

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin - Schlossmannhaus

Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und- Immunologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. U. Göbel

**Induktion einer antileukämischen Immunantwort in der
Maus durch Vakzinierung mit autologen Leukämiezellen
und MIP-1 α /IL-2 oder MIP-1 α /GM-CSF produzierenden
Fibroblasten**

**Vergleich der Effektivität beider Zytokinkombinationen und
Charakterisierung der zellulären Mediatoren der
Immunantwort**

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

Vorgelegt von

Stefan Balzer

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. M. Raab, Dekan

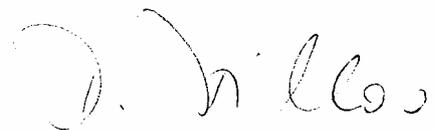
Referentin: Priv.-Doz. Dr. Dilloo

Korreferent: Prof. Dr. Gattermann

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Die akute lymphatische Leukämie im Kindesalter.....	2
1.2 Immuntherapeutische Behandlungsansätze.....	2
1.3 Leukämievakzinen als immunologische Therapieoption	4
1.4 Vakzination mit gentechnisch veränderten Leukämiezellen	5
1.4.1 Stimulation des efferenten Armes: Direkte T-Zell-Aktivierung.....	6
1.4.2 Stimulation des afferenten Armes: T-Zell-Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen (cross-priming).....	6
1.5 Die Rolle von Chemokinen in Vakzinationskonzepten	7
1.5.1 Macrophage Inflammatory Protein 1 α (MIP-1 α).....	8
1.6 Generierung einer Leukämievakzine durch differentielle Kombination von Zytokinen mit dem Chemokin MIP-1 α	8
1.6.1 Kombination von MIP-1 α mit IL-2: Stimulation des efferenten Arms.....	9
1.6.2 Kombination von MIP-1 α mit GM-CSF: Stimulation des afferenten Arms	11
1.7 Murines Vakzinationsmodell	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Mausmodell.....	12
2.2 Zelllinien	12
2.3 Kultivierung von retroviral transduzierten Zelllinien.....	13
2.4 Untersuchung der chemotaktischen Effekte der Vakzinekombinationen <i>in vivo</i>	13
2.4.1 Immunhistochemische Färbungen.....	14
2.5 Effekt der Vakzine bei bestehender Leukämie <i>in vivo</i>	15
2.6 Depletion einzelner T-Zell-Populationen <i>in vivo</i>	17
2.7 Untersuchung von Effektorzellen in den Milzen vakzinierter Mäuse.....	18
2.7.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Effektorzellpopulationen	19
2.7.2 Zytotoxizität der Milzzellen vakzinierter Mäuse <i>in vitro</i>	20
2.8 Adoptiver Transfer der Milzzellen.....	20
2.9 Statistische Analyse	20
3 Ergebnisse	21
3.1 MIP-1 α in Kombination mit IL-2 oder GM-CSF führt zu einer verstärkten T-Zell-Infiltration der Vakzinestelle	21
3.2 Die Behandlung mit den MIP-1 α Kombinationsvakzinen inhibiert das Wachstum leukämischer Tumore <i>in vivo</i>	23
3.3 Die MIP-1 α +IL-2 und die MIP-1 α +GM-CSF Vakzinekombinationen führen zu einem längeren Überleben	25
3.4 In Milzen der mit MIP-1 α +IL-2 oder MIP-1 α +GM-CSF behandelten Tiere können vermehrt aktivierte T-Zellen nachgewiesen werden	27
3.5 Die Vakzinierung mit MIP-1 α +IL-2 oder MIP-1 α +GM-CSF stimuliert die antileukämische zytotoxische Aktivität.....	29
3.6 Die Wirkungen der MIP-1 α +IL-2 und der MIP-1 α +GM-CSF Vakzine werden durch unterschiedliche Effektorzellen vermittelt.....	30
3.7 Adoptiver Transfer immunkompetenter Milzzellen.....	34
4 Diskussion.....	36
Literatur.....	43

Zusammenfassung

Obwohl die Prognose von Kindern, die an einer Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) leiden, durch die Weiterentwicklung interdisziplinärer Therapiekonzepte in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert wurde, stellen therapierefraktäre Erkrankungen weiterhin eine therapeutische Herausforderung dar. Als ergänzendes immuntherapeutisches Behandlungskonzept werden Vakzinationsstrategien entwickelt, deren Ziel die Induktion einer spezifischen antileukämischen Immunantwort ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal das Chemokin Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α) im Rahmen einer Leukämievakzine verwendet. MIP-1 α wurde mit den Zytokinen Interleukin-2 (IL-2) bzw. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) kombiniert und die Effektivität der Vakzine in einem murinen ALL-Modell untersucht. Dabei wurden zur Produktion der Zytokine genetisch modifizierte Fibroblasten als Bystanderzellen eingesetzt und zusammen mit sublethal bestrahlten Leukämiezellen injiziert. Durch die subkutane Injektion der Vakzinezellen, die MIP-1 α in Kombination mit IL-2 bzw. GM-CSF produzierten, konnte in Mäusen mit vorbestehender leukämischer Erkrankung das Wachstum leukämischer Tumore verlangsamt und die Überlebenszeit signifikant verbessert werden. Die Effekte der MIP-1 α +IL-2 Vakzine wurden dabei vor allem durch CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen vermittelt. Durch die MIP-1 α +GM-CSF-Vakzine, die in ihrer Wirkung der MIP-1 α +IL-2 Vakzine überlegen war, wurden vor allem professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) aktiviert, die ihrerseits durch cross-priming-Effekte eine dauerhafte Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bewirkten. Eine Vakzination mit subletal bestrahlten Vakzinezellen, die MIP-1 α in Kombination mit GM-CSF produzieren, könnte in Zukunft eine zusätzliche Therapieoption für bisher therapierefraktäre Leukämieerkrankungen darstellen.



1 Einleitung

1.1 Die akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

Die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter sind Neoplasien, die sich von der lymphatischen Blutzellreihe ableiten. Dazu zählen die akute lymphatische Leukämie (ALL), die mit 35% die häufigste aller bösartigen Erkrankungen im Kindesalter darstellt, sowie die malignen Lymphome, die 12 % ausmachen. Die Prognose ist durch die Weiterentwicklung der Therapiekonzepte in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert worden. Etwa 80% aller Kinder, die an einer ALL leiden, können heute durch eine Polychemotherapie alleine oder in Kombination mit Radiotherapie geheilt werden^{1,2}. Im Falle einer primär therapierefraktären ALL oder in der Rezidivtherapie steht als weitere bewährte Therapieoption die allogene Blutstammzelltransplantation zur Verfügung, mit der bei etwa der Hälfte der betroffenen Patienten eine Heilung erreicht werden kann³⁻⁵.

Die Wirkung der allogenen Blutstammzelltransplantation erklärt sich nicht allein durch die zytotoxische Wirkung der zur Konditionierung eingesetzten Chemo- und Radiotherapie sondern auch durch die immunologische Kontrolle der Leukämie durch die transplantierten Spenderzellen, welche als Graft versus Leukemia (GvL) Effekt bezeichnet wird⁶. Für diese immunologische Kontrolle spielen T-Lymphozyten eine ganz entscheidende Rolle. So ist die Transplantation T-Zell-depletierter Stammzellen mit einem höheren Risiko eines Rezidivs nach erfolgter allogener Stammzelltransplantation verbunden^{7,8}.

1.2 Immuntherapeutische Behandlungsansätze

Die Möglichkeit, daß eine Immunantwort gegen Leukämiezellen ausgebildet werden kann, ist durch den GvL-Effekt hinreichend belegt. Die Immunantwort gegen Leukämiezellen zu steigern und therapeutisch zu nutzen, ist daher ein naheliegender Ansatz. Im Wesentlichen sind hierzu drei Ansätze denkbar:

- Adoptive Immuntherapie: Vermittlung einer antileukämischen Immunantwort durch die Applikation von Immuneffektorzellen, die auch die Leukämiezellen als fremd erkennen.
- Stimulation von Immuneffektorzellen durch systemische Gabe von Zytokinen. Die systemische Therapie mit Zytokinen führt zu einer Antigen-unspezifischen Effektorzell-Stimulation und Immunantwort.

- Verbesserung der Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) zur Auslösung einer Antigen-spezifischen Immunantwort und Expansion antileukämischer Effektorzellen *in vivo*.

Im Falle der chronisch myeloischen Leukämie wurde die Applikation von Spender-Lymphozyten, die sogenannte Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI), zur adoptiven Immuntherapie von Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation bereits klinisch etabliert. Durch Gabe von Lymphozyten des ursprünglichen Stammzellspenders können bis zu 70% der Patienten mit einem CML-Rezidiv in der chronischen Phase erneut in Remission gebracht werden⁹. Bei ALL-Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation ist das Ansprechen auf DLI mit einem Langzeitüberleben von 15% jedoch deutlich geringer¹⁰. Dies mag mit der hohen Proliferationskapazität von ALL-Blasten zusammenhängen, da auch bei CML-Rezidiven in der akzelerierten Phase eine DLI-Therapie deutlich seltener erfolgreich ist. Zudem sind ALL-Blasten deutlich weniger immunogen als Blasten einer CML.

Ein weiterer immuntherapeutischer Ansatz der Leukämie-Behandlung ist die Gabe des T-Zell-Aktivators Interleukin-2 (IL-2). Die systemische Applikation von IL-2 hat eine verbesserte Effektorzellantwort durch die Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen zum Ziel. *In vitro* können durch IL-2 T-Zellen aktiviert und zum anderen sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) generiert werden^{11,12}. Diese Aktivierung erfolgt unabhängig von spezifischen Antigenen. Durch IL-2 ausgelöste Immunantworten sind somit nicht Antigen-spezifisch sondern generalisiert. Die systemische Gabe von IL-2 selbst in hohen Dosierungen hat in der klinischen Anwendung insbesondere bei den akuten Leukämien bei nur geringem therapeutischem Nutzen ausgeprägte systemisch-toxische Wirkungen zur Folge^{13,14}.

Während die Donor-Lymphozyten-Gaben und die systemischen Therapie mit IL-2 zur Immuntherapie von Leukämien in klinischen Protokollen geprüft wurden, sind verschiedene Vakzinationskonzepte unter Verwendung genetisch veränderter Vakzinezellen *in vitro* entwickelt und in Tiermodellen geprüft worden¹⁵⁻²¹. Sie alle haben das Ziel, durch adäquate Antigenpräsentation eine verbesserte T-Zell-Stimulation zu erreichen und damit eine spezifische antileukämische Immunantwort durch Stimulation und Expansion leukämiespezifischer Effektorzellen auszulösen.

1.3 Leukämievakzinen als immunologische Therapieoption

Eine Reihe unterschiedlicher Antigene, die als Ziel-Antigene für eine antileukämische Immunantwort dienen können, wurden bereits identifiziert. Dazu gehören u.a. Fusionsprodukte leukämiespezifischer chromosomaler Translokationen, wie z.B. bcr-abl^{15,22,23}, Antigene, die von Leukämiezellen deutlich überexprimiert werden, wie z.B. human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)^{24,25} und Antigene, die ausschließlich von verschiedenen malignen Zellen, aber nicht von normalem Gewebe exprimiert werden, wie z.B. das anti-apoptotische Protein Survivin²⁶⁻²⁸.

Obwohl B-ALL-Blasten als Vorläufer von B-Zellen in hohem Maße MHC-Moleküle exprimieren und daher grundsätzlich in der Lage sind, diese Antigene in ausreichendem Maße zu präsentieren, entkommen sie trotzdem immer wieder den Überwachungsmechanismen des körpereigenen Immunsystems. Dies wird darauf zurückgeführt, daß ihnen die kostimulatorischen Signalmoleküle fehlen, die zur T-Zell-Aktivierung erforderlich sind. Zur Auslösung einer effektiven T-Zell-Antwort sind grundsätzlich zwei Signale erforderlich²⁹.

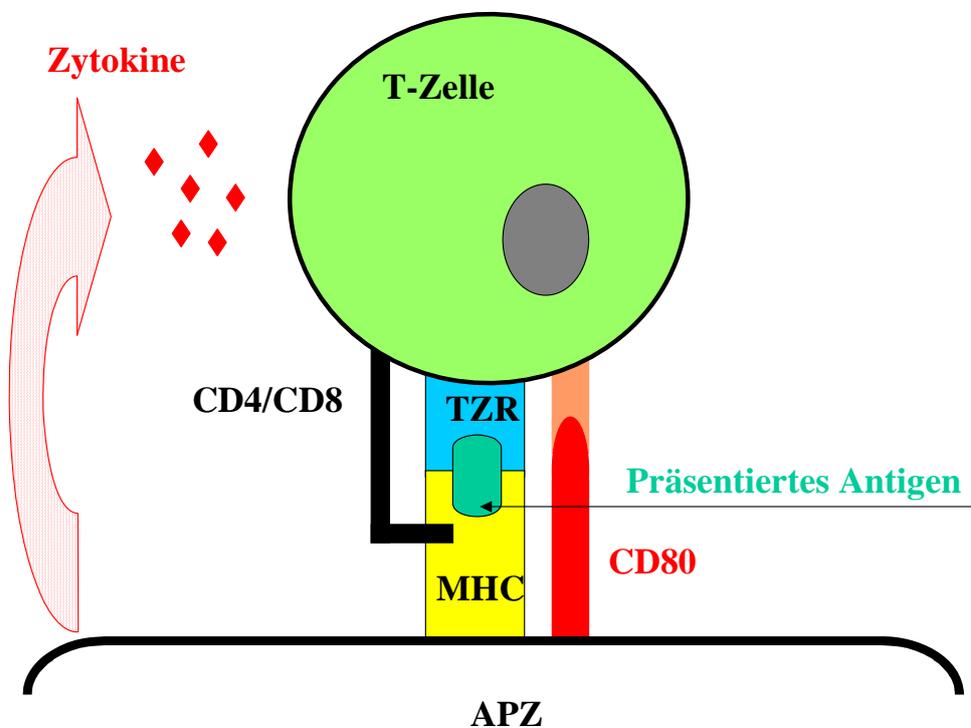


Abb. 1.1: T-Zell-Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen (APZ)

Zur Aktivierung sind neben dem von MHC-Molekülen präsentierten Antigen kostimulatorische Oberflächenmoleküle bzw. Zytokine als zweites Signal erforderlich.

Das erste Signal besteht aus einem spezifischen Antigen, das in Kombination mit dem MHC-Komplex den T-Zellen präsentiert und von ihnen erkannt wird. Zur Aktivierung der T-Zelle gegen das erkannte Antigen wird jedoch noch ein zweites Signal benötigt. Es kann durch kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80 oder CD40L oder stimulatorische Zytokine wie z.B. dem T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2³⁰⁻³² vermittelt werden. Eine Aktivierung des T-Zell-Rezeptors durch das passende Antigen ohne ein zusätzliches Aktivierungssignal hat wiederum eine antigen-spezifische Anergie der T-Zelle und damit eine immunologische Toleranz gegenüber dem betreffenden Antigen zur Folge³³.

1.4 Vakzination mit gentechnisch veränderten Leukämiezellen

Um eine effektive antileukämische Immunantwort auslösen zu können, müssen die Zellen einer Leukämievakzine also einerseits spezifische Antigene auf MHC-Molekülen präsentieren und gleichzeitig die benötigten kostimulatorischen Signalmoleküle als Aktivierungssignal liefern. Eine Möglichkeit, die Fähigkeit der Leukämiezellen zur Antigenpräsentation zu verbessern, besteht darin, Leukämiezellen *in vitro* mit Genen, die für kostimulatorische Moleküle kodieren, zu transduzieren^{11,17,19,34,35}. Ziel der gentechnischen Modifikation der Leukämiezellen ist, durch serielle Injektionen dieser Vakzinezellen eine systemische antileukämische Immunantwort auszulösen. Die Wirksamkeit solcher Vakzinationsstrategien ist sowohl in mehreren murinen Modellen solider Tumoren^{36,37} als auch in einigen Leukämie modellen^{16,19,34,35} überprüft worden. Erste klinische Studien prüfen Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Impfung mit transduzierten Vakzinezellen vor allem bei Patienten mit soliden Tumoren^{38,39}. Die gentechnische Veränderung primärer humaner B-ALL-Zellen ist mit den derzeit für die klinische Anwendung zugelassenen Vektoren und aufgrund der schwierigen Kultivierbarkeit von ALL-Blasten technisch äußerst schwierig. In verschiedenen Vakzinationsmodellen werden daher statt der malignen Zellen sogenannte Bystanderzellen mit den Genen für die kostimulatorischen Moleküle transduziert und zur Vakzination verwendet. Als Bystanderzellen eignen sich z.B. syngene Fibroblasten^{16,40}, da diese einfacher zu kultivieren und gentechnisch zu modifizieren sind. Die veränderten Fibroblasten, welche die entsprechenden immunstimulatorischen Moleküle produzieren, werden dann zur Herstellung der Vakzine mit den entsprechenden nativen Leukämiezellen gemischt, die ihre spezifischen Antigene an der Vakzinestelle präsentieren. Bei der Vakzinierung mit genetisch veränderten Vakzinezellen werden zur Stimulation des Immunsystems vor allem zwei Strategien verfolgt: die Stimulation des afferenten und des efferenten Arms der antineoplastischen Immunantwort.

1.4.1 Stimulation des efferenten Armes: Direkte T-Zell-Aktivierung

Hierzu werden in die malignen Zellen, bzw. in die entsprechenden Bystanderzellen die Gene für die fehlenden kostimulatorische Oberflächenmoleküle oder Zytokine zur T-Zell-Aktivierung eingebracht. Zur Stimulation des efferenten Arms der Immunabwehr erfolgt die direkte T-Zell-Aktivierung durch die Vakzinezellen am Ort der Injektion. Die Zellen der Vakzine präsentieren die spezifischen Tumor- oder Leukämie-Antigene und liefern zusätzlich die benötigten kostimulatorischen Signale für die Aktivierung der Effektorzellen. Eine Reihe von Tumorzellvaccineversuchen wurden nach dieser Strategie konzipiert. In die zur Vakzinierung eingesetzten malignen Zellen wurden die Gene für kostimulatorische Oberflächenproteine, z.B. CD80⁴¹ oder CD40L^{17,35}, oder Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-7, IL-12 oder TNF- α ^{16,36,42-44} eingebracht.

1.4.2 Stimulation des afferenten Armes: T-Zell-Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen (cross-priming)

Ein alternativer Ansatz ist die Stimulation des afferenten Armes des Immunsystems. Die T-Zell-Aktivierung durch die Vakzinezellen erfolgt hier durch Freisetzung von Zytokinen, wie z.B. Granulozyten-Macrophagen-Koloniestimulierendes Faktor (GM-CSF) und bewirkt eine Aktivierung professioneller Antigenpräsentierender Zellen (APZ). Diese nehmen spezifische Antigene aus zugrundegegangenen malignen Zellen auf, migrieren in die drainierenden Lymphknoten, präsentieren die Antigene dann zusammen mit den nötigen kostimulatorischen Signalen und induzieren so die antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung, ein Vorgang, der als cross-priming bezeichnet wird. Die hierbei wichtigste Population professioneller antigenpräsentierender Zellen sind die dendritischen Zellen, da sie in besonderer Weise geeignet sind, aufgrund der hohen Dichte von MHC- und kostimulatorischen Molekülen auch naive T-Zellen zu aktivieren⁴⁵. In Vakzineansätzen, die eine T-Zell-Aktivierung über cross-priming zum Ziel haben, wird vor allem das Zytokin GM-CSF verwendet^{20,21,46}. GM-CSF hat eine chemotaktische Wirkung auf dendritische Zellen und induziert ihre Ausreifung und kann damit eine verstärkte Präsentation relevanter Antigene bewirken⁴⁵.

Obwohl GM-CSF in mehreren klinischen Vakzinationsstudien zur Behandlung solider Tumoren erfolgreich eingesetzt wurde, zeigte es in murinen Leukämie-Modellen als Einzelsubstanz nur dann eine ausreichende Wirkung, wenn eine sehr hohe Vakzinezelldosis appliziert wurde, so daß die Anzahl der Vakzinezellen die der residuellen Leukämiezellen

stark überschritt^{20,21,47-50}. Daher war es in der Mehrzahl der Untersuchungen zur Effektivität einer GM-CSF Vakzine in Leukämie-Modellen erforderlich, GM-CSF mit einem zweiten kostimulatorischen Molekül zu kombinieren. In Kombination mit weiteren kostimulatorischen Signalen hat sich das GM-CSF im Hinblick auf die Induktion einer protektiven antileukämischen Immunantwort dann jedoch als ausgesprochen effektiv erwiesen^{16,34,51}.

1.5 Die Rolle von Chemokinen in Vakzinationskonzepten

Eine weitere Gruppe von Immunmodulatoren, die im Rahmen von Vakzinationsansätzen von Interesse sind, sind die Chemokine. Damit eine effektive antineoplastische Immunantwort durch Aktivierung von T-Zellen oder APZ ausgelöst werden kann, müssen diese zunächst in ausreichender Anzahl an der Vakzinestelle vorhanden sein. Bei Entzündungsreaktionen dirigieren physiologischerweise chemotaktische Moleküle, sogenannte Chemokine, die verschiedenen Immuneffektorzellen an den Ort einer Entzündung und bewirken die Migration von antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe⁵²⁻⁵⁵. Auch in verschiedenen Tumorkvakzineversuchen konnte gezeigt werden, dass Chemokine, wie z.B. Lymphotaktin, verschiedene Immuneffektorzellen an den Ort der Vakzineinjektion locken können, um sie so mit den spezifischen Antigenen und stimulatorischen Signalen in Kontakt zu bringen^{16,56-58}. Bisher sind mehr als 50 Chemokine und etwa 20 Chemokinrezeptoren identifiziert worden⁵⁹. Sie werden entsprechend der Position gemeinsamer Cysteinreste in der Aminosäuresequenz in α -Chemokine (C-X-C) und β -Chemokine (C-C) eingeteilt⁵⁹. Die Chemokine Lymphotaktin (C)⁶⁰ und Fraktalkin (C-X-3-C)⁶¹ sind die jeweils einzigen Moleküle zweier weiterer Chemokinfamilien. Die α -Chemokine wirken in erster Linie auf Neutrophile, wobei einige, wie z.B. das IL-8⁶² oder das Interferon-inducible protein 10 (IP-10)⁶³ auch auf T-Zellen chemotaktisch wirken. Die Moleküle der β -Chemokinfamilie wirken vor allem auf Monozyten und auf Lymphozyten⁶⁴. Lymphotaktin, das einzige Chemokin der C-Gruppe ist ein T- und NK-Zell-spezifisch wirkendes Chemokin^{60,65}.

Die synergistische Wirkung einer Chemokin/Zytokin Kombination zur Auslösung einer antileukämischen Immunantwort konnte für das Chemokin Lymphotaktin nachgewiesen werden¹⁶. Durch Vakzinierung mit einem Gemisch aus lymphoblastischen A20-Zellen und Fibroblasten, welche Lymphotaktin und den T-Zellaktivator IL-2 produzierten, ließ sich das Wachstum leukämischer Tumore in Mäusen unterdrücken und das Überleben der Tiere verbessern.

1.5.1 Macrophage Inflammatory Protein 1 α (MIP-1 α)

Während sich die chemotaktischen Effekte des Lymphotaktins vorwiegend auf T-Lymphozyten und NK-Zellen beschränken, ist das Chemokin Macrophage Inflammatory Protein 1 α (MIP-1 α) ein Molekül, welches verschiedene relevante Effektorzellpopulationen und antigenpräsentierende Zellen anziehen kann. Aufgrund dieser pleiotropen Wirkung ist MIP-1 α für die Generierung von Vakzinen von besonderem Interesse. Durch seine chemotaktische Wirkung auf T-Zellen und professionelle APZ könnte es in entsprechenden Versuchen sowohl eine direkte T-Zell-Aktivierung am Vakzineort als auch eine Wirkung über cross-priming-Effekte unterstützen.

MIP-1 α ist ein Chemokin der β - oder C-C Chemokin-Familie, zu der auch die Chemokine MIP-1 β , RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) gehören. MIP-1 α übt seine chemotaktische Aktivität auf Monozyten^{64,66} und dendritische Zellen⁶⁷ sowie auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten⁶⁸⁻⁷⁰, NK-Zellen^{71,72}, Eosinophile⁷³ und in geringerem Maße auf Basophile⁷⁴ über die Rezeptoren CCR1 und CCR5^{75,76} aus. Auf NK-Zellen und Monozyten wirkt MIP-1 α nicht nur chemotaktisch, es kann diese auch direkt aktivieren^{64,66,71}.

1.6 Generierung einer Leukämievakzine durch differentielle Kombination von Zytokinen mit dem Chemokin MIP-1 α

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effektivität einer Leukämievakzination mit Leukämiezellen und Fibroblasten, die das Chemokin MIP-1 α zusammen mit den Zytokinen IL-2 oder GM-CSF produzieren. Als murines Modell einer akuten lymphatischen Leukämie bzw. eines hochmalignen B-Zell-Lymphoms diente die lymphoblastische Zelllinie A20. Zur Vakzineherstellung wurde MIP-1 α einerseits mit IL-2 und in einem weiteren Ansatz mit GM-CSF kombiniert. Dabei wurden die Gene für MIP-1 α und die beiden beteiligten Zytokine IL-2 und GM-CSF nicht direkt in die syngenen Leukämiezellen eingebracht, sondern, wie bereits beschrieben, in syngene Fibroblasten, die gemeinsam mit den Leukämiezellen als Vakzine verabreicht wurden. Diese wurden zur Herstellung der Vakzine mit autologen nach Bestrahlung nicht mehr teilungsfähigen Leukämiezellen zur Bereitstellung spezifischer Leukämieantigene gemischt.

1.6.1 Kombination von MIP-1 α mit IL-2: Stimulation des efferenten Arms

Bei der ersten hier untersuchten Vakzinekombination sollte die chemotaktische Wirkung von MIP-1 α auf T-Zellen ausgenutzt werden. Zur direkten Aktivierung der angelockten T-Zellen an die Vakzinationsstelle wurde MIP-1 α mit dem Zytokin IL-2 kombiniert.

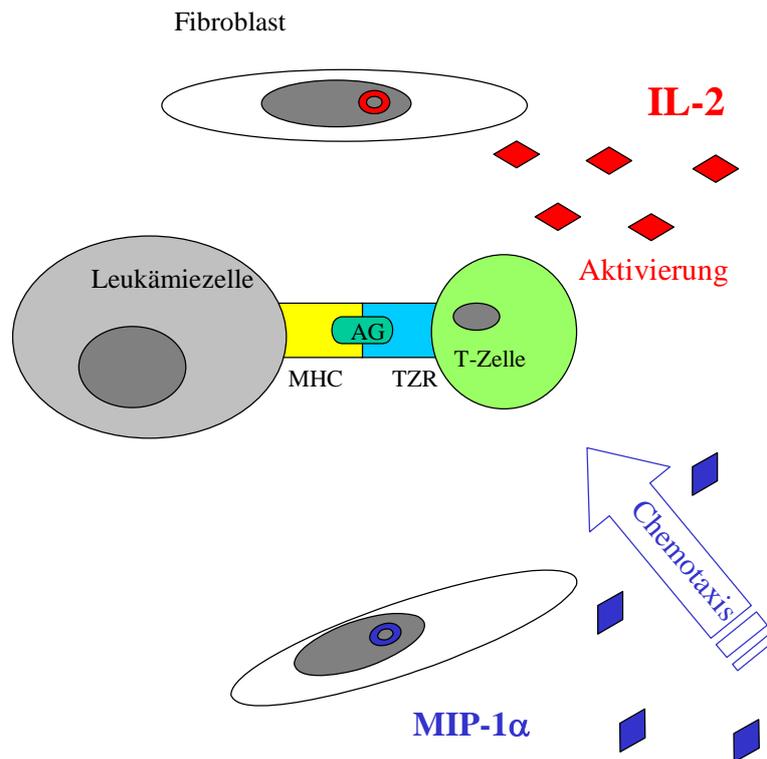


Abb. 1.2: Postulierte Wirkungsweise einer MIP-1 α /IL-2 Vakzine:

T-Zellen werden durch die parakrine Sekretion von MIP-1 α an den Vakzineort dirigiert und dort durch das in Kombination mit dem sezernierten IL-2 präsentierte leukämiespezifische Antigen aktiviert.

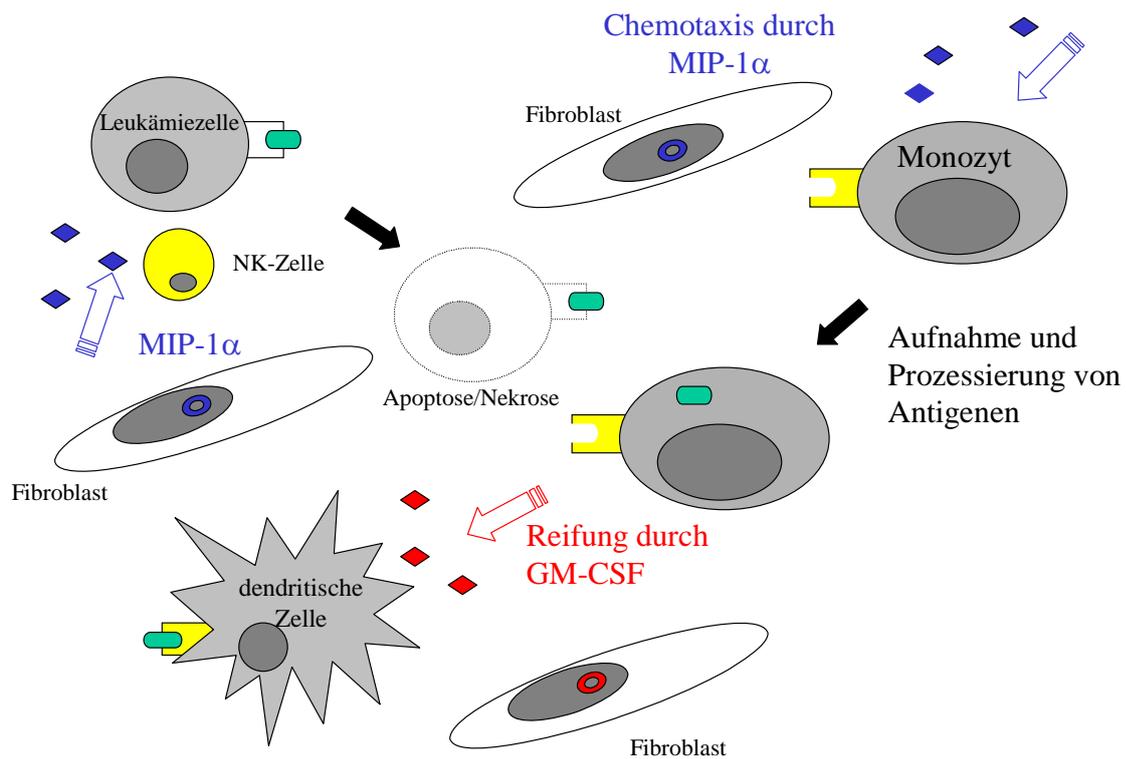


Abb. 1.3: Postulierte Wirkungsweise der MIP-1 α /GM-CSF Vakzine:

Durch die parakrine Sekretion von MIP-1 α werden Monozyten zum Vakzinationsort dirigiert. GM-CSF bewirkt ihre Ausreifung zu dendritischen Zellen nach der Aufnahme leukämie-spezifischer Antigene. Diese migrieren dann in drainierende Lymphknoten und bewirken dort eine leukämie-spezifische T-Zell-Aktivierung.

1.6.2 Kombination von MIP-1 α mit GM-CSF: Stimulation des afferenten Arms

Die Kombination von MIP-1 α mit GM-CSF hat die Stimulation des afferenten Armes des Immunsystems, also der professionellen APZ, zum Ziel. Die erforderliche T-Zell-Aktivierung soll hier indirekt durch cross-priming erfolgen. Diesem Ansatz lag vor allem der chemotaktische Effekt von MIP-1 α auf Monozyten und dendritische Zellen zugrunde.

Das Zytokin GM-CSF soll eine Differenzierung der monozytoiden Vorläuferzellen nach Aufnahme von Leukämie-spezifischen Antigenen zu dendritischen Zellen bewirken. Unter der Vorstellung, dass diese dann in die drainierenden Lymphknoten einwandern, um dort eine spezifische antileukämische T-Zell-Aktivierung zu erzeugen.

1.7 Murines Vakzinationsmodell

Mittels zwei verschiedener in der Literatur beschriebener Tumorzellvakzinationsmodelle werden unterschiedliche Vorgehensweisen der Vakzineapplikation hinsichtlich ihrer Wirkung überprüft.

Bei den klassischen *Vakzinationsmodellen* wird zunächst die Vakzine verabreicht und dann die Versuchstiere mit der Injektion von Tumorzellen belastet. Derartig konzipierte Versuche machen Aussagen über die protektive Wirkung der Vakzine auf ein Auswachsen der nachträglich applizierten Tumorzellen möglich. Um die Wirksamkeit der Vakzine bei vorhandener Resterkrankung zu überprüfen, wird in den sogenannten *Behandlungsmodellen* die Vakzine erst nach Injektion der Tumorzellen verabreicht. Die Behandlungsmodelle erfordern in der Regel eine stärkere Immunogenität der Vakzinezellen und stellen daher die stringenter Form der Vakzineprüfung dar. Parameter zur Überprüfung der Wirksamkeit einer Vakzine sind die klinische Beobachtung der Proliferation maligner Zellen und das Überleben nach Tumorzellbelastung.

In der vorliegenden Arbeit sind die Leukämiezellen durch eine subkutane Injektion verabreicht worden. Die subkutane Applikation der Leukämiezellen erlaubt durch das Auswachsen eines subkutanen Tumors ein einfaches Monitoring der Inhibition der Leukämiezellproliferation. Für ein valides Leukämiemodell ist jedoch zusätzlich die zügige systemische Aussaat der Blasten zu fordern, um die Systemerkrankung nachzustellen. Dies ist bei den A20-Zellen, einer hochproliferativen prä-B-lymphoblastischen Zelllinie der Fall^{21 77,78}.

2 Material und Methoden

2.1 Mausmodell

Die Tierversuche wurden mit weiblichen BALB/cBYJ Mäusen durchgeführt, welche zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns 11-13 Wochen alt waren. Die Mäuse wurden in der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet.

Die A20-Leukämiezellen und die Fibroblasten der Zelllinie Cl7.1, die als Bystanderzellen eingesetzt wurden, stammen aus BALB/c Mäusen. Das im Folgenden beschriebene murine Modell ist daher ein syngenes System.

2.2 Zelllinien

Sowohl die A20-Zelllinie als auch die Fibrosarkomlinie CL7.1, wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) erworben. Die Zelllinie A20 entstammt einem spontan entstandenen Tumor und besteht aus prä-B-Lymphomzellen^{77,78}. Sie exprimiert CD45R (B220), CD19, Heat Shock Antigen und Oberflächen-Immunglobuline. CD43 wird nicht exprimiert. Nach dem Antigen-Expressionsmuster zeigt die Zelllinie A20 daher eine prä-B-lymphoblastische Differenzierung. A20-Zellen zeigen *in vivo* eine schnelle Disseminierung in lymphatische Organe und das Knochenmark²¹ und eignen sich daher als murines Modell einer prä-B-ALL. Für die Zellkultur wurde das Medium RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) verwendet. Das Medium enthielt 10% fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin). Außerdem wurden 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin) sowie 0,5 mM β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Als Bystanderzellen für die Vakzine wurde die Fibrosarkomlinie CL7.1 verwendet. Die Fibroblasten wurden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (4,5 d/l D-Glucose, Biochrom, Berlin) verwendet. Dem Medium wurden 10% fetales Kälberserum, 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin zugesetzt.

2.3 Kultivierung von retroviral transduzierten Zelllinien

Nach retroviraler Transduktion exprimieren die zur Vakzineherstellung eingesetzten CL7.1 Zelllinien stabil murines MIP-1 α , murines GM-CSF oder humanes IL-2, welches aufgrund der ausgeprägten strukturellen Homologie zu murinem IL-2 auch im murinen Modell wirksam ist. Die erfolgreich transduzierten Zellen, die alle zusätzlich das Neomycin Phosphotransferase Gen (Neo[®]) exprimierten, wurden über mehrere Wochen durch Zugabe von 1 μ g/ml G418 (Gibco, Eggenstein) zum Kulturmedium selektioniert. Zur quantitativen Bestimmung der Zytokinproduktion wurden jeweils 10⁶ Zellen für 24h inkubiert. Die Konzentration der produzierten Zytokine wurde dann mit dem IL-2 Eli-pair ELISA (Diaclone, Besancon, Frankreich) dem mouse MIP-1 α und GM-CSF Quantikine[™] ELISA (R&D Systems, Abingdon, UK) in den Überständen gemessen. Die Konzentrationen betragen 8 ng/ml IL-2, 2 ng/ml GM-CSF und 35 ng/ml MIP-1 α .

2.4 Untersuchung der chemotaktischen Effekte der Vakzinekombinationen *in vivo*

In einem ersten Schritt soll die chemotaktische Wirkung der verwendeten Vakzinekombinationen auf immunkompetente Zellen *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde den Mäusen eine subkutane Injektion von 10⁵ A20-Zellen und 2x10⁵ Fibroblasten, die MIP-1 α und IL-2, MIP-1 α und GM-CSF oder nur das Neo[®]-Gen exprimierten, in 200 μ l PBS verabreicht. Vor der Injektion wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde den Mäusen mit 1 ml Tuberkulinspritzen und Stahlkanülen der Größe 26 Gauge (Braun, Melsungen) subkutan in die Flanke injiziert. Das subkutane Wachstum der injizierten Tumorzellen wurde beobachtet. Bei einer Tumorgröße von etwa 8 mm² wurden die Tiere getötet. Die Tumoren wurden entnommen und mittels immunhistochemischer Färbungen auf infiltrierende Effektorzellen untersucht.

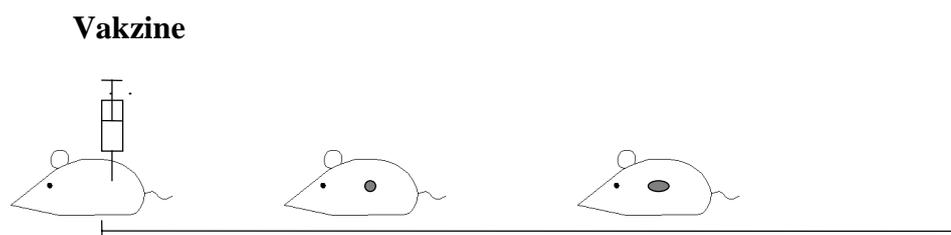


Abb. 2.1 Wachstum subkutaner Tumoren an der Vakzinationsstelle

2.4.1 Immunhistochemische Färbungen

Die im Tierversuch entnommenen Tumoren wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt. An einem Gefriermikrotom wurden $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, in Aceton fixiert und luftgetrocknet. Es folgte die immunhistochemische Färbung nach der APAAP (Alkalische Phosphatase-anti Alkalische Phosphatase)-Technik⁷⁹. Als primäre Antikörper wurden folgende monoklonale Antikörper aus der Ratte eingesetzt: CD4.1 (anti CD4) und CD8.2 (anti CD8). Beide Hybridome wurden freundlicherweise von Dr. J. Mysliwietz, GSF Nationales Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München, zur Verfügung gestellt. Zuerst wurden die Schnitte mit einer Lösung aus 5% normalem Rattenserum (DAKO, Neuss) in „Antibody Diluent With Background Reducing Components“ (DAKO, Neuss) inkubiert. Je $200\ \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden auf jeden Schnitt pipettiert und dieser dann in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch diese Proteinlösung mit normalem Rattenserum sollten unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert und so eine Hintergrundfärbung verhindert werden. Nach 30-minütiger Inkubation wurde der Überstand mit 1 molarer TBS-Lösung (DAKO, Neuss) abgespült.

Die primären Antikörper wurden in einer Konzentration von $250\ \text{ng}/\mu\text{l}$ in 1molarer TBS gelöst eingesetzt. Diese Konzentration hatte sich in Vorversuchen als optimal für die beiden Antikörper herausgestellt. Je $200\ \mu\text{l}$ dieser Antikörperlösung wurden auf die Schnitte pipettiert und diese wieder für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und nicht gebundene Antikörper mit TBS abgespült. Als Sekundärantikörper wurde ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Ratten-Immunglobuline eingesetzt (Rabbit anti Rat-Ig; DAKO, Neuss), der im Verhältnis 1:50 in TBS verdünnt war. Jeder Schnitt wurde mit $200\ \mu\text{l}$ der Antikörperlösung für 30 Minuten inkubiert und dann mit TBS abgespült. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit dem APAAP-Komplex (DAKO, Neuss). Dieser besteht aus alkalischer Phosphatase und einem monoklonalen Antikörper aus der Ratte, der gegen diese alkalische Phosphatase gerichtet ist. Beide bilden einen festen Komplex. Das Ratten-Immunglobulin wird von dem gebundenen Sekundärantikörper erkannt und ebenfalls gebunden. Der APAAP-Komplex wurde 1:50 in TBS verdünnt. Wieder wurden $200\mu\text{l}$ der Lösung auf jeden Objektträger pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in der feuchten Kammer mit TBS abgespült. Es folgte die Zugabe von des Farbstoffsubstrates Fuchsin Red (DAKO, Neuss). $200\ \mu\text{l}$ wurden auf jeden Objektträger pipettiert. An den Stellen, an denen der Primärantikörper und somit auch Sekundärantikörper und APAAP-Komplex gebunden waren, wurde das Substrat zu einem

festen roten Farbniederschlag umgesetzt. Das nicht verbrauchte Substrat wurde nach 30 Minuten mit TBS abgespült. Die Präparate wurden 60 Sekunden in Hämalaun (Sigma, Deisenhofen) gegengefärbt, dann für 15 Minuten gewässert und schließlich in Glyceringelatine eingedeckt.

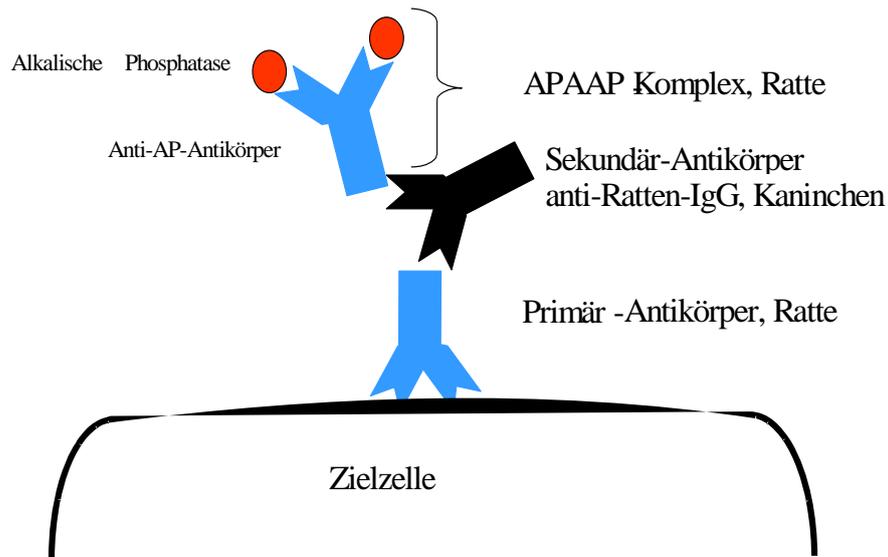


Abb. 2.2: Prinzip der APAAP-Färbung

Die Zielstruktur wird durch den Primär-Antikörper (Ratte) erkannt. Der Sekundärantikörper (Kaninchen) bindet an den Primär-Antikörper und an den im dritten Schritt zugeführten APAAP-Komplex. Durch die gebundene alkalische Phosphatase wird anschließend ein Farbstoffsubstrat umgesetzt.

2.5 Effekt der Vakzine bei bestehender Leukämie *in vivo*

In dem nachfolgend beschriebenen Therapiemodell wird die Wirkung der Vakzinekombinationen auf eine bereits bestehende Leukämie *in vivo* untersucht. Dieses Modell wurde bereits für die Vakzinierung mit Lymphotaktin und IL-2 beschrieben¹⁶ und berücksichtigt die klinische Situation der Minimal Residual Disease. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen am Tag des Versuchsbeginns eine Injektion von 10^5 A20-Zellen in 200 μ l PBS subkutan in die Flanke verabreicht. Nach vier Tagen erhielten die Mäuse die subkutane Injektion der subletal bestrahlten Vakzinezellen, jeweils 10^5 A20-Zellen und 2×10^5 Fibroblasten. Am Tag 14 nach Inokulation der A20-Leukämiezellen wurde die subkutane Vakzineinjektion wiederholt.

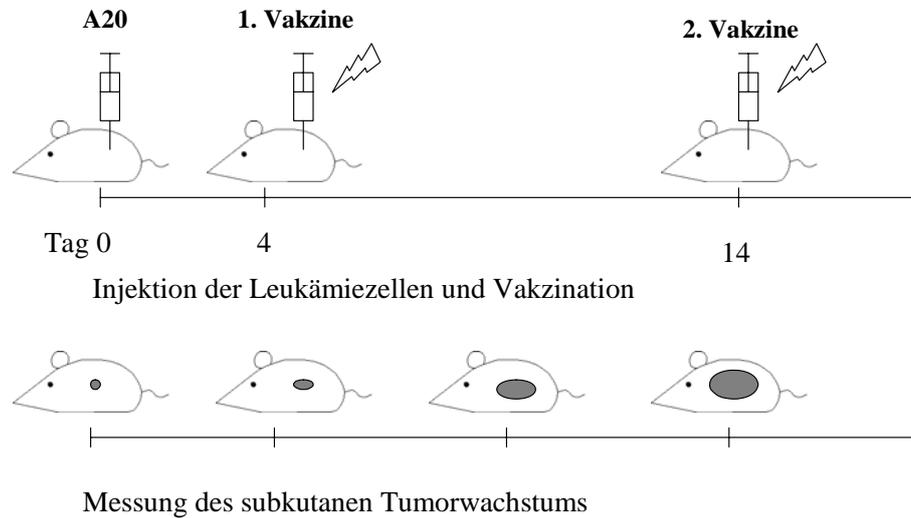


Abb. 2.3 Behandlungsmodell

Zunächst wurden die Leukämiezellen subkutan injiziert. Nach 4 Tagen erfolgte die Injektion der bestrahlten Vakzinezellen. In diesem *Behandlungsmodell* wird die Effektivität der Vakzine bei einer vorbestehenden Leukämie untersucht.

Die Mäuse der ersten Versuchsgruppe erhielten eine Vakzine, die aus A20-Zellen und MIP-1 α produzierenden Fibroblasten bestand. Zwei Versuchsgruppen wurden mit IL-2, bzw. GM-CSF produzierenden Fibroblasten behandelt. Zwei weiteren Gruppen wurden Vakzinekombinationen injiziert. In der einen Gruppe wurden MIP-1 α und IL-2 produzierende Fibroblasten mit A20-Zellen gemischt. In der anderen Gruppe wurde eine Kombination aus MIP-1 α und GM-CSF produzierenden Fibroblasten verwendet. Den Tieren der Negativkontrollgruppe wurde eine Mischung aus A20-Zellen und Fibroblasten, die lediglich das Neo[®]-Gen exprimierten, verabreicht.

Die zur Vakzinierung eingesetzten Zellen, sowohl die A20- Leukämiezellen als auch die Fibroblasten, wurden direkt vor der Injektion mit 10 Gy bestrahlt, um ein Auswachsen dieser Zellen zu einem eigenen Tumor zu verhindern. Im Laufe der ersten Versuchsreihe stellte sich heraus, dass in einigen Mäusen die in der Vakzine zur Zytokinproduktion als Bystander-Zellen eingesetzten Fibroblasten zu Fibrosarkomen auswuchsen.

In einer weiteren parallel durchgeführten Doktorarbeit wurden Versuche mit unterschiedlich stark bestrahlten Fibroblasten durchgeführt. Diese Versuche ergaben eine optimale Bestrahlungsdosis von 30 Gy, um die Proliferation der Fibroblasten *in vivo* zu verhindern und gleichzeitig eine ausreichende Zytokinproduktion zu gewährleisten. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Fibroblasten mit 30 Gy bestrahlt, während für die A20-Zellen die Dosis von 10 Gy beibehalten wurde. Danach trat das Problem der auswachsenden Fibrosarkome nur noch sehr vereinzelt auf. Von jedem Tumor wurde eine Probe genommen und zur

Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Die genaue Aufarbeitung wurde analog zur Aufarbeitung der Milzen durchgeführt und wird in dem entsprechenden Kapitel beschrieben. Die Einzelzellsuspensionen wurden mit den monoklonalen Antikörpern CD49e und CD45R (Pharmingen, Hamburg) inkubiert und anschließend im Durchflußzytometer gemessen. Mäuse, die Fibrosarkome entwickelt hatten (CD49e positiv), wurden aus der statistischen Auswertung herausgenommen und nur Mäuse mit leukämischen A20-Tumoren (CD45R positiv) wurden gewertet.

Nach der Injektion der A20-Zellen und zweifacher Vakzinierung wurden die Mäuse täglich untersucht und zweimal wöchentlich gewogen. Das Wachstum der subkutanen Tumoren wurde zweimal wöchentlich mit einer Schieblehre gemessen. Wenn die Größe der Tumoren 450 mm² erreicht hatte, oder die Tiere durch das Tumorwachstum mehr als 30 % an Gewicht zugenommen hatten, wurden sie getötet. Außerdem wurden sie getötet, wenn der Allgemeinzustand durch das Tumorleiden stark reduziert war, oder wenn eine Ulzeration der Tumoren beobachtet wurde.

Die einzelnen Gruppen bestanden jeweils aus 5-7 Mäusen. Jeder Vakzinierungsversuch wurde mindestens einmal wiederholt.

2.6 Depletion einzelner T-Zell-Populationen *in vivo*

Um zu untersuchen, welche T-Zell-Populationen die Mediatoren der beobachteten Vakzinewirkung waren, wurden bei einem Teil der Mäuse vor der Injektion der A20-Zellen und Vakzination die CD4⁺ bzw. die CD8⁺ T-Zellen durch Injektion monoklonaler Antikörper *in vivo* depletiert. Dazu wurden die gleichen Antikörper wie in den immunhistochemischen Färbungen verwendet, CD4.1 (anti CD4) und CD8.2 (anti CD8). Jeweils 100µg der Antikörper wurden in 200µl PBS mit einer Tuberkulinspritze und Stahlkanülen der Größe 26 Gauge (Braun, Melsungen) intraperitoneal injiziert.

Am darauffolgenden Tag folgte die subkutane Injektion der A20-Zellen, wie zuvor beschrieben. Auch die Vakzinierung erfolgte nach dem gleichen Schema. Um die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen dauerhaft zu depletieren, wurden die intraperitonealen Antikörperinjektionen zweimal wöchentlich wiederholt.

Zusätzlich zur Depletion CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden in einer Gruppe von Mäusen, die die MIP-1α + IL-2 Vakzine erhielten, die NK-Zellen depletiert. Dazu wurden zweimal wöchentlich 25µl anti-asialo-GM1 Antiserum (Wako, Neuss) intraperitoneal injiziert. Durchflußzytometrische Blutuntersuchungen während des Versuches zeigten, dass die

beschriebenen Antikörper-Depletionen dauerhaft zu einer zahlenmäßigen Reduktion der betreffenden Zellpopulationen um 98% führten.

2.7 Untersuchung von Effektorzellen in den Milzen vakzinierter Mäuse

Wenn die Mäuse aufgrund der Tumorgröße, Ulzeration oder aufgrund erkennbaren Leidens getötet wurden, wurden ihnen die Milzen zur durchflusszytometrischen Analyse und für Zytotoxizitätsuntersuchungen steril entnommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit sterilen Instrumenten und Reagenzien unter der Sterilbank. Die Milzen wurden mit einem gläsernen Homogenisator in RPMI 1640 zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet. Diese wurden in ein 50 ml Röhrchen (Falcon, Hamburg) überführt und 5 Minuten bei 330 g (Heraeus Megafuge 2.0) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Durch Zugabe von 20 ml NH_4Cl bei 4°C wurden die in der Suspension enthaltenen Erythrozyten lysiert. Nach 3 Minuten Einwirkzeit auf Eis wurde die Suspension bei 330 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 20 ml RPMI 1640 aufgenommen, um zurückgebliebenes NH_4Cl zu verdünnen und auszuwaschen. Die Zentrifugation und Resuspendierung in 20 ml RPMI 1640 wurde wiederholt. Die Zellsuspension wurde durch ein $70\ \mu\text{m}$ Sieb (Falcon, Hamburg) filtriert, um größere Fasern und Gewebestücke zu entfernen, die bei der späteren durchflußzytometrischen Messung die Düsen des Gerätes hätten verstopfen können. Als nächstes wurde die Zellzahl in der Suspension durch Auszählung einer Probe in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Ein Anteil der Suspension, der 10^7 Zellen enthielt, wurde in ein 12 ml Röhrchen (Falcon, Hamburg) überführt und bei 330 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS mit 3% fetalem Kälberserum und 0,1% NaN_3 resuspendiert. Diese Zellen waren zur durchflußzytometrischen Analyse bestimmt.

Die übrigen Milzzellen wurden bei 330 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in einer der Zellzahl entsprechenden Menge eines Einfriermediums, bestehend aus 90% fetalem Kälberserum und 10% DMSO (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen. Je 2×10^7 Zellen in je 1,4 ml des Einfriermediums wurden in Einfriergefäße (Nunc) überführt und für spätere Untersuchungen der Zytotoxizität gegen Leukämiezellen *in vitro* bei -80°C eingefroren.

2.7.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Effektorzellpopulationen

Die Splenozyten-Suspensionen wurden zur quantitativen Bestimmung einzelner Effektorzellpopulationen durchflusszytometrisch untersucht. Durch Zugabe des monoklonalen Antikörpers gegen Fc-Rezeptoren CD16/CD32 (Pharmingen, Hamburg) sollte zunächst die unspezifische Bindung der später zur Färbung eingesetzten Antikörper verhindert werden. Zu 1 ml Milzzellsuspension ($= 10^7$ Zellen) wurden 10 μ l des Antikörpers pipettiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann 1,5 ml PBS mit 3% fetalem Kälberserum und 0,1% NaN_3 zugegeben. Im Anschluß wurde die Färbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern durchgeführt. Die durch die Fluorochrome FITC oder PE markierten monoklonalen Antikörper stammten von der Firma Pharmingen, Hamburg. Zur Bestimmung der jeweiligen T-Zell-Zahl wurde der Antikörper anti-CD3e eingesetzt. Dieser wurde mit anti-CD40, anti-CD86 (B7.2) oder mit anti-MHC II (I-Ad) kombiniert, um aktivierte T-Zellen nachzuweisen. Die CD4/CD8 Ratio wurde mit den Antikörpern anti-CD8 (Ly2) und anti CD4 (L3T4) bestimmt. Durch die Kombination von anti-CD8 und anti-CD44 sollten zytotoxische Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Mit dem Antikörper anti-CD11b wurde die Anzahl professioneller Antigenpräsentierender Zellen (APZ) untersucht. Mit dem Ziel, aktivierte APZ nachzuweisen, wurde anti-CD11b mit Antikörpern gegen die kostimulatorischen Oberflächenmarker CD40, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und MAC3 und gegen MHCII (I-Ad) kombiniert. Zum Nachweis der für die postulierten cross-priming-Effekte wesentlichen dendritischen Zellen wurde eine Doppelfärbung mit anti-CD11b und anti-CD11c, sowie eine Färbung mit dem Antikörper NLDC145 durchgeführt. Zum Nachweis von B-Zellen wurde der Antikörper CD19 verwendet, zum Nachweis von NK-Zellen DX-5.

Jedes Reagenzröhrchen enthielt je ein Nanogramm jedes der beiden beteiligten Antikörper in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Dazu wurden jeweils 50 μ l der beschriebenen Splenozytensuspension pipettiert, was einer Zellzahl von 2×10^5 pro Färbungsansatz entsprach. Die Zellen wurden 30 Minuten abgedunkelt und auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 330 g für 5 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde dekantiert. Pro Reagenzröhrchen wurden 3 ml PBS mit 3% fetalem Kälberserum und 0,1% NaN_3 zugegeben und die Pellets auf einem Vortex resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten bei 330 g wurde der Überstand mit den nicht gebundenen Antikörpern dekantiert. Die Pellets wurden in 500 μ l PBS mit 3% fetalem Kälberserum und 0,1% NaN_3 resuspendiert. Durch Zugabe von 500 μ l Paraformaldehydlösung wurden die gefärbten Zellen für 30 Minuten auf Eis fixiert. Danach folgte eine erneute Zentrifugation und ein Dekantieren des Überstandes zur Entfernung des Paraformaldehyds. Nach Zugabe von 3ml PBS und

Resuspendierung erfolgte eine weitere Zentrifugation. Wieder wurde der Überstand dekantiert und die Pellets in 150 µl PBS resuspendiert. Bis zur endgültigen Messung wurden die gefärbten und fixierten Zellen abgedunkelt und bei 4°C aufbewahrt.

Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte an einem FACScan der Firma Becton-Dickinson. Die Auswertung der Messdaten wurde mit der Software CellQuest der Firma Becton-Dickinson durchgeführt.

2.7.2 Zytotoxizität der Milzzellen vakzinierter Mäuse *in vitro*

Zur Untersuchung der durch die Vakzinen ausgelösten antileukämischen zytotoxischen Aktivität wurden Mäuse nach dem beschriebenen Vakzineschema behandelt. 11 Tage nach der zweiten Vakzineinjektion, am Tag 25 nach Injektion der Leukämiezellen, wurden sie getötet und die Milzen entnommen. Aus den Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, wie unter 2.6 beschrieben und in Portionen zu je 2×10^7 Zellen eingefroren, um später die zytotoxische Aktivität der Milzzellen *in vitro* zu bestimmen. Diese Untersuchungen wurden durch Frau Dr. M. Roskrow im GSF in München durchgeführt.

2.8 Adoptiver Transfer der Milzzellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch Übertragung von Leukozyten vakzinierter Mäuse ein protektiver Effekt gegenüber den A20-Leukämiezellen erreicht werden kann. Dazu wurde die A20-Injektion und die Vakzinierung entsprechend dem zuvor beschriebenen Behandlungsmodell durchgeführt. Am Tag 25 nach A20-Inokulation wurden die Mäuse getötet. Ihre Milzen wurden, wie unter 2.6 beschrieben, zu Einzellsuspensionen aufgearbeitet. Die Milzzellen der Mäuse einer Gruppe wurden gepoolt. Je 10^7 dieser gepoolten Milzzellen wurden neuen Mäusen intraperitoneal injiziert. Anschließend erhielten diese Mäuse unter dem Schutz der zuvor applizierten Splenozyten eine subkutane Injektion von 10^5 A20 in 200 µl PBS. Wie in den vorherigen Versuchen wurde das subkutane Tumorwachstum gemessen und die Überlebenszeit nach A20-Inokulation beobachtet.

2.9 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen zum Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen wurden mittels Chi²- und Wilcoxon-Tests durchgeführt. Zur Dokumentation der statistischen Signifikanz wurde ein p-Wert <0,05 zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

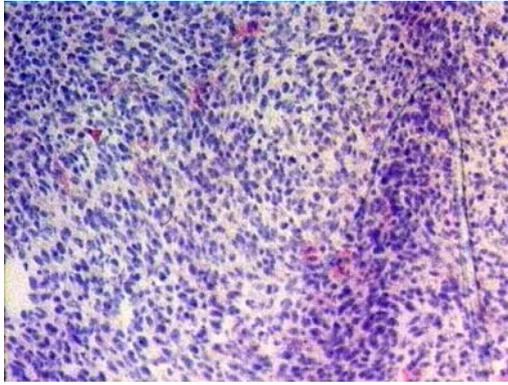
3.1 MIP-1 α in Kombination mit IL-2 oder GM-CSF führt zu einer verstärkten T-Zell-Infiltration der Vakzinestelle

Zunächst wurden die chemotaktischen Effekte von MIP-1 α in Kombination mit IL-2 oder GM-CSF auf immunkompetente Zellen *in vivo* untersucht. Dazu erhielten weibliche BALB/c Mäuse eine subkutane Injektion der unbestrahlten Vakzine. Diese bestand aus syngenem Cl7.1 Fibroblasten, die zur Cytokin/Chemokin-Produktion zugesetzt wurden und infolge retroviralen Gentransfers MIP-1 α , IL-2 oder GM-CSF exprimierten, sowie aus ebenfalls syngenem A20-Leukämiezellen, die die für die Vakzinierung benötigten leukämiespezifischen Antigene präsentierten. Jede Maus erhielt eine subkutane Injektion mit je 10^5 A20-Zellen und 2×10^5 Fibroblasten. Jeweils die Hälfte der Fibroblasten sezernierte MIP-1 α , die andere Hälfte IL-2. In einer anderen Gruppe wurde auf die gleiche Weise MIP-1 α produzierende Fibroblasten mit GM-CSF produzierenden Zellen kombiniert. In der Negativkontrollgruppe wurden mit den A20-Zellen Fibroblasten verabreicht, die nur das Neomycin-Resistenzgen (Neo[®]), jedoch keines der genannten Zytokine exprimierten.

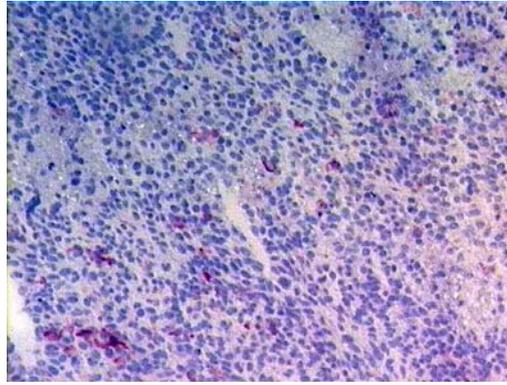
Die Zellen wurden vor der Injektion nicht bestrahlt, so dass sie nach einiger Zeit am Injektionsort subkutane Tumoren bildeten. Sobald diese Tumoren eine Größe von ca. 8 mm² erreicht hatten, wurden die Mäuse getötet. In der Kontrollgruppe erreichten die Tumoren die beschriebene Zielgröße bereits am Tag 15 \pm 0 nach Injektion des Zellgemisches. Bei den Mäusen, denen Chemokin/Zytokin produzierende Fibroblasten injiziert worden waren, konnte als möglicher Hinweis auf einen protektiven Effekt der sezernierten Zytokine ein stark verzögertes Tumorstadium beobachtet werden. Tatsächlich entwickelten die Mäuse der Kombinationsgruppen gleich große Tumoren signifikant später, in der MIP-1 α /IL-2 Gruppe am Tag 25 \pm 3 und in der MIP-1 α /GM-CSF Gruppe sogar erst am Tag 42 \pm 10.

Die Tumoren wurden entfernt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wurden 5 μ m dicke Tumorschnitte angefertigt und mittels immunhistochemischer Färbungen auf infiltrierende immunkompetente Zellen untersucht. Die Färbungen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4 und CD8 nach der APAAP-Methode durchgeführt.

CD4



CD8



Neo

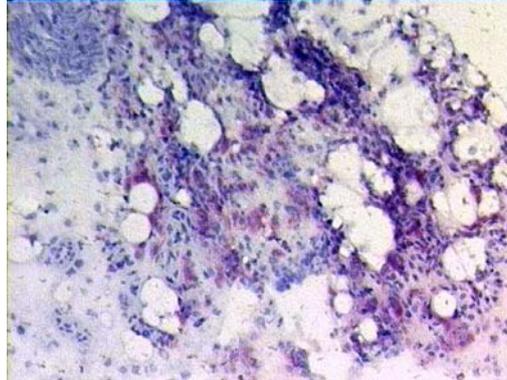
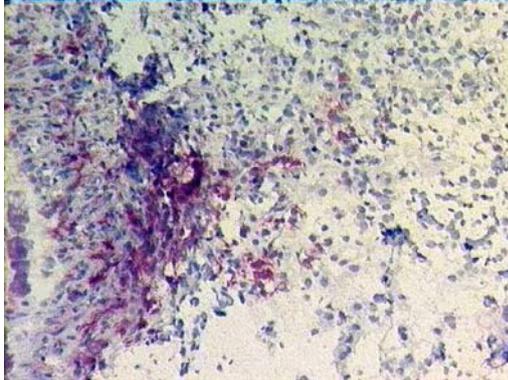
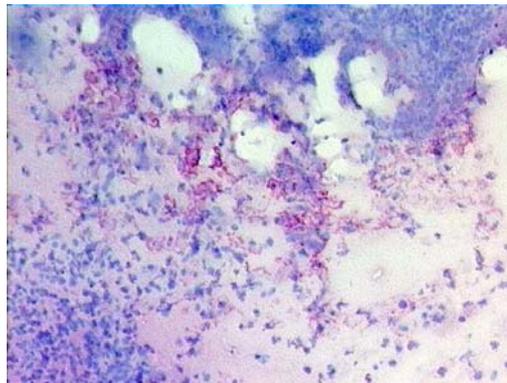
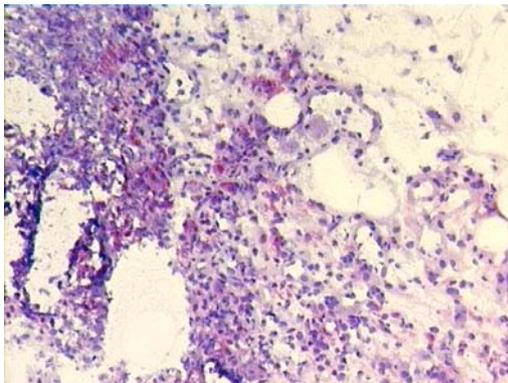
MIP-1 α
+ IL2MIP-1 α
+ GM-CSF

Abb. 3.1 T-Zell-Infiltration der Injektionsstellen nach Vakzinierung mit A20-Zellen und Zytokin/Chemokin produzierenden Fibroblasten

An den CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen haben der primäre Antikörper und danach der APAAP-Komplex gebunden. Durch einen Umsatz des Farbstoffsubstrates durch den APAAP-Komplex hat sich an diesen Zellen ein roter Niederschlag gebildet. Die übrigen Zellen sind durch die unspezifische Gegenfärbung mit Hämalaun blau eingefärbt.

Die Injektionsstellen in beiden Verumvaccinegruppen unterschieden sich von denen der Kontrollgruppe nicht durch die Anzahl, wohl aber durch die Verteilung der infiltrierenden Lymphozyten. Die Tumoren der Negativkontrollgruppe (Neo[®]) zeigten ein intaktes Gewebe, welches nur durch vereinzelte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen infiltriert war. Die Tumoren, deren Zellen MIP-1 α in Kombination mit IL-2 oder mit GM-CSF exprimierten, zeigten ein anderes

Bild: Zentral waren große nekrotische Areale zu sehen. Am Rand dieser Nekrosezonen lagen nestförmige Infiltrate von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Die Tumoren wurden mit der gleichen Färbungsmethode auf infiltrierende CD11b positive Zellen untersucht. CD11b ist ein Marker, der vor allem von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Diese Färbung sollte infiltrierende antigenpräsentierende Zellen zeigen. Die untersuchten Schnitte zeigten keine Unterschiede in der CD11b-Infiltration zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Vakzinekombinationen.

3.2 Die Behandlung mit den MIP-1 α Kombinationsvakzinen inhibiert das Wachstum leukämischer Tumore *in vivo*

In einem *Behandlungsmodell* sollte nun untersucht werden, inwieweit durch die zuvor beschriebene Vakzine das Wachstum zuvor injizierter A20-Leukämiezellen und damit ein Progress der Erkrankung verhindert werden konnte. Während in vielen Vakzinestudien zuerst die Vakzination und dann die Injektion der Tumorzellen erfolgte, sollte durch dieses Therapiemodell die klinische Situation der „Minimal Residual Disease“ nachgestellt werden. In mehreren Gruppen von Versuchstieren wurde die Effektivität der Behandlung einer bereits existierenden Leukämie mit Vakzinezellen, die das Chemokin MIP-1 α zusammen mit dem Zytokin IL-2 exprimieren, untersucht. In weiteren Gruppen wurde MIP-1 α mit GM-CSF kombiniert. MIP-1 α , IL-2 und GM-CSF wurden ebenfalls einzeln eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten wieder Fibroblasten, die lediglich das Neo[®]-Gen exprimierten, jedoch keines der verwendeten Zytokine.

Weiblichen BALB/c Mäusen wurde am Tag 0 des Versuchs eine subkutane Injektion nicht bestrahlter A20-Leukämiezellen verabreicht. Am Tag 4 und 14 des Versuchs folgte eine subkutane Injektion der Vakzine aus A20-Zellen und Cl 7.1 Fibroblasten. Unmittelbar vor der Injektion waren A20-Zellen und Fibroblasten mit 10 Gray bestrahlt worden. Die Bestrahlung sollte deren weitere Teilung und damit die Tumorbildung aus den zur Vakzinierung verwendeten Zellen verhindern. Die verabreichte Vakzine bestand aus 10⁵ A20-Zellen und 2x10⁵ Fibroblasten, die entweder MIP-1 α , IL-2 oder GM-CSF exprimierten. In den beiden Kombinationsvakzinen wurden je 10⁵ MIP-1 α sezernierende Fibroblasten mit 10⁵ IL-2 oder GM-CSF sezernierenden Fibroblasten und 10⁵ A20-Zellen gemischt. In der Negativkontrollgruppe bestand die Vakzine aus A20-Zellen und Fibroblasten, die nur das bereits beschriebene Neo[®]-Gen exprimierten.

Zur Beurteilung der Effektivität dieser Behandlung wurde das subkutane Tumorwachstum mittels einer Schieblehre gemessen. Die Zunahme der Tumorgöße in mm^2 diente als Maß für die Proliferation der leukämischen Zellen. Es wurden insgesamt drei Tierversuchsreihen durchgeführt. In die Berechnung der durchschnittlichen Tumorgöße gingen die gemessenen Werte aus allen drei Versuchsreihen ein.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Tumorzellen auf CD45R und CD49e zeigte sich, dass in einigen Tieren nicht die A20-Lymphomzellen sondern die mit der Vakzine injizierten Fibroblasten zum Tumor ausgewachsen waren. Daraufhin wurde die Bestrahlungsdosis der Fibroblasten von 10 Gray auf 30 Gray angehoben, worauf dieses Problem nur noch vereinzelt auftrat. Die Mäuse mit durchflußzytometrisch diagnostizierten CD49e positiven Fibrosarkomen wurden aus der Auswertung herausgenommen.

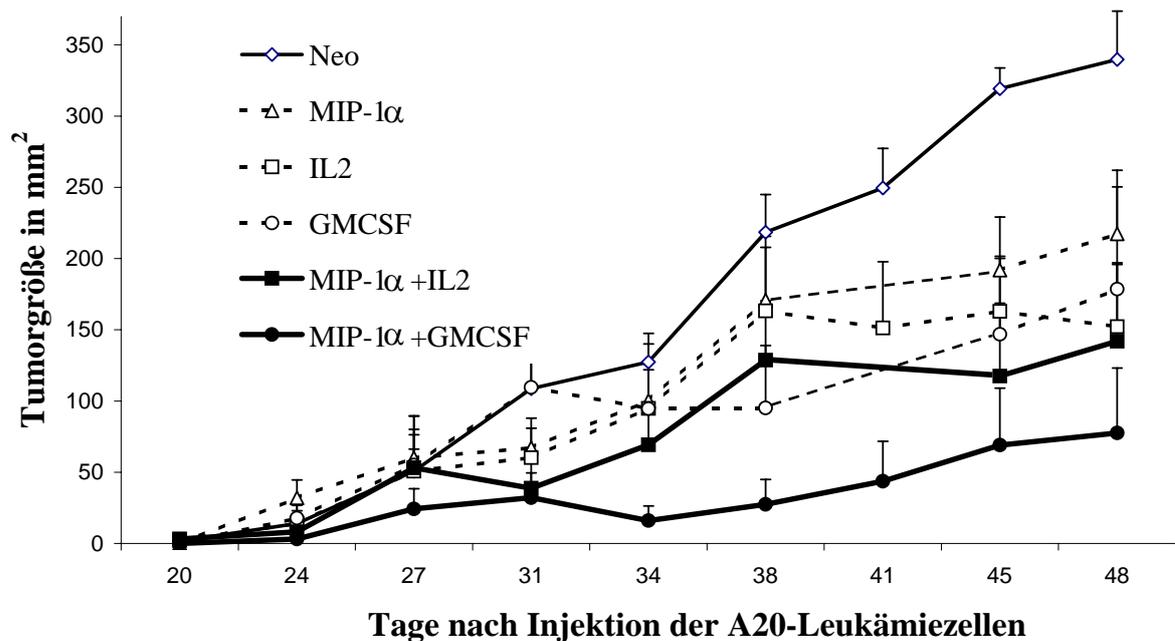


Abb. 3.2: Durchschnittliche Tumorgöße in mm^2 nach Injektion von A20-Zellen und anschließender Vakzinierung mit A20-Zellen und Zytokin/Chemokin produzierenden Fibroblasten

Die Vakzination mit MIP-1 α /IL-2 bzw. MIP-1 α /GM-CSF produzierenden Vakzinezellen verlangsamt das Wachstum leukämischer Tumore.

In der Negativkontrollgruppe (Neo[®]) waren Tumoren zuerst am Tag 20 tastbar und wuchsen kontinuierlich weiter. Zum Zeitpunkt, als die letzten Tiere dieser Gruppe getötet wurden, am

Tag 48 des Versuchs, hatte die durchschnittliche Tumorgroße 340 mm² erreicht. Als am Tag 38 die durchschnittliche Tumorgroße in der Negativkontrollgruppe bereits 218±20 mm² erreicht hatte betrug sie in der MIP-1α/IL-2 Gruppe lediglich 128±42 mm² und in der MIP-1α/GM-CSF Gruppe sogar nur 28±18 mm². Als am Tag 48 die letzten Tiere der Negativkontrollgruppe bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 340 mm² getötet wurden, maßen die Tumoren 142±56 mm² in den Mäusen nach MIP-1α/IL-2 Vakzination und 78±46 mm² bei den mit MIP-1α/GM-CSF vakzinierten Tieren.

Bei den Mäusen, die mit einem der einzelnen Faktoren MIP-1α, IL-2 oder GM-CSF behandelt worden waren, wuchsen die leukämischen Tumoren signifikant langsamer als in der Negativkontrollgruppe (p<0,05). Durch die Kombination von MIP-1α mit IL-2 konnte keine zusätzliche Inhibition des Tumorwachstums erzielt werden. Die Kombination aus MIP-1α und GM-CSF führte zu einem synergistischen Effekt der beiden beteiligten Substanzen. Die Tumoren wuchsen signifikant langsamer als bei den Mäusen, die einen der einzelnen Faktoren oder die Kombination aus MIP-1α und IL-2 erhalten hatten (p<0,01).

Die subkutane Injektion von MIP-1α, IL-2 oder GM-CSF sezernierenden Fibroblasten verlangsamte den Progress einer A20-Leukämie, gemessen am Wachstum der subkutanen Tumoren, signifikant. Durch die Kombination von MIP-1α mit IL-2 wird keine additive Wirkung der beiden Substanzen erreicht. Jedoch die Kombination von MIP-1α mit GM-CSF verbessert die Wirkung der Vakzine auf das Tumorwachstum signifikant.

3.3 Die MIP-1α +IL-2 und die MIP-1α +GM-CSF Vakzinekombinationen führen zu einem längeren Überleben

Im vorher beschriebenen Versuch wurde außerdem die Überlebenszeit der Mäuse nach Injektion der A20-Leukämiezellen beobachtet. Die Mäuse wurden getötet, wenn ihre Tumoren eine Größe von mehr als 450 mm² erreichten, wenn die Tiere durch den Tumor mehr als 30% des Körpergewichtes zugenommen hatten, oder wenn der Tumor eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Tiere verursachte. Dies war insbesondere bei Ulzeration oder Blutung der Tumoroberfläche oder bei infiltrationsbedingten Lähmungen der Extremitäten der Fall.

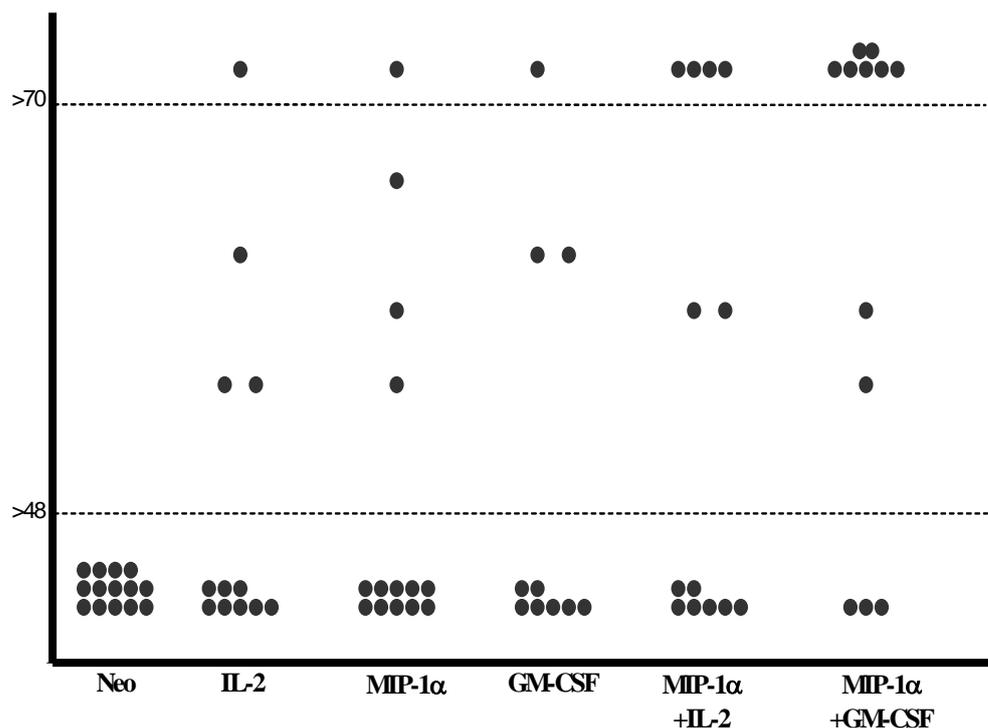


Abb. 3.3: Überleben der Mäuse nach A20-Injektion und anschließender Vakzination mit A20-Zellen und Chemokin/Zytokin produzierenden Fibroblasten

Jeder Punkt entspricht einem Tier. Auf der y-Achse ist die überlebte Zeit in Tagen nach A20-Injektion aufgetragen. Die Vakzination mit MIP-1α + IL-2 oder MIP-1α + GM-CSF produzierenden Vakzinezellen führte zu einem signifikanten Überlebensvorteil.

Während am Tag 48 bereits alle 14 Tiere der Negativkontrollgruppe tot waren, lebten zu diesem Zeitpunkt noch 33% der mit IL-2 vakzinierten Tiere. In der GM-CSF-Gruppe lebten noch 30% der Tiere, in der MIP-1α - Gruppe 29%. In der mit der Kombination aus MIP-1α und IL-2 behandelten Gruppe lebten noch 46% der Tiere. In der mit MIP-1α und GM-CSF vakzinierten Gruppe betrug die Anzahl der überlebenden Tiere 75%. Von den Tieren, die mit der Kombination aus MIP-1α und IL-2 behandelt worden waren, lebten 31% noch am Tag 70 des Versuches. In der Gruppe, die mit MIP-1α und GM-CSF behandelt worden war, lebten zu diesem Zeitpunkt noch 58% der Tiere.

Die Vakzinierung mit MIP-1α + IL-2 bewirkte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zur Negativkontrollgruppe ($p < 0,03$). Die Kombination von MIP-1α mit GM-CSF führte ebenfalls zu verlängertem Überleben ($p < 0,001$). Die Mäuse dieser Gruppe überlebten Belastung mit den Leukämiezellen außerdem signifikant länger als die Tiere, die mit Vakzinezellen behandelt worden waren, welche nur MIP-1α, IL-2 oder GM-CSF alleine produzierten ($p < 0,01$).

3.4 In Milzen der mit MIP-1 α +IL-2 oder MIP-1 α +GM-CSF behandelten Tiere können vermehrt aktivierte T-Zellen nachgewiesen werden

Zusätzlich zur Messung des Tumorwachstums und der Beobachtung der Überlebenszeit wurde die Anzahl verschiedener Leukozyten-Subpopulationen in den Milzen der vakzinieren Mäuse untersucht, um festzustellen welche Effektorzellen die Mediatoren der beobachteten Immunantwort waren. Im Einzelnen handelte es sich bei den untersuchten Populationen um CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, antigenpräsentierende Zellen, sowie verschiedene Aktivierungsmarker für diese Zellpopulationen.

Nach ihrer Tötung wurden den Mäusen aus den oben beschriebenen Vakzineversuchen die Milzen entnommen.

Die Milzen wurden zu Zellsuspensionen aufgearbeitet. Diese wurden mit FITC- und PE-markierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die gegen die jeweils untersuchten Zellen und deren Aktivierungsmarker gerichtet waren. Anschließend wurden die so behandelten Milzzellen im Durchflusszytometer analysiert.

In den Mäusen, die entweder die MIP-1 α /IL-2 oder die MIP-1 α /GM-CSF Vakzine erhalten hatten, konnte im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine erhöhte Anzahl CD4⁺ T-Helfer-Zellen nachgewiesen werden. Ein ähnlicher, wenn auch nicht so deutlicher Anstieg war auch bei den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zu beobachten (Abb.3.4).

Die prozentuale Anzahl von T-Zellen (CD3 positiv), die CD86 oder das murine MHC II-Molekül I-Ad exprimierten, war nach Behandlung mit den Vakzinekombinationen MIP-1 α + IL-2 und MIP-1 α + GM-CSF ebenfalls erhöht. Sowohl CD86 als auch MHC II-Moleküle werden von T-Zellen vor allem nach Aktivierung exprimiert. Außerdem wurde die Expression von CD44 auf T-Zellen gemessen. Auf T-Gedächtniszellen wird eine besonders hohe Expression von CD44 beobachtet. Eine vermehrte Anzahl von T-Gedächtniszellen nach MIP-1 α + IL-2 oder MIP-1 α + GM-CSF Vakzinierung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

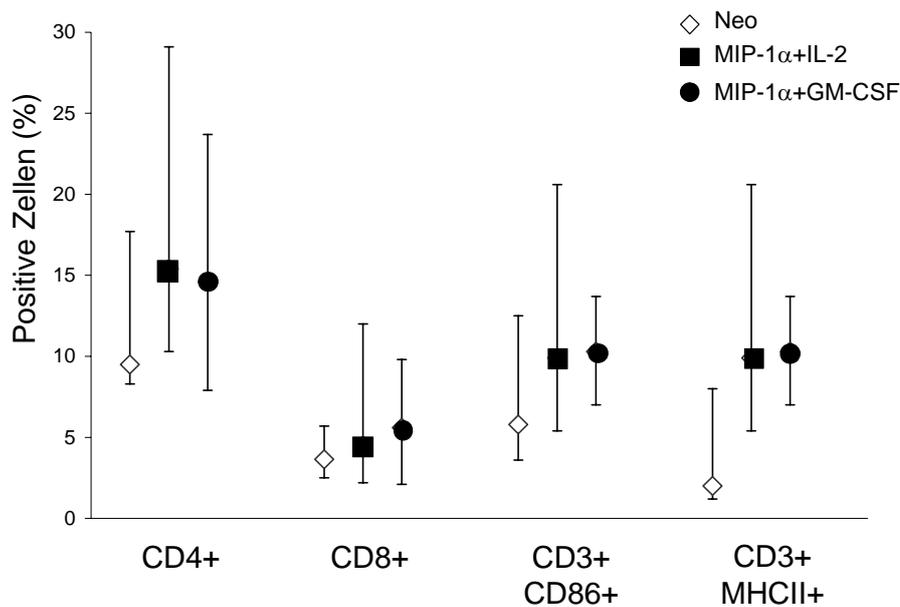


Abb. 3.4: Prozentualer Anteil einzelner T-Zell-Populationen in den Milzen vakzinierter Mäuse

In den Milzen von Mäusen nach Vakzination mit MIP-1 α /IL-2 oder MIP-1 α /GM-CSF produzierenden Vakzinezellen sind mehr CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachweisbar. Außerdem exprimieren mehr T-Zellen die Aktivierungsmarker MHC II oder CD86.

Mit dem Antikörper NLDC-145 und den Doppelfärbungen CD11b/CD11c bzw. CD11b/MHC II wurden dendritische Zellen⁸⁰ untersucht. Durch eine gemeinsame Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 oder CD86 auf CD11b positiven Zellen sollten aktivierte dendritische Zellen nachgewiesen werden. Die Doppelfärbung mit NLDC145 und CD11c zeigte einen mit $1,5 \pm 0,6\%$ diskret höheren Anteil an dendritischen Zellen in den Milzen der MIP-1 α /GM-CSF Gruppe verglichen mit $0,9 \pm 0,3\%$ in der MIP-1 α /IL-2 Gruppe und $0,8 \pm 0,2\%$ in der Negativkontrolle. Davon abgesehen zeigte sich keine Änderung in der Anzahl antigenpräsentierender Zellen. Jedoch bestanden zwischen den einzelnen Gruppen Unterschiede im Aktivierungsstatus der CD 11b positiven APZ.

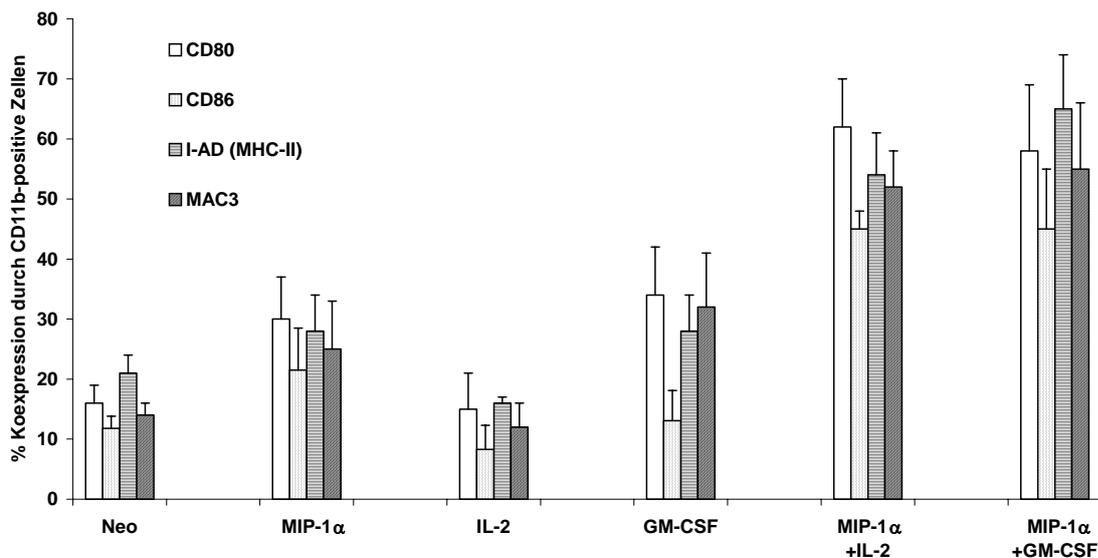


Abb. 3.5: Expression von Aktivierungsmarkern durch CD11b positive APZ

Nach Vakzination mit MIP-1α/IL-2 oder MIP-1α/GM-CSF produzierenden Vakzinezellen exprimieren mehr CD11b positive APZ die Aktivierungsmarker CD80, CD86 und MHC II

Nach Vakzinierung mit beiden MIP-1α Kombinationen exprimierte ein größerer Anteil CD11b positiver APZ die genannten Marker als Zeichen einer verstärkten Aktivierung. Dieser Effekt konnte nach Vakzinierung mit Vakzinezellen, die nur eine der jeweiligen Einzelsubstanzen exprimierten, nicht beobachtet werden.

In weiteren Färbungen wurde die prozentuale Anzahl von NK-Zellen (DX-5 positiv), Monozyten/Makrophagen (MAC 3 positiv) und B-Lymphozyten (CD19 positiv) gemessen.

In keiner dieser Färbungen zeigten sich jedoch weitere Unterschiede zwischen den Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen.

3.5 Die Vakzinierung mit MIP-1α +IL-2 oder MIP-1α +GM-CSF stimuliert die antileukämische zytotoxische Aktivität

Zur Untersuchung der durch die Vakzinekombinationen ausgelösten zytotoxischen Aktivität wurden Mäuse zwei Wochen nach der zweiten Vakzinierung getötet. Die Milzen wurden entnommen und Einzellzell suspensionen hergestellt, die dann in einem standardisierten Chromium-Release-Assay auf ihre spezifische zytotoxische Aktivität gegen A20-Zellen und die durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität gegen die NK-sensible Zelllinie YAC-1 *in vitro* untersucht wurden.

Milzzellen aus Mäusen, die die MIP-1 α + IL-2 Vakzine erhalten hatten, zeigten eine erhöhte zytotoxische Aktivität gegen A20- und YAC-1-Zellen verglichen mit der Negativkontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war die zytotoxische Aktivität, die durch die MIP-1 α + GM-CSF Vakzine ausgelöst worden war, spezifisch nur gegen A20-Zellen gerichtet. Eine verstärkte Zytotoxizität gegen YAC-1-Zellen, die für eine erhöhte NK-Aktivität sprechen würde, zeigte sich hier nicht. Wie bereits zuvor erwähnt wurden die Zytotoxizitäts-Assays von Frau Dr. Marie Roskrow im GSF in München durchgeführt.

3.6 Die Wirkungen der MIP-1 α +IL-2 und der MIP-1 α +GM-CSF Vakzine werden durch unterschiedliche Effektorzellen vermittelt

Mit dem folgenden Versuch sollte geklärt werden, welche Rolle CD4⁺ Helfer-T-Zellen, CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten und NK-Zellen für die beobachteten Vakzineeffekte *in vivo* spielten. Zu diesem Zweck wurden die A20-Injektion und die Vakzinierung mit den Kombinationen Neo[®], MIP-1 α /IL-2, und MIP-1 α /GM-CSF durchgeführt, wie im vorangegangenen Versuch beschrieben. Bei einigen Mäusen wurde jeweils eine der genannten Zellpopulationen *in vivo* depletiert. Dazu wurde den Tieren einen Tag vor Inokulation der A20-Zellen und danach zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion einer Antikörperlösung verabreicht. Dabei handelte es sich um monoklonale Antikörper, die gegen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen oder NK-Zellen gerichtet waren. Wie bereits im Vorversuch beschrieben, wurden die Effekte der beiden Vakzinekombinationen bei Mäusen nach Depletion der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen bzw. der NK-Zellen durch Messung des Tumorwachstums und Beobachtung der Überlebenszeit untersucht.

Die postulierte Wirkung der MIP-1 α /GM-CSF -Vakzine beruht auf einer T-Zell-Aktivierung durch dendritische Zellen. Eine Aktivierung von NK-Zellen und LAK, wie sie durch IL-2 beobachtet wurde spielt hier keine Rolle. Diese postulierte Wirkung deckt sich mit der Beobachtung aus dem oben beschriebenen Versuch, in dem nach MIP-1 α /GM-CSF-Vakzinierung eine spezifische zytotoxische Aktivität gegen A20-Zellen *in vitro* beobachtet werden konnte, aber keine unspezifische NK-Aktivität, wie nach MIP-1 α /IL-2-Vakzinierung. Daher wurde bei den MIP-1 α /GM-CSF-vakzinierten Mäusen auf eine NK-Zell-Depletion verzichtet.

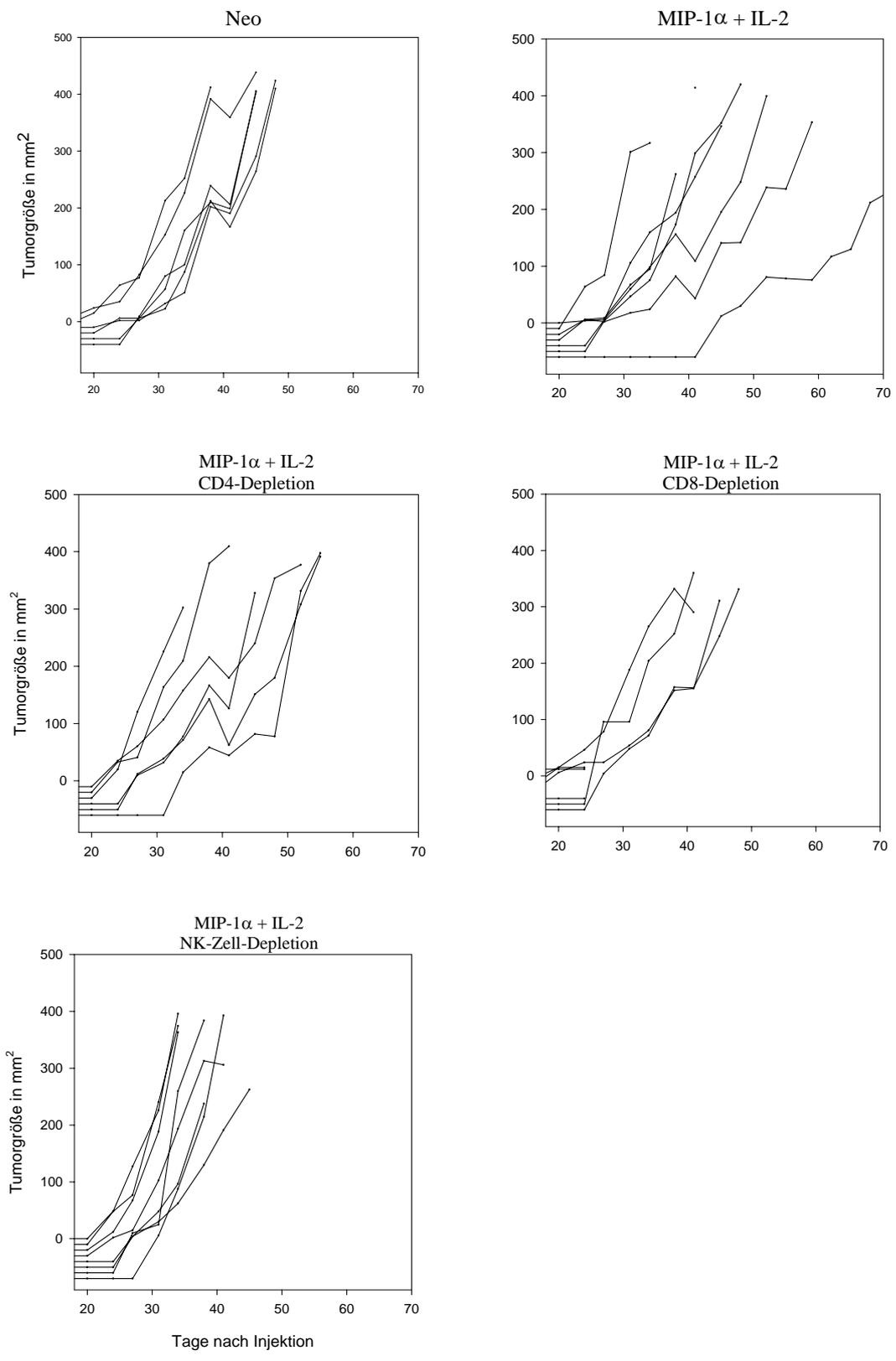


Abb. 3.6: Tumorwachstum nach CD4-, CD8- oder NK-Zell-Depletion und Vakzination mit A20-Zellen und MIP-1 α /IL-2 produzierenden Fibroblasten

Abb. 3.6 zeigt das Tumorwachstum bei den einzelnen Mäusen nach Vakzinierung mit MIP-1 α und IL-2. Wie schon in den vorherigen Versuchen beobachtet, wuchsen die Tumoren später und langsamer als in der Negativkontrollgruppe.

Bei Mäusen, die nach Depletion der CD4⁺ Helfer-T-Zellen mit der MIP-1 α /IL-2 Vakzine behandelt worden waren, wuchsen die leukämischen Tumoren ähnlich schnell wie bei den nicht depletierten Tieren.

Vakzinezellen		Keine Depletion	Anti-CD4	Anti-CD8	NEO
MIP-1α+IL-2	TumorgroÙe (Tag 45-48)	209 \pm 83	235 \pm 65	322 \pm 6	416 \pm 7
MIP-1α+GM-CSF	TumorgroÙe (Tag 45-48)	61 \pm 57	125 \pm 50	143 \pm 72	334 \pm 3
MIP-1α+IL-2	Überlebende (Tag >48)	3/7	3/7	0/5	0/7
MIP-1α+GM-CSF	Überlebende (Tag >70)	5/7	2/7	2/7	0/7

Tab. 3.1: Überleben nach CD4-, CD8- oder NK-Zell-Depletion und Vakzination mit A20-Zellen und MIP-1 α /IL-2 bzw. MIP-1 α /GM-CSF produzierenden Fibroblasten

Auch auf die Überlebenszeit hatte die Depletion der CD4⁺ T-Zellen keinen negativen Einfluß. Am Tag 48 des Versuches lebten noch 3 von 7 Tieren nach Vakzination mit MIP-1 α /IL-2 produzierenden Vakzinezellen und Depletion der CD4⁺ T-Zellen, ebenso in der Gruppe, die nur die MIP-1 α /IL-2 Vakzine erhalten hatte.

Durch Depletion der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen oder der NK-Zellen konnte der Effekt der MIP-1 α /IL-2 Vakzine jedoch vollständig aufgehoben werden. Die Tumorwachstumskurven in den betroffenen Gruppen zeigten den gleichen Verlauf wie die der Negativkontrollgruppe.

Am Tag 48 des Versuches lebte nur noch ein Tier aus der CD8-depletierten Gruppe und keine der NK-depletierten Mäuse. Sie überlebten damit die A20-Injektion genau so lange wie die Mäuse der Negativkontrollgruppe.

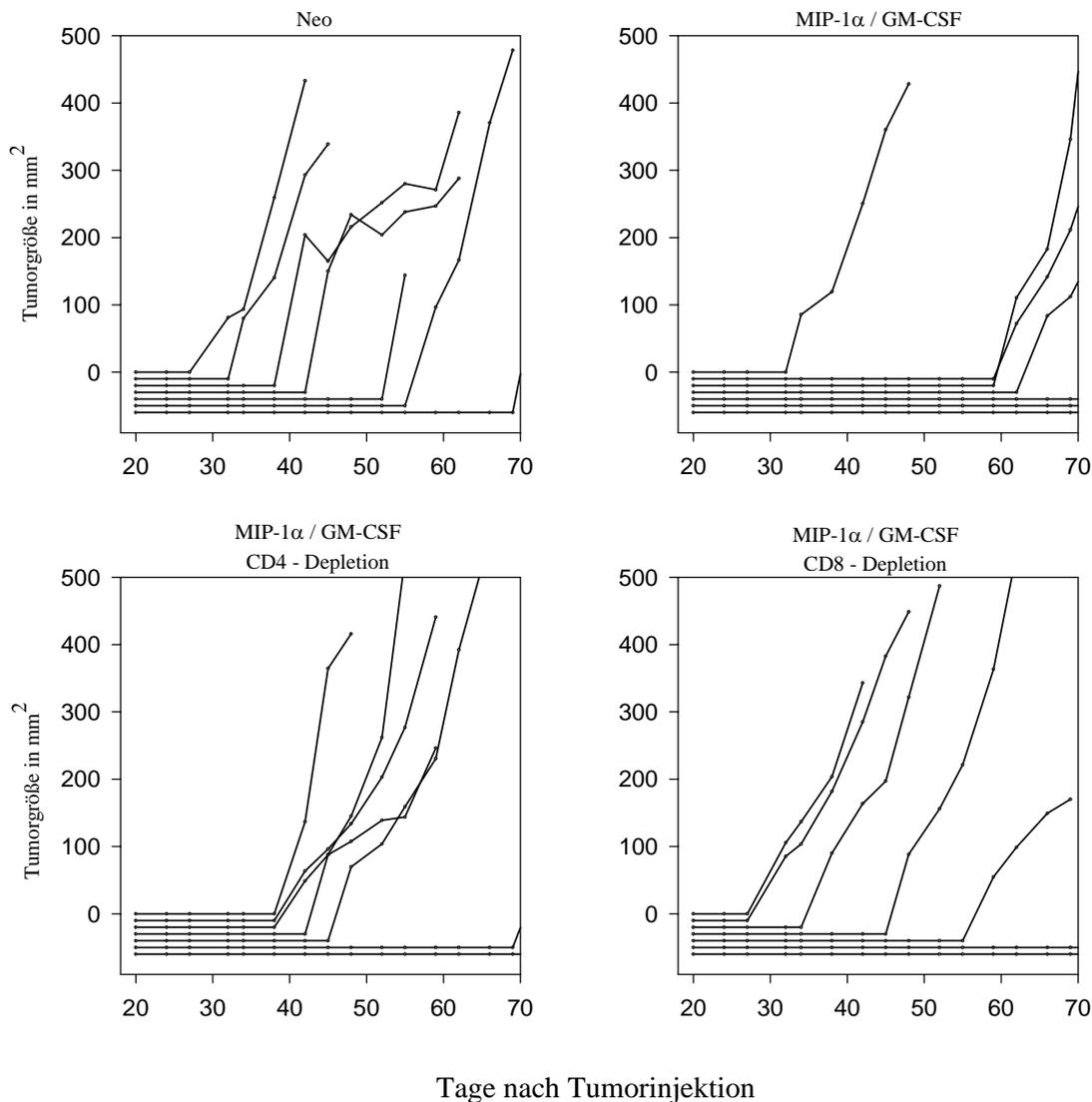


Abb. 3.6: Tumorwachstum nach CD4- oder CD8- Depletion und Vakzination mit A20-Zellen und MIP-1 α /GM-CSF produzierenden Fibroblasten
 Nach Depletion von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wird der protektive Effekt der MIP-1 α /GM-CSF Vakzine nicht mehr beobachtet.

Obwohl in diesem Versuch das Tumorwachstum in allen Gruppen wesentlich langsamer war als in den vorher durchgeführten Versuchen, war auch hier die bereits beschriebene Verlangsamung des Tumorwachstums durch Vakzinierung mit MIP-1 α /GMCSF exprimierenden Fibroblasten zu beobachten.

Sowohl bei den CD4-depletierten als auch bei den CD8-depletierten Mäusen wuchsen die Tumoren schneller als nach MIP-1 α /GM-CSF-Vakzinierung ohne Depletion. Die Verlangsamung des Tumorwachstums und die Verlängerung der Überlebenszeit durch die Vakzine war in beiden Fällen eingeschränkt.

Die Wirkung der MIP-1 α /IL-2-Vakzinierung kann durch Depletion der CD8⁺ Lymphozyten oder der NK-Zellen vollständig aufgehoben werden. Dagegen scheinen die CD4⁺ Helfer-T-Zellen für die Wirkung dieser Vakzine keine entscheidende Rolle zu spielen, da ihre Depletion ohne Einfluß auf die Vakzinewirkung bleibt.

In Mäusen, die mit der Kombination MIP-1 α +GM-CSF behandelt wurden konnte die Wirkung sowohl durch CD4- als auch durch CD8-Depletion teilweise aufgehoben werden. Dies lässt auf eine direkte Beteiligung beider Zellpopulationen an der Wirkung dieser Vakzinekombination schließen.

3.7 Adoptiver Transfer immunkompetenter Milzzellen

In diesem Versuch sollte die Möglichkeit untersucht werden, die zuvor nachgewiesene Immunität gegen Leukämiezellen durch adoptiven Transfer immunkompetenter Milzzellen auf nicht vakzinierte Mäuse zu übertragen.

Dazu wurde die A20-Injektion und die Vakzinierung mit MIP-1 α + IL- 2 sowie mit MIP-1 α + GM-CSF durchgeführt, wie schon beschrieben. Am Tag 25 nach Injektion der A20-Zellen wurden die Tiere getötet. Die Milzen wurden entnommen und zu Zellsuspensionen aufgearbeitet. Die Milzzellen der Mäuse jeweils einer Vakzinegruppe wurden gepoolt und neuen Mäusen intraperitoneal injiziert. Jeder Maus wurden 10^7 Milzzellen verabreicht. Noch am gleichen Tag erhielten diese Mäuse außerdem eine subkutane Injektion von 10^5 A20-Zellen. Abb. 3.8 zeigt die Überlebenszeit bei diesen Mäusen.

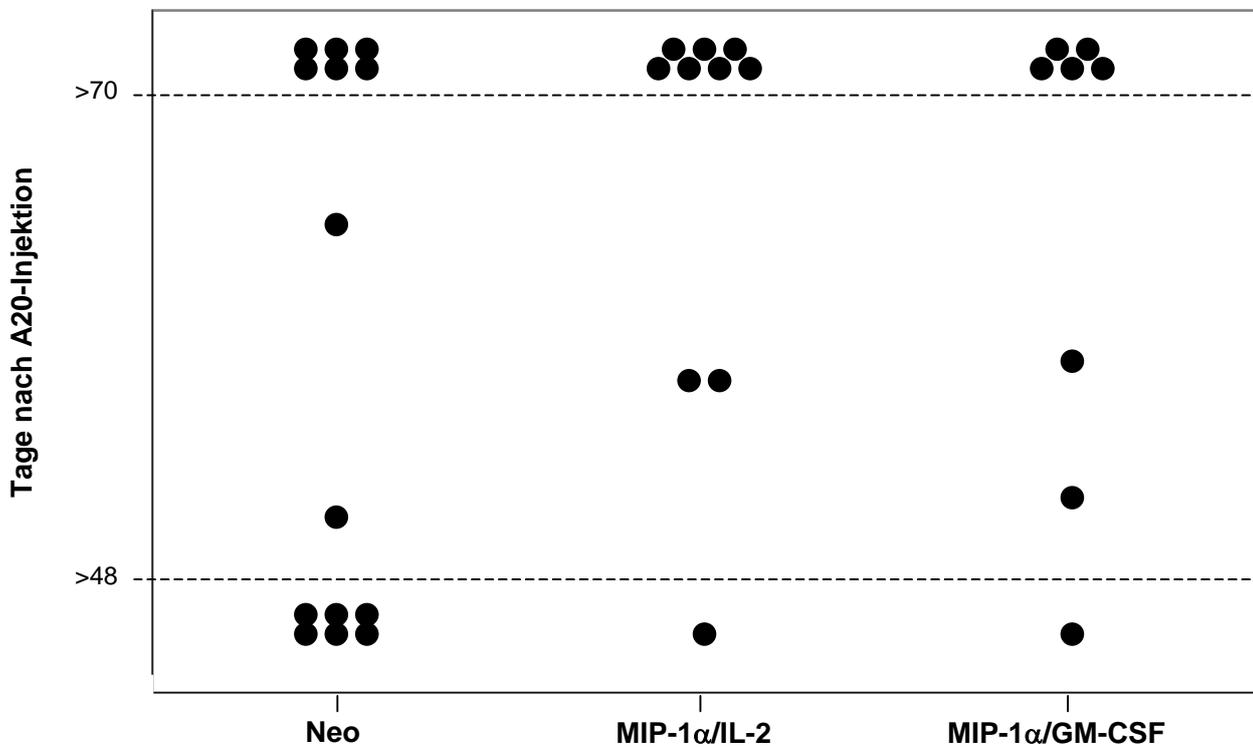


Abb. 3.8: Überleben nach Injektion von Milzzellen vakzinierter Mäuse und anschließender A20-Injektion

In allen drei Versuchsgruppen gab es Tiere, die bis zum Ende des Versuches keine tastbaren Tumoren entwickelten. 43% der Mäuse, die Milzzellen von Tieren aus der Negativkontrollgruppe erhalten hatten überlebten den Tag 70 des Versuches. In den Gruppen, die mit Milzzellen aus einer der beiden Kombinationsvakzinegruppen behandelt worden waren, zeigte sich ein besseres Langzeitüberleben nach Tag 70 mit 70% in der MIP-1 α /IL-2 Gruppe und 62% in der MIP-1 α /GM-CSF Gruppe.

4 Diskussion

Trotz der großen Fortschritte der letzten Jahrzehnte in der Radio- und Chemotherapie akuter Leukämien im Kindesalter und der damit verbesserten Prognose sind im Falle primär therapierefraktärer Erkrankungen und für Rezidive nach Polychemotherapie die zur Verfügung stehenden therapeutischen Optionen vielfach nicht ausreichend. Die ungünstige Prognose im Falle rezidivierter Leukämien macht die Entwicklung alternativer Therapiekonzepte erforderlich.

Der Graft-versus-Leukemia-Effekt nach allogener Knochenmarktransplantation zeigt, dass prinzipiell die Möglichkeit besteht, eine Immunantwort gegen Leukämiezellen zu induzieren. Leukämiezellen exprimieren eine Reihe von Antigenen, die als Ziel für eine Immunantwort in Frage kommen^{15,22-28}. Außerdem sind sie durch die Expression von MHC in der Lage, diese in ausreichendem Maße zu präsentieren. Ihnen fehlen jedoch die nötigen kostimulatorischen Signale, die erforderlich sind, um eine effektive antineoplastische Immunantwort auszulösen. Eine Möglichkeit zur Auslösung einer solchen antileukämischen Immunantwort könnte in der Entwicklung von Impfstoffen bestehen. In murinen Leukämiemodellen wurden z.B. antigenbeladene dendritische Zellen oder gentechnisch veränderte zytokinproduzierende Leukämiezellen zur Vakzination eingesetzt mit dem Ziel, eine antileukämische Immunantwort auszulösen¹⁵⁻²¹. Zur Immuntherapie solider Tumoren wurden ähnliche Vakzinationsstrategien bereits erfolgreich in klinischen Studien am Patienten getestet^{30,81-83}. Zur Immuntherapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ist das ideale Zytokin bzw. die ideale Zytokinkombination für die Entwicklung einer Leukämievakzine bisher jedoch nicht gefunden worden. In der vorliegenden Untersuchung wurde das Chemokin MIP-1 α zur Entwicklung einer Leukämievakzine im murinen Modell eingesetzt. Als Modell einer prä-B-Leukämie diente die murine lymphoblastische Zelllinie A20. MIP-1 α wurde mit den beiden Zytokinen IL-2 und GM-CSF kombiniert, um die immunmodulatorischen Effekte auf antigenpräsentierende Zellen und zytotoxische T-Zellen durch entsprechende stimulatorische Moleküle zu ergänzen. Die Verwendung des Chemokins MIP-1 α im Rahmen einer Leukämievakzine wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Durch die Kombinationen von MIP-1 α mit GM-CSF oder IL-2 konnte jeweils eine effektive protektive Immunantwort gegen eine aktive leukämische Erkrankung in Mäusen ausgelöst werden.

Im Rahmen der meisten Leukämie- bzw. Tumorstimmungsmodelle wurde bisher die Vakzination vor der Belastung mit den malignen Zellen durchgeführt. Diese Modelle lassen jedoch keine Schlussfolgerungen für die Effektivität der Vakzinationskonzepte in der klinischen Anwendung zu, weil in der klinischen Situation eine Tumorstimmung in der Regel zur Verhinderung eines Rückfalls bei vorbestehender Erkrankung eingesetzt werden wird. Daher wurde die Wirksamkeit der hier beschriebenen Vakzinekombinationen auf eine bestehende leukämische Erkrankung in einem sogenannten *Behandlungsmodell* untersucht, d.h. zuerst wurden die Leukämiezellen injiziert und erst einige Tage später mit der Impfung begonnen. Dieser Ansatz war als ein Modell für die mögliche klinische Anwendung der Leukämievakzine im Falle einer therapierefraktären minimalen Resttumorkrankung konzipiert. Nach Injektion der Leukämiezellen und anschließender Verabreichung von zwei Impfungen einige Tage später überlebten die Mäuse signifikant länger als die Tiere der Kontrollgruppe. Dabei war die Kombination aus MIP-1 α und GM-CSF der Kombination aus MIP-1 α und IL-2 in ihrer Wirkung überlegen. Obgleich auch nach der Behandlung mit Vakzinezellen, die MIP-1 α , GM-CSF oder IL-2 alleine produzierten, ein langsames Wachstum der subkutanen leukämischen Tumoren beobachtet werden konnte, führten die Einzelsubstanzen nicht zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit. Dies weist auf eine synergistische Wirkung von MIP-1 α in Kombination mit IL-2 und in noch stärkerem Maße mit GM-CSF hinsichtlich der diesen Effekt vermittelnden Zellpopulationen hin.

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden Immunantworten physiologischerweise durch ein komplexes Netzwerk aus zellulären und humoralen Signalen gesteuert. In diesem Netzwerk spielen Chemokine neben zellgebundenen Signalmolekülen und löslichen Zytokinen eine entscheidende Rolle in der Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen des Immunsystems. Das Chemokin MIP-1 α ist deshalb aufgrund seiner pleiotropen Wirkung auf verschiedene Effektorzellen ein vielversprechendes Molekül für die Entwicklung einer Leukämievakzine. Durch seine chemotaktischen Effekte können mehrere unterschiedliche Zellpopulationen, zu denen sowohl antigenpräsentierende Zellen als auch zytotoxische Effektorzellen zählen, an den Ort der Vakzinierung dirigiert^{64,66-73} und mit den relevanten Antigenen der Leukämiezellen in Kontakt gebracht werden. Die Gene für MIP-1 α , GM-CSF und IL-2 wurden dabei im Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung in der vorliegenden Untersuchung nicht in die zur Vakzinierung eingesetzten Leukämiezellen selbst eingebracht, da die Kultivierung primärer humaner akut lymphoblastischer Leukämiezellen und ihre genetische Modifikation mit den für die klinische Applikation zugelassenen

Vektoren äußerst schwierig ist. Vielmehr wurden zur parakrinen Sekretion der Zytokine und Chemokine Fibroblasten eingesetzt, die nach retroviraler Transduktion MIP-1 α , IL-2 oder GM-CSF sezernierten. Diese Fibroblasten fungierten als Bystanderzellen und wurden zur Zytokinproduktion am Ort der Vakzine zusammen mit den Leukämiezellen injiziert. Im Falle einer klinischen Anwendung würde die Verwendung solcher Zelllinien die technischen und logistischen Schwierigkeiten eines Gentransfers in die jeweiligen primären Leukämiezellen umgehen und hätte außerdem den Vorteil einer weitaus besseren Standardisierbarkeit der produzierten Zytokinmengen. In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine parakrine Sekretion durch einzelne Zellen zur Auslösung einer Immunantwort ausreichend ist⁸⁴. Analog zu diesen physiologischen Beobachtungen ist die Möglichkeit, eine antileukämische Immunantwort durch die Vakzinierung mit Zytokin/Chemokin produzierenden Bystanderzellen in Kombination mit Leukämiezellen auszulösen, durch vorangegangene Vakzinationversuche ebenfalls belegt¹⁶. Ebenso führte auch in unserem Modell die parakrine Sekretion von MIP-1 α in Kombination mit IL-2 oder GM-CSF durch Fibroblasten am Vakzineort zu einer systemischen antileukämischen Immunantwort.

Die Wirkungen der durch die injizierten Vakzinezellen freigesetzten Zytokine und Chemokine wurde in mehreren unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Zunächst interessierte dabei, welche Effektorzellen überhaupt durch die sezernierten Chemokine und Zytokine an den Impfort gelockt werden. Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben der Injektionsstellen immunhistochemisch untersucht. Dabei fiel zunächst auf, dass die unbestrahlten Vakzinezellen, welche die Kombination aus MIP-1 α und IL-2 oder GM-CSF sezernierten, sich signifikant langsamer zu Tumoren entwickelten als die Zellen des Kontrollimpfstoffs, die keine Zytokine produzierten. Diese Beobachtung weist bereits auf einen hemmenden Effekt der Zytokin/Chemokin Kombinationen auf das Wachstum der Leukämiezellen hin. Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Impfknoten fiel eine dichte nestförmige Infiltration der Injektionsstelle durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf. In den Mäusen, welche die Kontrollvakzine erhalten hatten, zeigten sich nur vereinzelte T-Zell-Infiltrate. Die vermehrte T-Zell-Infiltration, die durch die Chemokin/Zytokin-Kombinationen ausgelöst wurde, steht im Einklang mit der Beobachtung, dass aktivierende Zytokine alleine nicht ausreichen, um eine Infiltration durch T-Zellen und NK-Zellen am Impfort zu erreichen, sondern dass zusätzlich ein Chemokin, wie z.B. das Lymphotoaktin erforderlich ist¹⁶. Im Gegensatz zum Lymphotoaktin, welches auf T-Zellen und NK-Zellen wirkt, weist das hier

verwendete MIP-1 α zusätzlich eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und dendritische Zellen auf^{64,67}. Eine Infiltration durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) wurde bei der Untersuchung der Impfknoten nicht beobachtet. Das liegt daran, dass die chemotaktische Wirkung des MIP-1 α auf dendritische Zellen nur vorübergehend ist⁸⁵. Nach der Aufnahme und Prozessierung relevanter Antigene wandern die dendritischen Zellen in die drainierenden Lymphknoten ein, in denen dann die Aktivierung der T-Zellen stattfindet⁸⁶. Daher waren sie zu dem Zeitpunkt, als die injizierten unbestrahlten Zellen zu tastbaren Knoten herangewachsen und damit der histologischen Untersuchung zugänglich waren, am Impfort nicht mehr nachweisbar.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen in den Milzen der Mäuse, welche die MIP-1 α +IL-2 oder MIP-1 α +GM-CSF Vakzine erhalten hatten, zeigten einen Anstieg der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie eine erhöhte Expression spezifischer Aktivierungsmarker, verglichen mit Tieren der Kontrollgruppe. Eine erhöhte Anzahl dendritischer Zellen in den Milzen der vakzinierten Mäuse konnten wir bei unseren durchflusszytometrischen Untersuchungen allerdings nicht beobachten. Da die Lebensdauer dendritischer Zellen nach Migration in die drainierenden Lymphknoten bzw. in die Milz dort nur etwa 48 Stunden beträgt²⁹, war mit einer quantitativen Expansion zum Zeitpunkt der Untersuchung mehrere Wochen nach Vakzinierung auch nicht mehr zu rechnen. Allerdings zeigte sich bei den Mäusen, welche die MIP-1 α +GM-CSF Vakzine erhalten hatten, eine qualitative Veränderung der CD11b positiven antigenpräsentierenden Zellen. Diese zeigten eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und MHC II, verglichen mit der Kontrollgruppe und mit den Tieren, die MIP-1 α , IL-2 oder GM-CSF alleine zur Vakzination erhalten hatten. Die vermehrte Expression von MHC-Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 hat eine Optimierung der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung zur Folge.

Um auch *in vivo* zu bestätigen, dass die T-Lymphozyten in der antileukämischen Immunreaktion die entscheidende Effektorzellpopulation sind, wurden die Vakzineversuche unter *in vivo*-Depletion einzelner Lymphozyten- oder NK-Zell-Populationen wiederholt. Hierbei wurden in einzelnen Versuchsgruppen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen oder NK-Zellen durch regelmäßige Injektionen von Antikörpern gegen die entsprechende Zellpopulation eliminiert. In solchen Depletionsversuchen kann dann die Wirkung einer Vakzine in Abwesenheit der jeweiligen Zellpopulationen beobachtet werden. Für die Effekte der beiden untersuchten Vakzinekombinationen waren jeweils unterschiedliche Zellpopulationen

verantwortlich. Die Wirkung der Kombination aus MIP-1 α und IL-2 beruhte vor allem auf einer Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen. Die Bedeutung der NK-Zell-Aktivität für die Wirkung einer MIP-1 α +IL-2 produzierenden Vakzine konnte sowohl in *in vitro*-Zytotoxizitätsassays als auch in den *in vivo*-Depletionsversuchen nachgewiesen werden. Die Depletion der CD8⁺ T-Zellen oder der NK-Zellen hob die protektiven Effekte der MIP-1 α +IL-2 Vakzine auf, wohingegen die Neutralisierung der CD4⁺ T-Zellen keine Auswirkung auf die beobachtete Wirkung der Vakzine hatte. Neben seiner chemotaktischen Wirkung auf verschiedene Effektorzellpopulationen induziert MIP-1 α die Entwicklung sogenannter chemokine-activated killer cells (CHAK), einer zytotoxischen Zellpopulation, die sich von den IL-2-induzierten lymphokine-activated killer cells (LAK) abgrenzen lässt^{72,87}. Da MHC-Moleküle zur Aktivierung von NK-Zellen nicht benötigt werden, ist die Kombination von MIP-1 α mit IL-2 ein vielversprechender Ansatz zur Aktivierung einer MHC-unabhängigen zytotoxischen Reaktion speziell gegen neoplastische Zellen, die MHC-Moleküle nur in geringem Ausmaß exprimieren. Der NK-Zell-dominierte Wirkmechanismus spiegelt sich auch in den Überlebenskurven der MIP-1 α /IL-2 Impfgruppe wieder. Trotz der beobachteten Aktivierung Leukämie-spezifischer zytotoxischer T-Zellen und einer kurzfristigen Protektion mit 46% Überlebender am Tag 48 gab es nur 31% Langzeit-Überlebende in der MIP-1 α +IL-2 Gruppe. Die ausgeprägte Kurzzeitprotektion bei fehlendem Langzeitschutz passt sehr gut zu einer kombinierten NK- und T-Zell-Zytotoxizität bei fehlender Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. Die essentielle Bedeutung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen für die *in vivo* Aktivierung zytotoxischer T-Zellen wurde vielfach beschrieben^{45,88,89}. So zeigte sich auch in unserem Versuch mit 58% der Tiere ein höherer Anteil Langzeit-Überlebender nach MIP-1 α +GM-CSF Vakzinierung, durch die sowohl eine Antwort durch CD4⁺ als auch durch CD8⁺ T-Zellen ausgelöst wurde. Sowohl die Depletion der CD4⁺ als auch die Depletion der CD8⁺ T-Zellen hatte einen verminderten protektiven Effekt der MIP-1 α +GM-CSF Vakzine zur Folge. Im Einklang dazu stehen auch Ergebnisse aus vorherigen Versuchen im A20-Leukämie-Modell, die zeigen konnten, dass eine systemische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen für eine andauernde antileukämische Immunantwort erforderlich ist^{16,17}. Die Expansion von T-Helfer-Zellen deutet auf cross-priming als den im Vordergrund stehenden Mechanismus der MIP-1 α /GM-CSF-Impfung hin.

Genau wie das Chemokin MIP-1 α kann auch das Zytokin GM-CSF antigenpräsentierende Zellen an den Ort des Tumorwachstums dirigieren⁴⁵. GM-CSF hat sich als Einzelsubstanz in Tumorkvakzine-Versuchen als äußerst effektiv erwiesen. In mehreren Tiermodellen^{46,93-96} und

in ersten klinischen Studien^{38,97-100} konnten durch GM-CSF sezernierende Vakzinezellen spezifische Immunantworten gegen solide Tumoren ausgelöst werden. An diesen Immunreaktionen waren nicht nur CD8⁺ T-Zellen sondern auch TH1 und TH2 T-Helfer-Zellen beteiligt^{98,101}. GM-CSF stimuliert zytotoxische Effekte gegen Tumorzellen⁹⁰, verstärkt die Antigen-Präsentation durch Monozyten^{91,92} und bewirkt die Ausreifung dendritischer Zellen, die dann ihrerseits zu einer ausgeprägten Aktivierung ruhender T-Zellen führen⁸⁶. Wahrscheinlich ist das sogenannte cross-priming von T-Zellen der wesentliche Mechanismus, der einer durch GM-CSF stimulierten Immunantwort zugrunde liegt^{45,89}. Dabei werden die relevanten tumorspezifischen Antigene nicht durch die Tumorzelle selbst präsentiert, sondern durch dendritische Zellen aus dem Knochenmark, die zum Vakzinationsort gelockt werden. Um eine genügende Zahl antigenpräsentierender Zellen an der Vakzinestelle zu erreichen, scheint eine große Menge sezernierten GM-CSF nötig zu sein. Eine derartig hohe GM-CSF-Expression kann durch viralen Gentransfer in Zellen solider Tumoren erreicht werden. In Leukämievakzinezellen ist es jedoch äußerst schwierig, eine derartig hohe Genexpression zu erreichen. Vor allem die Transduktion primärer humaner lymphatischer Leukämiezellen durch die momentan zur Verfügung stehenden Vektorsysteme ist schwierig. Auch mit Herpes- und Lentiviralen Vektoren werden lediglich GM-CSF-Mengen im unteren Nanogramm-Bereich erreicht^{102,103}. Dies könnte einer der Gründe sein, warum GM-CSF als Einzelsubstanz in Vakzinestrategien gegen bereits bestehende leukämische Erkrankungen vergleichsweise ineffektiv war. Nur durch die Auswahl von Zellklonen mit sehr hoher GM-CSF-Produktion oder durch Vakzinierung mit Zellzahlen, welche die der injizierten leukämischen Zellen bei Weitem überstiegen, konnten effektive antileukämische Immunantworten beobachtet werden^{20,21,47-50}. In den meisten murinen *in vivo*-Modellen zur Vakzinierung gegen akute Leukämien wurde GM-CSF daher in Kombination mit verschiedenen anderen immunmodulatorischen Substanzen verwendet^{16,34,51}. In dem vorliegenden Versuch konnte eine synergistische Wirkung von MIP-1 α und GM-CSF bei einer vergleichsweise niedrigen GM-CSF-Konzentration von 2ng/10⁶ Zellen/24h beobachtet werden.

Das Potential von MIP-1 α in einer Leukämievakzinestrategie beruht auf seinem breiten chemotaktischen Wirkungsspektrum auf antigenpräsentierende Zellen auf der einen und zytotoxische Effektorzellen auf der andern Seite. Diese pleiotropische Aktivität kann durch verschiedene Zytokine ergänzt werden, um eine Aktivierung sowohl des afferenten als auch des efferenten Arms der Immunabwehr zu erzielen. In der vorliegenden Untersuchung konnte

gezeigt werden, dass durch die Kombination von MIP-1 α mit IL-2 oder GM-CSF in einer Leukämievakzine eine potente antileukämische Immunantwort ausgelöst werden kann. Die Proliferation vorhandener leukämischer Blasten und damit ein Progress der leukämischen Erkrankung konnte dadurch in einem großen Teil der behandelten Tiere verhindert werden. Eine Vakzination mit subletal bestrahlten Vakzinezellen, die MIP-1 α in Kombination mit GM-CSF produzieren, könnte daher in Zukunft eine zusätzliche Therapieoption für bisher therapierefraktäre Leukämieerkrankungen darstellen. Unsere Beobachtung, dass immunmodulatorisch wirksame Bystanderzellen vermisch mit neoplastischen Zellen ausreichend sind, um den Impferfolg zu vermitteln, erlaubt eine enorme Vereinfachung des Herstellungsprozesses einer solchen Vakzine. Dabei werden nicht nur die technischen Schwierigkeiten der Transduktion von Leukämiezellen umgangen. Die Etablierung einer Bystanderzelllinie würde die quantitativ definierte Produktion der jeweiligen Zytokine und Chemokine durch die Vakzinezellen sowie eingehende Prüfungen zur Qualitätssicherung überhaupt erst ermöglichen. Außerdem lassen sich mit dem Vakzinationsansatz mit Bystanderzellen Impfstoffe für verschiedene neoplastische Erkrankungen produzieren, so dass eine breitere Anwendung auch außerhalb der Leukämiebehandlung in der Behandlung solider Tumoren möglich wird. So hat sich die Impfung mit GM-CSF produzierenden Vakzinezellen bereits in mehreren Studien zur Therapie solider Tumoren als wirksam erwiesen^{36, 37, 38, 97-100}. Dies legt nahe, dass die Kombination mit MIP-1 α zur Verstärkung der Wirksamkeit nicht nur zur Behandlung leukämischer Erkrankungen sinnvoll sein könnte.

Literatur

1. Harms D, Janka-Schaub G: Cooperative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): Longterm follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 14:2234, 2000
2. Schrappe M, Camitta B, Pui C, Eden T, Gaynon P, Gustafsson G, Janka-Schaub G, Kamps W, Masera G, Sallan S, Tsuchida M, Vilmer E: Long term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14:2193, 2000
3. Dopfer H, Henze G, Bender-Goetze C, Ebell W, Ehninger G, Friedrich W, Gadner H, Klingebiel T, Peters C, Riehm H: Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission after intensive primary and relapse therapy according to the BFM- and COALL-protocols: Results of the German Cooperative Study. *Blood* 78:2780, 1991
4. Henze G, Fengler R, Hartmann R, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Niethammer D, Riehm H: Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group. *Blood* 78:1166, 1991
5. Lang P, Handgretinger R, Niethammer D, Schlegel P, Schumm M, Greil J, Bader P, Engel C, Scheel W, H., Eyrich M, Klingebiel T: Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* , 2002
6. Horowitz M, Gale R, Sondel Pea: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75:555, 1990
7. Cavazzana-Calvo M, Bordigoni P, Michel Gea: A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high risk acute lymphoblastic leukemia in children: prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. Societe Francaise de Greffe de Moelle Osseuse. *British Journal of Hematology* 93:131, 1996
8. Goldman J, Gale R, Horowitz Mea: Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Annals of Internal Medicine* 108:806, 1988
9. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JLea: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte infusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 86:2041, 1995

10. Collins RHj, Goldstein S, Giralt S, Levine J, Porter D, Drobyski W, Barret J, Johnson M, Kirk A, Horowitz M, Parker P: Donor leukocyte infusions in acute lymphocytiv leukemia. *Bone Marrow Transplant* 26:511, 2000
11. Cignetti A, Guarini A, GillioTos A, Reato G, Foa R: Interleukin 2 transduced human leukemic cells induce major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted anti-leukemic effectors in mixed lymphocyte-tumor cultures. *Cancer Gene Therapy* 7:167, 2000
12. Foa R, Guarini A, Gilio Tos Aea: Peripheral blood and bone marrow immnophenotypic and functional modifications induced in acute leukemia patients treated with interleukin 2: evidence of in vivo lymphokine-activated killer cell generation. *Cancer Res.* 51:964, 1991
13. Foa R: Interleukin-2 and gene therapy in the managment of acute lymphoblastic leukemia. *Baillieres Clin. Hematol.* :421, 1994
14. Heslop H, Gottlieb D, Bianchi Aea: In vivo induction of gamma interferon and tumor necrosis factor by interleukin-2 infusion following intensive chemotherapy or autologous marrow transplantation. *Blood* 74:1374, 1989
15. He L, Feng H, Raymond A, Kreeger M, Zeng Y, Graner M, Whitesell L, Katsanis E: Dendritic cell peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 50:31, 2001
16. Dilloo D, Bacon K, Holden W, Zhong W, Burdach S, Zlotnik A, Brenner M: Combined chemokine and cytokine gene transfer enhances antitumor immunity. *Nat Med* 2:1090, 1996
17. Dilloo D, Brown M, Roskrow M, Zhong W, Holladay M, Holden W, Brenner M: CD40 ligand induces an antileukemia immune response in vivo. *Blood* 90:1927, 1997
18. Dunussi-Joannopoulos K, Weinstein HJ, Nickerson PW, Strom TB, Burakoff SJ, Croop JM, Arceci RJ: Irradiated B7-1 transduced primary acute myelogenous leukemia (AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML. *Blood* 87:2938, 1996
19. Dunussi-Joannopoulos K, Weinstein HJ, Arceci RJ, Croop JM: Gene Therapy with B7.1 and GM-CSF vaccines in a murine AML model. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 19:536, 1997
20. Dunussi-Joannopoulos K, Dranoff G, Weinstein HJ, Ferrara JL, Bierer BE, Croop JM: Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood* 91:222, 1998

21. Levitsky HI, Montgomery J, Ahmadzadeh M, Staveley-O'Carroll K, Guarnieri F, Longo DL, Kwak LW: Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotype-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity. *J Immunol* 156:3858, 1996
22. Yasukawa M, Ohminami H, Kaneko S, Yakushijin Y, Nishimura Y, Inokuchi K, Miyakuni T, Nakao S, Kishi K, Kubonishi I, Dan K, Fujita S: CD4(+) cytotoxic T-cell clones specific for bcr-abl b3a2 fusion peptide augment colony formation by chronic myelogenous leukemia cells in a b3a2-specific and HLA-DR-restricted manner. *Blood* 92:3355, 1998
23. Yotnda P, Garcia F, Peuchmaur M, Grandchamp B, Duval M, Lemonnier F, Vilmer E, Langlade-Demoyen P: Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* 102:455, 1998
24. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Champlin RE, Davis MM: A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T-lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 59:2675, 1999
25. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, Davis MM: Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 6:1018, 2000
26. Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, Zanetti M: Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4796, 2000
27. Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S: Identification of telomerase reverse transcriptase derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 97:2903, 2001
28. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC: Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am. J. Pathol.* 152:43, 1998
29. Bernard A, Lamy, Alberti I: The two-signal-model of T-cell activation after 30 years. *Transplantation* 73:31, 2002
30. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P: Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 60:397, 1990

31. Harding F, McArthur J, Gross J, Raulet D, Allison J: CD28-mediated signalling costimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356:607, 1992
32. Van Kooten C, Banchereau J: Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current opinions in Immunology* 9:330, 1997
33. Schwartz RH: A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248:1349, 1990
34. Stripecke R, Skelton DC, Gruber T, Afar D, Pattengale PK, Witte ON, Kohn DB: Immune response to Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia induced by expression of CD80, interleukin 2, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Hum Gene Ther* 9:2049, 1998
35. Verecque R, Buffenoir G, Preudhomme C, Hetuin D, Bauters F, Fenaux P, Quesnel B: Gene transfer of GM-CSF, CD80 and CD154 cDNA enhances survival in a murine model of acute leukemia with persistence of a minimal residual disease. *Gene Ther* 7:1312, 2000
36. Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, Jaffee LM, Karasuyama H, Baker M, Pardoll DM: Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 254:713, 1991
37. Tepper RI, Mule JJ: Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor-cells. *Human Gene Therapy* 5:153, 1994
38. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Dranoff G, et al.: Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13141, 1998
39. NN: Human gene marker/therapy clinical protocols (complete updated listing). *Human gene therapy* 12:2251, 2001
40. Dilloo D, Leimig T, Zhong W, Mei Z, Brenner M: Co-stimulatory signals can be effectively delivered by gene-modified accessory cells in a leukemia vaccine. *Blood* 86 Suppl 1:466a, 1995
41. Matulonis UA, Dosiou C, Lamont C, Freeman GJ, Mauch P, Nadler LM, Griffin JD: Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells. *Blood* 85:2507, 1995

42. Blankenstein T, Qin ZH, Uberla K, Muller W, Rosen H, Volk HD, Diamantstein T: Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor alpha gene transfer. *J Exp Med* 173:1047, 1991
43. Schmidt-Wolf IG, Huhn D, Neubauer A, Wittig B: Interleukin-7 gene transfer in patients with metastatic colon carcinoma, renal cell carcinoma, melanoma, or with lymphoma. *Hum Gene Ther* 5:1161, 1994
44. Schadendorf D, Czarnetzki BM, Wittig B: Interleukin-7, interleukin-12, and GM-CSF gene transfer in patients with metastatic melanoma. *J Mol Med* 73:473, 1995
45. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H: Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264:961, 1994
46. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3539, 1993
47. Hsieh CL, Pang VF, Chen DS, Hwang LH: Regression of established mouse leukemia by GM-CSF-transduced tumor vaccine: implications for cytotoxic T lymphocyte responses and tumor burdens. *Hum Gene Ther* 8:1843, 1997
48. de Vos S, Kohn DB, Cho SK, McBride WH, Said JW, Koeffler HP: Immunotherapy against murine leukemia. *Leukemia* 12:401, 1998
49. Strehl J, Selmayr M, Kremer JP, Hultner L, Lindhofer H, Mocikat R: Gene therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified trioma cells. *Int J Cancer* 83:113, 1999
50. Stripecke R, Skelton DC, Pattengale PK, Shimada H, Kohn DB: Combination of CD80 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor coexpression by a leukemia cell vaccine: preclinical studies in a murine model recapitulating Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hum Gene Ther* 10:2109, 1999
51. Nakazaki Y, Tani K, Lin ZT, Sumimoto H, Hibino H, Tanabe T, Wu MS, Izawa K, Hase H, Takahashi S, Tojo A, Azuma M, Hamada H, Mori S, Asano S: Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine hematopoietic tumor cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Ther* 5:1355, 1998
52. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H: Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 62:634, 1997

53. Tedla N, Wang HW, McNeil HP, Di Girolamo N, Hampartzoumian T, Wakefield D, Lloyd A: Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *J Immunol* 161:5663, 1998
54. Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O: Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* 273:7118, 1998
55. Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, Chamberlain JS, Giedlin M, Aukerman L, Mule JJ: T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res* 61:2062, 2001
56. Cao X, Zhang W, He L, Xie Z, Ma S, Tao Q, Yu Y, Hamada H, Wang J: Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J Immunol* 161:6238, 1998
57. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, Oppenheim JJ, Kwak LW: Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 167:6644, 2001
58. Nomura T, Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Fujita S: Enhancement of anti-tumor immunity by tumor cells transfected with the secondary lymphoid tissue chemokine EBI-1-ligand chemokine and stromal cell-derived factor-1alpha chemokine genes. *Int J Cancer* 91:597, 2001
59. Rollins BJ: Chemokines. *Blood* 90:909, 1997
60. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al.: Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266:1395, 1994
61. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640, 1997
62. Qin S, LaRosa G, Campbell JJ, Smith-Heath H, Kassam N, Shi X, Zeng L, Butcher EC, Mackay CR: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur J Immunol* 26:640, 1996

63. Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, Galli G, Francalanci M, Manetti R, Marra F, Vanini V, Maggi E, Romagnani S: Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alpha beta+ CD8+ single-positive T cells, TCR gamma delta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood* 97:601, 2001
64. Ugucioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M: Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol* 25:64, 1995
65. Hedrick JA, Saylor V, Figueroa D, Mizoue L, Xu Y, Menon S, Abrams J, Handel T, Zlotnik A: Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* 158:1533, 1997
66. Fahey TJ, 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B: Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* 148:2764, 1992
67. Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM: Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J Leukoc Biol* 60:365, 1996
68. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV: Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 177:1821, 1993
69. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ: Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260:355, 1993
70. Roth SJ, Carr MW, Springer TA: C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 25:3482, 1995
71. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR: Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 155:3877, 1995
72. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B: Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 156:322, 1996

73. Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA: RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 176:1489, 1992
74. Alam R, Kumar D, Anderson-Walters D, Forsythe PA: Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. *J Immunol* 152:1298, 1994
75. Gao JL, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Francke U, Murphy PM: Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med* 177:1421, 1993
76. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF: Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 271:17161, 1996
77. Kim KJ, Kanellopoulos-Langevin C, Merwin RM, Sachs DH, Asofsky R: Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* 122:549, 1979
78. Glimcher LH, Kim KJ, Green I, Paul WE: Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells. *J Exp Med* 155:445, 1982
79. Li CY, Ziesmer SC, Yam LT, English MC, Janckila AJ: Practical immunocytochemical identification of human blood cells. *Am J Clin Pathol* 81:204, 1984
80. Inaba K, Steinman RM, Witmer Pack M, Aya H, Inaba M, Sudo T, Wolpe S, Schuler G: Identification of proliferating Dendritic Cell Precursors in Mouse Blood. *Journal of Experimental Medicine* 175:1157, 1992
81. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P: Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 57:503, 1989
82. Bubenik J, Simova J, Jandlova T: Immunotherapy of cancer using local administration of lymphoid cells transformed by IL-2 cDNA and constitutively producing IL-2. *Immunol. Lett.* 23:287, 1990
83. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E: Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces potent immunity. *J. Exp. Med.* 172:1217, 1990
84. Cook DN, Smithies O, Strieter RM, Frelinger JA, Serody JS: CD8+ T cells are a biologically relevant source of macrophage inflammatory protein-1 alpha in vivo. *J Immunol* 162:5423, 1999

85. Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, Gilman SC, Stellato C, Gladue RP, Schleimer RP, Beck LA: Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164:3392, 2000
86. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM: Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169:1169, 1989
87. Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ: CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol* 26:315, 1996
88. Keene JA, Forman J: Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 155:768, 1982
89. Huang AY, Bruce AT, Pardoll DM, Levitsky HI: In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4:349, 1996
90. Grabstein KH, Urdal DL, Tushinski RJ, Mochizuki DY, Price VL, Cantrell MA, Gillis S, Conlon PJ: Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* 232:506, 1986
91. Coleman DL, Chodakewitz JA, Bartiss AH, Mellors JW: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances selective effector functions of tissue-derived macrophages. *Blood* 72:573, 1988
92. Masucci G, Wersall P, Ragnhammar P, Mellstedt H: Granulocyte-monocyte-colony-stimulating factor augments the cytotoxic capacity of lymphocytes and monocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 29:288, 1989
93. Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maass G, Berger M, Schilcher F, Schaffner G, Birnstiel ML: Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4711, 1995
94. Chatterjee SK, Qin H, Manna S, Tripathi PK: Recombinant vaccinia virus expressing cytokine GM-CSF as tumor vaccine. *Anticancer Res* 19:2869, 1999
95. Suh KW, Piantadosi S, Yazdi HA, Pardoll DM, Brem H, Choti MA: Treatment of liver metastases from colon carcinoma with autologous tumor vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Surg Oncol* 72:218, 1999
96. Kinoshita Y, Kono T, Yasumoto R, Kishimoto T, Wang CY, Haas GP, Nishisaka N: Antitumor Effect on Murine Renal Cell Carcinoma by Autologous Tumor

Vaccines Genetically Modified with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-6 Cells. *J Immunother* 24:205, 2001

97. Jaffee EM, Abrams R, Cameron J, Donehower R, Duerr M, Gossett J, Greten TF, Grochow L, Hruban R, Kern S, Lillemoe KD, O'Reilly S, Pardoll D, Pitt HA, Sauter P, Weber C, Yeo C: A phase I clinical trial of lethally irradiated allogeneic pancreatic tumor cells transfected with the GM-CSF gene for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Hum Gene Ther* 9:1951, 1998

98. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF, Nelson WG: Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 59:5160, 1999

99. Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, Goemann M, Coleman J, Grochow L, Donehower RC, Lillemoe KD, O'Reilly S, Abrams RA, Pardoll DM, Cameron JL, Yeo CJ: Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 19:145, 2001

100. Kusumoto M, Umeda S, Ikubo A, Aoki Y, Tawfik O, Oben R, Williamson S, Jewell W, Suzuki T: Phase 1 clinical trial of irradiated autologous melanoma cells adenovirally transduced with human GM-CSF gene. *Cancer Immunol Immunother* 50:373, 2001

101. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H: The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188:2357, 1998

102. Dilloo D, Rill D, Entwistle C, Bournsnel M, Zhong W, Holden W, Holladay M, Inglis S, Brenner M: A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 89:119, 1997

103. Stripecke R, Cardoso AA, Pepper KA, Skelton DC, Yu XJ, Mascarenhas L, Weinberg KI, Nadler LM, Kohn DB: Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses. *Blood* 96:1317, 2000

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Anregungen zur Fertigstellung dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Frau PD Dr. med. Dagmar Dilloo.

Herrn Dr. rer. nat. Andree Zibert danke ich für die intensive Betreuung während der Durchführung sämtlicher Experimente, sowie für die geduldigen Ratschläge bei der Auswertung der Daten.

Bei Frau Dr. A. Treiber möchte ich mich für die praktische Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche bedanken.

Ferner danke ich Frau Corinna Strolz für die Anleitung zur Erstellung der Kryopräparate und die immunhistochemischen Färbungen.

Bei Frau Christa Krüsemann bedanke ich mich herzlich für die geduldige Einarbeitung in die Zellkultur und die Durchflußzytometrie, für die praktische Begleitung der gesamten Arbeit und viele wertvolle methodische Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Gabriele Kochannek und meinen Eltern, sowie allen, die mir die Kraft gegeben haben diese Arbeit durchzuführen und zu einem guten Ende zu bringen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Stefan Balzer
geb. am 31.10.1972
in Leverkusen
verheiratet

Eltern

Arnold Balzer, geb am 27.05.1940
Fachkrankenschwester für Anästhesie und
Intensivmedizin
Rita Balzer, geb. Bankstahl, geb. am 08.12.1939
Krankenschwester

Schulbildung

1979-1983
1983-1992

Kath. Grundschule Leverkusen-Manfort
Lise-Meitner-Schule Leverkusen,
Städt. Gymnasium

Zivildienst

1992-1993

Klinikum Leverkusen, Kinderklinik

Studium

1994-2001

Studium der Humanmedizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
3. Staatsexamen am 26.11.2001

2000

Auszeichnung mit dem „Hannover Leukemia and
Lymphoma Research Prize, 2nd Prize“

Berufliche Laufbahn

Januar 2002 bis
Juli 2003

Arzt im Praktikum
Universitätsklinikum Düsseldorf, Zentrum
für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

seit Juli 2003

Assistenzarzt
Universitätsklinikum Düsseldorf, Zentrum
für Kinderheilkunde und Jugendmedizin