

Aus der klinischen Abteilung
des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes und der Klinik für Endokrinologie
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Wirkung immunstimulierender DNA auf
humane dendritische Zellen -
Neue Wege zur Auslösung und Modulation einer Immunantwort**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Dirk-Thomas Schattenberg

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.,
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

Koreferent: Prof. Dr. med. Rainer Haas

*Sichere Wahrheit erkannte kein Mensch und wird keiner erkennen
Über die Götter und alle die Dinge, von denen ich spreche.
Sollte einer auch einst die vollkommenste Wahrheit verkünden,
Wissen könnt' er das nicht: Es ist alles durchwebt von Vermutung.*

Xenophanes, um 500 v. Chr.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	I
1.1	Immuntherapien	1
1.2	Dendritische Zellen und ihre Rolle im Immunsystem	2
1.3	Immunstimulatorische DNA	6
1.4	Fragestellung	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Probanden	9
2.1.2	Patienten	9
2.1.3	Tiere	10
2.1.4	Zellkulturmaterialien	10
2.1.5	Molekularbiologie	11
2.1.6	Durchflußzytometrie	12
2.2	Methoden	13
2.2.1	Methoden der <i>in vitro</i> Versuche zur Etablierung einer MODC-basierten Immuntherapie	13
2.2.1.1	Präparation humaner MODC aus venösem, heparinisiertem Blut	13
2.2.1.2	Ausreifung humaner MODC für die Immuntherapie	14
2.2.1.3	Durchflußzytometrische Messungen	14
2.2.1.4	Magnetische Zellsortierung	16
2.2.1.5	Versuche zum Zugabezeitpunkt des Antigens bei humanen MODC	16
2.2.1.6	T-Zell-Proliferationsassays	16
2.2.1.7	Kryokonservierung und Vitalitätstest mit Trypanblaulösung	17
2.2.2	Methoden zur Überprüfung der Wirkung von immunstimulierender DNA auf humane MODC	17
2.2.2.1	Präparation immunstimulierender Plasmid-DNA und IS-ODN	17
2.2.2.2	Endotoxinbestimmungen	19
2.2.2.3	Präparation muriner BMDC aus Knochenmarkzellen	20
2.2.2.4	Ausreifungsversuche mit IS-DNA bei humanen MODC	20
2.2.2.5	Ausreifungsversuche mit IS-DNA bei murinen BMDC	21
2.2.2.6	Messung der Zytokinsekretion von DC mittels ELISA	21
2.2.2.7	T-Zell-Proliferationsassays mit IS-PL-ausgereiften MODC	22
2.2.2.8	Intrazytoplasmatische Zytokinfärbungen	22
2.2.3	Fallstudie: Methoden der <i>in vivo</i> MODC-Immuntherapie bei metastasiertem Nebenschilddrüsenkarzinom	23
2.2.3.1	Therapieschema bei der NSD-Karzinombehandlung	23
2.2.3.2	Herstellung von Tumorlysat aus Karzinomgewebe	23
2.2.3.3	Therapieerfolgskontrolle <i>in vivo</i> (DTH-Hauttests, Tumormarker)	24
2.2.3.4	Therapieerfolgskontrolle <i>in vitro</i> (T-Zell-Proliferationsassays)	24
2.2.4	Statistik	24

3	Ergebnisse	25
3.1	Etablierung einer MODC-basierten Immuntherapie in vitro	25
3.1.1	Präparation der dendritischen Zellen	25
3.1.2	Ausreifung der MODC für den Einsatz in der Tumorthherapie	27
3.1.3	Beladung der MODC mit Antigen	29
3.2	IS-Plasmid-DNA ausgereifte humane MODC stimulieren eine zytotoxische Immunantwort in vitro	30
3.2.1	Herstellung immunstimulatorischer DNA	30
3.2.2	Humane MODC reifen durch Stimulation mit IS-Plasmid-DNA aus	30
3.2.3	Effekt von IS-ODN auf die Ausreifung von DC	33
3.2.4	Wirkmechanismus der IS-DNA vermittelten MODC Ausreifung	35
3.2.5	Aktivierung IS-PL stimulierter DC zur Sekretion von IL-6 und IL-12	36
3.2.6	Kapazität IS-PL-ausgereifter MODC zur Stimulation einer T _{H1} -Immunantwort	37
3.3	Fallstudie: In vivo Immuntherapie mit MODC bei metastasiertem NSD-Karzinom	40
3.3.1	Antigenspezifische <i>in vitro</i> Immunreaktion im T-Zell-Proliferationsassay	40
3.3.2	Antigenspezifische <i>in vivo</i> Immunreaktion beim DTH-Hauttest	41
3.3.3	CD 4 / CD 8-Verhältnis bei der Tumorlysat-spezifischen Immunreaktion	42
3.3.4	Klinischer Verlauf und Tumormarker der NSD-Karzinompatientin	43
4	Diskussion	45
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang	73
7.1	Übersicht ausgewählter humaner CD-Antigene	73
7.2	Deklaration von Helsinki	74
7.3	Danksagungen	75
7.4	Lebenslauf	76
7.5	Publikationen	77

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle („antigen presenting cell“)
AS	Aminosäure
BMDC	Dendritische Zellen aus Knochenmarkzellen („bone marrow derived DC“)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungscluster („cluster of differentiation“)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CMV	Cytomegalievirus
CpG-Motiv	Cytosin-Guanin-Dinukleotid-Motiv
C-PL	Kontroll-Plasmid
CPM	Ereignisse pro Minute („counts per minute“)
CT	Computertomographie
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DTH	Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ (IV) („delayed type hypersensitivity“)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunosorbent-Assay („enzyme-linked immuno sorbent assay“)
EU	Endotoxin-Einheiten („endotoxin units“)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter („fluorescence-activated cell sorter“)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Granulozyten / Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	Menschliches Immunschwächevirus („human immunodeficiency virus“)
HLA	Humanes Leukozytenantigen („human leucocyte antigen“; \Leftrightarrow MHC)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie („high pressure liquid chromatography“)
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle („intercellular adhesion molecules“)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

i.m.	intramuskulär
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IS-DNA	Immunstimulierende DNA
IS-ODN	Immunstimulierendes Oligodesoxynukleotid
IS-PL	Immunstimulierendes Plasmid
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LAL-Assay	Limulus Amebocyte Lysate Assay
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
MART	„melanoma antigen recognized by T cells“ (Melanomantigen)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“; \Leftrightarrow HLA)
MIIC	MHC Klasse II Kompartiment („MHC class II compartment“)
Min	Minuten
MODC	Dendritische Zellen aus mononukleären Vorläuferzellen („monocyte derived DC“)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSD	Nebenschilddrüse
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
OVA	Ovalbumin
P/S	Penicillin / Streptomycin
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („peripheral blood mononuclear cells“)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin5
PHA	Phytohämagglutinin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTH	Parathormon
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RT	Raumtemperatur
SACS	Staphylococcus aureus Cowan I Stamm (Suspension abgetöteter Bakterien)
SEM	Standardfehler / Mittlerer Fehler des Mittelwertes („standard error of mean“)
SI	Stimulationsindex
SSC	Side Scatter

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor („transforming growth factor“)
T _{H1}	T-Helferzelle Typ 1
T _{H2}	T-Helferzelle Typ 2
TL	Tumorlysat
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TT	Tetanustoxoid
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktosid

1 Einleitung

1.1 Immuntherapien

Eine der großen zukünftigen Herausforderungen in der Medizin wird die Kontrolle der Immunantwort sein, so daß unerwünschte Immunreaktionen unterdrückt und erwünschte gefördert werden können.

Ausgehend von den Impferfolgen von Jenner und Pasteur bei Pocken und Cholera feierte die moderne Immunologie einige ihrer größten Erfolge durch Impfungen, die einige menschliche Krankheiten stark dezimieren oder sogar ausrotten konnten. Die Impfung ist bis heute die erfolgreichste Manipulation des Immunsystems, da sie sich dessen natürliche Spezifität und Induzierbarkeit zunutze macht. Durch das stetig anwachsende medizinische Wissen über Tumore und infektiöse Erreger können jedoch verbesserte Strategien entwickelt werden, um das Immunsystem gegen Krebs und Infektionen zu mobilisieren. Neben der Anwendung monoklonaler Antikörper ermöglichten gentechnische Verfahren erstmals den Einsatz von Zytokinen (Interferone, Interleukine und Tumornekrosefaktoren). Diese Immunmodulatoren stehen in einer außerordentlich komplexen Wechselbeziehung zueinander und entfalten ihre biologischen und therapeutischen Wirkungen im Organismus niemals isoliert. Vergleichsweise gering waren daher die Erfolgsquoten beim Einsatz einzelner Substanzen, und im Verhältnis dazu die Nebenwirkungen noch zu hoch.

Zur Hemmung unerwünschter Immunreaktionen bei Allergie, Autoimmunität und Transplantatabstoßung werden oft Substanzen genutzt, die sämtliche adaptiven Immunreaktionen gleichermaßen unterdrücken. Vielversprechender hingegen wären auch hier Eingriffe in das Immunsystem, die ähnlich der endogenen Regulation des Immunsystems bestimmte Reaktionen in antigenspezifischer Weise unterdrücken würde, ohne dadurch die allgemeine Immunkompetenz des Körpers zu beeinträchtigen.

In dieser Situation hat sich durch ein verbessertes Verständnis der Mechanismen von Infektionen und Tumorentstehung, Regulation von T-Zell Immunantworten und durch die Identifikation von Tumor-/Virusantigenen der Fokus des Interesses auf einen Zelltyp gerichtet, der den Schlüssel zu den genannten Mechanismen darzustellen scheint - die dendritischen Zellen. Sie erlebten 25 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung (Steinman und Cohn, 1973) vor allem mit dem Einsatz in der Immuntherapie maligner Tumoren eine Renaissance.

Mit dieser Arbeit soll nun ein neuer Ansatz vorgestellt werden, durch den es der humanen Immuntherapie möglich sein könnte, durch dendritische Zellen nicht nur allein das Immunsystem antigenspezifisch zu aktivieren, sondern gleichzeitig auch die Art der ausgelösten Immunantwort selektiv in eine bestimmte Richtung zu beeinflussen.

1.2 Dendritische Zellen und ihre Rolle im Immunsystem

Spezifische Immunität wird durch B- und T-Lymphozyten vermittelt, aber deren Aktivität scheint großteils durch dendritische Zellen (DC) kontrolliert zu werden. Die DC beginnen in der Peripherie mit der Antigenaufnahme und Prozessierung, bevor sie anschließend in die sekundären lymphatischen Organe migrieren. Dort bewirkt die Präsentation aufgenommener Antigenfragmente in Kombination mit costimulierenden Molekülen und der Sekretion von Zytokinen die Auslösung einer Immunantwort. Zusätzlich zu dieser Aktivierung der Lymphozyten vermitteln DC aber auch Toleranz bei T-Zellen gegenüber körpereigenen Antigenen („Selbst-Antigenen“) und minimieren hierdurch autoimmune Reaktionen. Zuvor ein vernachlässigter Zelltyp, erlauben die heutigen Kulturmethoden die Gewinnung einer suffizienten Anzahl von DC für molekulare und zelluläre Analysen. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigten immer deutlicher die zentrale Rolle der DC in der Auslösung und Modulation einer Immunantwort. Zugleich zeichnete sich das enorme Potential ab, das diese Zellen für eine Manipulation des Immunsystems bieten. Erste Therapieversuche mit Tumorantigen-beladenen DC konnten bei metastasierten Karzinomen bereits eine Tumorregression oder -eradikation bewirken.

Unter dem Begriff der dendritischen Zellen wird eine äußerst heterogene Gruppe von Zellpopulationen zusammengefasst, die bezüglich Herkunft und Funktionen differieren. Mehrere Wege der DC-Entwicklung sind bekannt oder werden vermutet: so können DC aus Monozyten des peripheren Blutes (MODC) kultiviert werden (Sallusto et al., 1994; Romani et al., 1996; Thurnher et al., 1997), während aus CD34⁺ Vorläuferzellen des Knochenmarks BMDC entstehen (Inaba et al., 1992; Shortman et al., 1997; Mackensen et al., 2000). Die CD34⁺ Zellen enthalten Vorläuferzellen für zwei verschiedene DC-Subpopulationen, die epidermalen Langerhans-Zellen und die interstitiellen DC (Caux et al., 1996; Strunk et al., 1997). Ein funktioneller Unterschied besteht darin, daß nur interstitielle DC direkt B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren können (Caux et al., 1997). Für eine lymphoide DC-

Subpopulation, deren Aufgabe die Induktion immunologischer Toleranz sein könnte (Suss und Shortman, 1996; Grouard et al., 1997), wird die Entstehung aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit T-Zellen angenommen (Ardavin et al., 1993).

Für eine DC-basierte Tumorthherapie mit wiederholten Vakzinierungen sind MODC in besonderem Maße geeignet, da ausgereifte MODC die stärksten bekannten antigenpräsentierenden Zellen sind (Romani et al., 1996; Reddy et al., 1997). MODC lassen sich mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 in großen Mengen kultivieren, zur Gewinnung der monozytären Vorläuferzellen ist nur eine Blutentnahme erforderlich.

DC lassen sich aufgrund ihrer typischen (namensgebenden) Morphologie und dem charakteristischen Muster der Oberflächenantigene eindeutig identifizieren. So weisen humane MODC eine starke Expression der antigenpräsentierenden HLA Klasse I und II sowie CD1a-Moleküle auf. Damit einher geht die Expression der costimulierenden Moleküle CD 80 und CD 86, bei gleichzeitiger Abwesenheit Monozyten-/Makrophagen- (CD 14) und Lymphozyten-spezifischer (CD 3, CD 19) Oberflächenmarker (Caux et al., 1994; Sallusto et al., 1995; Romani et al., 1996). Als DC-Marker dient hierbei CD 1a, das auf nahezu allen DC exprimiert wird. Der Ausreifungsmarker CD 83 hingegen wird nur bei ausgereiften DC nachgewiesen (Tedder et al., 1994; Romani et al., 1996).

Mit dieser Expression von antigenpräsentierenden und costimulierenden Molekülen sind DC bestens für ihre Hauptaufgabe, die Induktion und Modulation von Immunreaktionen, ausgestattet. HLA Klasse II / Antigen-Komplexe sind auf DC in bis zu 100-fach höherer Anzahl vorhanden als bei anderen APC (B-Zellen und Makrophagen) (Inaba et al., 1997). Normale T-Zell-Proliferationsassays werden in der Regel mit der gleichen Anzahl von Stimulator-Zellen und Responder-Zellen durchgeführt, während bereits eine einzige DC mit ihrer immensen Stimulationswirkung etwa 100 - 3000 T-Zellen aktivieren kann (Reddy et al., 1997; Banchereau et al., 1998). Reife DC können große Mengen IL-12 sezernieren und bewirken damit eine Verstärkung sowohl der angeborenen (NK-Zellen) als auch der erworbenen Immunität (B- und T-Zellen) (Koch et al., 1996; Cella et al., 1996). DC exprimieren zusätzlich Moleküle, die mit Rezeptoren auf T-Zellen interagieren, um die Adhäsion (ICAM-1/CD 54) und Signalwirkung (Costimulation; CD 80 und CD 86) zu erhöhen (Caux et al., 1994; Inaba et al., 1994). Diese Eigenschaften (HLA Expression, IL-12 Produktion, costimulierende Moleküle) können innerhalb eines Tages nach Kontakt mit vielen Stress- und Gefahrensignalen (u.a. bakterielle Produkte) hochreguliert werden.

Bereits die Entwicklung humaner MODC offenbart ihre Anpassung an die Antigenpräsentation und Induktion von Immunreaktionen: in den meisten Geweben kommen die DC

in einem „unreifen“ Zustand vor. Sie besitzen eine geringe T-Zell-stimulatorische Potenz und lassen für die T-Zell-Aktivierung benötigten Signale (CD 40, CD 54, CD 80) vermissen. Im unreifen Zustand nehmen DC rezeptorvermittelt (Sallusto et al., 1994; Sallusto et al., 1995), über Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993; Inaba et al., 1993) und Pinozytose (Sallusto et al., 1995) Antigene auf, die in besondere HLA Klasse II-Molekül-reiche Zellkompartimente (MIIC) transportiert werden. Dort bildet sich eine große Anzahl von HLA Klasse II / Antigen-Komplexen (Sallusto et al., 1994; Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997). Bewirken starke immunologische Stimuli eine Ausreifung der DC, werden diese HLA Klasse II / Antigen-Komplexe zur Zelloberfläche befördert, wo sie für mehrere Tage stabil bleiben (Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997). Wichtig für die Induktion einer effektiven zytotoxischen Antwort (Heemels et al., 1995; Banchereau et al., 1998) ist jedoch die Fähigkeit von DC, exogene Antigene auch über HLA Klasse I-Moleküle präsentieren zu können; jedoch verbleibt hier der zugrunde liegende Mechanismus noch unklar (Bender et al., 1995; Albert et al., 1998). Ausgereifte DC beenden die Antigenaufnahme und exprimieren costimulierende Moleküle (CD 80, CD 86) zur T-Zell-Aktivierung. Diese Wandlung der ausgereiften DC zur professionellen antigenpräsentierenden Zelle bewirkt im Zusammenspiel mit der Zytokinsekretion ihre enorme Kapazität zur T-Zell-Stimulation (Abbildung 1.1).

Abbildung 1.1 Eigenschaften unreifer und reifer DC

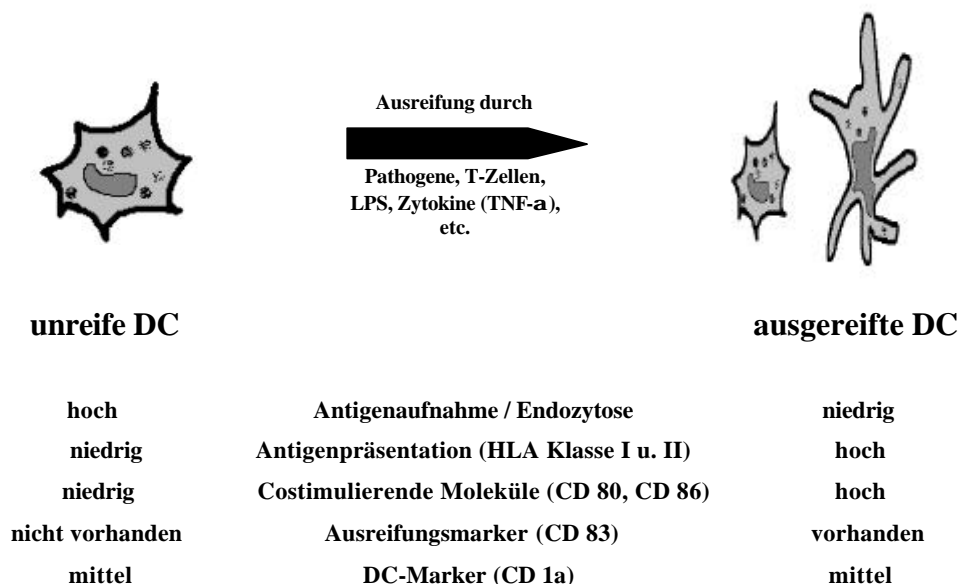


Abb. 1.1: Die Stimulation durch Pathogene, T-Zellen, LPS oder Zytokine (TNF- α), etc. lässt humane DC ausreifen. Aufgeführt sind wichtige Veränderungen der DC-Eigenschaften auf ihrem Entwicklungsweg zur professionellen antigenpräsentierenden Zelle.

Die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen kann zur Ausbildung verschiedener Immunreaktionen führen: sowohl die Bildung von Antikörpern als auch die zelluläre Reaktion mit einer Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ (DTH) wird durch CD 4⁺ T-Zellen vermittelt. Die Erklärung für das Phänomen, daß die gleichen T-Helferzellen derart verschiedene Immunreaktionen auslösen, lieferte die Entdeckung zweier unterschiedlicher Populationen von CD 4⁺ T-Zellen (sogenannte T_{H1}- bzw. T_{H2}-Zellen), die in ihrem Zytokinsekretionsmuster differierten (Mosmann et al., 1986). Naive T-Zellen (T_{H0}-Zellen) entwickeln sich entweder zu T_{H1}-Klonen, die zelluläre Immunität vermitteln und IFN- γ (sowie IL-2 & TNF- β) sezernieren, oder zu T_{H2}-Klonen, die insbesondere die Bildung von Antikörpern fördern und für die eine IL-4- (IL-5 & IL-13) Sekretion kennzeichnend ist. Beginnt sich eine T-Zell Immunreaktion (T_{H1} oder T_{H2}) zu entwickeln, tendiert sie zu einer progressiven Verstärkung ihrer Polarisierung. Verantwortlich hierfür ist die Sekretion der entsprechenden Zytokine, die einerseits inhibierend auf T-Zell-Klone mit entgegengesetzter Polarisierung einwirken und andererseits als autokriner Wachstumsfaktor dienen. Die wichtigsten Auslöser für die T_{H1}/T_{H2}-Differenzierung naiver (T_{H0}) Zellen sind ebenfalls Zytokine, wobei vor allem das von Makrophagen und DC produzierte IL-12 eine T_{H1}-Entwicklung, IL-4 eine T_{H2}-Polarisierung fördert (Abbas et al., 1996). Seit kurzem wird auch die Entwicklung einer T_{H3}-Population mit TGF- β 1 Sekretion angenommen, die mit der Ausbildung immunologischer Toleranz in Verbindung steht (Zeller et al., 1999; Prud'homme et al., 2000).

In der DC-basierten Immuntherapie werden humane MODC *in vitro* u.a. mit Tumor- oder Virus-assoziierten Antigenen beladen, um nach Re-Applikation *in vivo* eine Tumorspezifische Immunantwort zu bewirken. Für eine erfolgreiche Tumor-/Infektionsbekämpfung ist eine effektive zytotoxische (T_{H1}) Immunantwort wichtig, die wiederum eine antigenspezifische, HLA-Klasse I gebundene Aktivierung von CD 8⁺ T-Zellen voraussetzt (Heemels und Ploegh, 1995). Das „Lizenz-Modell“ der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Guerder und Matzinger, 1992; Lanzavecchia, 1998) geht dabei von der „Lizenzierung“ der APC (in diesem Fall eine DC) aus, die daraufhin autonom eine zytotoxische Immunreaktion auslösen kann. Die vorhergehende Aktivierung der APC wird mittels CD 40 / CD 40-Ligand-Interaktion durch CD 4⁺ T-Zellen ausgelöst. Dieses theoretische Modell der autonomen Stimulation einer antigenspezifischen zytotoxischen Immunantwort durch „lizenzierte“ APC wird durch eine wachsende Zahl von Arbeiten untermauert (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Baxevanis et al., 2000).

1.3 Immunstimulatorische DNA

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss immunstimulierender DNA (IS-DNA) auf humane MODC zu untersuchen.

Für Lipopolysaccharide und eine Reihe weiterer bakterieller Produkte war eine stimulierende Wirkung auf das Immunsystem von Säugetieren bekannt. Seit kurzem ist ein derartiger Effekt auch für bakterielle DNA nachgewiesen worden (Messina et al., 1991; Yamamoto et al., 1992; Stacey et al., 1996). Ein wichtiger Unterschied zwischen bakterieller DNA (mit einem starken immunstimulierenden Effekt) und Vertebraten-DNA (ohne immunstimulierenden Effekt) ist das häufige Vorkommen unmethylierter CpG-Dinukleotide in bakterieller DNA, während diese sogenannten CpG-Motive in Vertebraten-DNA wesentlich seltener zu finden sind und zu 80% eine Methylierung aufweisen (Krieg et al., 1995). Die stärksten immunstimulatorischen CpG-Motive weisen einen Aufbau aus zwei 5'-Purinen, einem unmethyliertem Cytosin-Guanin und zwei 3'-Pyrimidinen auf (z.B. 5'-AACGTT-3') (Krieg et al., 1995; Sato et al., 1996; Pisetsky et al., 1996). Ausgesuchte synthetische Oligodesoxynukleotide, die unmethylierte CpG-Motive enthielten, zeigten ebenfalls immunologische Effekte, die den Wirkungen bakterieller DNA vergleichbar waren. Diese immunstimulierenden ODN (IS-ODN) konnten die Aktivierung von B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen auslösen (Krieg et al., 1995; Messina et al., 1991; Yamamoto et al., 1992; Stacey et al., 1996). Zusätzlich erhöhten sie die Produktion von Zytokinen (TNF- α , IL-6, IL-12), die an der Entwicklung einer aktiven Immunantwort mitwirken (Cowdery et al., 1996; Halpern et al., 1996; Klinman et al., 1996). Die Stärke und Art der Wirkung von CpG-Motiven wird entscheidend durch die Sequenz der flankierenden Purin- und Pyrimidinbasen beeinflusst (Krieg et al., 1995; Sato et al., 1996).

Möglicherweise repräsentiert diese Aktivierung von Lymphozyten durch die CpG-Motive in bakterieller DNA einen Abwehrmechanismus des Immunsystems, um die bakterielle von der körpereigenen DNA zu unterscheiden (Krieg et al., 1995). Die molekularen Mechanismen, die den IS-DNA-vermittelten immunologischen Effekten zugrunde liegen, sind momentan noch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Unabhängig von den beteiligten Mechanismen ist aber deutlich, daß IS-DNA starke immunologische Effekte auf naive Lymphozyten ausübt. So kann IS-DNA antigenpräsentierende Zellen zur Produktion von T_{HI}-Zytokinen (IL-12, IL-18) stimulieren und auf diese Weise die antigenspezifische Differenzierung naiver T-Zellen in zytotoxische T-Zellen bewirken. Synergistisch hierzu wirkt die durch CpG-Motive induzierte Produktion des immunregulatorischen T_{HI}-Zytokins IFN- γ durch NK-Zellen (Cowdery et al.,

1996; Yi et al., 1996). Diese Tendenz zur Ausbildung einer T_{HI}-polarisierten Immunantwort nach IS-DNA-Stimulation könnte sich bei einem Einsatz in der Immuntherapie von Tumoren oder intrazellulären Erregern als nützlich erweisen.

Die immunstimulierende, T_{HI}-polarisierende Wirkung von IS-DNA konnte bereits im murinen System und bei humanen Lymphozyten (Yamamoto et al., 1994; Ballas et al., 1996; Roman et al., 1997; Sparwasser et al., 1998) gezeigt werden. Trotz der großen Bedeutung der MODC vor allem für Tumorummuntherapien war die Wirkung von IS-DNA auf humane MODC jedoch bisher noch weitgehend unbekannt.

1.4 Fragestellung

Als wichtigste antigenpräsentierende Zellen bieten sich DC aufgrund ihrer besonderen Fähigkeiten für einen Einsatz bei Immuntherapien an. Humane MODC haben für die DC-basierten Tumorimmuntherapien eine enorme Bedeutung erlangt.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein optimiertes Protokoll für MODC-basierte Immuntherapien erarbeitet. Zusätzlich wurde versucht, mit dem Einsatz von immunstimulierender DNA neue Chancen für MODC-basierte Immuntherapien aufzuzeigen und eine selektive Beeinflussung der T_{H1}/T_{H2} -Polarisierung einer Immunantwort zu ermöglichen. Abschließend soll in einer Fallstudie die praktische Anwendung einer MODC-basierten Immuntherapie exemplarisch verdeutlicht werden: mit der vorliegenden Fallstudie erfolgt erstmalig die Beschreibung der Behandlung eines endokrinen Karzinoms durch eine MODC-basierte Therapie.

Die Arbeit verfolgt somit diese wesentlichen Zielsetzungen:

- ***In vitro* Versuche zur Etablierung einer MODC-basierten Immuntherapie**
(Erarbeitung eines optimierten Protokolls zur Isolierung, Antigenbeladung und Ausreifung humaner MODC für den Einsatz bei Immuntherapien)
- **Etablierung einer *in vitro* Methode mit IS-DNA-ausgereiften MODC für zukünftige *in vivo* Immuntherapien**
(Untersuchung des Effektes von IS-DNA auf die Ausreifung und Aktivierung humaner MODC *in vitro* und Bestimmung der T_{H1}/T_{H2} -Balance bei einer *in vitro* Immunreaktion, die durch IS-DNA-stimulierte MODC hervorgerufen wird)
- **Fallstudie: *In vivo* Immuntherapie mit MODC bei metastasiertem Nebenschilddrüsenkarzinom**
(Generieren einer Antitumor-Immunreaktion durch MODC-basierte Immuntherapie bei einem Nebenschilddrüsenkarzinom sowie Nachweis der Immunreaktion *in vitro* und *in vivo*)

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Zellkulturarbeiten wurden grundsätzlich unter sterilen, möglichst konstanten Bedingungen durchgeführt. Die Arbeiten mit potentiell infektiösen Materialien wie Blut, Serum oder Zellkulturen erfolgten in einer Laminar Air Flow-Sicherheitsbank Klasse II. Für alle Experimente wurden Lipopolysaccharidfreie-(LPS) oder Low-LPS-Medien eingesetzt, um eine unspezifische Stimulation der kultivierten MODC zu vermeiden.

2.1.1 Probanden

Das heparinisierte, venöse Blut für Ausreifungs- und Stimulationsexperimente mit MODC stammte von 20 verschiedenen, gesunden Probanden (Alter 21-39 Jahre; 12 männlich und 8 weiblich). Bei Einsatz von Tetanustoxoid als Antigen in Stimulationsexperimenten wurde nur Blut von Probanden mit nachgewiesenem, sicheren Tetanus-Impfschutz verwendet.

2.1.2 Patienten

Eine Patientin mit Nebenschilddrüsen(NSD)-Karzinom (Alter: 50 Jahre) wurde 1991 erstmalig an die Klinik für Endokrinologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf überwiesen. Nach der Diagnose eines primären Hyperparathyreoidismus wurde eine Nebenschilddrüse entfernt und histologisch als benignes Adenom diagnostiziert. Die Serumkonzentrationen von Kalzium und Parathormon fielen nach der Operation anfänglich ab, zeigten jedoch bei den Nachuntersuchungen im Laufe der Jahre einen stetigen Anstieg. Bei weiteren Operationen 1994 und 1995 mußte aberrantes Nebenschilddrüsenewebe aus der linken submandibulären Region exzidiert werden, was zur Diagnose eines Nebenschilddrüsen-Karzinoms führte.

Ab 1997 entwickelte die Patientin alle Symptome einer lange bestehenden Hyperkalzämie mit schweren Knochenschmerzen, großem Gewichtsverlust und extremer Muskelschwäche. Diese Symptome konnten durch eine intravenöse Therapie mit Bisphosphonaten, Diuretika und Kortikoiden gemildert werden. Im Sommer 1998 erhöhte sich das Parathormon im Serum auf 1080 pg / ml (Normwert: < 50 pg / ml). Die angefertigten CT-Aufnahmen zeigten ein lokales Rezidiv im Hals und eine Lungenmetastase im rechten unteren Lungenlappen. Nach der Resektion des Lokalrezidivs und der Lungenmetastase sank der Parathormonspiegel im Serum merklich ab, blieb aber erhöht (> 200 pg / ml) und bewies damit residuales Tumorgewebe.

Da die Patientin eine Chemotherapie ablehnte, wurde mit einer Immuntherapie versucht, den Tumor zu eradizieren. Die Patientin willigte nach umfassender Aufklärung in die Behandlung ein. Die Ethikkommission stimmte dem Studienprotokoll zu (Studiennummer: 1350).

2.1.3 Tiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse (NOD-Junioren; ID: 2/001, F₂) stammten aus der Zucht von Fr. Prof. L. Herberg, Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf. Zur Präparation von Knochenmarkzellen wurden männliche Tiere im Alter von 5 Wochen verwendet.

2.1.4 Zellkulturmaterialien

Das verwendete Zellkulturmedium bestand aus RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin + 10% FKS + P/S (1:1000) (RPMI 1640+), der Erythrozytenlysepuffer aus 37 mg / l EDTA Dinatriumsalz Dihydrat + 8,29 g / l NH₄Cl + 1 g / l K₂HPO₄. Seren (FKS bzw. autologes humanes Serum) wurden vor Gebrauch hitzeinaktiviert (45 Minuten bei 56°C).

[6- ³ H]-Thymidin (TRK.61, 1 mCi)	Amersham, Little Chalfont, England
Bestrahlungsgerät	Institut für Hygiene, Universität Düsseldorf
BSA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DynaBeads M-450 (anti-CD4, CD8 oder CD19)	Dynal, Hamburg, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einfrierbox	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Einfriermedium-DMSO	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Einwegpipetten (1 ml / 2,5 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
ELISA-Platten-Reader SLT Spectra	SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
ELISA-Platten-Schüttler	Medgenix, Springfield (MO), U.S.A.
Eppendorf-Caps (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ficoll-Hypaque	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Filterplatten UniFilter GF/C für Zellharvester	Packard, Dreieich, Deutschland
FKS	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Flachbodenplatten (96-Loch)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
GM-CSF (human, aus Leukomax 400)	Novartis, Nürnberg, Deutschland
GM-CSF (murin)	Pharmingen, San Diego (CA), U.S.A.
Heparin-Natrium (Liquemin N 25000)	Roche, Mannheim, Deutschland
Homogenisator (konisch)	Merck, Darmstadt, Deutschland
IL-12 ELISA (human)	Roche, Mannheim, Deutschland
IL-4 (human)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
IL-6 EASIA (human)	Biosource, Fleurus, Belgien
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
KLH	Calbiochem, La Jolla (CA), U.S.A.

Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
LeukoSep-Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Falcon (Life Tech.), Karlsruhe, Deutschland
Magnethalter MPC-1	Dynal, Hamburg, Deutschland
Medium RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Fluovert	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikroszintillations-Counter Top Count	Packard, Dreieich, Deutschland
NaCl-Lösung (0,9%, steril)	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand (Merck), Darmstadt, Deutschland
NH ₄ Cl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ovalbumin (Grad VII)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
P/S (10.000 U/ml Penizillin; 10 mg/ml Streptomycin)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Parathormon (AS 1-84) / (AS 1-34)	Biosynthan, Berlin, Deutschland
PBS	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Phytohemagglutinin (PHA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Pipetboy Accu-Jet	Brand (Merck), Darmstadt, Deutschland
Pipetten(-spitzen) (2 µl / 10 µl / 100 µl / 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spectrophotometer BioSpec-1601	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Szintillatorflüssigkeit Microscint 20	Packard, Dreieich, Deutschland
Tetanustoxoid	SVM, Bilhoven, Niederlande
TNF-α (human)	Roche, Mannheim, Deutschland
Trypanblau-Standardlösung (0,4%)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Zellharvester Filtermaid 196	Packard, Dreieich, Deutschland
Zellkulturflaschen (50 ml / 250 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6-Loch / 24-Loch)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sigma 3 K 30	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Falcon (Life Tech.), Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Molekularbiologie

Ampicillin	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld, Hannover, Deutschland

Cycler GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer, Norwalk (CT), U.S.A.
DNA-Molekulargewichtsmarker 1 kb	Promega, Mannheim, Deutschland
DNase I, (RNase-frei, +Puffer)	Roche, Mannheim, Deutschland
E. Coli (Subcloning Efficiency DH5 α)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese Power Supply PS 305 LT	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophoresekammer	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Endo-Free Plasmid Kit Giga	Qiagen, Hilden, Deutschland
Essigsäure 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gel-Loading Solution	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
HPLC-Wasser (LiChrosolv)	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin (500 x)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
LB-Broth	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Lumi-Imager TM Workstation	Roche, Mannheim, Deutschland
ODN (HPLC-gereinigt)	Biotez, Berlin, Deutschland
PCR-Tubes	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Probenröhrchen (endotoxinfrei)	BioWhittaker, Walkersville (MD), USA
QCL-1000 LAL Test Kit	BioWhittaker, Walkersville (MD), USA
Restriktionsendonuklease BamH1	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionsendonuklease Xma I	Promega, Mannheim, Deutschland
S.O.C.-Medium	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
TAE-Puffer (10 x)	Promega, Mannheim, Deutschland
Vektor pEGFP-C ₂	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Vektor pGEM-4Z	Promega, Mannheim, Deutschland
Vortexgerät Minishaker MS 2	Ika, Wilmington (NC), U.S.A.
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktosid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Durchflußzytometrie

Becton Dickinson FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Cytofix / Cytoperm Kit (with GolgiPlug)	Pharmingen, San Diego (CA), U.S.A.
Dako Fluorospheres	Dako, Glostrup, Dänemark
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Falcon (Becton D.), Heidelberg, Deutschland

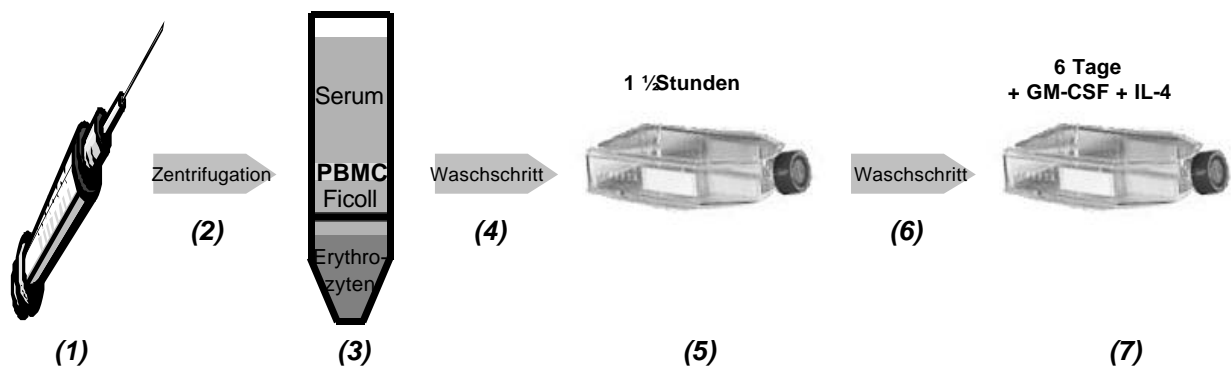
2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der *in vitro* Versuche zur Etablierung einer MODC-basierten Immuntherapie

2.2.1.1 Präparation humaner MODC aus venösem, heparinisiertem Blut

Zur Herstellung humaner MODC werden PBMC durch Dichtezentrifugation mit Ficoll-Hypaque-Lösung isoliert. Die mononukleären Zellen werden anschließend in einer Zellkulturflasche einem Adhärenzschritt unterzogen. Die adhärierenden Zellen müssen für sechs Tage mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 kultiviert werden, um unreife MODC zu erhalten. Diese Methode zur Präparation humaner MODC aus venösem Blut basiert in ihren Grundzügen auf den Protokollen von Romani et al. (1996), Sallusto et al. (1994) und Thurner et al. (1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde das folgende, abgeänderte Protokoll entwickelt:



(1) Den Probanden wurde 200 ml venöses Blut in 20 ml-Spritzen (2500 I.E. Heparin / Spritze) steril abgenommen. Daraufhin konnten 30 ml des venösen Blutes in ein LeukoSep-Röhrchen mit 14 ml Ficoll-Hypaque (R.T.) eingefüllt und zentrifugiert (2) werden (18 Min. bei 700 x g, R.T., ohne Bremse). Aus dem Gradienten (3) konnte jetzt ein großer Teil der Ficoll-Lösung und des Serums vorsichtig abgesaugt werden, bis die weiße PBMC-Schicht ungefähr einen Zentimeter über dem Filterplättchen schwamm. Die PBMC wurden nun in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen abgegossen und mit PBS gewaschen (4) (12 Min. bei 400 x g, R.T.). Der Überstand wurde dekantiert, die PBMC in 8 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei R.T. inkubiert. Nach dem Auffüllen mit PBS (R.T.) auf 50 ml mussten die PBMC erneut gewaschen (12 Min. bei 400 x g, R.T.) und anschließend im Kulturmedium RPMI 1640+ (RPMI 1640 mit L-Glutamin + 10 % FKS + P/S 1:1000) gelöst werden. Die PBMC konnten jetzt entweder für T-Zell-Proliferationsassays oder zur Herstellung von MODC verwendet werden.

Für die Präparation von MODC folgte ein Adhärenzschritt **(5)**: jeweils 10 ml der im Kulturmedium gelösten Zellen (5×10^6 bis 1×10^7 PBMC / ml) wurden in einer 250 ml-Zellkulturflasche (Greiner) im Brutschrank kultiviert (90 Min. bei 37°C, 5% CO₂). Danach konnte das Kulturmedium mit den nicht-festhaftenden Zellen vorsichtig abgenommen werden. Durch vier Waschschrte mit PBS **(6)** (R.T.) sollten die nicht-adhärennten Zellen möglichst vollständig aus der Kulturflasche eliminiert werden. Abschließend erfolgte das Auffüllen der Kulturflasche **(7)** durch 10 ml RPMI 1640+ Kulturmedium mit GM-CSF (1000 U / ml) und IL-4 (1000 U / ml). Die Zellen wurden für sechs Tage im Brutschrank kultiviert (37°C, 5% CO₂). Während der Kulturphase lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Nach drei Tagen wurden erneut Zytokine (1000 U / ml GM-CSF und 1000 U / ml IL-4) und zusätzlich 2 ml frisches Medium RPMI 1640+ in die Kultur gegeben. Nach sechstägiger Kultur wurden die unreifen MODC für Experimente oder Antitumorimmunisierungen verwendet.

2.2.1.2 Ausreifung humaner MODC für die Immuntherapie

Unreife humane MODC (Tag 6 der Kultur) wurden mit TNF- α zur Ausreifung gebracht. Nach der sechstägigen Kulturphase (Abschnitt 2.2.1.1) wurden 4×10^5 unreife MODC / ml in RPMI 1640+ mit GM-CSF (1000 U / ml) gelöst und zusammen mit TNF- α (1000 U / ml) inkubiert (1 Tage bei 37°C, 5% CO₂). Die Zellen wurden nach dem Ende der Inkubationszeit durchflußzytometrisch untersucht (Abschnitt 2.2.1.3).

2.2.1.3 Durchflußzytometrische Messungen

Bei der Durchflußzytometrie wurden die Zellen mit fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert (direkte Immunfluoreszenz). Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen waren in der Regel 2- oder 3-Farbanalysen. Die hierbei auftretende spektrale Überlappung der einzelnen Emissionsspektren (FITC, PE und PE-Cy5) erforderte eine entsprechende Einstellung der Kompensation. Zur Bestimmung der Kompensationseinstellung (FITC gegen PE bzw. PE gegen PE-Cy5) dienten Dako-Fluorospheres und gefärbte, humane Zellen. Isotypische Immunglobuline (Isotypkontrollen), die der Spezies des spezifischen Antikörpers entsprachen, dienten als Negativkontrollen und erfassten die unspezifische Bindung der Fluorochrome und Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Zellen. Diese Kontrolle (Zellen plus konjugiertes isotypisches Immunglobulin) konnte zum Setzen der Quadranten bzw. Regionen und damit zur Ermittlung der Anteile an markerpositiven Zellen benutzt werden. Die Instrumenteneinstellungen wurden so gewählt, daß sich die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Isotypkontrollen im Bereich von 10^0 bis 10^1 (4-Log-Darstellung) befanden und in der FSC/SSC-Darstellung eine klare Abgrenzung der Zellpopulationen möglich war.

Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung wurden für jede Färbung etwa 5×10^5 bis 1×10^6 DC bzw. 1×10^6 bis 3×10^6 PBMC in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 500 μ l PBS suspendiert. Nach Zugabe der mit Fluorochromen (FITC, PE oder PE-Cy5) markierten Antikörper inkubierten die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen in eiskaltem PBS wurden die Zellen in 500 μ l PBS gelöst und umgehend am Durchflußzytometer analysiert. Alle fluorochrom-konjugierten Antikörper (Tabelle 2.1) wurden in den vom Hersteller empfohlenen Mengen eingesetzt. Jede Messung am Durchflußzytometer beruhte auf mindestens 10.000 Ereignissen. Die Marker und Quadranten zur Abgrenzung von antigenpositiven Zellpopulationen wurden entsprechend den isotypischen Kontrollfärbungen festgesetzt. Bei Messungen zur Bestimmung der Oberflächenmarker-expression von Lymphozyten und DC wurde zuerst eine Region um die jeweilige Zellpopulation in der FSC/SSC-Darstellung gelegt. Aus dieser Region, die im folgenden auch als „Lymphozyten“- bzw. „DC-Region“ bezeichnet wird, stammten alle gemessenen Ereignisse. Falls die Reinheit einer Zellpopulation bestimmt werden musste, wurden alle Zellen gemessen (nachfolgend als „alle Zellen“ bezeichnet).

Die Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgte mit Lysis II und WinMDI 2.8 Software. Bei DC wurde als Maß für die Expression eines bestimmten Antigens der Expressionsindex bestimmt. Er errechnet sich als Produkt von mittlerer Fluoreszenzintensität der markerpositiven Zellen und dem prozentualen Anteil der markerpositiven Zellen, gemessen in der DC-Region der FSC/SSC-Darstellung.

Tabelle 2.1 Liste monoklonaler Antikörper für die Durchflußzytometrie

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD 1a – PE ¹	BL 6	IgG1 (Maus)	Immunotech (Marseille, Frankreich)
CD 3 – PE ¹	UCHT1	IgG1 (Maus)	Dako (Glostrup, Dänemark)
CD 4 – FITC ¹	RPA-T4	IgG1 (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
CD 8 – PE ¹	HIT 8a	IgG1 (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
CD 14 – FITC ¹	MΦ P9	IgG2b (Maus)	BectonDickinson (Heidelberg, Deutschland)
CD 19 – PE-Cy5 ¹	J4.119	IgG1 (Maus)	Immunotech (Marseille, Frankreich)
CD 80 – FITC ¹	MAB 104	IgG1 (Maus)	Immunotech (Marseille, Frankreich)
CD 83 – FITC ¹	HB 15a	IgG2b (Maus)	Immunotech (Marseille, Frankreich)
CD 86 – PE ¹	2331	IgG1 (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
HLA-A,B,C – PE ¹	G46-2.6	IgG1 (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
HLA-DR,DP,DQ – FITC ¹	TÜ 39	IgG2a (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
IL-4 – FITC ¹	MP4-25D2	IgG1 (Ratte)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
INF- γ - FITC ¹	B27	IgG1 (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
CD 11c – FITC ²	HL3	IgG1 (Hamster)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
CD 86 – FITC ²	GL-1	IgG2a (Ratte)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
Isotypkontrolle (Maus) – FITC ¹	MOPC-21	IgG1 (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
Isotypkontrolle (Maus) – FITC ¹	G155-178	IgG2a (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
Isotypkontrolle (Maus) – FITC ¹	27-35	IgG2b (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
Isotypkontrolle (Maus) – PE ¹	679.1 Mc7	IgG1 (Maus)	Immunotech (Marseille, Frankreich)
Isotypkontrolle (Maus)-PE-Cy5 ¹	RPA-T8	IgG1 (Maus)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
Isotypkontrolle (Hamster) – FITC ²	G 235-2356	IgG1 (Hamster)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)
Isotypkontrolle (Ratte) – FITC ²	R 35-95	IgG2a (Ratte)	PharMingen (San Diego, CA, U.S.A.)

¹ Spezifität anti-Human ² Spezifität anti-Maus

2.2.1.4 Magnetische Zellsortierung

Bei der magnetischen Zellsortierung können durch ein starkes Magnetfeld und monoklonale Antikörper, an die paramagnetische Partikel gekoppelt sind, Zellpopulationen aufgetrennt werden. Für Stimulationsversuche mit MODC wurden bei einigen T-Zell-Proliferationsassays entweder CD4⁺ oder CD8⁺ Lymphozyten angereichert, indem die restlichen Lymphozyten durch den Dynabead-Mix anti-CD8 und -CD19 bzw. anti-CD4 und -CD19 depletiert wurden (negative Selektion). Die hierfür verwendeten Dynabeads M-450 mußten vor ihrer Verwendung zweimal in PBS + 2% FKS gewaschen werden, um den zytotoxischen Stabilisator Natriumazid (NaN₃) auszuwaschen. Die aus venösem Blut gewonnenen PBMC (Abschnitt 2.2.1.1) wurden zweimal in kaltem PBS gewaschen, bevor sie in einer Konzentration von 2×10^7 PBMC / ml in kaltem PBS + 2% FKS gelöst und mit dem Dynabead-Mix in einem 15 ml Probenröhrchen inkubiert werden konnten (30 Min. bei 4°C auf einem Rollmischgerät). Die Anzahl der Dynabeads pro Zielzelle betrug mehr als vier, um eine 99%-ige Depletion zu erreichen. Danach wurde das Probenröhrchen mit kaltem PBS + 2% FKS auf 10 ml aufgefüllt, geschüttelt und für 3 Minuten in den Magnethalter eingespannt. Nachdem sich an der Röhrcheninnenwand ein braunes Sediment (Dynabeads bzw. Dynabead-markierte Zellen) abzeichnete, konnte der mit CD4⁺ bzw. CD8⁺ Lymphozyten angereicherte Überstand abgenommen werden. Der Sedimentationsschritt wurde mit dem Überstand wiederholt, um eine möglichst vollständige Depletion zu erreichen. Der Überstand nach dem zweiten Sedimentationsschritt, der die CD4⁺ bzw. CD8⁺ Lymphozyten enthielt, konnte gewaschen, im Kulturmedium RPMI 1640+ gelöst und für T-Zell-Proliferationsassays verwendet werden (Abschnitt 2.2.1.6).

2.2.1.5 Versuche zum Zugabezeitpunkt des Antigens bei humanen MODC

In T-Zell-Proliferationsassays sollte die Auswirkung unterschiedlicher Zugabezeitpunkte für das Antigen untersucht werden. Zur Bestimmung der stimulatorischen Kapazität von MODC auf PBMC wurden 4×10^5 unreife MODC / ml (Tag 6 der Kultur) in RPMI 1640+ mit GM-CSF (1000 U / ml) durch TNF- α (1000 U / ml, 2 Tage) ausgereift. Die Zugabe des Antigens Tetanustoxoid (2,5 μ g / ml) erfolgte 2 Tage vor, 1 Tag vor oder gleichzeitig mit der Zugabe des Ausreifungsstimulus. Nach der Ausreifung wurden die MODC vor der Verwendung im Proliferationsassay zur Beseitigung von überschüssigem, nicht phagozytiertem Antigen dreimal in PBS gewaschen.

2.2.1.6 T-Zell-Proliferationsassays

Die T-Zell-Proliferationsassays erfolgten mit PBMC, CD 4⁺ oder CD 8⁺ Lymphozyten Tetanus-immunisierter Probanden (Isolierung: Abschnitt 2.2.1.4), die von autologen TT-beladenen, TNF- α -

ausgereiften MODC stimuliert wurden (Abschnitt 2.2.1.5). In einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden $1,5 \times 10^4$ MODC in 200 μ l RPMI 1640 + 10% FKS + P/S mit $8,5 \times 10^4$ frischen PBMC, CD4⁺ oder CD8⁺ Lymphozyten für 4 Tage bei 37°C kultiviert.

Die Zellen wurden nach Beendigung der Kulturphase mit einem Zellharvester geerntet. Die Zugabe der [³H]-Thymidinlösung (1 μ Ci / Loch) erfolgte immer 18 Stunden vor Beendigung der Kulturphase. Die [³H]-Thymidin-markierte DNA der Zellen wurde durch den Zellharvester in 6 Waschgängen auf eine neue 96-Loch-Filterplatte aufgebracht. Das überschüssige, nicht in die DNA eingebaute [³H]-Thymidin passierte den Filter. Die Filterplatte konnte jetzt mit Szintillator aufgefüllt (30 μ l / Loch) und zur Messung in den β -Counter gegeben werden.

2.2.1.7 Kryokonservierung und Vitalitätstest mit Trypanblaulösung

Im Falle einer Kryokonservierung wurden die isolierten PBMC (Abschnitt 2.2.1.1) in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen / ml in Einfriermedium aufgenommen, umgehend in 1,5 ml Kryoröhrchen gefüllt und in einer Einfrierbox bis auf -80°C abgekühlt. Die weitere Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Beim Auftauvorgang wurden der Inhalt zügig aufgetaut, mit Kulturmedium vermischt und die Zellen zweimal in RPMI 1640 gewaschen. Eine mikroskopische Verifizierung der Zellvitalität erfolgte mittels Trypanblaufärbung (Verdünnung 1 : 10).

2.2.2 Methoden zur Überprüfung der Wirkung von immunstimulierender DNA auf humane MODC

2.2.2.1 Präparation immunstimulierender Plasmid-DNA und IS-ODN

Um die Wirkung immunstimulatorischer DNA-Sequenzen auf die Ausreifung von MODC zu bestimmen, wurden sowohl ODN als auch Plasmid-DNA zur Stimulation der MODC verwendet.

Die beiden getesteten Plasmide IS-PL (pGEM-4Z-Vektor) und die Kontrolle C-PL (pEGFP-C₂-Vektor) enthielten schwach immunstimulierende Sequenzen. IS-PL mit einer Ampicillin-Resistenz besaß jedoch zusätzlich zwei stark immunstimulierende Sequenzen (5'-AACGTT-3'), die C-PL mit einer Kanamycin-Resistenz fehlten (Sato et al. 1996) (Abbildung 2.1).

Abbildung 2.1 Struktur von IS-PL und C-PL

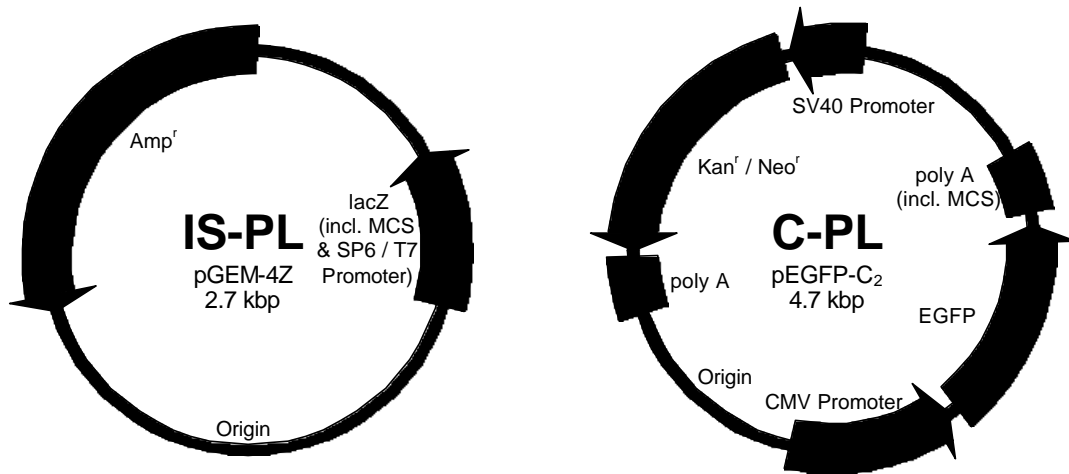


Abb. 2.1: Das verwendete immunstimulatorische Plasmid (IS-PL) enthielt in seiner Ampicillin-Resistenz (Amp^r) die stark immunstimulierende Sequenz 5'-AACGTT-3', die dem Kontrollplasmid (C-PL) mit einer Kanamycin/Neomycin-Resistenz (Kan^r/Neo^r) fehlte. Beide Plasmide enthielten (in ihrer lacZ bzw. CMV-Promotor Region) auch schwach immunstimulierende Sequenzen (5'-GACGTC-3' und 5'-AGCGCT-3') (Sato et al., 1996).

Die Auswahl der auf ihre immunstimulatorische Potenz getesteten ODN beinhaltete Sequenzen, die von anderen Autoren als immunstimulatorisch wirksam erkannt wurden, und Sequenzen, die aus dem Ampicillin-Resistenzgen des IS-PL stammten (Tabelle 2.2). Die HPLC-gereinigten ODN wurden in endotoxinfreiem Wasser gelöst. Phosphorthioat-stabilisierte ODN waren durchgängig an allen Basen stabilisiert. Es erfolgte eine photometrische Kontrollmessung der vom Hersteller angegebenen ODN-Konzentrationen.

Tabelle 2.2 Sequenzen und Literaturquellen der verwendeten ODN

Bezeichnung	ODN-Sequenz	Literaturquelle
IS-1585	5'-GGGGTCAACGTTGAGGGGGG-3'	Chu et al. 1997, Ballas et al. 1996
C-1585	5'-GGGGTCAAGCTTGAGGGGGG-3'	
IS-1668	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGCT-3' ¹	Krieg et al. 1995, Lipfort et al. 1997, Sparwasser et al. 1998
C-1720	5'-TCCATGAGCTTCCTGATGCT-3' ¹	
IS-1760	5'-ATAATCGACGTTCAAGAAAG-3'	Hartmann et al. 1999
C-1760	5'-ATAATGCAGCTTCAAGAAAG-3'	
IS-4Z	5'-TTGGAAAACGTTCTTCGGGG-3'	Sequenz des pGEM-4Z Vektors, Basenpaare 1932-1952 (Ampicillinresistenz)
C-4Z	5'-TTGGAAAAGCTTCTTCGGGG-3'	
INHIB	5'-TGACCCTCTCCCAT-3'	Rykova et al. 1999

¹ Phosphorthioat-stabilisiert

Die Amplifikation und Präparation der verwendeten Plasmide IS-PL (Ampicillin-Resistenz) und C-PL (Kanamycin-Resistenz) geschah nach folgendem Protokoll: 200 µl kompetente E. Coli wurden auf Eis aufgetaut und mit 3 µl DMSO sowie 0,01 µg Plasmid-DNA für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Erwärmung auf 42° C für 50 Sekunden inkubierten die E. Coli für weitere 2 Minuten auf Eis. Zum Abschluß wurden 500 µl S.O.C.-Medium hinzugegeben und der Ansatz im Schüttler inkubiert (60 Minuten, 37° C, 180 U / min). Nachdem ein Teil des Ansatzes auf einer Agarplatte (LB-Agarose + IPTG 1:200 + X-Gal 1:1000) mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin 1:1000 oder Kanamycin 1:500) ausgestrichen wurde, konnte nach 16 Stunden bei 37° C eine einzelne, gut abgrenzbare Kolonie gepickt werden. Die weitere Plasmid-Präparation erfolgte nach dem Protokoll des Qiagen Plasmid Giga Kits.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde in aqua ad iniectabilia gelöst. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA erfolgte photometrisch durch Messung der OD 260 nm bzw. der OD 260 nm / 280 nm-Relation. Der Endotoxingehalt der Plasmid-Präparationen wurde im LAL-Assay (Abschnitt 2.2.2.2) überprüft.

Um den Einfluß der DNA-Sequenz auf die DC-Ausreifung überprüfen zu können, wurden bei einem Teil der Stimulationsversuche IS-PL und C-PL eingesetzt, nachdem zuvor deren Sequenzen durch einen DNase-Verdau zerstört worden waren. Für diese Stimulationsversuche geschah ein DNase-Verdau von IS-PL und C-PL mit RNase-freier DNase I für 48 Stunden bei 37°C (3 Units DNase I / µg DNA), gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der DNase bei 95° C für 45 Minuten. Die IS-PL- und C-PL-Präparationen wurden für eine Kontrollelektrophorese mit den Restriktionsenzymen BamHI und Xma I (15 Units Enzym / µg DNA) über Nacht verdaut. Bei allen enzymatischen Reaktionen wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Reaktionspuffer (10 x) benutzt und der Rest des Ansatzes mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl für Restriktionsenzyme bzw. 100 µl für den DNase-Verdau aufgefüllt.

Die DNA-Präparationen und die Vollständigkeit des Plasmid-Verdaus wurden durch Gelelektrophoresen mit einem 1%-igen Agarose-Gel überprüft. Als Laufpuffer diente TAE (1x), als Größenstandard wurde ein 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker verwendet. Die digitale Dokumentation des Elektrophoreseresultates erfolgte mit einer Lumi-ImagerTM-Workstation.

2.2.2.2 Endotoxinbestimmungen

Um eine Endotoxin-bedingte immunstimulierende Wirkung auszuschließen, mußten die mit dem Qiagen Endo-Free Plasmid Kit vorgenommen Plasmidpräparationen auf Endotoxine getestet werden. Der hierzu verwendete QCL-1000 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay von Biowhittaker ist ein von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (United States Food and Drug Administration, FDA) anerkannter photometrischer Test zur quantitativen Endotoxinbestimmung (FDA 1987).

Alle verwendeten Materialien, die in Kontakt zu Proben und Testreagenzien kamen, waren pyrogenfrei. Zunächst wurden aus der Endotoxinstammlösung die Standardverdünnungen von 0,1 bis 1,0 EU / ml in pyrogenfreiem Wasser (aqua ad iniectabilia) hergestellt. Jeweils 50 µl Standardlösung, Probenlösung oder Wasser (Leerwert) wurden in ein Probenröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 50 µl Lysatlösung inkubierten die Proben für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Nachfolgend wurde in die Probenröhrchen 100 µl Substratlösung gegeben und es erfolgte eine erneute sechsminütige Inkubation bei 37°C. Die enzymatische Reaktion wurde mit 100 µl Stopplösung (25% Essigsäure) beendet und die Absorption bei 405 nm im Photometer gemessen. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen, wobei der Leerwert (Wasser) als Nullwert diente.

2.2.2.3 Präparation muriner BMDC aus Knochenmarkzellen

Die Präparation muriner BMDC erfolgte aus Knochenmarkzellen und richtete sich im wesentlichen nach dem Protokoll von Inaba et al., 1992. Durch Zytokinzugabe entstanden in einer fünftägigen Zellkulturphase die unreifen murinen BMDC.

Den Mäusen wurden unter möglichst keimfreien Bedingungen die Femura entnommen und diese vollständig von Muskel- und Bindegewebe befreit. Anschließend begannen drei Waschschritte in sterilen Petrischalen, zuerst in 70%-igem Ethanol für 1 Minute und dann zweimal in PBS unter Verwendung von jeweils neuen Petrischalen. Die Femura wurden in eine Petrischale mit RPMI 1640 überführt und die Kondylen mit einer Schere abgetrennt. Mit einer 25G-Kanüle konnte das Knochenmark durch etwa 2 ml RPMI herausgespült werden. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension mussten die Zellen in Erythrozytenlysepuffer inkubiert werden (10 Min., R.T.). Für die folgende Zellkulturphase (5 Tage bei 37°C, 5% CO₂) wurden 2 x 10⁶ Zellen / ml in RPMI 1640+ Medium mit 10 ng / ml GM-CSF resuspendiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte auf 24-Loch-Zellkulturplatten (1 ml / Loch). Beginnend mit dem folgenden Kulturtag wurde jeden zweiten Tag ein Medienwechsel vorgenommen, bei dem 70% - 80% des Kulturmediums verworfen und durch die gleiche Menge frischen RPMI 1640+ Mediums mit 10 ng / ml GM-CSF ersetzt wurden. Nach 5 Tagen erfolgte die Stimulation der unreifen murinen BMDC zu ausgereiften Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben.

2.2.2.4 Ausreifungsversuche mit IS-DNA bei humanen MODC

Unreife humane MODC (Tag 6 der Kultur, Abschnitt 2.2.1.1) wurden mit TNF-α (1000 U / ml), immunstimulatorischen Plasmiden (0,01-20 µg / ml) und ODN (0,01-20 µg / ml) zur Ausreifung gebracht. 4 x 10⁵ unreife MODC / ml wurden in RPMI 1640+ mit GM-CSF (1000 U / ml) suspendiert

und zusammen mit dem jeweiligen Ausreifungsstimulus inkubiert. Die MODC wurden nach dem Ende der Inkubationszeit (3 Tage bei 37°C, 5% CO₂) durchflußzytometrisch untersucht (Abschnitt 2.2.1.3).

2.2.2.5 Ausreifungsversuche mit IS-DNA bei murinen BMDC

Die Ausreifungswirkung der IS-ODN sollte durch einen Kontrollversuch mit murinen BMDC verifiziert werden. Hierzu diente die Inkubation (2 Tage, 37°C, 5% CO₂) unreifer muriner BMDC (Tag 5) mit 6,5 µg / ml (1 µM) ODN in RPMI 1640+. Anschließend wurde die Ausreifungswirkung durchflußzytometrisch überprüft (Abschnitt 2.2.1.3)

2.2.2.6 Messung der Zytokinsekretion von DC mittels ELISA

Die IL-6 und IL-12p75 Zytokinkonzentrationen in eingefrorenen Zellkulturüberständen (-80°C) von stimulierten MODC wurden mit kommerziell erhältlichen „Sandwich“-ELISA bestimmt. Der verwendete IL-12p75 ELISA maß spezifisch das bioaktive IL-12p75, die Untereinheiten p35 und p40 wurden nicht detektiert. Weder der IL-6 noch der IL-12p75 ELISA zeigte nach Herstellerangaben eine Kreuzreaktivität mit anderen Zytokinen.

Die Probenvolumina, Inkubationszeiten und -temperaturen, Waschschrte sowie die Wellenlänge bei der Bestimmung der optischen Dichte richteten sich nach den Vorgaben der mitgelieferten Versuchsprotokolle des Herstellers (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3 ELISA Versuchsprotokoll zur Bestimmung humaner Zytokine

ELISA	IL-6	IL-12p75
Probenvolumen	50 µl	20 µl
Inkubationszeit (Probe)	60 Min. bei RT	30 Min. bei RT*
Waschschrte	3	1
Inkubationszeit („detection antibody“)	60 Min. bei RT	120 Min. bei RT
Waschschrte	3	3
Inkubationszeit (Substrat)	30 Min. bei RT	20 Min. bei RT
Wellenlänge	450 nm	450 nm
Sensitivität	2 pg / ml	5,8 pg / ml
Standardbereich	0 – 1500 pg / ml	0 – 800 pg / ml

*Beim IL-12p75 ELISA wurde die streptavidinbeschichtete 96-Loch-Platte im ersten Inkubationsschritt zusammen mit dem biotinmarkierten „capture antibody“ inkubiert. Die Probe wurde erst beim nächsten Inkubationsschritt zusammen mit dem „detection antibody“ hinzugefügt.

2.2.2.7 T-Zell-Proliferationsassays mit IS-PL-ausgereiften MODC

Die stimulatorische Kapazität der MODC zur Auslösung antigenspezifischer Immunantworten sollte bei T-Zell-Proliferationsassays mit unreifen, TNF- α - und IS-PL-ausgereiften MODC als Stimulatorzellen gezeigt werden. In einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden pro Loch 1×10^5 frische PBMC in 200 μ l RPMI 1640 + 10% autologem Serum + P/S zusammen mit MODC kultiviert (5 Tage, 37°C, 5% CO₂). Die PBMC stammten von gesunden, Tetanus-immunisierten Probanden. Zur Stimulation dienten 1×10^3 autologe MODC, die zuvor mit Tetanustoxoid (5 μ g / ml) oder dem Kontrollantigen Ovalbumin (50 μ g / ml) beladen worden waren. 36 Stunden nach der Antigenbeladung erfolgte die Zugabe des Ausreifungsstimulus für weitere 60 Stunden. Als Ausreifungsstimuli wurden TNF- α (1000 U / ml) oder IS-PL (1 μ g / ml) eingesetzt. Vor der Verwendung im Proliferationsassay wurden die MODC bestrahlt (5000 rad) und dreimal in PBS gewaschen, um überschüssiges, nicht-phagozytiertes Antigen zu entfernen. Die T-Zell-Proliferationsassays wurden im folgenden wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben durchgeführt.

2.2.2.8 Intrazytoplasmatische Zytokinfärbungen

Nach Stimulation der PBMC in den Proliferationsassays (Abschnitt 2.2.2.7) mit IS-PL- oder TNF- α -ausgereiften MODC erfolgte eine durchflußzytometrische Bestimmung des Zytokinsekretionsmusters (T_{H1} / T_{H2}-Balance) durch intrazelluläre Zytokinfärbung (Cytofix / Cytoperm Kit mit GolgiPlug, PharMingen). Dazu wurden während der letzten 12 Stunden des fünftägigen T-Zell-Proliferationsassays 2 μ l / ml GolgiPlugTM (enthält Brefeldin A) zur Kultur hinzugefügt. Nach dem Ernten und Waschen (1000 μ l Färbepuffer) von 1×10^6 bis 3×10^6 stimulierten PBMC folgte eine Inkubation (30 Min., 4°C im Dunkeln) mit den für Oberflächenantigene spezifischen Antikörpern und anschließendem Waschschrift (1000 μ l Färbepuffer). Die Inkubation (30 Min. bei 4°C im Dunkeln) in 250 μ l Cytofix / Cytoperm-Lösung führte zur Fixation und Permeabilisierung der Zellwand. Die PBMC wurden nach einem weiteren Waschschrift (1000 μ l Perm / WashTM-Lösung) in 50 μ l Perm / WashTM-Lösung aufgenommen. Fluorochromkonjugierte anti-IFN- γ / anti-IL-4 Antikörper inkubierten für 30 Min. bei 4°C im Dunkeln mit den Zellen. Nach dem abschließenden Waschschrift in 1000 μ l Perm / WashTM-Lösung konnten die PBMC in 400 μ l Färbepuffer gelöst und am FACScan durchflußzytometrisch analysiert werden.

2.2.3 Fallstudie: Methoden der *in vivo* MODC-Immuntherapie bei metastasiertem Nebenschilddrüsenkarzinom

2.2.3.1 Therapieschema bei der NSD-Karzinombehandlung

Für MODC-basierte Anti-Tumorstimmulierung bei Patienten wurden die Blutentnahmen mit 20 ml-Spritzen (2500 I.E. Heparin / Spritze) vorgenommen. Die Kultur unreifer MODC aus dem venösen Blut erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1.1 dargestellt.

Diese unreifen, autologen MODC (Tag 6 der Kultur) wurden für die Tumorthherapie des NSD-Karzinoms mit Tumorlysate (100 µg / ml) beladen. Bei therapeutischer Verwendung von reifen MODC wurde jeweils nur ein Antigen zusammen mit dem Ausreifungsstimulus TNF-α an Tag 6 in die Zellkultur gegeben. Es wurden 4×10^5 DC / ml entweder mit Tumorlysate (100 µg / ml), PTH (AS 1-84; 1 µg / ml; bzw. bioaktives Peptid, AS 1-34; 100 µg / ml) oder KLH (100 µg / ml) beladen und in RPMI 1640+ mit GM-CSF (1000 U / ml) und TNF-α (1000 U / ml) kultiviert.

Am darauffolgenden Tag (Tag 7 der Kultur) wurden die antigenbeladenen MODC dreimal in steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen (400 x g, 12 Min., R.T.) und in 1000 µl Endvolumen aufgenommen. Die Applikation der Zellen für die Tumorthherapie erfolgte subkutan (500 µl) und sonographisch gesteuert in einen inguinalen Lymphknoten (n = 3) bzw. in den perinodalen Bereich (500 µl). Die NSD-Karzinompatientin erhielt insgesamt 15 Vakzinierungen (Therapieschema: Abbildung 3.17). Die ersten vier Behandlungen erfolgten wöchentlich, alle weiteren Behandlungen in einem zwei- bis vierwöchigen Rhythmus. Die Vakzinierungen begannen mit unreifen, Tumorlysate-beladenen MODC und wurden nach dem 3. Zyklus mit TNF-α-ausgereiften MODC fortgesetzt. Nach dem 2. Zyklus konnte die Therapie um PTH-beladene (AS 1-84; ab dem 17. Zyklus ersetzt durch das bioaktive Peptid) MODC, nach dem 6. Zyklus um KLH-beladene MODC erweitert werden.

2.2.3.2 Herstellung von Tumorlysate aus Karzinomgewebe

Bei der NSD-Karzinompatientin konnte als Ausgangsgewebe für die Herstellung von Tumorlysate eine Lungenmetastase aus einer Lungenflügelteilresektion (1998) verwendet werden. Nach der Resektion wurde das Tumorgewebe umgehend in eiskaltem PBS aufgenommen und zügig weiterverarbeitet. Nachdem das Gewebe in kleine Stücke zerteilt worden war, wurden die Tumorzellen in RPMI 1640 Medium dispergiert. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen (7 Zyklen; 30 Min. bei -180°C) sowie eine zusätzliche mechanische Homogenisierung mit einem konischen Homogenisator lysierte die Tumorzellen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Min. bei 60 x g, 4°C) konnten größere Partikel entfernt und der Überstand durch einen Filter (0,2 µm) sterilfiltriert werden. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt und das Tumorlysate in einer Konzentration von 2 mg / ml bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Therapieerfolgskontrolle *in vivo* (DTH-Hauttests, Tumormarker)

Zur *in vivo* Therapieerfolgskontrolle bei der NSD-Karzinompatientin dienten zervikale und thorakale CT-Aufnahmen sowie die Ergebnisse des Delayed-type-hypersensitivity(DTH)-Tests. Beim DTH-Hauttest zur Überprüfung der antigenspezifischen zellulären Immunität wurden im Oberarm intradermal Tumorlysate (5 µg in 50 µl 0,9%-iger NaCl-Lösung), PTH (1 µg) oder KLH (5 µg, nach dem 6. Zyklus beginnend) nach jedem zweiten Zyklus injiziert. Ein positiver Ausfall der Hautreaktion wurde definiert als Erythem (Durchmesser > 5 mm) mit Induration 48 Stunden nach intradermaler Injektion.

Als Verlaufskontrolle wurden bei der Patientin die Parameter Kalzium (im Serum) und als Tumormarker Parathormon (im Serum) bestimmt (Institut für Laboratoriumsdiagnostik, Universität Düsseldorf).

Das *in vivo* CD 4 / CD 8-Verhältnis der Lymphozyten im peripheren Blut wurde durchflußzytometrisch über direkte Immunfluoreszenz bestimmt (Abschnitt 2.2.1.3).

2.2.3.4 Therapieerfolgskontrolle *in vitro* (T-Zell-Proliferationsassays)

Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung des Therapieergebnisses *in vitro* mit Hilfe von T-Zell-Proliferationsassays zum Nachweis einer antigenspezifischen Immunreaktion. Bei den Proliferationsassays zur Bestimmung der *in vitro* Reaktivität der NSD-Karzinompatientin gegen Tumorlysate, PTH und KLH wurden frisch präparierte oder kryokonservierte PBMC verwendet (Präparation: Abschnitt 2.2.1.1, Kryokonservierung: Abschnitt 2.2.1.7). 1×10^5 Zellen / Loch wurden in 200 µl RPMI 1640 + 10% autologem Serum + P/S in einer 96-Loch-Rundbodenplatte kultiviert (5 Tage, 37°C, 5% CO₂). Zur Stimulation der Zellen diente Tumorlysate (1-100 µg / ml), Parathormon (1 µg / ml), Phytohemagglutinin (1-100 µg / ml), KLH (1-100 µg / ml) und als Kontrolle Ovalbumin (1-100 µg / ml). Weiterhin wurden die T-Zell-Proliferationsassays wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben durchgeführt. Zeitgleich mit der Auswertung wurde das *in vitro* CD 4 / CD 8-Verhältnis der mit TL-stimulierten Lymphozyten durchflußzytometrisch mittels direkter Immunfluoreszenz (Abschnitt 2.2.1.3) bestimmt.

2.2.4 Statistik

Bei allen Experimenten wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte (abhängig von der Versuchsanordnung) mit dem ungepaarten oder gepaarten Student' t-Test. Der ungepaarte Student' t-Test wurde unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen der Stichproben durchgeführt. Ein Unterschied konnte als signifikant (hochsignifikant) betrachtet werden, wenn für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ($p < 0,01$) erfüllt war.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer MODC-basierten Immuntherapie *in vitro*

3.1.1 Präparation der dendritischen Zellen

Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Präparation von MODC basierte in ihren Grundzügen auf unterschiedlichen Protokollen verschiedener Autoren. Die Erfordernisse einer klinischen Therapie mit MODC verlangten eine hohe Reinheit und Menge der Zellen sowie gleichzeitig ein möglichst einfaches, sicheres und standardisiertes Protokoll für die Präparation. Das hier entwickelte Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.1.1) wurde dementsprechend optimiert, um die bestmögliche Therapie zu gewährleisten.

Für die Isolierung der PBMC erbrachte die Verwendung der LeukoSep-Röhrchen anstelle von 50 ml Zentrifugenröhrchen eine um 20% - 50% höhere Zellausbeute ($1 - 2 \times 10^7$ PBMC / ml) bei der Ficoll-Dichtezentrifugation. Zusätzlich ließ sich durch das Absaugen des Serumüberstandes die Zahl kontaminierender Thrombozyten in der MODC-Präparation drastisch verringern. Im folgenden Anheftungsschritt wurden die PBMC in 250 ml Zellkulturflaschen von Greiner, Falcon und Corning Costar für 90 Minuten inkubiert. Die unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten der Zellkulturflaschen verschiedener Firmen (bedingt durch differierende Produktionstechniken bei der Ausformung der Kulturflaschen) hatten keine nachweisbaren Auswirkungen auf das Anheftungsverhalten der Zellen. Von entscheidender Bedeutung für die Qualität der MODC-Präparationen war der folgende Waschschrift. Mit der Standardisierung des Waschvorganges bei Verwendung von 4 Waschzyklen konnte eine Lösung gefunden werden, die eine hohe MODC-Ausbeute bei zugleich sehr geringer Verunreinigung durch Lymphozyten ermöglichte. In der anschließenden sechstägigen Kulturphase erfolgte die erneute Medium- und Zytokinzugabe nur einmalig nach drei Tagen. Eine Beeinträchtigung der Heranreifung der Zellen zu MODC hierdurch konnte nicht festgestellt werden.

Nach Abschluss der Kulturphase mit GM-CSF und IL-4 (Tag 6) erschienen die unreifen MODC ($5 - 10 \times 10^6$ MODC / 100 ml Blut) als nicht-adhärenente Zellen mit der charakteristischen Morphologie dendritischer Zellen (Abbildungen 3.3-3.5). Die FACS-Analyse bewies mit 70% - 95% CD 1a⁺ MODC die hohe Reinheit der Präparationen (n = 41). Der kontaminierende Anteil an Lymphozyten und Makrophagen lag bei weniger als 10% der Zellen (Abbildung 3.1).

Abbildung 3.1 Qualität und Reinheit humaner MODC-Präparationen

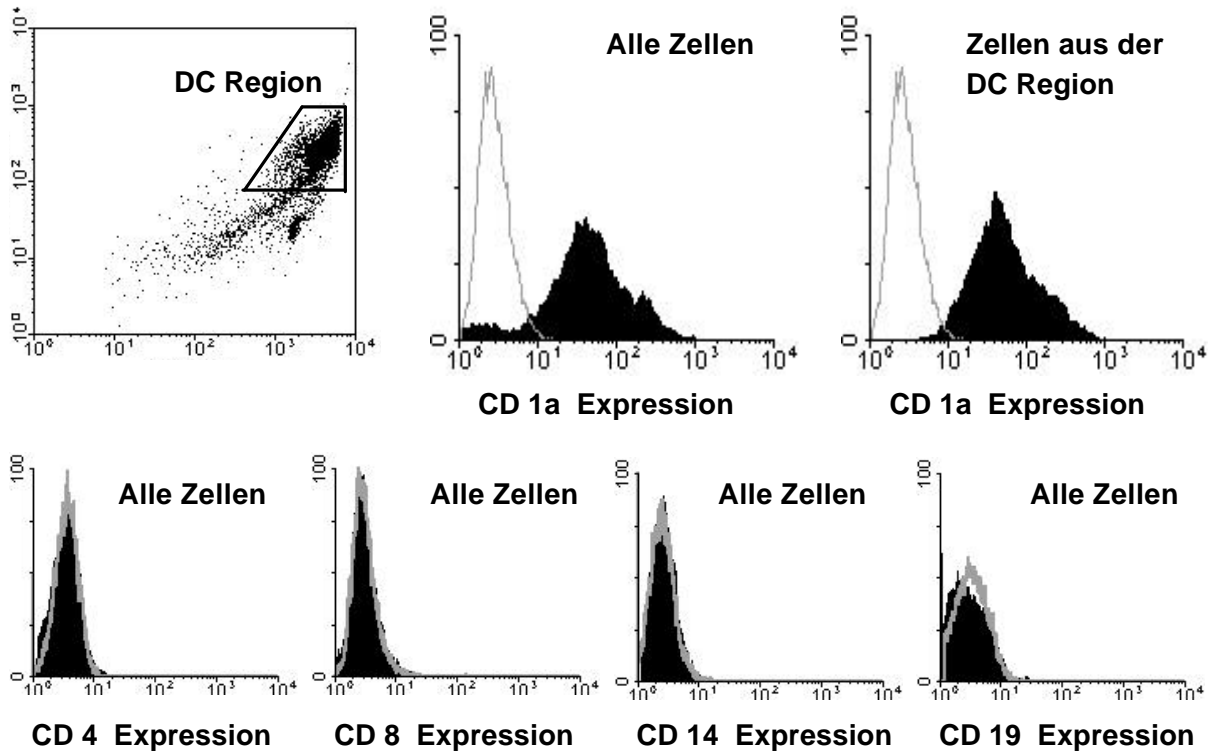


Abb. 3.1: Repräsentative FACS-Analyse von unreifen MODC (Tag 6); gemessen wurden alle Zellen oder nur die Zellen aus der DC-Region. Darstellung als FSC vs. SSC (Dot Plot) bzw. Ereignisse vs. Fluoreszenzintensität (Histogramm).

Obere Reihe: Die MODC-Präparationen wiesen 70 - 95% CD 1a⁺ Zellen auf (grau: Isotypkontrolle). Bei Messung innerhalb der im Dot Plot abgegrenzten DC-Region waren mehr als 95% der Zellen CD 1a⁺.

Untere Reihe: Der Anteil verunreinigender mononukleärer Zellen (T- und B-Lymphozyten, Makrophagen) in der DC-Präparation betrug weniger als 10% (grau: Isotypkontrolle).

Die MODC wiesen eine starke Expression des DC-Markers CD 1a und von HLA Klasse II-Molekülen auf. Mit der hohen Expression des costimulierenden Moleküls CD 80 und HLA Klasse I-Molekülen, einer schwachen CD 86- und fehlender Expression des Ausreifungsmarkers CD 83 zeigten sie das typische Muster unreifer MODC (Abbildung 3.2).

3.1.2 Ausreifung der MODC für den Einsatz in der Tumorthherapie

Beim Einsatz in der Tumorthherapie wurden die unreifen MODC (Tag 6) über einen Zeitraum von 24 Stunden mit TNF- α (1000 U / ml) ausgereift. Anschließend präsentierten sie in der durchflußzytometrischen Messung das charakteristische Bild ausgereifter MODC: Die Expression des DC-Markers CD 1a und des Ausreifungsmarkers CD 83 sowie eine starke Expression der costimulierenden Moleküle CD 80 und CD 86 und von HLA Klasse I und Klasse II-Molekülen (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.6).

Abbildung 3.2 TNF- α -ausgereifte MODC in der Tumorthherapie

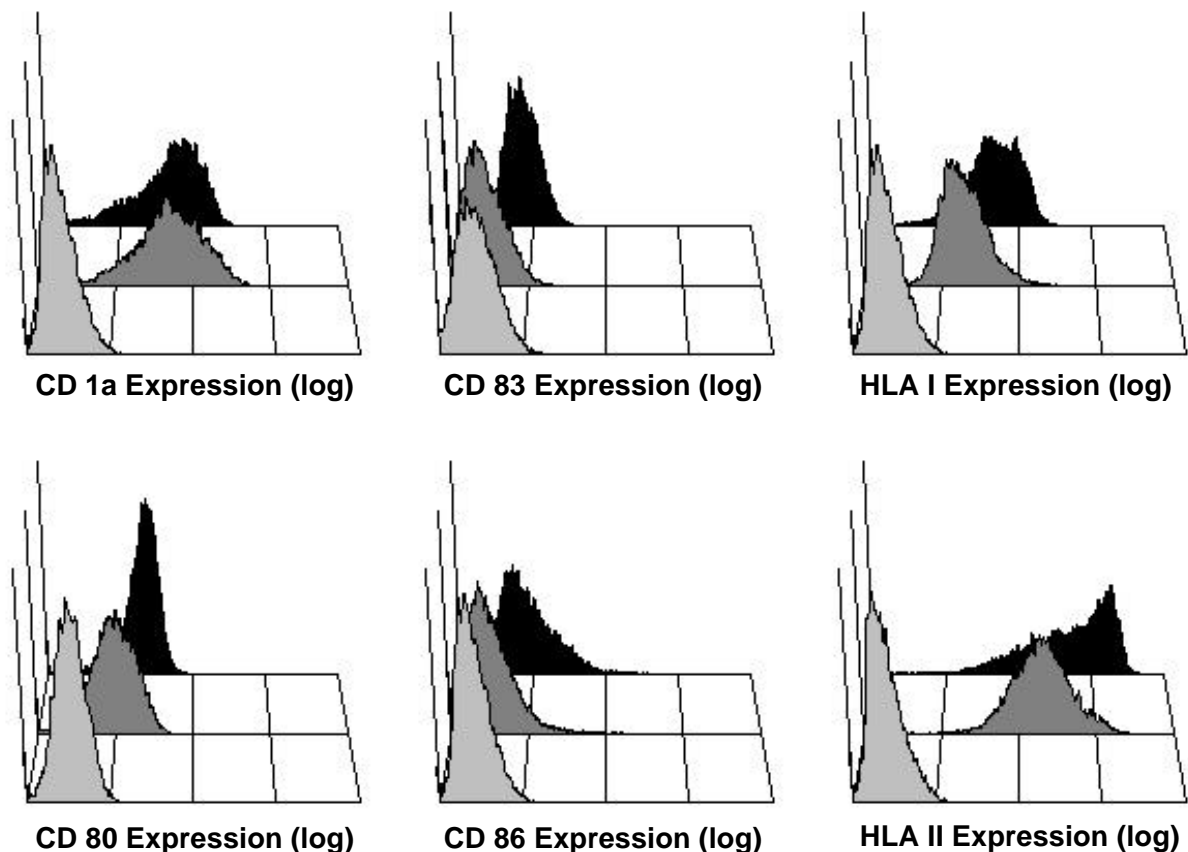


Abb. 3.2: Repräsentative FACS-Analyse von unreifen (dunkelgraues Histogramm) und TNF- α -ausgereiften MODC (schwarzes Histogramm) für die Tumorthherapie (Tag 7). Die Isotypkontrollen für unreife und reife MODC waren ähnlich und werden daher nur einmal gezeigt (hellgraues Histogramm). Die Messung erfolgte in der DC-Region, Darstellung als Ereignisse (Skala: 0 - 100) vs. Fluoreszenzintensität (Skala: log; 10^0 - 10^4).

Unausgereifte und TNF- α -ausgereifte MODC unterschieden sich kaum in der Expression des DC-Markers CD 1a, jedoch induzierte TNF- α (1000 U / ml) die Expression des Ausreifungsmarkers CD 83 und des costimulatorischen Moleküls CD 86. Die Expression von HLA Klasse I- und HLA Klasse II-Molekülen sowie des costimulierenden Moleküls CD 80 war bei ausgereiften MODC deutlich erhöht.

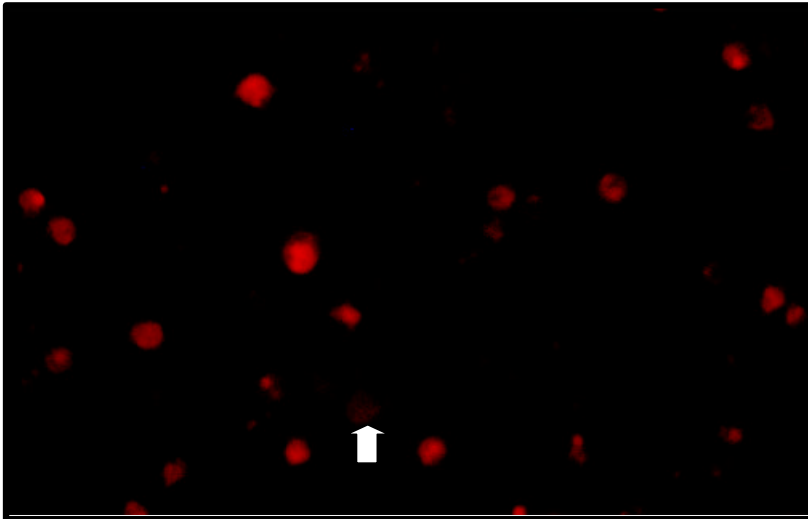


Abbildung 3.3

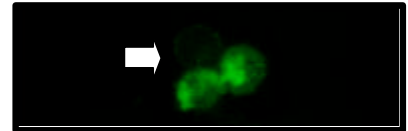


Abbildung 3.4

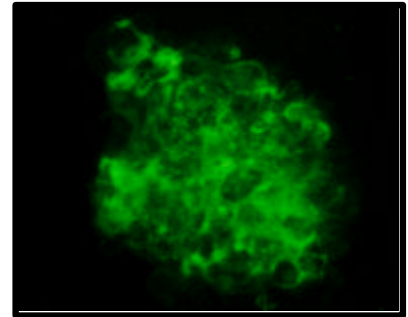


Abbildung 3.5

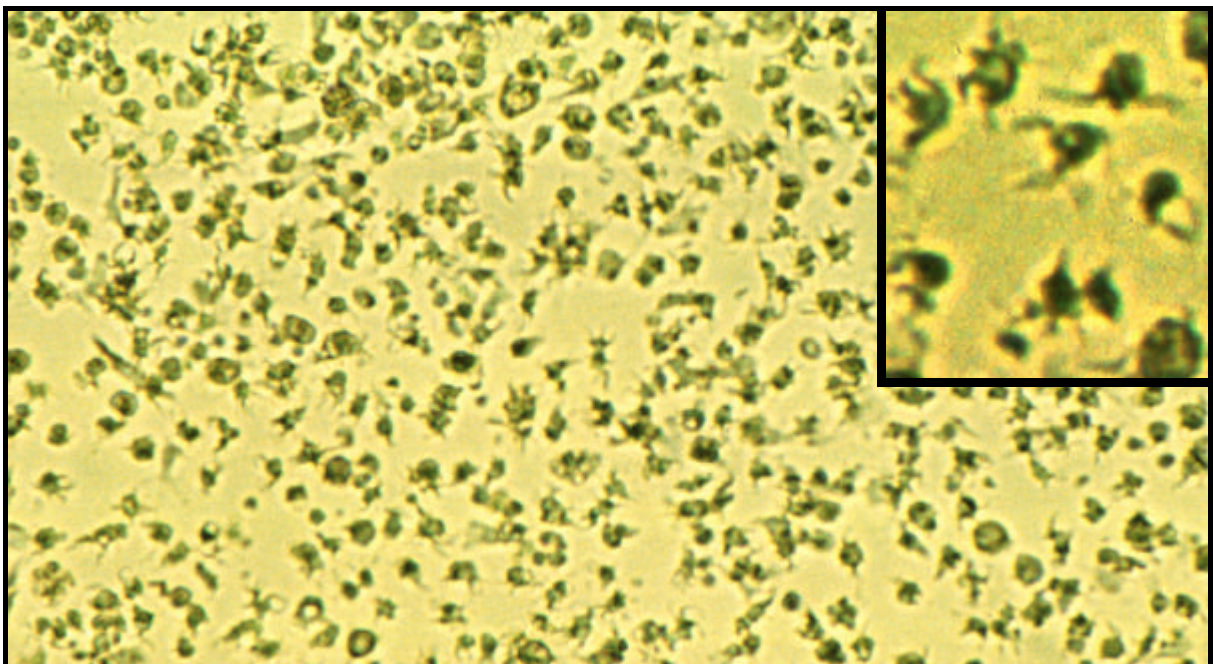


Abbildung 3.6

Abb. 3.3-3.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unfixierter humaner MODC. Die Zellen wurden mit fluorchrommarkierten Antikörpern gegen CD 1a (PE, Vergrößerung 200-fach, Abb. 3.3) und HLA Klasse II-Moleküle (FITC, Vergrößerung 200-fach, Abb. 3.4 u. 3.5) gefärbt. Die unreifen MODC exprimierten CD 1a und HLA Klasse II-Moleküle (Abb. 3.3 u. 3.4) und zeigten bei Ausreifung die Tendenz zur Bildung von Zellhaufen (Abb. 3.5). Pfeile markieren antigenegative Zellen.

Abb. 3.6: Lichtmikroskopische Aufnahme TNF- α -ausgereifter humaner MODC (Vergrößerung 120-fach). Im vergrößerten Ausschnitt (300-fach) sind die namensgebenden Zellfortsätze der dendritischen Zellen zu erkennen.

3.1.3 Beladung der MODC mit Antigen

Für die Testung der funktionellen Aktivität der DC wurden die unreifen MODC an Tag 6 mit dem entsprechenden Antigen beladen, die Ausreifung der Zellen mit TNF- α (1000 U / ml) erfolgte gleichzeitig. Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Antigenzugabe und der jeweiligen Stimulationswirkung auf verschiedene Lymphozytenpopulationen wurden Proliferationsassays mit Tetanustoxoid-beladenen, TNF- α -ausgereiften MODC eines Tetanus-immunisierten Probanden durchgeführt. Eine verlängerte Zeitspanne (1 - 2 Tage) für die Antigen-Beladung der MODC hatte keine nachweisbaren Vorteile gegenüber der gleichzeitigen Zugabe von Ausreifungsstimulus und Antigen. Die starke stimulatorische Kapazität der MODC auf PBMC und CD 4⁺ Lymphozyten war ersichtlich. Interessanterweise zeigte sich keine direkte Stimulation von CD 8⁺ Lymphozyten durch MODC (Abbildung 3.7).

Abbildung 3.7 Zeitpunkt der Antigenzugabe bei MODC und T-Zell-Stimulation

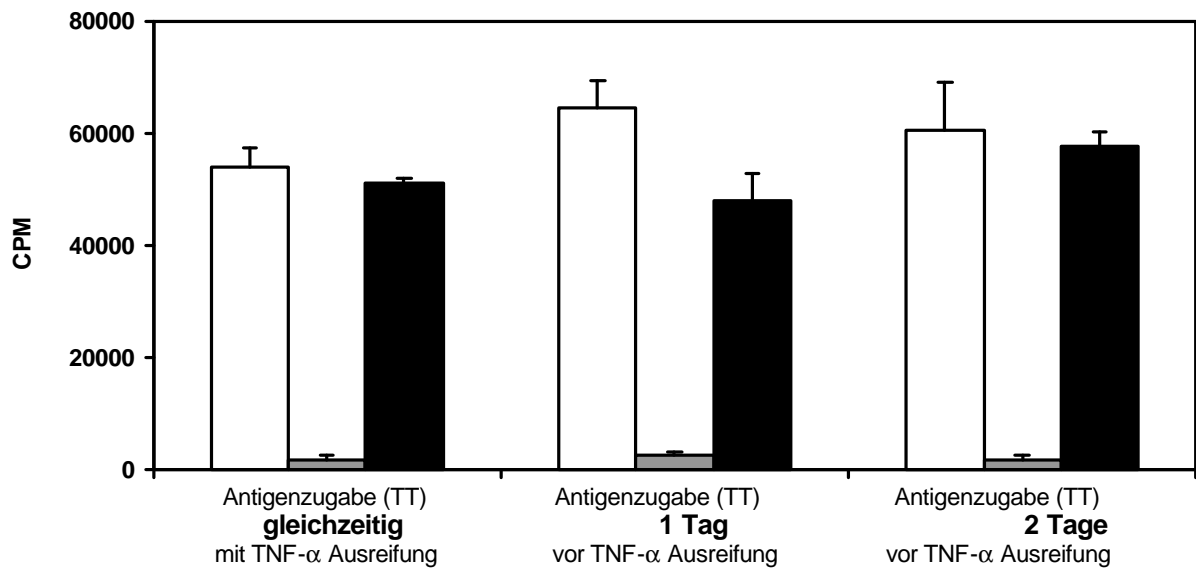


Abb. 3.7: T-Zell-Proliferationsassay mit Tetanustoxoid-beladenen, TNF- α -ausgereiften MODC eines Tetanus-immunisierten Probanden. $1,5 \times 10^4$ bestrahlte, mit Antigen beladene und gewaschene MODC stimulierten im Proliferationsassay (4 Tage) $8,5 \times 10^4$ CD 4⁺ Lymphozyten (□), CD 8⁺ Lymphozyten (■) oder PBMC (■). Darstellung der Proliferationsantwort als Mittelwerte (CPM / Loch) \pm SEM.

Der Zeitpunkt der Antigenzugabe (2,5 μ g TT / ml) bei der Beladung der MODC hatte keinen Einfluß auf deren stimulatorische Wirkung. Es konnte eine starke stimulatorische Kapazität der MODC auf PBMC und CD 4⁺ Lymphozyten gezeigt werden, eine direkte Stimulation von CD 8⁺ Lymphozyten durch MODC fand interessanterweise nicht statt.

3.2 IS-Plasmid-DNA ausgereifte humane MODC stimulieren eine zytotoxische Immunantwort *in vitro*

3.2.1 Herstellung immunstimulatorischer DNA

Die sehr hohe Reinheit aller Präparationen von IS-Plasmid-DNA mit dem Qiagen Endo-Free Plasmid Kits zeigten OD-Quotienten (OD_{260nm} / OD_{280nm}) von 1,90 bis 1,93. Eine Verunreinigung durch Endotoxine lag bei keiner der Plasmidpräparationen vor; der mit dem LAL-Assay gemessene Endotoxingehalt betrug immer weniger als 0,04 EU / μg DNA. Zur Kontrolle des Sequenz-spezifischen Einflusses wurden in einigen Experimenten die Plasmide mit DNase verdaut. Die Vollständigkeit des DNase-Verdau konnte gelelektrophoretisch bestätigt werden. Alle verwendeten IS-ODN waren HPLC gereinigt.

3.2.2 Humane MODC reifen durch Stimulation mit IS-Plasmid-DNA aus

Um die Wirkung von IS-DNA auf humane MODC zu testen, wurden MODC mit Plasmid-DNA inkubiert, die immunstimulatorische Sequenzen enthielt ($n = 10$). Die stimulierten MODC zeigten alle Merkmale stark ausgereifter DC (Abbildung 3.8): IS-PL ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) mit starken IS-Sequenzen induzierte die Expression des Ausreifungsmarkers CD 83 ($p < 0,01$ vs. unreife MODC) und des costimulierenden Moleküls CD 86 ($p < 0,001$). Die Expression von HLA Klasse I ($p < 0,001$), HLA Klasse II-Molekülen ($p < 0,001$) und des costimulierenden Moleküls CD 80 ($p < 0,001$) wurde stark erhöht, bei dem DC-Marker CD 1a blieb diese unverändert. Die Plasmidwirkungen waren konzentrationsabhängig ($n = 3$) (Abbildung 3.9). Bei Stimulation von MODC durch C-PL, das nur schwache IS-Sequenzen aufwies, zeigte sich eine geringere Ausreifungswirkung, die erst bei hohen Plasmidkonzentrationen ($20 \mu\text{g} / \text{ml}$) auftrat. Dabei fand sich eine signifikante Erhöhung der Expression nur bei CD 86 ($p < 0,04$ vs. unreife MODC) und HLA Klasse II-Molekülen ($p < 0,03$).

Abbildung 3.8 Ausreifung humaner MODC durch IS-PL

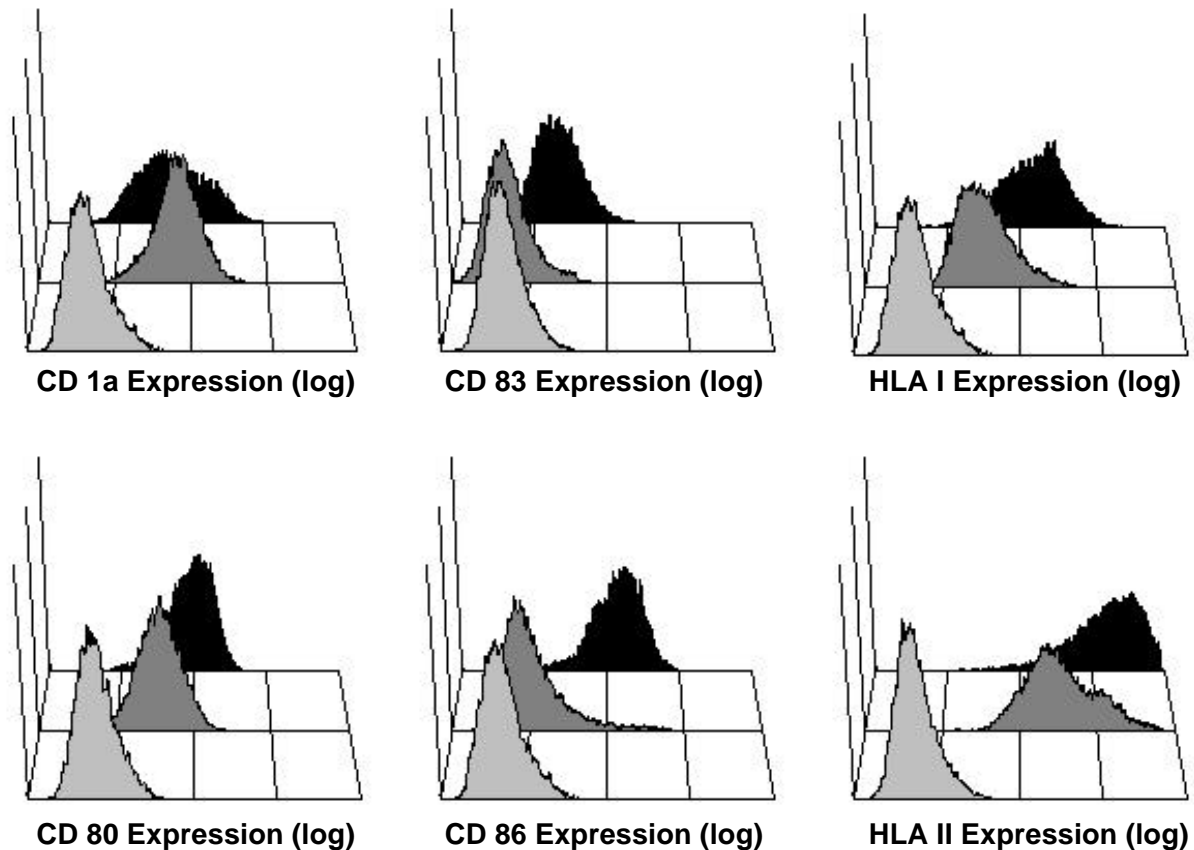


Abb. 3.8: Repräsentative FACS-Analyse von unreifen (dunkelgraues Histogramm) und IS-PL-ausgereiften MODC (schwarzes Histogramm) (Tag 9). Die Isotypkontrollen für unreife und reife MODC waren ähnlich und werden daher nur einmal gezeigt (hellgraues Histogramm). Die Messung erfolgte in der DC-Region, Darstellung als Ereignisse (Skala: 0 - 100) vs. Fluoreszenzintensität (Skala: log; 10^0 - 10^4).

In der Expression des DC-Markers CD 1a glichen sich unausgereifte und IS-PL-ausgereifte MODC. Die Ausreifungswirkung des IS-PL ($20 \mu\text{g} / \text{ml}$) führt zu einer sehr starken Expression des Ausreifungsmarkers CD 83 und des costimulatorischen Moleküls CD 86. Im Vergleich zu unreifen MODC war die Expression von HLA Klasse I und HLA Klasse II-Molekülen sowie des costimulierenden Moleküls CD 80 bei IS-PL-ausgereiften MODC deutlich erhöht.

Durch einen DNase-Verdau wurden in einigen Versuchen die Sequenzen von IS-PL und C-PL zerstört (Abbildung 3.20). Die MODC zeigten nach Stimulation mit DNase-verdauten Plasmiden keine signifikante Ausreifung mehr (Abbildung 3.9 und 3.10).

Abbildung 3.9 Konzentrationsabhängige Ausreifung von MODC durch Plasmid-DNA

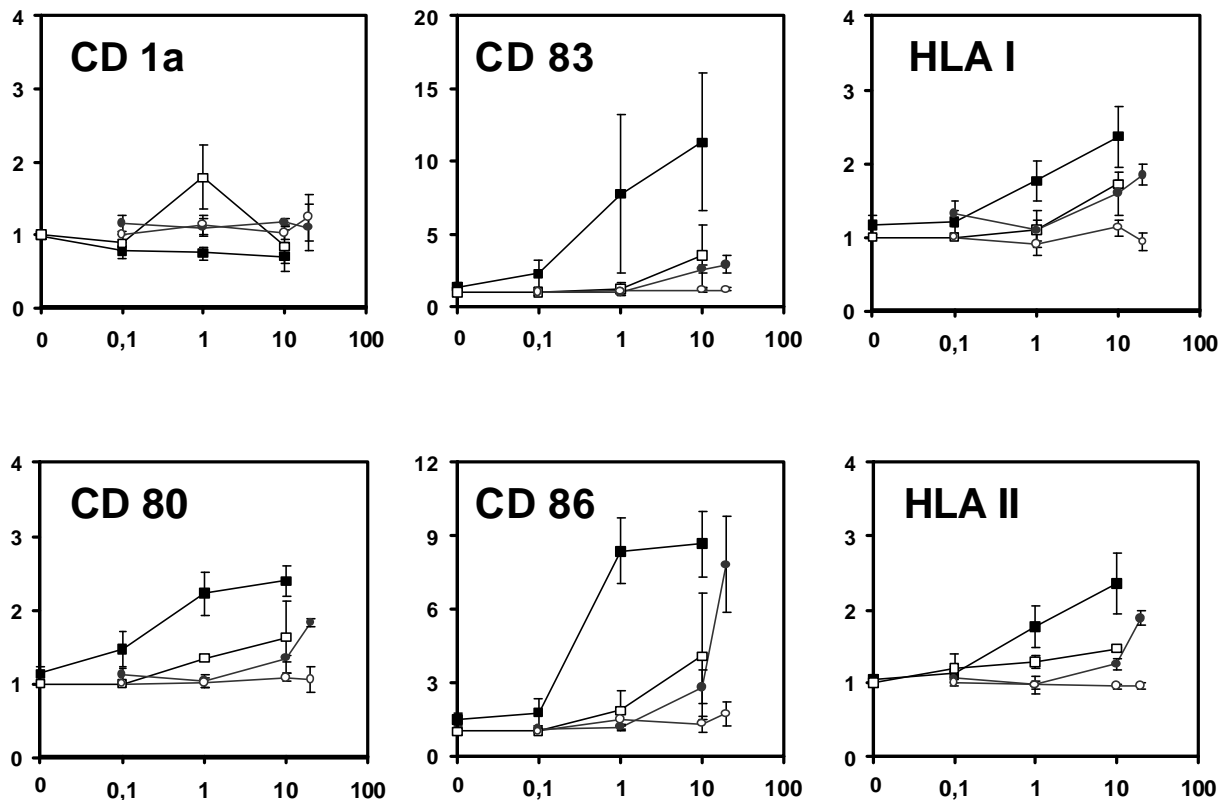


Abb. 3.9: Plasmid-DNA stimulierte MODC zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg in der Expression von Ausreifungsmarkern (CD 83), costimulierenden Molekülen (CD 80, CD 86) und HLA Klasse I und II-Molekülen. Dargestellt ist die Markerexpression \pm SEM in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration (log). Die Markerexpression wurde relativ zu unstimulierten MODC berechnet.

IS-PL (■ ; 0,1-10 µg / ml) löste bereits in geringerer Konzentration als C-PL (● ; 0,1-20 µg / ml) eine starke Ausreifung von MODC aus. Eine deutlich schwächere MODC-Ausreifung zeigte sich erst bei hohen Konzentrationen von C-PL (20 µg / ml). Keine Ausreifung verursachten die Kontrollen, DNase-verdautes IS-PL (□ ; 0,1-10 µg / ml) und C-PL (○ ; 0,1-20 µg / ml).

Abbildung 3.10 Wirkung verschiedener Ausreifungsstimuli auf humane MODC

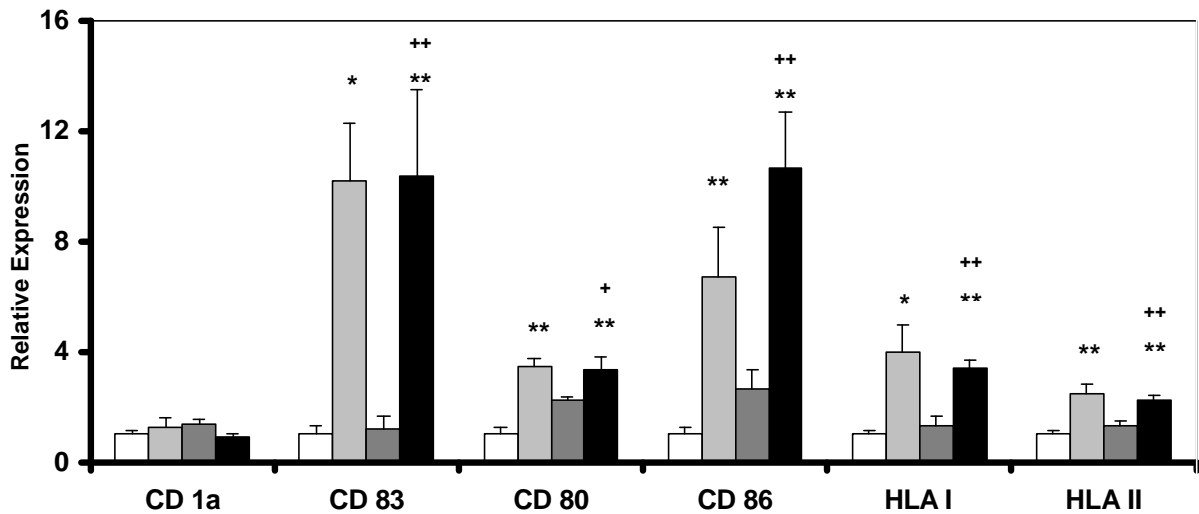


Abb. 3.10: Zur Bestimmung der Ausreifungswirkung wurden humane MODC für 3 Tage mit TNF- α (■ ; 1000 U / ml) oder IS-PL (■ ; 1 μ g / ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten unreife (□ ; Tag 9) oder mit DNase-verdaulichem IS-PL (■ ; 1 μ g / ml) stimulierte MODC. Die Expression \pm SEM wurde relativ zu unreifen MODC berechnet (*/+ p < 0,05; **/+ p < 0,01 vs. unreife MODC / mit DNase-verdaulichem IS-PL stimulierte MODC). TNF- α und IS-PL zeigen eine vergleichbare Ausreifungswirkung auf humane MODC. Ein DNase-Verdau dagegen hebt die ausreifende Wirkung des IS-PL auf.

3.2.3 Effekt von IS-ODN auf die Ausreifung von DC

Für IS-ODN mit CpG-Motiven konnte bereits eine ausreifende Wirkung auf murine BMDC (ODN IS-1668), die Aktivierung humaner Monozyten (ODN IS-1760) sowie muriner und humaner NK-Zellen (ODN IS-1585) gezeigt werden. Diese IS-ODN und ein weiteres ODN, das ein CpG-Motiv aus dem Ampicillinresistenzgen des IS-PL enthielt (ODN IS-4Z), wurden in ihrer Wirkung auf humane MODC getestet (n = 5). Überraschenderweise bewirkte keines der IS-ODN (Phosphorthioat-stabilisiert oder nicht; 0,01 - 10 μ g ODN / ml) eine Ausreifung und Aktivierung von humanen MODC, obwohl ihre ausreifende Wirkung an murinen BMDC verifiziert werden konnte (n = 3) (Abbildung 3.11).

Murine BMDC wurden als CD 11c⁺ Zellen identifiziert und die CD 86 Expression als Maß für den Ausreifungsgrad bestimmt.

Abbildung 3.11 Ausreifung humaner MODC und muriner BMDC durch IS-ODN

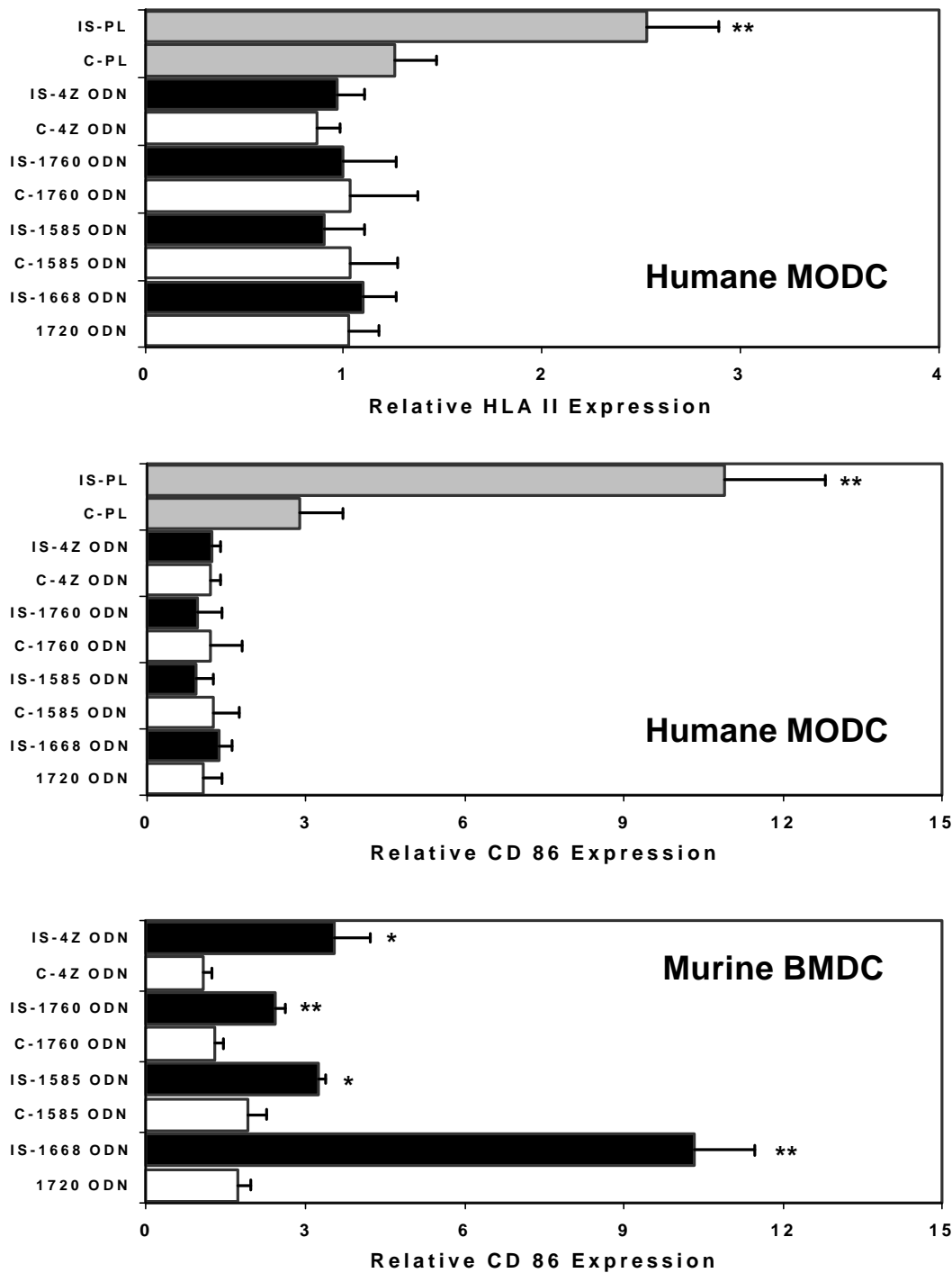


Abb. 3.11: Wirkung von IS-ODN auf die Ausreifung humaner MODC (Oben, Mitte) und muriner BMDC (Unten). Die HLA Klasse II bzw. CD 86-Markerexpression \pm SEM wurde relativ zu unstimulierten MODC berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle).

Oben/Mitte: Alle getesteten IS-ODN (■ ; $6,5 \mu\text{g} / \text{ml}$) und die zugehörigen Kontroll-ODN (□ ; $6,5 \mu\text{g} / \text{ml}$) hatten keine ausreifende Wirkung auf humane MODC. Die Positivkontrolle IS-PL (■ ; $1 \mu\text{g} / \text{ml}$) ließ die humanen MODC erwartungsgemäß ausreifen.

Unten: Zur Verifizierung der IS-ODN-Aktivität wurden diese an einer Präparation muriner BMDC auf ihre Wirksamkeit überprüft und zeigten die erwartete Ausreifung der Zellen.

3.2.4 Wirkmechanismus der IS-DNA vermittelten MODC Ausreifung

Im murinen System konnte für ein bestimmtes ODN (ODN INHIB) eine Hemmung der Plasmid-DNA-induzierten Wirkung auf Lymphozyten festgestellt werden. Der Einfluß dieses ODN INHIB auf die Ausreifung von humanen MODC sollte ebenfalls untersucht werden. Jedoch zeigte der ODN INHIB bei Zugabe in bis zu 10-fachem Überschuss (10 µg / ml) noch keine hemmende Wirkung auf die Ausreifung von IS-PL-stimulierten MODC (1 µg / ml) (n = 2). Selbst bei Einsatz von 10 µg / ml ODN INHIB ließ sich die reguläre Ausreifung durch IS-PL nicht unterdrücken und die MODC zeigten sowohl mit als auch ohne ODN INHIB-Zugabe nahezu identisch das Bild ausgereifter Zellen (Abbildung 3.12).

Abbildung 3.12 Fehlende Inhibition der IS-PL-vermittelten MODC Ausreifung durch ODN INHIB

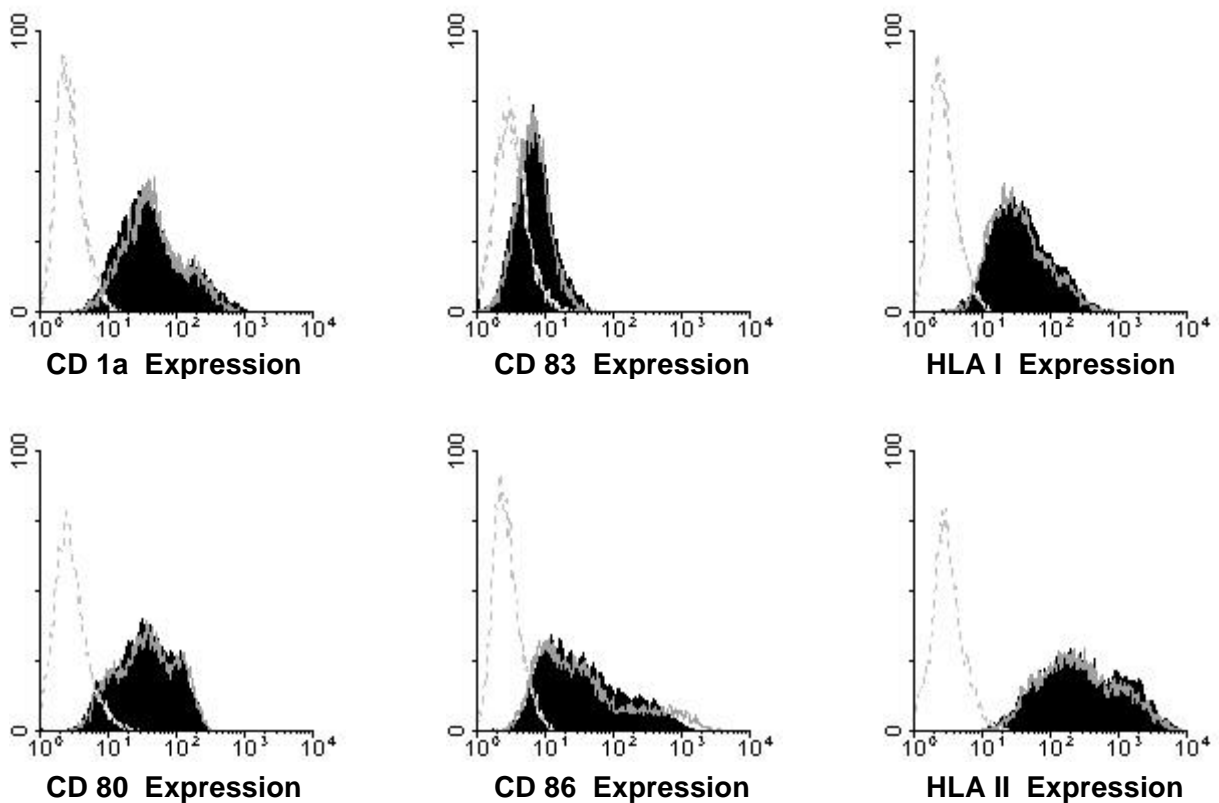


Abb. 3.12: Repräsentative FACS-Analyse von IS-PL-ausgereiften humanen MODC (1 µg / ml, Tag 9). Messung in der DC-Region; Darstellung als Ereignisse vs. Fluoreszenzintensität. Die Zellen zeigten durchflußzytometrisch das typische Bild ausgereifter MODC (Isotypkontrolle: hellgrau gestrichelt). Selbst nach Zugabe von ODN INHIB in 10-fachem Überschuss (10 µg / ml) zeigte sich bei derart behandelten MODC (graues Histogramm, 1 µg / ml) keine Verminderung der Ausreifung im Vergleich zur normalen Stimulation nur mit IS-PL (schwarzes Histogramm, 1 µg / ml). Die IS-PL-vermittelte Ausreifung ließ sich nicht durch ODN INHIB hemmen.

3.2.5 Aktivierung IS-PL stimulierter DC zur Sekretion von IL-6 und IL-12

Neben costimulierenden Molekülen auf der Oberfläche der MODC stellt das Muster der sezernierten Zytokine wichtige stimulatorische oder inhibitorische Signale für B- und T-Zellen bereit und beeinflusst somit stark die Auslösung einer Immunantwort. Daher wurden die IL-6 und IL-12(p75)-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von TNF- α - oder Plasmid-DNA stimulierten MODC bestimmt (n = 4-9). IS-PL (1 μ g / ml) induzierte einen extremen Anstieg der IL-6 Ausschüttung (38.258 ± 10.572 pg / ml) und auch die Produktion von bioaktivem IL-12(p75) (25 ± 6 pg / ml). Eine Inkubation der MODC mit TNF- α (1000 U / ml) oder C-PL (20 μ g / ml) resultierte in einer signifikant niedrigeren IL-6 Sekretion (1094 ± 632 pg / ml bzw. 721 ± 612 pg / ml), eine IL-12(p75)-Produktion war nicht mehr messbar (Nachweisgrenze: 5,8 pg / ml). Ein zuvor durchgeführter DNase-Verdau von IS-PL führte zu einem Verlust der aktivierenden Wirkung auf MODC (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 IS-PL induziert die IL-6 und IL-12 Sekretion humaner MODC

Ausreifungsstimulus		IL-6	IL-12(p75)
Unreife MODC		148 \pm 35	n.n.**
TNF- α	(1000 U / ml)	1094 \pm 632	n.n.**
IS-PL	(1 μ g / ml)	38.258 \pm 10.572*	25 \pm 6
IS-PL (DNase-Verdau)	(1 μ g / ml)	759 \pm 403	n.n.**
C-PL	(20 μ g / ml)	721 \pm 612	n.n.**
C-PL (DNase-Verdau)	(20 μ g / ml)	33 \pm 23	n.n.**

Tab. 3.1: Bestimmung der IL-6 und IL-12p75-Sekretion stimulierter humaner MODC (Tag 9) im Zellkulturüberstand mittels ELISA. 4×10^5 MODC / ml wurden für 3 Tage mit den Ausreifungsstimuli inkubiert, Angaben in pg / ml \pm SEM (* p < 0,01 vs. unreife MODC, IS-PL (DNase-Verdau)- und TNF- α -stimulierte MODC; ** n.n. = nicht nachweisbar, Nachweisgrenze IL-12(p75): 5,8 pg / ml).

3.2.6 Kapazität IS-PL-ausgereifter MODC zur Stimulation einer $T_{\text{H}}1$ -Immunantwort

Um zu überprüfen, ob die IS-PL DNA vermittelte Aktivierung der DC mit einer erhöhten Kapazität zur T-Zell-Stimulation assoziiert ist, wurden T-Zell-Proliferationsassays mit Zellen von Tetanus-immunisierten Probanden durchgeführt ($n = 3$). Die Stimulation erfolgte mit unreifen, $\text{TNF-}\alpha$ - oder IS-PL-ausgereiften MODC, die zuvor mit Ovalbumin oder Tetanustoxoid beladen wurden. Mit dem Kontrollprotein Ovalbumin beladene MODC führten nicht zu einer erhöhten T-Zell-Proliferation, unabhängig vom verwendeten Ausreifungsstimulus. Tetanustoxoid-beladene unreife MODC lösten eine T-Zell-Proliferation aus ($\text{SI } 4,9 \pm 0,5$; $p < 0,05$). Die T-Zell-Proliferation stieg signifikant an, wenn $\text{TNF-}\alpha$ -ausgereifte MODC ($\text{SI } 11,7 \pm 4,1$; $p < 0,03$) oder IS-PL-ausgereifte MODC ($\text{SI } 12,0 \pm 3,2$; $p < 0,04$) als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt wurden (Abb. 3.13 und Abb. 3.18-3.19).

Abbildung 3.13 Kapazität humaner MODC zur Stimulation antigenspezifischer T-Zell-Proliferation

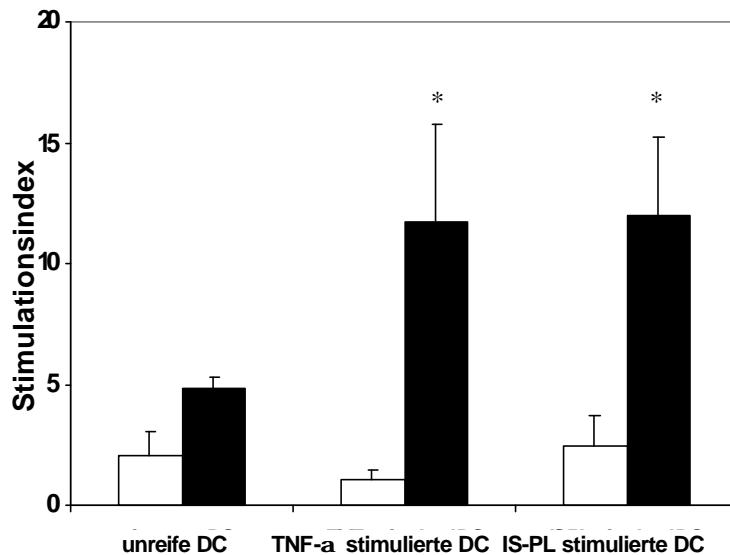


Abb 3.13: Unreife MODC wurden mit Ovalbumin (□, 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) oder Tetanustoxoid (■, 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) beladen und mit $\text{TNF-}\alpha$ (1000 U / ml) oder IS-PL (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ausgereift (Tag 8-10). Die MODC wurden gewaschen, bestrahlt und mit 1×10^5 frisch präparierten PBMC im Verhältnis 1:100 kultiviert (5 Tage). Die T-Zell-Proliferation ist als Stimulationsindex \pm SEM relativ zur Proliferation unstimulierter PBMC dargestellt. $\text{TNF-}\alpha$ und IS-PL ausgereifte MODC stimulierten eine starke, antigenspezifische T-Zell-Proliferation (* $p < 0,04$ vs. Ovalbumin).

Parallel zu den T-Zell-Proliferationsassays wurde die T_{H1} / T_{H2} -Balance der stimulierten T-Zellen durch intrazytoplasmatische IFN- γ / IL-4-Färbung analysiert (n = 3). Weniger als 4% der CD 3⁺ Zellen wiesen eine messbare IFN- γ -Sekretion nach Stimulation mit Ovalbumin-beladenen unreifen oder reifen MODC auf. Hingegen zeigte sich mit TT-beladenen DC bei unreifen MODC eine IFN- γ -Sekretion bei 6,7% \pm 2,6% der T-Zellen. Die IFN- γ -Expression wurde durch TNF- α -ausgereifte MODC gesteigert (15,4% \pm 1,4%; p < 0,01). Eine signifikant stärkere Polarisierung in Richtung einer T_{H1} -Immunantwort konnte durch Stimulation der T-Zellen mit IS-PL-ausgereiften MODC erreicht werden (25,2% \pm 2,7%; p < 0,01). Der Anteil an IL-4 produzierenden, in die Richtung einer T_{H2} -Immunantwort polarisierten T-Lymphozyten lag unabhängig von der MODC-Stimulation immer bei weniger als 4% der T-Zellen (Abbildung 3.14).

Abbildung 3.14 Antigen-spezifische T_{H1}-Immunantwort durch IS-PL ausgereifte MODC

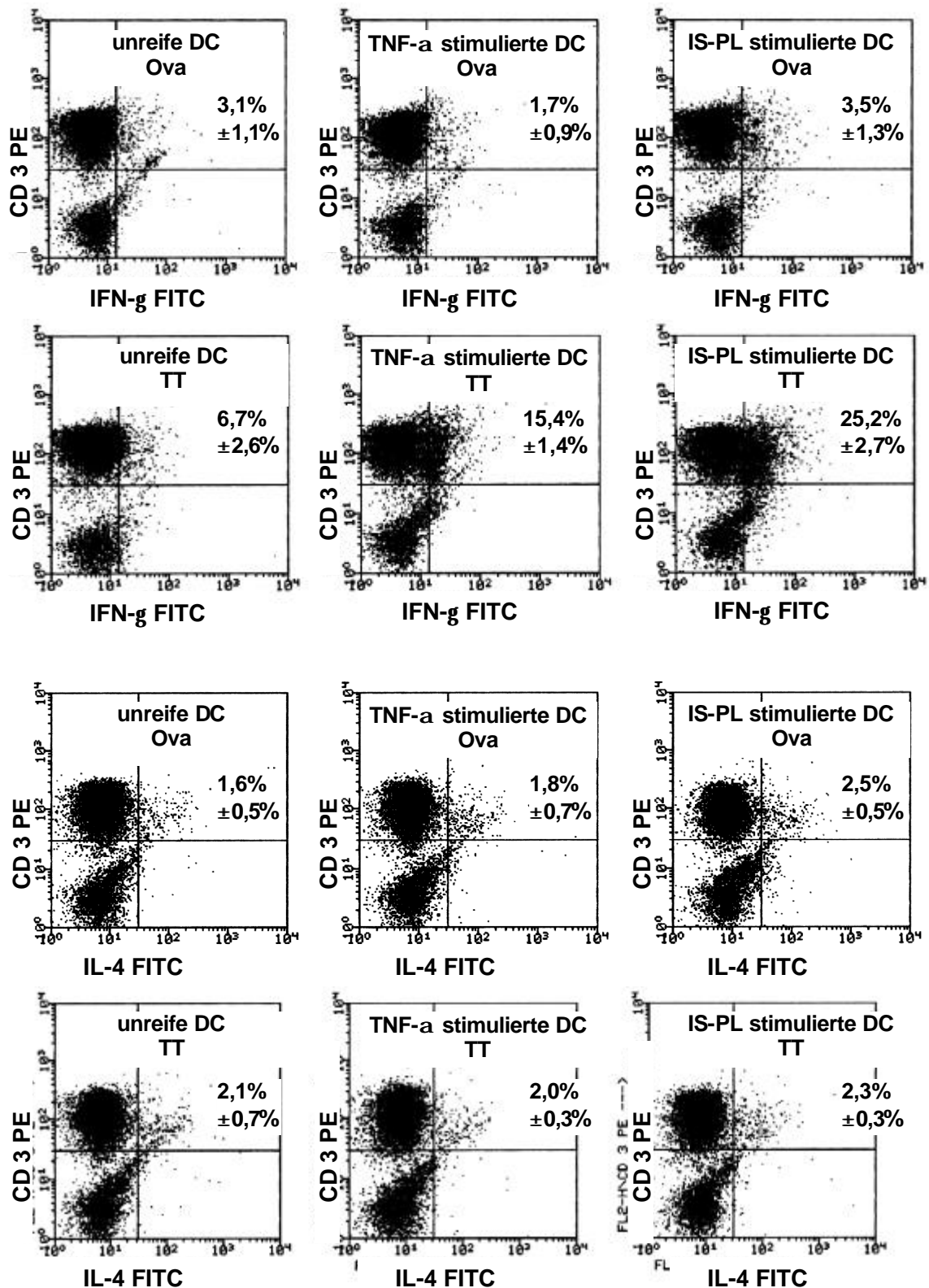


Abb 3.14: Bestimmung der IFN- γ und IL-4 Synthese von CD 3-positiven PBMC (1×10^5), die mit 1×10^3 unreifen oder TNF- α - bzw. IS-PL ausgereiften MODC stimuliert wurden. Die MODC waren zuvor mit Tetanustoxoid (TT) oder dem Kontrollprotein Ovalbumin (Ova) beladen worden. Angegeben ist der Prozentsatz IFN- γ / IL-4 positiver T-Lymphozyten \pm SEM. Tetanustoxoid-beladene, IS-PL-ausgereifte MODC lösen eine stärkere IFN- γ -Produktion aus als TNF- α -ausgereifte MODC ($p < 0,02$) oder unreife MODC ($p < 0,005$).

3.3 Fallstudie: *In vivo* Immuntherapie mit MODC bei metastasiertem NSD-Karzinom

3.3.1 Antigen-spezifische *in vitro* Immunreaktion im T-Zell-Proliferationsassay

Die antigen-spezifische *in vitro* Immunreaktion der NSD-Karzinompatientin auf Tumorlysat, Parathormon und KLH wurde mit T-Zell-Proliferationsassays überprüft (n = 5).

Vor Beginn der Therapie gab es keine *in vitro* T-Zell-Reaktivität gegen die verwendeten Antigene bei der Patientin, wie der maximale Stimulationsindex (SI_{max} , bei 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) für Tumorlysat (SI_{max} 1.1 vs. Ovalbumin), Parathormon (SI_{max} 1.1) oder KLH (SI_{max} 1.3) im T-Zell-Assay zeigte. Der als Positivkontrolle eingesetzte unspezifische T-Zell-Stimulator PHA (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) induzierte eine starke *in vitro* Reaktivität (SI 281.1).

Nach dem 6. Zyklus (3 Zyklen mit unreifen MODC, 3 Zyklen mit ausgereiften MODC) war erstmals eine beginnende Tumorlysat-spezifische Immunantwort (SI_{max} 2.4) zu beobachten. Für PTH konnte keine Reaktivität gezeigt werden. Da der Tumormarker (Parathormon im Serum) weiter anstieg, wurde nach dem 6. Zyklus KLH als zusätzliches Antigen zur Induktion einer starken CD 4⁺ T-Zell-Antwort in das Therapieschema mit aufgenommen.

Nach dem 10. Zyklus konnte eine starke, dosisabhängige PBMC-Proliferation im T-Zell-Assay sowohl für Tumorlysat mit SI 1,8 (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) bis SI 5,7 (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, p < 0,01 vs. vor Therapie) als auch für KLH mit SI 2,2 (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) bis SI 6,2 (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, p < 0,01 vs. vor Therapie) nachgewiesen werden. Eine PTH-spezifische Reaktion im T-Zell-Assay blieb aus (SI_{max} 1.1) (Abbildung 3.15) und konnte auch nach dem Einsatz der erhöhten Menge des bioaktiven PTH-Peptids (ab der 34. Behandlungswoche) nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 3.15 Antigen-spezifische *in vitro* Immunantwort nach der Karzinomtherapie

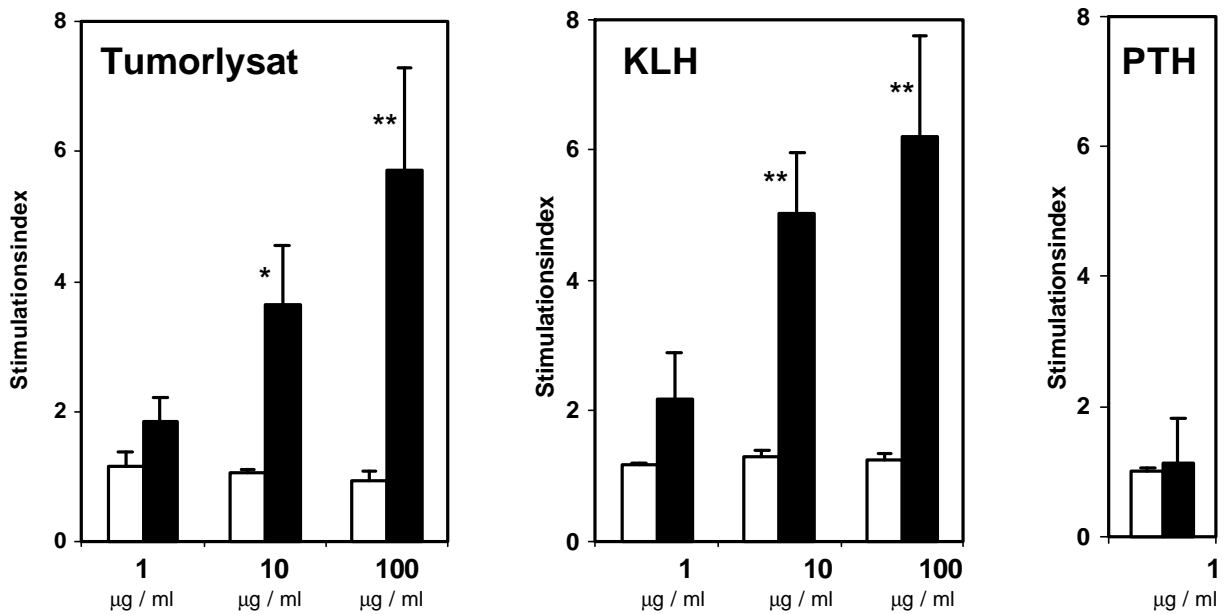


Abb. 3.15: T-Zell-Proliferationsassay (5 Tage) mit 1×10^5 PBMC der NSD-Karzinompatientin vor und nach der Therapie. Die Stimulation erfolgte mit Tumorlysat (1-100 µg / ml), KLH (1-100 µg / ml) und Parathormon (PTH, 1 µg / ml). Darstellung als Stimmulationsindex \pm SEM relativ zu Ovalbumin-stimulierten PBMC (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. vor Therapie). Vor Therapie (□) ist gegen keines der verwendeten Antigene eine *in vitro* Immunreaktivität vorhanden. Nach Therapie (■) ist konzentrationsabhängig für Tumorlysat (10. Zyklus) und KLH (10. Zyklus) eine starke antigenspezifische Immunreaktion nachweisbar, jedoch nicht für Parathormon (AS 1-84).

3.3.2 Antigen-spezifische *in vivo* Immunreaktion beim DTH-Hauttest

Um die *in vivo* Immunreaktion der NSD-Karzinompatientin zu überprüfen, wurde der DTH-Hauttest als Standardtechnik zum Nachweis antigenspezifischer zellulärer Immunität benutzt. Nach der ersten Immunisierung mit MODC war keine Reaktion im DTH-Hauttest auf Tumorlysat, PTH oder KLH zu beobachten. Auch nach sechs Immunisierungszyklen mit Tumorlysat waren weder ein Erythrem noch eine Induration feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt fehlte ebenfalls eine Tumorlysat-spezifische *in vitro* Reaktion im T-Zell-Proliferationsassay. Nachdem KLH (ein CD 4⁺-Stimulator) als zusätzliches Antigen in die Therapie mit aufgenommen wurde, zeigte sich nach dem 10. Zyklus eine signifikante Tumorlysat-spezifische Reaktion im DTH-Test mit Erythrem (18 mm Durchmesser) und Induration (Abbildung 3.21). Gleichzeitig führte auch KLH zu einem positiven DTH-Test bei der NSD-Karzinompatientin. Eine *in vivo* PTH-spezifische T-Zell-Immunität ließ sich im DTH-Test erst nachweisen, als die Immunisierungen (ab der 34. Behandlungswoche) mit einer

gesteigerten Menge des bioaktiven PTH-Peptids (AS 1-34; 100 µg / ml) durchgeführt wurden. Die Vakzinierungen mit der zuerst verwendeten geringeren Menge des PTH-Peptids (AS 1-84; 1 µg / ml) führten dagegen nicht zu einem positiven Ausfall des DTH-Hauttestes.

3.3.3 CD 4 / CD 8-Verhältnis bei der Tumorlysat-spezifischen Immunreaktion

Das *in vivo* CD 4 / CD 8-Verhältnis der NSD-Karzinompatientin wurde aus frischen PBMC nach Ficoll-Dichtezentrifugation bestimmt. Vor Therapiebeginn lag das CD 4 / CD 8-Verhältnis bei 2,3 und schwankte im Therapieverlauf ungerichtet im Bereich zwischen 1,8 und 2,5. Bei Proliferationsassays, in denen die T-Zellen der NSD-Karzinompatientin mit Tumorlysat (100 µg / ml) stimuliert wurden, erfolgte nach 5 Tagen eine Bestimmung des *in vitro* CD 4 / CD 8-Verhältnisses der T-Lymphozyten. Vor Therapiebeginn wiesen im T-Zell-Proliferationsassay sowohl Ovalbumin- als auch Tumorlysat-stimulierte Lymphozyten mit 1,9 das gleiche CD 4 / CD 8-Verhältnis auf. Im Verlauf der Therapie zeigte sich ein ähnliches Bild. Selbst als nach dem 10. Zyklus eine starke TL-spezifische T-Zell-Proliferation (SI > 6) vorlag, war mit einem CD 4 / CD 8-Verhältnis von 2,0 für Tumorlysat keine Änderung gegenüber der Kontrolle (Ovalbumin) mit 1,9 zu beobachten (Abbildung 3.16).

Abbildung 3.16 CD 4 / CD 8-Verhältnis im T-Zell-Proliferationsassay nach TL-Stimulation

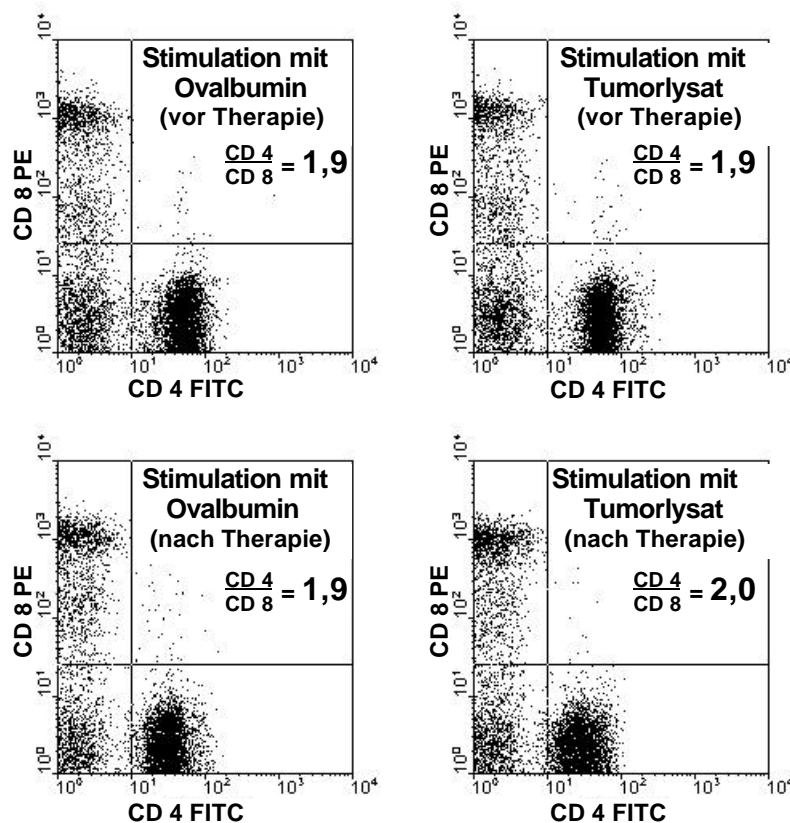


Abb. 3.16: FACS-Analyse des *in vitro* CD 4 / CD 8-Verhältnisses im T-Zell-Proliferationsassay der NSD-Karzinompatientin; gemessen wurden alle Zellen aus der Lymphozyten-Region. Weder vor Therapiebeginn (*obere Reihe*) noch nach dem Auftreten einer Tumorlysat-spezifischen Immunreaktion (10. Zyklus, *untere Reihe*) zeigte sich im T-Zell-Proliferations-assay eine Änderung des CD 4 / CD 8-Verhältnisses von Tumorlysat-stimulierten T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Ovalbumin).

3.3.4 Klinischer Verlauf und Tumormarker der NSD-Karzinompatientin

Alle Immunisierungen mit MODC wurden von der Patientin ohne Nebenwirkungen toleriert. Die Behandlung der Patientin (Abbildung 3.17) erfolgte während des gesamten Zeitraums der Immunisierungen ambulant.

Obwohl gegen Tumorlysat und KLH signifikante *in vitro* und *in vivo* Immunreaktionen vorlagen, konnte keine relevante Verbesserung des klinischen Zustandes der Patientin erreicht werden. Der Parathormonspiegel im Serum stieg von 190 pg / ml auf 1080 pg / ml an, um dann zeitgleich mit der Entwicklung einer PTH-spezifischen *in vivo* Reaktion (nach Einsatz des bioaktiven PTH-Peptids, AS 1-34) stetig auf Werte um 400 pg / ml abzufallen (Normwert: < 50 pg / ml). Der Kalzium-Serumspiegel stieg von 2,5 mmol / l auf über 4 mmol / l an. Nach dem 12. Immunisierungszyklus zeigten CT-Aufnahmen des Thorax eine Progression der Lungenmetastasen, die Patientin verstarb 22 Monate nach Therapiebeginn an einer Pneumonie.

Abbildung 3.17 Therapieschema und Verlaufparameter der NSD-Karzinombehandlung

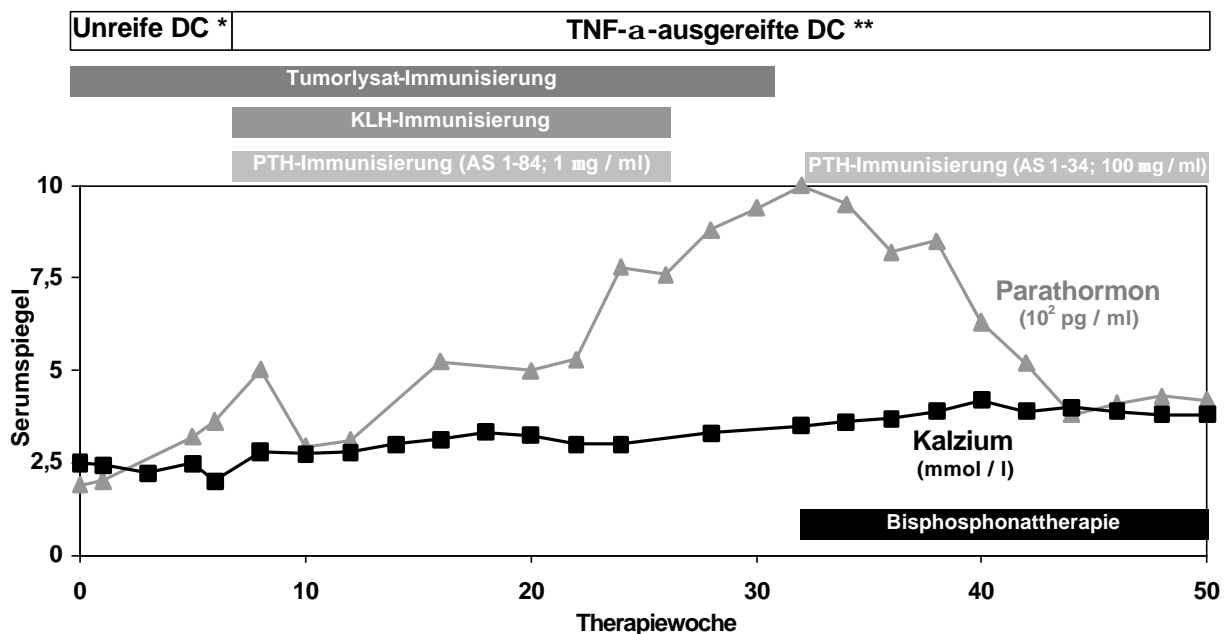


Abb. 3.17: Therapieschema und Serumspiegel der Verlaufspamerter Parathormon und Kalzium bei der NSD-Karzinomtherapie (Immunisierungen im Intervall von * 1 Woche; ** 2 Wochen).

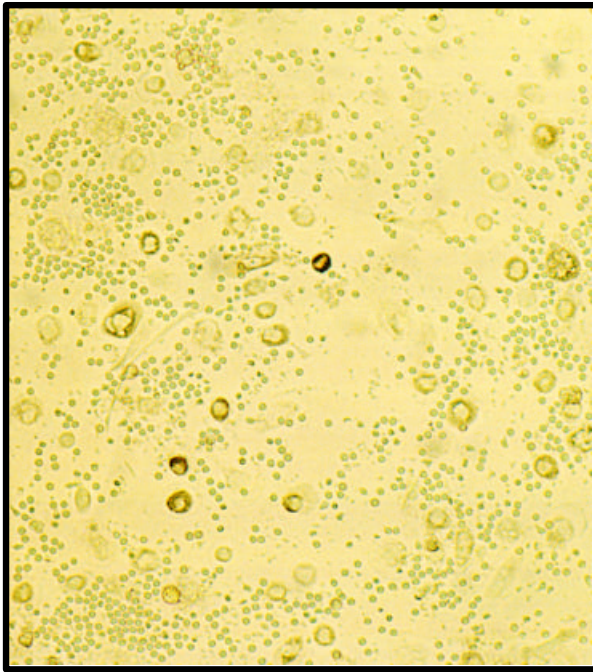


Abbildung 3.18

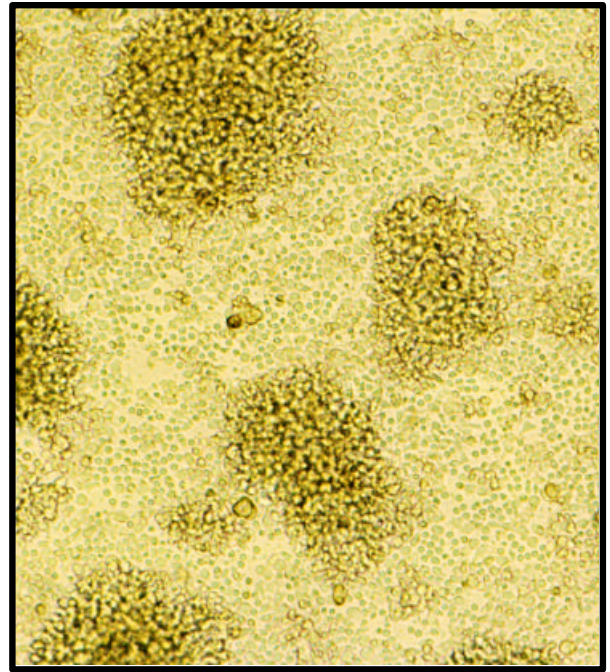


Abbildung 3.19

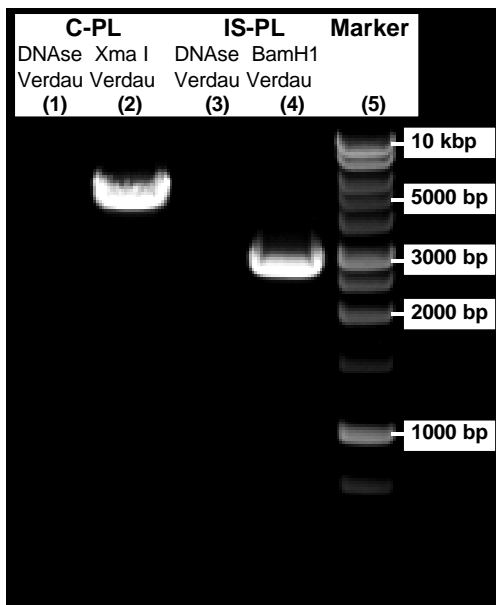


Abbildung 3.20



Abbildung 3.21

Abb. 3.18-3.19: Lichtmikroskopische Aufnahme (100-fach vergrößert) von PBMC, die für 4 Tage durch MODC stimuliert wurden (Verhältnis 100:1). Bei Beladung der MODC mit dem Kontrollprotein Ovalbumin zeigte sich keine PBMC-Proliferation (Abb. 3.18), während die TT-beladenen MODC eine starke Proliferation mit charakteristischer Bildung von Zellhaufen auslösten (Abb. 3.19).

Abb. 3.20: Gelelektrophorese zur Überprüfung des vollständigen DNase-Verdau von C-PL und IS-PL. Bei Einsatz gleicher Plasmidmengen (0,5µg / Spur) zeigte sich, dass beim Verdau durch Restriktionsenzyme mit einer Schnittstelle im Vektor das Plasmid linear vorlag (Spur (2) u. (4)), der DNase-Verdau aber das Plasmid vollständig in Nukleotide zerteilte und keine Bande mehr sichtbar war (Spur (1) u. (3)).

Abb. 3.21: Oberarm-Hautreaktion der NSD-Karzinompatientin auf Tumorlysat und KLH beim DTH-Test. Als Standardtechnik zur Überprüfung antigenspezifischer Immunität *in vivo* zeigte der DTH-Test nach dem 10. Therapiezyklus einen positiven Ausfall mit Erythem und Induration (18 mm bzw. 20 mm Durchmesser) bei Injektion von Tumorlysat (5µg) und KLH (5µg).

4 Diskussion

MODC-basierte Immuntherapien

Dendritische Zellen (DC) sind die effizientesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie können Immunreaktionen auslösen und modulieren, entweder durch Stimulation von B-Zellen zur Produktion von Antikörpern oder T-Zellen zur Kontrolle der zellvermittelten Immunität (Cella et al., 1997a; Banchereau und Steinman, 1998). Die Kultur von humanen DC kann aus CD 34⁺ Knochenmarkstammzellen, Monozyten oder lymphoiden Vorläuferzellen erfolgen (Inaba et al., 1992; Shortman et al., 1997; Sallusto et al., 1994; Romani et al., 1996; Ardavin et al., 1993). Insbesondere die Herstellung von MODC aus isolierten Monozyten durch GM-CSF- und IL-4-Zugabe bietet eine praktikable Methode, um DC für eine klinische Anwendung in ausreichender Menge herzustellen. Der therapeutische Einsatz dieser Zellen wäre vielfältig, scheinen MODC doch die Möglichkeit zu bieten, selektiv die T_{H1}- und T_{H2}- Aktivierung zu manipulieren, spezifische T-Zell-Immunität gegen virusinfizierte Zellen oder Tumoren hervorzurufen oder Toleranz zu induzieren (Suss und Shortman, 1996; Cella et al., 1997a; Banchereau und Steinman, 1998; Lanzavecchia, 1998). Die klinische Anwendung setzt jedoch ein standardisiertes, einfaches und verlässliches Protokoll zur Isolierung großer MODC Mengen voraus.

Gegenwärtig existieren mehrere Protokolle, die eine Kultur von MODC aus adhärennten Monozyten durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 zur Grundlage haben, jedoch in wichtigen Detailfragen Unterschiede aufweisen (Romani et al., 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Alijagic et al., 1995; Romani et al., 1996 und Thurnher et al., 1997). Daher wurde in dieser Arbeit versucht, ein optimiertes Protokoll für die Kultur von MODC mit GM-CSF und IL-4 zu erarbeiten. Es sollte in Hinblick auf einen klinischen Einsatz der MODC möglichst sicher (geringe Kontaminationsgefahr), standardisiert, einfach in der Handhabung sein sowie gleichzeitig eine hohe Reinheit und Ausbeute an MODC gewährleisten. So konnte ein optimierter Waschschrift nach der Anheftungsphase für die mononukleären Zellen als mitentscheidend für die Qualität der Präparation identifiziert werden, während sich durch Veränderungen der Medienwechsel und Zytokinzugaben oder die Verwendung verschiedener Oberflächenmaterialien im Anheftungsschritt keine signifikante Verbesserung der Präparation erreichen ließ. Ohne Qualitätseinbußen konnte im Vergleich zu anderen Protokollen mit einer

Reduzierung des Arbeitsaufwandes für die Zellkultur zusätzlich die Kontaminationsgefahr verringert werden. Enorme Bedeutung für den Reinheitsgrad und die Ausbeute der isolierten MODC hatte der Waschschrift, bei dem durch die Standardisierung eine gute Reproduktion der Ergebnisse erreicht wurde. Das vorliegende Protokoll zur MODC-Präparation bietet somit im klinischen Alltag eine verlässliche Grundlage für qualitativ und quantitativ hochwertige MODC-Präparationen mit 70% - 95% CD 1a⁺ Zellen.

Die DC wurden aufgrund ihrer typischen Morphologie und dem Muster ihrer Oberflächenantigene identifiziert. Unreife MODC sind durch die Expression von CD 1a, costimulierenden (CD 80 / CD 86) und antigenpräsentierenden Molekülen sowie die Abwesenheit spezifischer Lymphozyten- und Makrophagenmarker gekennzeichnet (Romani et al., 1996). Mit dem vorliegenden Protokoll konnte eine vergleichsweise hohe Reinheit (70% - 95% CD 1a⁺ Zellen) der MODC-Präparationen bei sehr geringer Kontamination (< 10%) mit Lymphozyten und Makrophagen erreicht werden. Die Zahl der isolierten MODC (5 - 10 x 10⁶ MODC / 100 ml Blut) lag jedoch etwas unter den in anderen Protokollen beschriebenen Werten. Ein wichtiger Grund hierfür ist in der umfangreichen Waschprozedur nach dem Anheftungsschritt zu suchen, da ein hoher Reinheitsgrad der Präparationen auch eine erhöhte Anzahl von Waschschritten zur Entfernung kontaminierender Zellen erforderte.

Mit der Möglichkeit, humane MODC aus peripherem Blut zu kultivieren, stehen ausreichende Zellzahlen für eine klinische Anwendung zur Verfügung. Gegenwärtig verfolgt ein großer Teil der Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der DC das Ziel, die außergewöhnlichen Fähigkeiten dieser Zellen für die Entwicklung von Antitumor-Vakzinen einzusetzen. Eine Auslösung spezifischer T-Zell-Antworten durch Immunisierung mit Tumorantigen-beladenen DC und resultierender Tumor-Regression oder Eradikation konnte bereits im Tiermodell und mehreren Phase I / II Studien beim Menschen nachgewiesen werden. Bei Immunisierungen mit humanen DC gegen maligne Melanome (Turner et al., 1999; Mackensen et al. 2000), Prostatakarzinome (Tjoa et al., 1998; Murphy et al., 2000; Lodge et al., 2000), Kolonkarzinom-Metastasen (Specht et al., 1997), Nierenzellkarzinome (Rieser et al., 2000; Holtl et al., 1999), Zervixkarzinome (Santin et al., 1999) und Mammakarzinome (Alters et al., 1997) liegt der Focus hauptsächlich auf Neoplasien, für die definierte Tumorantigene bekannt sind.

Über den optimalen Applikationsweg antigenbeladener MODC in der Immuntherapie herrscht gegenwärtig noch Uneinigkeit. Subkutane und intralymphatische DC-Applikationen lösten in der Therapie humaner Karzinome suffiziente Immunreaktionen in vitro und in vivo aus. Auch

die hohe Effektivität einer intravenösen Injektion konnte demonstriert werden (Hsu et al., 1996). DC können nach Migration in das lymphatische Gewebe naive T- und B-Zellen durch Zytokinsekretion anlocken (Adema et al., 1997) und die Lebensfähigkeit rezirkulierender Lymphozyten erhalten (Brocker, 1997). Subkutane und intralymphatische Injektionen führten zur Ansammlung der DC vorwiegend in den regionären Lymphknoten, während eine intravenöse Gabe von DC eine Ansammlung zuerst in der Lunge und anschließend in Leber, Milz und Knochenmark bewirkte (Morse et al., 1999a; Eggert et al., 1999). Neuere Erkenntnisse belegen für die intradermale Injektion eine rasche Migration der DC in regionäre Lymphknoten, die der subkutanen Injektionsform überlegen war (Morse et al., 1999). Zukünftige Konzepte der Immuntherapie könnten somit die intradermale Injektion favorisieren. Die aktive Immuntherapie mit DC stützt sich im wesentlichen auf die regionären Lymphknoten als primären Ort der spezifischen Erkennung des Antigens und der nachfolgenden Aktivierung des Immunsystems. Die große Bedeutung der regionären Lymphknoten für eine DC-Immuntherapie wird durch Ergebnisse unterstrichen, die für eine radikale chirurgische Entfernung der Lymphknoten bei Tumoroperationen einen merklich negativen Einfluss auf eine postoperative Immuntherapie nachgewiesen haben (Santin, 2000).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Verteilung von DC in verschiedene Bereiche des lymphatischen Gewebes maßgeblich durch die Art der Applikation bestimmt wird. Unklar verbleibt, ob die Anreicherung der DC in verschiedenen lymphatischen Geweben auch eine Beeinflussung ihrer funktionellen Aktivität bewirkt. In der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Fallstudie (Immuntherapie eines NSD-Karzinoms) erfolgte aufgrund der bei Therapiebeginn vorliegenden Erkenntnisse die Applikation der MODC zu gleichen Teilen subkutan und intralymphatisch (als Injektion in einen lokalen Lymphknoten oder den lymphknotennahen Bereich).

Für die antigenspezifische Immuntherapie mit MODC ist eine effektive Beladung der Zellen mit dem Antigen eine wichtige Voraussetzung. Während unreife DC eine starke phagozytische Aktivität für lösliche Antigene aufweisen, beenden ausgereifte DC die Antigenaufnahme (Reis e Sousa et al., 1993; Inaba et al., 1993). Ausgereifte DC können phagozytiertes Antigen über HLA Klasse I und II-Moleküle präsentieren und haben sich als potente Stimulatoren von CD 4⁺ und CD 8⁺ T-Zellen erwiesen (Sauter et al., 2000). Während der Mechanismus der Antigenpräsentation mit HLA Klasse II-Molekülen über den Weg der MIICs (MHC class II-rich compartments) gut dokumentiert ist (Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997), herrscht bisher Unklarheit über den Mechanismus, der DC die Präsentation

exogener Antigene mit HLA Klasse II-Molekülen erlaubt (Bender et al., 1995; Albert et al., 1998).

Die aus Antigenfragmenten und HLA-Molekülen gebildeten Komplexe bleiben über Tage stabil und können im Zusammenspiel mit costimulierenden Molekülen und Zytokinsekretion die Auslösung einer antigenspezifischen Immunantwort bewirken (Pierre et al., 1997; Cella et al., 1997).

Eine DC-basierte Immuntherapie fordert eine möglichst wirksame Beladung der Zellen mit Antigen. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit zeitabhängige Antigenbeladung und die Auswirkungen auf die Reaktion verschiedener T-Zell-Subpopulationen bestimmt werden. Eine Verlängerung der Zeitspanne für die Phagozytose des zugefügten Antigens um 24 oder 48 Stunden hatte im Vergleich zur simultanen Applikation von Antigen und Ausreifungsstimulus keine Auswirkung auf die T-Zell-stimulatorische Wirkung der MODC. Der Versuch, die endozytotischen Vesikel mit dem zugefügten Antigen aufzusättigen, um nach Ausreifung der MODC eine erhöhte Anzahl von HLA-Molekül / Antigen Komplexen zu erhalten, konnte somit keine verstärkte T-Zell-Stimulation bewirken. Die MODC bewirkten auch keine direkte Stimulation von CD 8⁺ T-Zellen. Hierfür scheint eine vorhergehende Aktivierung der MODC durch CD 4⁺ T-Zellen erforderlich zu sein (Baxevanis et al., 2000), um eine „Lizenzierung“ der MODC zur autonomen Auslösung zytotoxischer Immunantworten zu erreichen (Lanzavecchia, 1998).

Die Resultate unterstreichen erneut die äußerst effektive Aufnahme und Präsentation kleinster Antigenmengen durch MODC (Sallusto et al., 1995). In der Entwicklung des Immuntherapie-schemas für die vorgestellte Fallstudie ermöglichte diese schnelle Antigenprozessierung die gleichzeitige Applikation von Antigen und Ausreifungsstimulus zu den MODC, ohne daß hierdurch deren Stimulationskapazität tangiert wurde.

In ihren Anfängen hat die DC-basierte Immuntherapie vor allem bei malignen Erkrankungen bereits beeindruckende Erfolge vorzuweisen, obwohl die angewendeten Therapiekonzepte noch am Anfang eines wahrscheinlich langen Optimierungsprozesses stehen. Mit *in vitro* Versuchen zur Antigenbeladung und einem abgeänderten Protokoll zur MODC-Isolierung möchte sich die vorliegende Arbeit an der Suche nach einem verbesserten Therapiekonzept zur Immuntherapie beteiligen.

IS-Plasmid DNA-ausgereifte MODC induzieren eine zytotoxische Immunantwort in vitro - Chancen für zukünftige in vivo Immuntherapien

Die DC-basierte Immuntherapie ist auf hochgradig ausgereifte und aktivierte MODC angewiesen, um eine effektive Immunantwort auslösen zu können. Im Rahmen von DC-basierten Anti-Tumorvakzinierungen konnte dies bisher nur durch die Behandlung der Zellen mit dem Ausreifungsstimulus TNF- α erreicht werden.

Obwohl in mehreren Tiermodellen (Maus) eine Aktivierung von DC durch CpG-Motive demonstriert wurde, gab es bisher nur wenig Erkenntnisse über den Effekt von IS-DNA Sequenzen auf die Ausreifung und Aktivierung von humanen DC. In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals auch die ausreifende Wirkung von IS-Plasmid-DNA auf humane MODC gezeigt werden.

Bei der Behandlung mit IS-Plasmid-DNA induzierte IS-PL eine konzentrationsabhängige Ausreifung unreifer humaner MODC, die sich in einer verstärkten Expression des Ausreifungs-markers CD 83 (~ 10-fach), der kostimulierenden Moleküle CD 80 (~ 4-fach) und CD 86 (~ 11-fach) sowie von HLA Klasse I (~ 4-fach) und HLA Klasse II-Molekülen (~ 2-fach) zeigte. Dieser Effekt war DNA-Sequenz-spezifisch, da eine Zerstörung der IS-PL Sequenz durch einen vorherigen DNase-Verdau mit einem Verlust der Reaktivität einherging. C-PL, dem stark immunstimulierende Sequenzen fehlten, konnte mit seinen schwachen IS-Sequenzen nur eine vergleichsweise geringe Ausreifung der MODC hervorrufen. Dieser Effekt trat erst bei höheren Konzentrationen von C-PL auf und ließ sich gleichfalls durch einen DNase-Verdau des Plasmids verhindern. Kontrollmessungen mit dem LAL-Assay schlossen eine Verunreinigung der Plasmidpräparationen mit Endotoxinen aus.

Diese Ergebnisse belegen die Ausreifung humaner MODC durch IS-Plasmid-DNA und deuten darauf hin, daß immunstimulatorische DNA als unspezifisches Erkennungsmuster (z.B. für Infektionen) zur Förderung einer Immunantwort dienen könnte. So konnte auch kürzlich die starke Aktivierung humaner MODC durch doppelsträngige RNA nachgewiesen werden (Cella et al., 1999).

Überraschenderweise löste keines der getesteten immunstimulierenden Oligodesoxynukleotide (IS-ODN) eine Ausreifung und Aktivierung humaner MODC aus, obwohl die eingesetzten ODN Konzentrationen äquivalent zu wirksamen Mengen von IS-PL waren. Für einige der IS-ODN war zuvor die Induktion einer starken T_{H1}-Immunantwort in der Maus (IS-

1585, IS-1668) (Sparwasser et al., 1998; Jakob et al., 1998; Sato et al., 1996; Roman et al., 1997; Chu et al., 1997) oder die Aktivierung humaner Monozyten (IS-1760) (Hartmann et al., 1999) gezeigt worden. Auch ODN IS-4Z mit dem starken immunstimulatorischen CpG-Motiv aus dem Ampicillinresistenzgen des IS-PL blieb bei humanen MODC ohne Effekt.

Die Wirksamkeit aller verwendeten ODN konnte durch die signifikante Aktivierung von murinen BMDC belegt werden. Bei dem CpG-Motiv aus dem Ampicillinresistenzgen (IS-4Z) wurde die hohe stimulatorische Potenz auch im murinen System durch eine starke BMDC-Aktivierung nachgewiesen. Die vorliegenden differierenden Ergebnisse zur Wirkung von IS-ODN auf humane und murine DC könnten durch Unterschiede in der Erkennung von CpG-Motiven begründet sein. Hartman et al. (1999a) konnten für ein IS-ODN mit einem 5'-TCGTCGTT-3' CpG-Motiv zeigen, daß es zwar humane DC des peripheren Blutes, nicht aber humane MODC aktivierte. Obwohl in dieser Arbeit differierende ODN verwendet wurden, bestätigen die vorliegenden Ergebnisse das Fehlen einer MODC-Antwort auf IS-ODN, die im murinen System wirksam sind.

Zusätzlich wurden bei humanen MODC Untersuchungen mit einem ODN durchgeführt, für das eine Hemmung der Plasmid-DNA-induzierten Wirkung auf murine Lymphozyten beschrieben wurde (ODN INHIB; Rykova et al., 1999).

Für murine BMDC gibt es bereits erste Erkenntnisse über den Signaltransduktionsmechanismus. So scheint IS-DNA ihre Wirkung nach Aufnahme über einen nicht-sequenzspezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche auszuüben, gefolgt von der Bindung an eine endosomale CpG-DNA-spezifische rezeptorähnliche Struktur, von der die Signaltransduktion vermittelt wird (Häcker et al., 1998). Bei Lymphozyten aus der murinen Milz konnte die Bindung von ODN INHIB an ein IS-DNA-spezifisches Rezeptorprotein mit nachfolgender Inhibierung einer Plasmid-DNA-induzierten Lymphozytenproliferation gezeigt werden (Rykova et al., 1999).

ODN INHIB vermochte aber in der vorliegenden Arbeit keine Wirkungsabschwächung der IS-PL vermittelten MODC Ausreifung hervorzurufen. Das Fehlen dieser Inhibitionswirkung auch bei 10-fachem Überschuß von ODN INHIB im humanen System ist daher ein weiteres Indiz, das auf differierende DNA-Rezeptoren oder sogar einen unterschiedlichen Wirkmechanismus von IS-DNA im murinen System hindeutet.

Die beginnende Charakterisierung muriner MODC in Kombination mit einem Protokoll zur Anzucht dieser Zellen (Schreurs et al., 1999) lässt für die Zukunft eine genauere Klärung der

Frage nach differierenden Wirkungen im Vergleich zu humanen MODC erhoffen, als dieses durch Versuche mit murinen BMDC geschehen könnte.

In dieser Arbeit konnte damit die starke immunstimulierende Wirkung von Plasmid-DNA auf humane MODC nachgewiesen werden. Die durchflußzytometrische Untersuchung zeigte phänotypisch eine gleichwertige MODC-Ausreifungswirkung für IS-PL und den konventionellen Ausreifungsstimulus $\text{TNF-}\alpha$. Der Einfluss dieser beiden verschiedenen Ausreifungsmethoden auf die Aktivierung der MODC zur T-Zell-Stimulation und die Art der ausgelösten Immunantwort sollte weiter untersucht werden:

Die immunstimulierende Kapazität von DC beruht nicht allein auf einer vermehrten Expression von HLA Klasse II- und costimulierenden Molekülen auf der Zelloberfläche, sondern bedingt auch die Produktion wichtiger Zytokine (Trinchieri und Scott, 1994). Um die funktionelle Aktivität der MODC zur Stimulation einer zytotoxischen Immunantwort zu erfassen, wurden an der Entwicklung einer T_{HI} -Immunantwort beteiligte Zytokine gemessen. Durch Stimulation mit IS-PL konnte neben der Ausreifungswirkung eine erhebliche Aktivierung der MODC zur Produktion von IL-6 und IL-12 ausgelöst werden. Einhergehend mit dieser Zytokinproduktion zeigte sich in antigenspezifischen T-Zell-Proliferationsassays mit IS-PL stimulierten MODC eine starke Polarisierung in die Richtung einer T_{HI} -Immunantwort.

In Übereinstimmung mit Arbeiten an murinen DC (Sparwasser et al., 1998) konnte bei der IS-PL-Aktivierung der humanen MODC eine hohe Sekretion von IL-6 beobachtet werden, das sowohl zur Proliferation und Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten als auch zur Produktion von Immunglobulinen bei B-Lymphozyten führt (Akira et al., 1993). Im Vergleich zu unreifen MODC führt IS-PL zu einer dramatisch gesteigerten IL-6 Sekretion (~ 260-fach), der konventionelle Ausreifungsstimulus $\text{TNF-}\alpha$ hingegen nur zu einem signifikant schwächeren Anstieg (~ 7-fach).

Mehrere Arbeiten dokumentierten einen signifikanten IL-12-Anstieg nach CpG-ODN-Stimulation von murinen Splenozyten, kutanen DC und murinen DC (Sparwasser et al., 1998; Jakob et al., 1998; Cella et al., 1999). Bioaktives IL-12 fördert die Differenzierung naiver T_{H0} -Zellen in T_{HI} -Zellen (Manetti et al., 1993; Hsieh et al., 1993), (co)-stimuliert bereits differenzierte T_{HI} -Zellen zur Proliferation und $\text{IFN-}\gamma$ -Sekretion (Murphy et al., 1994), verstärkt die lytische Aktivität unspezifischer NK-Zellen (Kobayashi et al., 1989) und begünstigt spezifische, zytotoxische T-Zell-Antworten (Gately et al., 1991). Nur eine

Stimulation humaner MODC mit IS-PL induzierte die Sekretion von bioaktivem IL-12, jedoch fand sich im Vergleich zu CpG-ODN-stimulierten murinen BMDC (Sparwasser et al., 1998; Jakob et al., 1998; Cella et al., 1999) eine geringere IL-12-Produktion. Begründet sein könnte diese nur moderate IL-12 Synthese zum Teil in speziesspezifischen Abweichungen von humanen und murinen DC in der Reaktion auf IS-DNA oder durch Differenzen in den verwendeten Assays zum IL-12-Nachweis (IL-12 p40/p35-Heterodimer vs. IL-12 p40-Monomer). In dieser Arbeit wurde das bioaktive IL-12 p40/p35-Heterodimer nachgewiesen und nicht die IL-12 p40-Untereinheit bestimmt, da die p40-Untereinheit bei der IL-12 Synthese im Überschuss (bis zu 100-fach) produziert wird (Stern et al., 1990; D'Andrea et al., 1992; Heinzel et al., 1994). Es konnte sogar ein IL-12-Antagonismus für das murine (Gillesen et al., 1995) und humane (Ling et al., 1995) IL-12 p40-Monomer nachgewiesen werden. Die Messung nur der IL-12 p40-Untereinheit alleine erlaubt daher keine Aussage über die biologische IL-12 Aktivität. Die Produktion von bioaktivem IL-12 durch MODC konnte in dieser Arbeit nur nach Stimulation mit IS-PL nachgewiesen werden, die Verwendung von TNF- α oder DNase-verdaulichem IS-PL induzierte keine messbare IL-12 Sekretion.

Damit führte bei humanen MODC nur der Ausreifungsstimulus IS-PL zu einem Zytokinsekretionsmuster, das bei MODC-Stimulation von Lymphozyten eine starke Polarisierung in die Richtung einer T_{H1}-Immunantwort erwarten lässt. Weder TNF- α noch das zur Kontrolle mit DNase verdaute IS-PL vermochten ein vergleichbares, T_{H1}-förderndes Zytokinsekretionsmuster bei MODC auszulösen.

Eine weiterführende Charakterisierung der funktionellen Aktivität der MODC erfolgte in T-Zell-Proliferationsassays mit dem Antigen Tetanustoxoid. IS-PL- und TNF- α -ausgereifte MODC zeigten eine ähnlich starke antigenspezifische Stimulationswirkung auf T-Zellen Tetanus-immunisierter Probanden, während unreife MODC eine signifikant schwächere T-Zell-Proliferation hervorriefen. Diese Befunde entsprechen den bisher bekannten Ergebnissen über eine verstärkte T-Zell-Stimulation durch ausgereifte MODC im Vergleich zu unreifen MODC (Young und Steinman, 1990; Zhou und Tedder, 1995; Nijman et al., 1995).

Eine Ausreifung mit IS-PL oder TNF- α führte zu einer vergleichbaren Stimulationswirkung der MODC auf T-Zellen. Jedoch konnte für IS-PL-ausgereifte MODC die Stimulation einer T_{H1}-Immunantwort vermutet werden, da IS-ODN und IS-DNA im murinen und humanen System eine T_{H1}-Antwort fördern (Roman et al., 1997; Ballas et al., 1996; Chu et al., 1997). Auch das Zytokinsekretionsmuster der IS-PL-stimulierten MODC mit der Produktion von

bioaktivem IL-12 und einer hohen IL-6 Sekretion ließ eine starke Polarisation in Richtung einer zytotoxischen Immunantwort erwarten. Die durchflußzytometrischen Untersuchungen der T_{H1} / T_{H2} -Balance der Lymphozyten im Proliferationsassay bestätigten das Vorherrschen eines T_{H1} -Phänotyps (25% IFN- γ produzierende T-Lymphozyten) bei Stimulation mit IS-PL-ausgereiften MODC. Die durch IS-PL-ausgereifte MODC hervorgerufene T_{H1} -Antwort war signifikant stärker als bei Verwendung von unreifen oder TNF- α -ausgereiften MODC.

Das Vorherrschen des T_{H1} -Phänotyps wies auf eine Differenzierung in T_{H1} -polarisierte T-Zellen durch IS-PL-stimulierte MODC hin. Alternativ könnten IS-PL-stimulierte MODC die Aktivierung von T-Gedächtniszellen bewirkt haben, die bereits auf eine T_{H1} -Antwort festgelegt waren.

Sowohl IS-PL- als auch TNF- α -ausgereifte MODC zeigten eine vergleichbar große Kapazität zur T-Zell-Stimulation. Jedoch konnte bei humanen MODC nur durch die Aktivierung mit IS-PL neben einem die T_{H1} -Immunantwort förderndem Zytokinsekretionsmuster auch die Stimulation einer starken T_{H1} -Antwort im Proliferationsassay ausgelöst werden. Für die Immuntherapie von Karzinomen und intrazellulären Erregern bietet sich damit durch IS-PL-ausgereifte MODC der Vorteil, eine stärkere zytotoxische Immunantwort auslösen zu können als mit dem konventionellen Ausreifungsstimulus TNF- α .

Zusätzlich unterstützt der Nachweis einer großen stimulatorischen Kapazität von IS-PL-ausgereiften MODC die Idee, daß die begleitende Verabreichung von IS-Plasmid DNA bei herkömmlichen oder DNA-basierten Impfungen die Ausbildung einer starken T_{H1} -Immunantwort fördern könnte.

Fallstudie: In vivo Immuntherapie mit MODC bei metastasiertem Nebenschilddrüsenkarzinom

Dies ist die erste Beschreibung eines Behandlungsversuches bei einem endokrinen Karzinom durch Vakzinierung mit antigenbeladenen MODC. Durch die *in vivo* Behandlung eines Nebenschilddrüsen(NSD)-Karzinoms mit Tumorlysat(TL)-beladenen MODC sollte die Effektivität dieses Therapiekonzeptes gezeigt und gleichzeitig die DC-basierte Immuntherapie erst-

malig auf das Gebiet der endokrinen Karzinome erweitert werden. Nach anfänglicher Therapie mit unausgereiften MODC konnte nach wiederholten Immunisierungen mit TNF- α -ausgereiften MODC eine tumorspezifische T-Zell-Antwort gezeigt werden. (Für die Therapie mit IS-PL-ausgereiften MODC wäre die Genehmigung einer Gentherapie erforderlich gewesen).

Das Nebenschilddrüsenkarzinom ist ein seltener maligner Tumor, der aufgrund gesteigerter Parathormonwerte die Symptome einer chronischen Hyperkalzämie hervorruft. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 30% und die 10-Jahre-Überlebensrate beträgt ungefähr 15% (Shane und Bilezikian, 1982). Bestrahlung und Chemotherapie haben sich bei der Kontrolle von Tumorrezidiven und metastatischen Läsionen als unwirksam erwiesen (Shane und Bilezikian, 1982; Bukowski et al., 1984; Calandra et al., 1984; Schott et al., 2000). Daher wurde in dem vorliegenden Fall eines metastasierten NSD-Karzinoms mit einer MODC-basierten Immuntherapie versucht, das Tumorwachstum zu kontrollieren.

Der *in vivo* Nachweis einer Tumorlysat-spezifischen Immunantwort erfolgte durch einen positiven DTH-Hauttest nach dem 10. Vakzinierungszyklus. Mit der rapiden Entwicklung einer KLH-spezifischen- und einer nachfolgenden Tumorlysat-spezifischen Antwort zeigt das vorliegende Therapieschema seine Fähigkeit, eine effektive Immunantwort gegen einen malignen Tumor zu bewirken. Zudem zeigte sich auch eine starke TL- und KLH-spezifische *in vitro* Immunreaktion im T-Zell-Proliferationsassays, deren Auftreten mit der *in vivo* Antwort zeitlich korrelierte. Trotz wiederholter Vakzinierungen mit dem PTH-Peptid (AS 1-84; 1 μ g / ml) ließ sich keine PTH-spezifische Immunantwort *in vivo* (und *in vitro*) zeigen. Erst der Einsatz einer größeren Menge des bioaktiven PTH-Peptids (AS 1-34; 100 μ g / ml) bei den Immunisierungen erzeugte auch hier eine starke antigenspezifische *in vivo* Immunreaktion, die mit einem Abfall des PTH-Serumspiegels korrelierte.

In einem ähnlichen Fall von metastasiertem Nebenschilddrüsenkarzinom mit extremer Hyperkalzämie konnte nach PTH-Immunisierung (ohne Verwendung von MODC) eine PTH-spezifische T_{H2}-Antwort demonstriert werden (Bradwell und Harvey, 1999). Einer Patientin wurden verschiedene humane und bovine PTH-Peptide mit komplettem Freund'schem Adjuvans (suspendiert in steriler Kochsalzlösung) in Intervallen von 3 bis 7 Wochen subkutan appliziert. Durch diese Strategie konnte die B-Zell-Toleranz durchbrochen und eine PTH-Autoantikörperproduktion ausgelöst werden. In diesem Fall resultierte eine klinische Besserung der Symptome aus der Bindung von Antikörpern an freies PTH im Serum, so daß

eine rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zielzellen verhindert wurde. Hingegen konnte der PTH-Serumspiegel nicht verringert werden, sondern stieg im Therapieverlauf konstant an.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Therapie ein Abfall des PTH-Serumspiegels bei der Patientin erreicht werden, jedoch wurde trotz sinkender PTH-Serumwerte keine klinische Besserung der Symptomatik erreicht. Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre die Auslösung unterschiedlicher Immunreaktionen in den beiden NSD-Karzinomfällen. Sowohl der Modus der Antigenapplikation (Vakzinierung mit und ohne DC) als auch die Verwendung nur eines einzelnen bioaktiven PTH-Peptides an Stelle des Cocktails aus humanen und bovinen PTH-Peptiden lassen differierende Immunreaktionen wahrscheinlich erscheinen.

Aus naheliegenden Gründen bietet sich die DC-basierte Tumorthherapie bei den malignen Erkrankungen an, für die definierte Tumorantigene verfügbar sind (z.B. PSA, CEA, MART) (Morse et al., 1999b; Nair et al., 1999; Murphy et al., 2000; Lodge et al., 2000; Philip et al., 2000). Analog zur Verfahrensweise bei anderen Karzinomen ohne bekannte Tumorantigene (Fields et al., 1998; Nestle et al., 1998; Mulders et al., 1999; Hinkel et al., 2000) erfolgte daher die Beladung der MODC mit lysiertem autologem Tumorgewebe (Tumorlysat). Insbesondere bei diesen Vakzinierungen könnte der Co-Immunisierung mit KLH eine wichtige Rolle zukommen, da KLH durch die Auslösung einer starken T-Helfer-Zell-Antwort und eine Aktivierung der Zytokinproduktion in den regionären Lymphknoten für ein Umfeld sorgt, das eine effektive zytotoxische T-Zell Antwort begünstigt. Die Induktion einer *in vitro* T-Zell-Antwort gegen Tumorlysat und KLH bei der NSD-Karzinomtherapie spricht dafür, einen generellen Einsatz von KLH oder ähnlichen Immunstimulanzien in der DC-basierten Immuntherapie mit schwachen Antigenen (Tumorlysat) in Betracht zu ziehen. Mehrere Therapiekonzepte bedienen sich bereits der Co-Immunisierung mit KLH (Lim und Bailey-Wood, 1999; Rieser et al., 2000). Berichte über vereinzelte Patienten ohne Immunantwort auf KLH-Immunisierung sind selten (Rieser et al., 2000).

Die in dieser Arbeit bei der NSD-Karzinompatientin beobachteten starken *in vivo* Immunreaktionen waren jedoch nur mit einem unbefriedigenden klinischen Effekt verbunden. Die Entwicklung weiterer Lungenmetastasen konnte durch Immunisierungen mit Tumorlysat nicht verhindert werden. Daher wurde der Versuch einer kurativen Behandlung mit Tumorlysat-Vakzinierungen eingestellt und weiterhin vordringlich versucht, den Kalzium-Serumspiegel durch fortgesetzte Immunisierungen mit 100-fach höher dosiertem bioaktiven PTH-Peptid (und unterstützt durch eine Bisphosphonattherapie) zu kontrollieren. Der initial weiter

angestiegene Parathormon-Serumspiegel begann daraufhin stetig abzufallen, während der Kalzium-Serumspiegel auf erhöhtem Niveau verharrte.

Im weiteren Verlauf verweigerte die Patientin diese Behandlung und unterzog sich einer Chemotherapie an einer auswärtigen Klinik. Die Patientin verstarb bei schlechtem Allgemein- und Ernährungszustand 22 Monate nach Therapiebeginn an einer Pneumonie.

Diese Diskrepanz zwischen der starken *in vivo* Immunreaktion und dem unbefriedigenden klinischen Effekt könnte durch das fortgeschrittene Krankheitsstadium mit hohen Tumormassen, das Fehlen eines spezifischen Tumorantigens für das Nebenschilddrüsenkarzinom oder die unzureichende Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen trotz Bildung von T-Gedächtniszellen bedingt sein. Für eine ungenügende Induktion zytotoxischer T-Zellen spricht die Beobachtung, daß bei den TL-spezifischen *in vitro* Immunreaktionen im T-Zell-Proliferationsassay keine entsprechende Veränderung des CD 4 / CD 8-Verhältnisses zu finden war. Gleiches gilt für das *in vivo* CD 4 / CD 8-Verhältnis (im peripher-venösen Blut), wo aber aufgrund der geringen Zahl spezifischer CD 8⁺ Zellen nicht mit einer nachweisbaren Veränderung gerechnet werden konnte.

Alle Vakzinierungen mit DC erfolgten ambulant und wurden von der NSD-Karzinompatientin ohne Nebenwirkungen toleriert. Andere Studien berichteten vereinzelt über leichte Nebenwirkungen (mildes Fieber) bei einem kleinen Teil der Patienten nach DC-basierten Immuntherapien, anaphylaktische Reaktionen nach wiederholten Immunisierungen, das Auftreten einer Vitiligo (Mackensen et al., 2000; Mackensen et al., 2000a) sowie Antikörperbildung (IgM, IgG und IgE) gegen FKS (Mackensen et al., 2000a). Die Induktion von Autoimmunität wurde auch schon für tierexperimentelle Studien beschrieben (Ludewig et al., 2000).

Zusammenfassend kann nach bisherigem Erkenntnisstand davon ausgegangen werden, daß Antitumor-Vakzinierungen mit DC effektive tumorspezifische Immunreaktionen *in vivo* hervorrufen können, ohne jedoch gravierende Nebenwirkungen auszulösen.

Unabhängig vom klinischen Ausgang der NSD-Karzinompatientin repräsentiert die Vakzinierung mit antigenbeladenen MODC eine vielversprechende neue Strategie zur Induktion von T-Zell-Antworten gegen schwache Antigene wie z.B. Tumorproteine. Dieser Ansatz stellt daher auch im endokrinologischen Bereich neue Möglichkeiten zur Therapie fortgeschrittener, Strahlen- und Chemotherapie-resistenter maligner Erkrankungen zur Verfügung.

Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die immunologische Forschung war für lange Zeit auf Antigene und Lymphozyten fokussiert, jedoch führt die bloße Anwesenheit dieser zwei Fraktionen nicht immer zu Immunität. Eine dritte Gruppe, das antigenpräsentierende System der DC, hat sich als wichtiges auslösendes und modulierendes Element bei einer Immunantwort erwiesen. Durch ihre zentrale Stellung in der Kontrolle von Immunreaktionen sind DC ein wichtiges Ziel bei vielen klinischen Situationen mit einer Beteiligung von T-Lymphozyten.

Ein großer Teil der Forschungsbemühungen im Bereich der DC-Immuntherapie hat die Behandlung maligner Tumoren zum Ziel:

Als antigenpräsentierende Zellen können DC eine effektive Immunantwort gegen Tumoren auslösen: DC phagozytieren und präsentieren nicht nur lösliches Antigen in Komplex mit HLA Klasse I und II-Molekülen (Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997), sondern können auch direkt Tumorantigene von apoptotischen Zellen aufnehmen, diese in Komplex mit HLA Klasse I-Molekülen präsentieren und eine antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort bewirken (Russo et al., 2000). Die Funktion der DC beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Regulation von T- und B-Zell-Antworten, sondern sie sind in der Tumorabwehr auch als direkte Effektorzelle bedeutsam (Chapoval et al., 2000). Ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle der DC in der Tumorbekämpfung ist der Befund, daß eine Ausreifung von DC alleine durch nekrotische Tumorzellen ausgelöst werden kann, nicht aber durch Gewebszellen oder apoptotische Zellen (Sauter et al., 2000).

Bei Patienten mit malignen Erkrankungen können die Tumoren aber einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen. So wurde u.a. für verschiedene Karzinome die Fähigkeit nachgewiesen, DC zur Apoptose zu veranlassen (Esche et al., 1999; Kiertscher et al., 2000). Auch sind Tumor-infiltrierende DC defizitär in ihrer antigenpräsentierenden Funktion (Chaux et al., 1997).

Diese Funktionseinbußen der DC bei Tumorpatienten beziehen sich jedoch nicht auf DC, die aus monozytären Vorläuferzellen *ex vivo* kultiviert werden: kultivierte, autologe MODC konnten bei Karzinompatienten eine starke T-Zell-Stimulation auslösen; aus dem peripheren Blut isolierte DC hingegen waren dazu nicht in der Lage (Gabrilovich et al., 1997). Diese Beobachtungen würden eine Erklärung dafür bieten, weshalb die *ex vivo* Beladung der MODC mit Antigen eine effektive Antitumor-Immunreaktion bei Patienten induzieren kann,

während die DC im peripheren Blut der Patienten bei dieser Aufgabe zuvor offensichtlich versagt haben.

Die Möglichkeit, humane MODC mit GM-CSF und IL-4 in großer Menge aus venösem Blut zu generieren, erlaubt den therapeutischen Einsatz von MODC mit ihren vielfältigen Fähigkeiten. Die vorliegende Arbeit bietet zu diesem Zweck ein Protokoll an, das auf die Isolierung von MODC für den Einsatz in DC-basierten Immuntherapien zugeschnitten wurde. Die vorgestellte Fallstudie konnte mit der *in vivo* Behandlung eines Nebenschilddrüsen-(NSD)-Karzinoms mit Tumorlysat(TL)-beladenen MODC die Effektivität dieses Therapiekonzeptes demonstrieren, indem starke Tumor-spezifische Immunreaktionen *in vitro* und *in vivo* induziert wurden. Gleichzeitig erfolgte damit die erstmalige Beschreibung einer DC-basierten Immuntherapie auf dem Gebiet der endokrinen Karzinome.

Weiterhin bildet das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Isolierung von MODC die Grundlage einer Studie über DC-basierte Immuntherapien endokriner Karzinome, in deren Rahmen eine Reihe unterschiedlicher endokriner Karzinome (neuroendokrines Pankreas-karzinom, medulläres Schilddrüsenkarzinom, Nebenschilddrüsenkarzinom) behandelt und Teilremissionen bzw. eine Reduzierung der Tumormassen erreicht wurden (Schott et al., 1999; Schott et al., 2001; Schott et al., 2001a).

Humane MODC, die in ausreichenden Zellzahlen für eine klinische Anwendung kultiviert werden können, haben sich zu einem bevorzugten Ziel von Immuntherapien entwickelt. Die *ex vivo* Manipulation von MODC scheint Möglichkeiten zur selektiven Modulation von T_{H1}- und T_{H2}- Aktivierung, zur Induktion von Toleranz sowie spezifischer T-Zell Immunität gegen infizierte Zellen und Tumoren zu eröffnen (Cella et al., 1997a; Banchereau und Steinman, 1998; Lanzavecchia, 1998).

Erste vielversprechende Erfolge mit dem Konzept einer DC-basierten Immuntherapie ließen sich bereits in der Karzinombehandlung mit Tumorregressionen und -eradikationen erzielen (Ashley et al., 1997; Specht et al., 1997; Nestle et al., 1998; Nair et al., 1999; Schott et al., 1999; Murphy et al., 2000; Lodge et al., 2000).

Auch an neuen Strategien zur Vakzinierung gegen intrazelluläre Erreger (bakteriell oder viral), die weltweit große Gesundheitsprobleme verursachen, wird gearbeitet (z.B. *Leishmania donovani* / *Mycobacterium tuberculosis*: Ahuja et al., 1999; Demangel und Britton, 2000; oder HIV: Kusakabe et al., 2000).

Ausschlaggebend für die zukünftige Bedeutung der DC-basierten Immuntherapie wird aber eine Verbesserung der Effektivität sein. Viele der gegenwärtigen Vorschläge hierzu befassen sich mit einer wirkungsvolleren Antigenbeladung und Präsentation der DC, so die Transfektion mit einer sich selbst replizierenden RNA-Vakzine (Ying et al., 1999; Leitner et al., 1999), der virus-vermittelte Gentransfer in DC (Di Nicola et al., 1998; Wan et al., 1999; Russo et al., 2000) oder die Bildung einer Fusionszelle aus DC und Tumorzelle (Gong et al., 2000).

Weiterhin wird versucht, die ausgelöste antigenspezifische Immunreaktion in die Richtung einer T_{HI} -Immunantwort zu beeinflussen, die für eine effektive Bekämpfung u.a. von Tumoren und intrazellulären Erregern benötigt wird. Die gegenwärtigen Ansätze hierzu favorisieren die Gabe komplexer Zytokinkombinationen während der DC-Kulturphase (Sato et al., 1999), die Transfektion/Transduktion der DC mit Zytokin-codierenden DNA-Sequenzen (Ahuja et al., 1999) oder sogar die Verwendung von IL-10 defizienten APC (Igiertseme et al., 2000) zur Auslösung einer T_{HI} -Immunantwort.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Wirkung von IS-Plasmid-DNA auf humane MODC eröffnet hier einen alternativen Weg: Unreife humane MODC (d.h. jene Zellen, auf die sich der überwiegende Teil der DC-Immuntherapiekonzepte stützt) könnten ohne weitere Zytokingaben mit IS-Plasmid-DNA ausgereift werden und würden gleichzeitig (ohne zusätzliche Manipulationen) die gewünschte zytotoxische Immunantwort generieren. Zur Ausreifung der Zellen würden Plasmide mit multiplen starken IS-Sequenzen oder nur die jeweiligen IS-Sequenzen alleine Anwendung finden. Bei einer Transfektion/Transduktion der MODC mit DNA-kodierten Tumorantigenen könnte sich die Möglichkeit bieten, eine starke zytotoxische Antwort auszulösen, indem ein (eventuell speziell konstruierter) Vektor mit starken IS-Sequenzen gewählt wird. Weitere Forschungsbemühungen würden hier die Frage nach den am besten geeigneten IS-Sequenzen für humane *in vivo* Therapien klären.

Bei Schutzimpfungen (i.m., etc.) wird nicht mehr nur mit dem Einsatz von Impfstoffen auf DNA-Basis experimentiert, sondern auch die Verwendung von DC bei DNA-basierten Vakzinierungen gegen intrazelluläre Erreger (Influenza-Virus: Casares et al., 1997) rückt mehr und mehr ins Blickfeld. Sollte sich dieser Ansatz durchsetzen, böte auch hier der Einsatz von IS-Plasmid-DNA offensichtliche Vorteile.

Sowohl die Tumorbekämpfung als auch die Abwehr von intrazellulären Erregern erfordert eine starke antigenspezifische T_{HI} -Immunantwort. Obwohl der Beweis der Wirksamkeit einer

Immuntherapie mit IS-Plasmid-DNA ausgereiften MODC *in vivo* noch aussteht (da die Genehmigung einer Gentherapie Voraussetzung ist), sprechen die in dieser Arbeit vorgelegten *in vitro* Ergebnisse für den Einsatz von Plasmid-DNA zur Ausreifung von MODC. Dies wäre eine elegante Methode, da Plasmid-DNA durch eine Ausreifung der MODC sowohl deren T-Zell-stimulatorische Potenz erhöhen als auch die Induktion der gewünschten T_{HI}-Immunantwort ermöglichen könnte. Die IS-Plasmid-DNA vermittelte MODC-Ausreifung und Aktivierung scheint damit zukünftig eine weitere Verbesserung der *in vivo* Immuntherapien gegen Tumoren und wichtige Infektionskrankheiten zu versprechen.

5 Zusammenfassung

Dirk-Thomas Schattenberg

Wirkung immunstimulierender DNA auf humane dendritische Zellen - Neue Wege zur Auslösung und Modulation einer Immunantwort

Zielsetzung: Aktivierte dendritische Zellen (DC) nehmen eine Schlüsselstellung in der Auslösung einer Immunantwort ein und stellen daher ein vielversprechendes Medium für Immuntherapien beim Menschen dar. Für DC-basierte klinische Immuntherapien sollte ein optimiertes Protokoll zur Isolierung, Antigenbeladung und Ausreifung humaner DC, die aus Monozyten kultiviert wurden (MODC), erarbeitet werden. Mit dem Einsatz von immunstimulierender DNA (IS-DNA) zur MODC-Ausreifung wurde versucht, neue Wege für zukünftige Immuntherapien aufzuzeigen und die selektive Beeinflussung der T_{H1}/T_{H2} -Polarisierung einer Immunantwort zu ermöglichen. Abschließend soll in einer Fallstudie die praktische Anwendung einer MODC-basierten Immuntherapie gezeigt werden: erstmalig wird die Behandlung eines endokrinen Karzinoms (Nebenschilddrüsen-(NSD)-Karzinom) durch eine MODC-basierte Therapie beschrieben.

Methoden: Unreife MODC wurden durch Zugabe von Granulozyten/Makrophagen-stimulierendem-Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) aus Monozyten des peripheren Blutes kultiviert. Der Effekt der Ausreifungsstimuli Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und IS-DNA konnte mit durchflußzytometrischen Messungen sowie durch Bestimmung von Zytokinsekretion und T-Zell-stimulatorischer Potenz der MODC überprüft werden. Dabei wurde die T_{H1} / T_{H2} -Balance einer gegen Tetanustoxoid ausgelösten Immunreaktion analysiert.

Fallstudie: Für die Immuntherapie des NSD-Karzinoms wurden über den Zeitraum von einem Jahr 15 subkutane & intralymphatische Injektionen u.a. mit Tumorlysate(TL)-beladenen, TNF- α ausgereiften MODC durchgeführt.

Ergebnisse: Es wurde ein Protokoll entwickelt, durch das große Mengen an MODC ($5 - 10 \times 10^6$ MODC / 100 ml Blut) bei einer hohen Reinheit der Präparationen (70 - 95% $CD1a^+$ MODC) isoliert werden konnten.

Humane MODC ließen sich durch immunstimulierende Plasmid-DNA (IS-PL), nicht jedoch mit immunstimulierenden Oligodesoxynukleotiden (IS-ODN), aktivieren und ausreifen. IS-PL- und TNF- α -ausgereifte MODC besaßen eine vergleichbar hohe Kapazität zur T-Zell-Stimulation. Aber nur IS-PL-aktivierte MODC sezernierten große Mengen Interleukin-6 und Interleukin-12. T-Zellen, die von IS-PL-ausgereiften Tetanustoxoid-beladenen MODC stimuliert wurden, waren signifikant häufiger Interferon- γ positiv ($25,2 \pm 2,7\%$) als nach Stimulation mit TNF- α ($15,4 \pm 1,4\%$), was eine starke Aktivierung von T_{H1} -Lymphozyten belegt.

Fallstudie: Bereits nach 6 Vakzinierungen mit MODC ließ sich eine TL-spezifische Immunantwort *in vitro* und *in vivo* zeigen, jedoch konnte eine Tumorprogression nicht verhindert werden.

Schlussfolgerungen: Die Möglichkeit, humane MODC mit GM-CSF und IL-4 in großer Menge aus venösem Blut zu generieren, erlaubt den therapeutischen Einsatz von MODC mit ihren vielfältigen Fähigkeiten. Die vorliegende Arbeit bietet zu diesem Zweck ein Protokoll an, das auf die Isolierung von MODC für den Einsatz in DC-basierten Immuntherapien zugeschnitten wurde. Die vorgestellte Fallstudie konnte mit der *in vivo* Behandlung eines Nebenschilddrüsen(NSD)-Karzinoms mit Tumorlysate(TL)-beladenen MODC die Effektivität einer Immuntherapie erstmals auch bei endokrinen Tumoren demonstrieren, indem starke Tumor-spezifische Immunreaktionen *in vitro* und *in vivo* induziert wurden.

Sowohl die Tumorbekämpfung als auch die Abwehr von intrazellulären Erregern erfordert eine starke antigenspezifische T_{H1} -Immunantwort. Die in dieser Arbeit vorgelegten *in vitro* Ergebnisse sprechen für den Einsatz von Plasmid-DNA zur Ausreifung von MODC bei Immuntherapien. Dies wäre eine elegante Methode, da Plasmid-DNA durch eine Ausreifung der MODC sowohl deren T-Zell-stimulatorische Potenz erhöhen als auch die Induktion der gewünschten T_{H1} -Immunantwort ermöglichen könnte. Die IS-Plasmid-DNA vermittelte MODC-Ausreifung und Aktivierung scheint damit zukünftig eine weitere Verbesserung der *in vivo* Immuntherapien gegen Tumoren und wichtige Infektionskrankheiten zu versprechen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas AK**, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793
- Adema GJ**, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997; 387: 713-717
- Ahuja SS**, Reddick RL, Sato N, Montalbo E, KostECKI V, Zhao W, Dolan MJ, Melby PC, Ahuja SK. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J Immunol* 1999; 163: 3890-3897
- Akira S**, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54: 1-78
- Albert ML**, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-89
- Alijagic S**, Möller P, Artuc M, Jurgovsky K, Czarnetzki BM, Schadendorf D. Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3100-3107
- Alters SE**, Gadea JR, Holm B, Lebkowski J, Philip R. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J Immunother* 1999; 22: 229-236
- Alters SE**, Gadea JR, Philip R. Immunotherapy of cancer. Generation of CEA specific CTL using CEA peptide pulsed dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 519-524
- Ardavin C**, Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 1993; 362: 761-763
- Ashley DM**, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1177-1182
- Ballas ZK**, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 1840-1845
- Banchereau J**, Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- Baxevanis CN**, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 2000; 164: 3902-3912
- Bender A**, Bui LK, Feldman MA, Larsson M, Bhardwaj N. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J Exp Med* 1995; 182: 1663-1671

- Bennett SR**, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393: 478-480
- Bradwell AR**, Harvey TC. Control of hypercalcaemia of parathyroid carcinoma by immunisation. *Lancet* 1999; 353: 370-373
- Brocker T**. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1223-1232
- Bukowski RM**, Sheeler L, Cunningham J, Esselstyn C. Successful combination chemotherapy for metastatic parathyroid carcinoma. *Arch Intern Med* 1984; 144: 399-400
- Calandra DB**, Chejfec G, Foy BK, Lawrence AM, Paloyan E. Parathyroid carcinoma: biochemical and pathologic response to DTIC. *Surgery* 1984; 96: 1132-1137
- Casares S**, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* 1997; 186: 1481-1486
- Caux C**, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997; 90: 1458-1470
- Caux C**, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, Banchereau J. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994; 180: 1841-1847
- Cella M**, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782-787
- Cella M**, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999; 189: 821-829
- Cella M**, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997a; 9: 10-16
- Cella M**, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-752
- Chapoval AI**, Tamada K, Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 2346-2351
- Chaux P**, Favre N, Bonnotte B, Moutet M, Martin M, Martin F. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression. A role in the immune tolerance to antigenic tumors. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 525-528
- Chu RS**, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodesoxynucleotide act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997; 186: 1623-1631

- Cowdery JS**, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996; 156: 4570-4575
- D'Andrea A**, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, Chizzonite R, Wolf SF, Trinchieri G. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1992; 176: 1387-1398
- Demangel C**, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 318-324
- Di Nicola M**, Siena S, Bregni M, Longoni P, Magni M, Milanese M, Matteucci P, Mortarini R, Anichini A, Parmiani G, Drexler I, Erfle V, Sutter G, Gianni AM. Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther* 1998; 5: 350-356
- Eggert AA**, Schreurs MW, Boerman OC, Oyen WJ, de Boer AJ, Punt CJ, Figdor CG, Adema GJ. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res* 1999; 59: 3340-3345
- Esche C**, Lokshin A, Shurin GV, Gastman BR, Rabinowich H, Watkins SC, Lotze MT, Shurin MR. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J Leukocyte Biol* 1999; 66: 336-344
- Fields RC**, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9482-9487
- Gabrilovich DI**, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 483-490
- Gately MK**, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, Familletti PC, Sinigaglia F, Chizzonite R, Gubler U, Stern AS. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol* 1991; 147: 127-142
- Gillessen S**, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, Presky DH, Stern AS, Gately MK. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: A potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 1995; 25: 200-206
- Gong J**, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, Kufe D. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2715-2718
- Grouard G**, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185: 1101-1111
- Guerder S**, Matzinger P. A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 1992; 176: 553-564

- Häcker H**, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; 17: 6230-6240
- Halpern MD**, Kurlander RJ, Pisetsky DS. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* 1996; 167: 72-78
- Hartmann G**, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther* 1999; 6: 893-903
- Hartmann G**, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999a; 96: 9305-9310
- Heemels MT**, Ploegh H. Generation, translocation and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Ann Rev Biochemistry* 1995; 64: 463-491
- Heinzel FP**, Rerko DM, Ling P, Hakimi J, Schoenhaut DS. Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. *Infect Immun* 1994; 62: 4244-4249
- Hinkel A**, Tso CL, Gitlitz BJ, Neagos N, Schmid I, Paik SH, deKernion J, Figlin R, Belldegrun A. Immunomodulatory dendritic cells generated from nonfractionated bulk peripheral blood mononuclear cell cultures induce growth of cytotoxic T cells against renal cell carcinoma. *J Immunother* 2000; 23: 83-93
- Holti L**, Rieser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H, Radmayr C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J Urology* 1999; 161: 777-782
- Hsieh CS**, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD 4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-549
- 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
- Igietseme JU**, Ananaba GA, Bolier J, Bowers S, Moore T, Belay T, Eko FO, Lyn D, Black CM. Suppression of endogenous IL-10 gene expression in dendritic cells enhances antigen presentation for specific Th1 induction: potential for cellular vaccine development. *J Immunol* 2000; 164: 4212-4219
- Inaba K**, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993; 178: 479-488
- Inaba K**, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176: 1693-1702

- Inaba K**, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997; 186: 665-672
- Inaba K**, Witmer PM, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994; 180: 1849-1860
- Jakob T**, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998; 161: 3042-3049
- Kiertscher SM**, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 1269-1276
- Klinman DM**, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2879-2883
- Kobayashi M**, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 827-845
- Koch F**, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996; 184: 741-746
- Krieg A**, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-549
- Kusakabe K**, Xin KQ, Katoh H, Sumino K, Hagiwara E, Kawamoto S, Okuda K, Miyagi Y, Aoki I, Nishioka K, Klinman D, Okuda K. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. *J Immunol* 2000; 164: 3102-3111
- Lanzavecchia A**. Immunology. Licence to kill. *Nature* 1998; 393: 413-414
- Leitner WW**, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 1999; 18: 765-777
- Lim SH**, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 1999; 83: 215-222
- Ling P**, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Pan YCE, Hakimi J. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biological activity. *J Immunol* 1995; 154: 116-127

- Lipfort GB**, Sparwasser T, Bauer M, Zimmermann S, Koch ES, Heeg K, Wagner H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3420-3426
- Lodge PA**, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res* 2000; 60: 829-833
- Ludewig B**, Ochsenbein AF, Odermatt B, Paulin D, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 2000; 191: 795-804
- Mackensen A**, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immun* 2000a; 49: 152-156
- Mackensen A**, Herbst B, Chen JL, Kohler G, Noppen C, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V, Lindemann A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 2000; 86: 385-392
- Manetti R**, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1199-1204
- Messina JP**, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; 147: 1759-1764
- Morse MA**, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999a; 59: 56-58
- Morse MA**, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME, Lysterly HK. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 1999b; 5: 1331-1338
- Mosmann TR**, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357
- Mulders P**, Tso CL, Gitlitz B, Kaboo R, Hinkel A, Frand S, Kiertscher S, Roth MD, deKernion J, Figlin R, Beldegrun A. Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 445-454
- Murphy EE**, Terres G, Macatonia SE, Hsieh CS, Mattson J, Lanier L, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy K, O'Garra A. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon γ

- production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* 1994; 180: 223-231
- Murphy GP**, Tjoa BA, Simmons SJ, Rogers MK, Kenny GM, Jarisch J. Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate* 2000; 43: 59-62
- Nair SK**, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lysterly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* 1999; 82: 121-124
- Nestle FO**, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-332
- Nestle FO**, Filgueira L, Nickoloff BJ, Burg G. Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J Invest Dermatology* 1998; 110: 762-766
- Nijman HW**, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Oorschot VM, Vierboom MP, van de Keur M, Kenemans P, Kast WM, Geuze HJ, Melief CJ. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 1995; 182: 163-174
- Nishioka Y**, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res* 1999; 59: 4035-4041
- Philip R**, Alters SE, Brunette E, Ashton J, Gadea J, Yau J, Lebkowski J, Philip M. Dendritic cells loaded with MART-1 peptide or infected with adenoviral construct are functionally equivalent in the induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with melanoma. *J Immunother* 2000; 23: 168-176
- Pierre P**, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, Mellman I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 787-792
- Pisetsky DS**. Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity* 1996; 5: 303-310
- Prud'homme GJ**, Piccirillo CA. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2000; 14: 23-42
- Reddy A**, Sapp M, Feldmann M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997; 90: 3640-3646
- Reis e Sousa C**, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 392-399
- Reis e Sousa C**, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp*

Med 1993; 178: 509-519

- Ridge JP**, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393: 474-478
- Rieser C**, Ramoner R, Holtl L, Rogatsch H, Papesh C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M. Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Int* 2000; 63: 151-159
- Roman M**, Martin OE, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 1997; 3: 849-854
- Romani N**, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93
- Romani N**, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kaempgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Meth* 1996; 196: 137-151
- Russo V**, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, Bordignon C, Traversari C. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2185-2190
- Rykova EY**, Laktionov PP, Vlassov VV. Activation of spleen lymphocytes by plasmid DNA. *Vaccine* 1999; 17: 1193-1200
- Sallusto F**, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389-400
- Sallusto F**, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118
- Santin AD**, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, Parham GP, Cannon MJ. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J Virol* 1999; 73: 5402-5410
- Santin AD**. Lymph node metastases: the importance of the microenvironment. *Cancer* 2000; 88: 175-179
- Sato M**, Iwakabe K, Kimura S, Nishimura T. Functional skewing of bone marrow-derived dendritic cells by Th1- or Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 1999; 67: 63-68

- Sato Y**, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 1996; 273: 352-354
- Sauter B**, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191: 423-434
- Schoenberger SP**, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393: 480-483
- Schott M**, Feldkamp J, Lettmann M, Simon D, Scherbaum WA, Seissler J. Dendritic cell immunotherapy in a neuroendocrine pancreas carcinoma. *Clin Endocrinol* 2001a; 55: 271-277
- Schott M**, Scherbaum WA, Feldkamp J. Drug therapy of endocrine neoplasms. Part I: Thyroid neoplasms, adrenal neoplasms and parathyroid neoplasms. *Med Klin* 2000; 95: 20-25
- Schott M**, Seissler J, Feldkamp J, von Schilling C, Scherbaum WA. Dendritic cell immunotherapy induces antitumour response in parathyroid carcinoma and neuroendocrine pancreas carcinoma. *Horm Metab Res* 1999; 31: 662-664
- Schott M**, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum WA, Feldkamp J. Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. *J Clin Endocr Metab* 2001; 86: 4965-4969
- Schreurs MW**, Eggert AA, de Boer AJ, Figdor CG, Adema GJ. Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2835-2841
- Shane E**, Bilezikian JP. Parathyroid carcinoma: a review of 62 patients. *Endocr Rev* 1982; 3: 218-226
- Shortman K**, Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* 1997; 15: 409-419
- Sparwasser T**, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2045-2054
- Specht JM**, Wang G, Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, Rosenberg SA, Hwu P. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med* 1997; 186: 1213-1221
- Stacey KJ**, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 2116-2122
- Steinman RM**, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-1162
- Steinman RM**. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-296

- Stern AS**, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YCE, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, Gately MK. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990; 87: 6808-6812
- Suss G**, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183: 1789-1796
- Tedder TF**, Engel P. New CD from the B cell section of the Fifth International Workshop on human leukocyte differentiation antigens. *Leukemia and Lymphoma* 1994; 13 (Suppl. 1): 61-64
- Turner B**, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669-1678
- Thurnher M**, Papesh C, Ramoner R, et al. In vitro generation of CD 83⁺ human blood dendritic cells for active tumor immunotherapy. *Exp Hematology* 1997; 25: 232-237
- Tjoa BA**, Simmons SJ, Bowes VA, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Cobb OE, Ireton RC, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL, Murphy GP. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 1998; 36: 39-44
- Trinchieri G**, Scott P. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol Today* 1994; 15: 460-463
- Tuting T**, Wilson CC, Martin DM, Baar J, DeLeo A, Lotze MT, Storkus WJ. DNA vaccines targeting dendritic cells for the immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 295-304
- Wan Y**, Emtage P, Zhu Q, Foley R, Pilon A, Roberts B, Gaudie J. Enhanced immune response to the melanoma antigen gp100 using recombinant adenovirus-transduced dendritic cells. *Cell Immunol* 1999; 198: 131-138
- Weiner GJ**, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10833-10837
- Yamamoto S**, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79: 866-873
- Yamamoto S**, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microl Immunol* 1992; 36: 983-997
- Yamamoto T**, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 775-779

- Yang S**, Vervaert CE, Burch Jr J, Grichnik J, Seigler HF, Darrow TL. Murine dendritic cells transfected with human GP100 elicit both antigen-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity. *Int J Cancer* 1999; 83: 532-540
- Yi AK**, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1996; 156: 558-564
- Ying H**, Zaks TZ, Wang RF, Irvine KR, Kammula US, Marincola FM, Leitner WW, Restifo NP. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat Med* 1999; 5: 823-827
- Young JW**, Steinman RM. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med* 1990; 171: 1315-1332
- Zeller JC**, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Ruscetti FW, Narula S, Roncarolo MG, Blazar BR. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 1999; 163: 3684-3691
- Zhou LJ**, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD 83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154: 3821-3835

7 Anhang

7.1 Übersicht ausgewählter humaner CD-Antigene

CD-Antigen	Alternative Bezeichnungen	MW (kDa)	Expression	Funktion
CD 1a	T 6	49	DC, Thymozyten, Langerhans-Zellen	Möglicherweise Antigenpräsentation für T-Zellen über den „nicht-klassischen“ Weg
CD 1b	-	45	DC, Thymozyten	Lipidantigen-präsentierendes Molekül
CD 1c	-	43	DC, Thymozyten, Langerhans-Zellen	Lipidantigen-präsentierendes Molekül (vermutet)
CD 3	T3-Antigen, CD 3-Komplex	16-28	T-Zellen, Thymozyten	Signaltransduktion, Assoziation mit dem T-Zell-Rezeptor
CD 4	T4-Antigen	59	T-Zellen, Thymozyten, Monozyten (Subpopulation)	HLA II-Korezeptor, Antigenpräsentation, HIV-Rezeptor
CD 8	T8-Antigen	32	T-Zellen, Thymozyten, Natürliche Killerzellen (Sub)	HLA I-Korezeptor, Antigenpräsentation
CD 14	LPS-LBP-Rezeptor	55	Monozyten, Granulozyten, Makrophagen	Rezeptor für LPS/LBP-Komplex (LPS/LPS-bindendes-Protein)
CD 19	B4-Antigen	95	B-Zellen	B-Zell-Proliferation, Signaltransduktion mit CD 21, CD 81
CD 28	Tp 44	44	T-Zellen (Subpopulation), aktivierte B-Zellen	T-Zell-Aktivierung, Ligand für CD 80/CD 86, Signaltransduktion
CD 34	My 10	105-120	Hämatopoetische Progenitorzellen	Ligand für L-Selektin
CD 40	-	44-48	DC, Makrophagen, B-Zellen	Bindet CD 40-L, Rezeptor für co-stimulat. Signale bei B-Zellen, Zytokinproduktion bei Makrophagen und DC
CD 40-L	T-BAM	39	Aktivierte CD 4 ⁺ T-Zellen	Ligand für CD 40
CD 54	ICAM-1	90	weitverbreitet	Interzelluläres Adhäsionsmolekül, Ligand für LFA-1 (CD 11a/CD18) und CR3 (CD 11b/CD18)
CD 80	B 7-1, BB-1	60	Antigenpräsentierende Zellen (aktivierte B-Zellen, Monozyten, DC)	Costimulatorisches Molekül der T-Zell-Aktivierung, Ligand für CD 28 und CD 152
CD 83	HB 15	45	Langerhans-Zellen, DC	unbekannt, dient als Marker für ausgereifte DC
CD 86	B 7-2	75	Antigenpräsentierende Zellen (aktivierte B-Zellen, Monozyten, DC)	Costimulatorisches Molekül der T-Zell-Aktivierung, Ligand für CD 28 und CD 152
CD 152	Cytotox. Lymphoz. Antigen 4 (CTLA-4)	44	Aktivierte T-Zellen	Rezeptor für CD 80 und CD 86, Regulation der T-Zell-Aktivierung

Quelle: Stockinger H, Majdic O, Knapp W. The CD system of leukocyte surface molecules. *Current Protocols in Immunology* 2000; A.4A.1-A.4A.39

7.2 Deklaration von Helsinki

Der Weltärztebund, Deklaration von Helsinki (1964)
Empfehlungen für Ärzte, die in der biomedizinischen Forschung am Menschen tätig sind
Auszüge aus der geänderten Form von 1996

Aufgabe des Arztes ist die Erhaltung der Gesundheit des Menschen. Der Erfüllung dieser Aufgabe dient er mit seinem Wissen und Gewissen.

Ziel der biomedizinischen Forschung am Menschen muß es sein, diagnostische, therapeutische und prophylaktische Verfahren sowie das Verständnis für die Ätiologie und Pathogenese der Krankheit zu verbessern.

Medizinischer Fortschritt beruht auf Forschung, die sich letztlich auch auf Versuche am Menschen stützen muß.

Biomedizinische Forschung am Menschen muß den allgemein anerkannten wissenschaftlichen Grundsätzen entsprechen; sie sollte auf ausreichenden Laboratoriums- und Tierversuchen sowie einer umfassenden Kenntnis der wissenschaftlichen Literatur aufbauen.

Die Planung und Durchführung eines jeden Versuches am Menschen sollte eindeutig in einem Versuchsprotokoll niedergelegt werden, welches einem besonders berufenen, vom Forschungsteam und Sponsor unabhängigen Ausschuß zur Beratung, Stellungnahme und Orientierung vorgelegt werden sollte.

Biomedizinische Forschung am Menschen ist nur zulässig, wenn die Bedeutung des Versuchszieles in einem angemessenen Verhältnis zum Risiko für die Versuchsperson steht.

Jedem biomedizinischen Forschungsvorhaben am Menschen sollte eine sorgfältige Abschätzung der voraussagbaren Risiken im Vergleich zu dem voraussichtlichen Nutzen für die Versuchsperson oder andere vorausgehen. Die Sorge um die Belange der Versuchsperson muß stets ausschlaggebend sein im Vergleich zu den Interessen der Wissenschaft und Gesellschaft.

Das Recht der Versuchsperson auf Wahrung ihrer Unversehrtheit muß stets geachtet werden. Es sollte alles getan werden, um die Privatsphäre der Versuchsperson zu wahren; die Wirkung auf die körperliche und geistige Unversehrtheit sowie die Persönlichkeit der Versuchsperson sollte so gering wie möglich gehalten werden.

Der Arzt sollte es unterlassen, bei Versuchen am Menschen tätig zu werden, wenn er nicht überzeugt ist, daß das mit dem Versuch verbundene Wagnis für vorhersagbar gehalten wird. Der Arzt sollte jeden Versuch abbrechen, sobald sich herausstellt, daß das Wagnis den möglichen Nutzen übersteigt.

Bei jedem Versuch am Menschen muß jede Versuchsperson ausreichend über Absicht, Durchführung, erwarteten Nutzen und Risiken des Versuches sowie über möglicherweise damit verbundene Störungen des Wohlbefindens unterrichtet werden. Die Versuchsperson sollte darauf hingewiesen werden, daß es ihr freisteht, die Teilnahme am Versuch zu verweigern und daß sie jederzeit eine einmal gegebene Zustimmung widerrufen kann. Nach dieser Aufklärung sollte der Arzt die freiwillige Zustimmung der Versuchsperson einholen; die Erklärung sollte vorzugsweise schriftlich erfolgen.

Bei der Behandlung eines Kranken muß der Arzt die Freiheit haben, neue diagnostische und therapeutische Maßnahmen anzuwenden, wenn sie nach seinem eigenen Urteil die Hoffnung bieten, das Leben des Patienten zu retten, seine Gesundheit wiederherzustellen oder sein Leiden zu lindern.

Die Weigerung eines Patienten, an einem Versuch teilzunehmen, darf niemals die Beziehung zwischen Arzt und Patient beeinträchtigen.

7.3 Danksagungen

Für die umfassende wissenschaftliche Betreuung sowie viele interessante Anregungen und Diskussionen möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. med. Matthias Schott, Priv.-Doz. Dr. med. Jochen Seissler und Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Feldkamp bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Scherbaum danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf.

Für die intensive Unterstützung, kritische Diskussionen und die Begleitung bei der Durchführung der Experimente gilt mein Dank Herrn stud. med. Thilo Krüger, Herrn Dipl.-Biol. Gerald Reindl, Herrn Dr. rer. nat. Günter Päth, Herrn Dipl.-Biochem. Holger Steinbrenner und Frau Dr. rer. nat. Barbara Schwippert.

Durch ihren persönlichen Einsatz und ihre Hilfsbereitschaft während meiner experimentellen Arbeiten am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut und der Klinik für Endokrinologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bin ich Frau Dipl.-Biol. Petra Ebner, Herrn Vladimir Fouxon, Frau Melanie Lettmann, Frau Mojdeh Rassouli, Frau Barbara Schmitz, Frau Dipl.-Biol. Christiane von Schilling, Frau Ilka Schumacher, Frau Dipl.-Biol. Sandra Wagner, Frau Ulrike Wohlrab und Frau Cordula Wünsche zu Dank verpflichtet.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich sowohl für die Förderung meines Medizinstudiums als auch meiner Promotion.

Ganz besonders jedoch danke ich meinen Eltern, ohne deren stets gewährte Unterstützung mir das Studium der Medizin und die Anfertigung der vorliegenden Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Dirk-Thomas Schattenberg	Geburtsdatum:	5. Mai 1975
Anschrift:	Otto-Hahn-Str. 110 40591 Düsseldorf Tel.: 0211 – 7590568 E-mail: schatted@uni-duesseldorf.de	Geburtsort:	Bonn
		Familienstand:	ledig
		Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung, Wehrdienst:

1981 – 1985	Grundschule Wülfrath-Ellenbeek
1985 – 1991	Städtisches Gymnasium Wülfrath
1991 – 1992	Mason City High School, Mason City, Iowa, U.S.A. (Abschluß: Graduation)
1992 – 1994	Städtisches Gymnasium Wülfrath (Abschluß: Abitur)
1994 – 1995	Grundwehrdienst (Sanitäter im 1./FüUstgRgt 30, Düsseldorf)

Studium:

1995 – 2002	Studium der Humanmedizin (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) 1997 Ärztliche Vorprüfung 1998 1. Staatsexamen 2001 2. Staatsexamen 2002 3. Staatsexamen
1995 – 2002	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
2000 – 2002	Studium der Betriebswirtschaftslehre (Fernuniversität Hagen)

Berufserfahrung:

2001 – 2002	Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Chirurgie, Innere Medizin, Pädiatrie)
-------------	---

7.5 Publikationen

Schattenberg D, Schott M, Reindl G, Krueger T, Tschoepe D, Feldkamp J, Scherbaum WA, Seissler J. Response of human monocyte-derived dendritic cells to immunostimulatory DNA. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2824-2831

Schott M, Feldkamp J, **Schattenberg D**, Krueger T, Dotzenrath C, Seissler J, Scherbaum WA. Induction of cellular immunity in a parathyroid carcinoma treated with tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 300-306

Schott M, Feldkamp J, **Schattenberg D**, Seissler J, Scherbaum WA. Dendritic cell immunotherapy in disseminated parathyroid carcinoma. *Lancet* 1999; 353: 1188-1189