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

Medizinische Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Immuntherapie im Modell des Pankreaskarzinoms: Kombination einer optimierten dendritischen Zellvakzine mit Chemotherapie und selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmern

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

vorgelegt von
Jan Herten
aus Münster

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Endres
2. Berichterstatter:	PD Dr. F. Th. Kolligs
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. P. Johnson
	Prof. Dr. V. Heinemann
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. A. Eigler
	Dr. M. Dauer
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1
1.1 Therapie des Pankreaskarzinoms 1
1.1.1 Grundlagen zum Pankreaskarzinom 1
1.1.2 Gemcitabin in der Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms 2
1.2 Die Bedeutung der Cyclooxygenase-2 in der Tumortherapie 4
1.2.1 Grundlagen zur Cyclooxygenase-2 4
1.2.2 Die Cyclooxygenase-2 in der Tumortherapie 6
1.3 Tumorimmunologie 8
1.3.1 Grundlagen zum humanen Immunsystem 8
1.3.2 Das angeborene Immunsystem 9
1.3.3 Das adaptive Immunsystem 10
1.3.4 Die dendritische Zelle 12
1.3.4.1 Grundlagen zu dendritischen Zellen 12
1.3.4.2 Fähigkeiten und Eigenschaften der dendritischen Zellen 13
1.3.4.3 Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen 14
1.3.4.4 *In vitro*-Kultur von dendritischen Zellen 16
1.3.4.5 Entwicklung von reifen dendritischen Zellen in 48 Stunden 17
1.3.5 Immunescape-Mechanismen von Tumoren 17
1.4 Dendritische Zellen in der Tumortherapie 19
1.4.1 Aufbau einer Vakzine mit dendritischen Zellen 19
1.4.2 Kombination der Vakzine mit einer Chemotherapie 21
1.5 Zielsetzung 22
2 MATERIAL UND METHODEN 23
2.1 Material 23
2.1.1 Geräte 23
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial 23
2.1.2.1 Chemikalien 23
2.1.2.2 Radioaktive Chemikalien 24
2.1.2.3 Reagenzien-Kits 24
2.1.2.4 Material für die Zellkultur 25
2.1.2.5 Zytokine und Stimulantien 25
2.1.2.6 Kulturmedien, Lösungen und Puffer 26
2.1.3 Verwendete Kultur-Medien und Puffer 27
2.1.4 Antikörper 27
2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe 28
2.1.6 Tetramere 29
2.1.7 Peptide 29
2.1.8 Zelllinien 29

2.2 Methoden 30
2.2.1 Zellkultur von PBMC 30
2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen 30
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität 30
2.2.2 Isolation verschiedener Zellpopulationen 30
2.2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes 30
2.2.2.2 Gewinnung von aufgereinigten Monozyten über Adhärenz-Selektion 31
2.2.2.3 Gewinnung von aufgereinigten Monozyten über magnetische Zellseparation 32
2.2.2.4 Isolation von T-Zellen über magnetische Zellseparation 33
2.2.3 Zellkultur mit dendritischen Zellen 34
2.2.3.1 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen in 48 Stunden 34
2.2.3.2 Antigen-Beladung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen 34
2.2.3.3 Zytokinfreie Kultur dendritischer Zellen („wash-out"-Test) 35
2.2.3.4 Langzeit-Kokultur von dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen 35
2.2.4 Arbeiten mit den verschiedenen Zelllinien 36
2.2.4.1 Zellkultur der Zelllinien 36
2.2.4.2 Herstellung von Tumorlysat als Antigenquelle 37
2.2.4.3 Etablierung einer neuen Pankreaskarzinom-Zelllinie 37
2.3 Analyseverfahren 39
2.3.1 Lichtmikroskopie 39
2.3.2 Photographien 39
2.3.3 Sandwich Enzyme-linked Immmunosorbent Assay 39
2.3.4 Enzyme-linked Immunospot Assay 40
2.3.5 Durchflusszytometrie 41
2.3.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip 41
2.3.5.2 Lifegate-Analyse 42
2.3.5.3 FACS-Analyse von Oberflächenmolekülen 43
2.3.5.4 FACS-Analyse von intrazellulären Molekülen 43
2.3.5.5 FACS-Analyse von Zell-Apoptose 44
2.3.5.6 FACS-Analyse der Antigen-Aufnahme von *FastDC* 44
2.3.5.7 Identifizierung HLA-A2 positiver Zellen 45
2.3.5.8 Tetramer-Analysen (MHC-I/Peptid-Komplexe) 45
2.3.6 [^{3}H]-Thymidin-Proliferationstest 45
2.3.7 Test der Zell-vermittelten Zytotoxizität (^{51}Chrom-Lyse-Test) 46
2.3.8 Proliferations-Analyse der Tumorzellen 48
2.3.9 Nachweis Tumor-spezifischer Genmutationen 48
2.3.10 Statistische Analyse 49

3 ERGEBNISSE 50

3.1 Generierung von reifen dendritischen Zellen in 48 Stunden 50

3.1.1 Monozyten können in 48 Stunden Kultur effektiv mit Tumor-Antigen beladen werden 50

3.1.2 Die Differenzierung und Ausreifung von *FastDC* wird durch die Beladung mit Tumor-assoziierten Antigenen nicht beeinflusst 51

3.1.3 Die Stimulation mit IL-1β, TNF-α und PGE_2 führt zu einer stabilen Ausreifung der *FastDC* 53

3.2 Induktion von aktivierten T-Zellen durch Antigen-beladene *FastDC* 55

3.2.1 In der Kokultur führen *FastDC* zur Aktivierung der T-Zellen 55

3.2.2 In der Kokultur induzieren *FastDC* die Proliferation der T-Zellen 57

3.2.3 Mit Tumorantigen beladene *FastDC* induzieren in der Kokultur mit autologen T-Zellen ein Th1-gewichtetes Zytokinprofil 58

3.3 Induktion einer Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort in autologen T-Zellen durch Antigen-beladene *FastDC* 59

3.3.1 Die durch Antigen-beladene *FastDC* induzierte T-Zell-Reaktion ist spezifisch für das verwendete Antigen 59

3.3.2 Antigen-beladene *FastDC* induzieren in autologen T-Zellen eine Antigen-spezifische IFN-γ-Produktion 60

3.3.3 Antigen-beladene *FastDC* induzieren T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen Melanom- und Pankreas-assoziierte Antigene 62

3.4 Kombination aus *FastDC*-basierter Immuntherapie und Pharmakotherapie *in vitro* 63

3.4.1 Cyclooxygenase-2-Hemmer und Gemcitabin hemmen *in vitro* die Tumorzellproliferation ohne das Überleben der Tumorzellen zu beeinflussen 63

3.4.2 Vorinkubation mit Cyclooxygenase-2-Hemmern oder Gemcitabin sensitiviert Tumorzellen gegenüber der T-Zell-vermittelten Lyse 65

3.4.3 COX-2-Inhibitoren oder Gemcitabin haben keinen Einfluss auf die Aktivierung von *FastDC* 67

3.4.4 COX-2-Hemmer und Gemcitabin hemmen in hohen Konzentrationen die T-Zell-Proliferation 68

3.5 Etablierung und Charakterisierung einer Pankreaskarzinom-Zelllinie 69

3.5.1 Etablierung einer neuen Pankreaskarzinomzelllinie 69

3.5.2 Charakterisierung der neuen Tumorzelllinie 72

3.5.2.1 Die Zelllinie *HDPC-1* ist epithelialen Ursprungs 72

3.5.2.2 Die Zelllinie *HDPC-1* trägt MHC-Moleküle 73

3.5.2.3 Die Zelllinie *HDPC-1* produziert typische Zytokine 74

3.5.2.4 Die Zelllinie *HDPC-1* trägt typische Eigenschaften des Pankreaskarzinoms 75

3.5.3 Proliferation der Tumorzelllinien unter Behandlung mit selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmern 76

4 DISKUSSION 78

4.1 Generation von *FastDC* aus Monozyten in 48 Stunden 78

4.1.1 Optimale Ausreifung der *FastDC* durch eine Kombination aus TNF-α, IL-1β und PGE_2 79

4.1.2 Die Kombination aus TNF-α, IL-1β und PGE_2 führt zu einer stabilen Ausreifung der *FastDC* 80

4.1.3 Antigen-Beladung der *FastDC* 81

4.1.4 T-Zell-Aktivierung 82

4.1.5 Bedeutung der Ergebnisse 82

4.2 Chemosensitivierung von Tumorzellen mit Gemcitabin und selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmern 84

4.2.1 Tumor-Antigen beladene *FastDC* induzieren Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen 84

4.2.2 Direkter Effekt von Gemcitabin und Cyclooxygenase-2-Hemmern auf Pankreaskarzinomzellen 85

4.2.3 Sensitivierung der Pankreaskarzinomzellen durch Gemcitabin und selektive Cyclooxygenase-2-Hemmer 86

4.2.4 Möglicher Mechanismus der Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber CTL-Antworten durch Cyclooxygenase-2-Hemmer 87

4.3 Vakzinestrategie mit DC-basierter Immuntherapie und Behandlung mit Gemcitabin und Cyclooxygenase-2-Hemmern 88

4.3.1 Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit dendritischen Zellen 88

4.3.2 Medikamentöse Therapie des Pankreaskarzinoms 90

4.4 Etablierung einer neuen Pankreaskarzinom-Zelllinie 91

4.4.1 Etablierung der neuen Zelllinie *HCPC-1* 91

4.4.2 Eigenschaften der neuen Zelllinie *HDPC-1* 92

4.5 Ausblick 94

5 ZUSAMMENFASSUNG 97

LITERATURVERZEICHNIS 99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 113

ANHANG 116

DANKSAGUNG 119

PUBLIKATIONEN 120

LEBENSLAUF 123

1 EINLEITUNG

1.1 Therapie des Pankreaskarzinoms

1.1.1 Grundlagen zum Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist in der westlichen Welt die fünfthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen [Jemal, 2003]. Dabei gehört das Pankreaskarzinom insgesamt zu den weniger häufigen Tumorerkrankungen, allerdings mit einer ansteigenden Inzidenz. In den westlichen Industrienationen werden altersadjustierte Inzidenzraten von 3 bis 18 Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen pro Jahr angegeben. Der Altersgipfel dieser Erkrankung liegt zwischen der 6. und 8. Dekade (60 bis 70% der Erkrankten sind älter als 60 Jahre), wobei Männer häufiger betroffen sind. Neben der chronischen Pankreatitis, der hereditären Pankreatitis und dem Diabetes mellitus konnte vor allem das Rauchen von Zigaretten als ätiologisch bedeutsamer Faktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gesichert werden. Weitere mögliche Faktoren wie chronischer Alkoholkonsum, eiweiß- und/oder kohlenhydratreiche Ernährung und fortgesetzter Kontakt mit bestimmten chemischen Substanzen (z. B. α-Naphtylamin oder Benzidin) werden zur Zeit noch kontrovers diskutiert.

Bei 80 % der Pankreasmalignome handelt es sich um duktale Adenokarzinome, die überwiegend im Kopf des Pankreas lokalisiert sind. Die genaue Karzinogenese und der eigentliche Ursprung des Pankreaskarzinoms sind noch unklar. Die Adenokarzinome scheinen sich aus Läsionen der duktalen Pankreasepithelien (so genannte Pankreas-Intraepitheliale-Neoplasie, PanIN) zu entwickeln. Eine eindeutige so genannte Adenom-Karzinom-Sequenz, wie sie z.B. beim Kolonkarzinom gezeigt wurde, lässt sich derzeit noch nicht nachweisen. Allerdings treten im Verlauf der Karzinogenese charakteristische Mutationen auf. Darunter sind zum Beispiel Mutationen die zur Aktivierung von Her2/neu (*Epidermal growth factor*-Rezeptor), k-ras (Onkogen) und der Telomerase führen. Die Familie der Ras-Onkogene, zu der auch k-ras gehört, kodiert für eine Reihe von GTPasen, die an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind und in die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren eingebunden sind. Mutationen können zu einer permanenten Aktivierung der Proteine und so auch der beteiligten Signalwege führen. Zusätzlich entstehen bei der Karzinogenese Mutationen in Tumorsuppressor-Genen wie p53 oder auch DPC4. Deren Aufgabe ist es, in Zellen mit Schäden in der DNS die Apoptose (programmierten Zelltod) einzuleiten, um eine

weitere Entartung zu verhindern. Mutationen in diesen Genen können zu einer Deaktivierung dieser Schutzmechanismen führen. Alle diese Veränderungen im Genprofil maligner Ursprungszellen machen schließlich die unkontrollierte Proliferation und Invasivität der Tumorzellen möglich und können daher auch in der Diagnostik von Tumoren eingesetzt werden. Eine Mutation im k-ras-Onkogen kommt beispielsweise bei fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen in nahezu 100 % vor [Bardeesy, 2002].

Das Pankreaskarzinom hat unter allen gastrointestinalen Karzinomen die schlechteste Prognose. Besonders die frühe Metastasierung und die außerordentlich hohe lokale Tumorprogression mit früher Infiltration in benachbarte Organe und große Gefäße auf der einen Seite und die oft spät und unspezifisch erscheinenden Symptome auf der anderen Seite machen eine kurative Therapie regelmäßig unmöglich [DiMagno, 1999]. Zum Zeitpunkt der Diagnose haben gerade noch 10 bis 15 % der Patienten ein so lokalisiertes Tumorstadium, dass eine potentiell kurative chirurgische Tumortherapie versucht werden kann [Rosewicz, 1997]. In diesem Fall wird in der Regel eine Duodenopankreatektomie nach Whipple durchgeführt, die bei diesem kleinen Teil der Patienten eine 5-Jahresüberlebensrate von 20 % möglich macht [Ahrendt, 2002]. Die 5-Jahresüberlebensrate für alle Patienten liegt allerdings bei weniger als 1 % und die mediane Überlebenszeit bei nur 4 bis 6 Monaten [Brand, 1998]. Zur Verbesserung der Prognose werden neben dem chirurgischen Eingriff bei manchen Patienten auch Chemo- und/oder Radiotherapie-Versuche unternommen. Auf Grund der ausgeprägten Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber den aktuellen Therapien sind die Effekte auf das Langzeitüberleben allerdings minimal. Deshalb beschränkt sich die Therapie bei fortgeschrittenen Tumorstadien zur Zeit im Regelfall auf palliative Behandlungsstrategien, um zumindest eine Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen.

1.1.2 Gemcitabin in der Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms

Da die meisten Patienten mit einem Pankreaskarzinom bei Diagnosestellung bereits älter als 60 Jahre sind, werden die Behandlungsmöglichkeiten auch durch Vor- und Begleiterkrankungen der Patienten deutlich eingeschränkt [Niederhuber, 1995]. Zusätzlich leiden über 80 % der Patienten zusätzlich an durch den Tumor bedingten Symptomen wie Schmerzen, Schwäche, Gewichtsverlust und mangelnde Leistungsfähigkeit, was den Einsatz potentiell toxischer Chemotherapeutika limitiert [Cascinu, 1999].

Bei Patienten mit nicht operablem Pankreaskarzinom ist derzeit das Zytostatikum Gemcitabin (Gemzar®) die effektivste Behandlung und damit Therapie der Wahl. Auch sie führt allerdings nur bei etwa 20 % der Patienten zu einer klinischen Verbesserung. Im Vergleich zur Therapie mit dem häufig bei gastrointestinalen Tumoren eingesetzten 5-Fluorouracil (5-FU) bringt Gemcitabin aber immerhin eine moderate Verlängerung des Überlebens [Burris, 1997]. Trotz allem überlebt der Großteil der mit Gemcitabin behandelten Patienten nicht mehr als 6 Monate. Nach 12 Monaten beträgt die Überlebensrate 18 % bei den Patienten mit Gemcitabin-Therapie und nur 2 % bei 5-FU-Therapie. Diese Daten machen deutlich, dass neue Behandlungsstrategien notwendig sind, um gegen diese aggressiven und weitgehend Therapie-resistenten Tumore optimale Erfolge zu erzielen und die Prognose der Patienten zu verbessern. Es wurden daher bereits multiple Therapieansätze untersucht, die eine Chemotherapie mit Gemcitabin mit anderen Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin oder auch neueren Anti-Angiogenese-Strategien wie Anti-VEGF-Rezeptor-Antikörper-2 kombinieren [Heinemann, 2006; Bruns, 2002]. Denn eine Verbesserung des Behandlungserfolgs scheint beim Pankreaskarzinom am ehesten durch Kombination mehrerer Therapiestrategien erreichbar.

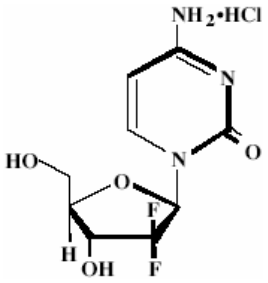

Abbildung 1:
Strukturformel für Gemcitabin
(2'-deoxy-2',2'-difluorocytidin monochlorid).

Gemcitabin (2'Deoxy-2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) wurde 1996 in weiten Teilen Europas für die Therapie des Pankreaskarzinoms zugelassen (siehe Abb. 1). Es ist ein Antimetabolit und stellt ein Analog des natürlichen Deoxycytidins dar. Der primäre Wirkmechanismus besteht darin, dass Gemcitabin nach Phosphorylierung durch die Deoxycytidinkinase zur Triphosphatform in die DNS der Zielzelle eingebaut wird. Als falsches Nukleotid inhibiert Gemcitabin so die DNS-Elongation, was somit zum Strangabbruch und über apoptotische Mechanismen zum Zelltod führt. Dabei kann sich hinter dem dFdC-Baustein eine weitere nicht veränderte Base anlagern, was die Reparaturmechanismen der DNS behindert. Dieser Effekt und weitere Wirkungen durch Gemcitabindiphosphat führen zur einer intrazellulären Anreicherung von

Gemcitabin und zu einer Verstärkung der zytostatischen Wirkung. Nach einer intravenösen Infusion der Standarddosis von 1000 mg/m^2 Gemcitabin über 30 min werden im Blut maximale Serumspitzenspiegel zwischen 3,2 und 45,5 µg/ml (entspricht zwischen 10,7 und 151,8 µM) erreicht. Gemcitabin besitzt eine extrazelluläre Halbwertzeit von ca. 30 min und wird zu großen Teilen in Form von inaktiven Metaboliten über den Urin ausgeschieden.

Eine Übersicht der mit einer Gemcitabin-Therapie assoziierten Nebenwirkungen wurde bereits 1996 vorgelegt [Green, 1996]. Dabei wurden 18 Studien mit insgesamt 790 Patienten analysiert, in denen Gemcitabin als Monotherapie appliziert wurde. In allen Studien wurden Dosierungen zwischen 800 und 1250 mg/m^2 an den Tagen 1, 8 und 15 in einem vierwöchigen Zyklus verwendet. Dabei war das Auftreten von Nebenwirkungen im Allgemeinen dosisabhängig und regelmäßig die hämatologische Toxizität dosisbegrenzend. Als Ausdruck der Myelosuppression wurden häufig Anämie, Leukozytopenie und/oder Thrombozytopenie beobachtet, wobei die Neutropenie am häufigsten war (WHO Toxizität Grad III 19 %, Grad IV 6 %). Die nicht-hämatologische Toxizität resultierte in folgenden Symptomen: Passagere Erhöhungen der Lebertransaminasen, meist geringgradig ausgeprägte Übelkeit und Erbrechen, Diarrhöen oder Obstipation, Mukositis, periphere Ödeme, Dyspnoe, Grippe-ähnliche Symptome mit Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Myalgien und Müdigkeit. Neurotoxizität wurde in Zusammenhang mit einer Gemcitabin-Therapie selten beschrieben und es trat gewöhnlich kein Haarausfall auf. Die Nebenwirkungen waren in den meisten Fällen mild ausgeprägt und führten nur bei wenigen der Patienten zum Therapieabbruch.

1.2 Die Bedeutung der Cyclooxygenase-2 in der Tumortherapie

1.2.1 Grundlagen zur Cyclooxygenase-2

Die Cyclooxygenase ist ein Enzym, das in Zellen am Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Prostaglandinen beteiligt ist (siehe Abb. 2). Das wichtigste Substrat für die Cyclooxygenase ist dabei die Arachidonsäure, die durch das Enzym zuerst zu dem Endoperoxid-Derivat Prostaglandin-G_2 (PGG_2) konvertiert wird. Im folgenden Schritt wird die Hydroperoxid-Gruppe zu einem Alkohol reduziert. Dazu dient eine zweite enzymatische Aktivität des selben Polypeptids als Peroxidase. Da die Cyclooxygenase diese zwei aufeinander folgenden enzymatischen Reaktionen

katalysiert, wird sie auch als Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase, PGH-Synthase oder PGG/H-Synthase bezeichnet. Die für das Protein bzw. auch das Gen der Cyclooxygenase gängige Abkürzung „COX“ beschreibt vor allem die erste enzymatische Reaktion. PGH_2 wird dann weiter über eine Reihe metabolischer Enzyme in eine Familie von bioaktiven Lipiden umgewandelt, welche die Prostaglandine und Thromboxane beinhalten (Abb. 2). Dabei überwiegt in den verschiedenen Zelltypen meistens ein bestimmter typischer Metabolit. Zum Beispiel ist das Prostaglandin-E_2 (PGE_2) das Hauptprodukt in Makrophagen, das Prostaglandin-D_2 (PGD_2) in Mastzellen und Thromboxan-A_2 (TxA_2) in Thrombozyten.

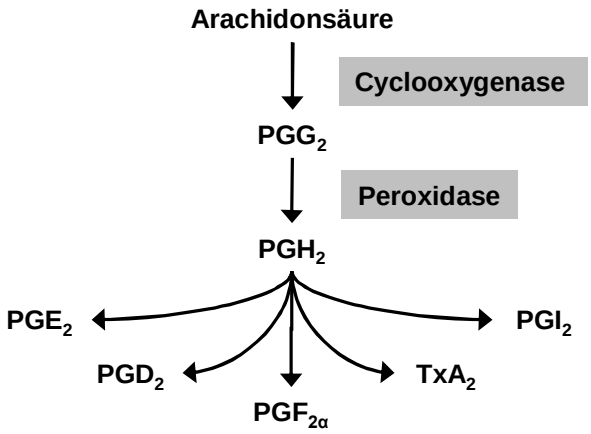

Abbildung 2: Biosynthese von Prostaglandinen über die beiden enzymatischen Aktivitäten der Cyclooxygenase (COX). PG: Prostaglandin, Tx: Thromboxan

Zunächst wurde bei der Untersuchung der Wirkung von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), die in Zellen die Prostaglandinsynthese hemmen und so antiinflammatorisch wirken, eine COX als mögliches Ziel der NSAR identifiziert [Vane, 1971]. Dabei ergaben sich bei weiteren Untersuchungen von Wirkmechanismen der NSAR Anfang der 90er Jahre Erkenntnisse, die einige Effekte der NSAR als COX-unabhängig erscheinen ließen bzw. nahelegten, dass es neben der bisher bekannten COX eine zusätzliche sehr ähnliche Enzymaktivität geben müsse. Sie wurde dann 1992 erstmalig als Isoform des bisherigen, jetzt als COX-1 bezeichneten Enzyms, als COX-2 beschrieben [Fletcher, 1992; Hla, 1992].

Die COX-1 ist konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert und katalysiert die Synthese von Prostaglandinen, welche z.B. dem Schutz der Magenmukosa und der Regulation der Thrombozytenaggregation dienen. Das erklärt auch die bekannten

Nebenwirkungen der NSAR wie Magenulcera oder gastrointestinale Blutungen. Die Isoform COX-2 wird nur in wenigen Geweben physiologisch exprimiert, die Expression ist aber im Gegensatz zur COX-1 durch verschiedene Stimuli wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren induzierbar. So kommt es vor allem bei Entzündungsreaktionen, in Gewebsläsionen und entstehenden oder manifesten Tumoren zur Expression der COX-2. Daraus entstand die Hypothese, durch die Hemmung der COX-2 würden die antiinflammatorische Wirkung und durch die Hemmung der COX-1 die unerwünschten Wirkungen der NSAR hervorgerufen. Mit der Herstellung neuerer COX-Hemmer, die vermehrt oder ausschließlich eine selektive Hemmung der COX-2 hervorrufen, sollte schließlich erreicht werden, die inflammatorische Prostaglandinproduktion hemmen zu können, ohne gleichzeitig in die erwünschten Prostaglandineffekte einzugreifen.

1.2.2 Die Cyclooxygenase-2 in der Tumortherapie

Bei epidemiologischen Studien, die untersuchen sollten welche kardioprotektive oder entzündungshemmende Wirkung bei langfristiger Einnahme von NSAR zu erreichen ist, entdeckte man eine zusätzliche antineoplastische Wirkung der COX-Hemmung. So war z.B. in mehreren Studien das Risiko an einem Kolonkarzinom zu versterben bei langfristiger regelmäßiger Einnahme von Aspirin® (Acetylsalicylsäure, ASS) um 40 bis 50 % niedriger als in der Normalbevölkerung [Giovannucci, 1995; Thun, 1991]. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass die COX tatsächlich in der Karzinogenese von malignen Tumoren eine entscheidende Rolle spielt (siehe auch Tab. 1) [Marnett, 2002].

Auf Grund der vielfältigen Effekte der COX-2 bzw. der Prostaglandine in der Karzinogenese entstehen viele Angriffspunkte für eine Therapie mit COX-2-Hemmern. Durch sie kann zum Beispiel die Proliferation von Tumorzellen gehemmt und in diesen Apoptose induziert werden [Eibl, 2003; Elder, 1997; Piazza, 1997]. Auch die Neoangiogenese und Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen kann durch eine Unterdrückung der Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) durch die COX-2-Hemmer reduziert werden [Wei, 2004; Masferrer, 2000]. Damit bietet die selektive Hemmung der COX-2 eine zunehmend attraktive neue Waffe im Kampf gegen maligne Tumore. Auch für die Therapie von Patienten mit Pankreaskarzinom erscheinen COX-2-Hemmer gut geeignet. Denn besonders in der Karzinogenese gastrointestinaler Tumore spielt die Aktivierung und Überexpression der COX-2 eine wichtige Rolle [Grover, 2003]. Dabei ist besonders beim Pankreaskarzinom regelmäßig eine Überexpression festzustellen [Kokawa, 2001; Merati, 2001; Yip-Schneider, 2000].

Es konnte gezeigt werden, dass sie mit einer reduzierten Funktion von dendritischen Zellen (DC) und T-Zellen in den Tumorpatienten einhergeht [Pockaj, 2004].

Tabelle 1: Direkt bzw. indirekt durch die Cyclooxygenase vermittelte Effekte bei der Karzinogenese von malignen Tumoren [Marnett, 2002].

Zellproliferation	Stimulation oder Hemmung der Zellproliferation, -differenzierung oder Tumormetastasierung durch Prostaglandine
Mutagenität	Direkte mutagene Wirkung von Malondialdehyd, einem Substrat von PGH_2; Metabolische Aktivierung von chemischen Karzinogenen durch die Peroxidase-Aktivität der COX
Karzinogenese	Beteiligung von Prostaglandinen bei der Karzinogenese und Invasivität von malignen Tumoren (benigne Tumor besitzen keine COX-2)
Immunsystem	Immunosuppression durch PGE_2 z.B. durch Hemmung der Reifung von dendritischen Zellen und Verschiebung des Zytokinprofils von IL-12 zu IL-10
Angiogenese	Steigerung der Produktion von proangiogenetischen Faktoren wie z.B. VEGF
Therapie	Wachstumshemmung von Tumoren durch die Hemmung der COX

Durch die Behandlung mit selektiven COX-2-Hemmern kann die immunsuppressive Wirkung, die Tumore unter anderem durch die Produktion von PGE_2 erzeugen, und die daraus resultierende Hemmung der DC-Reifung und -Funktion *in vitro* wieder aufgehoben werden [Sombroek, 2002]. Außerdem wird durch die COX-2-Hemmung die Balance zwischen der Synthese von Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-10 (IL-10) wieder hergestellt und so eine Immunreaktion gegen den Tumor wieder ermöglicht [Stolina, 2000]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Tumorzellen durch COX-2-Inhibition *in vitro* für die Todesrezeptor-vermittelte Lyse sensitiviert werden können, was ein Hinweis auf ihre mögliche Rolle in der Verstärkung T-Zell-vermittelter anti-Tumor Antworten ist [Totzke, 2003]. Die ersten Erkenntnisse aus murinen Tumormodellen zeigten, dass eine orale Behandlung mit COX-2-Hemmern tatsächlich auch *in vivo* effektiv die Reaktionen auf Virus-basierte Vakzinestrategien steigern kann [DeLong, 2003; Zeytin, 2004].

Somit könnte sich eine Kombination von COX-2-Hemmern mit einer DC-basierten Immuntherapie auch für Patienten mit Pankreaskarzinom als Erfolg versprechend erweisen. Dazu kommt, dass die COX-2-Hemmer ihre antiproliferativen und proapoptotischen Effekte auf Tumorzellen interessanterweise unabhängig von der Expression des Enzyms entwickeln [Totzke, 2003]. COX-2-Hemmer können also alleine oder auch in Kombination mit anderen Behandlungsstrategien eingesetzt werden, ohne dass der zu behandelnde Tumor die COX-2 überhaupt exprimieren muss.

1.3 Tumorimmunologie

1.3.1 Grundlagen zum humanen Immunsystem

Bei der Pathogenese des Pankreaskarzinoms wird augenscheinlich, dass schon kleine genetische Alterationen ausreichen, um aus gesunden Körperzellen maligne sich ausbreitende Karzinomzellen werden zu lassen. Die zellulären Veränderungen entstehen dabei z.B. durch chemische Noxen wie beim Rauchen, durch chronische Entzündungsreize oder auch durch Strahlungsschäden. Diese Prozesse finden vielfach und ständig in jedem Menschen statt und trotzdem entstehen nicht regelmäßig maligne Neoplasien. Verhindert wird dies in aller Regel von einem System aus verschiedenen spezialisierten Zellen und deren komplexem Zusammenspiel, dem Immunsystem. Dieses ist nicht nur dafür bestimmt, den Körper vor Angriffen exogener Noxen oder Mikroorganismen zu verteidigen, sondern auch vor endogenen Bedrohungen in Form von Virenbefall oder maligner Entartung pathologisch veränderter Zellen. Eine der wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems ist es dabei, gesunde Körperzellen nicht anzugreifen, sondern effektiv zwischen „selbst“ und „fremd“ differenzieren zu können.

Das Immunsystem bedient sich hierbei zweier sich ergänzender Teile, zum einen dem angeborenen und zum anderen dem adaptiven, erworbenen Immunsystem. Besonders in der frühen Phase einer Immunreaktion ist das angeborene System von Bedeutung, das in der Lage ist eine Infektion zu erkennen und effektiv zu bekämpfen. Die dabei eingesetzten Mechanismen beinhalten die Phagozytose, Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und Antigen-Präsentation. Zusätzlich wird die Aktivierung des adaptiven Immunsystems eingeleitet, um eine den jeweiligen Erfordernissen angepasste spezifische Immunantwort zu erzeugen. Die beiden Teile

des Systems bilden so ein gemeinsames Abwehrkonzept, in dem die angeborene Immunität als Sensor und Aktivator für die dann folgende spezifische Immunität dient.

1.3.2 Das angeborene Immunsystem

In der Tumorabwehr sind im angeborenen Immunsystem insbesondere zwei Mechanismen bedeutend: Die Produktion von Interferonen und die Zerstörung durch so genannte natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

Interferone (IFN), eine Gruppe immunregulatorischer Proteine, werden in IFN Typ I oder Typ II eingeteilt und von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert [Farrar, 1993; Pestka, 2000]. Die Familie der IFN Typ I, zu denen unter anderem das IFN-α und das IFN-β gehören, kommt hauptsächlich bei antiviralen Reaktionen zum Einsatz. Auf mikrobielle Stimuli werden die IFN Typ I rasch sezerniert und aktivieren eine Vielzahl von Effektorzellen, sowohl des angeborenen wie auch des erworbenen Immunsystems. IFN-γ ist der einzige Vertreter der IFN Typ-II und wird hauptsächlich von T-Zellen oder NK-Zellen gebildet, die vorher durch Antigene oder Zytokine stimuliert wurden. Dieses IFN-γ wird heute als das wichtigste immunregulatorische Protein der IFN-Familie angesehen [Billiau, 1996]. Es spielt vor allem in der Verteidigungsstrategie gegen Tumorzellen eine wichtige Rolle.

NK-Zellen sind Lymphozyten, die sich dadurch auszeichnen, dass es ihnen möglich ist, Tumorzellen auch ohne eine vorausgegangene Stimulation anzugreifen und zu lysieren [Trinchieri, 1989]. Sie stammen mit den T-Zellen zusammen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle ab [Mingari, 1991; Rodewald, 1992]. Trotz ihrer Verwandtschaft zu den T-Zellen tragen NK-Zellen aber keine rearrangierten, Antigen-spezifischen Rezeptoren und benötigen keine Ausreifung. Morphologisch zeichnen sich die relativ großen Zellen durch ihre azurophilen Granula im Zytoplasma aus und sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD16 und CD56 von anderen Lymphozyten und durch Fehlen des CD3-Komplexes auch von T-Zellen abzugrenzen. Die Effektormechanismen der NK-Zellen bestehen in der Zytokinproduktion (insbesondere IFN-γ, TNF-α und GM-CSF) und der direkten Zytotoxizität, mit der sie in der Lage sind infizierte und insbesondere maligne Zellen zu zerstören.

Dabei erkennen sie die Zielzellen über zwei Mechanismen: Wie viele andere Immunzellen exprimieren NK-Zellen sog. Fcγ-Rezeptoren, welche Immunglobuline der Klasse IgG über deren Fc-Teil binden können. Über diese Fcγ-Rezeptoren binden NK-

Zellen durch IgG-Immunglobuline opsonierte Zielzellen und führen über Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität zur Lyse der Zelle. Dieser Mechanismus beschreibt eine quasi indirekt adaptive Immunreaktion, da die NK-Zellen nur durch das adaptive System durch Antikörper markierte Zielzellen lysieren. Als zweiten Erkennungsmechanismus nutzen die NK-Zellen ihre spezifischen *killer-activating receptors* (KARs) und *killer-inhibitory receptors* (KIRs). Die KARs binden über noch nicht bekannte Moleküle an kernhaltige Zellen und stellen in ihrer verbundenen Form für die NK-Zellen die „Lizenz zur Zelllyse“ dar. Gleichzeitig interagieren aber die KIRs mit MHC Klasse I-Molekülen (*major histocompatibility complex*) auf der Zielzelle. Diese Bindung der KIRs an MHC-I hebt im Normalfall über inhibitorische Signale den Lyseauftrag wieder auf, so dass die gesunden MHC-I-tragenden Körperzellen nicht angegriffen werden. Kommt es aber zum Verlust an MHC-I auf der Zelloberfläche, wie es typischerweise bei der malignen Entartung einer Zelle zu beobachten ist, so entfällt die Inhibition der NK-Zellen durch die KIRs und die aktivierenden Signale der KARs überwiegen. Dieser Mechanismus, der auch als „*missing self*“ bezeichnet wird, führt dann zur Lyse der Zielzelle [Ljunggren, 1990].

1.3.3 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, den B- und den T-Zellen. Die Besonderheit des adaptiven Immunsystems ist das Vorliegen einer großen Anzahl Antigen-spezifischer Zellen, die jeweils mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet sind. Diese Vielfalt an verschiedenen Erkennungsrezeptoren erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass für jedes spezifische Antigen auch ein „passender“ Lymphozyt existiert. Deshalb unterliegen die Lymphozyten einer speziellen Differenzierung, der so genannten klonalen Selektion. Während der Lymphozytenreifung werden durch Rekombination der für die Antigenrezeptoren kodierenden Gene strukturell einzigartige B- bzw. T-Zellrezeptoren erzeugt. Dabei entsteht ein zufällig generierter Pool an unzähligen verschiedenen Rezeptoren. Im Laufe des Lebens werden dann durch verschiedene positive und negative Selektionsmechanismen Zellen mit „unbrauchbaren“ Rezeptoren aussortiert und Zellen, die ihr spezifisches Antigen erkennen aktiviert, klonal expandiert und zu ihrer Effektorfunktion angeregt.

B-Zellen haben vor allem die Aufgabe durch ihre Antikörperproduktion das angeborene Immunsystem mit den natürlichen Killerzellen zu aktivieren und maligne Zellen für

einen Angriff mit spezifischen Antikörpern zu markieren. Eine besondere Bedeutung in der Tumorimmunologie haben die T-Zellen. Sie stellen mit ca. zwei Dritteln auch die größte Lymphozytenpopulation unter den peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) dar. Reife T-Zellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche den CD3-Komplex und zusätzlich entweder den CD4- oder den CD8-Korezeptor. Mit ihrem nach dem Rearrangementprozess entstandenen, jeweils einzigartigen T-Zell-Rezeptor (TcR), können sie Antigene erkennen, die zu kurzkettigen Peptiden prozessiert wurden und ihnen in den so genannten MHC-Molekülen präsentiert werden. Für die T-Zellen ist ein Antigen definiert als Fremd-Peptid, gebunden an entweder MHC-I-Moleküle für $CD8^+$, oder MHC-II-Moleküle für $CD4^+$ T-Zellen. Diese Spezifikation ist im Laufe der Zellreifung im Thymus entstanden, in dem nur T-Zellen mit solchen TcR zugelassen werden, die mit geringer Affinität an die eigenen MHC-Moleküle binden (sog. positive Selektion/MHC-Restriktion), und diejenigen ausschließt, welche spezifisch für MHC/Selbst-Peptid-Komplexe sind (negative Selektion). Nach diesem Selektionsprozess sind schließlich nur noch Zellen vorhanden, die spezifisch für Fremd-Peptide sind, die auf eigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. Die Antigenerkennung ist also MHC-abhängig und native Fremdantigene, die nicht in prozessierter Peptid-Form vorliegen und nicht im Zusammenhang mit MHC-Molekülen präsentiert werden, können in der Regel nicht erkannt werden.

Für die Aktivierung naiver T-Zellen ist aber die bloße Erkennung des spezifischen Liganden durch den TcR nicht ausreichend, sondern es muss zusätzlich zu einem gleichzeitigen kostimulatorischen Signal (z.B. über eine Bindung zwischen B7 und CD28) kommen. Die dafür notwendige Molekülausstattung besitzen nur professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie z.B. die DC. Nach dem ersten Aktivierungssignal - dem sog. „*Priming*“ - muss die einzelne Antigen-spezifische T-Zelle noch proliferieren und der so expandierte Zellklon in Effektorzellen differenziert werden. Die bereits einmal „geprimten“ Zellen sind dann bei einem zweiten Antigen-Kontakt viel leichter und oft auch durch alleinige Antigen-Erkennung zu aktivieren.

Die Effektorfunktionen, die von T-Zellen ausgeübt werden, sind dabei vielfältig. Die $CD4^+$ T-Helfer-Zellen „helfen“ der Initiation einer potenten Immunantwort, in dem sie Signale und Zytokine produzieren, die einerseits die Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antigen-produzierenden Plasmazellen erzielen und andererseits Makrophagen und zytotoxische T-Zellen dabei unterstützen, intrazelluläre Pathogene zu eliminieren [Murphy, 2002]. Die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen binden an die Zellen, die ihr spezifisches Antigen in Verbindung mit MHC-I tragen, und werden so

zum Angriff aktiviert, der über mehrere Mechanismen möglich ist. Zum einen können aus den Granula der T-Zellen Granzyme und Perforine freigesetzt werden. Dabei bildet Perforin Poren in der Zellmembran der Zielzelle, wodurch die Granzyme eindringen und in den Zielzellen die Apoptosekaskade aktivieren können. Andererseits können die T-Zellen über ein Oberflächenmolekül, den Fas-Liganden (CD95L) mit den Fas-Rezeptoren (CD95) - den so genannten „Todesrezeptoren“ - auf der Zielzelle Kontakt aufnehmen, was letztendlich ebenfalls zur Apoptose der Zelle führt. Außerdem produzieren die T-Zellen noch IFN-γ und TNF-α/β, um die Immunantwort zu steigern. Die T-Zellen können dabei durch ihr Repertoire an TcR eine fast unbegrenzte Anzahl an Antigenen erkennen und direkt oder indirekt deren Eliminierung einleiten. Damit sind sie elementar für die zelluläre Abwehr maligner Zellen.

1.3.4 Die dendritische Zelle

1.3.4.1 Grundlagen zu dendritischen Zellen

Die DC (dendron = griechisch: Baum) tragen ihren Namen auf Grund der langen Zellausläufer, die ihnen ihre charakteristische Form verleihen [Steimle, 1993]. Sie stellen die Verknüpfung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem dar und sind hoch spezialisierte APC mit der einzigartigen Fähigkeit Immunantworten anzustoßen und zu kontrollieren [Banchereau, 2000]. Sie präsentieren naiven T-Zellen ihr Antigen und sind so in der Lage, spezifische zytotoxische T-Zellen nach vorherigem Kontakt mit T-Helferzellen [Ridge, 1998] oder auch unmittelbar zu stimulieren [Inaba, 1987].

Seit ihrer ursprünglichen Beschreibung [Steinman, 1973] hat sich gezeigt, dass DC eine heterogene Population von Zellen darstellen, die sich in ihrer Differenzierung und Funktion unterscheiden. Im humanen System der DC, die alle von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen abstammen, lassen sich mindestens drei DC-Subpopulationen unterscheiden. Die interstitiellen DC in der Haut und den lymphatischen Organen und zwei Untergruppen von DC im peripheren Blut, die myeloide $CD11c^+$ DC (mDC) und die plasmazytoide/lymphoide $CD11c^-$ DC (pDC) [Shortman, 2002]. Diese zwei Subpopulationen von DC im peripheren Blut unterscheiden sich nicht nur in der Expression von CD11c, sondern weisen auch eine unterschiedliche Regulation durch Zytokine auf. Diese Arbeit konzentriert auf DC myeloiden Ursprungs.

1.3.4.2 Fähigkeiten und Eigenschaften der dendritischen Zellen

In nahezu allen peripheren Geweben befindet sich ein Netzwerk von *unreifen* DC, die als „Wächter“ des Immunsystems ständig ihre Umgebung durch Phagozytose und Endozytose von extrazellulärem Material kontrollieren. Außerdem werden die DC und deren Vorläufer über die Bindung verschiedener Chemokine an die jeweiligen Chemokinrezeptoren zu den Infektions- bzw. Antigen-Quellen geleitet [Sallusto, 2000]. Die Antigene werden nach der Aufnahme durch intrazelluläre Proteasen und Peptidasen zu Peptiden degradiert. Diese Peptide werden dann zytosolisch mit MHC Klasse II-Molekülen verbunden und an die Zelloberfläche transportiert um dort präsentiert zu werden.
DC haben zusätzlich die einzigartige Fähigkeit von extrazellulär aufgenommene Peptide gleichzeitig auch an MHC Klasse I-Moleküle zu binden und zu präsentieren. Dies wird als Kreuzpräsentation (*cross presentation)* bezeichnet [Belz, 2002]. Normalerweise werden von den Körperzellen intrazelluläre Peptide nur auf MHC-I-Molekülen und von Antigen-präsentierenden Zellen extrazelluläre Peptide nur auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Durch die Kreuzpräsentation der DC werden die potentiellen Antigene gleichzeitig für die $CD4^+$ und die $CD8^+$ T-Zellen erkennbar gemacht. Der turn-over der dendritischen MHC-Moleküle ist sehr langsam und die Expressionsdichte sehr hoch, so dass Peptide über einen langen Zeitraum präsentiert werden können [Steinman, 1991].

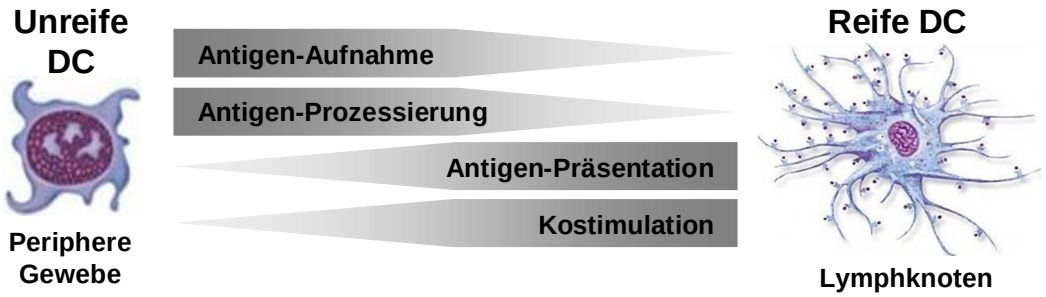

Abbildung 3: Veränderung in Phänotyp, Aufenthaltsort und Spezialisierung der DC im Verlauf der Ausreifung.

Nach einem Antigenkontakt oder dem Einwirken inflammatorischer Signale, die zur Ausreifung der DC führen, verlieren diese die Fähigkeit zur weiteren Antigen-Aufnahme und –Prozessierung und wechseln ihre Spezialisierung (siehe Abb. 3). Den *reifen* DC fehlen phänotypisch die Eigenschaften ihrer Ursprungszelle wie z.B. der Monozyten-Marker CD14, sie exprimieren dafür jetzt aber kostimulatorische Moleküle,

Adhäsionsmoleküle und eine sehr hohe Dichte an MHC-Molekülen [Cella, 1997; Cella, 1996; Schnurr, 2000]. Als spezifischen Marker tragen sie CD83, das als typischer Reifemarker dient und wahrscheinlich auch bei der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist [Scholler, 2002]. Außerdem produzieren sie große Mengen an immunaktivierenden Zytokinen, wie z.B. IL-12, welches z.B. naive $CD4^+$ T-Zellen zu IFN-γ-produzierenden TH1-Zellen polarisiert [Guermonprez, 2002]. Durch Expression des Chemokinrezeptors CCR7 können sie einem Gradienten aus den in lymphatischen Geweben produzierten Chemokinen CCL19 (auch ELC, MIP-3β) und CCL21 (auch SLC, 6-C-kine) folgen und so über die afferente Lymphe in den nächsten drainierenden Lymphknoten einwandern („*homing*“) [Randolph, 2001]. In den T-Zell-Arealen der Lymphknoten kommen sie dann als interdigitierende retikuläre Zellen [Cella, 1997; Steinman, 1991] vor und können dort mit den naiven T-Zellen interagieren und so eine adaptive Immunantwort initiieren (siehe Abb. 4).

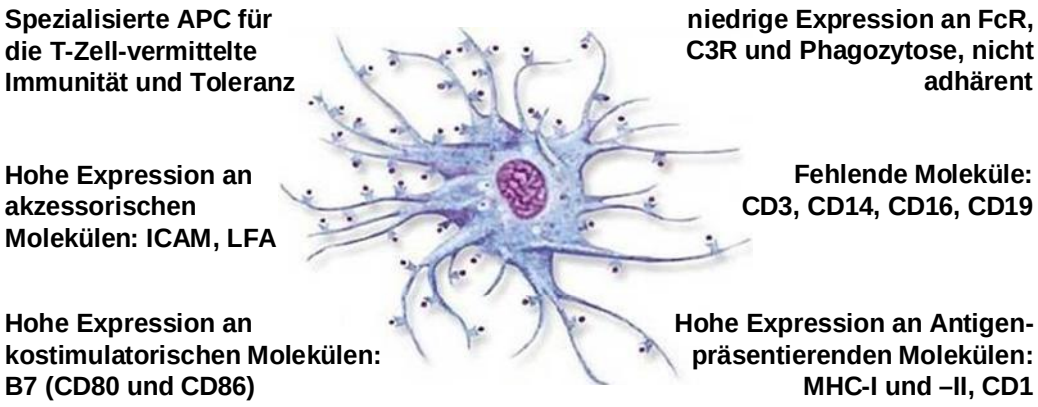

Abbildung 4: Übersicht über funktionelle und phänotypische Eigenschaften der reifen DC.

1.3.4.3 Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen

In Abhängigkeit ihres Aktivierungsgrades sind DC in der Lage gegenüber dem präsentierten Antigen eine Toleranz oder aber eine spezifische Immunantwort zu initiieren. Die Effektivität der erzielten Immunantwort wird dabei entscheidend durch das kostimulatorische Potential der DC bestimmt, da neben der MHC-abhängigen Antigen-Präsentation auch gleichzeitig ausreichende kostimulatorische Signale die T-Zellen aktivieren müssen. Unreife DC können den T-Zellen lediglich MHC-gebundenes Antigen ohne gleichzeitige Kostimulation präsentieren und erzeugen so Toleranz gegenüber diesem Antigen [Dhodapkar, 2001]. Erst die voll ausgereiften DC können durch zusätzliche adäquate Kostimulation eine effektive T-Zell-vermittelte

Immunantwort induzieren [Shortman, 2001]. Insgesamt können erst voll ausgereifte DC alle drei synergistischen Signale liefern, die zur Aktivierung spezifischer T-Zellen benötigt werden [Bubenik, 1996]:

- **Antigen-Präsentation:** Tumorantigene, die im Zusammenhang mit MHC-I bzw. MHC-II spezifischen T-Zellrezeptoren auf zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) bzw. T-Helferzellen ($CD4^+$) präsentiert werden
- **Kostimulation:** Interaktion von nicht Antigen-spezifischen kostimulatorischen Signalen wie CD80 oder CD86 mit CD28 auf T-Zellen
- **Zytokine:** Proliferative Signale durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren, um tumorreaktive Lymphozyten zu rekrutieren

Eine ausgereifte DC ist dabei in der Lage mehrere Tausend T-Zellen zu stimulieren, wobei sich bei der Interaktion stabile so genannte „*cluster*“ aus den DC und den T-Zellen bilden [Banchereau, 1998].

Um die vollständige Aktivierung zu erreichen, die notwendig ist, um naive $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen zu primen, wird $CD4^+$ T-Zell-Hilfe benötigt [Bennett, 1997; Faiola, 2002]. Beim vorrangigen Kontakt präsentiert die DC den $CD4^+$ T-Helfer-Zellen über MHC-II-Moleküle das Antigen, was diese dazu bringt ihrerseits die DC über einen Kontakt zwischen CD40-Ligand (T-Zelle) und CD40 (DC) weiter zu aktivieren. Erst dann ist die kostimulatorische Fähigkeit der DC ausreichend um mit zusätzlicher Unterstützung der $CD4^+$ T-Zell-Hilfe die spezifischen zytotoxischen T-Zellen durch Präsentation von Antigen auf MHC-I zu primen. Zusätzlich werden die so geprimten Zellen dann über Zytokinsignale der DC (IL-12) und der T-Helferzellen (IL-2) expandiert. Die dadurch erzeugten Antigen- bzw. Tumor-spezifischen und zytotoxischen T-Zellen sind dann in der Lage, die Tumorzellen als Antigen-Ursprung zu erkennen und anzugreifen (siehe Abb. 5).

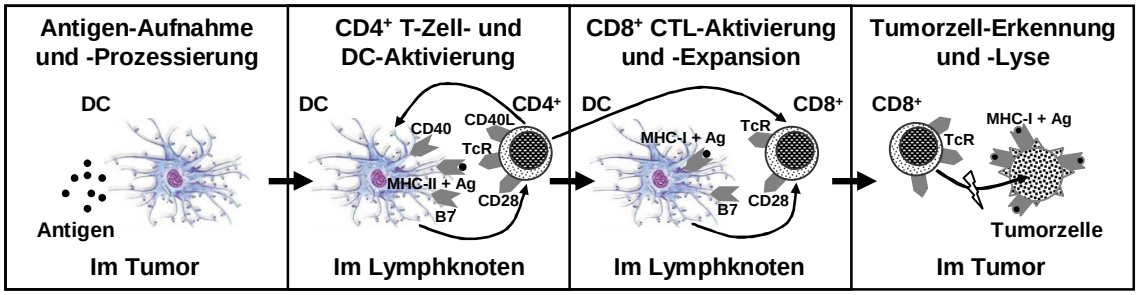

Abbildung 5: Ablauf einer Abwehrreaktion gegen Tumorzellen über dendritische Zellen und T-Zellen.

1.3.4.4 *In vitro*-Kultur von dendritischen Zellen

Auf Grund ihrer besonderen Eigenschaften sind DC das ideale Instrument für die Bekämpfung von Tumoren. Die Anzahl der zirkulierenden DC ist mit weniger als 1 % der mononukleären Zellen [Steinman, 1991] allerdings viel zu gering für genauere Untersuchungen mit DC bzw. deren Einsatz in einer Immuntherapie. Die Erkenntnisse über die Zellbiologie und Funktion der DC wurden daher weitgehend durch *in vitro*-Experimente gewonnen.

Mehreren Arbeitgruppen gelang es, aus verschiedenen Vorläuferzellen durch Kultur mit bestimmten Zytokinen mDC zu generieren. Dafür konnten $CD34^+$ Stammzellen [Caux, 1996], $CD11c^+$ Vorläuferzellen des peripheren Blutes [Ito, 1999] oder $CD14^+$ Monozyten [Romani, 1994; Sallusto, 1994] verwendet werden. Um die Zellen zu differenzieren und auszureifen, wurden dann Zytokin-Stimulationen mit Interleukin-4 (IL-4), Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Interleukin-10 (IL-10) und anderen Faktoren durchgeführt [Morel, 1997; Romani, 1994; Saraya, 1996]. Die jeweils erzeugten Zellen unterschieden sich dabei sowohl phänotypisch als auch funktionell in Abhängigkeit von ihrer Generierungsmethode [Hart, 1997].

Romani entwickelte 1994 ein mittlerweile weitgehend als Standard etabliertes Protokoll, mit dessen Hilfe man unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF mDC aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes generieren kann [Romani, 1994]. Dafür werden Monozyten für 5 bis 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 kultiviert um unreife DC zu erhalten, die dann für weitere 2 bis 3 Tage mit mikrobiellen, proinflammatorischen oder T-Zell-abhängigen Stimuli aktiviert werden müssen. Dabei wurde ein Cocktail aus TNF-α, IL-1β, IL-6 und PGE_2 als besonders effektiv bei der Ausreifung von DC für die Aktivierung von T-Zellen gefunden [Jonuleit, 1997]. Man erhält schließlich ausgereifte DC mit der vollen T-Zell-stimulierenden Kapazität, die der von Hart 1997 vorgeschlagenen Arbeitsdefinition für DC entsprechen [Hart, 1997]. Sie haben die Fähigkeit eine primäre T-Zellantwort zu stimulieren, durch Gewebe zu migrieren, zu relativ spezifischer Phagozytose und zur spontanen Clusterbildung mit T-Zellen *in vitro*. Außerdem tragen sie Oberflächenmarker, die sie deutlich vom Phänotyp von Makrophagen, B-Zellen und anderen Immunzellen unterscheiden, exprimieren in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand DC-typische Marker und unterscheiden sich auch in ihren zytochemischen Vorgängen deutlich von Makrophagen-spezifischen

Reaktionen. Das Expressionsprofil der Oberflächenmarker ist dabei stark abhängig vom Reifegrad der Zellen [Hart, 1997].

1.3.4.5 Entwicklung von reifen dendritischen Zellen in 48 Stunden

Zunehmend entwickelte sich die Ansicht, dass die Reifung von DC aus monozytären Vorläufern auch *in vivo* eine Relevanz haben könnte. Allerdings waren die genauen Bedingungen und die zeitlichen Verhältnisse unter denen dies geschieht noch nicht bekannt. Experimentelle Daten wiesen aber darauf hin, dass die Reifungszeit in der Entwicklung der DC aus Monozyten in den gängigen Protokollen nicht unbedingt die physiologischen Verhältnisse widerspiegelt. Einzelne Experimente zeigten, dass sich Monozyten unter bestimmten Bedingungen in wesentlich kürzerer Zeit bzw. sogar spontan zu DC entwickeln können [Ho, 2002; Randolph, 1998].

Aus diesen Erkenntnissen konnte unsere Arbeitsgruppe schließlich ein neues Protokoll zur Generierung von reifen DC aus Monozyten innerhalb von nur 48 Stunden entwickeln [Dauer, 2003; Obermaier, 2003]. Die so genannten *FastDC* wurden nur noch für 24 h mit GM-CSF und IL-4 behandelt und anschließend für weitere 24 h mit einem Cocktail aus IL-1β, IL-6, TNF-α und PGE_2 ausgereift. So erzeugte *FastDC* zeigten im Vergleich zu DC, die nach dem Standard 7-Tage-Protokoll gefertigt wurden, keine Nachteile in ihrem Reifestatus bezüglich Oberflächenmarker-Expression, Chemokin-Sensibilität und T-Zell-Aktivierung. Zusätzlich waren die erzielte Zellreinheit und -ausbeute bei den *FastDC* gegenüber nach Standard generierten DC deutlich gesteigert. Die Möglichkeit Monozyten-generierte DC [Fong, 2000] und jetzt auch nach dem neuen Protokoll unserer Arbeitsgruppe *FastDC* in großen Mengen und in relativ kurzer Zeit *in vitro* zu generieren, macht sie zu einem interessanten Instrument für Vakzinestrategien im Rahmen der Immuntherapie maligner Tumoren.

1.3.5 Immunescape-Mechanismen von Tumoren

Leider zeigen maligne Tumoren häufig eine sehr geringe Immunogenität, welche unter anderem durch die Unfähigkeit der Tumorzellen hervorgerufen wird, alleine zur Aktivierung naiver T-Zellen zu führen [Ochsenbein, 1999; Ochsenbein, 2001]. Zusätzlich haben maligne Zellen Mechanismen entwickelt, mit denen sie der Erkennung und dem Angriff von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL)

entgehen können. Denn letztendlich können sich größere Tumorzellkonglomerate nur entwickeln, wenn die hier beschriebenen Abwehrsysteme des Immunsystems versagen.

Grundsätzlich werden auch maligne Zellen durch die Präsentation von Antigen-Peptiden auf MHC-I-Molekülen erkannt. Dafür binden die CTL zuerst unspezifisch über Adhäsionsmoleküle (LFA-1/CD11a) an die Zielzellen (ICAM/CD54). Erkennen sie dort einen Komplex aus MHC-I plus Selbst-Peptid, entfernen sie sich wieder, bei MHC-I plus Fremd-Peptid startet eine vorher aktivierte T-Zelle den Angriff. Im Gegensatz zum Priming wird hierbei keine zusätzliche Kostimulation mehr benötigt. Bei den Peptiden kann es sich zum einen um „Tumor-spezifische“ Antigene handeln, die bei entarteten Zellen durch Mutationen normaler zellulärer Gene auftreten (z.B. β-catenin, k-ras). Nach der Prozessierung der veränderten Proteine werden diese „neuen“ Proteinfragmente präsentiert und vom Immunsystem als Fremd-Signal erkannt. Als „Tumor-assoziierte“ Antigene werden solche Antigene bezeichnet, die nicht nur bei Tumorzellen, sondern auch bei normalen Zellen exprimiert werden (z.B. p53, Her2/neu). Hier entsteht das Fremd-Signal durch eine gegenüber gesunden Zellen deutlich gesteigerte Expressionsdichte der Antigene bei den Tumorzellen [Igney, 2002]. Das Expressionsmuster der Antigene kann dabei auch innerhalb eines Tumors sehr heterogen sein, so dass ein Patient durchaus Immunreaktionen gegen mehrere Antigene entwickeln kann [Lee, 1999].

Tumorzellen haben allerdings gegen viele notwendige Schritte im Aufbau einer effektiven Immunantwort Mechanismen entwickelt, um dem Angriff zu entgehen. Dazu gehören z.B. der Verlust von Adhäsionsmolekülen, der Verlust oder die verminderte Expression der MHC-Peptid-Komplexe [Gilboa, 1999] oder auch Defekte in der Antigen-Prozessierung [Johnsen, 1999] um einer Erkennung durch die CTL zu entgehen. Die Aktivierung der einzelnen Immunzellen beeinflussen Tumorzellen z. B. durch die Produktion von immunsuppressiven Faktoren wie TGF-β (*transforming growth factor*), IL-10 und VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Außerdem entwickeln sie anti-apoptotische Moleküle oder regulieren die Expression des Todesrezeptors CD95 herunter um eine Apoptoseinduktion durch CTL zu vermeiden. Es gibt sogar Hinweise, dass Tumorzellen durch eigene Expression von CD95-Ligand die Immunzellen beim Zell-Kontakt selber in die Apoptose zwingen [Walker, 1997].

Auch beim Pankreaskarzinom scheinen diese Mechanismen zu greifen. In Untersuchungen von Gewebsproben aus Pankreaskarzinomen konnten im Bereich des

Tumors kaum infiltrierende Immunzellen gefunden werden [von Bernstorff, 2001; Dallal, 2002]. Als mögliche Ursache fand man im Tumorgewebe erhöhte Konzentrationen von VEGF [Itakura, 1997; Seo, 2000], wobei VEGF neben der Neovaskularisation und Metastasierung des Tumors z.B. auch zu einem Defekt in der Reifung von DC führt [Ohm, 2001]. Auch IL-10 und TGF-β werden vermehrt gebildet [von Bernstorff, 2001], was bei Patienten mit Pankreaskarzinom zu einer Veränderung der Immunreaktion führt und so eine effektive CTL-Antwort verhindert [Bellone, 1999]. Außerdem konnte auf Pankreaskarzinomzellen tatsächlich die Expression von Fas-Ligand und eine damit einhergehende Apoptose von Immunzellen im Tumor festgestellt werden [Ohta, 2004; Satoh, 1999].

Diese Mechanismen können nicht nur die physiologische Immunantwort in den Patienten einschränken, sondern könnten auch die Effektivität einer DC-Vakzine limitieren [Zinkernagel, 2001]. Die Kombination der DC-basierten Immuntherapie mit anderen Behandlungsstrategien wie Chemotherapie, Hemmung der COX-2 oder Bestrahlung könnte also nicht nur dazu dienen, die Tumorausbreitung lokal zu reduzieren, sondern auch die Immunresistenz der Tumorzellen zu durchbrechen.

1.4 Dendritische Zellen in der Tumortherapie

1.4.1 Aufbau einer Vakzine mit dendritischen Zellen

Bei der geringen Immunogenität von Tumoren gegenüber der physiologischen Immunantwort erscheint der Einsatz von DC als Adjuvans in der Tumortherapie sinnvoll [Schuler, 1997]. Damit soll das Ungleichgewicht zwischen der physiologischen Immunreaktion und den Immunescape-Mechanismen des Tumors zu Gunsten des Immunsystems entschieden werden. Um den immunsuppressiven Faktoren der Tumore zu entgehen, werden die DC für den immuntherapeutischen Einsatz *ex vivo* mit Antigen beladen (gepulst) und ausgereift, und dann als Vakzine für den Patienten verwendet (Abb. 6). Dabei hat sich gezeigt, dass ausgereifte gegenüber unreifen DC deutlich besser geeignet sind, eine effektive T-Zell-Reaktion zu induzieren [Jonuleit, 2001].

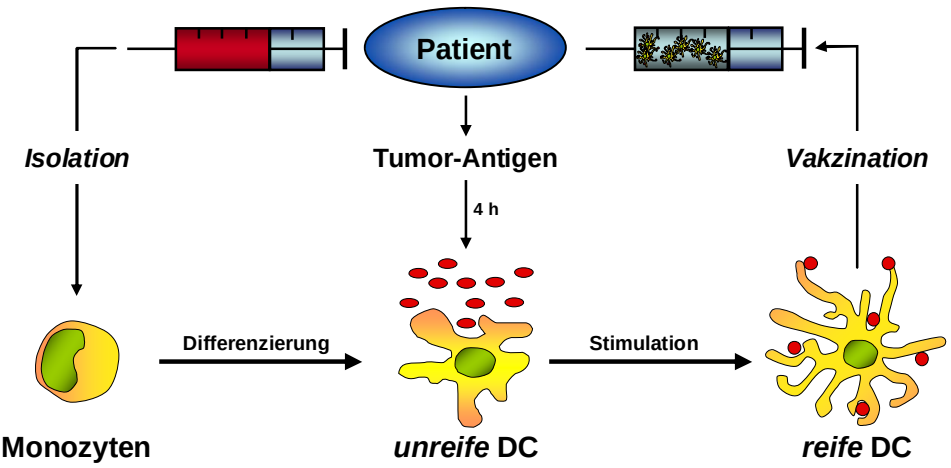

Abbildung 6: Schema einer Vakzinetherapie mit DC. Der Tumorpatient sollte - sofern möglich - zuerst einer Resektion des Tumors unterzogen werden. Dabei wird das entfernte Tumorgewebe asserviert und als spätere Antigenquelle aufbereitet. Für die Vakzine werden dem Patienten dann etwa 100 ml Blut abgenommen, aus dem die Monozyten isoliert werden können. Diese werden *in vitro* zu DC ausgereift und mit dem gewonnenen Tumorantigen beladen. Die aktivierten und beladenen DC werden schließlich dem Patienten wieder injiziert, um so eine effektive T-Zell-Antwort gegen den Tumor zu induzieren.

Für die Beladung der DC mit Antigen können unterschiedliche Ansätze gewählt werden. Eine Immunisierung mit definierten Tumorantigenen ist leider nur in seltenen Fällen möglich, da für viele Tumore bisher keine geeigneten Antigene beschrieben sind [Boon, 1994] und die Gefahr besteht, dass sich die Tumorzellen durch Mutation oder Verlust der eingesetzten Antigene dem immunologischen Angriff entziehen. Das Beladen mit Tumor-spezifischen *Peptiden*, deren Antigenität bekannt ist, bewirkt die extrazelluläre Bindung an MHC-I-Moleküle. Dieser Ansatz erfordert die genaue Beschreibung von Tumorantigenen und HLA-spezifischen (Humanes Lymphozyten Antigen) Bindungsstellen [Murphy, 1996]. Ähnliches gilt für das Pulsen mit tumorspezifischen *Proteinen*, die von den DC aufgenommen und prozessiert werden müssen. Dafür würde sich beim Pankreaskarzinom z.B. das Tumormarker-Protein CA19-9 eignen [Marten, 2000], das aber wie viele dieser Antigene nicht ausschließlich Tumorzell-spezifisch ist. Bei diesem Ansatz können zusätzlich auch noch unbekannte antigene Determinanten des Proteins über beide MHC-Moleküle präsentiert werden. Die Verwendung von *Tumorlysat* zum Pulsen der DC stellt eine so genannte polyvalente Antigenquelle dar, da sie eine weitaus größere Anzahl Tumor-spezifischer, aber auch physiologischer Antigene enthält. Dabei ist die genaue Kenntnis der einzelnen enthaltenen antigenen Determinanten nicht notwendig. Die Aufbereitung der Tumorlysate selbst ist zwar unkompliziert, erfordert aber die operative Gewinnung von Tumormaterial bzw. die Kultur autologer Tumorzellen *in vitro* [Nair, 1997]. Nachteilig

hierbei ist die mögliche Induktion einer Autoimmunität durch die Vakzinierung gegen auch physiologisch vorkommende Antigene. Außerdem gibt es die Möglichkeit *Tumor-mRNA* (oder cDNA) als Antigen-Quelle zu verwenden. Dafür reicht theoretisch die Entnahme weniger Tumorzellen, deren mRNA amplifiziert werden kann. Die RNA (DNA) wird von den DC aufgenommen, translatiert, das resultierende Protein dann prozessiert und an MHC-I-Molekülen präsentiert.

Im Vergleich zu Immuntherapien mit z.B. gentechnisch veränderten Tumorzellen sind Vakzinationen mit DC leichter durchführbar und kostengünstiger. Autologe DC können relativ einfach *ex vivo* generiert, mit Antigenen gepulst und im ausgereiften Zustand zurückgegeben werden [Gilboa, 1994]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Vakzine mit *in vitro* generierten und mit Tumor-Antigen beladenen DC *in vivo* zu CTL-Antworten gegen Tumore führt und bei einigen Tumorpatienten eine Tumorregression erzeugt werden kann [Banchereau, 2001; Fong, 2001; Nestle, 1998; Thurner, 1999]. Für das Pankreaskarzinom konnten zumindest in einem Hamster-Modell ermutigende Ergebnisse bei der Tumortherapie erzielt werden [Akiyama, 2002]. Die Applikation der DC als Vakzine kann auf verschiedenen Wegen geschehen und beeinflusst dadurch die Verteilung der DC in die lymphatischen Gewebe [Morse, 1999]. Möglichkeiten sind zum Beispiel die Injektion *intranodal* in einen Tumor-fernen Lymphknoten, *subkutan*, *intradermal*, *intravenös* oder auch *intraperitoneal*. Diese Vakzinierung sollte in regelmäßigen Abständen wiederholt werden und könnte zusätzlich auch mit einer anderen Therapie wie z.B. einer Chemotherapie kombiniert werden.

1.4.2 Kombination der Vakzine mit einer Chemotherapie

In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Injektion von DC mit einer Chemotherapie kombiniert werden kann, um so Tumore komplett zu eliminieren, die sich gegenüber einer DC- oder einer Chemotherapie alleine resistent gezeigt hatten [Shin, 2003; Tanaka, 2002; Tong, 2001]. Ein möglicher Mechanismus dafür ist die Antigenaufnahme apoptotischer Zellen durch die DC, die in Tumore von Mäusen injiziert wurden, die mit Chemotherapie vorbehandelt wurden. Dies könnte in einer verstärkten Kreuzpräsentation von Tumor-Antigenen über den MHC-I-Signalweg bei den DC und so einer vermehrten Aktivierung von Tumor-spezifischen CTL resultieren [Albert, 1998; Belz, 2002; Nowak, 2003; Schnurr, 2002]. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Chemotherapie Tumorzellen durch eine Verstärkung der Expression der Tumorantigene oder der Todesrezeptoren und eine so

erleichterte Erkennung und Lyse durch Antigen-spezifische CTL *in vitro* für die Immunantwort sensitivieren kann [Bergmann-Leitner, 2000; Bergmann-Leitner, 2001; Correale, 2003].

1.5 Zielsetzung

Das Pankreaskarzinom ist auf Grund seiner Aggressivität und seiner spät auftretenden Symptomatik einer der gastrointestinalen Tumoren mit der höchsten Letalität. Auch die palliative Chemotherapie mit Gemcitabin als aktuelle Therapie der Wahl erbringt nur bei einigen der Patienten Erfolge, die insgesamt nicht zufriedenstellend sind.

Das menschliche Immunsystem ist mit seinen spezialisierten Immunzellen durchaus in der Lage, maligne Zellen zu erkennen und zu vernichten. Eine besondere Rolle spielen dabei die DC, die als hochpotente APC eine Tumor-spezifische Immunreaktion induzieren können. Die Tumore haben jedoch Mechanismen entwickelt, sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen in dem sie z.B. lösliche Faktoren bilden, durch die Reifung und Aktivierung der DC *in vivo* gehemmt werden. Vor diesem Hintergrund sind bereits Strategien für eine Vakzinetherapie mit *in vitro* ausgereiften DC entwickelt worden, die gegen verschiedene Tumore eingesetzt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro*-Modell für eine DC-basierte Vakzine gegen Pankreaskarzinomzellen verwendet. Ziel war es, die nach einem neuen verkürzten Protokoll generierten *FastDC* anhand ihres Phänotyps, ihrer Funktion und ihrer Fähigkeit T-Zell-Antworten gegen Tumor-Antigene zu induzieren, auf ihre Einsetzbarkeit in einer Vakzine zu testen. Außerdem wurde untersucht, ob eine zusätzliche Therapie mit Gemcitabin und/oder selektiven COX-2-Hemmern die CTL-Antwort gegen Pankreaskarzinomzellen steigern könnte. Um die Verträglichkeit dieser medikamentösen Behandlung mit einer DC-basierten Immuntherapie zu bestimmen, wurden die Effekte von Gemcitabin und COX-2-Hemmern auf das Überleben, den Phänotyp und die stimulatorische Kapazität der DC und auf die Funktion von T-Zellen untersucht. Die Etablierung einer neuen Pankreaskarzinom-Zelllinie sollte es ermöglichen, die Effekte der Chemotherapie auf möglichst unveränderte Tumorzellen *in vitro* näher untersuchen zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Name	Firma
Begasungsbrutschrank	BBD 6220	Heraeus (München)
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISA-Reader	MRX	Dynatech Laboratories (Burlington, USA)
Beta-Counter	Betaplate Liquid Scintilation Beta Counter	Wallac Oy (Turku, Finnland)
Beta-Counter	1480 Wizard 3″ Gamma Counter	Wallac Oy (Turku, Finnland)
96 Well Harvester	MicroCell Harvester	Skatron (Ismaning)
Eismaschine	-	Ziegra (Isernhagen)
Flow	LaminAir® HB 2472 S	Heraeus (München)
Kamera	Nikon F-301	Nikon (Tokyo, Japan)
MACS-Gerät	MidiMACS	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss (Jena)
pH-Meter	pH 330	WTW (Weilheim)
Vortexer	Vortex VF 2	Janke & Kunkel GmbH (Staufen)
Waage	LP 6209	Sartorius (Göttingen)
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus (München)

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

2.1.2.1 Chemikalien

Name	Firma
5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Sigma (St. Louis, USA)
BD PharM Lyse™ Erythrozyten Lyse-Reagenz	Becton Dickinson (Heidelberg)
Brefeldin A	Sigma (St. Louis, USA)

Celecoxib (Celebrex®)	Pfizer (Karlsruhe)
Dimethyl-Sulphoxid (DMSO)	Sigma (St. Louis, USA)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylen-diamin-tetra-acetat (EDTA)	Sigma (St. Louis, USA)
FACSFlow, FACSRinse, FACSSafe	Becton Dickinson (Heidelberg)
FITC-Dextran	Sigma (St. Louis, USA)
Gemcitabin	Lilly (Bad Homburg)
Na-Heparin	Braun (Melsungen)
NS-398	Sigma (St. Louis, USA)
Propidiumiodid (PI)	Sigma (St. Louis, USA)
Sucrose	Merck (Darmstadt)
Szintilationsflüssigkeit für Beta-Counter "Betaplate Scint"	Wallac (Cambridge, UK)
Tetanustoxoid	Statens Serum Institute (Kopenhagen, Dänemark)
Triton-X	Merck (Darmstadt)
Trypanblau	Sigma (St. Louis, USA)

2.1.2.2 Radioaktive Chemikalien

Name	**Firma**
^{51}Chrom [$Na_2{}^{51}CrO_4$] (10 mCi/ml)	PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA)
[^{3}H]-Thymidin (1 mCi/ml)	Amersham (Freiburg)

2.1.2.3 Reagenzien-Kits

Name	**Firma**
Human IFN-ɣ ELISA	Becton Dickinson (Heidelberg)
Human IL-4 ELISA	Becton Dickinson (Heidelberg)
Human IL-10 ELISA	Becton Dickinson (Heidelberg)
Human IL-12p40/p70 ELISA	Bender MedSystems (Wien, Österreich)
Human IL-12p40 ELISA	Becton Dickinson (Heidelberg)
Human IL-12p70 ELISA	Becton Dickinson (Heidelberg)

Human TGF-β ELISA	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD45R0 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CellTiter 96® Aqueous One solution Cell Proliferation Assay	Promega (Mannheim)
Fix & Perm Zell-Permeabilisations-Kit	An der Grub (Kaumberg, Österreich)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche (Mannheim)
Human IFN-γ Development Module (ELISPOT)	R&D Systems (Wiesbaden)
Human VEGF ELISA	R&D Systems (Wiesbaden)
Pan T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

2.1.2.4 Material für die Zellkultur

Name	**Firma**
175 cm^2, 75 cm^2 Kulturflaschen	Greiner (Frickenhausen)
100 mm Kulturschalen	BD Falcon (Heidelberg)
6-, 12-, 24-, 48-, 96- Well-Rundboden-Zellkulturplatten	Greiner (Frickenhausen)
96-Well-Flachboden-Zellkulturplatten	NUNC (Wiesbaden)
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Millititer-ELISPOT-Kulturplatten	Millipore (Bedford, MA, USA)
Petri-Kulturschalen	NUNC (Wiesbaden)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius (Göttingen)
Radioaktivfilter	Wallac (Cambridge, UK)
Radioaktivfiltertüten	Wallac (Cambridge, UK)
Zellfilter 40 µm, 70 µm, 100 µm	BD Falcon (Heidelberg)
Zellschaber	Barstedt (Nümbrecht)

2.1.2.5 Zytokine und Stimulantien

Name	**Firma**
Calcium-Ionomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

GM-CSF *Leukomax*®	Novartis (Basel)
Interleukin-1β	Strathmann Biotech (Hannover)
Interleukin-2	Strathmann Biotech (Hannover)
Interleukin-4	Promega (Mannheim)
Interleukin-6	Strathmann Biotech (Hannover)
Interleukin-7	Strathmann Biotech (Hannover)
Phorbol Myristat Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phythämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Prostaglandin-E_2	Sigma (St. Louis, USA)
TNF-α	R&D Systems (Wiesbaden)

2.1.2.6 Kulturmedien, Lösungen und Puffer

Name	**Firma**
Amphotericin B (Fungizone®)	GibcoTM Invitrogen Corporation (Paisley, UK)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma (St. Louis, USA)
DMEM	PAA (Linz, Österreich)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA (Linz, Österreich)
EDTA 0,02% Lösung	Sigma (St. Louis, USA)
Ficoll Hypaque	Biochrom (Berlin)
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoTM Invitrogen Corporation (Paisley, UK)
Glukose 50%	Delta-Pharma (Pfullingen)
HEPES	Sigma (St. Louis, USA)
Humanes Serum Typ AB	BioWhittaker (Walkersville, USA)
Humanes Serum-Albumin 20% (HSA)	Bayer (Leverkusen)
L-Glutamin	PAA (Linz, Österreich)
Penicillin / Streptomycin	PAA (Linz, Österreich)
RPMI 1460 / RPMI 1460 farblos	Biochrom (Berlin)
Tween® 20	Sigma (St. Louis, USA)

2.1.3 Verwendete Kultur-Medien und Puffer

DC-Medium:	RPMI 1640 (Biochrom) + 2 % AB-Serum + 1,5 mM L-Glutamin + 100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
DC-Medium farblos:	RPMI 1640 farblos (Biochrom) + 2 % AB-Serum + 1,5 mM L-Glutamin + 100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Tumor-Medium:	RPMI 1640 (PAA) + 10 % FCS + 1,5 mM L-Glutamin + 100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
MACS-Puffer:	PBS + 0,5 % HSA + 2 mM EDTA (pH = 7,2-7,4)
DC-Kryo-Medium:	85 % AB-Serum + 10 % DMSO + 5 % Glucose
Tumor-Kryo-Medium:	Tumor-Medium + 10 % DMSO
Tumor-Transport-Medium:	DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 0,1 % Amphotericin B
Annexin-V Bindungs-Puffer:	PBS + 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4) + 140 mM NaCl + 2,5 mM $CaCl_2$
ELISPOT Wasch-Puffer:	PBS + 0,05 % Tween®20
ELISPOT Block-Puffer:	PBS + 5 % Sucrose + 1 % BSA
ELISPOT Test-Puffer:	PBS + 1 % BSA (pH 7,2–7,4)

2.1.4 Antikörper

Name	**Klon**	**Isotyp**	**Firma**
anti-HLA-DR,DP,DQ (MHC-II)	Tü 39	Maus IgG_{2a},κ	BD/Pharmingen
anti-HLA-DR	Tü 36	Maus IgG_{2a},κ	BD/Pharmingen
anti-HLA-A,B,C (MHC-I)	G46-2.6	Maus IgG_{2a},κ	BD/Pharmingen
anti-HLA-A2	BB7.2	Maus IgG_{2a},κ	BD/Pharmingen
anti-CD3	HIT3a	Maus IgG_{2a},κ	BD/Pharmingen
anti-CD4	RPA-T4	Maus IgG_{1},κ	BD/Pharmingen

anti-CD8	M-T701	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CD11c	B-ly6	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CD14	M5E2	Maus IgG_{2a},κ	BD/Pharmingen
anti-CD40	5C3	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CCR7	3D12	Ratte IgG_{2a},κ	Prof. R. Förster (Hannover)
anti-CD45R0	HIS24	Maus IgG_{2b},κ	BD/Pharmingen
anti-CD45RA	OX-33	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CD56	B159	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CD69	FN50	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CD80	L307.4	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CD83	HB15e	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-CD86	2331/FUN-1	Maus IgG_1,κ	BD/Pharmingen
anti-Cytokeratin 7,8	CAM5.2	Maus IgG_{2a},κ	BD/Pharmingen
anti-HEA	HEA125	Maus IgG_1,κ	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
anti-rat IgG_{2a} Biotin	RG7/1.30	-	BD/Pharmingen
Isotyp Maus IgG_1	MOPC21	-	BD/Pharmingen
Isotyp Maus IgG_{2a}	G155-178	-	BD/Pharmingen
MHC-I blockierender Antikörper	W6/32	Maus IgG_1	BD/Pharmingen
Streptavidin-APC	-	-	BD/Pharmingen

BD/Pharmingen : San Diego, USA.

2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:

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

2.1.6 Tetramere

Name	Peptid-Sequenz (N > C)	HLA	Herkunft
Melan-A_{26-35} A27L	ELAGIGILTV	HLA-A2	IBA GmbH (Göttingen)
Flu-MA_{58-66}	GILGFVFTL	HLA-A2	IBA GmbH (Göttingen)

2.1.7 Peptide

Als Peptid-Antigen wurden drei verschiedene HLA-A*0201-restringierte Peptide verwendet. Zum einen wurde das mit dem malignen Melanom assoziierte Differenzierungs-Antigen Melan-A/MART-1 mit der Sequenz „ELAGIGILTV“ verwendet, in dem an Position 2 im Vergleich zum physiologischen Peptid A durch L substituiert ist. Das steigert die Immunogenität des Peptids, das mit Melan-A_{26-35} A27L bezeichnet wird [Valmori, 1998]. Außerdem kamen Flu $matrix_{58-66}$ (GILGFVFTL) [Gotch, 1987], ein Peptid des Influenza Matrix-Protein, und HIV $pol_{476-484}$ (ILKEPVHGV) [Ogg, 1998], ein HIV-Protein zum Einsatz. Alle Peptide wurden mit einem *Multiple Peptide Synthesizer* (Peptide Synthesizer 433A; Applied Biosystems, Foster City, USA) durch die *core facility* des GSF Forschungszentrums München (Dr. Arnolds, München) synthetisiert. Durch HPLC-Analyse konnte die Reinheit als > 90 % bestimmt werden. Die lyophilisierten Peptide wurden bis zu ihrem Einsatz in 30 % DMSO-Lösung bei –20° C aufbewahrt. Im Folgenden werden sie mit *Mel*, *Flu* und *Pol* bezeichnet.

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	HLA-Typ	Referenz
BXPC-3	Humanes Pankreaskarzinom	HLA-$A2^+$	[Tan, 1986]
MiaPaCa-2	Humanes Pankreaskarzinom	HLA-$A2^-$	[Yunis, 1977]
PANC-1	Humanes Pankreaskarzinom	HLA-$A2^+$	[Lieber, 1975]
T2	Humane lymphoblastoide Zellen	HLA-$A2^+$	[Salter, 1985]

Alle Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur von PBMC

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37° C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem Anteil von 5 % CO_2 in Atmosphärenluft durchgeführt. Sämtliche Experimente und Zellkulturen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen unter einem *Laminar-Air-Flow* durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl vitaler Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Hierbei können lebende Zellen den Farbstoff ausschließen, tote Zellen dagegen werden blau angefärbt. Zum Test wurden 10 µl Zellsuspension in jeweils geeignetem Verhältnis (1:2 bis 1:100) mit Trypanblau verdünnt. Ein Aliquot von 10 µl dieser Mischung wurde unter ein Deckglas auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die Auszählung erfolgte dann lichtmikroskopisch innerhalb von vier Quadranten. Ein Quadrant enthält dabei 0,1 µl der Zellsuspension. Die Zellzahl der Probe errechnet sich daraus wie folgt: Mittelwert aus der Zellzahl der vier Quadranten x 10.000 x Verdünnungsfaktor = Zellzahl pro Milliliter.

2.2.2 Isolation verschiedener Zellpopulationen

2.2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation peripherer Blutleukozyten (im Folgenden als PBMC bezeichnet, *peripher blood mononuclear cells*) erfolgte über eine Dichtegradienten-Zentrifugation. Dazu wurden 200 ml mit Heparin (20 IU/ml) versetztes Vollblut von gemäß den Ethikrichtlinien ausgewählten gesunden Spendern verwandt. Das steril entnommene Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit NaCl 0,9 % verdünnt und 30 ml der Verdünnung zur Auftrennung der verschiedenen Zell-Fraktionen in einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen (*blue cap*) vorsichtig über 15 ml Biocoll (= Ficoll) aufgeschichtet, so dass zwei Phasen

entstanden. Biocoll besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1,077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichtegradienten-Zentrifugation die PBMC (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Biocoll anzureichern. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren wegen ihrer höheren Dichte in bzw. unter die Biocollschicht. Thrombozyten hingegen finden sich wegen ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Biocoll.

Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde für 20 min bei 1000g und 20° C ohne Bremse durchgeführt. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde vorsichtig - in möglichst kleinem Volumen - abpipettiert, mit NaCl 0,9 % auf 50 ml aufgefüllt und 15 min bei 520g und 20° C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen, das Zellpellet mit NaCl 0,9 % resuspendiert und jetzt bei 300g und 4° C für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt, um die PBMC von Plasmabestandteilen und Thrombozyten zu reinigen. Die so gewonnen PBMC wurden danach in frischem DC-Medium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl auf eine geeignete Zellkonzentration gebracht.

2.2.2.2 Gewinnung von aufgereinigten Monozyten über Adhärenz-Selektion

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

Die adhärente Monozytenschicht wurde zweimal durch horizontales Schwenken mit warmen PBS gewaschen, um noch hängen gebliebene Lymphozyten zu entfernen, und dann mit frischem DC-Medium über Nacht inkubiert. In dieser Zeit lösen sich die adhärenten Zellen wieder vom Boden der Kulturflasche. Am Folgetag wurden die bereits gelösten Monozyten mit einer Pipette aus der Kulturflasche in ein 50 ml Teströhrchen überführt und die restlichen, noch adhärenten Zellen in 15 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden gelöst. Nach nochmaligem Ausspülen der Kulturflasche mit PBS wurden die so angereicherten Monozyten gewaschen, in

frischem DC-Medium aufgenommen und durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit überprüft. Die Reinheit der auf diese Weise erhaltenen Monozyten war durchschnittlich größer als 90 %.

2.2.2.3 Gewinnung von aufgereinigten Monozyten über magnetische Zellseparation

Um Reinheit und Ausbeute der aus PBMC isolierten Monozyten zu erhöhen, wurde bei einigen Versuchen eine magnetische Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Sorting,* MACS) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei werden die Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel gekoppelt sind. Die aus Spenderblut bzw. *buffy coats* isolierten PBMC wurden hierfür abzentrifugiert (300g, 4° C, 10 min), das Medium dekantiert, die Zellen in 5 ml Ortholyse-Reagenz aufgenommen und für exakt 5 min inkubiert. Nach der erfolgten Lyse der noch enthaltenen Erythrozyten wurde noch einmal gewaschen, die Zellen in 30 ml MACS-Puffer aufgenommen, durch einen 40 µm Nylonfilter von Zellklumpen befreit und schließlich die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die PBMC in 80 µl MACS-Puffer pro 10 Mio Zellen resuspendiert und mit 10 µl der paramagnetischen CD14-MicroBeads pro 10 Mio Zellen für 15 min bei 4° C inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde die so markierte Zellsuspension in einer speziellen Separationssäule in ein starkes Magnetfeld eingebracht.

Durch die magnetische Markierung wurden die $CD14^+$ Monozyten beim durchlaufen durch die Separationssäule im Magnetfeld zurückgehalten, wohingegen die restlichen nicht markierten PBMC durch mehrmaliges Waschen mit MACS-Puffer aus der Säule eluiert werden konnten. Um die Monozyten zu gewinnen wurde die Säule danach aus dem Magnetfeld entfernt, so dass die Zellen nicht mehr zurückgehalten wurden, und mit Druck die so positiv selektionierten Monozyten aus der Säule gespült. Für die weiteren Versuche wurden sie dann noch einmal gewaschen und in frischem DC-Medium aufgenommen. Die Reinheit der auf diese Weise erhaltenen Monozyten war durchschnittlich größer als 95 %.

2.2.2.4 Isolation von T-Zellen über magnetische Zellseparation

Die Isolation von T-Zellen aus der nicht-adhärenten Zellfraktion der mononukleären Zellen (siehe 2.2.2.2) wurde mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurde in diesem Fall eine „negative Selektion“ durchgeführt, bei der durch zwei aufeinander folgende Markierungsschritte Zellen aller Zellpopulationen außer den T-Zellen markiert und entfernt werden. Zunächst wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen, die noch enthaltenen Erythrozyten durch osmotisch wirksamen Erythrozyten-Lysepuffer lysiert und evtl. enthaltene Zellaggregate durch Filtration durch einen 40 µm Nylonfilter entfernt. Im ersten Markierungsschritt wurden die so aufgereinigten Zellen mit 10 µl *Hapten-Antibody-Cocktail* pro 10 Mio Zellen für 10 min bei 4° C inkubiert. Dieser Cocktail enthält eine Mischung aus Hapten-gekoppelten Antikörpern gegen CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 und markiert so alle PBMC außer den T-Zellen, die dadurch über so genannte Negativ-Selektion gewonnen werden können. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen im zweiten Schritt mit paramagnetisch markierten Anti-Hapten-MicroBeads für weitere 15 min bei 4° C inkubiert.

Die markierte Zellsuspension wurde anschließend auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wurde in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht und somit alle mit MicroBeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Die unmarkierten T-Zellen konnten dann durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule eluiert werden. Die so erhaltenen T-Zellen waren eine Mischung aus allen T-Zell-Subpopulationen, so genannte panT-Zellen.

Für Versuche, in denen nur naive T-Zellen verwendet werden sollten, wurden beim zweiten Markierungsschritt zu dem Anti-Hapten-Antikörper zusätzlich paramagnetische CD45R0-MicroBeads hinzugefügt. Naive T-Zellen exprimieren den Oberflächenmarker CD45RA. Während der Reifung wird dieses Antigen proteolytisch umgebaut und erscheint auf reifen T-Zellen als CD45R0. Durch die magnetische Markierung der CD45R0 positiven reifen T-Zellen konnten in der Separation der Zellen im Magnetfeld die naiven CD45RA T-Zellen durch Negativ-Selektion gewonnen werden. Die durchflusszytometrisch festgestellte Reinheit der auf diese Art und Weise erhaltenen T-Zellen war durchschnittlich größer als 95 %.

2.2.3 Zellkultur mit dendritischen Zellen

2.2.3.1 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen in 48 Stunden

Für die Versuche mit DC wurde das in unserem Labor etablierte Modell zur Generation von DC in 48 h verwendet [Dauer, 2003]. Um aus aufgereinigten Monozyten *FastDC* zu generieren, wurden die Zellen in DC-Medium in 6-Well-Zellkulturplatten in einer Konzentration von 1 Mio/ml kultiviert. Die Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen wurde dann durch Zugabe von 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 iniziiert [Romani, 1994]. Nach 24 h Inkubation wurden die unreifen dendritischen Zellen durch Zugabe von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen stimuliert. Zur Stimulation wurde im Regelfall eine Kombination aus 10 ng/ml IL-1β, 1000 U/ml TNF-α und 1 µM PGE_2 eingesetzt [Jonuleit, 1997]. Nach weiteren 24 h - also insgesamt 48 h - Zellkultur wurde aus den 6-Well-Zellkulturplatten das Medium abgenommen und für spätere Zytokin-Untersuchungen bei -20° C eingefroren und die jetzt ausdifferenzierten dendritischen Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst. Nach zweimaligem Spülen der Kulturplatte mit PBS wurden die geernteten Zellen abzentrifugiert und in frischem Zytokin-freiem DC-Medium aufgenommen.

2.2.3.2 Antigen-Beladung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Für die Induktion Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten wurden die *FastDC* während ihrer Ausreifung mit den jeweils benötigten Antigenen beladen. Bei der Verwendung von Tumorlysat als Antigenquelle wurden dafür zu Beginn der 48 h DC-Kultur 50-100 µg/ml Lysat zugegeben. So konnten die Monozyten bzw. später differenzierten unreifen DC im Laufe ihrer Reifung zu *FastDC* das Tumorantigen aufnehmen. Da das Lysat der Tumorzellen die potentiellen Antigene in Proteinform enthält, muss es von den DC aufgenommen und prozessiert, d.h. die Proteine in geeignete Peptide zerlegt werden, die dann an der Zelloberfläche präsentiert werden können. Für die Beladung der DC mit Peptid-Antigenen ist keine aktive Antigenaufnahme der Zellen nötig. Die spezifisch hergestellten Peptide können sich direkt von außen in freien MHC-Molekülen der DC anlagern. Deshalb wurden in den jeweiligen Bedingungen 10 µM Melan-A- (Mel), 0,5 µM Influenza- (Flu) oder 10 µM HIV-Peptid (Pol) nur für die letzten 4 Stunden der DC-Ausreifung dazugegeben. Der Antigen-Überschuss wurde nach der

Ernte der so ausgereiften und Antigen-beladenen *FastDC* durch Waschschritte entfernt.

2.2.3.3 Zytokinfreie Kultur dendritischer Zellen („wash-out"-Test)

Um die ausgereiften *FastDC* in Hinsicht auf die Stabilität der erreichten Differenzierung zu untersuchen, wurde ein so genannter „*wash-out"*-Test durchgeführt [Feuerstein, 2000; Romani, 1996; Thurner, 1999]. Dafür wurden die für 48 h ausgereiften *FastDC* geerntet und intensiv gewaschen, um ihnen die stimulatorischen Zytokine und Wachstumsfaktoren zu entziehen. Nach diesem *wash-out* wurden die *FastDC* in einer Konzentration von 1 Mio/ml in frischem DC-Medium ohne jeglichen Zusatz von Zytokinen bei 37° C im Brutschrank weiterkultiviert. Die so kultivierten Zellen wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe durchflusszytometrischer Bestimmungen des Phänotyps und Messung des Zytokin-Profils mittels ELISA auf ihren Differenzierungsgrad untersucht.

Bei der Untersuchung der Empfindlichkeit des Aktivierungszustandes ausgereifter *FastDC* gegenüber einer pharmakologischen Behandlung wurden die jeweiligen Substanzen direkt nach dem Auswaschen der Zellen in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und bis zum Messzeitpunkt in der Zytokin-freien Kultur belassen.

2.2.3.4 Langzeit-Kokultur von dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen

Um *in vitro* mit DC eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort zu induzieren, wurde eine Kokultur aus *FastDC* und T-Zellen angelegt. Die Kokultur von reifen und Antigen-beladenen *FastDC* mit aufgereinigten autologen T-Zellen fand in 3 ml DC-Medium in 12-Well-Zellkulturplatten statt. Die *FastDC* wurden dabei sowohl zu Beginn der Kokultur als auch bei jeder Restimulation im Verhältnis von 1:10 zu den T-Zellen eingesetzt, meist etwa 3-5 x 10^5 *FastDC* zusammen mit 3-5 x 10^6 autologen T-Zellen. Um die Proliferation der induzierten spezifischen T-Zellen zu unterstützen wurden 25 U/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-7 als T-Zell-Wachstumsfaktoren zugegeben. Spätestens alle 72 h wurde die Hälfte des Kokultur-Mediums durch frisches DC-Medium mit IL-2 und IL-7 in gleicher Konzentration ersetzt. Die Kokultur wurde außerdem zweimal in wöchentlichem Abstand mit jeweils frisch generierten, ausgereiften und Antigen-

beladenen *FastDC* der gleichen Spender restimuliert. So bekamen die T-Zellen insgesamt jeweils dreimal das selbe Antigen präsentiert (siehe auch Abb. 7).

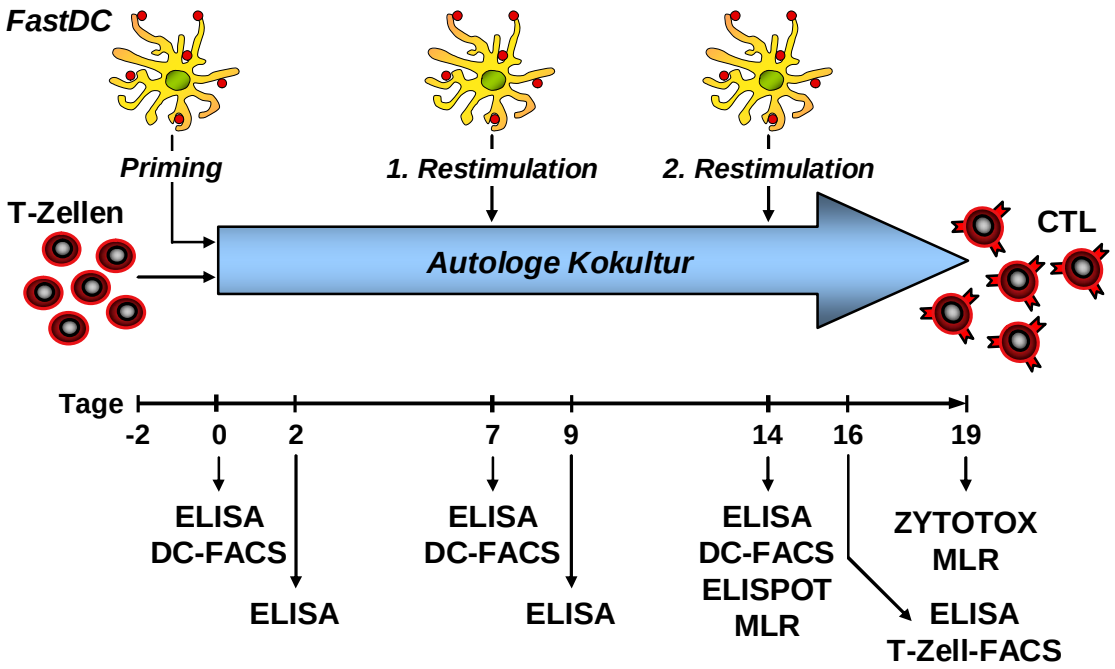

Abbildung 7: Versuchsaufbau der autologen Kokultur mit *FastDC* und T-Zellen. Antigen-beladene und ausgereifte *FastDC* und autologe T-Zellen werden kokultiviert. Die Kokultur wird wöchentlich mit frischen *FastDC* restimuliert um Antigen-spezifische CTL zu erhalten. Die Zeitachse zeigt den Verlauf der Kultur und die jeweils durchgeführten Analysen und Tests zur Charakterisierung der erzielten Reaktionen.

2.2.4 Arbeiten mit den verschiedenen Zelllinien

2.2.4.1 Zellkultur der Zelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 25-75 ml Kulturflaschen in Tumor-Medium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder Verunreinigung untersucht. Die Pankreaszelllinien BXPC-3, MiaPaCa-2 und PANC-1 zeigten dabei strikt adhärentes und konfluierendes Wachstum am Boden der Kulturflaschen. Das Medium wurde ihrem Wachstum entsprechend alle 2 bis 3 Tage dekantiert und durch frisches substituiert. Bei voller Konfluenz der Tumorzellen am Flaschenboden wurden die Zellen geerntet und gesplittet. Zur Zellernte wurden die adhärenten Zellen mit 10 ml eiskalter 0,02%iger EDTA-Lösung überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert. EDTA bindet dabei die Calcium-Ionen, die für die Zelladhäsion benötigt

werden und die Zellen lassen sich dann durch einfaches Schütteln der Kulturflasche ablösen. Die so gewonnenen Zellen wurden durch Zentrifugation (400g, 10 min, 4° C) gewaschen, in frischem Tumor-Medium resuspendiert und in 3 bis 5 Fraktionen wieder in Kultur gebracht. Die permanenten Zelllinien wurden so ca. zweimal pro Woche gesplittet. Mit den T2-Zellen wurde im Prinzip genauso verfahren, wobei sie ohne eine Behandlung mit EDTA aus den Kulturflaschen entfernt werden konnten, da sie nicht adhärent wachsen. In sämtlichen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen. Dazu wurden die Zellen zur Überprüfung an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Oberschleißheim) gesendet.

2.2.4.2 Herstellung von Tumorlysat als Antigenquelle

Die Herstellung von Tumorlysat aus PANC-1 Zellen geschah gemäß einer in unserem Labor etablierten Methode [Schnurr, 2001]. Nach dem Ernten der adhärent wachsenden PANC-1 Zellen (wie in 2.2.4.1 beschrieben) wurden die Tumorzellen in einer Konzentration von 5 Mio/ml in serumfreiem Tumor-Medium aufgenommen und sofort bei -80° C tiefgefroren. Die tiefgefrorene Probe wurde darauf hin bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und diese Frier-Tau-Zyklen insgesamt 5-mal hintereinander durchgeführt. Die Kristallbildung innerhalb der Zellen zerstört dabei die Plasmamembran und führt so zur Lyse der Zellen. Der grobe Zelldebris wurde anschließend durch Zentrifugation mit 300g für 10 min pelletiert und der Überstand über einen Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) filtriert. So erhielt man ein Tumorlysat aus reinem Tumor-Protein, das als Antigenquelle diente. Die jeweils enthaltene Proteinkonzentration wurde mittels einer Bradford-Proteinmessung bestimmt.

2.2.4.3 Etablierung einer neuen Pankreaskarzinom-Zelllinie

Für die nähere Charakterisierung und den experimentellen Einsatz von primären Tumorzellen des Pankreaskarzinoms wurde eine neue Pankreaskarzinomzelllinie etabliert. Dafür wurde im Rahmen einer an der Medizinischen Klinik Innenstadt gemäß den Ethikrichtlinien durchgeführten klinischen Studie zur Behandlung des Pankreaskarzinoms mit DC ein Operationsresektat bei einer Duodenopankreatektomie nach Whipple gewonnen. Um es für die spätere Zellkultur keimfrei zu halten, wurde es bereits im Operationssaal in ein steriles Transportgefäß überführt. Das Resektat wurde

sofort danach von einem erfahrenen Pathologen in Augenschein genommen und ein makroskopisch als Tumorgewebe erscheinendes Stück für die weitere Aufbereitung unter sterilen Bedingungen in Tumor-Transportmedium überführt. Das Gewebe wurde später auch histologisch als duktales Adenokarzinom des exokrinen Pankreas identifiziert.

Zur Reinigung wurde die Gewebsprobe in einer 100 mm Kulturschale mehrmals mit PBS gewaschen und das umgebende Bindegewebe, Fett und größere Blutgefäße wurden mit einem Skalpell vom makroskopisch erkennbaren Tumorgewebe entfernt. Um eine Einzelzellsuspension zu gewinnen, wurde das übrige Gewebsstück dann in Tumortransport-Medium aufgenommen und mit einem Skalpell sorgfältig die Gewebsoberfläche abgeschabt um möglichst einzelne Tumorzellen aus dem Gewebsverband auszulösen [Torres, 1995]. Das verbleibende Restgewebe wurde mit Hilfe eines Skalpells bis auf etwa 1 mm^3 große Fragmente zerkleinert. Alle größeren makroskopisch gut erkennbaren Gewebsstücke wurden schließlich entfernt, das Medium mit der Zellsuspension in ein Teströhrchen überführt und die Kulturschale zweimal mit PBS gespült um möglichst alle Zellen zu gewinnen. Die gesamte Suspension wurde über einen 70 µm-Filter filtriert, um restliche Zellfragmente zu entfernen und durch Zentrifugation für 10 min bei 400g und 4° C noch einmal gewaschen.

Das entstandene Pellet wurde in 20 ml Tumor-Medium resuspendiert, in 75 cm^2 Kulturflaschen überführt und bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Zellwachstum und Morphologie der Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch analysiert und alle drei Tage wurde die Hälfte des Kultur-Mediums durch frisches ersetzt. Nach drei Wochen Kultur war der Boden der Kulturflasche mit meist konfluierenden Zellkolonien bedeckt, die daraufhin wie in 2.2.4.1 beschrieben geerntet und in einer 175 cm^2 Kulturflasche in Tumor-Medium wieder ausgesät wurden. Die Kultur wurde dann immer bei totaler Konfluenz der Zellen geerntet und im Verhältnis von 1 zu 3-5 weiter kultiviert. Die Tumorzellen wurden so mit bis zu drei Passagen in der Woche expandiert. Die in den Versuchen verwendeten Tumorzellen haben, wenn nicht anders bezeichnet, mehr als 20 solcher Passagen durchlaufen.

2.3 Analyseverfahren

2.3.1 Lichtmikroskopie

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

2.3.2 Photographien

Alle bei der Licht- bzw. Elektronenmikroskopie von Zellen und Zellkulturen entstandenen Photos wurden eingescannt (Scanner Snapscan e50, AGFA, Köln) und mit Hilfe der Adobe Photoshop® Software (Adobe Systems, Mountain View, CA; Version 3.0) bearbeitet.

2.3.3 Sandwich Enzyme-linked Immmunosorbent Assay

Zum Nachweis löslicher Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein ultrasensitiver S*andwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Dafür wurden zellfreie Kulturüberstände abgenommen, bei Bedarf entsprechend vorverdünnt und in 96-Well-Flachbodenplatten gegeben, die zuvor mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichtet wurden, der fest an der Plastikoberfläche bindet. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an den Antikörper. Nach drei Waschschritten, durch die alles nicht gebundene Protein wieder entfernt wird, wird ein zweiter Biotin-gekoppelter Antikörper zugegeben, der an das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 min folgt ein weiterer Waschschritt. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch Ausbildung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht.

Nach Entfernung des überschüssigen Konjugates durch einen weiteren Waschschritt, gibt man die Substratlösung hinzu, die durch die gebundene Meerettich-Peroxidase zu einer Farbreaktion führt. Die Farbintensität ist hierbei proportional zur eingesetzten Protein-Konzentration der Probe und kann photometrisch mittels eines ELISA-Readers abgelesen werden. Durch eine Standardreihe aus bekannten Konzentrationen des gesuchten Proteins besteht die Möglichkeit die genaue in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen. Durch die Verwendung dieses „Sandwich-Systems“ mit zwei Protein-spezifischen Antikörpern, die über verschiedene Epitope an das Protein binden, wird das Risiko der Kreuzreaktivität minimiert und damit eine möglichst spezifische Aussage über die Konzentration ermöglicht. Für die Durchführung der ELISA-Analysen wurden kommerzielle Reagenziensätze nach dem jeweiligen Hersteller-Protokoll verwendet.

2.3.4 Enzyme-linked Immunospot Assay

Der ELISPOT-Test (*Enzyme-linked Immunospot Assay)* wurde vor ca. 15 Jahren als Variante des ELISA entwickelt und macht es möglich die Zytokin-Produktion von einzelnen Zellen zu visualisieren [Czerkinsky, 1988]. Im Gegensatz zum ELISA, für den nur zellfreie Kulturüberstände verwendet werden und der nur eine Aussage zur gesamten Protein-Konzentration liefert, werden im ELISPOT die Protein produzierenden Zellen selbst eingesetzt und lassen so einen Schluss auf die Frequenz der Protein-spezifischen Zellen zu.

Um mit dem ELISPOT die Frequenz IFN-γ-produzierender T-Zellen zu bestimmen wurden 96-Well Nitrozellulose-Platten über Nacht bei 4° C mit 100 µl von einem IFN-γ-Antiköper beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit ELISPOT-Waschpuffer gewaschen und die unbeschichteten Stellen für 2 h bei 37° C mit 200 µl Block-Puffer pro Well blockiert. Die T-Zellen wurden separat in einer andern 96-Well-Platte mit APC (*FastDC*, T2-Zellen oder Tumorzellen) in einem Verhältnis von 10:1 gemischt und dann unverzüglich in Triplikaten in den ELISPOT-Platten ausplattiert. Dabei wurden die T-Zell-Konzentrationen von 10-50 x 10^3 Zellen pro Well eingesetzt. Bei der folgenden Inkubation für 18 h bei 37° C wurden die ELISPOT-Platten mit einem 13 x 16 cm Stück handelsüblicher Alu-Folie eingeschlagen um Hintergrund-Effekte zu minimieren [Kalyuzhny, 2001]. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen durch viermaliges Waschen aus den Wells entfernt und 100 µl eines zweiten Biotin-gekoppelten IFN-γ-Antiköpers dazugegeben.

Nach 24 h Inkubation bei 4° C wurden die Platten wieder viermal gewaschen und dann noch für 2 h bei Raumtemperatur mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat beschichtet. Einem weiteren Waschschritt folgte dann für die Farbreaktion die Zugabe von 100 µl der Substrat-Lösung (BCIP/NBT-Chromogen) pro Well. Unter Lichtausschluss wurden die Platten für 30 min bei Raumtemperatur belassen und die Farbreaktion dann durch Waschen der Platten unter fließendem Wasser abgestoppt. Die feuchten Platten wurden für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Das abschließende Auszählen der Spots wurde entweder lichtmikroskopisch oder mit Hilfe eines automatischen ELISPOT-Readers vorgenommen. Als Kontrollen für die Hintergrund-Effekte wurden jeweils T-Zellen alleine ohne jeglichen Stimulus und als Kontrolle für die Maximalreaktion T-Zellen mit PMA/Ionomycin in Triplikaten angesetzt. Für die ELISPOT-Analysen wurde ein kommerzieller Reagenziensatz nach dem Protokoll des Herstellers verwandt.

2.3.5 Durchflusszytometrie

2.3.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *fluorescence-activated cell sorter* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihrer Größe und Zellstruktur voneinander zu unterscheiden und die verschiedenen Zellpopulationen auf die qualitative und quantitative Expression von Oberflächenantigenen zu untersuchen. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen in einer Kapillare mit einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl (Argon, λ= 488 nm) geführt. Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) Linse gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird wesentlich durch die Größe, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität der Zellen bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation kann anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden.

Dazu werden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die entsprechenden Oberflächenantigene markiert. Der Laserstrahl regt das Chromophor, der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die

durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle binden. Beim Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten primären Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist.

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

2.3.5.2 Lifegate-Analyse

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

2.3.5.3 FACS-Analyse von Oberflächenmolekülen

Für die FACS-Analyse von Oberflächenmolekülen wurden ca. 1-5 x 10^5 Zellen direkt in 200 µl Medium in ein FACS-Röhrchen überführt oder gegebenenfalls noch einmal abzentrifugiert, dekantiert und dann in 200 µl PBS plus 3 % FCS resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15-30 min bei 4° C unter Lichtausschluss mit FITC-, PE-, PerCP- oder APC-gekoppelten (siehe 2.1.5) Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wurde anschließend der Inkubationsschritt, diesmal mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Isotyp-spezifischen Antikörper wiederholt.

Für die Färbung mit Anti-CCR7 wurde eine dreifache indirekte Fluoreszenz eingesetzt. Dafür wurde im ersten Schritt ein CCR7-spezifischer nicht fluoreszierender Ratten-Antikörper, im zweiten Schritt ein Biotin-gekoppelter Isotyp-spezifischer Anti-Ratte-Antikörper und im dritten Schritt dann ein fluoreszierendes Streptavidin-APC-Konjugat, das an Biotin bindet, verwendet. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde immer auf einem FACS-Calibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

2.3.5.4 FACS-Analyse von intrazellulären Molekülen

Zur durchflusszytometrischen Darstellung intrazellulärer Moleküle war es notwendig die Zellmembran für den Durchtritt der Antikörper zu permeabilisieren. Um die Zellintegrität während des Permeabilisierungsvorgangs zu erhalten, werden die Zellen dafür zunächst fixiert. Nach einer eventuellen konventionellen Färbung der Oberflächenmoleküle wurden die Zellen mit 100 µl Paraformaldehyd (Lösung A, Fix & Perm-Reagenz) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 100 µl Saponin-haltiger Lösung (Lösung B, Fix & Perm-Reagenz) für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und der entsprechende Fluoreszenz-Antikörper für die intrazelluläre Färbung hinzugegeben. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und dann wie bereits beschrieben analysiert.

2.3.5.5 FACS-Analyse von Zell-Apoptose

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

Propidium-Iodid dagegen kann erst in einer späten Phase der Apoptose die Zellen anfärben, da es nur beschädigte Zellmembranen passieren kann. Dort färbt es dann durch Interkalierung die DNS im Zellkern. In der frühen Apoptose erscheinen die Zellen also auf Grund der noch intakten Zellmembran lediglich Annexin-V-FITC positiv, wohingegen sie im Verlauf der Apoptose in Richtung Zelluntergang zusätzlich PI positiv werden. Diese charakteristische Kinetik kann mit Hilfe der FACS-Analyse nachvollzogen werden. Dafür wurden die Zellen wie in 2.3.5.3 beschrieben mit Annexin-V gefärbt, wobei alle Schritte in *Annexin-V-Binding-Buffer* stattfanden, der ein besonders Calcium-reiches Milieu für die Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserin schafft. Propidium-Iodid wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml unmittelbar vor der FACS-Analyse zugegeben [Martin, 1995; Reutelingsperger, 1997].

2.3.5.6 FACS-Analyse der Antigen-Aufnahme von *FastDC*

Um *FastDC* auf ihre Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme zu untersuchen wurde als Modell die Aufnahme von löslichem FITC-Dextran im FACS analysiert. FITC-Dextran ist ein Zuckermolekül, das für die FACS-Analyse mit FITC Fluoreszenz-markiert ist und von den *FastDC* durch Endozytose aufgenommen wird. Dafür wurden *FastDC* für 2 h mit 0,5 mg/ml FITC-Dextran entweder bei 37° C im Brutschrank oder auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und dann im FACS analysiert. Dabei dienten die auf Eis inkubierten Zellen als Kontrolle für die unspezifische Bindung von FITC-Dextran an die Zelloberfläche der *FastDC*.

2.3.5.7 Identifizierung HLA-A2 positiver Zellen

Für die Versuche zur Charakterisierung der Immunantwort gegen die HLA-$A2^+$ Pankreaszelllinien wurden geeignete Spender-Zellen der selben HLA-Klasse benötigt. Die Typisierung der freiwilligen Probanden für die Blutspenden erfolgte dabei durchflusszytometrisch mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Antikörpers gegen das HLA-A2 Oberflächenmolekül. Dafür wurden PBMC nach dem unter 2.3.5.3 beschriebenen Verfahren angefärbt und analysiert. Als Kontrolle dienten dabei Spender mit bekanntem HLA-A2-Typus.

2.3.5.8 Tetramer-Analysen (MHC-I/Peptid-Komplexe)

Mittels der Tetramer-Analyse können T-Zellen, die einen spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren, durchflusszytometrisch erkannt werden. Die Aminosäuren des Epitops und der HLA-Typ müssen dafür bekannt sein. Tetramere bestehen aus vier identischen Biotin-gekoppelten MHC-I-Molekülen, die durch ein fluoreszenz-markiertes Streptavidin-Molekül verbunden sind. Die MHC-I-Moleküle können dabei mit verschiedenen bekannten Peptiden beladen werden. So lässt sich über die Bindung der MHC-I/Peptid-Komplexe an den dazu spezifischen T-Zell-Rezeptor die Subpopulation Peptid-spezifischer T-Zellen in einer T-Zellpopulation durchflusszytometrisch darstellen. Durch zusätzliche Färbung von Oberflächenmolekülen kann so z.B. die Frequenz Antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen in PBMC bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen zuerst für 30-45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit 0,3 µl der verschiedenen Tetramere inkubiert, gründlich gewaschen und dann wie unter 2.3.5.3 beschrieben die Oberflächenmoleküle angefärbt. Bei der Analyse diente jeweils ein HLA-$A2^-$ Spender als Kontrolle für die unspezifische Bindung der Tetramere.

2.3.6 [^{3}H]-Thymidin-Proliferationstest

Zum Nachweis der Proliferation von T-Zellen wurde ein [^{3}H]-Thymidin-Proliferationstest durchgeführt. Dabei wird zu den Zellen, deren Proliferation untersucht werden soll, mit radioaktivem Tritium markiertes Thymidin gegeben. Die Zellen nehmen dieses auf und bauen es bei der DNS-Neusynthese in gleichem Maße wie das physiologische

unmarkierte Thymidin in die DNS ein. Der Einbau ist dabei abhängig von der DNS-Syntheserate und dient damit als Marker für die Proliferation. Der Vorteil gegenüber anderen Messmethoden besteht hierbei darin, dass die Proliferation in einem sehr frühen Stadium gemessen wird, in dem sich die Zellen noch nicht vollständig dupliziert haben müssen.

Um die Abhängigkeit der T-Zell-Proliferation von der Aktivierung und Stimulation durch *FastDC* zu untersuchen, wurde eine sog. *mixed lymphocyte reaction* (MLR), eine Kultur in der die verschiedenen Lymphozytenpopulationen (*FastDC* und T-Zellen) gemischt werden, angesetzt. Dazu wurden die T-Zellen 7 Tage nach der 1. Restimulation aus der Langzeit-Kokultur geerntet (siehe 2.2.3.3, Abb. 7), gewaschen und in DC-Medium auf eine geeignete Zellkonzentration eingestellt. Die 2. Restimulation mit frisch isolierten, ausgereiften und Antigen-beladenen *FastDC* wurde in einer 96-Well-Rundbodenplatte durchgeführt. Dabei wurden die *FastDC* mit den T-Zellen in verschiedenen Verhältnissen von 1:20 bis 1:360 in 200 µl Medium in Quadruplikaten ausplattiert. Zusätzlich wurde als Kontrolle ein Quadruplikat mit T-Zellen ohne *FastDC* angelegt. Die so entstandene MLR wurde für 48 h bei 37° C im Brutschrank kultiviert, dann wurde in alle Wells 20 µl [^{3}H]-Thymidin (1 µCi pro Well) dazugegeben und eine weitere 18 h Inkubation angeschlossen. In dieser Zeit bauen die Zellen das radioaktive Thymidin in ihre DNS ein. Ein Einbau in die Antigen-präsentierenden Zellen, der durch vorherige Bestrahlung der Zellen ausgeschlossen werden kann, spielt hier keine wesentliche Rolle, da die verwendeten DC ausdifferenzierte Zellen sind, die nicht mehr proliferieren. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkulturen mit Hilfe eines *96 MicroCell Harvesters* geerntet, auf Filtermatten transferiert und das nicht inkorporierte Thymidin abgewaschen. Nach einer mehrstündigen Trocknung wurden die Filter in eine Plastiktasche eingeschweißt und mit Szintillationsflüssigkeit imprägniert, die die relativ schwache β-Strahlung in Szintillationen umwandelt und damit messbar macht. Danach konnte die Radioaktivität der Filter in einem Szintillationszähler in Szintillationen pro Minute (*cpm, counts per minute*) bestimmt werden. Die Proliferationsrate der T-Zellen nach Aktivierung durch *FastDC* konnte so anhand der gemessenen cpm quantifiziert und verglichen werden.

2.3.7 Test der Zell-vermittelten Zytotoxizität (^{51}Chrom-Lyse-Test)

Der ^{51}Chrom-Lyse-Test stellt eine quantitative Methode dar, mit der die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen wie z.B. zytotoxischen T-Zellen (CTL) gegenüber mit

^{51}Chrom markierten Zielzellen (*targets*) ermittelt wird. Dazu werden Zielzellen in ^{51}Chromat^{6+} inkubiert, wobei die Zielzellen das ^{51}Chromat^{6+} aufnehmen und zu ^{51}Chromat^{3+} reduzieren. Das reduzierte ^{51}Chromat^{3+} wird von intakten Zellen kaum wieder freigesetzt und kann von anderen Zellen nicht aufgenommen werden. Werden die Zielzellen dann aber mit den Effektorzellen koinkubiert, wird durch Zytolyse das radioaktive ^{51}Chrom aus den Zielzellen in den Kultur-Überstand freigesetzt und kann in diesem mit Hilfe eines γ-Strahlen-Zählers gemessen werden. Da sich die Menge des freigesetzten ^{51}Chroms proportional zur Zytolyse der Zielzellen verhält, lässt sich so auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen schließen.

Zur Durchführung des Tests wurden die Zielzellen in einem 15 ml Teströhrchen abzentrifugiert, in 100 µl AB-Serum resuspendiert und 1 h bei 37° C mit $Na_2{}^{51}CrO_4$ (100 µCi pro 10^6 Zellen) unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit DC-Medium wurden je 3-5 x 10^3 Zielzellen pro Well in einer 96-Well Rundboden-Platte in Triplikaten in einem Gesamtvolumen von 200 µl auf die vorher ebenfalls gewaschenen Effektorzellen pipettiert. Dabei wurden die Effektorzellen in den jeweils angegebenen Verhältnissen (E:T Ratio) mit den Zielzellen gemischt. Nach 4 h Inkubation bei 37° C wurden jeweils 50 µl Überstand pro Well in Szintillationsröhrchen übertragen und in einem γ-Strahlen-Zähler die radioaktiven Zerfälle über 1 min (cpm, *counts per minute*) gemessen. Für jede verwendete Zielzelllinie wurde außerdem als Kontrolle die spontane Freisetzung durch Inkubation der Zielzellen ohne Effektorzellen und die maximale Freisetzung von ^{51}Chrom durch Inkubation der Zielzellen mit dem Detergenz Triton-X, das die Phospholipidmembran der Zellen auflöst, bestimmt. Die Kontrollbedingungen wurden dabei in jeweils fünf gleichen Wells angesetzt. Alle Lyse-Tests wurden in DC-Medium durchgeführt. Die Auswertung erfolgte computergestützt mit Hilfe einer selbst entwickelten Microsoft-Excel® Tabellen-Kalkulation. Dabei wurde die Stärke der Zytotoxizität der Effektorzellen in Prozent spezifische Lyse angegeben. Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

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

Um die MHC-Abhängigkeit der gemessenen Lyse-Raten zu untersuchen wurden die Zielzellen in einigen Experimenten vor dem Einsatz im Lyse-Test mit einem MHC-I blockierenden Antikörper in einer Endkonzentration von 10 mg/ml für 30 min inkubiert. Für die Bestimmung von pharmakologischen Effekten auf die Zielzellen wurden die Zellen bereits am Tag vor dem ^{51}Chrom-Lyse-Test geerntet und mit den jeweils

angegebenen Konzentrationen der verschiedenen pharmakologischen Substanzen in Kultur gebracht und so für 18 h über Nacht vorbehandelt. Am nächsten Tag wurden diese Zielzellen im Lyse-Test eingesetzt wie oben beschrieben.

2.3.8 Proliferations-Analyse der Tumorzellen

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

Dafür wurden die Tumorzellen geerntet wie in 2.2.4 beschrieben und daraufhin in 96-Well Kulturplatten in einer Konzentration von 10^4 Zellen pro Well in Tumor-Medium ohne Phenol-Rot ausplattiert, da Phenol-Rot mit den Messwerten der Testsubstanz interferieren würde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 20 µl der *CellTiter 96® Aqueous One Solution* Test-Lösung zu jedem Well pipettiert und die Zellen für 1-4 h bei 37° C inkubiert. Mittels eines ELISA-Readers wurde dann die Absorption bei 450 nm gemessen. Dabei wurden jeweils die Mittelwerte aus Triplikaten errechnet und die Hintergrund-Absorption abgezogen. Um die gemessenen Absorptionswerte in eine Zellzahl umrechnen zu können, wurde bei jedem Versuch mit den jeweils verwendeten Zelllinien eine Standard-Verdünnungsreihe mit bekannten Zellkonzentrationen angelegt. Mit Hilfe einer mathematischen Näherung, die mit Microsoft Excel® durchgeführt wurde, konnten so die absoluten Zellzahlen abgeschätzt werden.

2.3.9 Nachweis Tumor-spezifischer Genmutationen

Der Nachweis der Tumor-spezifischen Genmutationen in k-ras wurde in Kooperation mit Frau Dr. Török aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. C. Folwaczny (Chirurgische

Klinik und Poliklinik Innenstadt der LMU) durchgeführt. Dazu wurden die Tumorzellen aus ihrer Kultur geerntet (wie in 2.2.4.1 beschrieben) und im Folgenden die DNA aus den Zellen extrahiert. Eine Mutation im k-ras-Onkogen wurde dann mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-PCR (RFLP-PCR) dargestellt. Bei der Wildtyp-DNA liegt eine Restriktionsschnittstelle im Kodon 12 von k-ras. Liegt nun im Kodon 12 eine Mutation vor, kann das Restriktionsenzym an der mutierten Schnittstelle nicht ansetzen und es enstehen nach dem Verdau durch die Restriktionsenzyme weniger Restriktionsfragmente. Eine Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte in einer Gel-Elektrophorese zeigte dann das Vorliegen eines Wildtyp- oder mutierten k-ras an. Um die festgestellten Mutationen im Kodon 12 noch genauer darzustellen wurde die DNA im Anschluss sequenziert und die genaue Basenabfolge festgestellt.

2.3.10 Statistische Analyse

Bei den Experimenten mit Mehrfachwerten oder mehreren Spendern sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of means*, SEM) dargestellt ist. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei Werten für $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ angenommen und ist durch Markierung mit einem * bzw. zwei ** bezeichnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Alle anderen rechnerischen Auswertungen und die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

3 ERGEBNISSE

3.1 Generierung von reifen dendritischen Zellen in 48 Stunden

3.1.1 Monozyten können in 48 Stunden Kultur effektiv mit Tumor-Antigen beladen werden

Für diese Arbeit wurden ausnahmslos DC verwendet, die nach einem in unserer Arbeitsgruppe neu etablierten Protokoll generiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung, Antigenbeladung und Ausreifung von Monozyten zu reifen dendritischen Zellen innerhalb von 48 h möglich ist (*FastDC*) [Dauer, 2003]. Die nach diesem Protokoll gewonnenen *FastDC* zeigten in verschiedenen Tests eine vergleichbare Reife und Funktionalität wie solche DC, die nach einer weit verbreiteten Standardmethode über insgesamt 7 bis 8 Tage kultiviert wurden [Feuerstein, 2000; Romani, 1996] . Hierzu wurden erstmals *FastDC* mit Tumor-assoziierten Antigenen beladen und zur Induktion spezifischer T-Zell-Antworten gegen Melanom- oder Pankreaskarzinom-Antigene eingesetzt.

Aus 200 ml Spenderblut konnten durch Dichtegradientenzentrifugation die PBMC und anschließend durch Plastik-Adhärenz aus den PBMC ca. 10 bis 30 Mio Monozyten isoliert werden. Sie wurden anschließend sofort in Kultur gebracht und mit GM-CSF und IL-4 für 48 h inkubiert. Die so erzeugten unreifen Zellen zeigten gegenüber den ursprünglichen Monozyten sowohl im Lichtmikroskop als auch in der Streulichtanalyse der Durchflusszytometrie eine noch unveränderte Morphologie (Daten nicht gezeigt).

Die hervorragende Eigenschaft in der Funktion unreifer DC ist die Fähigkeit lösliche Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Diese geht mit zunehmender Reifung verloren. Die Aufnahme von löslichen Antigenen mittels Endozytose wurde beispielhaft mit dem fluoreszierenden löslichen FITC-Dextran überprüft. Dafür wurden aufgereinigte und mit GM-CSF plus IL-4 zu unreifen *FastDC* differenzierte Monozyten nach 24 bzw. 48 Stunden aus der Kultur genommen und für 2 Stunden bei 37° C mit FITC-Dextran inkubiert. Die Aufnahme des löslichen FITC-Dextran wurde dann durchflusszytometrisch überprüft. Dabei zeigten die unreifen *FastDC* nach 24 h Kultur mit GM-CSF plus IL-4 eine deutliche Aufnahme von löslichem FITC-Dextran, wobei sich bereits mehr als 50 % der Zellen anfärbten und die mittlere Fluoreszenzintensität mehr als 3-fach erhöht war. Nach 48 h Kultur waren dann mehr als 90 % der Zellen mit einer

mehr als 10-fach erhöhten mittleren Fluoreszenzintensität FITC-positiv, was die ausgeprägte Fähigkeit der *FastDC* zur Aufnahme von löslichen Antigenen demonstriert, und die Daten von Dauer et al. bestätigt (Abb. 8).

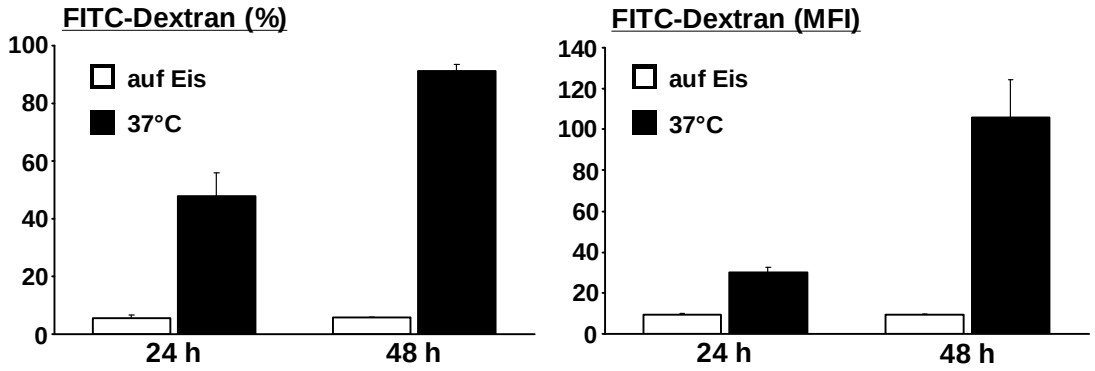

Abbildung 8: *FastDC* zeigen eine deutliche Aufnahme von Antigen in Form von löslichem FITC-Dextran. Monozyten wurden mit GM-CSF plus IL-4 kultiviert und nach 24 bzw. 48 h Differenzierung für 2 h mit löslichem FITC-Dextran inkubiert. Als Kontrolle der unspezifischen Anfärbung dienten auf Eis inkubierte DC. Die Zellen wurden gewaschen und der prozentuale Anteil und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FITC-positiven Zellen anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Hier sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten gezeigt.

3.1.2 Die Differenzierung und Ausreifung von *FastDC* wird durch die Beladung mit Tumor-assoziierten Antigenen nicht beeinflusst

Nach 24 h Kultur mit GM-CSF und IL-4 wurde die Reifung der Monozyten zusätzlich für weitere 24 h durch eine Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-1β (IL-1β), Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) und Prostaglandin-E_2 (PGE_2) unterstützt. Nach insgesamt nur 48 h Kultur zeigten die Monozyten morphologisch das typische Erscheinungsbild reifer DC (Daten nicht gezeigt). Für den Einsatz als APC wurden die *FastDC* während ihrer Ausreifung zusätzlich mit verschiedenen Tumor-Antigenpräparationen beladen. Dazu wurden die Monozyten HLA-A2-positiver Spender während der 24 h Differenzierungsphase mit GM-CSF plus IL-4 zusätzlich mit einem durch mehrere Gefrier-Tau-Zyklen gewonnenen Tumorzelllysat (hergestellt wie in 2.2.4.2 beschrieben) der ebenfalls HLA-A2-positiven Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 inkubiert. So konnten die *FastDC* im Stadium der unreifen DC das Lysat aufnehmen, prozessieren und auf der Zelloberfläche in den MHC-II- und über Kreuzpräsentation auch in den MHC-I-Komplexen präsentieren.

Alternativ wurde die Beladung der *FastDC* mit HLA-A2-restringierten Tumor-Peptid-Antigenen durch Zugabe der jeweiligen Peptide für die letzten 4 h der Ausreifungsphase mit den proinflammatorischen Zytokinen erreicht. Die Peptid-Antigene konnten so von außen die MHC-I-Komplexe (HLA-A2) der *FastDC* besetzen.

Nach 48 h Kultur wurde das Überleben und die Ausbeute der so beladenen *FastDC* mit dem Trypanblau-Ausschlusstest und der Lifegate-Analyse im Durchflusszytometer bestimmt. Um die Reifung der *FastDC* zu überprüfen, wurden die Zellen nach der Kultur mit Antikörpern gegen die jeweiligen Oberflächenmoleküle markiert und ihr Expressionsmuster im Durchflusszytometer charakterisiert. Es wurden unreife, d.h. nach der Differenzierung mit GM-CSF plus IL-4 nicht weiter stimulierte oder mit proinflammatorischen Zytokinen stimulierte und mit PANC-Lysat beladene reife *FastDC* untersucht. Die Ausbeute an lebenden *FastDC* und deren Differenzierung und Ausreifung wurde durch die Beladung mit Tumor-Antigen nicht beeinflusst. Aus den kultivierten Monozyten konnten durchschnittlich 30 bis 50 % lebende *FastDC* mit einer Reinheit von durchschnittlich größer als 95 % gewonnen werden (Daten nicht gezeigt, Abb. 9 B links).

In der Analyse der Oberflächenmarker zeigten bereits die mit GM-CSF plus IL-4 differenzierten Zellen ein Verschwinden der Expression des Monozyten-Markers CD14 und eine erhöhte Expression von CD86 und MHC-II, bei jedoch noch fehlenden Aktivierungsmarkern wie CD80 und CD83. In der Streulichtanalyse erschienen die Zellen noch in einer inhomogenen Population mit einer Reinheit < 90 %. Diese Zellen entsprechen dem Stadium von unreifen DC (Abb. 9 A). Nach 48 h Zellkultur zeigten die zusätzlich mit inflammatorischen Zytokinen stimulierten und Antigen-beladenen *FastDC* im Gegensatz zu den unreifen DC den charakteristischen Phänotyp reifer DC. Der Monozyten-Marker CD14 wurde bereits nach der Differenzierungsphase zu unreifen DC nicht mehr exprimiert, die Zellen exprimierten jetzt auch in hohem Maße die Oberflächenmarker für die DC-T-Zell-Interaktion CD40, CD80, CD86 und MHC-II, sowie den Chemokinrezeptor CCR7, der für die Einwanderung der DC in die Lymphknoten benötigt wird. Die so erzielte Ausreifung der Zellen zeigte mit einem $CD14^{-}$ $CD40^{+}CD80^{+}CD83^{+}CD86^{high}MHC\text{-}II^{high}CCR7^{+}$ Expressionsmuster das klassische Bild einer potenten DC mit der Fähigkeit zur Migration, Antigen-Präsentation und T-Zell-Aktivierung und wurde von der Beladung mit Tumorantigen nicht negativ beeinflusst (Abb. 9 B).

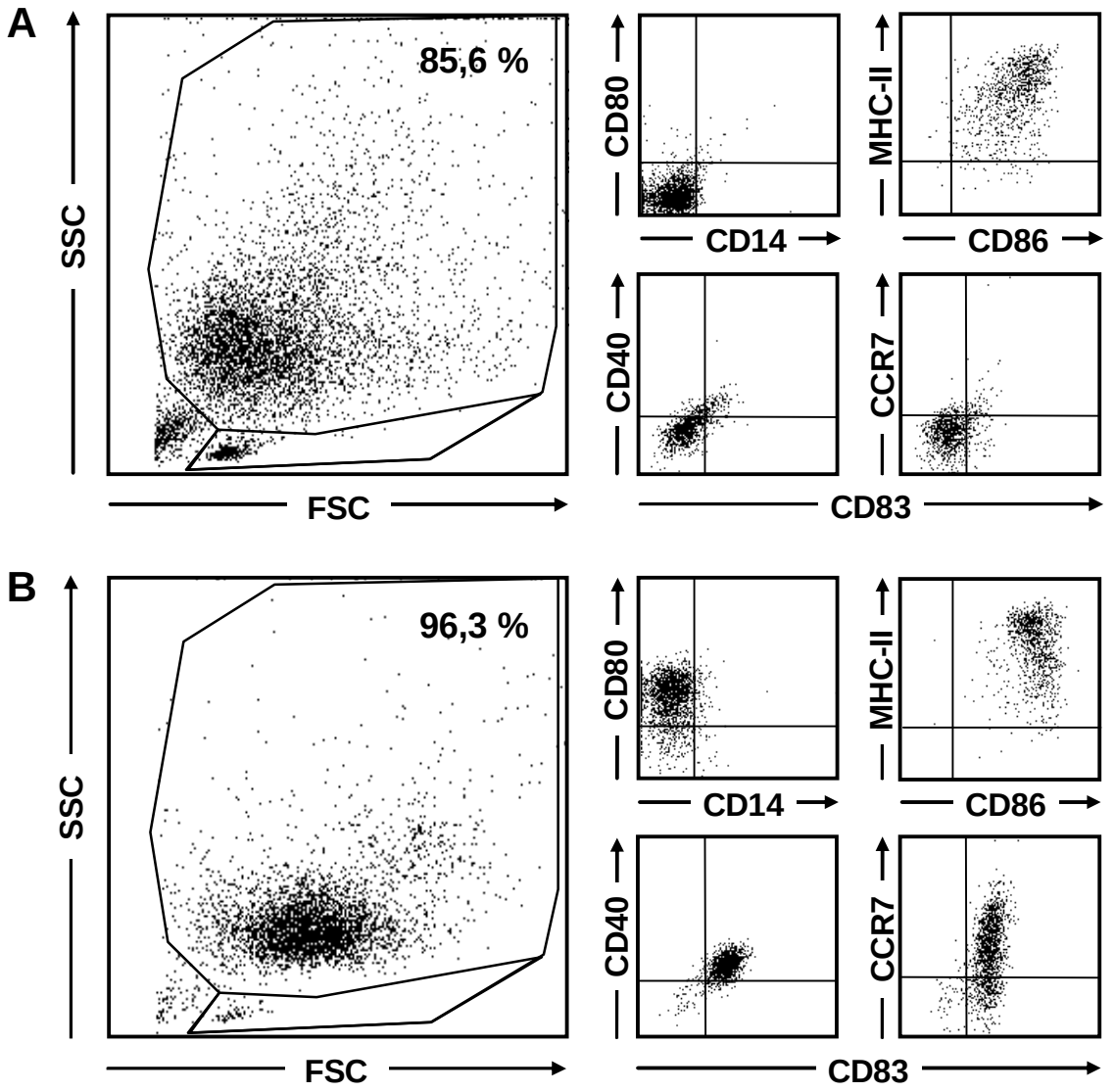

Abbildung 9: Monozyten entwickeln sich nach einer Differenzierung mit GM-CSF plus IL-4 und einer anschließenden Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β, TNF-α und PGE_2 in insgesamt nur 48 h zu reifen *FastDC*. Monozyten wurden entweder für 48 h nur mit GM-CSF plus IL-4 kultiviert (A) oder mit Tumorlysat beladen und zusätzlich in den letzten 24 h mit IL-1β, TNF-α und PGE_2 stimuliert (B). Die Aktivierung der *FastDC* wurde mit Hilfe der Expression der Oberflächenmarker im Durchflusszytometer bestimmt. Hier ist das Ergebnis der FACS-Analyse eines repräsentativen Spenders von mehr als 10 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt. FSC: Vorwärtsstreulicht, SSC: Seitwärtsstreulicht

3.1.3 Die Stimulation mit IL-1β, TNF-α und PGE_2 führt zu einer stabilen Ausreifung der *FastDC*

In den Vorarbeiten zur Etablierung des Protokolls für die Generation von *FastDC* wurde nach der Differenzierungsphase mit GM-CSF plus IL-4 zur Stimulation der Zellen eine Viererkombination aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β, IL-6, TNF-α und

PGE_2 verwendet. Dabei ergaben sich bereits Hinweise, dass zur ausreichenden Ausreifung der *FastDC* auf Interleukin-6 verzichtet werden kann [Dauer, 2003]. In dieser Arbeit wurde in der Folge nach der einfachsten und optimalen Stimulation für die Generierung von *FastDC* gesucht. Dabei zeigte sich in den vergleichenden Versuchen letztendlich die Dreierkombination aus IL-1β, TNF-α und PGE_2 ohne IL-6 der Viererkombination in der Aktivierung der *FastDC* ebenbürtig oder sogar überlegen. Die ebenfalls in diesem Rahmen untersuchten Zweierkombinationen aus IL-1β und TNF-α bzw. TNF-α und PGE_2 waren deutlich schlechter in ihrer Stimulationswirkung, wobei hierbei besonders ein Mangel in der Expression von CCR7 auffiel (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Versuche wurden auf Grund dieser Ergebnisse nur noch *FastDC* verwendet, welche mit einer Dreier-Kombination aus IL-1β, TNF-α und PGE_2 ausgereift wurden.

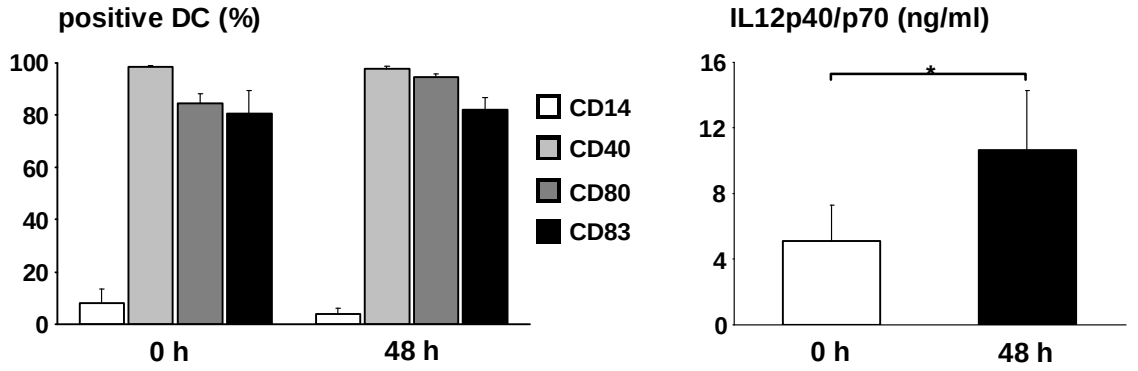

Abbildung 10: Die nach 48 h Kultur erreichte Ausreifung der *FastDC* ist in Zytokin-freiem Medium für 48 h stabil. Monozyten wurden mit Tumorlysat beladen und in 48 h mit GM-CSF/IL-4 und proinflammatorischen Zytokinen ausgereift (Zeitpunkt 0 h), gewaschen und in Zytokin-freiem Medium weitere 48 h kultiviert (Zeitpunkt 48 h). Das Reifestadium wurde an Hand der Oberflächenmarker durchflusszytometrisch und an Hand der Zytokinproduktion mittels ELISA überprüft. Hier sind Mittelwerte + SEM aus 4 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die *FastDC* sollten durch die Stimulation mit dieser Dreier-Kombination in ein ausdifferenziertes Reifestadium gelangen, das keine Rückkehr in weniger aktive oder sogar monozytäre Stadien mehr zulässt. Gerade um mit *FastDC* in einer Vakzine-Therapie bei Patienten eine suffiziente Anti-Tumorantwort induzieren zu können, ist es notwendig, dass die *FastDC* sich nach der Applikation nicht wieder in weniger differenzierte Stadien zurückentwickeln und so ihre immunstimulatorische Wirkung verlieren. Um dies sicherzustellen, wurden die *FastDC* einem „wash-out"-Versuch unterzogen. Dafür wurden *FastDC* mit Tumorlysat beladen und in 48 h Kultur mit

GM-CSF plus IL-4 und proinflammatorischen Zytokinen ausgereift. Nach 48 h Kultur wurden die Zellen von allen Stimulations-Zytokinen freigewaschen („wash-out“) und für weitere 48 h in Zytokin-freiem Medium kultiviert. Vor und nach dem „wash-out“ wurde mittels Durchflusszytometer bzw. ELISA die Reife der so ausgewaschenen *FastDC* überprüft. Die mit der Dreierkombination ausgereiften *FastDC* zeigten hierbei eine sehr gute Ausreifung, die auch im „wash-out“-Versuch stabil blieb.
Das nach 48 h primärer Kultur bestehende Oberflächenmarkerprofil der reifen $CD14^{-}CD40^{+}CD80^{+}CD83^{+}CD86^{high}$HLA-$DR^{high}$ *FastDC* war nach der Zytokin-freien 48-h-Kultur praktisch unverändert. Die schon primär starke Produktion von IL-12p40/p70 stieg im Verlauf noch signifikant auf mehr als das doppelte an (Abb. 10).

3.2 Induktion von aktivierten T-Zellen durch Antigen-beladene *FastDC*

3.2.1 In der Kokultur führen *FastDC* zur Aktivierung der T-Zellen

Um Tumor-spezifische und aktivierte CTL zu induzieren, ist ein direkter Kontakt zwischen reifen Antigen-beladenen DC und aktivierbaren T-Zellen notwendig. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die ausgereiften *FastDC* die notwendigen Rezeptoren/Liganden zur Aktivierung von T-Zellen wie MHC-Komplexe oder auch Oberflächenmoleküle wie CD40, CD80 und CD86 exprimieren. Ob diese *FastDC* jedoch tatsächlich zur komplexen Interaktion mit $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen und zu deren Antigen-spezifischer Aktivierung fähig sind, wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

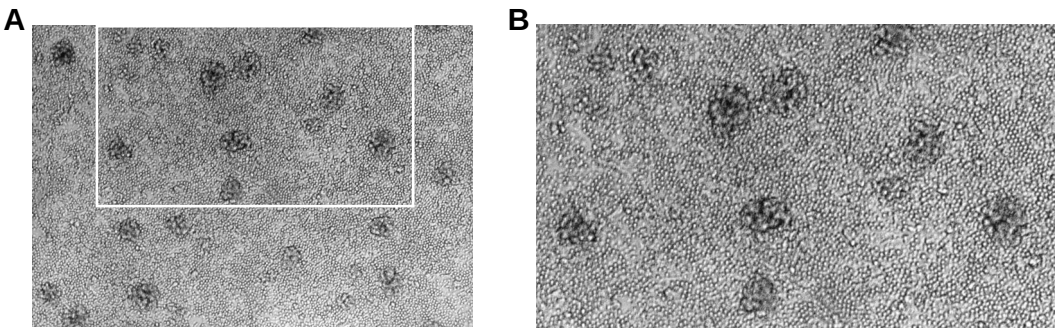

Abbildung 11: In der Kokultur kommt es zur Interaktion der *FastDC* mit den T-Zellen. Naive $CD3^{+}CD45RA^{+}CD45R0^{-}$ T-Zellen wurden mit reifen Antigen-beladenen *FastDC* kokultiviert. Die Abbildung zeigt ein beispielhaftes lichtmikroskopisches Zellbild (A) nach 48 h Kokultur von einem Spender aus mehr als 10 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern. B zeigt eine Vergrößerung aus A.

Es wurden $CD3^+$ panT-Zellen oder $CD3^+CD45R0^-$ naive T-Zellen mittels MACS-Technik aus PBMC isoliert und mit reifen und Antigen-beladenen autologen *FastDC* kokultiviert. Zur Kontrolle wurde die Kokultur parallel auch mit unreifen und unbeladenen DC durchgeführt. Die verwendeten T-Zellen wurden vor Einsatz und nach 48 h in der Kokultur mit den *FastDC* lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch auf ihre Aktivierung untersucht. Bereits nach 48 h Kokultur konnte man lichtmikroskopisch die Interaktion zwischen *FastDC* und T-Zellen durch Entstehung von Zell-Zell-Kontakten in Form so genannter „Cluster“ erkennen (Abb. 11).

Auch in der Darstellung der Oberflächenmarker der T-Zellen zeigt sich eine deutliche Aktivierung der primär ruhenden $CD69^-CD45RA^+$ naiven T-Zellen. Bereits die Kokultur mit unbeladenen, unreifen *FastDC* führte zu einer gewissen unspezifischen Aktivierung, die Antigen-beladenen *FastDC* jedoch zu einer deutlichen Aktivierung mit 50 % $CD69^+$ T-Zellen und Verlust des Naivitätsmarkers CD45RA (Abb. 12 A). Bei der Kokultur mit panT-Zellen ließ sich der Anteil an primär vorliegenden aktiven T-Zellen annähernd verdoppeln. Auffallend war auch eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu Gunsten der $CD8^+$ Zellen (Abb. 12 B). Die Kokultur führte dabei durch die Interaktion von *FastDC* und T-Zellen zur Aktivierung sowohl der $CD4^+$ als auch der $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 12 A, B).

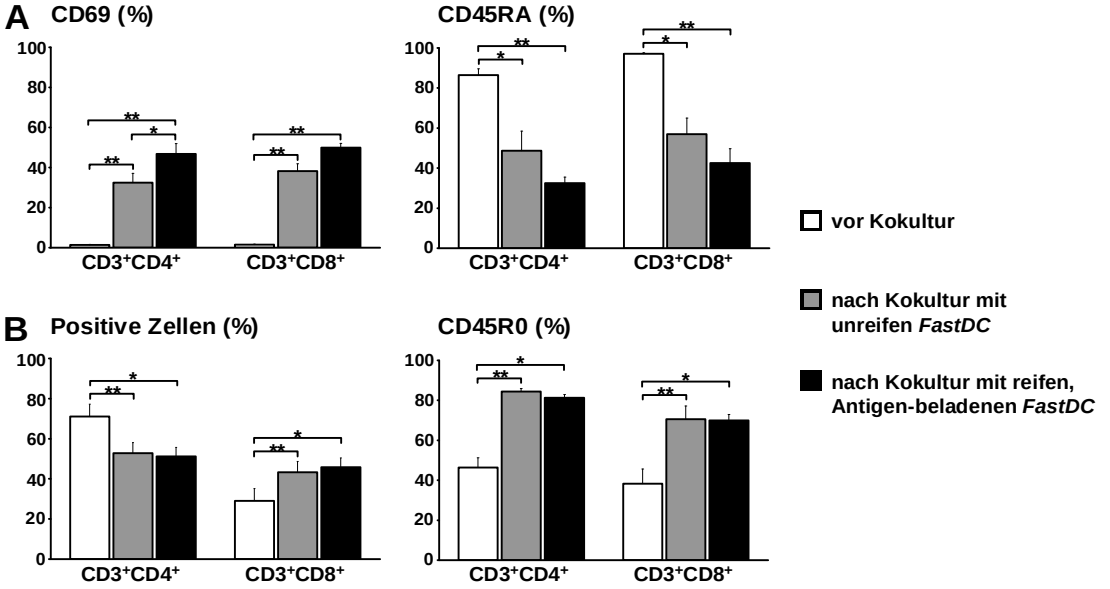

Abbildung 12: Die Interaktion der *FastDC* mit den T-Zellen in der Kokultur führt zur Aktivierung der T-Zellen. Naive $CD3^+CD45R0^-$ T-Zellen (A) oder panT-Zellen (B) wurden mit reifen Antigen-beladenen *FastDC* kokultiviert. Als Kontrolle dienten Kokulturen mit unreifen, unbeladenen *FastDC*. Die T-Zell-Aktivierung wurde durchflusszytometrisch an Hand der Oberflächenmarker vor Einsatz in die Kokultur und nach 48 h Kokultur mit den *FastDC* bestimmt. Hier sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 4 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt.

3.2.2 In der Kokultur induzieren *FastDC* die Proliferation der T-Zellen

Eine ausreichende Immunantwort gegen Tumorzellen ist von einer ausreichenden Anzahl an aktivierten und Antigen-spezifischen T-Zellen abhängig. Die Fähigkeit der *FastDC*, die kokultivierten autologen T-Zellen nicht nur zu aktivieren, sondern auch zur Proliferation anzuregen wurde mit Hilfe eines [^{3}H]-Thymidin-Proliferationsversuchs getestet. Dazu wurden CD3$^+$ panT-Zellen und CD3$^+$CD45R0$^-$ naive T-Zellen der gleichen Spender jeweils entweder mit unreifen, reifen oder reifen mit PANC-Lysat beladenen *FastDC* kokultiviert. Nach 5 Tagen Kokultur wurden die T-Zellen mit [^{3}H]-Thymidin markiert und 18 h später die Aufnahme gemessen. Als Kontrollen dienten hierbei die Kokultur mit unreifen *FastDC* und die T-Zell-Prolifertion alleine ohne Stimulation mit *FastDC* (Abb. 13, Daten nicht gezeigt).

Die ausgereiften *FastDC* zeigten eine titrierbare hohe Potenz sowohl panT-Zellen, als auch naive T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Besonders bei den naiven T-Zellen ließ sich der Effekt durch die Beladung der *FastDC* mit Tumor-Antigen noch deutlich steigern, wobei insgesamt erwartungsgemäß eine schwächere Reaktion zu erzielen war. Unausgereifte *FastDC* konnten nur eine Proliferationsrate hervorrufen, die der von T-Zellen alleine ohne Stimulation vergleichbar war (Abb. 13, Daten nicht gezeigt).

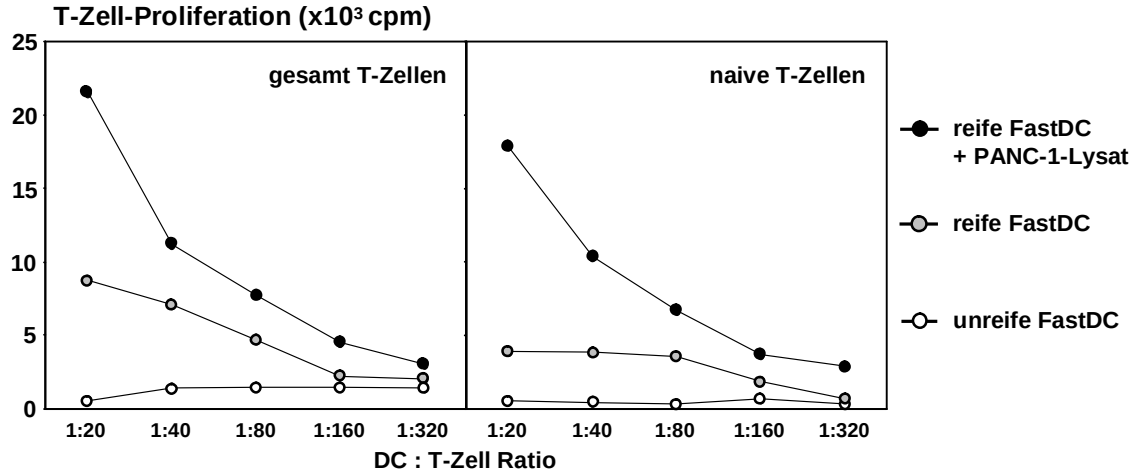

Abbildung 13: Reife und Antigen-beladene *FastDC* führen in einer Kokultur zur Proliferation der T-Zellen. Autologe CD3$^+$ panT-Zellen oder CD3$^+$CD45R0$^-$ naive T-Zellen der gleichen Spender wurden mit reifen *FastDC* oder ausgereiften und mit PANC-1-Lysat beladenen *FastDC* kokultiviert. Kokulturen mit unreifen *FastDC* dienten als Kontrolle. Um die T-Zell-Proliferation zu bestimmen wurden T-Zellen mit [^{3}H]-Thymidin inkubiert und die Aufnahme nach 18 h gemessen. Die T-Zell-Proliferation alleine ohne Stimulation mit *FastDC* lag bei nur 0,5 x 10^3 cpm (Daten nicht gezeigt). Hier sind die Daten von einem repräsentativen Spender aus 4 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern dargestellt.

3.2.3 Mit Tumorantigen beladene *FastDC* induzieren in der Kokultur mit autologen T-Zellen ein Th1-gewichtetes Zytokinprofil

Für die Induktion effektiver zytotoxischer T-Zell-Antworten gegen Tumorzellen muss mit den Antigen-beladenen *FastDC* eine Th1-gewichtete Immunantwort erzeugt werden. Um dies zu überprüfen wurden mit Hilfe der MACS-Technik aus aufgereinigten PBMC die $CD3^+$ T-Zellen isoliert (Reinheit größer als 95 %) und mit autologen und mit Tumorlysat beladenen *FastDC* kokultiviert. Danach wurden im Wochenrhythmus Restimulationen mit frischen Lysat-beladenen *FastDC* durchgeführt. Unstimulierte *FastDC* wurden in der Kokultur als Kontrolle eingesetzt. In den Kultur-Überständen konnte besonders nach Einsatz der Antigen-beladenen *FastDC* in die Kokultur eine hohe Konzentration an IL-12 gemessen werden (Abb. 14 A).

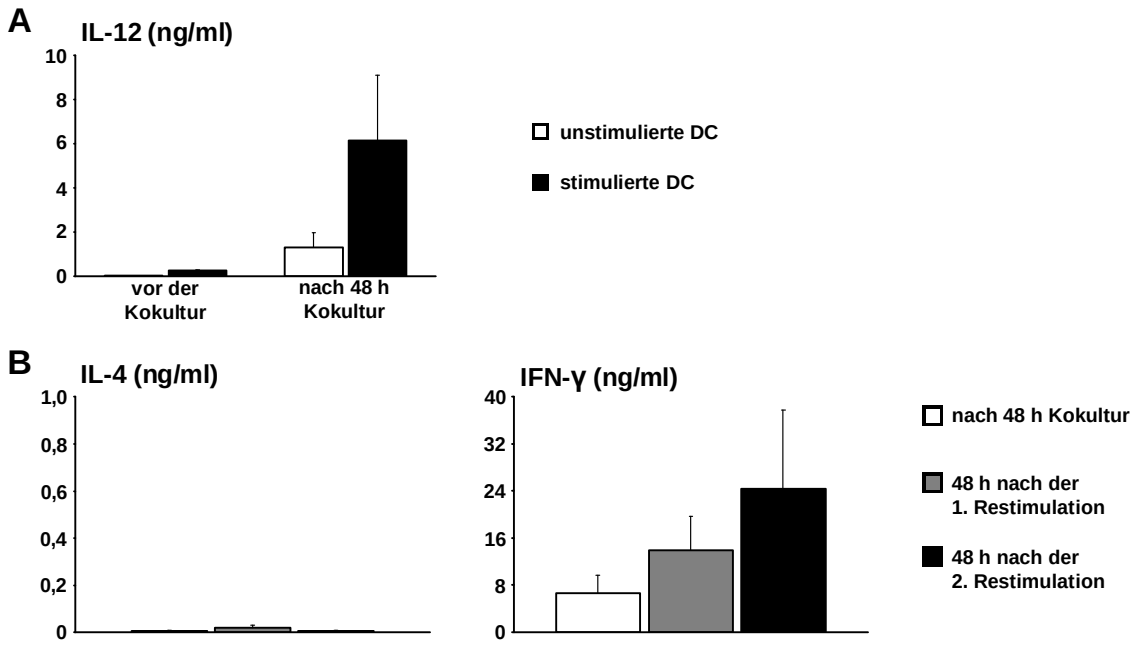

Abbildung 14: Mit Tumorantigen beladene *FastDC* induzieren eine Th1-gerichtete Zytokinantwort in der Kokultur mit autologen T-Zellen. Vor dem Beginn und nach 48 h der Kokultur von Antigen-beladenen und ausgereiften *FastDC* mit autologen T-Zellen wurde in den Kulturüberständen die IL-12 Produktion bestimmt. Die Überstände aus Kulturen mit unstimulierten *FastDC* und aus T-Zell-Kokulturen mit unstimulierten DC wurden als Kontrolle verwendet (A). Die autologen T-Zellen wurden wöchentlich mit beladenen *FastDC* restimuliert. Die Überstände der Kokulturen wurden jeweils 48 h nach Stimulation mit frischen *FastDC* abgenommen und die Konzentration von IL-4 und IFN-γ bestimmt (B). Hier sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 4 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt.

Von dem typischen Th1-Zytokin IFN-γ wurden schon zu Beginn der Kokultur hohe Konzentration in den Überständen der T-Zell-Kulturen erreicht, die nach jeder Stimulation mit frischen beladenen *FastDC* noch weiter anstiegen. Dahingegen lag die Konzentration des Th2-Zytokins IL-4 im Verlauf der Kokultur immer nur im Bereich der Nachweisgrenze (Abb. 14 B). Dieses Zytokinprofil in den Kokulturen mit Antigen-beladenen *FastDC* und autologen T-Zellen weist auf das Enstehen einer Th1-Antwort hin.

3.3 Induktion einer Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort in autologen T-Zellen durch Antigen-beladene *FastDC*

3.3.1 Die durch Antigen-beladene *FastDC* induzierte T-Zell-Reaktion ist spezifisch für das verwendete Antigen

Letztendlich ist bei der Generierung einer Immunantwort gegen Tumorzellen die Funktionalität und Effektivität der induzierten T-Zellen der entscheidende Faktor. Es werden T-Zellen benötigt, deren Immunreaktion einerseits Antigen-spezifisch ist und andererseits die Tumorzellen durch IFN-γ-Produktion oder direkte Zytotoxizität attackiert. Um die bisher induzierten T-Zellantworten auf ihre Spezifität zu untersuchen, wurden Antigen-beladene *FastDC* mit autologen panT-Zellen kokultiviert. Dafür wurde als Vereinfachung ein Modell mit den HLA-A2-abhängigen Peptiden Melan-A_{26-35}A27L (Melan-A, Melanom) und Flu-MA_{58-66} (Flu, Influenza) benutzt. So konnten im Gegensatz zur polyvalenten Antigenquelle Tumorlysat in diesem Fall T-Zell-Antworten gegen jeweils ein einziges bekanntes und nachweisbares Epitop induziert werden.

Autologe T-Zellen wurden entweder mit Melan-A- oder Flu-Peptid beladenen *FastDC* HLA-A2-positiver Spender in Kokultur gebracht und wöchentlich mit frischen *FastDC* stimuliert. Nach der zweiten Restimulation wurden die T-Zellen aus der Kokultur genommen und die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen mit Hilfe von geeigneten Tetrameren im Durchflusszytometer auf das Vorliegen Peptid-spezifischer T-Zell-Rezeptoren untersucht (Abb. 15). Als Kontrolle wurden HLA-A2-negative Spender verwendet und die T-Zellen mit dem jeweils anderen Tetramer getestet. Dabei ließ sich sowohl die Induktion Melan-A- wie auch Flu-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nachweisen. Durch den Test mit dem jeweils irrelevanten Tetramer konnte der Anteil der unspezifischen Aktivierung von bereits vor der Kultur existierenden spezifischen T-Zellen kontrolliert

werden. Die durch Peptid-beladene *FastDC* induzierten T-Zellen zeigten jeweils einen etwa 3-fach erhöhten Anteil an spezifischen T-Zellen gegenüber den mit dem fremden Peptid induzierten. Das letztendlich erreichte Niveau lag bei Melan-A mit 3 % deutlich höher als bei Flu mit 0,6 %, wobei hier dann auch der mit Fremdpeptid erzielte Anteil mit 1 % gegenüber 0,2 % erhöht war (Abb. 15).

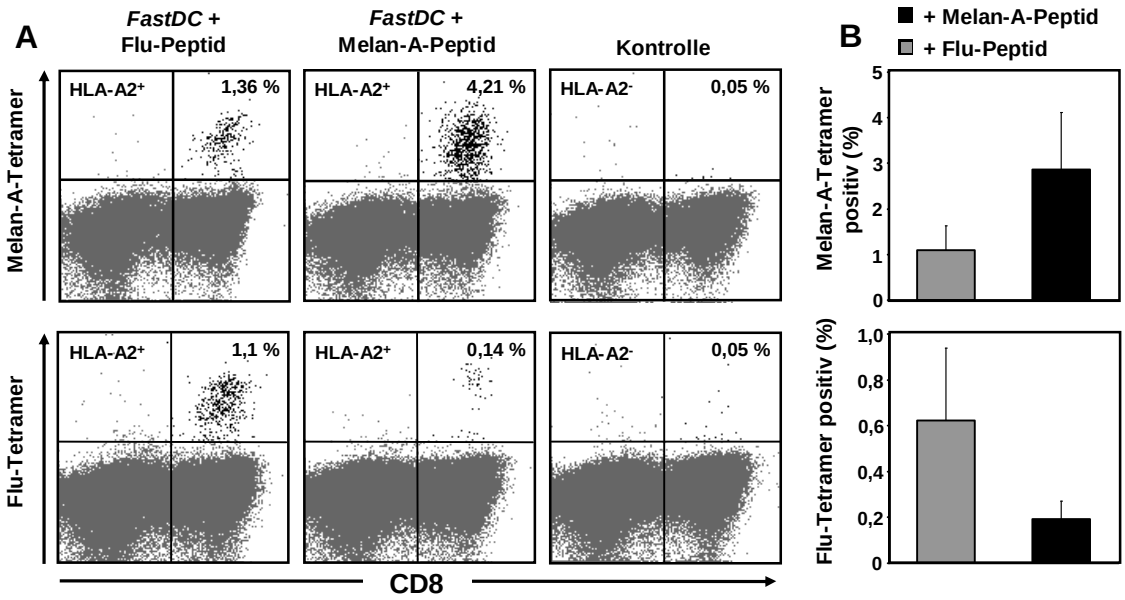

Abbildung 15: Die durch Peptid-beladene *FastDC* induzierte T-Zell-Reaktion ist spezifisch für das verwendete Antigen. T-Zellen wurden mit Melan-A- bzw. Flu-Peptid beladenen *FastDC* kokultiviert. Der Anteil der Peptid-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen wurde nach der 2. wöchentlichen Restimulation mit Melan-A-Tetramer (obere Reihe) bzw. Flu-Tetramer (untere Reihe) bestimmt. Als Kontrolle diente jeweils ein $HLA\text{-}A2^-$ Spender. Außerdem wurden auch die mit dem jeweils „irrelevanten" Peptid induzierten T-Zellen getestet (B). Hier sind die Daten eines repräsentativen Spenders (A) bzw. die Mittelwerte + SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern (B) gezeigt.

3.3.2 Antigen-beladene *FastDC* induzieren in autologen T-Zellen eine Antigen-spezifische IFN-γ-Produktion

Die erhaltenen Antigen-spezifischen T-Zellen sollten bei Stimulation mit den verschiedenen Tumor-Antigenen mit der Produktion von IFN-γ reagieren. Dafür wurden autologe T-Zellen mit *FastDC* kokultiviert, die entweder mit PANC-1-Lysat oder mit dem Melan-A-Peptid beladen worden waren. Es wurden insgesamt drei wöchentliche Stimulationen durchgeführt um schließlich mittels ELISPOT die Anzahl von IFN-γ-produzierenden T-Zellen zu messen.

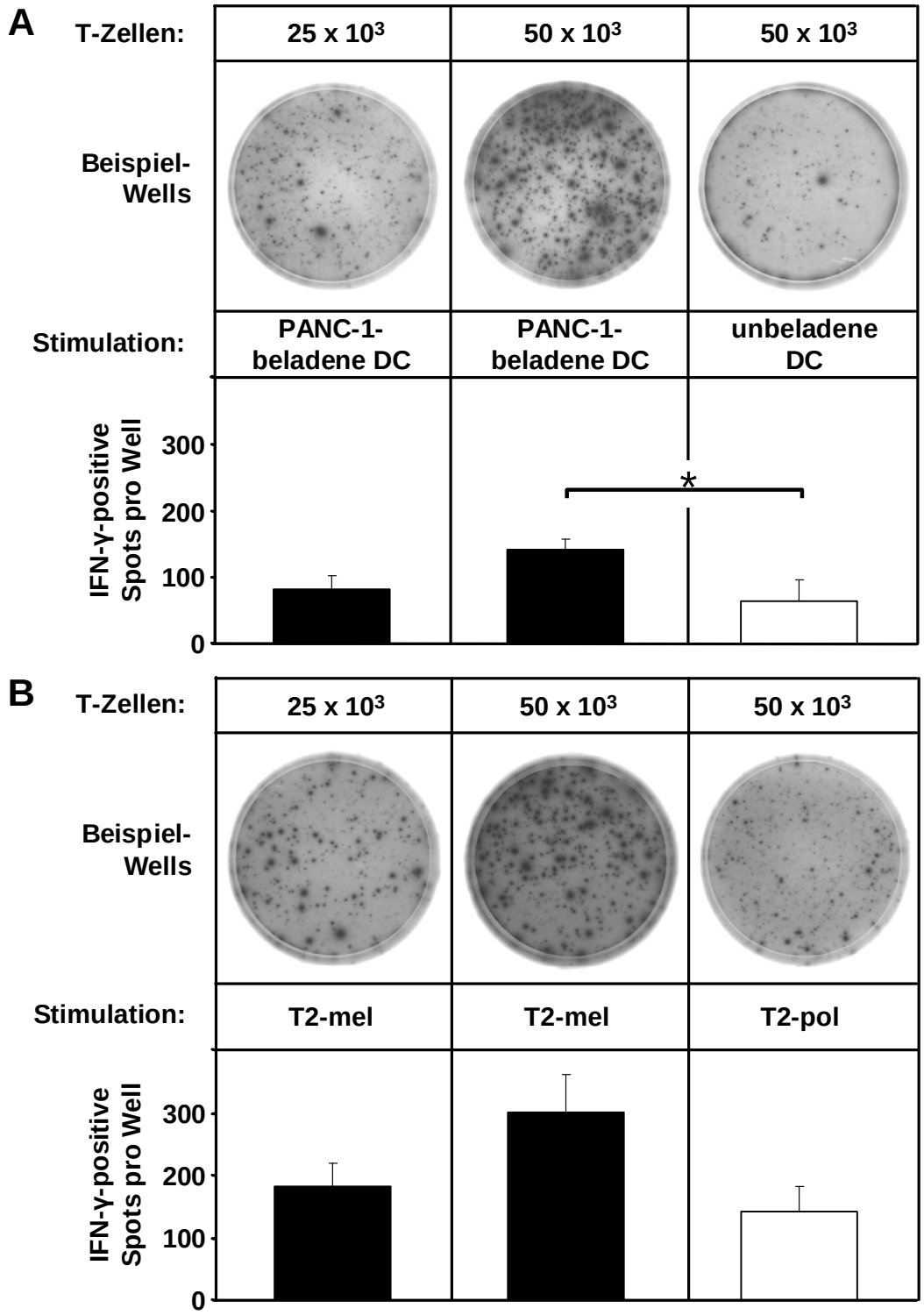

Abbildung 16: *FastDC* induzieren Antigen-spezifische IFN-γ-produzierende T-Zellen. T-Zellen wurden in Kokulturen mit Lysat-beladenen (A) oder mit Melan-A-Peptid beladenen (B) *FastDC* stimuliert. 7 Tage nach der 1. Restimulation wurden die T-Zellen im ELISPOT mit Lysat-beladenen *FastDC* (A) oder mit Melan-A beladenen T2-Zellen stimuliert und in verschiedenen Zelldichten (25 und 50 x 10^3 T-Zellen) die Frequenz IFN-γ-produzierender Zellen gemessen. Die Kontrollen wurden mit unbeladenen *FastDC* oder mit dem irrelevanten pol-Peptid-beladenen T2-Zellen durchgeführt (jeweils rechte Spalte). Hier sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt. Die obere Reihe zeigt Fotos von Beispiel-Wells aus der ELISPOT-Analyse aus Triplikaten eines repräsentativen Spenders.

Für die letzte Restimulation im ELISPOT-Versuch wurden entweder Lysat-beladene FastDC oder mit Melan-A-Peptid beladene T2-Zellen verwendet. Die Kontrollen wurden entweder mit unbeladenen FastDC oder mit dem irrelevanten HIV pol-Peptid beladenen T2-Zellen restimuliert (Abb. 16 A und B). Dabei konnten in beiden Systemen Antigen-spezifische IFN-γ-produzierende T-Zellen festgestellt werden. In der Kokulturen mit Lysat-beladenen FastDC lag die Frequenz bei ca. 0,3 % (Abb. 16 A) und in der Kokultur mit Melan-A-beladenen FastDC bei ca. 0,6 % (Abb. 16 B), wobei die unspezifische Reaktion mit 0,1 % bzw. 0,3 % in den Kontrollen deutlich schwächer war.

3.3.3 Antigen-beladene *FastDC* induzieren T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen Melanom- und Pankreas-assoziierte Antigene

Um die lytische Aktivität der induzierten $CD8^+$ T-Zellen gegen Pankreaskarzinomzellen zu testen, wurden Lysat-beladene *FastDC* mit autologen T-Zellen kokultiviert. Parallel wurde untersucht, ob mit dem HLA-A2-abhängigen Melan-A-Peptid beladene *FastDC* eine CTL-Antwort gegen ein einzelnes Epitop induzieren können.

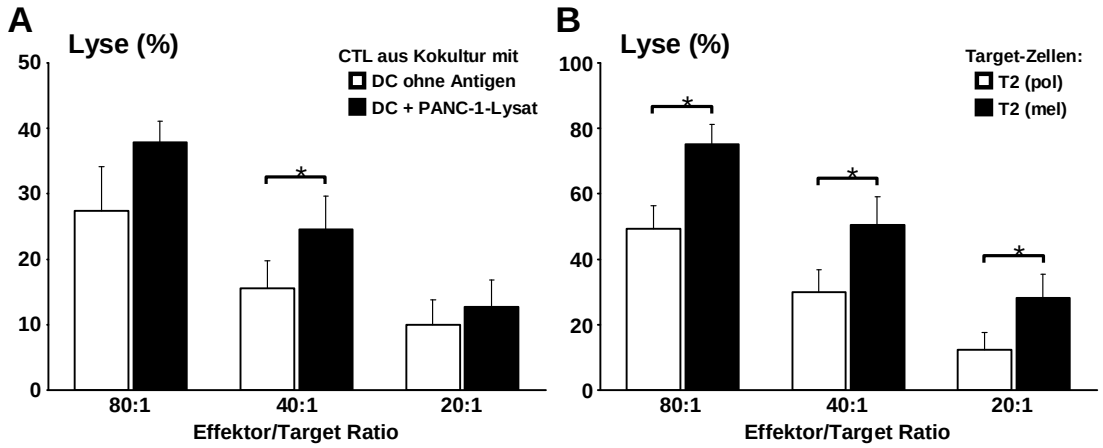

Abbildung 17: Mit Tumor-Antigen beladene *FastDC* induzieren T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen Pankreas- und Melanom-Antigene. Autologe T-Zellen wurden mit Lysat-beladenen bzw. Melan-A-beladenen *FastDC* kokultiviert. Fünf Tage nach der 2. Restimulation wurden die T-Zellen geerntet und entweder mit $_{51}$Cr-markierten PANC-1-Zellen (A) oder mit $_{51}$Cr-markierten und mit Melan-A-beladenen T2-Zellen (B) als Zielzellen inkubiert. Nach 4 h wurde die lytische Aktivität über das freigewordene $_{51}$Cr im Überstand gemessen. Als Kontrollen wurden entweder als Effektor T-Zellen aus der Kokultur mit unbeladenen *FastDC* (A) oder mit einem irrelevanten Peptid (HIV pol$_{476-484}$) beladene T2-Zellen als Target-Zellen (B) im Zytotoxizitätsversuch verwendet. Hier sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 5 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt.

Die lytische Aktivität der CTL aus der Kokultur mit Antigen-beladenen *FastDC* wurde mit einem Zytotoxizitätsversuch getestet. Dafür wurden die autologen T-Zellen fünf Tage nach der zweiten Restimulation mit beladenen *FastDC* aus der Kokultur geerntet. Anschließend wurden mit $_{51}$Cr-markierte PANC-1-Zellen (Abb. 17 A) oder $_{51}$Cr-markierte T2-Zellen, welche mit Melan-A-Peptid beladen waren (Abb. 17 B), für 4 h gemeinsam mit den T-Zellen aus den jeweils passenden Kokulturen in Kultur gebracht. Zur Kontrolle wurden entweder $_{51}$Cr-markierte PANC-1-Zellen mit T-Zellen aus der Kokultur mit unbeladenen *FastDC* kokultiviert (Abb. 17 A), oder die $_{51}$Cr-markierten T2-Zellen als Target-Zellen mit einem irrelevanten Peptid (HIV pol$_{476-484}$) beladen (Abb. 17 B). Dabei waren sowohl mit Lysat- wie auch mit Melan-A-Peptid beladene *FastDC* fähig, in autologen T-Zellen eine Tumorantigen-spezifische CTL-Antwort zu induzieren (Abb. 17 A und B).

3.4 Kombination aus *FastDC*-basierter Immuntherapie und Pharmakotherapie *in vitro*

3.4.1 Cyclooxygenase-2-Hemmer und Gemcitabin hemmen *in vitro* die Tumorzellproliferation ohne das Überleben der Tumorzellen zu beeinflussen

Unsere Hypothese war, dass eine zusätzliche Vorbehandlung der PANC-1 Tumorzellen mit COX-2-Hemmern oder Gemcitabin, die *in vivo* gute antineoplastische Eigenschaften zeigen, die durch Lysat-beladene *FastDC* erreichte T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen steigern könnte.

Zunächst wurden jedoch die direkten zytotoxischen Effekte der verwendeten Substanzen auf Pankreaskarzinomzellen untersucht. Diese Versuche wurden mit verschiedenen bereits etablierten und einer aus Patientenmaterial neu generierten Pankreaskarzinomzelllinie durchgeführt (siehe auch 2.2.4.3). Hier sind nur die Ergebnisse der in den Versuchen mit *FastDC* regelmäßig verwendeten PANC-1-Zelllinie gezeigt. Die PANC-1-Zellen wurden in bestimmten Zell-Konzentrationen in Kultur gebracht und zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem kolorimetrischen Assay, bei dem abhängig vom Stoffwechsel der Zellen ein Farbumschlag erzeugt wird, quantifiziert. Die Zellen wurden entweder nur in Medium kultiviert (Abb. 18 A), oder zusätzlich mit verschiedenen Pharmaka behandelt (Abb. 18 B).

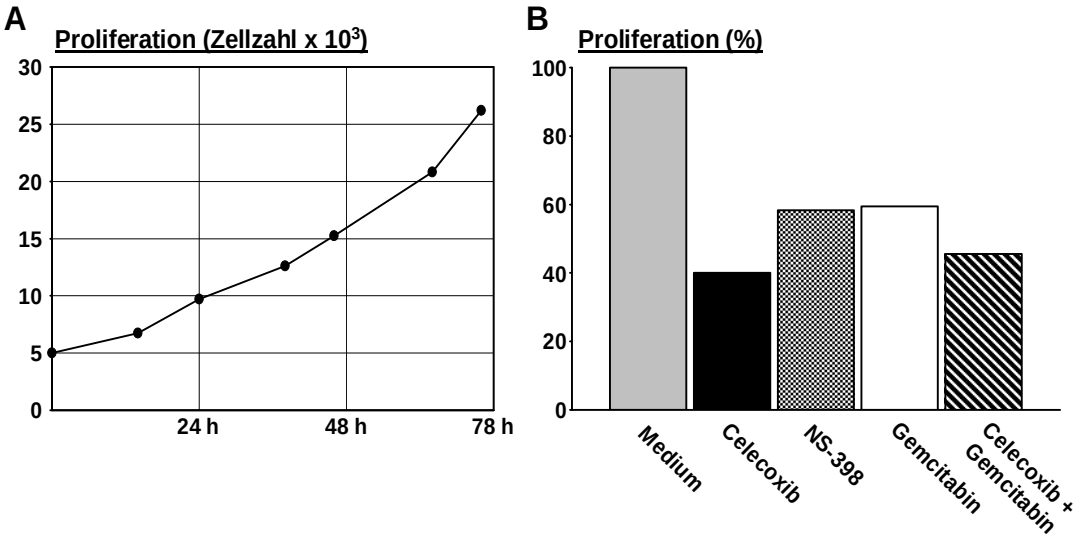

Abbildung 18: COX-2-Hemmer und Gemcitabin hemmen *in vitro* die Tumorzellproliferation. PANC-1-Tumorzellen wurden in Medium bei 37° C kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays die Zellzahl bestimmt (A). Zusätzlich wurden Tumorzellen mit Celecoxib (50 µM), NS-398 (20 µM), Gemcitabin (50 nM) oder Celecoxib plus Gemcitabin inkubiert und nach 24 h Kultur die Proliferationsrate gemessen (B). Die Proliferation der unbehandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Hier sind die Daten aus einem repräsentativen Proliferationsversuch von mehr als 3 Versuchen gezeigt.

Gemcitabin wurde in einer Konzentration von 50 nM, was etwa 0,2 % der Plasma-Spitzenkonzentration bei mit Gemcitabin behandelten Patienten entspricht [Grunewald, 1992], in einer „low dose"-Therapie eingesetzt. Die verwendete Zelllinie PANC-1 gehört zu den Tumorzelllinien, die das Enzym COX-2 nicht exprimiert. Deshalb mussten COX-2-unabhängige Effekte erreicht werden, für die 5- bis 10-mal höhere Dosen verwendet werden müssen, als für eine Hemmung des Enzyms notwendig wären [Grosch, 2001]. Die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen durch die Therapie wurde nach 24 h Kultur im Durchflusszytometer mit einer Annexin-FITC/PI Doppelfärbung untersucht (Abb. 19).

Die untersuchten PANC-1-Zellen zeigten eine hohe Proliferationsrate mit einer Verdopplungszeit von 24 bis 30 h (Abb. 18 A, siehe auch Abb. 28). Obwohl die Proliferation der PANC-1-Zellen bei der Behandlung mit Gemcitabin als auch durch COX-2-Hemmer deutlich reduziert wurde (Abb. 18 B), zeigten sich die Tumorzellen insgesamt relativ resistent gegenüber den getesteten Medikamenten. Nur die mit Gemcitabin behandelten Zellen zeigten in der Annexin/PI-Färbung eine leicht erhöhte Apoptose-Rate (Abb. 19). Es zeigte sich dabei weder auf die Proliferation noch auf die Apoptose-Rate der Tumorzellen ein additiver Effekt, wenn COX-2-Hemmer mit

Gemcitabin kombiniert wurden (Abb. 18, 19). Das heißt, die Behandlung der Tumorzellen führt *in vitro* zwar zu einer negativen Beeinflussung ihrer Proliferation, nicht aber ihres Überlebens.

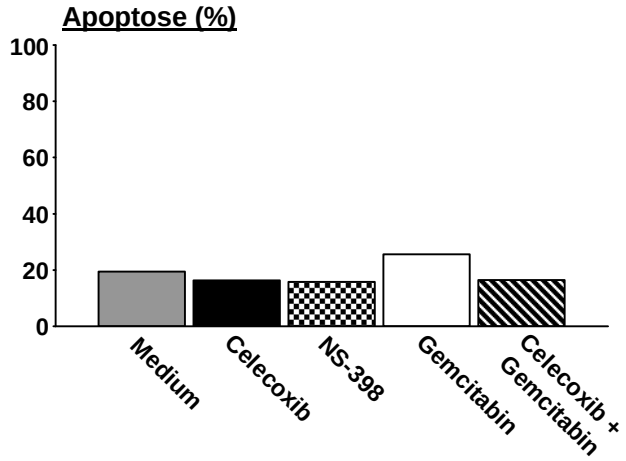

Abbildung 19: COX-2-Hemmer und Gemcitabin beeinflussen die Apoptose-Rate der Tumorzellen kaum. PANC-1-Tumorzellen wurden bei 37° C in Medium alleine oder mit Celecoxib (50 µM), NS-398 (20 µM), Gemcitabin (50 nM) oder Celecoxib plus Gemcitabin inkubiert. Nach 24 h Kultur wurde mittels Annexin-FITC/PI-Färbung und durchfluss-zytometrischer Analyse die Apoptose-Rate gemessen. Apoptotische Zellen wurden als Annexin-FITC-positive und PI-negative Zellen definiert. Hier sind die Daten aus einem repräsentativen Proliferationsversuch gezeigt.

3.4.2 Vorinkubation mit Cyclooxygenase-2-Hemmern oder Gemcitabin sensitiviert Tumorzellen gegenüber der T-Zell-vermittelten Lyse

Nachdem eine direkte apoptotische Wirkung der COX-2-Hemmer und auch von Gemcitabin ausgeschlossen werden konnte, sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit den verschiedenen Medikamenten einen Einfluss auf die durch *FastDC* induzierte T-Zell-vermittelte Lyse hat. Tumor-Antigen spezifische T-Zellen wurden dafür in Kokulturen mit autologen Antigen-beladenen *FastDC* generiert wie bereits beschrieben und die so erzeugten CTL im Zytotoxizitätsversuch mit $_{51}$Cr-markierten PANC-1-Zellen kokultiviert. Vor dem Zytotoxizitätstest wurden die Tumorzellen in diesem Fall aber für 18 h entweder mit Celecoxib, NS-398, Gemcitabin oder Celecoxib plus Gemcitabin behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach der Vorbehandlung wurden die Tumorzellen sorgfältig gewaschen, um die pharmakologischen Substanzen zu entfernen. Die vorbehandelten PANC-1-Zellen wurden dann mit $_{51}$Cr markiert und mit den zytotoxischen T-Zellen in einer Kokultur

angesetzt. Die spezifische Lyse wurde errechnet, indem jeweils die unspezifische Lyse durch T-Zellen aus den Kokulturen mit unbeladenen *FastDC* abgezogen wurde. Letztere betrug bei einem Verhältnis von 40:1 (Effektor- zu Targetzellen) ungefähr 15 % (siehe Abb. 17 A, 20 B).

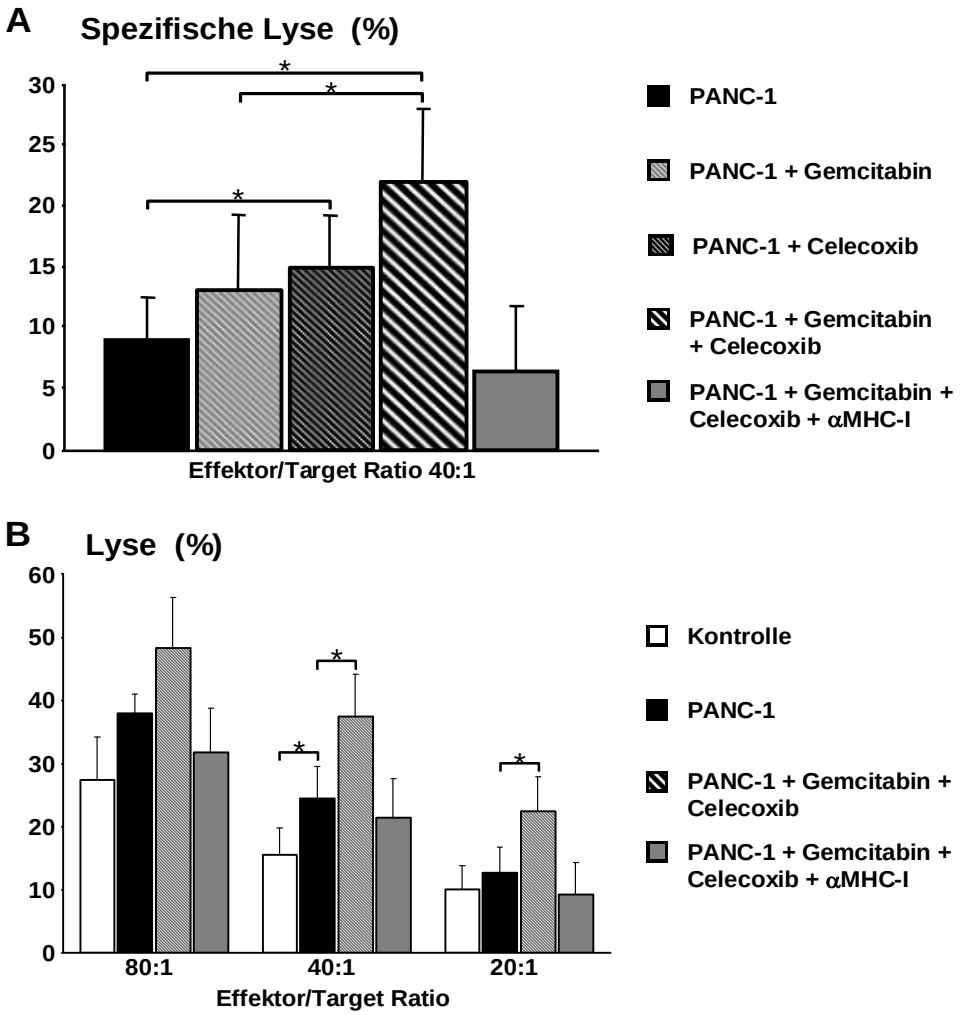

Abbildung 20: Die Vorinkubation mit COX-2-Inhibitoren oder Gemcitabin sensitiviert Pankreaskarzinomzellen gegenüber der T-Zell-vermittelten Lyse. Tumor-Antigen spezifische T-Zellen, die durch Kokultur mit *FastDC* induziert wurden, wurden 5 Tage nach der zweiten Restimulation geerntet und im Zytotoxizitätsversuch eingesetzt. Dabei wurden sie mit $_{51}$Cr markierten PANC-1-Zellen, die entweder unbehandelt oder für 18 h mit Celecoxib (50 µM), NS-398 (20 µM), Gemcitabin (50 nM) oder Celecoxib plus Gemcitabin vorbehandelt waren, kokultiviert. Nach 4 h wurden die Kulturüberstände abgenommen, um anhand des freigewordenen $_{51}$Cr die Lyse-Raten zu bestimmen (A, die Lyse von T-Zellen aus der Kokultur mit unbeladenen *FastDC* wurde in diesem Fall jeweils abgezogen). Der monoklonale Antikörper W6/32 wurde verwendet, um die MHC-I-Moleküle auf den PANC-1-Zellen zu blockieren, bevor sie mit den T-Zellen kokultiviert wurden (B, als Kontrolle diente die Lyse unbehandelter Tumorzellen durch T-Zellen aus der Kokultur mit unbeladenen *FastDC*). Hier sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 5 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt.

Die Vorbehandlung der PANC-1-Zellen mit Celecoxib führte im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen zu einer Steigerung der spezifischen Tumorzelllyse um 67 % (Abb. 20 A, 15 % gegen 9 %). Auch die Behandlung mit NS-398 führte zu vergleichbar gesteigerten Lyseraten (Daten nicht gezeigt). Nach der Vorinkubation der Tumorzellen mit Gemcitabin zeigte sich zwar ebenfalls ein Trend zu erhöhter Lyse, dem allerdings die statistische Signifikanz fehlte (12 % gegen 9 %). Interessanterweise konnte mit einer Kombination aus Celecoxib plus Gemcitabin bei der Vorbehandlung der PANC-1-Zellen eine mehr als 2-fach erhöhte Tumorzelllyse erzeugt werden (22 % gegen 9 %). Um zu testen, ob die gemessene Lyse auch tatsächlich durch Zell-Zell-Kontakte zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-I-Molekülen der Tumorzellen zu Stande kam, wurden die vorbehandelten Tumorzellen vor der Kokultur mit den CTL mit einem MHC-I blockierenden Antikörper inkubiert. Die Blockade der MHC-I-Moleküle auf den Zielzellen führte zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der spezifischen Lyse von PANC-1-Zellen, welche mit Celecoxib plus Gemcitabin vorbehandelt waren (Abb. 20 B).

3.4.3 COX-2-Inhibitoren oder Gemcitabin haben keinen Einfluss auf die Aktivierung von *FastDC*

Die Kombination einer *FastDC*-basierten Immuntherapie mit einer pharmakologischen Behandlung der Tumorzellen könnte *in vivo* durch gleichzeitig entstehende hemmende Effekte der Medikamente auf die induzierte Immunantwort beeinflusst werden. Die bei einer Vakzine applizierten *FastDC* könnten im Körper des Patienten durch die vorliegenden Konzentrationen der eingesetzten Medikamente gehemmt werden. Deshalb sollte *in vitro* untersucht werden, ob die verwendeten Substanzen einen direkten Einfluss auf den Reifestatus oder das Überleben der *FastDC* haben, die zur T-Zell-Aktivierung eingesetzt werden sollten.

Um die *in vivo*-Situation nach Applikation der *FastDC* in einer Vakzine zu simulieren, wurden reife *FastDC* generiert und nach der 48-stündigen Ausreifung in einem „wash out“-Versuch ohne weitere Zytokine, allerdings in Gegenwart der verschiedenen Medikamente, für 48 h weiter kultiviert. Die Überlebensrate der *FastDC* wurde dann mittels Lifegate-Analyse und der Reifestatus mittels Analyse der Oberflächenmarker und der Zytokinproduktion bestimmt (Abb. 21 A und B). Unter diesen „wash-out“-Bedingungen zeigte weder die Inkubation mit COX-2-Hemmern oder Gemcitabin alleine, noch die Behandlung mit der Kombination aus den beiden Pharmaka einen signifikanten Effekt auf das Überleben der *FastDC* (Daten nicht gezeigt). Die

Expression der Oberflächenmarker und die Produktion von IL-12 wurden bei den ausgereiften *FastDC* nach der Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht negativ beeinflusst (Abb. 21 A und B).

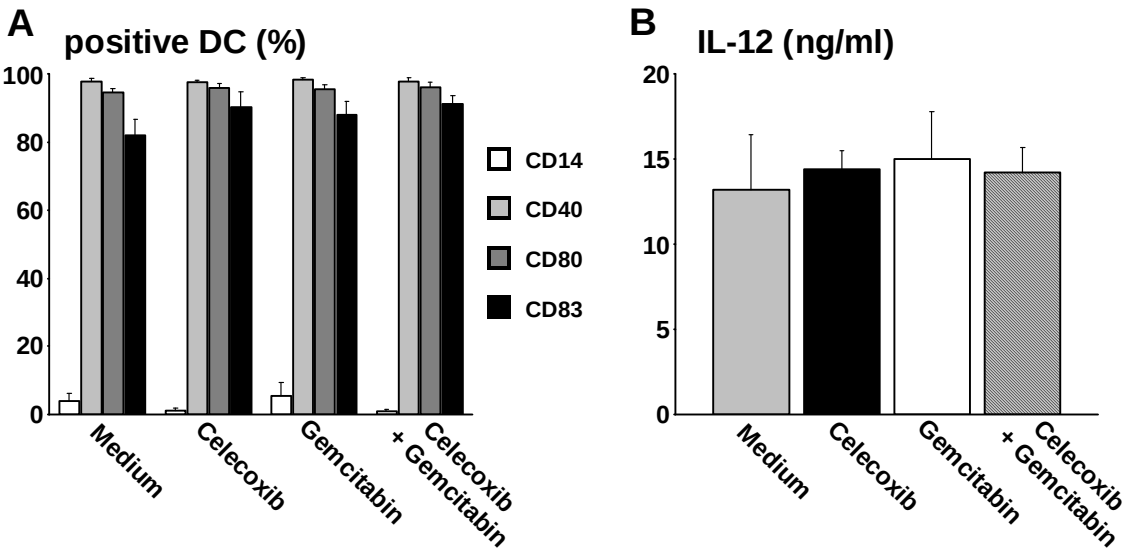

Abbildung 21: COX-2-Hemmer und Gemcitabin haben keinen negativen Einfluss auf die Aktivierung von *FastDC*. Reife *FastDC* wurden nach ihrer Generierung gewaschen und dann in Zytokin-freiem Medium weiter kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Celecoxib (50 µM), Gemcitabin (50 nM) oder Celecoxib plus Gemcitabin behandelt. Nach 48 h Kultur wurde der Reifestatus der *FastDC* an Hand der Oberflächenmarkerexpression (A) und Zytokinproduktion (B) bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte *FastDC* (Medium). Hier sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 4 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt.

3.4.4 COX-2-Hemmer und Gemcitabin hemmen in hohen Konzentrationen die T-Zell-Proliferation

Auch die eingesetzten T-Zellen wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit COX-2-Hemmern oder Gemcitabin untersucht. Dazu wurden entweder autologe T-Zellen mit Tetanus-Toxoid beladenen *FastDC* (autologe MLR), oder nicht-adhärente PBMC mit allogenen *FastDC* kokultiviert (allogene MLR) und so durch die Antigen-Präsentation bzw. die Allogenität der *FastDC* zur Proliferation angeregt. Dabei wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder mit verschiedenen Konzentrationen an Celecoxib oder Gemcitabin behandelt. Nach 5 Tagen Kokultur wurde mittels [^{3}H]-Thymidin-Aufnahme die Proliferation der T-Zellen gemessen (Abb. 22, Daten nicht gezeigt).

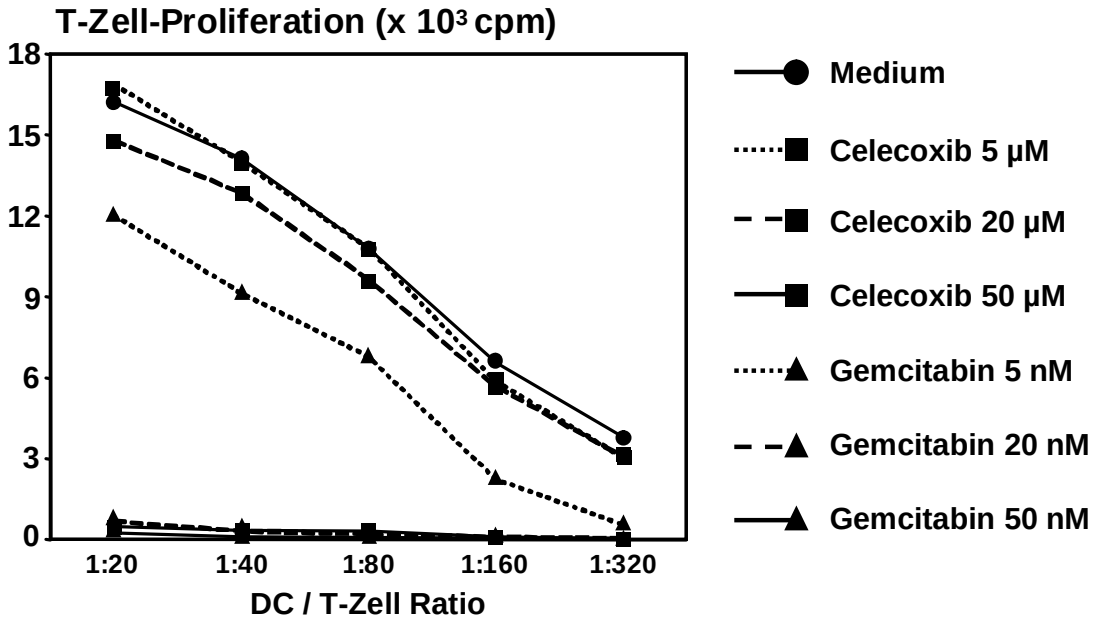

Abbildung 22: COX-2-Hemmer und Gemcitabin hemmen in hohen Konzentrationen die T-Zell-Proliferation. Mit Tetanus-Toxoid beladene *FastDC* wurden mit autologen T-Zellen in verschiedenen Zellzahl-Verhältnissen kokultiviert. Nach 5 Tagen wurde mittels der Aufnahme von [^{3}H]-Thymidin die Proliferation der T-Zellen gemessen. Dabei wurde Celecoxib oder Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen wie angegeben zu den Kokulturen gegeben. Hier sind jeweils die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern gezeigt.

Die Behandlung mit Gemcitabin führte zu einer beinahe kompletten Hemmung der Proliferation von allogenen und auch autologen T-Zellen, die durch *FastDC* aktiviert wurden (Daten nicht gezeigt, Abb. 22). Nur bei der niedrigsten Konzentration (5 nM) war eine – wenn auch um ca. ein Drittel geringere – Proliferation messbar. Celecoxib zeigte bis zu einer Konzentration von 20 µM keinen deutlich negativen Effekt, wohingegen eine Konzentration von 50 µM auch hemmend auf die T-Zellproliferation wirkte. COX-2-Hemmer scheinen also nicht nur effektiver in der Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber T-Zell-vermittelter Lyse zu sein, sondern beeinflussen auch weniger die durch *FastDC* induzierte T-Zell-Aktivierung.

3.5 Etablierung und Charakterisierung einer Pankreaskarzinom-Zelllinie

3.5.1 Etablierung einer neuen Pankreaskarzinomzelllinie

Für die beschriebenen Arbeiten über *FastDC* induzierte T-Zellantworten gegen Pankreaskarzinomzellen wurden verschiedene etablierte Pankreaskarzinomzelllinien

verwendet. Diese Zelllinien unterliegen aber durch ihre langfristige *in vitro*-Kultur einer stetigen Veränderung in ihrem Genprofil und entsprechen somit in ihren Eigenschaften nur noch bedingt primären Tumorzellen. Um der *in vivo*-Situation näher zu kommen, müssten deshalb idealerweise frisch entnommene Tumorzellen eines Tumorpatienten untersucht werden. Eine *in vitro*-Kultur von Karzinomzellen aus Pankreaskarzinom-gewebe ist jedoch schwierig. Es wurde deshalb versucht, aus primärem Tumormaterial direkt nach der operativen Entfernung eines Pankreaskarzinoms durch geeignete Aufbereitung eine Tumorzelllinie zu etablieren.

Dafür wurde ein Operationsresektat, das bei einer Duodeno-Pankreatektomie nach Whipple gewonnen wurde, von einem Pathologen in Augenschein genommen und ein makroskopisch als Tumorgewebe klassifizierbares Stück unter sterilen Bedingungen für die weitere Aufbereitung asserviert. Dies erfolgte im Rahmen einer an der Medizinischen Klinik Innenstadt gemäß den Ethikrichtlinien durchgeführten klinischen Studie zur Behandlung des Pankreaskarzinom mit DC. Das Gewebe wurde später auch histologisch als ein duktales Adenokarzinom des exokrinen Pankreas identifiziert. Die Gewebsprobe wurde sorgfältig vom Restgewebe getrennt und das übrige Gewebsstück dann in Medium aufgenommen. Zur Erstellung eine Einzelzellsuspension wurde mit einem Skalpell sorgfältig die Gewebsoberfläche abgeschabt, um einzelne Tumorzellen aus dem Gewebsverband auszulösen [Torres, 1995]. Das Restgewebe wurde mit Hilfe des Skalpells bis auf etwa 1 mm^3 große Fragmente zerkleinert. Die Zellsuspension wurde dann durch Filtration über einen 70 µm-Filter und mehrere Zentrifugationsschritte weiter aufgereinigt und schließlich in Tumor-Medium in Kultur gebracht und bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Zell-Wachstum und Morphologie wurden täglich lichtmikroskopisch überwacht und alle drei Tage wurde die Hälfte des verbrauchten Kultur-Mediums durch frisches ersetzt. Bald konnten im Lichtmikroskop deutlich zwei verschiedene jeweils adhärente Zelltypen in der Kultur identifiziert werden. In der Mehrzahl länglich spindelförmige, zum Teil mehrfach verzweigte Zellen mit schwach kontrastierten Zellkernen, die wohl Bindegewebszellen (Fibroblasten) entsprachen und dazwischen Zellkolonien aus deutlich plumperen polymorphen Zellen mit deutlich erkennbarem Zellkern und Nukleoli. Nach drei Wochen Kultur war der Boden der Kulturflasche mit meist konfluierend wachsenden Zellkolonien bedeckt, die geerntet und in einer größeren Kulturflasche wieder ausgesät wurden. Die Kultur wurde dann immer wieder bei totaler Konfluenz der Zellen geerntet und im Verhältnis von 1:3 bis 1:5 weiter kultiviert (Kultur-Passage). Die Tumorzellen wurden so mit bis zu drei Passagen in der Woche expandiert.

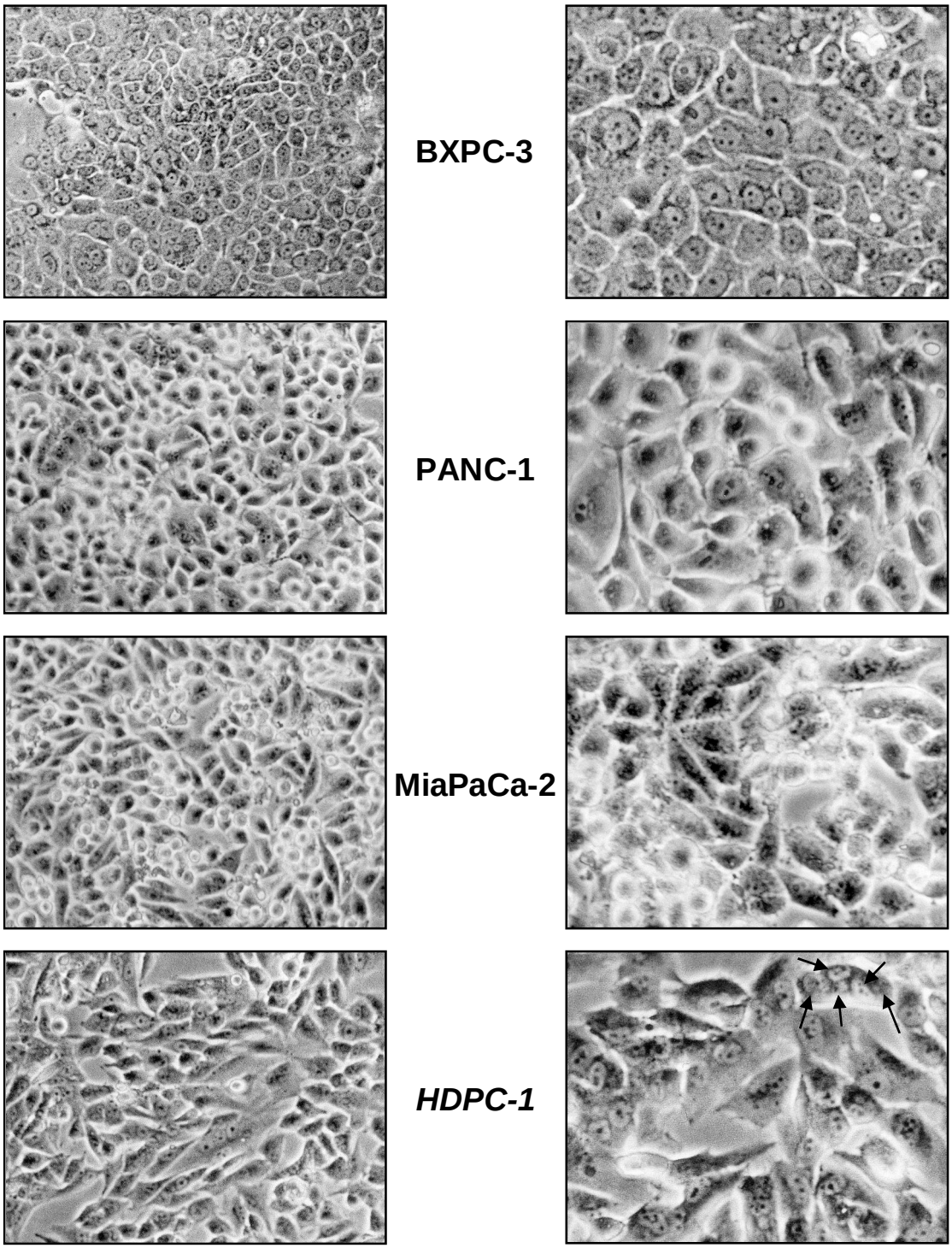

Abbildung 23: Lichtmikroskopische Abbildungen der verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien in verschiedenen Vergrößerungen. Die Zelllinien zeigen ihr jeweils charakteristisches adhärentes Wachstum in der Zellkultur. Bei der neuen Zelllinie *HDPC-1* fallen mehrkernige Zellen auf (Pfeile).

Die so entstandene Zelllinie zeigte lichtmikroskopisch deutliche Ähnlichkeiten zu den etablierten, kommerziell erhältlichen Tumorzelllinien und mit erkennbaren Mitosen und

mehrkernigen Zellen eindeutige Eigenschaften maligner Tumorzellen (Abb. 23). Die neu etablierte Zelllinie wurde vorläufig in Anlehnung an die Vergleichszelllinien als *HDPC-1* (Humanes-duktales-Pankreaskarzinom)-Zelllinie bezeichnet.

Um die epitheliale Herkunft der kultivierten Zellen zu testen und so eine Expansion von Bindegewebszellen in der Kultur auszuschließen, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrisch mit einem Antikörper gegen das Humane Epitheliale Antigen HEA untersucht. Dabei zeigte sich bereits nach 3 Kulturpassagen ein Anteil der HEA^+ Zellen von ca. 30 %, der im Verlauf nach 20 Passagen mit > 99 % eine Kultur reiner epithelialer Zellen anzeigte (Abb. 24). Die in den weiteren Versuchen verwendeten Tumorzellen haben, wenn nicht anders bezeichnet, mehr als 20 solcher Passagen hinter sich.

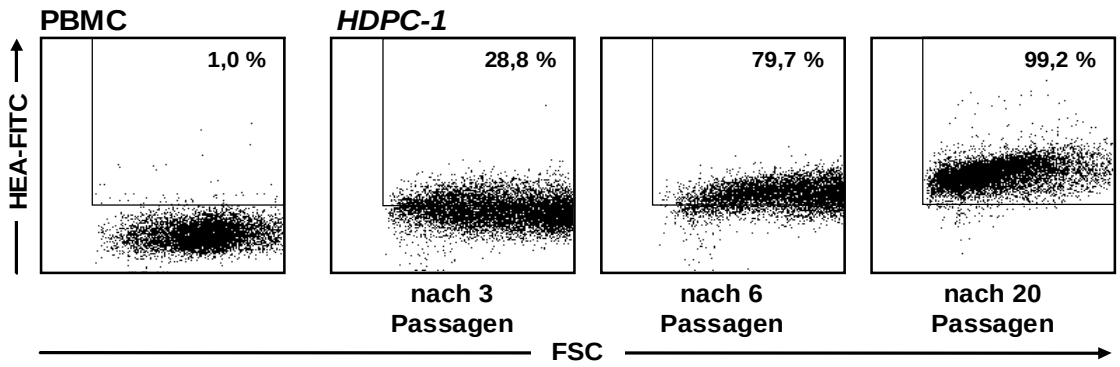

Abbildung 24: Der Anteil der HEA-positiven Zellen steigt im Verlauf der Zellkultur stetig an. Die Zellen aus der Zellkultur wurden nach einigen Kultur-Passagen durchflusszytometrisch auf ihre Expression von HEA untersucht. Als Kontrolle dienten jeweils HEA-negative PBMC.

3.5.2 Charakterisierung der neuen Tumorzelllinie

3.5.2.1 Die Zelllinie *HDPC-1* ist epithelialen Ursprungs

Zur weiteren Einordnung der Zelllinie *HDPC-1* wurden vergleichende Untersuchungen mit den bereits etablierten Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, MiaPaCa-2 und BXPC-3 durchgeführt. Um den epithelialen Ursprung der Zellen zu verifizieren wurden die verschiedenen Zelllinien durchflusszytometrisch mit dem bereits verwendeten Antikörper gegen HEA getestet. In der Forschung weit verbreitet zur Diagnostik von Epithelzellen sind die intrazellulären Cytokeratine. Deshalb wurde auch die Expression der Cytokeratine 7 und 8 durch Intrazellulärfärbung der Zellen untersucht (Abb. 25).

Erwartungsgemäß erschienen alle drei Referenz-Zelllinien sowohl HEA$^+$, als auch Cytokeratin$^+$, wobei sich besonders bei HEA deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Expression zeigten. Auch für die neue Zelllinie *HDPC-1* konnte durch eine hohe Expression von HEA und Cytokeratin eine epitheliale Herkunft bestätigt werden (Abb. 25).

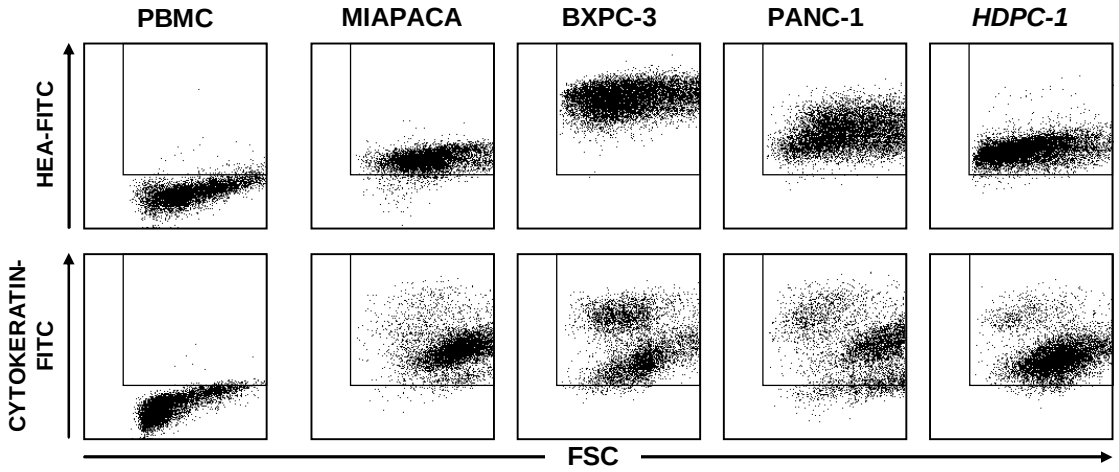

Abbildung 25: Expression der charakteristischen Zellmarkern von Epithelzellen HEA und Cytokeratin bei den verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien. Nicht epitheliale PBMC dienten als Negativkontrolle.

3.5.2.2 Die Zelllinie *HDPC-1* trägt MHC-Moleküle

Für den Einsatz der Zellen in Versuchen zur Zell-vermittelten Immuntherapie war die Expression von Histokompatibilitätskomplexen auf den Tumorzellen von Bedeutung. Dazu wurden die neue Zelllinie *HDPC-1* und die drei Vergleichszellinien mit Antikörpern gegen MHC-I (HLA-A, -B, -C), MHC-II (HLA-DP, -DQ, -DR) und HLA-A2 (MHC-I) markiert und im Durchflusszytometer das Oberflächenmarkerprofil dargestellt. Die neue Zelllinie *HDPC*-1 zeigte hier die mit Abstand stärkste Expression des ubiquitär vorkommenden MHC-I und erstaunlicherweise eine deutliche Expression von MHC-II, das normalerweise nur auf den Antigen-präsentierenden Zellen des Körpers zu finden ist (Abb. 26). Durch diese besondere Eigenschaft konnte auch eine Kontamination mit Zellen der anderen MHC-II-negativen Tumorzelllinien im Verlauf der Etablierung ausgeschlossen werden. Auch für Versuche mit HLA-A2 positiven Spendern kann die Zelllinie *HDPC-1* verwendet werden, da sie im Vergleich zu der negativen Zelllinie MiaPaCa-2 eine gesteigerte Expression von HLA-A2 im Bereich der positiven Zelllinien PANC-1 und BXPC-3 aufweist.

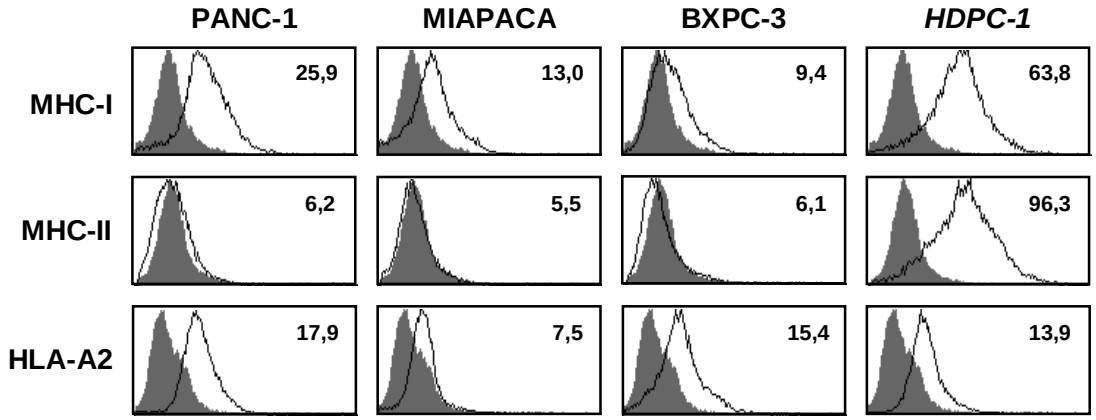

Abbildung 26: Expression von HLA-Oberflächenmolekülen auf den Tumorzelllinien. Hier sind jeweils die Daten der mittleren Fluoreszenzintensität der Zelllinien (schwarze Linie) gegen die Isotypenkontrolle (graue Fläche) aufgetragen.

3.5.2.3 Die Zelllinie *HDPC-1* produziert typische Zytokine

In Hinblick auf einen Einsatz als Antigenquelle für *FastDC* war auch die Produktion von typischerweise immunsuppressiven Faktoren durch die Tumorzellen von Interesse. Durch Untersuchung des sezernierten Zytokinprofils sollten Eigenschaften der noch unbekannten Zelllinie *HDPC-1* gefunden werden, die sie als Pankreaskarzinom-Zelllinie charakterisieren sollten. Die neue Zelllinie *HDPC-1* wurde deshalb mittels ELISA aus den Überständen der Zellkultur im Vergleich mit den anderen Zelllinien auf die Produktion der typischen immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF-β untersucht. Dabei konnte in allen untersuchten Zelllinien inklusive der neuen Zelllinie *HDPC-1* eine Produktion von IL-10 sowie von TGF-β nachgewiesen werden (Abb. 27).

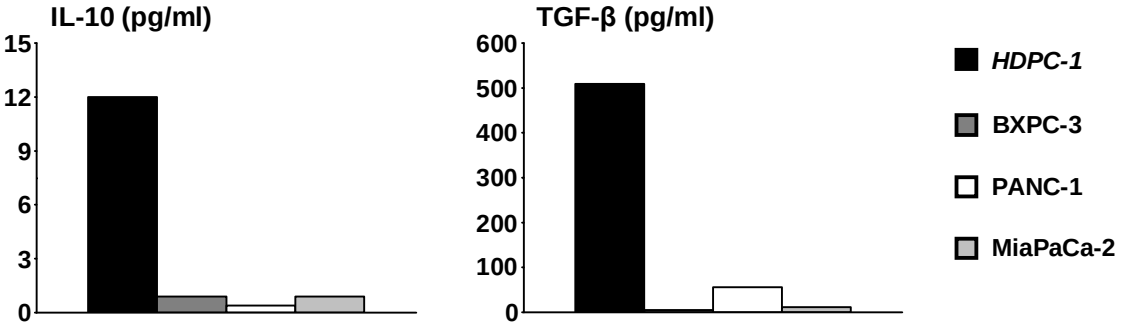

Abbildung 27: Produktion der Zytokine IL-10 und TGF-β in den Tumorzellkulturen. Aus den Zellkulturüberständen der verschiedenen Zelllinien wurde mittels ELISA die Produktion von IL-10 und TGF-β bestimmt.

Die Produktion der *HDPC-1*-Zellen lag bei beiden Zytokinen deutlich über dem Durchschnitt der Vergleichszelllinien. Dies weist darauf hin, dass die Zelllinien im Laufe ihrer Zellkultur einen Teil ihrer Eigenschaften verlieren. Es erscheint deshalb sinnvoll eine relativ vergleichsweise „junge“ Zelllinie wie *HDPC-1* zum Vergleich heranziehen zu können (Abb. 27).

3.5.2.4 Die Zelllinie *HDPC-1* trägt typische Eigenschaften des Pankreaskarzinoms

Um sicher zu stellen, dass es sich bei der angezüchteten Zelllinie tatsächlich um Zellen des malignen Pankreaskarzinoms handelt und nicht um andere Zellen wie z.B. Fibroblasten oder durch eine Verunreinigung bei der Zellkultur expandierte andere Zellreihe, wurden *HDPC-1*-Zellen nach weiteren typischen Merkmalen von Pankreaskarzinomzellen untersucht. Dafür wurden zunächst die Überstände der Zellkultur von *HDPC-1* im Routinelabor der Medizinischen Klinik auf Tumormarker untersucht. Es konnte dabei sowohl CEA (Carcinoembrionales Antigen) als auch CA125 (*Cancer antigen* 125) im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Beide dargestellten Tumormarker sind zwar nicht spezifisch, aber dennoch typisch für Pankreaskarzinome und werden auch in der klinischen Diagnostik eingesetzt.

Außerdem wurden die Zellen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Török aus der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. C. Folwaczny (Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt der LMU) auf die für die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms typischen Mutationen von k-ras und p53 untersucht. In dem Tumorsuppressorgen p53 fanden sich dabei in den charakteristischen Exonsequenzen keine Mutationen. Im Protoonkogen k-ras fand sich eine Mutation im Kodon 12, die beim Pankreaskarzinom als charakteristisch angesehen wird. Bei der Sequenzierung dieser Mutation wurde ein heterozygoter Basenaustausch von GGT zu GAT festgestellt, was einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat entspricht. Dies ist die häufigste der bekannten Mutationen im Kodon 12. Die typischen genetischen Veränderungen bestätigen den Ursprung der Zellen von *HDPC-1* aus Pankreaskarzinomzellen.

3.5.3 Proliferation der Tumorzelllinien unter Behandlung mit selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmern

Als Vorversuche für die Kombination aus Immuntherapie mit *FastDC* und einer Behandlung mit COX-2-Hemmern oder Gemcitabin wurden Proliferationsversuche mit den Zelllinien durchgeführt. So konnte die Proliferationsrate der neuen Zelllinie *HDPC-1* eingeordnet und zusätzlich die Effekte der medikamentösen Behandlung auf das Tumorzellwachstum untersucht werden. Dafür wurden die Zellen in dem beschriebenen kolorimetrischen Assay in bestimmten Zellkonzentrationen angesetzt und entweder nur in Medium kultiviert oder zusätzlich mit dem experimentellen COX-2-Hemmer NS-398 behandelt. An mehreren Zeitpunkten der Kultur wurden dann mittels Farbumschlag die Zellzahlen bestimmt (vgl. auch Kapitel 2.3.8). Alle untersuchten Zelllinien zeigten ein starkes Zellwachstum, wobei MiaPaCa-2 mit einer Verdopplungszeit von ca. 24 h am schnellsten wuchs. PANC-1 und die neue Zelllinie *HDPC-1* zeigten mit ca. 30 h eine geringere Verdopplungszeit. Die Zelllinie BXPC-3 entwickelte sich noch deutlich langsamer, wobei diese gemessenen Proliferationsraten durchaus den sonstigen Beobachtungen der Tumorzellkulturen entsprachen (Abb. 28, durchgezogene Linien). Die Behandlung mit dem COX-2-Hemmer NS-398 verringerte bei allen Tumorzellen das Wachstum, führte aber offensichtlich nicht zum Zelltod, da die eingesetzte Zellzahl nie unterschritten wurde (Abb. 28, gestrichelte Linien).

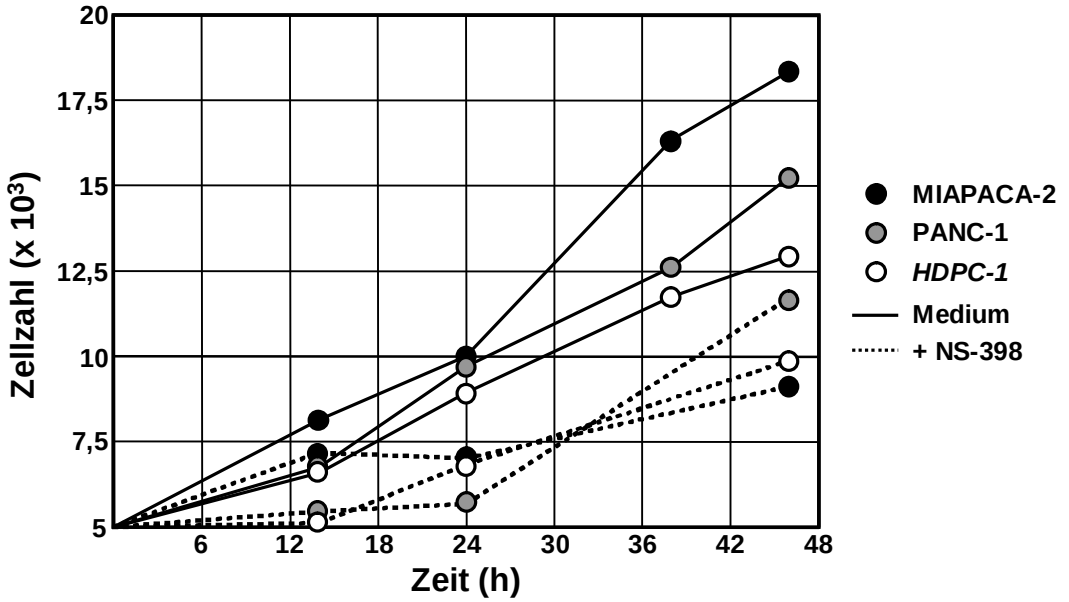

Abbildung 28: Proliferation der verschiedenen Tumorzelllinien über 48 h in Medium (durchgezogene Linien) oder zusätzlicher Behandlung mit NS-398 20 µM (gestrichelte Linien).

Um experimentell feststellen zu können, ob der Proliferations-hemmende Effekt von NS-398 zu den COX-2-abhängigen oder –unabhängigen Wirkungen gehörte, sollte nachträglich die Expression der COX-2 in den Zelllinien untersucht werden. Diese wurde indirekt über die PGE_2-Produktion der Zellen mittels ELISA aus dem Kulturüberstand nachgewiesen.

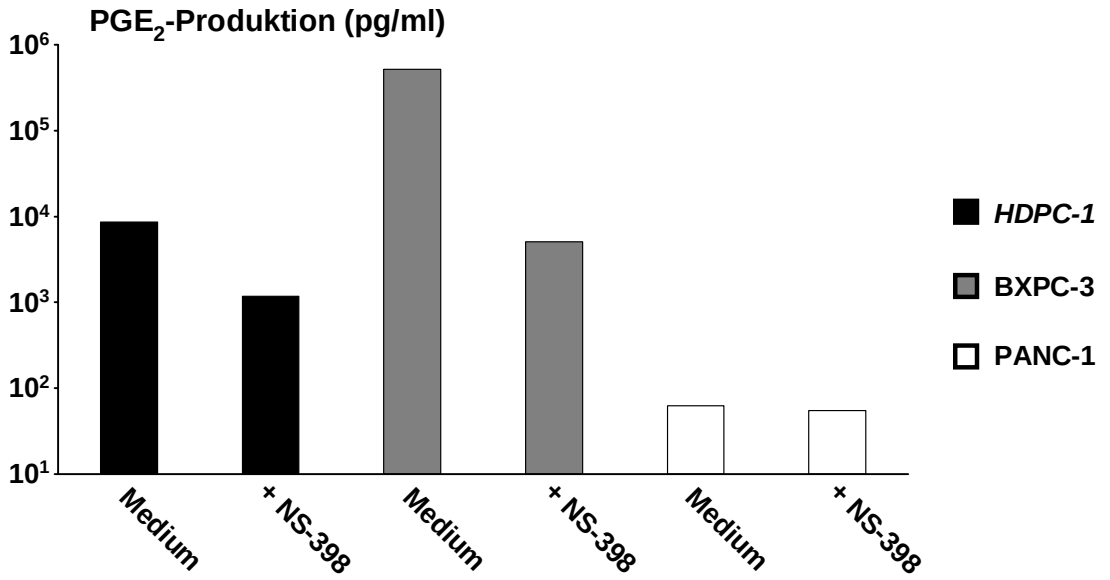

Abbildung 29: PGE_2-Produktion der Zelllinien, unbehandelt und nach Hemmung mit dem selektiven COX-2-Hemmer NS-398 (50 µM).

Die Zelllinie BXPC-3 zeigte eine ausgeprägte Produktion an PGE_2, entsprechend der in der Literatur beschriebenen COX-2-Expression. Die COX-2-negativen PANC-1-Zellen zeigten entsprechend keine PGE_2-Konzentration. Die neue Zelllinie *HDPC-1* erwies sich anhand der PGE_2-Produktion als COX-2-positiv. Die deutliche Unterdrückung der PGE_2-Produktion nach Hemmung der COX-2 mit NS-398 zeigte, dass die dabei gemessenen Konzentrationen an PGE_2 tatsächlich die Expression der COX-2 und nicht der COX-1 widerspiegelten. In der als COX-2-negativ anzusehenden Zelllinie PANC-1 konnte erwartungsgemäß auch durch NS-398 kein Unterschied erzielt werden (Abb. 29).

4 DISKUSSION

Die weiterhin schlechte Prognose und die bisher unbefriedigende Therapie des Pankreaskarzinoms machen neue Behandlungsstrategien notwendig. Dafür bieten sich immuntherapeutische Ansätze an, die eine spontane physiologische Immunreaktion gegen Tumorzellen unterstützen. Besonders Patienten mit noch geringer Tumorlast oder im Zustand nach einer radikalen Operation könnten von einer Immuntherapie profitieren. Für eine effektive Tumorzellabwehr sind hochpotente APC wie die DC notwendig, die durch die Präsentation der Tumor-Antigene in Zusammenhang mit MHC-Komplexen tumorspezifische zytotoxische T-Zellen induzieren und aktivieren können. Allerdings können Tumore *in vivo*, zum Beispiel durch die Sekretion von IL-10 oder VEGF, die Funktion und die Reifung von DC hemmen [Gabrilovich, 1998; Schuler, 1997]. Mittlerweile ist es jedoch möglich, DC in größeren Mengen *in vitro* zu generieren [Caux, 1996; Inaba, 1992; Romani, 1994] und sie mit verschiedenen Tumorantigenen zu beladen, um sie dann als Vakzine bei Tumorpatienten zu verwenden. Der zusätzliche Einsatz anti-neoplastischer Medikamente könnte die Effekte der DC-basierten Immuntherapie verstärken.

4.1 Generation von *FastDC* aus Monozyten in 48 Stunden

In den vorliegenden Untersuchungen konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass DC, die in nur 48 h *in vitro*-Kultur aus humanen Monozyten generiert wurden, die Fähigkeit besitzen Tumor-Antigen-spezifische T-Zell-Reaktionen zu induzieren. Hierbei wurde eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte neue Strategie zur Generierung von DC innerhalb von 48 h (*FastDC*) verwendet [Dauer, 2003; Obermaier, 2003]. Dies bietet gegenüber den Standard-Verfahren, die dafür 5 bis 7 Tage ansetzen, wesentliche Vorteile. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass nach der *FastDC*-Strategie generierte DC im Vergleich zu nach Standard generierten Monozyten-abgeleiteten DC nicht nur eine vergleichbare Kapazität in der Stimulation von T-Zellen besitzen, sondern auch mit einer höheren Ausbeute und Reinheit produziert werden können. Mit dieser neuen Strategie konnten aus 100 ml peripherem Blut zuerst über Plastik-Adhärenz die Monozyten isoliert werden und schließlich nach 48 h Zell-Kultur daraus etwa 2,5 bis 7 Mio ausgereifte und Antigen-beladene *FastDC* generiert werden. Die Monozyten, die dafür 24 h mit GM-CSF plus IL-4 kultiviert und im Anschluss für weitere 24 h mit den proinflammatorischen Mediatoren TNF-α, IL-1β und

PGE_2 [Dauer, 2003; Feuerstein, 2000] stimuliert werden, durchlaufen auch in dieser verkürzten Generierungszeit alle Phasen der DC-Reifung. Die Zellen tragen übergangsweise die charakteristischen Eigenschaften unreifer DC mit einem Expressionsverlust des monozytären Markers CD14 und einer hohen Endozytoserate von löslichem Dextran. Letztendlich entwickeln sie sich dann zu voll ausgereiften DC mit der typischen Morphologie und einer ausgeprägten Expression von Reifemarkern wie CD83, von kostimulatorischen Molekülen zur T-Zell-Aktivierung, von MHC-Molekülen zur Antigen-Präsentation und des für das Homing benötigten Chemokin-rezeptors CCR7. Die durch die 48 h Kultur erzielte Reinheit (durchschnittlich > 95 %) und die Ausbeute (durchschnittlich 50 %) der ausgereiften *FastDC* lagen in den vorliegenden Versuchen im Rahmen der Vorarbeiten [Dauer, 2003; Obermaier, 2003]. Zusätzlich zu dieser hohen Reinheit liegt die Zell-Ausbeute dabei aber etwa doppelt so hoch wie bei in 5 bis 7 Tagen generierten DC [Marten, 2002; Romani, 1994].

4.1.1 Optimale Ausreifung der *FastDC* durch eine Kombination aus TNF-α, IL-1β und PGE_2

Die Möglichkeit, durch die proinflammatorischen Mediatoren TNF-α und PGE_2 eine komplette DC-Ausreifung aus Monozyten zu erhalten, indem sie am Tag 2 der Kultur mit GM-CSF plus IL-4 zugegeben werden, ist eine neue Erkenntnis unserer Arbeitgruppe. Allerdings bestätigen die Effekte von einigen der proinflammatorischen Zytokine, die hier zur Ausreifung, Zytokin-Produktion und T-Zell-Aktivierung bei *FastDC* eingesetzt wurden, die bisherigen Resultate aus Studien mit nach Standard in 7 Tagen generierten DC. So waren PGE_2 und eine Reihe anderer getesteter Stimulantien einschließlich CD40-Ligand nicht fähig einzeln zu einer phänotypischen Reifung von DC zu führen. Zur vollständigen Ausreifung der FastDC wurde ein Zusammenwirken von PGE_2 mit TNF-α oder IL-1β und PGE_2 benötigt [Kalinski, 1998; Rieser, 1997; Scandella, 2002]. Im Standardschema für Monozyten-generierte DC zeigte sich letztendlich ein Cocktail aus TNF-α, IL-1β, IL-6 und PGE_2 am effektivsten zur Ausreifung [Jonuleit, 1997; Feuerstein, 2000]. Nach den für diese Arbeit durchgeführten Vorversuchen und den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe [Dauer, 2003] stellte sich allerdings heraus, dass für die Generierung von *FastDC* auf IL-6 bei der Ausreifung verzichtet werden kann und ein Cocktail aus TNF-α, IL-1β und PGE_2 optimal ausgereifte *FastDC* liefert, was in dieser Arbeit durchweg bestätigt werden konnte.

4.1.2 Die Kombination aus TNF-α, IL-1β und PGE_2 führt zu einer stabilen Ausreifung der *FastDC*

Neben der typischen Morphologie der DC mit vielen verzweigten Zellfortsätzen orientiert sich die Reife der DC auch an der Expression charakteristischer Oberflächenmarker. Die nach 48 h Kultur mit GM-CSF plus IL-4 und der Kombination aus TNF-α, IL-1β und PGE_2 erzeugten *FastDC* zeigen mit ihrem Oberflächenprofil ($CD14^-CD40^+CD80^+CD83^+CD86^{high}$MHC-I/II$^{high}CCR7^{high}$) alle notwendigen Marker, die sie für Antigen-Präsentation, Kostimulation und Migration in die sekundär lymphatischen Organe benötigen. Besonders für den Einsatz in einer immuntherapeutischen Vakzine könnte es aber nicht nur auf das Erreichen dieses Reifestatus, sondern vor allem auf die Stabilität dieser Reife ankommen. Denn bis die DC nach ihrer Applikation letztendlich auf aktivierbare T-Zellen treffen, müssen sie alle ihre immunstimulatorischen Fähigkeiten aufrechterhalten.

Die Arbeitsgruppe um H. Jonuleit konnte in vergleichenden Untersuchungen von unreifen bzw. ausgereiften DC in einer Vakzine bereits zeigen, dass nur mit ausgereiften DC *in vivo* effektive T-Zell-Antworten zu induzieren sind [Jonuleit, 2001]. Die Stabilität der ausgereiften DC wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen mit Hilfe des „wash out"-Tests überprüft, in dem stimulierte DC in Zytokin-freiem Medium weiter kultiviert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach der Standard-Methode generierte DC, die mit Monozyten-konditioniertem Medium bzw. mit einem Cocktail aus TNF-α, IL-1β, IL-6 und PGE_2 ausgereift wurden, in ihrer Morphologie und der Expression von Reife- und Stimulationsmarkern wie CD83, CD86 und MHC-Molekülen über 2 bis 3 Tage auch ohne weitere Stimulation stabil bleiben [Feuerstein, 2000; Romani, 1996; Thurner, 1999].

Bei eingehenderen Untersuchungen konnten Palucka et al. experimentell nachweisen, dass DC jederzeit wieder in Monozyten/Makrophagen zurück differenzieren können, wenn die vorausgegangene Stimulation nicht ausreicht. Nur nach ausreichender Stimulation erreichen die DC in ihrer Ausreifung ein irreversibles Endstadium ihrer Differenzierung [Palucka, 1998]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die in nur 48 h generierten *FastDC* eine vollständige Ausreifung erreichen, die über mindestens 48 h ohne weitere Stimulation stabil bleibt. Die *FastDC* zeigen keinen Anhalt für eine Entdifferenzierung, sondern können teilweise ihre Funktion wie z.B. die Zytokinproduktion sogar noch steigern.

4.1.3 Antigen-Beladung der *FastDC*

Für den Einsatz der DC als Vakzine bei Tumorpatienten müssen die Zellen vor der Applikation mit einem geeigneten Antigen beladen werden. Dafür stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, die sich in ihrer Anwendung und ihrer Eignung je nach dem Zieltumor unterscheiden. Prinzipiell können als Antigenquelle z.B. einzelne Tumor-Peptide, Tumor-Proteine, sog. polyvalente Antigene wie Tumorlysat oder auch eine Mischung aus mehreren Peptid-Antigenen, und zuletzt auch Tumor-RNA dienen [Reinhard, 2002].

Für die hier vorgestellten Versuche wurden sowohl Peptid-Antigene als auch Tumorlysat verwendet. Die Peptide bestehen aus 8 bis 10 Aminosäuren und können direkt von außen auf die MHC-I-Moleküle der DC geladen werden. Allerdings müssen für diese Methode spezifische Peptide für den jeweiligen Tumor bekannt sein. Das in dieser Arbeit eingesetzte Melan-A-Peptid ist zusätzlich so verändert worden, dass zwar die Bindungsstellen erhalten sind, es aber immunogener als das Urpeptid wirkt [Valmori, 1998]. Die Immuntherapie mit einzelnen Peptiden ist zwar sehr tumorspezifisch, birgt aber besonders der Gefahr durch Ausweich-Mechanismen des Tumors, wie Veränderungen in der Expression von MHC-Molekülen oder des Tumor-assoziierten Epitops, wirkungslos zu werden. Außerdem sind für viele Tumore wie auch das Pankreaskarzinom noch wenig spezifische Peptide bekannt. Dem Ausweichen des Tumors vor einer Peptid-spezifischen Immunreaktion kann man entgegentreten, indem man polyvalente Antigene, also entweder eine Mischung von mehreren Peptiden oder auch autologes Tumorlysat, verwendet. Durch das Lysieren der Tumorzellen entsteht eine Antigen-Lösung bei der die malignen antigenen Epitope enthalten sind und nicht vorher bekannt sein müssen. Allerdings wird so auch potentiell gegen ebenfalls enthaltente physiologische Antigene geimpft. Die Impfung mit Lysat-beladenen DC verspricht besonders effektiv zu sein, da gleichzeitig gegen viele Antigene eine Immunreaktion erzeugt werden kann und so auch potentiell immunogene Epitope enthalten sein können, die noch unbekannt sind.

In einer Studie von Nestle et al., in der Patienten entweder mit Lysat- oder Peptid-gepulsten DC vakziniert wurden, war die Reaktionsrate in der Gruppe der Lysat-DC (50 %, 2 von 4 Patienten) doppelt so groß wie in der Gruppe mit Peptid-DC (25 %, 3 von 12 Patienten) [Nestle, 1998]. Im Gegensatz zu den Peptiden müssen Antigene in Proteinform von den DC erst in die Zelle aufgenommen werden, dort in einzelne Peptide prozessiert und an MHC-Moleküle gebunden werden, um letztendlich auf der

Zelloberfläche präsentiert werden zu können. Die DC haben hierbei die einzigartige Fähigkeit, die von außen aufgenommenen Antigene nicht nur auf den MHC-II-, sondern auch auf MHC-I-Molekülen gleichzeitig den $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen zu präsentieren (*Crosspresentation*) [Carbone, 1998]. Die Beladung der *FastDC* mit Tumorlysat konnte gegenüber dem Standard-Protokoll, in dem das Antigen erst nach 5 bis 7 Tagen Kultur mit GM-CSF plus IL-4 zu den DC gegeben wird [Thumann, 2003], deutlich vereinfacht werden. Für die Beladung von *FastDC* werden die Monozyten gleichzeitig mit GM-CSF plus IL-4 und dem Tumorlysat in Kultur gebracht. In den folgenden 48 h erfolgt die Aufnahme und Prozessierung der Antigene. Für die hier eingesetzten *FastDC* konnte die Antigen-Aufnahme durch die Endozytose von löslichem Dextran simuliert werden. Die Prozessierung und Präsentation der Antigene konnte durch die Antigen-spezifische Aktivierung und Proliferation von T-Zellen bewiesen werden.

4.1.4 T-Zell-Aktivierung

FastDC, die mit Tumor-Antigenen beladen wurden, können autologe T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen, was zunächst einmal ihre Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme, -Prozessierung und –Präsentation auf MHC-Komplexen anzeigt. Die starken proliferativen Antworten allogener T-Zellen, aber auch naiver $CD45RA^+$ autologer T-Zellen zeigen, dass die Antigen-beladenen *FastDC* nicht nur Immunantworten gegenüber sog. *Recall*-Antigenen stimulieren, sondern auch durch eine ausreichende Kostimulation effektiv primäre Immunantworten induzieren können. Darüber hinaus sind sie fähig Th1-gewichtete Immunantworten zu erzeugen, wie die IFN-γ-Produktion von autologen T-Zellen nach der Kokultur mit Antigen-beladenen *FastDC* zeigt.

4.1.5 Bedeutung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die Entwicklung von reifen DC aus monozytären Vorläuferzellen nicht mehr als 2 Tage *in vitro*-Kultur benötigt. *FastDC*, die mit einem Cocktail aus proinflammatorischen Zytokinen ausgereift werden, besitzen die Fähigkeit Antigen-spezifische T-Zell-Reaktionen zu induzieren und autologe naive T-Zellen zu primen. Außerdem exprimieren die *FastDC* den für die Wanderung in die Lymphknoten benötigten Chemokinrezeptor CCR7 und induzieren ein Th1-gewichtetes Zytokinprofil in autologen T-Zellen, was demonstriert, dass sie alle

Qualitäten besitzen, die als erforderlich für eine effektive DC-basierte anti-Tumor Vakzine angesehen werden.

Diese Resultate bestätigen bisherige experimentelle Hinweise, dass die zirkulierenden Monozyten einen Pool von Vorläuferzellen darstellen, die sich in kurzer Zeit in DC differenzieren können. Randolph et al. konnte zeigen, dass eine Subpopulation von Monozyten, nachdem sie durch eine Endothelgrenze in kollagene Matrix migriert ist, wieder umkehrt und zurückwandert [Randolph, 1998]. Diese rückwärtige Migration simuliert den Eintritt der Zellen in die Lymphgefäße und ist mit einer Herunterregulation des Monozyten-Markers CD14 und einer Aufregulation der MHC-II-Moleküle assoziiert. Trafen diese Monozyten jedoch in der Kollagen-Matrix auf phagozytierbare Partikel, so erreichten die transmigrierten Zellen innerhalb von 48 h den Phänotyp reifer DC und eine hohe allostimulatorische Kapazität. *In vivo* könnte so eine schnelle Differenzierung und Ausreifung von Monozyten zu DC dadurch induziert werden, dass während einer Entzündungsreaktion die Produktion von GM-CSF durch die Endothelzellen und die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF-α, IL-1β und PGE_2 durch gewebsständige Immunzellen mit mikrobiellen Stimuli zusammenwirken [Luft, 2002; Sato, 1997; Shortman, 2002].

In vitro wurde bisher eine Kultur mit GM-CSF plus IL-4 über 5 bis 7 Tage benötigt, um die Differenzierung und die charakteristischen morphologischen Veränderungen von DC zu induzieren und so entstand daraus dann ein Standard-Protokoll für die Generation von DC aus Monozyten [Romani, 1994; Sallusto, 1994]. Obwohl diese Methode für die Generation von DC-ähnlichen Zellen, von denen auch nachgewiesen werden konnte, dass sie in einer Reihe von Vakzine-Studien [Nestle, 1998; Thurnher, 1997] *in vivo* effektiv Immunantworten gegen verschiedene Tumore induzieren können, tatsächlich eingesetzt werden kann, spiegelt sie doch wahrscheinlich nicht die Zeitverhältnisse bei der physiologischen Differenzierung von DC aus Monozyten wider.

Die Generation von *FastDC* nach diesem neuen Protokoll reduziert gegenüber der verlängerten *in vitro*-Kultur, die in den Standard-Protokollen nötig ist, deutlich die Zeit, den Arbeitsaufwand und die Kosten, die mit der *in vitro*-Kultur von DC-Vorläuferzellen verbunden sind. Außerdem zeigt sie sich durch die kürzere Kulturzeit auch weniger sensibel gegenüber externen Störfaktoren wie z.B. einer mikrobiellen Kontamination der Kultur. In unseren Versuchen erzeugte die Generierung von *FastDC* dabei wesentlich zuverlässiger eine höhere Ausbeute an lebenden und voll ausgereiften DC, als es mit dem Standard 7-Tage-Protokoll bisher möglich war. Diese Ergebnisse

könnten den Einsatz von DC in klinischen Studien für die zelluläre Immuntherapie deutlich erleichtern.

4.2 Chemosensitivierung von Tumorzellen mit Gemcitabin und selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmern

In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass es möglich ist Pankreaskarzinomzellen durch eine zusätzliche pharmakologische Behandlung gegenüber dem Angriff von Tumor-reaktiven CTL zu sensitivieren. Tumor-spezifische CTL wurden dafür durch *in vitro*-Stimulation von CD3+ T-Zellen mit Tumorlysat beladenen *FastDC* induziert und anschließend in Zytotoxizitäts-Versuchen auf ihre Antigen-Spezifität und ihre Funktion untersucht. Dieses *in vitro*-Modell wurde verwendet, um zu demonstrieren, dass anti-Tumor CTL-Antworten gesteigert werden können, wenn die Pankreaskarzinomzellen zusätzlich mit Gemcitabin oder mit COX-2-Hemmern behandelt werden. Im Gegensatz zu Gemcitabin zeigten die COX-2-Hemmer *in vitro* weniger Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen durch DC, was sie zu attraktiven Kandidaten für eine Kombinationsbehandlung zusammen mit DC-basierten immuntherapeutischen Strategien macht.

4.2.1 Tumor-Antigen beladene *FastDC* induzieren Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen

FastDC wurden mit Zell-Lysat von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen beladen, um in *in vitro*-Kokulturen CTL zu induzieren, die spezifisch gegen Tumor-Antigene gerichtet sind. Tumorlysat enthält nicht nur bekannte sowie unbekannte Tumor-Antigene, sondern auch eine Vielzahl an Faktoren, die potentiell zu einer Inhibition der DC-Funktion führen können, wie z.B. IL-10, TGF-β oder VEGF [Kobie, 2003]. Deshalb sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass die Beladung von *FastDC* mit Tumorzelllysat als Antigen-Quelle einen negativen Einfluss auf deren Phänotyp, Überleben oder die Zytokinproduktion hat. Die *FastDC* ließen sich aber trotz möglicher immunsuppressiver Faktoren im Tumorzelllysat vollständig ausreifen. In der Kokultur mit autologen T-Zellen waren die mit Lysat beladenen *FastDC* außerdem hochpotent in der Aktivierung der T-Zellen, der Induktion von T-Zell-Proliferation und konnten eine Th1-gewichteten Immunreaktion induzieren. Daraufhin analysierten wir die Kapazität

von Lysat-gepulsten *FastDC* tumor-spezifische zytotoxische T-Zell-Antworten zu induzieren. Zum Vergleich mit Tumorzelllysat als Antigen wurden dabei *FastDC* eingesetzt, die mit einem einzigen Epitop beladen wurden. Dafür wurde ein Peptid eingesetzt, das von dem Melanom-assoziierten Antigen Melan-A/MART-1 stammt. Letztendlich führte die Beladung mit beiden unterschiedlichen Antigen-Stategien jeweils zur Induktion von Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Antworten.

Zwei Restimulationen mit Lysat-gepulsten *FastDC* waren ausreichend, um Tumor-spezifische und IFN-γ-produzierende T-Zellen zu aktivieren, wie durch die ELISPOT- und die Zytotoxizitäts-Analyse festgestellt wurde. Die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen konnten wir durch den parallelen Einsatz von Peptid-Antigenen nicht nur im ELISPOT, sondern auch durch die Untersuchungen mit Peptid-spezifischen Tetrameren nachweisen. Die dabei durch Antigen-spezifische aber auch unspezifische DC-Stimulation erreichten Prozentraten an Antigen-spezifischen T-Zellen lagen dabei im Rahmen derer, die z.B. Märten et al. in einem vergleichbaren System mit CEA- bzw. CAP-1-gepulsten DC erzielt hatten [Marten, 2002]. Der Nachweis von Antigen-spezifischen und im Zytotoxizitäts-Versuch funktionell effektiven CTL ermöglichte es uns, in diesem System den Effekt von Gemcitabin und COX-2-Hemmern auf die Sensitivität von PANC-1-Zellen gegenüber der CTL-vermittelten Lyse zu untersuchen.

4.2.2 Direkter Effekt von Gemcitabin und Cyclooxygenase-2-Hemmern auf Pankreaskarzinomzellen

Das Zytostatikum Gemcitabin ist derzeit die Therapie der Wahl für nicht operable Pankreaskarzinom-Patienten [Burris, 1997]. Die hier *in vitro* verwendeten PANC-1-Zellen haben sich allerdings als relativ resistent gegenüber einer Therapie mit Gemcitabin gezeigt, was möglicherweise auf ihre hohe konstitutive Expression des Transkriptionsfaktors NF-κB zurückzuführen ist [Arlt, 2003]. Gemcitabin kann zwar *in vitro* das Wachstum von PANC-1 und anderen Pankreaskarzinomzelllinien reduzieren, erzeugt aber keine relevanten Apoptoseraten in den Zelllinien [Li, 1999; Yip-Schneider, 2001].

NSAR und selektive COX-2-Hemmer inhibieren ebenfalls *in vitro* die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen [Ding, 2000; Molina, 1999; Yip-Schneider, 2001] und für einen der selektiven COX-2-Hemmer konnte auch in einem orthotopen Maus-Modell für das Pankreaskarzinom eine Hemmung des Tumorwachstums gezeigt werden [Tseng,

2002]. Was dagegen die Kapazität der COX-2-Hemmer bei der Induktion von Apoptose in Pankreaskarzinomzellen betrifft, wurden bisher gegensätzliche Resultate berichtet. Während in einer Reihe von Studien argumentiert wird, COX-2-Hemmer würden einen apoptotischen Zelltod initiieren [Ding, 2000; Eibl, 2003; Grosch, 2001], konnten Yip-Schneider et al. in Pankreaskarzinomzellen, die mit COX-2-Hemmern behandelt wurden keine Apoptose beobachten, auch nicht nach Zugabe von Gemcitabin [Yip-Schneider, 2001]. In Übereinstimmung mit den letzteren Erkenntnissen führten weder Gemcitabin noch COX-2-Hemmer alleine (in Konzentrationen von weniger als 100 µM verwendet) oder in Kombination mit Gemcitabin zu relevanter Apoptose in PANC-1-Zellen. Deshalb konnten wir, unbeeinträchtigt von direkten Effekten der Medikamente auf die Tumorzellen, deren indirekte Effekte auf die CTL-vermittelte Lyse von lebenden Pankreaskarzinomzellen untersuchen.

4.2.3 Sensitivierung der Pankreaskarzinomzellen durch Gemcitabin und selektive Cyclooxygenase-2-Hemmer

Sowohl durch eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit Gemcitabin, als auch mit COX-2-Hemmern konnte die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber CTL-Antworten erhöht werden. Allerdings führten nur COX-2-Hemmer zu einer signifikanten Steigerung in der spezifischen Lyse von PANC-1-Zellen. Interessanterweise hatte die kombinierte Vorbehandlung der Tumorzellen mit Gemcitabin plus Celecoxib einen additiven Effekt auf die Sensitivierung gegenüber den CTL. Doch die Analyse von durch *FastDC* induzierte proliferative T-Zell-Antworten zeigte, dass Gemcitabin als antiproliferatives Zytostatikum auch auf die Aktivierung von T-Zellen einen hemmenden Effekt hat. Dies wurde sogar bei einer Konzentration, die nur ein Zehntel derjenigen für die Behandlung der Tumorzellen eingesetzten entsprach beobachtet, wobei diese schon nur weniger als 1 % der Plasma-Spitzen-Konzentration bei Patienten widerspiegelt. Ob Gemcitabin die selben negativen Effekte auf die Induktion von Tumor-spezifischen CTL-Antworten durch DC auch *in vivo* besitzt, muss noch festgestellt werden.

Der mögliche Mechanismus für die Tumorzell-Sensitivierung gegenüber CTL-Antworten durch die COX-2-Hemmer soll in Zukunft noch näher untersucht werden. Die Induktion von Apoptose, genauso wie die Sensitivierung gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Lyse durch COX-2-Hemmer, sind bekanntermaßen unabhängig von einer Expression der COX-2 durch die Tumorzellen und erfordern

Konzentrationen, die etwa 10-mal höher sind, als die für die Inhibition des Enzyms benötigte [Eibl, 2003; Grosch, 2001; Totzke, 2003]. *In vivo* können diese Konzentrationen (50-100 µM) systemisch aber nicht ohne signifikante Toxizität erreicht werden. Die Plasmakonzentrationen, die bei Einnahme der notwendigen Dosis von Celecoxib für die Reduktion des Polypenwachstums in Patienten mit Familiärer-Adenomatöser-Polyposis (400 mg 2 x tägl.) erzielt werden, liegen zwischen 3 bis 5 µM und scheinen gut verträglich zu sein [Grosch, 2001; Phillips, 2002].

4.2.4 Möglicher Mechanismus der Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber CTL-Antworten durch Cyclooxygenase-2-Hemmer

Da die COX-2-Hemmer in den hier eingesetzten Konzentrationen keine Apoptose induzieren, müssen folglich andere Mechanismen an der beobachteten Sensitivierung von PANC-1-Zellen gegenüber der CTL-vermittelten Lyse beteiligt sein. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass COX-2-Hemmer Tumorzellen gegenüber einem CD95-vermittelten Angriff sensitivieren können, und zwar über einen COX-2-unabhängigen Mechanismus [Totzke, 2003]. Deshalb ist eine mögliche Hypothese für die Erklärung der beobachteten Immunsensitivierung der Tumorzellen, dass die Interaktion zwischen CD95 auf den Tumorzellen und CD95-Ligand auf den CTL zu dem beobachteten Anstieg in der CTL-vermittelten Tumorzell-Lyse nach Behandlung mit COX-2-Hemmern beiträgt. Eine Sensitivierung gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Lyse durch COX-2-Hemmer ist bereits für mehrere Zelllinien verschiedenen Ursprungs berichtet worden [Nzeako, 2002; Totzke, 2003].

In einem Modell mit Melanomzelllinien konnte gezeigt werden, dass auch eine Behandlung der Tumorzellen mit klassischen Chemotherapeutika, wie in diesem Falle 5-Fluorouracil (5-FU), einen immunsensitivierenden Effekt haben kann. Die Therapie mit 5-FU führte zu einer gesteigerten Expression von HLA-A2 und ebenfalls von CD95 auf den Tumorzellen und machte sie so gegenüber einer CTL-vermittelten Lyse deutlich anfälliger [Yang, 2004]. Das heißt, sowohl die Erkennung der Tumorzellen durch aktivierte CTL, als auch die Induktion von Apoptose über den Todesrezeptor CD95 kann durch die Therapie mit der Chemotherapie erleichtert werden. Das könnte wahrscheinlich erklären, warum wir in unseren Versuchen durch die Kombination aus COX-2-Hemmung und Chemotherapie mit Gemcitabin einen zusätzlichen synergistischen Effekt auf die Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber einer CTL-vermittelten Lyse feststellen konnten. Die beobachtete Sensitivierung von

Pankreaskarzinomzellen gegenüber der Lyse durch CTL, die evtl. über den CD95-Signalweg vermittelt wird, beschreibt einen neuen Mechanismus für die Steigerung von Immunreaktionen gegen maligne Tumorzellen durch COX-2-Hemmer und liefert ein gutes Argument, sie begleitend mit immuntherapeutischen Strategien wie der DC-basierten Vakzine einzusetzen. Obwohl die inhibitorische Wirkung von Gemcitabin auf die Immunantwort kontraproduktiv für die Kombination mit einer Immuntherapie erscheint, sollte der additive Effekt von COX-2-Hemmern und Gemcitabin auf die Tumorzell-Sensitivierung gegenüber CTL-Antworten weiter untersucht werden.

Interessanterweise ließ sich der Anstieg in der Lyse von PANC-1-Zellen nach der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Celecoxib durch eine Blockade der MHC-I-Moleküle vollständig aufheben. Dies lässt darauf schließen, dass tatsächlich die Tumorzell-Lyse durch Tumor-spezifische CTL gesteigert wird. Möglicherweise spielen auch zusätzliche Mechanismen wie z.B. eine gesteigerte Expression von Tumor-Antigen oder die Aktivierung von pro-apoptotischen Signalwegen eine Rolle bei dem synergistischen Effekt von Gemcitabin und Celecoxib auf die CTL-abhängige Tumorzell-Lyse. Die Effektivität von kombinierten Strategien aus COX-2-Hemmern, Chemotherapie und DC-basierter Vakzine und deren Einfluss auf CTL-Antworten gegen maligne Tumore bleibt *in vivo* noch zu untersuchen.

4.3 Vakzinestrategie mit DC-basierter Immuntherapie und Behandlung mit Gemcitabin und Cyclooxygenase-2-Hemmern

4.3.1 Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit dendritischen Zellen

Die in dieser Arbeit *in vitro* untersuchten und dargestellten Ergebnisse machen Hoffnung, dass auch *in vivo* bei Patienten mit Pankreaskarzinom durch eine kombinierte Strategie aus Immuntherapie und paralleler medikamentöser Behandlung Erfolge erzielt werden können. Allerdings müssen wie bei jeder neuen Therapie auch die möglichen zu erwartenden Nebenwirkungen der Behandlung beachtet und bei der Therapieentscheidung abgewogen werden.

Zur Immuntherapie mit DC gibt es mittlerweile eine große Anzahl von Studien für die verschiedensten Tumorerkrankungen. Obwohl diese neue Therapiestrategie dabei oftmals aus ethischen Gründen nur an Patienten mit weit fortgeschrittener

Tumorerkrankung und Metastasen angewendet wird, konnten trotz der hohen Tumorlast durchaus Erfolge erzielt werden. Für das Pankreaskarzinom, das sich als besonders therapieresistent gegenüber herkömmlichen Ansätzen herausgestellt hat, gibt es aber bisher noch wenige Daten. Stift et al. haben in einer Phase-I-Studie eine Vakzine mit reifen und mit Tumor-Lysat beladenen DC mit einer zusätzlichen systemischen Gabe von Interleukin-2 (IL-2) kombiniert und unter anderem auch bei insgesamt 9 Patienten mit Pankreaskarzinom getestet [Stift, 2003]. Um die durch die intranodale Vakzine erzeugte Immunreaktion zu testen, wurde nach mindestens 4 Vakzinierungen in 3-wöchigen Abständen ein sog. Hypersensibilitätstest vom verzögerten Typ (*Delayed-Type Hypersensitivity Test*, DTH) durchgeführt. In den Unterarm applizierte Antigen-beladene DC führten bei 7 der 9 Patienten (78 %) zu einer Hautinduration und zeigten so eine Antigen-spezifische Immunreaktion des Patienten an. Das mittlere Überleben lag bei 6 Monaten, wobei die Erkrankungen der hier eingeschlossenen Patienten vor der Vakzine bereits einem Tumor Stadium IV (UICC) entsprachen.

Für zukünftige Immuntherapien mit DC ist vor allem auch die Frage nach möglichen Nebenwirkungen einer solchen Therapie wichtig. In der exemplarisch aufgeführten Studie (Stift et al.) konnten jedoch keinerlei höhergradige Nebenwirkungen bei den behandelten Patienten festgestellt werden. Nach dem Prinzip einer DC-basierten Vakzine ist dies zu erwarten, denn letztendlich wird dem Patienten mit den DC ein „Wirkstoff“ appliziert, der vorher aus seinem eigenen Blut gewonnen wurde. Vereinfacht handelt es sich um eine immunologisch aufbereitete Eigenblutspende. Trotzdem fürchtet man bei der Vakzine mit Antigen-beladenen DC eine gravierende Nebenwirkung. Gerade bei der Verwendung von Tumorlysat als Antigenquelle könnten auch gegen die im Lysat enthaltenen physiologischen Antigene Immunreaktionen erzeugt werden und so auf längere Zeit Autoimmunerkrankungen entstehen [Ludewig, 2000]. In der Studie von Stift et al. wurden die Patienten deshalb vor und nach der Vakzinierung auf Auto-Antikörper getestet. Im Verlauf der Therapie entwickelten 4 der insgesamt 20 eingeschlossenen Patienten mit soliden Tumoren Auto-Antikörper, bei 3 der 4 Patienten waren es Anti-Histon-Antikörper. Keiner der behandelten Patienten mit Pankreaskarzinom entwickelte Auto-Antikörper und Anzeichen für eine Autoimmunerkrankung konnten bei keinem der Patienten festgestellt werden [Stift, 2003]. Bei der derzeitigen Prognose des Pankreaskarzinoms wären allerdings selbst später auftretende Autoimmunerkrankungen durch eine Immuntherapie durchaus in Kauf zu nehmen, wenn man dafür eine Verbesserung von Lebensqualität und Überleben der Patienten erreicht.

4.3.2 Medikamentöse Therapie des Pankreaskarzinoms

Die Therapie der Wahl bei Patienten mit Pankreaskarzinom im fortgeschrittenen Stadium ist derzeit eine Mono-Chemotherapie mit Gemcitabin (1000 mg/m^2), idealerweise nach einer möglichst radikalen Operation. Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 dargestellt, sprechen aber nur etwa 20 % der Patienten überhaupt auf diese Therapie an und das mittlere Überleben aller so behandelten liegt nur bei 6 Monaten [Burris, 1997]. Da andere Chemotherapeutika eine noch schlechtere Erfolgsrate aufweisen, wird jetzt verstärkt versucht, mit Kombinationen aus mehreren Medikamenten die Effizienz der Therapie zu steigern [McKenna, 2003]. Die Arbeitsgruppe um Ferrari et al. veröffentlichte kürzlich Ergebnisse aus einer Phase-II- Studie mit 42 Patienten, in der Gemcitabin (1000 mg/m^2) mit Celecoxib (400 mg 2 x tägl.) bei der Therapie des Pankreas-karzinoms kombiniert wurde. Die Resultate sind ermutigend. Zum einen wurde bei über 50 % der Patienten ein klinischer Erfolg (mehr als 70 % mit mindestens stabilem Tumorwachstum) und ein mittleres Überleben von 9,1 Monaten festgestellt, zum anderen waren durch die Kombinationstherapie keine vermehrten Nebenwirkungen festzustellen [Ferrari, 2005]. Auch eine Kombination aus Celecoxib (400 mg 2 x tägl.) und 5-Fluorouracil (5-FU, 200 mg/m^2 2 x tägl.), das vor allem beim Kolonkarzinom zur Standardtherapie zählt, war in einer Pilotstudie als gut durchführbar und von den Patienten gut toleriert getestet worden [Milella, 2004].

Eine alleinige Behandlung mit selektiven COX-2-Hemmern wie Celecoxib mit der für das Kolonkarzinom auch in Deutschland zugelassenen Gesamtdosis von 800 mg pro Tag gestaltet sich für die Patienten nebenwirkungsarm und gut verträglich. So konnte mit einer 6-monatigen Therapie mit Celecoxib bei Patienten mit Familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP) die Zahl der kolorektalen Polypen deutlich gesenkt werden und gleichzeitig traten in der Behandlungsgruppe nicht mehr Nebenwirkungen auf als in der Placebogruppe. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Durchfall (13 %) und Abdominalschmerzen (7 %) [Steinbach, 2000]. Die bei nicht-selektiven Cyclooxygense-Hemmern häufig auftretenden Nebenwirkungen durch die Beeinflussung der Thrombozyten-Funktion und des Magenschutzes sind vor allem über die COX-1 vermittelt. Daher ist das Nebenwirkungsprofil bei selektiven COX-2-Hemmern besser. Allerdings sind diese Medikamente kürzlich in die Schlagzeilen geraten, da ihnen bei langfristiger und hochdosierter Einnahme eine prothrombotische Wirkung nachgesagt wird. Nachdem von vermehrten thrombotischen Ereignissen wie z.B. Herzinfarkt unter der Therapie mit COX-2-Hemmern berichtet wurde, hatte die Pharmaindustrie sogar das Präparat Vioxx® (Rofecoxib) kurzfristig vom Markt

genommen. Andere Studien zeigten gleichzeitig einen positiven Effekt der COX-2-Hemmer auf Endothelzellen und damit sogar eine kardioprotektive Wirkung. Für eine Behandlung von Tumorpatienten bleibt letztendlich abzuwägen, ob der anti-neoplastische Nutzen eine solchen Therapie das kardiovaskuläre Risiko aufwiegen kann.

4.4 Etablierung einer neuen Pankreaskarzinom-Zelllinie

Das Arbeiten mit Tumormaterial in unserem *in vitro*-Modell für eine zukünftige DC-Vakzine bringt zahlreiche Schwierigkeiten mit sich. Zum einen sollte eine Vakzine mit Tumorlysat beladenen DC bei Patienten mit Pankreaskarzinom möglichst regelmäßig und möglichst oft wiederholt werden, um eine effektive und letztendlich dauerhafte Immunreaktion gegen die Tumorantigene zu erzeugen. Dafür würde man aber in vielen Fällen weit mehr Tumormaterial benötigen, als bei einer Operation des Patienten aus dem Resektionspräparat gewonnen werden kann. Zum anderen will man auch bei der *in vitro*-Forschung an Tumorzellen und deren speziellen Eigenschaften und Behandlungsmöglichkeiten mit Zellkulturen arbeiten, die der *in vivo*-Situation noch möglichst nahe kommen.

Die kommerziell zu erwerbenden Zelllinien haben zwar den Vorteil, dass sie schon gut untersucht sind, allerdings sind bei ihnen viele Eigenschaften und Funktionen durch die lange Zellkultur über hunderte Generationen entscheidend verändert. Beispielsweise ist es für eine Zelllinie, die in Reinkultur *in vitro* gehalten wird, nicht mehr notwendig Abwehrmechanismen gegen das Immunsystem aufrecht zu erhalten. Aus diesen Gründen ist es besonders interessant mit frisch etablierten Zelllinien zu arbeiten. Es gelang schließlich im Rahmen dieser Arbeit aus primärem Tumorgewebe die neue Pankreaskarzinom-Zelllinie *HDPC-1* zu etablieren und zu charakterisieren.

4.4.1 Etablierung der neuen Zelllinie *HCPC-1*

Die Etablierung von Zelllinien aus solidem Tumorgewebe wird besonders beim Pankreaskarzinom durch die typische Histologie von einzelnen Tumorzellnestern in Mitten von Bindegewebe erschwert. Bei der Aufbereitung eines solchen Gewebsstücks ist die Zahl der Tumorzellen deutlich geringer als die der übrigen Zellarten, die vor allem Fibroblasten aus dem Stroma darstellen. Außerdem ist es außerordentlich

schwierig, die für die Zellkultur benötigten einzelnen Tumorzellen aus dem zähen und kompakten Tumorgewebe zu lösen, ohne sie dabei zu zerstören. Sind die Zellen erfolgreich in Kultur gebracht, werden die wenigen Tumorzellen oft in kürzester Zeit von den ebenfalls adhärent wachsenden Fibroblasten überwachsen. Trotzdem ist es immer wieder Arbeitsgruppen gelungen, humane Pankreaskarzinom-Zelllinien zu etablieren [Fralix, 2000; Frazier, 1996; Jaffee, 1998]. Häufig wurden die bereits beschriebenen Probleme umgangen, in dem als Ursprungsmateriel der Zelllinien Tumorzellen aus Metastasen [Frazier, 1990; Kato, 1999; Sato, 2000] oder Aszites [Yamada, 1998] isoliert wurden. Dabei musste der Primärtumor nicht operativ angegangen werden und die Tumorzelldichte und –reinheit war höher. Allerdings entsprechen diese metastasierten Zellen in wichtigen ihrer Eigenschaften nicht mehr dem Primärtumor, dessen Gewebsgrenzen sie überwinden konnten. Die in den vorliegenden Versuchen eingesetzten Vergleichszelllinien BXPC-3 [Tan, 1986], MiaPaCa-2 [Yunis, 1977] und PANC-1 [Lieber, 1975] wurden schon vor über 20 Jahren etabliert und sind seitdem ständiger Bestandteil der *in vitro* Pankreaskarzinom-Forschung.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nun erstmals in unserem Labor eine primäre Pankreaskarzinom-Zelllinie zu etablieren. Als Tumorquelle wurde dabei ein Resektionspräparat einer Duodenopankreatektomie nach Whipple verwendet. Die Tumorzellen konnten durch einfaches schaben mit der Skalpellklinge an der Oberfläche des Gewebsstückes aus ihrem bindegewebigen Verband gelöst werden [Torres, 1995]. Die Einzelzelllösung wurde dann in Kultur gebracht und die verbleibenden größeren Gewebsstücke wurden zur Gewinnung von Tumorlysat weiter verwendet. Um aus solch zähen Geweben die Tumorzellen zu lösen werden die Gewebsstücke sonst häufig zuerst maschinell zerkleinert und anschließend einem Cocktail aus Verdauungsenzymen ausgesetzt. Im Gegensatz dazu ist die bei uns angewendete Methode der Tumorzell-Gewinnung deutlich einfacher durchzuführen und bietet außerdem die Möglichkeit, durch zusätzliche Lysat-Herstellung Antigen zur Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit DC zu gewinnen.

4.4.2 Eigenschaften der neuen Zelllinie *HDPC-1*

Wie bereits beschrieben, bestehen solche als Zellsuspension aus Tumorgewebe ausgebrachten Zellkulturen zu Beginn der Kultur in der Regel aus mehreren Zelltypen. Die häufig enthaltenen Fibroblasten sind dabei schlecht von den Tumorzellen zu

unterscheiden, da sie den Tumorzellen in der Proliferation, der Zellform und dem adhärenten Zellwachstum sehr ähnlich sind. Den epithelialen Ursprung, den man bei Tumorzellen erwarten würde, wiesen wir deshalb regelmäßig durch Kontrolle der kultivierten Zellen auf ihre Expression von HEA [Kruger, 2000] und Cytokeratin [Ridwelski, 2001] nach, die üblicherweise zur Diagnostik von Tumorzellen eingesetzt werden. Die neue Zelllinie *HDPC-1* bestand dabei nach etwa 20 Kulturpassagen nachweislich aus einer reinen Kultur von epithelialen Zellen.

Durch den zusätzlichen Nachweis typischer Eigenschaften von Pankreaskarzinomzellen sollte außerdem die Malignität der etablierten Zellen untersucht werden. Zuerst wurden dafür nach Merkmalen maligner Zellen gesucht, die besonders im Rahmen von Immuntherapien in Form der Immunescape-Mechanismen relevant sind. Für die Erkennung des Immunsystems ist eine ausreichende Expression von MHC-I-Molekülen auf den Tumorzellen wichtig, die deshalb bei malignen Zellen häufig unterdrückt ist [Rees, 1999]. Die Zellen der neuen Zelllinie *HDPC-1* exprimierten aber nicht nur in hohem Maße MHC-I, sondern als einzige der getesteten Zellreihen auch MHC-II, das im Normalfall nur auf APC vorkommt. Allerdings hatten schon Scupoli et al. bei einer Untersuchung des MHC-Profils von Pakreaskarzinomzellen bei 3 von 8 (37,5 %) Pankreaskarzinom-Gewebeproben bzw. 6 von 18 (33 %) Pankreaskarzinom-Zelllinien eine MHC-II-Expression festgestellt [Scupoli, 1996]. Auch die Ergebnisse für PANC-1 und MiaPaCa-2 konnten durch diese Vorarbeiten bestätigt werden. Durch die Fähigkeit der Zelllinie *HDPC-1* zur MHC-II-Expression konnte eine Verunreinigung der Zellkultur durch andere Zelltypen ausgeschlossen werden.

Ein anderer Ausweich-Mechanismus der Tumorzellen vor dem Immunsystem ist die Produktion von immunsuppressiv wirkenden Zytokinen wie IL-10 oder TGF-β, die auch beim Pankreaskarzinom eine effektive Immunreaktion verhindern können [Bellone, 1999]. Wir konnten in allen untersuchten Zelllinien sowohl IL-10 wie auch TGF-β nachweisen, wobei die Produktion der neuen Zelllinie *HDPC-1* mehr als 15-fach höher war als die der Vergleichszelllinien. Das kann ein Hinweis darauf sein, wie wichtig es ist, für immunologische Forschung auch auf frisch etablierte Zelllinien zurückgreifen zu können, die noch möglichst viele ihrer Eigenschaften erhalten haben.

Diese Eigenschaften sind zwar hinweisend auf maligne Zellen, aber keineswegs spezifisch für Zellen des Pankreaskarzinoms. Auch die im Überstand von *HDPC-1* registrierten Tumormarker CEA und CA125 sind ein weiterer Hinweis, jedoch ebenfalls nicht nur beim Pankreaskarzinom zu finden. Allerdings entstehen im Verlauf der

Karzinogenese des Pankreaskarzinoms charakteristische genetische Alterationen, die bei der Identifizierung der Zellen weiterführen könnten. So entstehen regelmäßig Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 und dem Protoonkogen k-ras. Eine Mutation von k-ras kommt bei über 90 % der Pankreaskarzinome vor und eine Mutation im Kodon 12 von k-ras gilt als Tumor-spezifisch [Berndt, 1998; Luttges, 1999]. Auch die Vergleichszelllinien PANC-1 und MiaPaCa-2 tragen diese Mutation, wohingegen bei BXPC-3 ein Wildtyp vorliegt [Nakada, 2001]. Bei etwa zwei Drittel der Mutationen besteht eine Verschiebung von GGT zu GAT, was einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat entspricht. Die neue Zelllinie *HDPC-1* wies zwar im Tumorsuppressorgen p53 keine relevanten Alterationen auf, konnte aber durch die charakteristische Mutation im Kodon 12 von k-ras (GGT zu GAT) eindeutig einem Pankreaskarzinom zugeordnet werden.

Für die weitere Erforschung der Effekte von COX-2-Hemmern auf Pankreaskarzinomzellen konnte die neue Zelllinie *HDPC-1* deshalb ohne weiteres eingesetzt werden. Dabei zeigte sie eine gute Proliferationshemmung durch Behandlung mit selektiven COX-2-Hemmern und im indirekten Nachweis auch eine deutliche Expression der COX-2 und scheint damit auch für den Einsatz in weiteren Versuchsmodellen zur Wirkung von COX-2-Hemmern geeignet zu sein. Außerdem ist eine Einreichung der Zelllinie bei Zellbank der *American Type Culture Collection* (ATCC) geplant.

4.5 Ausblick

In den letzten Jahren wurde im Kampf gegen maligne Tumore stetig nach neuen und effektiveren Behandlungsstrategien gesucht. Das Pankreaskarzinom steht dabei wegen seiner relativ geringen Inzidenz bisher nicht im Vordergrund, eine Optimierung der derzeitigen Therapie erscheint aber auf Grund der immer noch verheerenden Prognose der Erkrankung relevant. Durch das genauere Verständnis von Karzinogenese und Tumorimmunologie ist die Immuntherapie von malignen Tumoren ein wichtiger Teil der neuen Therapiestrategien geworden.

Es wurden mittlerweile weltweit klinische Studien initiiert, in deren Mittelpunkt eine Immuntherapie mit DC steht. Insgesamt konnte dabei festgestellt werden, dass ein klinischer Einsatz von DC gut durchführbar und nur mit sehr geringen Nebenwirkungen verbunden ist. Bisher wurde keine wesentliche Autoimmunität induziert. Ein klinisches

Ansprechen auf die Behandlung wird von den meisten Arbeitsgruppen beschrieben und reicht von einer Stabilisierung der Erkrankung über partielle bis zu kompletten Remissionen. Begleitanalysen, wie ELISPOT-Untersuchungen, *delayed type hypersensitivity reaction* (DTH-Reaktion) und Messungen der Zytokinproduktion oder auch der Zell-vermittelten Zytotoxizität von peripheren Blutlymphozyten demonstrieren das Vorliegen einer durch die DC-Therapie induzierten Immunantwort.

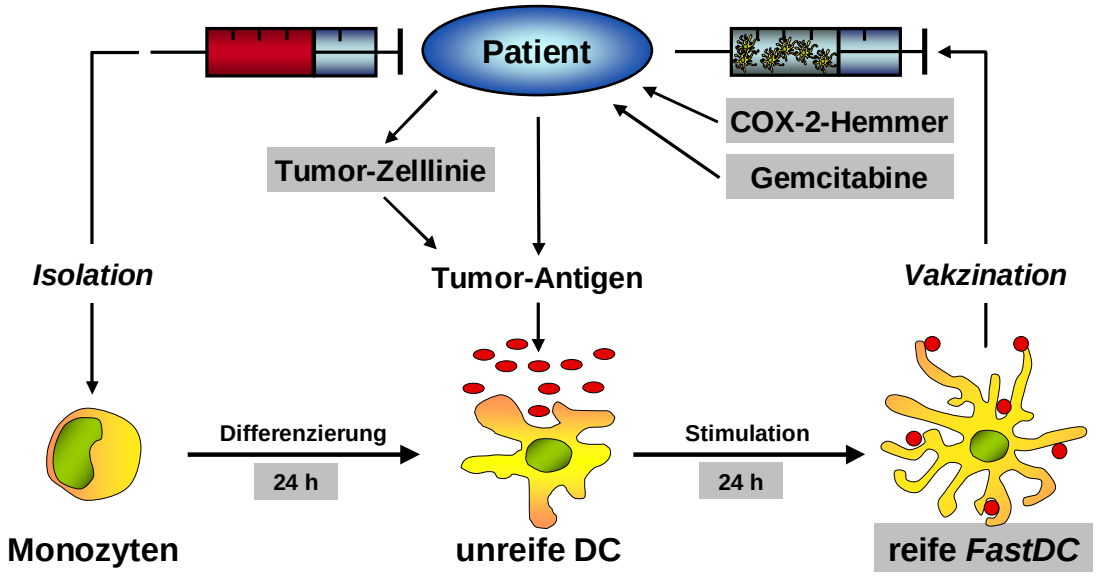

Abbildung 30: Optimiertes Vakzineschema für eine Immuntherapie mit DC. Der Einsatz von *FastDC*, jeweils frisch etablierten Zelllinien und einer Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und COX-2-Hemmern könnte die Effektivität einer DC-basierten Immuntherapie deutlich steigern.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine DC-Vakzine für Patienten mit Pankreaskarzinom optimiert und ihre Effektivität *in vitro* überprüft werden. Die erzielten Ergebnisse könnten eine Vakzine-Therapie dabei an verschiedenen Stellen verbessern (siehe Abb. 30). Der Einsatz von *FastDC* hat sich als einfacher, ertragreicher und weniger störanfällig erwiesen als nach Standard generierte DC. Sie können alle Anforderungen für eine effektive Immuntherapie, wie Antigen-Aufnahme, Antigen-Präsentation und *priming* naiver T-Zellen erfüllen. Durch die nur 48-stündige Kulturzeit der *FastDC* können Kosten und Risiken einer Vakzine minimiert werden und durch die größere Ausbeute an funktionsfähigen *FastDC* die Effektivität für den Patienten deutlich gesteigert werden.

Außerdem konnte in den vorliegenden Versuchen gezeigt werden, dass eine DC-basierte Vakzine mit einer Therapie aus Gemcitabin und COX-2-Hemmern kombiniert werden kann. Dabei sollten die Tumorzellen durch die medikamentöse Behandlung gegenüber der durch die DC hervor gerufene Immunantwort sensitiviert werden. Beide Substanzen sind außerdem bereits alleine eingesetzt gut antineoplastisch wirksam und haben ein relativ geringes Nebenwirkungsprofil. Um die *in vitro* festgestellte Hemmung der T-Zell-Funktion durch die Medikamente zu reduzieren, könnte die Applikation von *FastDC*-Vakzine und Chemotherapie zum Beispiel zeitlich alternierend durchgeführt werden. Die der Sensitivierung zu Grunde liegenden Mechanismen sollten zum genauen Verständnis und einer spezifischen Behandlung näher untersucht werden.

Zusätzlich sollte weiter an der Etablierung primärer Tumorzelllinien aus primärem Patientenmaterial gearbeitet werden. Zum einen sind so wichtige Zelleigenschaften an möglichst unverändertem Tumorgewebe zu erforschen und zum anderen stehen den Patienten so unerschöpfliche Antigen-Quellen zur Verfügung, die auch eine längerfristige regelmäßige Vakzinierung mit Antigen-beladenen *FastDC* möglich machen. Es bleibt zu untersuchen, ob die hier *in vitro* erzielten ermutigenden Ergebnisse bei der *in vivo*-Gabe von *FastDC* und kombinierter Therapie aus Gemcitabin und COX-2-Hemmern bei Patienten mit Pankreaskarzinom eine vergleichbare Wirkung erzielen. Die Immuntherapie könnte so, gerade bei gegenüber derzeitigen Standard-Therapien resistenten malignen Erkrankungen, eine wichtige neue Therapieoption darstellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das fortgeschrittene Pankreaskarzinom besitzt eine sehr schlechte Prognose. Die Erfolge der derzeit als Standard eingesetzten Chemotherapie mit Gemcitabin sind unzureichend. Deshalb ist die Entwicklung alternativer Therapiestrategien dringend erforderlich. Eine besondere Rolle kommt dabei dendritischen Zellen (DC) zu, die als hochpotente Antigen-präsentierende Zellen eine Tumor-spezifische Immunreaktion *in vivo* induzieren können. Es sind Strategien für eine Vakzinetherapie mit *in vitro* ausgereiften DC entwickelt worden, die zur Therapie von Patienten mit malignen Tumoren eingesetzt werden können. Jedoch zeigten in den bisherigen klinischen Studien nur wenige Patienten mit soliden Tumoren ein klinisches Ansprechen auf eine DC-basierte Vakzine. Möglichkeiten, die Erfolge der DC-basierten antitumoralen Immuntherapie zu verbessern, liegen in der Optimierung der Protokolle zur DC-Generierung und in der Kombination mit anderen, z.B. pharmakologischen Therapien. Neben der bereits etablierten Chemotherapie bieten sich hier selektive COX-2-Hemmer an, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation maligne entarteter Zellen hemmen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro*-Modell für eine DC-basierte Vakzine für Patienten mit Pankreaskarzinom verwendet, um die Fähigkeit nach einem neuen, verkürzten Protokoll generierter *FastDC*, zytotoxische T-Zell-Antworten gegen Tumor-Antigene zu induzieren, zu testen. Außerdem wurde untersucht, ob eine zusätzliche Therapie mit Gemcitabin und selektiven COX-2-Hemmern Pankreaskarzinomzellen gegen die induzierte zytotoxische T-Zell-Antwort sensitivieren kann. Um die Kompatibilität dieser medikamentösen Behandlung mit einer DC-basierten Immuntherapie zu überprüfen, wurden die Effekte von Gemcitabin und COX-2-Hemmern auf das Überleben, den Phänotyp und die T-Zell-stimulatorische Kapazität der DC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *FastDC* alle für eine DC-basierte Vakzine notwendigen Eigenschaften aufweisen; darüber hinaus wird durch die Beladung mit Tumorlysat aus Pankreaskarzinomzellen ihr Überleben und ihre Funktion nicht negativ beeinflusst. Tumorlysat-beladene *FastD*C induzieren zytotoxische T-Zellen, die Pankreaskarzinomzellen erkennen und lysieren können. Die über zytotoxische T-Zellen vermittelte Lyse konnte durch eine Vorinkubation der Pankreaskarzinomzellen mit Gemcitabin oder Celecoxib deutlich gesteigert werden. Besonders effektiv ist die Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber der zytotoxischen T-Zell-Antwort bei Kombination von Gemcitabin und Celecoxib. Die für den klinischen

Einsatz untersuchten Wirkungen der Medikamente auf *FastDC* und T-Zellen erbrachte unterschiedliche Ergebnisse: während die *FastDC* von einer Inkubation mit den Pharmaka unbeeinflusst blieben, führten hohe Konzentrationen zu einer Hemmung von aktivierten T-Zellen *in vitro*. Die Signifikanz dieser Befunde sollte zunächst in nachfolgenden Arbeiten im murinen Tumormodell überprüft werden.

Die Untersuchung der Mechanismen, die zu einer Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber T-Zellantworten führen, ist besonders gut an frisch etablierten Zelllinien möglich, die gegenüber lange *in vitro* kultivierten Zelllinien keine wesentlichen Veränderungen ihrer immuninhibitorischen Eigenschaften aufweisen. Zu diesem Zweck etablierten und charakterisierten wir aus Patientenmaterial eine neue Pankreaskarzinomzelllinie (*HDPC-1*). Die Zellen wiesen alle Charakteristika malignen Wachstums auf und zeigten darüberhinaus Eigenschaften, die sie für den Einsatz in Versuchen zur DC-basierten Immuntherapie des Pankreaskarzinoms interessant machen, wie z.B. das hohe Maß an Expression von MHC-Molekülen.

LITERATURVERZEICHNIS

Ahrendt, S. A. and Pitt, H. A. (2002). "Surgical management of pancreatic cancer". *Oncology (Williston Park) 16:725-34*.

Akiyama, Y., Maruyama, K., Nara, N., Hojo, T., Cheng, J. Y., Mori, T., Wiltrout, R. H. and Yamaguchi, K. (2002). "Antitumor effects induced by dendritic cell-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters". *Cancer Lett 184:37-47*.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. and Bhardwaj, N. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes". *J Exp Med 188:1359-68*.

Arlt, A., Gehrz, A., Muerkoster, S., Vorndamm, J., Kruse, M. L., Folsch, U. R. and Schafer, H. (2003). "Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death". *Oncogene 22:3243-51*.

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

Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R. and Fay, J. (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine". *Cancer Res 61:6451-8*.

Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity". *Nature 392:245-52*.

Bardeesy, N. and DePinho, R. A. (2002). "Pancreatic cancer biology and genetics". *Nat Rev Cancer 2:897-909*.

Bellone, G., Turletti, A., Artusio, E., Mareschi, K., Carbone, A., Tibaudi, D., Robecchi, A., Emanuelli, G. and Rodeck, U. (1999). "Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients". *Am J Pathol 155:537-47*.

Belz, G. T., Carbone, F. R. and Heath, W. R. (2002). "Cross-presentation of antigens by dendritic cells". *Crit Rev Immunol 22:439-48*.

Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help". *J Exp Med 186:65-70*.

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

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

Berndt, C., Haubold, K., Wenger, F., Brux, B., Muller, J., Bendzko, P., Hillebrand, T., Kottgen, E. and Zanow, J. (1998). "K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases". *Clin Chem 44:2103-7*.

Billiau, A. (1996). "Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis". *Adv Immunol 62:61-130*.

Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A. (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes". *Annu Rev Immunol 12:337-65*.

Brand, R. E. and Tempero, M. A. (1998). "Pancreatic cancer". *Curr Opin Oncol 10:362-6*.

Bruns, C. J., Shrader, M., Harbison, M. T., Portera, C., Solorzano, C. C., Jauch, K. W., Hicklin, D.J., Radinsky, R., Ellis, L.M. (2002). "Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice". *Int J Cancer 102(2):101-8.*

Bubenik, J. (1996). "Gene transfer for immunotherapy of cancer". *Gene Ther 3:944-5*.

Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D. and Von Hoff, D. D. (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial". *J Clin Oncol 15:2403-13*.

Carbone, F. R., Kurts, C., Bennett, S. R., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1998). "Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance". *Immunol Today 19:368-73*.

Cascinu, S., Graziano, F. and Catalano, G. (1999). "Chemotherapy for advanced pancreatic cancer: it may no longer be ignored". *Ann Oncol 10:105-9*.

Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. and Banchereau, J. (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells". *Nature 360:258-61*.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D. and Banchereau, J. (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha". *J Exp Med 184:695-706*.

Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. and Lanzavecchia, A. (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells". *Nature 388:782-7*.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation". *J Exp Med 184:747-52*.

Correale, P., Aquino, A., Giuliani, A., Pellegrini, M., Micheli, L., Cusi, M. G., Nencini, C., Petrioli, R., Prete, S. P., De Vecchis, L., Turriziani, M., Giorgi, G., Bonmassar, E. and Francini, G. (2003). "Treatment of colon and breast carcinoma cells with 5-fluorouracil enhances expression of carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-A(*)02.01 restricted, CEA-peptide-specific cytotoxic T cells in vitro". *Int J Cancer 104:437-45*.

Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H. P., Nilsson, L. A., Klareskog, L. and Ouchterlony, O. (1988). "Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells". *J Immunol Methods 110:29-36*.

Dallal, R. M., Christakos, P., Lee, K., Egawa, S., Son, Y. I. and Lotze, M. T. (2002). "Paucity of dendritic cells in pancreatic cancer". *Surgery 131:135-8*.

Dauer, M., Obermaier, B., Herten, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S. and Eigler, A. (2003). "Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors". *J Immunol 170:4069-76*.

DeLong, P., Tanaka, T., Kruklitis, R., Henry, A. C., Kapoor, V., Kaiser, L. R., Sterman, D. H. and Albelda, S. M. (2003). "Use of cyclooxygenase-2 inhibition to enhance the efficacy of immunotherapy". *Cancer Res 63:7845-52*.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. and Bhardwaj, N. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells". *J Exp Med 193:233-8*.

DiMagno, E. P., Reber, H. A. and Tempero, M. A. (1999). "AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association". *Gastroenterology 117:1464-84*.

Ding, X. Z., Tong, W. G. and Adrian, T. E. (2000). "Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells". *Anticancer Res 20:2625-31*.

Eibl, G., Reber, H. A., Wente, M. N. and Hines, O. J. (2003). "The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide induces apoptosis in pancreatic cancer cells independent of COX-2". *Pancreas 26:33-41*.

Elder, D. J., Halton, D. E., Hague, A. and Paraskeva, C. (1997). "Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression". *Clin Cancer Res 3:1679-83*.

Faiola, B., Doyle, C., Gilboa, E. and Nair, S. (2002). "Influence of CD4 T cells and the source of major histocompatibility complex class II-restricted peptides on cytotoxic T-cell priming by dendritic cells". *Immunology 105:47-55*.

Farrar, M. A. and Schreiber, R. D. (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor". *Annu Rev Immunol 11:571-611*.

Ferrari, V., Valcamonico, F., Amoroso, V., Simoncini, E., Vassalli, L., Marpicati, P., Rangoni, G., Grisanti, S., Tiberio, G. A., Nodari, F., Strina, C. and Marini, G. (2005). "Gemcitabine plus celecoxib (GECO) in advanced pancreatic cancer: a phase II trial". *Cancer Chemother Pharmacol:1-6*.

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

Fletcher, B. S., Kujubu, D. A., Perrin, D. M. and Herschman, H. R. (1992). "Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase". *J Biol Chem 267:4338-44*.

Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Breen, J. K., Strang, G., Ruegg, C. L. and Engleman, E. G. (2001). "Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy". *J Immunol 167:7150-6*.

Fong, L. and Engleman, E. G. (2000). "Dendritic cells in cancer immunotherapy". *Annu Rev Immunol 18:245-73*.

Fralix, K. D., Ahmed, M. M., Mattingly, C., Swiderski, C., McGrath, P. C., Venkatasubbarao, K., Kamada, N., Mohiuddin, M., Strodel, W. E. and Freeman, J. W. (2000). "Characterization of a newly established human pancreatic carcinoma cell line, UK Pan-1". *Cancer 88:2010-21*.

Frazier, M. L., Fernandez, E., de Llorens, R., Brown, N. M., Pathak, S., Cleary, K. R., Abbruzzese, J. L., Berry, K., Olive, M., Le Maistre, A. and Evans, D. B. (1996). "Pancreatic adenocarcinoma cell line, MDAPanc-28, with features of both acinar and ductal cells". *Int J Pancreatol 19:31-8*.

Frazier, M. L., Pathak, S., Wang, Z. W., Cleary, K., Singletary, S. E., Olive, M., Mackay, B., Steck, P. A. and Levin, B. (1990). "Establishment of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line, MDAPanc-3". *Pancreas 5:8-16*.

Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S. and Carbone, D. P. (1998). "Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo". *Blood 92:4150-66*.

Gilboa, E. (1999). "How tumors escape immune destruction and what we can do about it". *Cancer Immunol Immunother 48:382-5*.

Gilboa, E., Lyerly, H. K., Vieweg, J. and Saito, S. (1994). "Immunotherapy of cancer using cytokine gene-modified tumor vaccines". *Semin Cancer Biol 5:409-17*.

Giovannucci, E., Egan, K. M., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C. and Speizer, F. E. (1995). "Aspirin and the risk of colorectal cancer in women". *N Engl J Med 333:609-14*.

Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A. and McMichael, A. (1987). "Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2". *Nature 326:881-2*.

Green, M. R. (1996). "Gemcitabine safety overview". *Semin Oncol 23:32-5*.

Grosch, S., Tegeder, I., Niederberger, E., Brautigam, L. and Geisslinger, G. (2001). "COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib". *Faseb J 15:2742-4*.

Grover, J. K., Yadav, S., Vats, V. and Joshi, Y. K. (2003). "Cyclo-oxygenase 2 inhibitors: emerging roles in the gut". *Int J Colorectal Dis 18:279-91*.

Grunewald, R., Kantarjian, H., Du, M., Faucher, K., Tarassoff, P. and Plunkett, W. (1992). "Gemcitabine in leukemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study". *J Clin Oncol 10:406-13*.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. and Amigorena, S. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells". *Annu Rev Immunol 20:621-67*.

Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response". *Blood 90:3245-87*.

Heinemann, V., Quietzsch, D., Gieseler, F., Gonnermann, M., Schonekas, H., Rost, A., Neuhaus, H., Haag, C., Clemens, M., Heinrich, B., Vehling-Kaiser, U., Fuchs, M., Fleckenstein, D., Gesierich, W., Uthgenannt, D., Einsele, H., Holstege, A., Hinke, A., Schalhorn, A., Wilkowski, R. (2006). "Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer". *J Clin Oncol 24(24):3946-52.*

Hla, T. and Neilson, K. (1992). "Human cyclooxygenase-2 cDNA". *Proc Natl Acad Sci U S A 89:7384-8*.

Ho, C. S., Munster, D., Pyke, C. M., Hart, D. N. and Lopez, J. A. (2002). "Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines". *Blood 99:2897-904*.

Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack". *J Leukoc Biol 71:907-20*.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R. M. (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor". *J Exp Med 176:1693-702*.

Inaba, K., Young, J. W. and Steinman, R. M. (1987). "Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells". *J Exp Med 166:182-94*.

Itakura, J., Ishiwata, T., Friess, H., Fujii, H., Matsumoto, Y., Buchler, M. W. and Korc, M. (1997). "Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression". *Clin Cancer Res 3:1309-16*.

Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells". *J Immunol 163:1409-19*.

Jaffee, E. M., Schutte, M., Gossett, J., Morsberger, L. A., Adler, A. J., Thomas, M., Greten, T. F., Hruban, R. H., Yeo, C. J. and Griffin, C. A. (1998). "Development and characterization of a cytokine-secreting pancreatic adenocarcinoma vaccine from primary tumors for use in clinical trials". *Cancer J Sci Am 4:194-203*.

Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E. and Thun, M. J. (2003). "Cancer statistics, 2003". *CA Cancer J Clin 53:5-26*.

Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M. and Harding, C. V. (1999). "Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis". *J Immunol 163:4224-31*.

Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A. H. (2001). "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 93:243-51*.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A. H. (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions". *Eur J Immunol 27:3135-42*.

Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M. and Kapsenberg, M. L. (1998). "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation". *J Immunol 161:2804-9*.

Kalyuzhny, A. and Stark, S. (2001). "A simple method to reduce the background and improve well-to-well reproducibility of staining in ELISPOT assays". *J Immunol Methods 257:93-7*.

Kato, M., Shimada, Y., Tanaka, H., Hosotani, R., Ohshio, G., Ishizaki, K. and Imamura, M. (1999). "Characterization of six cell lines established from human pancreatic adenocarcinomas". *Cancer 85:832-40*.

Kobie, J. J., Wu, R. S., Kurt, R. A., Lou, S., Adelman, M. K., Whitesell, L. J., Ramanathapuram, L. V., Arteaga, C. L. and Akporiaye, E. T. (2003). "Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines". *Cancer Res 63:1860-4*.

Kokawa, A., Kondo, H., Gotoda, T., Ono, H., Saito, D., Nakadaira, S., Kosuge, T. and Yoshida, S. (2001). "Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors". *Cancer 91:333-8*.

Kruger, W., Datta, C., Badbaran, A., Togel, F., Gutensohn, K., Carrero, I., Kroger, N., Janicke, F. and Zander, A. R. (2000). "Immunomagnetic tumor cell selection--implications for the detection of disseminated cancer cells". *Transfusion 40:1489-93*.

Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P. D., Roederer, M. and Davis, M. M. (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients". *Nat Med 5:677-85*.

Li, Y., Singh, B., Ali, N. and Sarkar, F. H. (1999). "Induction of growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells by auristatin-PE and gemcitabine". *Int J Mol Med 3:647-53*.

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

Ljunggren, H. G. and Karre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition". *Immunol Today 11:237-44*.

Ludewig, B., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (2000). "Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease". *J Exp Med 191:795-804*.

Luft, T., Jefford, M., Luetjens, P., Toy, T., Hochrein, H., Masterman, K. A., Maliszewski, C., Shortman, K., Cebon, J. and Maraskovsky, E. (2002). "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets". *Blood 100:1362-72*.

Luttges, J., Schlehe, B., Menke, M. A., Vogel, I., Henne-Bruns, D. and Kloppel, G. (1999). "The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium". *Cancer 85:1703-10*.

Marnett, L. J. and DuBois, R. N. (2002). "COX-2: a target for colon cancer prevention". *Annu Rev Pharmacol Toxicol 42:55-80*.

Marten, A., Greten, T., Ziske, C., Renoth, S., Schottker, B., Buttgereit, P., Schakowski, F., von Rucker, A., Sauerbruch, T. and Schmidt-Wolf, I. H. (2002). "Generation of activated and antigen-specific T cells with cytotoxic activity after co-culture with dendritic cells". *Cancer Immunol Immunother 51:25-32*.

Marten, A., Schottker, B., Ziske, C., Weineck, S., Buttgereit, P., Huhn, D., Sauerbruch, T. and Schmidt-Wolf, I. G. (2000). "Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with CA 19-9 protein". *J Immunother 23:464-72*.

Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. and Green, D. R. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl". *J Exp Med 182:1545-56*.

Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Settle, S. L., Woerner, B. M., Edwards, D. A., Flickinger, A. G., Moore, R. J. and Seibert, K. (2000). "Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors". *Cancer Res 60:1306-11*.

McKenna, S. and Eatock, M. (2003). "The medical management of pancreatic cancer: a review". *Oncologist 8:149-60*.

Merati, K., said Siadaty, M., Andea, A., Sarkar, F., Ben-Josef, E., Mohammad, R., Philip, P., Shields, A. F., Vaitkevicius, V., Grignon, D. J. and Adsay, N. V. (2001). "Expression of inflammatory modulator COX-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its relationship to pathologic and clinical parameters". *Am J Clin Oncol 24:447-52*.

Milella, M., Gelibter, A., Di Cosimo, S., Bria, E., Ruggeri, E. M., Carlini, P., Malaguti, P., Pellicciotta, M., Terzoli, E. and Cognetti, F. (2004). "Pilot study of celecoxib and infusional 5-fluorouracil as second-line treatment for advanced pancreatic carcinoma". *Cancer 101:133-8*.

Mingari, M. C., Poggi, A., Biassoni, R., Bellomo, R., Ciccone, E., Pella, N., Morelli, L., Verdiani, S., Moretta, A. and Moretta, L. (1991). "In vitro proliferation and cloning of CD3- CD16+ cells from human thymocyte precursors". *J Exp Med 174:21-6*.

Molina, M. A., Sitja-Arnau, M., Lemoine, M. G., Frazier, M. L. and Sinicrope, F. A. (1999). "Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs". *Cancer Res 59:4356-62*.

Morel, A. S., Quaratino, S., Douek, D. C. and Londei, M. (1997). "Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step". *Eur J Immunol 27:26-34*.

Morse, M. A., Coleman, R. E., Akabani, G., Niehaus, N., Coleman, D. and Lyerly, H. K. (1999). "Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies". *Cancer Res 59:56-8*.

Murphy, G., Tjoa, B., Ragde, H., Kenny, G. and Boynton, A. (1996). "Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen". *Prostate 29:371-80*.

Murphy, K. M. and Reiner, S. L. (2002). "The lineage decisions of helper T cells". *Nat Rev Immunol 2:933-44*.

Nair, S. K., Snyder, D., Rouse, B. T. and Gilboa, E. (1997). "Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts". *Int J Cancer 70:706-15*.

Nakada, Y., Saito, S., Ohzawa, K., Morioka, C. Y., Kita, K., Minemura, M., Takahara, T. and Watanabe, A. (2001). "Antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines". *Pancreatology 1:314-9*.

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

Niederhuber, J. E., Brennan, M. F. and Menck, H. R. (1995). "The National Cancer Data Base report on pancreatic cancer". *Cancer 76:1671-7*.

Nowak, A. K., Lake, R. A., Marzo, A. L., Scott, B., Heath, W. R., Collins, E. J., Frelinger, J. A. and Robinson, B. W. (2003). "Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells". *J Immunol 170:4905-13*.

Nzeako, U. C., Guicciardi, M. E., Yoon, J. H., Bronk, S. F. and Gores, G. J. (2002). "COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells". *Hepatology 35:552-9*.

Obermaier, B., Dauer, M., Herten, J., Schad, K., Endres, S. and Eigler, A. (2003). "Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes". *Biol Proced Online 5:197-203*.

Ochsenbein, A. F., Klenerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1999). "Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance". *Proc Natl Acad Sci U S A 96:2233-8*.

Ochsenbein, A. F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hermans, J., Hemmi, S., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (2001). "Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction". *Nature 411:1058-64*.

Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D. D., Nixon, D. F. and McMichael, A. J. (1998). "Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA". *Science 279:2103-6*.

Ohm, J. E. and Carbone, D. P. (2001). "VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency". *Immunol Res 23:263-72*.

Ohta, T., Elnemr, A., Kitagawa, H., Kayahara, M., Takamura, H., Fujimura, T., Nishimura, G., Shimizu, K., Yi, S. Q. and Miwa, K. (2004). "Fas ligand expression in human pancreatic cancer". *Oncol Rep 12:749-54*.

Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F. and Gluckman, J. C. (1998). "Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation". *J Immunol 160:4587-95*.

Pestka, S. (2000). "The human interferon alpha species and receptors". *Biopolymers 55:254-87*.

Phillips, R. K., Wallace, M. H., Lynch, P. M., Hawk, E., Gordon, G. B., Saunders, B. P., Wakabayashi, N., Shen, Y., Zimmerman, S., Godio, L., Rodrigues-Bigas, M., Su, L. K., Sherman, J., Kelloff, G., Levin, B. and Steinbach, G. (2002). "A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis". *Gut 50:857-60*.

Piazza, G. A., Rahm, A. K., Finn, T. S., Fryer, B. H., Li, H., Stoumen, A. L., Pamukcu, R. and Ahnen, D. J. (1997). "Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction".

Cancer Res 57:2452-9.

Pockaj, B. A., Basu, G. D., Pathangey, L. B., Gray, R. J., Hernandez, J. L., Gendler, S. J. and Mukherjee, P. (2004). "Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer". *Ann Surg Oncol 11:328-39*.

Randolph, G. J. (2001). "Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators". *Semin Immunol 13:267-74*.

Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M. and Muller, W. A. (1998). "Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking". *Science 282:480-3*.

Rees, R. C. and Mian, S. (1999). "Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses". *Cancer Immunol Immunother 48:374-81*.

Reinhard, G., Marten, A., Kiske, S. M., Feil, F., Bieber, T. and Schmidt-Wolf, I. G. (2002). "Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy". *Br J Cancer 86:1529-33*.

Reutelingsperger, C. P. and van Heerde, W. L. (1997). "Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis". *Cell Mol Life Sci 53:527-32*.

Ridge, J. P., Di Rosa, F. and Matzinger, P. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell". *Nature 393:474-8*.

Ridwelski, K., Meyer, F., Fahlke, J., Kasper, U., Roessner, A. and Lippert, H. (2001). "[Value of cytokeratin and Ca 19-9 antigen in immunohistological detection of disseminated tumor cells in lymph nodes in pancreas carcinoma]". *Chirurg 72:920-6*.

Rieser, C., Bock, G., Klocker, H., Bartsch, G. and Thurnher, M. (1997). "Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production". *J Exp Med 186:1603-8*.

Rodewald, H. R., Moingeon, P., Lucich, J. L., Dosiou, C., Lopez, P. and Reinherz, E. L. (1992). "A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells". *Cell 69:139-50*.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. and Schuler, G. (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood". *J Exp Med 180:83-93*.

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D. and Schuler, G. (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability". *J Immunol Methods 196:137-51*.

Rosewicz, S. and Wiedenmann, B. (1997). "Pancreatic carcinoma". *Lancet 349:485-9*.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha". *J Exp Med 179:1109-18*.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2000). "Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression". *Immunol Rev 177:134-40*.

Salter, R. D., Howell, D. N. and Cresswell, P. (1985). "Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids". *Immunogenetics 21:235-46*.

Saraya, K. and Reid, C. D. (1996). "Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ progenitors in bone marrow and cord blood". *Br J Haematol 93:258-64*.

Sato, N., Mizumoto, K., Beppu, K., Maehara, N., Kusumoto, M., Nabae, T., Morisaki, T., Katano, M. and Tanaka, M. (2000). "Establishment of a new human pancreatic cancer cell line, NOR-P1, with high angiogenic activity and metastatic potential". *Cancer Lett 155:153-61*.

Sato, T., Kirimura, Y. and Mori, Y. (1997). "The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts". *J Invest Dermatol 109:334-9*.

Satoh, K., Shimosegawa, T., Masamune, A., Hirota, M., Koizumi, M. and Toyota, T. (1999). "Fas ligand is frequently expressed in human pancreatic duct cell carcinoma". *Pancreas 19:339-45*.

Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R. and Groettrup, M. (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells". *Blood 100:1354-61*.

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

Schnurr, M., Scholz, C., Rothenfusser, S., Galambos, P., Dauer, M., Robe, J., Endres, S. and Eigler, A. (2002). "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 62:2347-52*.

Schnurr, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S. and Eigler, A. (2000). "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells". *J Immunol 165:4704-9*.

Scholler, N., Hayden-Ledbetter, M., Dahlin, A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E. and Ledbetter, J. A. (2002). "Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity". *J Immunol 168:2599-602*.

Schuler, G. and Steinman, R. M. (1997). "Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors". *J Exp Med 186:1183-7*.

Scupoli, M. T., Sartoris, S., Tosi, G., Ennas, M. G., Nicolis, M., Cestari, T., Zamboni, G., Martignoni, G., Lemoine, N. R., Scarpa, A. and Accolla, R. S. (1996). "Expression of MHC class I and class II antigens in pancreatic adenocarcinomas". *Tissue Antigens 48:301-11*.

Seo, Y., Baba, H., Fukuda, T., Takashima, M. and Sugimachi, K. (2000). "High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma". *Cancer 88:2239-45*.

Shin, J. Y., Lee, S. K., Kang, C. D., Chung, J. S., Lee, E. Y., Seo, S. Y., Lee, S. Y., Baek, S. Y., Kim, B. S., Kim, J. B. and Yoon, S. (2003). "Antitumor effect of intratumoral administration of dendritic cell combination with vincristine chemotherapy in a murine fibrosarcoma model". *Histol Histopathol 18:435-47*.

Shortman, K. and Heath, W. R. (2001). "Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells". *Nat Immunol 2:988-9*.

Shortman, K. and Liu, Y. J. (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes". *Nat Rev Immunol 2:151-61*.

Sombroek, C. C., Stam, A. G., Masterson, A. J., Lougheed, S. M., Schakel, M. J., Meijer, C. J., Pinedo, H. M., van den Eertwegh, A. J., Scheper, R. J. and de Gruijl, T. D. (2002). "Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation". *J Immunol 168:4333-43*.

Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M. and Mach, B. (1993). "Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)". *Cell 75:135-46*.

Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L. K. and Levin, B. (2000). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis". *N Engl J Med 342:1946-52*.

Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity". *Annu Rev Immunol 9:271-96*.

Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution". *J Exp Med 137:1142-62*.

Stift, A., Friedl, J., Dubsky, P., Bachleitner-Hofmann, T., Schueller, G., Zontsich, T., Benkoe, T., Radelbauer, K., Brostjan, C., Jakesz, R. and Gnant, M. (2003). "Dendritic cell-based vaccination in solid cancer". *J Clin Oncol 21:135-42*.

Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P. W., Portanova, J., Lee, J. C. and Dubinett, S. M. (2000). "Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis". *J Immunol 164:361-70*.

Tan, M. H., Nowak, N. J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., Pickren, J. W., Berjian, R., Douglass, H. O., Jr. and Chu, T. M. (1986). "Characterization of a new primary human pancreatic tumor line". *Cancer Invest 4:15-23*.

Tanaka, F., Yamaguchi, H., Ohta, M., Mashino, K., Sonoda, H., Sadanaga, N., Inoue, H. and Mori, M. (2002). "Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo". *Int J Cancer 101:265-9*.

Thumann, P., Moc, I., Humrich, J., Berger, T. G., Schultz, E. S., Schuler, G. and Jenne, L. (2003). "Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations". *J Immunol Methods 277:1-16*.

Thun, M. J., Namboodiri, M. M. and Heath, C. W., Jr. (1991). "Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer". *N Engl J Med 325:1593-6*.

Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E. and Schuler, G. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma". *J Exp Med 190:1669-78*.

Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A. and Schuler, G. (1999). "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application". *J Immunol Methods 223:1-15*.

Thurnher, M., Klocker, H., Papesh, C., Ramoner, R., Radmayr, C., Hobisch, A., Gastl, G., Romani, N., Ebner, S., Bock, G. and Bartsch, G. (1997). "Dendritic cells for the immunotherapy of renal cell carcinoma". *Urol Int 59:1-5*.

Tong, Y., Song, W. and Crystal, R. G. (2001). "Combined intratumoral injection of bone marrow-derived dendritic cells and systemic chemotherapy to treat pre-existing murine tumors". *Cancer Res 61:7530-5*.

Torres, F. X., Mackowiak, P. G., Brown, R. D., Linden, M. D. and Zarbo, R. J. (1995). "Comparison of two methods of mechanical disaggregation of scirrhous breast adenocarcinomas for DNA flow cytometric analysis of whole cells". *Am J Clin Pathol 103:8-13*.

Totzke, G., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R. U. (2003). "Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition". *Oncogene 22:8021-30*.

Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells". *Adv Immunol 47:187-376*.

Tseng, W. W., Deganutti, A., Chen, M. N., Saxton, R. E. and Liu, C. D. (2002). "Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer". *J Gastrointest Surg 6:838-43; discussion 44*.

Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C. and Romero, P. (1998). "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues". *J Immunol 160:1750-8*.

Vane, J. R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs". *Nat New Biol 231:232-5*.

von Bernstorff, W., Voss, M., Freichel, S., Schmid, A., Vogel, I., Johnk, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B. and Kalthoff, H. (2001). "Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients". *Clin Cancer Res 7:925s-32s*.

Walker, P. R., Saas, P. and Dietrich, P. Y. (1997). "Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back". *J Immunol 158:4521-4*.

Wei, D., Wang, L., He, Y., Xiong, H. Q., Abbruzzese, J. L. and Xie, K. (2004). "Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity". *Cancer Res 64:2030-8*.

Yamada, T., Okajima, F., Adachi, M., Ohwada, S. and Kondo, Y. (1998). "Growth dependency of a new human pancreatic cancer cell line, YAPC, on autocrine interleukin-1alpha stimulation". *Int J Cancer 76:141-7*.

Yang, S. and Haluska, F. G. (2004). "Treatment of melanoma with 5-fluorouracil or dacarbazine in vitro sensitizes cells to antigen-specific CTL lysis through perforin/granzyme- and Fas-mediated pathways". *J Immunol 172:4599-608*.

Yip-Schneider, M. T., Barnard, D. S., Billings, S. D., Cheng, L., Heilman, D. K., Lin, A., Marshall, S. J., Crowell, P. L., Marshall, M. S. and Sweeney, C. J. (2000). "Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas". *Carcinogenesis 21:139-46*.

Yip-Schneider, M. T., Sweeney, C. J., Jung, S. H., Crowell, P. L. and Marshall, M. S. (2001). "Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells". *J Pharmacol Exp Ther 298:976-85*.

Yunis, A. A., Arimura, G. K. and Russin, D. J. (1977). "Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase". *Int J Cancer 19:218-35*.

Zeytin, H. E., Patel, A. C., Rogers, C. J., Canter, D., Hursting, S. D., Schlom, J. and Greiner, J. W. (2004). "Combination of a poxvirus-based vaccine with a cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) elicits antitumor immunity and long-term survival in CEA.Tg/MIN mice". *Cancer Res 64:3668-78*.

Zinkernagel, R. M. (2001). "Immunity against solid tumors?" *Int J Cancer 93:1-5*.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
5-FU	5-Fluoro-Uracil
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASS	Acetylsalicylsäure
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
CA-125	*Cancer antigen*
CD	*Cluster of differentiation*
cDNA	*Copy*-Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembrionales Antigen
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CO_2	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
cpm	*Counts per minute*
CTL	*Cytotoxic t-cell lymphocyte*
DC	Dendritische Zelle
dFdC	2'Deoxy-2',2'-difluorodeoxycytidine (= Gemcitabin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTH	*Delayed-type hypersensitivity*
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ELISPOT	*Enzyme-linked immunosorbent spot assay*
FACS	*Fluorescence-activated cell sorter*
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
Flu	Flu matrix$_{58-66}$-Peptid (Influenza-assoziiert)
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HDPC-1	Humanes duktales Pankreaskarzinom Zelllinie

HEA	Humanes Epitheliales Antigen
HIV	*Human immunodeficiency virus*
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSA	Humanes Serum-Albumin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KAR	*Killer activating receptor*
KIR	*Killer inhibitory receptor*
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	*Magnetic activated cell sorting*
mDC	Myeloide dendritische Zelle
Mel	Melan-A_{26-35} A27L-Peptid (Melanom-assoziiert)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	*Major histocompatibility complex*
MLR	*Mixed lymphocyte reaction*
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NaCl	Natrium-Chlorid
NADH	Nicotinamidadenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenin-Dinucleotidphosphat
NF-κB	*Nuclear factor kappa B*
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSAR	Nicht-steroidales Antirheumatikum
PanIN	Intraepitheliale Neoplasie des Pankreas
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	*Phosphate-buffered saline*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PG	Prostaglandin

PHA	Phythämagglutinin
PI	Propidium-Iodid
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
Pol	HIV $pol_{476-484}$-Peptid (HIV-assoziiert)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
SEM	*Standard error of mean*
TAP	*Transporters associated with antigen processing*
TcR	T-Zell-Rezeptor
TGF	*Transforming growth factor*
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tx	Thromboxan
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*

ANHANG

1. Verwendete Zelloberflächenmarker:

Marker	Exprimierende Zellen (Auswahl)	Funktion
CD1a,b,c,d	Dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, corticale Thymozyten, B-Zellen (CD1c)	Antigenpräsentation, MHC-I ähnliches Molekül
CD2	T-Zellen, NK-Zellen	Adhäsionsmolekül
CD3	T-Zellen, Thymozyten	Assoziiert mit dem T-Zellrezeptor, notwendig für die Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des T-Zellrezeptors
CD4	T-Helferzellen, inflammatorische T-Zellen	Korezeptor für MHC-II-Moleküle
CD8	Zytotoxische T-Zellen	Korezeptor für MHC-I-Moleküle
CD11a (LFA-1)	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	Untereinheit des Integrins LFA-1, bindet an ICAM-1 (CD54)
CD11b	Myeloide Zellen, NK-Zellen	Untereinheit des Integrins CR3; bindet an ICAM-1 (CD54), Komplement C3b und extrazelluläre Matrixproteine
CD11c	Myeloide Zellen	Untereinheit des Integrins CR4, bindet Fibrinogen
CD14	Myelomonozytäre Zellen	Rezeptor für Lipopolysaccharide
CD16	NK-Zellen, neutrophile Zellen	Vermittelt antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
CD19	B-Zellen	Bildet einen Komplex mit CD21 und CD81, Korezeptor
CD28	Untergruppen von T-Zellen, aktivierte B-Zellen	Aktivierung naiver T-Zellen, Rezeptor für kostimulatorisches Signal CD80
CD32	Monozyten, Granulozyten, B-Zellen	Niedrigaffiner Fc-Rezeptor

CD34	Hämatopoetische Vorläuferzellen	Stammzellenmarker
CD36	Thrombozyten, Monozyten, Endothelzellen	Adhäsionsmolekül der Thrombozyten, beteiligt bei der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen
CD40	Dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen	Rezeptor für kostimulatorische Signale, fördert Zytokinproduktion bei DC
CD40L	Aktivierte CD4-Zellen	Ligand für CD40
CD45RA	Naïve T-Zellen, B-Zellen, Monozyten	Isoform von CD45, die A-Exon enthält
CD45R0	T- und B-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Isoform von CD45, die weder A- noch B-Exon enthält
CD54 (ICAM-1)	Hämatopoetische und nichthämatopoetische Zellen	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
CD56	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül
CD64	Monozyten, Makrophagen	Hochaffiner IgG-Rezeptor, Festhalten von Antigenen
CD69	Aktivierte T- und B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen	Unbekannt, frühes Aktivierungs-Antigen
CD80 (B7.1)	Dendritische Zellen, Untergruppe von B-Zellen	Kostimulator, Ligand für CD28
CD83	Dendritische Zellen	Unbekannt
CD86 (B7.2)	Dendritische Zellen, Monozyten, aktivierte B-Zellen	Kostimulator
CD95 (Fas)	Vielzahl an Zellen	Bindet Fas-Ligand, induziert Apoptose
CD152 (CTLA-4)	Aktivierte T-Zellen	Ligand für CD40, induziert Proliferation und Aktivierung von B-Zellen
CCR7	Naive T-Zellen, reife DC, B-Zellen	Rezeptor für die Chemokine CCL-19 (Mip-3β) und CCL-21 (6Ckine, SLC)

2. Verwendete Zytokine:

Zytokin	Produzierende Zellen	Wirkung
IL-1β	Makrophagen, Epithelzellen	Fieber, T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-2	T-Zellen	T-Zellproliferation
IL-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, *in vitro* Unterdrückung der Monozytenentwicklung
IL-6	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	T- und B-Zell-Wachstum und -Differentierung, Fieber, Produktion von Akute Phase Protein
IL-7	Knochenmarkstroma	Wachstum von Prä-B- und Prä-T-Zellen
IL-10	T-Zellen, Makrophagen, Epstein-Barr-Virus	wirksamer Inhibitor für Makrophagenfunktionen
IL-12	B-Zellen, Makrophagen	aktiviert NK-Zellen
GM-CSF	Makrophagen, T-Zellen	stimuliert Wachstum und Differenzierung der myelomonozytären Linie
IFN- γ	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, Erhöhung der MHC-Expression
TNF- α	Makrophagen, NK-Zellen	Einfluss auf Entzündung, Immunabwehr, Endothelaktivierung, zytostatische Wirkung auf Tumorzellen
TGF- β	Monozyten, T-Zellen	hemmt das Zellwachstum, antiinflammatorisch

DANKSAGUNG

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in die hervorragende Arbeitsatmosphäre seiner Forschungsabteilung. Insbesondere möchte ich mich für die außerordentliche Unterstützung und die Möglichkeit zum Besuch internationaler Kongresse bedanken.

Für die kontinuierliche und persönliche Betreuung und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meinen Betreuern PD Dr. Andreas Eigler und besonders Dr. Marc Dauer ausdrücklich danken.

Ferner gilt mein Dank den Mitdoktoranden Bianca Obermaier, Katharina Schad und Tobias Meskendahl für die herzliche Zusammenarbeit und der Laborassistentin Rosemarie Kiefl für ihre tatkräftige und aufopferungsvolle Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und Geschwistern und meiner Lebensgefährtin Barbara Hofmann, für die stete emotionale Unterstützung und Motivation.

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

2003 1. M. Dauer, B. Obermaier, **J. Herten**, C. Haerle, K. Pohl, S. Rothenfusser, M. Schnurr, S. Endres, A. Eigler.
Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentaition from blood precursors.
Journal of Immunology 2003 (170) 4069-4076. (IF 6,7)

2. B. Obermaier, M. Dauer, **J. Herten**, K. Schad, S. Endres, A. Eigler.
Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes.
Biological Procedures Online 2003, (5) 197-203.

2005 3. M. Dauer, **J. Herten**, C. Bauer, F. Renner, K. Schad, M. Schnurr, S. Endres, A. Eigler.
Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells.
Journal of Immunotherapy 2005, 28(4) 332-42. (IF 4,0)

4. M. Dauer, K. Schad, **J. Herten**, R. Kiefl, S. Endres, A. Eigler.
FastDC derived from human monocytes within 48 hours effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells.
Journal of Immunological Methods 2005, 302(1-2):145-55. (IF 2,7)

5. M. Dauer, K. Schad, J. Junkmann, C. Bauer, **J. Herten**, R. Kiefl, M. Schnurr, S. Endres, A. Eigler.
IFN-α promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4.
Journal of Leukocyte Biology 2006, 80(2):278-86. (IF 4,3)

Briefe

2004 1. M. Dauer, K. Schad, **J. Herten**, S. Endres, A. Eigler.
Dendritic cell differentiation (letter response).
Journal of Immunology 2004, (172) 3-4. (IF 6,7)

Publizierte Abstrakts

2003 1. M. Dauer, **J. Herten**, T. Meskendahl, M. Schnurr, S. Endres, A. Eigler.
Antigen loading of dendritic cells for tumor immunotherapy: pancreatic carcinoma cell lysates reduce survival of dendritic cells *in vitro*.
Digestive Disease Week 2003, Orlando, USA
Gastroenterology 2003

2. M. Dauer, **J. Herten**, S. Eigenbrod, K. Schad, S. Endres, A. Eigler.
Steigerung der durch dendritische Zellen induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen Pankreaskarzinomzellen durch Vorbehandlung mit Gemcitabin und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren.
58. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2003, Nürnberg.
Z Gastroenterol 2003 (41) 833.

3. M. Dauer, **J. Herten**, S. Eigenbrod, K. Schad, S. Endres, A. Eigler.
Vorbehandlung von Pankreaskarzinomzellen mit Chemotherapie und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren steigert die Effektivität einer durch dendritische Zellen induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort.
31. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern 2003, Herzogenaurach.
Z Gastroenterol 2003 (41) 944.

2004 4. M. Dauer, **J. Herten**, K. Schad, S. Eigenbrod, S. Endres, A. Eigler.
Pretreatment with gemcitabine and cyclooxygenase-2-inhibitors sensitizes pancreatic carcinoma cells to cytotoxic T cell responses induced by tumor-lysate pulsed dendritic cells.
Digestive Disease Week 2004, New Orleans, USA
Gastroenterology 2004 (126) A1-815.

5. M. Dauer, **J. Herten**, C. Bauer, M. Schnurr, S. Endres, W. Heldwein, A. Eigler.
Charakterisíerung einer optimierten dendritischen Zellvakzine und synergistisch wirksamer pharmakologischer Therapiestrategien im Pankreaskarzinom-*in vitro*-Modell.
32. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern 2004, Garmisch-Patenkirchen.
Z Gastroenterol 2004 (42) 1207.

2005 6. M. Dauer, **J. Herten**, C. Bauer, M. Schnurr, S. Endres, W. Heldwein, A. Eigler.
Zelluläre Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit dendritischen Zellen: Evaluation synergistisch wirksamer Therapiestrategien *in vitro*.
111. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 2005, Wiesbaden.
Med Klin 100: V-VI 2005

7. C. Bauer, F. Bauernfeind, M. Dauer, **J. Herten**, F. Renner, M. Schnurr, S. Endres, A. Eigler.
COX-2-Inhibitoren sensitivieren Pankreaskarzinomzellen gegenüber Apoptoseinduktion durch Hitze und CD95-Aktivierung und induzieren die CD95-Expression.
111. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 2005, Wiesbaden.
Med Klin 100: V-VI 2005

Posterpräsentationen:

2003 **J. Herten**, M. Dauer, S. Eigenbrod, K. Schad, S. Endres, A. Eigler
Dendritic cell-induced CTL responses against pancreatic carcinoma cells can be enhanced by pretreatment with gemcitabine and cyclooxygenase-2-inhibitors.
Biotherapy of Cancer, Großhadern, 2003

Vorträge:

2003 *Steigerung der durch dendritische Zellen induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen Pankreaskarzinomzellen durch Vorbehandlung mit Gemcitabin und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren.*
Gastroenterologisches Doktoranden-Kolloquium, Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München, Juli 2003.

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Jan Herten
geboren am 23.05.1978 in Münster

Schulbildung

1984 – 1988	Gustav-Walle-Grundschule Würzburg
1988 – 1997	Siebold-Gymnasium Würzburg
Juni 1997	Abitur, Siebold-Gymnasium Würzburg, Note: 1,8

Zivildienst

1997 – 1998	Zivildienst als Krankenpfleger in der Allgemein-Chirurgie im Missionsärztlichen Krankenhaus Würzburg

Studium

Oktober 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock
August 2000	Ärztliche Vorprüfung, Universität Rostock, Note: 2,3
Oktober 2000	Fortsetzung des Studiums an der LMU München
August 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München
März 2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München
April 2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München
26. April 2005	Approbation als Arzt, Gesamtnote 2,2

Praktisches Jahr

Apr. – Aug. 2004	Innere Medizin/Gastroenterologie, Krankenhaus München Neuperlach, Prof. Dr. W. Schmitt
Aug. – Nov. 2004	Neurologie, Städtisches Krankenhaus München-Harlaching, Prof. Dr. R. Haberl
Nov. – Mär. 2005	Chirurgie, Kantonsspital Uri in Altdorf (Schweiz), Dr. G. Burri

Experimentelle Arbeit

2002 – 2005	Dissertation bei Prof. Dr. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Arbeitsgruppe Gastroenterologische Immuntherapie (Leiter: PD Dr. A. Eigler), Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der LMU München
Thema:	Immuntherapie des Pankreaskarzinoms: Optimierung einer Vakzine-Strategie durch Kombination von in 48 h generierten dendritischen Zellen mit Gemcitabin und selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmern *in vitro*

Berufliche Tätigkeit

Seit Jan. 2006	Assistenzarzt im Klinikum Freising, Innere Medizin II, Chefarzt Dr. K. G. Mackes