

2 Material und Methoden

2.1 Reagentien und Lösungen

Folgenden Lösungen wurden von Biochrom (Berlin) bezogen: Ficoll-Lösung, Trypsin (2,5% {w/v}) in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS. Dulbecco's PBS (Phospat Buffered Saline) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ wurde von Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen. Paraformaldehydlösung (PFA), Natriumazid, Bromphenolblau, Ethanol wurden von Merck (Darmstadt) geliefert.

Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1), Ethidiumbromid, Agarose, Dimethylsulfoxid (DMSO), β -Mercaptoethanol, DNase I (RNase frei), Lipofektin-Reagenz, stammten von Boehringer (Mannheim). Von Sigma (Deisenhofen) wurden folgende Reagentien bezogen: Penicillin G, Chloramphenicol, NP 40, L-Tyrosin, Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), 2,5% DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2.]octan).

RNeasy Total RNA Kit, QIAshredder (Homogenizer) stammen von Qiagen (Hilden).

[3, 5] ^3H -Tyrosin, 50 Ci/mmol, ^{14}C -Tyrosin, 50 Ci/mmol und ^3H -Thymidin, 5 Ci/mmol stammten vom Amersham (Braunschweig).

Charcoal (Norit SG activated charcoal) wurde von Aldrich (Bad Homburg), Trypanblau (0,5% [w/v]) von Seromed, ^3H -Acetyl CoA von Dupont-NEN (Dreieich) und Mitomycin C (2 mg/ml) von Medac, Hamburg bezogen.

Interleukin-4 (IL-4) ($5 \cdot 10^6$ U/mg) wurde freundlicherweise von Dr. Peters (Schering-Plough, Nutley, NJ) zur Verfügung gestellt, bzw. bei Pharmingen (San Diego, USA) gekauft. Granulozyten-Makrophagen-kolonienstimulierender Faktor (GM-CSF) ($3,1 \cdot 10^6$ U/mg) wurde freundlicherweise von Dr. U. Haus (Novartis, Nürnberg) zur Verfügung gestellt. IL-2 ($3 \cdot 10^6$ U/mg) stammte von Eurocetus (Ratingen), Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) ($4,55 \cdot 10^6$ U/mg) wurde von Genzyme, Vitrotech (Rüsselsheim) bezogen.

2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen (Karl Bleymehl Reinraumtechnik). Die Zellen wurden bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit unter Kohlendioxid-Begasung (5%) kultiviert (Heraeus Sepatech, Berlin). Die Kultur sämtli-

cher Zellen erfolgte soweit nicht anders angegeben in RPMI 1640 Medium (Gibco BRL) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) sowie 2 mM L-Glutamin und Antibiotika (100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin). Alle diese Zusätze wurden von Biochrom KG (Berlin) bezogen. Die Kultur der T-Zellen erfolgte in AIMV Medium (Gibco BRL) unter Zusatz von 5% humanem AB-Serum (Sigma, Deisenhofen). Für die Transfektionsversuche wurde Serum-freies Opti-MEM, Medium (Gibco BRL, Karlsruhe) verwendet.

2.3 Zelllinien

Die für die Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendete humane Melanomzelllinie UKRV-MEL-15 wurde an der Hautklinik, Virchow Klinikum der Charité etabliert. Die SK-MEL-29 Zelllinie wurde von Dr. L. J. Old (Ludwig Institute for Cancer Research, New York) zur Verfügung gestellt. Die humane Zervixkarzinomzelllinie HT3 wurde von (Rockville, MD, USA) geliefert. Der zytotoxische T-Zellklon (CTL) IVSB wurde von Dr. T. Wölfel (Wölfel et al., 1994; 1993) zur Verfügung gestellt. Die humane T2-Zelllinie (T- und B-Zell-Hybrid) stammte von Dr. Hanski (BFUK, Berlin).

2.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung humaner Monozyten und Lymphozyten wurde heparinisiertes Vollblut gesunder Spender bzw. Blutzellkonzentrate (Buffy coats) verwendet. Diese wurden von der Blutbank des Virchow Klinikums der Charité zur Verfügung gestellt.

Die Isolierung von Leukozyten aus peripherem Blut erfolgte nach Romani et al. (1994). Durch Dichtegradientenzentrifugation lassen sich Gemische mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC) mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten (Dichte: 1,077 g/ml) auftrennen.

Heparinisiertes Blut (Liquemin N 25.000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) wurde zuerst 1:1 mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS verdünnt und vorsichtig über die Ficoll-Lösung geschichtet. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation, 1800 U/min bei Raumtemperatur, wurde die Schicht mit den mononukleären Zellen mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in PBS aufgenommen und danach bei 1600 U/min und einer Temperatur von 10 °C für 10 min zentrifugiert. Ein zweiter Waschschritt erfolgte bei 900 U/min für 10 min. Anschließend wurde das Zellpellet in RPMI 1640 Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. 20 ml die-

ser Zellsuspension wurden jeweils auf eine Gewebekulturplatte (Costar, Cambridge, MA) aufgetragen. Aus den nicht-adhärennten Zellen lassen sich T-Lymphozyten isolieren. Die adhärennten Monozyten wurden zur Gewinnung dendritischer Zellen weiter kultiviert.

Zum Teil wurden die gewonnenen Zellen eingefroren. Zum Einfrieren wurden jeweils 10^7 Zellen in 900 μ l FCS (10%) und 100 μ l DMSO (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert. Das DMSO dient dabei als Frostschutz, um ein Platzen der Zellen beim Einfrieren zu verhindern. Um eine Abkühlungsrate von 1 °C/min zu erreichen, wurden die Einfrierröhrchen in einem NALGENE Cryo 1 °C Freezing Container bei -70 °C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

2.5 Gewinnung dendritischer Zellen aus Monozyten

Die Kultur von Monozyten zur Gewinnung dendritischer Zellen basierte auf einer Standardmethode (Romani et al., 1994). Die adhärennten Monozyten wurden, unter Zusatz von GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml), in frischem RPMI Medium (10% FCS) gehalten. Unter diesen Bedingungen lösen sich die Zellen vom Boden der Platte und werden darauf in Suspensionskultur weiter kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Hierzu wurden 10 ml des Kulturmediums von den Gewebekulturplatten abgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium mit Zytokinen (800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4) aufgenommen und wieder auf die Gewebekulturplatte gegeben. Die Zellen wurden in der Regel nach 7 Tagen geerntet und für weitere Untersuchungen eingesetzt. Um die morphologischen Änderungen der Zellen zu verfolgen, wurde ein Teil dieser Zellen bis zum 14. Tag unter Zytokinanzusatz (GM-CSF und IL-4) weiter kultiviert.

Um den Einfluß von TNF- α auf den Reifungsprozess von dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (am Tag 1, 7 und 14) Zellen entnommen und 24 Stunden lang mit TNF- α (10 ng/ml) behandelt. Kontrollzellen wurden auf identische Weise, jedoch ohne Zusatz von TNF- α kultiviert. Die auf diese Weise erhaltenen Zellen wurden anschließend weiter untersucht. Ein Teil der Zellen wurde nach 7 Tagen in Kultur für Transfektionsversuche verwendet.

2.6 Einfluß von TNF- α auf dendritische Zellen

Um den Einfluß von TNF- α auf das Ausreifen von dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) zu verschiedenen Zeiten (Tag 1, 7 und

14) mit TNF- α (10 ng/ml) versetzt und für 24 Stunden inkubiert. Die Expression von Zelloberflächenantigenen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Die phänotypische und morphologische Änderung der Zellen wurde außerdem lichtmikroskopisch untersucht und dokumentiert (Contax-Kamera 167 MT).

2.7 Isolierung und Anreicherung von Lymphozyten

Zur Isolierung von T-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden die nicht-adhärente Zellen verwendet. Hierzu dienten zwei unterschiedliche Methoden. Bei der Ersten wurden B-Lymphozyten und T-Lymphozyten mit Hilfe einer mit Nylonwolle gefüllten Säule getrennt. Hierbei binden B-Lymphozyten, die meisten anderen phagozytierenden Zellen sowie alle tote Zellen an der Wolle, wohingegen T-Lymphozyten hindurchwandern. Eine Luer-Spritze wurde mit einem Bausch synthetischer Wolle (0,6 g/Säule) gefüllt. Die Säule wurde zuerst mit Ca²⁺ / Mg²⁺ freiem PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml RPMI-Medium und 10% Humanserum bei 37 °C für 45 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann durch die Säule geleitet. Innerhalb von 45 min war die Trennung von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten abgeschlossen. Hierdurch konnten etwa 50%-80% der Zellen wiedergewonnen werden, wobei eine Reinheit von 95%-98% erzielt wurde.

Alternativ wurden T-Zellen durch eine Negativ-Selektion mit Hilfe von magnetischen Beads isoliert. Dabei wurde die Zellsuspension zuerst mit monoklonalen Antikörpern (Immunotech; Marseille) gegen Zelloberflächenmarker wie HLA-DR, CD11b, CD15 und CD56 (50 μ g/Ansatz) im Überschuß versetzt und für 45 min bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen und einer Zentrifugation (7 min, 1200 U/min) erfolgte der Zusatz von Ziege-anti-Maus-Ig-gekoppelten magnetischen Beads (Immunotech, Marseille). Nach einer erneuten Inkubation für 45 min bei 4 °C erfolgte die Trennung der Zellen mit Hilfe eines Handmagneten (Dynal, Hamburg). Die nicht markierten Zellen sind die T-Lymphozyten. Diese wurden nach zweimaligem Waschen und einer Zentrifugation (7 min, 1200 U/min) in einer kleinen Menge PBS aufgenommen, anschließend mit Fluoresceinthiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelten monoklonale Antikörper gegen T-Zell-spezifische Zelloberflächenantigene markiert und durchflußzytometrisch analysiert.

Um bestimmte Subpopulationen von T-Zellen (CD4⁺ bzw. CD8⁺) zu isolieren, wurde eine Trennung mit Hilfe eines magnetischen Zellsorter-Systems MACS (Myltenyi, Biotec, Bergisch-Gladbach) gemäß Anweisung des Herstellers nach Harbeck et al. (1995), durchgeführt. Die selektive magnetische Markierung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen erfolgte mit Antikörper-MicroBeads (M-450 CD4 bzw. M-450 CD8) ge-

gen den CD4 oder CD8 Rezeptor, der auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten exprimiert wird. Die magnetisch markierten Zellen wurden dann mit Hilfe einer Selektionssäule (MiniMACS, VarioMACS oder SuperMACS) angereichert. Der Markierungs- und Separationsprozeß ließ die Morphologie der Zellen unbeeinflusst, so daß die erhaltenen Zellen anschließend für nachfolgende Untersuchungen verwendet werden konnten. Die auf diese Weise angereicherten Zellen wurden durchflußzytometrisch, analysiert. Durch diese Methode wurde reproduzierbar eine Reinheit der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen von 95%-99 % erzielt.

2.8 T-Zell Kultur

Der in vorliegenden Studie verwendete zytotoxische T-Zell-Klon (CTL) IVS B wurde von Dr. T. Wölfel zur Verfügung gestellt (Wölfel et al., 1994). Dieser CTL-Klon erkennt spezifisch das Tyrosinase-Peptid Ty-2 (YMNGTMSQV), in Verbindung mit dem HLA-A2 Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen, welche Tyrosinase endogen exprimieren.

Um eine Langzeitkultur zu etablieren, wurde der Klon nach der Methode von Wölfel et al. (1994) weiter kultiviert. Dazu wurden auf eine 24-Lochgewebepatte (Greiner, Nürtingen) $2 \cdot 10^5$ bis $3 \cdot 10^5$ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) pro Vertiefung in 1 ml RPMI Medium mit 10% Humanserum ausplattiert. Um eine Proliferation des Klons zu induzieren, wurden autologe SK-Mel 29 Tumorzellen ($5 \cdot 10^4$ Zellen/well) als Stimulatorzellen sowie T2-Zellen ($2 \cdot 10^5$ Zellen/well) als Feederzelle, zugegeben. T2-Zellen stellen Hybride aus menschlichen T-(CEM) und B-(721.174) lymphoblastoiden Zellen dar. Die Zellen exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle, HLA-A2, Bw4, B5 und Bw6 (Salter et al., 1985). Um einer Proliferation der Stimulatorzellen sowie der Feederzellen während des Experiments zu verhindern, wurden diese Zellen vor dem Ausplattieren mit 1 mg/ml Mitomycin C (Medac, Hamburg) für 35 min bei 37 °C behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen intensiv gewaschen, um das Mitomycin vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml RPMI Medium mit 10% Humanserum unter Zusatz von Zytokinen, IL-2 (25 U/ml) und IL-4 (5 U/ml) aufgenommen. Dieses Verfahren wurde wöchentlich bis zur weiteren Verwendung der (CTL) IVS B Zellen wiederholt.

2.9 Peptide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von Biosystem (Weiterstadt) synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Laut Hersteller betrug der Reinheitsgrad etwa 95%. Für den Antigenpräsentations-Assay wurden die Peptide Ty-1:MLLAVLYCL (0,5 mg/ml); Ty-2:YMNGTMSQV (0,5 mg/ml) und CMV-p: FIAGNSAYEYV (0,5 mg/ml) verwendet.

Die aus neun Aminosäuren bestehenden Peptide Ty-1 und Ty-2 leiten sich aus der humanen Tyrosinase ab. Sie wurden ursprünglich in Verbindung mit HLA-A2-Molekülen auf der Zelloberfläche von Melanozyten nachgewiesen (Wölfel et al., 1993; 1994). Das Peptid CMV-p leitet sich vom Zytomegalie-Virus ab und kommt gebunden an HLA-A2 auf der Zelloberfläche virusinfizierter Zellen vor (Parker et al., 1992). Das Tetanus-toxoid TT (550000 U/ml) wurde von Merieux (Marseille) bezogen.

Im Rahmen der Impfversuche wurden folgende weitere Peptide verwendet: Tyrosinase (MLLAVLYCL) (2,0 mg/ml), gp100 (KTWGQYWQF) (5,0 mg/ml), MART-1/Melan-A (AAGIGILTV) (2,5 mg/ml), MAGE-1 (EADPTGHSY) (5,0 mg/ml), MAGE-3 (EVDPIGHLY) (5,0 mg/ml). Das hier verwendete Protein KLH (Keyhole limpet Hemocyanata) stammte von Calbiochem (Bad Soden).

2.10 Lymphozytenstimulationstest

Um eine stimulatorische Wirkung von dendritischen Zellen auf ruhende, vorher nicht aktivierte T-Zellen zu testen, wurde die gemischte Leukozyten Reaktion (mixed leukocyte reaction, MLR) als in vitro Modell verwendet (Weir, 1996). Diese Reaktion beruht auf der Alloreaktivität von T-Zellen, die allele Polymorphismen allogener MHC-Moleküle erkennen, auf diese reagieren und verstärkt proliferieren. Die dendritischen Zellen wurden aus peripheren Blut verschiedener Spender gewonnen und am 7. Tag aus Gewebekulturplatten gesammelt und zentrifugiert (1200 U/min für 7 min). Für das Testsystem wurden T-Lymphozyten wie oben beschrieben isoliert.

Die T-Zellen (PBL) zweier allogener Spender wurden auf einer 96-Lochgewebeplatte ($2 \cdot 10^5$ Zellen/well) ausplattiert. Die dendritischen Zellen wurden in verschiedenen Verhältnissen (1:10, 1:50 oder 1:100) zu den T-Zellen des gleichen oder allogener Spender gegeben. Die auf diese Weise behandelten Zellen wurden fünf Tage lang bei 37 °C inkubiert. 1 µCi/well des tritiummarkierten Thymidins (^3H -Thymidin 5 Ci/mmol, Amersham) wurde 16 Stunden vor der Zellernte dazugegeben. Die Radioaktivität der Zellen wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers (β -Counter Beck-

mann 6000) gemessen. Der Einbau von ^3H -Thymidin in die zelluläre DNA diente zum Nachweis der spezifischen T-Zell-Proliferation.

2.11 Antigenpräsentationstest

Um die Fähigkeit dendritischer Zellen zur Präsentation löslicher Antigene zu testen, wurde eine Methode ähnlich des MLR Tests verwendet. Im Gegensatz zur MLR wurden für den Antigenpräsentationstest ausschließlich dendritische Zellen und T-Zellen eines Spenders verwendet. Die dendritischen Zellen wurden mit löslichen Antigenen wie dem, aus dem Zytomegalie-Viren stammenden CMV-Peptid (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), oder auch mit Tetanus-Toxoid, TT, (1500 IU/ml) beladen. Zum Beladen wurden die Zellen eine Stunde lang mit dem jeweiligen Antigen inkubiert. Danach wurden die nicht gebundenen Antigene durch mehrfaches Waschen entfernt. Die dendritischen Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen (1:10; 1:50 und 1:100) zu den T-Zellen ($2 \cdot 10^5$ Zellen/well) in einer 96-Lochplatte gegeben. Als Kontrolle wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) aus dem Blut des gleichen Spenders auf die gleiche Weise wie die dendritischen Zellen mit CMV und TT beladen und angesetzt. Als weitere Kontrolle diente ein Ansatz ohne vorheriger Behandlung mit Antigen. Die Proliferation der T-Zellen wurde wie beschrieben mit ^3H -Thymidin bestimmt.

2.12 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die phänotypische Charakterisierung von Zellen aufgrund der Expression von bestimmten Proteinen auf der Zelloberfläche, welche mit einer geeigneten Fluoreszenzmarkierung versehen werden. Ein Zellgemisch wird durch eine Kapillare im Durchflußzytometer gedrückt, hierdurch werden feine Tropfen erzeugt, von denen jeder nur eine einzige Zelle enthält. Alle Tropfen passieren einen Laserstrahl. Es kommt sowohl zur Lichtstreuung an den Zellen als auch zu einer Fluoreszenzemission.

Die Intensität des von den Zellen in Vorwärtsrichtung gestreuten Lichtes ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht läßt Rückschlüsse auf die Zelldichte und die Granularität der Zellen zu. Die Fluoreszenz ermöglicht eine Aussage über die Bindung der Fluoreszenzsonde und damit über die Expression bestimmter Oberflächenproteine. Markiert man die Zellen mit einem einzigen Fluoreszenzfarbstoff, werden die Daten üblicherweise als ein Histogramm der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl dargestellt. Bei zwei oder

mehreren Fluoreszenzsonden erscheinen die Daten hingegen als Streudiagramm bzw. als Konturdiagramm, wobei die Fluoreszenzintensität einer Sonde gegen die einer zweiten aufgetragen wird.

2.12.1 Experimentelle Durchführung

Die Expression von Zelloberflächenmolekülen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines Durchflußzytometers der Firma Coulter (Epics XL Flow Cytometer, Coulter Electronics, Krefeld) analysiert. Für die Färbung der zu untersuchenden Moleküle wurden in der Regel von der Maus stammende monoklonale Primärantikörper verwendet, in Verbindung mit grünfluoreszierenden Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder rotfluoreszierenden Phycoerythrin (PE)-konjugierten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörpern.

Jeweils etwa $2 \cdot 10^5$ der zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) eingesetzt und zweimal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen sowie Bindungsstellen für Ig-Rezeptoren wurden durch Inkubation mit humanem AB-Serum blockiert. Die Zellen wurden anschließend mit den entsprechenden Maus-Primärantikörpern ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) für 20 min bei 4°C inkubiert, zum Entfernen nicht gebundener Antikörper zweimal gewaschen und mit einem FITC-konjugierten GAM-(Fab₂)-Fragment (1:20 in PBS) versetzt. Nach Inkubation (20 min bei 4°C) wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in $500 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und am Durchflußzytometer vermessen. Teilweise erfolgte eine direkte Anfärbung der entsprechenden Antigene mit FITC- oder PE-konjugierten Antikörpern. Die aus einer unspezifischen Bindung resultierende Fluoreszenz wurde mittels eines Kontrollantikörpers des gleichen Isotyps bewertet (Negativkontrolle).

Für die Darstellung des zeitabhängigen Differenzierungsverlaufs wurde der prozentuale Anteil an positiven Zellen, d. h. Zellen, die ein bestimmtes Antigen exprimierten, im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt. Sollten Parallelansätze zu einem bestimmten Zeitpunkt miteinander verglichen werden, so wurde zusätzlich die mittlere Fluoreszenzintensität ausgewertet, von der zuvor die Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle abgezogen wurde.

In der Regel wurden pro Messung etwa 2000 Zellen bis 5000 Zellen analysiert. Die toten Zellen wurden mittels Färbung mit $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumiodid (Sigma, München) bestimmt und von der Messung ausgeschlossen.

2.12.2 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind unter Angabe ihrer Spezifität und der Bezugsquelle in Tabelle 1 aufgeführt.

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
HLA-A B C	B9.11.1	IgG _{2a}	Immunotech
HLA-DR	B8.12.2	IgG _{2b}	Immunotech
HLA-DQ	SPVL3 I	IgG _{2a}	Immunotech
CD1a	B17.20.9	IgG _{2a}	Immunotech
CD1b	4.A7.6	IgG _{2a}	Immunotech
CD1c	L161	IgG ₁	Immunotech
CD3	X35	IgG _{2a}	Immunotech
CD4	MT310	IgG ₁	Dakopatts
CD8	DK25	IgG ₁	Dakopatts
CD11a	25.3.1	IgG _{1a}	Immunotech
CD11b	BEAR1	IgG ₁	Immunotech
CD11c	BU15	IgG _{1a}	Immunotech
CD14	RMO52	IgG _{2a}	Immunotech
CD15	80H5	IgM	Immunotech
CD16	3G8	IgG ₁	Immunotech
CD18	BL5	IgG ₁	Dakopatts
CD19	J4.119	IgG ₁	Immunotech
CD20	Bly-1	IgG ₁	Dakopatts
CD23	9P.25	IgG ₁	Immunotech
CD26	BA5	IgG _{2a}	Immunotech
CD32	2E1	IgG _{2a}	Immunotech

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD34	QBEND10	IgG ₁	Immunotech
CD40	Mab89	IgG ₁	Kroczek
CD45	ALB12	IgG _{2b}	Immunotech
CD54	84H10	IgG ₁	Immunotech
CD56	T199	IgG ₁	Immunotech
CD58	AICD	IgG _{2a}	Immunotech
CD64	10.1	IgG ₁	Calbiochem
CD69	TP1/55.33.1	IgG _{2b}	Immunotech
CD80	BB1	IgM	Clark
CD86	BB1	IgG ₁	Calbiochem
FcεRI	29C6	IgG ₁	Hakimi
HLA-A2	BB7.2		Coulie

Tabelle 1 *Liste der verwendeten Primärantikörper.*

Bezugsquellen: Immunotech, Marseille, Calbiochem, San Diego, Dakopatts, Hamburg, Dr. Hakimi, Nutley, Dr. Kroczek, Berlin, Dr. Clark, Seattle, Dr. Coulie, Brüssel.

2.13 Plasmid-DNA

Die verwendeten Expressionsvektoren β -Galactosidase und Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (Artuc et al., 1995), die unter Kontrolle des CMV-Promotors stehen, wurden von Stratagene (Heidelberg) bezogen. Der Expressionsvektor für humane Tyrosinase stammte von Invitrogen (Leek, Niederlande).

2.14 Transfektion von Zellen

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion von Zellen zur Klärung verschiedener Fragestellungen verwendet. Zum einen diente sie dem reinen Nachweis der Transfektionseffizienz dendritischer Zellen sowohl auf mRNA als auch auf

Proteinebene. Zum anderen wurden die transfizierten DC für funktionelle Studien eingesetzt.

Die Transfektion von dendritischen Zellen wurde mit Hilfe von Lipofektin-Reagenz (Gibco BRL) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Felgner et al., 1987). Zuerst wurde die DNA-Konzentration, Lipofektinmenge und Zellzahl für die Transfektion dendritischer Zellen optimiert.

Zur Transfektion wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen/well in einer 6-Lochplatte in 2 ml serumfreiem RPMI-Medium verteilt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde der DNA-Liposomen Komplex (2 µg DNA/well, 10 µl/well Liposomen) in serumfreiem Opti-MEM, Medium (Gibco BRL) zugesetzt. Die Ansätze wurden 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert.

Die in dieser Zeit transfizierten Zellen wurden für weitere 24 Stunden in Kulturmedium gehalten und anschließend in 1 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS aufgenommen. Nicht gebundene DNA wurde durch zehnmünütige Zentrifugation bei 1200 U/min bei 4 °C entfernt. Das Pellet wurde in 150 µl 0,125 M Tris-HCl, pH 7,8 aufgenommen und unter mehrfachem Einfrieren (10 min bei -80 °C) und Auftauen (10 min bei 37 °C) lysiert. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde das Zellysate bei -20 °C eingefroren. Für den Nachweis der Genexpression wurde das Zellpellet direkt ins flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Für einen histochemischen Nachweis der β -Galactosidase wurden die Zellen unmittelbar nach der Transfektion gefärbt. Als Kontrolle diente eine Transfektion mit dem pBasic-CAT-Vektor.

2.14.1 Histochemische Färbung der Zellen

Die Transfektion der Zellen wurde durch Hydrolyse von 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosid (X-Gal) durch β -Galactosidase nachgewiesen. Dabei wurde das chromogene Substrat von dem Enzym in Bromchloroindol hydrolysiert, das eine Blaufärbung der Zellen bewirkt.

Zuerst wurden die transfizierten Zellen in 6-Lochplatten mehrmals mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS gewaschen und nach Entfernung des PBS mit 1 ml 3,8% Formaldehydlösung für 10 min bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen und mit 1ml X-Gal-Lösung, 20 mg/ml in Dimethylformamid (Sigma) überschichtet. Die X-Gal Lösung wurde anschließend mit 100 mM Natrium Phosphat, pH 7,3 (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4), 3 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 3 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 3 H_2O , 1,3 mM MgCl_2 auf 1 mg/ml X-Gal eingestellt. Nach 6 Stunden bis 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbung der Zellen lichtmikroskopisch (Zeiss, Contax-Kamera 167 MT) untersucht.

2.14.2 Bestimmung der Enzymaktivität

Um die Enzymaktivität aus Zellextrakten transfizierter Zellen zu bestimmen wurde ein kommerziell erhältliches CAT-Enzym als Standard verwendet (Rouet et al., 1992). Das CAT-Enzym acetyliert ^{14}C -Chloramphenicol. Daher kann seine Aktivität aus der Menge des acetylierten ^{14}C -Chloramphenicols direkt bestimmt werden.

Die CAT-Aktivität wurde aus dem Zellysats bestimmt. Hierzu erfolgte zunächst eine Bestimmung des Gesamtproteingehalts. Die Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Proben erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen BCA Proteinbestimmungskits (Pierce, Rockford, IL, USA). Eine eventuell vorhandene endogene Acetyltransferase-Aktivität wurde durch Erhitzen der Proben bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min zersört. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und aus dem Überstand $30\text{ }\mu\text{l}$ entnommen und mit $200\text{ }\mu\text{l}$ einer frisch hergestellten CAT-Reaktionslösung (125 mM Tris-HCl, pH 7,8 $25\text{ }\mu\text{l}$; $1,25\text{ mM}$ Chloramphenicol $50\text{ }\mu\text{l}$; $0,35\text{ }\mu\text{M}$ ^3H -Acetyl-CoA, $1,4\text{ Ci/mM}$, $0,1\text{ }\mu\text{Ci}$ ad $124,9\text{ }\mu\text{l}$ Aqua dest.) gemischt. Danach wurde die Lösung in Probenröhrchen mit 5 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Fluozint-Packard) überschichtet und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Zeitintervall von einer Minute in einem β -Counter (Beckmann 6000) bis die enzymatische Reaktion beendet war.

Für die Bestimmung der β -Galactosidase Aktivität wurden $30\text{ }\mu\text{l}$ des Zellysats 1:25 mit 100 mM Hepes, 150 mM NaCl, $4,5\text{ mM}$ Mg-Aspartat, 1% BSA, $0,05\%$ Tween 20 und $3,3\text{ mM}$ Chlorphenol-red- β -Galacto-pyranosid, pH 7,2 (Boehringer-Mannheim) verdünnt und 60 min bis 120 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Enzymaktivität wurde in einem Photometer (UV-160 Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Die ermittelten Werte wurden mit einem β -Galactosidase-Standard (Promega, Madison, WI) verglichen.

Bei der Transfektion von dendritischen Zellen mit humaner Tyrosinase, erfolgte die Bestimmung der Tyrosinhydroxylase Aktivität aus dem Lysat transfizierter Zellen. Die Aktivität läßt sich durch die Umwandlung von ^3H Tyrosin zu L-DOPA unter Produktion von $^3\text{H}_2\text{O}$ quantitativ bestimmen (Halaban et al., 1983). Transfizierte Zellen wurden zuerst von den 6-Lochplatten mit Trypsin-EDTA abgelöst, zweimal in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (7 min bei 1200 U/min). Das Zellpellet wurde in $100\text{ }\mu\text{l}$ einer 1% NP40-Lösung in $0,05\text{ M}$ Tris-HCl, pH 7,2 (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und 60 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mechanisch lysiert. Zellkerne, Detergens-unlöslichen Komponenten und unaufgebrochenen Zellen wurden durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 15000 U/min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ entfernt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines BCA Proteinbestimmungskits erfolgte die Inkubation der Proben ($30\text{ }\mu\text{l}$) in $0,25\text{ mM}$ L-Tyrosin, $5\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Tyrosin, Chloramphenicol (1 mg/ml), BSA ($0,1\text{ mg/ml}$) und $0,05\text{ mM}$ L-Dopa in $0,1\text{ M}$ Phosphatpuffer pH 6,8 (Sigma, Deisenhofen) für 2 Stunden bei

37 °C. Das Gesamtvolumen der Proben betrug 50 µl. Das hier verwendete Antibiotikum Chloramphenicol diente als Inhibitor der Proteinsynthese und verhinderte den Einbau des radioaktiven Tyrosins in andere Makromoleküle. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 0,4 ml *Charcoal Norit SG activated charcoal* (Aldrich, Bad Homburg) (10% w/v in 1% Trichloressigsäure) beendet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 14000 U/min für 5 min. Aus dem Überstand wurden 100 µl entnommen und die Radioaktivität in einem β -Counter (Beckmann 6000) ermittelt.

2.15 Induktion und Bestimmung der Zytokinproduktion

Die Zytokinproduktion der DC wurde auf mRNA Ebene bestimmt, um den Einfluß verschiedener Stimulanzen auf die Zytokinexpression zu ermitteln. Es wurde die Expression folgender Zytokine untersucht: TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IFN- α . Dendritische Zellen (10^6) wurden entweder mit verschiedenen Peptiden (Tyrosinase, Melan-A / MART-1, gp100, MAGE-1 und MAGE-3 jeweils 10µg/ml), mit KLH (50 µg/ml) oder mit Tumorlysaten (100 µg/ml) stimuliert. Als Kontrollen dienten jeweils nicht stimulierte sowie mit DMSO behandelte Zellen. Ein Einfluß von 0,1% DMSO auf die Zytokinexpression sollte ausgeschlossen werden, da einige Peptide in DMSO gelöst werden mußten. Außerdem wurde parallel dazu die Zytokinexpression in mit Tyrosinase transfizierten dendritischen Zellen sowie in nur mit Leervektor transfizierten Zellen bestimmt.

2.16 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis der Expression transfizierter Gene und für den Nachweis der Zytokinproduktion in dendritischen Zellen herangezogen. Außerdem wurde mittels RT-PCR die basale Expression der zur untersuchenden Gene in HT3 Zellen untersucht.

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Total RNA Kits* (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert und von DNA Verunreinigungen durch enzymatischen Verdau mit RNase-freier DNase I (Boehringer-Mannheim) befreit. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Präparationen erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Photometer (Shimadzu) sowie gelelektrophoretisch.

Die RNA wurde anschließend mittels eines Einzelstrang-Synthesekits (Boehringer-Mannheim) unter Verwendung randomisierter Primer nach Anweisung des Herstellers revers transkribiert. Die erhaltene Einzelstrang cDNA diente in der folgenden PCR als Matrize. In Tabelle 2 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer-Paare (TIB-Molbiol) unter Angabe ihrer Spezifitäten, der Fragmentlängen korrespondierender Produkte und zugehörigen Referenzen zusammengefasst.

Tabelle 2 Für die Untersuchung verwendete Primer-Paare

Sequenz	Spezifität	Fragmentgröße
5'-TTG GCA GAT TGT CTG TAG CC 5'-AGG CAT TGT GCA TGC TGC TT	hTYR1 hTYR2	248 bp
5'-GTC TTT ATG CAA TGG AAC GC 5'-GCT ATC CCA GTA AGT GGA CT	hTYR3 hTYR4	207 bp
5'-GGT GAG CTG GTG ATA TG 5'-CGA CAT GGA AGC CAT CA	CAT3013 CAT3347	367 bp
5'-CCG CGT TAC ATA ACT TAC 5'-CTC TAG TTA GCC AGA GAG	cmvPRO-100 cmvPRO-592	527 bp
5'-ACT GCT CAT CGG CTG TTG 5'-TCA GCC ATG TCT CAG GTG	MART1-5 MART1-3	265 bp
5'-AGA TCC TGC AGG ATG TGC 5'-CAA TGG GAC AAG AGC AGA	pMel17-5 pMel17-3	540 bp
5'-TTG CCG AAG ATC TCA GGAA 5'-CTT GCC TCC TCA CAGAG	MAGE1-5 MAGE1-3	470 bp
5'-TGG AGG ACC AGA GGC CCCC 5'-GGA CGA TTA TCA GGA GGC CTGC	MAGE3-5 MAGE3-3	714 bp
5'-AAA GGA TTA GTA AAG GGT 5'-CAT TCT GCT TGA AAT AAG	TRP1-5 TRP1-3	670 bp
5'-CTG GGT GCA GAG TCG GCC 5'-ATT GGG CCC AAG CAG GCC	TRP2-5 TRP2-3	300 bp
5'-ATG TGG CTG CAG AGC CTG CTG C 3'-C TGG CTC CCA GCA GTC AAA GGG	GM-CSF	424 bp

Sequenz	Spezifität	Frag- ment- größe
5'-GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGCA 3'-GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T	TNF- α	444 bp
5'-TGA TGG CAA CCA GTT CCA GAA GGC TCA AG 3'-ACA CCT CCC AGG CAC AAG GGC TGT ATT TT	IFN- α	303 bp
5'-CAA GGA GAG CAT GGT GGT AGT AGC AAC CAA CG 3'-TAG TGC CGT GAG TTT CCC AGA AGA AGA GGA GG	IL-1 α	491 bp
5'-ATG GCA GAA GTA CCT AAG CTC GC 3'-A CAC AAA TTG CAT GGT GAA GTC AGT T	IL-1 β	802 bp
5'-AAG CTG AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA AGG CG 3'-AGC TAT CCC AGA GCC CCA GAT CCG ATT TTG G	IL-10	328 bp
5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG 3'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC	β -Aktin	838 bp
5'-GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG 3'-GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC	GAPDH	197 bp

Referenzen: (1, 2) Smith et al, 1991, (2) Kawakami et al, 1994, (3) Wagner et al, 1995, (4) Van de Bruggen et al, 1994, (5) Gaugler et al, 1994, (6) Shibata et al, 1992, (7) Bouchard et al, 1994, (8) Miyatake et al., 1985, (9) Pennika et al, 1984.

Die PCR-Amplifikationen erfolgten unter Verwendung eines Masterkits von Boehringer-Mannheim, der alle erforderliche Komponenten enthält (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,005% [v/v] Brij, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix, 1,25 IU Taq-Polymerase pro 50 μ l Endansatz). Die Primer lagen in einer Endkonzentration von 1 μ M vor, die cDNA wurde unverdünnt eingesetzt. Um eine Verunreinigung durch Plasmid-DNA auszuschließen wurde ein spezifischer CMV-Promotor Primer verwendet.

Für die Amplifikation der verschiedenen Produkte wurden die in Tabelle 3 dargestellten Bedingungen gewählt.

Die Reaktionsprodukte wurden gelelektrophoretisch analysiert. Als Größenstandard diente die 1000-bp-Leiter von Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA).

Initiale Denaturierung	94°C / 5 min
Annealing	variabel ^a / 1 min
Extension	72°C / 1 min
Denaturierung	94°C / 1 min
Letzte Extension	72°C / 1 min
Zyklen-Anzahl	variabel ^b

a. Annealing Temperaturen: 60°C für TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IFN- α , β -Aktin

b. Zyklen-Anzahl: 35 für TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IFN- α , β -Aktin

Tabelle 3 *PCR-Bedingungen*

2.17 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten in vitro

Um zu bestimmen, ob in peripherem Blut gesunder Spender autoreaktive, melanozytenantigen-spezifische T-Lymphozyten vorhanden sind wurden dendritischen Zellen mit Tyrosinase transfiziert und als Stimulatorzellen mit autologen T-Lymphozyten kokultiviert. Nach Inkubation und Entfernung des Überstands wurden zu den transfizierten dendritischen Zellen autologe T-Lymphozyten (10^6 Zellen/well in 1 ml AIM-V Medium mit 10% HS) und IL-7 (5 U/ml) gegeben. Die Phänotypisierung der T-Zellen erfolgte nach 10 Tagen durchflußzytometrisch. Um ein Wachstum von CD4⁺ T-Zellen zu verhindern wurden diese Zellen aus dem Zellgemisch mit Hilfe magnetischer Beads entfernt, wie oben beschrieben.

Vom 10. Tag an erfolgte die Ernte der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, welche durch Kokultur mit tyrosinasetransfizierten DC stimuliert worden waren. Diese Zellen wurden erneut mit transfizierten DC kokultiviert (10^6 T-Zellen pro well und $2 \cdot 10^5$ DC pro well), wobei ein Austausch der transfizierten DC nach jeweils einer Woche erfolgte. Ein Mediumwechsel mit IL-2 (10 U/ml) Zusatz fand jeden zweiten bis fünften Tag statt.

Nach 4 Wochen wurde die zytolytische Aktivität der CD8⁺ Zellen bestimmt. Hierzu wurde der Lactat Dehydrogenase (LDH) Tests verwendet (Korzeniewski et al., 1983).

2.17.1 Lactat-Dehydrogenase-Test (LDH)

Die Messung der zytolytischen Aktivität von CTL, nach Kokultur mit autologen transfizierten DC, gegenüber Melanomzellen erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen LDH-Kits (Boehringer-Mannheim). Hierbei handelt es sich um eine nichtradioaktive Alternativmethode für den ^{51}Cr -release-assay. Sie basiert auf Messung der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase, welche aus dem Zytosol lysierter Zellen in den Überstand abgegeben wird.

Aus Kultur in 24-Lochplatten wurden zuerst Effektorzellen (CTL) gesammelt, gewaschen und auf Anzahl und Vitalität der Zellen geprüft. Als zu lysierende Zielzellen wurden für dieses Experiment eine HLA-A2-positive und Tyrosinase-positive Melanomzelllinie (UKRV-MEL-15) verwendet. Die Expression der Tyrosinase wurde durch RT-PCR nachgewiesen. Das Vorhandensein der HLA-A2 Moleküle wurde durchflußzytometrisch bestimmt.

Die Zielzellen wurden in 96-U-Lochplatten (Nunc) ausplattiert ($5 \cdot 10^3$ Zellen pro well in 100 μl RPMI 1640 Medium). Effektorzellen wurden in verschiedenen Verhältnissen in 100 μl Medium zu den Testzellen gegeben. Nach Inkubation bei 37 °C über sechs Stunden erfolgte eine Zentrifugation der Platten bei 1200 U/min für 7 min. Die erhaltenen Kulturüberstände wurden anschließend auf eine neue 96-Loch-Platte (mit flachem Boden) übertragen und mit 100 μl Reaktionsgemisch (Färbelösung und Katalysator) aus dem LDH-Kit 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm (Titertek Multiscan MCC/340, Meckenheim). Die spezifische Lysis wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Lyse (\%)} = \frac{A_{\text{Exp}} - A_{\text{Effektor,spontan}} - A_{\text{Ziel,spontan}}}{A_{\text{Ziel,total}} - A_{\text{Ziel,spontan}}} 100$$

Hierbei bezeichnet A_{Exp} die Absorption in den Testansätzen, $A_{\text{Effektor,spontan}}$ und $A_{\text{Ziel,spontan}}$ die Absorption der Kontrollansätze, welche nur Effektor- bzw. Targetzellen enthielten. $A_{\text{Ziel,total}}$ entspricht der Absorption nach Lyse der Zielzellen mit Triton X-100.

2.18 Immunisierung von Melanompatienten

2.18.1 Klinisches Protokoll

Das klinische Protokoll der Versuchsreihe wurde von den Ethik-Kommissionen der beteiligten Kliniken genehmigt. Die teilnehmenden Patienten wurden an der Hautklinik des Virchow-Klinikums der Charite Berlin sowie an der medizinischen Hochschule der Universität Zürich ambulant behandelt. Insgesamt nahmen 16 Patienten an der Studie teil, welche im April 1996 gestartet und im März 1997 beendet wurde.

Die Selektion der Patienten erfolgte nach vorher festgelegten Einschlusskriterien wie des histologischen Nachweises der Metastasierung eines malignen Melanoms, entsprechender Leber und Nierenfunktion (Bilirubin < 3 mg/ml, Serum-Kreatinin < 1,5 mg/ml) und einer voraussichtlichen Lebenserwartung von mindestens 12 Wochen. Alle herzkranken Patienten, alle Patienten, die eine schwerwiegende psychische Erkrankung aufwiesen, sowie alle Patienten mit akuter Hepatitis oder HIV Infektion wurden ausgeschlossen. Alle beteiligten Patienten wurden ausführlich über den Verlauf der Studie informiert und erklärten schriftlich ihre Einverständnis mit der Teilnahme.

Eine Woche vor der geplanten ersten Immunisierung wurde den Patienten operativ Tumormaterial entnommen. Zur Herstellung von dendritischen Zellen, sowie von Zelllysaten wurden ferner 100 ml Blut von jedem Patienten abgenommen. Bis zum Beginn der Immunisierung wurden von den beteiligten Ärzten die notwendigen Untersuchungen, Multitest Merieux und DTH-Tests vorgenommen. Die Immunisierung mit autologen dendritischen Zellen erfolgte zunächst vier Wochen lang in wöchentlichen Abständen. Die dendritischen Zellen wurden entweder intralymphatisch oder intranodal verabreicht.

Zum Zeitpunkt der 5. Immunisierung (6. Woche) erfolgte eine erste komplette, immunologisches und klinisches Untersuchung (Ultraschall, Röntgen und Computertomographie). Diese Untersuchungen wurden 4 Wochen später (10. Behandlungswoche) und danach alle 2 Monate bis zum Ende der Studie wiederholt.

2.18.2 Auswertung der klinischen Studien

Im Rahmen der klinischen Studie wurden sowohl Informationen bezüglich des Nebenwirkungsspektrums als auch der klinischen Wirksamkeit der Immunisierung bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Melanom gesammelt. Die Ergebnisse wurden während der Studie von den behandelnden Ärzten und dem die Studie begleitenden

Biostatistiker überwacht. Es galten folgende Kriterien für Klinisches Ansprechen und gute Verträglichkeit der Immuntherapie:

Komplettes Ansprechen (CR, complete response): komplettes Verschwinden aller klinischen Manifestationen des metastasierenden Melanoms während eines Zeitraums von über einem Monat.

Partielles Ansprechen (PR, partial response): Regression von mehr als 50% der gesamten Tumormasse.

Gemischtes Ansprechen (MR, mixed response): Regression an manchen metastatischen Tumorlokalisationen und eine Progression an anderen Läsionen.

Keine Veränderung (SD, stable disease): konstantes Verhalten des Tumors ohne wesentliche Verschlechterung oder Verbesserung innerhalb von 6 Wochen.

Progression (PD, progressive disease): unzweifelhaftes Wachsen der Tumormasse um mehr als 50%.

Die Häufigkeit und der Schweregrad von Nebenwirkungen wurden nach Kriterien der WHO ausgewertet.

2.18.3 Präparation der dendritischen Zellen

Die Kultur und Charakterisierung der dendritischen Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte während der ersten sechs Wochen wöchentlich und dann nochmal jeweils in der 9. und 10. Woche.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von dendritischen Zellen diente frisch entnommenes peripheres Blut (100 ml) der Melanompatienten. Eine Hälfte des Blutes wurde genauso wie angegeben verarbeitet, während die andere Hälfte nach Dichtegradientenzentrifugation bei -70 °C eingefroren und für nachfolgende Untersuchungen, aufbewahrt wurde. Durch entsprechende Kultur mit IL-4 und GM-CSF konnten aus 50 ml Blut etwa 1 bis $5 \cdot 10^6$ dendritische Zellen erhalten werden. Die Beladung der dendritischen Zellen mit entsprechenden Peptiden erfolgte nach sieben Tagen.

Die Beladung der dendritischen Zellen mit Peptiden erfolgte auf der Grundlage von Daten die in Studien zur Charakterisierung von tumor-assoziierten Peptiden mittels zytotoxischer T-Lymphozyten gewonnen wurden (Boon et al., 1994; Houghton, 1994). In diesen Studien wurden Fragmente der folgenden Proteine in Assoziation mit definierten MHC-I Molekülen auf Melanomzellen nachgewiesen:

Tyrosinase (MLLAVLYCL)
Melan A / MART-1 (AAGIGILTV)
gp-100 (KTWGQYWQV)

diese werden alle durch das HLA-A2 Molekül präsentiert, während MAGE-1 (EADPTGHSY) und MAGE-3 (EVDPIGHLY) mit HLA-A1 assoziiert sind. Um die Effektivität der durch die DC hervorgerufenen Immunisierung zu überprüfen, erfolgte parallel eine Beladung der Zellen mit dem Schnecken-Protein Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH, (Calbiochem, Bad Soden). KLH ist ein potentes Antigen, welches in jedem Fall zu einer T-Zell vermittelten Immunantwort führt.

In Abhängigkeit vom Haplotyp des Patienten (nach vorangegangener HLA-Typisierung) wurden die entsprechender Peptide für jeden einzelnen Patienten gesucht und zum Beladen dendritischer Zellen verwendet. Das Beladen der DC mit Peptiden erfolgte durch eine zweistündige Inkubation der Zellen mit 50 µg/ml Peptid bei Raumtemperatur. Die Patienten, welche einen anderen HLA-A-Typ als HLA-A1 oder HLA-A2 exprimierten, konnten nur dann in Betracht gezogen werden, wenn von ihnen auch Tumormaterial zur Verfügung stand. In diesem Fall erfolgte die Beladung der Zellen mit autologen Tumorlysaten (100 µg/ml) gefolgt von einer vierstündigen Inkubation bei Raumtemperatur. Alle Patienten die an der Studie teilnahmen, erhielten zusätzlich zu den Peptid- bzw. Tumorlysat-behandelten Zellen noch KLH-beladene dendritische Zellen. Das KLH wurde vor Anwendung mittels einer Reinigungssäule (Detoxigel Column, Pierce) mit sterilem PBS viermal gewaschen und nachfolgend der Endotoxingehalt mittels des LAL-Tests (Limulus aebocyte lysate assay; Sigma) bestimmt. KLH wurde dann über Nacht in 5 l physiologischer NaCl-Lösung dialysiert, um dann auf eine Konzentration von 1 mg/ml in 0,9% NaCl eingestellt und steril filtriert (0,45 µm Filter) zu werden. Die Beladung der DC mit KLH erfolgte durch eine zweistündige Inkubation der DC mit 50 µg/ml KLH bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die dendritischen Zellen mit sterilem PBS dreimal gewaschen und in PBS (je 0,5 ml pro 10⁶ DC) für die Injektion aufgenommen. Die Impfung wurde unmittelbar nach Vorbereitung der Zellen durch die betreuenden Ärzte vorgenommen.

2.18.4 Hauttests

Die Reaktion auf autologe, antigen-beladene DC, sowie die Menge an dendritischen Zellen, die zur Auslösung einer T-Zellaktivierung nötig war wurde vor der Impfung der Patienten durch einen Hauttest (delayed-type hypersensitivity, DTH) bestimmt. Dazu wurden DC (jeweils 1 10⁵ DC pro Test) mit den einzelnen Peptiden (50 µg/ml), mit Tumor-Lysaten (10 µg/ml) oder mit KLH (5 µg/ml) zwei Stunden lang bei Raum-

temperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an unbehandelten DC eingesetzt. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach Zentrifugation in 300 µl PBS aufgenommen. Die auf diese Weise vorbereiteten Zellsuspensionen wurden dann von den behandelnden Ärzten den Patienten intradermal injiziert. Im Fall einer positiven DTH-Reaktion wurde der Hauttest in der 6. Woche und in der 10. Woche nach Impfung wiederholt. Weitere Hauttests erfolgten in zweimonatlichen Abständen nach Beendigung der Immunisierung.

Parallel zu den DTH-Tests wurde ein kommerziell erhältlicher „recall-DTH Test“ (Multitest Merieux, Leimen) in die Haut des anderen Unterarms injiziert. Multitest Merieux enthält einen Teststempel mit 7 verschiedenen Antigenen (Tetanus, Diphtherie, Streptokokkus, Tuberkulin, Candida, Trichophyton und Proteus). Nach Definition wird eine DTH als positiv bewertet, wenn eine Rötung größer 5 mm im Durchmesser auftritt und 48 h nach intradermaler Injektion eine Schwellung der Haut besteht.

2.18.5 Herstellung des Tumorlysats

Die Herstellung des Tumorlysats erfolgte aus frisch entnommenen und in sterilem PBS aufgenommenen Tumorgewebe. Nach Entfernung nichtmalignem Gewebes erfolgte eine mechanische Zerkleinerung des Tumorknotens und anschließend eine Filtration bis eine Einzelzellsuspension erhalten wurde (Schadendorf et al., 1994). Nach Zellzahlbestimmung, Vitalitätsbestimmung (Trypanblau), Waschen der Zellen in sterilem PBS und Zentrifugation bei 1200 U/min für 7 min erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 100 µl PBS. Die Zellen wurden anschließend durch 4 bis 5 Einfrier- (15 min in flüssigem Stickstoff) und Auftauzyklen (15 min bei 37 °C) lysiert. Mittels Lichtmikroskopie erfolgte eine Kontrolle des Lysefortschritts. Abschließend erfolgte eine niedertourige Zentrifugation (600 U/min für 10 min) zur Entfernung von großen Zellbestandteilen (z.B. Zellkerne). Der gewonnene Überstand wurde steril filtriert (0,2 µm Filter) und sein Proteingehalt bestimmt (BCA Test, Pierce, Rockford IL, USA). Die Lysate wurden abschließend portioniert und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.