

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -

**TIEREXPERIMENTELLE STUDIE ZUM EINSATZ
DENDRITISCHER ZELLEN IN DER IMMUNTHERAPIE DER
AKUTEN MYELOISCHEN LEUKÄMIE**

**Induktion von Antitumoraktivität durch Immunisierung mit
fusionierten Zellen bestehend aus dendritischen Zellen und
AML-Blasten**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Christina Doench

aus München

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Serve

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Stögbauer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2004

Dirk
und
meinen Eltern

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -
Referent: Prof. Dr. med. H. Serve
Koreferent: Prof. Dr. med. F. Stögbauer

ZUSAMMENFASSUNG

TIEREXPERIMENTELLE STUDIE ZUM EINSATZ DENDRITISCHER ZELLEN IN DER IMMUNTHERAPIE DER AKUTEN MYELOISCHEN LEUKÄMIE

Induktion von Antitumoraktivität durch Immunisierung mit fusionierten Zellen bestehend aus dendritischen Zellen und AML-Blasten

Doench, Christina

Trotz bedeutender Fortschritte in der zytostatischen Therapie beträgt die 5-Jahres-Überlebenszeit der akuten myeloischen Leukämie (AML) nur 10-40%. Multiple Chemotherapieresistenzen sowie das Bestehen einer sich der Chemotherapie entziehenden minimalen Resterkrankung sind Gründe für diese frustrierenden Ergebnisse. Bei zusätzlich hoher therapie-assoziierten Morbidität und Mortalität könnten immuntherapeutische Ansätze eine sinnvolle Ergänzung im Therapiekonzept darstellen.

Zahlreiche Forschungsarbeiten der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Entwicklung von Strategien, um den tumorspezifischen Entgehungsmechanismen entgegen zu wirken und das Immunsystem so zu stimulieren, dass es maligne Zellen erkennt und abtötet. Der Einsatz dendritischer Zellen (DC) erwies sich in diesem Zusammenhang als sehr viel versprechend, da sie professionelle, antigenpräsentierende Zellen (APC) sind und als potenteste Stimulatoren der primären Immunantwort angesehen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung experimenteller Therapiemethoden der AML im transplantablen Leukämie-modell syngener Mäuse. Nachdem im Rahmen der Etablierung des Leukämie-modells der SL/AM-Maus die Reproduzierbarkeit der für dieses Modell charakteristischen Eigenschaften gezeigt werden konnte, standardisierten wir ein Verfahren zur Differenzierung DC aus dem Knochenmark der Mäuse. Weiterhin zeigten wir die erfolgreiche Fusion von DC mit für die SL/AM-Maus syngenen leukämischen Blasten (M1), welche eine optimale Beladung der DC mit tumorspezifischen Antigenen ermöglicht.

In weiteren Untersuchungen beschäftigte sich die Arbeit mit der Induktion einer Antitumoraktivität durch Vakzinierung mit autologen DC-M1-Fusionszellen. Im Rahmen dieser Experimente konnte eine effektive Stimulierung der körpereigenen Immunabwehr gezeigt werden. In geringerem Ausmaß war dies ebenfalls für den Einsatz allogener DC fusioniert mit M1-Zellen nachweisbar. Weiterhin wurde unter Verzicht auf die Fusion die Wirksamkeit von Vakzinierungen mit Mixturen, bestehend aus bestrahlten M1 und autologen bzw. allogenen DC geprüft. Hierbei konnte keine ausreichende Antitumoraktivität verzeichnet werden.

Bevor die Vakzinierung mit DC im Rahmen der Immuntherapie sich neben den konventionellen Behandlungsstrategien der AML im Menschen etablieren kann, müssen weitere Studien erfolgen. Die erhobenen Ergebnisse machen Mut, dass auf diesem Wege ein Fortschritt in der Therapie der Leukämie möglich sein kann.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite:</u>
1. Einleitung	1
1.1 Akute myeloische Leukämie	1
1.2 Therapie der akuten myeloischen Leukämie	1
1.3 Dendritische Zellen	3
1.3.1 Herkunft und Funktion dendritischer Zellen	3
1.3.2 Aktivierung und Reifung myeloider dendritischer Zellen	4
1.3.3 Induktion einer T-Zell vermittelten Immunantwort	5
1.3.4 Differenzierung muriner dendritischer Zellen in-vitro	7
1.4 Experimentelle Grundlagen für neue immuntherapeutische Strategien	7
1.5 Das Leukämiemodell der SL/AM-Maus	12
1.6 Problemstellung und eigener Ansatz	12
2. Versuchstiere, Material und Methoden	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 Material	16
2.2.1 Reagenzien	16
2.2.2 Geräte und Gefäße	17
2.2.3 Gebrauchslösungen	19
2.2.4 FACS-Antikörper	21
2.2.5 Tumorzelllinie	22
2.2.6 Programme	22
2.3 Methoden	23
2.3.1 M1-Zellkultur	23
2.3.2 Gewinnung und Kultur von Maus-BmDC	23
2.3.3 Fusion von DC mit M1-Zellen	24

2.3.5	Immunphänotypisierung	24
2.3.6	Übertragung der Leukämie	28
2.3.7	Vakzinierung und Challenge	28
2.3.8	Gewinnung von Mausorganen	29
2.3.9	Gewinnung von peripherem Blut	29
2.3.10	Gewinnung von Knochenmarkzellen, -kulturen und –ausstrichen	29
2.3.11	Aufbereitung der Organe zur mikroskopischen Untersuchung	30
2.3.12	Statistische Analyse	30
3.	Ergebnisse	31
3.1	Standardisierung des Leukämiemodells der SL/AM-Maus	31
3.1.1	Beobachtungen nach Verabreichung einer leukämie- induzierender Dosis M1-Zellen	31
3.1.2	Immunogene Wirkung der M1-Zellen	40
3.2	Etablierung des Protokolls zur Gewinnung von DC aus murinem Knochenmark	41
3.3	Fusion von DC und M1-Zellen	47
3.3.1	Morphologie der DC-M1-Fusionszellen	47
3.3.2	Immunphänotypische Analyse der DC-M1-Fusionszellen	48
3.4	Einsatz von autologen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunsierung gegenüber der AML	50
3.5	Einsatz von allogenen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunsierung gegenüber der AML	52
3.6	Einfluss der Fusion auf die Induktion einer Antitumoraktivität: Einsatz von DC-M1-Mixtur als Vakzin zur Immunsierung gegenüber der AML unter Verwendung autologer und allogener DC	54

4.	Diskussion	56
4.1	Standardisierung des Leukämie Modells der SL/AM-Maus	56
4.2	Etablierung des Protokolls zur Gewinnung von DC aus murinem Knochenmark	58
4.3	Fusion von DC und M1-Zellen	61
4.4.	Einsatz von autologen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML	65
4.5.	Einsatz von allogenen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML	71
4.6	Einfluss der Fusion auf die Induktion einer Antitumoraktivität: Einsatz von DC-M1-Mixtur als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML unter Verwendung autologer und allogener DC	72
4.7	Schlussfolgerung	74
5.	Zusammenfassung	76
6.	Literatur	78
7.	Danksagung	94
8.	Lebenslauf	95
9.	Anhang	96

Abkürzungen:

AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle(n)
BmDC	bone marrow-derived dendritic cell
CD	cluster of differentiation
CR	komplette Remission
CTL	zytotoxische(r) T-Lymphozyten
DC	dendritische(r) Zelle(n)
Fas	Protein der TNF-Rezeptorfamilie, tragen bestimmte Zielzellen
FKS	fetales Kälber Serum
Flt3-L	Flt-3 Ligand, gehört zur Familie der Typ III Rezeptortyrosinkinase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	graft versus host disease = Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
GvL	graft versus leukemia = Transplantat-gegen-Leukämie
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KM	Knochenmark(s)
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	major histocompatibility complex
MRD	Minimal residual disease = Minimale Resterkrankung
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
Sek-AK	Sekundärantikörper
TCR	T-Zell Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrose Faktor α

Abbildungsverzeichnis:

1.	Molekulare Interaktionen zwischen aktivierten DC und T-Lymphozyten	6
2.	Offener Situs	33
3.	Entnommene Organe aus Leukämiemaus	33
4.	KM-Zellen nach Kultur	34
5.	M1-Zellen	34
6.	Leber-Histologie, 100-fach vergrößert	36
7.	Leber-Histologie, 400-fach vergrößert	36
8.	Milz-Histologie, 100-fach vergrößert	37
9.	Milz-Histologie, 400-fach vergrößert	37
10.	Sternal-Knochenmarks-Histologie	38
11.	Knochenmarkausstrich	38
12.	Peripherer Blutausstrich	39
13.	DC in Kultur an Tag 9	43
14.	Clusterbildung der DC	43
15.	Immunphänotypische Analyse der DC – Histogramme	46
16.	Fusion aus DC und Leukämiezelle	47
17.	Immunphänotypische Analyse der M1, DC und fusionierten Zellen – DotPlot	49

Grafikverzeichnis:

1.	Überlebenszeit nach M1-Challenge	32
2.	Immunogene Wirkung der M1	41
3.	Immunogene Wirkung der DC-M1-Fusionszellen	51
4.	Vergleich der immuonogenen Wirkung der autologen und allogenen DC-M1-Fusionszellen	53
5.	Immunogene Wirkung der DC-M1-Mixturen	55

Tabellenverzeichnis:

1.	Antigennomenklatur	24
2.	Färbeprotokoll zur FACS-Messung	26
3.	Vakzinkonzentrationen	28
4.	BmDC-Ausbeute	45

1. EINLEITUNG

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems des Knochenmarks (KM). Nach einer klinisch inapparenten Phase der autonomen Proliferation kommt es zur Expansion des myeloischen malignen Zellklons mit generalisierter Infiltration des gesamten blutbildenden Gewebes. Relativ häufig kann es zur Ausschwemmung unreif-zelliger Blasten in das periphere Blut kommen, seltener im fortgeschrittenen Stadium auch zur Infiltration weiterer Organe. Durch die zunehmende Verdrängung der gesunden Zellen im KM entsteht eine Insuffizienz der Granulo-, Thrombo- und Erythropoese. Die Patienten leiden an Infektanfälligkeit, Blutungen und allgemeiner Schwäche, die unbehandelt meist innerhalb weniger Monate zum Tode führen [19, 62].

1.2 Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Bis heute ist die Chemotherapie die einzige erfolgreiche Behandlungsmethode der AML. Ziel der systemischen Zytostatika-Gabe ist es, eine komplette Remission (CR) zu induzieren mit einer unter der Nachweisgrenze von 5% liegenden Reduktion des Anteils der leukämischen Blasten im KM und Blastenfreiheit im peripheren Blut sowie der Wiederherstellung des normalen Blutbildes [13, 62, 98]. Mit dem Einsatz einer frühen Therapieintensivierung in Form von Doppelinduktion ist diese CR bei ca. 70% der Patienten erreichbar [13, 15, 16]. Um einen langfristigen Therapieerfolg zu erzielen, wird in der Postremissionsphase in den meisten Fällen eine intensivierete Spätkonsolidierung mit hochdosierter Chemotherapie und sich anschließendem autologen Stammzellersatz oder einer allogenen Knochenmarktransplantation (KMT) durchgeführt [16, 18].

Eine andere Möglichkeit besteht in der sich an die intensivierte Frühkonsolidierung anschließenden zyklischen und über Jahre erstreckenden myelotoxischen Erhaltungstherapie [13, 14].

Trotzdem beträgt die 5-Jahres-Überlebenszeit bei den unter 60-Jährigen nur 35-40%, bei den Patienten über 60 Jahren nur 10-15% [13, 19]. Ausnahmen bilden Patienten nach allogener KMT mit 66% Langzeit-Remission nach 3,5 Jahren [2, 16]. Diese Daten relativieren sich jedoch unter dem Aspekt der positiven Selektion, die auf das vorzeitige Ausscheiden therapieresistenter Fälle zurückzuführen ist.

Zum einen kann diese schlechte Prognose durch die entstehenden multiplen Chemotherapieresistenzen erklärt werden [19]. Eine andere Ursache sind residuale Tumorzellen. Da sich jeweils nur ein Teil der leukämischen Zellpopulation in Proliferation befindet, können trotz intensiver und wiederholter zytostatischer Therapie nicht alle malignen Zellen vernichtet werden. Dieser Zustand wird mit minimaler Resterkrankung (MRD = Minimal residual disease) bezeichnet und ist die Basis auf der ein Rezidiv entstehen kann [109]. Dank der Erkenntnis, dass bestimmte Chromosomenaberrationen spezifisch für verschiedene AML-Untergruppen sind, können mit Hilfe empfindlicher molekulargenetischer Methoden (PCR) Tumorzellen im Stadium der MRD bei Patienten identifiziert werden, die sich klinisch und zytologisch in einer CR befinden [17, 20, 62, 82]. Allerdings kann ein quantitativer Anstieg oder ein plötzlicher Nachweis eines zuvor negativen PCR-Signals ein späteres Rezidiv mit großer Wahrscheinlichkeit vorherzusagen [76, 106]. Gerade deswegen ist die frühzeitige Erkennung einer MRD von Bedeutung, da sich hieraus die seltene Möglichkeit ergibt, in einem frühen Stadium mit geringer Tumormasse die Therapie entsprechend effektiver zu gestalten [34].

Gegen nun ausschließlich sich auf weitere Intensivierung der Chemotherapie beschränkende Maßnahmen spricht nicht nur die bereits erwähnte zunehmende Resistenz der Tumorzellen, sondern auch die zum Teil nicht mehr zu rechtfertigende therapieassoziierte Morbidität und Mortalität [40]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da der Altersmedian der AML jenseits des sechzigsten Lebensjahres liegt [14, 19] und somit die Häufigkeit vorgeschädigter Organe bzw.

herabgesetzter Leistungsfähigkeit des Immunsystems zunimmt. Dabei ergeben sich nicht nur Organtoxizitätsgrenzen für Herz, Leber und Niere, sondern vor allem auch für das KM mit der Gefahr prolongierter Aplasien, die das Risiko lebensbedrohlicher Infektions- und Blutungskomplikationen trotz optimierter supportiver Therapie beinhalten [62].

Somit erscheint es dringend erforderlich neue Behandlungsmethoden zu entwickeln und experimentell zu prüfen [19, 35, 40].

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind professionelle, antigenpräsentierende Zellen (APC) und extrem potente Stimulatoren der primären Immunantwort [58, 100, 101]. Sie gelten als einzige APC, die in der Lage sind, sowohl naive T-Lymphozyten zur primären Immunantwort als auch T-Gedächtnis- und T-Effektorzellen zur adaptiven Immunantwort zu aktivieren [5, 46, 55, 79, 88]. Nachdem sie 1868 erstmals in der Epidermis als Langerhanssche Zellen beschrieben wurden, gelang 1973 Steinman und Cohn der Nachweis von DC in der Milz von Mäusen. Sie benannten die DC nach ihrem charakteristischen mikroskopischen Erscheinungsbild mit zahlreichen astartigen zytoplasmatischen Ausläufern (griechisch: dendros, deutsch: Baum) [99]. Mit Ausnahme des ZNS, der Hoden und Teilen des Auges konnten DC in weiteren Forschungsarbeiten in nahezu allen Organen nachgewiesen werden [55, 101, 110].

1.3.1 Herkunft und Funktion dendritischer Zellen

DC lassen sich in 2 Hauptgruppen, myeloide und lymphoide DC, unterscheiden, welche wiederum je nach Phänotyp oder Funktion unterteilt werden können [84, 89].

Die myeloiden DC werden als bedeutend für die Induktion einer Immunantwort gegen Fremdartigene angesehen. Ihre Aufgabe besteht darin, Antigene aus

der Peripherie in die sekundären lymphatischen Gewebe zu transportieren und dort ruhende T-Zellen spezifisch zu aktivieren [4, 5].

Von den lymphoiden DC wird angenommen, dass sie sich unter normalen Umständen nicht wie myeloide DC vorerst im nichtlymphatischen Gewebe aufhalten, sondern direkt vom Blut in die lymphatischen Gewebe wandern. Wahrscheinlich spielen sie unter anderem eine Rolle bei der Entwicklung bzw. Erhaltung der Autoimmuntoleranz. Einer Untergruppe der lymphoiden DC, den folliculären DC fällt die Aufgabe zu, B-Zellen Antigene in Form von Immunkomplexen zu präsentieren und somit die humorale Abwehr zu aktivieren [65, 74].

Es wird angenommen, dass DC nach erfolgreicher T-Zellaktivierung einem zell-signalvermittelten, apoptotischen Zelltod unterliegen [29, 55], womit ihr Fehlen in der efferenten Lymphbahn erklärt wäre [4].

1.3.2 Aktivierung und Reifung myeloider dendritischer Zellen

Durch die Lokalisation der myeloiden DC an der Körperoberfläche und ihren Eintrittspforten begegnen sie als „mobile Wächterzellen“ eindringenden Antigenen als erstes. Zusätzlich veranlassen inflammatorische Stimuli und infektiöse Erreger weitere DC zur Einwanderung ins betroffene Gewebe [4]. Bei Antigenkontakt kombinieren die noch unreifen DC als artfremd erkannte Peptide mit MHC-Molekülen der Klasse I und II, um sie anschließend auf ihrer Oberfläche zu präsentieren – allerdings in einem bedeutend größeren Ausmaß als bei anderen APC üblich. Die Aufbereitung des Antigens sowie verschiedene mikrobielle Produkte und proinflammatorische Stimuli aktivieren die DC und induzieren einen Reifungsprozess, bei dem die Fähigkeit zur Antigenaufnahme weitgehend verloren geht. Stattdessen nimmt die Dichte und Stabilität der an MHC-Moleküle gebundenen Peptide zu, womit die Antigenpräsentation optimiert wird [4, 58, 90, 101, 110]. Die Zytoskelettstruktur wird neu organisiert, die Anzahl der Kostimulations- und Adhäsionsmoleküle gesteigert und eine veränderte Expression von Chemokin-Rezeptoren ermöglicht den DC aus der Peri-

pherie in die T-Zell-abhängigen Areale der lymphatischen Organe zu gelangen und eine Immunantwort zu induzieren [4, 45, 53, 55, 92].

1.3.3 Induktion einer T-Zell vermittelten Immunantwort

Im lymphatischen Gewebe angelangt, treten die DC mit ruhenden T-Lymphozyten in Kontakt. Die Beschaffenheit des Antigens beeinflusst dabei die Art und Qualität der induzierten Immunantwort erheblich. Intrazelluläre Antigene werden hauptsächlich von MHC-Klasse-I Molekülen präsentiert und von naiven $CD8^+$ T-Lymphozyten erkannt. Diese wandeln sich daraufhin in zytotoxische $CD8^+$ Effektor T-Lymphozyten (CTL) um, so dass vorwiegend eine zellvermittelte Immunantwort aktiviert wird. Im Gegensatz dazu werden extrazelluläre Antigene nach Phago- oder Pinozytose an MHC-Moleküle der Klasse II gebunden und präsentiert. Da sie bevorzugt von $CD4^+$ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) erkannt werden, führt dieser Vorgang über die Stimulierung von B-Zellen zur Auslösung einer humoralen Immunantwort [52, 55, 58].

Zur suffizienten antigenspezifischen T-Zellaktivierung ist es meist nicht ausreichend, dass der T-Zell Rezeptor Komplex (TCR) eines naiven T-Lymphozyten die an MHC-Moleküle gebundenen Peptide erkennt, sondern entsprechend des 2-Signal Modells zusätzlich Adhäsionsinteraktionen und Kostimulation über entsprechende Moleküle stattfindet. CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sind solche kostimulatorischen Moleküle, die auf der Oberfläche von Zellen, insbesondere auf gereiften DC exprimiert werden und durch Bindung an CD28 die klonale Proliferation, Zytokinsekretion und Effektor Funktion von $CD4^-$ und $CD8^+$ -positiven T-Lymphozyten verstärken [24, 52, 81]. Aktivierte T-Lymphozyten exprimieren einen zusätzlichen Rezeptor für CD80 und CD86, den CTLA-4, der dem CD28 strukturell sehr ähnelt. CTLA-4 hat jedoch eine negative Regulationsfunktion und verhindert damit eine überschießende Lymphozytenreaktion [67, 80]. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD50 (ICAM-3) und CD58 (LFA-3) auf der Oberfläche der DC wird ebenfalls im Rahmen dieses Reifungsprozesses hochreguliert [101, 110].

ICAM-Moleküle binden an T-zelluläre Integrine wie LFA-1 oder MAC-1, LFA-3 an CD2. Die Interaktion des von den DC exprimierten CD40-Moleküls mit dem T-Lymphozytären CD40-Ligand (CD40L) sowie das von den T-Lymphozyten freigesetzte IFN- γ regen die DC zur Sekretion von Chemokinen (IL-8, MIP-1 α und β) und Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-4 und IL-12 an. Diese Botenstoffe unterstützen nicht nur die Aktivierung bzw. Differenzierung von natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten, sondern stimulieren auch Makrophagen, B-Zellen und Eosinophile [4, 5, 12, 45, 89]. Der Reifungsprozess, der diese Interaktionen und damit eine effektive T-Zellstimulierung erst ermöglicht, kann allerdings durch Zytokine wie das von den T-Lymphozyten sezernierte IL-10 oder den tumorassoziierten „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) supprimiert werden [4, 45, 55, 105].

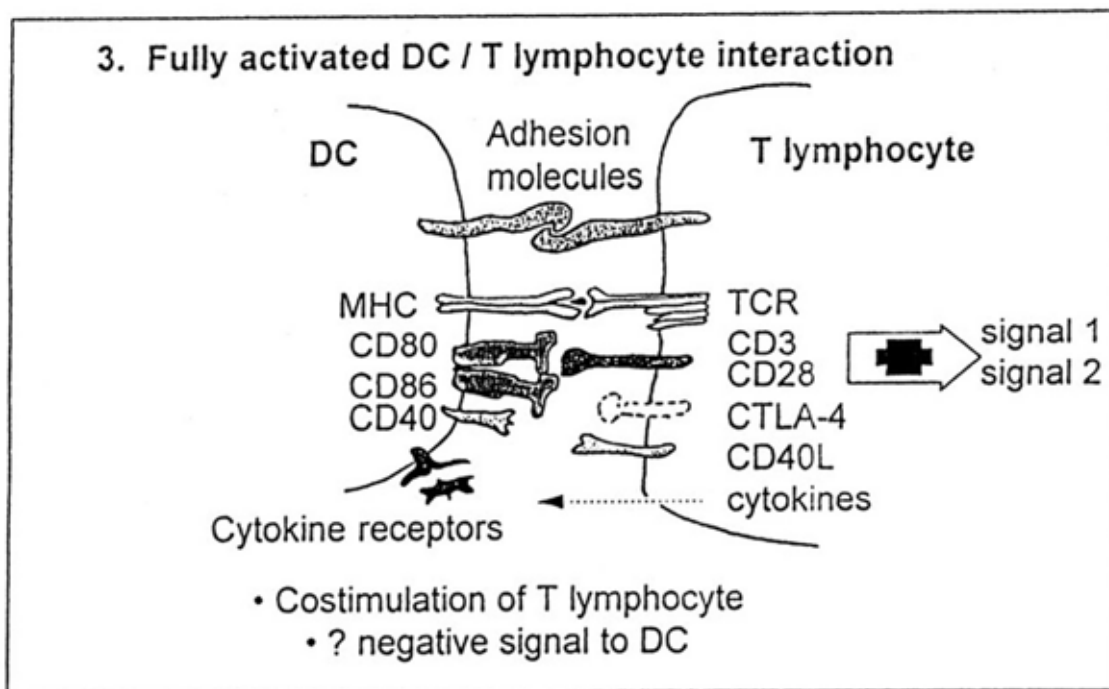


Abb.1 nach Hart DN [55]: Molekulare Interaktionen zwischen aktivierten DC und T-Lymphozyten. Entsprechend des 2-Signal-Modells bindet das antigentragende MHC-Molekül an den T-Zell Rezeptor und die Kostimulatoren CD80 und CD86 an CD28 und CTLA-4. Adhäsionsmoleküle binden entsprechend untereinander, CD40 mit CD40L. Aktivierende und inhibierende Zellsignale werden durch verschiedene Zytokine übermittelt.

1.3.4 Differenzierung muriner dendritischer Zellen in-vitro

Murine DC können heute in großer Zahl in-vitro durch Kultivierung von Maus-Knochenmark mit GM-CSF [64] oder einer Kombination von GM-CSF und IL-4 [22, 79, 94, 111] gewonnen werden. Problematisch bei der alleinigen Kultur mit GM-CSF ist allerdings die gleichzeitige starke Stimulierung von Granulozyten und Makrophagen, die dazu neigen die DC zu verdrängen [79, 64, 94]. IL-4 scheint neben der Unterdrückung der Makrophagendifferenzierung die Reifung der DC entscheidend zu unterstützen [78, 79, 110]. Alternativ können TNF α , Flt3-Ligand, LPS oder CD40-Ligand als weitere Zusätze verwendet werden. In Hinblick auf den Reifungsgrad der DC, gemessen an Morphologie, Antigenaufnahme, Migrationsverhalten, IL-12 Sekretion und Antigenpräsentation, erbrachte der Einsatz des CD40L nach vorangegangener Kultur mit GM-CSF und IL-4 die Erfolg versprechendsten Resultate [70]. Versuche mit Knock-out Mäusen ohne GM-CSF oder GM-CSF Rezeptor konnten beweisen, dass GM-CSF in-vivo nicht unbedingt für die Differenzierung notwendig ist, jedoch dessen Anwesenheit die Anzahl der DC zum Teil deutlich erhöht [107].

1.4 Experimentelle Grundlagen für neue immuntherapeutische Strategien

Grundlage der Immuntherapie ist die Hypothese, dass Tumorzellen spezifische Proteine auf ihrer Oberfläche exprimieren, die nicht oder in wesentlich geringerem Umfang auf gesunden Zellen nachweisbar sind. Unterstützt wird diese These durch die prognostisch besseren Ergebnisse, die im Rahmen der allogenen KMT beobachtet wurden. Der Erfolg scheint hierbei durch den sogenannten graft-versus-leukemia (GvL) Effekt hervorgerufen zu sein, der auf sich aus dem transplantierten KM entwickelnden allogenen zytotoxischen T-Lymphozyten basiert. Bei dem Versuch, durch T-Zell Depletion des Spender-KM die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (graft versus host disease = GvHD) nach allogener Transplantation abzuschwächen, kam es zu einem deutlichen Anstieg

der Rezidivrate. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die nach allogener KMT rezidierten, durch Infusion der Lymphozyten ihrer KM-Spender erneut eine CR induziert werden konnte [2, 10, 17, 38, 39, 40, 95]. Die Methode hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass nicht nur spezifisch die AML-Blasten angegriffen werden, sondern auch eine GvHD entstehen kann, bei der sich die transplantierten Spenderzellen gegen die Zellen des Empfängers richten und damit eine Reihe von zum Teil schwerwiegenden Komplikationen verursachen.

Ziel der zahlreichen Forschungsarbeiten ist es, das Immunsystem so zu stimulieren, dass es maligne Zellen erkennt und spezifisch abtötet. Mit derartigen immuntherapeutischen Maßnahmen wäre neben der akuten Tumorbehandlung als Ergänzung zur Chemo- oder Strahlentherapie bzw. Operation auch die Induktion einer Rezidivprophylaxe denkbar. Ein zentrales Problem dieser Ansätze liegt in der Fähigkeit der Tumorzellen, der Immunabwehr zu entgehen bzw. diese sogar zu inhibieren. Zu den verschiedenen Strategien, die den Tumorzellen zu eigen sind, gehören beispielsweise, dass sie das zur Antigenpräsentation wichtige MHC-Klasse-I Molekül herunterregulieren oder ein Mangel an der zur Aktivierung immunkompetenter Zellen essentiellen kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche. Aber auch eine unzureichende Expression an tumorspezifischen Antigenen bzw. deren fehlende Immunogenität sowie die tumorinduzierte Sekretion von immunsupprimierenden Faktoren (TGF- β und IL-10) und eine Fas-Ligand induzierte Apoptose aktivierter T-Lymphozyten kommen als Mechanismen in Frage [3, 21, 24, 30, 44, 45, 67].

Grundsätzlich bieten sich verschiedene experimentelle Möglichkeiten, um das Immunsystem entsprechend zu aktivieren:

1. Verbesserung der T-Zellaktivierung über Transfektion von Tumorzellen mit kostimulatorischen Molekülen

Auf der Oberfläche leukämischer Blasten sind meist in hoher Anzahl MHC-Moleküle der Klasse I und II nachweisbar, jedoch nur in Ausnahmefällen das Molekül CD80 [60]. Es konnte gezeigt werden, dass leukämische Blasten durch

Transfektion genetisch so verändert werden, dass sie CD80-Moleküle exprimieren und im Tiermodell eine Tumormunität und im geringeren Ausmaß auch eine therapeutische Wirkung erzielen können [7, 33, 61]. Die Reduktion der Tumorlast vor Behandlung mit transfizierten Zellen durch Chemotherapie verbesserte dabei die Ergebnisse deutlich [34]. In geringerem Umfang konnte dies auch für die Transfektion des kostimulatorischen Moleküls CD86 nachgewiesen werden [35].

2. Verbesserung der Immunantwort durch Zytokinstimulation

Die Immunogenität von Tumoren ist sehr unterschiedlich und wird unter anderem entscheidend von der Art und Menge vorhandener Zytokine mitbestimmt [26, 35, 42]. Auf dieser Annahme basierend wurden Vakzinationsversuche unter Verwendung von Zytokin-transfizierter Tumorzellen oder DCs durchgeführt, mit dem Ziel, eine potente Antitumor-Immunität zu induzieren. Der Einsatz von GM-CSF erwies sich hierbei als besonders erfolgreich [45, 68, 77]. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die zytokinvermittelte Migration und Differenzierung dendritischer Zellen zurückzuführen. [28, 32, 35, 42, 101, 110].

3. Verbesserung der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

Aufgrund der potenten Antigenpräsentation und der heute optimierten in-vitro Differenzierung sind DC ideale Effektorzellen für die Verstärkung der Immunantwort gegenüber Tumoren [5, 51, 53]. Ziel zahlreicher Forschungsarbeiten ist es, DC in-vitro zu gewinnen und sie dann mit tumorspezifischen Antigenen zu beladen. Von den auf diese Weise manipulierten Zellen erhofft man sich, dass sie – zurückgegeben in den Patienten – als ein „zelluläres Vakzin“ dem Immunsystem ermöglichen, gezielt Tumorzellen zu eliminieren. In tierexperimentellen Studien und in ersten Studien beim Menschen wurde demonstriert, dass DC nach in-vitro Kontakt mit tumorassoziierten Antigenen in der Lage sind, in-vivo sowohl eine prophylaktische [9, 22, 27, 50, 79, 88] als auch eine therapeutische Immunantwort hervorzurufen [23, 70, 71, 73, 111, 112], zum Teil sogar in weit fortgeschrittenen metastasierten Stadien [46, 47, 69, 85, 104].

Für den klinischen Einsatz der in-vitro differenzierten DC werden zurzeit unterschiedliche Strategien der Antigenbeladung verfolgt:

Pulsing mit tumorspezifischen Antigenen

Beim Pulsing werden DC mit tumorspezifischen Antigenen in Form von abgetöteten Tumorzellen oder Tumorzelllysaten koinkubiert [41, 43, 50, 86, 97, 111]. Die DC nehmen die Antigene aktiv auf und bauen sie größtenteils in Endosomen ab. Von dort werden die Peptide vornehmlich auf MHC-Klasse-II Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert. Dies hat allerdings zur Folge, dass vorwiegend CD4⁺-Zellen aktiviert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Koppelung der Peptide an Partikel oder heat-shock-Proteine eine vermehrte MHC-Klasse-I gebundene Antigenpräsentation und somit die für die Tumorthherapie als effektiver angesehene zytotoxische Immunantwort induziert werden kann [54, 58]. Die direkte Beladung der MHC-Klasse-I Moleküle der DC von außen mit tumorspezifischen Peptiden sichert die Dominanz der zytotoxischen Immunantwort [22, 36, 87, 88], jedoch ist die MHC-Restriktion ein entscheidender Nachteil. Nicht jedes bekannte Peptid passt auf die spezifischen MHC-Moleküle. Somit wird die Verwendung von bereits bekannten Peptiden limitiert sowie eine HLA-Typisierung vor Therapiebeginn erforderlich [83]. Problematisch ist auch, dass erst wenige tumorspezifische Antigene identifiziert worden sind, die von T-Zellen entsprechend erkannt werden können [45, 58, 79]. Eine weitere Alternative liegt in der Verwendung von tumorspezifischer m-RNA, bei der mittels PCR eine große Anzahl an Antigenen aus sehr geringen Mengen an Tumorgewebe gewonnen werden kann [9, 45]. Diese birgt jedoch auch die Gefahr einer unerwünschten Autoimmunreaktion im Falle großer Ähnlichkeit der kodierten Tumorepitope mit denen der gesunden Gewebeproteine [83].

Transfektion mit DNA

Tumor-DNA wird in die DC eingebracht und von ihr selbst transkribiert und translatiert. Im Rahmen des normalen Zellstoffwechsels wird das produzierte Fremdprotein schließlich abgebaut. Die dabei entstehenden Proteine werden

von der Zelle auf MHC-Moleküle geladen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der gezielten Einschleusung des Antigens in das zytoplasmatische Kompartiment der Zelle, die die Kopplung des Proteins an ein MHC-Klasse-I Molekül zur Folge hat und damit die zur Tumorthherapie gewünschte Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen [45, 58, 68].

Fusion dendritischer Zellen mit Tumorzellen

Um die immunstimulatorischen Fähigkeiten der DC mit den Antigenen des Tumors zu vereinen, werden DC und Tumorzellen mittels chemischer Substanzen oder elektrisch miteinander verschmolzen. Die so erzeugten Fusionszellen präsentieren an ihrer Oberfläche sowohl die tumorspezifischen Antigene als auch die für DC typische und für eine effektive T-Zellstimulation notwendige hohe Anzahl an MHC-Klasse-I und -II Molekülen sowie kostimulatorischer Signale [23, 43, 46, 48, 56, 69, 71, 108]. Die Fusionierung hat den Vorteil, dass polypeptidische Vakzine hergestellt werden, die den polyklonalen TU-Zellen mehr entsprechen als einzelne ausgewählte Antigene und somit die Möglichkeit einer Selektion von Tumorzellvarianten, die das entsprechende Antigen nicht präsentieren, reduzieren [43, 73]. Allerdings besteht die Gefahr, dass auch gesunde Zellen mit DC fusionieren und dadurch eine unerwünschte Autoimmunantwort ausgelöst wird [56].

Thema weiterer Forschungsgruppen ist die in-vivo-Stimulation der DC. Die systemische Verabreichung vom Wachstumsfaktor Flt3-Ligand konnte beispielsweise im tierexperimentellen Modell eine deutliche Expansion der DC in-vivo induzieren [89, 94]. Eine weitere Alternative stellt die orale Verabreichung von mit Tumorantigenen transfizierten Bakterien dar. In diesem Fall liefert das Bakterium nicht nur das relevante Antigen, sondern zusätzlich DC-aktivierende Signale (LPS) [45, 53].

1.5 Das Leukämiemodell der SL/AM-Maus

Die immunkompetente SL/AM-Maus gehört zu dem in Japan etablierten SL-Inzuchtstamm [1]. 1969 konnte Ichikawa die M1-Zelllinie der SL/AM-Maus isolieren, eine spontane und nicht eigenständig immunogen wirkende promyelozytäre AML [61, 63].

Durch die i.v. Injektion von $\geq 10^4$ M1-Zellen kann in den syngenen Tieren eine Leukämie ausgelöst werden, an der die Tiere innerhalb von 60 Tagen erkranken und versterben [61].

1.6 Problemstellung und eigener Ansatz

Die Ergebnisse der derzeitigen AML-Therapie sind auf Grund der hohen Rezidivraten von über 60% bzw. bei den über 60-Jährigen von über 85% in den ersten 5 Jahren weiterhin unbefriedigend. Eine Verbesserung der Prognose ist vor allem durch eine Optimierung der Postremissionstherapie zu erwarten. Eine interessante Ergänzung zur Intensivierung der Chemotherapie mit ihren erheblichen Nebenwirkungen scheint hier die Immuntherapie zu bieten. Die Ergebnisse von Studien über Knochenmarktransplantationen sowie von den oben beschriebenen immuntherapeutischen Ansätzen sind ermutigend. Zusätzlich ermöglicht die hohe Sensitivität der Diagnostik die frühzeitige Erkennung einer MRD, bei der derartige Therapiekonzepte am Erfolg versprechendsten sind.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung eines neuen Therapieverfahrens zur immuntherapeutischen Behandlung der AML. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens sollte ein valides tierexperimentelles Modell entwickelt werden, das richtungweisend für spätere Studien am Menschen sein könnte. Auf der Hypothese basierend, dass sich durch eine Verbesserung der Präsentation leukämiespezifischer Antigene eine zytotoxische Immunantwort induzieren lässt, sollten in-vitro fusionierte Hybridzellen aus DC und AML-Blasten als Vakzine in-vivo im Leukämiemodell der SL/AM-Maus getestet werden.

Folgende Punkte sollten erarbeitet bzw. geprüft werden:

1. Standardisierung des Leukämie-modells der SL/AM-Maus
 - Wie viele M1-Zellen werden benötigt um eine Leukämie zu induzieren?
 - Innerhalb welchen Zeitraumes erkranken bzw. versterben die Tiere post injectionem?
 - Ist der Einsatz dieses Tiermodells für die Evaluierung immunologischer Therapiemethoden der AML als realistisch zu betrachten?
 - Ist die M1-Zelllinie selbst immunogen?

2. Etablierung des Protokolls zur Gewinnung von DC aus murinem KM
 - Ist die Gewinnung reifer DC mit dem uns vorliegenden Protokoll möglich?
 - Weisen die DC nach 9 Tagen der Kultur spezifische morphologische und immunphänotypische Merkmale auf?
 - Wie viele reife DC sind nach 9 Tagen Kultur pro Maus zu ernten?

3. Fusion von DC und M1-Zellen
 - Ist die Fusionierung von DC und M1-Zellen mit dem uns vorliegenden Protokoll möglich sowie morphologisch und immunphänotypisch nachweisbar?

4. Einsatz von autologen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML
 - Ist eine Immunisierung der SL/AM-Maus gegenüber der M1-induzierten AML mit fusionierten Zellen bestehend aus autologen DC und AML-Blasten möglich?

5. Einsatz von allogenen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML
- Ist eine Immunisierung der SL/AM-Maus gegenüber der M1-induzierten AML mit fusionierten Zellen bestehend aus allogenen DC und AML-Blasten möglich?
 - Besteht ein Unterschied bezüglich der immunologischen Wirksamkeit der fusionierten allogenen DC-M1-Zellen und der autologen DC-M1-Zellen?
6. Einfluss der Fusion auf die Induktion einer Antitumoraktivität: Vergleich verschiedener Vakzinaufbereitungsformen bestehend aus DC und M1
- Haben die Injektionen mit Mixturen aus autologen bzw. allogenen DC und M1-Zellen einen immunisierenden Effekt?
 - In welchem Verhältnis stehen sie zu den Vakzinierungen mit DC-M1-Fusionszellen?

2. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an Albinomäusen des syngenen SL/AM-Stammes durchgeführt. Da diese Mauslinie weder in Europa noch in den USA verfügbar ist, wurde ein Stamm von Tieren aus einer japanischen Zucht (Dr. Akinori Ishimoto, Virus Research Institute, Kyoto University, Japan) in der zentralen Tierversuchsanlage der Universität Münster etabliert (Leiter: Prof. Dr. med. vet. Richter). Die Weiterzucht und Versorgung wurde von unserer AG vollständig übernommen. Unter keimarmen Bedingungen (belüftete Käfige mit Filterabdeckung, die inklusiver der Streu und des Wassers autoklaviert wurden; Umsetzen der Tiere unter steriler Werkbank) wurden alle Mäuse bei einer Raumtemperatur von $21 \pm 2^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 5\%$ in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 10:14 Stunden gehalten und mit Altromin-Haltungsfutter und autoklaviertem Wasser ad libitum gefüttert.

Für die Versuchsreihen wurden 6-34 Wochen alte SL/AM-Mäuse eingesetzt und zu je 5 (weibliche Tiere) bzw. einzeln (männliche Tiere) in einem Käfig gehalten. Die Zuteilung zu den einzelnen Versuchsgruppen war streng zufällig. Jede am Versuch teilnehmende Maus wurde durch entsprechende Einschnitte am Ohr gekennzeichnet, um Verwechslungen untereinander auszuschließen.

Für einen Teil der Versuche wurden 32-48 Wochen alte Mäuse des C3H/HeJ Stammes (Charles River Laboratories, Germany) zur Knochenmarkspende verwendet. Diese Mäuse wurden unter den gleichen Bedingungen wie die SL/AM-Mäuse gehalten.

(Die Genehmigungen des Tierschutzbeauftragten der Universität Münster Dr. Otto und der Tierschutzkommission des Regierungspräsidenten von Münster, vertreten durch Dr. Piontkowski, zur Einfuhr und Zucht der Mäuse (Zeichen 39/401a) vom 15.03.99 sowie zur Durchführung der geplanten Versuche Zeichen G23/98, G20/2000) vom 02.12.98 bzw. 26.05.00 liegen vor. s. Anhang).

2.2 Material

2.2.1 Reagenzien

- MEM Alpha, ohne RNS und DNS, Gibco BRL, Paisley, UK
- Dulbecco's MEM (DMEM), ohne Sodium Pyruvat, mit Glucose und Pyridoxine HCL, Gibco BRL, Paisley, UK
- RPMI 1640 ohne Serum, 20mM Hepes Puffer ohne NaHCO₃, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Phosphat gepufferte Saline (PBS) Dulbeccos, ohne Calcium, Magnesium und Sodium Bikarbonat, Gibco BRL, Paisley, UK
- CellGro DC Medium, CellGenix Technologies Transfer GmbH, Freiburg, Deutschland
- Fetales Kälber Serum (FKS), Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- L-Glutamin, (200mM), Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Penicillin / Streptomycin (P/S), Gibco BRL, Paisley, UK
- Gentamycin, Sigma, San Louis, USA
- Vitamins, 100x konzentriert, Gibco BRL, Paisley, UK
- Nicht essentielle Aminosäuren (NEA), 100x konzentriert, Gibco BRL, Paisley, UK
- Mercaptoethanol (ME), Sigma, San Louis, USA
- Pyruvat, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF, recomb. mouse), PharMingen, Heidelberg, Deutschland
- Interleukin-4 (IL-4, recomb. mouse), PharMingen, Heidelberg, Deutschland
- Polyethylenglykol-Lösung (PEG solution), Sigma, San Louis, USA
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl), Sigma, San Louis, USA
- Kaliumhydrogencarbonat (KH CO₃), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Äthylendiamintetraessigsäuresalz (Na-EDTA), Serva, Heidelberg, Deutschland

- dH₂O, Zentralapotheke der Universitätskliniken, Münster, Deutschland
- Natriumnitrat (NaN₃), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Hitzestabiles Antigen (HSA) 20%, Baxter Deutschland GmbH, München, Deutschland
- Propidiumjodid (PI), 95-95%, Sigma, San Louis, USA
- Quicklyser, Sysmex Corporation, Kobe, Japan
- Alkohol 70%, Zentralapotheke der Universitätskliniken, Münster, Deutschland
- Diethylether pro narcosi, Zentralapotheke der Universitätskliniken, Münster, Deutschland
- Formalin, Zentralapotheke der Universitätskliniken, Münster, Deutschland
- Isotone Kochsalzlösung 0,9% Braun, B/Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

2.2.2 Geräte und Gefäße

- Begasungsbrutschrank Cytoperm (5% CO₂, 37,5°C), Sepatech, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Sterilbank VFB 1806, ClanLaf, Dänemark
- Sterilbank, Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
- Cryofuge M 7000, Sepatech, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Labofuge M, Sepatech, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Phasenkontrastmikroskop / IMT-2, Olympus, Hamburg, Deutschland
- Phasenkontrastmikroskop / IM 35, mit Photoapparat, Zeiss, Deutschland
- Heizbares Wasserbad, Kottermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
- Microcellcounter F 300, Sysmex, Norderstedt, Deutschland
- Auto Dilutor AD 260, Sysmex, Norderstedt, Deutschland
- Cytospinn, Shandon Elliott, Pittsburgh, USA
- Vortex Genie 2TM, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

- Vacuum Pump XF54 23050, Milipore, Molsheim, Frankreich
- FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA
- Filtercards, Shandon INC, Pittsburgh, USA
- Falcontubes 15ml, 50 ml, Becton Dickinson, San Jose, USA
- 6-Well-Platte, Nunclon, Multidish, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- Zellkulturflasche, Nunclon, 175ml und 250ml, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- Nunc Cryo Tubes, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- Zellkulturschale, Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, USA
- Rundbodenröhrchen (Polysterol), 5ml, Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, USA
- Cellstrainer, 100µm, Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
- Steriflip, 50ml, Milipore, Molsheim, Frankreich
- Filter, Millex-GV, Millex-FG, Milipore, Molsheim, Frankreich
- Einmalkanülen TSK Supra, steril, TSK, Tochigi, Japan
- Pipettierhilfe Pipettboy acu, Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
- Pipetten, steril, 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml, Becton Dickinson Labware, NJ USA
- Pipette Typ Reference, 1-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen, steril und unsteril, Steriltips, 10µl, 100µl, 1000µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Einmalspritzen steril, 10ml, AMETA, Kriftel, Deutschland
- Omnifix, Einmalspritzen steril, 1 ml, B/Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Sterican, Einmal-Injektions-Kanüle, Gr.18, B/Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Objektträger 76x26mm, Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Ebermünde, Deutschland
- Altromin-Haltungsfutter 1324 Ratten / Mäuse, Altrogge, Lage, Deutschland
- Makrolon-Mauskäfige, Charles River Laboratories, Deutschland

2.2.3 Gebrauchslösungen

M1-Kulturmedium

A-MEM	215,5 ml
DMEM	215,5 ml
FKS	50 ml
P/S	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Pyruvat	5 ml
NEA	2 ml
Vitamine	2 ml

DMEM und α -MEM wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und mit 10% FKS, 1% gefiltertem P/S, 1% gefiltertem L-Glutamin und 1% Pyruvat sowie mit NEA und Vitaminen versetzt.

BmDC-Medium

RPMI 1640	500 ml
FKS	25 ml
L-Glutamin	5 ml
NEA	50 μ l
ME	3,5 μ l
Gentamycin	750 μ l

5% FKS und je 1% L-Glutamin und NEA, sowie je 50 μ M ME und Gentamycin wurden gefiltert und zu 500 ml RPMI hinzugegeben.

(Entspricht dem Protokoll nach Inaba et al. [64], modifiziert nach den persönlichen Angaben von Mitarbeitern der Forschungsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. S. Grabbe der Dermatologie der Universität Münster).

Erythrozyten-Lyse-Puffer

dH ₂ O	500 ml
NH ₄ Cl	4,15 g
KHCO ₃	0,5 g
NaEDTA	1,85 mg

NH₄Cl, KHCO₃ und NaEDTA wurden in destilliertem Wasser gelöst und gefiltert. (Entspricht dem Protokoll nach Inaba et al. [64], modifiziert nach den persönlichen Angaben von Mitarbeitern der Forschungsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. S. Grabbe der Dermatologie der Universität Münster).

Spüllösung

PBS	500 ml
FKS	5 ml

PBS wurde mit 1% FKS ergänzt.

Fusionsmedium ohne Serum

RPMI 1640	500ml
L-Glutamin	2,5ml
Gentamycin	0,5ml

RPMI wurde mit 1% einer 100 mM Glutaminlösung und 50 µg/ml Gentamycin versetzt. (Entspricht dem Protokoll nach Lindel et al. [72]).

Fusionsmedium mit Serum

RPMI 1640 500 ml
L-Glutamin 5 ml
Gentamycin 0,5 ml
FKS 50 ml

1% einer 200 mM Glutaminlösung, sowie 50 µg/ml Gentamycin und 10% FKS wurden RPMI hinzugefügt. (Entspricht dem Protokoll nach Lindel et al. [72]).

FACS-Stammlösung

PBS 20 ml
NaN₃ 4 g

Natriumnitrat wurde PBS hinzugegeben.

FACS-Waschpuffer

PBS 1000 ml
HSA (20%) 5 ml
FACS-Stammlösung 5 ml

PBS wurde mit HSA und FACS-Stammlösung versetzt.

2.2.4 FACS-Antikörper

- Chrom Pure Mouse IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland
- Rat IgG2b, purified, Isotypenkontrolle, PharMingen, Heidelberg, Deutschland
- CD 11c, hamster-anti-mouse, purified, Endogen, Woburn, MA, USA
- CD 40, rat-anti-mouse, purified, PharMingen, Heidelberg, Deutschland

- CD 80, rat-anti-mouse, purified, PharMingen, Heidelberg, Deutschland
- CD 86, rat-anti-mouse, purified, PharMingen, Heidelberg, Deutschland
- Dendritische Zellen, interdigitierend (DEC 205 = NLDC-145), rat-anti-mouse, Dianova, Hamburg, Deutschland
- I-A^d, aus Überstand, rat-anti-mouse, freundl. Überlassung von Prof. Dr. med. S. Grabbe, Dermatologie der WWU Münster, Deutschland
- Goat-anti-rat IgG FITC (Fluoresceinisothiozyanat), Dianova, Hamburg, Deutschland
- Rabbit-anti-hamster (arm.) IgG FITC, Dianova, Hamburg, Deutschland
- Mouse IgG2a FITC Isotypenkontrolle, Dianova, Hamburg, Deutschland
- Mouse IgG2a PE (Phycoerythrin) Isotypenkontrolle, Dianova, Hamburg, Deutschland
- CD 54,(anti-mouse)-FITC, Dianova, Hamburg, Deutschland
- CD 80, (anti-mouse)-FITC, Dianova, Hamburg, Deutschland
- CD 86, (anti-mouse)-PE, Dianova, Hamburg, Deutschland
- CD 135, (anti-mouse)-PE, PharMingen, Heidelberg, Deutschland

2.2.5 Tumorzelllinie

M1, murine myeloid leukemia, DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

2.2.6 Programme

- FACSCalibur-Research-Software, Cellquest, Becton Dickinson, San Jose, USA
- Caliburstation, BD applications für FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA
- SPSS für Windows, Version 11,5, Programmsystem der Universität Münster, Deutschland

2.3 Methoden

2.3.1 M1-Zellkultur

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage auf eine Konzentration von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/ml neu in M1-Medium (s. 2.2.3) eingestellt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.2 Gewinnung und Kultur von Maus-BmDC

Nach Tötung des Tieres durch tiefe Ethernarkose mit anschließendem Genickbruch und Waschung der Maus mit 70%igem Alkohol wurden unter sterilen Bedingungen Femur und Tibia beidseitig entnommen, sauber präpariert, knapp ober- bzw. unterhalb der gelenkbildenden Anteile eröffnet und mit sterilem PBS +1% FKS freigespült. Nach Erzeugung einer Einzelzellsuspension aus den zusammenhängenden Knochenmarkszellen durch mehrmaliges Pipettieren wurde diese mit 1250 rpm für 6-7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Erythrozyten wurden durch Zugabe des Erythrozyten-Lyse Puffers aufgelöst. Nach 3 Minuten wurde die Suspension durch ein Nygonsieb gespült und ein zweites Mal gewaschen. Nach 2-stündiger Inkubation der Zellen in einer Konzentration von 10 ml BmDC-Medium pro 2 Mäuse pro Zellkultur-schale wurden die nichtadhaerenten Zellen geerntet und unter Zugabe von 150 U/ml GM-CSF und 75 U/ml IL-4 in einer Konzentration von $0,6 \times 10^6$ Zellen in einer 6-well-Platte neu ausgesät. Diese Prozedur bestehend aus Ernten, Waschen, Aussähen und erneuter Stimulation mit Zytokinen wurde an Tag 4 und 7 wiederholt. In einem Teil der Versuche wurde am 7. Tag das BmDC-Medium durch CellGro DC Medium ersetzt. An Tag 9 waren die DC ausgereift. (entspricht dem Protokoll nach Inaba et al. [64], modifiziert nach den persönlichen Angaben von Mitarbeitern der Forschungsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. S. Grabbe der Dermatologie der Universität Münster).

2.3.3 Fusion von DC mit M1-Zellen

Um die Antigeneigenschaften der Zellen zu vereinen, wurden je 1×10^6 DC und 1×10^6 M1-Zellen mit 40 ml Fusionsmedium ohne Serum vorsichtig vermischt und bei 4°C für 10 Minuten bei $400 \times g$ zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das durch weiches Klopfen aufgelockerte Sediment wurde tropfenweise mit 1 ml, zuvor auf 37°C erwärmtem Polyethylenglycol (PEG) versetzt und für 60 Sekunden in das Wärmebecken gestellt. In Minutenschritten wurde dann die Zellmischung mit serumfreiem Fusionsmedium verdünnt und nach 5 Minuten mit serumhaltigem Fusionsmedium gewaschen. (entspricht dem Protokoll nach Lindel et al. [72])

2.3.5 Immunphänotypisierung

Markierung mit monoklonalen Antikörpern

Die verwendeten monoklonalen Antikörper sowie die Klassifikation der Antigene nach der CD Nomenklatur sind in der Tabelle 1 aufgeführt [67].

Tabelle 1: Antigennomenklatur

Antigen	Antikörper	Zelltyp	Funktionen
CD11c (CR4, gp150/95)	Anti-CD11c	Myeloide Zellen	Untereinheit des Integrins CR4; bindet Fibrinogen
CD40	Anti-CD40	B-Zellen, Makrophagen, DC, Epithelbasalzellen	bindet CD40L; Rezeptor für kostimulatorische Signale der B-Zellen; fördert Zytokinproduktion bei Makrophagen und DC

CD54 (ICAM-1)	Anti-CD54	Hämatopoetische und nichthämatopoetische Zellen	interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1; bindet das CD11a/CD18 Integrin (LFA-1) und das CD11b/CD18 Integrin (Mac-1)
CD80 (B7-1)	Anti-CD80	Untergruppen von B-Zellen, DC	Costimulator, Ligand für CD28 und CTLA-4
CD86 (B7-2)	Anti-CD86	Monozyten, aktivierte B-Zellen, DC	Costimulator; Ligand für CD28 und CTLA-4
CD135 (flt3, FLK2, STK-1)	Anti-CD135	Multipotente Vorläufer- zellen, Vorläufer von myeloiden Monozyten und B-Zellen, M1-Zellen [8]	Rezeptor für Wachstumsfaktoren
DEC 205 (vormals NLDC-145) = interdigitierendes Zell-Antigen [64]	Anti- DEC 205	interdigitierende DC, aktivierte Makrophagen, Epithelzellen des Thymus	bindet Antigene, um diese an die weiter- verarbeitenden Kompartimente zu leiten, ähnelt dem Mannose-Rezeptor [55, 65, 101]
I-A ^d = murines MHC-Klasse-II- Molekül [61]	Anti-I-A ^d	DC, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, aktivierte T-Zellen; nicht auf M1-Zellen [61]	präsentiert endogene Peptide den CD4 ⁺ T-Lymphozyten

Die zu charakterisierenden Zellen bzw. Zellsuspensionen wurden auf 5×10^5 – 1×10^6 Zellen in geringem Volumen konzentriert und mit unspezifischen Mausantikörpern (Chrom Pure Mouse IgG) 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden für 60 Minuten die gewünschten Antikörper hinzugegeben. Aufgrund der zum Teil verwendeten, nicht direkt mit Farbstoff konjugierten Antikörper (CD11c, CD40, CD80, CD86, DEC 205, IA^d) war in diesen Fällen ein weiterer 30-minütiger Inkubationsschritt mit farbkonjugierten Sekundärantikörpern (Sek-AK) notwendig. Sämtliche Färbeschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach den Färbeschritten wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zugabe von PI unmittelbar vor der Durchflusszytometrie, um avitale Zellen bzw. Zellfragmente anzufärben und somit bei der Datenanalyse abgrenzen zu können, erwies sich als hilfreich.

Tabelle 2: Färbeprotokoll zur FACS-Messung

Ansatz	1. gefärbtes Antigen (FITC)	2. gefärbtes Antigen (PE)
1	Isotypkontrolle (+Sek-AK)	
2	CD40 (+Sek-AK)	
3	CD54	
4	CD80 (+Sek-AK)	
5	CD86 (+Sek-AK)	
6	DEC 205 (+Sek-AK)	
7	IA ^d (+Sek-AK)	
8	Isotypkontrolle	Isotypkontrolle
9	CD86	CD80
10	CD11c (+Sek-AK)	CD11b
11	IA ^d (+Sek-AK)	CD135

Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie (FACS^R = fluorescence-activated cell sorter) ermöglicht die Identifizierung und das Sortieren von Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Dabei können Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzfarben bestimmt werden [102]. Nach Blockade der Fc Rezeptoren mit unspezifischen Antikörpern wird die zu analysierende Zellsuspension mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantigene der Zellen inkubiert. Die spezifischen Antikörper sind oder werden dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, um bestimmte Zellen in einer Population entsprechend den von ihnen spezifisch präsentierten Oberflächenmolekülen zu markieren. Die Suspension wird in ein wesentlich größeres Volumen einer Salzlösung aufgenommen und durch eine Kapillare gedrückt. Durch den so entstandenen feinen Flüssigkeitsstrahl wird erreicht, dass die Zellen den Analysepunkt am Laser einzeln passieren. An diesem Punkt kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung und die gebundenen Farbmoleküle werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute Licht, das Informationen über die Größe und die Granularität liefert, als auch das emittierte Licht, welches Auskünfte über die Expression der Oberflächenproteine jeder einzelnen Zelle ermöglicht. Diese Daten werden vom Computer analysiert und in einem Histogramm (angewendet bei nur einem Farbstoff) oder in einem Dot-Plot, einem zweidimensionalen Streudiagramm (angewendet bei 2 oder mehr verschiedenen Farbstoffen), dargestellt. Zur korrekten Auswertung ist eine Kontrollmessung zur Berücksichtigung der Autofluoreszenz unerlässlich. Die prozentualen Anteile der für die verschiedenen Farbstoffe bzw. Antigene positiven oder negativen Zellen werden zusätzlich als berechnete Daten in einer Tabelle aufgelistet [67].

2.3.6 Übertragung der Leukämie

Die zu injizierende Zellsuspension wurde unter Verwendung von gekühltem PBS als Trägersubstanz entsprechend des Protokolls von Hirano et al. [61] auf eine Konzentration von 5×10^4 M1-Zellen/200 μ l eingestellt und während der gesamten Zeit auf Eis gelagert.

Jedem Tier wurden exakt 200 μ l in die zuvor unter Einwirkung von Rotlicht dilatierte Schwanzvene injiziert. Die Kompression der Einstichstelle für 1-2 Minuten konnte ein Austreten der Injektionsflüssigkeit verhindern.

2.3.7 Vakzinierung und Challenge

Die verschiedenen Vakzine wurden auf unterschiedliche, der Tabelle 3 zu entnehmende Konzentrationen eingestellt. Trägersubstanz und Lagerung waren wie in 2.3.6 beschrieben. Eine möglicherweise denkbare eigene leukogene Wirkung der Vakzine wurde durch eine vor der Injektion durchgeführte Bestrahlung der Zellen mit 30 Gy ausgeschlossen. Die Injektion wurde wie unter 2.3.6 erläutert mit 200 μ l pro Maus durchgeführt und im Abstand von 14 Tagen wiederholt. Nach Ablauf weiterer 14 Tage wurde den Mäusen die leukogen wirkende Dosis von 5×10^4 unbestrahlten M1-Zellen wie bereits unter 2.3.6 beschreiben verabreicht. Da anfänglich vermehrt Embolien direkt nach der 2. Vakzinierung bzw. nach M1-Challenge auftraten, wurden die Zellsuspensionen mit 3 Tropfen Heparin pro 5 ml versetzt und das Volumen pro Maus von 200 auf 300 μ l erhöht.

Tabelle 3: Vakzinkonzentrationen

Vakzine	Zellzahl
M1	5×10^4
DC(SL)/M1 – Fusion (autolog)	$2,5 \times 10^5$
DC(C3H)/M1 – Fusion (allogen)	$2,5 \times 10^5$
DC(SL)/M1 – Mixtur (autolog)	1×10^6
DC(C3H)/M1 – Mixtur (allogen)	1×10^6

2.3.8 Gewinnung von Mausorganen

Moribunde Tiere wurden in tiefer Ethernarkose durch einen Genickbruch getötet oder beim täglichen Kontrollgang tot im Käfig aufgefunden. Nach gründlichem Abspülen der Maus mit 70%igem Ethanol wurden Sternum, Leber und Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und der Situs auf eventuell vorhandene Tumoren überprüft. Die Organe wurden fotografiert und für die Aufbereitung zur mikroskopischen Untersuchung in Formalin fixiert.

2.3.9 Gewinnung von peripherem Blut

Dies war nur in Fällen möglich, in denen die Maus getötet und rasch gearbeitet wurde, da im anderen Fall das Blut bereits geronnen war. Nach Eröffnung des Brustkorbes wurde das Herz dargestellt und punktiert. Das über eine Kanüle aspirierte Blut wurde auf einen Objektträger aufgetragen, ausgestrichen und ins hämatologische Labor der Universität Münster zur Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbung gegeben.

2.3.10 Gewinnung von Knochenmarkzellen, -kulturen und -ausstrichen

Wie unter 2.3.2 beschrieben wurde das Knochenmark der verstorbenen Tiere aus einem Femur gewonnen und eine Einzelzellsuspension in PBS hergestellt. Die KM-Zellen wurden durch ein Nylonsieb gefiltert, gewaschen, mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 Zellen/ml in M1-Medium aufgenommen und in 6-well-plates inkubiert. Zusätzlich wurde von dieser frischen Knochenmarkzellsuspension ein Cytospinn hergestellt und fotografiert.

Der andere Femur wurde zur Gewinnung eines Knochenmarkausstriches ebenfalls ausgelöst und sorgfältig von noch anhängendem Muskelgewebe befreit. Der Femurkopf und die Kondylen wurden abgetrennt und der Femur auf einem Objektträger zerquetscht und verrieben. Das so entstandene Präparat

wurde im hämatologischen Labor des Universitätsklinikums Münster mit HE gefärbt.

2.3.11 Aufbereitung der Organe zur mikroskopischen Untersuchung

Die lichtmikroskopische Begutachtung der Organe wurde für jede Versuchsgruppe durchgeführt. Dazu wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster die in Formalin fixierten Gewebeproben entwässert und in Paraplast eingebettet. Die Schnittserien wurden mit HE angefärbt.

2.3.12 Statistische Analyse

Die Überlebenszeitanalysen wurden unter Verwendung von SPSS errechnet und in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

Zur Signifikanzberechnung der Unterschiede zweier Vakzine in den Überlebenszeitkurven wurde der Logranktest bzw. bei sich überschneidenden Kurven der Breslowtest angewendet. Die Signifikanz war als $p < 0,05$ definiert.

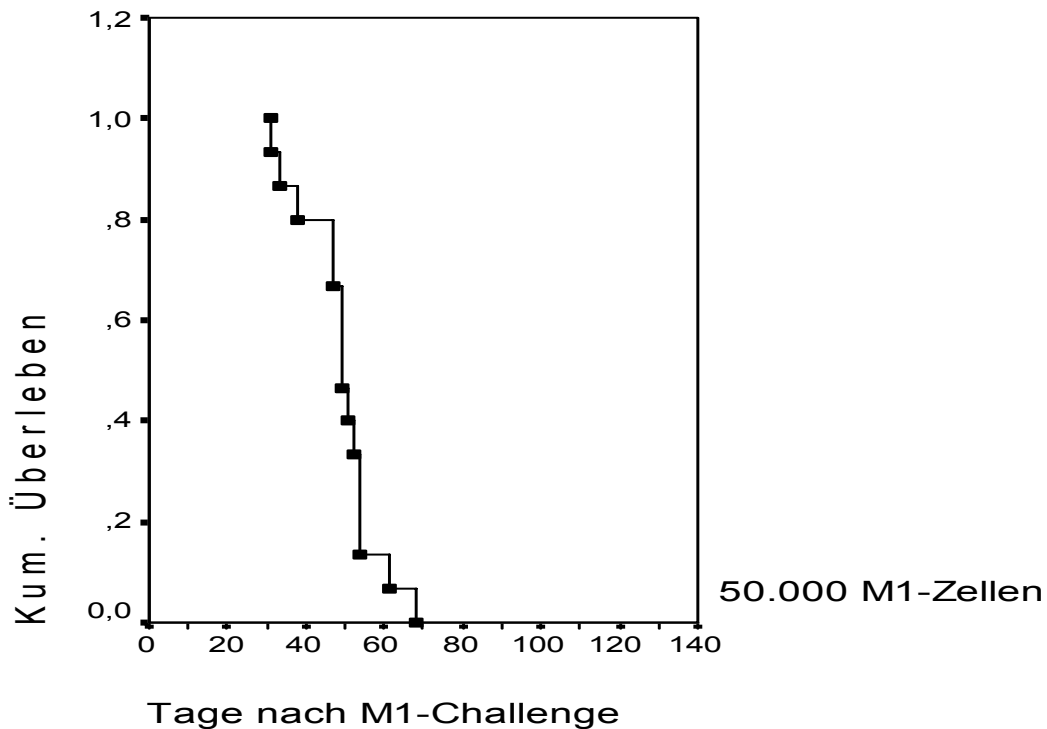
3. ERGEBNISSE

3.1 Standardisierung des Leukämiemodells der SL/AM-Maus

3.1.1 Beobachtungen nach Verabreichung einer leukämieinduzierenden Dosis M1-Zellen

In 3 Versuchsreihen mit je 5 Tieren wurden an Tag 0 je 5×10^4 M1-Zellen intravenös in die Schwanzvene gesunder, immunkompetenter SL/AM-Mäuse injiziert. Die Tiere wurden täglich auf Anzeichen von Krankheitssymptomen überprüft. Moribunde Mäuse wurden getötet, um ein unnötig langes Leiden zu verhindern. Nach einer Latenzzeit von 30 Tagen erkrankten die ersten Tiere. Dem Finalstadium gingen meist einige Tage voraus, in denen zunehmende Dyspnoe und Abgeschlagenheit sowie eine Steigerung des Leibesumfangs auf Grund massiven Aszites zu beobachten war. In seltenen Fällen entwickelten die Mäuse äußerlich sichtbare Tumoren. Eine Maus wurde aufgrund einer Querschnittssymptomatik getötet. Alle injizierten Tiere verstarben zwischen Tag 31 und Tag 68 post injectionem. Der Median für die Überlebenszeit lag bei 49 Tagen (Grafik 1).

Überlebenszeit nach M1-Challenge



Grafik 1: Überlebenszeit der Mäuse nach i.v. Injektion mit 5×10^4 M1-Zellen. Die Tiere verstarben zwischen dem 31. und 68. Tag post injectionem. Der Median für die Überlebenszeit betrug 49 Tage.

Die Sektion der Mäuse ergab eine regelmäßig auftretende massive, aszitesbegleitete Splenomegalie, zumeist kombiniert mit einer Heptomegalie (siehe Abb. 2 + 3). Zum Teil waren makroskopisch sichtbare stark vergrößerte Lymphknoten in Leisten und Axillen sowie Tumoren entstanden. Der in einem Fall aufgetretenen Querschnittslähmung lag eine Fraktur des zwölften Brustwirbelkörpers zu Grunde. Die gewonnenen KM-Zellen entsprachen der typischen Morphologie des M1-Zellklons mit kleiner rundlich-ovaler Form, glatt begrenzt und einem den größten Teil des Zytoplasma einnehmenden Zellkern. Die immunphänotypische Analyse ergab ebenfalls das charakteristische Oberflächenmarkerbild der M1-Zelllinie mit einem deutlichen Mangel an MHC-Klasse-II Molekülen und CD 80. Unter M1-Kulturbedingungen zeigten sie ein gutes Wachstum (Abb. 4).



Abb. 2: Offener Situs einer an AML verstorbenen Maus mit deutlicher Hepatosplenomegalie.

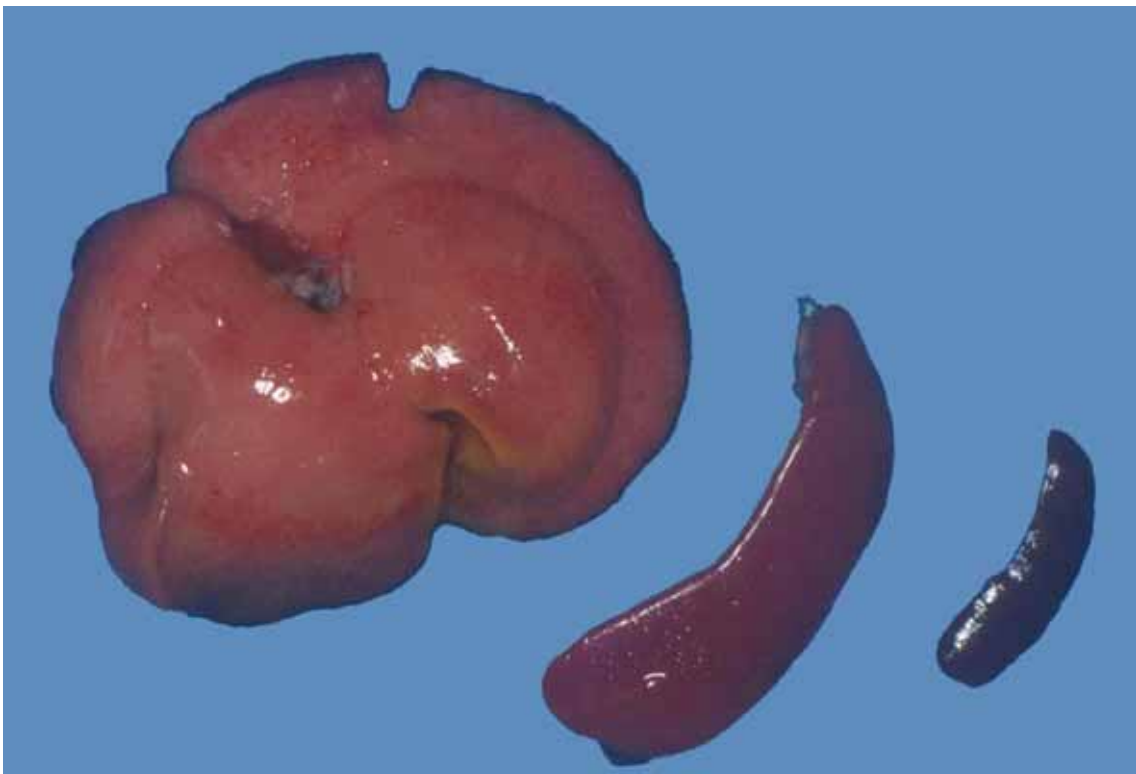


Abb. 3: Entnommene Organe aus Leukämiemaus mit Vergleichsmilz aus gesunder Maus, Leukämiemilz: 2 x 0,7cm, Vergleichsmilz: 1,3 x 0,4cm (in anderen Versuchstieren z. T. bis 3 x 1cm große Milz)

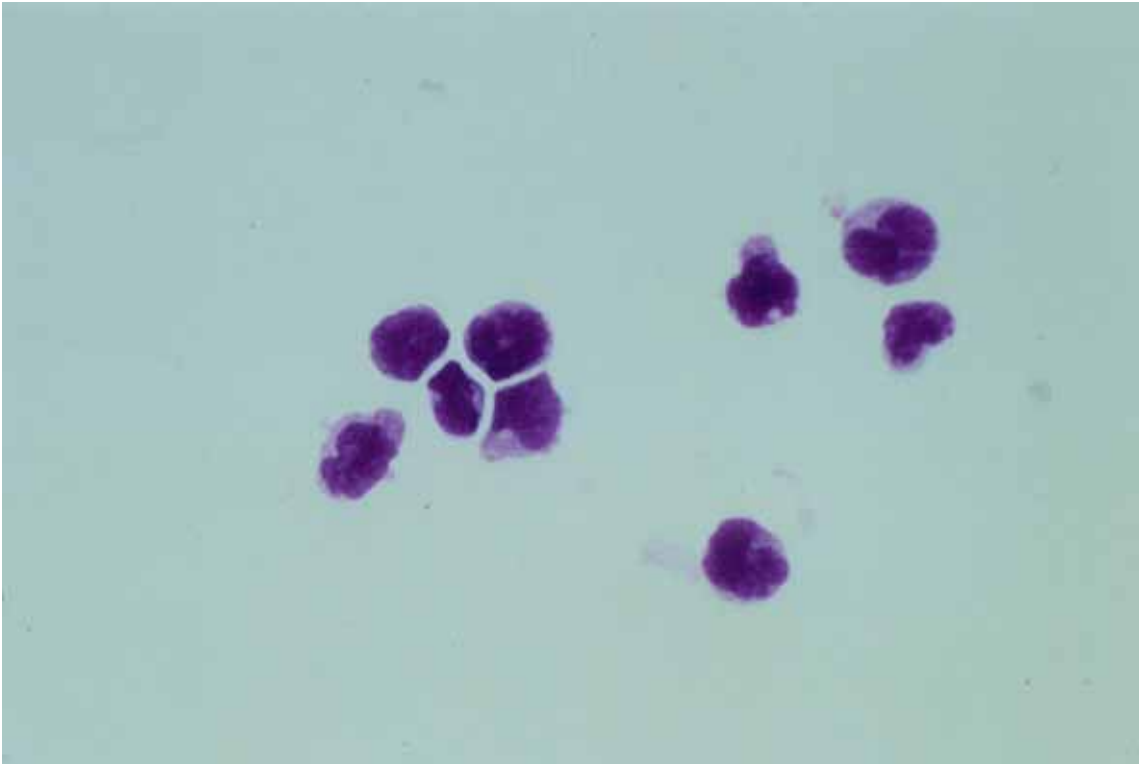


Abb. 4: KM-Zellen nach Kultur - typische Morphologie des M1-Zellklons mit kleiner rundlich-ovaler Form, glatt begrenzt und einem den größten Teil des Zytoplasma einnehmenden Zellkern (400 x Vergrößerung), zum Vergleich s. Abb. 5

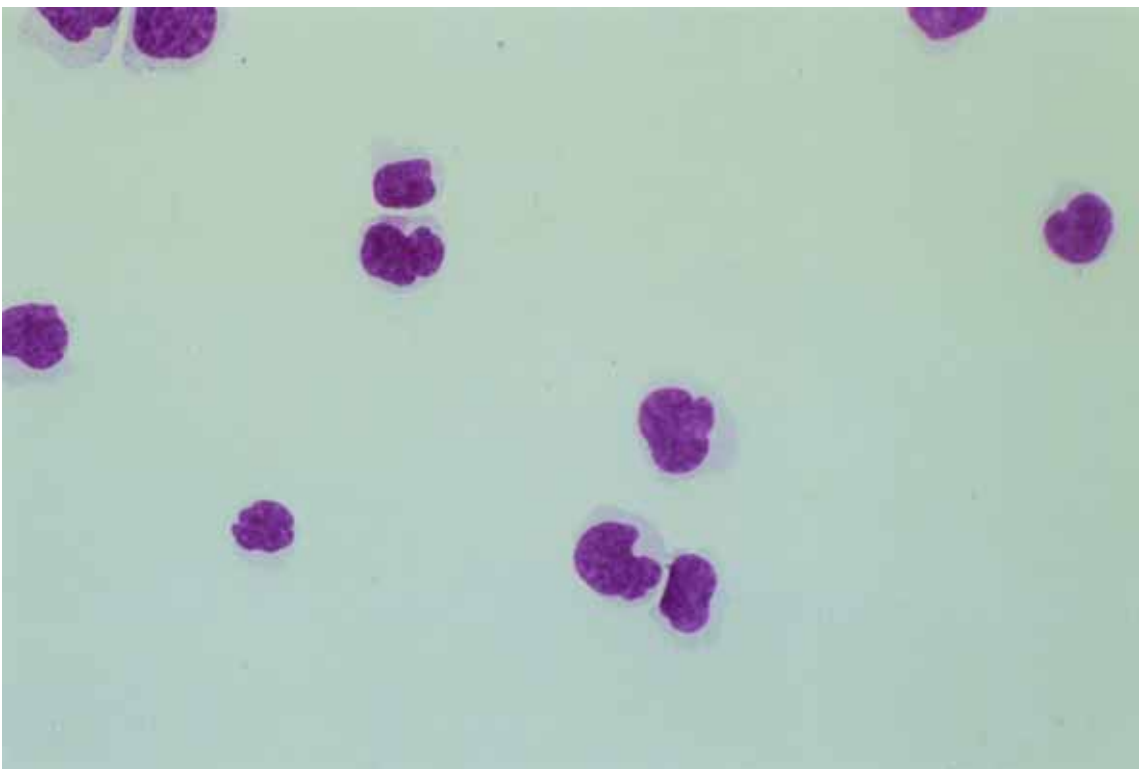


Abb. 5: M1-Zellen (400 x Vergrößerung)

Histologisch war eine diffuse Infiltration sowohl der seziierten Organe (Leber, Milz, Sternum und Knochenmark) als auch im geringeren Ausmaß des peripheren Blutes durch leukämische Blasten zu erkennen. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die während dieser Versuchsreihe erhobenen makroskopischen und histologischen Befunde (Abb. 6-12).

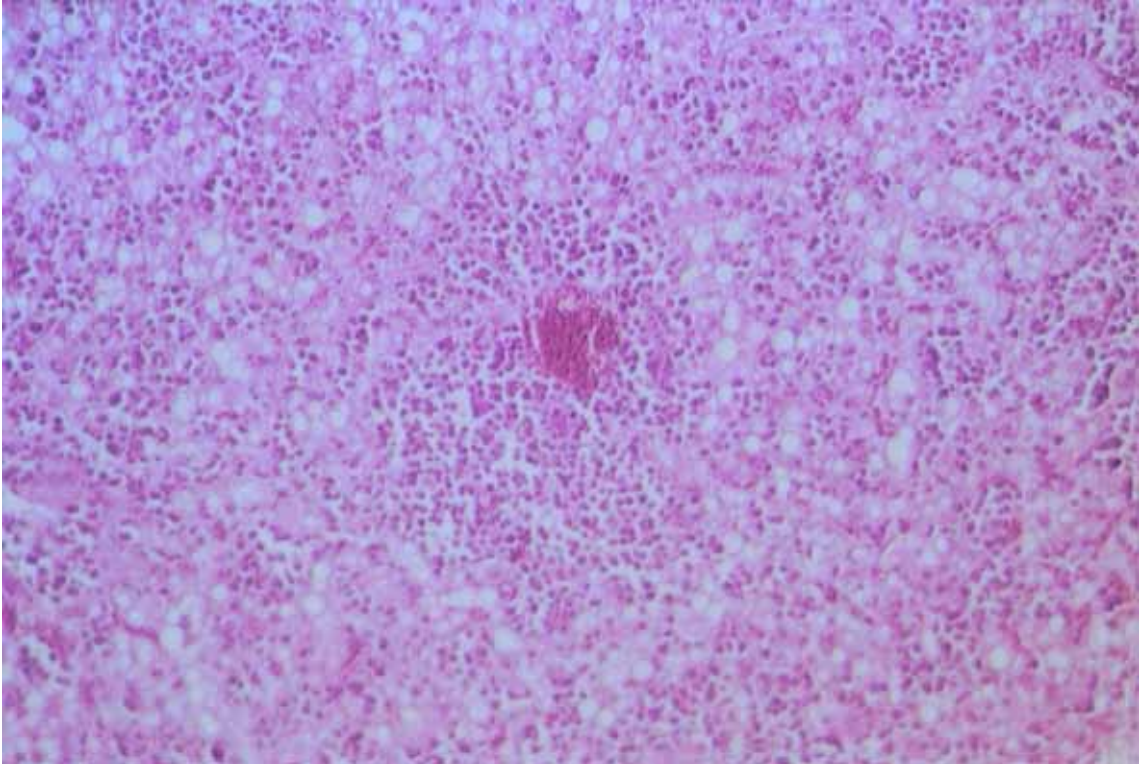


Abb. 6: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Leberparenchyms durch leukämische Zellen nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen i.v. (100 x Vergrößerung)

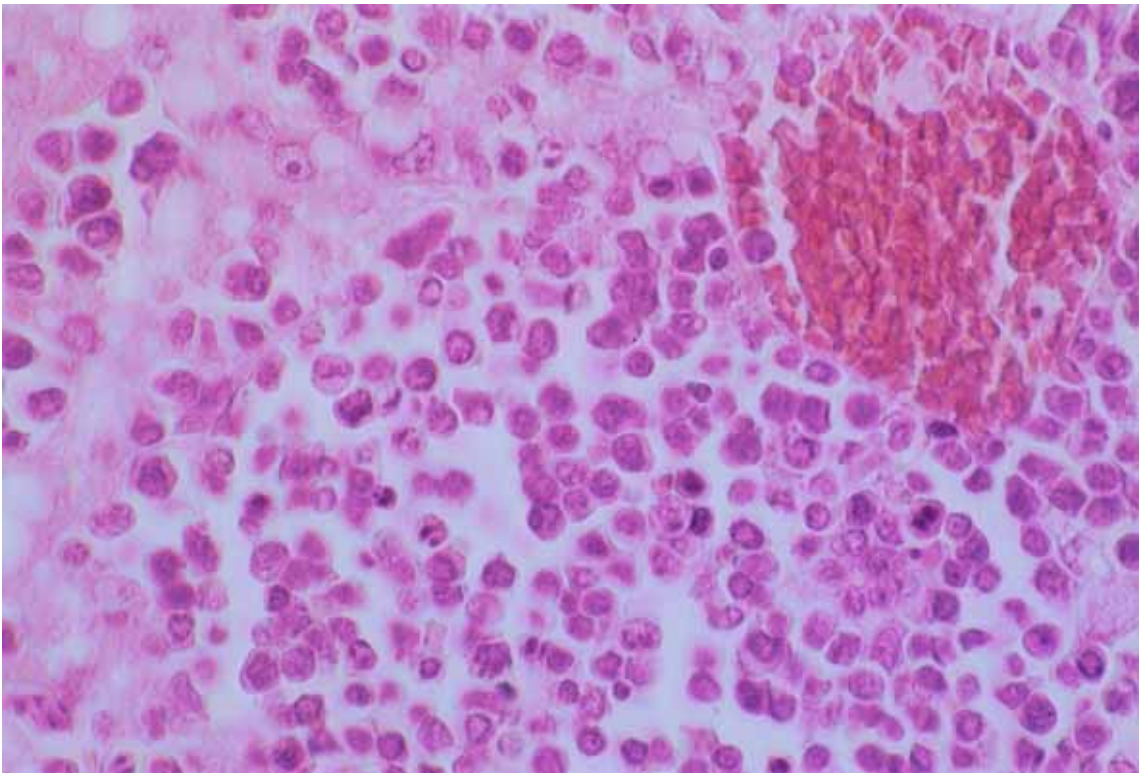


Abb. 7: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Leberparenchyms durch leukämische Zellen nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen i.v. (400 x Vergrößerung)

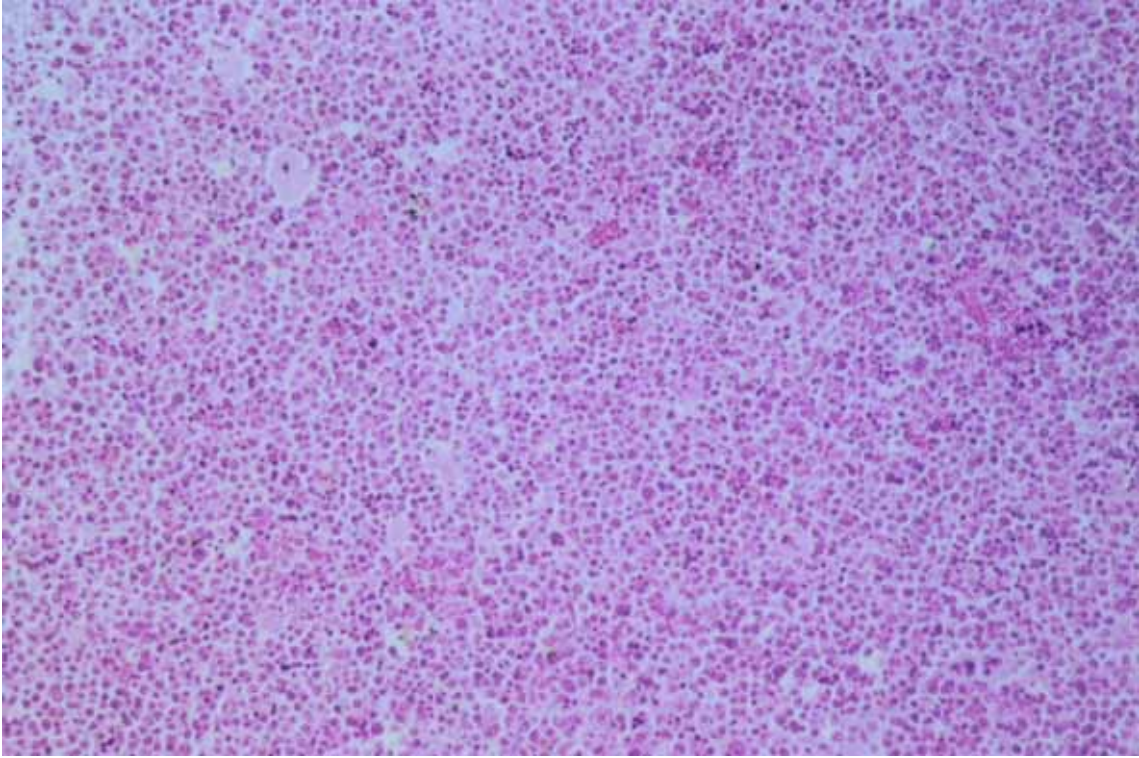


Abb. 8: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Milzparenchyms durch leukämische Zellen nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen i.v. (100 x Vergrößerung)

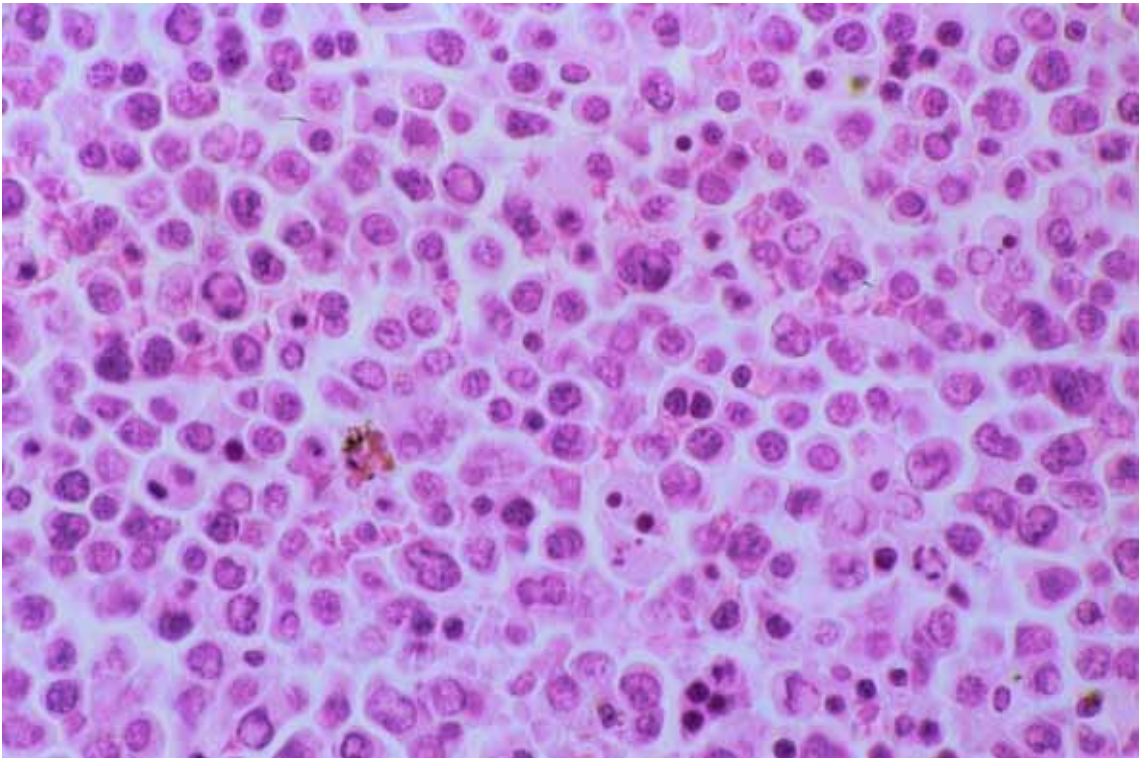


Abb. 9: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Milzparenchyms durch leukämische Zellen nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen i.v. (400 x Vergrößerung)

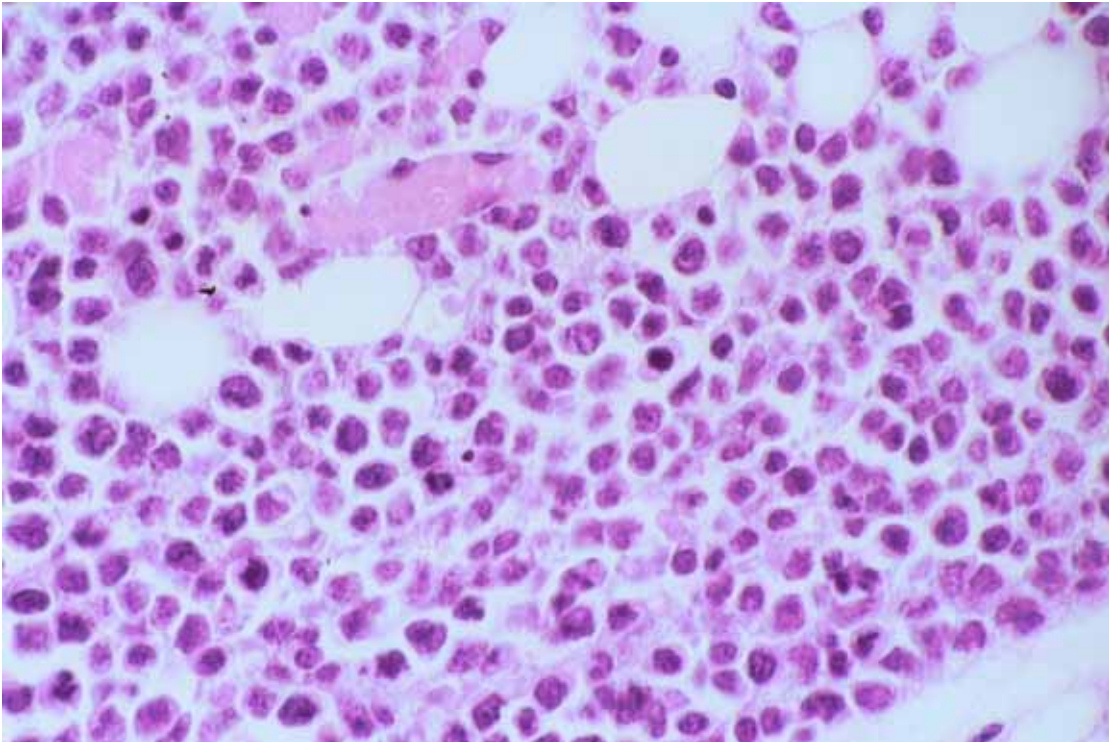


Abb. 10: Histologisches Bild einer massiven leukämischen Infiltration des sternalen KM mit Verdrängung der normalen Hämatopoese nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen i.v. (400 x Vergrößerung)

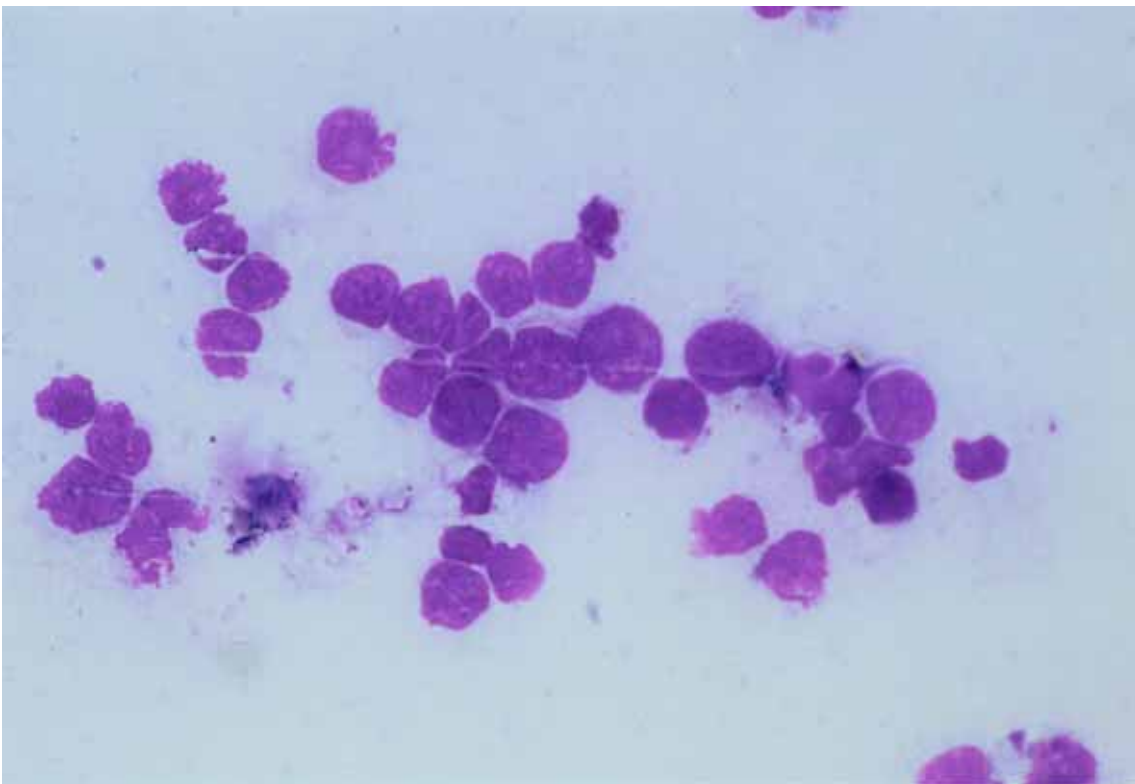


Abb. 11: Knochenmarkausstrich aus dem Femurknochen einer leukämischen Maus nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen i.v. (400 x Vergrößerung)

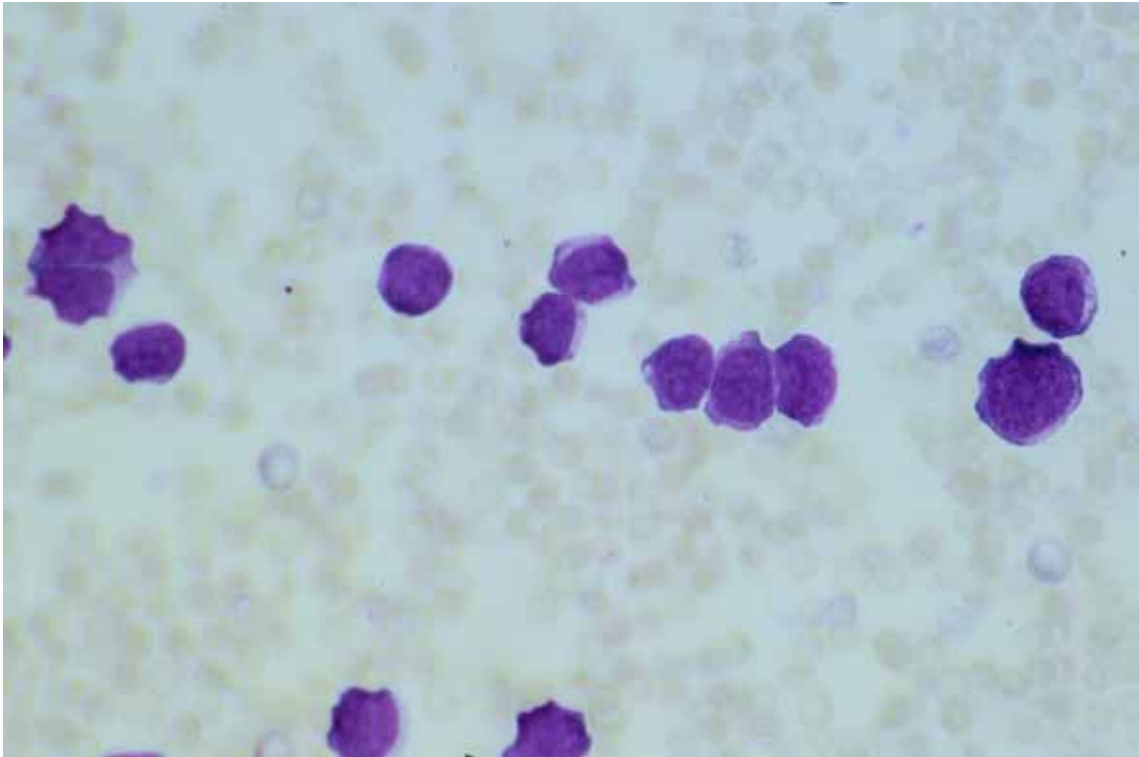


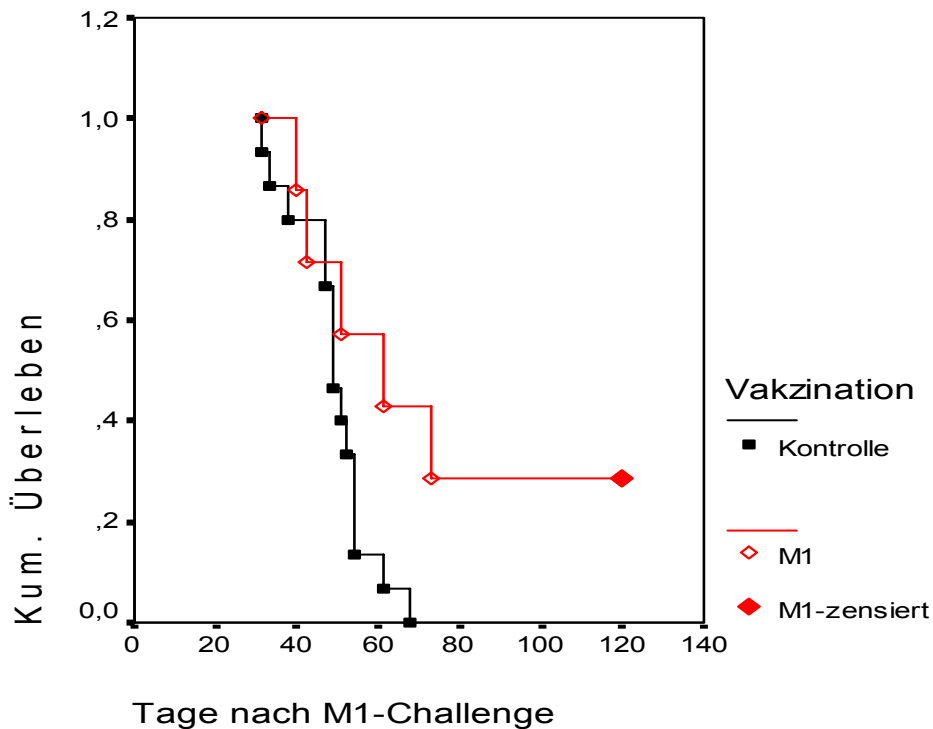
Abb. 12: Peripherer Blutausstrich einer leukämischen Maus nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen i.v. (400 x Vergrößerung)

3.1.2 Immunogene Wirkung der M1-Zellen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, ob die M1-Zelllinie selbst in der Lage ist, eine Immunität gegenüber einer M1-induzierten Leukämie zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurde entsprechend des unter 2.3.7 beschriebenen Protokolls an Tag -28 einer Gruppe von 7 Mäusen je 5×10^4 M1-Zellen intravenös verabreicht. Die Zellsuspension wurde zuvor mit 30 Gy bestrahlt, um eine ungehemmte Proliferation und somit die Induktion einer Leukämie zu vermeiden. Der Vorgang wurde an Tag -14 wiederholt. Nach weiteren 14 Tagen (=Tag 0) wurden den Tieren je 5×10^4 nicht bestrahlte M1-Zellen injiziert. 5 von 7 Mäusen (= 71,4%) verstarben im Rahmen dieses Versuches mit geringgradiger Verzögerung im Vergleich zu den nicht vakzinierten Tieren (Tag 40-73). Der Median für die Überlebenszeit lag bei 61 Tagen. Auch hier gingen dem Finalstadium einige Tage voraus, an denen deutlich klinische Anzeichen der Leukämiemanifestation zu beobachten waren. Die Tiere schienen zunehmend geschwächt bis apathisch, waren zum Teil dyspnoeisch und wiesen einen deutlich gesteigerten Leibesumfang auf. Die Sektion der Mäuse ergab ebenfalls vergleichbare Befunde wie bereits unter 3.1.1 beschrieben. Neben einer aszitesbegleiteten Hepatosplenomegalie waren Tumoren im Bereich der Vena cava, im Analbereich sowie makroskopisch sichtbare stark vergrößerte Lymphknoten in Leisten und Axillen zu finden. Die gewonnenen KM-Zellen entsprachen den makroskopischen Aspekten des M1-Zellklons und zeigten ein gutes Wachstum unter M1-Kulturbedingungen.

Im Rahmen der histologischen Befundung zeigte sich eine diffuse leukämische Infiltration der seziierten Organe (Leber, Milz, Sternum und Knochenmark) sowie des peripheren Blutes.

Immunogene Wirkung der M1



Grafik 2: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse: kein signifikanter Überlebenszeitvorteil für die zuvor vaccinierten Mäuse (M1) gegenüber den nicht vaccinierten Mäusen (Kontrolle) nach M1-Challenge ($p=0,1571$).

3.2 Etablierung des Protokolls zur Gewinnung von DC aus murinem Knochenmark

Die murinen Knochenmarkszellen wurden entsprechend des unter 2.3.2 geschilderten Protokolls gewonnen und kultiviert sowie täglich mikroskopiert. In den ersten Tagen konnte ein relativ buntes Zellbild beobachtet werden, in dem der Anteil an adhärennten Makrophagen deutlich dominierte. Die Makrophagen bildeten sternförmige Ausläufer und setzten sich am Kulturschalenboden ab. Durch das regelmäßige Ernten der nichtadhärennten Zellen konnte ihr Anteil reduziert werden. Ab Tag 5 gewannen einige nichtadhärennte Zellen an Größe und entwickelten zytoplasmatische Ausläufer (Abb. 13). Erste einzelne aus dem KM gewonnene DC (BmDC) waren erkennbar, deren Zahl während der folgenden

Tage deutlich zunahm. Zwischen Tag 7 und 9 konnte beobachtet werden, dass die BmDC eine Tendenz zeigten, miteinander Zellklumpen („Cluster“) zu bilden (Abb. 14). Ab Tag 10 reduzierte sich die Zahl der vitalen BmDC in der Zellkultur.



Abb. 13: BmDC mit typischen zytoplasmatischen Ausläufern in Kultur an Tag 9.



Abb. 14: BmDC, die sich zu einem Zellklumpen verbinden („clustern“).
Im Hintergrund sind adhärenente Makrophagen zu erkennen.

Die Ausbeute der BmDC konnte durch den Einsatz von CellGro DC Medium ab dem 7. Tag entscheidend verbessert werden. Bezogen auf die initial pro Maus gewonnenen Knochenmarkszellen ergab sich unter der Verwendung von CellGro DC Medium eine BmDC-Ausbeute von 8,9% der Ausgangszellzahl an Tag 9, während bei alleiniger Stimulation mit GM-CSF und IL-4 lediglich 4,4% erreicht werden konnten (Tabelle 4). Bei Betrachtung der durchschnittlich errechneten Werte pro Maus ließ sich eine Steigerung von $0,9 \times 10^6$ BmDC ohne CellGro auf $2,7 \times 10^6$ BmDC unter Einsatz von CellGro verzeichnen.

Ein weiterer Versuch der BmDC-Kultur bestand aus der Verabreichung von CellGro DC Medium bei gleichzeitigem Verzicht von GM-CSF und IL-4 ab Tag 7. Dabei konnte keine ausreichende BmDC-Ausreifung beobachtet werden.

Tabelle 4: BmDC-Ausbeute

Ansatz	Anzahl der Mäuse	Gesamtzellzahl Tag 1	Gesamtzellzahl Tag 9	Zahl pro Maus Tag 1	Zahl pro Maus Tag 9	Ausbeute in %	Bemerkungen
1	3	25 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	8,3	0,4	4,8	
2	10	200 x 10 ⁶	8,4 x 10 ⁶	20	0,8	4	
3	5	161 x 10 ⁶	6,8 x 10 ⁶	32,2	1,4	4,3	
4	3	106 x 10 ⁶	8,7 x 10 ⁶	35,3	2,9	8,2	+ CG
5	4	105 x 10 ⁶	7,2 x 10 ⁶	26,3	1,8	6,8	+ CG
6	4	164 x 10 ⁶	27 x 10 ⁶	41	6,8	16,6	+ CG
7	4	120 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁶	30	1,4	4,6	+ CG
8	4	100 x 10 ⁶	11,4x 10 ⁶	25	2,9	11,6	+ CG
9	13	427 x 10 ⁶	36 x 10 ⁶	32,8	2,8	8,5	+ CG
10	5	165 x 10 ⁶	6,9 x 10 ⁶	33	1,4	4,2	+ CG
11	11	355 x 10 ⁶	36,2 x 10 ⁶	32,3	3,3	10,2	+ CG
12	3	93 x 10 ⁶	9,5 x 10 ⁶	31	3,2	10,3	+ CG
13	10	300 x 10 ⁶	34,7 x 10 ⁶	30	3,5	11,6	+ CG
14	10	210 x 10 ⁶	25,2x 10 ⁶	21	2,5	11,9	+ CG
15	11	320 x 10 ⁶	15,9 x 10 ⁶	29	1,5	5,1	+ CG
16	10	230 x 10 ⁶	13x 10 ⁶	23	1,3	5,7	+ CG

Die immunphänotypische Analyse wurde erschwert durch die relativ inhomogene Zellpopulation. Es ließen sich jedoch eindeutig Zellen nachweisen, die positiv für die DC typischen Oberflächenmerkmale CD11c, CD40, CD54, CD80, CD86, DEC205 und I-A^d (=MHC-Klasse II) waren (Abb.15).

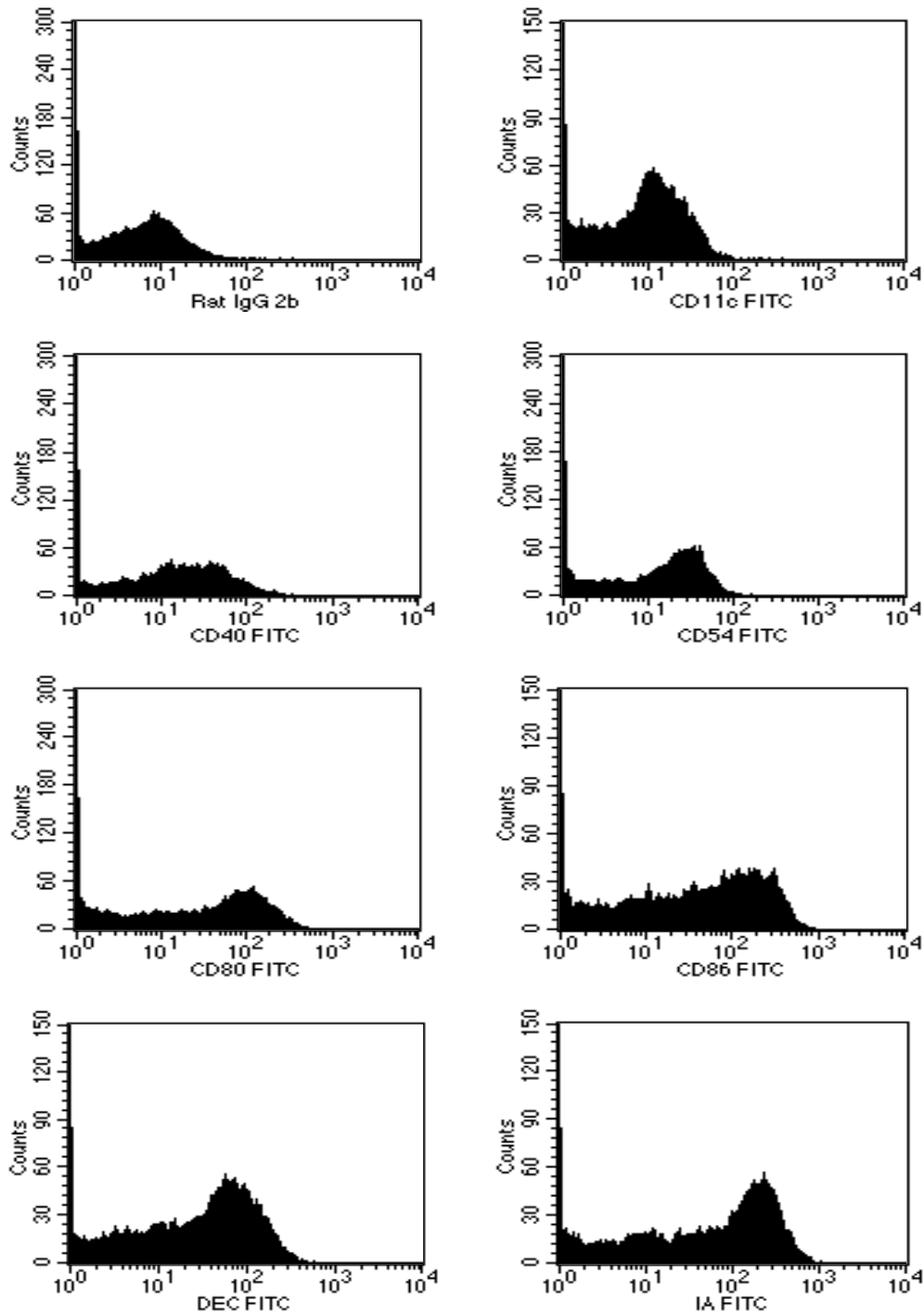


Abb. 15: Immunphänotypische Analyse der DC unter Verwendung von Isotypenkontrolle mit Rat IgG, CD11c, CD40, CD54, CD80, CD86, DEC 205 und IA Darstellung in Histogrammen

3.3 Fusion von DC und M1-Zellen

3.3.1 Morphologie der DC-M1-Fusionszellen

Zur Vereinigung der Antigeneigenschaften von DC und M1-Zellen wurden diese unter Zugabe von PEG miteinander fusioniert (s. 2.3.3). Die fusionierten Zellen waren groß, mehrkernig und wiesen morphologische Eigenschaften beider Zelltypen auf. So waren neben den zytoplasmatischen Ausläufern, der typischen Größe und der Inhomogenität des Zytosols der DC auch charakteristische Merkmale der M1, wie deren kleinere rundlich-ovale Form und große Zellkerne zu erkennen. Im Zytoplasma der Zellen konnte ein relativ hohes Vorkommen von Vakuolen beobachtet werden (s. Abb.16).

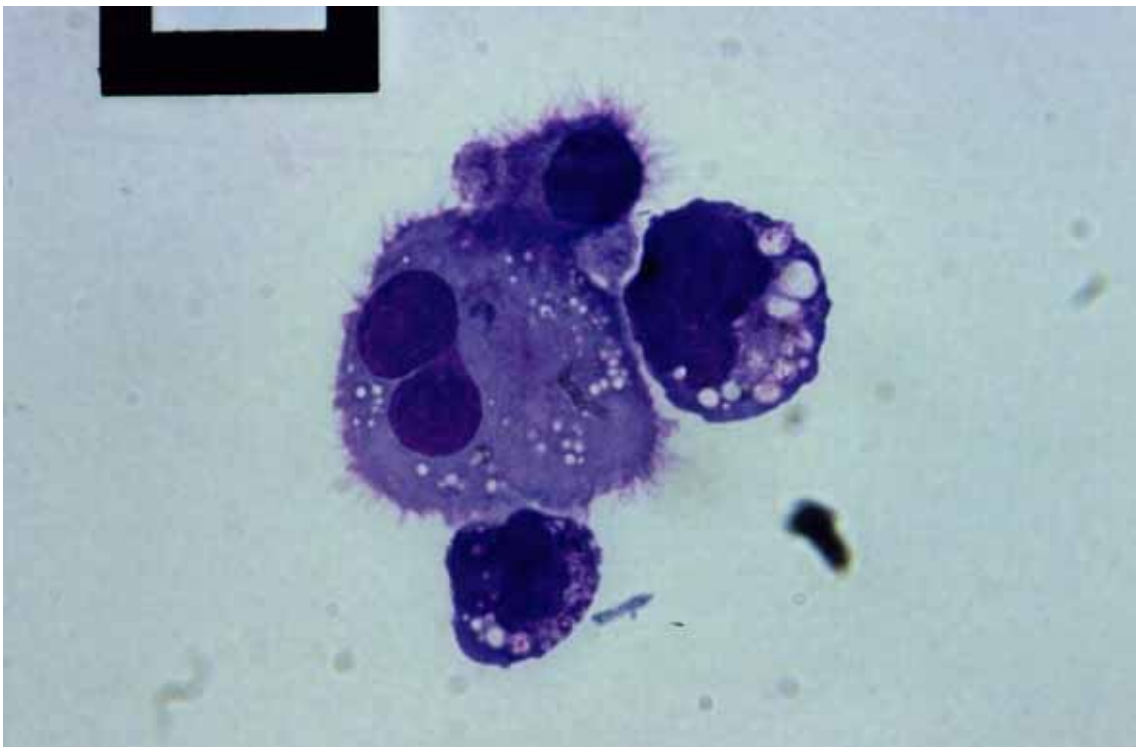


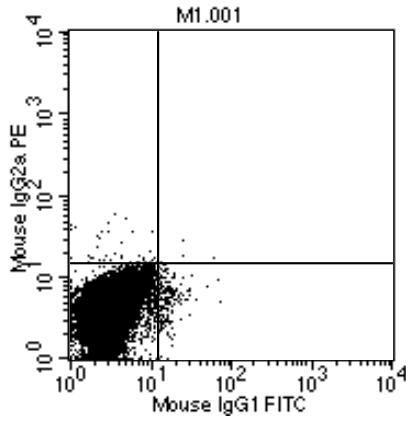
Abb. 16: Fusion einer DC mit Leukämiezellen

Es fand allerdings nicht ausschließlich nur eine Fusion von DC mit M1-Zellen statt. Sowohl die DC als auch die M1-Zellen fusionierten zum Teil mit Zellen der eigenen Linie. Dies zeigte sich auch in der durchgeführten Immunphänotypisierung (s. unten).

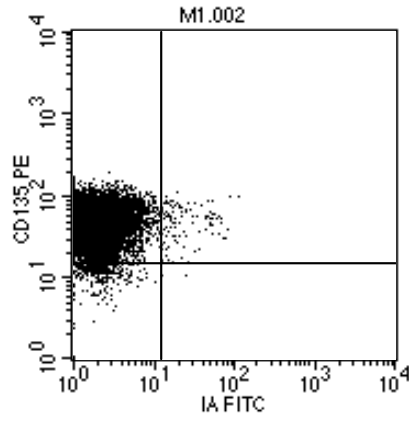
3.3.2 Immunphänotypische Analyse der DC-M1-Fusionszellen

In der immunphänotypischen Analyse konnte eindeutig ein großer Anteil an Zellen nachgewiesen werden, die die Antigeneigenschaften von sowohl reifen DC als auch von M1-Zellen auf ihrer Oberfläche repräsentierten und damit die erfolgreiche Fusion bewiesen. Insbesondere in der zweifachen Anfärbung mit I-A^d und CD135 in der Dot Plot-Darstellung war dies sehr deutlich zu sehen. Hier waren 53,13% der Zellen positiv für den M1-spezifischen Oberflächenmarker CD135 und den DC-typischen I-A^d. Das zusätzliche Vorkommen von Zellen in den oberen linken oder unteren rechten Quadranten, welches einer nur einseitigen Anfärbung entspricht, lässt sich durch Fusionierungen der Zellen miteinander innerhalb der eigenen Zelllinie bzw. nicht fusionierter Zellen erklären, welche dann lediglich für einen der beiden entsprechenden Oberflächenmarker positiv sind (Abb.17).

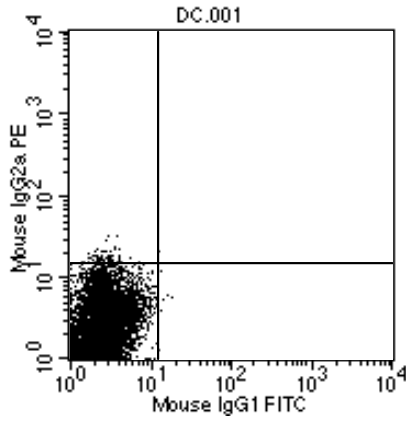
M1: Isotypenkontrolle



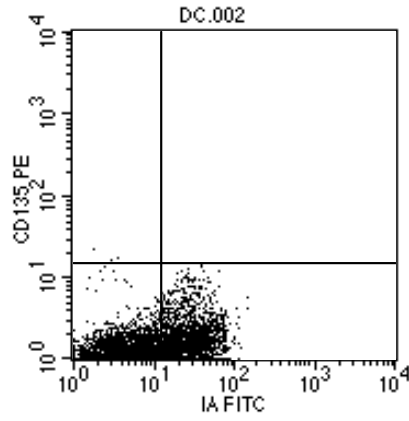
M1: CD135 gegen IA



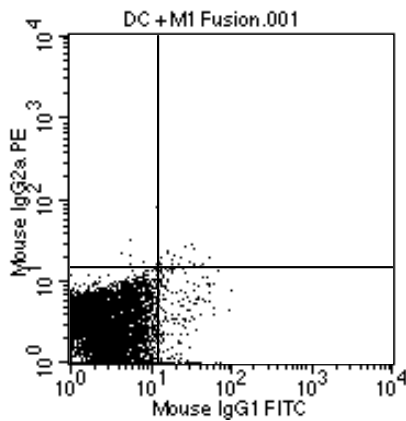
DC: Isotypenkontrolle



DC: CD135 gegen IA



Fusion: Isotypenkontrolle



Fusion: CD135 gegen IA

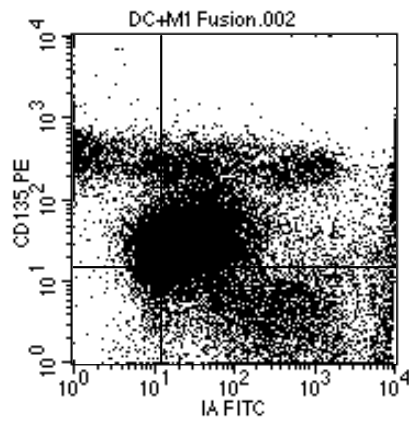


Abb. 17: Immunphänotypische Analyse der M1, DC und fusionierten DC-M1-Zellen unter Verwendung von CD135 und I-A^d. 53,13% der Fusionszellen sind CD135⁺I-A^{d+}, 20,63% CD135⁺I-A^{d-}, 23,4% CD135⁻I-A^{d+} und 3,2% CD135⁻I-A^{d-}, Darstellung i.DotPlot

3.4 Einsatz von autologen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML

Nachdem die erfolgreiche Fusion der DC mit M1-Zellen belegt werden konnte, wurde die Fähigkeit der fusionierten Zellen zur Immunisierung gegenüber M1-Zellen untersucht. Hierfür wurden je $2,5 \times 10^5$ fusionierte und anschließend bestrahlte DC-M1-Zellen entsprechend des unter 2.3.7 beschriebenen Protokolls insgesamt 10 SL/AM-Mäusen in 14-tägigem Abstand zweimalig intravenös verabreicht. Nach Injektion der zuvor als leukämieinduzierend verifizierten Dosis von 5×10^4 nicht bestrahlten M1-Zellen wurden die Tiere täglich auf Anzeichen von Krankheitssymptomen überprüft. Mäuse mit deutlich eingeschränkter Lebenserwartung im Rahmen des leukämischen Finalstadiums mit den Symptomen wie unter 3.1 beschrieben, wurden getötet, um ihr unnötiges Leiden zu verkürzen.

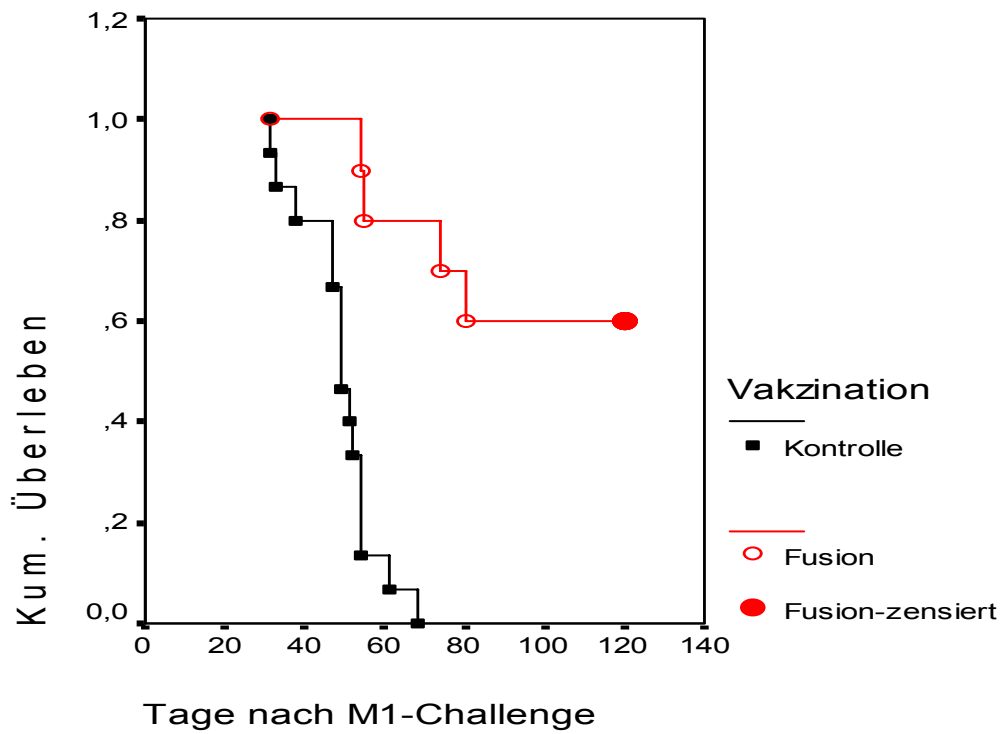
Mit dem ersten Todesfall am 54. Tag post injectionem sowie dem letzten an Tag 80 konnte im Vergleich zu den M1-Kontrollen (mittlere Überlebenszeit 47 Tage post injectionem) ein verzögertes Einsetzen der Krankheitssymptome bzw. der Todesfälle verzeichnet werden. Während des Beobachtungszeitraumes von 120 Tagen verstarben 40% der Tiere, die übrigen 60% wiesen während der gesamten Versuchsdauer keine Anzeichen einer Erkrankung auf. Somit zeigte sich ein eindeutiger, statistisch signifikanter ($p=0,001$) Überlebensvorteil für die mit fusionierten Zellen vorbehandelten Tiere (Grafik 3).

Die verstorbenen Tiere zeigten in unterschiedlichem Ausmaß eine zumeist massive aszitesbegleitete Hepatosplenomegalie. Des Weiteren waren Tumoren paraaortal sowie makroskopisch sichtbare stark vergrößerte Lymphknotenkonglomerate in Leisten und Axillen zu finden. In einem Fall trat eine Querschnittssymptomatik in Folge einer pathologischen Brustwirbelkörperfraktur auf. Die gewonnenen KM-Zellen entsprachen der typischen Morphologie des M1-Zellklons mit kleiner rundlich-ovaler Form, glatt begrenzt und einem großen Zellkern und zeigten ein gutes Wachstum unter M1-Kulturbedingungen.

Histologisch war auch hier eine diffuse Infiltration sowohl der seziierten Organe (Leber, Milz, Sternum und Knochenmark) als auch im geringeren Ausmaß des

peripheren Blutes durch leukämische Blasten zu erkennen. Diese Befunde entsprechen den bereits unter 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Beobachtungen.

Immunogene Wirkung der DC-M1-Fusionszellen



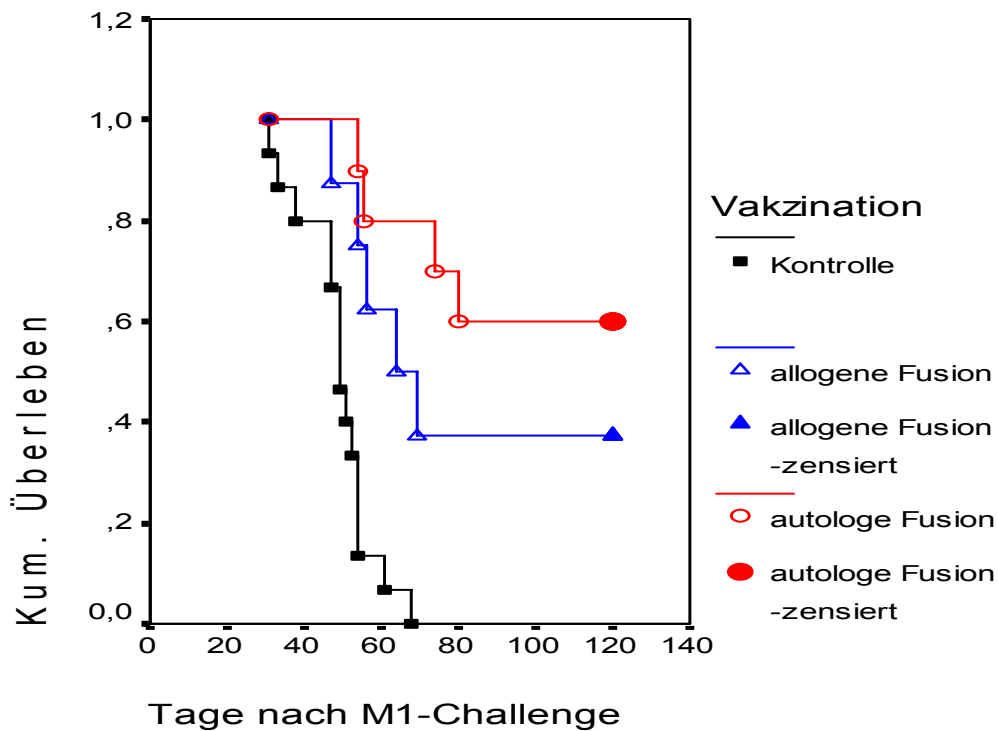
Grafik 3:Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse: Überlebenszeitvorteil für die zuvor vakzinierten Mäuse (Fusion) gegenüber den nicht vakzinierten Mäuse (Kontrolle) nach M1-Challenge mit einer Signifikanz von $p=0,001$.

3.5 Einsatz von allogenen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML

In diesem Experiment sollte der Einfluss der Verwendung allogener DC an Stelle autologer DC überprüft werden. Zu diesem Zweck gewannen wir die DC wie in 2.3.2 beschrieben von C3H/HeJ-Mäusen und fusionierten sie mit den M1-Zellen. 8 SL/AM-Mäusen wurden je $2,5 \times 10^5$ allogene DC-M1-Fusionszellen zweimalig in 14-tägigem Abstand injiziert. Auch hier wurden die Zellen vor Injektion mit 30 Gy bestrahlt. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem Ablauf des unter 3.4 beschriebenen Experiments mit autologen fusionierten DC-M1-Zellen.

Der erste Todesfall trat am 47. Tag post injectionem, der letzte am 69. Tag auf. Der Median für die Überlebenszeit lag bei 64 Tagen. Insgesamt verstarben 5 von 8 Tieren (=62,5%). Sie zeigten dabei die typischen Symptome des Finalstadiums sowie die zuvor bereits unter 3.1.1 und 3.1.4 beschriebenen Sektionsbefunde der Organe. Die verbleibenden 3 Tiere der Gruppe (= 37,5%) überlebten den Beobachtungszeitraum von 120 Tagen ohne Anzeichen einer beginnenden Erkrankung. Somit ergab sich für den Einsatz von fusionierten allogenen DC-M1-Zellen ein signifikanter Überlebensvorteil ($p=0,0023$) gegenüber den nicht vakzinierten Tieren. Im Vergleich zu den autologen DC-M1-Fusionszellen scheinen diese geringfügig potenter. Ein signifikanter Unterschied konnte hierbei jedoch nicht festgestellt werden ($p=0,2604$) (Grafik 4).

Vergleich der immunogenen Wirkung der autologen und allogenen DC-M1-Fusionszellen



Grafik 4:Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse: Überlebenszeitvorteil für die zuvor vakzierten Mäuse (autologe Fusion = autologe DC-M1-Fusionszellen, allogene Fusion = allogene DC-M1-Fusionszellen) gegenüber den nicht vakzierten Mäuse (Kontrolle) nach M1-Challenge mit einer Signifikanz von $p^{\text{autologe Fusion}}=0,001$ bzw. $p^{\text{allogene Fusion}}=0,0023$. Der Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Vakzinen (autologer Fusion und allogener Fusion) ließ sich nicht als signifikant nachweisen ($p=0,2604$), die autologe Fusion scheint jedoch geringgradig potenter zu sein.

3.6 Einfluss der Fusion auf die Induktion einer Antitumoraktivität: Einsatz von DC-M1-Mixtur als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML unter Verwendung autologer und allogener DC

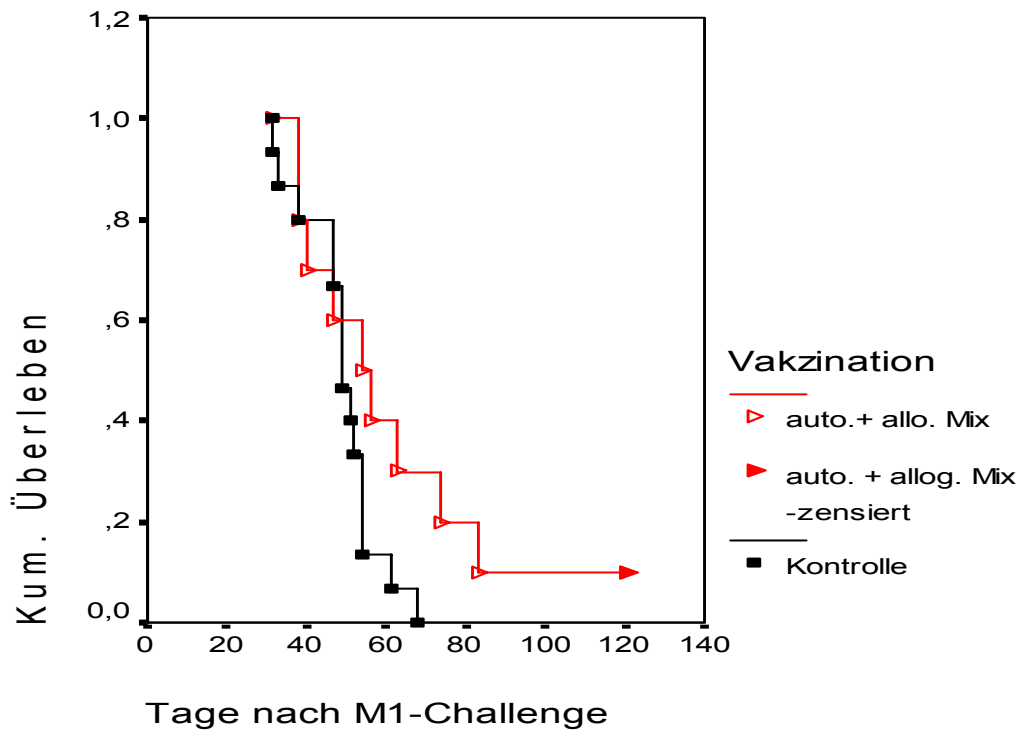
Zwei weiteren Gruppen von 4 bzw. 6 SL/AM-Mäusen wurde mit gleicher Methodik eine Mixtur bestehend aus autologen bzw. allogenen DC und M1-Zellen injiziert. Hier betrug die Zellzahl ebenfalls 1×10^6 pro Maus. Vor Injektion wurden die zu verabreichenden Zellen mit 30 Gy bestrahlt.

In der Gruppe, in der eine Mixtur aus autologen DC und M1-Zellen verwendet worden war, starben drei Tiere zwischen Tag 38 und 54 post injectionem. Die verbleibende vierte Maus (=25%) verlebte die restliche Versuchszeit ohne erkennbare gesundheitliche Einschränkungen. Der Median für die Überlebenszeit entsprach mit 47 Tagen exakt dem der nicht vakzinierten Tiere.

Bei Vakzinierung mit einer Mixtur aus allogenen DC und M1-Zellen verstarben alle Tiere zwischen Tag 38 und 83 post injectionem. Der Median für die Überlebenszeit lag bei 54 Tagen.

In beiden Gruppen konnte kein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber den nicht vakzinierten Tieren ausgemacht werden ($p=0,2569$).

Immunogene Wirkung der DC-M1-Mixturen



Grafik 5:Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse: kein signifikanter Überlebenszeitvorteil für die zuvor vakzinierten Mäuse (auto. +allo. Mix) gegenüber den nicht vakzinierten Mäusen (Kontrolle) nach M1-Challenge ($p=0,2569$). Da sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vakzinen nachweisen ließ ($p=0,7487$), wurden sie in der vorliegenden Grafik als eine Kurve dargestellt.

4. DISKUSSION

Trotz intensiver Chemotherapie beträgt die 5-Jahres-Überlebenszeit der AML nur 10-40% [13, 19]. Multiple Chemotherapieresistenzen sowie das Bestehen einer sich der Chemotherapie entziehenden minimalen Resterkrankung sind Gründe für diese frustrierenden Ergebnisse [19, 40]. Bei zusätzlich hoher therapieassoziierter Morbidität und Mortalität würden immuntherapeutische Ansätze eine sinnvolle Ergänzung der bisherigen Strategien bilden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde nach Standardisierung der Versuchsbedingungen die Möglichkeit der Induktion einer Antitumorimmunität unter Einsatz fusionierter Zellen bestehend aus DC und leukämischen Blasten untersucht.

4.1 Standardisierung des Leukämiemodells der SL/AM-Maus

In dieser ersten Versuchsreihe galt es, das zuvor beschriebene Leukämiemodell der SL/AM-Maus [61, 63] unter den Bedingungen des hiesigen Labors nachzuvollziehen und somit zu überprüfen, ob es für die von uns geplanten Zwecke geeignet ist.

Dabei zeigte sich eine eindeutige Reproduzierbarkeit der von Hirano et al. erhobenen Ergebnisse. Die von uns beobachtete Überlebenszeit der Mäuse nach Injektion von 5×10^4 M1-Zellen betrug im Mittel 49 Tage (Tag 31-Tag 68, Grafik1) und entsprach damit den zuvor publizierten Daten. Ebenso konnten wir Beobachtungen bestätigen, die dem Finalstadium vorausgehende klinische Anzeichen der Leukämie wie Abgeschlagenheit, Dyspnoe und ausgeprägter Aszites beschrieben. Desgleichen war bei der Sektion die Infiltration des KM und des peripheren Blutes mit leukämischen Blasten sowie eine massive Splenomegalie (Abb.2, 3,10,11 und 12) nachweisbar. Zusätzlich waren Blutbildveränderungen bestehend aus Leukozytose, Anämie und Thrombozytopenie 2

Wochen vor der klinischen Manifestation von Hirano et al. gemessen worden [61]. Die Befunde entsprechen dem Verlauf einer humanen AML mit zentralem Beginn im KM und einem schrittweisen Verlust der normalen Hämatopoese sowie darauf folgender Streuung in die peripheren Organe.

Diese Beobachtungen bestätigten den Einsatz des SL/AM-Maus-Modells als ein geeignetes Tiermodell zur Durchführung der von uns geplanten Grundlagenstudie zur Immuntherapie der AML.

Um für die geplanten folgenden Versuche eine eigenständige Immunogenität der M1 ausschließen zu können, vakzinierten wir eine Gruppe von Mäusen zweimalig mit zuvor bestrahlten M1-Zellen. In ihrer Arbeit hatten Hirano et al. die Bestrahlung mit 30 Gy als ausreichend ermittelt, um das Proliferationsvermögen der M1 zu unterbinden [61]. Bei Verabreichung einer leukämogenen Dosis nicht bestrahlter M1-Zellen an die so vorbehandelten Tiere konnte jedoch im Gegensatz zu den von Hirano et al. veröffentlichten Ergebnissen ein in 28,6% der Fälle ereignisfreies Überleben über den Beobachtungszeitraum von 120 Tagen hinweg ohne Anzeichen eines Krankheitsbeginns verzeichnet werden (Grafik 2). Trotz der fehlenden statistischen Signifikanz des Überlebenszeitvorteiles ($p=0,1571$) spricht dieses Ergebnis für eine möglicherweise zumindest schwach immunogen wirkende AML. Hirano et al. hatten nach einmaliger Vakzinierung mit bestrahlten M1-Zellen keinen Überlebensvorteil nach M1-Challenge gegenüber nicht vakzinierten Mäusen ausmachen können und somit die M1-Zelllinie als nicht eigenständig immunogen bewertet [61]. Der Grund für diesen Unterschied bleibt unklar. Möglicherweise ist die Ursache in der unterschiedlichen Anzahl der Immunisierungen zu finden. So ist es vorstellbar, dass eine zweimalige Vakzinierung in der Lage ist, eine stärkere Immunantwort hervorzurufen. Weitere Experimente sind notwendig, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

4.2 Etablierung des Protokolls zur Gewinnung von DC aus murinem Knochenmark

Zum Zeitpunkt der Entdeckung der DC waren diese nur vereinzelt im Körper zu identifizieren und ihre Isolierung sehr schwierig [91, 99]. Im Verlauf der Jahre konnten jedoch im Rahmen diverser Forschungsarbeiten die DC in zunehmendem Maße in-vitro verfügbar gemacht werden. Neben der Entwicklung aus der pluripotenten Stammzelle des KM wurden die Möglichkeiten der DC-Differenzierung aus CD34+ peripheren Blutstammzellen und Monozyten sowie aus leukämischen Blasten selbst etabliert [25, 41, 55, 64, 70, 96, 104, 105, 110, 111].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir die erfolgreiche Gewinnung muriner DC aus dem KM (BmDC) der SL/AM-Mäuse zeigen. In Anlehnung an das Protokoll von Inaba et al. zur DC-Differenzierung [64] mit den unter 2.3.10 beschriebenen Modifikationen kultivierten wir unter Einsatz von GM-CSF und IL-4 für 9 Tage die KM-Zellen der SL/AM-Mäuse. In der Zellkultur ließen sich daraufhin nichtadhärente Zellen mit härchenartigen Ausläufern beobachten (Abb.13), die eine Neigung zur Bildung von Zellkonglomeraten in der Kultur aufwiesen (Abb.14). Dieses Verhalten ist in der Fachliteratur als „Clusterbildung“ bekannt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Cluster funktionelle Einheiten mit verschiedenen Reifestufen der DC darstellen. Es wird angenommen, dass es dabei zu wichtigen Zellinteraktionen kommt, welche für die spätere professionelle APC-Funktion der DC und somit für eine potente Immunantwort der von ihnen stimulierten zytotoxischen T-Zellen essentiell sind [41]. An Tag 9 zeigten sich die immunphänotypisch analysierten Zellen positiv für I-A^d (=MHC-Klasse-II Moleküle), CD80 und CD86 sowie für CD54, CD40, und DEC205 und wiesen somit die charakteristischen Oberflächenmerkmale der DC auf (Abb.15). Der Oberflächenmarker CD135, der typischerweise auf den in den folgenden Versuchen eingesetzten M1-Zellen deutlich positiv ist, ließ sich auf den DC nicht nachweisen (Abb.17).

Unter Einsatz von serumfreiem CellGro DC Medium ab dem 7. Tag konnte die erzielte Menge an BmDC noch verdoppelt werden, so dass nach 9 Tagen eine Zellzahl von $2,7 \times 10^6$ BmDC pro Maus zu verzeichnen war (Tabelle 4).

Inaba et al. beschrieben eine DC-Ausbeute mit Werten von $>5 \times 10^6$ BmDC pro Maus, allerdings nach Lymphozytendepletion und unter Einsatz höherer GM-CSF und IL-4-Konzentrationen. Andere Autoren publizierten Ergebnisse zwischen 1×10^7 BmDC pro Maus nach Lymphozytendepletion und ebenfalls höheren Zytokinkonzentrationen [111] bis $>10^8$ BmDC pro Maus [73]. Die Gruppe um Son testete den Einfluss der GM-CSF und IL4-Konzentration auf die resultierende Zellzahl pro Maus am Ende der Kultur und zeigte, dass bei der Verwendung von 1000 U/ml der Zytokine eine 20%-ige Steigerung des BmDC-Anteils im Vergleich zu dem Einsatz von 125 U/ml auszumachen war [96]. Da im Rahmen unserer Experimente lediglich 150 U/ml verwendet wurden, könnte dies möglicherweise die beschriebenen besseren Kultur-Ergebnisse der anderen Autoren im Vergleich zu den von uns ermittelten Zahlen erklären.

Die verwendeten Zytokine spielen eine wichtige Rolle in dem Reifungsprozess der DC. Nicht nur die verwendete Konzentration ist dabei von Bedeutung, sondern auch die Art der verwendeten Stimuli. Sie sind Gegenstand zahlreicher Studien, in denen sowohl ihre individuelle Funktion als auch die empfehlenswerteste Kombination mit anderen Zytokinen geklärt werden soll [42, 64, 78, 79, 96, 105]. In-vitro und möglicherweise auch in-vivo können inflammatorische Stimuli wie $\text{TNF}\alpha$, Flt3-Ligand, LPS, IL-1 und IL-6 sowie der Kontakt mit T-Zellen über den CD40-Liganden den Reifungsprozess der DC aktivieren und damit eine zytotoxische T-Zell-Antwort induzieren. Dies ist insbesondere in den letzten Tagen der Kultur entscheidend. Die DC-Kultur unter alleinigem Einsatz von GM-CSF und IL-4 wurde in diesem Vergleich als deutlich weniger effizient bewertet, da neben einer geringeren Anzahl an kostimulatorischen Oberflächenmolekülen die gemessene Zytokinsekretion niedriger lag und keine ausreichende Tumormunität in-vivo nachweisbar war [70]. Dies legte die Vermutung nahe, dass das Ausmaß der Immunreaktion vom Reifegrad der DC abhängig ist (siehe dazu weiter unten). Mayordomo et al. konnten jedoch bewei-

sen, dass es durchaus möglich ist, potente und somit reife DC in einer Kultur mit GM-SCF und IL-4 zu gewinnen, die sowohl eine therapeutische als auch eine protektive Immunantwort erzielen [79]. Mehrere Studien belegen allerdings den wesentlichen Anteil des IL-4 bezüglich dieser Ergebnisse [42, 70, 78, 79, 110].

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Heterogenität der sich in Kultur entwickelnden KM-Zellen. Da es sich wie bereits erwähnt um pluripotente Stammzellen des KM handelt, ist es nicht erstaunlich, dass unter Verwendung von Zytokinen wie GM-CSF neben den erwünschten BmDC sich insbesondere auch Granulozyten und Makrophagen entwickeln [79]. Daneben befinden sich naturgemäß zusätzlich lymphozytäre Zellen im KM. Um einen höheren Reinheitsgrad der BmDC-Kultur zu erlangen und unter der Annahme somit auch bessere Wachstumsbedingungen zu schaffen, wird in vielen Publikationen vom Einsatz der Lymphozytendepletion mittels Verabreichung spezifischer Antikörper gegen T- und B-Lymphozyten sowie MHC-Klasse-II Molekül-positive-Zellen berichtet [23, 71, 79, 87, 88, 108]. Die so vorbehandelten Kulturen weisen einen 75-80%igen Reinheitsgrad für BmDC auf [111]. Des Weiteren wurde eine erfolgreiche Inhibierung der Granulozytendifferenzierung unter Zusatz von TNF α beschrieben [79]. Dies kann möglicherweise die im Vergleich zu unseren Ergebnissen in anderen Arbeiten stärkere Präsentation der einzelnen DC-charakteristischen Oberflächenmoleküle erklären. Da wir auf ein Selektionsverfahren zu Beginn der Kultur verzichteten, wies die BmDC-Kultur eine gewisse Inhomogenität auf. Neben den gewünschten DC bestand eine Koexistenz anderer, von der pluripotenten Stammzelle abstammender Zellen wie Granulozyten oder Makrophagen, welche in der immunphänotypischen Analyse zu einer Verzerrung des Oberflächenbildes führte.

Son et al. widerlegten allerdings die Theorie der Notwendigkeit einer nach Möglichkeit reinen Kultur während der DC-Entwicklung. Sie berichteten über Ergebnisse von $3-4 \times 10^7$ BmDC pro Maus nach Kultur nicht selektierter KM-Zellen. Durch Verwendung von Metrizamide zur Separation der B-Zellen und Granulo-

zyten von der Kultur an Tag 9 und anschließender Zentrifugation konnte eine Reinheit von 85-95% erreicht werden. Die so generierten Zellen wiesen sogar einen höheren Anteil an für reife DC typischen Merkmalen sowie eine effektivere CD8⁺ T-Zell-Stimulation auf. Möglicherweise gibt es Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellen mit Sekretion stimulierender Zytokine, die eine Reifung der DC unterstützen [96].

Zusammenfassend betrachtet bestehen diverse Möglichkeiten der DC-Gewinnung. Festzuhalten bleibt, dass es uns unter Einsatz von GM-CSF und IL-4 erfolgreich gelang, DC aus murinem KM mit charakteristischen morphologischen und immunphänotypischen Merkmalen zu differenzieren. Die Fähigkeit dieser DC, eine protektive Immunität zu induzieren, wurde im Rahmen der sich anschließenden Experimente geprüft.

4.3 Fusion von DC und M1-Zellen

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, besitzen Tumorzellen zahlreiche Mechanismen, sich der körpereigenen Immunabwehr zu entziehen beziehungsweise diese sogar zu inhibieren. Im Fall der hier eingesetzten Leukämie-Zelllinie M1 spielt der Mangel von MHC-Klasse-II Molekülen eine wesentliche Rolle. Wie bereits erwähnt, sind diese für die Aktivierung der CD4⁺ T-Lymphozyten notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass bei fehlender CD4⁺-T-Zell-Aktivierung auf Grund nicht vorhandener MHC-Klasse-II Moleküle die Induktion einer ausreichenden Immunantwort ausbleibt, obwohl die MHC-Klasse-I Molekülgebundene Antigenpräsentation gewährleistet ist [37, 85, 87, 88, 111]. Des Weiteren fehlt den M1-Zellen die Präsentation des kostimulatorischen CD80-Moleküls auf ihrer Oberfläche, welches noch stärker als das kostimulatorische CD86-Molekül essentiell für die effektive Aktivierung von T-Lymphozyten ist [7, 33, 35, 61]. Bei Blockade der kostimulatorischen Signale durch Gabe von CD80- und CD86-neutralisierender Antikörper oder CTLA-4 Ig konnten verschiedene Ar-

beitsgruppen das Ausbleiben einer suffizienten Immunantwort beobachten [71, 111].

Ziel zahlreicher immuntherapeutischer Forschungsarbeiten der letzten Jahre war es, Strategien zu entwickeln um derartigen tumorspezifischen Mechanismen zur Umgehung der immunologischen Abwehr entgegen zu wirken. Dabei erwies sich der Einsatz dendritischer Zellen als äußerst viel versprechend. Diverse Arbeiten belegen die Fähigkeit der DC als professionelle APC durch Stimulation spezifischer CTL eine protektive und therapeutische Antitumorimmunität zu induzieren [9, 22, 23, 27, 50, 70, 71, 73, 79, 88, 111]. Dies ist sowohl auf das erhöhte Vorkommen von MHC-Molekülen sowie kostimulatorischen Signalen und Adhäsionsmolekülen auf ihrer Oberfläche als auch auf die Sekretion immunstimulatorischer, zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen essentieller Zytokine zurückzuführen. Insbesondere der Frage der optimalen Beladung der DC mit (tumor-)spezifischen Antigenen zur Induktion einer gezielten Immunantwort wurde intensiv nachgegangen [43, 54, 58, 83, 108].

Bislang konnten nur sehr vereinzelt tumor-assoziierte Antigene der AML-Subtypen identifiziert werden, welche auf Grund der hohen Heterogenität der akuten Leukämien längst nicht immer nachweisbar sind [11, 103]. Dies macht den theoretischen Ansatz der vorliegenden Arbeit so attraktiv. Durch die Fusion der leukämischen Blasten mit den dendritischen Zellen wird unter Umgehung der Identifizierung einzelner Antigene eine professionelle Präsentation multipler leukämiespezifischer Oberflächenmerkmale gewährleistet. Für die Induktion einer effektiven Immunantwort scheint es von Vorteil zu sein, nicht nur einzelne, sondern mehrere tumorspezifische Antigene gleichzeitig zu präsentieren. Durch die simultane Präsentation verschiedener Antigene sind unterschiedliche Angriffsflächen auf den Zielzellen vorgegeben und somit die Möglichkeiten einer Selektion von Tumorzellvarianten, die das entsprechende Antigen nicht präsentieren und so den spezifisch aktivierten zytotoxischen Zellen entkommen, reduziert [3, 27, 49, 71, 111]. Neben der von uns angewandten Fusion von DC mit Tumorzellen werden die Transfektion der DC mit Tumor-RNA sowie das Pulsing

der DC mit apoptotischen Tumorzellen oder Tumorzelllysaten in diesem Zusammenhang als Methoden der Wahl angesehen. Zu bedenken ist beim Einsatz dieser Vakzine jedoch die Möglichkeit der Induktion einer Autoimmunreaktion gegen das normale Gewebe, aus dem der Tumor hervorgegangen ist [53, 56, 75, 97, 108].

Als Nachteil des Pulsingverfahrens wird von einigen Autoren die in erster Linie auf MHC-Klasse-II Moleküle beschränkte Präsentation der aufgenommenen Antigene kritisiert, da diese vorrangig die CD4⁺-T-Lymphozyten stimulieren und die gewünschte Aktivierung der CTL ausbleibt [54, 58]. Die DC scheinen jedoch auch über Möglichkeiten zu verfügen, die exogenen Antigene an MHC-Klasse-I Moleküle zu koppeln. Die genauen Mechanismen dieser als „cross-presentation“ bezeichneten Antigenaufbereitung sind allerdings bislang ungeklärt [5, 41, 43, 73]. Eine weitere Strategie besteht aus dem Einsatz direkt an MHC-Klasse-I Moleküle gekoppelter Antigene, so dass die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort sicher gewährleistet ist. Jedoch stellt sich hier die Problematik der limitierenden MHC-Restriktion [45, 83, 108]. Die Gruppe um Galea-Lauri et al. haben verschiedene „Loading-Strategien“ bezüglich der Fähigkeit einer Aktivierung der CTL in-vitro miteinander verglichen und konnten eine Überlegenheit der Fusionsmethode gegenüber dem Pulsing mit apoptotischen Leukämiezellfragmenten sowie dem Pulsing mit Tumorzell-Lysaten feststellen [43].

Da die Leukämie eine Erkrankung ist, in deren Rahmen sich die entarteten, ungehemmt proliferierenden Zellen nicht in Form eines soliden Tumors, sondern als Einzelzellsuspension darstellen, besteht weder die Problematik der aufwendigen mechanischen oder enzymatischen Tumoraufbereitung zur Tumorzellgewinnung noch der langfristigen Tumorzellkultur, um genügend hohe Zellzahlen zu erreichen. Die Verfügbarkeit ausreichend hoher Zellzahlen zur Fusion mit den DC kann somit problemlos gewährleistet werden [43].

Die Vorteile der Fusion gegenüber anderen Beladungsstrategien sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Die Fusion von DC mit Tumorzellen ermöglicht die Präsentation von Tumorantigenen ohne die Notwendigkeit ihrer zuvorigen Identifikation. Dies ist insbesondere von Interesse, da erst wenige AML-spezifische Antigene bekannt sind.
2. Durch die simultane Präsentation multipler Tumorantigene werden auch Subpopulationen der Tumorerkrankung erfasst und damit die Möglichkeiten der Bildung einer Mutation, die sich den CTL entzieht, reduziert.
3. Durch die natürliche Tumorantigenaufbereitung mit Präsentation der Antigene in Form von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Komplexen auf der Zelloberfläche der DC wird eine spezifische Aktivierung sowohl der CD4⁺- als auch der CD8⁺-T-Lymphozyten ermöglicht [48, 49, 57, 108].
4. Die Fusion ist eine relativ unkompliziert durchzuführende Methode zur Antigenbeladung dendritischer Zellen [108].

Im Rahmen dieses Versuches wurde die erfolgreiche Fusion muriner BmDC der SL/AM-Maus mit der AML-Zelllinie M1 durchgeführt. Nach 9 tägiger Zellkultur wurden die BmDC entsprechend des unter 2.3.3 beschriebenen Protokolls nach Lindel et al. mit den M1-Zellen unter Zusatz von PEG fusioniert. Die fusionierten Zellen waren multinukleär und wiesen morphologische Eigenschaften beider Zelltypen auf. Für eine erfolgreiche Fusion beweisend war jedoch die immunphänotypische Analyse. Die fusionierten Zellen waren sowohl für CD135 (in Rahmen dieses Versuches M1-spezifisch) als auch für I-A^d (=MHC-Klasse-II und hier DC-typisch) positiv und präsentierten somit Oberflächenmerkmale beider Zellen. In den vergleichenden Analysen reiner M1- bzw. BmDC-Kulturen fehlten entsprechend bei der M1-Kultur für I-A^d positive Zellen sowie in der BmDC-Kultur CD135 positive Zellen (Abb.17).

In der Dot Plot-Darstellung der fusionierten Zellen zeigte sich zusätzlich ein erheblicher Anteil an Zellen, die nur für ein Merkmal positiv waren. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Autoren, deren Erfolgsrate der zweifach anfärbenden und somit erfolgreich fusionierten Zellen zwischen 20-32% lag [43, 49, 73, 108]. Kugler et al. erreichten mittels Elektrofusion lediglich 10-15% fusionierter Zellen [69], obwohl im direkten Vergleich der Methoden kein Unterschied zwischen der chemischen Fusion mit PEG und der Elektrofusion beobachtet werden konnte [73]. Unsere Ergebnisse liegen mit einem Anteil von 53% an zweifach anfärbenden und somit fusionierten Zellen deutlich über denen der zuvor publizierten Daten. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass die Doppelfluoreszenz nicht ausschließlich auf fusionierte DC-Tumor-Zellen zurückzuführen ist. So konnte nachgewiesen werden, dass bei der Anfärbung der Oberflächenmoleküle der fusionierten Zellen eine erhöhte Zahl falsch doppelt positiver Zellen gemessen wird. Im Rahmen des Fusionsstressses fallen gehäuft Zellfragmente oder apoptotisches Material an, das sich an nicht fusionierte Zellen anlagern kann und damit eine Doppelfluoreszenz verursacht [69, 73]. In Anbetracht dieser Erkenntnisse ist womöglich von einer geringeren Anzahl korrekt fusionierter Zellen in der Analyse auszugehen.

4.4. Einsatz von autologen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML

Wie bereits erwähnt stellen immuntherapeutische Ansätze eine interessante zusätzliche Option in der Behandlung maligner Erkrankungen dar. Insbesondere der Einsatz von professionellen APC in Form von DC scheint dabei Erfolg versprechend zu sein. Bestärkt wird ihre Verwendung zusätzlich durch den Umstand, dass für Karzinom-Patienten nach Chemotherapie oder Stammzelltransplantation eine deutlich niedrigere Anzahl an DC im Vergleich zu Gesunden beschrieben wird. Ob der Grund dafür in der verabreichten Therapie oder aber in der Erkrankung selbst zu finden ist, konnte bislang noch nicht geklärt werden [91].

Aus den oben genannten Gründen halten wir die Fusion von DC mit Tumorzellen, in unserem Fall leukämische Blasten, für eine sinnvolle Methode in der Herstellung eines Antitumorimmunität induzierenden Vakzins. Diverse Publikationen berichten bereits über den erfolgreichen Einsatz fusionierter Zellen bei soliden Tumoren. In verschiedenen Tiermodellen konnte sowohl eine protektive Immunität als auch eine Tumorregression, teils sogar in fortgeschrittenen metastasierten Stadien nach Verabreichung fusionierter Zellen beobachtet werden [23, 46, 47, 56, 71, 73, 108]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neben den Sofort-Reaktionen die fusionierten DC-Tumor-Zellen auch in der Lage sind, eine Langzeit-Immunität gegenüber den Tumoren als Folge der Aktivierung von T-Gedächtniszellen zu induzieren [23, 71].

Weitere Arbeiten lieferten viel versprechende in-vitro Ansätze im humanen Bereich [48, 49, 43]. Erste Studien über den in-vivo Einsatz der fusionierten DC-Tumor-Zellen im Menschen ergaben positive Ergebnisse. So konnte bei Nierenzell-Karzinompatienten im metastasierten Stadium ein Rückgang der Metastasen beziehungsweise eine Tumorregression nachgewiesen werden [69].

Galea-Lauri et al. demonstrierten, dass die CTL-Aktivierung sowohl antigenspezifisch als auch MHC-restringiert ist. Den durch fusionierte Zellen aktivierten CTL fehlte es sowohl an einer signifikanten zytolytischen Aktivität gegenüber unspezifischen, nicht zuvor präsentierten Antigenen als auch gegenüber antigenspezifisch gepulsten allogenen DC [43, 49].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der Induktion einer protektiven Immunität gegenüber der M1-AML mittels Vakzinierung fusionierter DC-M1-Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass Fusionszellen aus BmDC und M1-Leukämiezellen in der Lage sind, eine Antitumorimmunität zu induzieren. Die mit DC-M1-Fusionszellen vakzinierten SL/AM-Mäuse wiesen in 60% der Fälle keinerlei Anzeichen einer beginnenden Erkrankung während des Beobachtungszeitraumes von 120 Tagen auf und schienen somit eine protektive Stimulation ihres Immunsystems erfahren zu haben. Bei

den übrigen 40% war im Vergleich zu den nicht vakzinierten Tieren ein verzögertes Einsetzen der Symptome zu verzeichnen. Die Sektionsbefunde der verstorbenen Tiere unterschieden sich nicht von denen der nicht vakzinierten Tiere. In ihren Organen ließen sich ubiquitär leukämische Infiltrate nachweisen. Trotz dieser Therapieversagerquote ließ sich ein Überlebensvorteil gegenüber nicht vakzinierten Tieren mit einer Signifikanz von $p=0,001$ ausmachen. Die Ursachen des Versagens der Therapie in 40% der Fälle im Vergleich zu den teilweise besseren Ansprechraten anderer Arbeiten konnte nicht definitiv geklärt werden. Erwähnenswert ist allerdings, dass selten eine 100%ige Ansprechquote erreicht wurde [69, 71, 73]. Im Folgenden werden verschiedene, möglicherweise die Induktion einer Immunantwort beeinflussende Faktoren diskutiert.

Koinkubation

Denkbar ist, dass der Grund für die von uns ermittelte niedrigere Ansprechrate auf die Vakzinierungen in der Verwendung unterschiedlicher Fusionsprotokolle liegt. So gibt es diverse Arbeiten, in denen die Hybridzellen nach erfolgter Fusion über mehrere Stunden kokultiviert werden [23, 43, 46-49, 108]. Beim Vergleich von DC-Tumor-Fusionszellen mit anschließender Inkubation und einer Kokultivierung von DC und Tumorzellen konnte kein Unterschied der Vakzine bezüglich der Induktion einer zytotoxischen Immunantwort ausgemacht werden. Hingegen ließ sich bei Verzicht auf diese gemeinsame Inkubation für die Mixtur aus DC und Tumorzellen keine immunisierende Wirkung mehr nachweisen [23]. In Bezug auf die fusionierten Zellen wurde die Bedeutung der Kokultivierung leider nicht getestet. Wenn man jedoch in Betracht zieht, dass gewöhnlich die Anzahl der erfolgreich fusionierten Zellen nur 20-24% beträgt [43, 73, 108], scheint es plausibel, dass ein Teil der immunogenen Wirkung der verabreichten Vakzine eventuell auf die sich an die Fusion anschließende Zellkultur zurückzuführen ist. Genau betrachtet entspricht die Kokultivierung einem zusätzlichen Pulsing der DC mit apoptotischen Leukämiezellfragmenten und Tumorzelllysaten, in deren Rahmen weitere immunkompetente APC entstehen. In Bezug auf unsere Ergebnisse könnte dieser Protokollunterschied ein wesentlicher Faktor für die schwächer ausgeprägte Wirkung des verwendeten Vakzins sein.

Fusionsmethode

Als weiterer Diskussionspunkt gilt die Optimierung des Fusionsverfahrens. Nachdem die beiden verwendeten Verfahren der chemischen und elektrischen Fusion bislang als gleichwertig betrachtet wurden, berichteten Hayashi et al. über einen eindeutigen Vorteil der Elektrofusion. Neben Gründen wie erhöhte Toxizität und Instabilität beklagten sie die schlechte Reproduzierbarkeit sowie die unterschiedliche Ansprechbarkeit der verschiedenen Tumoren bei Verwendung chemisch fusionierter Zellen. Viele der vorangegangenen veröffentlichten Ergebnisse über erfolgreiche Fusionen seien anzuzweifeln, da – wie oben bereits erwähnt – eine Kokultivation sich anschließt und somit die natürliche Aufnahme von Tumorzellfragmenten eine zusätzliche Rolle gespielt haben kann. Insbesondere die FACS-Analysen-Ergebnisse im Dot Plot können durch DC, die Zellreste phagozytiert haben, oder durch Zellaggregate verfälscht sein [57]. Dies bestätigen Untersuchungen, in denen nach Koinkubation von DC und Tumorzellen ohne Zusatz von PEG ebenfalls 17% der Zellen eine Doppelfluoreszenz aufwiesen [73]. Diese Fehlerquelle konnte für unsere Experimente jedoch ausgeschlossen werden, da wir ohne Ausnahme die Zellen direkt nach Fusion analysierten beziehungsweise injizierten. Möglicherweise wären mittels der elektrischen Fusion höhere Zahlen an fusionierten Zellen erreichbar gewesen. Hayashi et al. berichten über routinemäßig 50%. Diese Ergebnisse lagen jedoch zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Experimente noch nicht vor.

Verwendung von Selektionsmedien

Eine Methode zur Gewinnung möglichst reiner und hochkonzentrierter Fusions-Zell-Suspensionen besteht in der Verwendung eines Selektionsmedium [46]. Der Mechanismus dieser Selektion besteht aus der Blockade des Tumorzellstoffwechsels. Die DC sind im Besitz eines Enzyms, der Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyl-Transferase, welches ihnen ermöglicht die Stoffwechselblockade zu umgehen. Sie sind jedoch nicht mehr teilungsfähig und sterben trotz intakten Stoffwechsels nach einigen Tagen ab. Da die fusionierten Zellen die Fähigkeit der Stoffwechselumgehung der DC sowie die Teilungsfähigkeit der Tumorzellen besitzen, sind sie als einzige Zellen in der Lage weiter zu existieren [72]. Es gilt

jedoch zu bedenken, dass möglicherweise nicht alle Tumorzellen sich entsprechend blockieren und somit selektieren lassen [108].

Einfluss der Bestrahlung

Des Weiteren haben wir die Bestrahlung der Vakzine vor Injektion betrachtet. Die Verabreichung von 50 Gy reicht aus, um die Immunogenität der fusionierten Zellen zu reduzieren. Diesen Verlust könnte man allerdings bei Bestrahlung der Tumorzellen vor Fusion umgehen [57]. Es ist natürlich fraglich, ob auch die von uns verwendete geringere Dosis von 30 Gy diesbezüglich eine Rolle spielt. Im Vergleich mit anderen Arbeiten scheint dies nicht unbedingt der Fall zu sein (siehe auch 4.6) [23, 43, 69, 71, 108].

Reifegrad der DC

Gegenstand zahlreicher Diskussionen bei der Verwendung dendritischer Zellen im Rahmen der Immuntherapie ist der Einfluss des Reifegrades der verwendeten DC. Wie bereits erwähnt hängt die Effektivität der Antigenaufnahme und –präsentation sowie das Ausmaß der Fähigkeit zur Migration in die lymphatischen Organe und der dort induzierten Immunantwort entscheidend vom Aktivierungs –und Differenzierungsgrad der DC ab [28, 70]. Im Gegensatz zu unreifen DC, deren Spezialisierung vorrangig in der optimalen Antigenaufnahme und –aufbereitung zu sehen ist, liegt der Vorteil bei der Verwendung reifer DC in einer höheren Migrationsfähigkeit sowie einer potenteren Stimulation sowohl zytotoxischer T-Lymphozyten als auch $CD4^+$ -T-Zellen. Zusätzlich sind reife DC in der Lage, supprimierenden Einflüssen des IL-10 zu widerstehen [104]. Zu beachten ist auch, dass DC in der Lage sind, eine Toleranz gegenüber den von ihnen präsentierten Antigenen zu induzieren. Es wird angenommen, dass das Fehlen des 2.Signals in Form von Kostimulation auf unreifen DC während der Ag-Präsentation zur T-Zellapoptosis oder Toleranzentwicklung führt [79, 81, 86]. Des Weiteren wurde eine Hemmung der T-Zell induzierten Immunantwort mit Ausschüttung von immunsupprimierendem IL-10 nach in-vivo Administration unreifer DC beschrieben [31]. Da in Bezug auf das von uns verwendete DC-Vakzin eine natürliche Antigenaufnahme nicht mehr notwendig war, ist die

Verwendung reifer DC in diesem Kontext eindeutig vorzuziehen. Für andere Verfahren der Antigenbeladung, wie beispielsweise dem Pulsing scheint der Einsatz von unreifen DC durchaus sinnvoll, allerdings sollte in diesem Fall eine Reifung der DC vor Injektion induziert werden.

Applikationsort

Verschiedene Forschungsgruppen haben sich mit der Optimierung der Injektionsmethode auseinandergesetzt, da der Ort der Verabreichung eine wesentliche Rolle für die spätere Lokalisation der DC und der von ihnen ausgelösten CTL-Reaktion zu spielen scheint. So war bei Injektion des Vakzins in das subkutane Gewebe in erster Linie eine Einwanderung der DC in die T-Zell-Areale lokaler Lymphknoten zu beobachten. Im Gegensatz dazu sind nach intravenöser Injektion DC vermehrt in gut durchbluteten Regionen wie Milz, Lunge, Leber, Nieren und nur vereinzelt in den kleinen Lymphknoten nachweisbar [6, 36, 53, 93]. In Anbetracht dieser Ergebnisse muss die Frage gestellt werden, gegen welche Art von Tumor sich die Immunantwort richten soll. So konnte für Tumoren der Haut ein eindeutiger Vorteil für die subkutane Injektionsmethode nachgewiesen werden. Diese Tumoren liegen in der Peripherie des Körpers versteckt und fallen somit vorerst nur in den lokalen Lymphknoten auf. Sie sind effektiver zu behandeln mit DC, die die peripheren LN erreichen können [36, 104]. Intravenöse Injektionen schienen in dem Fall sogar kontraproduktiv zu wirken [104]. Die AML ist hingegen eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems und insofern in der Blutbahn und den entsprechend gut durchbluteten Organen lokalisiert, so dass die Anwendung von intravenösen Injektionsmethoden hier sinnvoller scheint [93]. Zusätzliche Studien werden jedoch weiterhin benötigt.

Vakzinierungshäufigkeit

In verschiedenen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Wiederholungen der Vakzinverabreichungen sinnvoll scheinen, da sie sowohl die Stärke der Immunantwort positiv beeinflussen als auch zur Induktion einer anhaltenden Immunität führen [53, 59, 71, 84, 93]. Bei häufiger Stimulation (ab 6 Injektionen)

in kurzen Abschnitten (wöchentlich) war jedoch eher eine Abnahme der zytotoxischen Immunantwort zu beobachten [93]. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf einen Fas-vermittelten Zelltod der T-Lymphozyten bei Restimulation zurückzuführen, dessen Zweck in der Vermeidung einer Überstimulation zu sehen ist. Hierbei sind ausschließlich naive T-Zellen betroffen. Die zuvor geprimten T-Zellen scheinen - möglicherweise im Zusammenhang mit der Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses - diesem Mechanismus gegenüber resistent [66]. Durch eine Verlängerung der Injektionsabstände war diese Problematik vermeidbar [93].

Im Gegensatz dazu wird bei der Verwendung allogener, antigenbeladener DC angenommen, dass die CTL bei wiederholter Stimulation die Oberflächenmerkmale auf den DC der späteren Injektionen wieder erkennen. In diesem Fall können die DC selbst zum Ziel von voraktivierten T-Zellen werden und die Effektivität der repetitiven Vakzinierungen limitieren [53, 59].

Unter Umständen liegt hier ein weiterer verbesserungswürdiger Punkt bezüglich der von uns durchgeführten Experimente. Möglicherweise wäre mit einer höheren Anzahl an Vakzinationen eine bessere Ansprechrate erreichbar.

4.5. Einsatz von allogenen DC-M1-Fusionszellen als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML

Vom Einsatz allogener DC verspricht man sich eine zusätzliche Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten. So konnte für die Fusion von humanen allogenen DC mit Nierenzellkarzinomzellen die Induktion einer Antitumorimmunität in-vivo im Sinne einer Reduktion der bestehenden Tumormasse beziehungsweise in Einzelfällen einer kompletten Remission mit Rückgang aller metastatischen Läsionen nachgewiesen werden [69]. Bei einem Vergleich der Potenz von allogenen gegenüber autologen DC im Rahmen von Vakzinen bestehend aus DC-Ovarialkarzinom-Fusionszellen konnte eine stärkere Proliferation der stimulierten T-Zellen bei Verwendung allogener DC verzeichnet werden. Bezüglich der indu-

zierten tumorspezifischen CTL-Reaktion ließ sich jedoch kein Unterschied feststellen [49].

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse überprüften wir die Fähigkeit allogener DC nach Fusion mit M1-Zellen eine protektive Immunität gegenüber einem späteren M1-Challenge in der SL/AM-Maus zu induzieren. Es zeigte sich, dass allogene DC-M1-Fusionszellen ebenfalls in der Lage sind eine Antitumorimmunität hervorzurufen. Allerdings schien dies in einem geringeren Ausmaß als bei Einsatz von autologen DC-M1-Fusionszellen der Fall zu sein. Im Gegensatz zu den 40% verstorbenen Mäusen bei Einsatz der autologen DC-M1-Fusionszellen verstarben in dem Beobachtungszeitraum von 120 Tagen 62,5% der Tiere mit einer geringgradigen zeitlichen Verzögerung gegenüber den nicht vakzinierten Tieren. Dabei zeigten sie die gleichen Krankheitssymptome und Sektionsbefunde wie die nicht vakzinierten Mäuse. 37,5% der Tiere blieben nach Verabreichung der leukogenen Dosis ohne Anzeichen einer beginnenden Erkrankung. Statistisch konnte somit ein signifikanter Überlebensvorteil der mit allogenen DC-M1-Fusionszellen vakzinierten Tiere gegenüber nicht vakzinierten Mäusen ausgemacht werden ($p=0,0023$) (Grafik 4). Der Unterschied zwischen den verwendeten autologen DC-M1-Fusionszellen und den allogenen DC-M1-Fusionszellen ließ sich hingegen nicht als signifikant nachweisen ($p=0,2604$), was den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten entspricht.

4.6 Einfluss der Fusion auf die Induktion einer Antitumoraktivität: Einsatz von DC-M1-Mixtur als Vakzin zur Immunisierung gegenüber der AML unter Verwendung autologer und allogener DC

Die erfolgreiche Induktion einer Antitumoraktivität mittels Vakzinierung mit sowohl autologen als auch allogenen DC-M1-Fusionszellen warf die Frage auf, ob – wie angenommen - die Fusion der DC mit den Leukämiezellen für diese Reaktion ursächlich war oder ob eine alleinige Injektion von einer in-vitro hergestellten Mixtur von DC mit M1-Zellen ähnliche Ergebnisse liefern würde.

Bereits in anderen Arbeiten wurde der Möglichkeit der Induktion einer Anti-Tumorimmunität unter alleiniger Verwendung von DC oder einer Kombination aus DC und Tumorzellen nachgegangen. Dabei wurden konträre Aussagen getroffen. So konnte bei Vakzinierungen, die ausschließlich DC beinhalteten kein Einfluss bezüglich des Krankheitsverlaufs ausgemacht werden. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob bestrahlte oder unbestrahlte DC eingesetzt wurden [23, 46]. Für die Mixtur aus bestrahlten DC und Tumorzellen wurde ebenfalls keine immunstimulatorische Wirkung beschrieben [23, 43]. Dies änderte sich allerdings, sobald die Zellen vor Injektion für einige Stunden gemeinsam kultiviert wurden (siehe auch 4.4) [23, 73]. Im Gegensatz dazu stehen Publikationen von Coveney et al., die zumindest eine Verzögerung des Wachstums der nach Vakzinierung mit einer Mixtur verabreichten Tumorzelllinie verzeichneten. Bemerkenswerterweise wurden hier nicht bestrahlte DC mit bestrahlten Tumorzellen zusammen verabreicht. Eine Koinkubation der Zellen hatte zuvor nicht stattgefunden [27]. Diese Ergebnisse bestätigen erneut den Verdacht, dass neben der bereits erwähnten Koinkubation die Bestrahlung der Zellen möglicherweise eine wesentliche Rolle spielen könnte (siehe auch 4.4).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder für den Einsatz von autologen noch für allogene DC in einer bestrahlten DC-M1-Mixtur ein signifikanter Überlebenszeitvorteil gegenüber nicht vakzinierten Tieren dargestellt werden ($p=0,2569$). Während bei der Injektion der autologen DC-M1-Mixtur eine Maus von vieren den Beobachtungszeitraum überlebte, verstarben bei Einsatz der allogenen DC-M1-Mixtur alle Tiere (Grafik 6). Auf eine Koinkubation vor Injektion war verzichtet worden.

Diese Ergebnisse entsprechen den zuvor beschriebenen Resultaten von Celuzzi et al. sowie Galea-Lauri et al. [23,43] und bestätigen, dass bei fehlender Kokultivierung keine ausreichende Immunstimulation der CTL stattfindet.

Dass in einem Fall eine Maus überlebte, kann möglicherweise auf einen Fehler bei der Applikation zurückzuführen sein. Denkbar allerdings spekulativ, wäre auch, dass in diesem Einzelfall die DC noch die Fähigkeit besaßen, Antigene aufzunehmen und somit entsprechend ihrer Bestimmung eine Immunreaktion

hervorriefen. Eine weitere Hypothese basiert auf der Annahme, dass die Zugabe von FKS zum Kulturmedium der Zellen von Bedeutung sein könnte. In-vitro führt eine FKS-Exposition zu einer starken syngenen T-Zellantwort [87, 88, 104]. Eine unspezifische Stimulation der T-Lymphozyten durch den Zellen anhaftendes FKS in-vivo könnte demnach die Induktion einer Immunantwort unterstützt haben. Dies würde möglicherweise auch die Ergebnisse im Rahmen der M1-Vakzinierung erklären. Zur Klärung dieser Aspekte könnten weitergehende Untersuchungen der stimulierten CTL, insbesondere bezüglich ihrer Antigen-spezifität beitragen.

4.7 Schlussfolgerung

Das Leukämiemodell der SL/AM-Maus bestätigte sich im Rahmen dieser Arbeit als ein geeignetes Tiermodell zum Studium verschiedener Therapiemöglichkeiten der AML. Des Weiteren zeigten die hier gewonnenen Ergebnisse über den Einsatz von fusionierten DC-Leukämiezellen die erfolgreiche Induktion einer körpereigenen tumorbezogenen Immunantwort und lassen somit eine immuntherapeutische Ergänzung in der konventionellen AML-Therapie als möglich erscheinen.

Studien im humanen Bereich zum Einsatz dendritischer Zellen in-vivo erbrachten bereits die ersten Erfolge. Bemerkenswerterweise konnten dabei bislang keine Nebenwirkungen beobachtet werden, was insbesondere in Hinblick auf die hohe Toxizität der herkömmlichen Behandlungsmethoden als wertvoll zu beurteilen ist. Sicherlich ist bei Einsatz derartiger Vakzine, neben der optimalen Antigenauswahl und -präsentation sowie Art und Häufigkeit der Verabreichung, der Typ der verwendeten DC von entscheidender Bedeutung.

Es konnten bereits diverse Untergruppen der DC identifiziert werden, die sich nicht nur bezüglich ihrer Abstammung und Lokalisation unterscheiden, sondern auch in ihren Differenzierungsgraden. Bislang konnte nur ein Teil ihrer immunregulatorischen Funktionen und Interaktionen eindeutig geklärt werden. Neben

der Induktion der T-Zell abhängigen Immunantwort und B-Zell-Aktivierung wird ihnen eine große Bedeutung in Bezug auf die Toleranzentwicklung zugesprochen. So sind weitere Studien notwendig, um diese viel versprechenden Immunsystem-Modulatoren vollends zu verstehen und sie entsprechend erfolgreich einzusetzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz bedeutender Fortschritte in der zytostatischen Therapie beträgt die 5-Jahres-Überlebenszeit der akuten myeloischen Leukämie (AML) nur 10-40%. Multiple Chemotherapieresistenzen sowie das Bestehen einer sich der Chemotherapie entziehenden minimalen Resterkrankung sind Gründe für diese frustrierenden Ergebnisse. Bei zusätzlich hoher therapieassoziierter Morbidität und Mortalität könnten immuntherapeutische Ansätze eine sinnvolle Ergänzung im Therapiekonzept darstellen.

Zahlreiche Forschungsarbeiten der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Entwicklung von Strategien, um den tumor-spezifischen Entgehungsmechanismen entgegen zu wirken und das Immunsystem so zu stimulieren, dass es maligne Zellen erkennt und abtötet. Der Einsatz dendritischer Zellen (DC) erwies sich in diesem Zusammenhang als sehr viel versprechend, da sie professionelle, antigenpräsentierende Zellen sind und als potenteste Stimulatoren der primären Immunantwort angesehen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung experimenteller Therapiemethoden der AML im transplantablen Leukämiemodell syngener Mäuse. Nachdem im Rahmen der Etablierung des Leukämiemodells der SL/AM-Maus die Reproduzierbarkeit der für dieses Modell charakteristischen Eigenschaften gezeigt werden konnte, standardisierten wir ein Verfahren zur Differenzierung DC aus dem Knochenmark der Mäuse. Weiterhin zeigten wir die erfolgreiche Fusion von DC mit für die SL/AM-Maus syngenen leukämischen Blasten (M1), welche eine optimale Beladung der DC mit tumorspezifischen Antigenen ermöglicht.

In weiteren Untersuchungen beschäftigte sich die Arbeit mit der Induktion einer Antitumoraktivität durch Vakzinierung mit autologen DC-M1-Fusionszellen. Im

Rahmen dieser Experimente konnte eine effektive Stimulierung der körpereigenen Immunabwehr gezeigt werden. In geringerem Ausmaß war dies ebenfalls für den Einsatz allogener DC fusioniert mit M1-Zellen nachweisbar.

Weiterhin wurde unter Verzicht auf die Fusion die Wirksamkeit von Vakzinierungen mit Mixturen bestehend aus bestrahlten M1 und autologen bzw. allogenen DC geprüft. Hierbei konnte keine ausreichende Antitumoraktivität verzeichnet werden.

Bevor die Vakzinierung mit DC im Rahmen der Immuntherapie sich neben den konventionellen Behandlungsstrategien der AML im Menschen etablieren kann, müssen weitere Studien erfolgen. Die erhobenen Ergebnisse machen Mut, dass auf diesem Wege ein Fortschritt in der Therapie der Leukämie möglich sein kann.

6. LITERATUR

1. Abujiang P, Yamada Y, Haller O, Kobayashi H, Kamoto T, Lu L-M, Ogawa M, Ishimoto A, Katoh H, Kanehira K, Ikegami S, Fufumoto M, Hiai H (1996): The origin of SL family mice, *Laboratory Animal Science* 46(4): 410-417.
2. Alexandroff AB, McIntyre CA, Porter JC, Zeuthen J, Vile RG, Taub DD (1998a): Sticky and smelly issues: lessons on tumour cell and leucocyte trafficking, gene and immunotherapy of cancer. *Br J Cancer* 77(11): 1806-1811.
3. Alexandroff AB, Robins RA, Murray A, James K (1998b): Tumor immunology: false hopes – new horizons?. *Immunology Today* 19(6): 247-250.
4. Austyn JM (1998): Dendritic cells. *Curr Opin Hematol* 5: 3-15.
5. Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
6. Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ (1997): In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro. A chimpanzee model. *J Immunol* 158: 4543-4547.
7. Baskar S, Clements VK, Glimcher LH, Nabavi N, Ostrand-Rosenberg S (1996): Rejection of MHC class II-transfected tumor cells requires induction of tumor-encoded B7-1 and/or B7-2 costimulatory molecules. *J Immunol* 156: 3821-3827.

8. Begley CG, Rasko JEJ, Curtis D, Takagi K, Metcalf D, Hilton D, Roberts B, Nicola NA, Rossner MT (1996): Murine flt3 ligand protects M1 leukemic cells from LIF-induced differentiation and suppression of self-renewal. *Experimental Haematology* 24: 1247-1257.
9. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E (1996): Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Ex Med* 184: 465-472.
10. Boyer MW, Vallera DA, Taylor PA, Gray GS, Katsanis E, Gorden K, Orchard PJ, Blazar BR (1997): The role of B7 Costimulation by murine acute myeloid leukemia in the generation and function of a CD8⁺ T-cell line with potent in vivo graft-versus-leukemia properties. *Blood* 89(9): 3477-3485.
11. Brugger W, Schneider A, Schammann T, Dill P, Grünebach F, Bühring H-J, Kanz L, Brossart P (2001): Dendritic cell-based vaccines in patients with hematological malignancies. *Ann N Y Acad Sci* 938: 359-362.
12. Bubeník J (1999): Dendritic cell-based cancer vaccines. *Folia Biologica (Praha)* 45:71-74.
13. Büchner T, Urbanitz D, Hiddemann W, Rühl H, Ludwig WD, Fischer J, Aul HC, Vaupel HA, Kuse R, Zeile G, Nowrouzian MR, König HJ, Walter M, Wendt FC, Sodomann H, Hossfeld DK, von Paleske A, Löffler H, Gassmann W, Hellriegel KP, Fülle HH, Lunscken C, Emmerich B, Pralle H, Pees HW, Pfreundschuh M, Bartels H, Koeppen KM, Schwerdtfeger R, Donhuijsen-Ant R, Mainzer K, Bonfert B, Köppler H, Zurborn KH, Ranft K, Thiel E, Heinecke A (1985): Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 3(12): 1583-1589.

14. Büchner T, Hiddemann W (1990a): Treatment strategies in acute myeloid leukemia (AML). A. First-line chemotherapy. *Blut* 60(2): 61-67.
15. Büchner T, Hiddemann W, Maschmeyer G, Ludwig W, Löffler H, Nowrouzian M, Aul C, Heinecke A for the AMLCG (1990b): How to improve therapy for adult acute myeloid leukemia: studies of the AML Cooperative Group in the Federal Republic of Germany. *J Cancer Res Clin Oncol* 116: 97-99.
16. Büchner T, Hiddemann W, Wörmann B, Löffler H, Maschmeyer G, Ludwig WD, Aul C, Lengfelder E, Schaefer Uw, Schmitz N, Heinecke A (1992): Longterm results in adult AML: conventional induction with maintenance versus double induction with maintenance versus allogenic or autologous BMT. Data from AMLCG. *Annals of Hematology* 64 (Suppl): A113.
17. Büchner T (1997): Treatment of adult acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 9: 18-25.
18. Büchner T, Hiddemann W, Berdel W, Wörmann B, Löffler H, Schoch C, Haferlach T, Ludwig WD, Maschmeyer G, Stalb P, Andreesen R, Balleisen L, Haase D, Eimermacher H, Aul C, Rasche H, Uhlig J, Grüneisen A, Reis HE, Hartlapp J, Hirschmann WD, Weh HJ, Pielken HJ, Gassmann W, Sauerland MC, Heinecke A (2001): Remission induction therapy: the more intensive the better? *Cancer Chemother Pharmacol* 48 (Suppl 1):S41-44.
19. Burnett AK, Eden OB (1997): The treatment of acute leukemia. *Lancet* 349: 270-275.
20. Burnett AK, Kell J, Rowentree C (2000): Acute myeloid leukemia: therapeutic indications, *Curr Opin Hematol* 7(6): 333-338.

21. Buzyn A, Petit F, Ostankowitch M, Figueiredo S, Varet B, Guillet J-G, Ameisen J-C, Estaquier J (1999): Membrane-bound Fas (Apo-1/CD95) Ligand on leucemic cells: a mechanism of tumor immune escape in leukemia patients. *Blood* 94(9): 3135-3140.
22. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr (1996): Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 183: 283-287.
23. Celluzzi CM, Falo LD Jr (1998): Cutting Edge: Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. *J Immunol* 160: 3081-3085.
24. Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS (1992): Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71:1093-1102.
25. Choudhury A, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K, Sutaria S, Sinha I, Champlin RE, Claxton DF (1999): Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-Cell responses. *Blood* 93(3): 780-786.
26. Colombo MP and Forni G (1994): Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now?. *Immunol Today* 15(2): 48-51.
27. Coveney E, Wheatley III GH, Lyerly HK (1997): Active immunization using dendritic cells mixed with tumor cells inhibits the growth of primary breast cancer. *Surgery* 122: 228-234.

28. Curiel-Levandrowski C, Mahnke K, Labeur M, Roters B, Schmidt W, Granstein RD, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S (1999): Transfection of immature murine bone marrow-derived dendritic cells with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene potently enhances their in vivo antigen-presenting capacity. *J Immunol* 163: 174-183.
29. De Smedt T, Pajak B, Klaus GGB, Noelle RJ, Urbain J, Leo O, Moser M (1998): Antigen-specific T lymphocytes regulate Lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. *J Immunol* 161: 4476-4479.
30. De Vos S, Kohn DB, Cho SK, McBride WH, Said JW, Koeffler HP (1998): Immunotherapy against murine leukemia. *Leukemia* 12: 401-405.
31. Dhodapkar MV, Steinmann R, Krasovsky J, Munz C, Bharwaj N (2001): Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193: 233-238.
32. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golubek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC (1993): 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 USA* 90: 3539-3543.
33. Dunussi-Joannopoulos K, Weinstein HJ, Nickerson PW, Strom TB, Burakoff SJ, Croop JM, Arceci RJ (1996): Irradiated B7-1 transduced primary acute myelogenous leukaemia (AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML. *Blood* 87(7): 2938-2946.
34. Dunussi-Joannopoulos K, Krenger W; Weinstein HJ, Ferrara JLM, Croop JM (1997): CD8⁺ T cells activated during the course of murine acute

myelogenous leukemia elicit therapeutic responses to late B7 vaccines after cytoreductive treatment. *Blood* 89(8): 2915-2924.

35. Dunussi-Joannopoulos K, Dranoff G, Weinstein HJ, Ferrara JLM, Bierer BE, Croop JM (1998): 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(1): 222-230.
36. Eggert AAO, Schreurs MWJ, Boermann OC, Oyen WJC, de Boer AJ, Punt CJA, Figdor CG, Adema GJ (1999): Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Research* 59: 3340-3345.
37. Faiola B, Doyle C, Gilboa E, Nair S (2002): Influence of CD4 T cells and the source of major histocompatibility complex class II-restricted peptides on cytotoxic T-cell priming by dendritic cells. *Immunol* 105: 47-55.
38. Falkenburg JHF, Faber LM, van den Elshout M, van Luxemburg-Heijs SAP, Hooftmann-den Otter A, Smit WM, Voogt PJ, Willemze R (1993): Generation of donor-derived antileukemic cytotoxic T-lymphocytes responses for treatment of relapsed leukemia after allogeneic HLA-identical bone marrow transplantation. *J Immunotherapy* 14: 305-309.
39. Falkenburg JH, Smit WM, Willemze R (1997): Cytotoxic T-lymphocytes (CTL) responses against acute or chronic myeloid leukemia. *Immunol Rev* 157: 223-230.
40. Frankel AE, Bare MR, Hogge DE, Stuart RK (2001): Immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Curr Pharm Biotechnol* 2(3): 209-215.

41. Fujii S-i, Fujimoto K, Shimizu K, Ezaki T, Kawano F, Takatsuki K, Kawakita M, Matsuno K (1999a): Presentation of tumor antigens by phagocytic dendritic cell clusters generated from human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Cancer Research* 59: 2150-2158.
42. Fujii S-i, Hamada H, Fujimoto K, Shimomura T, Kawakita M (1999b): Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine-expressing tumor cells are associated with the enhanced survival of mice bearing syngenic tumors. *Blood* 93(12): 4328-4335.
43. Galea-Lauri J, Darling D, Mufti G, Harrison P, Farzaneh F (2002): Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 51(6): 299-310.
44. Gilboa E (1999): How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol Immunother* 48: 382-385.
45. Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P (1997): Dendritic cells hold there promise for immunotherapy. *Immunol Today* 18(3): 102-104.
46. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D (1997): Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic cells and carcinoma cells. *Nature Medicine* 3(5): 558-561.
47. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Li Y, Chen L, Takeuchi H, Qu H, Rowse GJ, Gendler SJ, Kufe D (1998): Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic cells and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6279-6283.

48. Gong J, Avigan D, Dongshu C, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, Kufe D (2000a): Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusion of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(6): 2715-2718. This article has been corrected: see *PNAS USA* 97(9): 5011b, 2000.
49. Gong J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, Cannistra S, Avigan D, Kufe D (2000b): Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol* 165: 1705-1711.
50. Grabbe S, Bruvers S, Gallo RG, Knisely TL, Nazareno R, Granstein RD (1991): Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol*. 146(10): 3656-3661.
51. Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, Granstein RD (1995): Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy?. *Immunology Today* 16(3): 117-121.
52. Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM (1994): Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 84(10): 3261-3282.
53. Gunzer M, Grabbe S (2001): Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Crit Rev Immunol* 21(1-3): 133-145.
54. Harding CV, Song R (1994): Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 153(11): 4925-4933.
55. Hart DNJ (1997): Dendritic cells: Unique leukocytes populations which control the primary immune response. *Blood* 90(9): 3245-3287.

56. Hart I, Colaco C (1997): Immunotherapy. Fusion induces tumor rejection. *Nature* 388: 626-627.
57. Hayashi T, Tanaka H, Tanaka J, Wang R, Averbook BJ, Cohen PA, Shu S (2002): Immunogenicity and therapeutic efficacy of dendritic-tumor hybrid cells generated by electrofusion. *Clin Immunol* 104(1): 14-20.
58. Herbst B, Lindemann A (1998): Dendritische Zellen für die Immuntherapie. *Die gelben Hefte* 98(1): 1-9.
59. Hermans IF, Ritchie DS, Yang J, Roberts JM, Ronchese F (2000): CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol* 164(6): 3095-3101.
60. Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, Ohtake S, Hirashima K, Emi N, Saito K, Hirano M, Shinohara K, Takeuchi M, Taketazu F, Tsunoda S, Ogura M, Omine M, Saito T, Yazaki Y, Ueda R, Hirai H (1996): Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia* 10(7):1168-1176.
61. Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, Azuma M, Okumura Ko, Yazaki Y, Yagita H, Hirai H (1997): Protective and therapeutic immunity against leukemia induced by irradiated B7-1 (CD80)-transduced leukemic cells. *Human Gene Therapy* 8: 1375-1384.
62. Hoffbrand AV, Pettit JE, Hoelzer D (1997): *Roches Grundkurs Hämatologie*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien, 3. Aufl..
63. Ichikawa Y (1969): Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J Cell Physiol* 74(3):223-234.

64. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinmann RM (1992): Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-1702.
65. Inaba K (1997): Dendritic cells as antigen-presenting cells in vivo. *Immunology and Cell Biology* 75: 206-208.
66. Inaba M, Kurasawa K, Mamura M, Kumano K, Saito Y, Iwamoto I (1999): Primed T cells are more resistant to FAS-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J Immunol* 163: 1315-1320.
67. Janeway CA, Travers P (1997): *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 2. Aufl..
68. Klein C, Bueler H, Mulligan RC (2000): Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J Exp Med* 191(10):1699-1708.
69. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zöller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Müller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Müller GA, Ringert R-H (2000): Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature Medicine* 6(3): 332-336.
70. Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S (1999): Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 162: 168-175.

71. Lespagnard L, Mettens P(1998): Dendritic cells fused with mastocytoma cells elicit therapeutic antitumor immunity. *Int J Cancer* 76(2):250-258.
72. Lindel T, Bauer J (1989): *Zell- und Gewebekultur*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
73. Lindner M, Schirmacher V (2002): Tumour cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols. *Eur J Invest* 32(3): 207-217.
74. Liu YJ, Grouard G, de Bouteiller O, Banchereau J (1996): Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytol* 166: 139-179.
75. Ludewig B, Odermatt B, Ochsenbein AF, Zinkernagel RM, Hengartner H (1999): Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases. *Immunol Rev* 169: 45-54.
76. Lo Coco F, Diverio D, Pandolfi PP, Biondi A, Rossi V, Avvisati G, Rambaldi A, Arcese W, Petti MC, Meloni G, Mandelli F, Grignani F, Masera G, Barbui T, Pelicci PG (1992): Molecular evaluation of residual disease as a predictor of relapse in acute promyelocytic leukemia. *Lancet* 340: 1437-1438.
77. Mach N, Gillensen S, Wilson SB, Sheehan C, Mihm M, Dranoff G (2000): Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor or Flt3-Ligand. *Cancer Research* 60: 3239-3246.
78. Masurier C, Pioche-Durieu C, Colombo BM, Lacave R, Lemoine FM, Klatzmann D, Guigon M (1999): Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow

cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunol* 96(4): 569-577.

79. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, Lotze MT (1995): Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity. *Nature Medicine* 1(12): 1297-1302.
80. McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH (1998): The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol Rev* 165: 231-247.
81. McLellan AD, Starling GC, Williams GC, Hock BD, Hart DNJ (1995): Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol* 25: 2064-2068.
82. Miller WH Jr, Kakizuka A, Frankel SR, Warrel RP Jr, DeBlasio A, Levine K, Evans RM, Dmitrovsky E (1992): Reverse transcription polymerase chain reaction for the rearranged retinoic acid receptor α clarifies diagnosis and detects minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2694-2698.
83. Morse MA, Lysterly HK (1998): Immunotherapy of cancer using dendritic cells. *Cytokines Cell Mol Ther* 4(1): 35-44.
84. Morse MA, Lysterly HK (2000): Dendritic cell-based immunization for cancer therapy. *Cancer Gene Therapy* 465: 335-346.
85. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998): Vaccination of melanoma patients with peptide-pulsed or tumor-lysates-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4(3): 328-332.

86. Paczesny S, Beranger S, Salzmann J-L, Klatzmann D, Colombo BM (2001): Protection of mice against leukemia after vaccination with bone marrow-derived dendritic cells loaded with apoptotic leukemia cells. *Cancer Research* 61: 2386-2389.
87. Porgador A, Gilboa E (1995): Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class 1-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 182: 255-260.
88. Porgador A, Snyder D, Gilboa E (1996): Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 156: 2918-2926.
89. Pullendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, Maliszewski CR, Maraskovsky E (1997): Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 159(5): 2222-2231.
90. Robinson SP, Saraya K, Reid CDL (1998): Developmental aspects of dendritic cells in vitro and in vivo. *Leukemia and Lymphoma* 29: 477-490.
91. Savary CA, Graziutti ML, Melichar B, Przepiorka D, Freedman RS, Cowart RE, Cohen DM, Anaissie EJ, Woodside DG, McIntyre BW, Pierson DL, Pellis NR, Rex JH (1998): Multidimensional flow-cytometric analysis of dendritic cells in peripheral blood of normal donors and cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 45: 234-240.
92. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Dauer M, Krug A, Hartmann G, Eigler A, Endres S (2002): Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Dtsch Arztebl* 99(37):A 2408-2416.

93. Serody JS, Collins EJ, Tisch RM, Kuhns JJ, Frelinger JA (2000): T cell activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery. *J Immunol* 164: 4961-4967.
94. Shurin MR, Pandharipande PP, Zorina TD, Haluszczak C, Subbotin VM, Hunter O, Brumfield A, Storkus WJ, Maraskovsky E, Lotze MT (1997): FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cellular Immunology* 179: 174-184
95. Simonsson B (1996): Treatment of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia (AML): focus on immunotherapeutic options. *Leukemia* 10, Suppl 2: S44-S45.
96. Son YI, Egawa S, Tatsumi T, Redlinger RE Jr, Kalinski P, Kanto T (2002): A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* 262(1-2): 145-157.
97. Spisek R, Chevallier P, Morineau N, Milpied N, Avet-Loiseau H, Harousseau J-L, Meflah K, Gregoire M (2002): Induction of leukemia-specific cytotoxic responses by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Research* 62: 2861-2868.
98. Staib P, Lathan B, Diehl V (1998): Leukämien. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg) *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 4.Aufl..
99. Steinman RM, Cohn ZA (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Identification, Quantitation, Tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162.

100. Steinman RM, Witmer MD (1978): Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(10): 5132-5136.
101. Steinman RM (1991): The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296.
102. Terstappen LWMM, Loken MR (1988): Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. *Cytometry* 9: 548-556.
103. Terstappen LW; Safford M, Könemann S, Loken MR, Zurlutter K, Büchner T, Hiddemann W, Wörmann B (1992): Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia* 6(1): 70-80.
104. Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Bröcker EB, Steinman RM, Enk A, Kämpgen E, Schuler G (1999a): Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190(11): 1669-1678.
105. Thurner B, Röder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kämpgen E, Bender A, Schuler G (1999b): Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *Journal of Immunological Methods* 223: 1-15.

106. Tobal K, Liu Yin JA (1996): Monitoring of minimal residual disease by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for AML1-MTG8 transcripts in AML-M2 with t(8;21). *Blood* 88(10): 3704-3709.
107. Vremec D, Lieschke GJ, Dunn AR, Robb L, Metcalf D, Shortman K (1997): The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur J Immunol* 27: 40-44.
108. Wang J, Saffold S, Cao X, Krauss J, Chen W (1998): Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *J Immunol* 161: 5516-5524.
109. Wörmann B, Safford M, Könemann S, Zurlutter K, Piechotka K, Schreiber K, Loken MR, Büchner T, Hiddemann W, Terstappen LWMM (1992): Prospective study on the clinical relevance of residual disease in AML patients in complete remission. *Annals of Hematology* 64 (Suppl.): 165.
110. Young JW, Steinman RM (1996): The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation. *Stem Cells* 14: 376-387.
111. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ (1996): Therapy of murine tumors with peptide-pulsed dendritic cells: Dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 183: 87-97.
112. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1998): Eradication of established murine tumors using novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine* 4(5): 594-600.

7. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Serve und Herrn Dr. med. Karsten Kratz-Albers für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung, insbesondere auch für ihre Zeit, die ich stets beanspruchen durfte bedanken. Sie haben mir die Begeisterung am wissenschaftlichen Arbeiten im Bereich der experimentellen Hämatologie und Onkologie vermittelt.

Mein besonderer Dank gilt Rainer Schmidt, Petra Pennekamp und Johannes Wiekowski für die intensive Unterstützung beim tierexperimentellen Arbeiten, sowie den Mitarbeitern des Labors für molekulare Onkologie, die mit Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft zu einem angenehmen und erfolgreichen Arbeiten beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, des hämatologischen Labors der Inneren Medizin A sowie der dermatologischen Klinik der Universität Münster für die freundliche Unterstützung.

Dank auch an Anika und Stephan Hiller sowie meinen Bruder Jan für ihre bereitwillige Hilfeleistung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Dirk, der mir immer wieder tatkräftig zur Seite stand und mit viel Geduld auf so manche gemeinsame freie Stunde verzichtet hat.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich den Idealen der Medizin nahe brachten. Ihre ermutigende Unterstützung hatte maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

8. LEBENS LAUF

Name: Christina Doench
Geburtsdatum: 17.03.1975
Geburtsort: München
Eltern: Dr. med. Jörg Doench
Dr. med. Bärbel Doench, geb. Ehrens
Geschwister: Jan, geb. 20.04.1977
Konfession: evangelisch

Schulbildung: 1981-1985: St. Antonius Grundschule in Bevergern
1985-1994: Johannes Kepler Gymnasium in
Ibbenbüren

Studium: 1995-2002: Studium der Humanmedizin an der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
März 1997: Ärztliche Vorprüfung
März 1998: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2001: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2002: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: April 2001-April 2002:
Städt. Kliniken Dortmund – Anästhesie und Innere
Medizin
St. John´s Hospital in Bangalore, Indien - Chirurgie

Ärztin im Praktikum: seit November 2002 in der Abteilung für Innere
Medizin des St. Elisabeth-Hospitals in Bochum

Dortmund, den 18.02.2004

9. ANHANG



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
Dr. Hubert Serve
Medizinische Klinik und Poliklinik
- Innere Medizin A - der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 20/2000)

26. Mai 2000

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 24.01.2000, hier eingegangen am
07.02.2000, **und Ergänzungen** vom 26.04.2000, hier
eingegangen am 05.05.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Serve,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

Evaluierung experimenteller Therapiemethoden der AML im transplantablen Leukämiemodell der Maus.

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Dr. Hubert Serve
Medizinische Klinik A
Hämatologie/Onkologie
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

Herr
Dr. med. K. Kratz-Albers
Medizinische Klinik A
Hämatologie/Onkologie
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 41-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=cbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 41-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 40 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 40 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1, 5, 6, 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2, 10, 11, 14, 21, 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum 30. 06. 2002.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

480 Mäuse.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Die Mitarbeiter (cand.med.) Christina Dönch, Britta Massmann und Rainer Schmitt dürfen solange nicht am Versuchsvorhaben beteiligt werden, bis der Nachweis der Teilnahme am Versuchstierkunde-Kursus dem Veterinäramt der Stadt Münster vorliegt.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


Dr. Piontkowski



Bezirksregierung Münster

Dr. Berdel
Dr.

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Herrn
Prof. Dr. med. Wolfgang Berdel
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik
- Innere Medizin A -
Albert-Schweitzer-Straße 33

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 23/98)

48149 Münster

2 . Dezember 1998

Betr.: Tierschutz;

hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren
- Verlängerung des Tierversuchs G 23/98:
"Prüfung aktivierender Mutationen des
Tyrosinkinaserzeptors flk2 auf ihre
leukämogene Wirkung in der Maus"

Bezug: Ihr Antrag vom 24.11.1998,
Mein Genehmigungsbescheid vom 24.07.98
-Az.. 23.0835.1.0 (G 23/98) -

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Berdel,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) i.d.F. der Bekanntmachung
vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren
Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a.
Versuchsvorhabens bis zum 30.11.1999.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

[Handwritten Signature]
Dr. Piontkowski

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Medizinische Klinik und Poliklinik
Innere Medizin A
z.H. Herrn Dr. Hubert Serve
Albert-Schweitzer-Str. 33
48149 Münster

VETERINÄR- UND
LEBENSMITTEL-
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1
Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 106
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
Amt_39@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
24.01.2000 an die Bezirksregierung
hier eingegangen am 09.02.2000

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401 a)

Münster,
14.02.2000

Tierschutzgesetz;

Tierversuch G 20/2000

Versuchsleiter und Antragsteller: Dr. Hubert Serve

Stellvertreter: Dr. Karsten Kratz-Albers

Sehr geehrter Herr Dr. Serve,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Zucht und Haltung von

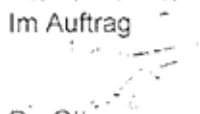
bis zu 500 Mäusen.

Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Pfleger der ZTE zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Prof. Dr. Richter zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.

Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches. Bitte beachten Sie, dass der Versuch erst begonnen werden kann, wenn Ihnen die Genehmigung der Bezirksregierung Münster vorliegt.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster	Kto.-Nr. 393 210 000	(BLZ 400 400 29)
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster	Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 90)
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 36-161	(BLZ 440 100 46)	Dresdner Bank Münster	Kto.-Nr. 606 165 600	(BLZ 400 800 40)
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 305 100	(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster aG	Kto.-Nr. 4 200 900	(BLZ 401 600 50)
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 305 022	(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster	Kto.-Nr. 61 220	(BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

• Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J *0251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Medizinische Klinik und Poliklinik
Innere Medizin A
Hämatologie/Onkologie
z.H. Herrn Dr. Hubert Serve
Albert-Schweitzer-Str. 33
48149 Münster

VETERINÄR- UND
LEBENSMITTELÜBER-
WACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 106
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
Amt_39@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung
Münster,
15.03.19999

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
e-mail vom 11.03.99

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401 a)

TIERSCHUTZGESETZ

hier: Genehmigung zur Zucht und Haltung von Versuchstieren - mein Schreiben vom 06.10.1998

Sehr geehrter Herr Dr. Serve,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz in der z.Z. gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zum Züchten und Halten von

bis zu 500 Mäusen des Stammes SL/AM.


Die Erlaubnis wird unter folgenden Auflagen erteilt:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Mitarbeiter der ZIE zuständig.
2. Über die Zucht und den Verbleib der Tiere sind Aufzeichnungen zu machen und mindestens drei Jahre lang aufzubewahren.
3. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.
4. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Prof. Dr. Richter zu erfolgen
5. Der Tierschutzbeauftragte der Uni, Herr Dr. Lücke, ist über die Zucht und Haltung zu informieren.

Diese Erlaubnis ist bei Verstoß gegen das Tierschutzgesetz jederzeit widerruflich.

Mit freundlichen Grüßen

i.A.


Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. /52	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster	Kto.-Nr. 393 210 0/00	(BLZ 400 400 28)
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster	Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 00)
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 38-481	(BLZ 440 100 40)	Dresdner Bank Münster	Kto.-Nr. 606 465 600	(BLZ 400 600 40)
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 306 100	(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster eG	Kto.-Nr. 4 200 930	(BLZ 401 600 50)
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 308 002	(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster	Kto.-Nr. 61 228	(BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

☎ Hauptvermittlung (0251) 492 0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J 10251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt.muenster.de



Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Herrn
MD PhD Masao Mizuki
Dep. of Hematology/Oncology
Osaka University Medical School
2 - 2 Yamada - oka, Suite City
Osaka 565
Japan

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401 a)

DIE
OBERBÜRGERMEISTERIN



VETERINÄR- UND
LEBENSMITTELÜBER-
WACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 106
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
Amt_39@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Münster.
15.09.1998

Einfuhr von Wirbeltieren aus Drittländern Genehmigung nach § 11 a Abs. 4 Tierschutzgesetz

Sehr geehrter Herr Mizuki,

hiermit genehmige ich die Einfuhr von

12 Mäusen des Mausstammes SL/Am aus Japan

über die Grenzkontrollstelle Frankfurt-Main/Flughafen nach Münster. Die Einfuhr erfolgt am 22.09.1998.

Die Tiere werden zu Versuchszwecken verwendet; die Haltung erfolgt in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Richter.

Begründung:

Am 25.08.1998 haben Sie eine Genehmigung nach § 11 a Abs. 4 Tierschutzgesetz über Herrn Dr. Serve der Medizinischen Klinik und Poliklinik Münster beantragt. Unter Beachtung der geltenden gesetzlichen Regelungen kann ich Ihnen die beantragte Genehmigung erteilen.

Mit freundlichen Grüßen

i.A.

Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster	Kto.-Nr. 393 210 0/00	(BLZ 400 400 78)
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster	Kto.-Nr. 0470 006	(BLZ 400 700 00)
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 30-401	(BLZ 440 100 48)	Groszner Bank Münster	Kto.-Nr. 096 495 900	(BLZ 400 900 40)
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 070 005 109	(BLZ 400 101 11)	Volkbank Münster eG	Kto.-Nr. 4 200 800	(BLZ 401 600 50)
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 506 002	(BLZ 440 201 01)	Westdeutsche Landesbank Münster	Kto.-Nr. 61 226	(BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

Städt. Hauptvermittlung	(0251) 492-0
Telefax	(0251) 492-7750
Datex	10251437#
F-Mail	
Stadtverwaltung	tg.stadt-muenster@de