

## 4 Diskussion

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von pigmentproduzierenden Melanozyten abstammt, welche neuroektodermalen Ursprungs sind. Es ist der wichtigste Tumor der dermatologischen Onkologie, nicht unbedingt aufgrund der Häufigkeit seines Auftretens, sondern aufgrund seines aggressiven Wachstumsverhaltens und seiner ausgeprägten Therapieresistenz, insbesondere nach erfolgter Metastasierung.

Die Metastasierung des malignen Melanoms erfolgt entweder lymphogen oder hämatogen. Mit eingetretener Disseminierung der malignen Erkrankung sinkt die Überlebenserwartung der Patienten dramatisch. Ist es zu einer Fernmetastasierung gekommen, sind die Überlebenschancen gering (Ahman et al. 1989). Herkömmliche Therapiestrategien einschließlich Chemotherapien führen nicht zu den erwünschten Erfolgen (Garbe 1993; Ahman et al. 1989; Ho und Sober 1990; Parkinson et al. 1992).

In den letzten Jahren haben Untersuchungen der spezifischen Immunantwort gegen Melanomzellen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) als die Effektorzellen identifiziert, welche im Wesentlichen für die Vernichtung von Melanomzellen *in vivo* verantwortlich sind. Diese CTL erkennen Melanomzellen anhand von HLA-Klasse-I-Molekülen in Verbindung mit Peptiden, die von melanosomalen Proteinen abgeleitet sind. Allerdings ist die natürliche Immunreaktion gegen die Melanomzellen häufig nicht ausreichend, um eine Remission des Tumors zu erzielen. Daher wurde von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, dendritische Zellen, die mit tumorspezifischen Peptiden beladen sind, zur Vakzinierung gegen Tumorzellen zu verwenden (Grabbe et al. 1995; Lanzavecchia, 1993).

Dieses Vorgehen erscheint aussichtsreich, da die Präsentation von Peptiden durch antigenpräsentierende dendritische Zellen der physiologische Weg der Induktion einer spezifischen Immunantwort durch Lymphozyten ist (Steinman 1991; Grabbe et al. 1995; Lanzavecchia 1993).

*In vitro* mit Tumorantigenen beladene dendritische Zellen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen *in vivo* als therapeutische Vakzine für die Tumorthherapie benutzt (Steinman 1991; Grabbe et al. 1995; Paglia et al. 1993; Paglia et al., 1996; De Bruijn et al. 1992).

Allerdings wurden erst in jüngster Zeit Methoden entwickelt, um eine ausreichende Zahl funktionell aktiver DC zu gewinnen. Als Ausgangsmaterial dienten entweder Zellen aus Knochenmark oder aus peripheren Blut. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Zusatz von GM-CSF und / oder Zytokinen wie IL-4 TNF- $\alpha$ , SCF und

FTL3 Ligand (Peters et al. 1996; Caux et al. 1992; Romani et al. 1994, 1996; Sallusto und Lanzavecchia 1994).

Im Rahmen vorliegenden Arbeit zur Therapie des fortgeschrittenen Melanoms, wurden dendritische Zellen aus peripherem Blut durch Kultur mit GM-CSF und IL-4 *in vitro* generiert. Um die optimalen Bedingungen für die Gewinnung von DC zu bestimmen, wurden zunächst die DC aus peripherem Blut gesunder Spender erzeugt. Später wurden DC auch aus dem Blut von Melanompatienten gewonnen.

## 4.1 Eigenschaften dendritischer Zellen

DC sind in der Lage B- und T-Lymphozyten effektiv zu stimulieren (Steinman 1991). Damit spielen sie eine Schlüsselrolle in der Steuerung und der Regulation des Immunsystems. Die Forschung zur Funktion der DC wurde allerdings lange dadurch behindert, daß es keine effektiven Methoden gab, diese Zellen zu isolieren und in Kultur zu halten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die von Romani et al. (1994) entwickelte Methode in unserem Labor in der Hautklinik des Virchow Klinikums der Charite etabliert.

Die Grundidee des von Romani et al. (1994) erarbeiteten Protokolls besteht darin, daß man, mit Hilfe von Zytokinen, Monozyten dazu bringen kann, sich zu DC zu entwickeln. Als Ausgangsmaterial diente hierbei peripheres Blut. Die hieraus erhaltenen Zellen, zeigten nach einem Tag in Kultur die für mononukleäre Zellen typischen Aggregate (Abb. 3). Allerdings dürften zu diesem Zeitpunkt auch noch andere Zelltypen in Kultur vorhanden sein. Die Identifikation von DC wird dadurch erschwert, daß bisher nur ein spezifischer Marker (CD 83) bekannt ist, welcher jedoch nur auf reifen DC vorkommt (Zhou und Tedder, 1995). Ansonsten zeichnen sich DC dadurch aus, daß MHC-II Moleküle und costimulatorische Adhäsionsmoleküle konstitutiv exprimiert werden und durch das Fehlen von für andere Zelllinien typischen Markern. Die Analyse der exprimierten Oberflächenmarker ergab, daß in Kultur Zellen vorhanden waren, welche MHC-II Moleküle exprimierten. Der Nachweis von HLA-DR spricht für das Vorhandensein von unreifen DC in den Kulturansätzen. Diese HLA-DR Expression läßt sich durch TNF- $\alpha$  vermindern, was ebenfalls für Vorhandensein unreifer DC spricht. CD11b ist ein Adhäsionsmolekül, dessen Vorkommen auf DC ebenfalls beschrieben wurde (Abb. 4). Allerdings stellt es keinen spezifischen Marker dar, weil es z.B. auch auf NK-Zellen gefunden wird (Thomas und Lipsky, 1994).

Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Nachweis von DC stellt die Morphologie dar. Nach sieben Tagen waren entsprechende morphologische Details, wie z. B. dendritische Ausläufer zu beobachten (Abb. 5). Die Änderungen der Expression der

MHC-II Moleküle und der Adhäsionsmoleküle CD58, CD11b, CD11c und CD1a sowie die Induzierbarkeit von CD54 spricht für eine Anreicherung und eine Reifung der DC in Kultur (Abb. 6). Ferner wurden auch costimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) nachgewiesen, deren Expression sich durch Zugabe von TNF- $\alpha$  noch weiter steigern ließ. Typische Marker für T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen waren nicht nachweisbar (Abb. 8). Nach vierzehn Tagen in Kultur ging die Expression der MHC-Moleküle sowie von CD54, CD11b und CD11c wieder zurück (Abb.11). Insgesamt ergibt sich aus den vorliegenden Daten, daß DC erfolgreich aus peripheren mononukleären Zellen generiert und in Kultur angereichert werden konnten. Die Daten deuten daraufhin, daß die DC nach sieben Tagen in Kultur einen optimalen Reifegrad erreichen und für weitere Experimente geeignet sind. Nach längeren Zeiten in Kultur verringert sich die Expression relevanter Oberflächenmarker, was möglicherweise eine Anpassung der Zellen an die Kulturbedingungen darstellt und ihre Eignung für weitere Tests einschränken könnte. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen mit Zellen nach siebentägiger Kultur durchgeführt.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Rezeptoren auf unreifen DC entdeckt, welche für die Antigenaufnahme dieser Zellen von entscheidender Bedeutung sind. Hierzu zählen verschiedene Typ II Lektine, wie DCIR, dectin-2 und CLEC-1, welche eine Rolle bei der Aufnahme glykosylierter Antigene und ihrem Transport zu den antigenverarbeitenden Kompartimenten der DC spielen (Bates et al., 1999; Arizumi et al., 2000; Colonna et al., 2000). Ferner sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, wie DORA, ILT3 ebenfalls für die Antigenaufnahme bzw. die Migration dendritischer Zellen von Bedeutung (Bates et al., 1998; Cella et al., 1997). Die Aufnahme mikrobieller Lipopeptide erfolgt über Rezeptoren der TLR Familie (TLR2 und TLR3). Diese Rezeptoren stimulieren die Reifung der DC (Hertz et al., 2001; Rescigno et al., 1999; Muzio et al., 2000). Virale, bakterielle sowie bestimmte Tumorantigene können an Hitzeschockproteine binden. Diese Komplexe werden von unreifen DC mit Hilfe entsprechender Rezeptoren aufgenommen und verarbeitet (Colaco et al., 1998). Die entsprechenden Antigene können MHC-I abhängig präsentiert werden (Castellino et al., 2000; Singh-Jasuja et al., 2000; Basu et al., 2001).

Von besonderem Interesse für das Verständnis der DC Funktion sind  $\alpha\gamma\beta_5$  Integrin und CD36. Diese Proteine spielen eine Schlüsselrolle bei der Phagozytose apoptotischer und eventuell auch nekrotischer Zellen und der MHC-I abhängigen Präsentation der entsprechenden Antigen sowie der darauf beruhenden Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Cross presentation) (Albert et al., 1998a, 1998b). Sauter et al. (2000) konnten nachweisen, daß lediglich nekrotische Zellen zu einer T-Zelle Stimulation führen, während die Aufnahme und anschließende Präsentation von Antigenen aus apoptotischen Zellen zu einer Toleranz führen kann (Steinmann et al.,

2000). Das Auftreten der hier erwähnten Marker wurde erst in jüngster Zeit beschrieben und war zum Zeitpunkt der hier dargestellten experimentellen Arbeiten noch unbekannt. Es bleibt damit zu prüfen, inwieweit diese Marker auch auf den mit Hilfe der beschriebenen Methoden generierten DC nachgewiesen werden können.

Die Zugabe von IL-4 zum Kulturmedium hemmt den Arachidonsäuremetabolismus der DC und die Biosynthese von Leukotrienen, wie z.B. LTC<sub>4</sub>. Hierdurch sind DC, welche aus peripheren Blutmonozyten generiert wurden in ihrer Migrationsfähigkeit stark eingeschränkt (Spanbroek, 2001). Dieser Stoffwechseldefekt schränkt den Nutzen solcher DC für eine Vakzinierung ein, da diese Zellen nicht mehr in die Lymphknoten einwandern können. Andererseits ist dieser Defekt für die vorliegende Arbeit nicht relevant, da die beladenen DC ohnehin direkt in die Lymphknoten injiziert wurden und die wichtigen immunstimulatorischen Fähigkeiten der DC auf jeden Fall erhalten bleiben. Wanderungsfähige DC lassen sich in-vitro durch Zusatz von IL-15 statt IL-4 zum Kulturmedium gewinnen (Mohamedzadeh et al., 2001). Inwieweit diese DC Vorteile bei einer Vakzinierung bieten, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen (Thurnher und Zelle-Rieser, 2001).

Die isolierten DC zeigten immunstimulatorische Eigenschaften. Diese wurden mit Hilfe von MLR Experimenten nachgewiesen. Hierbei war in einem autologen System erwartungsgemäß nur eine geringe Stimulation der PBL nachweisbar. Dies ist unmittelbar verständlich, da eine Stimulation autologer PBL in vivo das Auftreten von Autoimmunreaktionen begünstigen würde. Hingegen kommt es im allogenen System zu einer starken Stimulation der PBL (Abb. 12). Im autologen System bewirkten DC eine starke Immunstimulation, nachdem sie mit Fremdartigen beladen worden waren (Abb. 13). Dieses Verhalten entspricht dem von DC in vivo. Diese Untersuchungen bestätigen, daß die aus PBMC generierten DC die normalen immunstimulatorischen Funktionen zeigen, welche DC auch in vivo aufweisen.

Neben dem Beladen der DC durch Inkubation mit Peptidfragmenten können sie auch durch Transfektion mit einem Zielmolekül dazu gebracht werden das entsprechende Antigen zu präsentieren. Hierbei kommt die Transfektion dem natürlichen Ablauf der Antigenpräsentation näher, da die entsprechenden Proteine stabil in den DC exprimiert werden und nach der üblichen Prozessierung auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Zur Transfektion wurden zwei gängige Reportergene ( $\beta$ -Galactosidase und CAT) sowie Tyrosinase verwendet. Tyrosinase ist insofern von Interesse, da dieses Molekül von Melanozyten exprimiert wird und bei vielen Melanomzelllinien auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Daher könnten Tyrosinasefragmente durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden, welche daraufhin die Melanomzellen angreifen.

Die Expression aller getesteten Gene ließ sich durch RT-PCR in den transfizierten Zellen nachweisen (Abb. 15). Auf Proteinebene ließ sich sowohl eine CAT-Aktivität als auch eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nachweisen. Eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

konnte auf Proteinebene nur in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 14). Dies könnte daran liegen, daß das Molekül in den transfizierten Zellen relativ schnell abgebaut wird und sich somit die Farbreaktion nicht voll entwickeln konnte.

Tyrosinase wurde auf m-RNA Ebene ebenfalls durch RT-PCR nachgewiesen (Abb. 15). Auf Proteinebene erfolgte der Nachweis durch einen Tyrosin-Hydroxylase-Assay. Hiermit konnte gezeigt werden, daß Tyrosinase in den transfizierten Zellen exprimiert wird. Eine Expression der Tyrosinase ist jedoch nicht hinreichend um eine funktionale Antwort geeigneter Effektorzellen zu induzieren. Daher wurden mit Tyrosinase transfizierte DC mit einem tyrosinase-spezifischen T-Zellklon kokultiviert. Hierbei wurde sowohl mit transfizierten als auch mit extern beladenen DC eine Zellaggregation beobachtet. Dies deutet daraufhin, daß die T-Zellen die präsentierten Tyrosinase-Fragmente erkennen können und auf sie reagieren. Auch der Anstieg der TNF- $\alpha$  Konzentration im Kulturmedium spricht für eine Aktivierung der T-Zellen. Durch die vorliegenden Experimente konnte gezeigt werden, daß DC im Prinzip transfizierbar sind und die entsprechenden Proteine auch prozessierten und in einer für eine T-Zell Stimulation geeigneten Weise auf ihrer Oberfläche präsentieren.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, ob bei gesunden Spendern Tyrosinase-spezifische naive T-Zellen vorhanden sind und ob diese durch transfizierte DC aktiviert werden können. In Kokultur mit transfizierten DC reiften die T-Zellen zu CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen heran. Dies wurde durchflußzytometrisch anhand der Expression von CD8 nachgewiesen (Abb. 17). Die Frage die sich darauf stellte war nun, inwieweit die CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch eine zytolytische Aktivität besaßen. Hierzu wurden die reifen T-Zellen zusammen mit einer Melanomzelllinie, welche Tyrosinase exprimiert (Abb. 18), kultiviert. Es konnte mit Hilfe eines LDH-Assays eindeutig gezeigt werden, daß die entsprechenden Tumorzellen von den T-Zellen erkannt und abgetötet werden (Abb. 19). Die Ergebnisse zeigen, daß im Blut gesunder Spender autoreaktive T-Zellen vorhanden sein können und daß transfizierte DC in der Lage sind diese zu aktivieren und eine Reifung zu funktionsfähigen zytotoxischen Zellen zu induzieren.

Nach Ghaneker et al. (1996) exprimieren DC nach Stimulation mit HIV-1 oder HSV mRNA für IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL10, GM-CSF und TNF- $\alpha$ . Die Expression eines Teils dieser Zytokine durch DC wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter dem Einfluß verschiedener stimulatorischer Agentien untersucht. Unstimulierte DC exprimierten lediglich TNF- $\alpha$  und IL-10, wobei es sich bei IL-10 um ein inhibitorisches Zytokin handelt, welches zur Kontrolle der T-Zell Antwort dient. Die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  ist typisch für reife DC. Es wurde bei den hier beschriebenen Experimenten unter allen Bedingungen exprimiert. Bei IFN- $\alpha$  handelt es sich ebenfalls um ein proinflammatorisches Zytokin. Es wird nach Stimulation mit Peptiden exprimiert. Interessanterweise war eine Stimulation

mit Tumor-Lysat nicht in der Lage die Expression zu induzieren. Die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und GM-CSF scheint erheblich vom verwendeten Stimulus abzuhängen. IL-1 $\alpha$  wird nach Stimulation mit Tumor-Lysat oder mit KLH exprimiert. Eine Expression von IL-1 $\beta$  war mit keinem der getesteten Substanzen nachweisbar, während GM-CSF durch einige der verwendeten Peptide induzierbar ist. Insgesamt scheint eine Stimulation der DC durch unterschiedliche Substanzen eine differenzierte Expression der unterschiedlichen Zytokine zu bewirken. Auffällig ist, daß eine Transfektion, auch lediglich mit Leervektor, die Expression der untersuchten Zytokine induziert. Hierbei könnte es sich um eine unspezifische Stressreaktion der Zellen auf die Transfektion handeln. Allgemein hängt die genaue Art der Zytokinproduktion stark vom Reifegrad, der Art der Induktion der Reifung und vom Mikromilieu der Zellen ab. Die Art des Zytokinmusters, u.a. IL-12, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-6, IL-17, IL-16, TNF- $\alpha$ , MIF, bestimmt die Funktion der DC, Induktion einer Th1 oder Th2 Antwort (Banchereau et al., 2000).

## 4.2 Tumorummunisierung

In den letzten Jahren haben Untersuchungen der spezifischen Immunantwort gegen Melanomzellen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) als die Effektorzellen identifiziert, welche wesentlich für die Vernichtung von Melanomzellen *in vivo* verantwortlich sind. Diese CTLs erkennen Melanomzellen anhand von HLA-Klasse-I-Molekülen in Verbindung mit Peptiden, die von melanosomalen Proteinen abgeleitet sind. Allerdings ist die natürliche Immunreaktion gegen die Melanomzellen häufig nicht ausreichend um eine Remission des Tumors zu erzielen. Daher wurde von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, dendritische Zellen, die mit tumorspezifischen Peptiden beladen sind, zur Vakzinierung gegen Tumorzellen zu verwenden (Grabbe et al. 1995; Lanzavecchia A. 1993).

Dieses Vorgehen erscheint aussichtsreich, da die Präsentation von Peptiden durch antigenpräsentierende dendritische Zellen der physiologische Weg der Induktion einer spezifischen Immunantwort durch Lymphozyten ist (Ramensee, 1993; Sherman, 1993). *In vitro* mit Tumorantigenen beladene dendritische Zellen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen *in vivo* als therapeutische Vakzine für die Tumorthherapie benutzt (Steinman, 1991; Grabbe et al., 1995; Paglia et al., 1993; De Bruijn et al., 1992).

Bis in jüngste Zeit spielten DC bei der Entwicklung von Anti-Tumor-Impfstoffen keine größere Rolle. Allerdings hat die Verwendung von DC mehrere Vorteile. Zum einen bewirken sie eine maximale T-Zell Aktivierung zum anderen wird eine Anergie

der T-Zellen verhindert und auch der Einsatz von Adjuvantien überflüssig gemacht (Steinmann, 1991, Bhardwaj et al., 1994).

Es wurde beschrieben, daß mit Influenza oder HIV spezifischen Peptiden beladene DC eine starke CTL Antwort induzieren können (Nonacs et al., 1992, Takhashi et al., 1993). Ferner konnte Cohen et al. (1994) nachweisen, daß Langerhans Zellen aus Mäusen eine starke CTL Antwort bewirken.

Für das humane Melanom ist nur eine begrenzte Zahl von Tumorantigenen beschrieben worden, von denen nur wenige gut charakterisiert sind (Boon et al., 1994; Houghton et al., 1994; Parmiani et al., 1993; Pardoll et al., 1994).

Bevor es zu einer Immunantwort gegen einen Tumor kommen kann, müssen naiven T-Zellen entsprechende spezifische Tumorantigene, an MHC-I Moleküle gebunden, präsentiert werden. Die T-Zellen proliferieren daraufhin und entwickeln sich zu CTL (Rammensee et al., 1993, 1995; Sherman et al., 1993).

Die bisher beschriebenen Tumorantigene können nur mit bestimmten MHC-I Subtypen effektiv präsentiert werden. Daher kommen nur wenige Tumorkranke für eine Behandlung mit den bisher bekannten Antigenen in Betracht.

Das metastasierende, maligne Melanom spricht nur sehr schlecht auf konventionelle Behandlungsmethoden an. Daher erscheint es gerade bei dieser Tumorart sinnvoll auf immunologische Ansätze zurückzugreifen, zumal eine Reihe von spezifischen Antigenen für diesen Tumor bekannt und charakterisiert ist.

Dendritische Zellen sind die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen (Steinman, 1991). Das therapeutische Potential von auf diesem Zelltyp basierenden Vakzinierungsstrategien konnte in mehreren Tumormodellen tierexperimentell nachgewiesen werden (Grabbe et al., 1995). Hsu et al. (1996) konnten zeigen, daß bei drei von vier Patienten mit follikulärem Lymphom durch Behandlung mit dendritischen Zellen eine klinische Verbesserung erzielt werden konnte. Die dendritischen Zellen waren hierfür mit Antikörper Fragmenten gleichen Idiotyps beladen worden.

Im Fall des malignen Melanoms lagen nur sehr begrenzte experimentelle Ergebnisse vor. Mukherji et al. (1995) verwendeten dendritische Zellen, welche mit MAGE-1 Peptid beladen waren. Es konnte zwar keine Verbesserung des klinischen Zustands der Patienten beobachtet werden, allerdings wurden in zwei von drei Patienten MAGE-1 spezifische CTL nachgewiesen. In der Zwischenzeit wurden auch Immunisierungsstudien mit Peptiden durchgeführt, wobei die antigen-spezifische Immunantwort nicht ausreichte um den Tumor zu vernichten. Unter Verwendung von intradermalen Peptiden wurden einige Remissionen beobachtet (Marchand et al. 1995, Jäger et al., 1996). Eine weitere Studie ergab zwar eine Aktivierung peptid-spezifischer CTL, aber keine klinisch relevanten Resultate (Cormier et al., 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein Vakzinierungsansatz zur Therapie des malignen Melanoms auf der Basis von dendritischen Zellen ausgearbeitet. Hierbei wurden die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ausgearbeiteten und ver-

besserten Methoden zur Herstellung der benötigten dendritischen Zellen verwendet.

Insgesamt nahmen 16 Patienten an der Studie teil. Sie wurden mit in vitro erzeugten autologen dendritischen Zellen immunisiert, welche entweder mit melanom-spezifischen Peptiden oder autologen Tumorlysaten beladen waren. In beiden Varianten wurde auch immer KLH eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein stark immunogenes Antigen, welches den Nachweis einer spezifischen Immunantwort erlaubt. Die Behandlung wurde generell sehr gut vertragen und es traten nur wenige, milde Nebenwirkungen auf.

Bei allen Patienten trat eine Immunantwort auf KLH auf, welche durch entsprechende DTH Tests nachgewiesen wurde (Abb. 21a). Darüberhinaus könnte der Einsatz eines Antigens wie KLH entscheidend für den Erfolg einer Therapie sein, da KLH eine starke Aktivierung von T-Helfer Zellen bewirkt, was wiederum die Produktion von Zytokinen in den Lymphknoten anregt. Diese Zytokine sind notwendig für die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen.

Bemerkenswerterweise konnte bei zwei Patienten (Nr. 4 und Nr. 8) eine positive DTH-Reaktion auf KLH sechs Monate nach der letzten Immunisierung beobachtet werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten auch eine Infiltration der Injektionsstelle durch  $CD45RO^+$   $CD8^+$  T-Zellen (Abb. 21c). Auch bei entsprechenden Tests mit beladenden DC ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abb. 21 b, d). Dies zeigt, daß durch die Impfung im Prinzip eine langanhaltende Immunantwort induziert werden kann.

Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vakzinierungsstudien konnte eine Stimulation  $CD8^+$  T-Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen werden nur durch Kontakt mit MHC-I gebundenem Antigen stimuliert. Hieraus ergibt sich, daß die oben skizzierten Wege der MHC-I abhängigen Antigenpräsentation auch bei der Verwendung von exogen mit Tumorlysat oder Peptiden beladenen DC eine Rolle spielt. Das heißt die exogen zugegebenen Antigene verdrängen nicht die bereits an MHC-I gebundenen Fragmente, sondern werden von DC möglicherweise über einen der oben skizzierten Wege aufgenommen und verarbeitet.

Neben den  $CD8^+$  T-Zellen konnten bei den behandelten Patienten auch  $CD4^+$  Zellen nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet daraufhin, daß bei den Patienten sowohl eine Th1 als auch eine Th2 Reaktion induziert wurde. Dies ist insofern erwünscht, da eine optimale Tumormunität ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Immunantworten voraussetzt (Hung et al., 1998, Schüler et al., 1999).

Die klinischen Ergebnisse sind noch einmal in Abb. 23 zusammengefasst. Von 16 Patienten waren nach Abschluß der Therapie zwei genesen, der Zustand dreier Patienten hatte sich verbessert und ein Patient war stabil geblieben. Bei den Patienten bei denen die Therapie anschlug ergaben sich z.T. deutliche Verbesserungen des klinischen Bildes (Abb. 22 a-d).



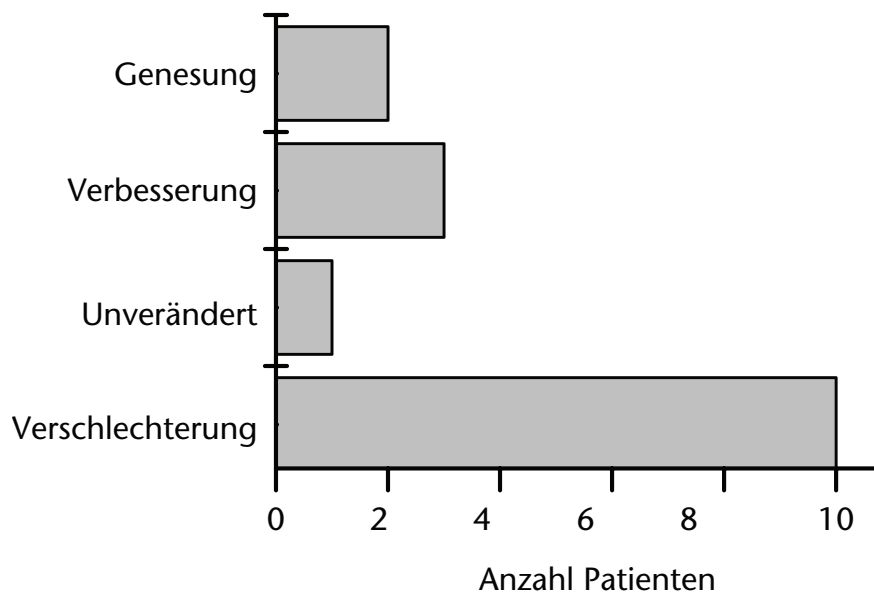


Abb. 23 *Klinische Ergebnisse der Immunisierung mit beladenen DC. Bei fünf der 16 behandelten Patienten ergab sich eine klinisch relevante Verbesserung des Krankheitsbildes*

Die Ergebnisse der Immunisierungsexperimente zeigen, daß eine Immunisierung von Melanom Patienten mit peptid-beladenen DC eine gut verträgliche Behandlung darstellt. Mit ihr kann sowohl eine antigenspezifische Immunisierung als auch eine klinische Verbesserung der Krankheit erreicht werden. Dennoch ist es denkbar, daß durch eine verbesserte Stimulation der DC die klinische Wirksamkeit weiter gesteigert werden kann. Hierzu sind insbesondere Oligonukleotide mit einem CpG Motiv geeignet (Stacey et al., 2000). Die Eigenschaften dieser Oligonukleotide variieren stark mit ihrem Ursprung. Bakterielle CpG-Oligonukleotide sind in der Regel kaum methyliert, außerdem treten sie in bakterieller DNA sehr viel häufiger als in Wirbeltier-DNA auf. Das vermehrte Auftreten von CpG-Oligonukleotiden ist charakteristisch für eine Infektion mit intrazellulären Erregern und führt zur Induktion Th1 Antwort, d.h. zur Stimulation von IFN- $\gamma$  bildenden T-Helferzellen und von zytotoxischen T-Zellen.

An dieser immunologischen Antwort sind DC beteiligt. CpG-Oligonukleotide können eine Reifung unreifer DC und die Produktion von Zytokinen wie IL-12, TNF- $\alpha$  und IL-6 induzieren (Hartmann et al., 1999) . Ferner wird die Expression von MHC-I und MHC-II, sowie von CD80, CD86 und CD40 verstärkt (Jakob et al., 1998; Liu et al., 1998). Aufgrund dieser Aktivierung von DC durch CpG-Oligonukleotide könnten diese ein geeignetes Adjuvans für eine Vakzinierung darstellen. Klinische Studien zu dieser Fragestellung stehen allerdings noch aus (Weiner, 2001).