverfahren bei einer Reihe von Tumoren als vielversprechend erwiesen (Falk und Issels 2001). Sie führt u.a. zu einer erhöhten Expression von hsp auf den Tumorzellen (Multhoff 1997) und der gesteigerten Infiltration der Tumors mit Immun-Effektorzellen (Todryk et al. 1999). Die Kombination der Hyperthermie mit einer dendritischen Zellvakzinierung könnte somit die gesteigerte Immunogenität der Antigen-Aufbereitung als auch der Tumor-Zielzellen bei der Induktion zellulärer Immunreaktionen über NK-Zellen und spezifische T-Zellen nützen (Multhoff et al. 1998).

Zum heutigen Zeitpunkt haben die ersten Vakzinierungsversuche mit Antigen-beladenen dendritischen Zellen ihre Wirksamkeit *in vivo* gegen eine Reihe von Tumoren gezeigt. Die Integration neuer Erkenntnisse aus der Tumor-immunologischen Grundlagenforschung in das Design der kommenden dendritischen Zell-Vakzine-Studien ist ein vielversprechender Weg, die Induktion einer klinisch effektiven Antitumor-Immunität zu erreichen. Hierbei zeichnet sich ab, dass eine multifaktorielle Vorgehensweise mit gezielter Manipulation der dendritischen Zell-Physiologie und der Antigen-Aufbereitung, unterstützt durch eine systemische Immunmodulation die größte Aussicht auf dauerhaften klinischen Erfolg hat.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Vorarbeiten zur Entwicklung einer dendritischen Tumorstoffimpfung auf der Basis von Tumorzelllysate-gepulsten dendritischen Zellen, die bei der Immuntherapie des Pankreaskarzinoms zum Einsatz kommen soll. Die zentrale Rolle dendritischer Zellen bei der Initiierung zellulärer Immunantworten hat große Aufmerksamkeit auf ihren Einsatz als Impfung zur Induktion einer systemischen Antitumor-Immunität gelenkt. Erste klinische Studien mit *ex vivo* manipulierten und Antigen-beladenen dendritischen Zellen zur Behandlung von Malignomen erzielten bei einem Teil der Patienten ein immunologisches Ansprechen und in Einzelfällen klinische Besserung bei nur geringen Nebenwirkungen. Diese Strategien eröffnen neue Behandlungsmöglichkeiten von Tumoren wie dem Pankreaskarzinom, bei denen bisherige therapeutische Strategien unzureichend sind.

Eine Voraussetzung für den Einsatz dendritischer Zellen in der Immuntherapie ist, dass sie in ausreichender Zahl isoliert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll zur Generierung dendritischer Zellen aus adherenten mononukleären Zellen im peripheren Blut im Hinblick auf eine reproduzierbare Zellzahl und -reinheit und die Durchführbarkeit unter klinisch anwendbaren Bedingungen optimiert. Die dendritischen Zellen wurden nach Morphologie, Immunphänotyp und funktionellen Eigenschaften charakterisiert.

Aufgrund ihrer hohen Endozytose-Aktivität eigneten sich unaktivierte dendritische Zellen am besten für die Beladung mit löslichen Antigenen aus einem Tumorzelllysate. Unter Verwendung verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien wurde ein Protokoll für die Antigen-Beladung dendritischer Zellen mit Tumorzelllysate erstellt. Neben der Ermittlung der optimalen Lysatkonzentration wurden sowohl stimulatorische als auch hemmende Wirkungen der verwendeten Zelllinien auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität der dendritischen Zellen festgestellt.

Durch die Aktivierung der dendritischen Zellen mit proinflammatorischen Stimuli kam es zur Ausbildung eines stabilen, stark immunstimulatorischen Phänotyps. Beim systematischen Vergleich verschiedener Reifestimuli anhand der Parameter wie Expressionsdichte von Adhäsions-, Antigen-präsentierenden MHC- und kostimulatorischen Molekülen, T-Zell-stimulatorischer Potenz und Produktion von IL-12 zeigte sich die Kombination aus TNF- α und PGE₂ als der potenteste Stimulus, der auch in klinischen Studien einsetzbar ist.

Zur Induktion Tumor-spezifischer zytotoxischer T-Zellen wurden autologe T-Zellen gesunder, HLA-gematchter Spender in wöchentlichem Abstand mit Tumorzelllysate-gepulsten (Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1) und aktivierten dendritischen Zellen restimuliert. In einem parallelen Ansatz wurde durch gleichzeitige Antigen-Beladung mit Tumorzelllysate und dem immunogenen Protein KLH untersucht, ob sich die spezifische Immunantwort durch Zugabe eines Adjuvans steigern lässt.

Im Verlauf der Kokultur konnten in den Tumorzelllysate-gepulsten Kokulturen die deutlich gesteigerte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie eine hohe Freisetzung von IL-12 und IFN- γ als Indikatoren einer T-Zell-Aktivierung gemessen werden. Zum Zeitpunkt der dritten Stimulation konnte zudem eine erhöhte Frequenz an spezifischen T-Zellen durch den Nachweis einer Tumorzelllysate-induzierten T-Zell-Proliferation gezeigt werden.

Nach vier Stimulationen wurde die spezifische zytotoxische Aktivität gegen Panc-1 Tumorzellen gezeigt. Die starke Inhibition der Lyse-Reaktion durch MHC I-blockierende Antikörper weist auf eine vorwiegend durch CD8+ CTL vermittelte Tumorzell-Lyse hin.

T-Zellen aus der Kokultur mit Lysate plus KLH-gepulsten dendritischen Zellen zeigten im Verlauf der Kokultur eine stärkere Aktivierung anhand der oben genannten Indikatoren, sowie eine erhöhte lytische Aktivität gegen die Tumorzellen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Induktion einer spezifischen Immunantwort durch die Zugabe von KLH gesteigert werden kann. Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen den untersuchten Indikatoren der T-Zell-Aktivierung im Verlauf der Kokultur und der späteren zytotoxischen Aktivität der T-Zellen.

In dieser Arbeit wird ein Modell vorgestellt, mit dessen Hilfe sich *in vitro* der Einfluss verschiedener Parameter auf eine effektive T-Zell-Aktivierung durch Tumor-Antigen-beladene dendritische Zellen systematisch untersuchen lassen und innovative Strategien bei der Weiterentwicklung von dendritischen Zell-Vakzinen im Hinblick auf deren klinischen Einsatz erprobt werden können.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdel-Wahab Z, DeMatos P, Hester D, Dong XD, Seigler HF.
Human dendritic cells, pulsed with either melanoma tumor cell lysates or the gp100 peptide(280-288), induce pairs of T-cell cultures with similar phenotype and lytic activity.
Cell Immunol (1998) **186**:63-74.
2. Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Hojo T, Cheng JY, Mori T, Wiltrot RH, Yamaguchi K.
Antitumor effects induced by dendritic cell-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters.
Cancer Lett (2002) **184**:37-47.
3. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N.
Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs.
Nature (1998) **392**:86-9.
4. Allison JP, Krummel MF.
The Yin and Yang of T cell costimulation.
Science (1995) **270**:932-3.
5. Ardavin C.
Thymic dendritic cells.
Immunol Today (1997) **18**:350-61.
6. Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H.
Origin and differentiation of dendritic cells.
Trends Immunol (2001) **22**:691-700.
7. Armstrong AC, Eaton D, Ewing JC.
Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer.
BMJ (2001) **323**:1289-93.
8. Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, Schild H.
Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells.
J Immunol (1999) **162**:3757-60.
9. Asavaroengchai W, Kotera Y, Mule JJ.
Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery.
Proc Natl Acad Sci USA (2002) **99**:931-6.
10. Bachmann MF, Oxenius A, Pircher H, Hengartner H, Ashton-Richardt PA, Tonegawa S, Zinkernagel RM.
TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins.
Eur J Immunol (1995) **25**:1739-43.

11. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.

Immunobiology of dendritic cells.

Annu Rev Immunol (2000) **18**:767-811.

12. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J.

Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine.

Cancer Res (2001) **61**:6451-8.

13. Banchereau J, Steinman RM.

Dendritic cells and the control of immunity.

Nature (1998) **392**:245-52.

14. Barth RJ, Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA.

Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes.

J Exp Med (1991) **173**:647-58.

15. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N.

Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood.

J Immunol Methods (1996) **196**:121-35.

16. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR.

Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help.

J Exp Med (1997) **186**:65-70.

17. Bonham CA, Lu L, Banas RA, Fontes P, Rao AS, Starzl TE, Zeevi A, Thomson AW.

TGF-beta 1 pretreatment impairs the allostimulatory function of human bone marrow-derived antigen-presenting cells for both naive and primed T cells.

Transpl Immunol (1996) **4**:186-91.

18. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A.

Tumor antigens recognized by T lymphocytes.

Annu Rev Immunol (1994) **12**:337-65.

19. Boon T, van der Bruggen P.

Human tumor antigens recognized by T lymphocytes.

J Exp Med (1996) **183**:725-9.

20. Boyum A.

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.

Scand J Clin Lab Invest Suppl 1968; **97**:77-89.

-
21. Brossart P, Bevan MJ.
Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines.
Blood (1997) **90**:1594-9.
22. Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G, Endres S.
Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation In vitro and therapeutic anti-tumor immune responses In vivo.
J Immunol (2000) **165**:6278-86.
23. Burch PA, Breen JK, Buckner JC, Gastineau DA, Kaur JA, Laus RL, Padley DJ, Peshwa MV, Pitot HC, Richardson RL, Smits BJ, Sopapan P, Strang G, Valone FH, Vuk-Pavlovic S.
Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer.
Clin Cancer Res (2000) **6**:2175-82.
24. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A.
Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.
Nature (1997) **388**:782-7.
25. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M.
Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.
Nat Med (1999) **5**:919-23.
26. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G.
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 (1996) **184**:747-52.
27. Chang AE, Redman BG, Whitfield JR, Nickoloff BJ, Braun TM, Lee PP, Geiger JD, Mule JJ.
A Phase I Trial of Tumor Lysate-pulsed Dendritic Cells in the Treatment of Advanced Cancer.
Clin Cancer Res (2002) **8**:1021-32.
28. Chu KU, Ravindranath MH, Gonzales A, Nishimoto K, Tam WY, Soh D, Bilchik A, Katopodis N, Morton DL.
Gangliosides as targets for immunotherapy for pancreatic adenocarcinoma.
Cancer (2000) **88**:1828-36.

-
29. Constant SL, Bottomly K.
Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches.
Annu Rev Immunol (1997) **15**:297-322.
30. Crawford K, Gabuzda D, Pantazopoulos V, Xu J, Clement C, Reinherz E, Alper CA.
Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells.
J Immunol (1999) **163**:5920-8.
31. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S.
A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment.
Immunity (1998) **9**:325-36.
32. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N.
Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.
J Exp Med (2001) **193**:233-8.
33. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, Donahoe SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF, Bhardwaj N.
Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells.
J Clin Invest (1999) **104**:173-80.
34. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C.
Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites.
J Exp Med (1998) **188**:373-86.
35. Falk MH, Issels RD.
Hyperthermia in oncology.
Int J Hyperthermia (2001) **17**:1-18.
36. Feng H, Zeng Y, Whitesell L, Katsanis E.
Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity.
Blood (2001) **97**:3505-12.
37. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L.
Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo.
Nat Med (1999) **5**:405-11.

-
38. Fields RC, Shimizu K, Mule JJ.
Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo.
Proc Natl Acad Sci USA (1998) **95**:9482-7.
39. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG.
Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy.
J Immunol (2001) **167**:7150-6.
40. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG.
Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients.
J Immunol (2001) **166**:4254-9.
41. Fong L, Engleman EG.
Dendritic cells in cancer immunotherapy.
Annu Rev Immunol (2000) **18**:245-73.
42. Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG.
Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy.
Proc Natl Acad Sci USA (2001) **98**:8809-14.
43. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP.
Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells
Nat Med (1996) **2**:1096-103.
44. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P.
Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells.
Nat Med (1999) **5**:1249-55.
45. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, Chang AE, Braun TM, Mule JJ.
Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression.
Cancer Res (2001) **61**:8513-9.
46. Germain RN.
MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation.
Cell (1994) **76**:287-99.
47. Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK.
Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines.
Cancer Immunol Immunother (1998) **46**:82-7.

-
48. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D.
Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells.
Nat Med (1997) **3**:558-61.
49. Gunzer M, Friedl P, Niggemann B, Brocker EB, Kampgen E, Zanker KS.
Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines.
J Leukoc Biol (2000) **67**:622-9.
50. Hart DN.
Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.
Blood (1997) **90**:3245-87.
51. Hart DN, Newton MR, Reece-Smith H, Fabre JW, Morris PJ.
Major histocompatibility complex antigens in the rat pancreas, isolated pancreatic islets, thyroid, and adrenal.
Transplantation (1983) **36**:431-5.
52. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM.
CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells.
Proc Natl Acad Sci USA (1999) **96**:9305-10.
53. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC.
Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo.
J Exp Med (2001) **194**:769-79.
54. Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J.
Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors.
J Clin Invest (2002) **109**:409-17.
55. Hernando JJ, Park TW, Kubler K, Offergeld R, Schlebusch H, Bauknecht T.
Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial.
Cancer Immunol Immunother (2002) **51**:45-52.
56. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G.
Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells.
Eur J Immunol (1996) **26**:659-68.

-
57. Holtl L, Rieser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H, Radmayr C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M.
Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells.
J Urol (1999) **161**:777-82.
58. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R.
Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen- pulsed dendritic cells.
Nat Med (1996) **2**:52-8.
59. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A.
The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells.
Immunity (1998) **8**:89-95.
60. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM.
Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo.
J Exp Med (1993) **178**:479-88.
61. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM.
Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.
J Exp Med (1992) **176**:1693-702.
62. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM.
High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes.
J Exp Med (1997) **186**:665-72.
63. Jaffee EM, Schutte M, Gossett J, Morsberger LA, Adler AJ, Thomas M, Greten TF, Hruban RH, Yeo CJ, Griffin CA.
Development and characterization of a cytokine-secreting pancreatic adenocarcinoma vaccine from primary tumors for use in clinical trials.
Cancer J Sci Am (1998) **4**:194-203.
64. Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans HC.
Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4.
J Exp Med (1989) **170**:577-82.
65. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH.
A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection.
Int J Cancer (2001) **93**:243-51.

-
66. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH.
Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells.
J Exp Med (2000) **192**:1213-22.
67. Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML.
Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer.
Blood (2001) **97**:3466-9.
68. Kampgen E, Becker J, Brocker EB.
Cell therapy with dendritic cells.
Internist (Berl) (2001) **42**:1314-20.
69. Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hammerling GJ.
NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides.
J Immunol (2001) **167**:5247-53.
70. Klenerman P, Cerundolo V, Dunbar PR.
Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools.
Nat Rev Immunol (2002) **2**:263-72.
71. Koehne G, Smith KM, Ferguson TL, Williams RY, Heller G, Pamer EG, Dupont B, O'Reilly RJ.
Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein-Barr virus-specific and alloreactive T cells detected by intracellular interferon-gamma production and growth of cytotoxic precursors.
Blood (2002) **99**:1730-40.
72. Konomi Y, Sekine T, Takayama T, Fuji M, Tanaka T.
Cytotoxic activity of CD4+ T cells against autologous tumor cells.
Jpn J Cancer Res (1995) **86**:854-60.
73. Kubuschok B, Schmits R, Hartmann F, Cochlovius C, Breit R, Konig J, Pistorius G, Schilling M, Renner C, Pfreundschuh M.
Use of Spontaneous Epstein-Barr Virus-Lymphoblastoid Cell Lines Genetically Modified to Express Tumor Antigen as Cancer Vaccines: Mutated p21 ras Oncogene in Pancreatic Carcinoma as a Model.
Hum Gene Ther (2002) **13**:815-27.
74. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH.
Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids.
Nat Med (2000) **6**:332-6.

-
75. Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, Hart S, Miller RA, Levy R.
Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors.
N Engl J Med (1992) **327**:1209-15.
76. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F.
Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells.
Nat Immunol (2000) **1**:311-6.
77. Lanzavecchia A.
Immunology. Licence to kill.
Nature (1998) **393**:413-4.
78. Larsson M, Jin X, Ramratnam B, Ogg GS, Engelmayer J, Demoitie MA, McMichael AJ, Cox WI, Steinman RM, Nixon D, Bhardwaj N.
A recombinant vaccinia virus based ELISPOT assay detects high frequencies of Pol-specific CD8 T cells in HIV-1-positive individuals.
Aids (1999) **13**:767-77.
79. Lim SH, Bailey-Wood R.
Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma.
Int J Cancer (1999) **83**:215-22.
80. Ludewig B, Ochsenbein AF, Odermatt B, Paulin D, Hengartner H, Zinkernagel RM.
Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease.
J Exp Med (2000) **191**:795-804.
81. Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E.
Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets.
Blood (2002) **100**:1362-1372.
82. Lynch DH, Andreasen A, Maraskovsky E, Whitmore J, Miller RE, Schuh JC.
Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo.
Nat Med (1997) **3**:625-31.
83. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A.
Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells.
J Immunol (1995) **154**:5071-9.

-
84. Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Kohler G, Noppen C, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V, Lindemann A.
Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells.
Int J Cancer (2000) **86**:385-92.
85. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ.
Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation.
Cytometry (1995) **20**:127-33.
86. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ.
Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified.
J Exp Med (1996) **184**:1953-62.
87. Martin P, del Hoyo GM, Anjuere F, Ruiz SR, Arias CF, Marin AR, Ardavin C.
Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors.
Blood (2000) **96**:2511-9.
88. Matzinger P.
An innate sense of danger.
Semin Immunol (1998) **10**:399-415.
89. Matzinger P.
Tolerance, danger, and the extended family.
Annu Rev Immunol (1994) **12**:991-1045.
90. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB.
Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity.
Nat Med (1995) **1**:1297-302.
91. McCarty TM, Liu X, Sun JY, Peralta EA, Diamond DJ, Ellenhorn JD.
Targeting p53 for adoptive T-cell immunotherapy.
Cancer Res (1998) **58**:2601-5.
92. McKenzie JL, Beard ME, Hart DN.
Depletion of donor kidney dendritic cells prolongs graft survival.
Transplant Proc (1984) **16**:948-51.
93. Moodycliffe AM, Shreedhar V, Ullrich SE, Walterscheid J, Bucana C, Kripke ML, Flores-Romo L.
CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes.
J Exp Med (2000) **191**:2011-20.

-
94. Mortarini R, Anichini A, Di Nicola M, Siena S, Bregni M, Belli F, Molla A, Gianni AM, Parmiani G.
Autologous dendritic cells derived from CD34+ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of melan-A/Mart-1(27-35)-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors.
Cancer Res (1997) **57**:5534-41.
95. Mukherjee P, Ginardi AR, Madsen CS, Sterner CJ, Adriance MC, Tevethia MJ, Gendler SJ.
Mice with spontaneous pancreatic cancer naturally develop MUC-1-specific CTLs that eradicate tumors when adoptively transferred.
J Immunol (2000) **165**:3451-60.
96. Mulders P, Tso CL, Gitlitz B, Kaboo R, Hinkel A, Frand S, Kiertscher S, Roth MD, deKernion J, Figlin R, Belldegrun A.
Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines.
Clin Cancer Res (1999) **5**:445-54.
97. Mule JJ.
Tumor vaccine strategies that employ dendritic cells and tumor lysates: experimental and clinical studies.
Immunol Invest (2000) **29**:127-9.
98. Multhoff G.
Heat shock protein 72 (HSP72), a hyperthermia-inducible immunogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's sarcoma cells.
Int J Hyperthermia (1997) **13**:39-48.
99. Multhoff G, Botzler C, Issels R.
The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response.
Biol Chem (1998) **379**:295-300.
100. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL.
Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment.
Prostate (1999) **39**:54-9.
101. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lysterly HK, Morse MA.
Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA.
Int J Cancer (1999) **82**:121-4.

102. Nair SK, Morse M, Boczkowski D, Cumming RI, Vasovic L, Gilboa E, Lyerly HK.

Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells.

Ann Surg (2002) **235**:540-9.

103. Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E.

Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts.

Int J Cancer (1997) **70**:706-15.

104. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D.

Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.

Nat Med (1998) **4**:328-32.

105. Ngo VN, Tang HL, Cyster JG.

Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells.

J Exp Med (1998) **188**:181-91.

106. Osman Y, Takahashi M, Zheng Z, Toba K, Liu A, Furukawa T, Aizawa Y, Shibata A, Koike T.

Activation of autologous or HLA-identical sibling cytotoxic T lymphocytes by blood derived dendritic cells pulsed with tumor cell extracts.

Oncol Rep (1999) **6**:1057-63.

107. Pardoll DM.

Cancer vaccines.

Nat Med (1998) **4**:525-31.

108. Parmiani G.

Tumor immunity as autoimmunity: tumor antigens include normal self proteins which stimulate anergic peripheral T cells.

Immunol Today (1993) **14**:536-8.

109. Paul WE, Seder RA.

Lymphocyte responses and cytokines.

Cell (1994) **76**:241-51.

110. Peiper M, Goedegebuure PS, Eberlein TJ.

Generation of peptide-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells capable of lysing human pancreatic cancer cells.

Surgery (1997) **122**:235-41.

111. Peiper M, Goedegebuure PS, Izbicki JR, Eberlein TJ.

Pancreatic cancer associated ascites-derived CTL recognize a nine-amino-acid peptide GP2 derived from HER2/neu.

Anticancer Res (1999) **19**:2471-5.

-
112. Phillips JH, Lanier LL.
Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity.
J Exp Med (1986) **164**:814-25.
113. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC.
Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo.
J Exp Med (1996) **184**:883-91.
114. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA.
Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking.
Science (1998) **282**:480-3.
115. Reeves ME, Royal RE, Lam JS, Rosenberg SA, Hwu P.
Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene.
Cancer Res (1996) **56**:5672-7.
116. Reichardt VL, Okada CY, Liso A, Benike CJ, Stockerl-Goldstein KE, Engleman EG, Blume KG, Levy R.
Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study.
Blood (1999) **93**:2411-9.
117. Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J.
Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow.
J Immunol (1992) **149**:2681-8.
118. Ria F, Penna G, Adorini L.
Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells.
Eur J Immunol (1998) **28**:2003-16.
119. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P.
A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper cell and a T-killer cell.
Nature (1998) **393**:474-8.
120. Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M.
Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production.
J Exp Med (1997) **186**:1603-8.

121. Rocha Lima CM, Centeno B.
Update on pancreatic cancer.
Curr Opin Oncol (2002) **14**:424-30.
122. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G.
Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.
J Exp Med (1994) **180**:83-93.
123. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G.
Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability.
J Immunol Methods (1996) **196**:137-51.
124. Rosenberg L.
Pancreatic cancer: a review of emerging therapies.
Drugs (2000) **59**:1071-89.
125. Rosenberg SA.
Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens.
Immunol Today (1997) **18**:175-82.
126. Rosenberg SA.
New opportunities for the development of cancer immunotherapies.
Cancer J Sci Am (1998) **4 Suppl 1**:S1-4.
127. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST.
Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes.
J Immunol (1999) **162**:2472-5.
128. Salio M, Cerundolo V, Lanzavecchia A.
Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells.
Eur J Immunol (2000) **30**:705-8.
129. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A.
Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products.
J Exp Med (1995) **182**:389-400.
130. Sallusto F, Lanzavecchia A.
Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.
J Exp Med (1994) **179**:1109-18.

131. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F.

Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice.

J Exp Med (2000) **191**:1777-88.

132. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells.

J Exp Med (2000) **191**:423-34.

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

Cancer Res (2001) **61**:6445-50.

134. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, Robe J, Endres S, Eigler A.

Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells.

Cancer Res (2002) **62**:2347-52.

135. Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A.

Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells.

J Immunol (2000) **165**:4704-9.

136. Schott M, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum WA, Feldkamp J. Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination.

J Clin Endocrinol Metab (2001) **86**:4965-9.

137. Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, Roder C, Haendle I, Leisgang W, Dunbar R, Cerundolo V, von Den Driesch P, Knop J, Brocker EB, Enk A, Kampgen E, Schuler G.

Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells.

J Immunol (2000) **165**:3492-6.

138. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G.

Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells.

J Exp Med (2002) **195**:1279-88.

-
139. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL.
Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules.
J Immunol (1997) **158**:2723-30.
140. Shimizu K, Fields RC, Giedlin M, Mule JJ.
Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines.
Proc Natl Acad Sci USA (1999) **96**:2268-73.
141. Shimizu K, Thomas EK, Giedlin M, Mule JJ.
Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein.
Cancer Res (2001) **61**:2618-24.
142. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ.
The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.
Science (1999) **284**:1835-7.
143. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A, Lombardi L, Ravagnani F, Parmiani G, Gianni AM.
Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy.
Exp Hematol (1995) **23**:1463-71.
144. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH.
Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells.
Blood (1999) **93**:1634-42.
145. Steinbrink K, Paragnik L, Jonuleit H, Tuting T, Knop J, Enk AH.
Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins.
Arch Dermatol Res (2000) **292**:437-45.
146. Steinbrink K, Wolfi M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH.
Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.
J Immunol (1997) **159**:4772-80.
147. Steinman RM.
The dendritic cell system and its role in immunogenicity.
Annu Rev Immunol (1991) **9**:271-96.
148. Steinman RM, Cohn ZA.
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.
J Exp Med (1973) **137**:1142-1162.
149. Steinman RM, Dhodapkar M.
Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future.
Int J Cancer (2001) **94**:459-73.

150. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA.
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.
3. Functional properties in vivo.
J Exp Med (1974) **139**:1431-45.
151. Steinman RM, Swanson J.
The endocytic activity of dendritic cells.
J Exp Med (1995) **182**:283-8.
152. Steinman RM, Witmer MD.
Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.
Proc Natl Acad Sci USA (1978) **75**:5132-6.
153. Suni MA, Picker LJ, Maino VC.
Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry.
J Immunol Methods (1998) **212**:89-98.
154. Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M.
Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio.
J Exp Med (2000) **192**:405-12.
155. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A.
The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells.
Immunol Today (1994) **15**:479-83.
156. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G.
Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.
J Exp Med (1999) **190**:1669-78.
157. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G.
Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application.
J Immunol Methods (1999) **223**:1-15.
158. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Okada CY, van Beckhoven A, Liles TM, Engleman EG, Levy R.
Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients.
Blood (2002) **99**:1517-26.

159. Timmerman JM, Levy R.
Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy.
Annu Rev Med (1999) **50**:507-29.
160. Timmerman JM, Levy R.
Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine.
J Immunol (2000) **164**:4797-803.
161. Titzer S, Christensen O, Mancke O, Tesch H, Wolf J, Emmerich B, Carsten C, Diehl V, Bohlen H.
Vaccination of multiple myeloma patients with idotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects.
Br J Haematol (2000) **108**:805-16.
162. Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppacciaro A, Vile RG.
Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake.
J Immunol (1999) **163**:1398-408.
163. Toujas L, Delcros JG, Diez E, Gervois N, Semana G, Corradin G, Jotereau F.
Human monocyte-derived macrophages and dendritic cells are comparably effective in vitro in presenting HLA class I-restricted exogenous peptides.
Immunology (1997) **91**:635-42.
164. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL.
Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor.
Science (2000) **290**:2152-4.
165. Trinchieri G.
Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.
Annu Rev Immunol (1995) **13**:251-76.
166. Tsai V, Southwood S, Sidney J, Sakaguchi K, Kawakami Y, Appella E, Sette A, Celis E.
Identification of subdominant CTL epitopes of the GP100 melanoma-associated tumor antigen by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells.
J Immunol (1997) **158**:1796-802.
167. Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, Mellman I.
Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells.
Science (2000) **288**:522-7.

-
168. Tuting T, Wilson CC, Martin DM, Baar J, DeLeo A, Lotze MT, Storkus WJ. DNA vaccines targeting dendritic cells for the immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol* (1998) **451**:295-304.
169. van Schooten WC, Strang G, Palathumpat V. Biological properties of dendritic cells: implications to their use in the treatment of cancer. *Mol Med Today* (1997) **3**:254-60.
170. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4⁺ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* (1997) **99**:1739-50.
171. Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J Exp Med* (2001) **193**:F19-22.
172. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* (2001) **7**:297-303.
173. Young JW, Steinman RM. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4⁺ helper T cells. *J Exp Med* (1990) **171**:1315-32.
174. Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**:2588-92.
175. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* (1995) **154**:3821-35.
176. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ. 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* (1996) **183**:87-97.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AB-Serum	humanes Serum der Blutgruppe AB
Ak	Antikörper
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
CpG-ODN	Cytidine-Phosphate-Guanosine Oligodeoxynucleotide
CPM	<i>counts per minute</i>
Cr	Chrom
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DZ	dendritische Zellen
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälber-Serum
Flt3	<i>Fms-like tyrosine kinase receptor 3</i>
g	Zentripetalbeschleunigung der Erde
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
MNC	mononukleäre Zellen
μ g	Mikro-Gramm
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
PBDC	dendritische Zelle des peripheren Blutes

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
pg	Piko-Gramm
PI	Propidiumiodid
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PSA	Prostata spezifisches Antigen
Rh+	Rhesusfaktor positiv
RNS	Ribonukleinsäure
SEM	<i>standard error of mean</i>
TAP	<i>transporters associated with antigen-processing</i>
Th-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TuLy	Tumorzelllysat
U	Units

Danksagung

Herrn Professor Dr. Stefan Endres, meinem Doktorvater, danke ich für die Möglichkeit an einer interessanten und herausfordernden Fragestellung arbeiten zu können. Von dem professionellen Arbeitsumfeld und der kollegialen Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe habe ich viel profitiert. Für die Unterstützung bei der Präsentation meiner Ergebnisse auf internationalen Kongressen gilt mein besonderer Dank.

Herrn Dr. Andreas Eigler und Herrn Dr. Maximilian Schnurr, den Betreuern meiner Doktorarbeit, danke ich für die Einführung in das wissenschaftlichen Arbeiten und die Betreuung meiner Arbeit. Die regelmäßige Diskussion der experimentellen Fragestellungen und die enge Zusammenarbeit bei der Weiterentwicklung der experimentellen Techniken waren für die Umsetzung meiner Arbeit eine große Hilfe.

Meinen Co-Doktoranden Florian Then, Christoph Scholz und Hendrikje Nienborg danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Herrn Dr. Bidlingmaier danke ich für seinen Rat bei Fragen zu durchflusszytometrischen Versuchen und der Möglichkeit Messungen an dem FACS-Gerät in der Endokrinologischen Abteilung, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München durchzuführen. Für ihre große Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung in immunologische Messmethoden und die Bereitstellung der Messgeräte bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Pape, Institut für Immunologie der Universität München.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Albert und Mitarbeitern, Labor für Immungenetik, Dr. von Haunersches Kinderspital der Universität München, für die HLA-Typisierung der Pankreaskarzinomzelllinien und der freiwilligen Probanden. Herrn Prof. Welsch und Mitarbeitern, Anatomische Anstalt der Universität München – Lehrstuhl II, danke ich für die Hilfe bei der Raster-elektronen-mikroskopische Darstellung der dendritischen Zellen.

Veröffentlichungen

A

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind, mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der LMU München, in Teilen in folgender Originalarbeit veröffentlicht:

M. Schnurr¹, **P. Galambos**¹, C. Scholz, H. Nienborg, F. Then, M. Dauer, S. Endres, A. Eigler (¹ both authors contributed equally)
Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells induce a T cell response against pancreatic carcinoma: an *in vitro* model for the assessment of tumor vaccines
Cancer Res 2001 61: 6445-6450

B

Autorenschaft bei weiteren Originalarbeiten:

M. Schnurr, F. Then, **P. Galambos**, C. Scholz, B. Siegmund, S. Endres, A. Eigler
Extracellular ATP and TNF- α synergize in the activation and maturation of human dendritic cells
J Immunol 2000 165: 4704-4709

M. Schnurr, C. Scholz, S. Rothenfusser, **P. Galambos**, M. Dauer, J. Röbe, S. Endres, A. Eigler
Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysate in promoting cross-priming of CTL and activate NK and $\gamma\delta$ T cells
Cancer Res 2002 62: 2347-2352

C

Autorenschaft bei Übersichtsarbeiten:

M. Schnurr, **P. Galambos**, C. Scholz, M. Dauer, A. Krug, G. Hartmann, A. Eigler, S. Endres
Dendritische Zellen: Träger tumorgerichteter Immuntherapie
Dtsch Arztebl 2002; 99: A 2408-2416 [Heft 37]

D

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen in Form von Kurzvorträgen und Postern vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden:

A. Eigler, M. Schnurr, **P. Galambos**, G. Hartmann, B. Emmerich, U. Löhrs, L. Schweiberer, S. Endres

Autologe dendritische Zellen als Tumorstoffimpfung bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom

Symposium Gentianum, 10. Klausurtagung der Medizin. Klinik, 1999

M. Schnurr, **P. Galambos**, M. Bidlingmaier, K. Tschoep, C. Brunner, A. Eigler, S. Endres

Reifung humaner dendritischer Zellen

Symposium Gentianum, 10. Klausurtagung der Medizin. Klinik, 1999

M. Schnurr, **P. Galambos**, M. Bidlingmaier, K. Tschoep, C. Brunner, A. Eigler, S. Endres

Reife-Induktion humaner dendritischer Zellen aus dem peripheren Blut

105. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 1999

Med Klinik 1999; Vol 94:121

P. Galambos, M. Schnurr, M. Bidlingmaier, K. Tschoep, A. Eigler, S. Endres

Entwicklung einer Dendritischen Zell-Vakzine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom

54. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 1999

Z Gastroenterol 1999, 37:340

P. Galambos, M. Schnurr, H. Nienborg, F. Then, B. Siegmund,

M. Bidlingmaier, S. Endres, A. Eigler

Reifeinduzierte dendritische Zellen als Tumorstoffimpfung bei der Immuntherapie von Pankreaskarzinomen

Research Festival Großhadern, 1999

Research Festival 1999, S. 355, P 203

H. Nienborg, **P. Galambos**, M. Schnurr, F. Then, B. Siegmund,

M. Bidlingmaier, S. Endres, A. Eigler

In vitro Induktion zytotoxischer T-Zellen mit Tumorlysat-gepulsten dendritischen Zellen

Research Festival Großhadern, 1999

Research Festival 1999, S. 119, V 82

P. Galambos, H. Nienborg, M. Schnurr, F. Then, S. Endres, A. Eigler

Development of a tumor vaccine based on cell-lysate pulsed dendritic cells: an *in vitro* model

5th International Symposium: Biological Therapy of Cancer, München, 1999

European Journal of Cancer 99, Vol.35, Suppl. 5, S.29:56

P. Galambos, M. Schnurr, H. Nienborg, B. Siegmund, M. Bidlingmaier, S. Endres, A. Eigler

In vitro assessment of the efficacy of a tumor vaccine with autologous, tumor-lysate pulsed dendritic cells

6th International Workshop on Langerhans Cells, New York, 1999

J Invest Dermatology, 114:224, 2000

M. Schnurr, **P. Galambos**, F. Then, C. Scholz, H. Nienborg, S. Endres, A. Eigler

Extracellular adenine nucleotides activate human dendritic cells: ATP induced IL-12 production and upregulation of MHC-II and costimulatory molecules

6th International Symposium on Dendritic Cells, Port Douglas, Australien, 2000

P. Galambos, M. Schnurr, F. Then, C. Scholz, H. Nienborg, S. Endres, A. Eigler

Enhancing the potency of a tumor vaccine based on cell-lysate pulsed dendritic cells: an *in vitro* model

6th International Symposium on Dendritic Cells, Port Douglas, Australien, 2000

C. Scholz, F. Then, M. Schnurr, **P. Galambos**, H. Nienborg, S. Endres, A. Eigler

Differential induction of CTL-mediated cytotoxicity *in vitro* using dendritic cells pulsed with whole cell antigen preparations

6th International Symposium on Dendritic Cells, Port Douglas, Australien, 2000

P. Galambos, M. Schnurr, F. Then, C. Scholz, H. Nienborg, S. Endres, A. Eigler
Entwicklung einer Tumorstoffimpfung auf der Basis von Zelllysat-gepulsten humanen dendritischen Zellen: ein *in vitro* Modell

106. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 2000

Med Klinik 2000; Vol 106:342

C. Scholz, F. Then, M. Schnurr, **P. Galambos**, S. Endres, A. Eigler

Dendritische Zellen als Tumorstoffimpfung bei der Immuntherapie des Pankreas-karzinoms: Einfluss der Antigenherstellung auf die Immunantwort *in vitro*

55. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechsel-krankheiten, 2000

Z Gastroenterol 2000, 38:211

Lebenslauf

16.01.1974 Peter Galambos, geboren in München als Sohn von Katalin und Paul Galambos

Schulausbildung

1980 - 84 Grundschule, Volksschule Gräfelfing
 1984 - 93 Gymnasium, Karlsgymnasium München-Pasing
 - 11. Schuljahr an der Rugby School, Warwickshire, GB
 - Allgemeine Hochschulreife (Note 1,3)

Studium

1993 - 94 Studium der Philosophie, Philosophische Fakultät S.J. in München

seit 1994 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München

seit 1994 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

1996 Physikum (1,66)

1997 1. Staatsexamen (2,00)

1997 - 98 University College London Medical School (UCL), GB mit einem Jahresstipendium des DAAD

seit 1998 Doktorarbeit bei Prof. Dr. S. Endres in der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München

2000 2. Staatsexamen (1,00)

2001-02 Praktisches Jahr; Teilnahme am PJ-Austauschprogramm der "München-Harvard Alliance for Medical Education"

1. Terial: Innere Medizin am Massachusetts General Hospital und Mt. Auburn Hospital, Harvard Medical School, USA

2. Terial: Chirurgie am Brigham and Women's Hospital und Children's Hospital, Harvard Medical School, USA und Royal Melbourne Hospital, Australien

3. Terial: Augenheilkunde in der Augenklinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München und Moorfields Eye Hospital, GB

2002 3. Staatsexamen (1,00)