

**TUMORZELL-DC ZELLHYBRIDE IN DER BEHANDLUNG
DES EXOKRIN DUKTALEN PANKREASKARZINOMS**

- EINE *IN VITRO* UND *IN VIVO* STUDIE -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Patricia Ellen Etzrodt
aus: Würselen (Rheinland)
2007

Angefertigt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. I. Schmidt-Wolf
2. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. v. Rücker

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.06. und 12.06.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Aus: Medizinische Klinik I, Universitätsklinik, Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. T. Sauerbruch

Inhaltsverzeichnis

Kapitelnummer	Seite
<u>1 Einleitung</u>	6
1.1 Immunsystem	6
1.1.1 Hauptgewebeverträglichkeitskomplex	7
1.1.2 Naive T-Zellen	9
1.1.3 Professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC)	9
1.1.4 CD4+ Effektorzellen	10
1.1.5 CD8+ Effektorzellen	10
1.1.6 Gedächtnis T-Zellen	11
1.2 Immunologische Effektorzellen	12
1.3 Der CD40 Ligand	13
1.4 Interaktion der Oberflächenantigene CD40 und CD40L (CD154)	14
1.5 Dendritische Zellen (DC)	15
1.6 Tumorstoffe	20
1.7 Pankreaskarzinom	21
1.8 Möglichkeiten des Gentransfers	22
1.9 Zellfusion	24
1.10 Zielsetzung	26
<u>2 Material und Methoden</u>	28
2.1 Material	28
2.1.1 Lösungen, Puffer und Reagentien	28
2.1.2 Zytokine	28
2.1.3 Antikörper	29
2.1.4 Kulturmedien	29
2.1.5 Mäuse	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Gewinnung von Monozyten	30
2.2.2 MACS (magnetische Zellseparation) zur Zellanreicherung	32
2.2.3 Zellzählung dendritischer Zellen	33

2.2.4 Kultur dendritischer Zellen	33
2.2.5 Elektrofusion dendritischer Zellen mit Tumorzellen (Pankreaskarzinomzellen Panc02)	34
2.2.6 Virustransfektion mittels Ad-GFP (Green fluorescence protein)	35
2.2.7 Virustransfektion mittels AdCD40L	36
2.2.8 Tumorzelllinie	37
2.2.9 Kultur der Tumorzelllinie	37
2.2.10 Kokultur von dendritischen Zellen mit Pankreaskarzinomzellen Panc02	38
2.2.11 Durchflusszytometrie	38
2.2.12 Zellfärbung zur Bestimmung der Fusionseffizienz	39
2.2.13 Immunphänotypisierung dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometer	40
2.2.14 Lymphozytenseparation aus der Mäusemilz	40
2.2.15 Propidiumjodid-Färbung (PI-Färbung)	41
2.2.16 Zytotoxizitätsnachweis	42
2.2.17 Tumorinokulation in C57/BJ 6 Mäuse	43
2.2.18 Kontrolle des Tumorwachstums	44
2.2.19 Inokulation von nativen DC oder fusionierten DC in einen orthotopen Pankreastumor	44
2.2.20 Ende des Tierversuches	44
2.2.21 ELISpot-Analytik	44
2.3 Statistische Auswertung	45
<u>3 Ergebnisse</u>	46
3.1 Herstellung muriner dendritischer Zellen	46
3.2 Kultur dendritischer Zellen	46
3.3 Aktivierung dendritischer Zellen	46
3.4 Kokultur dendritischer Zellen mit Pankreaskarzinomzellen Panc 02	47
3.5 Auswertung der Zellfärbungen	48
3.6 Fusion dendritischer Zellen mit Pankreaskarzinomzellen Panc 02	49
3.7 Vitalitätskontrolle der Kultur der Panc02-DC- Zellhybride	55
3.8 Virustransfektion mittels Ad- GFP (Green fluorescence protein)	55
3.9 Virustransfektion mittels AdCD40L	57
3.10 <i>In vitro</i> Zytotoxizitätsnachweis	57

3.11 ELISpot	58
3.12 Tumorgrößenbestimmung nach intratumoraler Injektion von ungeladenen DC und Panc02-DC Hybriden	59
<u>4 Diskussion</u>	61
4.1 Isolierung und Kultur muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark	61
4.2 Aktivierung dendritischer Zellen	61
4.3 Fusion muriner dendritischer Zellen mit murinen Pankreaskarzinomzellen Panc02	62
4.4 Virustransfektion AdCD40L dendritischer Zellen, Pankreaskarzinomzellen Panc02 und von DC- Panc02- Zellhybriden	64
4.5 Zytotoxizitätseigenschaften der DC alleine und des DC/Panc02-Hybrides und des Hybrides aus DC/ Panc02/ AdCD40L	65
4.6 ELISpot Analytik	66
4.7 Klinischer Ausblick	66
<u>5 Zusammenfassung</u>	68
<u>6 Abbildungen</u>	69
<u>7 Tabellen</u>	70
<u>8 Literatur</u>	71
<u>9 Danksagung</u>	79

Diese Arbeit ist ein gemeinsames Projekt mit der Doktorarbeit von Herrn Alex Eliu, der sich mit dem Thema der Virustransfektion von dendritischen Zellen und Panc02-DC-Zellhybriden mit dem Adenovirus AdCD40L beschäftigt hat. Sie enthält Teile und Experimente, die gemeinsam erarbeitet wurden.

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung ob die Fusion von murinen DC, als antigenpräsentierende Zellen, mit murinen Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* die Immunantwort gegen ein exokrin duktales Pankreaskarzinom steigert und somit als Möglichkeit einer Immuntherapie für diese nur sehr unzureichend behandelbare Erkrankung zur Verfügung steht.

Des Weiteren werden ergänzende Ausschnitte aus der gemeinsamen Erarbeitung mit Herrn Alex Eliu aufgezeigt, der sich gezielt mit der Frage nach einer gesteigerten Immunantwort gegen ein exokrin duktales Pankreaskarzinom nach Virustransfektion mit dem Adenovirus Ad CD40L der dendritischen, der Pankreaskarzinom- sowie der aus beiden Zellarten fusionierten Zellen beschäftigte.

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem dient der Verteidigung schädlicher, körperfremder Organismen im Körper. In den Vertebraten haben sich unterschiedliche Immunsysteme entwickelt. Zum einen gibt es das adoptive Immunsystem, in dem spezialisierte Zellen die Gefahren für den Körper (z.B. infizierte Zellen, Verletzungen) erkennen und daraufhin entsprechende antigenspezifische Zellen aktivieren können.

Zum anderen gibt es ein System, in dem Pathogene von spezialisierten Zellen aufgenommen werden und dem Immunsystem nach einer Prozessierung präsentiert werden. Zur Elimination solcher Zellen, die der Ursprung für weitere Pathogene sein können, gibt es auf der Oberfläche aller Zellen Proteine, die MHC-Moleküle, die die Abbauprodukte des kompletten zellulären Proteinkatabolismus in Form von Peptiden präsentieren. Die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APC) des menschlichen

Körpers sind die DC, die im Folgenden noch detaillierter charakterisiert werden. Die Präsentation erfolgt mit gleichzeitig präsentierten kostimulatorischen Peptiden, die von im Thymus gereiften CD4+ bzw. CD8+ naiven T-Zellen erkannt werden. Diese CD4+ und CD8+ T-Zellen können keine im Thymus vorkommenden, d.h. körpereigenen Peptide mehr erkennen. So kommt es zur Aktivierung dieser T-Zellen die sich in CD4+ T-Helferzellen bzw. CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten differenzieren. Die T-Helferzellen modulieren die Immunantwort durch Ausschüttung von Zytokinen, und die zytotoxischen T-Zellen töten die Zellen durch Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose.

1.1.1 Hauptgewebeverträglichkeitskomplex

Proteine des Hauptgewebeverträglichkeitskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) kommen außer auf Erythrozyten in verschiedenen Ausprägungen auf den Oberflächen von Zellen aller Gewebe vor. Man unterscheidet bei den MHC Molekülen MHC-Klasse-I und -II, die als Antigenpräsentationsmoleküle dienen. MHC-Klasse-I-Moleküle binden zellinterne Antigene. Endogene, in der Zelle synthetisierte Antigenpeptide, werden im endoplasmatischen Retikulum an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren exogen aufgenommene Antigene auf der Zelloberfläche. Zunächst werden die exogen aufgenommenen Antigene in Phagosomen zu Peptiden gespalten und das Phagosom verschmilzt mit einem Endosom, das MHC-Klasse-II-Moleküle enthält, deren Bindungsstelle bis dahin durch ein CLIP-Fragment (class-II-inhibiting protein) geschützt ist. Beim Menschen heißt der MHC HLA-System, bei Mäusen H2. Der MHC kann aufgrund seiner Polymorphie und Polygenie unterschiedliche Peptide mehr oder weniger stark binden, was abhängig ist von den Aminosäureseitenketten des Peptids zu seiner Bindungsstelle. Die gebundenen und an der Oberfläche präsentierten Peptide stammen hauptsächlich aus dem zytosolischen Proteinabbau und spiegeln so das Geschehen in der Zelle auf der Oberfläche wider.

Moleküle des polymorphen und peptidbindenden MHC II kommen nur auf der Oberfläche von speziellen antigenpräsentierenden Zellen vor, d.h. auf DC, Makrophagen und B-Zellen. Neben den beiden klassischen MHC-Molekülen gibt es

noch wenig bis nicht polymorphe, nicht Peptid.- präsentierende MHC-Moleküle, wie z.B. HLA-H, das die Eisenaufnahme reguliert.

1.1.2 Naive T-Zellen

T-Zellen sind nach ihrer Ausbildung im Thymus für die Erkennung körperfremder Peptide geschult und werden als naive, bzw. reife T-Zellen bezeichnet. T-Zellen deren T-Zellrezeptor an ein MHC I-Molekül bindet, exprimieren nur den Co-Rezeptor CD8, während T-Zellen deren T-Zellrezeptor an ein MHC II Molekül bindet nur noch CD4 exprimieren. Die Bindung der T-Zellrezeptoren an die MHC-Peptid-Komplexe darf allerdings nicht zu ausgeprägt sein, da die so entstehenden T-Zellen sonst autoreaktiv wären (negative Selektion). Nach Verlassen des Thymus binden die naiven T-Zellen ohne aktiviert zu werden körpereigene MHC-Peptid-Komplexe mit geringer Affinität können aber jederzeit durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden.

Naive T-Zellen exprimieren verschiedene Oberflächenmarker wie CD62L oder CD28, die für die Kostimulation bei Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen nötig sind [1]. Ihre Lebenszeit ist recht lang, aber abhängig von der ständigen Ligation des T-Zellrezeptors zu Peptid-MHC-Komplexen und IL7 Bindung [26] [9] [49] [75] [80]. Eine starke T-Zellrezeptor-Bindung ohne Kostimulation führt zur Anergie von T-Zellen, d.h. die T-Zellen werden inaktiviert. In Gegenwart von DC kommt es durch Antigenpräsentation und Freisetzung von Zytokinen zur Kostimulation und Aktivierung der T-Zellen.

1.1.3 Professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC)

Makrophagen und B-Lymphozyten können als antigenpräsentierende Zellen dienen, jedoch der weitaus größte Teil dieser Aufgabe wird von DC übernommen, die zwischen 10 und 100 mal mehr MHC-Moleküle als Makrophagen und B-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche haben können [7][44]. Unreife DC kommen in den Epithelien aller Gewebe vor (z.B. als Langerhans'sche Zellen der Haut), wo sie ihre Umgebung durch verschiedene Endozytosevorgänge überwachen. Durch Bindung an ihre Rezeptoren, bzw. nach Aufnahme von nekrotischen oder apoptotischen Zellbruchstücken wird die DC durch dieses Gefahrensignal aktiviert und reift. Diese Reifung verändert die Morphologie der DC: die dendritischen Zellausläufer verschwinden und die Zelle wandert zum drainierenden Lymphknoten, wobei sie gleichzeitig sämtliche

Endozytosevorgänge stoppt und kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) exprimiert. Durch Bindung an T-Zellrezeptoren kommt es so zur Aktivierung einer naiven T-Zelle und schließlich zur Differenzierung dieser zu einer T-Effektorzelle unter Änderung des Expressionsmusters ihrer Oberflächenmoleküle. Diese T-Zelle produziert IL-2, das autokrin wirkend zwei bis drei Zellteilungen pro Tag über eine Dauer von mehreren Tagen auslöst und CD27-abhängig ist [38]. Die Zellteilungen sind besonders wichtig für die Entwicklung zur T-Effektorzelle, da ohne Teilungen keine Effektormoleküle (siehe 2.1.5.) produziert werden und die T-Zellen anergisch werden würden [65] [90]. Die Effektorzellen, die nun keinen Kostimulus bei Antigenkontakt mehr brauchen, besitzen im Vergleich mit den naiven T-Zellen einen wesentlich geringeren Schwellenwert bezüglich der Antigendichte und –menge um die Zielzelle zu zerstören.

1.1.4 CD4+ Effektorzellen

CD4+ T-Zellen benötigen -verglichen mit CD8+ T-Zellen- einen verhältnismäßig langen Kontakt von 20-24 Stunden mit einer antigenpräsentierenden Zelle um sich zu Effektorzellen differenzieren zu können [45] [43]. Aktivierte T-Helferzellen können mittels den von ihnen sezernierten Zytokinen entweder eine zellvermittelte (TH1) oder eine humorale (TH2) Immunantwort einleiten, was abhängig ist vom Zytokinprofil, das zum Zeitpunkt der Aktivierung vorhanden ist. Die von den Helferzellsubtypen sezernierten Zytokine hemmen zusätzlich die Differenzierung von T-Zellen in den jeweils anderen Subtyp. Bei bestimmten Virusinfektionen können aber auch beide Subtypen nebeneinander auftreten [39]. Nach Aktivierung einer T-Helferzelle befindet sie sich in einem bis zu sechs Tagen dauernden, aktivierungsinduzierten Refraktärzustand, in dem sie und ihre Nachkommen nicht mehr auf Stimuli reagieren [22].

1.1.5 CD8+ Effektorzellen

Um eine naive CD8+ T-Zelle zur Proliferation anzuregen und als Effektorzelle zu programmieren, ist ein Antigenkontakt von 2h in Form eines Peptid-MHC-Komplexes auf einer antigenpräsentierenden Zelle ausreichend [87]. Ist die Antigendichte auf der antigenpräsentierenden Zelle zu gering um eine naive CD8+ T-Zelle zu aktivieren,

können TH1 Zellen, die Antigen auf der gleichen antigenpräsentierenden Zelle erkennen, diese über CD40-CD40L-Wechselwirkung zu höherer kostimulatorischer Aktivität anregen und so die zytotoxische Lymphozyten-(CTL)-Antwort unterstützen. Die CD8+ T-Zelle teilt sich nach der Aktivierung mindestens fünf bis neun Mal und synthetisiert dabei Perforin und Granzyme, zytotoxische Proteine, die intrazellulär gespeichert werden, wobei diese Zellen bereits nach einer Teilung zytolytisch wirken können [65]. Bei Bindung an eine antigenpräsentierende Zelle, z.B. an eine virusinfizierte Zelle, schüttet die Effektorzelle nun zielgerichtet diese Proteine aus. Die Perforine erzeugen Löcher in der Membran der Zielzelle, wodurch die Granzyme ins Zytoplasma gelangen und Apoptose auslösen können. Zusätzlich kann die zytotoxische Zelle über einen zweiten Mechanismus z.B. virusinfizierte Zellen abtöten: Durch Expression von CD95L kommt es zur Bindung an CD95 auf z.B. virusinfizierten Zellen, was deren Apoptose auslöst.

1.1.6 Gedächtnis T-Zellen

Nach Elimination des Pathogens, bei einer Virusinfektion typischerweise nach 7-10 Tagen, sterben zirka 95% der spezifischen T-Zellen in einem Prozess, der aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) genannt wird. Der Zellabbau findet dabei größtenteils in der Leber und auch in der Milz statt [42] [78]. Der überlebende Anteil der spezifischen Zellen zirkuliert durch die peripheren Organe, d.h. Leber, Lunge, Nieren, Darm, Thymus und Knochenmark, wo er das so genannte T-Zellgedächtnis bildet. Nach abgeklungener Infektion bleiben die CD8+ Gedächtnis-T-Zellzahlen recht konstant [62], während die CD4+ Gedächtnis-T-Zellzahlen ständig leicht abnehmen [40]. Dabei wird immer noch sehr kontrovers diskutiert, ob im Körper Spuren von Antigen vorhanden sein müssen [52] oder nicht [54], damit Gedächtnis-T-Zellen überleben können.

Gedächtnis T-Zellen vermitteln bei erneuter Infektion eine wesentlich schnellere T-Zellantwort. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen sind sie sofort nach Antigenkontakt ohne Kostimulation fähig, Effektormoleküle wie Perforin und Granzyme zu sezernieren. Dabei haben naive Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen den gleichen Aktivierungsschwellenwert bei unterschiedlicher Kinetik [49,50]. Gedächtnis-T-Zellen werden bei erneutem Antigenkontakt größer und teilen sich schneller als naive T-Zellen [18] [69] [88].

Zusätzlich unterscheiden sie sich in einer ganzen Reihe von Oberflächenmarkern von naiven T-Zellen, haben aber viele Oberflächenmarker mit Effektor-T-Zellen gemeinsam und können daher phänotypisch nur durch die von ihnen exprimierte Markerkombination zugeordnet werden. Es gibt zwei Arten von Gedächtnis-T-Zellen: eine Art scheint relativ kurzlebig zu sein und antigenabhängig in der Peripherie vorzukommen, während die andere antigenunabhängig und langlebig in den sekundären lymphatischen Organen zu finden ist [5] [52].

1.2 Immunologische Effektorzellen

Zu den immunologischen Effektorzellen zählen in diesem Zusammenhang die CD8+ zytotoxischen T-Zellen (CTL), die CD4+ T-Helfer-Zellen und die CD56+ natürlichen Killerzellen (NK-Zellen).

CD8+ CTL und CD4+ Th-Zellen expandieren als erworbener Zweig des Immunsystems durch eine Antigen-spezifische Aktivierung. Ihre lytische Aktivität basiert auf der MHC-abhängigen Erkennung der Antigene auf Zielzellen. NK- und NKT-Zellen (T-Zell-Untergruppen, die CTL und Th1 inhibieren) haben als Teil des angeborenen Zweigs des Immunsystems die natürliche Kapazität zur Abtötung von Zielzellen mit einer erniedrigten Expression von MHC-I-Molekülen (NK-Zellen) und Oberflächenglykolipiden (NKT-Zellen). Für viele Tumoren stellt die Herunterregulierung dieser Oberflächenmarker einen erfolgreichen Escape-Mechanismus gegen adaptative Immunantworten dar. Vor allem über die Freisetzung von Zytokinen wie IL-12 und IFN- α und - γ haben DC die Möglichkeit, die adaptiven und angeborenen Komponenten der Immunantwort zu dirigieren [86], [77] und das gesamte Spektrum an zellulären Tumorabwehrmechanismen zu induzieren.

Die CTL sind die wichtigsten Effektorzellen in der antitumorösen Tumorantwort. Ihre Stimulation erfolgt durch reife DC, die ihnen die Antigene in Gegenwart von MHC-Molekülen der Klasse I präsentieren. Dies geschieht auf direktem Weg oder indirekt unter Mitwirkung von T-Helferzellen. Die zytotoxische Aktivität zeigt sich nach Bindung an die Zielzelle durch die Freisetzung von lytischen Enzymen wie Perforin und Granzyme oder von Zytokinen wie z.B. Interferon- γ . Die korrekte Aktivierung der unreifen CTL erfolgt über APC und ist nicht möglich durch Tumorzellen oder mit Antigen

infizierten Zellen. *In vivo* zeigte sich, daß diese Aktivierung nur über DC zustande kommt. Die Zugabe von CD4- und CD8-Antikörper führte zu einer Verminderung der Lyse der murinen Tumorzellzahl *in vitro* und zu einer Verminderung der CD4+ und CD8+ Zellen [31].

Die endgültige Aktivierung der zytotoxischen T- Zellen erfolgt nur über kostimulatorische Faktoren wie CD40, CD80 und CD86, die an entsprechende Liganden der T- Lymphozyten binden, sowie über den Wachstumsfaktor IL-2, das Zytokin IL-12, welches die oben genannten kostimulatorischen Moleküle und den Differenzierungsfaktor IFN- γ hochreguliert [85]. Bei Fehlen der kostimulatorischen Faktoren werden die T- Lymphozyten anerg.

Eine andere Klasse immunologischer Effektorzellen sind die CD56+ Natural Killer Zellen (NK-Zellen), die zytotoxisch ohne vorherige Sensibilisierung reagieren. Zur Elimination von Zellen besitzen sie identische lytische Mechanismen wie die zytotoxischen T-Zellen, jedoch ohne vergleichbare Antigenerkennungsmoleküle und MHC-Marker. Einige virusinfizierte oder neoplastische Zellen haben sich *in vitro* als gegen die NK-induzierte Lyse resistent erwiesen, weshalb die lytische Aktivität der NK-Zellen teilweise auch als spezifisch angesehen werden kann. Zytokine, wie Interleukin-2, Interferon-12 und Tumornekrosefaktor, steigern den tumorabtötenden Effekt der NK-Zellen [55].

1.3 CD40 Ligand

Das CD40 Oberflächenantigen befindet sich auf B-Zellen, DC, folliculären DC (FDC), hämatopoetischen Progenitorzellen, Monozyten, Endothelzellen sowie auf einer Vielzahl von neoplastischen Zelltypen. Dieses Antigen gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren. Der CD40-Ligand ist ein TNF-verwandtes Glykoprotein, das vorwiegend auf CD4+ T- Zellen exprimiert wird und ein wichtiges Überlebenssignal für B-Zellen liefert. DC produzieren nach CD40-Ligation große Mengen IL-12 und beginnen ihre terminale Reifung. Dieses Zytokin induziert die Differenzierung der CD4+ Zelle in Richtung TH1 mit Freisetzung von IFN- γ . Durch IFN- γ wird die antimikrobielle und proinflammatorische Aktivität von Makrophagen stimuliert und die Aktivierung von CTL begünstigt. Hirano und seine Mitarbeiter zeigten 1999 in ihrer Arbeit, daß die Stimulation von CD40 durch seinen Ligand CD40L eine viel versprechende Methode im Hinblick auf die

Tumorthherapie ist. CD40 kann ein Zielrezeptor zum Angriff der neoplastischen Zellen sein. Seine Stimulation scheint Apoptose hervorzurufen und das Wachstum von transformierten Epithelzellen zu hemmen.

1.4 Interaktion der Oberflächenantigene CD40 und CD40L (CD154)

Immuntherapeutische Ansätze sind bestrebt, tumoröse Zellpopulationen für das körpereigene Immunsystem durch Einbringen von Genen für kostimulatorische Moleküle in antigenpräsentierende Zellen mit dem Ziel der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen erkennbar zu machen. Bei Tumorpatienten ist die Expression von CD40 Ligand (CD40L) - einem entscheidenden Molekül der T-Zell-Aktivierung, ein Membran-Glykoprotein der Klasse II - auf den T-Zellen herabgesetzt [66] [67] [3] [64] [93] [34]. Dieses Molekül wird vorübergehend auf CD4+ T-Zellen exprimiert, um dann nach ca. vier Stunden wieder herunterreguliert werden zu können, nachdem es zuvor an den CD3 T-Zellrezeptor gebunden hat [72] [12] [39]. Durch Expression von CD40L können aktivierte T-Zellen CD40 tragende DC, Monozyten oder B-Lymphozyten stimulieren, wodurch es zu einer erhöhten Produktion immunmodulatorischer Oberflächenantigene kommt, die eine verstärkte zelluläre Interaktion hervorruft [66] [66] [3] [8] [19] [24]. CD40 exprimierende Tumorzellen stellen neben Signalen, entsendet vom TNF, wichtige Triggerpunkte in der Aktivierung stimulatorischer Moleküle wie CD80 dar, was zu einer Aktivierung ruhender T-Zellen führt [48]. Dieser Zustand kann teilweise durch Gentransfer von CD40L in antigenpräsentierende Zellen (z.B. DC) verbessert werden, was eine verstärkte T-Zell-Aktivierung auslöst [11] [48] [92].

Neue Studien zeigten, daß die CD40-CD40L Interaktion wichtig ist für viele Funktionen der DC, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [17]. Diese Wechselwirkung steuert die Einwanderung von Antigen-tragenden DC der Haut zu den drainierenden Lymphknoten und spielt eine wichtige Rolle in der Einleitung der erworbenen T-Zell gebundenen Immunabwehr. Ein wichtiges Aktivierungssignal für APC (antigenpräsentierende Zellen) wird durch diese Interaktion ausgelöst, was sich durch die Hochregulierung der Oberflächenmarker CD80 und CD86 zeigt, die bei der T-Zell-Kostimulation von großer

Bedeutung ist. Weiterhin wird die Produktion von IL-8, TNF- α und IL-12 reguliert [14], [15], [13]. Die Produktion von IL-12 durch DC ist wichtig für die Reifung der Th1-Zellen und die Entwicklung der zellvermittelten Immunität. Die CD40-CD40L-Interaktion bewirkt neben einer verstärkten DC Aktivität eine Abschwächung von Faktoren, die schädlich für DC sein könnten. Durch das Zytokin IL-10, das von Tumorzellen produziert wird und wodurch es den Tumorzellen gelingt, sich den Immunerkennungssignalen zu entziehen, kommt es zu einer Hemmung der Funktion der DC [25]. Diese Hemmung kann durch die CD40-CD40L-Interaktion neutralisiert werden [10]. Aus diesen Gründen versuchen viele Studien zu zeigen, dass Tumorantigen-gepulste DC oder Tumorzell-DC-Hybride aufgrund der CD40-CD40L-Interaktion eine neue Strategie für eine verstärkte DC-Funktion darstellen.

1.5 Dendritische Zellen (DC)

1868 wurden zum ersten Mal DC von Paul Langerhans in der Haut beschrieben und weiterhin auf ihre Funktion untersucht. Ihr Name beruht auf der Eigenschaft, Membranausläufer auszubilden (dendron (griech.)=Baum) und so verschiedene Gestalten anzunehmen.

DC werden seit 1973 als hochpotente antigenpräsentierende Zellen angesehen [79]. Sie sind wichtig für die Unterscheidung der harmlosen von den gefährlichen Schädigungen des Immunsystems. Abhängig von der Antigenaufnahme kommt es entweder zur Induktion einer tolerogenen oder abwehrenden Immunreaktion gegen das jeweilige Antigen. Bei Antigenaufnahme ohne zusätzliche Stimuli bleibt die DC in ihrer „unreifen“ Zustandsform und besitzt tolerogene Eigenschaften. Nach Interaktion mit unreifen DC produzieren regulatorische T-Zellen IL-10, was zur Anergie Antigen-spezifischer T-Effektorzellen führt und den Körper vor Autoaggression gegen körpereigene Antigene schützt [47][23][37]. Durch mikrobielle Pathogene kann es zu einer lokalen Gewebeschädigung kommen, die Entzündungsmediatoren wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und Prostaglandine freisetzt und so eine Aktivierung und Ausreifung dendritischer Zellen bewirkt [7]. Weitere Gefahrensignale, wie mikrobielle Produkte, bakterielle DNA, aus geschädigtem Gewebe freigesetztes ATP [76] und die Interaktion mit aktivierten T-

Zellen über den CD40-Ligand [15], aktivieren DC direkt durch Bindung an Oberflächenrezeptoren.

DC entwickeln sich aus pluripotenten CD34+ Stammzellen des Knochenmarks, die sich entweder in lymphoide oder myeloische DC differenzieren. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen gehen tolerogene Thymus-ständige DC hervor, die durch Zerstörung autoreaktiver T-Zellen unkontrollierte Immunreaktionen gegen gesundes Gewebe verhindern [2]. Weiterhin können sich andere lymphoide Zelllinien entwickeln (plasmozytoide DC), die durch Produktion von Interferon- α zur Abwehr viraler Erkrankungen dienen [16][77]. Andererseits differenzieren sich die CD34+ Stammzellen zu myeloiden Vorläuferzellen, die durch Stimulierung Antigen-spezifischer T-Zellen „fremd“ erkannte Strukturen abwehren. Sie entwickeln sich zu CD14+ Monozyten, die entweder im Blut als Monozyten-DC wirksam werden oder sich im peripheren Gewebe zu Makrophagen ausdifferenzieren können. Des Weiteren können sich auch direkt myeloide DC bilden, die im Blut zirkulieren, oder sich über eine CD1+ Vorläuferzelle im peripheren Gewebe wie den Langerhans Zellen der Haut, den Schleimhäuten oder im Interstitium entwickeln [36]. Der letzte Schritt in der Entwicklung der DC ist die Ausreifung zu CD83+ Zellen.

DC können *in vitro* direkt aus dem Blut gewonnen werden. Aufgrund der geringen Zellausbeute zirkulierender dendritischer Zellen von 0,1-0,5% der mononukleären Zellen aus dem Blut bedient man sich der Gewinnung größerer Mengen dendritischer Zellen durch die *in vitro* Kultur von Monozyten oder CD34+ Stammzellen aus dem Knochenmark, Nabelschnurblut, Leukapherese-Produkten oder mononukleärer Blutzellen. Die Monozyten werden fünf Tage unter der Zugabe der Zytokine GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierender Faktor), TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α), IL-4 (IL-Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierender Faktor 4), IL-10 und SCF (Stammzellefaktor) kultiviert, wodurch eine hohe Ausbeute dendritischer Zellen resultiert, die die gleichen Eigenschaften wie *in vivo* beschriebene DC zeigen [74][61][71]. Sie sind in der Lage eine primäre T-Zellantwort zu stimulieren, durch das Gewebe zu wandern, besitzen Phagozytoseaktivität, erzeugen eine Clusterbildung mit T-Zellen *in vitro*, besitzen abhängig vom Reifungsgrad spezifische Oberflächenmarker zur Unterscheidung von Makrophagen, B-Lymphozyten und anderen Immunzellen und

sind in der Lage zytochemische Vorgänge zu induzieren zur Abgrenzung makrophagenspezifischer Reaktionen [36].

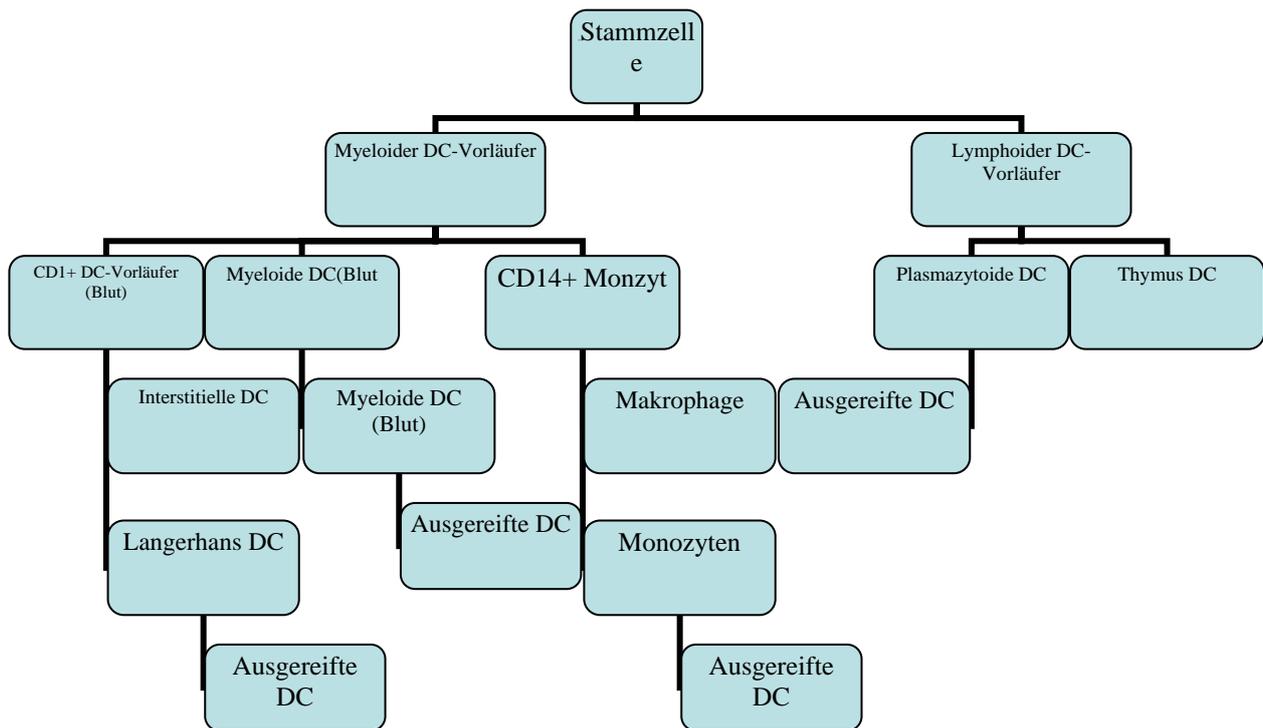


Abb.1 Die Möglichkeiten der hämatopoetischen Differenzierung lymphoider und myeloischer dendritischer Zellen, Timmermann und Levy 1999

Man findet nur wenige Zelllinien-spezifische Oberflächenmarker dendritischer Zellen wie CD2, CD3 (T- Lymphozyten), CD14 (Monozyten/Makrophagen), CD19, CD20, CD24 (B-

Lymphozyten) und CD16, CD56, CD57 (NK Zellen), wodurch sie sich von anderen Leukozytenpopulationen abgrenzen [36]. Immunphänotypisch lassen sie sich über ihre Oberflächenexpression von antigenpräsentierenden Molekülen (CD1, MHC I und II), Adhäsionsmolekülen (CD11, CD54, CD58) und T-Zell-stimulierenden Molekülen (CD40, CD80, CD86) charakterisieren. Abhängig vom Reifungsgrad besitzen sie unterschiedliche Funktionen. Als unreife Zellen kommen sie vor allem im lymphatischen Gewebe vor und zeichnen sich besonders durch ihre Fähigkeit aus, Antigene aufzunehmen durch Endo-, Pino- und Phagozytose, was bei ausgereiften DC nicht mehr möglich ist. Während des Reifungsprozesses exprimieren sie Chemokinrezeptoren, die die Migration in die T-Zell-reichen Zonen sekundärer lymphatischer Organe bewirken [73]. Über die Sekretion verschiedener Zytokine erfolgt die Interaktion mit naiven T-Zellen, die über ihren Antigen-spezifischen Rezeptor aktiviert werden und sich zu Antigen-spezifischen T-Effektorzellen entwickeln. Die aktivierten T-Zellen bewirken durch Rückkopplung über den CD40-Liganden eine verstärkte Aktivierung der DC und die Produktion von IL-12, das Th1-gerichtete Immunantworten über die Produktion der Zytokine IL-2 und INF- γ fördert [55][15]. Die Effektorzellen einer Th1-gerichteten Immunantwort sind CD8+ zytotoxische Zellen, die ihre Antigen-Epitope über die Präsentation auf MHC I-Molekülen erkennen. Hierbei erweisen sich die DC als Antigen-präsentierende Zellen besonders geeignet, extrazellulär aufgenommene Antigen-Epitope über MHC I Moleküle zu präsentieren, was als „Cross-Priming“ bezeichnet wird und die Induktion zytotoxischer Immunantworten gegen extrazelluläre Antigene bewirkt. Durch unterstützende gleichzeitige Erkennung von MHC II-präsentierenden Antigen-Epitopen durch die CD4+ T-Helferzellen wird ein noch effektiveres „Cross-Priming“ erreicht. Die reifen DC präsentieren Antigene an ihrer Oberfläche und bewirken so durch Einwanderung in die sekundär lymphatischen Gewebe wie Milz und Lymphknoten eine T- Zellstimulation.

Als „Wächter des Immunsystems“ weisen die DC außergewöhnliche Fähigkeiten auf, den T-Effektorzellen Antigene in einer stark immunogenen Form zu präsentieren und eine effektive Immunantwort zu induzieren, was sich darin zeigt, daß eine einzige aktivierte dendritische Zelle die Fähigkeit besitzt, bis zu 3000 naive T-Zellen zu stimulieren [79][7].

<u>Oberflächenmarker</u>	<u>Unreife DC</u>	<u>Reife DC</u>
Antigenpräsentierende Moleküle MHC I, MHC II	+	+++
Adhäsionsmoleküle CD 11, CD54, CD58	+	+++
Kostimulatorische Moleküle CD40, CD80 (B7.1), CD 86 (B7.2)	+	+++
Reifemarker CD 83	-	++
Leukozytendifferenzierungsantigene	-	-
<u>Funktionelle Marker</u>		
Antigen – Aufnahme über Man- nose-, Fcγ-, DEC 205 – Rezeptoren	++	+/-
Endozytoseaktivität	++	+/-
Motilität	+/-	++
Sekretion von IL-12 und T-Zell anlockenden Chemokine	-	+++

Tab.1 Charakteristika dendritischer Zellen im unreifen und reifen Stadium [11]

DC exprimieren zwei Typen von MHC-Molekülen: die Klasse I präsentiert den CD8-positiven zytotoxischen T- Lymphozyten Peptide endogener Proteine, die Klasse II den CD4 positiven Helfer T- Lymphozyten von außen aufgenommene Proteine, die zu Peptiden gespalten werden [30][59]. Die Menge der MHC Expression korreliert mit der Effizienz der Antigenpräsentation. Um die T-Zellen effektiv zu stimulieren und zur Vermehrung anzuregen, wird noch zusätzlich ein zweites Signal über kostimulatorische Faktoren wie CD80 oder CD86 benötigt.

Maligne entartete Zellen besitzen nur eine geringe immunogene Aktivität, weshalb sie nicht in der Lage sind, das Immunsystem zu ihrer Bekämpfung zu stimulieren. Die Ursache für die unzureichende Aktivierung naiver T-Zellen bei Tumoren zeigt sich im Fehlen kostimulatorischer Faktoren und der fehlenden Stimulation durch T-Helferzellen [85]. Aufgrund des „immune escape“ Mechanismus funktioniert die Antigenpräsentation

nicht *in vivo*. Viele Tumoren und Metastasen haben die Fähigkeit erworben, einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung zu entgehen. Eine reduzierte oder fehlende Präsentation von HLA Molekülen auf der Zelloberfläche macht Tumorzellen für T-Zellen immunologisch unsichtbar. Des Weiteren sind maligne Zellen in der Lage, das Immunsystem zu täuschen und zu inaktivieren und sich sehr rasch und unkontrolliert zu vermehren. Die Tumorzellen „verstecken“ sich in vom Immunsystem nicht erreichbaren Stellen (immunologisch privilegierte Stellen; z.B. Gehirn) oder hinter Bindegewebskapseln. Neben einer verminderten HLA Präsentation gelingt es manchen Tumorzellen über die Freisetzung von inhibierenden Faktoren, wie z.B. dem Tumor-Growth Factor TGF- β , die Abwehr der Immunabwehrzellen zu unterdrücken. *In vitro* kann jedoch eine Immunantwort erzeugt werden, der Transfer stimulierter antigenpräsentierender Zellen kann dann eine Immunantwort auslösen. Um dies zu realisieren, erscheint es sinnvoll DC einzusetzen, die durch Präsentation von Tumorantigenen potent zytotoxische Zellen aktivieren. Als mögliche Verfahren stehen zur Verfügung:

- Pulsierung dendritischer Zellen mit Tumor RNA oder Tumor Antigen
- Inkubation dendritischer Zellen mit Tumorzelllysat
- Fusion dendritischer Zellen mit Tumorzellen
- Virustransfektion dendritischer Zellen zur verstärkten zytotoxischen Immunantwort

1.6 Tumorstoffe

Mittels Immuntherapien können Abwehrreaktionen des Organismus beeinflusst werden. Im Rahmen maligner Tumoren bedeutet dies, daß das Immunsystem gegenüber Krebszellen sensibilisiert wird und die Abwehrbereitschaft gesteigert wird. Einige Formen der Immuntherapie bei bösartigen Erkrankungen erfolgen durch eine Verabreichung von Substanzen, die die Immunantwort beeinflussen, sog. Immunmodulatoren (Zytokine), mit denen sich die Abwehrzellen des Körpers untereinander verständigen und aktivieren können. Eine aktive Art der Immuntherapie besteht in Tumorstoffen, sog. Vakzinierungstherapien. Dadurch werden dem Immunsystem, ähnlich den Impfungen gegen virale oder bakterielle Erkrankungen, spezifische Antigene angeboten, die zu einer entsprechenden Immunreaktion führen

sollen. Die Impfung wird mit autologen (körpereigenen) Krebszellen des Patienten durchgeführt, die zuvor durch eine Operation gewonnen werden. Die aktiv-spezifische-Immuntherapie und die Impfung mit DC sind zwei Verfahren, die beide die Ziele verfolgen, das Auftreten von Metastasen oder Rückfällen zu verhindern beziehungsweise zu verzögern oder bereits vorhandene Metastasen oder Rezidive zu bekämpfen. Für die aktiv-spezifische-Immuntherapie wird der Impfstoff aus einer größeren Tumormasse hergestellt, die in Laboren zu spritzfertigen Ampullen aufbereitet wird, die nach Erstimpfung mit erhöhter Dosis und mehreren Auffrischimpfungen über Monate hinweg erfolgt. Die Impfung mit DC benötigt weniger Krebszellen, die dem Patienten entnommen werden müssen. DC werden aus Patientenblut entnommen, vermehrt und mit Tumorantigenen beladen, welche sie den Helfer- und Killerzellen nach Reimplantation präsentieren können. Zytokine können durch zusätzliche Aktivierungsmechanismen eine verstärkte Abwehrreaktion hervorrufen.

1.7 Pankreaskarzinom

Unter den Neoplasien des Gastrointestinaltraktes zeichnet sich das Pankreaskarzinom durch eine sehr schlechte Prognose aus mit einer Ein-Jahres-Überlebensrate von ca. 15-20% und einer 5-Jahres Überlebensrate unter 5%. Die Inzidenz liegt bei ca. 10/100000 Einwohner/Jahr, bei Rauchern oder auch bei Kaffeetrinkern kann sie erhöht sein. Der Häufigkeitsgipfel liegt im siebten Lebensjahrzehnt. Klinisch äußert sich das Pankreaskarzinom in oft uncharakteristischen Beschwerden wie bei einer chronischen Pankreatitis mit gürtelförmigen Oberbauchschmerzen, Inappetenz, Gewichtsverlust. Andererseits kann es sich auch ganz ohne Beschwerden zeigen. Als Therapieverfahren stehen zur Verfügung: die vollständige Resektion (Whipple-OP) oder adjuvante Therapieansätze wie Strahlen- oder Chemotherapie, die jedoch nur unzufriedenstellende Ergebnisse zeigen. Daher ist es wichtig, nach neuen, z.B. immuntherapeutischen Ansätzen, zu suchen.

Die Panc02 Zelllinie wurde 1984 durch Induktion mit 3-Methylcholanthren in C57BL/6 Mäusen zum Studium der Wirkung von Chemotherapeutika entwickelt. Dabei zeigte sich eine hohe Resistenz der Zelllinie gegen herkömmliche Substanzen, wie z.B.

Cyclophosphamid, Actinomycin D, 5-Fluoruracil, Vincristin, Adriamycin. Ein begrenztes Ansprechen erfolgte nur auf Nitrourate (PCNU). Diese Zelllinie stellte die erste Möglichkeit dar, murine Pankreaskarzinomzellen zu transplantieren [20].

1.8 Möglichkeiten des Gentransfers

Unter Gentransfer versteht man die künstliche Einschleusung von genetischem Material in eine Wirtszelle. Man unterscheidet virale von physikalisch-chemischen Methoden. Bei den letzteren zeigt sich im Allgemeinen die Schwierigkeit, daß die DNA eine negative elektrische Ladung besitzt, die ihre Aufnahme in die Zielzellen der Patienten erschwert, da die äußere Zellmembran ebenfalls negativ geladen ist und es so zu einer Abstoßungsreaktion kommt. Daher versucht man die DNA durch Zusatz von Chemikalien elektrisch zu neutralisieren oder die DNA mittels physischer Kraft direkt in die zu behandelnde Zelle zu bringen. Dazu stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Die Calciumphosphat-Methode dient der DNA-Fällung, wobei sich ein feiner Niederschlag bildet und die DNA schließlich mittels Phagozytose in das Zellinnere gelangt. Des Weiteren kann der Transport der DNA in positiv geladenen Liposomen erfolgen, was den Eintritt in die Zelle durch die negativ geladene Zellmembran erleichtert. Durch Mikroinjektion kann die DNA mit Hilfe einer Mikropipette direkt in einzelne Zellen injiziert werden. Ein weiteres Verfahren ist die Elektroporation, bei der die Zellmembranen in einem Medium, das die DNA enthält, über Stromstöße von bis zu 1500 Volt destabilisiert werden, was zum Eindringen der DNA in die Zellen führt. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Effizienz aus. Ebenfalls kann mittels der „Ballistischen Injektion“ DNA in die Zielzellen gelangen. Die Zellen werden hierbei mit DNA-beschichteten Gold- oder Wolfram-Kugeln beschossen. Im Vergleich zum viralen Transfer sind diese Methoden jedoch relativ ineffizient und die Integration sowie die Expression der gewünschten Gene ist hierbei nicht steuerbar, sondern unterliegt dem Zufall. Beim virusvermitteltem Gentransfer wird mit modifizierten Viren gearbeitet, sog. „entschärfte“ Viren, die keine Krankheit mehr hervorrufen. Viren zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, von Natur aus ihr Erbgut einzuschleusen. Sie docken an die Zellwand an, die sie mit Hilfe eines Enzyms an einer Stelle auflösen, und injizieren ihre DNA in den Zellkörper. Dabei dient das virale Genom als Vektor für den zu transferierenden

Genabschnitt. Die Zelle bildet nun neue Virenpartikel unter Auflösung der Zellwand und Freisetzung der neuen Viren. Manche Viren bauen jedoch ihr Genmaterial an beliebiger Stelle in die Chromosomen ein, was zu Schäden führen kann. Weiterhin erwägt man die Möglichkeit, daß sich die entschärften Viren im Körper unerwünscht verändern und wieder pathogen werden können oder eine Immunreaktion initiieren, die das Virus oder die von ihm infizierten Zellen zerstört, bevor die Therapie erste Wirkung zeigt. Als Gentransporteur (Vektoren) werden vor allem Adenoviren (Erkältungsviren) oder Retroviren eingesetzt. Adenoviren zeichnen sich durch einige besondere Vorteile aus: Sie zeigen eine hohe Übertragungseffizienz, können große Abschnitte von Fremd-DNA transportieren, sind in extrem hohem Titer züchtbar, infizieren sowohl sich noch teilende, als auch bereits völlig ausdifferenzierte Zellen. Man vermeidet mutagene Wirkungen dadurch, dass die DNA nicht in die Chromosomen der Wirtszelle integriert wird, sondern in loser Form in der Zelle bleibt. Sie können auch als Aerosol appliziert werden, was ihren Einsatz bei Atemwegserkrankungen vereinfacht. Nachteilig ist zu erwähnen, dass Adenoviren eine relativ heftige Immunantwort auslösen, und dass die transferierte DNA nur vorübergehend exprimiert wird, da sich die „lose“ DNA bei Zellteilungen nicht mitvermehrt, sondern auf die Tochterzellen verteilt.

Das Erbgut der Retroviren liegt in Form von RNA vor, die mit Hilfe eines speziellen Enzyms, der reversen Transkriptase, in virale DNA umgeschrieben wird und unter Mitwirkung eines weiteren Enzyms, der Integrase, in das Genom des Wirts integriert wird. Die Vorteile der Retroviren zeigen sich in einer hohen Übertragungseffizienz, in der Übertragung großer Fremd-DNA-Abschnitte und in einer dauerhaften Expression der übertragenen Gene durch die feste Integration in das Wirtsgenom. Als Nachteile stehen dem gegenüber, daß nur Zellen infiziert werden können, die sich gerade im Stadium der Teilung befinden, daß die Retroviren nur in niedrigen Titern züchtbar sind und dass die DNA an beliebigen Orten in die genomische DNA der Wirtszellen integriert wird, was zu Funktionsstörungen der betroffenen Gene führen kann. Als Alternative zu diesen Transfektionsmethoden steht noch die Injektion nackter DNA in Erprobung.

1.9 Zellfusion

Die Fusion dendritischer Zellen mit Tumorzellen ist ein neuer Ansatz in der Immuntherapie, der das Ziel verfolgt, T- Helfer Zellen für die Induktion tumorspezifischer zytolytischer Immunität zu aktivieren. Die Fusion wird durchgeführt mit murinen Tumorzellen und syngenen MHC-II-tragenden DC, um die Tumorantigenität mit der Immunogenität der syngenen MHC Moleküle zu kombinieren. Es sind bereits Versuche *in vitro*, im Mausmodell und in einigen klinischen Studien durchgeführt worden. Patienten mit fortgeschrittenen Stadien metastasierter Tumoren zeigten zum Teil komplette Remissionen, teilweise Remissionen oder unveränderte Krankheitsbilder [85]. Im Mausversuch zeigte sich nach Implantation des Tumors eine Regression dieses nach Injektion fusionierter dendritischer Zellen und Tumorzellen [56][41]. Folgende Tabelle zeigt dies anhand mehrerer Versuche mit verschiedenem Tumorgewebe.

Autor	Jahr	Tumorgewebe	Fusionseffizienz %	Ansprechen %
Gong	1997	Murines Adenokarzinom MC38	k.A.	100
Nestle	1998	Humanes Melanom	*lysatgepulst	27
Wang	1998	Murines Melanom B16	15-25	40
Trefzer	1999	Humanes Melanom	20-30	38
Kugler	2000	Humanes Nierenzellkarzinom	10-15	41
Gong	2000	Humanes Mammakarzinom	30	k.A.
Homma	2001	Murines HCC (BNL)	30	80
Kikuchi	2001	Humanes Gliom	22	25
Li	2001	Murines Melanom B16	10	38
Gong	2002	Murines Plasmozytom (4TOO)	30-50	80

Tab.2 Vergleich der Fusionseffizienz und des Ansprechens der Therapie mit DC-Tumorzellhybriden von verschiedenen Autoren

In vitro bewirken die Hybride die Lyse der Tumorzellen durch Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten sowie eine vermehrte Freisetzung von Interferon- γ aus den T-Lymphozyten in viel größerem Ausmaß, als dies durch DC oder durch Tumorzellen alleine geschieht [41].

Sowohl das Pulsen der DC mit Tumorantigenen als auch der Gentransfer erscheinen effektiv in der Förderung der antitumorösen Immunantwort. Dennoch besteht eine Einschränkung dieser Methoden in der Schwierigkeit, die geeigneten Tumorantigene oder ihre Gene zu identifizieren. Ein Versuch, dies zu umgehen geschieht mittels Tumorzell-DC-Hybride, welche Charakteristiken beider Zelltypen aufweisen und sowohl bekannte als auch unbekannte Tumorantigene dem Immunsystem präsentieren.

Es stehen mehrere Möglichkeiten der Zellfusion zur Verfügung. Die elektrische Zellfusion benutzt einen oder zwei elektrische Pulse, um die zwei verschiedenen Zelltypen miteinander zu vereinigen. Im Vergleich zur chemischen Methode, die mit Polyethylenglykol durchgeführt wird, hat sich die elektrische als effizienter herausgestellt [51]. Abhängig von der Zellart und vom eingesetzten elektrischen Puls wird eine Fusionsausbeute von 5 – 30 % erzielt.

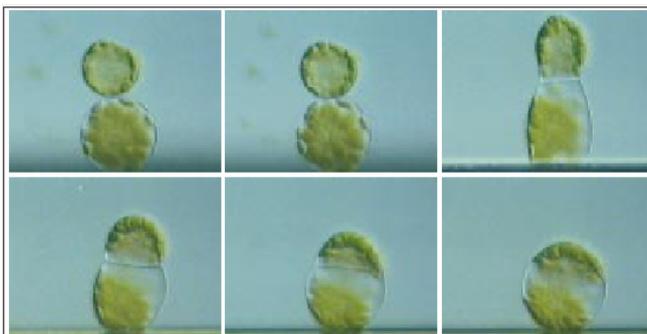


Abb.2 Zellfusion, Prof. Zimmermann, Würzburg

1.10 Zielsetzung

Tumorzellen können vom Immunsystem, und hier besonders von DC, nur unzureichend als solche erkannt und zerstört werden, was jedoch in ungenügendem Maße geschieht. Durch verschiedene, zum Teil noch unverstandene Mechanismen wird die Reifung antigenpräsentierender Zellen *in vivo* gehemmt. DC sind wichtig zur Aktivierung zytotoxischer tumorspezifischer T-Zellen, die die Tumorzellen gezielt angreifen. Zur Verbesserung der Anti-Tumor-Antwort werden hier DC mit Pankreaskarzinomzellen fusioniert, in der Absicht die hohe antigenpräsentierende Eigenschaft mit der hohen Antigenität zu verbinden.

Des Weiteren wird in Zusammenarbeit mit Herrn Alex Eliu eine weitere Verbesserung der Anti-Tumor Antwort durch eine CD40L-Virustransfektion der DC sowie der Panc02-DC Hybride erarbeitet.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist, diese neue Möglichkeit in der Immuntherapie zur Bekämpfung des Pankreaskarzinoms anzuwenden und ihre Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* zu prüfen. Hierfür werden DC aus dem Knochenmark der Maus gewonnen, deren Eigenschaften durchflusszytometrisch bestimmt und mit murinen Pankreaskarzinomzellen (Panc02) unter Verwendung verschiedener Fusionsprotokolle fusioniert. Als nächster Schritt gilt es, die Fusionseffizienz der murinen DC-Panc 02 Zellen mittels Durchflusszytometrie zu überprüfen, und sie auf ihren maximalen Wert zu steigern. Im Anschluss erfolgte in gemeinsamer Erarbeitung mit Herrn Alex Eliu die AdCD40L Transfektion. Die Interaktion zwischen dem Oberflächenantigen CD40 und dem CD40-Ligand scheint sehr wichtig für eine spezifische Antiimmunantwort zu sein. Als erster Schritt gilt es, die Transfektion der DC mit dem CD40-Ligand kodierenden Adenovirus mit derjenigen Menge an infektiösen Partikeln durchzuführen, mit der die höchste Zahl an CD40L positiven Zellen erzielt wird.

Als zweiter Schritt werden transfizierte DC mit murinen Pankreaskarzinomzellen (Panc02) fusioniert. Die Fusionseffizienz der murinen DC-Panc02 Zellen wird mittels Durchflusszytometrie überprüft und auf ihren maximalen Wert gesteigert.

Schließlich erfolgt die Transfektion der Panc02-DC Hybride und der Vergleich der Effizienz mit Hybridzellen aus Panc02 und AdCD40L- transfizierten Zellen.

Die so behandelten Zellen sollen die immunologischen Effektorzellen durch ihre Kokultivierung stärker aktivieren als unbehandelte Zellen, was sich durch eine erhöhte Zytotoxizität zeigen würde.

Bei nachgewiesener Effektivität *in vitro* sollen die so gewonnenen DC *in vivo* auf ihre antitumoröse Wirkung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Zur Durchführung dieser Arbeit bediente man sich der Einwegmaterialien (Fa. Falcon, Heidelberg, Deutschland), Elektroporationsküvetten der Größe 4mm (Fa. Equibio, Peqlab, Erlangen, Deutschland) und des MACS-Zellseparationsgeräts MS und Säulen Microbeads (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).

2.1.1 Lösungen, Puffer und Reagentien

Isofluran, Forene (Fa. Abbott, Wiesbaden, Deutschland)

Glukose 20%-ige Lösung, Glucosteril (Fa. Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)

BSA (Bovine Serum Albumin); FCS (Fetal Calf Serum); PBS (Phosphate Buffered Saline) (Fa. Laboratories, Linz, Österreich)

EDTA, 0,2 M (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Fluoreszenzfarbstoffe grün: PKH2, rot: PKH26 (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Erythrozytenlysepuffer: Ammoniumchlorid 8,29 g/l, Kaliumhydrogencarbonat 1,0 g/l, EDTA 0,0371 g/l in Aqua bidest, durch 0,2 µm-Filter steril filtriert

MACS-Puffer: PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA

PBS mit 1% BSA

Versene, 1:5000 (Fa. Gibco, Paisley, UK)

2.1.2 Zytokine

IL-1 β (100 U/ml) (Fa. Pepro Tech, London, UK)

IL-2 (300U/ml) (Fa. Pepro Tech, London, UK)

IL-4 (500U/ml)(Fa. Endogen, Woburn, USA)

GM-CSF(200U/ml) (Fa. Endogen, Woburn, USA)

IFN-γ (1000U/ml) (Fa. Pepro Tech, London, UK)

2.1.3 Antikörper

Anti LY6G/6R-1-UNLB, 0,5mg/ml (Fa. Southern Biotechnology, Birmingham, USA)

Anti CD45R/B220-UNLB, 0,5mg/ml (Fa. Southern Biotechnology, Birmingham, USA)

Anti MHC I PE (Fa. Southern Biotechnology, Birmingham, USA)

Anti CD4/L3T4-UNLB, 0,5mg/ml (Fa. Southern Biotechnology, Birmingham, USA)

Anti CD8/Lyt-2-UNLB, 0,5mg/ml (Fa. Southern Biotechnology, Birmingham, USA)

Goat-anti-rat IgG micro-beads (Fa. Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

Anti CD40 PE (Fa. Pharmingen, San Diego, USA)

Anti CD80 FITC, rat anti mouse (Fa. Serotec, Raleigh, USA)

Anti CD86 PE, rat anti mouse, 0,1mg/ml (Fa. Pharmingen, San Diego, USA)

2.1.4 Kulturmedien

RPMI-Medium: RPMI 1640 Glutamax (Fa. Gibco, Paisley, UK) + fetales Kälberserum FCS 10% (30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert) + Penicillin 10⁵ U/L + 10⁵ µg/L Streptomycin

Zytotox-Medium: RPMI 1640 farblos mit fetalem Kälberserum 2% (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert); Penicillin 105 U/L; 105 µg/L Streptomycin; L-Glutamin 1 mM; HEPES 25 mM

2.1.5 Mäuse

Für die Tierversuche wurden die Mäuse des Stammes C57/BJ6 verwendet. Nach Genehmigung des Tierversuches durch die Bezirksregierung Köln (Genehmigungsnummer Bezirksregierung Köln: 23.203.2-BN 22, 26/00) wurden diese Tiere unter Aufsicht des zentralen Tierstalles der Medizinischen Einrichtungen in Bonn gehalten. Die Tiere befanden sich in Gruppen zu fünf bis zehn Tieren pro Käfig mit einem Tag-Nachtrhythmus von jeweils zwölf Stunden bei frei zu wählender Trink- und Nahrungsmenge. Das Alter der Tiere schwankte zwischen einem und drei Monaten; eine Geschlechterpräferenz wurde nicht durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Monozyten

Mononukleäre Zellen werden aus dem Knochenmark des Femurs und der Tibia der Maus isoliert. Dazu wird die Maus zuvor mit Isofluran betäubt und anschließend durch eine Überstreckung der Halswirbelsäule getötet. Der Femur und die Tibia werden unter sterilen Bedingungen aus der Maus entnommen und in RPMI-Medium auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgt eine Reinigung der gewonnenen Knochen in 70%iger Ethanollösung. Nach Entfernen der Knochenköpfen wird das Knochenmark mittels 5ml Spritzen und RPMI-Medium aus dem Knochen gespült, mit dem Kolben einer 5ml Spritze durch einen Zell-Strainer (Nylonsieb) gerieben und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Das Falcon-Röhrchen wird nun in einer auf 4°C abgekühlten Zentrifuge (Varifuge 3.0, Fa. Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland) für sieben Minuten mit einer Geschwindigkeit von 800 Umdrehungen pro Minute (400×g) zentrifugiert. Der Überstand wird dann abgesaugt und das zurückbleibende Zell-Pellet wird in 10ml Erythrozytenlysepuffer gelöst und für zehn Minuten auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (7 min., 800 rpm, 4°C) und Entfernung des Überstandes erfolgt eine erste Zellzählung. Dazu wird das Zell-Pellet in 1ml PBS-Lösung gelöst und die Zellviabilität und Zellzahl nach Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3).

Die Zellen werden nun wieder in 10 ml PBS überführt und dann in einer Zentrifuge bei 800 rpm und 21°C für sieben Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zell-Pellet wird in 50µl PBS gelöst und spezifische Antikörper werden in folgenden Mengen zugegeben, wobei man insgesamt 6µl gelöste Antikörper pro 10⁶ Zellen benötigt. Der jeweilige Anteil an einem speziellen Antikörper ergibt sich aus folgender Auflistung:

40% LY6G

30% CD45R

10% MHC II

10% CD4

10% CD8

Durch diese Antikörper werden die Leukozyten des Knochenmarks von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen getrennt [50.]

Daraus ergibt sich eine zusammenfassende Formel zur Errechnung der spezifischen Antikörpermenge, die wie folgt lautet:

$$\text{Antikörpermenge}[\mu\text{l}] = \text{Zellzahl} \times 6\mu\text{l}/10^6 \times \text{prozentualer Anteil des Antikörpers}$$

Die Antikörper werden 20 Minuten mit den Zellen auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (8 Min., 800 rpm, 4°C) werden die gewonnenen Antikörper-beladenen Zellen in 80µl MACS-Puffer (PBS+BSA+EDTA) resuspendiert, bevor sie mit einem zweiten Antikörper behandelt werden. Dieser bindet an den ersten Antikörper und enthält einen ferromagnetischen Partikel, der der anschließenden Zellseparation dient. Es werden 10^7 Zellen mit 20µl goat-anti-rat microbeads beladen. Diese Zellsuspension wird nun zur optimalen Antikörperbindung für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Währenddessen werden 100ml MACS-Puffer (PBS+BSA+EDTA) entgast, indem ein mit MACS-Puffer gefülltes verschlossenes Schnabelröhrchen über einen Gummischlauch an eine Absaugpumpe (Vacuubrand Type BVC-01, Wertheim, Deutschland) angeschlossen ist. Nach 15-minütiger Inkubation der Antikörper wird die Zellsuspension mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt, bevor sie zentrifugiert wird. Der Überstand wird abgesaugt, und das Zell-Pellet wird in 500µl entgastem MACS-Puffer resuspendiert. Nun erfolgt die MACS-Zellseparation, wie sie in Kapitel 3.2.2 beschrieben wird. Nach anschließender Zentrifugation der Suspension der gewonnenen Zellen, die nicht mit den oben genannten Antikörpern beladen sind, wird der Überstand abgesaugt und das erhaltene Zell-Pellet für eine zweite Zellzählung in 1ml RPMI-Medium gelöst. Aus dem 1ml werden 20µl für die Zellzählung entnommen und die restlichen 980µl werden in eine große Kulturflasche gefüllt. Zusätzlich gibt man noch in die Kulturflasche (175 cm², Falcon, Becton Dickinson) 21ml RPMI-Medium +10% FCS +5% Penicillin/Streptomycin und folgende Zytokine: 110µl IL-4, 1100µl GM-CSF.

2.2.2 MACS (magnetische Zellseparation) zur Zellanreicherung

Bei dieser Trennmethode werden die Zellen von Interesse mit Mikropartikeln mit einem Durchmesser von 70nm markiert. Der wichtigste Bestandteil des MACS ist ein starkes Permanentmagnet-System, in dessen Magnetfeld eine Trennsäule eingebracht wird. Diese Trennsäule besitzt eine Matrix aus eisenmagnetischen Kugeln. Das Permanentmagnet-System erzeugt in der direkten Umgebung der Drähte oder Kugeln, bzw. in der Säule, einen Feldgradienten, der um ein Tausendfaches größer ist als die von einem vergleichbaren einfachen Magneten erzeugten magnetischen Kräfte. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung oder zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode nur zur Anreicherung von Zellen angewendet. Die zu sortierenden Zellen werden nach Anweisung des Herstellers mit Antikörpern, die an magnetische Mikro-Kügelchen (beads) gekoppelt sind, inkubiert, mit entgastem MACS-Puffer gewaschen und auf eine ferromagnetische Säule (LS-, BS-, CS-, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) in ein Magnetfeld gegeben. Der spezifische monoklonale Antikörper ist entweder direkt an superferromagnetische Partikel (microbeads) gebunden, oder er wird indirekt von einem zweiten Antikörper erkannt. Dieser zweite Antikörper ist an microbeads gebunden und erkennt den Fc-Anteil des ersten Antikörpers. An die microbeads gebundene Zellen können in einem magnetischen Feld über eine Säule getrennt werden. Durch Spülen der Säule mit entgastem MACS-Puffer werden ungebundene Zellen ausgewaschen, und Beads tragende Zellen verbleiben dort. In dieser Arbeit werden zuerst 500µl entgaster MACS-Puffer durch eine Mini-MACS-Säule geschickt, denen dann 500µl einer Zellsuspension aus gewonnenen Zellen und entgastem MACS-Puffer folgen und anschließend wird noch dreimal 500µl entgaster MACS-Puffer in dieselbe Säule gegeben. Die Zellen mit den oben erwähnten Antikörpern werden in der magnetischen Säule festgehalten. Jetzt kann man entweder ungebundene Zellen auffangen, die von unerwünschten Zellpopulationen gereinigt werden sollen, oder die Säule nach Entfernung aus dem Magnetfeld eluieren, um gebundene selektionierte Zellen zu erhalten.

2.2.3 Zellzählung dendritischer Zellen

Die erste Zellzählung erfolgt nach Gewinnung der Zellen aus dem Knochenmark der Maus und nach Behandlung dieser mit Erythrozytenlyse-Puffer, der die Erythrozyten entfernt. Die Zellviabilität und Zellzahl wird nach Trypanblau-Färbung durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Es ergeben sich Zellzahlen von 1×10^7 Zellen bis zu 8×10^7 Zellen. Die Zahl der toten Zellen lässt sich aufgrund ihrer Form und Dichte gut bestimmen und beträgt circa 5×10^6 - 8×10^6 . Nach zweifacher Antikörperfärbung und MACS-Zellseparation erfolgt eine zweite Zellzählung, ebenfalls nach Trypanblau-Färbung. 20 μ l Zellsuspension werden mit 180 μ l Trypanblau 0,5% 1:10 verdünnt. Ein Aliquot wird unter ein Deckplättchen pipettiert, wobei sich die Zählkammer durch die kapillare Ansaugung des Tropfens füllt. Im Anschluss kann man so im Lichtmikroskop die Zellen in den vier Eckquadranten (4mm^2) der Neubauer-Zählkammer zählen. Ein Quadrant enthält 0,1 μ l Zellsuspension. Hierbei ergeben sich Zellzahlen von 5×10^6 - 5×10^7 anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl im Quadrant} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die Arbeiten erfolgten alle bis auf die Zellzählung unter einer sterilen Werkbank (Herasafe 12, Heraeus, Hanau und anatair BSK, Bioflow, Meckenheim, Deutschland).

2.2.4 Kultur dendritischer Zellen

Die DC werden unter Nutzung ihrer Adhärenz auf Plastikoberflächen angereichert [68]. Die aus murinem Knochenmark gewonnenen DC werden mit einer Dichte von $2-4 \times 10^7$ Zellen in 21ml RPMI-Medium (+10%FCS +5% Penicillin/Streptomycin) in einer großen Zellkulturflasche ausgesät unter Zugabe der Zytokine IL-4 (110 μ l) und GM-CSF (1100 μ l). In der Literatur finden IL-4 Konzentrationen von 250-1000 U/ml bei der Kultur dendritischer Zellen Verwendung. Da die biologische Aktivität zwischen den Produkten verschiedener Hersteller starke Schwankungen aufweisen kann, wurde IL-4 der Firma Cell Sciences bzw. Endogen in einer Konzentration von 500 U/ml eingesetzt und die Kulturergebnisse verglichen.

Nach der Zellseparation werden die unreifen DC direkt im Anschluss in einer Konzentration von 1×10^7 - 3×10^7 Zellen in Zellkulturflaschen (175cm^2 , Falcon, Becton

Dickinson) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Kulturmedium im Brutschrank für 5-6 Tage inkubiert, um sich zu reifen DC zu entwickeln. Zur Unterstützung wird am dritten Tag 11ml Kulturmedium zugegeben, am sechsten Tag erfolgt eine weitere Mediumkontrolle, wobei das Kulturmedium je nach Bedarf ausgetauscht werden kann. Am siebten Tag werden die DC geerntet. Unter Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF wird eine schnellere Zellreifung beobachtet. Die nicht adhärenente Zellfraktion wird mit einer sterilen Pipette abgenommen und mit den adhärenenten Zellen im Falcon-Röhrchen vermischt, um eine höhere Zellausbeute zu erhalten. Zur Zellernte der adhärenenten Zellen werden diese mechanisch mittels eines cell-scrapers (Zellschaber) gelöst. Anschließend wird die Zellkulturflasche noch zweimal mit 10 ml PBS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) gespült, um auch eine möglichst hohe Ausbeute von DC zu erreichen. Im Verlauf der Kultur erfolgte mindestens jeden zweiten Tag eine Kontrolle der Zellmorphologie im Lichtmikroskop. Am fünften Tag erfolgt die Charakterisierung der Zellen und ihrer exprimierenden Oberflächenmarker in einer durchflusszytometrischen Analyse.

2.2.5 Elektrofusion dendritischer Zellen mit Tumorzellen (Pankreaskarzinomzellen Panc02)

Die Elektrofusion zählt zu den nicht-viralen Gentransfermethoden, den sog. physikalischen Methoden (elektrischer Impuls zur Öffnung der Zellmembran). Der Vorteil dieser Methode besteht in der geringen Toxizität und in der guten Toleranz des Immunsystems gegenüber den fusionierten Zellen. Diese Methode sowie auch andere physikalische Methoden des Gentransfers, wie der ballistische Gentransfer (Beschuss von Zellen z.B. mit Gold-DNA Partikeln) oder die Mikroinjektion der DNA (direktes Einbringen von DNA über Kapillaren), haben den Nachteil gegenüber dem viralen Gentransfer einer geringeren Transfektionseffizienz in primären Zellen.

Die Effizienz der Elektrofusion hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die wichtigsten Faktoren sind die Stärke des angelegten Feldes, die Dauer des elektrischen Pulses, die

Temperatur vor und nach dem elektrischen Impuls, die verwendete Zellkonzentration und das verwendete Elektrofusionsmedium.

Um maximale Elektrofusionseffizienzen zu erreichen, müssen alle diese Parameter für den jeweiligen Zelltyp optimal eingestellt werden. Zur Optimierung des Fusionsergebnisses wurden umfangreiche Vorversuche durchgeführt.

DC wurden in 400µl Glukoselösung in Gegenwart der Pankreaskarzinomzellen Panc02 zwei elektrischen Pulsen (1.Puls: 100-450V, 2.Puls: 500-2700V) ausgesetzt. Beim ersten Puls wurden die Zellen aneinandergereiht, beim zweiten die Zellmembran kurzfristig permeabel gemacht, um eine Neuordnung in Form von Zellhybriden zu ermöglichen [95][96] (siehe 5.4).

Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden nach Zentrifugation und Aufnahme des Zell-Pellets in Glukoselösung in der entsprechenden Zellzahl von je 2×10^6 dendritischer Zellen und Pankreaskarzinomzellen in die sterilen Elektroporationsküvetten (4mm, EquiBio) eingeführt. Alle Versuche wurden mit dem Electroporator EasyjecT Plus D 2000 (Fa. Equibio, Middlesex, UK) durchgeführt.

2.2.6 Virustransfektion mittels Ad-GFP (Green fluorescence protein)

Das GFP-Protein ist ein grün fluoreszierendes Protein, das natürlich in einer Quallenart vorkommt. Dieses GFP-Protein kann mit anderen Proteinen, die man genauer untersuchen möchte, fusioniert werden und in Zellen eingebracht werden. Anhand der Fluoreszenz kann das Fusions-Protein während des Zell-Zyklus beobachtet und genau lokalisiert werden. Durch diese Technik können Aussagen über die Funktion und die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen gemacht werden.

In gemeinsamer Erarbeitung mit Herrn Alex Eliu wurde das GFP exprimierende Adenovirus Ad-GFP verwendet, um Panc02-Tumorzellen und murine DC zu infizieren. Die Expression von GFP in Panc02 Zellen bzw. DC dient der Bestimmung der Transduktionseffizienz adenoviraler Vektoren. Das Adenovirus Ad-GFP wurde freundlicherweise von Prof. W. H. Caselmann (Medizinische Klinik und Polyklinik I, Bonn, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Bei den Panc02-Zellen und DC wurde die Transfektionseffizienz adenoviraler Vektoren durch GFP-Expression untersucht. Die Zellen wurden ausgesät und am Tag der Infektion in verschiedenen MOIs (multiplicity of infection) mit den GFP-übertragenden Adenoviren für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, um unter dem Fluoreszenzmikroskop die Expression des GFPs sichtbar zu machen. 48 Stunden nach der Infektion wurde die stärkste Expression der Adenoviren beobachtet und durch Auszählen der fluoreszierenden Zellen im Vergleich zu der gesamten Zellzahl der Prozentsatz der transduzierten Zellen ausgerechnet.

Über Messungen des Fluoreszenzfarbstoffs GFP kann auch durchflusszytometrisch die Expression des GFP-Proteins in DC nach der Transduktion mit GFP-enthaltenden Adenoviren gemessen werden.

2.2.7 Virustransfektion mittels AdCD40L

Die Interaktion der Oberflächenantigene CD40 und CD40 Ligand führt zu einer verstärkten Stimulation zytotoxischer T-Zellen, was letztendlich eine gesteigerte Immunantwort bedingt. Dies kann bei Tumorzellen durch Transfektion von Zellen mit einem Adenovirus, der die Expression des CD40 Liganden an der Zelloberfläche verstärkt, erreicht werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Adenovirus wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Caselmann (Medizinische Klinik und Polyklinik I, Bonn, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Zur adenoviralen Transfektion der Pankreaskarzinomzellen Panc02 wurden die Pankreaskarzinomzellen Panc02 zunächst für 2-3 Tage kultiviert bis sie eine bestimmte Konzentration erreicht haben. Parallel wurden 5 Tage alte ausgereifte murine DC in einer bestimmten Konzentration transfiziert. Es wurde eine Versuchsreihe zur Optimierung der Transfektion mit steigender MOI-Zahl durchgeführt. DC wurden mit einer Virusmenge von 2500 MOI und die Panc02 Zellen mit einer Virusmenge von 500 MOI infiziert. Zur Berechnung der Virusmenge wurde folgende Formel eingesetzt:

Virusmenge=MOI-Zahl × Zellzahl / Viruskonzentration.

In gemeinsamer Erarbeitung mit Herrn Alex Eliu wurde eine Viruskonzentration von $1 \times 10^{11} / \mu\text{l}$ verwendet. Nach der Hinzugabe des Virus erfolgt eine 30-minütige Inkubation. Im Anschluss werden die transfizierten DC für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert, ohne dass der Virus ausgewaschen wird. Die infizierten Panc02 Zellen werden ebenfalls für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Fusion der transfizierten Panc02 mit den transfizierten DC, die Fusion transfizierter Panc02 Zellen mit nicht transfizierten DC, die Fusion von transfizierten DC mit nicht transfizierten Panc02 Zellen und die durchflusszytometrische Analyse der transfizierten Zellen.

Ein anderer Ansatz ist die Virustransfektion der zuvor fusionierten DC mit den Pankreaskarzinomzellen Panc02, nach der oben genannten Methode.

Die Virustransfektion mittels AdCD40L erfolgte an 5 Tage alten DC, an 2 Tage zuvor geteilten Pankreaskarzinomzellen Panc02 und an 2 Tage alten Zellhybriden aus DC und Pankreaskarzinomzellen Panc02. Die Virustransfektion dendritischer Zellen wurde mit unterschiedlichen Virusmengen (MOI-Zahlen) durchgeführt.

Zur Kontrolle der Methode wurde eine Transfektion sowohl der DC als auch der Panc02 Zellen mit dem Virus lacZ mit einer MOI von 250 durchgeführt.

In einer weiteren Kontrolle der Transfektionseffizienz und -methode wurden humane Bronchialkarzinomzellen mit dem Adenovirus AdCD40L behandelt. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, daß 98% der transfizierten Zellen CD40L positiv waren.

2.2.8 Tumorzelllinie

Es wurde die murine, exokrin duktales Pankreaskarzinomzelllinie PANC02 verwendet (freundliche Gabe von Dr. Prieto, Universität Navarra, Pamplona, Spanien). Sie wurde 1984 erstbeschrieben von T.H. Corbett [20].

2.2.9 Kultur der Tumorzelllinie

Die Pankreaskarzinomzelllinie Panc02 wird in einer Menge von $4-5 \times 10^6$ in 12ml RPMI-Medium in einer Zellkulturflasche (75cm^2 , Falcon, Becton Dickinson) im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ihre Zellverdopplungszeit beträgt 3-4

Tage. Eine Teilung erfolgt 1-2x pro Woche in einem Verhältnis von 1:4. Die Zellen wachsen adhärent, so daß sie sich am besten enzymatisch mittels Versene (1:5000, Gibco) oder mit einem cell-scraper (Zellschaber) lösen lassen.

2.2.10 Kokultur von dendritischen Zellen mit Pankreaskarzinomzellen Panc02

Die Kokultur von DC und Pankreaskarzinomzellen Panc02 wird durchgeführt, um den Einfluss beider Zellentypen aufeinander zu beobachten.

Panc02 Zellen werden in Kulturmedium à 3ml pro well in 6-Loch-Platten (Multiwell, Becton Dickinson) in verdünnter Konzentration ausgesät und für einen Tag in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag erfolgt die Zugabe der 6 Tage alten DC in einer Konzentration von 4×10^6 im Verhältnis 1:1 zu den Pankreaskarzinomzellen. Nach einer Kokultivierung von einem Tag wird eine Antikörperfärbung mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD40, CD80, CD86 und MHC I durchgeführt (siehe 3.2.12). Im Anschluss erfolgt die durchflusszytometrische Auswertung.

2.2.11 Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der Oberflächenmoleküle der für die Fusion eingesetzten Zellen und der erfolgreich fusionierten Zellen bedient man sich der Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie stellt dabei ein optisches Messsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar. Es unterscheidet die Zellen in Hinblick auf ihre Zellgröße, Granulierung und rot oder grün fluoreszenz-markierte Antikörperbindung. Damit lassen sich prozentuale Anteile von Subpopulationen bestimmen. Monoklonale Antikörper oder Anti-Immunglobuline werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, wodurch bestimmte Zellen einer Population markiert werden. Die so gekennzeichneten Zellen werden in einem großen Volumen einer Salzlösung mittels Pressluft durch eine dünne Kapillare gedrückt, aus der sie in eine Probenkammer geschleust werden. Ein Hüllstrom aus entgastem Wasser (Sheat) erzeugt in dieser Kapillare mit dem Probenstrom eine laminare Strömung, in der die Zellen hintereinander perlschnurartig aufgereiht sind. In der Probenkammer werden die Zellen nach dem Prinzip der

hydrodynamischen Fokussierung durch einen Laserstrahl geführt und so zur Eigenfluoreszenz angeregt. Diese Signale werden von einem optischen Detektionssystem aus Photodioden und Photomultiplier (Elektronenvervielfacher) erfasst und in elektrische Impulse umgewandelt. Das Funktionsprinzip eines 3-Farben-Durchflusszytometers beschreibt, wie der Laserstrahl in der Probenkammer an den vorbeigeführten Zellen in zwei Richtungen gebrochen wird, und zwar in Richtung des Lasers (FS=Forward Scatter) und in eine Richtung orthogonal zum Laser und zum Flüssigkeitsstrom (SS=Sidescatter). Nach weiterer Fokussierung mittels Strahlteiler und Dicroitspiegel und dem Passieren eines Filters erreichen die Strahlen des Forward Scatter den Photodetektor und die Strahlen des Sidescatter (SS) das SS-Photomultiplier-Tube sowie die Photomultiplier-Tubes der drei Fluoreszenzen. Im Anschluss werden die Signale digitalisiert, verstärkt und in Kanäle entsprechend ihrer Intensität eingeteilt. Nach einer zwischengeschalteten Signalverstärkung, die sowohl linear als auch logarithmisch erfolgen kann, laufen die Signale durch einen A/D-Wandler (Analog/Digital-Wandler), welcher eine Einteilung in bis zu 1024 Kanäle entsprechend der Impulsintensität ausführt. So kann für jede Zelle eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften erreicht werden, die wiederum in zwei Kategorien, das Streulicht und die Fluoreszenz, eingeteilt wird. Bei der Fluoreszenz handelt es sich um die Lichtenergie, die nach Strahlungsabsorption durch ein Fluorochrom in Form von Emission wieder freigesetzt wird. Diese Emission wird von dem Photomultiplier-Tube gemessen und ist aufgrund des Stokes-Shift immer etwas langwelliger und energieärmer als die Absorptionsenergie. Da sowohl die Absorption als auch die Emission substanzspezifische Spektren aufweisen, kann durch die Wahl verschiedener Fluorochrome mit einheitlichem Absorptionsspektrum, aber unterschiedlicher Emissionsspektren, mit einer einzigen Lichtquelle gearbeitet werden.

2.2.12 Zellfärbung zur Bestimmung der Fusionseffizienz

Nach Kultivierung werden Pankreaskarzinomzellen Panc02 und reife DC geerntet. Die Zellen werden bei Raumtemperatur für sieben Minuten bei 800rpm zentrifugiert. Es folgt eine Zellzählung mit 20µl Zellsuspension und 180µl Trypanblau. Gleichzeitig wird eine Kontrollprobe beider Zellarten für die am Ende durchzuführende

durchflusszytometrische Auswertung entnommen. Die Färbemischung wird folgendermaßen hergestellt: 3µl grüner Farbstoff (PKH 2, Sigma)/ 10^7 Zellen werden mit 1ml Diluent A (Sigma) gemischt, was die Pankreaskarzinomellen Panc02 markiert, während 3µl roter Farbstoff (PKH 26, Sigma) mit 1ml Diluent C (Sigma) die DC färbt. Das Farbstoffgemisch wird sofort zu dem gewonnenen Zell-Pellet gegeben und resuspendiert. Während der Inkubation, die im Dunkeln erfolgt und für den roten Farbstoff drei Minuten, für den grünen Farbstoff zehn Minuten beträgt, wird das Falcon-Röhrchen, in dem sich die zu färbenden Zellen befinden, des Öfteren geschüttelt. Nach Inkubation der Farbstoffe erfolgt eine Inkubation mit 3ml FCS/ 10^7 Zellen für eine Minute. Anschließend wird RPMI-Medium (+10% FCS, +5% Penicillin/Streptomycin) zugegeben und zentrifugiert, dem ein dreimaliger Waschvorgang mit jeweils 6ml PBS folgt. Nun werden die Zellen gezählt und im Durchflusszytometer nach ihrer Anfärbbarkeit ausgewertet.

2.2.13 Immunphänotypisierung dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometer

DC wurden nach fünftägiger Kultur auf die Expression charakteristischer Oberflächenmarker untersucht. Reife DC wurden geerntet, zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Das Zell-Pellet wurde in 50µl PBS aufgenommen und resuspendiert. Es werden lichtempfindliche Fluorochrom konjugierte Antikörper hinzugegeben. CD40 ist PE-konjugiert (Phycoerythrin), CD86, CD80, MHC II sind FITC (Fluorisoithiocyanat) konjugiert. 10µl FITC konjugierte Antikörper und 5µl PE konjugierte Antikörper werden zu 50µl Zellsuspension gegeben. Die Inkubation erfolgt für 10-15 Minuten abgedunkelt im Kühlschrank bei 0°C auf Eis. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das gewonnene Zell-Pellet durchflusszytometrisch bestimmt. Die Messungen wurden am EPICS XL der Firma Coulter-Beckmann (Krefeld) mit der Software System II, Version 3.0 durchgeführt.

2.2.14 Lymphozytenseparation aus der Mäusemilz

Nach Präparation der Milz aus der zuvor getöteten Maus wird das Organ in ca. 5ml Kulturmedium überführt. Anschliessend wird die Milz in einem Nylonsieb (cell strainer)

über einem Falcon-Röhrchen mit einem Stempel einer 5ml Spritze ausgedrückt. Die Zellen werden mit 5ml PBS BSA 1% suspendiert und in ein Falcon-Röhrchen (Ausgangsröhrchen) überführt. Um möglichst viele Zellen zu erhalten, werden Sieb und Stempel am Ende mit PBS BSA 1% abgespült. Nun wird das Röhrchen acht Minuten bei 800rpm und bei 21°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen, und das gewonnene Zell-Pellet wird in 1ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und dann auf 5ml Erythrozytenlysepuffer aufgefüllt. Den Erythrozytenlysepuffer lässt man zehn Minuten einwirken, bevor erneut für acht Minuten bei 800rpm zentrifugiert wird. Der Überstand wird abgesaugt und 10ml PBS-BSA 1% werden zu dem Zell-Pellet gegeben und vermischt. Es wird noch einmal zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, und das erhaltene Zell-Pellet wird in Kulturmedium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturflasche gegeben unter Zugabe von 10µl/ml IFN-γ. Pro Milz werden meist $4-6 \times 10^7$ Zellen gewonnen. Zur Primärkultur werden am ersten Tag noch folgende Immunmodulatoren hinzugefügt: 300U/ml IL-2 (30µl/ml), 50 ng/ml α CD-3 (10µl/ml), 10µl/ml IFN-γ und 100U/ml IL-β (10µl/ml). Am Tag drei erfolgt die Zugabe von 300U/ml IL-2 und nach 14 Tagen Kultur und Erhalt reifer DC kann der Zytotoxitätsassay durchgeführt werden.

2.2.15 Propidiumjodid-Färbung (PI-Färbung)

Die Propidiumjodid-Gegenfärbung dient der Unterscheidung toter Zellen von lebenden Zellen. Es ist eine qualitative Methode um festzustellen, wieviele Zellen in einem Zellgemisch nekrotisch sind.

Propidiumjodid ist ein Stoff, der in DNA Stränge interkaliert. Eine fehlende Färbung zeigt somit eine intakte Membranintegrität und schließt eine Nekrose aus. Die Vorteile dieser Färbemethode bestehen in einer eindeutigen Darstellung nekrotischer Zellen und in der Untersuchung hoher Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit mittels dem Durchflusszytometer. Mittels Annexin, einem Ca^{2+} - und Phospholipid-bindendem Zellprotein, und Propidiumjodid können vier verschiedene Färbekombinationen erwartet werden, die wie folgt interpretiert werden können:

<u>Beobachtete Färbung:</u>	<u>Interpretation:</u>
Annexin- und PI- Färbung negativ	Vitale Zelle
Annexin-Färbung negativ, PI-Färbung positiv	Nekrotische Zelle
Annexin-Färbung positiv, PI-Färbung negativ	Apoptotische Zelle
Annexin- und PI-Färbung positiv	Nekrotische Zelle

Tab.3 Vergleich der Kombination verschiedener Zellfärbung zur Beurteilung der Vitalität von Zellen

2.2.16 Zytotoxizitätsnachweis

Als Zytotoxizitätsnachweis wurde ein Verfahren gewählt, das keine radioaktiven Substanzen benötigt und trotzdem sehr empfindliche Nachweise erbringt (Delfia EuTDA Cytotoxicity Assay, Perkin Elmer). Die Methode ist besonders für fragile Zelllinien geeignet und erleichtert eine optimierte Zellmarkierung. Die Zellmembran wird weder physikalisch noch chemisch behandelt und der Ligand wird in den Zielzellen schnell angereichert. Die Methode basiert auf der Beladung der Zielzellen mit einem Fluoreszenz-verstärkenden Ligand (BATDA), der die Zellmembran schnell durchdringt. In der Zelle erfolgt eine Hydrolyse zur Bildung eines hydrophilen Liganden, der die Membran nicht mehr passieren kann. Nach Zytolyse wird der Ligand freigesetzt und bindet an Eu. Eu und der TDA-Ligand bilden einen stabilen, stark fluoreszierenden Chelatkomplex. Das gemessene Signal entspricht der Menge der lysierten Zellen.

Targetzellen, deren Lyse durch Effektorzellen induziert werden soll, wurden mit 10.000 Zellen pro well in einer 96-Loch-MTP à 100 µl ausgesät. Um einen Hintergrund durch in FCS enthaltenes LDH und als pH-Indikator beigefügtes Phenolrot zu vermeiden, wurde RPMI 160 farblos mit einem Serumgehalt von 2% (Zytotox-Medium) verwendet. CIK-Zellen wurden in 100 µl/well so zugegeben, dass sich Effektor- zu Target-Verhältnisse im Bereich von 80:1 bis 2,5:1 ergaben. Parallel dazu wurde eine Platte mit Effektorzellen ohne Targetzellen pipettiert, um die Spontanfreisetzung der Effektorzellen zu bestimmen. Die wells wurden mit Zytotox-Medium ad 200 µl/well aufgefüllt. Es wurden

jeweils drei gleiche Wells pipettiert. In sechs Wells wurden Targetzellen ohne Effektorzellen pipettiert, um die Spontanfreisetzung der Targetzellen zu bestimmen. Ebenfalls als Sechsfachbestimmung wurde die Maximalfreisetzung der Targetzellen induziert, indem ein anionisches Detergenz (IGEPAL) 1% zu den Targetzellen gegeben wurde.

Nach einer fünfstündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Platten zentrifugiert (200×g, 7 min). 50 µl Überstand wurden geerntet und in eine neue 96-well-Platte überführt. Zu den Proben wurden 50 µl Substrat zugegeben, die Farbreaktion wurde nach ca. 20 min durch 50 µl einer 1 M Salzsäure/well abgestoppt. Die Extinktion wurde photometrisch bei 492 nm bestimmt. Die Extinktion von Zytotox-Medium wurde als Blank gemessen und von den gemessenen Extinktionen abgezogen. Zytotox-Medium mit 1% IGEPAL wurde als Blank für die maximal lysierten Targetzellen verwendet. Die prozentuale Zytotoxizität berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Lyse [\%]} = \frac{(\text{induzierte Targetfreisetzung} - \text{Effektorspontanfreisetzung}) - \text{Targetspontanfreisetzung}}{\text{Targetmaximalfreisetzung} - \text{Targetspontanfreisetzung}} * 100$$

2.2.17 Tumorinokulation in C57/BJ6 Mäuse

Es wurden Gruppen mit jeweils sechs Mäusen pro Gruppe gebildet. Die Versuche mit jeweils einer Gruppe wurden insgesamt drei Mal wiederholt. Für die *in vivo* Versuche bekamen C57/BJ6 Mäuse ca. 1×10^5 PANC02 (ca. 0,1ml) Zellen unter Ultraschallkontrolle in den Schwanz des Pankreas gespritzt. Hier wurden die Mäuse mittels Isofluran narkotisiert und in eine Beatmungsinstallation verbracht. Nach vollständiger Ruhigstellung des Tieres wurde ein 10 Mhz Schallkopf, der normalerweise als intraoperativer Schallkopf zur Beurteilung von Koronarien verwendet wird, auf den rasierten Oberbauch mit Hilfe eines Stativs positioniert. Als Vorlaufstrecke wurde handelsübliches, zentrifugiertes Ultraschallgel verwandt. Unter Ultraschallkontrolle wurde dann eine 16 G Nadel bis zum Pankreasschwanz vorgeführt und im Pankreasschwanz entleert.

2.2.18 Kontrolle des Tumorwachstums

Alle zwei Tage wurde mit der unter Punkt 3.2.17 beschriebenen Einrichtung das Größenwachstum beobachtet und gemessen.

2.2.19 Inokulation von nativen DC oder fusionierten DC in einen orthotopen Pankreastumor

Erreichte der Tumor sonografisch gemessen eine Größe von ca. 2mm im max. Durchmesser (zu >90% am Tag 3 nach der Tumorinokulation) wurde mittels der unter Punkt 3.2.17 beschriebenen Methode die Kontrollen, DC bzw. die entsprechenden Hybridkombinationen (1×10^5) unter Ultraschallkontrolle in den lokalen, orthotopen Pankreastumor gespritzt. Die Kontrolle des Wachstums erfolgte ebenfalls mit dieser Ultraschallmethode.

2.2.20 Ende des Tierversuches

Erreichte die Tumorgöße eine vorher im Antrag definierte Größe ($>200\text{mm}^3$), so wurde die Maus mittels kraniozervikaler Überstreckung getötet und der Tumor entnommen. Es wurde die Leber auf das Vorhandensein von Metastasen, der Bauchraum auf eine peritoneale Aussaat sowie auf eine Aszitesbildung untersucht. Gleichzeitig wurde die Milz entnommen und wie im Punkt 3.2.12 beschrieben behandelt. Kam es zu keinem Tumorwachstum, so wurde die Maus nach 40 Tagen getötet und die gleichen Untersuchungen wie bei den anderen Tieren durchgeführt.

2.2.21 ELISpot-Analytik

Die ELISpot-Technik erlaubt es, die Zytokinproduktion einzelner Zellen zu detektieren [89]. Es wurde ein humanes IFN- γ ELISpot Kit (Hölzel, Köln) verwendet. Hierbei werden Zellen auf einer mit monoklonalem Antikörper beschichteten 96-well HATF-Membranplatte (Millipore, Bedford, MA, USA) ausgesät. Die Zellen wurden mit Phytohämagglutinin in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ aktiviert. Während einer

zweitägigen Inkubation bindet von den Zellen produziertes IFN- γ an den Antikörper und kann nach Entfernen der Zellen durch einen sekundären, biotinylierten Antikörper markiert werden. Streptavidin-alkalische Phosphatase bindet an das Biotin und wird mittels BCIP/NBT Substrat nachgewiesen. Auf der Nylonmembran befinden sich nun blaue Spots, die unter einem Binokular-Mikroskop ausgezählt werden können. Es wurden Zellzahlen zwischen 10^6 und 10^5 /ml eingesetzt.

2.3 Statistische Auswertung:

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm Microsoft Excel 2002 durchgeführt. Der Student t-Test wurde angewandt, um signifikante Unterschiede aufzuzeigen.

In dieser Arbeit wurde bei der Fehlerangabe der Messwerte der mittlere Fehler des Mittelwertes $\Delta\bar{x}$ benutzt, welcher sich nach folgender Formel berechnet, wobei hier s für die Standardabweichung steht:

$$\Delta\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$\Delta\bar{x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung muriner dendritischer Zellen

Die durchgeführten Versuche bedienten sich der Methodik der Isolierung von unreifen DC aus murinem Knochenmark in ausreichender Zahl und Reinheit.

Man gewinnt bei einer Maus aus dem Femur und der Tibia beider Seiten ca. $3,5 \times 10^7$ ($\pm 2,5 \times 10^7$) kernhaltige Zellen. Die DC machen davon einen Anteil von etwa 30% aus, das heißt man erhält ca. $1,4 \times 10^7$ ($\pm 0,7 \times 10^7$) unreife DC.

3.2 Kultur dendritischer Zellen

Mit einer IL-4-Konzentration von 500 U/ml konnte bereits eine phänotypisch homogene Population dendritischer Zellen erzeugt werden.

Bei der Betrachtung der Zellmorphologien zeigte sich nach einer Kultivierung von sechs Tagen ein deutlich erhöhter Anteil an adhärenenten, Makrophagen-ähnlichen Zellen. Die dendritische Zellpopulation ließ sich bereits morphologisch und durch charakteristische Oberflächenmarker mittels der Durchflusszytometrie gut von den anderen Zellen abgrenzen. Die bei der Auswertung der Daten morphologisch eingegrenzte dendritische Zellpopulation exprimierte kostimulatorische Moleküle (CD40=17,5 \pm 2,1%, CD80=35%, CD86=35%) und antigenpräsentierende Moleküle (MHC I=96%).

Der Anstieg der Zahl dendritischer Zellen nach fünftägiger Kultur in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 betrug reproduzierbar (gemessen an n=50 Versuchen) 60% (\pm 10%) der ursprünglich erhaltenen unreifen DC.

3.3 Aktivierung dendritischer Zellen

Bezüglich der Zellmorphologie konnten im Verlauf der ersten 48 Stunden bei Betrachtung unter dem Mikroskop deutliche Veränderungen beobachtet werden. Aus den polymorphen Zellen mit groben zytoplasmatischen Ausläufern entwickelte sich eine homogene Population rundlicher Zellen mit vielen feinen, sternförmig ausgerichteten Zellausläufern (Abb.3).

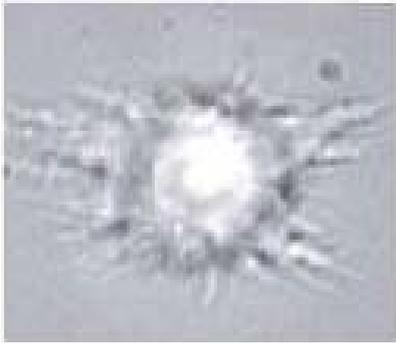


Abb.3 Typische DC-Zellmorphologie (Vergrößerung 200fach), eigene Aufnahme

Bei der Analyse der charakteristischen Oberflächenmarker auf DC zeigte sich eine niedrige Expression des CD40 und eine hohe Expression der untersuchten Oberflächenmarker CD80, CD86 und des antigenpräsentierenden Moleküls MHC-I, was mit der Dauer der Kultivierung und den Reifestimuli korrelierte.

	CD40	CD80	CD86	MHC I
DC	17,5 +/-1,5	35 +/-1,4	35 +/-3,2	96 +/-3,7

Tab.4 Oberflächenmarker (%), CD40, CD80, CD86 und MHC I von DC am Tag 5-7 ausgehend von den Mittelwerten und unter Beachtung des mittleren Fehlers des Mittelwertes $\Delta\bar{x}$. Die Tabelle zeigt die Daten von n=5 unterschiedlichen Experimenten. P=0,23 im t-Test für verbundene Stichproben für den Vergleich der Oberflächenantigene von DC und Panc02.

3.4 Kokultur dendritischer Zellen mit Pankreaskarzinomzellen Panc 02

Die Kokultur beider Zellarten zum Ausschluss gegenseitiger Beeinflussung und die Propidiumjodidfärbung (PI), welche die Anzahl toter Zellen widerspiegelt, zeigt Tab.5.

	MHC-I	CD40	CD80	CD86	PI
Panc 02	76+/-3,8	8+/-1,3	35+/-3,2	14+/-1,9	10+/-3,7
DC	96 +/-3,7	17,5+/-1,5	35 +/-1,4	35 +/-3,2	10 +/-2,3
Zellgemisch 1:1	80+/-1,4	4+/-4,3	18+/-2,8	25+/-4,1	6+/-3,2
Kokultur	78+/-3,5	13+/-2,5	24.3+/-2,9	20+/-2,5	18+/-4,2
Hybride	51,6+/-17,9	1,9+/- 5,2	8,4+/- 7,1	16+/- 2,1	11+/- 4,2

Tab.5 Vergleich der Oberflächenmarker MHC I, CD40, CD80, CD86 von Panc02, DC (5-7d), Panc02-DC Zellgemisch, Panc02-DC Kokultur (1d) und Panc02-DC Hybriden (2d) ausgehend von den Mittelwerten und unter Beachtung von $\Delta\bar{x}$. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse von je einem bis fünf unterschiedlichen Experimenten. P=0,28 im t-Test für verbundene Stichproben im Vergleich der Ergebnisse des CD40 der DC mit der Kokultur.

3.5 Auswertung der Zellfärbungen

Die Zellfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen PKH 2 (grün) und PKH 26 (rot) wirkte zytotoxisch, so daß nach der Färbung bei den DC 45,0% (+/-5.5%) und bei den Pankreaskarzinomzellen 48,9% (+/-6,1%) vital waren. Es sind 41 Versuche durchgeführt worden, die eine Variationsbreite abgestorbener Zellen zwischen 20-70% zeigte. Die überlebenden Zellen zeigten jedoch durchflusszytometrisch eine gute Anfärbbarkeit mit den Farbstoffen.

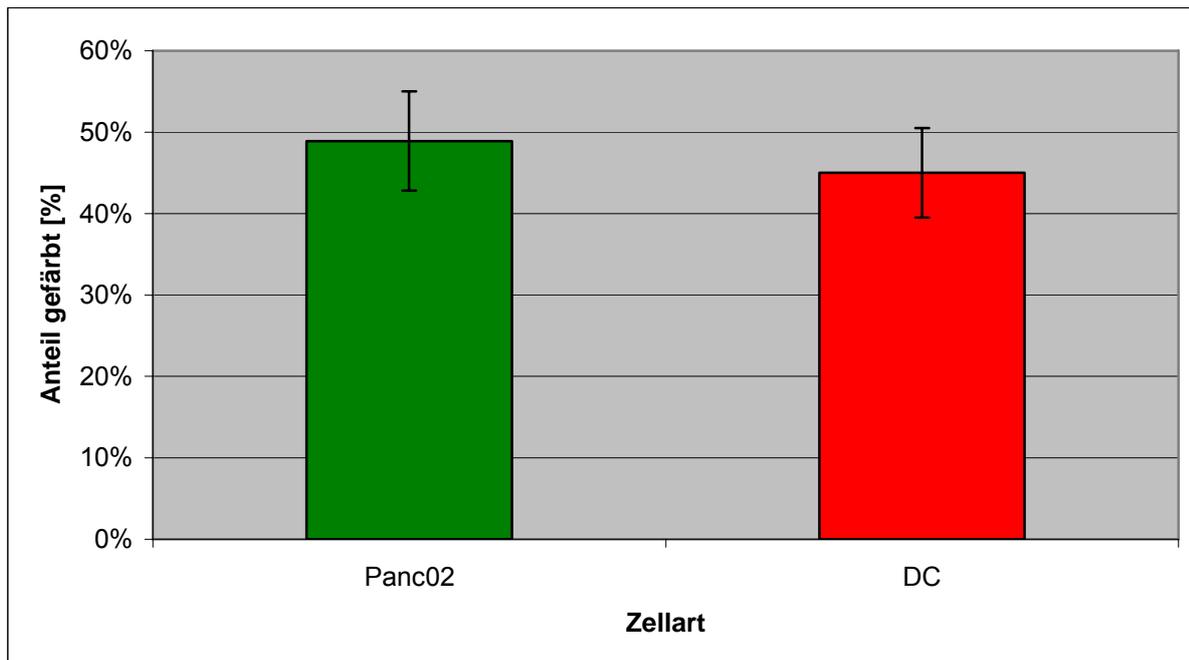


Abb.4 Anteil der überlebenden Panc02 und DC mit PKH 2 (grün) und PKH 26 (rot) gefärbt, ausgehend vom Mittelwert unter Berücksichtigung von $\Delta\bar{x}$ anhand von 28 Versuchen (n=28). P=0.64 im t-Test für den Vergleich des Anteils an gefärbten Zellen der beiden verschiedenen Zellarten, ausgehend von der Normalverteilung der Werte.

3.6 Fusion dendritischer Zellen mit Pankreaskarzinomzellen Panc 02

Nach mehreren Versuchen die Elektroporation mit anderen Zellzahlen (je $0,9 - 4 \times 10^6$), Glukosekonzentrationen (100-400 μ l) oder elektrischen Pulsen (100-2700V) durchzuführen, zeigten sich die besten Resultate bei einer Fusion dendritischer Zellen mit Pankreaskarzinomzellen in einem Verhältnis von 1:1, einer Zellzahl von je 2×10^6 , einer 400 μ l Glukoselösung der Konzentration von 0,3M und zwei hintereinander folgenden elektrischen Pulse wie folgt: 1.Puls: U=100V, C=3000 μ F, R=2310 Ω , T=6930msec; 2.Puls:V=2000V, C=25 μ F, R=1540 Ω , T=38,5msec. Ein anderes Protokoll ergab eine geringere Fusionseffizienz (ca. 5% +/- 3%), bei verändertem ersten Puls, wie folgt: Puls 1: U=100V, C=25 μ F, R=2310 Ω , T=57,5msec. Folgende Abbildungen (Abb.5 und Abb.6) zeigen die durchflusszytometrische Analyse der beiden eingesetzten Zellarten. Die Zellen können durch die unterschiedliche Farbe voneinander unterschieden werden: die Panc02 Zellen, die grün markiert sind, befinden sich in Abb.5

im Quadranten D, die rot markierten DC im Quadranten A, in einem Gemisch, das die gleiche Anzahl Panc02 und DC beinhaltet.

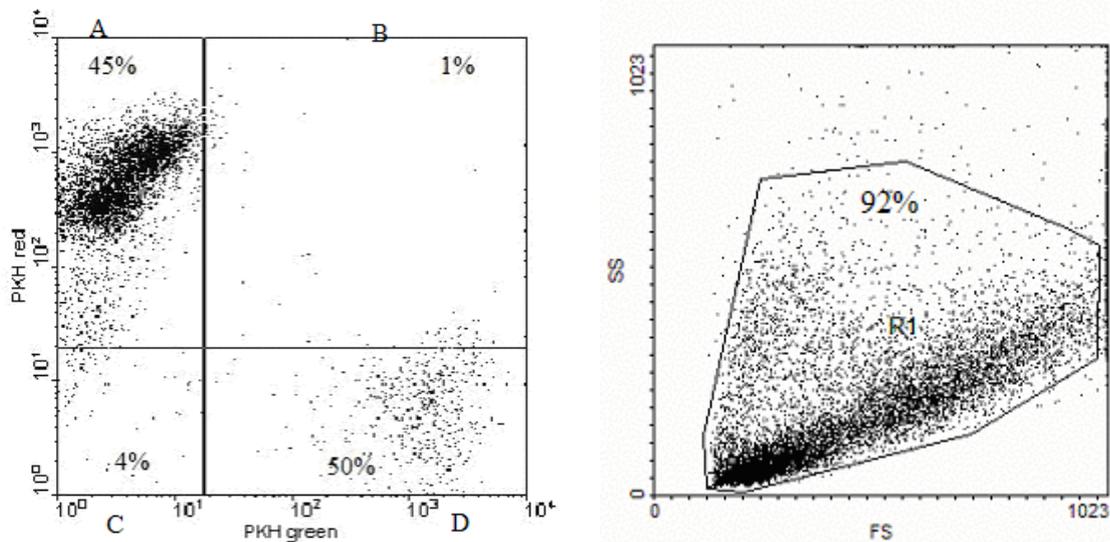


Abb.5 Durchflusszytometrische Analyse eines unfusionierten Gemischs von roten DC (45%) im Quadranten A und grünen Panc 02-Zellen (50%) im Quadranten D. Rechts werden die entsprechenden Zellgates dokumentiert.

Im Vergleich dazu befinden sich nach der Fusion 25% der so erhaltenen Zellen in dem Quadranten B, welcher die Zellen anzeigt, die sowohl grün als auch rot markiert sind (Abb.6).

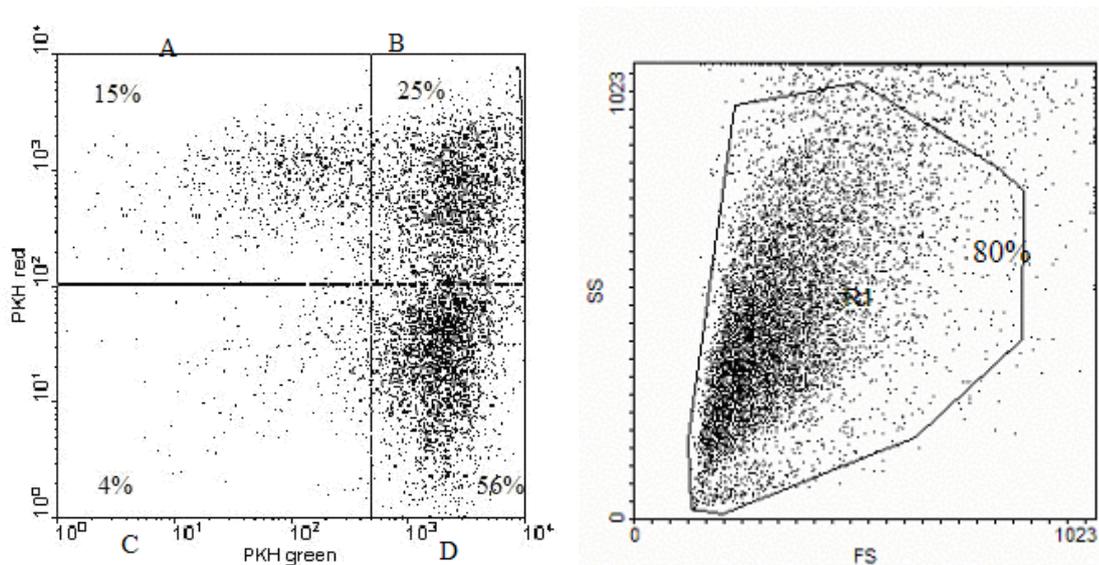


Abb.6 Durchflusszytometrische Analyse fusionierter Zellen (25%) rot und grün (100V/2000V) im Quadranten B, Panc 02-Zellen grün (56%) in D und DC rot (15%) im Quadranten A gefärbt. Rechts werden die entsprechenden Zellgates dokumentiert.

Die durchflusszytometrischen Bilder in Abb.5 und 6 sind nachträglich mit dem Programm WinMDI 2.8 zur anschaulicheren Darstellung der Daten bearbeitet worden, wodurch womöglich der Eindruck erweckt wird, die Messungen seien falsch kalibriert. Die Abb.5 links lässt vermuten, daß die Kalibrierung nicht optimal eingestellt war, da die Dichte der DC (Quadrant A) stärker ausgebildet ist als bei Panc02- Zellen (Quadrant D), obwohl die Zahlen beweisen, daß die beiden Zellpopulationen annähernd gleich groß sind (DC 45% und Panc02 50%). Es ist anzunehmen, daß einige Zellen dicht an der x- Achse liegen, so daß die Zellwolke nicht so dicht erscheint.

Ferner wurden die einzelnen Zellpopulationen nicht durch spezifische Gates charakterisiert, da sich das Erscheinungsbild bezüglich Zellgröße (FS) und Granularität (SS) zu einem großen Teil überschneidet (siehe Abb.7).

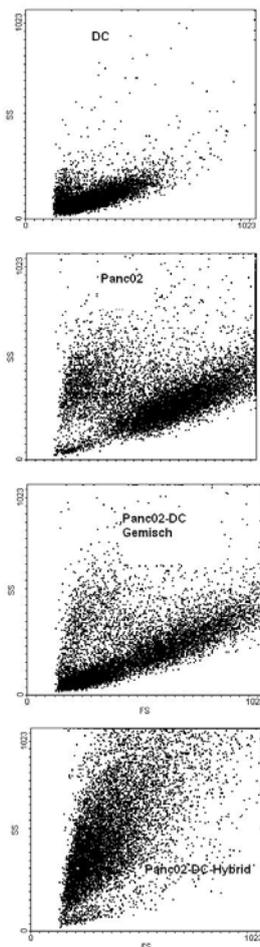


Abb.7 Vergleich des Erscheinungsbildes bezüglich Zellgröße (FS) und Zellgranulärität von DC, Panc02, Panc02-DC Gemisch und Panc02-DC Hybride

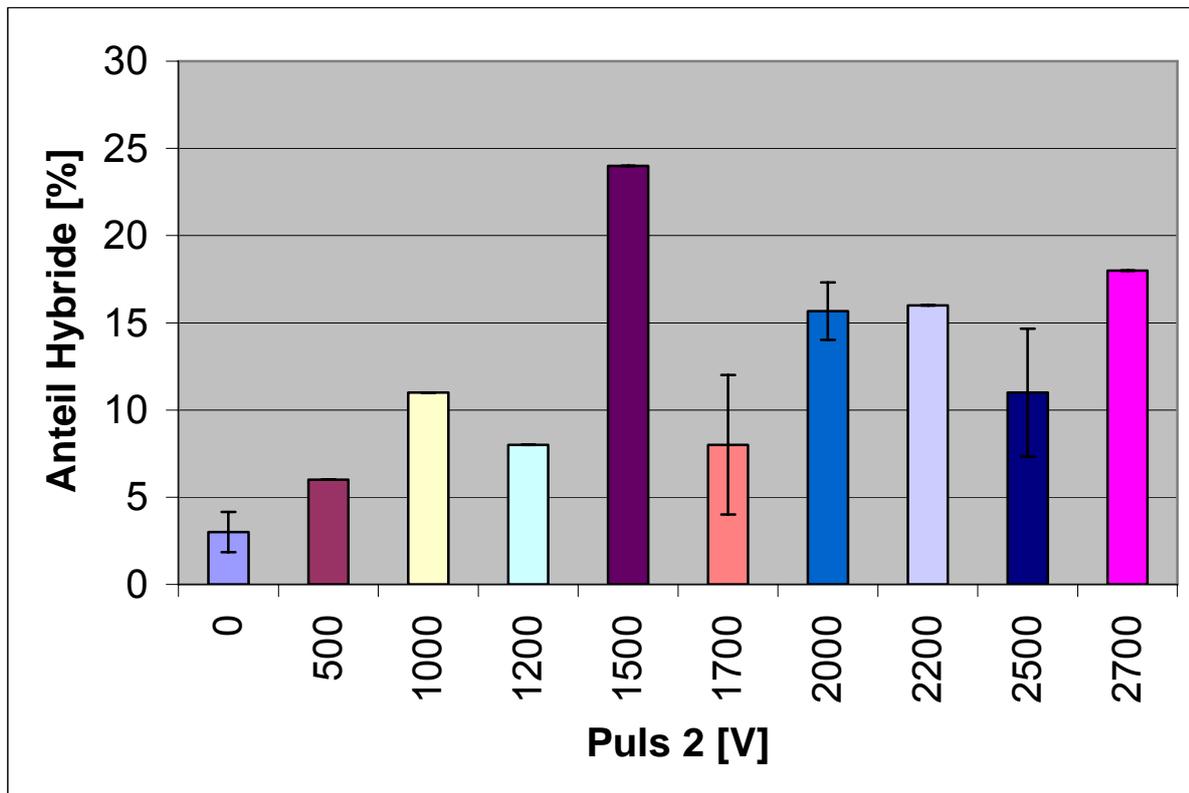


Abb.8 zeigt den Anteil der Panc 02-DC-Zellhybride abhängig von der Spannung des zweiten Pulses bei einem ersten Puls von 100 Volt, ausgehend von den Mittelwerten und unter Beachtung von $\Delta\bar{x}$, bei denjenigen Spannungen, mit denen mehrere Experimente durchgeführt wurden. Es wurden n=42 Experimente durchgeführt. P=0.056 für den t-Test im Vergleich von Hybriden bei 100/2000V mit allen anderen Pulsen, ausgehend von der Normalverteilung der Werte.

Der maximale reproduzierbare Anteil fusionierter Zellen ($30 \pm 2,8$) erfolgt bei einem ersten Puls von 100V und einem zweiten Puls von 2000V und bei einer Zellzahl von 4×10^6 Panc02 und 4×10^6 DC.

Nach Ermittlung der optimalen Fusionsbedingungen wurden die gewonnenen Zellhybride unmittelbar nach der Zellfusion auf den prozentualen Anteil ihrer Oberflächenantigene hin geprüft (s. Abb.9a) und mit den Oberflächenmarkern auf DC, Panc02, einer DC-Panc02 Kokultur sowie einem entsprechendem 1:1-Zellgemisch verglichen (s. Abb.9b).

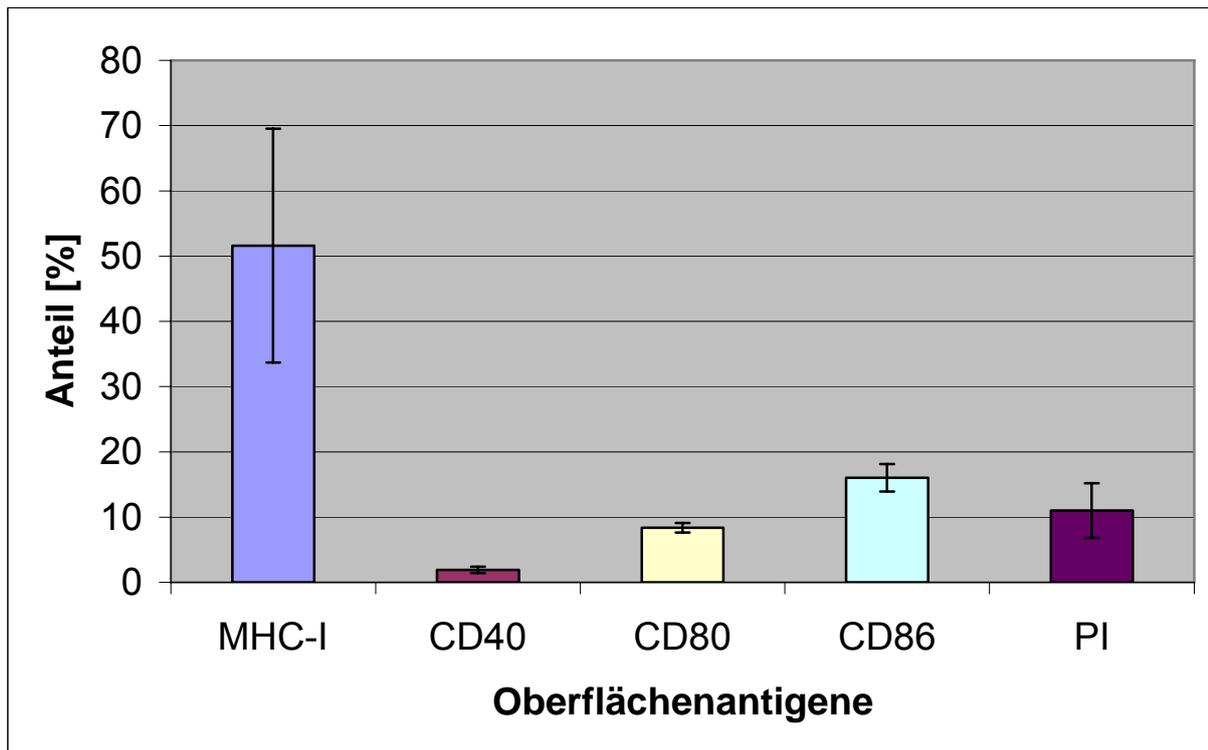


Abb.9a Bestimmung der Oberflächenantigene auf DC-Panc02 Hybriden unmittelbar nach erfolgter Fusion unter Berücksichtigung von $\Delta\bar{x}$. Es handelt sich um Ergebnisse von drei voneinander unterschiedlichen Experimenten (n=3).

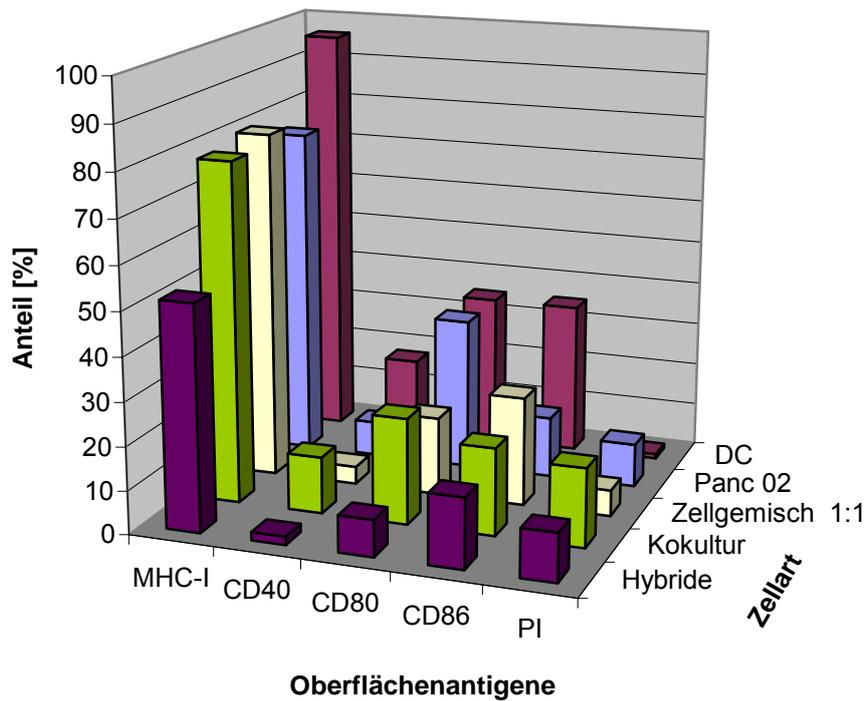


Abb.9b Vergleich der Oberflächenantigene von Panc02-DC Hybriden mit der Panc02-DC Kokultur, dem 1:1-Zellgemisch ohne Kultivierung, der nativen Panc02 und der nativen DC. $P=0.06$ im t-Test für verbundene Stichproben. Dieser Wert resultiert aus dem statistischen Vergleich der Oberflächenantigene der Panc02-DC-Hybride zu der Panc02-DC Kokultur.

In der Abb.9b bezeichnet die Panc02-DC Kokultur ein gemeinsames Verweilen der jeweiligen nativen Zellen über einen Zeitraum von einem Tag unter Zellkulturbedingungen. Das 1:1-Zellgemisch beschreibt die jeweiligen DC und Panc02 Zellen die unmittelbar vor der Messung hergestellt wurden, ohne gemeinsame Inkubation. Diese Zellen wurden nicht noch einmal in die verschiedenen Zellpopulationen aufgeteilt, da hier die Daten von den beiden einzelnen Zellarten auch vorliegen. Die Zellen der Kokultur wurden ihrerseits nicht durch Setzen von Gates in den Eigenschaften der einzelnen Populationen charakterisiert, da die verschiedenen Zelltypen nicht eindeutig voneinander durchflusszytometrisch abzugrenzen sind. (siehe Abb. 7 und zugehörige Erklärung).

Diese Zellanordnungen wurden als Kontrolle gewählt um Spontanfusionen auch ohne Elektropuls zu erkennen bzw. auszuschliessen. So konnte hier gezeigt werden, daß solche Spontanfusionen nicht stattfinden, und daß auch deswegen diese Zellen keine unterschiedlichen Markierungen tragen können.

3.7 Vitalitätskontrolle der Kultur der Panc02-DC- Zellhybride

Nach der Fusion von 1×10^6 Panc02 Zellen und 1×10^6 DC, wovon $0,4 \times 10^6$ als tote Zellen bestimmt wurden, wurde an verschiedenen Tagen (2, 4, 6 post fusionem) der Anteil von lebenden Zellen an zwei unterschiedlichen Zellpopulationen bestimmt.

Alter der Zellhybride [d]	Lebendzellzahl
2	$2,5 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
4	$4,2 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$
6	$6,5 \times 10^5 \pm 3,2 \times 10^5$

Tab.6 Bestimmung der Lebendzellzahl von Zellhybriden aus 1×10^6 Panc02 Zellen und 1×10^6 DC nach 2, 4, und 6 Tagen ausgehend von den Mittelwerten und unter Beachtung von $\Delta \bar{x}$. Es wurden sechs voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (n=6). P=0.26 im t-Test im Vergleich der Werte von Tag 2 zu Tag 6. Aufgrund des umfangreichen Versuchsansatzes und der fehlenden Zellzahlen wurde auf eine durchflusszytometrische Messung des Hybridanteiles nach 2,4 und 6 Tagen verzichtet. So ist die Messung der Oberflächenantigene bei den Panc02-DC Hybriden am Tag der Fusion erfolgt. Eine Veränderung der Merkmale wurde im Verlauf nicht untersucht.

3.8 Virustransfektion mittels Ad-GFP(Green fluorescein protein)

In gemeinsamer Erarbeitung mit Herrn Alex Eliu wurde die Virustransfektion mittels Ad-GFP an DC-Panc02 Zellhybriden, an nativen murinen DC und murinen Pankreaskarzinomzellen Panc02 durchgeführt. Die DC zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Virusaufnahme von 40%, während die Virusaufnahme der

Hybridzellen nur 10% betrug. Die Pankreaskarzinomzellen Panc02 inkorporierten das Virus mit 80-90% am besten (Abb.10).

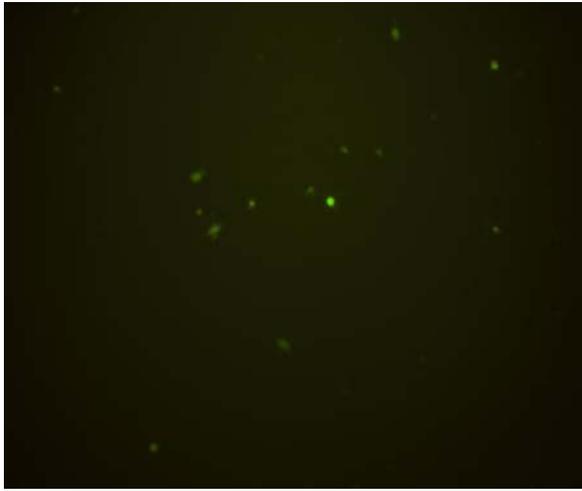


Abb.10 Ad-GFP-virusinfizierte DC-Panc02 Hybride,
(eigene Aufnahmen, Vergrößerung 30fach)

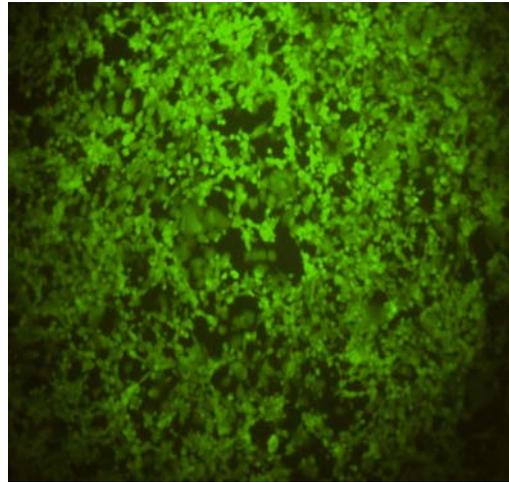


Abb.11 Ad-GFP-virusinfizierte Panc02

3.9 Virustransfektion mittels AdCD40L

Die Virustransfektion mittels AdCD40L wurde mit unterschiedlichen Virusmengen (MOI-Zahlen) an DC, Panc02 Zellen und Zellhybriden durchgeführt und in Vergleich mit dem Kontrollvirus lac Z gesetzt.

Im Hinblick auf die Effizienz der Virustransfektion von DC mit AdCD40L unter Berücksichtigung der Anzahl der nativen Zellen, der Virusmenge (μ l), der Viruspartikel, die auf eine Zelle treffen (MOI-Zahl), und der Propidiumjodidfärbung (PI-Färbung), die die Anzahl toter Zellen widerspiegelt, zeigte sich für die DC das günstigste Verhältnis zwischen transfizierten und abgestorbenen Zellen bei 2500MOI, für die Panc02 bei 500MOI, für die 1:1 fusionierten Zellen 250MOI, sowie die vor Fusion jeweils transfizierten Panc02 Zellen bei 500MOI und die transfizierten DC bei 2500MOI.

3.10 *In vitro* Zytotoxizitätsnachweis

Nach der Optimierung von Hybridisierungsbedingungen wurden die verschiedenen Hybride in einem Zytotoxizitätsassay auf ihre Lyseeigenschaften *in vitro* untersucht. Es fand sich die, wie schon bekannt, hohe natürliche Zytotoxizität von DC alleine, die durch eine Hybridisierung mit Panc02 Zellen an Zytotoxizität verlor. Eine Zytotoxizität von Panc02 Zellen alleine war, wie erwartet, nicht zu beobachten. Die Fusion von AdCD40L transfizierten DC und Panc02-Zellen allerdings führte zu einer starken Erhöhung der Zellzytotoxizität *in vitro*, die durch keine der weiteren Hybridkombinationen übertroffen oder gar gesteigert werden konnte.

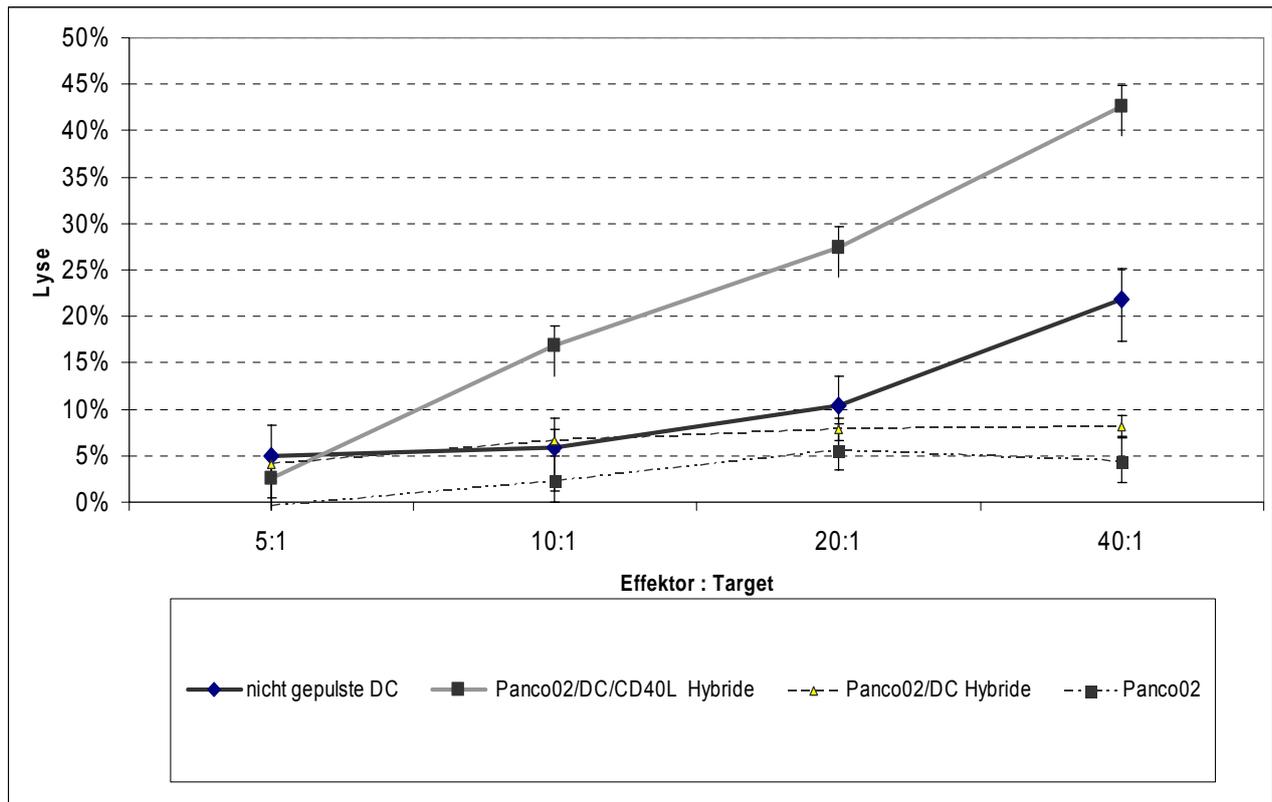


Abb.12 Lyseraten von nicht gepulsten acht Tage alten DC, sowie frischer Zellsuspensionen (Panco02/DC/AdCD40L Hybrid, Panc02-DC Hybrid und Panc02 alleine). Die Experimente zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von jeweils vier voneinander unabhängigen Experimenten.

3.11 ELISpot

Die tumortragenden Mäuse wurden orthotop mit ungepulsten DC, Panc02, Panc02/CD154 und Panc02 Hybriden behandelt. Nach 72 Std. wurden 200 000 Milzzellen isoliert und mit ungepulsten DC, Panc02, Panc02/CD154 und DC-Panc02 Hybriden restimuliert und dann auf die Produktion von IFN- γ in einem Elispotassay analysiert.

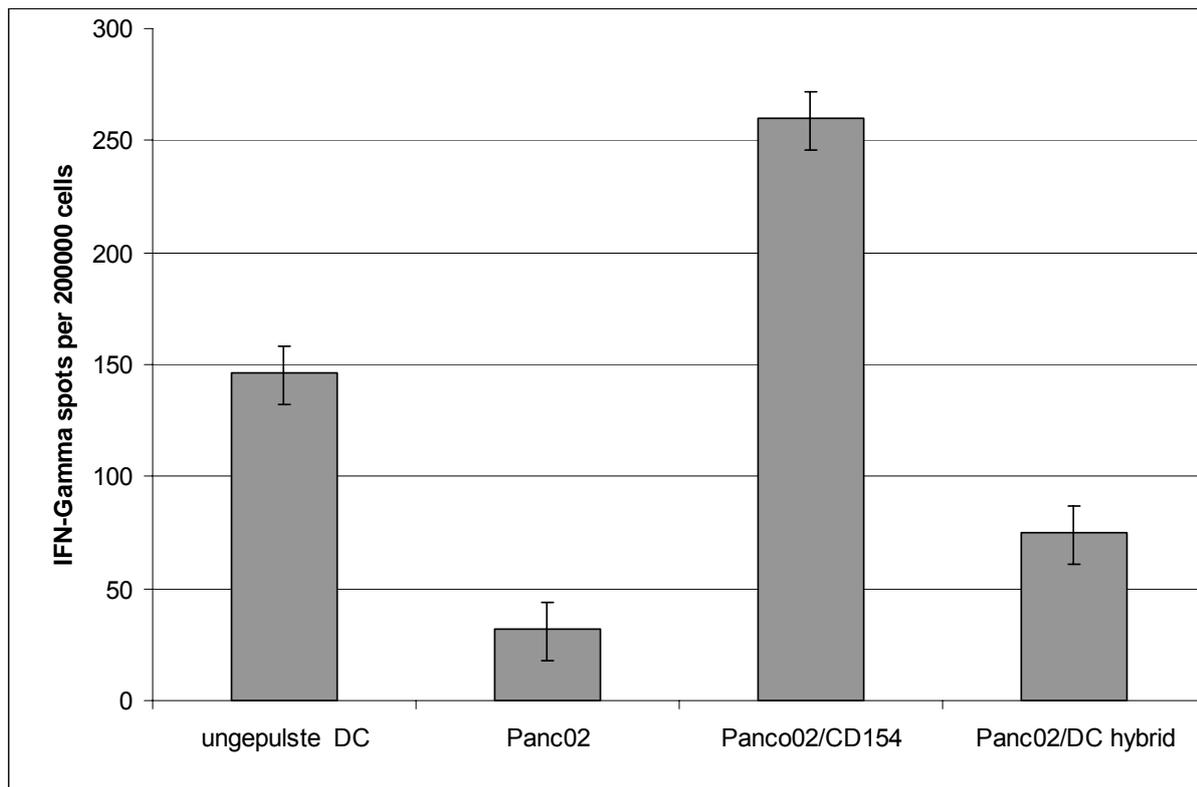


Abb.13 IFN- γ Produktion von Milzlymphozyten nach Stimulation *in vivo* mit ungepulsten DC, Panc02, Panc02/CD154 und DC-Panc02 Hybriden. Die Ergebnisse von jeweils drei verschiedenen Experimenten sind als Median \pm Standardabweichung dargestellt.

3.12 Tumorgrößenbestimmung nach intratumoraler Injektion von ungepulsten DC, Panc02-DC Hybriden und Panc02-DC/ADCD40L Hybriden

Die in den C57/BJ6 Mäusen gewachsenen Tumore wurden am dritten Tag mit einer Kochsalzkontrolle, ungepulsten DC, Panc02-DC Hybriden und Panc02-DC/AdCD40L-Hybriden intratumoral behandelt. Die Größe der Tumoren wurde sonografisch und zum Experimentende autoptisch bestimmt. Es ergaben sich folgende Tumorumfänge:

Behandlungsgruppe	Tumorumfang [mm ³]		Lebermetastasen
	Median	Range	
Kochsalzkontrolle	167	99-212	5/10
ungepulsten DC	99	87-111	2/10
Panc02-DC Hybrid	112	99-156	4/10

Panc02-DC/AdCD40L-Hybrid 53[§] 0-78 0/10

[§] p<0.05: tumor volume: Kochsalzkontrolle vs. Panc02-DC/ADCD40L Hybrid

Tab.9 Behandlung von Pankreaskarzinomen in der C57/BJ6 Maus mit ungepulsten DC, Panc02-DC Hybriden und Panc02-DC/AdCD40L Hybriden. Drei Tage nach Tumorimplantation wurden die Mäuse einmal intratumoral mit dem o.g. Hybrid behandelt. Das Tumolvolumen und die Lebermetastasen wurden sonografisch ausgemessen und die Werte mit den Autopsiebefunden verglichen. Es werden die Daten des Tages 40 gezeigt. Die Experimente zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von jeweils vier voneinander unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Isolierung und Kultur muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark

Analog den Ergebnissen von Inaba, Romani et al. [68] ließen sich unreife murine DC aus dem Knochenmark isolieren und nach fünftägiger Kultur unter Zugabe spezifischer Zytokine als reife, teilweise adhärente Zellen reproduzieren. Morphologisch zeigten die aktivierten DC typische multiple, sternförmige zytoplasmatische Zellausläufer. Diese reifen DC wurden hier für die Zellfusion verwendet.

Im Gegensatz dazu eignen sich unreife DC aufgrund ihrer hohen Endozytoseaktivität für die Beladung mit Antigenen, die nach Aufnahme und intrazellulärer Prozessierung über immunogene MHC-Peptid-Komplexe den T-Effektor-Zellen präsentiert werden. Für einen immuntherapeutischen Einsatz ohne weitere Reifeinduktion sind sie aber aufgrund ihres instabilen Phänotyps und potentiell tolerogenen Eigenschaften nur bedingt geeignet [80].

Andere Versuchsreihen wurden mit CD43⁺ Stammzellen-abgeleiteten DC oder mit Monozyten-abgeleiteten DC durchgeführt. *In vivo* scheint es aber bislang unklar zu sein, ob sich Monozyten in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu in Makrophagen oder DC differenzieren [21] oder sich erst nach transendothelialer Migration zu DC entwickeln.

4.2 Aktivierung dendritischer Zellen

Um eine potente Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen zu induzieren, ist eine Aktivierung der Antigen-präsentierenden dendritischen Zelle erforderlich [7]. Die Aktivierung der DC kann durch eine Vielzahl von Signalen erfolgen, die beim Eindringen von Mikroorganismen, entzündlichen Gewebsreaktionen und ungeordnetem Zellerfall freigesetzt werden. Diese Ausreifung der DC ist gekennzeichnet durch die Veränderung der dendritischen Zellfunktion von der Antigen-Aufnahme zur effektiven Antigen-Präsentation und der Ausprägung eines stabilen, stark immunstimulatorischen Phänotyps. Dhodapkar et al. (1999) zeigten den Unterschied zwischen der Wirkung aktivierter DC und unausgereifter DC im Hinblick auf die T-Zell-vermittelte Immunität,

der sich in Form einer lang anhaltenden Immunität im Vergleich zu einer Antigen-spezifischen Inhibition der T-Zell-Effektorfunktion darstellte [23]: Gesunden Probanden wurde einmalig eine bestimmte Menge aktivierter DC geimpft, was im Gegensatz zur Injektion von unausgereiften DC eine effektive T-Zell-vermittelte Immunität induzierte. Des Weiteren wurde eine geringere Toleranz und höhere Empfindlichkeit gegenüber Tumorantigenen bei reifen DC beschrieben [6][29][58].

Andere Arbeitsgruppen zeigten bei aktivierten im Vergleich zu unaktivierten DC eine gesteigerte Motilität [35], eine Resistenz gegen inhibierende Faktoren wie IL-10 und einen stabilen Phänotyp, der trotz Entzugs von GM-CSF und IL-4 für mehr als 96 Stunden eine T-Zell-stimulatorische Wirkung zeigte [82]. Im Hinblick auf eine effektive Antigen-Beladung konnten ausgereifte DC aufgrund ihrer geringen Phagozytoseaktivität nur von außen mit kurzen antigenen Peptidsequenzen beladen werden, die sich direkt an die freien Peptid-Bindungsstellen der hochregulierten MHC-I-Moleküle anlagerten [82], was in dieser Arbeit mittels der Zellfusion ausgeführt wurde. Somit konnte die Fähigkeit der DC zur Antigenpräsentation mit der verlorenen Fähigkeit der Antigenaufnahme verbunden werden.

In dieser Arbeit wurde auf die Einhaltung des Zeitpunktes und der Intensität der Aktivierung der DC durch stimulatorische Zytokine geachtet, um eine übermäßige Stimulation zu vermeiden, die zu einer Überaktivierung und in der Folge zur „Erschöpfung“ der DC führt [53], während eine zu geringe Aktivierung die Zellen für inhibitorische Einflüsse anfällig macht [70].

Dies bestätigt unsere Vermutung, dass sich reife DC zur Induktion einer T-Zell-Reaktion besser eignen als unreife DC, weshalb wir uns für die Verwendung aktivierter DC bei der Durchführung weiterer Schritte entschieden.

4.3 Fusion muriner dendritischer Zellen mit murinen Pankreaskarzinomzellen Panc02

Es wurde zur Steigerung der Immunantwort eine Vakzine aus Zellhybriden als Ergebnis der Fusion muriner Pankreaskarzinomzellen mit DC hergestellt.

Neben der Fusion existiert noch eine andere Möglichkeit die Immunantwort gegen Tumorzellen zu steigern, indem man DC mit antigenen Peptiden der Zelloberfläche von

Karzinomzellen pulst. Die Fusion von DC mit Karzinomzellen ist jedoch vorteilhaft im Vergleich zum Pulsen der DC, da auf der Zelloberfläche der Karzinomzellen nur wenige Peptide vorhanden sind und die Affinität des MHC-Komplexes der Tumorzelle für den T-Zell-Rezeptor klein ist. Daher ist beim Pulsen eine größere Zahl an Tumorzellen notwendig [41]. Ausserdem wird bei der Zellfusion die gesamte Tumorzelle inklusive aller auch noch nicht charakterisierter antigener Eigenschaften in die DC transferiert, wo die Antigenprozessierung auf natürlichem Wege erfolgen kann, was die Möglichkeit der Präsentation von multiplen Peptiden auf der DC-Oberfläche birgt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unter Anwendung der Zellfusion eine Steigerung der Fusionseffizienz von 14,1% (+/- 6,8%) bis auf 30% (+/-2,8%) mit der Erhöhung der eingesetzten Zellzahl. Im Hinblick auf die Möglichkeit der Gewinnung muriner DC zeigten sich im Durchschnitt in den nachfolgenden Versuchen die besten Ergebnisse bei einer Zellzahl von je 2×10^6 DC bzw. Panc02 Zellen.

Gong et al. [31], Li et al. [56] und Trefzer et al. [85] bedienten sich wie in der hier beschriebenen Arbeit der Durchflusszytometrie um die Fusionseffizienz von DC und Tumorzellen, wie Ovarialkarzinomzellen oder Melanomzellen, nachzuweisen. Gong und Mitarbeiter fusionierten DC und Ovarialkarzinomzellen in einem Verhältnis von 10:1 mittels PEG und erhielten eine maximale Fusionseffizienz von 30%. Li und Mitarbeiter fusionierten DC und murine Melanomzellen in einem Verhältnis von 2:1 ebenfalls mittels PEG und wiesen eine Fusionseffizienz von 10% nach. Zur Herstellung einer effizienten Hybridzellvakzine fusionierten Trefzer und Mitarbeiter Melanomzellen mit stimulierten B-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mittels Elektrofusion in Form eines einzelnen Pulses von 1000V/cm bei 25 μ F, unter Erhalt einer Fusionseffizienz von 20-30%. Eigene Versuche mit nur einem elektrischen Puls von 100-1200V ergaben im Vergleich eine nur sehr eingeschränkte Fusionseffizienz und wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der Experimente sind durch unterschiedlich verwendete Tumorzelllinien, fehlende Angaben über die Versuchsdurchführung, unterschiedliche DC oder durch unterschiedliche Fusionsprotokolle gegeben. Die in anderen Artikeln charakterisierten Tumorzellen sind entweder humanen Ursprungs, wie Melanom, Ovarialkarzinom, Nierenzellkarzinom, oder Gliom, oder aber murinen Ursprungs, wie zum Beispiel Melanom, multiples Myelom oder hepatozelluläres Karzinom. Die DC wurden sowohl von Monozyten [63], aus dem peripheren Blut [83]

oder als Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, wie in dieser Arbeit, gewonnen. Sie wurden entweder wie hier durch elektrische Pulse oder mit Hilfe von PEG zu Hybriden verarbeitet [31], oder durch Tumorzelllysate mit Tumorantigenen beladen [63]. Bei der Fusion mit PEG war die Fusionseffizienz vergleichbar mit der Anzahl der Hybridzellen, die mittels Elektrofusion erreicht wird [57].

Nach der DC Gewinnung konnten wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren typische DC Oberflächenmarker durchflusszytometrisch nachweisen: Gong [31] erwähnt MHC I, CD80 und CD86, Kikuchi [50] CD40, CD80, CD86 und Homma [41] CD80 und CD86. Die Hybridzellen zeigten zum größten Teil die gleichen Oberflächenantigene wie die DC jedoch in niedrigerer Dichte. Das Vorhandensein von MHC I und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den Hybridzellen deutet darauf hin, daß diese Zellen den naiven T-Zellen Antigene präsentieren und sie aktivieren können [41][33]. Die hier erhaltenen Panc02-DC-Hybride zeigten folgende Oberflächenantigene: MHC I, CD40, und in geringer Ausprägung CD80, CD86. Die Oberflächenmoleküle MHC I, CD80 und CD86 wurden auch von Gong et al. bei DC-Mammakarzinomzellhybriden [31] und DC-Plasmozytomzellhybriden [32] und von Kikuchi et al. bei DC-Gliomzellhybriden [50] und DC-HCC-Hybriden beschrieben.

Nach zwei Tagen wurde der Anteil an lebenden Zellen mit 15% der vor der Fusion eingesetzten Zellen bestimmt (Tab.5) (3.7). Aufgrund fehlender Angaben von Vitalfärbungen in den oben genannten Literaturstellen lassen sich keine Vergleiche in Bezug auf die oben genannten Daten anstellen.

4.4 Virustransfektion AdCD40L dendritischer Zellen, Pankreaskarzinomzellen Panc02 und von DC-Panc02-Zellhybriden

Der CD40 Ligand ist ein Glykoprotein, das über die Beeinflussung von DC durch die Produktion von Zytokinen, wie IL-12 und IFN- γ , und die Interaktion mit dem CD40 Oberflächenantigen eine erhöhte Immunantwort bewirkt und einen wachstumshemmenden Effekt auf Tumorzellen hat. Die CD40-CD40L Wechselwirkung kann weiterhin zu einer Umwandlung ruhender nicht-aktivierter T-Zellen in ihre aktivierte Form führen [28], die Oberflächenmarker CD80 und CD86 hochregulieren, und die

T-Zellproliferation erhöhen [17]. Andererseits kann eine Abschwächung von Faktoren erfolgen, welche die Funktion der DC hemmen, wie z.B. IL-10, welches von Tumorzellen produziert wird [30]. Anhand der Beobachtung, daß sich durch die Fusion der CD40 Anteil auf fast nicht mehr messbare Anteile reduzierte, wurde in gemeinsamer Erarbeitung mit Herrn Eliu in seiner Promotionsarbeit genauer gezeigt, daß mittels Virustransfektion mit dem Adenovirus AdCD40L die CD40 Expression erhöht wird. Dies wurde durchgeführt, um die Effizienz von DC im Hinblick auf die CTL Aktivierung zu steigern - mit dem Resultat einer vermehrten Bildung des CD40-CD40L Komplexes, welcher eine Steigerung der Immunantwort gegen Tumorzellen darstellt.

Die Steigerung des Anteils an CD40L-positiven Zellen war bei Hybriden, die vor der Fusion transfiziert wurden, um 15% (+/-9%) größer als bei Hybriden, die erst nach der Fusion transfiziert wurden. Das lässt darauf schließen, daß die Fähigkeit der Zellen Viren aufzunehmen durch die Elektroporation verringert wird.

4.5 Zytotoxizitätseigenschaften der DC alleine, des DC/Panc02 Hybrides und des Hybrides aus DC/Panc02/AdCD40L

In einem *in vitro* Zytotoxizitätsassay konnte gezeigt werden, daß das Hybrid aus DC-Panc02-AdCD40L die höchste Lyserate der Zielzellen auslöst. Das Hybrid aus DC und Panc02 Zellen zeigte gegenüber den reinen DC eine geringere Zytotoxizität und bestätigte die Beobachtung der hohen Selbstzytotoxizität von DC.

Dieses Hybrid wurde dann in einem in unserem Labor entwickelten und validierten Tiermodell eingesetzt. Auch hier zeigte sich eine doppelt so gute antitumoröse Wirkung des AdCD40L-transfizierten Hybrids gegenüber reinen DC und DC-Panc02-Hybriden. Damit wurde gezeigt, daß das Pankreaskarzinom der Maus durch immuntherapeutische Maßnahmen beeinflussbar ist.

4.6 ELISpot-Analytik

Interferon-gamma (IFN-gamma), das sogenannte *Immun-Interferon (Typ II)*, wird von Mitogen- oder Antigen-stimulierten T-Lymphozyten produziert. Der Anteil dieser Zellen entspricht also der Stärke einer Immunantwort. Wie von den Zytotoxizitätsdaten zu erwarten war, zeigen auch hier die ungepulsten DC und die CD40L transfizierten Panc02 die stärkste Induktion von IFN-gamma. Die stärkste *in vivo* Aktivität wird zudem ebenfalls in dieser Konstellation gesehen und unterstützt damit die Hypothese einer effektiven Stimulation einer zellulären Immunantwort durch DC und die CD40L Transfektion.

4.7 Klinischer Ausblick

Das exokrin duktales Pankreaskarzinom ist durch klassische onkologische Therapiestrategien wie Operation, Chemotherapie und Bestrahlung nur sehr begrenzt therapierbar.

Folgerichtig werden neue Therapieprinzipien intensiv untersucht. Zur Zeit werden dabei verschiedene Strategien zur Verbesserung der dendritischen Zell-Vakzine-Studien durchgeführt, und es gibt viele experimentelle Ansätze die nach erfolgreicher *in vitro* Testung *in vivo* auf ihre Wirksamkeit untersucht werden müssen [27].

Eine weitere offene Frage ist der optimale Applikationsweg und -ort für die DC-Vakzine, um eine effektive Migration der antigenbeladenen Zellen in regionale Lymphknoten zur Induktion der spezifischen T-Zellen sicherzustellen. 1999 zeigten Thurner und Mitarbeiter in einer Melanomstudie, daß die intradermale Applikation von Mage 3 (Melanoma Antigen Gene Expression Protein) peptidgepulsten DC eine deutlich stärkere Antigen-spezifische T-Zell-Antwort induzierte als die intravenöse Applikation. Intravenös verabreichte DC reichert sich zunächst in der Lunge und Leber an, bevor sie das lymphatische Gewebe erreichen, während die intradermale und intralymphatische Applikation zur direkten Migration in regionale Lymphknoten und der Induktion Th1-gerichteter (zytokininduzierte Makrophagenaktivierung) Immunantworten

fürte [28]. Die direkte intranodale Injektion bietet die Möglichkeit, die Migration zu umgehen [63].

Unsere Experimente zeigen die außergewöhnliche Potenz von DC bei der Regulation von Immunantworten für die Induktion einer effektiven Antitumor-Immunität. Wichtige Faktoren für den Erfolg der Tumorstoffe sind zum einen die Anzahl der applizierten DC und zum anderen ihre Lebensdauer nach erfolgter *in vivo* Applikation [81][60].

Im Hinblick auf die hier gezeigte Effizienz der induzierten Immun-Effektor-Mechanismen können nun dendritische Zellstoffe weiterentwickelt werden. Es muss in Zukunft untersucht werden, durch welche weiteren Modifikationen von DC und Hybridisierungspartnern eine effektive Antigenpräsentation und Induktion zytotoxischer CD8+ T-Zellen gegen eine Vielzahl von Tumor-Abstoßungsantigenen am ehesten gewährleistet ist.

Weiterhin sollen noch mehrere Arbeiten durchgeführt werden, um den wachstumshemmenden Effekt auf die CD40-CD40L Interaktion in Tumoren noch genauer zu erforschen. Möglicherweise bewirkt der CD40L eine Apoptose von Tumorzellen dadurch, dass er Oberflächenmoleküle wie das CD95-Antigen (Fas-Antigen) exprimiert, ein Rezeptorprotein, das zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört. Ausserdem können die Wachstumshemmung von Tumoren und der Zelltod durch IFN- γ verstärkt werden. IFN- γ erzeugt eine erhöhte CD40 Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen, was die Tumorzelle zugänglicher für den CD40-Ligand macht. Diese Tatsachen zeigen, daß eine Kombination von Immuntherapie, die Zytokine und CD40L beinhaltet, zusätzliche Vorteile bietet. Letztendlich bewirkt der CD40-Ligand eine erhöhte Immunantwort und zeigt direkte klinische antitumoröse Effekte in der Behandlung von CD40 positiven Karzinomen.

Die hier vorliegende Arbeit ist ferner ein wichtiger Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung, um den wachstumshemmenden Effekt auf die CD40-CD40L Interaktion in Tumoren noch genauer zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung einer dendritischen Tumorzellvakzine auf der Basis von fusionierten DC und Pankreaskarzinomzellen, die im Hinblick auf die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms einen großen Fortschritt bedeuten könnte.

Es sollte im Einzelnen ein DC-Tumorzellhybrid entwickelt werden, welches aufgrund der Antigenität einerseits und der gleichzeitigen Fähigkeit zur Antigenpräsentation andererseits zu einer verstärkten Induktion von zytotoxischen T-Zellen führt.

Unter Optimierung der Kultur muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark und Erarbeitung eines Protokolls für eine effektive Fusion muriner dendritischer Zellen mit einer pankreatischen Zelllinie Panc02 war es möglich, DC-Tumorzellhybride zu generieren, die zwar eine gesteigerte, jedoch gegenüber den alleinigen Kontrollen mit DC keine, sogar eine erniedrigte Zytotoxizität induzierten. Zur *in vitro* Untersuchung der Induktion einer tumorspezifischen Immunreaktion durch eine dendritische Zellvakzine wurde in mehreren Fusionsansätzen aus murinen DC und Pankreaskarzinomzellen Panc02 ihre spezifischen Oberflächenmarker und so ihre spezifische Aktivität gegen Tumorzellen nachgewiesen. Die Untersuchungen ergaben, daß es nach der Hybridisierung unter anderem zu einer CD40 Liganden Defizienz gekommen ist.

In gemeinsamer Erarbeitung mit Herrn Alex Eliu, der sich in seiner Promotionsarbeit mit der Transfektion von DC und Zellhybriden mit adenoviralem CD154 in der Behandlung des exokrinen duktales Pankreaskarzinoms befasste, konnte gezeigt werden, daß die Wirksamkeit dieser Hybride durch Transfektion mit einem Adenovirus für den CD40 Liganden (Ad CD40L) gesteigert werden konnte. Diese Transfektion führte zu einer signifikant erhöhten Induktion von zytotoxischen T-Zellen *in vitro* und zur besten antitumorösen Wirkung in einem *in vivo* Modell einer Pankreaskarzinom tragenden Maus.

In wie weit dieser Immun-Escape-Mechanismus der CD40-Herunterregulierung auf DC durch Tumorzellen auch *in vivo* eine Bedeutung hat, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

6 Abbildungen

Abb.1 Die Möglichkeiten der hämatopoetischen Differenzierung lymphoider und myeloischer dendritischer Zellen, Timmermann und Levy 1999, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.2 Zellfusion, Prof. Zimmermann, Würzburg, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.3 Typische DC-Zellmorphologie (Vergrößerung 200-fach), eigene Aufnahme, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.4 Panc02 Zellen und DC gefärbt mit Sigma PHK 02 und PHK 26, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.5 Durchflusszytometrische Analyse eines unfusionierten Gemischs von roten DC (45%) und grünen Panc02-Zellen (50%), Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.6 Durchflusszytometrische Analyse fusionierter Zellen (rot und grün), Panc02-Zellen (grün) und DC (rot), Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.7 Vergleich des Erscheinungsbildes bezüglich Zellgröße (FS) und Zellgranulärität von DC, Panc02, Panc02-DC Gemisch und Panc02-DC Hybride

Abb.8 Anteil der Panc02-DC-Zellhybride abhängig von der Spannung des zweiten Pulses

Abb.9a Bestimmung der Oberflächenantigene auf DC-Panc02 Hybriden, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.9b Vergleich der Oberflächenantigene von Panc02-DC Hybriden mit der Panc02-DC Kokultur, dem 1:1-Zellgemisch, der nativen Panc02 und der nativen DC, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.10 AdGFP virusinfizierte DC- Panc02 Hybride (eigene Aufnahme), Vergrößerung 30fach, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.11 AdGFP virusinfizierte Panc02, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Abb.12 Lyseraten von nicht gepulsten acht Tage alten DC, Panco02/DC/AdCD40L Hybrid, Panc02-DC Hybrid und Panc02 alleine, Abb. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

7 Tabellen

Tab.1 Charakteristika dendritischer Zellen im unreifen und reifen Stadium [11], Tab. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Tab.2 Vergleich der Fusionseffizienz und des Ansprechens der Therapie mit DC-Tumorzellhybriden von verschiedenen Autoren

Tab.3 Vergleich der Kombination verschiedener Zellfärbung zur Beurteilung der Vitalität von Zellen, Tab. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Tab.4 Oberflächenmarker (%), CD40, CD80, CD86 und MHC I von DC am Tag 5-7, Tab. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Tab.5 Vergleich der Oberflächenmarker MHC I, CD40, CD80, CD86 von Panc02, DC(5-7d), Panc02-DC Zellgemisch, Panc02-DC Kokultur (1d) und Panc02-DC Hybriden(2d), Tab. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Tab.6 Bestimmung der Lebendzellzahl von Zellhybriden aus 1×10^6 Panc02 Zellen und 1×10^6 DC nach 2, 4, und 6 Tagen, Tab. identisch in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

Tab.7 Behandlung von Pankreaskarzinomen in der C57/BJ6 Maus mit ungepulsten DC und Panc02-DC Hybriden. Es werden die Daten des Tages 30 gezeigt, Tab. ähnlich in der Promotionsarbeit von Herrn A. Eliu

8 Literatur

1. Ahmadzadeh M, Hussain SF, Farber DL, *Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells*. J Immunol 2001; 166: 926-935
2. Ardavin C, *Thymic dendritic cells*. Immunol Today 1997; 18: 350-361
3. Armitage RJ et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40*. Nature 1992; 357: 80-82
4. Bachmann MF et al., *Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection*. Eur J Immunol 1999; 29: 291-299
5. Bachmann MF et al., *Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells"*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 640-645
6. Banchereau J, Steinman RM, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature 1998; 392: 245-252
7. Banchereau J et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol 2000; 18: 767-811
8. Banchereau J et al., *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol 1994; 12: 881-922.
9. Brocker T, *Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells*. J Exp Med 1997; 186: 1223-1232
10. Brossart P et al., *Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells*. Cancer Res 2000; 60: 4485-4492
11. Cantwell M et al., *Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia*. Nat Med 1997; 3: 984-989
12. Castle BE et al., *Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes*. J Immunol 1993; 151: 1777-1788
13. Caux C et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med 1994; 180: 1263-1272
14. Caux C et al., *Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic*

- cells. *Int Immunol* 1994; 6: 1177-1185
15. Cella M et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.* *J Exp Med* 1996; 184: 747-752
 16. Cella M et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.* *Nat Med* 1999; 5: 919-923
 17. Chen HW et al., *Linkage of CD40L to a self-tumor antigen enhances the antitumor immune responses of dendritic cell-based treatment.* *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 341-348
 18. Cho BK et al., *Functional differences between memory and naive CD8 T cells.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2976-2981
 19. Clark EA, Ledbetter JA , *How B and T cells talk to each other.* *Nature* 1994; 367: 425-428
 20. Corbett TH et al., *Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice.* *Cancer Res* 1984; 44: 717-726
 21. Crawford K et al., *Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells.* *J Immunol*, 1999; 163: 5920-5928
 22. De Mattia F et al., *Antigen-experienced T cells undergo a transient phase of unresponsiveness following optimal stimulation.* *J Immunol* 1999; 163: 5929-5936
 23. Dhodapkar MV et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.* *J Exp Med* 2001; 193: 233-238
 24. Durie FH et al., *The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity.* *Immunol Today* 1994; 15: 406-411
 25. Enk AH et al., *Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance.* *J Immunol* 1993; 151: 2390-2398
 26. Ernst B et al., *The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery.* *Immunity* 1999; 11: 173-181
 27. Fong L, Engleman EG, *Dendritic cells in cancer immunotherapy.* *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 245-273
 28. Fong L et al., *Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer*

- patients*. J Immunol 2001; 166: 4254-4259
29. Gabilovich DI et al., *Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells*. J Immunol 2001; 166: 5398-5406
 30. Germain RN, *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation providing ligands for T lymphocyte activation*. Cell 1994; 76: 287-299
 31. Gong J et al., *Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 2715-2718
 32. Gong J et al., *Immunization against murine multiple myeloma with fusions of dendritic and plasmacytoma cells is potentiated by interleukin 12*. Blood 2002; 99: 2512-2517
 33. Gong J et al., *Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells*. Nat Med 1997; 3: 558-561
 34. Grewal IS et al., *Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis*. Science 1996; 273: 1864-1867
 35. Gunzer M et al., *Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines*. J Leukoc Biol 2000; 67: 622-629
 36. Hart DN, *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood 1997; 90: 3245-3287
 37. Hawiger D et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med 2001; 194: 769-779
 38. Hendriks J et al., *CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity*. Nat Immunol 2000; 1: 433-440
 39. Hermann P et al., *Expression of a 32-kDa ligand for the CD40 antigen on activated human T lymphocytes*. Eur J Immunol 1993; 23: 961-964
 40. Homann D, Teyton L, Oldstone MB, *Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory*. Nat Med 2001; 7: 913-919
 41. Homma S et al., *Preventive antitumor activity against hepatocellular carcinoma (HCC) induced by immunization with fusions of dendritic cells and HCC cells in mice*.

- J Gastroenterol 2001; 3: 764-771
42. Huang L et al., *The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo*. Immunity 1994; 1: 741-749
 43. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A, *The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells*. Immunity 1998; 8: 89-95
 44. Inaba K et al., *Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells*. J Exp Med 1998; 188: 2163-2173
 45. Jelley-Gibbs DM et al., *Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation*. J Immunol 2000; 165: 5017-5026
 46. Jonuleit H et al., *A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection*. Int J Cancer 2001; 93: 243-251
 47. Jonuleit H et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. J Exp Med 2000; 192: 1213-1222
 48. Kato K et al., *Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells*. J Clin Invest 1998; 101: 1133-1141
 49. Kieper WC, Jameson SC, *Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 13306-13311
 50. Kikuchi T et al., *Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells*. Cancer Immunol Immunother 2001; 50: 337-344
 51. Kohler G, Milstein C, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Biotechnology 1992; 24: 524-526
 52. Kundig TM et al., *On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9716-9723
 53. Langenkamp A et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol 2000; 1: 311-316
 54. Lau LL et al., *Cytotoxic T-cell memory without antigen*. Nature 1994; 369: 648-652

55. Lederer JA et al., *Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation*. J Exp Med 1996; 184: 397-406
56. Li J et al., *Purified hybrid cells from dendritic cell and tumor cell fusions are superior activators of antitumor immunity*. Cancer Immunol Immunother 2001; 50: 456-462
57. Lindner M, Schirmacher V, *Tumour cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols*. Eur J Clin Invest 2002; 32: 207-217
58. Lutz MB et al., *Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo*. Eur J Immunol 2000; 30: 1813-1822
59. Margulies DH, *The major Histocompatibility Complex*, In: Paul WE, Fundamental Immunology. Philadelphia - New York: Lippincott Raven, 1999: 263-285
60. Moodycliffe AM et al., *CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes*. J Exp Med 2000; 191: 2011-2020
61. Morel AS et al., *Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step*. Eur J Immunol 1997; 27: 26-34
62. Murali-Krishna K et al., *In vivo dynamics of anti-viral CD8 T cell responses to different epitopes. An evaluation of bystander activation in primary and secondary responses to viral infection*. Adv Exp Med Biol 1998; 452: 123-142
63. Nestle FO et al., *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells*. Nat Med 1998; 4: 328-332
64. Noelle RJ et al., *Role of contact and soluble factors in the growth and differentiation of B cells by helper T cells*. Adv Exp Med Biol 1992; 323: 131-138
65. Oehen S, Brduscha-Riem K, *Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division*. J Immunol 1998; 161: 5338-5346
66. Ranheim EA, Kipps TJ, *Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal*. J Exp Med 1993; 177: 925-935
67. Ranheim EA, Kipps TJ, *Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4*,

IL-10, and CD40L. Cell Immunol 1995; 161: 226-235

68. Reid CD et al., *Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow*. J Immunol 1992; 149: 2681-2688
69. Rogers PR, Dubey C, Swain SL, *Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen*. J Immunol 2000; 164: 2338-2346
70. Romani N et al., *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability*. J Immunol Methods 1996; 196: 137-151
71. Romani N et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med 1994; 180: 83-93
72. Roy M et al., *The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells*. J Immunol 1993; 151: 2497-2510
73. Saeki H et al., *Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes*. J Immunol 1999; 162: 2472-2475
74. Saraya K, Reid CD, *Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ progenitors in bone marrow and cord blood*. Br J Haematol 1996; 93: 258-264
75. Schluns KS et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol 2000; 1: 426-432
76. Schnurr M et al., *Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells*. J Immunol 2000; 165: 4704-4709
77. Siegal FP et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science 1999; 284: 1835-1837
78. Sprent J, von Boehmer H, *Helper function of T cells depleted of alloantigen-reactive lymphocytes by filtration through irradiated F1 hybrid recipients. I. Failure to collaborate with allogeneic B cells in a secondary response to sheep erythrocytes measured in vivo*. J Exp Med 1976;. 144: 616-626

79. Steinman RM, *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol 1991; 9: 271-296
80. Tan JT et al., *IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 8732-8737
81. Tanaka H et al., *Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio*. J Exp Med 2000; 192: 405-412
82. Thurner B et al., *Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma*. J Exp Med 1999; 190: 1669-1678
83. Timmerman JM et al, *Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients*. Blood 2002; 99: 1517-1526
84. Timmerman JM, Levy R, *Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy*. Annu Rev Med 1999; 50: 507-529
85. Trefzer U et al., *Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma*. Int J Cancer 2000; 85: 618-626
86. Trinchieri G, Scott P, *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions*. Res Immunol 1995; 146: 423-431
87. Van Stipdonk MJ, Lemmens EE, Schoenberger SP, *Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation*. Nat Immunol 2001; 2: 423-429
88. Veiga-Fernandes H et al., *Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo*. Nat Immunol 2000; 1: 47-53
89. Versteegen, JM et al., *Enumeration of IFN-gamma-producing human lymphocytes by spot-ELISA. A method to detect lymphokine-producing lymphocytes at the single-cell level*. J Immunol Methods 1988; 111: 25-29
90. Wells AD et al., *T cell effector function and anergy avoidance are quantitatively linked to cell division*. J Immunol 2000; 165: 2432-2443
91. Whitmire JK et al., *Long-term CD4 Th1 and Th2 memory following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection*. J Virol 1998; 72: 8281-8288
92. Wierda WG et al., *CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic*

leukemia. Blood 2000; 96: 2917-2924

93. Yang Y, Wilson JM, *CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40*. Science 1996; 273: 1862-1864
94. Zimmermann C et al., *Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences*. Eur J Immunol 1999; 29: 284-290
95. Zimmermann U, Vienken J, *Electric field-induced cell-to-cell fusion*. J Membr Biol 1982; 67: 165-182
96. Zimmermann U et al., *Electro-fusion of cells: principles and potential for the future*. Ciba Found Symp 1984; 103: 60-85

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Immun- und Genterapeutischen Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmidt-Wolf an der Med. Universitätsklinik und Poliklinik I Bonn, Allgemeine Innere, Leitung Prof. Dr. T. Sauerbruch durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ingo Schmidt-Wolf für das anregende Thema, für das angenehme Klima und die Hilfestellungen bei allen aufgetretenen Fragen.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Carsten Ziske für die gute Betreuung und das „Verfolgen des roten Fadens“ durch die ganze Arbeit.

Meinen Laborkollegen, insbesondere Alex Eliu, mit dem ich sowohl den experimentellen Teil als auch die theoretische Umsetzung erarbeitet habe, sowie Tanja Schmidt und Srinivas Nagaraj danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei vielen aufgetretenen Fragestellungen.

Letztendlich möchte ich noch ganz herzlich meiner Mutter, Frau Dr. Evelyn Etzrodt El-Meligi danken, die mir immer als nette und anregende Diskussionspartnerin zur Seite stand sowie meiner lieben Schwester Evita.