

**Der therapeutische Effekt von Dendrit-Tumor-Fusionszellen auf das
Tumorwachstum im Lewis-Lungen-Karzinom-Modell der Maus**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von

Michael Schneider

aus Siegen

Giessen 2008

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik IV, Hämatologie und Onkologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger
Der Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Gutachter: Prof. Dr. H. Sauer

Tag der Disputation: 09.06.2008

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

In Dank den besten Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Unspezifische Abwehrmechanismen	1
1.1.2 Dendritische Zellen	2
1.1.3 Spezifische Abwehrmechanismen	3
1.1.4 Zytokine, Mediatoren	8
1.1.5 Apoptose-Mechanismen	9
1.2 Tumورimmunologie	9
1.2.1 Tumorantigene	10
1.2.2 Escape-Mechanismen	11
1.2.3 Tumor-Immuntherapie	12
1.3 Der Lewis-Lungen-Tumor (LLC1)	14
2 Fragestellung	16
3 Material	17
3.1 Medien und Puffer	17
3.2 Verbrauchsmaterialien	18
3.3 Reagenzien, Zytokine und Antibiotika	19
3.4 Molekularbiologische Reagenzien	20
3.5 Antikörper und Färbungen	22
3.6 Geräte	23
3.7 Primer	25
3.8 Tiere	26
3.9 Tumorzelllinien	27
4 Methoden	28
4.1 Zellkulturarbeiten	28
4.1.1 Trypsinieren	28

4.1.2 Einfrieren von Zellen	28
4.1.3 Isolieren mononukleärer Zellen	28
4.1.4 Isolieren von CD3+ T-Zellen	29
4.1.5 Erzeugung von dendritischen Zellen aus Knochenmarkzellen	29
4.1.6 Herstellung von Hybriden	30
4.2 Immunhistochemische Arbeiten	31
4.2.1 Färben in Mikrotiterplatte	31
4.2.2 Fluoreszenz-Mikroskopie	32
4.3 Durchflusszytometrie	32
4.3.1 Standardzellen und deren Gebrauch	32
4.3.2 Überwachung der Fusionsrate	32
4.4 Molekularbiologische Arbeiten	33
4.4.1 RNA-Isolation	33
4.4.2 cDNA Synthese	34
4.4.3 Arbeiten mit Microarray-Technologie	34
4.4.5 Polymerase Kettenreaktion	36
4.4.6 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	36
4.4.7 Agarose-Gelelektrophorese und PCR-Produktaufreinigung	37
4.4.8 RT-PCR	38
4.4.9 Immunhistochemische Färbung	39
4.5 Funktionelle Zellkulturversuche	39
4.5.1 Proliferationstest	39
4.5.2 Zytotoxizitätstest	40
4.6 Arbeit mit Mäusen	41
4.6.1 Betäuben von Mäusen	41
4.6.2 Blutentnahme bei Mäusen	41
4.6.3 Schwanzveneninjektion	41
4.6.4 Tumoranimpfung	41
4.6.5 Tumorgrößenbestimmung	41
4.6.6 Immunisierung	42
4.6.7 Vakzinierung	42
4.6.8 Adoptive Therapie	42
4.6.9 Kombination aus Hybridaktivierten T-Lymphozyten und Hybridvakzinierung	43

4.7 Flat- Panel Volumen Computer-Tomographie	45
4.8 Bestimmung der Apoptose mittels „TUNEL-Assay“	46
4.9 Histologische Bestimmung der Metastasierung	46
4.10 Statistik	47
5 Ergebnisse	48
5.1 Verifizierung der Fusionsrate	48
5.2 Analyse der T-Zellfunktion nach Immunisierung in vitro	50
5.2.1 Analyse des Proliferationstests nach Immunisierung	51
5.2.2 Analyse des Zytotoxtests nach Immunisierung	51
5.2.3 Mikroarray und RT-PCR nach Immunisierung	53
5.3 Ergebnisse der Tumorchallenge nach Immunisierung	55
5.3.1 Ergebnisse des Tumorwachstums nach Immunisierung	58
5.3.2 Analyse des Proliferationstests nach Tumorchallenge	58
5.3.3 Analyse des Zytotoxtests nach Tumorchallenge	58
5.4 In-vivo und in-vitro-Ergebnisse nach Vakzinierungstherapie	59
5.4.1 Ergebnisse des Tumorwachstums nach Vakzinierung	61
5.4.2 Analyse des Proliferationstests nach Vakzinierung	61
5.4.3 Analyse des Zytotoxtests nach Vakzinierung	61
5.5 In-vivo und in-vitro-Ergebnisse nach adoptiver Therapie	61
5.5.1 Ergebnisse des Tumorwachstums nach adoptiver Therapie	64
5.5.2 Analyse des Proliferationstests nach adoptiver Therapie	64
5.5.3 Analyse des Zytotoxtests nach adoptiver Therapie	64
5.6 Ergebnisse der Kombinationstherapie aus adoptiver Therapie und Vakzinierung	65
5.6.1 Analyse der FpvCT (Flat panel volumetric Computed Tomography)-Darstellung nach Kombinationstherapie	68
5.6.2 Histologische Ergebnisse nach der Kombinationstherapie	73
5.6.3 Analyse des Proliferationstests nach Kombinationstherapie	77
5.6.4 Analyse des Zytotoxtests nach der Kombinationstherapie	77
5.6.5 Die Aktivität der Lymphozyten-Proliferations- und Apoptose-Gene in RT-PCR nach der Kombinationstherapie	80
6 Diskussion	82
6.1 In vitro gewonnene Daten zeigen funktionsfähige Hybride	83

6.1.1 Durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Daten bestätigen eine erfolgreiche Fusion	83
6.1.2 Bestätigung der T-Zellproliferation durch Hybride	84
6.1.3 Hybrid-aktivierte T-Zellen zeigen im Zytotoxtest das größte zytotoxische Potenzial	84
6.2 Unterschiedlicher Erfolg der Therapieverfahren in vivo	85
6.2.1 Immunisierung löst Anti-Tumor-Immunität aus	85
6.2.2 Vakzinierung bewirkt verringertes Tumorwachstum	86
6.2.3 Adoptive Therapie zeigt deutlich stärkeren Anti-Tumor-Effekt	86
6.2.4 Kombination aus Adoptiver Therapie und Vakzination hat den größten Erfolg	88
6.3 Potenzielle Fehlerquellen	93
6.4 Ausblick	93
7 Zusammenfassung	94
8 Summary	95
9 Literaturangaben	96
10 Publikationen	113
11 Weitere Veröffentlichungen (Poster)	113
12 Danksagung	114
13 Lebenslauf	115

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Fusion	31
Abb. 2: Experimentelles Design der Kombinationstherapie	45
Abb. 3: Facs Bilder zur Fusionskontrolle	49
Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Hybride	50
Abb. 5: Proliferations- und Zytotoxaktivität nach Immunisierung	52
Abb. 6: Microarray Ergebnisse	54
Abb. 7: RT-PCR Bestätigung der Microarray Ergebnisse	55
Abb. 8: Hybridimmunisierung	56
Abb. 9: Tumorwachstum, Zytotoxtest und Proliferation nach Hybrid Vakzinierung	59
Abb. 10: Adoptive Therapie	62
Abb. 11: Anti-Tumor Effekt der Hybrid-Kombinations Therapie	66
Abb. 12: Flach Feld Volumen Computertomographie (flat panel volume CT= FpvCT) Ergebnisse	69
Abb. 13: Analyse der Lungenmetastasierung mittels FpvCT und Histologie	71
Abb. 14: Histopathologischer Befund des Tumors nach der Kombinationstherapie	74
Abb. 15: Histopathologischer Befund der Lungenmetastasierung nach Kombinationstherapie	75
Abb. 16: Histopathologischer Befund der Milz nach Kombinationstherapie	76
Abb. 17: Proliferations- und Zytotox-Testergebnisse der Kombinationstherapie	78
Abb. 18: Semiquantitative RT-PCR Analyse	81
Abb. 19: Schematische Darstellung der, bei der Kombinationstherapie für die Tumorsuppression verantwortlichen Mechanismen	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zytokine und Mediatoren	8
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3: Reagenzien, Zytokine und Antibiotika	19
Tabelle 4: Molekularbiologische Reagenzien	20
Tabelle 5: Antikörper und Färbungen	22
Tabelle 6: Geräte	23
Tabelle 7: Primer für semiquantitative RT-PCR	25

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen präsentierende Zellen
A.U	Arbitrary Units
BSA	Bovines Serum Albumin
BZR	B-Zell Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
Cpm	Counts per minute
CT	Computer Tomographie
ZTL	T- Killer Zelle
DZ	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated Cellsortening
FADD	FAS Associated Death domain
FCS	Fetal Calv Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLT-3	FMS-like Tyrosinekinase 3
FpvCT	Flat panel volumetric Computed Tomography
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GMCSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HCV/HBV	Hepatitis C/B Virus
H&E	Hämatoxilin Eosin
HPV	Humanes Papilom Virus
H-TdR	Radioaktives, [³ H] Thymidin
HZ	Hybridzellen aus LLC1 Tumorzellen und dendritischen Zellen
ICOS	Inducible costimulator
Ig	Immunglobuline der Gruppen A, D, E, G und M
IL	Interleukin

INF	Interferon
LAK	Lymphokin aktivierte Lymphozyten
LKZ	Lymphknotenzellen (isolierte mononukleäre Zellen)
LPS	Lipopolysaccharide
Ltb	Lymphotoxin B
MGF	Mastcell Growth Factor
MHCI/II	Major Histocompatibility Complex Protein I und II
MLR	Mixed lymphocyte Reaktion
MZ	Milzzellen (isolierte mononukleäre Zellen)
NK	Natürliche Killerzelle
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyetylen Glycol
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E 2
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real Time-Polymerase Kettenreaktion
SZ	Standardzellen
SCDA	Standardzelllösung
SCF	Stemcellfactor
NOD/SCID	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
S.o.	Siehe oben
TAA	Tumor assoziierte Antigene
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TGF- β 1	Transforming growthfactor Beta 1
TH	T-Helferzellen
TIL	Tumorfilierte Lymphozyten
TLR	Toll-like Rezeptor
TNM	Tumorklassifikationssystem nach T= Primärtumorausdehnung, M= Metastasierung, N= Lymphknotenmetastasen
TUNEL	Terminal transferase uridyl nick end-labelling
TZR	T-Zell-Rezeptor
UpM	Umdrehungen pro Minute
ZTL	Zytotoxische T-Lymphozyten

1 Einleitung

In dieser Arbeit sind die Ergebnisse experimenteller immunotherapeutischer Therapieansätze, am malignen Lewis-Lung-Karzinom-Modell (LLC1) dargestellt.

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem wird in die unspezifische, angeborene Abwehr und die erworbene, spezifische Abwehr eingeteilt.

1.1.1 Unspezifische Abwehrmechanismen

Unspezifische Abwehrmechanismen setzen sich aus chemischen, physikalischen und biologischen Faktoren sowie komplizierten, zellulären Abwehrmechanismen zusammen. Diese können im Inneren des Körpers auf Oberflächenstrukturen reagieren und durch andere Zellen sowie Mediatoren aktiviert werden.

Die unspezifische Abwehr unterteilt sich in humorale und zelluläre Bestandteile.

Zur humoralen Abwehr gehören der Säureschutzmantel der Haut, die bakterielle Besiedlung der Hautoberfläche oder Schleimhäute mit apathogenen Keimen, die Reinigung der Haut oder der Atemwege durch Abtransport und Produktion von Schleim oder Talg unter Hilfe von Zilien und unter Einfluss von Enzymen wie Lysozym. Ein weiterer Teil der unspezifischen Abwehr ist das Komplementsystem, das auf dem so genannten klassischen und alternativen Weg aktiviert werden kann. Beim klassischen Weg spielen bei der Aktivierung Antigen-Antikörperkomplexe eine Rolle, während auf dem alternativen Weg die Aktivierung direkt durch Produkte von Mikroorganismen oder durch aggregiertes IgA ausgelöst wird.

Zur zellulären unspezifischen Abwehr gehören Makrophagen, Monozyten und Granulozyten mit phagozytischen Eigenschaften, sowie die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und die dendritischen Zellen. Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten werden durch Kontakt mit unbekanntem Oberflächenmolekülen aktiviert. NK-Zellen binden durch Fc-Rezeptoren (Rezeptoren für den Fc-Teil von Antikörpern) Antikörper auf ihrer Oberfläche. Sie können auch ohne Bindung von Antikörpern zur Abtötung von Zellen führen. Auf diese Weise können NK-Zellen tumorös veränderte Zellen abtöten, auch wenn diese auf ihrer Oberfläche einen Verlust von Haupthistokompatibili-

tätsfaktor-Molekülen (MHC-Moleküle) aufweisen. Diese Vorgänge werden auch als antikörpervermittelte und nicht antikörpervermittelte Zytotoxizität bezeichnet [Janeway CA, 2002].

1.1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) sind das Ziel vieler Untersuchungen, die momentan im Zusammenhang mit Anti-Tumorimmunität, aber auch mit anderen immunologischen Therapien untersucht werden. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Generierung einer zellvermittelten Immunität. Im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) sind DZ in der Lage mittels MHC-Molekülen Klasse I und II eine Aktivierung und Proliferation von naiven zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten (ZTL) und Helfer-CD4⁺-T-Lymphozyten (TH) zu bewirken [Bossart P, 1997; Nair S, 1992; Obshima Y, 1997; Progador A, 1995; Shen Z, 1997].

Wie B-Lymphozyten und Makrophagen, sind DZ in der Lage auch ruhende naive T-Zellen zu aktivieren [Pulendran B, 2001; Moser M, 2003]. DZ können in fast jedem Gewebe als unreife Vorläuferzellen vorliegen. Sie besitzen vor Ort die Fähigkeit zur Phagozytose. Werden die DZ durch Zytokine oder bakterielle Antigene aktiviert, verlieren sie ihre Ortsständigkeit und werden mobil. In diesem Stadium reduzieren sie ihre Phagozytosefähigkeit [Naughton M, 2001; Svensson M, 1997]. Sie durchlaufen eine funktionelle und phänotypische Veränderung, in dem sie von einer phagozytierenden zu einer antigenpräsentierenden Zelle heranreifen, was als DZ-Maturierung bezeichnet wird [Banchereau JF, 2000]. Reife DZ wirken hauptsächlich T-Zell-stimulierend. In diesem Stadium befinden sie sich zu einem großen Teil in den regionalen Lymphknoten. Dort treten sie in den T-Zell-Regionen der Lymphknoten mit T-Zellen in Kontakt und rufen durch Antigenpräsentation eine primäre Immunantwort hervor [Kalinski P, 1999; Liu YJ, 2000; Shortman K, 2002]. Dies geschieht mit Hilfe einer verstärkten Expression von Adhäsions-, MHC- und kostimulatorischen Molekülen, sowie durch Sekretion von Zytokinen wie IL-12. [Siegal FP, 1999; Cella M, 1999]. Bei der vorangegangenen Prozessierung werden die Tumorantigene (TAA) durch die DZ MHC-I-restringiert präsentiert, obwohl diese nicht dem Zytosol der Zelle entstammen, sondern durch Phagozytose aufgenommen wurden [Albert, ML, 1998]. Alle anderen APZ präsentieren zytosolische Proteine MHC-I-restringiert, während exogene Peptide, MHC-II-

restringiert präsentiert werden. Diese Fähigkeit der DZ exogene Antigene, an MHC-I-gebundene Peptide zu präsentieren, wird als „Cross-priming“ bezeichnet [Bossart, P, 1997; Norbury, CC, 1995; Rock KL, 1996]. Auf diese Weise können DZ CD8+-T-Zellen aktivieren. Zusätzlich werden MHC-II-gebundene Antigene präsentiert. Dies führt zu einer Aktivierung von CD4+-T-Helferzellen, welche die humorale Immunantwort und somit die Antikörperbildung aktivieren [Janeway CA, 2002, S. 25 ff.; S. 515-518]. DZ sind somit nicht nur in der Lage, spezifische T-Killerzellen zu aktivieren und deren klonale Expansion zu induzieren, sondern sie induzieren ebenfalls eine antigenspezifische Antikörperbildung.

Neben der natürlichen Entstehung von DZ aus CD34-positiven Progenitorzellen können DZ auch aus CD1-positiven Monozyten des peripheren Blutes oder aus Knochenmarkstammzellen generiert werden. Hierzu finden proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL4, GM-CSF, Flt3 und LPS Verwendung. Das Fehlen einer Tumorantigenpräsentation durch DZ in Vivo ist möglicherweise einer der Gründe, für die Unfähigkeit des Immunsystems, immunogene Tumore zu zerstören [Schuler G, 1997].

1.1.3 Spezifische Abwehrmechanismen

Die spezifischen Abwehrmechanismen werden unterteilt in zelluläre und humorale Bestandteile. Dazu gehören auf zellulärer Ebene die B-Lymphozyten, die T-Lymphozyten und die DZ als Bestandteil des Makrophagen/Monozyten-Systems. Auf humoraler Ebene sind Antikörper von elementarer Bedeutung. Sie werden von reifen B-Lymphozyten, nach Antigenpräsentation, spezifisch gegen Antigene gebildet. Im Zusammenspiel der unterschiedlichen Zelltypen sind Zytokine, aktivierte DZ, Makrophagen oder Signale von TLR (Toll-Like Receptors) für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems unabdingbar [Barton GM, 2002; Gordon S, 2002]. In der Feinabstimmung der unterschiedlichen Faktoren liegt die hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit des Immunsystems begründet. Es handelt sich hierbei um die entscheidenden Faktoren für die Ausbildung von spezifischen Erkennungsmechanismen und sie bilden das Gedächtnis des Immunsystems.

B-Lymphozyten

Beim Menschen werden B-Lymphozyten hauptsächlich im Knochenmark gebildet. Die Hauptaufgabe der B-Zellen besteht in der Sekretion von Antikörpern (AK). B-Lymphozyten verfügen über einen speziellen Oberflächenrezeptor, den so genannten B-Zellrezeptor (BZR). Wird ein Antigen durch Immunglobuline auf der Zelloberfläche erkannt, kommt es zur spezifischen Aufnahme des Antigens. Hierzu müssen diese Immunglobuline zum Antigen komplementäre Bindungsstellen aufweisen. Dies kann der Fall sein, wenn eine B-Zelle bereits Kontakt zu dem entsprechenden Antigen gehabt hat, also „geprimed“ war. Nach Bindung wird der aus Antigen und Antikörper bestehende Komplex internalisiert und prozessiert. Die B-Zelle ist nun in der Lage, Peptide aus Antikörpern an MHC II-Moleküle gekoppelt an der Zelloberfläche zu präsentieren. Die auf diese Weise stimulierten Zellen werden als Plasmazellen bezeichnet. Plasmazellen bilden, unter kostimulatorischem Einfluss von regulatorischen T-Zellen und Zytokinen, Antikörper.

Im Anschluss an eine akute Abwehrphase können sich so genannte Gedächtniszellen bilden. Sie führen bei erneutem Kontakt mit Antikörpern zu einer schnelleren und stärkeren Antikörperproduktion.

Wenn B-Lymphozyten nicht über passende Immunglobuline verfügen, handelt es sich um so genannte naive B-Zellen. Sie fungieren als APZ. Dieser Vorgang wird als unspezifische Aufnahme bezeichnet. Das Antigen wird aufgenommen und seine Fragmente an ihrer Oberfläche präsentiert [Janeway CA, 1997].

T-Lymphozyten

Genau wie die B-Zellen stammen auch die T-Lymphozyten von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Sie gelangen als Prä-T-Zellen in den Thymus und erfahren hier ihre Differenzierung. T-Zellen können in drei Haupttypen eingeteilt werden. Zu ihnen gehören die T-Killerzellen, die T-Helfer-Zellen und die regulatorischen T-Zellen (früher T-Suppressorzellen). Der T-Zellrezeptor einer jeden T-Zelle bestimmt ihre Spezifität.

Jede Stammzelle besitzt eine Vielzahl von Genen, die für unterschiedliche Abschnitte des T-Zellrezeptors codieren. Es existieren ca. 100 Millionen unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten dieser Abschnitte mit den entsprechenden T-Zellrezeptoren.

Nach Ausbildung des T-Zellrezeptors bekommen die T-Zellen im Thymus von den Thymusepithelzellen zum ersten Mal MHC-Moleküle präsentiert. Sie lernen diese als

körpereigen kennen und werden anhand ihrer MHC-Affinität selektioniert. Ist diese Affinität zu hoch, sind die Lymphozyten autoreaktiv und werden abgetötet. Ist sie zu niedrig, sterben die T-Zellen mangels Stimulation ab. So verlassen idealer Weise nur T-Lymphozyten mit nicht auto-immunologischem T-Zell-Rezeptor (TZR) den Thymus.

Es ist möglich, T-Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenmoleküle zu unterscheiden. Dies kann experimentell mit Hilfe von Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen geschehen. Die beiden wichtigsten Oberflächenmolekülen sind CD4 und CD8. Sie sind beide auf der Oberfläche von Prä-T-Zellen zu finden. Bei der ersten Begegnung mit MHC-Molekülen entscheidet nun die Affinität des TZR, zu MHC-I oder MHC-II über die weitere Differenzierung. Hat der TZR eine höhere Affinität zu MHC-I wird die Expression des CD8-Moleküls positiv selektioniert. Es entsteht ein Zellklon, der irreversibel MHC-I, CD8⁺ und CD4⁻ restringiert ist. Zu Zellen dieser Art gehören regulatorische T-Zellen und zytotoxische T-Zellen.

Umgekehrt ist es bei T-Helferzellen, deren Vorläufer eine hohe Affinität zu MHC-II aufweisen und bei denen deshalb die Ausbildung von CD4-Molekülen verstärkt wird. Diese Zellen sind dann MHC-II, CD8⁻ und CD4⁺ restringiert, und werden als T-Helferzellen bezeichnet. Die T-Helferzellen können weiter in TH1 und TH0/TH2 unterteilt werden. Diese unterscheiden sich in der Art der sezernierten Zytokine. TH1-Zellen sezernieren INF- γ und IL12. Diese Zytokine regen Makrophagen zur Phagozytose und zum Abtöten extrazellulärer Pathogene an. TH1 sind an der zellulären Immunreaktion beteiligt. TH2-Zellen produzieren hauptsächlich IL4 und IL10, die Plasmazellen zur Antikörpersynthese stimulieren. Sie wirken damit vor allem bei der humoralen Immunabwehr mit [Romagnani S, 1991].

Ein weiterer Differenzierungsmarker ist das CD45RO- bzw. CD45RA-System. CD45RO wird als so genannter „Gedächtnismarker“ bezeichnet. Er ist funktionell auf anderen T-Zellen zu finden als der für naive T-Zellen typische CD45RA [Bierer BE, 1989; Haynes EL, 1986].

Nur etwa 1% der Prä-T-Zellen im Thymus gelangen als reife T-Zellen in die Blutbahn. Bekommen diese reifen T-Zellen durch APZ, wie z.B. DZ ein Antigen präsentiert, werden die T-Zellen mit dem passenden TZR auf der Oberfläche positiv selektioniert und kloniert. Man bezeichnet dies auch als „klonale Selektionstheorie“. Kommt es nun nach einer Immunisierung zu einem zweiten Kontakt, besteht der Vorteil der Induktion einer adaptiven Immunantwort darin, dass sich die T-Zellen an das Antigen erinnern. Die Abwehrreaktion verläuft rascher und deutlich verstärkt ab. Die klonale Expansion und

ein immunologisches Gedächtnis sind die Voraussetzungen für jede Vakzinierung [David V, 1987].

Allgemein sind T-Lymphozyten im Gegensatz zu B-Lymphozyten nicht in der Lage ein Antigen direkt zu erkennen. Sie sind auf die Hilfe von APZ wie B-Lymphozyten oder DZ angewiesen. Allerdings sind T-Zellen nur in der Lage Peptide zu erkennen, die von einem syngenen MHC-Molekül präsentiert werden. D.h. die Präsentation der Antigene muss durch syngene APZ erfolgen. T-Lymphozyten können zusätzlich auf die Präsentation von Antigenen befallener Zellen reagieren.

Heute nimmt man an, dass ein Antigenkontakt allein nicht ausreicht, um eine Abwehrreaktion auszulösen. Zusätzlich müssen Mediatorsubstanzen (Interleukine), wie IL1 und IL6 und/oder akzessorische Zelladhäsionsmoleküle (z.B. CD2 und LFA-3 sowie LFA-1 und ICAM-1, B7 und CD28 oder CD4 bzw. CD8) anwesend sein. Diese greifen am invariablen Anteil der MHC-Moleküle an und unterstützen die Bindung zwischen T-Zelle und APZ.

Von besonderer Bedeutung ist, dass diese Signale die aktivierten Zellen gegenüber IL-2 sensibilisieren. Dies geschieht, indem sie zum einen die Expression der IL-2 Rezeptoren induzieren und zum anderen die Sekretion von IL-2 aus den T-Helferzellen stimulieren. So sorgen sie für eine klonale Expansion der antigenspezifischen Effektor-T-Zellen. Fehlen solche kostimulatorischen Signale, wird die T-Zelle inaktiviert und kann auf spätere Signale nicht mehr adäquat reagieren. Dieser Umstand wird auch als Anergie bezeichnet [Schwartz RH, 1990].

In der klassischen Immunologie geht man davon aus, dass das Immunsystem in der Lage ist, zwischen „fremd“ und „eigen“ zu unterscheiden. Nach dem „Danger-Model“ hingegen ist das Immunsystem in der Lage, zwischen „harmlos“ und „gefährlich“ zu unterscheiden. So werden auch körpereigene Strukturen angegriffen, wenn der Körper diese als gefährlich erkennt [Matzinger P, 1994; Anderson HA, 2000; Anderson MS, 2002; Matzinger P, 2001].

Die „Drei Signalthypothese“ geht davon aus, dass unterschiedliche Antigene durch das angeborene Immunsystem auf den folgenden Wegen erkannt werden:

1. Mikrobiell fremde Signale, wie z.B. Lipopolysaccharide von Bakterien.

2. Fehlen von „Eigen-Signalen“, wie bei Infektionen von Zellen durch Viren, die die Expression von MHC-Molekülen auf der Oberfläche vermindern.
3. Veränderte „Eigen-Signale“, wie bei tumorös veränderten Zellen, die auf ihrer Oberfläche atypische Proteine präsentieren [Medzhitov, R. 2002].

Humorale Bestandteile der spezifischen Abwehr

Bei der spezifischen nicht-zellulären Abwehr spielen Antikörper die wohl bedeutendste Rolle. Sie werden in fünf Untergruppen eingeteilt, die mit den Buchstaben A, D, E, G, und M gekennzeichnet sind. Die Untergruppen unterscheiden sich in ihrer Funktion, Struktur und ihrem zeitlichen und örtlichen Auftreten.

IgA ist hauptsächlich in Schleimhäuten an der Abwehr beteiligt. IgD sitzt auf der Oberfläche von B-Lymphozyten und ist an der Antigenerkennung durch B-Lymphozyten beteiligt. IgE spielt entwicklungsgeschichtlich eine wichtige Rolle in der Abwehr von Parasiten, ist heute jedoch hauptsächlich wegen seiner Beteiligung an allergischen Reaktionen von Bedeutung.

Die für diese Arbeit wichtigsten Antikörper sind: IgG mit ihren Subklassen IgG1 – IgG4, und IgM. IgG1 und IgG3 sind besonders an der Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Lymphozyten beteiligt. Sie wirken bei der Opsonisierung von Mikroorganismen und Fremdanitgenen mit. Bei der erstmaligen Erkennung eines Antigens werden von B-Lymphozyten, in der immunologischen Erstreaktion, IgM gebildet. Kommt es nach Abklingen der Primärreaktion zu einem Persistieren des Antigens oder zu erneutem Antigenkontakt, werden IgG gebildet. IgM sind durch ihre pentamere Struktur in der Lage, verschiedene antigentragende Strukturen miteinander zu verknüpfen. Dadurch können sie deren Phagozytose durch Zellen des Makrophagen/Monozytensystems erleichtern. Die IgG-Moleküle hingegen sind besser geeignet, T-Killerzellen zur Abtötung der mit ihnen markierten Zelle anzuregen und NK-Zellen zu aktivieren.

1.1.4 Zytokine, Mediatoren

Eine wichtige Rolle im Zusammenspiel der unterschiedlichen Vorgänge spielen Zytokine und Wachstumsmediatoren.

Tabelle 1: Zytokine und Mediatoren

Typ:	Herkunft:	Wirkung:
IL1	Ubiquitär, vor allem mononukleäre Makrophagen	Entzündung; Fieber; Aktivierung von B- und T-Lymphozyten; Steigerung der Synthese von GM-CSF, IL1, IL6 und Prostaglandin E1
IL2	T-Helferzellen	Wachstum und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen; Steigerung der Synthese von IL1 und Interferon
IL4	T-Lymphozyten, mononukleäre Makrophagen und Mastzellen	Wachstum und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten; Steigerung der Immunglobulinsynthese (IgG, IgE)
IL5	T-Helferzellen, mononukleäre Makrophagen, Mastzellen	Wachstum und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten; Steigerung der Immunglobulinsynthese (IgA, IgM); Wachstum von Vorläufern eosinophiler Granulozyten
IL10	Aktivierte T- und B-Lymphozyten, Mitogenstimulierte Monozyten und Makrophagen	Inhibition von INF- γ , IL2, TNF
IL12	DZ und Makrophagen	Induktion von T-Helferzellen und Steigerung von Wachstum und Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen
INF- γ	Natürliche Killerzellen, TH1 Helferzellen, und zytotoxische T-Zellen	Pro-inflamatorisch, Induktion von HLA-Klasse-1 und HLA-Klasse-2, Makrophagenaktivierung, Steigerung der Zytotoxizität in Makrophagen und natürlichen Killerzellen
GMCSF	T-Helferzellen, mononukleäre Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen	Wachstum von Granulozyten- und Monozytenvorläufern

[Ibelgaufts H,1995; Lederer JA, 1994; Fiorentino DF, 1994; Klein J, 1991; Rubin LA 1990]

1.1.5 Apoptose-Mechanismen

In vorangegangenen Studien wurden zwei Hauptwege der Zytotoxizität postuliert, mit denen zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) ihre Zielzellen angreifen. Diese beruhen zum einen auf Perforin und zum anderen auf FAS/FASL. Die Bindung des T-Zellrezeptor/CD8-Komplexes an MHC/Epitope auf Tumorzell-Oberflächen induziert ein Signal des CD3-Moleküls, welches zu einer Freisetzung von Perforin, Granzymen und Chemokinen führt. Perforin-Moleküle polymerisieren und formen Poren. Daraufhin lösen sie die osmotische Lyse der Zielzellen aus. Bestimmte Granzyme, die zusammen mit Perforinen sezerniert werden, treten durch diese Poren in die Zelle ein und können Caspasen (cystein-dependent aspartat-spezifische Proteasen) aktivieren, was zur Apoptose der Zelle führt. Dies geschieht durch die Zerstörung des Proteingerüsts der Zelle, durch den Abbau der Nukleoproteine und durch die Aktivierung von DNA-abbauenden Enzymen. Die ZTLs leiten zusätzlich eine Apoptose der Zielzelle durch FAS/FASL-Wechselwirkungen ein. FAS ergänzt das FADD (FAS-Associated Death Domain)-Adapterprotein zu einem „death-inducing“-Signal-Komplex. Dieser Komplex bewirkt eine Aktivierung von Caspase 8. Diese wiederum aktiviert weitere, nachgeordnete Caspasen wie Caspase 3, -6, -7, die sich gegenseitig in ihrer apoptotischen Wirkung verstärken. Die Art, mit der diese zytotoxischen Mechanismen in vivo eine ZTL-vermittelte Tumor-Zerstörung bewirken, bleibt indes kontrovers diskutiert. Darüber hinaus ist das Verhältnis der durch zytolytische Granula hervorgerufenen Zytotoxizität gegenüber der FAS/FASL-vermittelten Lyse noch nicht ausreichend erforscht [Berke G, 1997, Lowin B, 1994].

1.2 Tumormunologie

Allgemein werden Tumore in gutartige und bösartige Tumore unterteilt. Maligne Tumore bilden Metastasen und wachsen infiltrativ in umliegende Gewebe ein. Sie stellen eine große Gefahr für den Organismus dar. Gutartige Tumore hingegen bilden weder Metastasen, noch wachsen sie infiltrativ. Sie sind deshalb für den Körper kaum gefährlich.

Gatti et.al. konnten aufzeigen, dass das Immunsystem maßgeblich an der Beseitigung von tumorös-veränderten Zellen beteiligt ist. Sie stellten fest, dass auch nicht virologisch bedingte Tumore bei Immunsuppression vermehrt auftreten [Gatti RA, 1971]

Maligne Tumorzellen gehen aus körpereigenen Zellen hervor. Deshalb besteht eine große Ähnlichkeit zum gesunden Gewebe. Sie werden vom Immunsystem nicht als fremd

erkannt. Der Grund hierfür ist die Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Geweben und deren Antigenen. Die Fähigkeit des Immunsystems Krebszellen aufzuspüren und zu vernichten, wird als Immunüberwachung oder „Immuno-Surveillance“ bezeichnet. Diese Fähigkeit des Immunsystems, setzt das Vorhandensein von spezifischen Tumorantigenen voraus [Burnet FM, 1967].

1.2.1 Tumorantigene

Für immunologische Therapiestrategien sind Tumorantigene von immenser Bedeutung. Die verschiedenen Tumorantigene lassen sich in fünf verschiedene Klassen einteilen, die wiederum in die zwei Gruppen „individuell“ und „shared“ unterteilt werden können [Jäger E, 2002].

Tumorantigene werden als individuelle Tumorantigene bezeichnet wenn sie für einen Tumor spezifisch sind und nur von diesen exprimiert werden. Hierzu gehören folgende Klassen:

- Die patientenindividuellen Peptide, die durch spezifische Mutation entstanden sind und daher sehr spezifisch für den jeweiligen Tumor bei einem bestimmten Patienten sind. Hierbei handelt es sich um ideale Tumorantigene, allerdings würden sie eine sehr individuelle Therapie erfordern [Eynde BJ van den, 1997].
- Nur vom Tumor exprimierte spezifische Antigene, die in gesundem Gewebe nicht vorkommen. Beispielhaft sind virale Antigene (HCV-/HBV-induziertes hepatozelluläres Karzinom, HPV-induziertes Zervixkarzinom) oder Antigene, die durch Mutation oder Translokation von Onkogenen entstehen (p53-Mutation, ras-Mutation) zu nennen [Gilboa E, 1999].

Tumorassoziierte Antigene, die zwar gehäuft in Tumorgewebe zu finden, aber nicht für einen Tumor spezifisch sind, werden „shared“ Tumorantigene genannt. Zu dieser Gruppe gehören:

- Die auch als „Cancer testis Antigene“ bekannten Antigene, die in gesundem Gewebe, mit Ausnahme der Hoden und der Plazenta, nicht vorkommen. Sie können aber in vielen Tumoren reaktiviert werden, wie beispielsweise Proteine der Mage-, Gage-, Bage-Familie [Boon T, 1994; Eynde BJ van den, 1997; Pel A van, 1995] oder NY-Eso-1 [Jäger E, 1998].

- Differenzierungsantigene wie etwa Tyrosinase gp75, gp100 oder Melan A / Mart1, die bei Melanom-Patienten beschrieben sind [Boon T, 1994; Eynde BJ van den, 1997].
- Proteine, die in Tumoren überexprimiert vorliegen, gleichzeitig jedoch auch in gesundem Gewebe zu finden sind [Fenton RG, 1997]. Z.B.:HER-2/neu [Fisk B, 1994], Muc1 [Brossart P, 2001] sowie das Protoonkogen C-Met.

Trotz der Fülle an verschiedenen Tumorantigenen ist der Körper in vielen Fällen nicht in der Lage die Tumorantigene dem Immunsystem suffizient zu präsentieren. Dies ermöglicht es dem Tumor, trotz potentieller immunologischer Angriffspunkte weiter zu persistieren oder zu wachsen. Ferner ist der Tumor, auf Grund des bestehenden Selektionsdrucks, in der Lage die Expression seiner Tumorantigene zu unterdrücken, was als Escape-Mechanismus bezeichnet wird.

1.2.2 Escape-Mechanismen

Bei Escape-Mechanismen handelt es sich um Ausweichmöglichkeiten von Tumoren gegenüber einer sich entwickelnden Abwehrreaktion. Diese basieren auf Modulation der Molekülexpression, Immunoselektion, Antigen-Modulation, Produktion von blockierenden Faktoren und Immunsuppression.

Der zu Beginn der Tumorentstehung homogene Zellverband entwickelt sich immer mehr zu einer heterogenen Zellpopulation. Änderungen der Zelleigenschaften können zu einer Verringerung der Antigenität führen. Diese Zellen verfügen gegenüber den anderen Tumorzelllinien über einen Selektionsvorteil und wachsen schneller, was schließlich zu einer Dominanz der immunresistenten Subpopulation und zu einer generellen Immunresistenz des Tumors führt. Als mögliche Ursachen einer solchen Resistenz kommen eine verminderte Anzahl oder ein völliges Fehlen von Antigenen auf der Zelloberfläche in Frage.

Der Verlust von Antigenen der Zelloberfläche erfolgt durch sogenanntes Patching (Kreuzvernetzung mit Antikörpern mit anschließender Aggregatbildung), Capping (Sammlung an einem Zellpol) und Endozytose oder Abstoßung der Caps (Shedding) [Siegel BV, 1985].

Das Immunsystem wird von Tumoren durch so genannte blockierende Faktoren inhibiert. Bei diesen Faktoren handelt es sich wahrscheinlich um Antigen-Antikörperkomplexe, wobei das Antigen vermutlich von Tumorzellen stammt und

durch Shedding abgestoßen wurde [Alexandroff AB, 2000; Chambers CA, 2001; Fenton RG, 1997].

Lymphozyten aus tumortragenden Mäusen waren *in vitro* in der Lage, den Tumor abzutöten. Durch hinzufügen von Serum der tumortragenden Mäuse zum Testansatz kam der Abtötungsprozess völlig zum Stillstand.

Tumorzellen wird in einigen Veröffentlichungen die Fähigkeit zugesprochen ihre MHC-I-Moleküle herabzuregulieren [Costello RT, 1999; Gilboa E, 2001]. Dies führt zu einer verminderten Präsentation von Tumorantigenen z.B. durch TAP- oder Proteasom-Verminderung [Ferrone S, 1995; Seliger B, 1997].

Tumore sind in der Lage, durch Sekretion von Mediatoren (z.B. IL10, TGF- β) die Lymphozytenproliferation zu hemmen oder regulatorische T-Zellen zu induzieren [Gabrilovich DI, 1996; Tada T, 1991; Elgert KD, 1998; Salazar-Onfray F, 1999]. Regulatorische T-Zellen blockieren ihrerseits Effektor-T-Zellen direkt durch Zell-Zell-Kontakt, über suppressive Zytokine oder durch Induktion des Tryptophan abbauenden Enzyms IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase) [Mellor AL, 2004]. Die Effektor-Zellen selbst können durch ein fehlerhaftes T-Zell-Rezeptor-Repertoire oder anti-ideotypische Suppression zum Tumor-Escape beitragen.

1.2.3 Tumor-Immuntherapie

Die heutigen therapeutischen Möglichkeiten bestehen in der Regel aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Diese Therapien sind häufig nicht ausreichend und stellen eine große Belastung für den Patienten dar.

Deshalb sind im Kampf gegen Krebs immunologische Verfahren immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Jedoch scheinen die Patienten keine effiziente Immunantwort gegen die Tumore aufzubauen. Mögliche Gründe hierfür können sein: das Fehlen stark immunogener Neoantigene, eine Vielzahl von immunsuppressiven Mechanismen und die zuvor angeführten Escape-Mechanismen. Um die Immunabwehr zu beeinflussen, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten eine Vielzahl von immuntherapeutischen Strategien in der Behandlung maligner Erkrankungen klinisch angewendet. Zu erwähnen sind Therapien mit Zytokinen, Vakzinierungsmodelle mit definierten und undefinierten Antigenen, Antikörpertherapien oder auch die Gentherapie. Die größten Hoffnungen ruhen heute auf spezifischen Immuntherapieverfahren. Diese sollen in der

Lage sein, die Immuntoleranz von Tumoren zu durchbrechen und eine dauerhafte effiziente Immunantwort zu induzieren.

Vakzinierungsstrategien

Trotz Erkennung des Tumors durch T-Lymphozyten kommt es oft nicht zu einer immunologischen Reaktion, da kostimulatorische Faktoren fehlen. Um dieses Problem zu lösen nutzt man die Fähigkeit professioneller APZ, vor allem die DZ. Es wurden verschiedene Strategien entwickelt, tumorspezifische Antigene in DZ zu schleusen, um ZTL zu generieren, die sich gegen den Tumor richten. Obwohl es sich bei den Tumorantigenen um eine sehr schlecht fassbare Gruppe handelt, wurden einige sehr gut definierte Antigene in klinischen Versuchen zur Vakzinierung mit DZ verwendet [Brossart P, 1997; Rosenberg SA, 2001; Timmerman JM, 1999].

In einem Review über 1306 Behandlungen mit Vakzinen konnte eine Gesamtrate an tumorschädlichen Reaktionen von 3,3% dokumentiert werden [Rosenberg SA, 2004]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit die Tumorthherapie mit Vakzinen zu verbessern und alternative immunotherapeutische Anti-Tumor-Strategien zu entwickeln. Im Moment werden mehrere Alternativen der Behandlung von DZ mit Tumorantigenen untersucht. Zum einen die in vitro Beladung mit Tumorantigenen in Form von intakten Proteinen, MHC-I restringierte Peptidfragmente oder lysierten Tumorzellen [Progador A, 1995; Zitvogel L, 1996; Paglia P, 1996; Fields RC, 1998]. Zum anderen die retrovirale oder adenovirale Transfektion von Vektoren mit Tumorgensequenzen, welche für Tumorantigene codieren, in die DZ [Song W, 1997; Specht JM, 1997]. Eine weitere Möglichkeit ist die Transfektion von Tumor RNA in DZ, was ebenfalls zu einer Antigenpräsentation führen kann [Boczkowski D, 1996]. Diese meist tierexperimentellen Untersuchungen bilden die Grundlage für erste humane Vakzinierungsversuche z. B. an B-Zelllymphomen [Hsu FJ, 1996].

Die viel versprechendsten Ergebnisse konnten mit DZ-Tumorzell-Fusionen gewonnen werden, welche theoretisch alle Tumorantigene zugleich präsentieren und alle funktionalen Vorteile von DZ beibehalten [Rosenberg SA, 2001; Boon T, 1997; Gilboa E, 1998]. Darüber hinaus haben Studien in diversen Tier-Tumor-Modellen gezeigt, dass Hybridvakzinierung mit Hybriden oder adoptiver Transfer von Hybrid geprimten Lymphozyten, eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort gegenüber wenig immunogenen Tumoren hervorrufen können [Kawada M, 2003; Savai R, 2006; Wang J, 1998]. Auch bei Untersuchungen von humanen DZ-Tumor-Hybriden in vitro und in klinischen Stu-

dien waren die Ergebnisse sehr viel versprechend. Um einen maximalen und optimalen Anti-Tumor-Effekt zu erzielen bedürfen die Therapieansätze einer weitere Verbesserung. Es konnte belegt werden, dass die T-Zellaktivierung für den Antitumoreffekt der Hybridvakzinierung und den Effekt einer Therapie mit Hybrid geprimten adoptiven T-Lymphozyten verantwortlich ist [Galea-Lauri J, 2003; Sloan AE, 2003; Marten A, 2003; Trefzer U, 2000; Trefzer U, 2004].

Adoptive Therapiemaßnahmen stellen ebenfalls einen viel versprechenden Ansatz für neue Therapieverfahren dar. Dabei handelt es sich um die Möglichkeit einer zielgerichteten, immunologischen Therapie, mit der durch Aktivierung und Expansion von speziell gegen den Tumor gerichteten T-Zellen eine immunologische Anti-Tumor- Reaktion generiert werden soll.

Bisher handelte es sich beim adoptiven Transfer von gegenüber dem Tumor geprimten T-Zellen entweder um so genannte Lymphokin-Aktivierte T-Lymphozyten (LAK) oder um Tumor-Infiltrierende T-Lymphozyten (TIL). LAK werden aus dem Blut gewonnen, extrakorporal mit Hilfe von IL2 aktiviert und wieder dem Immunsystem zu geführt. Die Aktivierung dieser Lymphozyten hält allerdings nicht lange an und ist weder klonal noch sehr spezifisch. Eine gleichzeitige supportive Therapie mit IL2 kann diesen Effekt verstärken [Bordignon C, 1999]. Bei TIL handelt es sich um Tumor infiltrierende T-Lymphozyten, die häufig in Tumorbiopsien und Tumornahen Lymphknoten zu finden sind. Diese können ex vivo ebenfalls mit IL2 aktiviert und zur Therapie eingesetzt werden [Topalian SL, 1989; Lewko WM, 2000; Aebersold P, 1991; Rosenberg SA, 1994; Yannelli JR, 1996; Bordignon C, 1999]. Zur Expansion der T-Zellen werden so genannte Bioreaktoren verwendet [Knazek RA, 1990; Malone CC, 2001]. Beide Verfahren scheitern häufig an zu geringem Vorhandensein von Lymphozyten oder Tumorbiopsien. Sie sind aufwendig und schwer realisierbar.

1.3 Der Lewis-Lungen-Tumor (LLC1)

Das LLC1-Karzinom wurde erstmals 1951 von Margaret R. Lewis aus einem spontan entstandenen, epitheliale Lungentumor isoliert. Es ist ein in vielen Versuchen erprobter Modelltumor, von schneller Wachstumstendenz und mit geringem, immunogenem Potential. 1994 beschrieben Mandelboim et. al. isolierte Tumorantigene des LLC1 Tumors. Bei diesem tumorspezifischen Antigen, dem so genannten „Lewis- Lung-Carcinoma-(3LL)-specific Peptide“, handelt es sich um ein dem Connexin 37 ähnliches

Protein. Synthetisch hergestellte Octamäre, die entsprechend der Gensequenz geschaffen wurden, zeigten bei Transfektion an „leere“ H-2k^b die Fähigkeit, in vitro zytotoxische ZTL zu induzieren [Mandelboim O, 1994].

Connexine als Bestandteile des Zytoskeletts sind an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt. Sie sind für second Messenger permeabel, weswegen ihnen während der Entwicklung eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Darüber hinaus sind sie bei der onkogenetischen Transformation und bei der Regulation des Zellwachstums von Bedeutung [Beyer EC, 1990; Kanno Y, 1995; Savai R (A), 2005].

2 Fragestellung

Seit ihrer Entdeckung genießen DZ immer größere Bedeutung in der Erforschung von möglichen immunologischen Therapiestrategien. Das Zusammenspiel von T-Zellen und DZ, sowie die Funktion von durch DZ aktivierten T-Zellen, stehen im Zentrum dieser Arbeit. Darüber hinaus wird die Effizienz einer Kombinationstherapie aus Vakzinierung und dem adoptiven Transfer von Hybrid geprimten T-Zellen dargestellt.

Der LLC1-Tumor als etablierter muriner Tumor, mit bekanntem Tumorantigen („mutated connexin 37“) war das therapeutische Ziel unserer Studie. Mandelboim et. al. konnten eine Immunogenität des Tumorantigens *in vitro* nachweisen.

Es sollte getestet werden, in wie weit es möglich ist, durch die Immunisierung oder Vakzinierung mit Fusionszellen aus autologen DZ und LLC1-Zellen, eine Immunität gegenüber dem Tumor *in vivo* hervorzurufen. Weiterhin sollte es gelingen, zytotoxische T-Lymphozyten sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zu induzieren. Diese sollten dann für einen adoptiven, tumortheraeutischen Einsatz zur Verfügung stehen. Die Proliferations- und Zytotoxizitätseigenschaften dieser Zellen sollten *in vitro* in Kulturansätzen näher analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist eine Klassifikation und Charakterisierung der einzelnen Zellsubpopulationen, die an der Reaktion des Immunsystems beteiligt sind und der von ihnen produzierten Zytokine. In den RT-PCR- und Microarray-Untersuchungen wurden die Veränderungen der Genexpressionen im Verlauf der Experimente gemessen.

Um genaueren Aufschluss über das Zusammenwirken von therapeutisch gegebenen Zellen und Immunsystem zu erlangen, wurden in immunhistologischen Präparaten die Lokalisation, der Typ und die Verteilung der unterschiedlichen Zellen in den tumorinfiltrierten Geweben und in den Bestandteilen des Immunsystems beobachtet. Ein zusätzlicher Fokus lag auf der Charakterisierung, der durch mit Tumor-Antigenen geprimten ZTL, vermittelten Zytotoxizität.

Schließlich sollten in vergleichenden Untersuchungen des Wachstumsverhaltens die unterschiedlichen Vakzinierungsmethoden verglichen werden. Die Untersuchung der Sterblichkeit der hybridimmunisierten Mäuse, bzw. der adoptiv therapierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollgruppen war von großer Bedeutung.

3 Material

3.1 Medien und Puffer

Zellkulturmedien

Für die LLC1-Zelllinie und für die Kultur murinen Knochenmarks und muriner Milzzellen wurde RPMI-1640 Medium (PAN Biotech GmbH, Deutschland) unter Zusatz von 2% fetalem Kälberserum (FCS) (Greiner bio one, Deutschland), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (0.1 mg/ml) (Gibco, Deutschland) verwendet.

Für die B16/F10-Melanom-Zelllinie wurde DMEM/F12-Medium (Gibco, Deutschland) unter Zusatz von 10% FCS, Penicillin und Streptomycin verwendet.

Puffer zur Lyse von Erythrozyten

Die fertige „BD Pharm Lyse“ Pufferlösung wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt und zur Lyse von Erythrozyten verwendet.

Einfriermedium

Als Einfriermedium dienten die o.g. Kulturmedien unter Zusatz von 10% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deutschland).

Puffer

Als Puffer fand PBS (PAA Laboratories GmbH, Österreich) Saline Lösung, PH 7,4 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} Verwendung.

Radioaktive Reagenzien

Für Proliferationstests wurde 3H-markiertes Thymidin (3H-TdR), Stocklösung 777 MBq/ml (Amersham Buchler, Braunschweig) 1:20 in RPMI 1640 verdünnt und mit 20 μl pro Vertiefung der Mikrotiterplatte (0,037 MBq) eingesetzt.

Propideumjodid

Nur die Zellmembranen toter Zellen sind für Propideum Jodid durchlässig, so war es möglich, tote von intakten Zellen zu unterscheiden. Es wurde in einer Konzentration von 0,2 µg/ml verwendet.

Trypsin-Lösung

Für die Zellkultur von LLC1- und B16/F10-Tumorzellen war es für den Mediumwechsel nötig, die adherent wachsenden Zellen mittels EDTA-Trypsin-Lösung vom Flaschenboden zu lösen. Verwendet wurden Trypsin-Lösung 10x, welche mit PBS auf eine einfache Konzentration verdünnt wurde.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
96 Well Rundboden und V-Form-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Deutschland
10, 20 und 50ml Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Deutschland
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Pipettenaufsätze	Eppendorf, Deutschland
Pasteur Pipetten	Wu Mainz, Deutschland
Pipettboy	IBS (Integra Biosciences), Schweiz
Pipetten für Pipettboy	Falcon, Becton Dickinson, GmbH Deutschland
Multipette	Eppendorf, Deutschland
Combitips	Eppendorf, Deutschland
15 und 50ml Tubes	Greiner Bio-One, Deutschland
Heparin Kanülen	Becton Dickinson GmbH Deutschland
Heparin Spritze	Braun Melsungen AG, Deutschland
Messröhrchen für Durchflusszytometer	Sarstedt, Deutschland
Elektroporationscuvette	Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland

Produkt	Hersteller
Iopromide 300, 300 mg Jod/ml,	Schering, Deutschland
Dako Mounting Medium	Dako Cytomation Carpinteria, USA
Röntgenfilm	Amersham, UK
Chloroform	Fluka, Sigma Aldrich, Deutschland
Isopropanol	Fluka, Sigma Aldrich, Deutschland

3.3 Reagenzien, Zytokine und Antibiotika

Tabelle 3: Reagenzien, Zytokine und Antibiotika

Produkt	Hersteller
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Schweden
BD Pharm Lyse	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
GMCSF	Pepto Tech EC ltd. England
FLT-3	Pepto Tech EC ltd. England
IL4	Strathmann Biotech AG, Deutschland
LPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Dapi Blue	Linaris Biologische Produkte, Deutschland
Vectorshield	Linaris Biologische Produkte, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	PFA, Merk, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Heparin	Ratiopharm, Deutschland
Ketamin	Ketavet®; Pharmacia & Upjohn, Deutschland
Xylazine	Rompun®; Bayer, Deutschland

3.4 Molekularbiologische Reagenzien

Tabelle 4: Molekularbiologische Reagenzien

Produkt	Hersteller
Microarray Kit	-GE Array non-radioactive Ampo Labeling-LPR Kit (Super Array Bioscience Corp., Frederick, MD) -GE Array Q series mouse common cytokine gene microarray (Super Array Bioscience, cat # MM-003) -Software: GE Array Analyzer 1.2 (Super Array Bioscience Corp., Frederick, MD)
ZR Whole Blood Total RNA Kit	Zymo research Corp., USA
ImProm-II™ Reverse Transcription System mit oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primern	Promega Corporation, USA
GEA Primermix	Super Array Bioscience Corp., Frederick, USA
GEAprehyb Solution	Super Array Bioscience Corp., Frederick, USA
GEAhyb Hybridization Solution	Super Array Bioscience Corp., Frederick, USA
T-Zell Säulen	R&D Systems, USA
Lachssperma-DNA	Super Array Bioscience Corp., Frederick, USA
TRIZol	Invitrogen, Deutschland
Biotin-16-dUTP	Roche, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Mag collect Mouse CD3+ T-Zell Isolationskit	R&D Systems, USA
Chemilumineszenz Bestimmungskit	Amersham ECL Detection Kit, UK
Taq Polymerase	Promega, Deutschland
“loading“ Puffer mit Bromophenol Blue	MBI Fermentas, Deutschland

Produkt	Hersteller
1kb DNA Ladder	Invitrogen, Deutschland
10kb DNA Ladder	Invitrogen, Deutschland
Gel Extraction Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAquick Säule	QIAGEN, Deutschland
Biotin-16-dUTP	Roche, Deutschland
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
DNasefreies Wasser	QIAGEN, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Deutschland

Zusammensetzung der Reverse-Transkriptions-Reagenz

ImProm-II™ 5X Reaktionspuffer	4,0µl
MgCl ₂ , 25mM	2,0µl
dNTP Mix, 10mM	1,0µl
RNasin® Ribonuklease Inhibitor	1,0µl
ImProm-II™ Reverse Transkriptase	1,0µl
Nukleasefreies Wasser	6,0µl
Endvolumen	15,0µl

Real-time-PCR-Reagenz

Nukleasefreies Wasser	16,0µl
2x-Invitrogen Super Mix-Puffer	25,0µl
ROX Referenz Färbung 50x	1,0µl
MgCl ₂ , 50mM	2,0µl
Forward Primer, 10µM	1,0µl
Reverse Primer, 10µM	1,0µl
Volumen das der RT Reaktion hinzugefügt wird	1-3µl
PCR-Endvolumen	50,0µl

Zusammensetzung der Lösung zur Chemilumineszenz-Bestimmung

Für	4 Arrays	6 Arrays
Puffer L	72 µl	108 µl
Puffer AF (BLUE Röhrchen)	36 µl	54 µl
Biotin-16-dUTP (Roche 1-093-070)	8 µl	12 µl
DNA Polymerase (LE)	4 µl	6 µl
Endvolumen	120µl	180 µl

3.5 Antikörper und Färbungen

Tabelle 5: Antikörper und Färbungen

Produkt	Hersteller	Aufgabe
MHC Klasse II PE	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	B-Lymphozyten, Makrophagen und dendriti- sche Zellen.
IgG1 FITC	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	Zur Kontrolle irregulärer Antikörper
IgG2b PE	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	Zur Kontrolle irregulärer Antikörper
B7-1 PE (CD80)	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	Kostimulatorisches Molekül auf dendritischen Zellen
CD13/33 PE	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	Marker für myeloische Leukämie zur Färbung der Standardzellen.
PKH-26	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Rot fluoreszierender Zell- membranmarker
PKH-67	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Grün fluoreszierender Zellmembranmarker
CD3 FITC	PharMingen, USA	Marker für T-Lymphozyten
Polyklonale Ha- sen/Anti-Maus CD3 Antikörper	1:100; Calbiochem, Notting- ham, UK	Marker für T-Lymphozyten

Produkt	Hersteller	Aufgabe
Alexa Fluor [®] 488-markierten Ziegen Anti-Hasen IgG	Molecular Probes, Invitrogene, Deutschland	Zur Markierung der Hasen Antikörper
TUNEL Labeling-KIT	Roche, Mannheim, Germany	<i>in situ</i> "cell detection kit"
Hämatoxylin & Eosin (H&E)	Sigma, Deutschland	Färbung histologischer Schnitte
CD4 FITC	Pharmingen, Germany	CD4+ T-Zellen
CD8 FITC	Pharmingen, Germany	CD8+ T-zellen
CD16/CD32 FITC	Pharmingen, Germany	Zellen des Monozyten Makrophagen Systems
NK1.1 FITC	Pharmingen, Germany	Natural-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)
CD 11c PE	Pharmingen, Germany	Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen

3.6 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Produkt	Hersteller
Zytozentrifuge	Thermo- Cytospinn, USA
Mikrozentrifuge	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge	Heraus Instruments, USA
Durchflusszytometer	Beckmann und Coulter, Deutschland
Bench	Heraeus Instruments, USA
Brutschrank	Heraeus Instruments, USA
Elektroporationsgerät	Bio Rad, Hercules, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica Instruments, Deutschland

Produkt	Hersteller
Bestrahlungsgerät	OB 29; STS, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica Instruments, Deutschland
“Flat-panel volumetric computed tomography (FpvCT)”	GE Global Research, USA
Oberflächenscanner	TRACE 96, Berchthold Deutschland
Vortex	Heidolph, Deutschland
Microarray Ofen	Biometra System, Deutschland
BioRad, GelDoc-Imaging System	BioRad Laboratory Inc., USA
UV-Transilluminator	Biometra System, Deutschland
T3 Thermocycler	BioRad, Deutschland
Polytron Homogenisators	Roth, Deutschland
Spektrometer	TECAN, Deutschland
GelDoc-Imaging System	BioRad Laboratory Inc., USA

3.7 Primer

Aus der in Frage kommenden Genbanksequenz sind folgende Primersets zum Einsatz gekommen (+ sense; - antisense):

Tabelle 7: Primer für semiquantitative RT-PCR

Gen	Bestell Nr.	Primer	Größe
FASL	NM_010177	+ 5' - TCA GTT TTT CCC TGT CCA TCT T -3' - 5' - GGT GGA AGA GCT GAT ACA TTC C -3'	232
FAS	NM_007987	+ 5' - AAA GTG CTG GAA AAG GAG ACA G -3' - 5' - TCT TGC CCT CCT TGA TGT TAT T -3'	176
GZMB	NM_013542	+ 5' - TCG ACC CTA CAT GGC CTT AC -3' - 5' - TGG GGA ATG CAT TTT ACC AT -3'	198
PRF1	NM_011073	+ 5' - CAC CTC TTT CCA CCA GAC CTA C -3' - 5' - TAA TGG CTG ATA GCC TGT CTC A -3'	234
Casp 8	NM_009812	+ 5' - TTC CTA CCG AGA TCC TGT GAA T -3' - 5' - AGC TTC TTC CGT AGT GTG AAG G -3'	192
Casp 3	NM_009810	+ 5' - GGG CCT GTT GAA CTG AAA AA -3' - 5' - CCG TCC TTT GAA TTT CTC CA -3'	242
ICOSL	NM_015790.2	+ 5' - ACA AAG AAC CCA CAG GAA AC -3' - 5' - ACA GCC CAT AAG CAG ACA G -3'	299
INF γ	NM_008337.1	+ 5' - AGA CAA TGA ACG CTA CAC AC -3' - 5' - TCT TTT CTT CCA CAT CTA TGC C -3'	147
INF α -4	NM_010504	+ 5' - GCC TGT GTG ATG CAG GAA - 3', - 5' - TGC CAG CAA GTT GGT TGA G - 3',	174
INF α -2	X01969	+5' - TGA GCT ACT GGT CAA TCT GTT CTC - 3', - 5' - TTT GTC TCA CAC TCA CTC CTT CTC - 3',	554
INF α -11	NM_008333	+ 5' - AAG GTC CTG GCA CAA ATG Ag - 3', - 5' - CAT TCC AAG CAG CAG ATG AAG - 3',	190
IL-2	NM_001530)	+ 5' - TCC TCA CAG TGA CCT CAA GTC C - 3', - 5' - TGA CAG AAG GCT ATC CAT CTC C - 3',	512
IL4	NM_021283.1	+ 5' - ACG GAT GCG ACA AAA ATC AC -3' - 5' - ACC TTG GAA GCC CTA CAG AC -3'	154
IL5	NM_010558.1	+ 5' - CAC ATA CCC AAC CTT AGC ATC -3' - 5' - AGT CAA CCT TCT CTC TCC CC -3'	209

IL-7	NM_008371	+ 5' - ATC CTT GTT CTG CTG CCT GT - 3', - 5' - CCA GTG TTT GTG TGC CTT GT - 3',	295
IL10	NM_010548.1	+ 5' - GAC AAC ATA CTG CTA ACC GAC -3' - 5' - ATC ACT CTT CAC CTG CTC C -3'	252
IL12b	NM_008352.1	+ 5' - CAC TCC CCA TTC CTA CTT CTC -3' - 5' - CCA CTT TTC TTT CCT TTC CAA C -3'	259
IL-13	NM_008355	+ 5' - AGA CCA GAC TCC CCT GTG CA - 3', - 5' - TGG GTC CTG TAG ATG GCA TTG - 3',	322
CD28	NM_007642.2	+ 5' - TCT TCC TCT CTC CCT CTC TC -3' - 5' - CAA TCT CGT TAT ATC TGT CCC C -3'	251
TNFSF13b	NM_033622.1	+ 5' - GAC ACA GAT GAC AGG AAA TGA C -3' - 5' - AGC AAA AAC AGA GGC ACG G -3'	127
TNFRSF13c	NM_028075.1	+ 5' - TAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC -3' - 5' - ACT CAT TTA CCT GCC TGC C -3'	136
TNFSF14	NM_019418.1	+ 5' - TCC AGC CAC CAA AAC AGC AC -3' - 5' - TTC CCT TCT TTC CTC CCT TTC C -3'	182
GAPDH	NM_001001303	+ 5' - GCA GTG GCA AAG TGG AGA TT -3' - 5' - ACA GTC TTC TGG GTG GCA GT -3'	493
β-Actin	M12481	+ 5' - TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA - 3' - 5' - AGG AAG GCT GGA AAA GAG C - 3'.	573

3.8 Tiere

Es wurden weibliche C57/BL6 (H-2^b)- und BALB/C (H-2^d)-Mäuse im Alter von 3-5 Wochen verwendet. Diese Mäuse wurden von Charles Rivers, Sulzfeld, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die Haltung erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen und nach den Richtlinien für Tierexperimente der Europäischen Gemeinschaft.

3.9 Tumorzelllinien

Die LLC1-Zelllinie der C57/Bl6 (H-2b)-Mäuse bezogen wir aus der „American Type Culture Collection“ (ATCC, Manassas, VA, USA). Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 2% FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0.1 mg/ml) bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Die B16/F10 Melanom Zelllinie ist ebenfalls eine Tumorzelllinie der C57/BL6 (H-2b)-Maus aus der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Diese wurden in DMEM/F12-Medium unter Zusatz von 10% FCS, Penicillin und Streptomycin, bei 37°C in feuchter Atmosphäre bei 5% CO₂ kultiviert.

4 Methoden

4.1 Zellkulturarbeiten

4.1.1 Trypsinieren

Nach abpipettieren des Überstandes aus den Kulturflaschen wurden die adherenten Zellen mit 6 ml Trypsin überschichtet und zum Inkubieren in den Brutschrank gestellt. Die Inkubationszeit bei LLC1-Zellen betrug ca. 1 Min., bei B16/F10-Zellen etwa 2-5 Min.. Die Zellen wurden mit der Pipette abgespült, abpipettiert und mit 10 ml Waschmedium nachgespült. Die Suspension wurde mit 2 ml FCS in 50 ml Röhren gegeben, bei 1600 Umdrehungen pro Min. (UpM) für 8 Min. zentrifugiert. Um eine saubere Zellsuspension zu erhalten, wurde die Suspension gewaschen.

4.1.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in etwa $10\text{-}50 \times 10^6$ Zellen große Portionen aufgeteilt und in einem Volumen von 500 μ l Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium setzte sich zusammen aus 10% DMSO, 10% FCS und 80% Kulturmedium. Zum Zeitpunkt des Aufnehmens betrug die Temperatur etwa 0°C. Dies wurde durch Lagerung des Einfriermediums auf Eis erreicht. Die Zellsuspension wurde nun in einer Kühlkette von einer Stunde bei -20°C, 24 Stunden bei -80°C und anschließend -120°C tiefgefroren. Die Zellen verblieben entweder bei -120°C in der Tiefkühltruhe oder wurden in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen erfolgte möglichst schnell, mittels schwenken in 37°C warmen Wasser, sofortiger Zentrifugation und erneutem Waschen in RPMI Kulturmedium mit 5% FCS. Die Tumorzellen wurden erst nach einem Generationswechsel ihrer Funktion zugeführt.

4.1.3 Isolieren mononukleärer Zellen

Das Isolieren von mononukleären Zellen aus Blut bzw. Milz- und Lymphknoten-Zelllösungen oder zur Entfernung von toten Zellen und Zelldetritus, wurde mittels Ficoll Dichtegradient, mit einer Dichte von 1,077g/ml durchgeführt. Hierzu wurden 20ml Zellsuspension vorsichtig über 20ml Ficolllösung geschichtet und anschließend

25 Min. bei 2400 UpM zentrifugiert. Zwischen Ficoll und wässriger Lösung bildet sich nach der Zentrifugation ein sogenannter „Buffy Coat“. Dies ist ein Ring aus mononukleären Zellen, die sich auf Grund ihrer Dichte an der Grenzschicht beider wässriger Phasen sammeln. Alle übrigen Zellen kamen als Palett am Boden des Röhrchens zu liegen. Der Buffy Coat wurde mit Hilfe einer Pipette entnommen und mit Waschpuffer zwei mal gewaschen.

4.1.4 Isolieren von CD3+ T-Zellen

Eine Isolation der CD3+-T-Zellen wurde mit dem „Mag Collect“-T-Zell-Isolationskit durchgeführt. Hierzu wurde ein Ficolle einer Zellsuspension durchgeführt, um eine Lösung aus mononukleären Zellen zu erhalten. Diese wurden in 1x Mag collect Puffer aufgenommen und auf eine Zellzahl von 20×10^7 eingestellt. Der Zelllösung wurden 200µl „Mag Collect“ Maus T-Zellantikörper hinzugegeben, die gegen alle nicht-CD3+-Zellen gerichtet waren. Diese Lösung inkubierte für 15 Min. bei 5-8°C. Im nächsten Schritt wurden 200 µl des Mag Collect Streptavidin Ferrofluid hinzugegeben, welches an die antikörpermarkierten Zellen band und abermals 15 Min. inkubierte. Mit Hilfe eines magnetischen Feldes wurden nun die markierten Zellen, die sich dem Feld folgend ablagerten, herausgefiltert. Dies geschah, indem der Überstand mit den verbleibenden CD3+-T-Zellen abpipettiert wurde und die zurückbleibenden Zellen verworfen wurden. Dieser Vorgang konnte bei Bedarf wiederholt werden. Zur Gewährleistung der Reinheit der CD3+-T-Zellen, wurde sie mit Hilfe von FITC markierten CD3-Oberflächenmarkern zytometrisch überwacht. Die Säulen zeigten routinemäßig über 90% Reinheit an T-Zellen.

4.1.5 Erzeugung von dendritischen Zellen aus Knochenmarkzellen

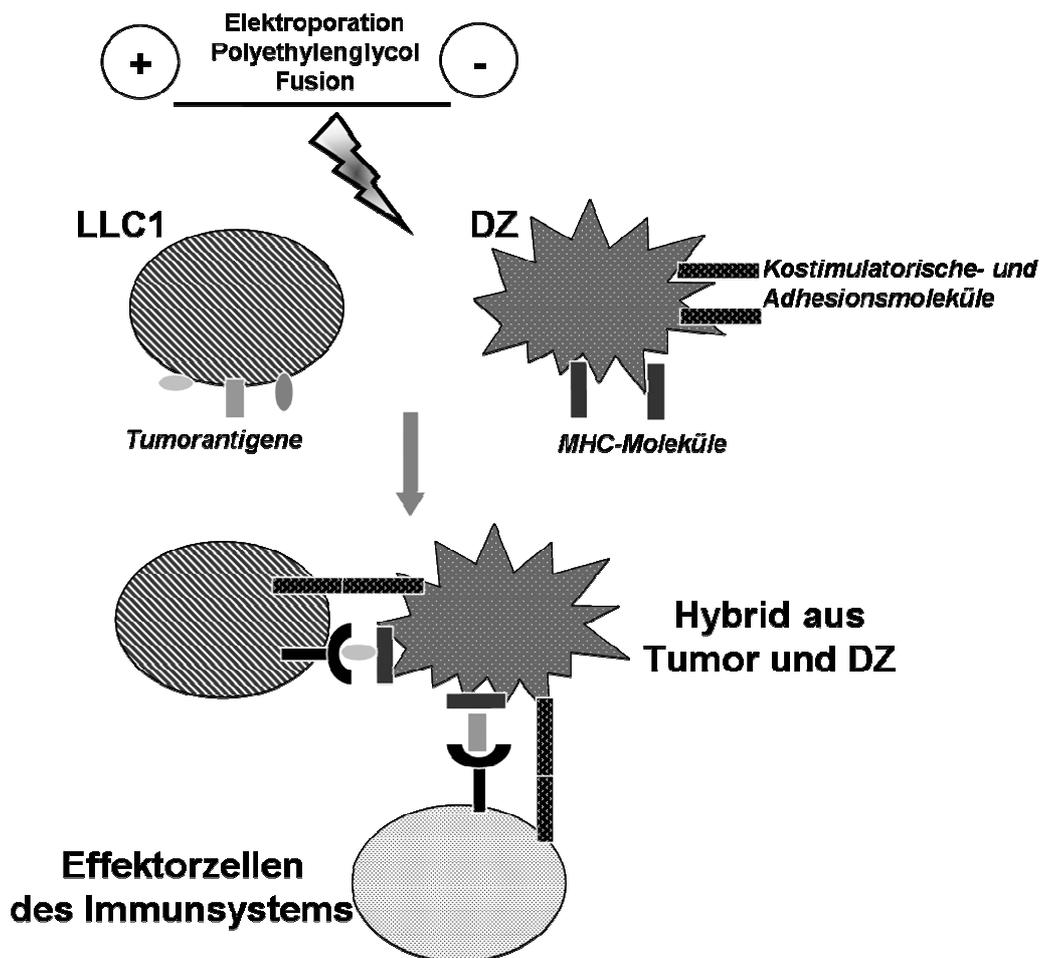
Durch Spülen des Femur und der Tibia wurden Knochenmarkszellen von C57/BL6-Mäusen gewonnen. Zur Elimination von störenden Erythrozyten wurden die Zelllösungen in 2ml vorbereiteter Erylyse-Lösung aufgenommen, 2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert. Bei Bedarf wurde der Vorgang wiederholt. Abschließend wurde die gereinigte Lösung noch zweimal mit PBS gewaschen und in RPMI-1640 Medium aufgenommen. Als Wachstumsfaktoren dienten 1000 U/ml GMCSF bzw. IL-4 und 100 µg/ml FLT3.

Am sechsten Tag wurden die lose adhärenen Zellen abgenommen, indem zuerst der Überstand verworfen und danach vorsichtig mit einer 10ml Pipette mehrmals abgespült wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die erneute Aufnahme in RPMI-1640 Medium, mit den oben genannten Wachstumsfaktoren und 10µg/ml LPS. Am zehnten Tag wurden erneut die lose adhärenen Zellen abgenommen und durch eine Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation aufgereinigt. Um den DZ Phänotyp sicherzustellen, wurden die Zellen mit monoklonalen CD11c PE-Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

4.1.6 Herstellung von Hybriden

Das zur Fusion der gewonnenen DZ mit LLC1-Tumorzellen angewandte Verfahren basiert auf einer Kombination aus Polyethylenglycol und Elektroporation (Abb.1). Die DZ wurden mit PKH-26-G1 rot und die LLC1-Zellen mit PKH-67-G1 grün angefärbt. Zunächst erfolgte die Aufteilung der Zellen in Portionen a 5×10^6 Zellen und das Lösen in 500µl Diluent Lösung. Diese Zellsuspension wurde nun mit 500µl einer Lösung, bestehend aus 4µl/ml PKH-26 oder 16µl/ml PKH-67, in Diluent, gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Min. wurde 1 ml bovines Albumin hinzugefügt und abermals 1 Min. inkubiert. Dieser Vorgang erfolgte soweit möglich unter Lichtabschluss. Nach Hinzufügen von 2ml RPMI-1640 erfolgte die Zentrifugation der Mischung mit einer Beschleunigung von 400g für 10 Min., bei einer Temperatur von 25°C. Nach weiteren zwei Waschsritten waren die Zellen nun fertig zur Fusion. Die gefärbten Zellen wurden gewaschen und die LLC1 Zellen in einer Elektroporationscuvette mit 200V/cm für 200µs mit einem Elektroporationsgerät poriert. Die so behandelten LLC1-Zellen wurden mit den DZ im Verhältnis 2:1 gemischt. Es erfolgte das zentrifugieren des Zellgemisches und das Aufnehmen in 1 ml warmem Polyethylenglycol unter ständigem Rütteln und Verdünnen der Suspension über 3 Min. mit 7ml RPMI-1640 Medium ohne Zusätze und anschließendes Waschen. Für 24 Stunden inkubierten die nun fusionierten Hybridzellen (HZ) in Serum freiem RPMI-1640 bei 37°C im Brutschrank [Banat GA, 2004].

Abb. 1: Schematische Darstellung der Fusion



Die gewonnenen DZ werden mit Hilfe einer Kombination aus Elektroporation und Polyethylenglycol fusioniert. Es resultieren Hybride aus beiden Zelltypen, die mit Zellen des Immunsystems interagieren.

4.2 Immunhistochemische Arbeiten

4.2.1 Färben in Mikrotiterplatte

Die Zellen wurden mittels FITC- oder PE- kombinierter monoklonaler Antikörper gegen NK1.1, MHC Klasse II, B7-1 PE (CD80) und CD 11c PE gefärbt. Als Kontrollantikörper dienten Ig G1 FITC und Ig G2b PE. Zur Färbung wurden in jede Vertiefung der 96 Well Rundbodenplatte 2×10^5 zu färbende Zellen in 200µl saliner Lösung gegeben. Es erfolgte die Zentrifugation dieser Platten bei 1400 Umdrehungen für 4 Min., Abwerfen des Überstandes und Aufnehmen der Zellen in 50µl Färbelösung, bestehend aus einer 1:10 Mischung, aus antikörpermarkiertem Farbstoff und PBS. Diese Lösung wurde für 30 Min. im Kühlschrank bei 6°C inkubiert. Anschließend erfolgte das

Auffüllen der Vertiefungen mit 150µl PBS, Resuspendieren und erneutes Zentrifugieren. Nach Aufnahme in PBS war die Zellsuspension nun bereit sie im Durchflußzytometer zu messen.

4.2.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Nach 48 Stunden in Kultur wurde die Fusionsrate mittels Fluoreszenzmikroskopie geprüft. Vor der Fusion wurden die LLC1-Zellen grün und die DZ rot fluoreszierend angefärbt. Die Hybride zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop eine gelbe Fluoreszenz. Auffällig war eine mangelnde Anfärbung mit Propidiumjodid, so dass es sich bei 90% der verwendeten Zellen um lebende, funktionsfähige Hybride handelte.

4.3 Durchflusszytometrie

4.3.1 Standardzellen und deren Gebrauch

Bei den Standardzellen (SZ) handelte es sich um CD 13 positive K562-Zelllinien. Diese wurden mit anti-CD13/33 PE markiert und in PBS mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Jeder Messung wurden die SZ in bekannter Konzentration ($10^5/100 \mu\text{l}$) beigefügt. Der für die SZ eingesetzte Puffer bestand aus PBS mit 1% BSA. Zusätzlich färbten sich die SZ bei Zugabe von 0,2 µg/ml Propidiumjodid, da es sich um tote Zellen handelte.

4.3.2 Überwachung der Fusionsrate

Nach 48 Stunden in Kultur wurden die fusionierten Zellen in saliner PBS Lösung aufgenommen und die Konzentration auf 1×10^6 Zelle/ml eingestellt. Um die Rate an HZ herauszufinden, wurde die Suspension mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zell-Sorters (Fluoreszenz Activated Cell Sorting = FACS) gemessen. Da die DZ nur mit PKH-26 und die LLC1-Zellen nur mit PKH-67 angefärbt waren, stellte die Rate der doppelpositiv gefärbten Zellen ein verlässliches Maß der Fusionseffizienz dar. Zusätzlich wurden die Zellen auf ihre Anfärbbarkeit mit CD11c, B7.1 und MHC Klasse II-Moleküle hin untersucht.

4.4 Molekularbiologische Arbeiten

4.4.1 RNA-Isolation

RNA-Isolation aus Blut

Die RNA-Isolation aus Blut erfolgte mittels eines ZR Whole-Blood Total RNA-Kit. Hierzu wurden 200µl Blut mit 600µl ZR-RNA-Kit gemischt. Diese Mischung wurde in einem Probenröhrchen in eine Zytocentrifuge gegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei über 10000 UpM für 30-60 Sec.. Anschließend wurde der Durchfluss abgeworfen und in 400 µl RNA-Vorwasch-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und nun die Lösung in 400µl RNA Waschpuffer resuspendiert. Nach Abwerfen des Überstandes wurden 50µl RNasefreies Wasser direkt auf die Säulenmatrix gegeben. Die Säule wurde nun in ein RNasefreies Röhrchen gegeben und die RNA vorsichtig herausgelöst.

RNA-Isolation aus Milzzellen und Tumorgewebe

Für die PCR aus Milzzellen und subkutanem Tumorgewebe wurde RNA mit Hilfe von TRIzol Reagenz aus exponentiell wachsenden Zell- und Gewebeskulturen isoliert. 100mg Tumorgewebe wurde homogenisiert, unter Verwendung eines Polytron-Homogenisators, in 1ml TRIzol-Reagenz aufgenommen und für 10 Min. inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 200µl Chloroform zu den Proben hinzu gegeben. Nach kräftigem Schütteln von Hand für 15 Sec. wurde die Lösung für 20 Min. bei 20°C inkubiert und bei 12000 x g für 15 Min. bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase entfernt und die RNA mit Hilfe von 0,5ml Isopropanol pro 1ml TRIzol Reagenz ausgefällt. Die RNA wurde für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12000 x g für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene RNA Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol pro 1ml TRIzol Reagenz gewaschen und bei 7500 x g für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde luftgetrocknet, bis das verbliebene Ethanol verflogen war und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der Probe erfolgte bis zur Verwendung bei -70°C. Die Konzentration und Reinheit wurde spektroskopisch über die Absorption von 260nm und 280nm bestimmt. Zur Beurteilung der RNA Konzentration wurde folgende Formel verwendet: **RNA Konzentration= $A_{260} \times \text{Lösung} \times 40\mu\text{g/ml}$** . Zur Bestimmung der Reinheit wurde das

A_{260}/A_{280} Verhältnis bestimmt. Bei einem Verhältnis **von 1,7 bis 2** ist in unseren Experimenten von einer reinen RNA auszugehen.

4.4.2 cDNA Synthese

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurden mit Hilfe eines nicht-radioaktiven GE Array, Ampo Labeling-LPR-Kit, Biotin-16-dUTP markierte cDNA-Proben aus 5 µg RNA gewonnen. Komplementäre DNA wurde unter Verwendung der Improm II Reverse-Transcriptase-Reagenz aus RNA synthetisiert. Zwei µg der gesamten RNA wurden mit 0,5 µg Oligo(dT)₁₅-Primer in Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 5 µl pro Reverse-Transkriptions-(RT)-Reaktion eingestellt. Diese Mischung wurde bei 70°C für 5 Min. denaturiert, gefolgt von raschem Abkühlen. Nach einer Zentrifugation wurde die RT-Reagenz hinzugefügt und diese Mischung bei 25°C 5 Min. inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 42°C für 1 Stunde. Die cDNA-Proben wurden nach der Synthese entweder sofort für die PCR verwendet oder bei -20°C eingefroren.

4.4.3 Arbeiten mit Microarray-Technologie

Es wurden Mäusegruppen gebildet, die mit DZ-, LLC1-Zellen, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder nur mit PBS immunisiert wurden. Aus jeder Gruppe wurde einigen Mäusen Blut abgenommen und daraus RNA isoliert. Die RNA wurde verwendet um sie, mit Q-Serie Zytokin-Microgen-Array zu hybridisieren. Hierzu wurde die Arraymembran zuvor mit 5ml deionisiertem Wasser angefeuchtet. Die GEHyb Hybridisierung Solution wurde auf 60°C vorgewärmt. Nach Abwerfen des deionisierten Wassers wurden 2ml GEPrehyb Lösung hinzugefügt und die Lösung mit dem Vortex gemischt. Zur Herstellung des GEPrehyb wurde durch Hitze denaturierte Lachssperma-DNA, die für 5 Min. auf 100°C erhitzt und sofort auf Eis gekühlt wurde, zu vorgewärmter GEHyb Hybridisierungslösung gegeben und auf eine endgültige Konzentration von 100 µg/ml eingestellt. Es wurden 3ml GEPrehyb pro Arrayansatz verwendet. Die GEPrehyb Lösung wurde bis zum Gebrauch bei 60°C gehalten. Die Proben wurden nun, für die Prähybridisierung im Röhrchen, in einen Hybridisierungszylinder überführt und 2 Stunden bei 60°C und 5 UpM prähybridisiert. Dieser Vorgang konnte, wenn nötig, bis zu 72 Stunden fortgesetzt werden.

Um Lumineszenzsignale zu erhalten und auf Röntgenfilm festzuhalten, fand eine Hybridisierung der Membranen mit Biotin-16-dUTP statt. Hierzu wurde das gesamte

denaturierte cDNA Volumen für die AmpoLabeling-LPR-Methode in 0,75ml vorgewärmte GEHyb Lösung aufgenommen. Die GEHyb Lösung wurde aus dem Hybridisierungsröhrchen abgeworfen und die GEHyb Lösung, die die Probe enthielt, hinein gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht, bei 60°C und 5rpm Rotation im Microarray-Ofen statt.

Am nächsten Tag wurde die GEHyb Lösung aus den Hybridisierungsröhrchen in ein sauberes Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Die Membranen wurden zweimal mit 5ml Waschlösung bei 60°C und 30 UpM über einen Zeitraum von 15 Min. pro Probe zentrifugiert. Die auf 60°C vorgewärmte Waschlösung bestand aus 2 x SSC und 1% SDS (100ml 20 x SSC und 50ml 20% SDS pro Liter).

Chemilumineszenz-Bestimmung

Die Lumineszenz der Proben wurde mit einem Chemilumineszenz-Kit bestimmt. Dieser basiert auf der Fähigkeit des Moleküls Streptavidin mit dem Vitamin Biotin zu reagieren. Biotin war in diesem Experiment mit einem Sekundärantikörper versetzt. Anschließend wurde mit einer Saure-Phosphatase-Reagenz der Sekundärantikörper gebunden. Das Enzym Saure Phosphatase kann im nächsten Schritt sichtbar gemacht werden. Dafür wurde die Array zunächst geblockt. Hierzu wurde die Waschlösung des letzten Waschganges verworfen und sofort 2ml GEAblocking Lösung hinzu gegeben. Es folgten 40 Min. Inkubation bei 30 UpM Zentrifugation. Als nächstes fand die Bindung an mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppeltem Streptavidin statt. Um den Bindungspuffer zu erhalten, wurde 5 x Puffer F auf eine einfache Lösung verdünnt und anschließend AP 1:8000 in diesem 1 x Puffer F gelöst, um den Bindungspuffer zu erhalten. Anschließend wurde die GEAblocking Lösung Q aus dem Röhrchen verworfen. Es wurden 2ml Bindungspuffer hinzu gegeben und für 10 Min. bei 10 UpM Zentrifugation inkubiert. Die Membranen wurden viermal mit 4 ml 1 x Puffer F, für 5 Min. gewaschen und bei jedem Waschschrift vorsichtig gerüttelt. Nach erneutem Spülen mit 3ml Puffer G konnten die Proben für die Messung der Lumineszenz vorbereitet werden. Hierzu wurde 1,0ml CDP-Star Chemilumineszenz Substrat in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Nach 4 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Membranen auf ein Filterpapier transferiert („geblottet“). Die Membran wurde anschließend in einen Plastikschatz überführt. Alle Blasen wurden entfernt. Nach Durchlaufen des kompletten Versuchsprotokolls wurden Aufnahmen der Microarray Membranen mit Röntgenfilmen vorgenommen. Direkt nach Blotting der Membranen wurde mit der Aufnahme der Ergebnisse

begonnen. Das Resultat erreichte ca. 2 Stunden nach Plotting ein Maximum. Die Belichtungszeit betrug 2 Min. Alle Bilder wurden mit einem BioRad „GelDoc-Imaging System“ aufgenommen und digital als Abbildung in Graustufen (16 bit) im TIFF-Format gespeichert. Die erhaltenen Bilddaten wurden mit der GE Array Analyser 1.2 Software auf verschiedene Genexpressionen untersucht. Zur Kontrolle der unterschiedlichen Felder diente die Aktivität der Hybridisierungssignale der β -Aktin-Bande als Vergleichsmaßstab.

4.4.5 Polymerase Kettenreaktion

Um das Vorhandensein bestimmter Gene, entweder im tierischen Gewebe oder direkt in Zellen, zu untersuchen wurden PCR-Untersuchungen durchgeführt. Das PCR-Signal wurde mit Hilfe spezifischer Primer, die für Gensequenzen der Gendatenbank designed wurden verstärkt (siehe Tabelle). Für die Standard-PCR wurden 20-23 Basenpaare („base pairs“, bp) lange Primer verwendet. Der AT-und GC-Gehalt wurde überprüft und der Unterschied in der Schmelztemperatur zwischen Forward-und Reverse-Primern wurde bei nicht mehr als 2-4°C gehalten.

Die Primersequenz wurde anhand der „NCBI-BLAST“-Suche auf mögliche Übereinstimmung mit anderen Genen hin untersucht. Die PCR-Reaktion fand in dünnwandigen 0,2ml-Röhrchen in einem T3-Thermocycler statt. Als Negativkontrolle wurden die PCR ohne „templates“ durchgeführt, um ein „self-annealing“ des Primärpaares auszuschließen. Es wurde darüber hinaus auch eine PCR für cDNA ohne Reverse Transkriptase durchgeführt, um die Probe auf Verunreinigung mit DNA zu überprüfen. Die Primerpaare wurden, abhängig von der Schmelztemperatur (ST) des jeweiligen Primerpaares, mit mehreren Fixierungstemperaturen überprüft, um ein klares und spezifisches Band in der PCR zu erhalten.

4.4.6 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Semiquantitative RT-PCR wurde für die cDNA-Proben unter Verwendung von Taq Polymerase durchgeführt. Die Probenröhrchen wurden zum Vermischen vorsichtig geschüttelt und mikrozentrifugiert bevor sie in den PCR-„Thermal Cycler“ gegeben wurden.

Programm des „Thermal Cycler“

Aktivierung der Hotstar Taq	95 °C	2 Min.
Denaturierung	94 °C	30 Sec.
Annealing	variabel	30 Sec.
Extension	72 °C	45 Sec.
Endgültige Extension	72 °C	10 Min.
Zyklen		30-35

4.4.7 Agarose-Gelelektrophorese und PCR-Produktaufreinigung

Die PCR-Reaktionen wurden mit einem 1% Agarosegel in 1 x TAE Puffer analysiert, der 6µl/100ml Ethidiumbromid enthielt. Die Proben wurden mit 6 x "loading"-Puffer (mit Bromophenol Blue Färbung) vorbereitet. Das Gel wurde bei 80V für 60 Min. mit 1 x TAE Puffer einer Elektrophorese unterzogen. Abhängig von der Fragmentgröße wurde entweder „100bp-DNA-Ladder“ (1kb) oder „GeneRuler-DNA-Ladder“-Mix (10kb) verwendet. Die DNA-Banden wurden unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Für die semiquantitative Analyse der PCR Produkte wurden 10-20µl von jeder Reaktion für eine Elektrophorese verwendet. Die PCR Signale wurden durch Bestimmung der optischen Dichte x Bandfläche in „Arbitrary Units“ (A.U.) quantifiziert. Die PCR-Signale wurden wie die RT-Produkte auch mit Hilfe der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) oder β -Actin normalisiert, um eine semiquantitative Einschätzung der Genexpression zu bekommen.

Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung des „QIAGEN Gel Extraction Kit“ isoliert und die Proben wurden vorsichtig auf das Gel geladen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Banden herausgeschnitten und in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Es wurden 300µl QG Puffer jeweils für 100mg Gel hinzugefügt. Nun inkubierten die Schnitte in Puffer bei 50°C für mindestens 15 Min. Es wurden 100µl Isopropanol hinzugefügt. Die Mischung wurde in eine QIAquick-Säule gegeben, gefolgt von einer Zentrifugation für 1 Min. bei maximaler Geschwindigkeit. Es folgte erneutes Hinzufügen von 500µl QG-Puffer zur Säule und abermaliges zentrifugieren. Nach Zugabe von 700µl PE-Puffer (mit Ethanol) zur Säule erfolgte eine Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde die Säule in ein frisches 1,5ml „recovery“-Röhrchen gegeben und 30µl vorgewärmter EB Puffer direkt in das

Zentrum der Säule gegeben. Bei Raumtemperatur inkubierte die Säule nun für 10 Min. und wurde anschließend für 2 Min. bei 12000 UpM zentrifugiert. Jetzt wurde die Säule verworfen und die DNA entweder bei -20°C tiefgefroren und aufgehoben oder zum sequenzieren versendet.

4.4.8 RT-PCR

RT-PCR nach Immunisierung

Um die Ergebnisse aus den Microarray-Untersuchungen zu bestätigen, wurden semi-quantitative RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag hierbei auf IL-2, IL-7, IL-13, IFN α -2, IFN α -4, und IFN α -11. Hierfür wurde die gesamte RNA unter Verwendung eines ZR Whole Blood Total RNA-Kit aus dem Blut der Mäuse isoliert. Der erste cDNA-Strang wurde mit dem Im-Prom-II™ Reverse Transkriptase System synthetisiert. Hierzu fanden passende oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primer (siehe Tabelle 1) Verwendung. Als Folgeschritt wurden 4 μ l cDNA-Produkt, als Vorlage in einem PCR-Ansatz vervielfacht. Das Endprodukt durchlief eine Gelelektrophorese auf der Basis eines 2% Agarosegels. Die Messung erfolgte nach Ethidiumbromidfärbung. Das Expressionsniveau von β -Actin und GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

RT-PCR nach Kombinationstherapie

Zur Genexpressionsanalyse nach Kombinationstherapie wurde die analysierte RNA aus Tumorzellen und CD3+ Zellen isoliert.

Aus den Milzzellen wurden mit Hilfe von kommerziell hergestellten T-Zell-Säulen die CD3+-Zellen isoliert. Ihre CD3 Zugehörigkeit wurde durchflusszytometrisch überwacht. Aus diesen Zellen wurde, wie oben beschrieben, die RNA isoliert und das Expressionsprofil der T-Zellproliferations- und Apotosegene in semiquantitativen RT-PCR-Analysen bestimmt. Es wurde die m-RNA Expression von CD28, ICOL, IL12b, TNFSF13c, TNFSF14 untersucht.

Aus den Tumorzellen wurde, wie bereits ausgeführt, mittels TRIzol Lösung die RNA gewonnen und für eine RT-PCR verwendet. Bei den Tumorzellen wurden ZTL-assoziierte proapoptotische Gene wie z.B.: Perforin, Granzym B, FAS, FASL, Caspase 8 und 3 überwacht.

4.4.9 Immunhistochemische Färbung

Die subkutanen Tumore und das Milz- und Lungengewebe wurden zur histologischen Analyse mit Formalin fixiert und in Paraffin gebettet. Von diesen Präparaten wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt und mit H&E gefärbt.

Durch Färbung mit CD3-spezifischen Antikörpern wurde die T-Zellpräsenz in den Schnitten untersucht. Vorsichtig wurden 5µm dicke, aufeinander folgende, Gefrierschnitte für 10 Min. fixiert, mit eiskaltem Aceton und Methanol luftgetrocknet und mit PBS befeuchtet. Die Gewebe wurden mit 3% BSA/PBS für 30 Min. bei 37°C geblockt und mit polyklonalen Hasen-Anti-Maus CD3-Antikörpern für eine Stunde bei 37°C in PBS inkubiert. Zur indirekten Immunfluoreszenz wurden die Proben mit Alexa Fluor® 488-markierten Ziegen-Anti-Hasen IgG inkubiert. Daraufhin wurden alle Schnitte mit DAPI-Kernfärbung zur Auszählung angefärbt und mit Dako-Fluoreszenz-Mountingmedium versiegelt. Als Negativkontrolle wurde auf den ersten Antikörper verzichtet und die Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 20 x analysiert.

4.5 Funktionelle Zellkulturversuche

4.5.1 Proliferationstest

3H-Thymidin Einbau

Für den Proliferationstest war es nötig, Milz und Lymphknoten zu exzedieren, indem den getöteten Mäusen das Peritoneum eröffnet wurde. Die entnommenen Organe wurden daraufhin klein geschnitten und durch ein steriles Sieb gefiltert. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde einem Ficoll-Paque überschichtet. Mit Hilfe des Dichtegradienten war es so möglich, die Lymphozyten zu isolieren und Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen. Die so gewonnenen Lymphozyten wurden in 96-Well-Rundbodenplatten verteilt (1×10^5 Zellen pro Well). Bestrahlte LLC1-Zellen, syngene aufgereinigte HZ, DZ, eine Mischung von syngenem DZ und LLC1-Zellen, eine Mischung aus lysierten LLC1-Zellen und DZ oder Balb/C-Lymphozyten wurden jeweils als Stimulatorzellen in Triplicates hinzugegeben. Als Kontrolle dienen Stimulatorzellen und/oder Lymphozyten allein. Alle Wells wurden mit Nährmedium auf ein Volumen

von 200µl aufgefüllt. Die Zellen wurden am 3. und 5. Tag auf ihre Inkorporation von ³H-TdR hin untersucht. Hierzu wurden jedem Well der 96-Loch-Mikrotiterplatte 37kBq einer ³H-markierten Tymidinlösung hinzugefügt. Diese verblieben zur Inkubation für sechs Stunden bei 37°C und 6% CO₂ im Brutschrank, wurden anschließend mit einem Filter abgeschöpft und mit einem Oberflächenscanner die Emission der β-Strahlung gemessen. Das Resultat wurde als mittlere Anzahl an Ereignissen pro Minute (cpm) x 10³ ± Standardabweichung aus 3 Kulturansätzen bestimmt. Die Proliferationsaktivität wurde als **Proliferationsindex (Radioaktivität (cpm)) pro Testansatz, geteilt durch die Radioaktivität im Kontrollansatz**, welche nur Effektor-Zellen enthielt, ermittelt um vergleichbare Werte zu erhalten [Banat GA, 2004].

4.5.2 Zytotoxizitätstest

Im Zytotoxizitätstest wurden die wie unter 4.5.1 beschrieben isolierten Lymphozyten, mit bestrahlten LLC1-Zellen, syngenen gereinigten Hybriden, allogenen T- Lymphozyten (Balb/C) oder syngenen B16/F10 Tumorzellen als Target, in Kultur genommen. Als Standard wurde ein Effektor/Target-Verhältnis wurde 40:1 festgelegt. Die Zytotoxizität der jeweiligen Effektor-Zellen wurde mit Hilfe der Standardzellmethode bestimmt. Die Analyse der T-Lymphozyten-/Target-Kokulturen erfolgte nach 4, 12 und 16 Stunden jeweils in 96-Well V-Form-Platten mittels anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16/CD32- und anti-NK1.1 FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern (Pharmingen, Deutschland). Die T-Zellen wurden mit den genannten Antikörpern markiert und nach einer Inkubationszeit von 30 Min. mit Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Puffer resuspendiert und mit 100µl Standardzellsuspension versetzt. Um die Vitalität der Zellpopulationen nicht negativ zu beeinflussen, wurden die Proben zeitlich möglichst kurz darauf im Durchflusszytometer gemessen. Die absoluten Zellzahlen wurden aus der linearen Korrelation zwischen gefärbten T-Lymphozyten, ungefärbten Targetzellen und der absoluten Zahl an SZ pro Probe bestimmt. Die Prozentrate der Zytotoxizität wurde nach folgender Formel bestimmt: **Zytotoxizität (in %) = 1 - LLC1_a/SC_a X SC_b/LLC1_b X 100**. (LLC1_a: Propidiumjodid negative LLC1 Zellen in Effektor-/Target-co-Kultur; SC_a: Standardzellen in Effektor-/Target-co-Kultur; SC_b: Standardzellen in LLC1/SZ-Kontrolle; LLC1_b: LLC1 in LLC1-/SZ-Kontrolle). Als Positivkontrolle dienten Allogene B16/F10 Tumorzellen, die im Sinne einer „mixed lymphocyte Reaktion“

(MLR) in allen Gruppen eine zytotoxische Reaktion auszulösen. Dies galt äquivalent für die anderen Targetzellen [Pechhold K, 1994].

4.6 Arbeit mit Mäusen

4.6.1 Betäuben von Mäusen

Um die Mäuse zu anästhesieren wurde bei ihnen eine intraperitoneale Injektion mit einer Mischung bestehend aus Ketamin und Xylazine durchgeführt.

4.6.2 Blutentnahme bei Mäusen

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse intraperitoneal anästhesiert, anschließend wurde die Arteria carotis freipräpariert. Daraufhin wurde ihnen mit einer Heparinspritze und einer feinen Heparinkanüle, unter Zusatz von Heparin, Blut abgenommen.

4.6.3 Schwanzveneninjektion

Zur Injektion der MZ/LKZ Suspension in die Schwanzvene wurden die Mäuse anästhesiert. Anschließend wurde mit einem selbst hergestellten Venenkatheter die Schwanzvene punktiert, die Zellsuspension mit 1×10^7 Zellen in 100µl PBS auf Körpertemperatur aufgewärmt und langsam injiziert.

4.6.4 Tumoranimpfung

Zur Tumoranimpfung wurden 1×10^6 LLC1-Zellen, gelöst in 50µl PBS, mit einer Heparinspritze und einer Heparinnadel langsam am Abdomen, im Bereich der Flanke, subkutan injiziert.

4.6.5 Tumorgrößenbestimmung

Mit einem digitalen Messschieber von Mitutoyo, wurde der längste Durchmesser L und der kürzeste Durchmesser W bestimmt, und nach der **Formel TV (mm³) = (L x W²)/2** das Volumen berechnet [Savai R (B), 2005].

4.6.6 Immunisierung

Die Immunisierung der C57/BL6-Mäuse fand durch zweimalige Injektion in die Fußsohle, im Abstand von einer Woche statt. Es wurden bei der Immunisierung 2×10^5 LLC1-Zellen (6000 Rad bestrahlt), DZ, Hybride oder PBS gespritzt. Vier Tage nach der letzten Injektion wurden aus jeder Mäusepopulation Blutproben entnommen und für Zytokinexpressionsanalysen verwendet. Des Weiteren wurden Milz und Lymphknoten entnommen, um aus ihnen Zellen zu gewinnen und diese für Proliferations- und Zytotoxizitätstests zu verwenden.

4.6.7 Vakzinierung

Für die Therapie bei bereits wachsendem Tumor wurden den C57/BL6-Mäusen zunächst subkutan 1×10^6 LLC1-Zellen injiziert. Am siebten und vierzehnten Tag wurden diese Mäuse dann mit 2×10^5 syngenem DZ oder Hybriden pro Maus, oder PBS als Kontrolle vakzinieren. Die Überwachung von Überlebenszeit und Tumorwachstum fand für jede Mäusepopulation unter gleichen Bedingungen für weitere 2 Wochen statt. Nach dieser Zeit wurden die Mäuse getötet, um abermals Lymphknoten und Milzzellen für Proliferations- und Zytotoxizitätstests zu gewinnen. Die C57/BL6-Mäuse wurden entweder mit 2×10^5 LLC1 (6000 rad bestrahlt), DZ, Hybriden oder PBS immunisiert. Die Verabreichung dieser Zellen durch Fußsohleninjektion wurde 2 mal mit einem Abstand von einer Woche vorgenommen. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde jede Maus mit 1×10^6 lebenden (unbestrahlten) LLC1 beimpft. Die aus 10 Mäusen bestehenden Gruppen wurden wöchentlich bezüglich Tumorwachstum und Überleben untersucht. Die überlebenden Mäuse wurden nach 4 Wochen getötet und ihre Milz- und Lymphknotenzellen gewonnen, um mit ihnen Zytotoxizitäts- und Proliferationsversuche durchzuführen.

4.6.8 Adoptive Therapie

Bei der adoptiven Therapie handelte es sich um eine Immuntherapie mit aktivierten Lymphozyten. Die C57/BL6-Mäuse bekamen hierfür 10^6 lebende LLC1-Tumorzellen, in 200 μ l PBS subcutan gespritzt. Hierdurch wurde in allen Mäusen ein gleich starkes Tumorwachstum induziert. Vier Tage nach Tumorinokulation wurden die Mäuse zufällig auf verschiedene Gruppen verteilt. Jede dieser Gruppen bekam eine intravenöse

Injektion von 1×10^7 Milz- und Lymphknotenzellen, die von Mäusen stammten, die zuvor entweder mit DZ oder HZ immunisiert und im Abstand von einer Woche re-immunisiert worden waren. Eine Boosterinjektion zur Verstärkung der immunologischen Reaktion erfolgte am 12. Tag durch erneute Injektion immunologisch aktivierter T-Lymphozyten. Die Mäuse wurden 4 Wochen bezüglich Tumorgroße und Überleben überwacht und anschließend zur Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen (MZ/LKZ) getötet. Die Zellen wurden in Proliferations- und Zytotoxtests analysiert.

4.6.9 Kombination aus Hybridaktivierten T-Lymphozyten und Hybridvakzinierung

In der Reihe der Experimente stand die Therapie mit einer Kombination aus Vakzinierung mit Hybriden und einer adoptiven Therapie mit hybridstimulierten T-Lymphozyten im Mittelpunkt.

Für die Therapie des LLC1-Tumors wurden den C57/BL6-Mäusen subkutan 1×10^6 LLC1-Zellen/200 μ l in saliner Lösung injiziert, um ein Tumorstadium einzuleiten. Nach vier Tagen Tumorstadium wurden die Mäuse zufällig auf verschiedene Therapiegruppen aufgeteilt. Die Therapie wurde mittels Fußsohleninjektion von 1×10^5 syngenen, mit 6000 rad bestrahlten LLC1-Tumorzellen, DZ oder Hybrid-Vakzinierung durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die Mäuse mit 1×10^7 MZ/LKZ-Zellen behandelt, die aus Mäusen gewonnen wurden, welche zuvor mit bestrahlten LLC1-Tumorzellen, DZ, oder Hybriden immunisiert und re-immunisiert wurden und anschließend mit bestrahlten LLC1-Tumorzellen und IL2 in Kultur aktiviert wurden. Nach drei Tagen erhielten die Mäuse eine Booster-Dosis an bestrahlten LLC1 Tumorzellen, DZ oder Hybridvakzinierung, gefolgt von einer Boosterdosis an adoptiven MZ/LKZ am nächsten Tag (wie oben beschrieben).

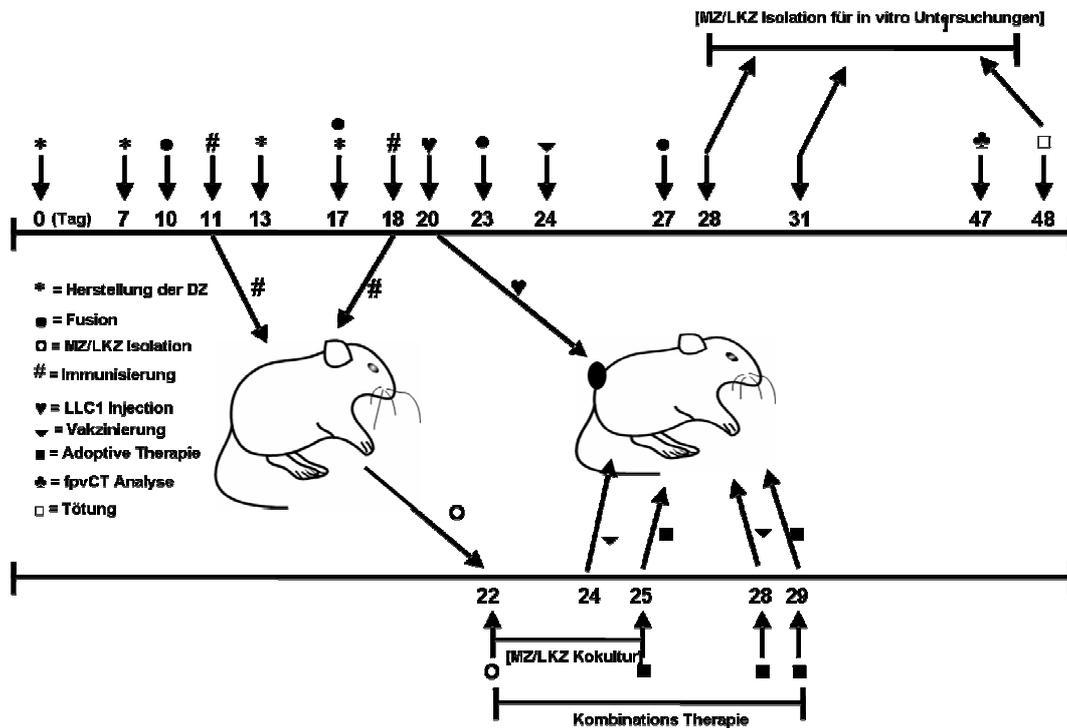
Nach der ersten Kombinationstherapie (TAG 28/5 Mäuse/Gruppe), nach der zweiten Booster Kombinationstherapie (Tag 31/5 Mäuse/Gruppe) und am Ende des Behandlungsprotokolls (Tag 48/verbleibende Mäuse) wurden die Mäuse zur Analyse der MZ/LKNZ in Proliferations- und Zytotoxtests getötet.

Um den therapeutischen Erfolg der unterschiedlichen Therapieschemata evaluieren zu können wurde das Tumorstadium über eine Dauer von 3 Wochen nach der zweiten

Boosterkombinationstherapie beobachtet und gemessen. Eine Darstellung dieses Therapieschemas zeigt Abb. 2.

Zusätzlich wurden am Ende des Behandlungsprotokolls mit Hilfe des Flachfeld-Volumen-CT (FpvCT) die Lungen auf Lungenmetastasen und die Milzen auf ihre Größe hin untersucht. Am Ende des Experimentes wurden den Tieren alle Organe entnommen, um sie auf histomorphologische Veränderungen hin zu untersuchen.

Abb. 2: Experimentelles Design der Kombinationstherapie



Für dieses Experiment wurden 105 männliche C57/BL6-Mäuse verwendet. In jeder Gruppe wurde das Tumorstadium von 15 Mäusen überwacht.

4.7 Flat- Panel Volumen Computer-Tomographie

Die FpvCT ist ein Prototyp eines hoch auflösenden Computertomographen, der von General Electric entwickelt wurde. Vorab wurden die Tiere mit intraperitonealer Injektion betäubt und bekamen einen Schwanzvenenkatheter implantiert. Anschließend wurden sie in die Mitte einer VCT Halterung gelegt und fixiert. Alle CT-Scans wurden mit 70kV/200mA (Aufnahmezeit: 8 sec./Rotation; 4.2cm Schichtdicke/Rotation) durchgeführt. Es konnte ein $70 \times 70 \times 70 \mu\text{m}^3$ Voxel (Volumetric Pixel) rekonstruiert werden. Zur intramuskulären und intraparenchymatösen Kontrastierung wurde über den liegenden Schwanzvenenkatheter 200 μl jodhaltiges Kontrastmittel (Iopromide 300, 300mg Jod/ml) 20 Sekunden vor jeder Aufnahme von Hand injiziert. Die Daten wurden in axialer Richtung in zwei Rotationsschnitten, über eine Strecke von 8,4cm, aufgenommen. Die Rohdaten wurden auf 2000 Frames pro Rotation rekonstruiert [Kiessling F, 2003].

4.8 Bestimmung der Apoptose mittels „TUNEL-Assay“

Die Apoptose im subkutanen Tumor und den Milz und Lungenschnitten wurde mit Hilfe von „TUNEL-Assay“ („TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“) sichtbar gemacht. Mit dieser Methode wurden freie 3'-hydroxy-Enden nachgewiesen, die bei apoptotischen Vorgängen in Zellen entstehen. Es wurde ein „*in situ* cell detection kit“, der Firma Roche verwendet. Hierzu wurden die Schnitte in 4% Paraformaldehyd für eine Stunde fixiert. Mit Triton X-100 wurden die Membranen permeabilisiert und bei 37°C für 60 Min. mit TUNEL-Reagenz inkubiert. Die nun gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 20 x Vergrößerung betrachtet. Zur Positiv-Kontrolle der TUNEL-Färbung wurden die Zellen mit 5µg/ml DNase-I behandelt und bei 37°C in feuchter Atmosphäre für 10 Min. inkubiert, um DNA-Strangbrüche zu induzieren. Als Negativkontrolle wurde die letzte Transferase des Färbeprozesses weggelassen.

4.9 Histologische Bestimmung der Metastasierung

Das Ausmaß der Metastasierung wurde anhand von Lungenschnitten bestimmt, die am Ende des Experiments aus den Lungen der getöteten Mäuse gewonnen wurden. Zunächst wurden die Lungen herauspräpariert und in Paraffin eingebettet. Die Schnittdicke betrug für alle Paraffinblocks 3µm. Insgesamt waren es etwa 50-80 Serienschritte für jeden Paraffinblock, in dem jeweils eine Lunge eingebettet war. Gefärbt wurden sie mit einer Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung. Sie wurden unter dem Lichtmikroskop auf das Vorhandensein und die Anzahl an Tumorzellnestern hin ausgewertet. Die Auswertung erfolgte in verblindeter Form. Die Metastasierung wurde in drei Grade eingeteilt. Diese Einteilung beruhte auf der Anzahl an Tumorzellen, in dem Lungenschnitt mit der maximalen Metastasenausdehnung (Grad I, Tumorzellen \leq 20-50; Grad II, Tumorzellen 50-100; Grad III, Tumorzellen \geq 100) [Ye QH, 2003].

4.10 Statistik

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mit Hilfe des „one-way-ANOVA-Test“ bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der „Student-Newman-Keuls-Vergleichstest“ durchgeführt wobei ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

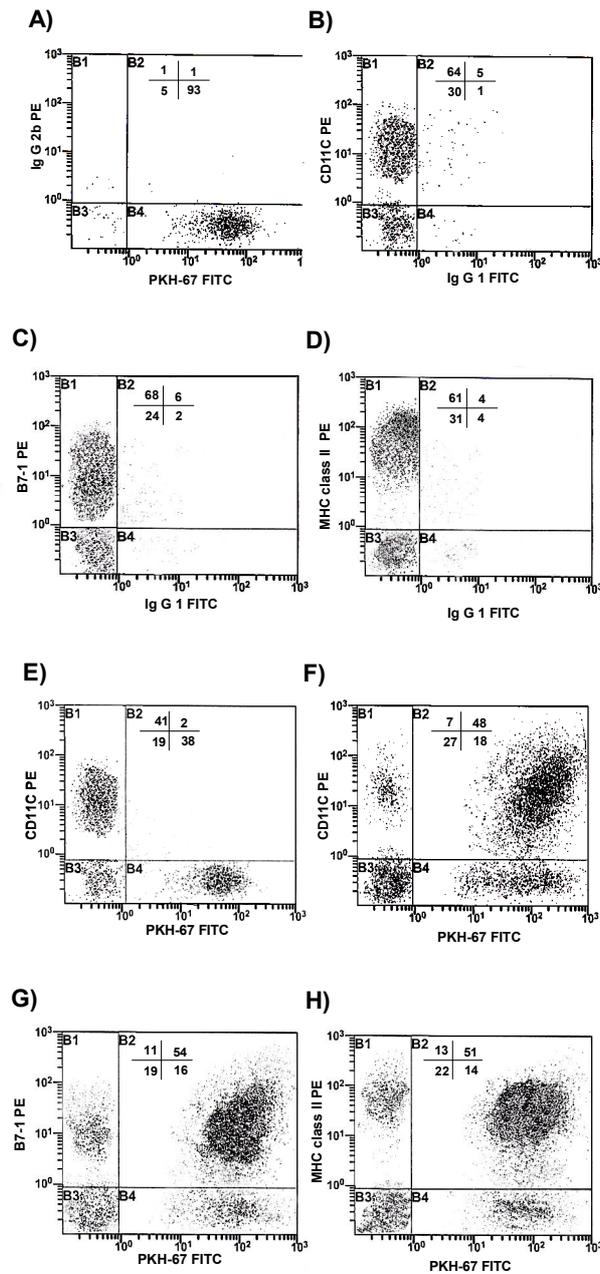
5 Ergebnisse

5.1 Verifizierung der Fusionsrate

Zur Qualitätsüberwachung der Fusion wurde der Anteil an CD11c-positiven Zellen an den DZ, mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dies erfolgte um sicherzustellen, dass es sich bei den fusionierten Zellen um DZ handelte. LLC1-Tumorzellen wurden mit dem Fitc-konjugiertem Membranmarker PKH-67 angefärbt (Abb. 3A). Die Charakterisierung des Phänotyps und die Aktivierung der aus Knochenmark gewonnenen DZ wurde dadurch bestätigt, dass ca. 60% der analysierten Zellen eine Expression von CD11c (Abb. 3B), B7.1 (Abb. 3C) und MHC-Klasse II (Abb. 3D) zeigten. Eine Färbung der LLC1-Tumorzellen mit PKH-67 und der DZ mit CD11c in einer DZ/LLC1-Mischung, zeigte nur wenige doppelpositive Zellen (Abb. 3E). Im Gegensatz hierzu zeigten die DZ/LLC1-Hybride etwa 50% doppelpositive Zellen (Abb. 3F). Ein weiterer Beleg für die Effizienz der Polyethylen/Elektroporations-Fusion war die Doppelpositivität der Hybride, bei Färbung der dendritischen Zellen mit kostimulatorischen Molekülen wie B7.1 und MHC Klasse II (Abb. 2G und H) und Färbung der LLC1-Zellen mit PKH-67.

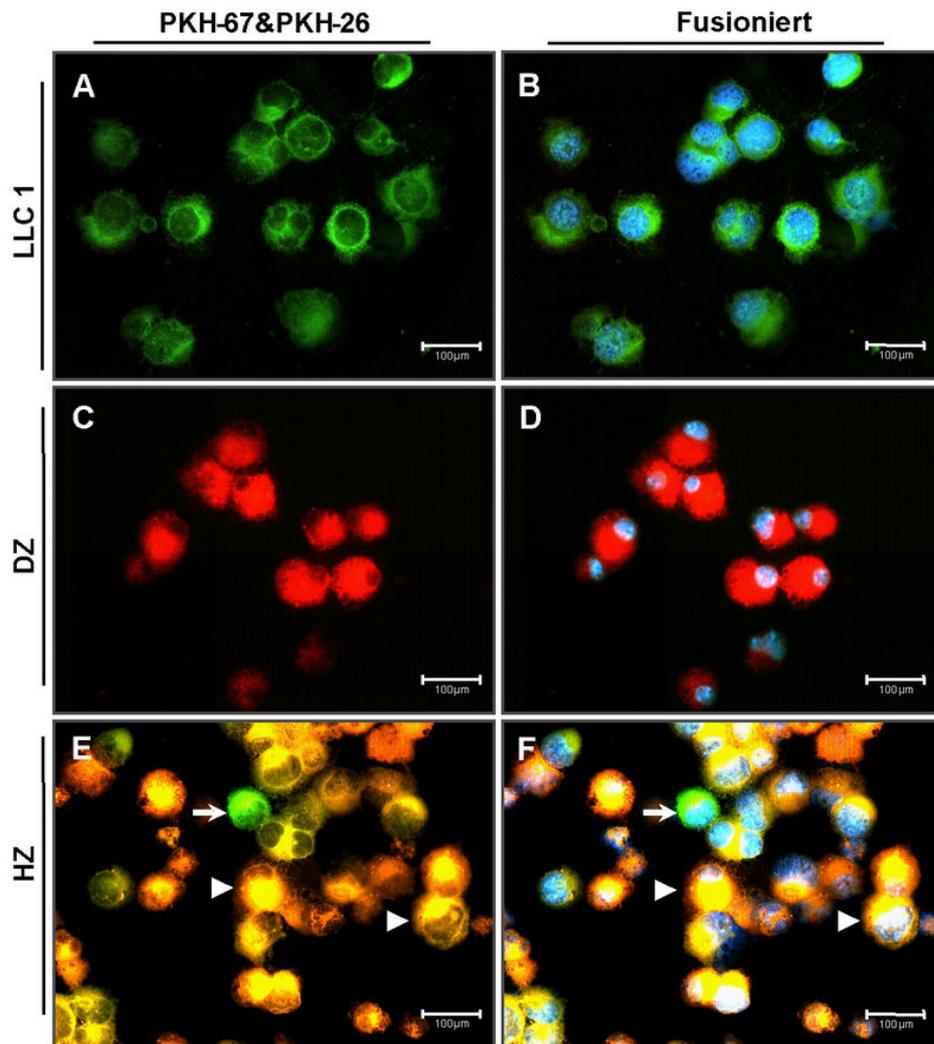
Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hybride, die ebenfalls eine deutliche Doppelfluoreszenz für PKH-26 und -67 zeigen. Auch wiesen die Zellen Kernpolymorphismen im Sinne von heterokaryonten Zellkernen auf (Abb. 4). Auf den Aufnahmen waren zum einen unfusionierte grün angefärbte PKH-67 positive LLC1-Zellen, zum anderen unfusionierte rot angefärbte PKH-26 positive DZ zu erkennen (Abb. 4A und B). Bei den orange oder gelb fluoreszierenden Zellen handelte es sich um Hybride (Abb. 4C). Einige Zellen zeigten am Tag der Fusion ein so genanntes "Membranoverlapping" im Sinne einer Verklebung einer DZ mit einer LLC1-Tumorzelle, ohne vollständige Fusion der Zellmembranen. Dieses Phänomen wurde am Tag nach der Fusion nicht mehr beobachtet, so dass davon auszugehen ist, dass auch diese Zellen noch vollständig fusionierten. Die Fusionsrate hat somit bis zu einem Maximum am Tag nach der Fusion noch zugenommen. Dies konnte durch Messungen am Durchflusszytometer bestätigt werden, bei denen am Tag nach der Fusion die Rate an doppelt positiv gefärbten HZ höher war als am Vortag.

Abb. 3: Facs-Bilder zur Fusionskontrolle



(A) PKH-67 Fluoreszenz auf LLC1-Zellen. (B) Expression von CD11c. (C) Expression von B 7.1 und (D) Expression von MHC Klasse II auf DZ. (E) CD11c und PKH-67 Fluoreszenzmischung auf DZ/LLC1. (F) Doppelfärbung mit PKH-67 und CD11c oder (G) mit B7.1 oder (H) MHC Klasse II auf fusionierten Hybriden. Die Oberflächenfluoreszenz-Intensität wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt.

Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Hybride



(A) PKH-67 gefärbte LLC1-Zellen (B) mit Dapi blau-Kernfärbung (C) PKH-26 gefärbte DZ (D) mit Dapi blau-Kernfärbung (E) doppelt gefärbte HZ (F) mit Dapi blau-Kernfärbung. ► zeigen die HZ, → zeigen die unfusionierten LLC1-Zellen. Skala Leiste: 100µm.

5.2 Analyse der T-Zellfunktion nach Immunisierung in vitro

Im T-Zellfunktionstest wurden naive C56/BL6-Mäuse mit DZ, LLC1, HZ, LLC1/DZ-Zellmischung, einer Mischung aus lysierten LLC1/DZ-Zellen oder PBS als Kontrolle, durch Injektion in die Fußsohle immunisiert. Am elften Tag nach der Injektion wurden den Mäusen die Milz und die Lymphknoten entfernt und aus ihnen die mononukleären Zellen mittels Ficoll-Paque isoliert.

5.2.1 Analyse des Proliferationstests nach Immunisierung

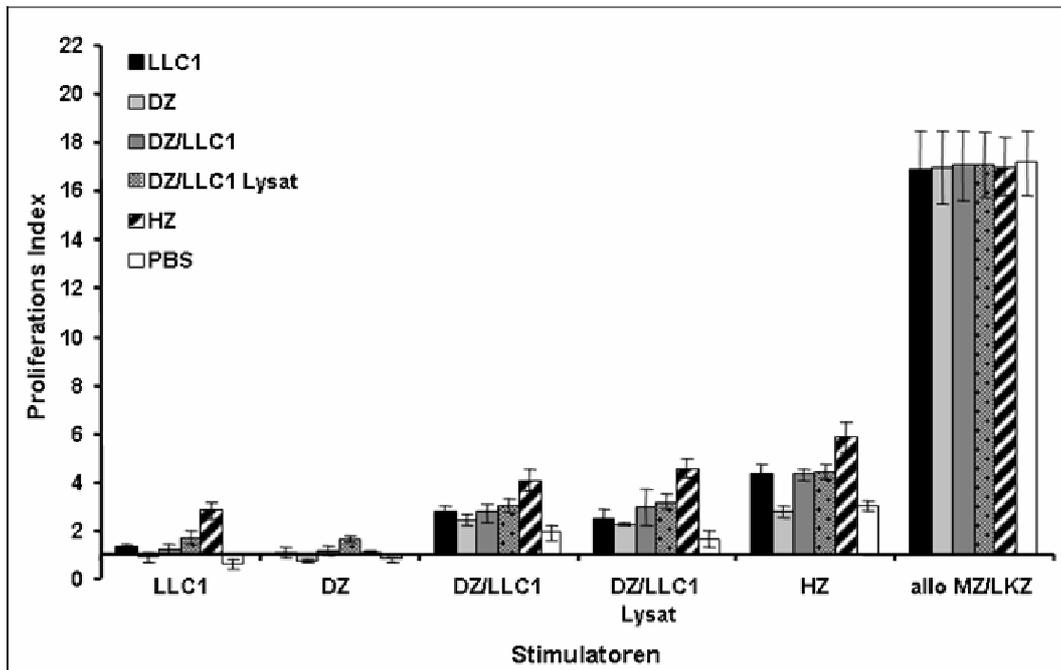
Die isolierten Milz- und Lymphknotenzellen wurden im Proliferationstest mit syngenen DZ, LLC1, Hybriden, einer unfusionierten LLC1/DZ-Mischung, einer Mischung aus lysierten-LLC1/DZ-Zellen oder MZ/LKZ (von BALB/C-Mäusen) allogenen Balb/C-Lymphozyten 4 Tage lang stimuliert und deren Proliferationsfähigkeit gegenüber den Stimulatoren untersucht. Nur die Lymphozyten, die aus Mäusen gewonnen wurden, welche vorher mit Hybriden immunisiert worden waren, zeigten eine Reaktion auf syngene naive Tumorzellen. Eine Reaktion gegen LLC1/DZ-Mischung oder Hybride allein wurde bei allen Effektor-Zellarten gefunden, wobei die stärkste Reaktion von den Hybrid-stimulierten Zellen ausging (Abb. 5A).

5.2.2 Analyse des Zytotoxtests nach Immunisierung

Um eine Induktion einer LLC1-spezifischen Zytotoxizität durch HZ zu prüfen, wurden die isolierten MZ/LKZ mit LLC1-Tumor, mit B16/F10-Melanomzellen und allogenen BALB/C-Lymphozyten inkubiert. Die B16/F10-Melanomzellen dienten hierbei als Negativkontrolle und die BALB/C-Lymphozyten als Positivkontrolle. Die Ergebnisse zeigten, dass die hybridstimulierten T-Lymphozyten einen deutlichen zytotoxischen Effekt gegenüber LLC1-Tumorzellen haben, nicht jedoch gegenüber den B16/F10-Tumorzellen (Abb. 5B).

Abb. 5: Proliferations- und Zytotoxaktivität nach Immunisierung

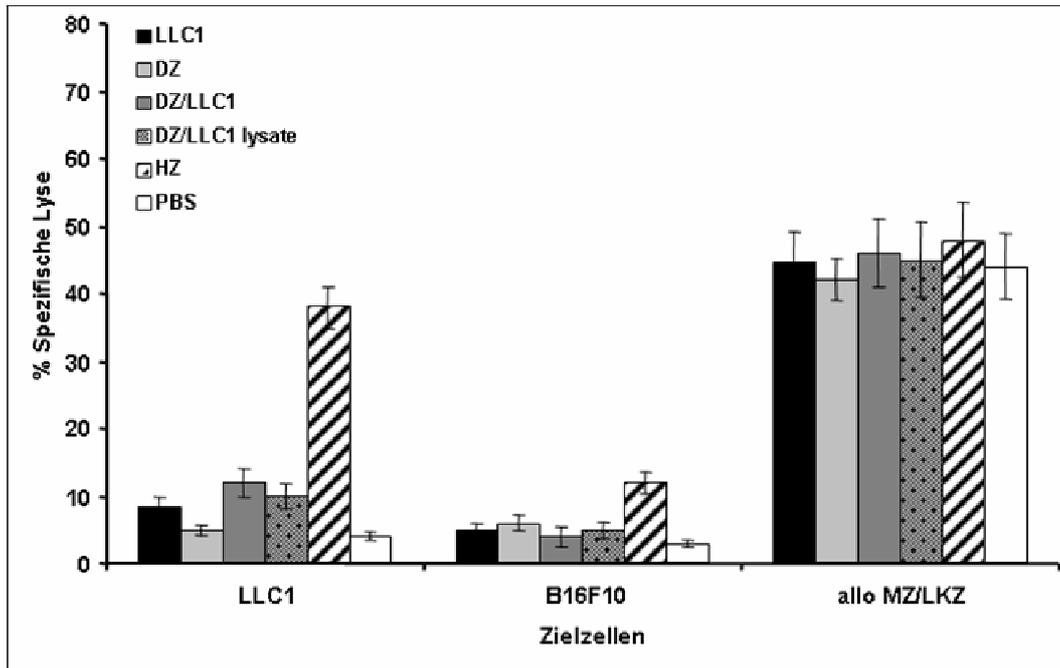
A)



(A) Proliferative Aktivität der MZ und LKZ gegenüber verschiedenen bestrahlten Stimulatorzellen. Die MZ und LKZ wurden aus Mäusen gewonnen, die mit bestrahlten LLC1, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder PBS als Kontrolle immunisiert wurden.

Als Target für die MZ/LKZ dienten LLC1-Tumorzellen, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder allogenen Lymphozyten (BALB/C). Die proliferative Aktivität wurde mittels [3H]-Thymidin-Inkorporation nach drei Tagen in Kultur bestimmt. Die Graphik zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung des Proliferationsindex (cpm des Testwertes/cpm der Kontrolle) aus jeweils 3 Kulturansätzen.

B)



(B) Zeigt die zytotoxische Kapazität von T-Lymphozyten aus MZ und LKZ, die aus Mäusen gewonnen wurden, die wie oben beschrieben immunisiert wurden. Sie wurden gegen LLC1-Tumorzellen, syngenen B16F10-Tumor als negative Kontrolle und allogenen BALB/C Lymphozyten in einem Effektor/Target-Verhältnis von 40:1 getestet. Dargestellt werden die Mittelwerte der prozentualen Lyse für die verschiedenen Experimente \pm Standardabweichung.

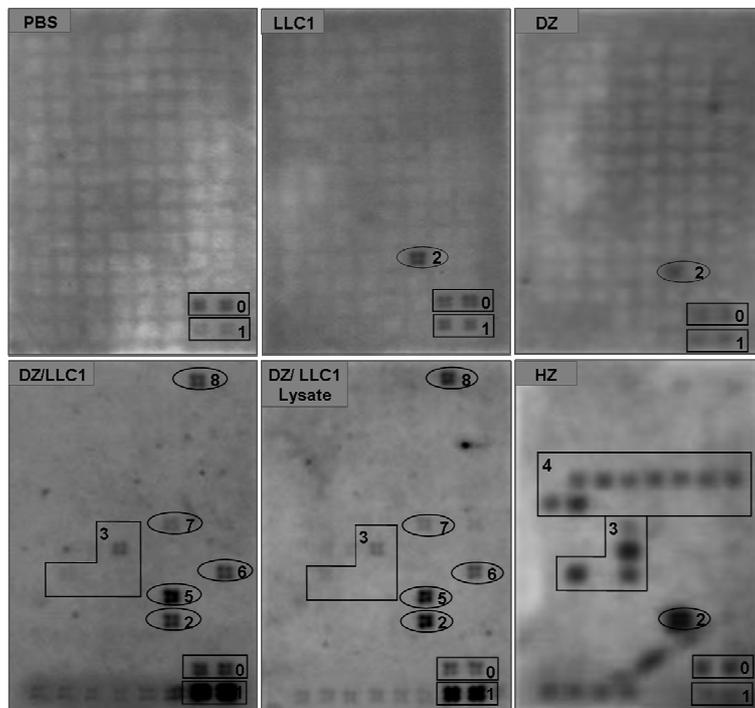
5.2.3 Mikroarray und RT-PCR nach Immunisierung

Um die Zytokine zu untersuchen, die durch LLC1/DZ-Hybride reguliert werden, wurde die zelluläre RNA aus Blutproben von Mäusen isoliert, die vorher mit LLC1, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, Hybriden oder PBS immunisiert worden waren. Nach Isolation wurde die RNA mit reverser Transkriptase transkribiert und mit "common cytokine gene array" hybridisiert. Abb. 6 zeigt die Expression der Interferon-Alpha Familie, Gen B, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 und 11 sowie Interleukin 2, 7, 13. Weiterhin weist sie eine Expression des Maus-Stammzellfaktor (SZF), des Mastzellfaktor (MGF) Kit Ligand und des Mitgliedes der Tumornekrosefaktor-Superfamilie 13b auf. Alle wurden im Vergleich zu den Kontrollen (LLC1, DZ und PBS), im Wesentlichen von Hybrid immunisierten Mäusen exprimiert. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden sie mit den Werten für β -Actin auf derselben Membran verglichen (Abb. 6).

Zur weiteren Bestätigung, der in der Mikroarray gewonnenen Daten, wurden die überexprimierten Zytokinfamilien in semi-quantitativen RT-PCR untersucht. Bei den hyb-

ridimmunisierten Mäusen war, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die Alpha-Interferonfamilie 2, 4, 7 und 11 sowie Interleukin 2, 7, 13 hoch reguliert (Abb. 7). Diese Feststellung bestätigte die Ergebnisse der Mikroarray Untersuchungen.

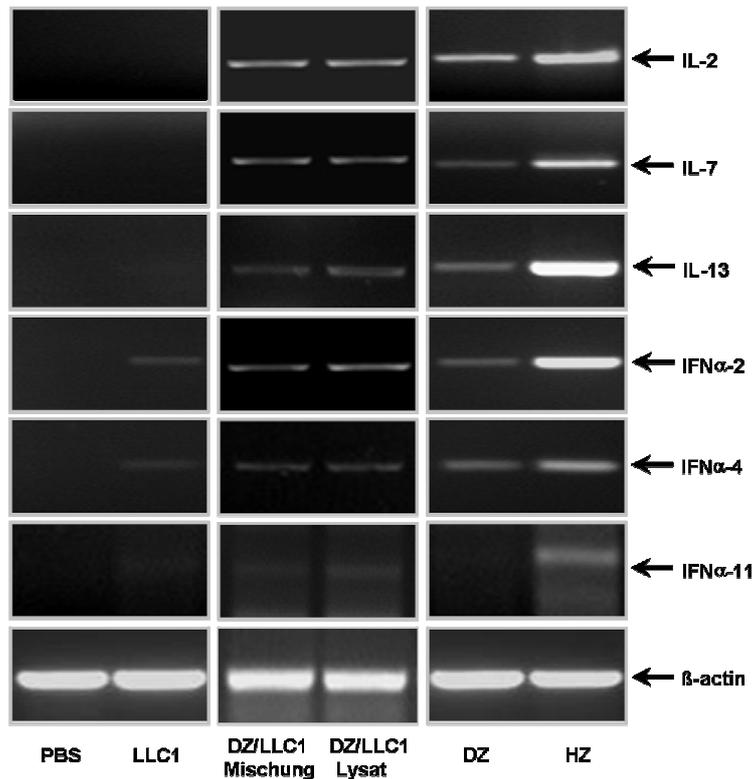
Abb. 6: Microarray-Ergebnisse



Die Abb. zeigt einen Microarray-Ansatz (Mouse common cytokine gene arrays), der mit cDNA-Proben durchgeführt wurde. Diese cDNA wurde aus Blutproben von Mäusen extrahiert, die mit LLC1, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder PBS immunisiert worden waren. Die gemessenen Zytokine aus den verschiedenen Proben sind unten aufgeführt:

- 1= β -Actin,
- 2= Tumornekrosefaktor Superfamilienmitglied 13b,
- 3= Interleukin 2, 7, 13 und auch Maus-Stammzellfaktor (SZF), Mastzell Wachstumsfaktor (MGF) kit Ligand,
- 4= Interferon Alpha Familie, Gene B, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, und 11,
- 5= Transforming growth factor, beta 1 (Tgf β 1),
- 6= Lymphotoxin B (Ltb),
- 7= Interleukin 16 (IL 16),
- 8= Protein Phosphat 1, katalytische Subeinheit, Alpha Isoform (Ppp1ca).

Abb. 7: RT-PCR Bestätigung der Microarray-Ergebnisse



Die mRNA-Spiegel jeder Zytokingruppe (IL-2, IL-7, IL-13, IFN α -2, IFN α -4 und IFN α -11), die in der Microarray eine signifikante Regulation durch HZ zeigen, wurden mit der semiquantitativen reverse-Transcriptase-PCR analysiert. Die Fülle an Zytokin-mRNA, in den mit LLC1, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder PBS immunisierten Proben wird im Verhältnis zur β -Actin-Aktivität dargestellt.

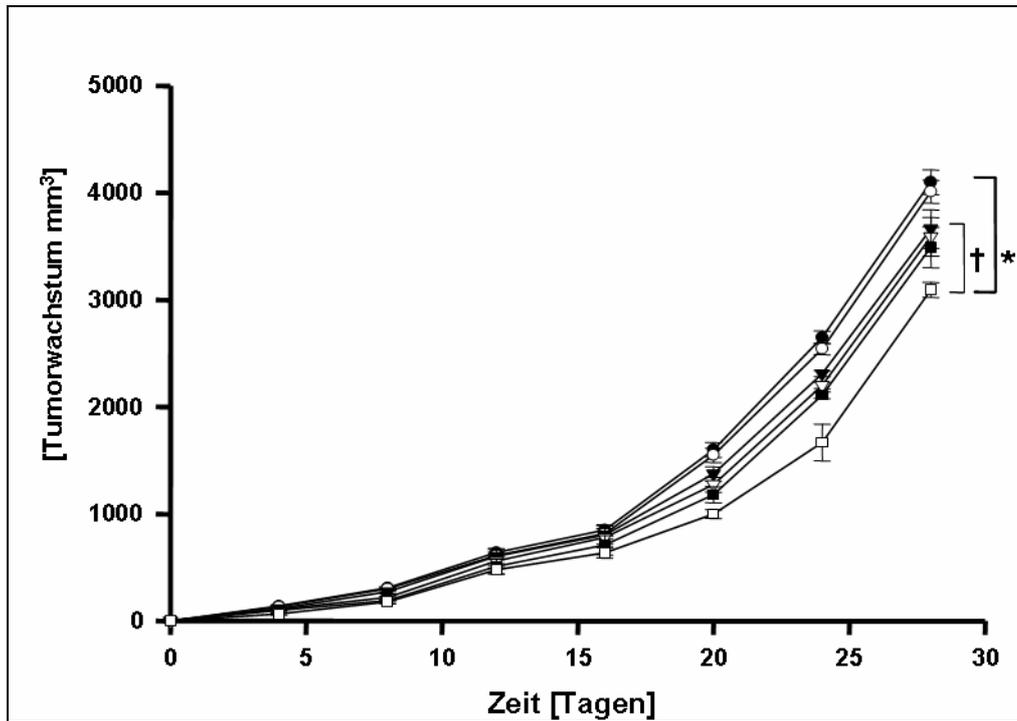
5.3 Ergebnisse der Tumorchallenge nach Immunisierung

Um zu zeigen, dass eine Immunisierung einen Einfluss auf das Tumorwachstum hat, wurden syngene Mäuse in Gruppen aufgeteilt und jeweils mit DZ, LLC1, Hybriden, LLC1/DZ-Zellmischung, einer Mischung aus lysierten LLC1/DZ-Zellen oder PBS immunisiert. Anschließend fand eine Überwachung des Tumorwachstum und der Überlebensrate statt (Abb. 8A).

Diese in vivo ermittelten Daten korrespondierten mit den in vitro evaluierten Daten aus dem Zytotox- und Proliferationstest, der die T-Zellfunktion der immunisierten Mäuse 28 Tage nach Tumorgabe zeigte. Zu diesem Zweck wurden alle Mäuse nach Ablauf von 28 Tagen getötet und ihre LKZ und MZ in Zytotox- und Proliferationstest untersucht (Abb. 8B und C).

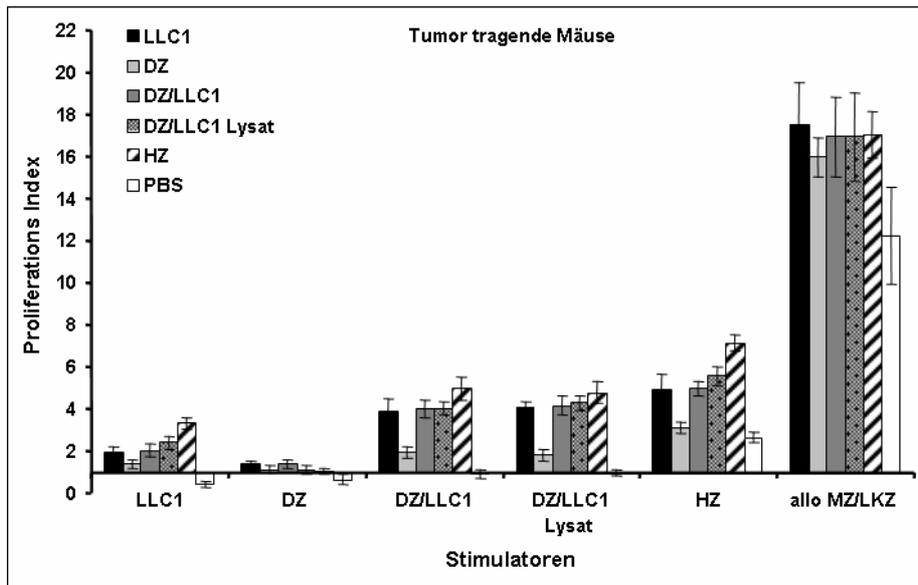
Abb. 8: Hybridimmunisierung

A)



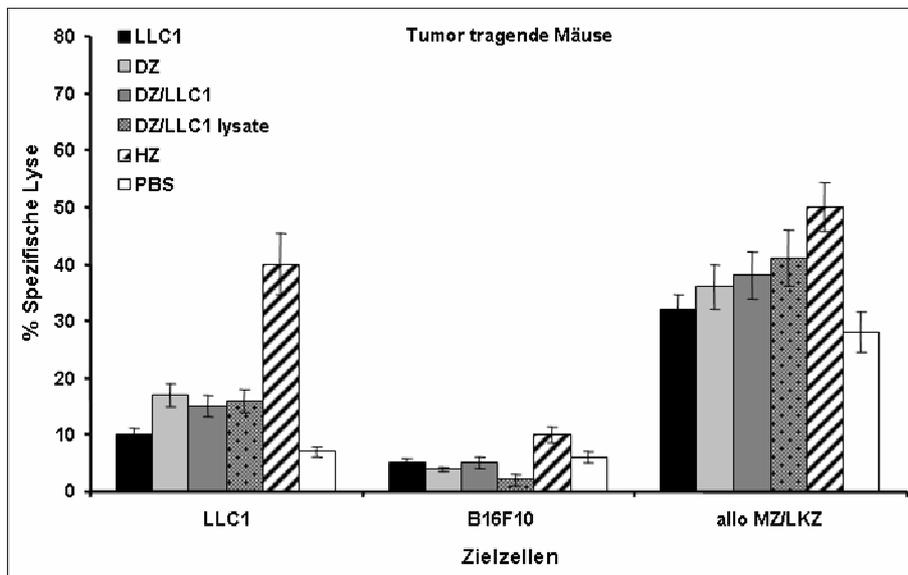
(A) Tumorwachstum von Mäusen, die zweimal immunisiert wurden mit: PBS (●), bestrahlten LLC1 (O), DZ (▼), DZ/LLC1-Mischung (▽), DZ/LLC1-Lysat (■) oder HZ (□) und am zweiten Tag nach Immunisierung subkutan mit LLC1-Tumor beimpft wurden. Danach wurde das Tumorwachstum kontinuierlich bestimmt. Die Daten sind als durchschnittliches Tumolvolumen aus 10 Mäusen \pm Standardabweichung angegeben (* mit $p < 0.05$ gegen PBS und LLC1; † $p < 0.05$ gegen DZ).

B)



(B) Proliferative Aktivität von MZ/LKZ als Reaktion auf verschiedene bestrahlte Stimulatorzellen. MZ/LKZ wurden aus Mäusen gewonnen, die mit bestrahlten LLC1, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder PBS als Kontrolle immunisiert wurden. Die MZ/LKZ wurden ebenfalls mit LLC1-Tumorzellen, DZ, DC/LLC1-Mischung, DC/LLC1-Lysat, HZ oder allogenen BALB/c-Lymphozyten in Kultur genommen. Die proliferative Aktivität wurde anhand der Thymidin-Inkorporation nach 3 Tagen in Kultur bestimmt. Es sind die Mittelwerte aus drei Kulturansätzen als Proliferationsindex (Cpm des Test-Well/Cpm der Kontrolle) \pm Standardabweichung dargestellt.

C)



(C) Zytotoxische Kapazität der MZ/LKZ wurden gegen LLC1-Zellen, syngenen B16/F10-Melanom-Tumor und allogenen BALB/c-Lymphozyten, in einem Effektor/Target-Verhältnis von 40:1 gemessen. Bei den Mittelwerten der Lyse im Zytotoxtest handelte es sich um Mittelwerte aus 4 verschiedenen Experimenten.

5.3.1 Ergebnisse des Tumorwachstums nach Immunisierung

Die Ergebnisse zeigten, dass alle Mäuse, die mit bestrahlten LLC1-Zellen oder PBS immunisiert wurden, ein Tumorwachstum in der ersten Woche aufwiesen und zu 60% in den ersten 28 Tagen nach Tumorgabe starben (Abb. 8A). Bei den Mäusen, die mit DZ immunisiert wurden, zeigte sich eine leichte Abnahme des Tumorwachstums (9%), während bei den hybridimmunisierten Mäusen, der Tumor erst später zu wachsen begann und eine signifikante Abnahme des Tumorwachstums um 23% zu verzeichnen war ($p < 0.05$ gegen PBS und LLC1; $p < 0.05$ gegen DZ). Auch in der Überlebenskurve zeigte sich ein deutlicher Vorteil bei den hybridimmunisierten Mäusen. Dies wird durch die Beobachtung einer vitaleren Aktivität der Mäuse der Hybridtherapiegruppe nach 28 Tagen unterstützt.

5.3.2 Analyse des Proliferationstests nach Tumorchallenge

Bei den Mäusen die immunisiert und mit Tumor angeimpft wurden, war im Vergleich zu Mäusen, die nur immunisiert wurden, nur eine leichte T-Zellreaktion festzustellen. So lässt sich sagen, dass die Tumordinjektion bei Tieren, die mit LLC1, DZ, LLC1/DZ-Mischung oder LLC1/DZ-Lysat immunisiert wurden, nicht in der Lage war, eine ausreichende T-Zell Proliferation gegen naive Tumorzellen zu induzieren (Abb. 8B).

5.3.3 Analyse des Zytotoxtests nach Tumorchallenge

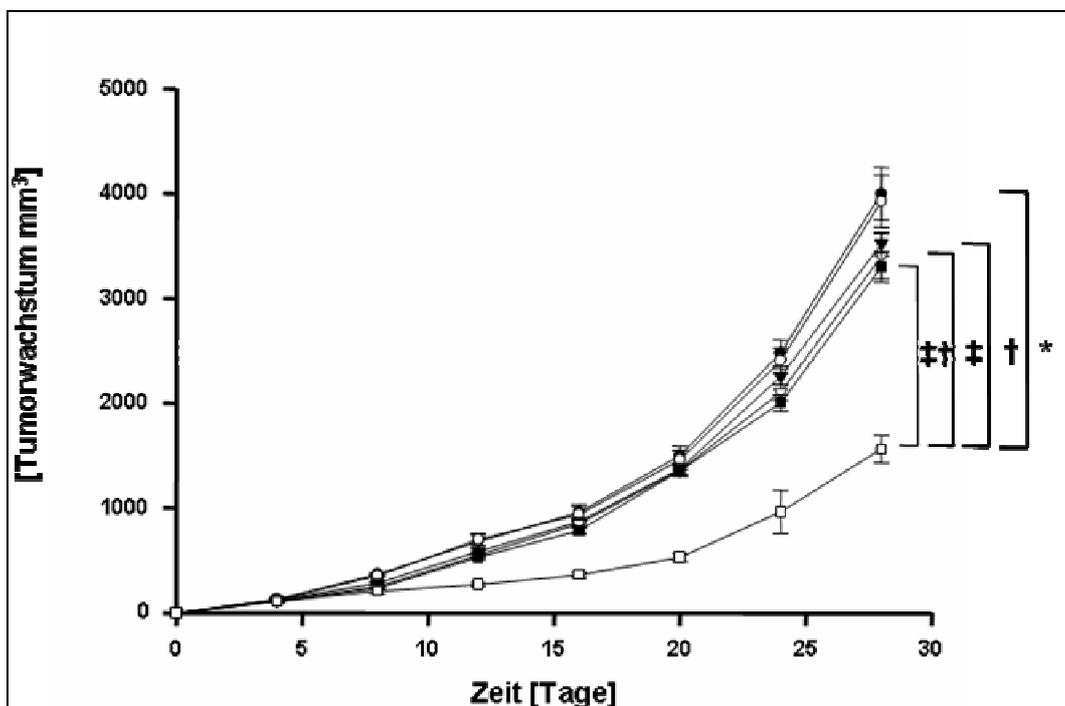
Im Vergleich zum Proliferationstest zeigten mit HZ immunisierte LKZ und MZ im Zytotoxtest 40% DZ-spezifische Lyse gegenüber LLC1-Zellen. Dem gegenüber entwickelten T-Zellen von DZ-immunisierten Mäusen 17% Lyse und T-Zellen von Mäusen, die nicht mit Tumor beimpft worden waren, entwickelten 5% Lyse (mit $p < 0.05$ gegen PBS und LLC1; $p < 0.05$ gegen DZ siehe Abb. 8C).

5.4 In-vivo und in-vitro-Ergebnisse nach Vakzinierungstherapie

Um den Anti-Tumoreffekt der Hybrid-Vakzinierung auf subkutan wachsende Tumoren zu untersuchen, wurden tumorbeimpfte Mäuse mit bestrahlten LLC1, DZ, HZ, bestrahlter DZ/LLC1-Mischung, bestrahltem DZ/LLC1-Lysat oder PBS am 7. und 14. Tag vakziniert.

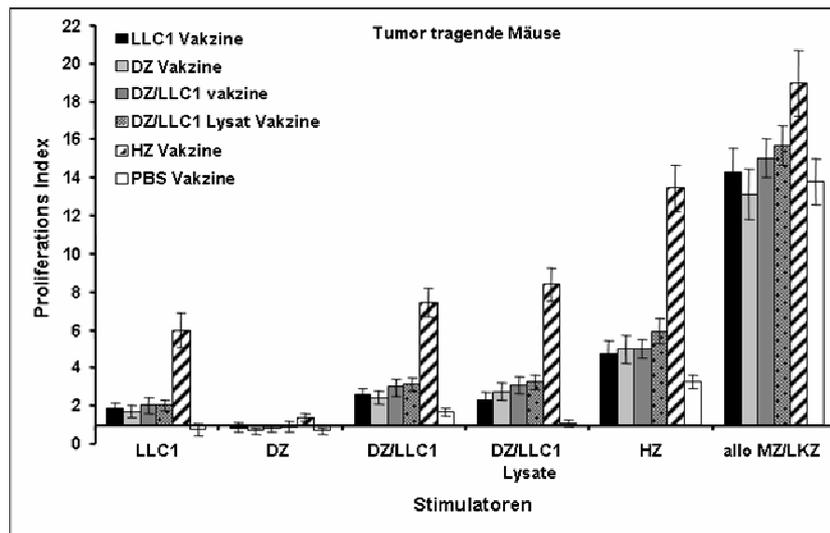
Abb. 9: Tumorwachstum, Zytotoxtest und Proliferation nach Hybrid Vakzinierung

A)



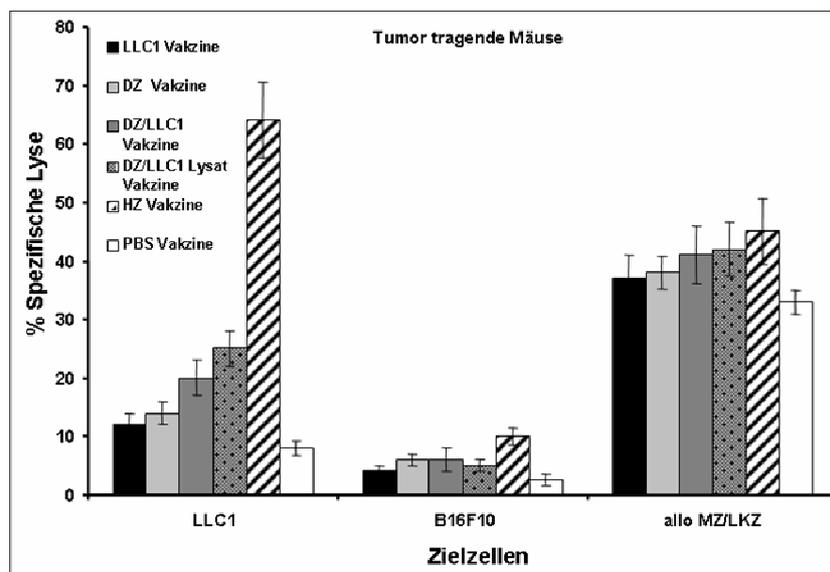
(A) 7 Tage nach Tumoranimpfung mit LLC1-Tumorzellen, wurden die Mäuse vakziniert mit: PBS (●), bestrahlten LLC1 (○), DZ (▼), bestrahlter DZ/LLC1-Mischung (▽), bestrahltem DZ/LLC1-Lysat (■) oder bestrahlten Hybriden (□). Das Tumorwachstum wird in jeder Gruppe von Mäusen im viertägigen Intervall untersucht. Die Daten sind dargestellt als durchschnittliches Tumolvolumen \pm Standardabweichung aus 10 Mäusen. *, $p < 0.05$ gegen PBS und LLC1; †, $p < 0.05$ gegen DZ; ‡, $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Mischung, ‡‡, $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Lysat.

B)



(B) Proliferative Aktivität der Lymphozyten (MZ/LKZ) als Reaktion auf verschiedene bestrahlte Stimulatorzellen. MZ/LKZ werden gewonnen aus tumorbeimpften Mäusen, die zuvor zweimal mit bestrahlten LLC1, DZ, bestrahlter DZ/LLC1-Mischung, bestrahltem DC/LLC1-Lysat, bestrahlten HZ oder PBS als Kontrolle vakziniert wurden. MZ/LKZ wurden mit LLC1-Tumorzellen, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder mit allogenen (BALB/c) Lymphozyten kultiviert. Die proliferative Aktivität wird durch die [³H] Thymidininkorporation nach 3 Tagen in Kultur gemessen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte aus drei Kulturansätzen, des Proliferationsindex (cpm des Tests Well/cpm der Kontrolle) \pm Standardabweichung.

C)



(C) Zytotoxische Kapazität der Lymphozyten (MZ/LKZ) wurde getestet gegen LLC1-Zellen, syngene B16/F10-Tumorzellen als Negativkontrolle und allogenen (BALB/C) Lymphozyten in einem Effektor/Target-Verhältnis von 40:1. MZ/LKZ wurden wie oben beschrieben gewonnen. Es sind die Mittelwerte aus vier verschiedenen Experimenten dargestellt.

5.4.1 Ergebnisse des Tumorwachstums nach Vakzinierung

Wie die Abb. 9A zeigt, verfügten Mäuse, die nur mit DZ allein immunisiert worden waren, über keinen höheren Schutz gegenüber dem LLC1-Tumor als die naiven, nur mit PBS immunisierten, Mäuse. Im Gegensatz hierzu konnte bei Tieren, die mit HZ immunisiert wurden, eine Reduktion des Tumorwachstums um etwa 60% (mit $p < 0.05$ gegen PBS und LLC1) erreicht werden. Der protektive Effekt hielt darüber hinaus länger an (28 Tage). Die hybridimmunisierten Mäuse wirkten subjektiv vitaler und es konnte ein normaleres Fressverhalten beobachtet werden.

5.4.2 Analyse des Proliferationstests nach Vakzinierung

Wie erwartet zeigten T-Lymphozyten aus LKZ und MZ von HZ immunisierten Mäuse einen Anstieg der T-Zell-Proliferation gegenüber allen Stimulatorzellreihen, während alle anderen Kontrollen sich als unzureichende Aktivatoren herausstellten (Abb. 9B).

5.4.3 Analyse des Zytotoxtests nach Vakzinierung

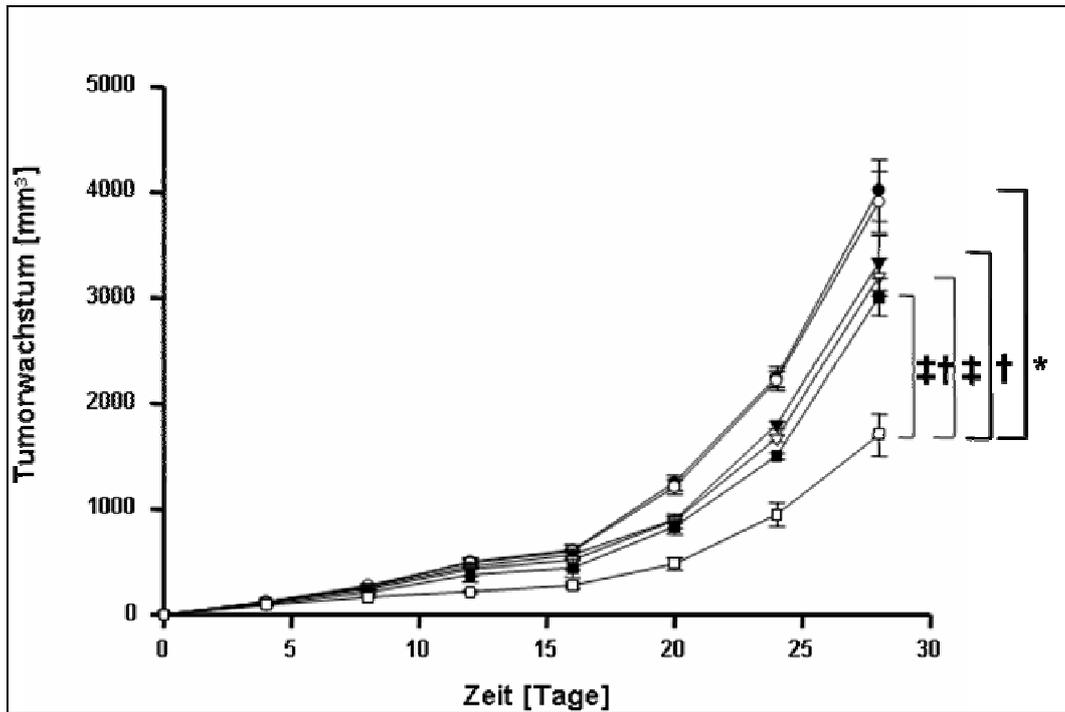
Im Zytotoxtest zeigten die T-Zellen der HZ-immunisierten Mäuse gegenüber den DZ-immunisierten Mäusen eine Rate an spezifischer Lyse von 65% ($p < 0.05$ gegen DZ, siehe Abb. 9C) gegenüber den Tumorzellen.

5.5 In-vivo und in-vitro-Ergebnisse nach adoptiver Therapie

Um das therapeutische Potential hybridstimulierter T-Zellen gegenüber wachsenden LLC1-Tumoren untersuchen zu können, wurden MZ/LKZ von DZ, HZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat oder PBS immunisierten C57BL/6-Mäuse isoliert. Diese Zellen wurden im Sinne einer adoptiven Therapie an Tag 4 und Tag 8 in die Schwanzvene injiziert.

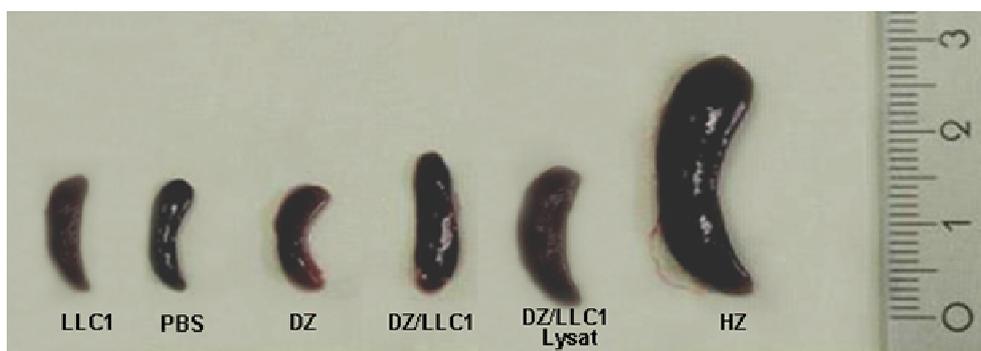
Abb. 10: Adoptive Therapie

A)



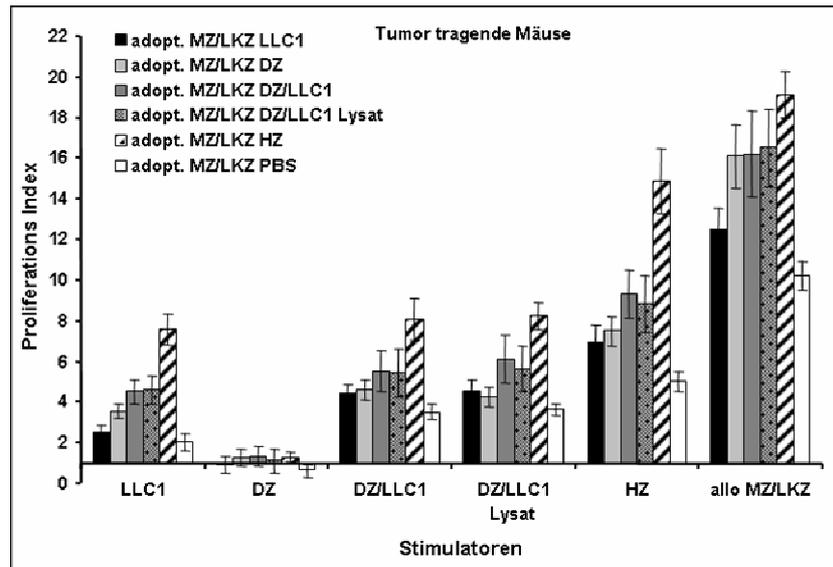
(A) Mäuse, die LLC1 beimpft wurden, sind zuvor mit MZ/LKZ behandelt worden. Diese MZ/LKZ stammen von Mäusen, die mit PBS (●), bestrahlten LLC1 (○), DZ (▼), bestrahlter DZ/LLC1-Mischung (◇), bestrahltem DZ/LLC1-Lysat (■) oder bestrahlten HZ (□) immunisiert wurden. Das Tumorstadium wird nach der Tumorbeimpfung kontinuierlich überwacht und gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte des Tumorstadiums \pm Standardabweichung von 10 Mäusen dargestellt. *, $p < 0.05$ gegen PBS und LLC1; †, $p < 0.05$ gegen DZ; ‡, $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Mischung, ‡†, $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Lysat.

B)



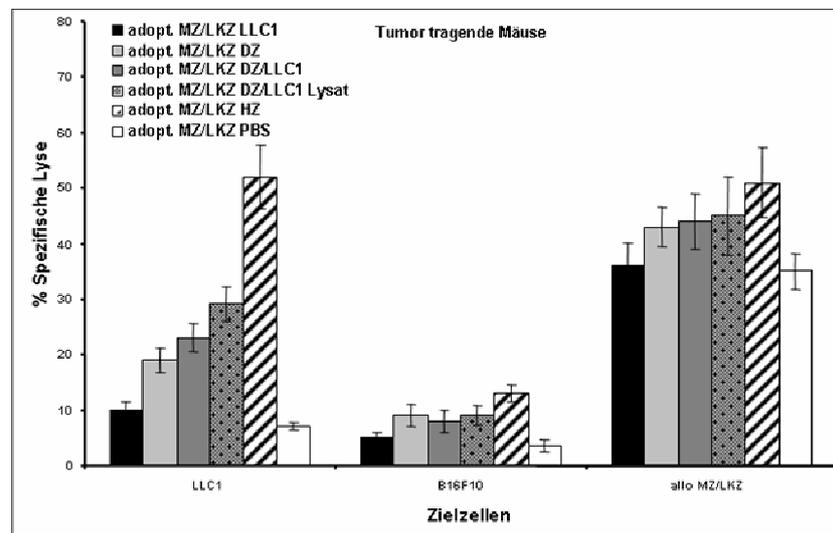
(B) Repräsentativ ausgewählte Milzen und Lymphknoten, die 28 Tage nach Tumorbeimpfung exzidiert worden sind.

C)



(C) Zeigt die proliferative Aktivität von MZ/LKZ, die aus tumorbeimpften Mäusen gewonnen wurden, die mit MZ/LKZ von immunisierten Mäusen therapiert wurden. MZ/LKZ wurden ebenfalls mit LLC1 Tumorzellen, DZ, DZ/LLC1-Mischung, DZ/LLC1-Lysat, HZ oder mit allogenen (BALB/C) MZ/LKZ immunisiert. Die proliferative Aktivität wurde durch die $[^3\text{H}]$ Thymidininkorporation nach 3 Tagen in Kultur gemessen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Proliferationsindex (cpm des Tests Well/cpm der Kontrolle) \pm Standardabweichung. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei Kulturansätzen.

D)



(D) Zytotoxische Kapazität der Lymphozyten (MZ/LKZ) wurde gegen LLC1-Zellen, syngene B16/F10-Tumorzellen als Negativkontrolle und allogenen (BALB/C) Lymphozyten in einem Effektor/Target Verhältnis von 40:1 getestet. MZ/LKZ wurden wie oben beschrieben gewonnen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier verschiedenen Experimenten.

5.5.1 Ergebnisse des Tumorwachstums nach adoptiver Therapie

In allen Gruppen begann das Tumorwachstum bereits am vierten Tag nach Tumoringjektion (Abb. 10A). Bei den Mäusen die T-Zellen gespritzt bekamen, die durch HZ aktiviert worden waren, zeigte sich ein drastischer Rückgang des Tumorwachstums 12 Tage nach Tumoringjektion. So konnte bei diesen Mäusen ein um 48% niedrigeres Tumorwachstum gezeigt werden. Dies steht im Vergleich zu 14% bei DZ, 18% bei DZ/LLC1-Mischung, 21% bei DZ/LLC1-Lysat immunisierten Mäusen. Eine Verzögerung des Tumorwachstums zwischen Tag 12 und Tag 28 mit durchschnittlich 51.1% konnte beobachtet werden (Werte errechnet aus den Mittelwerten gegenüber den Kontrollen mit $p < 0.05$ gegen PBS und LLC1; $p < 0.05$ gegen DZ; $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Mischung, $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Lysat).

Bei der Aufbereitung der Milzen und Lymphknoten konnte eine deutliche Zunahme der Milzgröße bei den Mäusen beobachtet werden, welche mit Lymphozyten therapiert wurden, die mit HZ stimuliert worden waren (Abb. 10B). Diese in vivo erhobenen Daten wurden durch die in vitro gewonnenen Erkenntnisse bestätigt.

5.5.2 Analyse des Proliferationstests nach adoptiver Therapie

Wie Abb. 10C zeigt, haben T-Lymphozyten von Mäusen, die mit MZ und LKZ von HZ-immunisierten Mäusen adoptiv behandelt worden waren, im Vergleich zu allen Kontrollen, eine verbesserte proliferative Kapazität gegenüber allen Stimulatorzellen. Es zeigt sich ein signifikanter Vorteil der Stimulation, der MZ und LKZ durch Hybride.

5.5.3 Analyse des Zytotoxtests nach adoptiver Therapie

Die spezifische zytotoxische Aktivität, die durch Injektion von T-Lymphozyten hervorgerufen wurde, die aus mit Hybriden immunisierten Milz und Lymphknotenzellen gewonnen wurden, war signifikant (um 50%) erhöht. Dies gilt im Vergleich zu allen anderen Gruppen, inklusive der nicht mit Tumor angeimpften, naiven T-Lymphozyten ($p < 0.05$ gegen PBS und LLC1; $p < 0.05$ gegen DZ; $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Mischung, $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Lysat siehe Abb. 10D).

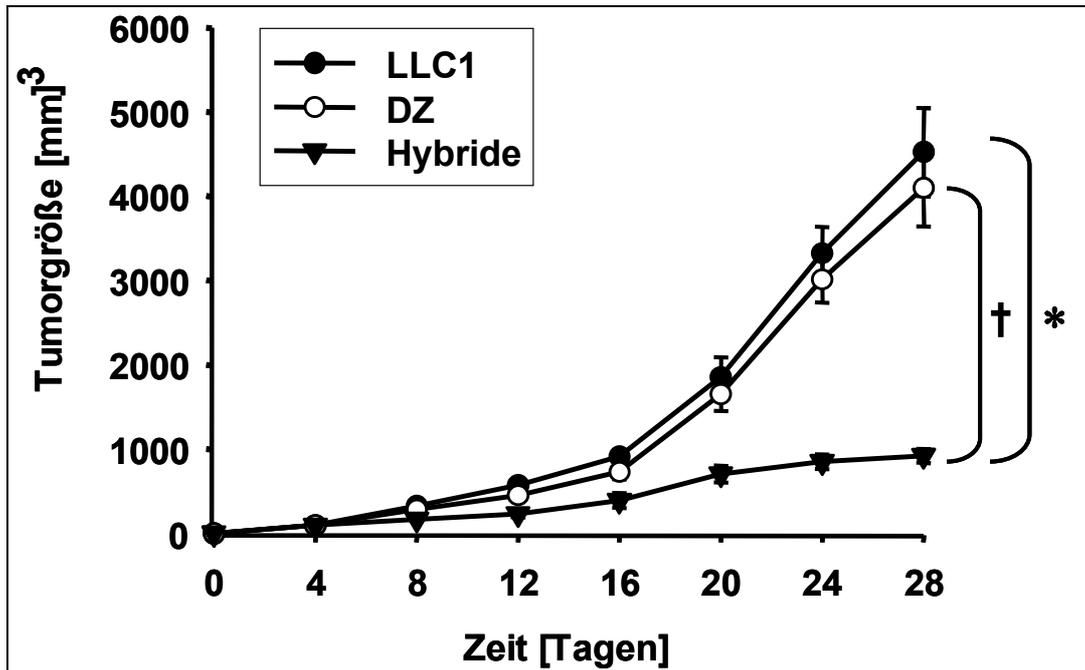
5.6 Ergebnisse der Kombinationstherapie aus adoptiver Therapie und Vakzinierung

Wie Abb. 11A zeigt, fand sich bei den mit einer DZ-Kombinationstherapie behandelten Mäusen kein wesentlich geringeres Tumorwachstum als bei den Mäusen der LLC1-Kontrollgruppe. Bemerkenswert war jedoch die frühe (16. Tag) Reduktion des Tumorwachstums, die bei den Mäusen der Hybridkombinationstherapie-Gruppe beobachtet werden konnte. Im Vergleich zur DZ-Kombinationstherapie fand sich eine Tumorstadiumsreduktion um 46%. Im Vergleich zur LLC1-Kontrolltherapie um betrug diese 57%. Die Tumorstadiumsreduktion zeigte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum und nahm mit der Zeit zu. Sie erreichte ein Maximum von 80% gegenüber LLC1-Kontrolltherapie und von 77% gegenüber DZ-Kombinationstherapie 28 Tage nach Tumorstadiuminjektion.

Überdies nahm die Überlebensrate der hybridtherapierten Mäuse zu. 4 Wochen nach Tumorstadiumbeimpfung hatte die Überlebensrate von hybridtherapierten Mäusen auf 81% zugenommen. Im Vergleich hierzu lag die Überlebensrate der DZ-Kombinationstherapie-Gruppe bei 33% und bei LLC1-Kontrolltherapiemäusen bei 24% (Abb. 11B). Darüber hinaus war am 20. Tag bei 10 von 15 hybridkombinationstherapierten Mäusen ein Nekroseareal im Zentrum des subkutan wachsenden Tumors festzustellen, welches bis zum Ende des Experimentes bestehen blieb. Alle angegebenen Prozentzahlen wurden aus den durchschnittlichen Tumorstadiumvolumina von 10 Mäusen mit $p < 0,05$ gegenüber LLC1 und $p < 0,05$ gegenüber DZ bestimmt.

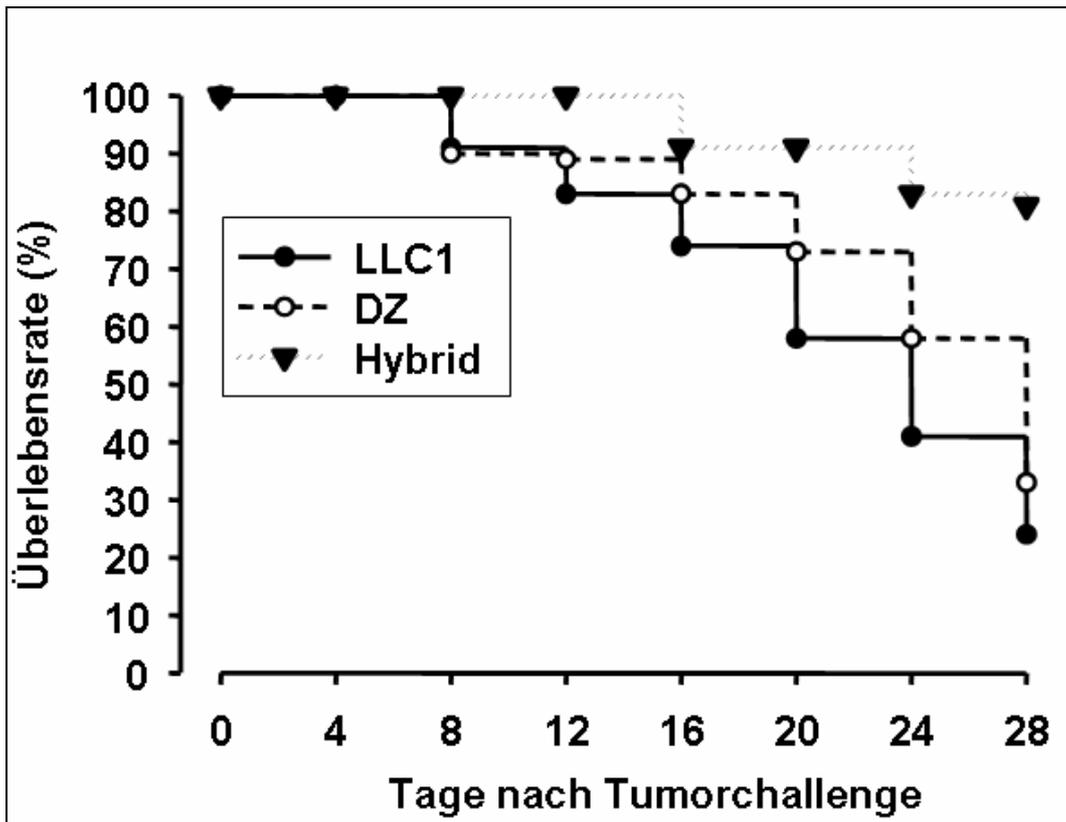
Abb. 11: Anti-Tumor Effekt der Hybrid-Kombinationstherapie

A)



(A) LLC1 Tumor tragende C57/BL6-Mäuse wurden mit bestrahlten LLC1 Tumorzellen als Kontrolle (●), DZ/LLC1 Kombination Therapie (○) oder Hybrid-Kombination Therapie (▼) behandelt. Das Tumormolumen wurde nach Tumorgabe alle 4 Tage gemessen. Die Daten sind als durchschnittliches Tumormolumen + Standardabweichung von 10 Mäusen mit * $p < 0,05$ gegenüber LLC1 und † $p < 0,05$ gegenüber DZ angegeben.

B)



(B) Überlebensvorteil der mit kombinierter Immuntherapie behandelten Mäuse nach 4 Tagen bestehendem LLC1 Tumor. Mit LLC1 behandelte Gruppe (●), DZ-Kombinations-Therapie Gruppe (○) oder Hybrid-Kombinations-Therapie Gruppe (▼).

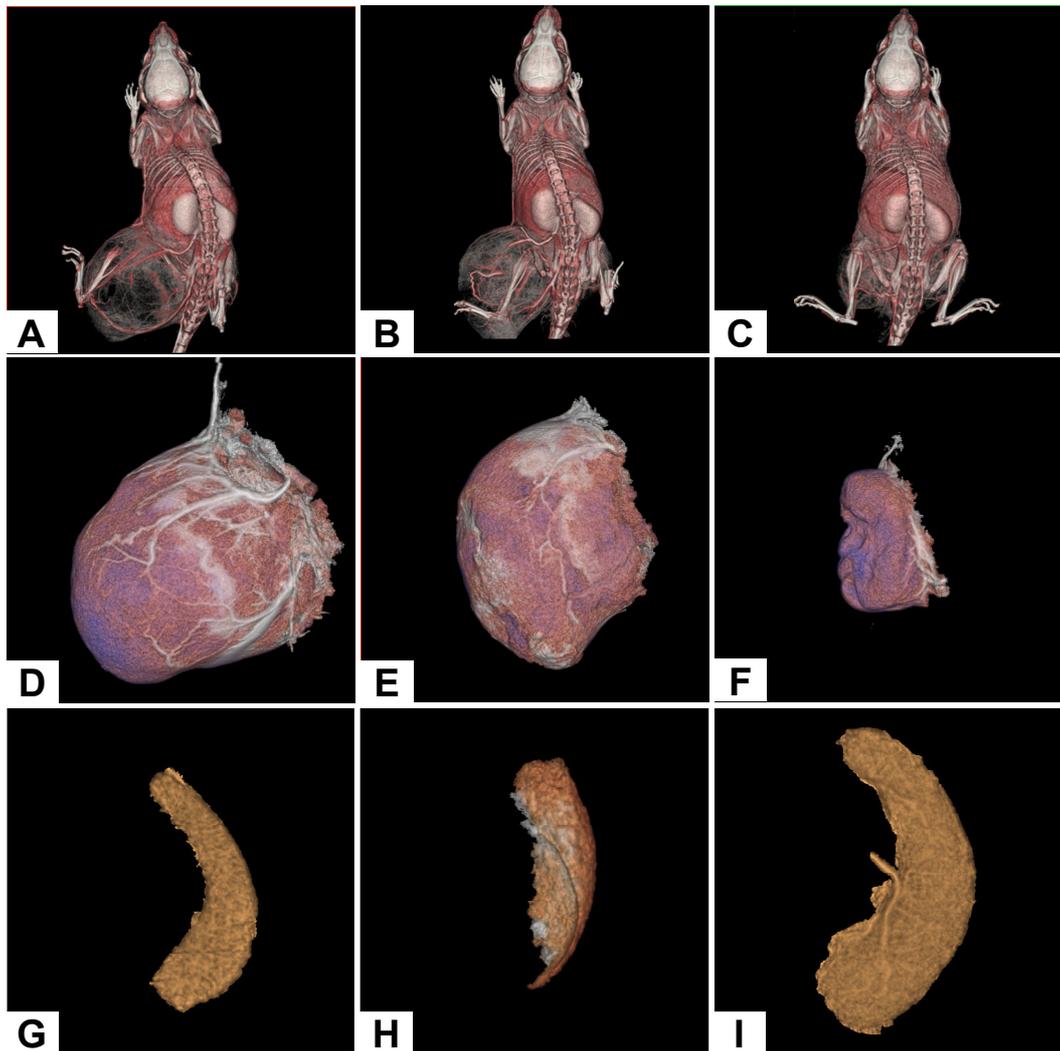
5.6.1 Analyse der FpvCT (Flat panel volumetric Computed Tomography)- Darstellung nach Kombinationstherapie

Darstellung der Tumore

Um detaillierte Informationen über die Tumormorphologie und Metastasierung von LLC1 tragenden Mäusen zu erhalten, wurden nicht invasive hoch auflösende FpvCT Untersuchungen durchgeführt. Sowohl die Tomographie, als auch die Kontrastmittelapplikation wurde sehr gut vertragen. Die Darstellung des Tumors zeigte eine Versorgung des Tumors durch die Vena testicularis und eine ernsthafte Knochenstrukturen entlang des Femur bis zum Kniegelenk. Bei den Mäusen, die mit DZ-Kombinationstherapie behandelt wurden, zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier infiltriert das Tumorgewebe das Kniegelenk hauptsächlich im Gebiet der proximalen Tibia, der Fibula und des distalen Femur. Überraschenderweise zeigten die Hybridtherapiemäuse im Gegensatz hierzu eine normale Knochenstruktur (Abb. 12A, B, C).

Durch eine digitale Extraktion des Tumors konnte das Volumen bestimmt werden. Die FpvCT-Abbildungen der Tumore der hybridtherapierten Mäuse zeigten ein signifikant niedrigeres Tumolvolumen. Das Tumolvolumen der hybridtherapierten Mäuse war mit einem durchschnittlichen Volumen von 1,359ccm wesentlich kleiner als bei DZ-kombinationstherapierten (6,33ccm) oder LLC1-therapierten Mäusen (10,502ccm) (Abb. 12D, E, F). Ferner konnten wir zusätzlich eine Zunahme des Milzvolumens der hybridkombinationstherapierten Mäusen gegenüber den Kontrollgruppen feststellen. Im Einzelnen betrug die Milzgröße bei hybridkombinationstherapierten Mäusen durchschnittlich 0,724ccm, bei DZ-kombinationstherapierten Mäusen 0,259ccm und bei LLC1-kontrolltherapierten Mäusen 0,259ccm (Abb. 12G, H, I) Alle Angaben sind als Mittelwert aus jeweils 10 Mäusen mit $p < 0,5$ gegenüber DC und LLC dargestellt. Überdies konnte ein relativ homogener Rückgang der Kontrastmittelanreicherung beobachtet werden, was für eine gesteigerte lokale Population an T-Lymphozyten, welche eine Tumorsuppression bewirken, sprechen kann.

Abb. 12: Flach-Feld-Volumen-Computertomographie (flat panel volume CT= FpvCT) Ergebnisse



Die Darstellung zeigt 3D-Angiographie-Bilder von Datensätzen, die mit dem FpvCT aufgenommen worden sind. Es sind Ganzkörperaufnahmen der Mäuse nach Kontrastmittelgabe bei einer (A) mit bestrahlten LLC1-Zellen behandelten Maus, (B) DZ-Kombinationstherapie Maus (C) Hybrid-Kombinationstherapie Maus.

Die Primärtumore wurden virtuell, halbautomatisch aus den Ganzkörperaufnahmen extrahiert, was die Tumolvolumenbestimmung vereinfachte. Dargestellt sind die extrahierten Tumore nach (D) LLC1, (E) DZ-Kombinationstherapie oder (F) Hybridkombinationstherapie. In allen überwachten Gruppen konnte eine Splenomegalie (G) LLC1, (H) DZ-Kombinationstherapie oder (I) Hybridkombinationstherapie festgestellt werden.

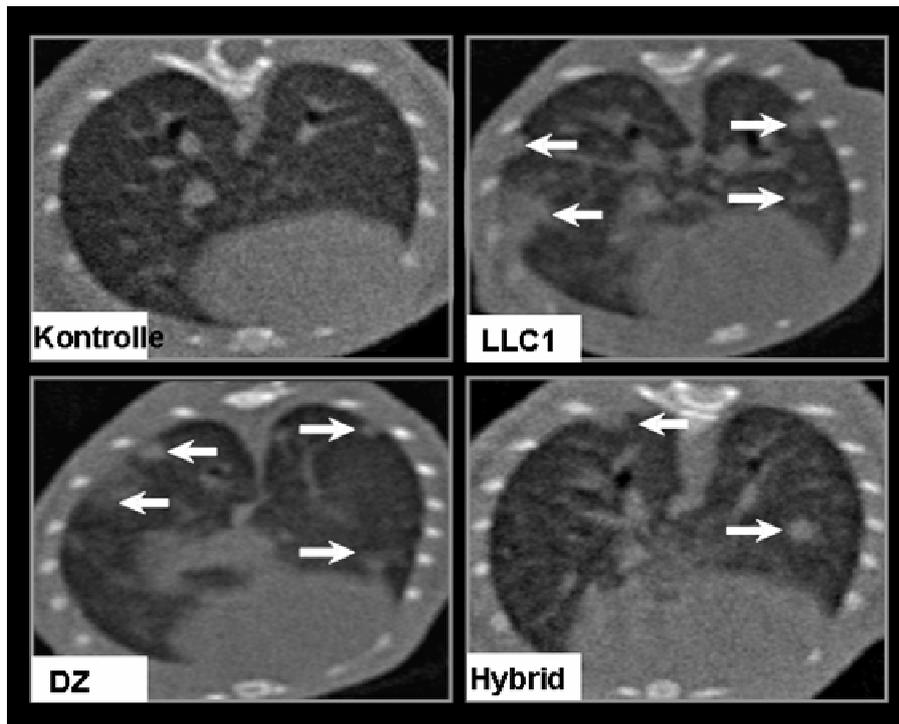
Darstellung der Lungenmetastasierung

Beim LLC1-Tumor ist es bekannt, dass er in die Lungen metastasiert. Deshalb galt das Interesse der Beobachtung, wie die Hybridkombinationstherapie nicht nur auf den Primärtumor, sondern auch auf die Fernmetastasen wirkte. Zu diesem Zweck wurde das metastatische Wachstum in Mäusen, die mit bestrahltem LLC1-Tumor, DZ- und Hybridkombinationstherapie behandelt wurden, überprüft. Dies geschah, indem zum einen FpvCT-Untersuchungen der Lungen durchgeführt und zum anderen, nach abgeschlossener Therapie Lungenschnitte mit H&E gefärbt wurden. Nahezu jede Lunge der Kontrolltiere enthielt zahlreiche metastatische Knoten. Die stärkste Reduktion der Metastasierung wurde bei Mäusen gefunden, die mit Hybridkombinationstherapie behandelt wurden. Diese Therapie reduzierte die Anzahl und die Größe der Metastasen signifikant (Abb. 13A). Die durchschnittliche Metastasengröße war bei der Hybridkombinationstherapie viel kleiner als bei den Kontrolltherapien. So betrug dieser Durchmesser bei der Hybridkombinationstherapie 1,3mm, bei der DZ-Kombinationstherapie 2,2mm und bei den LLC1 behandelten Mäusen 2,7mm (Abb. 13B).

Es wurden repräsentativ die histologischen Eigenschaften von metastatischen Tumorknötchen in den Lungen von Mäusen, die mit bestrahlten LLC1, DZ und Hybridtherapie behandelt wurden, untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Lungenschnitte bei den Mäusen aus der Hybridkombinationstherapie-Gruppe weniger und kleinere Tumore zeigten als bei Kontrolltherapiemäusen (Abb. 13C). Die Auswertung der Lungenschnitte der Hybridkombinationstherapie zeigte eine signifikante Reduktion der metastatischen Knoten im Vergleich zu den Kontrollschnitten (Abb. 13D).

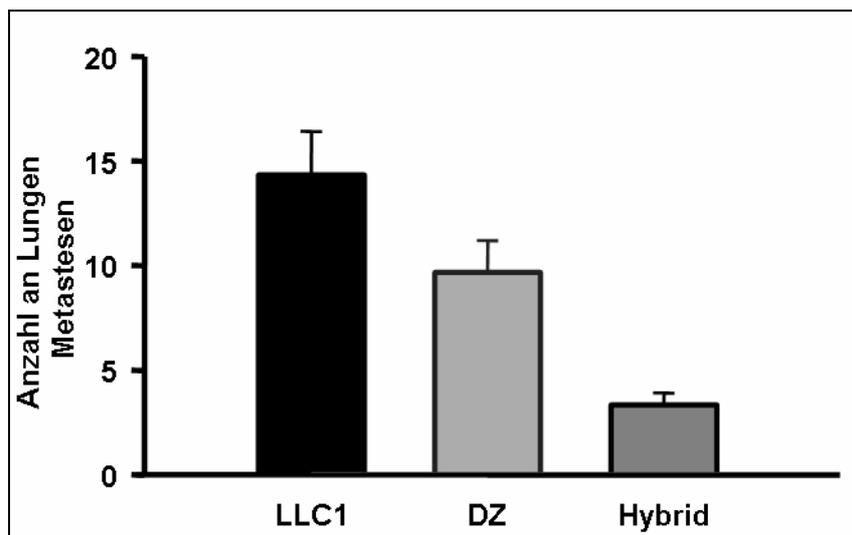
Abb. 13: Analyse der Lungenmetastasierung mittels FpvCT und Histologie

A)



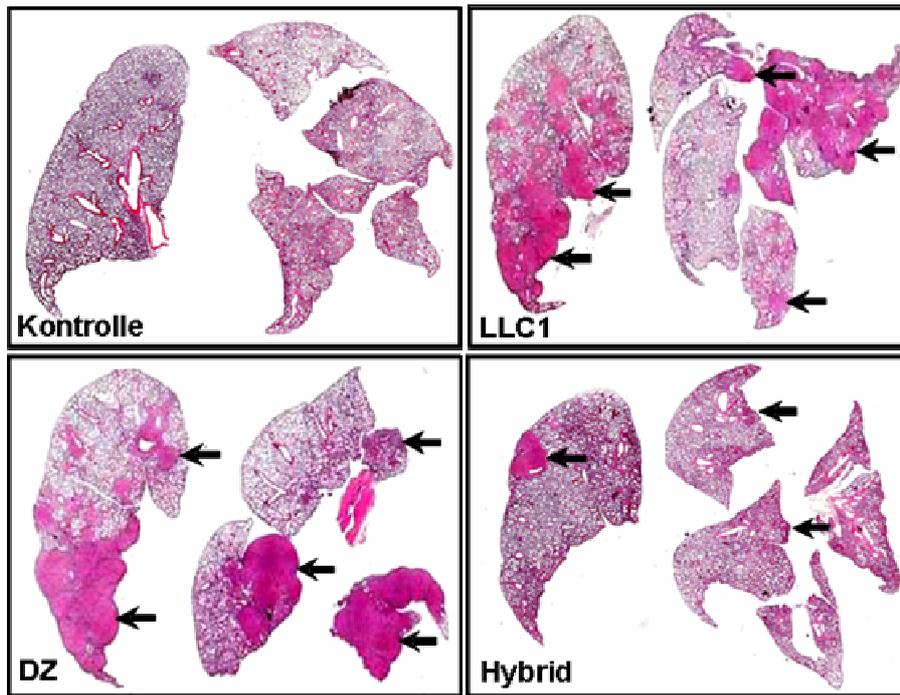
(A) Lungenmetastasenbestimmung mittels FpvCT bei tumortragenden C57/BL6-Mäusen, die mit LLC1, DZ-Kombinationstherapie oder Hybrid-Kombinationstherapie behandelt wurden. Das FpvCT- Scanning wurde 28 Tage nach LLC1-Zellinjektion durchgeführt. Zusätzlich sind repräsentative axiale Aufnahmen von Kontroll-Mäuselungen nach LLC1, DZ-Kombinationstherapie dargestellt.

B)



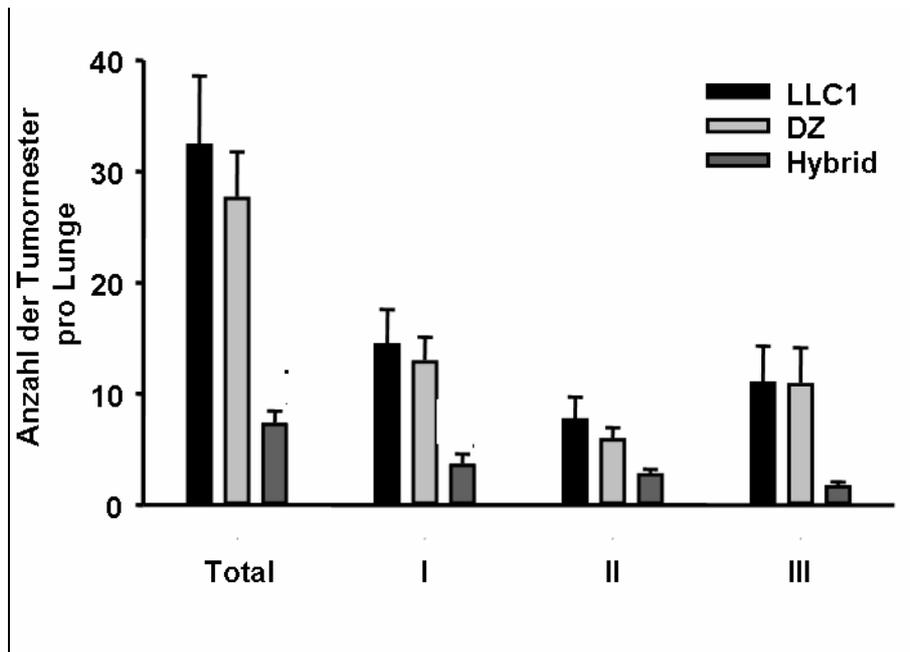
(B) Die Ergebnisse wurden durch FpvCT als totale Anzahl an Tumorclustern pro Lunge quantifiziert.

C)



(C) Histologische Analyse H&E gefärbter Schnitte des metastatischen Lungentumorgewebes, das nach subkutaner Injektion von LLC1-Tumorzellen gewonnen wurde. Die Querschnitte zeigen die therapieabhängigen metastatischen Tumore in den Lungen bei Kontrolle, LLC1, DZ-Kombinationstherapie oder Hybridkombinationstherapie

D)



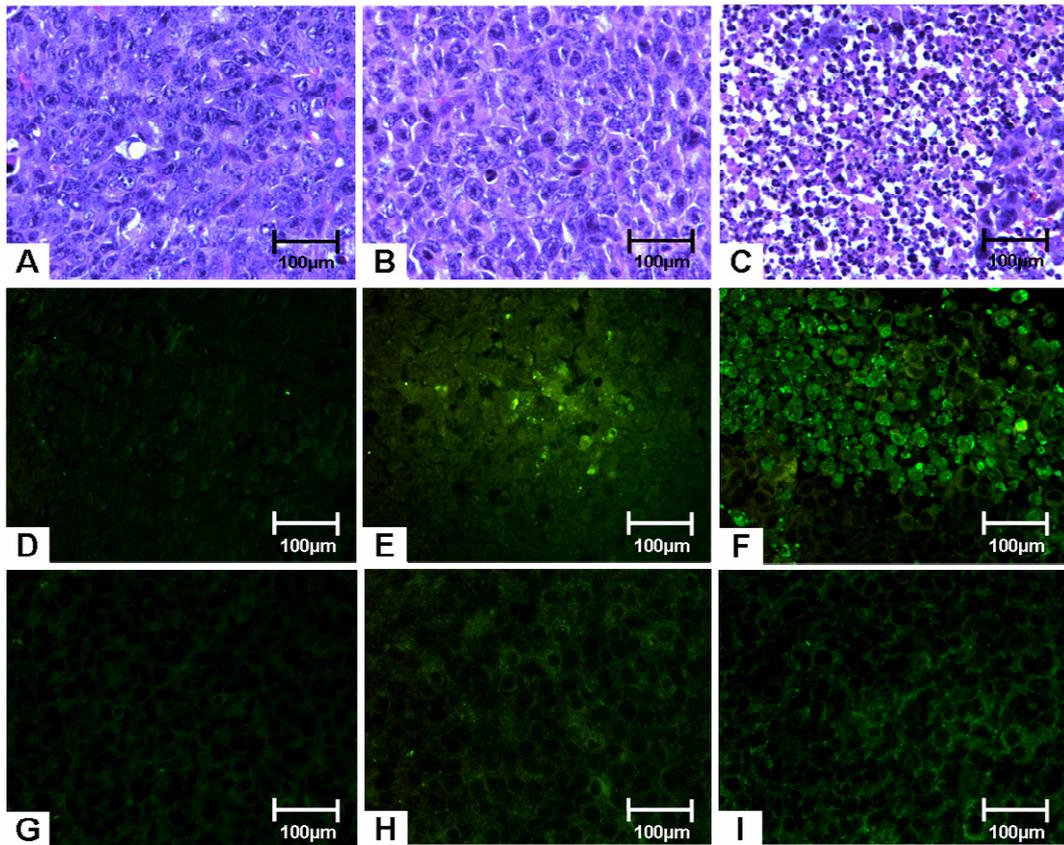
(D) Anzahl der Tumorzellnester pro Lunge quantifiziert durch Auszählung.

5.6.2 Histologische Ergebnisse nach der Kombinationstherapie

Bei den H&E gefärbten Schnitten des LLC1-Tumors konnte ein merklicher Unterschied zwischen den Tieren, die eine Hybridkombinationstherapie erhalten haben, und den Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 14A, B, C). Im Zentrum der Tumore der hybridkombinationstherapierten Mäuse konnte eine erhöhte Anzahl an kleinen Zellen nachgewiesen werden, die sich in der TUNEL-Färbung als apoptotisch herausstellten. Bei den Mäusen der Kontrolltherapie und der DZ-Kombinationstherapie konnten, in Aufarbeitungen des subkutanen Tumors, praktisch keine apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Die Anzahl an Tumorzellen, die sich im Zustand der Apoptose befanden, waren in der Gruppe der Hybridkombinationstherapie beträchtlich erhöht (Abb. 14D, E, F). Weiter konnte festgestellt werden, dass mehr CD3⁺-T-Zellen in den Tumoren, die mit Hybridkombinationstherapie behandelt wurden, zu finden waren (Abb. 14G, H, I).

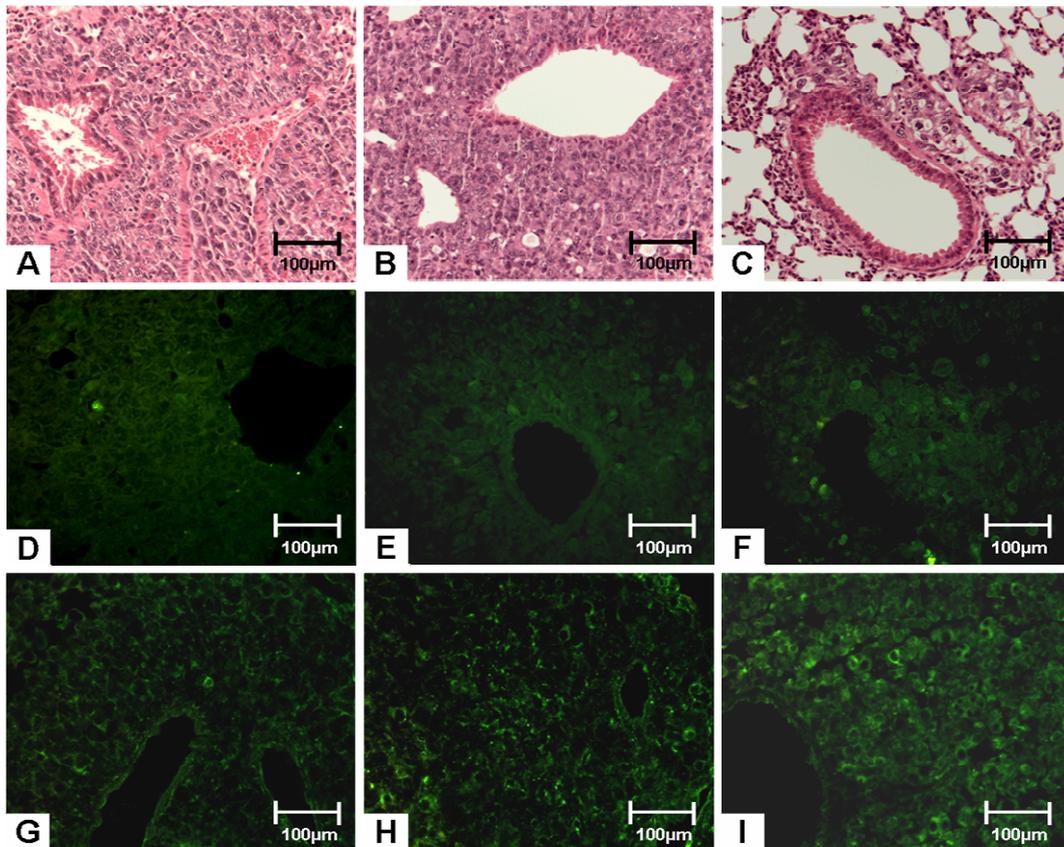
Bei den H&E gefärbten Lungenschnitten zeigte sich bei den hybridtherapierten Mäusen ein normales Lungengewebe mit wenigen kleinen metastatischen Tumoren im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen (Abb. 15A, B, C). Zusätzlich war die Anzahl an apoptotischen Zellen erhöht, wie die mikroskopischen Bilder der TUNEL-Färbungen zeigten (Abb. 15D, E, F). Auch die CD3-Expression in den Lungenschnitten der Hybridtherapiegruppe war gesteigert (Abb. 15G, H, I). Eine gesteigerte Zelldichte konnte bei den Milzschnitten der Hybridtherapiegruppe beobachtet werden (Abb. 16A, B, C), bei gleichzeitigem deutlichen Überwiegen der CD3⁺ Zellen (Abb. 16G, H, I). In den Milzschnitten aller drei Gruppen konnten nur sehr selten apoptotische Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16D, E, F).

Abb. 14: Histopathologischer Befund des Tumors nach der Kombinationstherapie



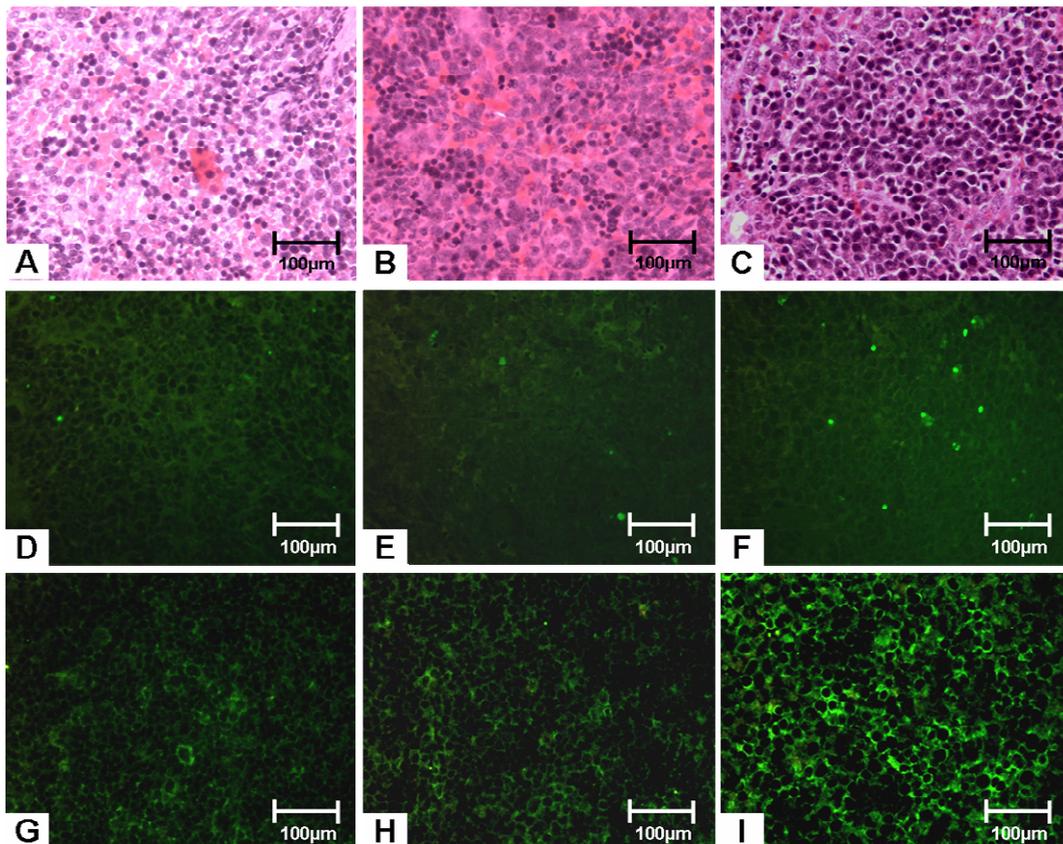
A bis C: 3µm dicke, H&E-gefärbte Tumorschnitte von (A) LLC1, (B) DZ-Kombinationstherapie oder (C) Hybridkombinationstherapie. D bis F: Färbung der Tumorschnitte mit “terminal transferase uridyl nick end-labelling” (TUNEL). Abb. (D) LLC1, (E) DZ-Kombinationstherapie oder (F) Hybridkombinationstherapie. Die Hybridkombinationstherapie-Gruppen-Tumorschnitte zeigten eine gesteigerte Zahl an apoptotischen Zellen. G bis I: Die Tumorschnitte wurden mit CD3-T-Zell-Marker markiert. Die mit (G) LLC1, (H) DZ-Kombinationstherapie oder (I) Hybridkombinationstherapie behandelten Gruppen zeigten in den Tumorschnitten eine gesteigerte Zahl CD3-+ Zellen.

Abb. 15: Histopathologischer Befund der Lungenmetastasierung nach Kombinationstherapie



A bis C: 3 µm dicke, H&E- gefärbte Lungenschnitte von (A) LLC1, (B) DZ- Kombinationstherapie oder (C) Hybridkombinationstherapie. Hybridkombinationstherapiegruppen Lungenschnitte zeigten weniger metastatische Tumore. D bis F: Die Lungenschnitte wurden mit TUNEL-Markern gefärbt (D) LLC1, (E) DZ-Kombinationstherapie oder (F) Hybridkombinationstherapie. Die Lungenmetastasen der Hybridkombinationstherapiegruppen zeigten eine gesteigerte Anzahl an apoptotischen Zellen. G bis I: Lungenschnitte gefärbt mit CD3 T-Lymphozytenmarkern (G) LLC1, (H) DZ-Kombinationstherapie oder (I) Hybridkombinationstherapie. Die Gruppe der hybridkombinationstherapierten Tumore zeigten mehr CD3+-Zellen

Abb. 16: Histopathologischer Befund der Milz nach Kombinationstherapie



A bis C: 3 µm dicke H&E- gefärbte Milzschnitte von (A) LLC1, (B) DZ- Kombinationstherapie oder (C) Hybridkombinationstherapie. Die Milzschnitte der Hybridkombinationstherapiegruppen zeigten eine gesteigerte Zelldichte. D bis F: Die Milzschnitte wurden mit TUNEL Färbung gefärbt (D) LLC1, (E) DZ- Kombinationstherapie oder (F) Hybridkombinationstherapie. G bis I: Die Milzschnitte wurden gefärbt mit CD3-T-Zellmarkern (G) LLC1, (H) DZ-Kombinationstherapie oder (I) Hybridkombinationstherapie. Die Milzschnitte der Hybridkombinationstherapiegruppen zeigten eine gesteigerte Zahl an CD3+-Zellen.

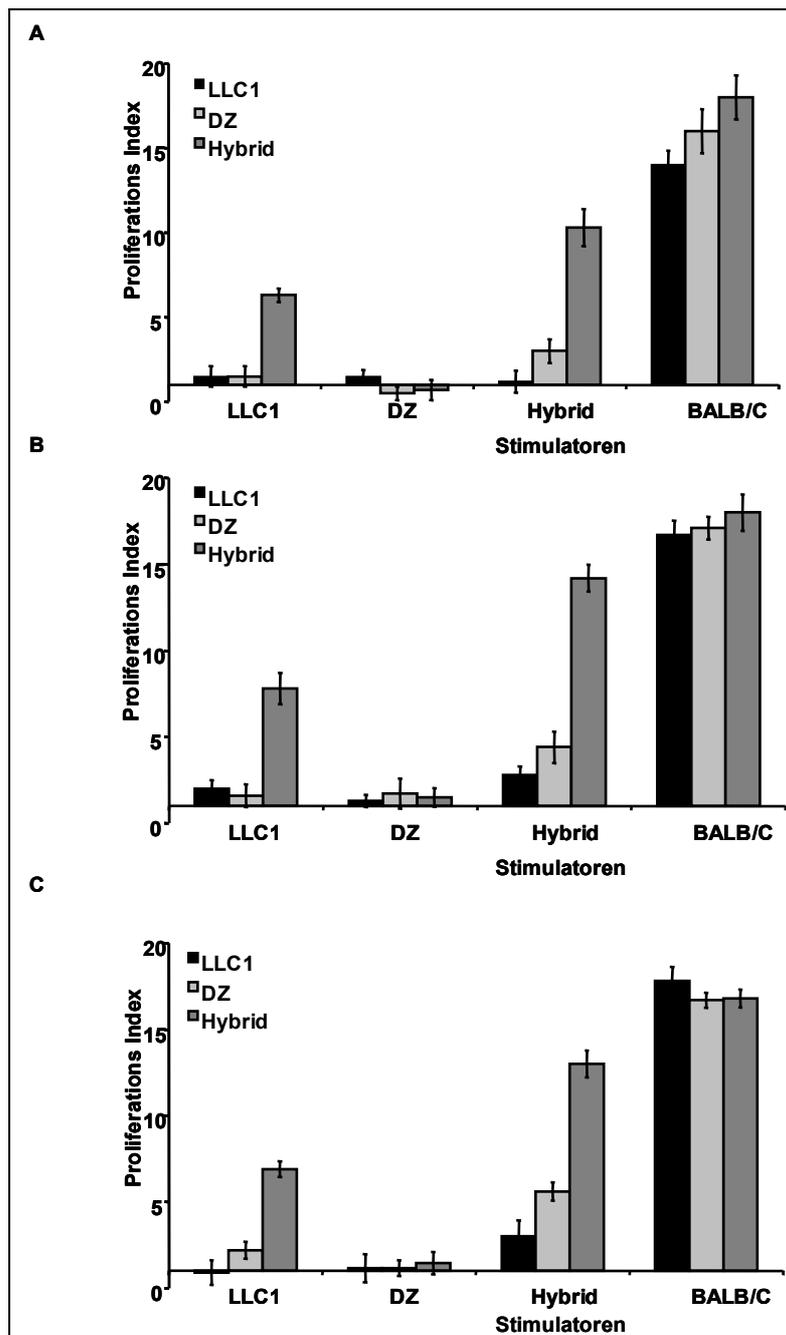
5.6.3 Analyse des Proliferationstests nach Kombinationstherapie

Um die Proliferationsfähigkeit und die Induktion einer LLC1-spezifischen zytotoxischen Reaktion durch T-Lymphozyten zu messen, wurden den therapierten Mäusen MZ/LKZ entnommen. Die MZ/LKZ aus jeder Therapiegruppe wurden an Tag 8, 11 und 28 gewonnen. Wie die Abb. 17 A, B und C zeigen, konnte bei den T-Lymphozyten, die aus hybridtherapierten Mäusen gewonnen wurden, eine gesteigerte proliferative Kapazität gegenüber LLC1, DZ und Hybridstimulation, mit deutlicher Betonung der Hybridstimulation, festgestellt werden.

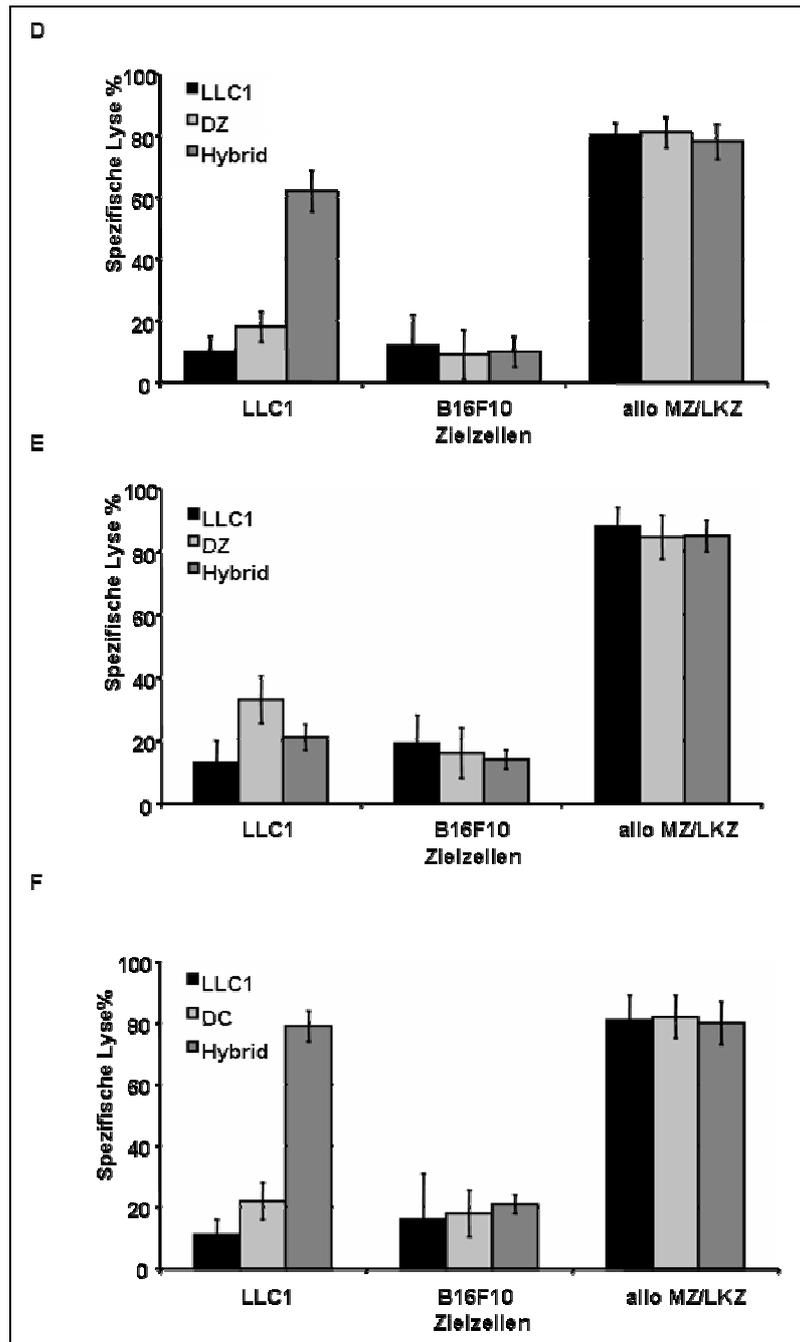
5.6.4 Analyse des Zytotoxtests nach der Kombinationstherapie

Die Induktion einer LLC1-spezifischen Zytotoxizität wurde gegenüber LLC1-Tumorzellen, B16/F10-Zellen (alternativer Tumor) oder allogenen Lymphozyten von BalbC-Mäusen getestet (Abb. 17D, E, F). Es zeigte sich lediglich eine zu vernachlässigende Zytotoxizität gegenüber LLC1- und B16/F10-Tumorzellen bei den T-Zellen der Mäuse, die mit DZ-Kombination behandelt worden waren. Im Gegensatz hierzu töteten die T-Lymphozyten, die von hybridtherapierten Mäusen stammten, spezifisch LLC1-Tumorzellen und keine B16/F10-Tumorzellen.

Abb. 17: Proliferations- und Zytotox-Testergebnisse der Kombinationstherapie



A-C zeigen die proliferative Aktivität von MZ und LKZ, die aus Mäusen gewonnen wurden, die mit LLC1, DZ-Kombinationstherapie oder Hybridkombinationstherapie behandelt wurden. MZ/LKZ wurden zum einen mit LLC1 Tumorzellen, DZ, Hybriden oder allogenen Lymphozyten (Balb/c) in Kultur genommen. Die proliferative Aktivität wurde über die ^3H Thymidininkorporation der MZ/LKZ bestimmt, nach (A) der ersten Kombinationstherapie (Tag 8), (B) zweiten Boosterkombinationstherapie (Tag 11) und (C) am Ende des Behandlungsprotokolls (Tag 28). Die Daten sind als Mittelwerte aus drei Kulturansätzen \pm Standardabweichung des Proliferationsindex (cpm der Testwell/cpm der Kontrolle) dargestellt.



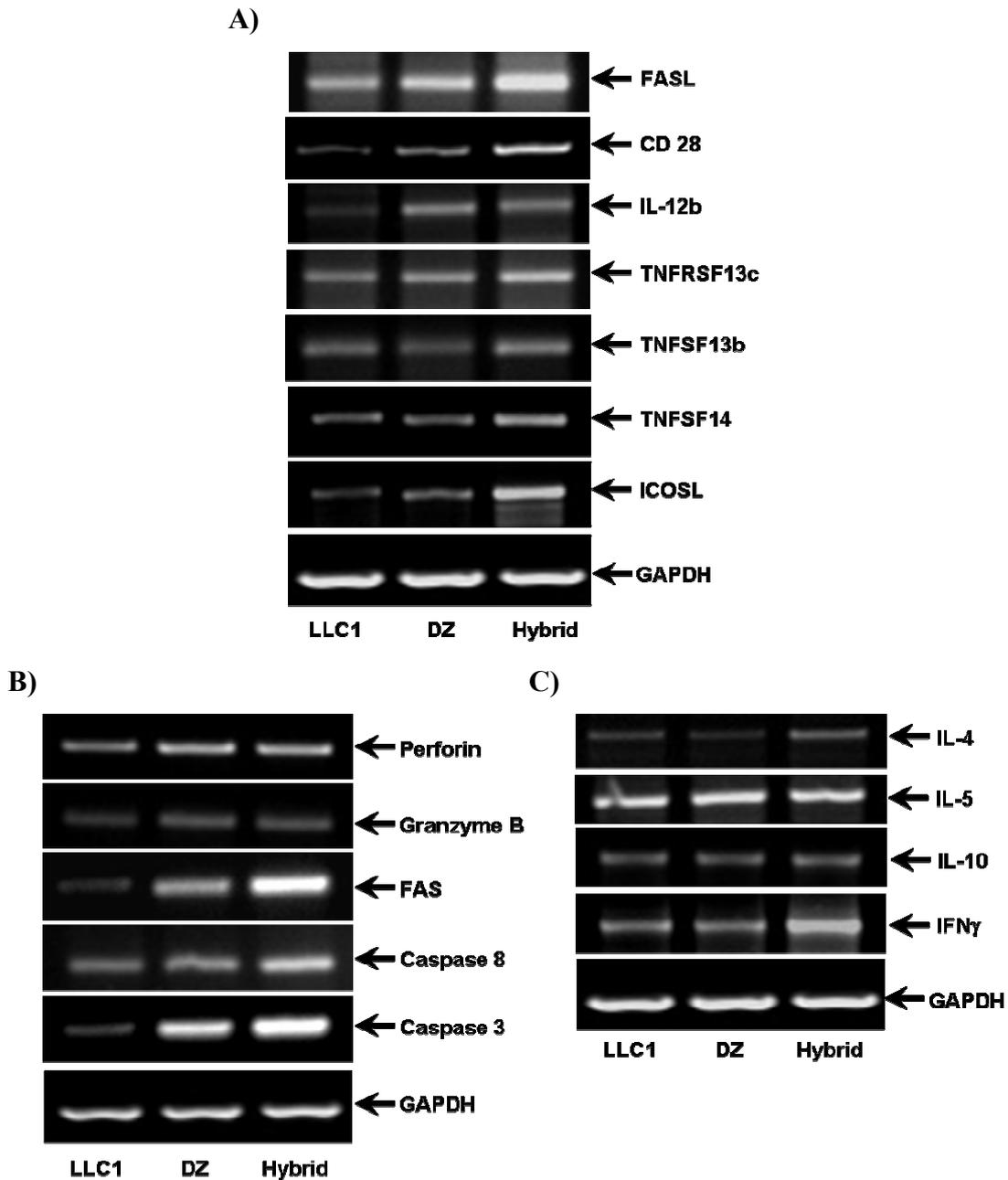
D-E zeigen die zytotoxischen Fähigkeiten der ZTL, die aus MZ/LKZ von Mäusen gewonnen und die wie oben beschrieben behandelt wurden. Die Messung erfolgte gegen LLC1-Zellen, syngene B16/F10-Tumorzellen und allogene (BALB/c) Lymphozyten in einem Effektor/Target-Verhältnis von 40:1. Die durchschnittlichen Lysewerte aus vier verschiedenen Experimenten sind dargestellt für **(D)** die erste Kombinationstherapie (Tag 8), **(E)** zweite Boosterkombinationstherapie (Tag 11) und **(F)** am Ende des Behandlungsprotokolls (Tag 28).

5.6.5 Die Aktivität der Lymphozyten-Proliferations- und Apoptose-Gene in RT-PCR nach der Kombinationstherapie

Das Expressionsprofil der T-Zellproliferations- und Apoptosegene wurde mit semiquantitativen RT-PCR-Analysen bestimmt. Die m-RNA-Spiegel von ZTL-Aktivierungs-, Differenzierungs- und Proliferationsgenen (CD28, ICOL, IL12b, TNFSF13c, TNFSF14) waren in Milzen von Tieren, die mit Hybridkombinationstherapie behandelt worden waren, im Vergleich zu Milzen von DZ-Kombinationstherapie oder LLC1-Therapie-Mäusen, hoch reguliert (Abb. 18A). Weiterhin waren ZTL-assoziierte, proapoptische Gene, wie z.B. Perforin, Granzym B, FAS, FASL, Caspase 8 und 3 in den Tumorzellen von hybridtherapierten Mäusen, im Vergleich zu Kontrollgruppentumoren, hoch reguliert (Abb. 18B). Bei den Tieren der Hybridkombinationstherapiegruppe wurde das mit Typ 1 assoziierte Zytokin INF, nicht aber die mit Typ 2 assoziierten Zytokine IL-4, 5 und 10, gesteigert produziert (Abb. 18C). Die Expression der Gene wurde im Vergleich zur Expression von GAPDH standardisiert.

Abb. 18: Semiquantitative RT-PCR-Analyse

Dargestellt sind repräsentative semi-quantitative RT-PCR-Analysen von T-Lymphozyten-, Proliferations-, Aktivations- und Apoptosegenen und der mRNA-Level von jedem Gen.



(A) T-Zell Proliferationsgene (CD28, ICOSL, IL-12b, TNFRSF13c, TNFSF13b, TNFSF14 und FASL in der Milz.

(B) Apoptose Gene, Perforin, Granzym B, FAS, Caspase 8 und Caspase 3 im Tumor.

(C) IL4, IL5, IL10 und IFN γ in der Milz. Die Ausprägung jedes mRNA-Genes ist relativ zur GAPDH Ausprägung dargestellt. Es werden die Ergebnisse der LLC1-, DZ/LLC1-Kombinationstherapie und der Hybridkombinationstherapie dargestellt.

6 Diskussion

Aufgrund ihrer überragenden Fähigkeit, eine antigenspezifische Immunität hervorzurufen, sind DZ eine hervorragende Basis für die Etablierung einer Immuntherapie gegen Krebs [Nestle FO, 1998; Mayordomo JI, 1995].

Die Induktion einer Anti-Tumor-Immunität durch DZ hängt vom Reifegrad der DZ ab [Labeur MS, 1999]. Durch die Aktivierung der DZ wird die Reifung induziert, was zu einer Abnahme der Antigenprozessierung und zu einer gesteigerten Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischer Faktoren führt. Diese reiferen DZ sind in der Lage in lymphatische Organe zu wandern, um Kontakt zu naiven T-Lymphozyten aufzunehmen und mit diesen zu interagieren. Obwohl sich ihre Apoptose in situ eher zu schnell vollzieht, geben sie ihre Antigene an endogene unreife DZ weiter, was nachfolgend zu einer Verstärkung der T-Zell-Reaktion führt [Kleindienst P, 2003].

Mögliche Gründe einer erfolglosen Immunreaktion gegen Tumorgewebe sind insuffizientes Antigenprozessing, die insuffiziente Antigenpräsentation von Tumorzellen, die Reduktion von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche und der Mangel an kostimulatorischen Signalen [Marincola FM, 1994; Restifo NP, 1996; Seliger B, 1996]. Zur Überwindung dieses Fehlers im Immunsystem sind viele Therapiestrategien entwickelt worden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit DZ, welche apoptotische Tumorzellen phagozytiert hatten, einen starken therapeutischen Einfluss auf tumortragende Individuen hat. Dieser Effekt beruht sowohl auf der Stimulation durch MHC-Klasse-II Moleküle als auch auf MHC-Klasse-I restringierten, zytotoxischen T-Lymphozyten [Henry F, 1999].

Das einfache Mischen von DZ mit Tumorzellen stellte sich für die Induktion einer Antitumorimmunität als wenig effektiv heraus, da es nur eingeschränkt zu einer Aufnahme der Tumorantigene kam [Wang J, 1998]. Aktuelle Studien zeigen, dass die Fusion von Tumorzellen mit DZ eine effizientere Methode ist, eine durch autologe T-Zellen vermittelte Immunantwort gegenüber dem Tumor hervorzurufen, da mit der Fusion das genetische Material der Tumorzelle in die DZ eingeschleust werden kann. Bei der Fusion kommt es über eine Zellverschmelzung zu einem kompletten Austausch der genetischen Information und zu einer vollständigen Präsentation von sowohl exogenen als auch endogenen Tumorantigenen. Die Funktionen der DZ bleiben vollständig erhalten. Die Fusion von Tumoren mit DZ verleiht nicht nur eine kurzweilige Immunität, sondern sie

stellt auch eine bleibende Quelle von Tumorantigenen dar, die in einem für die Präsentation optimalen Zustand vorliegen [Kuriyama H, 2004]. Dieser Umstand erleichtert die Bildung polyklonaler Effektor-Subpopulationen, die nicht nur auf ein Epitop des Tumorantigens reagieren, sondern ein breites Spektrum an Antigenen abdecken können [Gong J, 1997]. Hybride können potenziell als Transporter für Tumorantigene dienen. Hierzu müssen degenerierte Hybride von DZ oder Langerhanszellen durch Phagozytose aufgenommen werden.

6.1 In vitro gewonnene Daten zeigen funktionsfähige Hybride

6.1.1 Durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Daten bestätigen eine erfolgreiche Fusion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die hergestellten Hybride aus DZ und den autologen wenig immunogenen LLC1-Tumorzellen die ganze funktionelle Potenz von DZ aufweisen. Es konnten keine Hinweise gefunden werden, dass die Fusion, entweder durch den Fusionsprozess bedingt oder durch die Integration der LLC1-Zellen, irgendeinen schädigenden oder gar toxischen Effekt auf die antigenpräsentierenden und kostimulatorischen Eigenschaften des Fusions-Produktes hat. Die Bestimmung des Phänotyps der Fusionszellen im Durchflusszytometer zeigte sowohl eine Expression von MHC-Klasse-II Molekülen, CD11c und B7.1 als auch eine Markierung mit dem Membranmarker PKH-67, womit die LLC1-Tumorzellen vor der Fusion angefärbt wurden. Durch die Bestimmung der Rate an doppelpositiven Zellen konnte die Rate an Hybriden bestimmt werden.

Mittels Fluoreszenzmikroskop wurde die Fusion, durch eine Markierung mit PKH- 67 (LLC1) und PKH-26 (DZ), überwacht. Wir konnten sowohl einfach positive DZ, LLC, als auch doppelt positive Hybride beobachten. Auch ließen sich morphologische Veränderungen beobachten: zunächst waren die Hybride unregelmäßig mit beiden Farbstoffen bedeckt, 24 Stunden später zeigten sie eine homogene Struktur. Zusätzlich konnten wir nach der Fusion Kernpolymorphismen feststellen. All diese Beobachtungen bestätigen die sehr gute Funktionsfähigkeit der verwendeten Methode.

6.1.2 Bestätigung der T-Zellproliferation durch Hybride

Die Proliferation der Lymphozyten gegenüber den Stimulatorzellen wurde nach jedem Therapieabschnitt beurteilt und verglichen. Es konnte gezeigt werden, daß die Stimulation durch die Hybride in vitro den stärksten Wachstumsreiz für T-Lymphozyten darstellt. Die hybridstimulierten T-Lymphozyten reagieren am stärksten auf alle Wachstumsstimuli, wobei der nach den Hybriden stärkste Stimulus von LLC1-Tumorzellen ausging. Dies impliziert, dass der Kontakt mit den DZ allein bereits eine Aktivierung der T-Lymphozyten auslöst. Diese Aktivierung ist jedoch unspezifisch. Erst der Antigenkontakt in Form der LLC1-Zellen löst eine spezifische Aktivierung aus. Weder der DZ/LLC1-Mix, noch die Lysatbehandlung konnte eine stärkere Aktivierung oder Proliferation hervorrufen. Die Kontrollen (Lymphozyten, die vorher mit DZ, LLC1-Tumorzellen, LLC1/DZ-Mischung, LLC1/DZ-Lysat oder PBS Immunisiert worden waren) zeigten eine indifferente Proliferation gegenüber allen Stimulatoren. Die Immunisierung mit DZ/LLC1 Mischung oder DZ/LLC1 Lysat scheint eine leichte Proliferation zu induzieren, die im Gegensatz zur durch Hybride hervorgerufenen Proliferation gering ist.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Hybridstimulation gegenüber den anderen Therapieformen in der Induktion einer spezifischen T-Zell Proliferation deutlich überlegen ist. Die durch Stimulation mit Hybriden hervorgerufene starke Proliferation tumorspezifischer Lymphozyten bestätigt die Potenz unserer Hybride, eine signifikante Immunreaktion gegenüber LLC1-Tumoren zu induzieren.

6.1.3 Hybrid-aktivierte T-Zellen zeigen im Zytotoxtest das größte zytotoxische Potenzial

Nur die hybridstimulierten T-Zellen waren in der Lage, effektiv native LLC1-Tumorzellen zu lysieren. Die Spezifität dieser Reaktion wird dadurch deutlich, dass die T-Lymphozyten der hybridstimulierten Mäuse nur in der Lage sind LLC1-Tumorzellen zu lysieren. Allogene B16/F10-Tumorzellen können nicht lysiert werden. Die als Positivkontrolle fungierenden allogenen Mäuselymphozyten waren im Sinne einer „mixed lymphocyte Reaktion“ (MLR) in allen Gruppen in der Lage, eine zytotoxische Reaktion auszulösen. Die nach Vakzinierung entnommenen T-Zellen zeigen einen stärkeren zytotoxischen Effekt gegenüber den LLC1-Tumorzellen als gegenüber den allogenen BALBc MZ und LKZ. Eine weitere Beobachtung zeigt, dass in den tumortragenden,

nicht hybridimmunisierten Tieren, die Reaktion gegenüber allogenen BALBc-T-Zellen abnimmt. Dies deutet auf tumorinduzierte Immundefizienz hin. Dass dieser Umstand nicht in den hybridimmunisierten Mäusen zu beobachten war, ist ein Hinweis für die Überwindung der tumorinduzierten Immundefizienz durch eine Injektion mit Hybriden.

6.2 Unterschiedlicher Erfolg der Therapieverfahren in vivo

In unseren Untersuchungen haben wir die Anti-Tumor-Wirkung, die durch Hybride induziert wird, auf vier verschiedenen Wegen überprüft: Sie umfassen die protektive Immunisierung, die Vakzinierung, die adoptive Therapie mit hybridaktivierten Lymphozyten und eine Kombination aus Hybridtherapie und adoptiver Therapie.

6.2.1 Immunisierung löst Anti-Tumor-Immunität aus

In der Tiergruppe, die zum Ziel der Tumorprotektion mit Hybriden immunisiert wurde, stellten wir unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten und unterschiedliche Tumorgößen fest. Nur die mit Hybriden immunisierten Mäuse entwickelten teilweise eine Schutzimmunität gegenüber der Animpfung von LLC1-Tumoren. Dies korrespondiert mit der verstärkten proliferativen und zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten in vitro, welche aus Hybrid-immunisierten Mäusen gewonnen und gegen naive LLC1-Tumorzellen getestet wurden. Begleitet wurde die Immunantwort von einer gesteigerten Genexpression einiger Mitglieder der Interferon-Alpha-Familie (Gene B, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 und 11), der TNF-Superfamilie 13 und Interleukin 2, 7 und 13 im Blut von HZ-immunisierten Mäusen. Wir konnten diese Ergebnisse in unabhängigen RT-PCR Analysen bestätigen. Im Gegensatz zeigten Tiere, die mit LLC1, DZ, DZ/LLC1 Mischung, DZ/LLC1 Lysat und PBS immunisiert wurden, keine ausreichende T-Zell vermittelte Antitumoraktivität gegenüber LLC1-Tumorzellen. Die Lymphozyten, die von hybrid-immunisierten Mäusen stammten, zeigten keine Varianz in ihrer proliferativen und zytotoxischen Kapazität, im Vergleich zu den Ergebnissen der Kontrollgruppen. Diese Feststellung legt nahe, dass eine maximale Aktivierung der einzelnen Lymphozyten durch die Hybridstimulation hervorgerufen werden konnte. Darüber hinaus ist von einer vollständigen Aktivierung aller T-Zellen auszugehen. Die T-Zellen sind also nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ voll aktiviert.

6.2.2 Vakzinierung bewirkt verringertes Tumorwachstum

In vorangegangenen Studien therapeutischer Vakzinierungen mit Tumorextrakten wurde eine Verzögerung der Sterblichkeit auch nach der Immunisierung mit nicht Tumorantigen gepulsten DZ beobachtet. Dieser Effekt wird durch die Induktion von spezifischen CD8+-T-Zellen hervorgerufen [Yang S, 1997]. Wir konnten in unseren Experimenten eine durch HZ-Vakzinierung bedingte, lang wirksame, deutliche Reduktion des Tumorwachstums dokumentieren. Im Vergleich dazu fand sich ein geringerer Effekt der Vakzinierung mit nicht tumorbeladenen DZ oder mit Tumorlysate beladenen, aber nicht fusionierten DZ. Dies bestätigt die von Shimizu et al. beschriebenen Resultate von Versuchen mit therapeutischen Vakzinen [Shimizu K, 2004].

Die protektive Immunität gegenüber LLC1-Tumorimpfung, die durch die vorhergegangene Immunisierung mit HZ ausgelöst wird, ist möglicherweise abhängig von der injizierten Menge an Tumorzellen. Dieser Umstand könnte die unterschiedlichen Ergebnisse des Immunisierungs- und des Vakzinierungstherapieansatzes erklären. Es ist bereits bekannt, dass reife DZ weniger aktiv Antigene prozessieren und dafür ihre T-Zellaktivierungsfähigkeit stärker ausgeprägt ist [Labeur MS, 1999]. Diese Eigenschaft könnte sich als vorteilhaft erweisen, wenn es um das Eindringen in die T-Zellregionen nach dem ersten Antigenkontakt (bei der Booster Injektion) geht. Die zusätzliche Fähigkeit der Aufnahme von Tumorantigenen und deren Präsentation, gegenüber nicht aktivierten oder nur durch autologe DZ aktivierten T-Zellen in vivo, stellt eine Alternative dar. Die festgestellte Kapazität der HZ, Tumorantigene zu prozessieren und zu präsentieren, wurde auch durch die Feststellung bestätigt, dass eine Vakzinierung eine spezifische Aktivierung von ZTL gegen LLC1 Tumorzellen in vitro hervorruft.

Auch in der Überlebenskurve zeigt sich ein deutlicher Vorteil für die hybridvakzinieren Mäuse. Diese hatten eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 81 % gegenüber 24% bei LLC1 Kontrolltherapiemäusen, bzw. 33% gegenüber DZ-Kombinationstherapiemäusen ($p < 0.05$ gegen LLC1 und $p < 0.05$ gegen DZ/LLC1-Mischung).

6.2.3 Adoptive Therapie zeigt deutlich stärkeren Anti-Tumor-Effekt

Der adoptive Transfer von durch HZ-aktivierten T-Zellen verbessert, im Vergleich zu T-Zellen anderer Herkunft, die therapeutische Effektivität gegenüber einem bereits wachsenden Tumor. Es fand sich ein deutlich reduziertes Tumorwachstum mit durchschnittlich 48 % im Vergleich zur Kontrolle mit PBS Injektionen (mit $p < 0,05$). Die be-

obachtete höhere Zytotoxizität gegenüber naivem LLC1-Tumor wurde durch die höhere Zahl der murinen T-Zellen hervorgerufen, die zuvor durch die adoptive Therapie aktiviert worden waren. Die Beobachtung von Milzvergrößerungen legt eine gesteigerte Population von tumorsuppressorischen T-Lymphozyten nahe. Dies konnten wir in unseren histologischen Analysen der hypertrophierten Milzen bestätigen. Sowohl die drastische Hypertrophie [Kjaergaard J, 2003], als auch die therapeutische Effizienz einer adoptiven T-Zell-Therapie, gegenüber etablierten, soliden Tumoren [Wang J, 1998], wird bereits durch veröffentlichte Ergebnisse postuliert. Eine mögliche Ursache der fehlenden Überlegenheit der HZ-Vakzinierung gegenüber der adoptiven Therapie könnte sein, dass die erforderliche Zahl an HZ den Lymphknoten nicht erreicht oder dass ihre Halbwertszeit zu gering ist [Morse MA, 1999]. Die toxischen Effekte gegenüber den Tumorzellen basieren hauptsächlich auf CD8+-T-Lymphozyten. Aber auch CD4+-T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) scheinen bei den zytotoxischen Vorgängen eine Rolle zu spielen. Frühere Studien unterstützen diese Beobachtungen durch die Feststellung, dass durch die Eliminierung von CD4+- oder CD8+-Wirts T-Zellen, die Funktion der Hybride aufgehoben wird [Kjaergaard J, 2003]. Die Aktivierung der NK durch HZ wird wahrscheinlich eher durch CD4+-Zellen als direkt durch DZ vermittelt. NK die als Bestandteil der angeborenen Abwehr auf das Fehlen von MHC-Molekülen reagieren („missing-self-Hypothese“) werden hierbei durch Zellmediatoren aktiviert, die von CD4+-Zellen sezerniert werden [Klärre K, 1985]. Eine Interaktion von CD40-Ligand mit T-Zellen und von CD40 mit DZ kann eine IL-15 Produktion bei den DZ induzieren. Möglicherweise kann dieser Umstand zur Unterstützung einer Therapie mit adoptiv gegebenen ZTL oder zur Verbesserung einer vorhandenen natürlichen Abwehrreaktion genutzt werden.

Wenn man die verschiedenen bisher untersuchten Tumorimmuntherapien betrachtet, kann man zu dem Schluss kommen, dass die Tumorzellen selbst oder tumorinfiltrierte Lymphozyten (TIL) in der Lage sind, eine Ausschüttung von immunsuppressiven Faktoren hervorzurufen. In Frage kommen hier Transforming-Growth-Faktor-beta-1 (TGF- β 1), Interleukin-10 (IL10) und Prostaglandin E2 (PGE2), welche einen inaktivierenden Einfluss auf die T- und NK- Zellen des Wirtes haben [Henry F, 1999]. Im Gegensatz hierzu scheinen fusionierte Zellen keinen immunsuppressiven Einfluss zu haben [Tanaka H, 2002]. Darüber hinaus kann IL-12 benutzt werden, um eine Vakzinierung zu unterstützen [Hayashi T, 2002]. Wenn die suppressiven Zellen fehlen, kann die immunologische Aktivität der CD8+-T-Zellen ansteigen und in der Lage sein, den Tumor abzu-

stoßen [Terabe M, 2003]. All diese Feststellungen legen nahe, dass die Vakzinierung mit Hybriden die immunosuppressorischen Faktoren soweit reduziert, dass es zu einem Anstieg von ZTL kommt und diese eine aktive Tumorabwehrreaktion hervorrufen.

6.2.4 Kombination aus Adoptiver Therapie und Vakzination hat den größten Erfolg

Die Wirksamkeit der Vakzinierung mit Hybriden aus Tumorzellen und dendritischen Zellen oder der adoptiven Gabe von aktivierten T-Lymphozyten hat bisher die meisten Erwartungen nicht erfüllt [Kawada M, 2003; Wang J, 1998].

In der vorliegenden Schrift kann die hohe Wirksamkeit der Kombination aus wiederholter Hybridvakzinierung, gefolgt von adoptivem Transfer von hybridstimulierten T-Lymphozyten gezeigt werden. Diese führt zu einem hoch effektiven und persistierenden Schutz vor Tumorwachstum. Im Vergleich mit den DZ oder LLC1-Zellvakzinierungen im selben Tumormodell kann eine Verlangsamung des Tumorwachstums um 83% ($p < 0,05$ gegenüber LLC1 und $p < 0,05$ gegenüber DZ) erzielt und die Überlebensrate ungefähr verdreifacht werden. Das Ausstreuen von Tumormetastasen durch das LLC1 Karzinom, kann durch die Kombinationstherapie signifikant (70% mit $p < 0,05$ gegenüber LLC1 und $p < 0,05$ gegenüber DZ) verhindert werden.

Die Kombinationstherapie scheint ein günstiges, anhaltendes Umfeld für die Vermehrung von tumorspezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten zu schaffen. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, die eine Überexpression von löslichen T-Zellwachstumsfaktoren und proinflammatorischen Mediatoren (IL-2, IL-7, TNF- α und IFN- α) bei kombinationstherapierten Mäusen zeigten.

Die funktionelle Einschränkung einer alleinigen adoptiven T-Zelltherapie ist durch deren limitierte Expansionsfähigkeit in vivo, die herabgesetzte Funktion in vivo, die verkürzte Überlebensspanne der T-Zellen und die häufig beobachtete ineffiziente Invasion am Zielort bedingt [Foster AE, 2006; Knutson KL, 2002]. Die Überlebensspanne ist durch den programmierten Zelltod der gegebenen ZTL limitiert. Außerdem wird die Fähigkeit der ZTL Tumore zu zerstören herabgesetzt [Snyder JT, 2003]. DZ-Tumorzellhybride besitzen nicht nur Eigenschaften der DZ, sondern stellen auch eine bleibende Quelle an endogenen Tumorantigenen dar [Kuriyama H, 2004]. Dieser Umstand erleichtert die Einbeziehung polyklonaler Effektor-Subpopulationen in die Reaktion, nicht nur gegenüber einzelner Determinanten, sondern auch gegenüber einem mög-

lichst breiten Spektrum an Tumor Epitopen [Gong J, 1997]. Die bekannte Fähigkeit reifer DZ T-Zellen stärker zu aktivieren spielt eine wichtige Rolle beim „Boosting“ nach dem ersten Antigenkontakt. Infolgedessen wird angenommen, dass die Wiederholung der Kombinationstherapie die Expansion und die Polyklonalität sowohl der transferten, als auch der vor Ort aktivierten tumorspezifischen T-Zellen in vivo steigert. So könnte es zu einer Bildung von zytotoxischen Gedächtniszellen kommen. Folglich stellt unsere Kombinationstherapie eine Möglichkeit dar, alle oben genannten Schwierigkeiten zu überwinden. Sie ist in der Lage, die Probleme die sowohl mit der Vakzinationstherapie, als auch mit der adoptiven Therapie verbunden sind, zu lösen.

Diese Hypothese wird durch die Beobachtung des Anstieges der CD3+-Zellen in den Tumoren, in den metastatischen Läsionen und in den Milzen der Mäuse unterstützt. Dass die Expansion und Aktivierung der T-Zellen dem Tumor gegenüber zielgerichtet war, konnte in Proliferations- und Zytotoxversuchen eindrucksvoll demonstriert werden. Hier zeigten die T-Zellen eine gegenüber dem Tumor deutlich selektive Aktivität. Wir schließen aus unseren Experimenten, dass die effektivsten T-Zellpopulationen jene sind, welche sowohl ZTL als auch TH beinhalten. Es ist nicht überraschend, dass die stärkste Reaktion bei der Hybridkombinationstherapie gemessen werden konnte. Andererseits kann gezeigt werden, dass eine Vakzinierung die Bildung regulatorischer T-Zellen und das so genannte „Tumor-Trafficking“ fördert, statt die selektive Funktion der gegen den Tumor gerichteten Zellen zu verbessern [Zhou G, 2006]. Tumore sind in der Lage, DZ in TGF-Beta-exprimierende unreife DZ zu konvertieren. Diese vermitteln eine Proliferation von CD8+-, CCR7+-, IL-10+- sowie regulatorischen-T-Zellen [Ghiringhelli F, 2005]. Dieses Phänomen liefert eine mögliche Erklärung für unsere Feststellung unterschiedlicher, apoptotischer Raten zwischen Primärtumor und Metastase. Das wird durch die Beobachtung einer vermehrten Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen in den Tumoraläsionen von Patienten bestätigt [Viguier M, 2004]. Trotzdem reduziert die Hybridkombinationstherapie die Lungenmetastasierung signifikant und wird von einem leichten Anstieg der Apoptose und der T-Zellinfiltration des Tumorgewebes begleitet. Obwohl zuvor angenommen wurde, daß Fusionszellen therapeutisch effektiv gegenüber Lungenmetastasen wären, ist dies nur für die Fusion mit genetisch modifizierten Tumorzellen beschrieben [Cao X, 1999; Wei Y, 2006].

In der vorliegenden Schrift wird es als wahrscheinlich betrachtet, dass die Steigerung der kostimulatorischen Moleküle auf die zirkulierenden Effektor-Zellen (TH, ZTL, B-Zellen, DZ, Makrophagen etc.), inklusive der Mitglieder der B7 Familie (ICOS-Ligand,

CD28) und der TNF/TNFR Familie (TNFSF13a, TNFSF13b, TNFSF14 und FASL) zur Eradikation sowohl des Primärtumors, als auch der Metastasen beiträgt.

Demnach hat das kurze „priming“ und die adäquate T-Zellaktivierung durch Hybride dazu beigetragen, den durch Aktivierung induzierten Zelltod (Aktivation Induced Cell Death / AICD) der T-Zellen im späten Stadium zu verhindern.

Bezüglich der Rolle der hohen Expression von CD28 nehmen wir an, dass es die TZR-vermittelte Aktivierung und Proliferation steigert und ICOS zur Feinabstimmung der Effektor-T-Zell-Differenzierung anregt [Coyle AJ, 2000; Sharpe AH, 2002; Berkel ME van, 2006]. Es wird angenommen, dass die Hochregulation von „Inducible costimulators“ (ICOS) und CD28 bestehende Anti-Tumorreaktionen des Immunsystems boostert. Interessanterweise führt die Beteiligung sowohl von ICOS als auch von CD28 mit ihren Liganden gleichzeitig zu einer Steigerung von IFN- γ , nicht jedoch von IL-10 (Abb. 7). Beide Vorgänge führen zu einer Aktivierung von TH1-Zellen in vakzinierten, tumortragenden Mäusen.

Die Effektor-ZTL benötigen zur Aktivierung TH-Zellen und das von TH-Zellen sezernierte IL2. Darüber hinaus fördern sie die Proliferation von regulatorischen T-Zellen und deren Suppression [Antony PA, 2005]. Umgekehrt löst ein gesteigerter Spiegel an Mediatoren der TNF-Super-Familie eine verstärkte T-Zell-Aktivierung aus und sendet so genannte „Homing-Signale“. Dies initiiert zytolytische Reaktionen und eine Suppression von regulatorischen T-Zellen. Dass ZTL eine entscheidende Rolle bei der Tumorregression in vivo wahrnehmen ist unbestritten. Die genaue Zusammensetzung der T-Zellsubpopulationen ist jedoch genauso wichtig für den therapeutischen Einsatz in vivo und wurde noch nicht abschließend identifiziert. In vorangegangenen Studien wurden zwei Hauptwege etabliert, mit denen ZTL in der Lage sind, Zellen zu lysieren. Diese beruhen zum einen auf Perforin zum anderen auf FASL [Berke G, 1997; Lowin B, 1994]. Ein gesteigerter IFN- γ Spiegel bei den kombinationstherapierten Tieren verstärkt die Reaktion der Typ1- und Typ2-CD8⁺-T-Zellen. Typ1-T-Zellen sezernieren hauptsächlich INF- γ und töten Zellen entweder auf einem Perforin oder FAS-vermittelten Weg. Typ2-CD8⁺ T-Zellen sezernieren vorzugsweise IL4, IL5 und IL10 und töten auf einem Perforin-vermittelten Weg [Coyle AJ, 2000; Watts TH, 2005]. Diese Annahme wird unterstützt durch die Erhöhung der Apoptoserate im Primärtumor und den Metastasen. Die Induktion der Produktion von FAS/FASL, Caspase-3 und Caspase-8 durch die Hybridtherapie von LLC1-tragenden Mäusen, spielt nach den vorliegenden Erkenntnissen eine entscheidende Rolle bei der Apoptose.

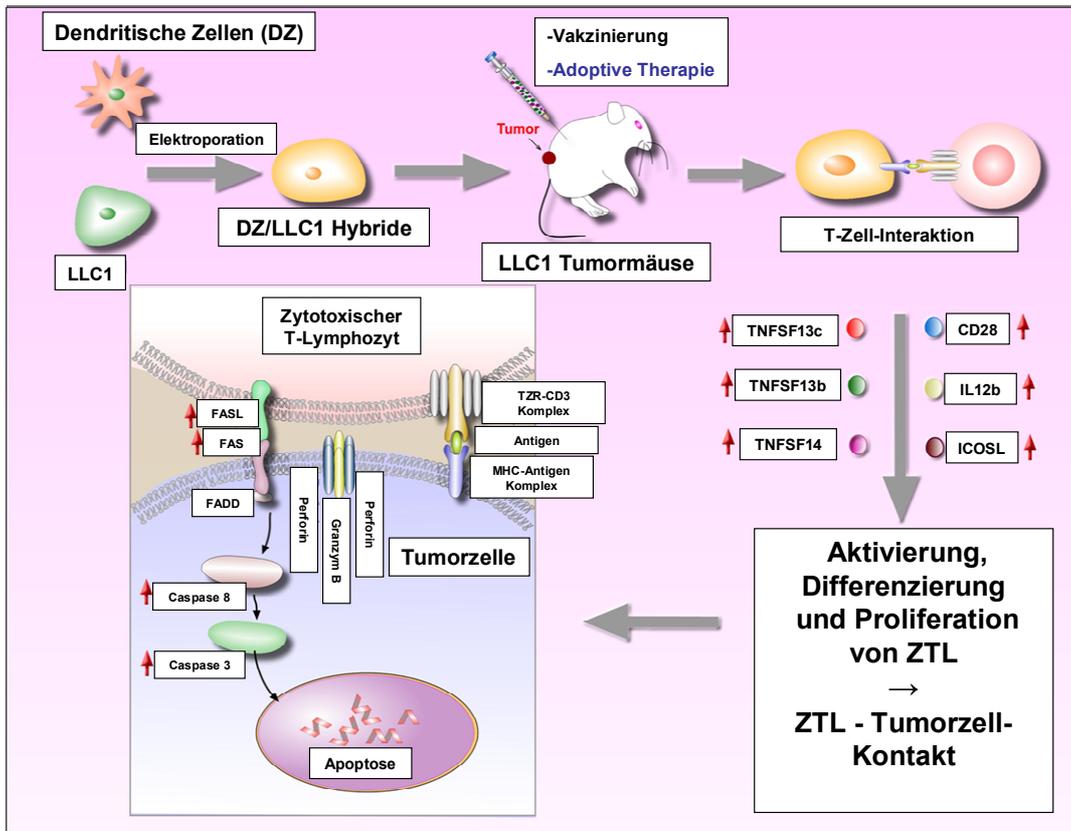
Für einige Mäusetumore konnte gezeigt werden, dass sie gegenüber FASL-vermittelter Lyse *in vitro* resistent sind. Dieser Umstand macht es unwahrscheinlich, dass dieser lytische Mechanismus einen wichtigen Weg zur Tumorelimination *in vivo* darstellt [Broek ME van den, 1996]. Die fehlende Übereinstimmung mit unseren Untersuchungen in diesem Punkt ist den Hybriden aus DZ und Tumorzellen zu zuschreiben. Für DZ, die mit FASL-exprimierenden Tumoren zusammen in Kultur genommen wurden, konnte gezeigt werden, dass sie eine tumorspezifische Immunantwort *in vivo* auslösen. Daraus kann gefolgert werden, dass die DZ während des FAS/FASL-vermittelten DZ-Tumorzellkontaktes Tumorantigene erwerben [Tada Y, 2002]. Die FAS- und FASL-Expression kann durch Zytokine (z.B. IFN- γ und TNF- α) oder durch Aktivierung der Lymphozyten induziert werden. Die notwendigen Lymphozyten sind im *in-vivo*-Milieu von hybridtherapierten, wenig immunogenen Karzinomen vorhanden.

Die Hybridkombinationstherapie verursacht eine Apoptose des Ziel Tumors hauptsächlich auf einem FAS/FASL-vermittelten Weg. Die gesteigerte Expression von FAS/FASL bedingt eine starke Interaktion von ZTL und Tumorzellen. Diese rufen eine FAS-vermittelte Steigerung der Bildung des FADD-(FAS-Associated Death Domain) Adapterproteins hervor. Aus FAS und FADD wird dann der so genannte „death inducing signaling complex“ gebildet, der Caspase 8 aktiviert, was die Aktivierung der nachgeschalteten Caspasen -3, -6, -7 bedingt. All diese Caspasen ergänzen und fördern sich in ihrer apoptotischen Wirkung (Abb. 19).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hybridkombinationstherapie bestehend aus wiederholten Vakzinierungen und adoptiver T-Zell-Therapie die stärkste wachstumshemmende Wirkung auf einen bereits etablierten Primärtumor und dessen Metastasen hat. Der therapeutische Effekt wurde begleitet von einer gesteigerten T-Helferzellmenge und einer Aktivierung von ZTL- und FAS- vermittelter Apoptose.

Eine Kombinationstherapie aus Hybriden und adoptivem T-Zelltransfer kann, auch in der Konsolidierungstherapie, nach Chemotherapie oder nach chirurgischer Tumorreduktion der primären Tumormasse, beim Menschen effektiv sein. Nicht selten kommt es nach klinischer Remission und ohne histologischen Nachweis von Tumorzellen zu einem Rezidiv. Dieser Umstand, der auch als minimale Resterkrankung bezeichnet wird, ist eine potentielle Indikation für eine weiterführende immunologische Tumorthherapie.

Abb. 19: Schematische Darstellung der bei der Kombinationstherapie für die Tumorsuppression verantwortlichen Mechanismen



DZ von C57/BL6-Mäusen wurden mit LLC1-Tumorzellen fusioniert, um Hybride zu generieren. Mäuse, die zuvor den LLC1-Tumor gespritzt bekamen, wurden mit einer Hybridkombinationstherapie behandelt. Nach der Hybridkombinationstherapie fand ein *in vivo* „signaling“ über Botenstoffe zwischen Hybriden und T-Lymphozyten statt, was zu einer Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von ZTL führte. Mehrere T-lymphozytärer Aktivations-, Differenzierungs- und Proliferationsmarker (wie CD28, IL12b, ICOSL, TNFRSF13c, TNFSF 13b und TNFSF14) waren gesteigert. Die aktivierten ZTL wanderten zum Zieltumor und lösten, durch Induktion von Apoptose, eine Anti-Tumor- Reaktion aus. Für ZTL konnte gezeigt werden, dass sie auf Granzym/Perforin oder FAS/FASL vermitteltem Weg, abhängig von der *in vivo*-Umgebung, eine Apoptose des Tumors auslösen.

6.3 Potenzielle Fehlerquellen

Zur Reduktion der auftretenden Fehler haben wir alle beeinflussbaren Faktoren durch sorgfältiges Arbeiten, Randomisierung, Standardisierung und objektive Messverfahren, soweit möglich, eliminiert.

Nicht von uns beeinflussbar war die tumorbedingte Tötung der Tiere aus ethischen Gründen. So konnten keine Beobachtungen länger als 28 Tage stattfinden. Deshalb kann in diesem Experiment zwar eine Aussage darüber getroffen werden, dass die Mäuse signifikant länger überlebt haben. Was jedoch nicht beurteilt werden kann ist das evtl. Auftreten von Residuen, die Überlebensrate der Mäuse, ob eine Restitutio ad integrum eingetreten wäre und wie bei einem Rezidiv der Therapieerfolg gewesen wäre.

6.4 Ausblick

In zukünftigen Untersuchungen soll zunächst ein humaner Tumor in einem so genannten „NOD/SCID-Mouse“-Modell (Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) untersucht werden. Bei diesem Modell wird den immundefizienten NOD/SCID-Mäusen ein humanes Immunsystem adoptiv transferiert. Die so behandelten Mäuse werden dann als human rekonstituierte Mäuse bezeichnet und bieten die Möglichkeit, in einer Maus das humane Immunsystem gegenüber einem humanen Tumor zu testen. Hierzu bekommen die Mäuse eine Tumoranimpfung mit einem humanen Tumor.

Logische Folge dieser Experimente wäre, bei ausreichendem Erfolg, diese Therapieversuche am Menschen fortzusetzen. Das Ziel solcher Therapieversuche ist die Etablierung einer beim Menschen anwendbaren immunologischen Therapie von malignen Tumoren. Zur Generierung ausreichender Zellzahlen von T-Lymphozyten und DZ muss evtl. auf humane Stammzellen zurückgegriffen werden.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob und welchen therapeutischen Effekt eine Therapie von malignen Tumoren mit Hybriden aus dendritischen Zellen und Tumorzellen, am Beispiel des Lewis-Lung-Karzinoms (LLC1) der C57/BL6 Mäuse, aufweist.

Zur Fusion wurde eine Kombination aus Polyethylenglycol- und Elektroporationsfusion verwendet. Die Effizienz der Fusion wurde mittels Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. In der Durchflußzytometrie fanden sich Fusionsraten von 50%, in der Fluoreszenzmikroskopie konnte die Fusionsprodukte quantitativ und qualitativ beurteilt werden.

Die Eigenschaften der Hybride wurden *in vivo* und *in vitro* untersucht. Die Stimulationsfähigkeit der HZ wurde sowohl in Proliferations- und Zytotoxizitätstests als auch in Immunisierungs-, Vakzinierungs-, Adoptiv- und Kombinationstherapieversuchen aus Vakzinierung und adoptiver Therapie untersucht. Das Tumorwachstum und das Metastasierungsverhalten wurde zum einen bildgebend mittels FpvCT und zum anderen post mortem mittels Histologie analysiert. Die Expression von Genen, die für Mediatoren der immunologischen Aktivierung und der Apoptose codieren, wurden mittels Microarray und RT-PCR überwacht.

Während die Immunisierung mit Hybriden lediglich zu einer 23%igen Reduktion des Tumorwachstums führte, waren die adoptive Therapie mit 48% Tumorreduktion oder die Vakzinierungstherapie mit 60% Tumorreduktion wesentlich erfolgreicher. Der beste therapeutische Effekt zeigte sich bei der Kombination aus adoptiver Therapie und Vakzinierung mit 80% Reduktion des Tumorwachstums (alle angegebenen Prozentzahlen mit $p < 0,05$ gegenüber LLC1 und $p < 0,05$ gegenüber DZ).

Dies dokumentiert, dass die Kombinationstherapie zu einem hocheffektiven und persistierenden Schutz vor Tumorwachstum führt. Es konnte eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine verringerte Metastasierung festgestellt werden. Ebenso konnte eine Erhöhung der Apoptoserate im Primärtumor und den Metastasen nachgewiesen werden. Die Induktion der Produktion von FAS/FASL, Caspase 3 und Caspase 8 durch die Hybridtherapie spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

Es kann konstatiert werden, dass eine Hybridkombinationstherapie bestehend aus wiederholten Vakzinierungen und adoptiver T-Zell-Therapie eine potente suppressorische Wirkung gegenüber dem Wachstum des Primärtumors und der Metastasen hat.

8 Summary

The aim of this study was to evaluate if and what kind of a therapeutic effect we could detect in the therapy of malignant tumors with hybrids of dendritic cells and tumor cells, using the example of the Lewis-Lung-Carcinoma (LLC1) of C57/BL6 mice.

For fusion, a combination of polyethylenglycol and electroporation was used. The fusion efficiency was controlled using flow cytometry and confocal microscopy. In flow cytometry fusion rates of 50% were detected, in confocal microscopy the fusion products were assessed both quantitatively and qualitatively.

The function of hybrids was evaluated *in vivo* and *in vitro*. The stimulation capacity of hybrid cells was assessed firstly in proliferation- and cytotoxicitytests and secondly in immunisation-, vaccination-, and combination therapy of vaccination and adoptive therapy. The growth of primer tumors and metastasis was first observed using FpvCT and then post mortem in the mice by performing histological stainings. The gene expression which code for mediators of the immunological activation and apoptosis was monitored using Microarray and PCR.

While immunisation with hybrids showed little success with only 23% tumorreduction, the results of the adoptive therapy (48% tumorreduction) or vaccination therapy (60% tumorreduction) were more promising. The best therapeutic effect was shown using a combination of adoptive therapy and vaccination with an 80% reduction in tumor growth (all given percentages with a p-value of $p < 0,05$ compared to LLC1 and $p < 0,05$ compared to DZ).

The combination therapy led to a highly effective and persisting protection against tumor growth. A slowing down of tumor growth and decreased scattering of tumor metastasis could be determined. Likewise, an increase of the rate of apoptosis in the primary tumor and the metastasis was detected. The induction of the production of FAS/FASL, Caspase3 and Caspase 8 by the hybrid therapy plays an important part in this increase. It can be stated that a hybrid combination therapy, consisting of repeated vaccination and adoptive T-Cell-therapy, has a potent suppressive effect on growth of the primary tumor and the metatasis.

9 Literaturangaben

Aebersold P, Hyatt C, Johnson S, Hines K, Korcak L, Sanders M, Lotze M, Topalian S, Yang J, und Rosenberg SA. *Lysis of autologous melanoma cells by tumor-infiltrating lymphocytes: association with clinical response.* J. Natl. Cancer Inst., 1991, 83 (13): 932-7.

Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S. *Antitumor Effect of Immunizations with Fusions of Dendritic and Glioma Cells in a Mouse Brain Tumor Model.* J Immunother., 2001, 24: 106-113.

Albert ML, Sauter B Bhardwaj N. *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs.* Nature, 1998, 392: 86-89.

Alexandroff AB, Jackson AM, Paterson T, Haley JL, Ross JA, Longo DL, Murphy WJ, James K, Taub DD. *Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours.* Mol. Immunol., 2000, 37: 515-526

Anderson HA, Hiltbold EM, PA Roche. *Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation.* Nat. Immunol., 2000, 1 (2): 156-62.

Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, Boehmer H von, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.* Science, 2002, 298 (5597): 1395-401.

Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW. *CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells.* J. Immunol., 2005, 174: 2591-2601.

Banat G.A, Christ O, Cochlovius B, Pralle HB, Zoller M. *Tumour-induced suppression of immune response and its correction.* Cancer Immunol. Immunother., 2001, 49: 573-586.

Banat GA, Usluoglu N, Hoeck M, Ihlow K, Hoppmann S, Pralle H. *Dendritic cells fused with core binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia blast cells induce activation of cytotoxic lymphocytes.* Br. J. Haematol., 2004, 126: 593-601.

Banchereau J, Steinman RM. *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature, 1998, 392: 245-252.

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

Barton GM, Medzhitov R. *Toll-like receptors and their ligands.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2002, 270: 81-92.

Berke G. *Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes.* Curr. Opin. Hematol., 1997, 4: 32-40.

Berkel ME van, Oosterwegel MA. *CD28 and ICOS: Similar or separate costimulators of T cells?* Immunol. Lett., 2006

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. *Connexin family of gap junction proteins.* J. Membr. Biol., 1990, 116: 187-19

Bierer BE, Sleckman BP, Ratofsky SE, Burakoff SJ. *The biologic roles of CD2, CD4 and CD8 in T-Zell activation.* Ann. Rev. Immunol., 1989, 7: 579-599

Boczkowski D, Nair SK, Snyder D. *Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo.* J. Exp. Med., 1996, 184: 465-472.

Boon T, Cerottini JC, Eynde B van den, Bruggen P van der, Pel A van. *Tumor antigens recognized by T lymphocytes.* Annu. Rev. Immunol., 1994, 12: 337-365

Boon T, Coulie PG, Eynde B Van den. *Tumor antigens recognized by T cells.* Immunol. Today, 1997, 18: 267-268.

Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S. *Cell therapy: achievements and perspectives.* Haematologica, 1999, 84 (12): 1110-49.

Broek ME van den, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice.* J. Exp. Med., 1996, 184: 1781-1790.

Broeke LT van den, Daschbach E, Thomas EK, Andringa G, Berzofsky JA. *Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity.* J. Immunol., 2003, 171: 5842-5852.

Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ. *Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL.* J. Immunol., 1997, 158: 3270-3276.

Brossart P, Schneider A, Dill P, Schammann T, Grünebach F, Wirths S, Kanz L, Bühring HJ, Brugger W. *The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes.* Cancer Res., 2001, 61: 6846-6850

Burnet FM. *Immunological aspects of malignant disease.* Lancet, 1967, 1 (7501): 1171-4.

Cao X, Zhang W, Wang J, Zhang M, Huang X, Hamada H, Chen W. *Therapy of established tumour with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells.* Immunology, 1999, 97: 616-625.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia. A. *Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells.* Curr. Opin. Immunol., 1997, 9: 10-16.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.* Nat. Med., 1999, 5 (8): 919-23.

Celluzzi CM, Falo LD, Jr. *Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection.* J. Immunol., 1998, 160: 3081-3085.

Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. *CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy.* Annu. Rev. Immunol., 2001, 19: 565-594

Costello RT, Gastaut JA, Olive D. *Tumor escape from immune surveillance.* Arch. Immunol. Ther. Exp., 1999, 47: 83-88

Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA. *The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses.* Immunity, 2000, 13: 95-105.

Darabi K, Karulin AY, Boehm BO, Hofstetter HH, Fabry Z, La Manna JC, Chavez JC, Tary-Lehmann M, Lehmann, PV. *The third signal in T cell-mediated autoimmune disease?* J. Immunol., 2004, 173: 92-99.

David V, Bourge JF, Guglielmi P, Mathieu-Mahul D, Degos L, Benussan A. *Human T-cell clones use a CD3-associated surface antigen recognition structure to exhibit both NK-like and allogeneic cytotoxic reactivity.* J. Immunol., 1987, 138: 2831-2836.

Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. *Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection.* J. Leukoc. Biol., 1998, 64(3): 275-90.

Eynde BJ van den, Boon T. *Tumor antigens recognized by T lymphocytes.* Int. J. Clin. Lab. Res., 1997, 27: 81-86

Fenton RG, Longo DL. *Danger versus tolerance: paradigms for future studies of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.* J. Natl. Cancer Inst., 1997, 89: 272-275

Fields RC, Shimizu K, Mulé JJ. *Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 9482-9487.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.* The Journal of Immunology, 1994, 146, 10: 3444-3451

Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG. *Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines.* J. Exp. Med., 1995, 181, 2109-2117

Foster AE, Rooney CM. *Improving T cell therapy for cancer.* Expert. Opin. Biol. Ther., 2006, 6: 215-229.

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.* Nat. Med., 1996, 2: 1096-1103

Galea-Lauri J, Darling D, Mufti G, Harrison P, Farzaneh F. *Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination.* Cancer Immunol. Immunother., 2002, 51: 299-310.

Gatti RA, Good RA. *Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review.* Cancer, 1971, 28 (1): 89-98.

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. *Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation.* J. Exp. Med., 2005, 202: 919-929.

Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK. *Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines.*

Cancer Immunol. Immunother. 1998, 46: 82-87.

Gilboa E. *The makings of a tumor rejection antigen.* Immunity, 1999, 11: 263-270

Gilboa E. *The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy.* Nat. Immunol., 2001, 2: 789-792

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

Gong J, Nikrui N, Chen D. *Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity.* J Immunol. 2000, 165: 1705-1711.

Gordon S. *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response.* Cell, 2002, 111, 7: 927-30.

Hart DN. *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.* Blood, 1997, 90: 3245-3287.

Hayashi T, Tanaka H, Tanaka J. *Immunogenicity and therapeutic efficacy of dendritic-tumor hybrid cells generated by electrofusion.* Clin Immunol., 2002, 104: 14-20.

Haynes EL, Nadler BF, Bernstein ID. *Leukocyte Typing II.* Springer Verlag, New York 1986

Henry F, Boisteau O, Bretaudeau L. *Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines.* Cancer Res., 1999, 59: 3329-3332.

Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.*

Nat. Med., 1996, 2: 52-58.

Ibelgaufts H. *Dictionary of cytokines.* VHC Verlagsgesellschaft mbh, 1995

Janeway CA, Walport M, Shlomchik M, Travers P. *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag 2002, 5. Auflage

Jäger E, Jäger D, Knuth A. *Clinical cancer vaccine trials.* Curr. Opin. Immunol., 2002, 14: 178-182

Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal.* Immunol. Today, 1999, 20 (12): 561-7.

Kanno Y, Katakoka K. *Intercellular communication through gap junctions.* Prog. Cell Res., 1995, Vol 4. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

Kawada M, Ikeda H, Takahashi T. *Vaccination of fusion cells of rat dendritic and carcinoma cells prevents tumor growth in vivo.* Int. J. Cancer, 2003 105: 520-526.

Kiessling F, Greschus S, Lichy MP, Bock M, Fink C, Vosseler S, Moll J, Mueller MM, Fusenig NE, Traupe H. *Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for noninvasive, high-resolution monitoring of tumor angiogenesis.* Nat. Med., 2004, 10: 1133-1138.

Kiessling F, Heilmann M, Vosseler S, Lichy M, Krix M, Fink C, Kiessling I, Steinbauer H, Schad L, Fusenig NE. *Dynamic T1-weighted monitoring of vascularization in human carcinoma heterotransplants by magnetic resonance imaging.* Int. J. Cancer, 2003, 104: 113-120.

Kjaergaard J, Shimizu K, Shu S. *Electrofusion of syngeneic dendritic cells and tumor generates potent therapeutic vaccine.* Cell Immunol., 2003, 225: 65-74.

Klärre K. *Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis.* Mechanisms of NK cell mediated cytotoxicity. Academic Press, Orlando 1985, 81-91

Klein J (Hrsg.). *Immunologie, Kapitel: 9 Lymphokine und ihre Rezeptoren.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1991

Kleindienst P, Brocker T. *Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo.* J Immunol., 2003, 170: 2817-2823.

Knazek RA, Wu YW, Aebersold PM, Rosenberg SA. *Culture of human tumor infiltrating lymphocytes in hollow fiber bioreactors.* J. Immunol. Methods, 1990, 127 (1): 29-37.

Knutson KL, Almand B, Mankoff DA, Schiffman K, Disis ML. *Adoptive T-cell therapy for the treatment of solid tumours.* Expert. Opin. Biol. Ther., 2002, 2: 55-66.

Kuriyama H, Shimizu K, Lee W, Kjaergaard J, Parkhurst MR, Cohen PA, Shu S. *Therapeutic vaccine generated by electrofusion of dendritic cells and tumour cells.* Dev. Biol. (Basel), 2004, 116: 169-178.

Labeur MS, Roters B, Pers B. *Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage.* J. Immunol., 1999, 162: 168-175.

Lederer JA, Liou JS, Todd MD, Glimcher LH, Lichtman AH. *Regulation of cytokine gene expression in T helper cell subsets.* Journal of Immunology, 1994, 152: 77-86

Lewko WM, Hall PB, Oldham RK. *Growth of tumor-derived activated T cells for the treatment of advanced cancer.* Cancer Biother. Radiopharm, 2000, 15, (4): 357-66.

Liu YJ, Kadowaki N, Risoan MC, Soumelis V. *T cell activation and polarization by DC1 and DC2.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2000, 251: 149-59.

Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. *Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways.* Nature 1994, 370: 650-652.

Malone CC, Schiltz PM, Mackintosh AD, Beutel LD, Heinemann FS, Dillman RO. *Characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes expanded in hollow-fiber bioreactors for immunotherapy of cancer.* Cancer Biother. Radiopharm., 2001, 16 (5): 381-90.

Mandelboim O, Berke G, Fridkin M, Feldman M, Eisenbach I. *CTL induction by a Tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma.* Letters of Nature 1994, 369: 67-71

Marincola FM, Shamamian P, Alexander RB. *Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines.* J Immunol., 1994;153: 1225-1237.

Marten A, Renoth S, Heinicke T, Albers P, Pauli A, Mey U, Caspari R, Flieger D, Hanfland P, Von RA. *Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma.* Hum. Gene Ther., 2003, 14: 483-494.

Matzinger P. *Tolerance, danger, and the extended family.* Annu. Rev. Immunol., 1994, 12: 991-1045.

Matzinger P. *Introduction to the series. Danger model of immunity.* Scand. J. Immunol., 2001, 54 (1-2): 2-3.

Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ. *Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity.* Nat. Med., 1995, 1: 1297-1302.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. *The Toll receptor family and microbial recognition.* Trends Microbiol., 2000, 8 (10): 452-456.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system.* Science, 2002, 296 (5566): 298-300.

Mellor AL, Munn DH. *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.* Nat. Rev. Immunol., 2004, 4 (10): 762-74.

Morse MA, Coleman RE, Akabani G. *Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies.* Cancer Res., 1999, 59: 56-58.

Moser M. *Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?* Immunity 2003, 19 (1): 5-8.

Nair S, Zhou F, Reddy R. *Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses in vitro.* J Exp Med., 1992, 175: 609-612.

Nair SK, Boczkowski D, Morse M. *Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA.* Nat Biotechnol., 1998, 16: 364-369.

Nair SK, Snyder D, Rouse BT. *Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts.* Int. J. Cancer., 1997, 70: 706-715.

Naughton M, Picus J, Zhu X, Catalona WJ, Vollmer RT, Humphrey PA. *Scatter Factor-Hepatocyte Growth Factor elevation in the serum of patients with prostate cancer.* J. Urol., 2001, 165: 1325-1328

Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, Watts C. *Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages.* Immunity, 1995, 3: 783-791

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M. *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.* Nat. Med. 1998, 4: 328-332.

Ohshima Y, Delespesse G. *T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells.* J. Immunol., 1997, 158: 629-636.

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

Pechhold K, Pohl T, Kabelitz D. *Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry.* Cytometry, 1994, 16: 152-159.

Pel A van, Bruggen P van der, Coulie PG, Brichard VG, Lethe B, Eynde B van den, Uyttenhoven C, Renauld JC, Boon T. *Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes.* Immunol. Rev., 1995, 145: 229-250

Perez-Diez A, Butterfield LH, Li L. *Generation of CD8⁺ and CD4⁺ T-cell response to dendritic cells genetically engineered to express the MART-1/Melan-A gene.* Cancer Res., 1998, 58: 5305-5309.

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

Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C. *Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors.* Trends Immunol. 2001, 22 (1): 41-7.

Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y. *Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy.* J. Natl. Cancer Inst., 1996, 88: 100-108.

Rock KL. *A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world.* Immunol. Today, 1996, 17: 131-137

Romagnani S. *Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more.* Immunology today, 1991, 12 (8): 256-57

Rosenberg SA. *Immunotherapy and gene therapy of cancer.* Cancer Res, 1991, 51 (18): 5074-5079.

Rosenberg SA. *Progress in human tumour immunology and immunotherapy.* Nature, 2001, 411: 380-384.

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines.* Nat. Med., 2004, 10: 909-915.

Rubin LA, Nelson DL. *The soluble Interleukin-2 Receptor: Biology, Function and Clinical Application.* Annals of Internal Medicine, 1990, 113: 619-627

Savai R (A), Wolf JC, Greschus S, Eul BG, Schermuly RT, Hänze J, Voswinckel R, Langheinrich AC, Grimminger F, Traupe H. *Analysis of tumor vessel supply in Lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution and imaging with micro- and flat-panel computed tomography.* Am. J. Pathol., 2005, 167: 937-946.

Savai R (B), Schermuly RT, Voswinckel R, Renigunta A, Reichmann B, Eul B, Grimminger F, Seeger W, Rose F, Hänze J. *HIF-1alpha attenuates tumor growth in spite of augmented vascularization in an A549 adenocarcinoma mouse model.* Int. J. Oncol., 2005, 27: 393-400.

Salazar-Onfray, F. *Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance.* Med. Oncol., 1999;16(2): 86-94.

Schwartz RH. *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy.* Science, 1990, 248: 1349-1356.

Schuler G, Steinman RM. *Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors.* J. Exp. Med., 1997, 186: 1183-1187.

Seliger B, Hohne A, Knuth A. *Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression.* Cancer Res., 1996, 56: 1756-1760.

Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. *TAP off-tumors on.* Immunol. Today, 1997, 18: 292-299

Sharpe AH, Freeman GJ. *The B7-CD28 superfamily.* Nat. Rev. Immunol., 2002, 2: 116-126.

Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. *Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules.* J. Immunol., 1997, 158: 2723-2730.

Shortman K, Liu YJ. *Mouse and human dendritic cell subtypes.* Nat. Rev. Immunol., 2002, 2 (3): 151-161.

Shimizu K, Kuriyama H, Kjaergaard J. *Comparative analysis of antigen loading strategies of dendritic cells for tumor immunotherapy.* J. Immunother., 2004, 27: 265-272.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.* Science, 1999, 284 (5421): 1835-1837.

Siegel BV. *Immunology and Oncology.* Intern. Rev. of Cytology, 1985, 96: 89-120.

Sloan AE, Parajuli P. *Human autologous dendritic cell-glioma fusions: feasibility and capacity to stimulate T cells with proliferative and cytolytic activity.* J. Neurooncol., 2003, 64: 177-183.

Snyder JT, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Belyakov IM. *Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity.* Curr. HIV. Res., 2003, 1: 287-294.

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

Specht JM, Wang G, Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, Rosenberg SA, Hwu P. *Dendritic cells retrovirally transduced with a model tumor antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases.* J. Exp. Med., 1997, 186: 1213-1221.

Steinman RM. *The dendritic cell system and its role in immunogenicity.* Annu. Rev. Immunol., 1991, 9: 271-296.

Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. *Bone-marrow derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells.* J. Immunol., 1997, 158: 4229-4236

Tada T, Hu FY, Kishimoto H, Furutani-Seiki M, Asano Y. *Molecular events in the T cell-mediated suppression of the immune response.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1991, 636: 20-27.

Tada Y, Wang J, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Okada S, Tokuhisa T, Sakiyama S, Tagawa M. *Cutting edge: a novel role for Fas ligand in facilitating antigen acquisition by dendritic cells.* J. Immunol., 2002, 169: 2241-2245.

Tanaka H, Shimizu K, Hayashi T. *Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells.* Cell Immunol., 2002, 220: 1-12.

Terabe M, Matsui S, Park JM. *Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence.* J. Exp. Med., 2003, 198: 1741-1752.

Timmerman JM, Levy R. *Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy.* Annu. Rev. Med., 1999, 50: 507-529.

Topalian SL, Solomon, D. und Rosenberg, S. A. *Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas.* J. Immunol., 1989, 142 (10), 3714-25.

Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sherev T, Sparbier K, Sterry W, Walden,P. *Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients.* Int. J. Cancer, 2004, 110: 730-740.

Trefzer U, Weingart G, Chen Y, Herberth G, Adrian K, Winter H, Audring H, Guo Y, Sterry W, Walden,P. *Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma.* Int. J. Cancer, 2000, 85: 618-626.

Tuting T, Wilson CC, Martin DM. *Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha.* J. Immunol., 1998, 160: 1139-1147.

Viguiet M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. *Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells.* J. Immunol., 2004, 173: 1444-1453.

Wang J, Saffold S, Cao X, Krauss J, and Chen W. *Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines.* J. Immunol., 1998. 161: 5516-5524.

Watts TH. *TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses.* Annu. Rev. Immunol., 2005, 23: 23-68.

Wei Y, Sticca RP, Holmes LM, Burgin KE, Li J, Williamson J, Evans L, Smith S J, Stephenson JJ, Wagner TE. *Dendritoma vaccination combined with low dose interleukin-2 in metastatic melanoma patients induced immunological and clinical responses.* Int. J. Oncol., 2006, 28: 585-593.

Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, Hines K, Jacknin L, Parker L, Sanders M, Rosenberg SA. *Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience.* Int. J. Cancer, 1996, 65 (4): 413-21.

Yang S, Darrow TL, Vervaert CE. *Immunotherapeutic potential of tumor antigen-pulsed and unpulsed dendritic cells generated from murine bone marrow.* Cell Immunol., 1997, 179: 84-95.

Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, SimonR, LiY, Robles AI, ChenY. *Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning.* Nat. Med., 2003, 9: 416-423.

Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH. *Effect of a cancer vaccine prepared by fusions of hepatocarcinoma cells with dendritic cells.* World J. Gastroenterol., 2001, 7: 690-694.

Zhang J., Salojin KV, Delovitch TL. *CD28 co-stimulation restores T cell responsiveness in NOD mice by overcoming deficiencies in Rac-1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling and IL-2 and IL-4 gene transcription.* Int. Immunol., 2001, 13: 377-384.

Zhou G, Drake CG, Levitsky HI. *Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines.* Blood, 2006, 107: 628-636.

Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T. *Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines.* J. Exp. Med., 1996, 183: 87-97.

10 Publikationen

Savai R, Schermuly RT, Schneider M, Pullamsetti SS, Grimminger F, Seeger W, Banat GA. *Hybrid-primed lymphocytes and hybrid vaccination prevent tumor growth of lewis lung carcinoma in mice.* J. Immunother., 2006, 29: 175-187.

Savai R, Schermuly RT, Pullamsetti SS, Schneider M, Greschus S, Ghofrani HA, Traupe H, Grimminger F, Banat GA. *A Combination hybrid-based vaccination/adotiv cellular therapy prevent tumor growth by involvement of T-cells.* Cancer Res. 2007, 67: 5443-5453

11 Weitere Veröffentlichungen (Poster)

Schneider M, Savai R., Hoeck M., Hoppmann S., Pralle H., Grimminger F, Schermuly R., Banat GA. *Immunization with Fusions of Murine Dendritic Cells and Lewis Lung Carcinoma 1 Cells Elicit T-cell Immunity* 2.-6.Oktober 2004 Posterpräsentation auf dem DGHO Kongress in Innsbruck, Österreich

Savai R, Schermuly RT, Schneider M, Pullamsetti SS, Grimminger F, Seeger W, Banat GA. *Hybrid-primed Lymphocytes and hybrid vaccination prevent tumor growth of Lewis Lung Carcinoma in mice.- und-*

Savai R, Schermuly RT, Schneider M, Pullamsetti SS, Greschus S, Grimminger F, Seeger W, Banat GA. *Combination of hybrid-primed lymphocytes an Vaccination prevent tumor growth of Lewis Lung Carcinoma in mice.* 30. Oktober -3. November 2005 auf dem ECCO Kongress in Paris, Frankreich.

Savai R, Schermuly RT, Schneider M, Pullamsetti SS, Grimminger F, Seeger W, Banat GA. *Hybrid-primed Lymphocytes and hybrid vaccination prevent tumor growth of Lewis Lung Carcinoma in mice.- und-*

Savai R, Schermuly RT, Schneider M, Pullamsetti SS, Greschus S, Grimminger F, Seeger W, Banat GA. *Cobination of hybrid-primed lymphocytes an Vaccination prevent tumor growth of lewis Lung Carcinoma in mice* 19.-24. Mai auf dem “American Thoracic Society (ATS)” Kongress in San Diego, USA.

12 Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Betreuer und Mentor Dr. Andre G. Banat für seine Unterstützung und seinen Glauben an die Sache danken. Ohne seine fachlichen und menschlichen Fähigkeiten wäre ich niemals so weit gekommen.

Ich danke herzlich meinem Kollegen und Freund Dr. Rajkumar Savai, der sowohl bei der praktischen, wie auch der theoretischen Umsetzung dieser Arbeit eine tragende Rolle gespielt hat. Er war ein echter Partner!

Ich möchte mich auch recht herzlich bei Marianne Hoeck für ihre Freundschaft bedanken und für die Geduld, mit der sie mir die vielen Dinge, die es in einem Labor zu wissen gibt, erklärt hat.

Für die tatkräftige Unterstützung mit Microarray und RT-PCR möchte ich auch Soni Pullmasetti herzlich danken. Prof. Dr. Ralph Schermuly danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der Tierexperimente.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Kollegen und Freunde aus dem Labor, Sabine Hoppman, Kerstin Ilow, Swantje Klar, Lars Burghardt. Danke für das Ertragen Kölscher Karnevalslieder, das Korrekturlesen und eure Unterstützung.

Auch dir Maren, für die hervorragende Korrektur meiner Arbeit vielen Dank.

Meiner Freundin Sarah danke ich für die unermüdliche Unterstützung dieser Arbeit und dafür, dass sie mir bei schlechter Laune und Frustration den nötigen Rückhalt gegeben hat.

Last but not least möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans Pralle und Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger für die Unterstützung, die Zurverfügungstellung dieses Themas und der nötigen Mittel danken.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geb. am 22.11.1978 in Siegen

Religion: Römisch katholisch

Schule:

1985-1989 Grundschule Obernetphen

1989-1998 Gesamtschule Siegen mit Abschluss der Hochschulreife

Zivildienst:

08/1998 - 08/1999 Tätigkeit als Aushilfskraft auf der chirurgischen Station des Jung Stilling Krankenhauses in Siegen, mit Schwerpunkt Unfallchirurgie

Studium:

10/1999 – 06/2006 Studium an der Universität Gießen in Deutschland

08/2001 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,33)

08/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 3)

03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,33)

05/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1)

03.06.2006 Approbation als Arzt

WS 2002/2003 Erasmus Austauschsemester an der Universität Valencia in Spanien

Berufliche Tätigkeiten:

- 1994 - 2001 Arbeit als Maschinenbediener bei der Firma Fuchsrohr in Siegen Kaan Marienborn
- WS 2001/2002 Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Physiologischen Institut der Universität Gießen
- 2003 - 2005 Arbeit als Aushilfe im Alten- und Schwerbehinderten-Wohnheim St. Anna in Gießen, in der Schwerbehinderten-Pflege.
- Seit 1.10.2006 Assistenzarzt für Unfallchirurgie und Orthopädie im Krankenhaus Hofheim am Taunus

Famulaturen:

- 02/2002 Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Florence Nightingale Krankenhaus in Düsseldorf, Kaiserswerth
- 09/2003 Klinik Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Gießen.
- 03/2004 Einwöchige Intensivfamulatur für Orthopädie, in den Pfeifferischen Stiftungen Magdeburg.
- 03/2004 Ambulanz der Hämatologie/ Onkologie der Universitätsklinik Gießen

Praktisches Jahr:

- Erstes Tertial: Vom 25.04.05 bis 14.08.05 Kantonsspital Bruderholz, Basel/Schweiz, in der Orthopädie.
- Zweites Tertial: Vom 15.08.05 bis 04.12.05 im Universitätsklinikum Gießen in der Inneren Medizin
- Drittes Tertial: Vom 05.12.05 bis 26.03.06 Universitätsklinikum Gießen in der Allgemein- und Unfallchirurgie.

