

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
(Leiter Prof. Dr. med. S. Endres)
der Medizinischen Klinik Innenstadt
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke)
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung der Immunantwort unter Therapie mit CpG-Oligodesoxynukleotiden und dendritischen Zellen im murinen Tumormodell

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Kristin Katharina Rall
aus
Reutlingen
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Enders
PD. Dr. P. Kufer

Mitbetreuung durch den
promoviertem Mitarbeiter: PD Dr. med. G. Hartmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeiner Hintergrund	1
1.2	Immunstimulatorische Oligodesoxynukleotide	3
1.2.1	Definition und geschichtlicher Hintergrund	3
1.2.2	Zelluläre Effekte immunstimulatorischer CpG-ODN	5
1.2.3	CpG-ODN und der TLR9	7
1.2.4	Therapeutische Möglichkeiten und erste <i>in vivo</i> Ergebnisse mit CpG-ODN	10
1.3	Dendritische Zellen und ihr Einsatz als Tumorstoffe	13
1.3.1	Immunbiologie dendritischer Zellen	13
1.3.2	Dendritische Zellen in der Tumorstoffe	17
1.4	Herkömmliche onkologische Therapieoptionen am Beispiel des Kolon- und des Nierenzellkarzinoms	20
1.5	Ziele der Arbeit	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Zellkulturmedien und Zelllinien	26
2.1.1	Kulturmedien	26
2.1.2	Tumorzelllinien	26
2.2	Oligodesoxynukleotide	28
2.3	Isolation und Kultur dendritischer Zellen	29
2.3.1	Präparation muriner dendritischer Vorläuferzellen aus Knochenmark	29
2.3.2	Elimination dominanter Zellpopulationen durch biomagnetische Depletion	30
2.3.3	Reifeinduktion dendritischer Zellen	31
2.4	Tumormodelle	33
2.4.1	Mäuse und Haltungsbedingungen	33
2.4.2	Subkutaner Tumormodell	33

2.5	Isolation von Effektorzellen der Immunantwort	35
2.5.1	Präparation murinen Milzgewebes	35
2.5.2	Isolation von T-Lymphozyten aus Splenozyten	35
2.6	Durchflusszytometrie (FACS)	36
2.6.1	Allgemeines Funktionsprinzip	36
2.6.2	FACS-Analyse von Oberflächenantigenen	37
2.7	IFN-γ -Bestimmung im Serum über ELISA	38
2.8	Analyse der lytischen Aktivität	38
2.8.1	Färbung der Zielzellen mit CFSE	38
2.8.2	Evaluierung der lytischen Aktivität von murinen Splenozyten im FACS	39
2.8.3	Analyse der lytischen Aktivität im ^{51}Cr -Release-Assay	42
2.9	Depletion von CD4- und CD8-positiven Zellen <i>in vivo</i>	43
2.10	Phasenkontrastmikroskopie	43
2.11	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	CpG-ODN als Therapie im subkutanen Tumormodell	44
3.1.1	CpG-ODN als Monotherapie im prophylaktischen Modell	44
3.1.2	Abstoßung etablierter Tumoren im therapeutischen Modell	45
3.1.3	Untersuchung „humaner“ CpG-Oligonukleotide	47
3.1.4	Hemmung des Tumorwachstums nach Verschiebung des Therapiebeginns	49
3.2	Untersuchung der lytischen Aktivität muriner Splenozyten <i>in vitro</i>	51
3.2.1	Erhöhung der lytischen Aktivität durch CpG-ODN	51
3.2.2	Antigen-unspezifische Tumorzelllyse zu Beginn der Therapie	52
3.2.3	Einfluss des angeborenen Immunsystems tumorfreier Mäuse auf die lytische Aktivität	55
3.2.4	Entwicklung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort unter peritumoraler Therapie mit CpG-ODN	56

3.2.5	Bedeutung der CD8-T-Zellen für die Entwicklung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort	60
3.3	Charakterisierung der Immunantwort <i>in vivo</i>	62
3.4	Verbesserung einer auf dendritischen Zellen basierenden Immuntherapie	65
3.4.1	Vergleich einer Therapie mit peritumoralem CpG-ODN und einer Therapie mit reifen aktivierten dendritischen Zellen	65
3.4.2	Abstoßung etablierter Tumoren durch peritumorale Injektion von CpG-ODN in Kombination mit kontralateraler Koinjektion von CpG-ODN und dendritischen Zellen	65
4	Diskussion	70
4.1	CpG-ODN und ihre Wirkung im subkutanen Tumormodell	70
4.1.1	Abhängigkeit vom Injektionsort und Parallelen zur Entzündungsreaktion– das „ <i>Danger-Modell</i> “	70
4.1.2	Bedeutung des CpG-Motivs – die zwei Typen von CpG-ODN	72
4.1.3	Unterschiede zwischen humanem und murinem System in Bezug auf das CpG-Motiv	75
4.1.4	Tumorgröße zu Therapiebeginn als limitierender Faktor für die Effektivität einer CpG-Monotherapie	77
4.2	Charakterisierung der Immunantwort – Zusammenspiel von Effektorzellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems	78
4.2.1	Charakterisierung der Immunantwort <i>in vitro</i>	78
4.2.2	Entwicklung einer CD8-abhängigen Immunantwort <i>in vivo</i>	80
4.3	Kombination von dendritischen Zellen und CpG-ODN in der Immuntherapie	81
4.3.1	Kombination zweier potenter Ansätze in der Therapie maximal großer Tumoren	81
4.3.2	Bedeutung von Generierung und Reifungsgrad dendritischer Zellen für den Therapieerfolg	83

4.3.3	Wege der Antigenbeladung und Vakzinierungsprotokoll dendritischer Zellen	85
4.3.4	Zukunft der DC-Vakzine im humanen System – Unterschiede zwischen Mensch und Maus sowie subkutanem und orthotopen Tumormodell	85
5	Zusammenfassung	89
6	Literaturverzeichnis	91
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	
	Danksagung	
	Veröffentlichungen	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Hintergrund

Obwohl auf dem Gebiet der Krebsforschung in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt wurden, ist der Kampf gegen den Krebs noch lange nicht gewonnen. Malignome bedienen sich verschiedener Mechanismen, um einem intakten Immunsystem zu entgehen. Einerseits spielt der Verlust von Tumorantigenen oder die Expression inhibierender Moleküle auf der Zelloberfläche eine große Rolle (Old 1992; Boon 1994), andererseits ermöglichen somatische Mutationen es sogar stark immunogenen Tumoren zu wachsen und in einem immunkompetenten Wirt zu persistieren (Boon 1994; Braun 2000).

Über die verantwortlichen Faktoren, die über Induktion oder Inhibierung einer Immunantwort entscheiden, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Hypothesen aufgestellt. So gilt bei der „Zwei-Signal-Hypothese“ (Zinkernagel 2001) das Erkennen von Antigen durch T- und B-Zellen mit Hilfe spezifischer Rezeptoren als Signal 1. Dieses Signal alleine hat einen negativen Effekt und inaktiviert spezifische Lymphozyten. Nur in Anwesenheit eines zweiten Signals, wie z.B. B7, CD40, Fas, oder Interleukin-2 wird dieselbe Zelle zur Proliferation und Differenzierung in eine Effektorzelle bewegt. Antigen-präsentierende Zellen (APC) nehmen hier eine Schlüsselposition ein, da sie nicht nur Antigen verschiedener Herkunft präsentieren, sondern auch kostimulatorische Moleküle exprimieren und in lymphatisches Gewebe wandern können.

Die Induktion protektiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) ist außerdem von der Anzahl an Tumorzellen bzw. der Menge an Antigen, der Dauer der Verfügbarkeit, sowie der Lokalisation innerhalb oder außerhalb sekundär lymphatischer Organe abhängig (Zinkernagel 2001). So stellte sich heraus, dass diffus systemisch applizierte Tumorzellen in ausreichenden Mengen zu einer Deletion von CTL führen. Andererseits werden Tumoren, die sich strikt außerhalb sekundär lymphatischen Gewebes befinden oder durch Barrieren von T-Zellen getrennt bleiben, von diesen ignoriert ohne sie in einen anergen Zustand zu versetzen. Eine Immuntherapie kann also nur erfolgreich sein

bei einer Tumorlast, die klein genug ist, um gerade keine T-Zell-Ignoranz auszulösen, aber ausreicht, um eine funktionierende T-Zell-Antwort zu induzieren.

In den meisten experimentellen Modellen kann eine prophylaktische Vakzinierung mit Tumorantigenen vor einer Tumorinduktion schützen. Dieser Ansatz entspricht den vorbeugenden Impfungen im eigentlichen Sinne, die heute gegen eine Vielzahl von Erkrankungen empfohlen oder zumindest möglich sind und gegen Tumorerkrankungen nur dann relevant erscheinen, wenn eine nachgewiesene genetische Disposition mit sehr hoher Penetranz vorliegt. Viel seltener werden Vakzinierungen bei manifesten Tumoren durchgeführt und selbst wenn, so erweisen sich solche postexpositionellen Protokolle nur zu einem kleinen Anteil als effektiv.

Jeder klinisch manifeste Tumor exprimiert an seiner Oberfläche eine Vielzahl von mehr oder weniger spezifischen Antigenen. Dennoch gelingt es diesem zu wachsen, ohne vom patienteneigenen Immunsystem erkannt zu werden. Die fehlende Verbindung der jeweiligen Antigene mit mikrobiellen molekularen Strukturen hat sich als bedeutender Grund hierfür herausgestellt. Schließlich wird seit mehr als einem Jahrhundert ein spontaner Rückgang von Tumoren bei Patienten beobachtet, die in enger Nachbarschaft zum wachsenden Tumor eine bakterielle Infektion entwickelt hatten (Wiemann 1994). Seitdem wurden die unterschiedlichsten Versuche unternommen eine mikrobielle Infektion nachzuahmen, um das Immunsystem dazu zu bringen, einen manifesten Tumor anzugreifen. Durch die Auslösung einer starken proinflammatorischen Immunantwort und somit einer hohen systemischen Toxizität wurden der Anwendung von bakteriellen Lysaten als Immunadjuvantien im Menschen bis heute jedoch deutliche Grenzen gesetzt.

Durch die Verwendung zuvor *in vitro* aktivierter dendritischer Zellen (DC) kann dieses Problem umgangen werden (Schuler 1997; Thurner 1999; Banchereau 2001; Mellman 2001). Ein anderer Ansatz ist die Identifizierung mikrobieller Moleküle, die erwünschte Immunantworten auslösen, ohne generell toxisch zu wirken. Oligodesoxynukleotide, die CpG-Motive enthalten (CpG-ODN), stellten sich hierbei als nützliche Instrumente heraus.

1.2 Immunstimulatorische Oligodesoxynukleotide

1.2.1 Definition und geschichtlicher Hintergrund

Oligodesoxynukleotide sind kurzkettige, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Moleküle, deren Einzelbausteine über Phosphatbrücken an den Desoxyeinheiten der Glykoside miteinander verbunden sind. CpG-Motive sind nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen.

Erstmals wurde Professor *Busch* in Bonn im Jahre 1866 darauf aufmerksam, dass es bei Patienten, die an multiplen Sarkomen der Gesichtshaut oder an malignen Drüsensarkomen des Halses litten, zu einer Tumorrückbildung kam, wenn sie gleichzeitig ein Erysipel entwickelten (Berliner-Klinische-Wochenschrift 23. März 1868). Dieselbe Beobachtung machte er, wenn er bei Patienten mit Halsdrüsensarkomen an der betroffenen Stelle selbst ein Erysipel induzierte.

Im Jahre 1891 begann der New Yorker Chirurg *William Coley* bei Patienten, die an einem inoperablen Sarkom erkrankt waren, Lysate aus Streptokokken oder hitzeinaktivierten Serratiastämmen, in die Tumormasse zu injizieren (Coley 1991). Erstaunlicherweise erreichte er bei über 40 % seiner 900 behandelten Patienten eine anhaltende klinische Remission. Andere konnten seine Erfolge allerdings in diesem Ausmaß nicht bestätigen, da zu diesem Zeitpunkt weder eine Standardisierbarkeit gegeben war noch die einzelnen Komponenten des Immunsystems bekannt waren und außerdem die Strahlentherapie mit ersten durchschlagenden Erfolgen in den Mittelpunkt rückte. Dennoch hatte er mit seinen Studien einen Meilenstein für heutige immuntherapeutische Ansätze in der Behandlung von Tumoren gesetzt.

Fast ein Jahrhundert später gelang es der Arbeitsgruppe um *Tokunaga et al.* zu zeigen, dass die bakterielle DNA selbst für die therapeutische Aktivität verantwortlich war. Er testete Lysate aus Tuberkelbakterien (BCG, *Bacillus Calmette-Guerin*), die er in verschiedene Fraktionen auftrennte, auf ihre therapeutische Aktivität in zwei murinen Tumormodellen. Dabei konnte er nur mit der DNA-haltigen Fraktion eine Tumorregression sowie eine Prävention von Metastasen bewirken (Tokunaga 1984). Innerhalb weniger Jahre konnte zunächst gezeigt werden, dass bakterielle DNA B-Zellen aktivieren und sowohl zur Proliferation als auch zur vermehrten Immunglobulin-

Synthese anregen kann (Messina 1991). Den Forschern der Arbeitsgruppe *Yamamoto et al.* gelang es 1992, den Unterschied zwischen Wirbeltier- und bakterieller DNA zu verdeutlichen, wobei es nur mit letzterer gelang, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu aktivieren und über Induktion der IFN- γ -Synthese indirekt eine Tumorrogression im Mausmodell zu bewirken (Tokunaga 1984; Yamamoto 1988). Um die für diese Effekte verantwortlichen Sequenzen ausfindig zu machen, wurden synthetisch hergestellte einzelsträngige ODN untersucht. Dabei erwiesen sich sogenannte Palindrome, komplementäre um ein zentrales Dinukleotid angeordnete Sequenzen, als maßgeblich für die therapeutische Aktivität.

In ihren *Antisense*-Experimenten (gezielte Hemmung der Bildung eines Proteins durch komplementäre Bindung eines *Antisense*-Oligos an die RNA) fanden *Krieg et al.* 1995 heraus, dass bakterielle DNA und synthetisch hergestellte ODN mit unmethylierten CpG-Dinukleotiden die B-Zell-Proliferation sowie die Ig-Sekretion *in vitro* und *in vivo* stimulieren (Krieg 1995). Dieser Effekt konnte durch ein gleichzeitiges Signal über den spezifischen Antigen-Rezeptor noch verstärkt werden. Als optimal stellten sich hierbei CpG-Dinukleotide heraus, die umgeben waren von zwei 5' Purinen (besonders GpA) und zwei 3' Pyrimidinen (besonders TpC oder TpT). Durch eine Methylierung der CpG-Dinukleotide, durch eine Eliminierung des CpG-Motivs, sowie durch eine Reduktion der Basenzahl auf weniger als acht wurde der Effekt aufgehoben. Ebenso zeigte an einen Untergrund gebundene CpG-ODN keine Wirkung, was auf die Notwendigkeit einer Aufnahme in die jeweilige Zelle schließen lässt. Mit diesen Ergebnissen war ein neuer, T-Zell-unabhängiger Weg der B-Zell-Aktivierung entdeckt.

Innerhalb eines Jahres konnten mehrere Gruppen diese Ergebnisse bestätigen. So waren auch für die oben beschriebene NK-Zell-Aktivierung nicht wie zunächst vermutet die Palindromsequenzen, sondern CpG-Motive ursächlich verantwortlich. Bei genaueren Untersuchungen stellte sich heraus, dass CpG-ODN, die anstelle der Phosphodiester-eine Phosphothioat-Modifikation (nicht an Bindung beteiligtes Sauerstoff-Atom wird durch Schwefelatom ersetzt) aufwiesen, nicht nur stabil gegen einen ansonsten raschen Abbau durch Nukleasen waren, sondern auch eine immunstimulatorische Eigenkomponente aufwiesen (Krieg 1996). Der nach einmaliger Injektion von CpG-ODN in Mäusen beobachtete rasche Zytokinanstieg deutete auf die Induktion einer TH1-Antwort hin. Durch diese gelang es Mäuse gegen eine Infektion mit *Listeria*

monocytogenes resistent zu machen, wenn die Injektion 48 Stunden vor der Infektion erfolgte (Krieg 1998).

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse, ist es sinnvoll an dieser Stelle zu verdeutlichen wie es dem Immunsystem gelingt, Vertebraten- von mikrobieller DNA zu unterscheiden und letztere als „Gefahren-Signal“ zu erkennen, das auf das Vorliegen einer Infektion hinweist. So liegen bei mikrobieller DNA CpG-Motive in der Regel in unmethylierter Form vor, während man bei Vertebraten in über 80 % Methyl-Cytosin findet (Bird 1987). Schon lange ist auch bekannt, dass die Häufigkeit von CG-Dinukleotiden in Bakterien einer statistischen Verteilung entspricht (1 von 16 Dinukleotiden), während sie bei Wirbeltieren statistisch unterrepräsentiert sind (1 von 64 Dinukleotiden). Bei den sowieso schon wenigen unmethylierten CpG-Motiven der Wirbeltiere schien es sich noch dazu um inhibitorische ODN zu handeln (Krieg 1998).

1.2.2 Zelluläre Effekte immunstimulatorischer CpG-ODN

Im folgenden sollen die bekannten Effekte, die CpG-ODN auf die verschiedenen Zellen des Immunsystems haben, beschrieben werden. CpG-ODN bringen *in vitro* unreife antigenpräsentierende dendritische Zellen (DC) dazu, vermehrt kostimulatorische Moleküle, wie MHC I, MHC II, CD40, CD80 und CD86 zu exprimieren und induzieren gleichzeitig eine vermehrte Sekretion von IL-12, TNF- α und IFN- α (Lipford 1997; Sparwasser 1998; Sparwasser 2000; Sparwasser 2000; Vabulas 2000). Durch die Umwandlung in eine professionelle APC gelingt es so unabhängig von T-Helferzellen, z.B. im drainierenden Lymphknoten eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen. Betrachtet man die sezernierten Zytokine, so wird deutlich, dass es sich in erster Linie um ein Th1-Milieu handelt (Jakob 1998). Auch in Monozyten und Makrophagen führt CpG-ODN zu gesteigerter IL-12-Ausschüttung (Chace 1997), sowie zu einer Verstärkung der Antikörper-abhängigen zytotoxischen Aktivität (ADCC). Wurden aber verschiedene Arten humaner DC untersucht, so zeigte sich im Gegensatz zum eben beschriebenen murinen System, dass nur die Subpopulation der plasmazytoiden DC direkt durch CpG aktiviert wird. Von Monozyten abgeleitete DC, die bekannterweise hoch sensitiv gegenüber LPS sind, reagierten nicht auf CpG-ODN.

Bei der Untersuchung von CpG-Sequenzen, die große Mengen von IFN- α und IFN- β in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) induzieren, stellte sich heraus, dass diese Zytokine ausschließlich von unreifen plasmazytoiden DC produziert wurden (Hartmann 1999; Krug 2001). Die Potenz der CpG-ODN, IFN-Typ-I zu induzieren korrelierte dabei unmittelbar mit ihrer Fähigkeit, die lytische Aktivität von NK-Zellen, sowie deren IFN- γ -Produktion zu erhöhen (Ballas 1996; Cowdery 1996). Auch bei der Aktivierung von NK-Zellen durch CpG-ODN handelt es sich also um einen indirekten kostimulatorischen Effekt.

CpG-DNA stellt ein potentes B-Zell-Mitogen dar. Auf direktem Wege können 95 % aller B-Zellen aus muriner Milz zum Eintritt in den Zellzyklus gebracht werden (Krieg 1995). Neben der Proliferation werden diese durch Induktion der Genexpression von *c-myc* und *bcl-x_L* vor spontaner und B-Zell-Lymphomzellen vor aktivierungsinduzierter Apoptose bewahrt (Wang 1997; Yi 1998; Yi and Krieg 1998; Yi 1999). Außerdem wird die Sekretion von IL-6, IL-10 und Immunglobulinen, sowie die Expression von CD86, CD40, CD54 und MHC II gesteigert (Yi 1996; Jahrsdorfer 2001). Durch gleichzeitige Stimulation über den spezifischen Antigen-Rezeptor ist eine weitere Steigerung möglich. Durch CpG-ODN aktivierte B-Cell-Zellen weisen eine starke stimulatorische Kapazität gegenüber T-Zellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) auf (Decker 2000). Die B-Zell-Antwort auf CpG-ODN ist polyklonal und in geeignetem Zytokinmilieu ist ein Ig-Klassenwechsel möglich (Liang 1996; Davis 1998). Die anfangs für murine B-Zellen beschriebenen Ergebnisse konnten für humane Zellen bestätigt werden (Hartmann 2000).

Die Annahme, dass auch T-Zellen primär durch CpG-ODN aktiviert werden könnten, da sie *in vitro* wie *in vivo* teilweise mit einer Hochregulierung von CD69 und CD86 reagierten, stellte sich bei genauer Betrachtung als falsch heraus. So blieb eine Aktivierung nach Aufreinigung der T-Zellen aus einer Splenozyten-Lösung und somit bei Abwesenheit von APC, aus. Stattdessen konnte auch hier ein Typ-1-IFN-vermittelter Effekt mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Zum einen blieb eine Aktivierung in IFN-1R-/- Mäusen aus, wobei auch eine Zugabe von IFN-1R und APC keine Wirkung zeigte. Zum anderen verursachte die Zugabe von IFN-1 aber nicht von IFN- γ dasselbe Muster einer teilweisen T-Zell-Aktivierung wie CpG-ODN. Auch T-Lymphozyten werden also indirekt über Aktivierung von APC stimuliert (Sun 1998).

Wurden T-Zellen allerdings schon vorher über ihren T-Zell-Rezeptor „getriggert“, so ist eine Stimulation auch in Abwesenheit von APC möglich, wenn die DNA-Sequenz ein zusätzliches Poly-Guanosin-Motiv enthält (Bendigs 1999; Hartmann 2000).

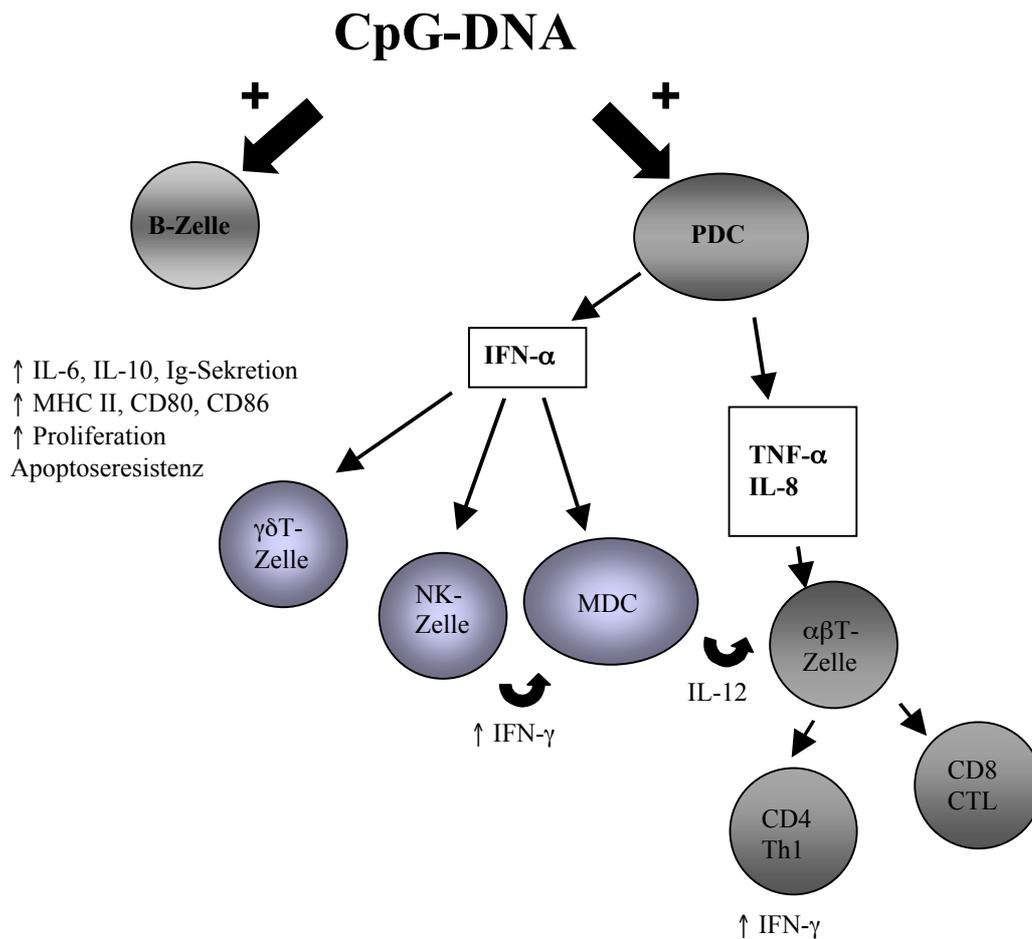


Abb. 1.1 Wirkungen von CpG-DNA auf die verschiedenen Zellen des menschlichen Immunsystems
Abkürzungen: PDC: plasmazytoide dendritische Zelle, MDC: monozytoide dendritische Zelle,
 CTL: zytotoxischer T-Lymphozyt, Th1-Zelle: T-Helferzelle Typ 1

1.2.3 CpG-ODN und der TLR9

Die Immunantwort auf mikrobielle Pathogene setzt sich aus einem angeborenem und einem erworbenen Teil zusammen. Eine große Herausforderung für Effektorzellen des angeborenen Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen einer hohen Zahl potentieller Pathogene und den körpereigenen Antigenen, obwohl ihnen nur eine begrenzte Zahl an verschiedenen Rezeptoren zur Verfügung steht. Im Laufe der

Evolution wurde deshalb eine Reihe von Rezeptoren entwickelt, die bestimmte stets wiederkehrende Motive auf Pathogenen erkennen, die bei höheren Eukaryoten nicht vorkommen. Diese Motive spielen für die eingedrungenen Mikroorganismen meist eine lebenswichtige Rolle und unterliegen deshalb keiner hohen Mutationsrate (Medzhitov 2001). Man spricht bei diesen Motiven von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und bei den korrespondierenden Rezeptoren auf Effektorzellen von *pattern-recognition receptors* (PRRs).

Obwohl CpG-DNA in letzter Zeit sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt wurde, was ihren Einsatz als Adjuvans betrifft, so gibt es noch viele Spekulationen über ihren molekularen Wirkungsmechanismus. Studien über die Pathogenese des septischen Schocksyndroms, hervorgerufen durch Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien insbesondere LPS, führten zu einem neuen Verständnis von Mechanismen des angeborenen Immunsystems (Ulevitch 1995). Das Erkennen von LPS war dabei abhängig von einem LPS-Bindungsprotein (LBP) sowie von CD14, was alleine aber keine Signale über die Zellmembran weitergeben konnte. In Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* stieß man auf eine Gruppe von Rezeptoren, sogenannte Toll-Rezeptoren, die sich als essentieller Bestandteil in der Embryonalentwicklung sowie als Schlüsselfigur in der Immunantwort gegen Pilze erwies (Lemaitre 1996). Eine homologe Familie dieser Toll-Rezeptoren, die „*Toll-like-receptors*“ (TLR), existiert auch in Säugetieren. Bis heute sind mindestens 10 verschiedene Vertreter dieser Familie beschrieben worden. So ist TLR4 verantwortlich für das Erkennen von LPS gramnegativer Bakterien, TLR2 erkennt Lipoproteine und Glykolipide verschiedener Bakterienarten und TLR5 bindet an Flagellin, das an der äußeren Membran einiger gramnegativer Arten vorkommt.

Die Arbeitsgruppe um Hemmi *et al.* konnte als erste bei Mäusen zeigen, dass die zelluläre Antwort auf CpG-ODN von TLR9 abhängig ist (Hemmi 2000). Sie untersuchte hierzu Mäuse, denen der TLR9 gänzlich fehlte. *In vitro* kam es nach Zugabe von CpG-ODN weder zur Proliferation von Splenozyten noch zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 oder IL-12 durch Makrophagen. Auch die normalerweise so deutliche Wirkung auf DC blieb aus. So war weder eine IL-12-Produktion noch eine verstärkte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle nachweisbar. TLR9-defiziente Mäuse erwiesen sich als resistent gegenüber einem sonst

tödlich endenden durch CpG-DNA induzierten Schocksyndrom. *In vivo* blieb die Entwicklung einer Th1-vermittelten Immunantwort aus. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch zwischen CpG-DNA und dem humanen TLR9 beschrieben. Durch Transfektion von TLR9 auf humane „nonresponder cells“ konnte eine Reagibilität gegenüber CpG-ODN hergestellt werden, wobei aber ein speziesspezifisches CpG-Motiv notwendig war (Bauer 2001).

TLRs haben eine intrazelluläre Domäne, die homolog ist zu der des IL-1-Rezeptors und deshalb als Toll-IL-1R-Domäne (TIR) bezeichnet wird. TIR bindet die homologe Domäne des zytoplasmatischen Adaptorproteins MyD88 (*Myeloid differentiation marker 88*). Dieses tritt wiederum über einen bestimmten Anteil (*death domain*) mit der Serin-Threonin-Kinase IRAK (*Interleukin-1-receptor-associated kinase*) in Verbindung. Die Kinase dissoziiert nach Autophosphorylierung und assoziiert mit dem Adaptorprotein TRAF6 (*Tumor necrosis factor receptor-activated factor 6*). Dieser Prozess resultiert schließlich in der Aktivierung zweier verschiedener Reaktionswege. Zum einen wird TAK-1 ein Mitglied der MAP-3-Kinasen-Familie und dadurch wiederum I κ B-Kinasen aktiviert, was zur Phosphorylierung von I κ B führt. Dadurch kann I κ B proteolytisch gespalten werden, NF- κ B wird freigesetzt und transloziert in den Zellkern, wo es die Expression von Zielgenen induziert. Andererseits können Mitglieder des AP-1-Komplexes von Transkriptionsfaktoren über JNK (*c-Jun NH₂-terminal kinase*) aktiviert werden (Abb.1.2). Über beide Wege werden letztendlich Genexpression und Zytokinsekretion induziert (Aderem 2000; Akira 2001).

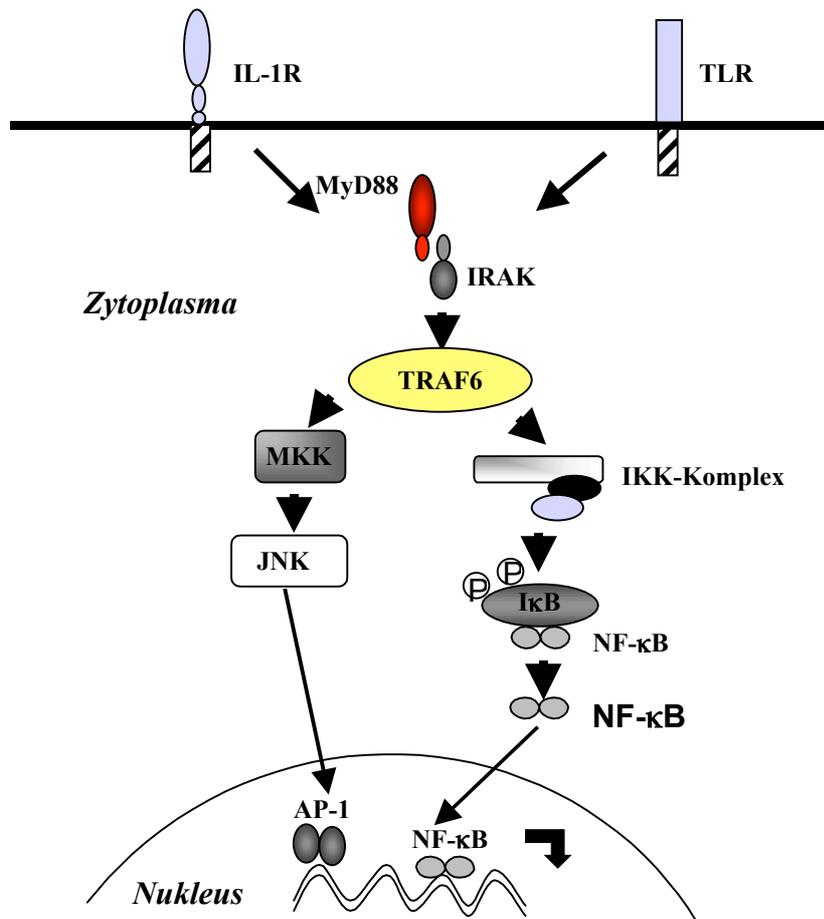


Abb.1.2 Signalkaskade, die durch IL-1 sowie durch TLR4 aber wahrscheinlich auch TLR9 ausgelöst werden kann (modifiziert nach (Akira 2001)).

1.2.4 Therapeutische Möglichkeiten und erste *in vivo* Ergebnisse mit CpG-Oligonukleotiden

Betrachtet man nun die oben beschriebenen Effekte von CpG-ODN auf die verschiedenen Zellen des Immunsystems, so liegt es nahe, diese als Adjuvantien in Kombination mit Impfstoffen anzuwenden. In verschiedenen Studien konnten sie in Mäusen eine spezifische Antwort gegen HBsAg verstärken, wobei sie andere Adjuvantien in Prozent der Serokonversion, der Geschwindigkeit des Auftretens sowie der Höhe des Antikörpertiters und außerdem in Prävalenz und Stärke der CTL-Antwort übertrafen (Lipford 2000). Eine 1999 begonnene Studie an gesunden Probanden konnte diese Ergebnisse auch im humanen System bestätigen. Beim Vergleich verschiedener Adjuvantien in der Maus, erwies sich die Kombination aus CpG-ODN und *Alum*, das

bisher als einziges Adjuvans zur Anwendung im Menschen zugelassen ist, als am potentesten bei gleichzeitig geringsten toxischen Nebenwirkungen (Weeratna 2000). Erste Versuche an Menschenaffen wurden an Orang-Utans gemacht, die bekanntermaßen kaum auf eine HBV-Impfung ansprechen. Nach Ausbruch von Hepatitis B wurde ein herkömmlicher Impfstoff mit CpG-ODN kombiniert. Dies führte innerhalb kurzer Zeit zu einer hohen Serokonversionsrate und hohem Antikörpertiter bei Einzeltieren einer Population (Davis 2000).

Durch die Induktion einer IFN- γ -abhängigen Th1-Antwort kann CpG protektiv gegenüber chronischen Infektionen mit intrazellulären Bakterien, Parasiten und Viren wirken. Diesen Effekt machte man sich zunutze, als man es gegen polymikrobielle Sepsis in Mäusen verwendete. Hierbei ist das Immunsystem unfähig adäquat auf Infektionen zu reagieren. Nach Anwendung von CpG konnte eine starke Ansammlung von Neutrophilen an der Entzündungsstelle beobachtet werden, die mit einer Steigerung ihrer phagozytotischen Aktivität reagierten (Weighardt 2000).

Von großer Bedeutung ist auch die Tatsache, dass es gelang mit CpG-ODN eine etablierte Th2-gerichtete Immunantwort in eine Th1-Antwort umzuwandeln (Heeg 1998). So war es möglich, Mäuse von einer letalen Th2-verursachten Erkrankung (Infektion mit *Leishmania major*) sogar zu einem späten Zeitpunkt zu heilen, indem man eine kurative Th1-Antwort induzierte (Zimmermann 1998). Es ergab sich damit die Möglichkeit, eine humorale und auch eine zellvermittelte Immunantwort zu verstärken, was sogar in sehr jungen Mäusen gelang, die eigentlich ein auf Th2-Antworten basierendes Immunsystem aufweisen (Weeratna 2001). CpG-ODN könnten somit einen wichtigen Beitrag zur Therapie von Allergien und Asthma leisten, denen eine Th2-vermittelte Pathologie zugrunde liegt (Kline 1998), und außerdem die Ausprägung allergischer Reaktionen bei Desensibilisierungen vermindern.

Auf dem Gebiet der Tumorerkrankungen ergeben sich ebenfalls viel versprechende Einsatzmöglichkeiten für CpG-ODN. So kann zum einen die Aktivierung der Immunzellen selbst genutzt werden, indem man CpG-ODN in die unmittelbare Umgebung eines etablierten Tumors injiziert. Schon eine einmalige Gabe erhöhte die Infiltration von Makrophagen, CD8-positiven Zellen und NK-Zellen in den Tumor. Mehrfache Gaben führten zu Langzeitüberleben und dem Schutz vor erneuter

Tumorinduktion. Die Selektion und Aufreinigung von Tumorantigenen könnte somit überflüssig werden (Carpentier 2000). Durch die Depletion von NK-Zellen konnte die Wirkung in mehreren Tumormodellen aufgehoben werden (Carpentier 1999). Die Effektivität einer peritumoralen CpG-Gabe korrelierte dabei mit der Immunogenität des jeweiligen Tumors, führte jedoch wenn auch nicht immer zu einer kompletten Abstoßung des Tumors, so doch zu einer deutlichen Wachstumsverlangsamung (Kawarada 2001). Zum anderen liegt es nahe, CpG-ODN zur Unterstützung der Immunisierung gegen tumorspezifische Antigene heranzuziehen. So gelang es in einem Melanommodell die durch eine Vakzine aus Tumor-assoziiertem Antigen und korrespondierendem T-Zell-Epitop induzierte CTL-Antwort mit Hilfe von CpG-ODN um das 10- bis 100-fache zu steigern (Davila 2000). Eine einmalige Gabe in Kombination mit Antigen und GM-CSF reichte aus, um die Entstehung eines murinen Lymphoms zu verhindern (Liu 1998). Die Stimulation frisch isolierter T-Helfer-Zellen mit syngenem Tumorzellen und APC in Anwesenheit von CpG-ODN induzierte eine große Zahl tumorspezifischer Th1-Zellen. Eine Einzelinjektion dieser Zellen genügte zur Eradikation eines disseminierten Lymphoms (Egeter 2000).

Ferner gibt es aus mehreren Tiermodellen Hinweise dafür, dass CpG-DNA die therapeutischen Erfolge, die mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumorantigene erzielt werden, noch erhöhen kann. So kann CpG die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) verstärken, was in einem murinen Lymphommodell die Tumorentstehung auf 20 % im Vergleich zu 90 % mit Antikörper alleine reduzierte (Wooldridge 1997). Der Einfluss von CpG-ODN auf die Reifedifferenzierung von DC *in vitro* hatte sich ebenfalls als sehr positiv erwiesen (Brunner 2000). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob *in vitro* mit CpG-ODN ausgereifte und aktivierte DC in Kombination mit CpG-Injektionen erfolgreich im Rahmen von Tumorkvakzinen eingesetzt werden können.

1.3. Dendritische Zellen und ihr Einsatz als Tumorvakzine

1.3.1 Immunbiologie dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (DC) gelten heute als die Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort und nehmen eine Schlüsselfunktion in der Verbindung von angeborenem (unspezifischem) und erworbenem (spezifischem) Immunsystem ein. Obwohl schon 1868 das erste Mal durch den Medizinstudenten Langerhans Zellen mit dendritischen Ausläufern in der Haut entdeckt worden waren, begann deren Charakterisierung erst vor ungefähr 30 Jahren. Durch die Beschreibung morphologisch ähnlicher Zellen in der Milz von Mäusen gelang es *Steinman und Cohn* 1973 diese, in ihrer Funktion bis dahin nicht verstandenen Zellen, in den Blickpunkt der Wissenschaft zu rücken. Aufgrund ihres Erscheinungsbildes in der Phasenkontrastmikroskopie tragen sie seitdem das Attribut „dendritisch“. Erst in den 80er Jahren wurde dann erkannt, dass die nach ihrem Entdecker benannten Langerhans-Zellen (LC) der Haut und die in murinen Milzen entdeckten DC ein- und demselben Zellsystem angehörten (Schuler 1997).

Zahlreiche Studien in murinen Tumormodellen haben gezeigt, dass DC, die *in vitro* mit Tumorantigenen beladen und anschließend Mäusen verabreicht wurden, zu einer T-Zell-vermittelten Tumorabstoßung führten. Unter anderem diese Ergebnisse veranlassten zur genaueren Untersuchung der DC-Morphologie, ihres Lebenszyklus, sowie ihrer Funktion. Reife DC sind durch zahlreiche Membranausläufer charakterisiert, die ganz verschiedene Formen annehmen können, sowie durch hohe Konzentrationen an Endosomen und Lysosomen, die zur Antigen-Prozessierung notwendig sind. Neben der Anwesenheit großer Mengen an MHC II-Molekülen auf der Zelloberfläche und dem Fehlen von *Lineage*-spezifischen CD14 (Monozyten), CD3 (T-Zellen), CD19, CD20, CD24 (B-Zellen), CD56 (NK-Zellen) und CD66b (Granulozyten) exprimieren DC eine ganze Reihe von Adhäsionsmolekülen (z.B. CD11c, ICAM-1, ICAM-2, LFA-3), die aber auch auf Monozyten und Makrophagen gefunden werden können, also keineswegs spezifisch für DC sind. Kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) werden ebenso wie Adhäsionsmoleküle und MHC II mit fortschreitender Ausreifung vermehrt exprimiert (McLellan 1995).

Ausgehend von einer CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark sind mindestens drei verschiedene DC-Untergruppen beim Menschen beschrieben worden.

So entstehen unter Verwendung von GM-CSF und IL-4 aus $CD11c^+ CD14^+ CD1^-$ - Vorläufern myeloide unreife DC, die durch Stimuli wie CD40L, LPS und bakterielle DNA zur Ausreifung gebracht werden können. Verwendet man dagegen M-CSF so entstehen Makrophagen. Myeloide Vorläufer können aber genauso zu $CD11c^+ CD14^- CD1^+$ -Zellen werden, die sich mit GM-CSF, IL-4 und TGF- β zu Langerhans Zellen entwickeln. Als dritte Gruppe sind die lymphoiden DC, auch pDC2 oder plasmazytoide DC genannt, bekannt. Diesen Zellen fehlt der myeloide Marker CD11c, sie exprimieren aber CD4 und große Mengen des IL-3-Rezeptors (CD123). Sie benötigen IL-3 zum Überleben, sowie ein Signal wie CD40L zur Ausreifung. Dadurch, dass sie imstande sind große Mengen an Typ-I IFN zu produzieren sorgen sie eher für eine Th2-Immunantwort, während nur $CD11c^+$ Zellen zur IL-12- und IFN- γ -Produktion und damit zur Induktion einer Th1-Immunantwort fähig sind (Grouard 1997; Olweus 1997; Rissoan 1999; Siegal 1999). Parallel hierzu wurden in der Maus DC entdeckt, die aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen, durch die Expression von CD8 α gekennzeichnet sind und eine Rolle in der Negativselektion von autoreaktiven T-Zellen im Thymus sowie dem *Priming* naiver T-Zellen in der Peripherie spielen. Dabei scheinen $CD8\alpha^+$ DC $CD4^+$ T-Zellen in Richtung einer Th1-Antwort zu lenken, während $CD8\alpha^-$ DC eher für eine Th2-Antwort sorgen (Pulendran 1999).

Um die Funktionen der dendritischen Zellen effektiv untersuchen zu können, muss man zunächst die unterschiedlichen Reifestadien verstanden haben. DC-Vorläufer aus dem Knochenmark zirkulieren im Blut und gelangen mit Hilfe verschiedener Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle zu spezifischen Orten im Körper, wo sie im unreifen Zustand eine Wächterfunktion ausüben. Dort sind sie jeder Zeit zur Antigenaufnahme bereit, benötigen aber zur Aktivierung ein Antigen-unabhängiges „Gefahrensignal“ in Form von unter anderem IFN- α und IFN- γ , LPS oder IL-1 β . Einmal aktiviert, reduzieren sie Antigenaufnahme und -prozessierung und konzentrieren sich auf die Präsentation von Antigenen, indem sie MHC II-, Adhäsionsmoleküle sowie kostimulatorische Moleküle vermehrt exprimieren.

In vitro konnte gezeigt werden, dass MHC I- wie MHC II-Moleküle das jeweilige Antigen in hoher Dichte und für lange Zeit stabil auf der Zelloberfläche präsentieren (Pulendran 1999). Aktivierte DC verlassen das Gewebe über afferente Lymphbahnen, um in die T-Zell-reiche parakortikale Zone des drainierenden Lymphknotens zu

gelangen. Dort induzieren sie durch Sekretion von IL-7 die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺- sowie die Differenzierung von B-Zellen (Armitage 1990; Zhou 1995). Durch Sekretion von IL-12 lenken sie T-Helfer-Zellen in Richtung Th1-Antwort (Heufler 1996; Yawalkar 1996). Die Schaffung eines solchen Milieus trägt zusammen mit ihrer Funktion als APC zur Schaffung potenter Antigen-spezifischer Immunantworten bei. Im Ausgleich hierzu können aktivierte CD4⁺-Zellen in sekundären lymphatischen Organen DC über CD40/CD40L-Interaktionen am Leben halten (Bennett 1998; Ridge 1998; Schoenberger 1998). Über Bindung an CD40 ist den DC ein *Priming* von CTL unabhängig von T-Helferzellen möglich. Aktivierte DC werden so vorübergehend zur Brücke zwischen CD4⁺T-Helferzellen und CD8⁺ CTL (Banchereau 2000).

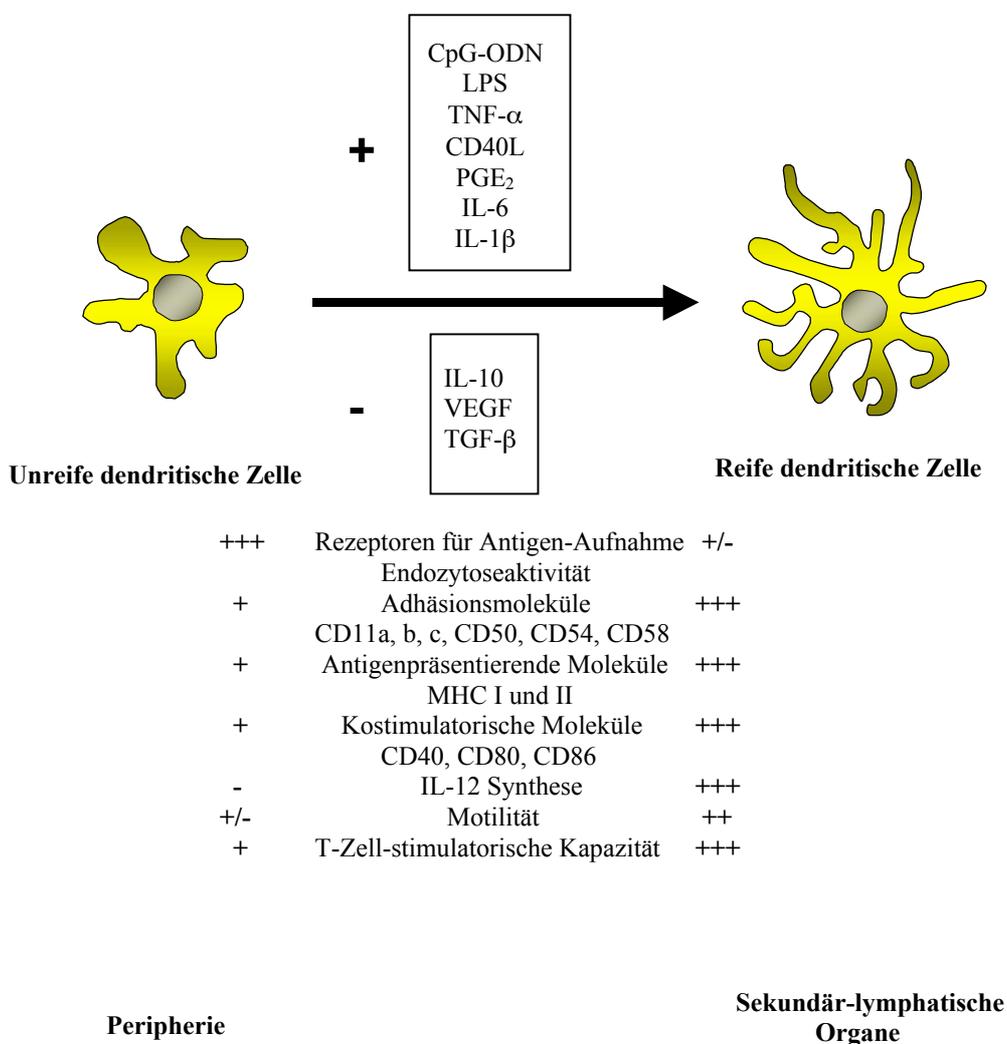


Abb. 1.3 Vereinfachte Übersicht über die phänotypischen und funktionellen Charakteristika unreifer respektive reifer dendritischer Zellen (modifiziert nach (Banchereau 1998))

Neben der Aktivierung von T-Zellen können DC auch auf direktem Wege naive sowie Gedächtnis-B-Zellen aktivieren. Durch Sekretion von IL-12 und einer löslichen Untereinheit des IL-6-Rezeptors beschleunigen sie die Differenzierung aktivierter Gedächtnis-B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Zellen sowie die Differenzierung naiver aktivierter B-Zellen zu Plasmazellen (Dubois 1997; Pulendran 1999). Dendritische Zellen bilden, wie bereits oben erwähnt, eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. So können sie auch unspezifische Effektorzellen wie NK-T-Zellen und NK-Zellen über Ausschüttung von Zytokinen oder auf direktem Wege beeinflussen. Die Sekretion von IFN- α durch CD11c⁻ Vorläuferzellen könnte so die antivirale und antitumorale Aktivität von NK-Zellen erhöhen (Pulendran 1999; Siegal 1999). DC in späteren Stadien könnten durch Ausschüttung von IL-12, IL-15 und IL-18 vielfältige Wirkungen erzielen (Geldhof 1998; Banchereau 2000).

In den meisten Geweben liegen DC in einem unreifen Zustand vor. Sie spielen dann eine wichtige Rolle als „Schildwächter“ des Immunsystems. Ihnen fehlen zwar für die T-Zell-Aktivierung wichtige kostimulatorische Moleküle, sie sind aber bestens für die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen gerüstet. Hierfür stehen ihnen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Neben dem klassischen endogenen Weg, der MHC I-Moleküle mit Peptiden aus körpereigenen Pathogenen oder solchen aus dem Zytosol belädt, können DC diese Moleküle auch über exogene Wege mit Peptiden aus phagozytierten Antigenen oder Immunkomplexen beladen. Dieses Phänomen wird als *cross-priming* bzw. *cross-presentation* bezeichnet. Die Aufnahme der Antigene erfolgt dabei über Phagozytose, Makropinozytose, über die extrazelluläre Flüssigkeiten in Vesikel eingeschlossen werden können, oder Rezeptor-vermittelte Endozytose über Mannose- und DEC 205- sowie Fc γ -Rezeptoren der Klasse I und II (Sallusto 1995). Nach Degradation der Antigene werden die entstandenen Polypeptide auf MHC II-Moleküle geladen, um nach Ausreifung der DC auf deren Oberfläche präsentiert zu werden. Aufgrund dieser verschiedenen Mechanismen sind sehr viel geringere Antigenkonzentrationen nötig als man es von anderen APC kennt (Banchereau 2000). Es wird angenommen, dass aktivierte DC nach Interaktion mit Lymphozyten durch Apoptose zugrundegehen.

Die meisten Studien konzentrieren sich zwar auf die Fähigkeit dendritischer Zellen T-Zellen zu aktivieren, aber bevor diese mit fremden Antigenen in Kontakt kommen, sollten sie zunächst lernen, körpereigene Antigene zu tolerieren. Dies geschieht zum einen im Thymus durch Deletion sich entwickelnder autoreaktiver T-Zellen (zentrale Toleranz) und zum anderen in sekundären lymphatischen Organen wahrscheinlich durch Induktion von Anergie oder Deletion reifer T-Zellen (periphere Toleranz). In beiden Fällen scheinen DC für die Toleranzinduktion verantwortlich zu sein (Banchereau 2000).

1.3.2 Dendritische Zellen in der Tumorthherapie

Viele Tumorantigene lösen keine Antigen-spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort im Patienten aus, was in anbetracht der oben erläuterten Zusammenhänge am Fehlen funktionstüchtiger DC im Tumorbereich liegen könnte. So sind DC beschrieben worden, die zwar Kolonkarzinome und Basaliome infiltrierte, denen aber CD80 und CD86 fehlten und die deshalb eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung aufwiesen (Chaux 1993).

Außerdem wurde schon mehrfach beobachtet, dass Tumoren Faktoren wie IL-10, TGF- β oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sezernieren, die die Entwicklung und Funktion der DC inhibieren (Alleva 1994; Dummer 1995; Gabrilovich 1996; Bronte 1999). So kann IL-10 DC sogar von ihrer eigentlichen Rolle der APC abbringen und zur Induktion einer antigenspezifischen Anergie führen, was einem Stadium der Toleranz gegenüber Tumorgewebe gleichkommt (Enk 1994; Enk 1997; Steinbrink 1999; Vendetti 2000). Auch Langerhans-Zellen der Epidermis kommen deshalb entweder überhaupt nicht im Lymphknoten an oder sie induzieren als unreife DC sogar eine Toleranz gegenüber Tumorzellen (Adler 1998; Lucas 1999; Steinbrink 1999). Dagegen scheinen einmal ausgereifte DC gegenüber hemmenden Zytokinen resistent zu sein (Steinbrink 1997). Berechtigte Hoffnung besteht also, dass *in vitro* ausgereifte DC als Bestandteil einer Vakzine spezifische Immunantworten induzieren könnten, wozu das DC-System im Patienten nicht oder nicht mehr fähig ist.

Die peptidspezifische Immuntherapie steht jedoch nicht jedem Patienten zur Verfügung, da die individuell generierten DC mit den geeigneten HLA-Antigenen ausgestattet sein

und tumorspezifische Peptide (TAA/ *tumor associated antigens*) bekannt sein bzw. zur Verfügung stehen müssen. Außerdem wird durch die Selektion eines begrenzten Repertoires an T-Zell-Klonen die Wahrscheinlichkeit geringer, auf eine Veränderung der Tumorantigene reagieren zu können. Bekannterweise kommt es aber bei Tumorzellen relativ häufig zu sogenannten Fluchtmutationen, wenn sie das immunogene Peptid verlieren ohne an maligner Potenz einzubüßen. Bezieht man also die genetische Instabilität, die mit maligner Entartung verbunden ist, in die Überlegungen mit ein, so müssen in einer Tumorzelle wesentlich mehr TAA vorhanden sein, gegen die spezifische Immunantworten gerichtet werden können (Kufe 2000). Schon deshalb werden ständig neue Methoden der Antigenbeladung sowie verschiedene Herkunftsquellen entwickelt. Zahlreiche Gruppen bedienen sich ganzer Tumorzellen als Antigenquelle. Hier kann zum einen aus Tumorzellen eluierte RNA verwendet werden, durch die in einem schwach immunogenen stark metastasierten Tumormodell eine dramatische Reduktion von Lungenmetastasen erreicht werden konnte (Boczkowski 1996; Koido 2000). Diese RNA könnte auch *in vitro* aus cDNA transkribiert werden, was die benötigte Tumorzellzahl weiter reduzieren würde.

Weiterhin ist das Beladen von DC mit Tumorzelllysate weit verbreitet. Auch hier besteht der Vorteil darin, dass solche Vakzinepräparationen alle relevanten Tumorproteine und -peptide beinhalten und keine molekulare Charakterisierung dieser Strukturen notwendig ist. So kam es beim metastasierten Melanom durch Verwendung von mit GM-CSF und IL-4 generierten und mit Tumorzelllysate gepulsten DC zur Induktion einer antigenspezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort (Nestle 1998). Injizierte man Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom mit autologem Tumorzelllysate gepulste DC aus dem peripheren Blut, die zuvor mit TNF- α und Prostaglandin E₂ (PGE₂) ausgereift worden waren, so war schon nach einmaliger Gabe eine Immunreaktion vom verzögerten Typ erkennbar. Ein therapeutischer Effekt war aber deutlich vom Stadium sowie der Progredienz des Tumors abhängig (Rieser 1999).

Studien im Mausmodell machten deutlich wie wichtig die jeweilige Darreichungsform sein kann. Eine intranodale Gabe der DC war dabei bezüglich der Induktion einer protektiven Th1-Antwort sowohl einer subkutanen als auch einer intravenösen Injektion überlegen. Weiterhin kam man zu der Erkenntnis, dass eine zusätzliche systemische Gabe bestimmter Zytokine wie IL-12 die Wirksamkeit einer DC-basierten Vakzine

weiter verbessern kann (Tatsumi 2001). Eine Synergie zwischen DC und systemischer IL-2-Gabe konnte schon mehrfach im Tierversuch gezeigt werden (Shimizu 1999).

In einer klinischen Studie zeigten Melanompatienten nach Peptidvakzinierung nur dann eine Immunantwort, wenn sie zusätzlich systemisch IL-2 erhielten (Rosenberg 1998). Auf diesen Überlegungen basiert wohl auch der Versuch ganze Tumorzellen *in vitro* mit Zytokin-Gen-Sequenzen zu transfizieren. Damit sezernieren die Tumorzellen nach entsprechender Selektion die gewünschten Zytokine und können so die Immunantwort des Organismus verstärken.

Eine weitere Alternative liegt in der Fusion von Tumorzelle und autologer APC. Den Anfang machte hierbei eine Gruppe, die DC mit MC38-Karzinom-Zellen fusionierte, was in der Maus zur Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen führte, die sowohl vor einer folgenden Tumorinduktion schützten als auch zur Abstoßung etablierter Metastasen beitrugen (Gong 1997). Auch die Fusion primärer humaner Brustkrebszellen mit autologen DC führte zum *Priming* und zur Proliferation von T-Zellen (Gong 2000).

In den oben beschriebenen klinischen Studien wurde wiederholt die Bedeutung des Tumorstadiums deutlich. In einer Mausstudie konnte nun gezeigt werden, dass das Level der Tumorapoptose *in situ* eine entscheidende Rolle im DC-vermittelten Anti-Tumoreffekt spielt. Durch Erhöhung des Apoptose-Index innerhalb der Tumormasse unter Verwendung von TNF- α ließ sich der therapeutische Effekt deutlich steigern (Candido 2001). Im Widerspruch hierzu steht aber die Untersuchung einer anderen Gruppe, die deutlich macht, dass DC gerade nicht durch gesunde Zellen oder solche, die dem physiologischen Zelltod (Apoptose) unterliegen, aktiviert werden. Endogene Stimuli wie gestresste, virusinfizierte oder nekrotische Zellen dagegen sind sinnvollerweise in der Lage DC ohne Zusatz exogener Substanzen zu aktivieren (Gallucci 1999). Neben dem metastasierten Melanom wurden DC bereits bei zahlreichen anderen Tumoren zur Immuntherapie eingesetzt, allerdings zumeist ohne dass signifikante klinische Remissionen erzielt werden konnten. Alle diese Studien unterscheiden sich methodisch in Bezug auf die verwendeten TAA, Reifegrad der verwendeten DC, Form der Antigen-Beladung sowie die Applikationsroute. Für eine Optimierung der DC-basierten Immuntherapie ist daher eine gezielte Evaluation der

verschiedenen Verfahren und der zugrundeliegenden immunologischen Parameter von entscheidender Bedeutung.

1.4 Herkömmliche onkologische Therapieoptionen am Beispiel des Kolon- und des Nierenzellkarzinoms

Anhand zweier Beispiele, dem fortgeschrittenen Kolon- sowie dem Nierenzellkarzinom, sollen hier Erfolge, aber vor allem auch Grenzen der Tumortherapie im Menschen aufgezeigt werden.

Bösartige Neubildungen des Kolorektums sind bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung nach dem Mammakarzinom, bei Männern nach Prostata- und Bronchialkarzinom die dritthäufigste. Bei beiden Geschlechtern stellen diese in Deutschland die zweithäufigste Krebstodesursache dar. Ungefähr 60000 Neuerkrankungen werden pro Jahr registriert, wobei Deutschland verglichen mit anderen EU-Ländern die höchste Inzidenz aufweist. Die Mortalität beträgt etwa 30-35/100000 bei den Männern und 20-25/100000 bei den Frauen. Das Vorkommen des kolorektalen Karzinoms hat sich von 1960 bis 1980 verdoppelt, ist seitdem aber ungefähr gleich geblieben. So liegt das Lebenszeitrisko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, derzeit bei 4-6 %, an einem solchen zu sterben bei etwa 2,5-3 % (Robert-Koch-Institut 2002). Kolonkarzinome sind vorwiegend im Sigma (45 %) sowie Colon ascendens lokalisiert und metastasieren frühzeitig. Im Laufe ihrer Erkrankung entwickeln 60 % der Patienten Metastasen. Die genaue Ätiologie des Kolonkarzinoms ist unbekannt. Neben Patienten mit einer positiven Familienanamnese für Adenome und kolorektale Karzinome sowie solchen mit chronischer Colitis ulcerosa weisen vor allem Personen mit autosomal-dominant vererbter familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) oder dem autosomal-dominant vererbten Lynch-Syndrom (hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom, HNPCC) ein stark erhöhtes bis zu 100 %-iges (FAP) Erkrankungsrisiko auf. Bei diesen Patienten sind engmaschige Kontrollen, in Einzelfällen auch prophylaktische Kolektomien überlebenswichtig.

Durch eine verbesserte Früherkennung ließen sich die Therapieerfolge deutlich erhöhen und somit die Zahl der Todesfälle drastisch reduzieren. Die Prognose ist in erster Linie abhängig vom primären Tumorstadium (TNM-Stadien und Grading) und dessen

Operabilität. So liegt die 5-Jahresüberlebensrate zwischen 90 % und weniger als 5 % (Schalhorn 2001). Auch heute noch besteht die einzige Heilungschance in einer kompletten Entfernung des primären Tumorgewebes (R0-Resektion) einschließlich des zugehörigen Lymphabflussgewebes (*en bloc* Resektion). Eine adjuvante Chemotherapie kann bei fortgeschrittenen Tumorstadien die Prognose verbessern. Die Effizienz neoadjuvanter Maßnahmen wurde bisher beim Kolonkarzinom nicht nachgewiesen (Jehle 2003).

Bis zu 50 % der Patienten erleiden nach einer anfangs erfolgreichen Operation des Primärtumors ein Rezidiv. Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel einer adjuvanten systemischen Therapie, die Heilungsraten durch eine Eradikation von Mikrometastasen zu verbessern. Da man hierbei jedoch zwangsläufig viele Patienten mitbehandelt, die durch die Operation bereits definitiv von ihrer Erkrankung geheilt sind, besitzt das Toxizitätsprofil der Chemotherapie große Bedeutung. Voraussetzung für eine adjuvante Chemotherapie ist die chirurgisch und histopathologisch dokumentierte R0-Resektion. Als Standardregime für das Kolonkarzinom im Stadium III gilt nach wie vor eine sechsmonatige Kombinationstherapie aus dem Pyrimidinsynthesehemmer 5-Fluoruracil (5-FU) und Leucovorin (Mamounas 1997; Wolmark 1999; Staib 2001). Hierdurch ist es möglich, das krankheitsfreie Intervall und damit auch die Überlebenszeit zu verlängern. Im Stadium II bietet die adjuvante Therapie allenfalls einen geringen Vorteil und kann nicht als Standard empfohlen werden. Die Entwicklung oral einzunehmender Fluoropyridin-Präparate wie Tegafur-Uracil (UFT®) oder auch Capecitabin ermöglichen mittlerweile eine nebenwirkungsarme und patientenfreundliche adjuvante Chemotherapie (Smith 2000; Pitot 2001). Zuletzt hat sich Oxaliplatin als Zusatz zum Standardregime aus 5-FU und Leucovorin als lebensverlängernd in der adjuvanten Situation herausgestellt (Andre 2004). Die heute erreichte Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten um etwa 15 % durch adjuvante Chemotherapie bleibt trotz aller Erfolge der letzten Jahre unbefriedigend.

Die Indikation zu einer palliativen Chemotherapie ist bei inoperablen Metastasen oder einem inoperablen Lokalrezidiv gegeben. Zuvor muss die Möglichkeit einer Resektion von Leber- und Lungenmetastasen geprüft werden. Eine primäre Kombination von 5-FU und Leucovorin mit Irinotecan oder Oxaliplatin stellt nach gegenwärtiger Datenlage am ehesten den Standard für Patienten mit metastasierter Erkrankung dar.

Beide Präparate spielen auch eine wichtige Rolle in der neoadjuvanten Chemotherapie primär inoperabler Lebermetastasen (Folprecht 2004). Trotz der deutlichen Verbesserung der Therapieergebnisse in den letzten Jahren ist die Behandlung von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom immer noch vorwiegend eine palliative mit dem Ziel, tumorbedingte Beschwerden zu lindern, die Lebensqualität zu verbessern und das progressionsfreie Intervall zu verlängern. Außerdem zeigte sich in Studien an Mäusen, dass 5-FU bei großen Tumormassen an Wirksamkeit einbüßt und dass die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika selbst bei nahe verwandten Tumoren mit gleicher geweblicher Herkunft stark schwanken kann (Van Laar 1996). „Biologische Therapien“ spielen deshalb eine immer wichtigere Rolle. Eine Vielzahl solcher Therapieansätze beruht auf einer Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems zur Bekämpfung des Tumors. Mit einem Ansatz dieser Art, den monoklonalen Antikörpern, sind bis jetzt insbesondere Erfolge auf dem Gebiet des Brustkrebses verzeichnet worden. Zielstrukturen dieser Antikörper sind häufig Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die von den jeweiligen Tumoren überexprimiert werden. Einige der schon erprobten Antikörper wirken in Kombination mit Chemo-, Strahlentherapie oder neueren Ansätzen synergistisch. So könnte über eine Blockade des VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und anderer Faktoren die Neoangiogenese innerhalb der Tumoren verhindert werden (Tebbutt 2002). Für das Kolonkarzinom hat sich der monoklonale EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Antikörper Cetuximab alleine und in Kombination mit Irinotecan als aktiv in der Zweitlinien-Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome erwiesen und konnte die Irinotecan-Unempfindlichkeit vorbehandelter Tumoren bei einem Teil der Patienten durchbrechen. Der VEGF-Antikörper Bevacizumab verlängerte das Überleben in Kombination mit 5-FU/ Leucovorin und Irinotecan (Folprecht 2004; Hurwitz 2004).

Hier wird deutlich, welche wichtige Rolle der Ansatz einer aktiven spezifischen Immunisierung (ASI) mit autologen Tumorzellen spielen könnte. Als eine weitere Art der Immuntherapie geht die ASI von in Normalgeweben nicht oder im Vergleich zu Tumorgewebe unterrepräsentierten Antigenen aus. Auch hier besteht das Ziel darin, das patienteneigene Immunsystem gegen den Tumor zu mobilisieren. In einer randomisierten klinischen Studie konnte bei Patienten nach Resektion eines Kolonkarzinoms im Stadium II mit Hilfe einer autologen Tumorzellvakzine eine deutliche Verbesserung der Klinik erreicht werden (Hanna 2001). Im Gegensatz hierzu

erwies sich der viel versprechende Einsatz von BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) als Adjuvans zusätzlich zu bestrahlten Tumorzellen bei Patienten in Stadium II und III nicht als ausreichend, um die 5-Jahresüberlebensrate zu erhöhen (Harris 2000).

Nur kurz soll hier noch auf das Nierenzellkarzinom eingegangen werden. Mit nur ungefähr zwei Prozent aller soliden Tumoren ist es eher selten, stellt aber dennoch das dritthäufigste urologische Malignom dar, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Die einzige kurative Therapie besteht auch in diesem Fall aus einer Operation, die zumindest bei einseitigem Auftreten als radikale Nephrektomie durchgeführt wird. Dieses Karzinom ist in ganz besonderem Maße ein Kandidat für die Immuntherapie, da sowohl Chemotherapie mit einer Gesamtansprechrates von weniger als 7 %, als auch Strahlen- und Hormontherapie praktisch wirkungslos bleiben (Deutsche-Krebsgesellschaft 2001). Bei 20 % der Patienten liegen schon bei Erstdiagnose Metastasen vor, bei weiteren 50 % treten diese im weiteren Verlauf der Erkrankung auf. Die Unterdrückung der Angiogenese scheint beim Nierenzellkarzinom eine besonders wichtige Therapieoption darzustellen. Als ein Wirkungsmechanismus stellte sich hierbei die Verminderung der Expression der angiogenen Faktoren VEGF und FGF (*fibroblast growth factor*) heraus (Sasamura 2002). Als möglicher Angiogenese-Hemmstoff hat auch Thalidomid, das 1962 wegen seiner Teratotoxizität vom Markt genommen werden musste, wieder Einzug in die experimentelle Therapie erfahren (Richardson 2002). Weite Verbreitung hat mittlerweile die Therapie mit IFN- α erfahren. Mit einer Ansprechrates von 10 bis 15 % in Phase-II und -III-Studien wird sie mittlerweile als Standard-Option in Erwägung gezogen. Angewandt nach radikaler Nephrektomie verlängert sie das Überleben bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom verglichen mit einer alleinigen Gabe ohne vorausgegangene Operation (Flanigan 2001). In einer prospektiven randomisierten Studie der Deutschen Urologisch-internistischen Multicenter Gruppe, brachte die Therapie mit IL-2 und IFN- α kürzlich an Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom einen Überlebensvorteil von bis zu einem Jahr. Bei akzeptablen Nebenwirkungen gehört dieses Therapieregime somit zum Behandlungsstandard im fortgeschrittenen Stadium (Deutsche-Urologisch-Internistische-Multicenter-Gruppe 2002). Neben der Verwendung von IL-2 und IL-12 werden zahlreiche klinische Studien zum Einsatz von auf dendritischen Zellen oder autologen Tumorzellen basierenden Vakzinepräparaten diskutiert oder sind bereits in Erprobung. Die Immuntherapie solider Tumore hat somit

noch nicht Einzug in den klinischen Alltag genommen. In einem Teil dieser Arbeit soll nun die therapeutische Potenz einer Kombination aus dendritischen Zellen als dem „natürlichen Adjuvans“ und CpG-ODN als „*Danger*-Signal“ in zwei murinen Tumormodellen untersucht werden. Möglicherweise gelingt es durch diesen neuen Ansatz auch der Anwendung im Patienten ein Stück näher zu kommen.

1.5 Ziele der Arbeit

Obwohl CpG-Oligodesoxynukleotide in ersten Studien an Mäusen bereits erfolgreich zur Induktion einer anti-Tumor-Antwort eingesetzt werden konnten, ist die genaue Wirkung auf das Immunsystem bislang unklar.

In früheren Studien wurde bereits die Ausreifung von dendritischen Zellen mit CpG-Oligodesoxynukleotiden und deren Aktivierungspotenzial gegenüber T-Lymphozyten untersucht. Diese dendritischen Zellen waren vor allem im prophylaktischen Modell aktiv (Brunner 2000). Bei diesem Ansatz wurden CpG-Oligodesoxynukleotide ausschließlich *in vitro* für die Stimulation von dendritischen Zellen verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die Immunantwort nach *in vivo*-Applikation von CpG-Oligodesoxynukleotiden zu charakterisieren. Hierbei soll der Beitrag des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems zur anti-Tumor-Aktivität herausgearbeitet werden, um Hinweise auf einen möglichst effektiven Einsatz in der Tumorthherapie zu erhalten. Zunächst soll der Effekt einer Monotherapie mit CpG-Oligodesoxynukleotiden und schließlich der einer Kombinationstherapie mit dendritischen Zellen untersucht werden. Die Ergebnisse sollen Hinweise liefern für den Aufbau von klinischen Studien bei der Immuntherapie von Tumoren.

Folgende Fragen sind Gegenstand dieser Dissertation:

1. Welchem Mechanismus bedient sich eine Monotherapie mit CpG-ODN im subkutanen Tumormodell im prophylaktischen sowie im therapeutischen Ansatz und wann stößt sie an ihre Grenzen?

-
2. Gelingt es durch CpG-ODN die lytische Aktivität von murinen Splenozyten gegenüber Tumorzellen zu erhöhen?
 3. Welchen Einfluss hat die angeborene Immunität auf die Tumorzelllyse?
 4. Kommt es unter peritumoraler Therapie mit CpG-ODN zur Ausbildung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort?
 5. Von welchen Zellen ist die anti-Tumor-Antwort *in vitro* bzw. *in vivo* abhängig?
 6. Lässt sich eine auf dendritischen Zellen basierende Immuntherapie durch Kombination mit CpG-ODN verbessern und wenn ja durch welchen Mechanismus?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmedien und Zelllinien

2.1.1 Kulturmedien

Als Kulturmedien wurde DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium, PAA, Linz*) für Tumorzelllinien sowie VLE-RPMI 1640 (*Biochrom AG, Berlin*) zur Kultivierung von T-Zellen und DC verwendet. Das jeweilige Medium wurde mit 20 nM L-Glutamin (*PAA, Linz*), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (*PAA, Linz*) sowie 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (*FCS, Gibco BRL, Paisley, GB*) supplementiert. Zur Vermeidung unspezifischer Stimulation wurden ausschließlich endotoxinarme (<0,01 EU/ml Endotoxin) und steril filtrierte Medien und Substanzen eingesetzt. Das verwendete FCS wurde zuvor bei 56°C für 30 Minuten wärmebehandelt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Im Folgenden wird auf diese Medien als Vollmedium Bezug genommen.

2.1.2 Tumorzelllinien

C26-Kolonkarzinom-Zelllinie

Diese Zelllinie eines ursprünglich chemisch durch N-nitroso-N-methylurethan induzierten Kolonkarzinoms (Chiodoni 1999) wurde auf kommerziellem Wege von *Cell Lines Service Heidelberg* bezogen. Alle verwendeten Zelllinien wurden von uns vor Versuchsbeginn auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Sie blieben während der gesamten Versuchsdauer mykoplasmenfrei. Die maligne Natur dieser Zelllinie wird durch drei Phänomene verdeutlicht. So kann sie sowohl auf Softagar als auch auf einer Fibroblasten-Einzelzellschicht wachsen. Außerdem bewirkt sie nach Injektion in thymusfreie Nacktmäuse das Entstehen eines stark progressiv wachsenden aplastischen Karzinoms.

Renca-Nierenzellkarzinom-Linie

Das Adenokarzinom entwickelte sich ursprünglich spontan. Die Tumorzellen wurden ebenfalls aus Balb/c Mäusen gewonnen (Salup 1985). Als Bezugsquelle diente auch hier der *Cell Lines Service, Heidelberg*. Beide Zelllinien wurden bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Brutschrank der Firma

Heraeus (HB 2472S, BBD 6220, *Heraeus, Hanau*) kultiviert. Sowohl bei C26- als auch bei Renca-Tumorzellen handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen, die in mittelgroßen bis großen Kulturflaschen (*Greiner, München*) liegend kultiviert wurden. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA (*PAA, Linz*) überschichtet, bis sich ein Großteil der Zellen unter Schwenken vom Boden abgelöst hatte (meist nach 2 bis 5 Minuten in Abhängigkeit von der Zelldichte). Die Reaktion wurde daraufhin sofort mit kaltem Vollmedium abgestoppt, die Zellsuspension mit Vollmedium auf 50 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (20°C, 400 g für 6 Minuten).

Zelllinie zur Produktion von murinem GM-CSF

Zur Produktion von mGM-CSF (*murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor*)-haltigem Überstand wurde die Zelllinie X-63, ein Geschenk von Prof. Thomas Brocker (Immunologie München), verwendet. Die Kultur erfolgte in DMEM Vollmedium ohne G418 Gentamicin-Sulfat (*Gibco BRL, Paisley, GB*). Zur Gewinnung des mGM-CSF wurden die X-63-Zellen, sobald das Medium eine stärkere Gelbfärbung aufwies, abzentrifugiert und der Überstand auf seine biologische Aktivität überprüft. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand der Hochregulation der MHC-II-Expression während der Generation von aus dem Knochenmark abgeleiteten DC mittels FACS-Analyse. Es wurden vier verschiedene Konzentrationen an zugegebenem GM-CSF-haltigen Überstand getestet (2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %). Nach Aliquotierung wurde der Überstand für spätere Versuche bei -20°C eingefroren. In flüssigem Stickstoff eingefrorene X-63-Zellen wurden bei Bedarf mit 1 mg/ml G418 Gentamicin-Sulfat (*Gibco BRL, Paisley, GB*) zunächst hochgezogen und dann ohne G418 weiterkultiviert. Ein erneutes Austesten der biologischen Aktivität war nach jedem Auftauen notwendig.

2.2 Oligodesoxynukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide (ODN) wurden von der *Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA, USA)* synthetisiert. Die ODN waren endotoxinfrei bzw. die Endotoxinkonzentration lag unter dem Detektionslimit ($<0,03$ EU/ml, LAL-Test, *BioWhittaker, Walkersville, MD, USA*). Sie wurden in einem TE-Puffer bestehend aus 10 mM Tris-Chlorid und 1 mM EDTA (*PAA, Linz*) gelöst (pH 8.0), durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Filter steril filtriert und anschließend in sterilem PBS (*PAA, Linz*) aliquotiert. Für die Stammlösung wurde kein PBS verwendet, da bei diversen molekularbiologischen Versuchen phosphorfreie Puffer benötigt werden. Die jeweilige Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers (*Pharmingene Gene Quant, BD Pharmingen, Heidelberg*) ermittelt. Dazu wurde die ODN-Lösung auf etwa $0,5\text{-}100 \mu\text{g/ml}$ mit PBS verdünnt und $100 \mu\text{l}$ in eine vorher mit destilliertem Wasser gereinigte Meßküvette pipettiert. In dem mit $100 \mu\text{l}$ PBS geeichten Photometer konnte nun bei 260 nm die Absorption gemessen und nach folgenden Formeln die Massenkonzentration bzw. Molarität bestimmt werden.

$$\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 0,027 = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100}{(1,5 \times \text{Na} + 0,71 \times \text{Nc} + 1,2 \times \text{Ng} + 0,84 \times \text{Nt})} = \text{Molarität in } \mu\text{M}$$

mit N_x = Anzahl der Basen vom Typ x im Oligodesoxynukleotid (a = Adenin, c = Cytosin, g = Guanin, t = Thymin)

Alle Messungen wurden in Duplikaten vorgenommen. Als Arbeitslösungen wurden Verdünnungen von 1 mg/ml hergestellt und wenn nicht anders erläutert wurden den Tieren je $100 \mu\text{l}$ (entspricht $100 \mu\text{g}$) subkutan (s. c.) injiziert. Die Oligodesoxynukleotide wurden bei -20°C gelagert.

Folgende ODN wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Name	Sequenz
ODN 2006	5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'
ODN 2216	5'-GGG GGA CGA TCG TCG GGG GG- 3'
ODN 1826	5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3'
ODN 1982	5'-TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT -3'

Alle verwendeten ODN enthielten anstelle der Phosphodiester- eine Phosphothioat-Modifikation (nicht an Bindung beteiligtes Sauerstoff-Atom wurde durch Schwefelatom ersetzt) und waren dadurch stabil gegenüber einem raschen Abbau durch Nukleasen.

2.3 Isolation und Kultur dendritischer Zellen

2.3.1 Präparation muriner dendritischer Vorläuferzellen aus Knochenmark

Die Generierung erfolgte mit geringen Abwandlungen wie in der Literatur beschrieben (Inaba 1992). Eine 6 bis 8 Wochen alte weibliche Balb/c Maus (Körpergewicht ≥ 20 g, *Harlan-Winkelmann, Borcheln*) wurde unter Inhalationsnarkose mit Forene[®] (Wirkstoff Isofluran, 1-Chlor-2,2,2-Trifluorethyl-Difluormethylether, *Abbott, Wiesbaden*) durch Exartikulation der Halswirbelsäule getötet. Nach Fixierung der Maus und Desinfektion der Hinterläufe mit EtOH erfolgte die Präparation von Tibia und Femur durch Entfernung von Fell und Muskulatur mittels Einmal-Skalpell und steriler Schere. Nach Überführung der unversehrten Knochen in eine mediumhaltige Kulturschale auf Eis fanden alle weiteren Schritte in der sterilen Atmosphäre eines Laminar-Air-Flow (*Lamin Air[®] HB2448, Heraeus, München*) statt. Einem kurzen Eintauchen der Knochen in EtOH und Überführen in frisches Medium folgte die zunächst einseitige Eröffnung knapp unterhalb der Epiphyse sowie das Einführen einer 25 G Kanüle. Mit insgesamt 10 ml frischem Medium wurden zunächst von einer Seite und nach Eröffnung der gegenüberliegenden Seite von beiden Seiten aus die Zellen des Knochenmarks in ein steriles 50 ml Tube (*Falcon, New Jersey, GB*) ausgespült. Zur Beseitigung störender Gewebstücke wurde die gewonnene Zellsuspension durch ein 70-100 μm Nylonsieb (*Falcon, New Jersey, GB*) filtriert und anschließend mit 10 ml Medium nachgespült. Nach kurzer Zentrifugation (400 g, 5 Minuten, 4°C) erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 20 ml *OrthoMune[®]* (*Ortho-Clinical Diagnostics, Neckargmünd*) durch eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Einer erneuten Zentrifugation (350 g, 5 Minuten, 4°C) folgte eine vorsichtige Resuspension der Zellen in 2 ml Vollmedium und die Zellzählung in einer Verdünnung von 1:100. Es wurden nur solche Zellsuspensionen verwendet, von denen über 95 % dank intakter Zellmembranen nicht mit dem Supravitalfarbstoff Trypanblau (*Sigma, München*) angefärbt werden konnten.

2.3.2 Elimination dominanter Zellpopulationen durch biomagnetische Depletion

Die Isolation unreifer dendritischer Vorläuferzellen aus der Knochenmark-Zellsuspension fand durch magnetische Depletion statt. Durch Zugabe von insgesamt $6 \mu\text{l}/10^6$ Zellen unkonjugierter Ratte-anti-Maus-Antikörper (40 % anti-CD45R, 30 % anti-Ly6G, und jeweils 10 % anti-MHC-II, anti-CD4 und anti-CD8, *BD Pharmingen, Heidelberg*) wurden B-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten markiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und einem erneuten Waschgang wurden ≥ 4 magnetische Ziege-anti-Ratte Dynabeads[®] (*Dynal Biotech, Hamburg*) pro Zelle zugefügt. Einer erneuten 30-minütigen Inkubationszeit unter ständigem Schwenken bei 6°C folgte die Depletion der an die Dynabeads[®] gebundenen Zellen in einem starken Magnetfeld mit Hilfe des Dynal MPC[®] (*Magnetic Particle Concentrator*), wobei die markierten Zellen an der dem Magneten zugewandten Seite des Falcon-Röhrchens haften blieben und die ungebundenen Zellen daher leicht entnommen werden konnten. Dabei sollte es sich bei den an die magnetischen Partikel gebundenen Zellen nur um zuvor mit primärem Antikörper markierte Zellen handeln. Die ungebundene Zellfraktion wurde in Medium in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und drei weiteren Depletionen im Zellseparator unterzogen bis makroskopisch keine Magneteinheiten mehr sichtbar waren. Bei der folgenden Zellzählung (in einer Verdünnung von 1:10) mit Trypanblau erhielt man ungefähr 20 bis 25 % der Ausgangszellzahl. Nachfolgend wurden in einer mittelgroßen Kulturflasche jeweils 5 Millionen DC-Vorläuferzellen zunächst in 11 ml Vollmedium, das mit 200 U/ml mGM-CSF (*Roche, Mannheim*) sowie 20 ng/ml IL-4 (*PeptoTech, London*) supplementiert war, kultiviert. An Tag 3 erfolgte die Zugabe von weiteren 11 ml substituierten Mediums. Bei einer Kontrolle an Tag 6 war je nach Bedarf der Austausch eines Teils des Kulturmediums möglich. Bei späteren Experimenten wurde das mGM-CSF durch Zugabe von 5 % Überstand aus der mGM-CSF produzierenden Kultur der X-63-Zellen ersetzt.

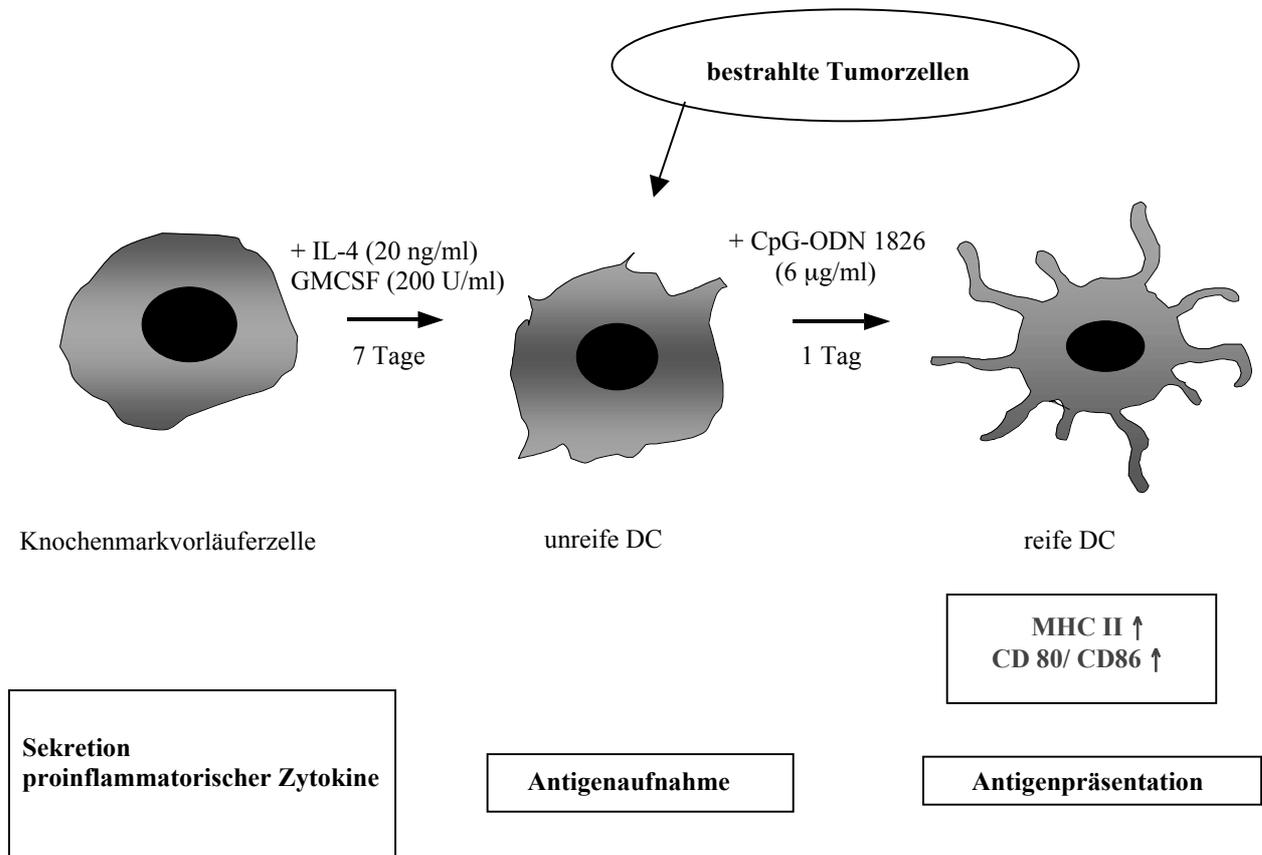


Abb. 2.1 Ausreifung und Aktivierung muriner dendritischer Vorläuferzellen

2.3.3 Reifeinduktion dendritischer Zellen

Zur Induktion der morphologischen Veränderungen, die zur effizienten Antigenpräsentation und zur vollen kostimulatorischen Kapazität führen, benötigen dendritische Zellen ein spezielles Zytokin-Milieu. Durch sechstägige Inkubation in Anwesenheit von IL-4 und mGM-CSF, ließen sich vordifferenzierte, aber in Bezug auf Oberflächenmarker noch unreife DC generieren. Als Antigenquelle wurden an Tag 7 bestrahlte (100 Gray) und somit nicht mehr teilungsfähige C26-Tumorzellen im Verhältnis DC:Tumorzellen = 1:5 zugegeben. Nach Kokultur über Nacht wurden die DC mit CpG-ODN 1826 (6 µg/ml) für weitere 24 h aktiviert, was zu deren vollständiger Ausreifung führte. Der Reifegrad wurde jedes Mal mittels FACS durch Messung der Expression der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 sowie des Reifemarkers MHC II

ermittelt. Dabei führte erst die Zugabe von CpG-ODN zu einer stärkeren Expression der Aktivierungsmarker, wogegen für eine Hochregulation von MHC Klasse II schon die Anwesenheit von IL-4 und mGM-CSF genügte. Dieser Reifemarker wurde durch Zugabe von CpG-ODN eher etwas reduziert.

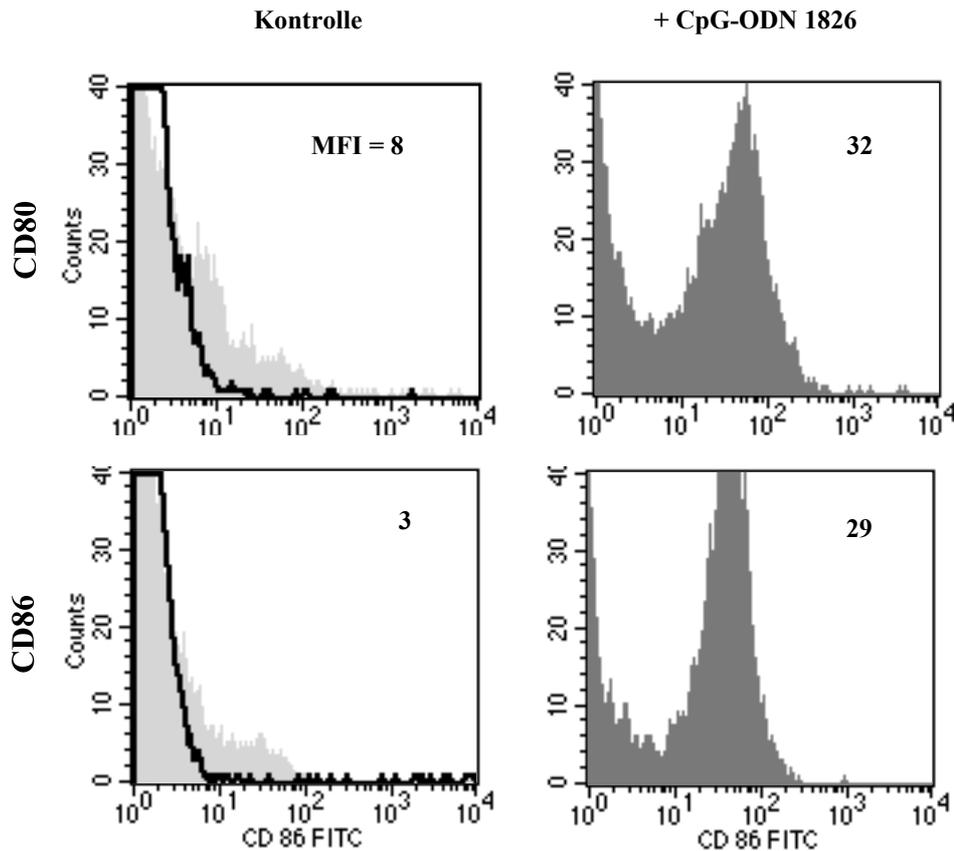


Abb. 2.2 Durchflusszytometrischer Nachweis der Reifeinduktion durch CpG-ODN

Unreife aus dem Knochenmark generierte DC wurden mit oder ohne CpG-ODN 1826 (6 µg/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 im Durchflusszytometer bestimmt. Der Isotyp ist durch die schwarze Linie markiert.

2.4 Tumormodelle

2.4.1 Mäuse und Haltungsbedingungen

Für alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden weibliche Balb/c Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen von der Firma *Harlan Winkelmann, Borcheln*, bezogen. Diese Inzuchtlinie ist bekannt für ihre ausgeprägte Th2-Antwort. Frühestens nach einer einwöchigen Aklimatisierung an die Umgebungsbedingungen wurde mit der Tumorinduktion begonnen. Die Haltung erfolgte in einem geschlossenen, den Hygieneanforderungen entsprechenden Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt. Die Betreuung einschließlich Fütterung mit Pelletfutter und Wasser *ad libidum* erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. In der Regel wurden maximal 6 Mäuse pro Käfig gehalten. Der zwölfstündige Hell/Dunkel-Rhythmus wurde durch eine Zeitschaltuhr geregelt und soweit möglich wurden Versuche nur tagsüber durchgeführt. Auch bei Langzeitversuchen wurden die Tiere spätestens ein Jahr nach Versuchsbeginn im Alter von 14 Monaten getötet. Die durchschnittliche Lebenserwartung weiblicher Balb/c Mäuse beträgt bei konventionellen Haltungsbedingungen 575 Tage (Storer 1966). Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsantrag Aktenzeichen 211-2531-7/2000).

2.4.2 Subkutanen Tumormodell

Zur Tumorinduktion wurden jeder Maus unter Inhalationsnarkose mit Isofluran 2×10^5 vitale Tumorzellen (C26-Kolonkarzinom- oder Renca-Nierenkarzinom-Zellen) in einem Volumen von 200 μl in eine oder beide Flanken injiziert. Dieses Anästhetikum wirkt ausreichend analgetisch und stark muskelrelaxierend, eine Antagonisierung war jedoch nicht notwendig, da die Tiere in der Regel bereits einige Sekunden nach der Injektion von selbst erwachten. Zur Induktion wurden noch nicht vollständig konfluent wachsende Zellen zunächst in der Kulturflasche zweimal mit kaltem zusatzfreiem HANKS Medium (*Biochrom AG, Berlin*) gewaschen, mit einem Zellschaber (*Sarstedt AG, Nümbrecht*) vorsichtig vom Flaschenboden gelöst und bei 350 g für 7 Minuten zentrifugiert. Die Verwendung von nicht supplementiertem HANKS Medium erfolgte, um möglicherweise im FCS-haltigen Medium befindliche immunmodulierende Substanzen aus der Injektionslösung zu entfernen und somit eine etwaige verfälschte

Reaktion des Immunsystems auf den Tumor zu verhindern. Durch die Verwendung von Trypanblau beim Zählen der Zellen war es möglich ausschließlich Zellen zur Tumorinduktion zu verwenden, die sich zu über 90 % als vital erwiesen hatten.

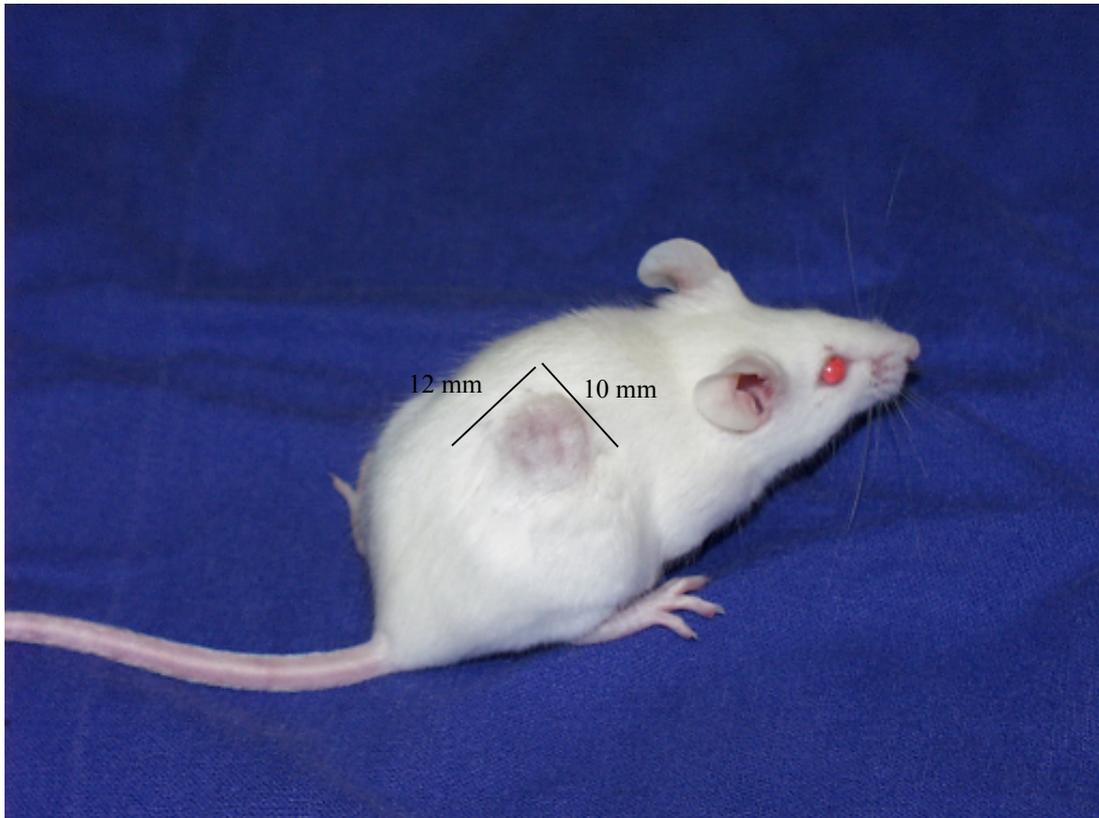


Abb. 2.3 Balb/c-Maus zwei Wochen nach subkutaner Induktion eines C26-Tumors

Die TumorgroÙe (Länge der Tumoren in mm x Breite der Tumoren in mm) wurde dreimal wöchentlich gemessen. Bei den verwendeten Tumoren war die Tiefenmessung durch die Größenentwicklung im Laufe der Therapie oft nicht durchführbar oder hätte zu einer starken Belastung der Versuchstiere geführt. Auf die Tiefenmessung und damit auf die Möglichkeit einer Volumenfeststellung wurde daher verzichtet.

Als Abbruchkriterium für einen Versuch galt eine Gewichtsabnahme der Mäuse auf unter 18 g, Verhaltensauffälligkeiten, sowie das Erreichen oder Überschreiten einer TumorgroÙe von 400 mm².

2.5 Isolation von Effektorzellen der Immunantwort

2.5.1 Präparation murinen Milzgewebes

Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran erfolgte das Töten des Tieres durch Exartikulation der Halswirbelsäule. Nach Fixierung der Maus und gründlicher äußerlicher Desinfektion mit EtOH (70 bis 80 %) erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes und die zügige Freipräparation sowie Entnahme der Milz unter sofortiger Überführung in eine sterile Kulturschale (*BD Falcon, Heidelberg*) auf Eis. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der *Laminar Air Flow* durchgeführt. Nach Zerteilung in kleine Stücke wurde die Milz durch ein Zellstrainersieb (70 µm Nylonsieb, *BD Falcon, Heidelberg*) gefiltert und nach gründlichem Nachspülen und Auffüllen mit Kulturmedium zentrifugiert (500 g, 5 Minuten, 4°C). Die Lyse der Erythrozyten erfolgte wie oben beschrieben mit 25 ml steril filtriertem OrthoMune®-Lyse-Puffer und 10-minütiger Inkubation auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation und vorsichtiger Resuspension wurden die Zellen in einer 1:100-Verdünnung mit Trypanblau gezählt.

2.5.2 Isolation von T-Lymphozyten aus Splenozyten

Im Anschluss an die unter 2.5.1 erwähnten Schritte folgte in bestimmten Fällen eine magnetische Zellseparation (*MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*), die es erlaubt, aus einer heterogenen Zellsuspension eine spezifische Art von Zellen zu isolieren. Um aus der Splenozytensuspension T-Lymphozyten zu gewinnen, wurden die gewaschenen und zentrifugierten Zellen zunächst in 90 µl MACS-Puffer (PBS, pH 7,2, supplementiert mit 0,5 % bovinem Serum-Albumin) pro 10^7 Gesamtzellen resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl MACS CD4 oder CD8 MicroBeads (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*) für 15 Minuten bei 6-12°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit der 10- bis 20-fachen Puffermenge gewaschen und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. In allen Experimenten wurden Säulen zur Positiv-Selektion verwendet, wobei die Auswahl der Größe (MS^+/RS^+ oder LS^+/VS^+) von der erwarteten positiven Zellzahl abhing. Nach Befeuchtung der Säule mit der für die jeweilige Größe empfohlenen Puffermenge erfolgte die Beschichtung mit der Zellsuspension in einem Volumen von 500 µl bis zu 10 ml je nach Zellzahl und Säulengröße. Die nicht

magnetisch markierten negativen Zellen konnten so ungehindert durchfließen, während die positiven Zellen zurückgehalten wurden. Nach dreimaligem Nachspülen der Säule mit Puffer wurde die Säule aus dem Separator entnommen und über einem passenden Sammelröhrchen mit einem Puffervolumen von 1 bis zu 5 ml mit Hilfe eines kleinen Kolbens durchgespült. Die auf diese Weise gewonnene Positivselektion wurde ebenso wie die von CD4- und/oder von CD8-positiven Zellen befreiten Splenozyten für die Untersuchung der Immunantwort *in vitro* verwendet. Nach Depletion blieb der Anteil der zurückgebliebenen CD4- und CD8-positiven Zellen stets unter 4 %.

2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

2.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen als Einzelzellsuspension mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls Streulicht- sowie Fluoreszenzsignale analysiert. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer (*FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg*) ist mit einem luftgekühlten Argonionen-Laser ausgestattet, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm mit einer Leistung von 15 mW emittiert. Als Messkammer dient dabei eine von Trägerflüssigkeit durchströmte Quarzküvette. Dadurch, dass der Zellstrom durch eine Kapillare fließt und stark beschleunigt wird, ist gewährleistet, daß die Zellen einzeln und in ausreichendem Abstand zueinander am Messpunkt vorbeifließen. Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter, FSC*) gibt dabei Aufschluss über die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter, SSC*) korreliert mit der Granularität der Zellen. Die gewünschten Zellpopulationen wurden anhand dieser Kriterien so eingestellt, daß sie einerseits deutlich abgrenzbar waren und andererseits tote Zellen und Zellfragmente, die sehr geringe FSC-Werte aufweisen, mit Hilfe eines bestimmten Aufnahme Fensters ausgeschlossen werden konnten. Der Laserstrahl regt die verwendeten Fluorochrome zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse

gesammelt werden. Bandpassfilter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. Die jeweilige Lichtemission wird von diesen Photodetektoren registriert und in elektrische Signale (Einheit Volt) umgewandelt. So können die verschiedenen Signale bei der Mehrfarbenanalyse (bis zu 4 Farben) getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden (Tabelle). Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle bzw. gebundener intrazellulärer Strukturen.

Kanal / Bandpassfilter	Farbe	Fluoreszenzfarbstoffe
Fl1 / 525 nm	grün	Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)
Fl2 / 575 nm	rot	R-Phycoerythrin (PE)
Fl3 / 650 nm	violett	Propidium Iodid (PI), Cy-Chrome™, Per-Cp
Fl4 / 660 nm	violett	Allophycocyanin (APC)

Tabelle: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Bei jeder Messung wurden im Durchschnitt 1×10^4 Zellen aufgenommen und anschließend mit dem FACS-Analyse Programm *Cell Quest* ausgewertet.

2.6.2 FACS-Analyse von Oberflächenantigenen

Für FACS-Analysen wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l Medium resuspendiert und daraufhin 30 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss mit jeweils 5 μ l FITC- (Fluoreszein-Isothiozyanat), PE- (Phycoerythrin), RPE- oder CyChrome™- (Konjugat aus Phycoerythrin und einem 1,5 kD Zyanid) gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Es wurden FITC-gefärbte Antikörper gegen CD4, CD8a, CD86, Ly6G und CD54, PE-gefärbte AK gegen CD3, CD45R, DX5 (*anti-mouse Pan-NK cells*), RPE-gefärbte AK gegen CD80 und MHC II, sowie CyChrome™-gefärbte AK gegen CD3 und CD4 (*BD Pharmingen, Heidelberg; Southern Biotechnology, Birmingham, USA*) verwendet. Als Kontrollfärbung diente bei jeder Messreihe ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter isotypgleicher IgG (IgG2B). Eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz ließ sich durch Zugabe von 10 % Rattenserum (*Sigma, München*) vor der Färbung deutlich reduzieren.

In einigen Versuchen wurde zusätzlich unmittelbar vor der Messung zur Anfärbung toter Zellen TO-PRO-3-iodide® (*Molecular Probes, Eugene, Oregon; USA*) zugegeben.

2.7 IFN- γ Bestimmung im Serum über ELISA

Die ELISA- (*enzyme-linked immunosorbent assay, OptEIA™, Pharmingen*) Technik wurde in dieser Arbeit zum spezifischen Nachweis von IFN- γ im Mäuseserum verwandt. Zur Gewinnung von Serum wurde Blut von heparinisierten Mäusen bei 4°C mit 350 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde zur Abtrennung störender Zellfragmente und Proteinaggregate für weitere 30 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Zur Analyse wurden zunächst 96-well-Flachbodenplatten mit 100 μ l einer den Anti-Maus IFN- γ -Antikörper enthaltenden Lösung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden sorgfältig mit Waschpuffer gewaschen und mit PBS plus 10 % FCS für 1 Stunde geblockt. Pro Well wurden 100 μ l der unterschiedlichen Konzentrationen der Standardkurve und unverdünntes Serum aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Platten mit 100 μ l biotinyliertem anti-Maus IFN- γ -Antikörper gefolgt von Avidin-Meerrettichperoxidase inkubiert. Die Platten wurden mehrmals gewaschen, 100 μ l/well Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, bereits gebrauchsfertig mitgeliefert) zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 50 μ l 1 M H₃PO₄ gestoppt und die Absorption mit einem ELISA-Reader ausgewertet.

2.8 Analyse der lytischen Aktivität

2.8.1 Färbung der Zielzellen mit CFSE

Ein Großteil dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe einer nicht-radioaktiven Methode, die lytische Aktivität von Splenozyten bzw. isolierten T-Lymphozyten gegenüber spezifischen Tumorzellen zu untersuchen. Dazu war es zunächst notwendig die Zielzellen (C26- oder Renca-Tumorzellen) zu markieren, um diese hinterher von den Effektorzellen unterscheiden zu können. In Vorversuchen hatte sich dafür der Farbstoff CFSE (*5(-and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyle ester, Molecular Probes*

Eugene, Oregon) als geeignet herausgestellt. Die Färbung beruht darauf, daß eine bestimmte Menge des Farbstoffs zu den Zielzellen gegeben wird und dieser dann irreversibel an intrazelluläre Proteine bindet. Diese Eigenschaft macht man sich häufig zunutze, wenn man CFSE einsetzt, um das Proliferationsverhalten bestimmter Zellen zu untersuchen. Teilen sich Zellen, so wird auch der Farbstoff gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt. Untersucht man angefärbte Zellen im Durchflusszytometer, so strahlen sich teilende Zellen weniger intensiv als solche, die nicht proliferieren. Zu Beginn der Färbung wurden noch nicht konfluent wachsende adhärenente Tumorzellen mit 2 ml Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst und anschließend zweimal in 50 ml 0,9 % ige NaCl (*Baxter, London, GB*) gewaschen. Die maximal mögliche Zellzahl betrug dabei 8 bis 10 Millionen für C26 und 4 bis 6 Millionen für Renca, da diese größer waren und stärker zur Verklumpung neigten. Zur Herstellung einer 100 µM CFSE-Lösung wurden 5 µl einer 5 mM Stammlösung mit 245 µl NaCl sehr gut vermischt. Diese Lösung wurde in einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt. Hierzu wurden die gewaschenen Zellen in 360 µl NaCl resuspendiert und mit 40 µl der zuvor hergestellten CFSE-Lösung sehr gründlich vermischt. Nach sofortigem Transferieren in ein sauberes 50 ml Röhrchen erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Daraufhin wurde die Reaktion mit 2 ml kaltem Vollmedium abgestoppt, mit NaCl auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und die gefärbten Zellen zweimal gewaschen (Zentrifugation bei 400 g, 4°C für 6 Minuten).

2.8.2 Evaluierung der lytischen Aktivität von murinen Splenozyten im FACS

Als Effektorzellen dienten je nach Fragestellung entweder vollständige Milzsuspensionen oder Splenozyten, bei denen zuvor CD8⁺-, CD4⁺- oder beide Zellfraktionen durch MACS depletiert worden waren. Verglichen wurden dabei zunächst die Zellen von mit CpG-ODN behandelten Tumormäusen, von mit CpG-ODN behandelten tumorfreien Mäusen oder von tumortragenden unbehandelten Mäusen mit denen einer unbehandelten tumorfreien Kontrollgruppe. Auf 48-well Flachbodenplatten wurden 25.000 CFSE-gefärbte C26- oder Renca-Tumorzellen pro well in einem Verhältnis gegenüber Effektorzellen von 1:50, 1:25 und 1:12,5 in 1 ml Vollmedium für 20 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zum Ernten möglichst aller Zellen erfolgte ein mehrmaliges vorsichtiges Spülen der wells mit kaltem PBS. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst wenige Zellen mechanisch zu beschädigen. Nach jedem

Erntevorgang wurden die jeweiligen wells mikroskopisch auf zurückgebliebene adhärenente Zellen geprüft und gegebenenfalls der Spülvorgang wiederholt. Unmittelbar vor der Messung im FACS wurde zu jeder Probe TO-PRO-3-iodide[®] hinzugegeben. Mit diesem Farbstoff war es möglich tote Zellen zu detektieren, da er an freiliegende DNA-Fragmente bindet. Dadurch, dass die Zielzellen mit CFSE markiert worden waren und sich außerdem in der Zellgröße deutlich unterschieden, ließen sie sich problemlos von den Effektorzellen abtrennen. Als Messgröße dienten CFSE-TO-PRO-doppelt-positive Zellen. Diese Population war sehr deutlich vom Rest abzugrenzen und entsprach dem durch aktivierte Effektorzellen lysierten Anteil an spezifischen Tumorzellen. Die lytische Aktivität wurde entweder in Absolutwerten (%) angegeben oder als Differenz zwischen lysierten Zellen in der behandelten Gruppe und in der Kontrollgruppe berechnet. Als Kontrollgruppe dienten jeweils tumorfreie unbehandelte Mäuse, deren Effektorzellen unter denselben Bedingungen mit gefärbten Tumorzellen inkubiert wurden. Um eine zu große Rate spontan zugrundegehender Tumorzellen auszuschließen, wurden in jedem Versuchsansatz Zielzellen alleine unter gleichen Bedingungen inkubiert und nach 20 Stunden die spontan toten Zellen gemessen. Dieser Anteil blieb in allen Versuchen unter 10 % der Ausgangszellzahl, so dass eine relevante Toxizität des CFSE-Farbstoffs ausgeschlossen werden konnte. Um die Entwicklung einer Tumorantigen-spezifischen Immunantwort zu untersuchen, wurden in einem Teil dieser Arbeit Splenozyten zunächst *in vitro* mit bestrahlten Tumorzellen kokultiviert. Dazu wurden in 12-well Platten 10 Millionen Splenozyten pro well zusammen mit 1 Million bestrahlten Tumorzellen in 3 ml Vollmedium substituiert mit 10 IU/ml IL-2 für 5 bis 6 Tage inkubiert. Nach Zugabe von 1×10^5 CFSE-gefärbten Tumorzellen wurden nach 20 Stunden die lysierten Tumorzellen im Durchflusszytometer gemessen.

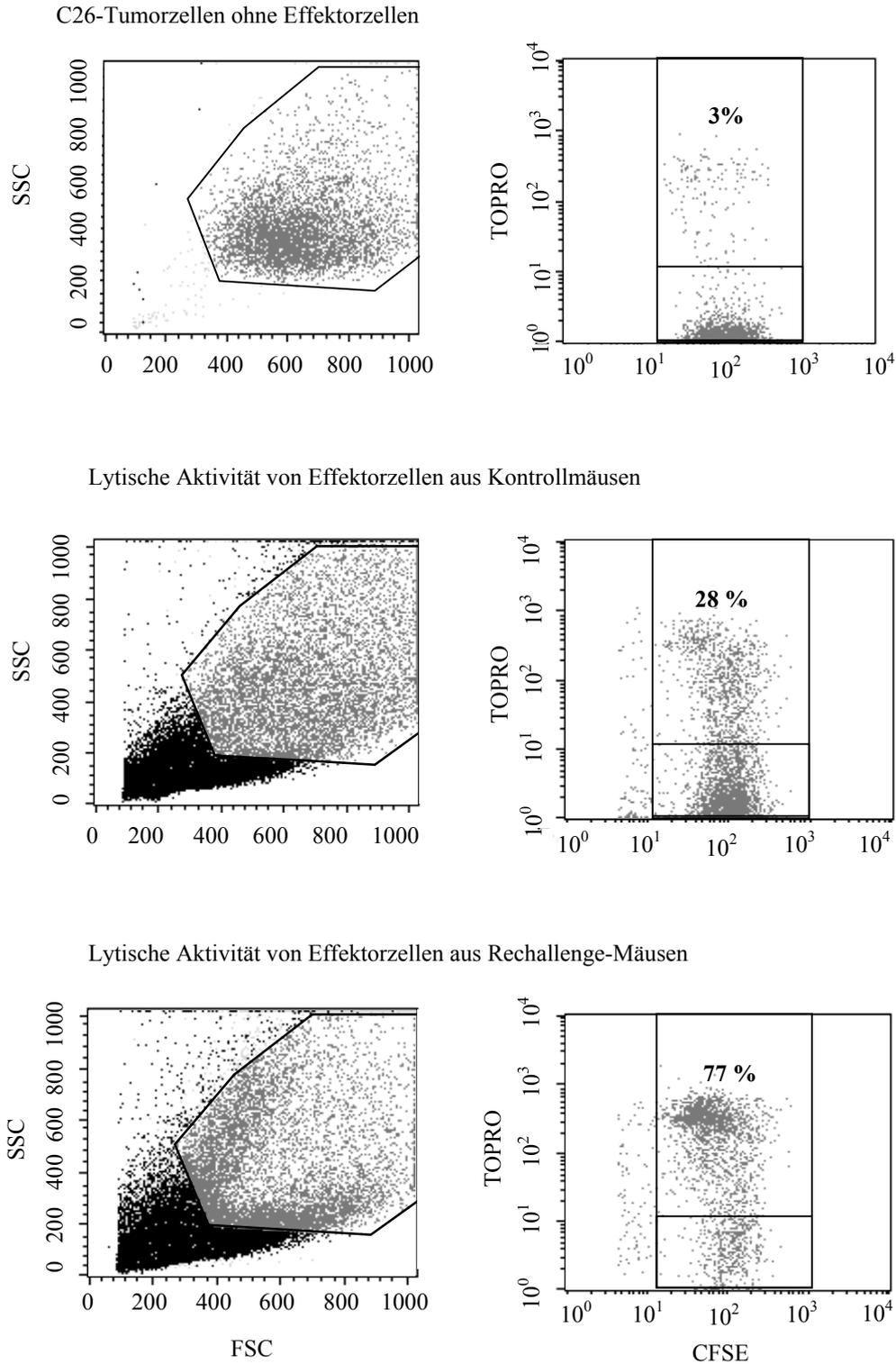


Abb. 2.4 Analyse der lytischen Aktivität im Durchflusszytometer

Nachdem zunächst ein *Gate* auf lebende Zellen eingestellt worden war, wurden die lysierten Tumorzellen aus dieser Population in % TO-PRO-CFSE-doppelt positive Zellen gemessen. Den Hintergrund machten spontan tote Tumorzellen aus, die jedes Mal unter 10 % lagen (obere Reihe). Verglichen wurde beispielsweise die Aktivität von Effektorzellen aus Kontrollmäusen (mittlere Reihe) mit der aus Rechallenge-Mäusen (untere Reihe). Das Verhältnis von Tumor- zu Effektorzellen betrug in der gezeigten Abbildung beispielhaft 1:25.

2.8.3 Analyse der lytischen Aktivität im ^{51}Cr -Release-Assay

Durch diese klassische Methode lässt sich ebenfalls die Lyse von Zellen quantifizieren. Dabei wird radioaktives ^{51}Cr in die Zielzellen eingebracht, die dieses dann freisetzen sobald sie lysiert werden bzw. die Zellmembran ihre Intaktheit verliert. Die im Überstand messbare Radioaktivität macht damit indirekt eine Aussage über die Anzahl der toten Zellen. Für einen solchen Ansatz wurden zunächst die Effektorzellen gewaschen und auf eine Konzentration von 9×10^5 Zellen/ml gebracht. Ausgehend von 3.000 geplanten Zielzellen wurden jeweils drei verschiedene Ansätze mit einem Verhältnis von Effektorzellen: Zielzellen von 30:1, 10:1 und 3:1 auf 96-well Platten pipettiert. Hierbei wurden stets Triplikate angefertigt. Zur Vorbereitung der Zielzellen wurden noch nicht konfluent wachsende C26-Tumorzellen aus einer 250 ml Kulturflasche mit Trypsin-EDTA abgelöst, gewaschen und in 10 μl reinem FCS ins Radioaktivlabor transportiert. Unter Einhaltung der Sicherheitsvorschriften wurden die Tumorzellen mit 50 μl ^{51}Cr in einer Bleikiste für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit jeweils 5 ml Vollmedium mehrere Male gewaschen (Zentrifugation bei 400 g, 4°C, 5 Minuten). Anschließend wurden die markierten Zellen gezählt und für die gewünschte Zellzahl von 3000 Zellen/well in einem passenden Volumen verdünnt. Die Inkubationsdauer zusammen mit den Effektorzellen (meist Gesamtsplenozyten) betrug je nach Versuchsansatz zwischen 12 und 48 Stunden. Zuletzt wurde 100 μl des Überstandes abgenommen und im *PACKARD COBRA II -Auto Gamma Counter* analysiert. Hierbei muß jedoch erwähnt werden, dass sich diese Methode nach mehreren Versuchsabwandlungen als für die verwendete Tumorzelllinie nicht geeignet herausstellte, da die spontane Chrom-Freisetzung und damit die Hintergrundradioaktivität zu hoch war. Die benötigte Bandbreite zwischen spontaner und maximaler Chrom-Freisetzung war damit nicht gegeben.

2.9 Depletion von CD4- und CD8-positiven Zellen *in vivo*

Den Mäusen wurden entweder je 1 mg des anti-CD4 mAB GK1.4 oder des anti-CD8 mAB RmCD8 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. R. Mocikat, GSF München) intraperitoneal injiziert. Hierzu wurden einen Tag vor Therapiebeginn 500 µg und einen Tag nach Therapiebeginn und danach dreimal alle 5 Tage 100 µg mAB in 200 µl sterilem PBS verabreicht. Die Depletion wurde durch Untersuchung von Splenozyten in der Durchflusszytometrie bestätigt. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Häufigkeit der CD8-positiven DC-Untereinheit in der murinen Milz durch den verwendeten Antikörper nicht beeinflusst wurde. Veränderungen in der Reaktion auf eine Tumorthherapie wurden durch Protokollierung der Tumorgröße (Fläche) während des Beobachtungszeitraums erfasst.

2.10 Phasenkontrastmikroskopie

Dieses Mikroskopierverfahren wurde zur routinemäßigen optischen Darstellung von Zellen und Zellkulturen verwandt. Tritt Licht durch ein optisch dichteres Medium (z.B. Plasmamembranen, Zellkerne) wird es in seiner Ausbreitungsgeschwindigkeit gehemmt. Dadurch entstehen Gang- und Phasenunterschiede zwischen den einzelnen Lichtwellen. In den Strahlengang eingebrachte Polarisationsfilter wandeln diese Gangunterschiede in Helligkeitsdifferenzen um, und führen damit zu einer kontrastreichen Darstellung der beobachteten Strukturen.

2.11 Statistik

Um zu untersuchen, ob sich die mittlere Tumorgröße bzw. Lyse der Tumorzellen in den verschiedenen Behandlungsgruppen unterscheidet, wurden zweiseitige Student's t-Tests für unabhängige Stichproben berechnet. Dabei gingen wir davon aus, dass die Daten in den Populationen normalverteilt sind, mit unbekannter aber gleicher Varianz (Varianzhomogenität). Als statistisch signifikante Ergebnisse wurden p-Werte mit $p < 0,05$ gewertet. Die statistische Analyse erfolgte im Excel-Programm (Macintosh Edition 98). Fehlerbalken wurden mit \pm SEM (*standard error of mean*) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 CpG-ODN als Therapie im subkutanen Tumormodell

3.1.1 CpG-ODN als Monotherapie im prophylaktischen Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die Gabe von CpG-ODN vor Tumorchallenge *in vivo* einen anti-Tumoreffekt aufweist. In diesem sogenannten prophylaktischen Ansatz erhielten Mäuse 7 Tage vor Induktion eines C26-Tumors eine subkutane Injektion mit CpG-ODN 1826 (100 µg). Hierbei wurde CpG-ODN auf derselben Seite wie anschließend die Tumorzellen injiziert. CpG-ODN alleine verzögerte das Tumorwachstum im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe ($p=0,05$ an Tag 21), letztendlich entwickelten aber alle Mäuse einen Tumor, an dem sie auch verstarben. Im Gegensatz hierzu zeigte das Kontroll-ODN 1982 keinen Effekt ($p=0,61$ an Tag 21). Beide ODN stimmen in Länge und Basengehalt nahezu überein, die zwei CG-Dinukleotide wurden bei der Kontrolle aber durch andere Basen ersetzt. Durch eine Koinjektion von CpG-ODN 1826 mit bestrahlten C26-Zellen konnte die anti-Tumor-Aktivität im Vergleich zur CpG-ODN-Monotherapie noch verstärkt werden ($p=0,001$ an Tag 21, Abb. 3.1).

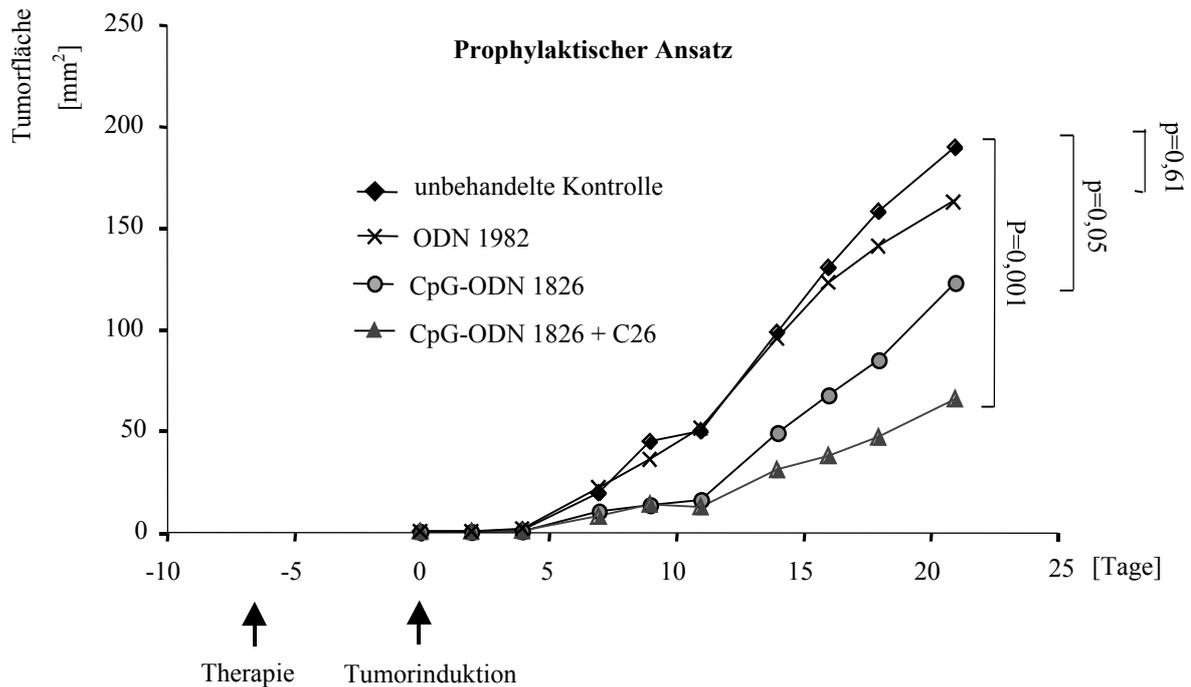


Abb. 3.1 Prophylaktische Vakzinierung mit CpG-ODN 1826

Mäuse blieben entweder unbehandelt (◆, n=10) oder erhielten 7 Tage vor Tumorinduktion eine ipsilaterale Injektion mit CpG-ODN 1826 (100 µg; ●, n=10), eine Koinjektion von CpG-ODN 1826 mit bestrahlten C26-Zellen (▲, n=10) oder mit dem Kontroll-ODN 1982 (100 µg; ×, n=5). Die mittlere Tumorgröße (mm²) ist bis Tag 21 aufgetragen.

3.1.2 Abstoßung etablierter Tumoren im therapeutischen Modell

Da eine prophylaktische Vakzinierung gegen Tumoren beim Menschen nicht naheliegt, wurde als nächstes CpG-ODN als Therapieform gegen bereits etablierte Tumoren untersucht. Im ersten therapeutischen Ansatz wurde dazu den Tieren, beginnend 5 Tage nach Induktion eines subkutanen C26-Tumors, wöchentlich 100 µg CpG-ODN 1826 injiziert. Erfolgte die Injektion in den Tumorrandbereich, so kam es bei 5 von 6 Mäusen zu einer kompletten Abstoßung des Tumors, während in der unbehandelten Kontrollgruppe alle 5 Tiere am Tumor zugrundegeringen (p < 0,001 an Tag 26, an dem die erste Maus der Kontrollgruppe verstarb). Ein wachsender Tumor in unmittelbarer Nachbarschaft der Injektion stellte sich bei einer Monotherapie mit CpG-ODN als zwingend notwendig heraus und konnte nicht durch eine Koinjektion mit Antigen in

Form bestrahlter Tumorzellen ersetzt werden (nicht in Abbildung). Eine CpG-Injektion in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke führte nur zu einer leichten Reduktion des Tumorwachstums ($p=0,09$ an Tag 26). Um eventuelle CG-unabhängige Effekte auszuschließen, wurde bei einer Gruppe von Mäusen das zum CpG-ODN 1826 gehörige Kontroll-Oligonukleotid 1982 eingesetzt. Wie erwartet blieb der mit CpG-ODN 1826 beobachtete Therapieeffekt bei einer peritumoralen Injektion von ODN 1982 aus ($p=0,40$ an Tag 26) (Abb. 3.2)

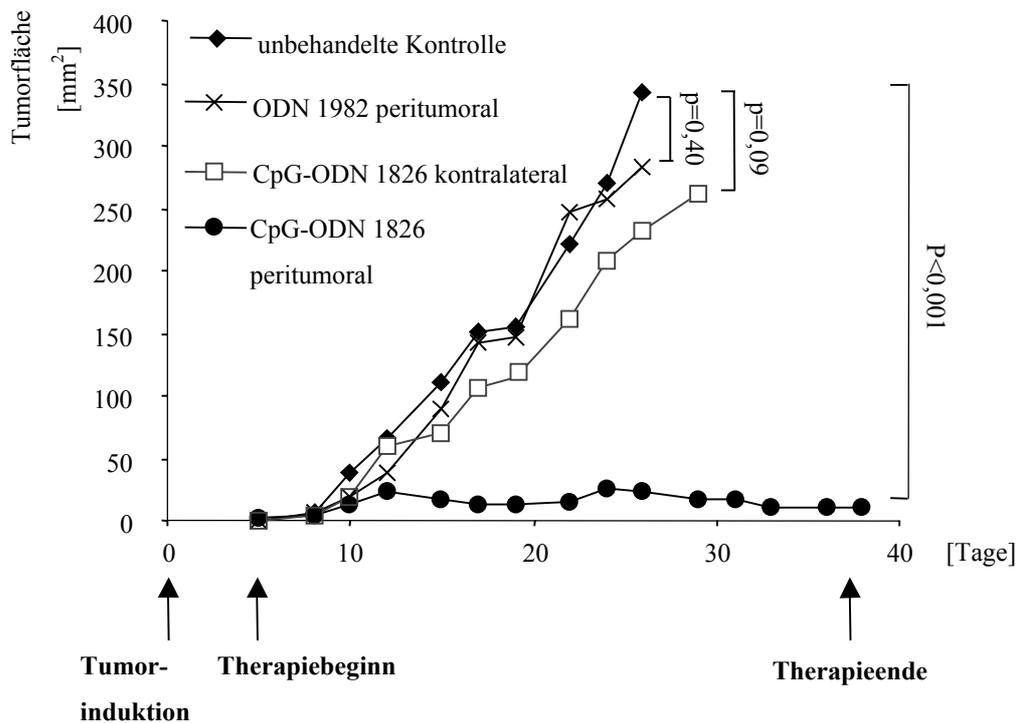


Abb. 3.2 Abstoßung etablierter Tumoren im therapeutischen Modell

Mäusen wurden C26-Tumoren an Tag 0 induziert. Beginnend an Tag 5 wurden die Tiere wöchentlich mit jeweils 100 µg CpG-ODN 1826 bzw. mit dem Kontroll-ODN 1982 behandelt. Die durchschnittlichen Tumorgrößen jeder Gruppe sind entweder bis zum Tod der ersten Maus oder bis zum Therapieende an Tag 38 aufgetragen. Dabei erfolgte die Injektion von CpG-ODN 1826 entweder in den Randbereich des Tumors (●, n=6) oder in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke (□, n=6). Das ODN 1982 wurde nur peritumoral injiziert (×, n=5). Als Kontrolle diente eine Gruppe unbehandelter Mäuse (◆, n=5).

3.1.3 Untersuchung „humaner“ CpG-Oligonukleotide

Es sind deutliche Unterschiede bekannt zwischen CpG-ODN, die im murinen und solchen, die im humanen System wirksam sind. In einer Studie dieser Arbeit wurden deshalb die Effekte potenter humaner CpG-ODN unterschiedlicher Wirkungsschwerpunkte (CpG-ODN 2216 sowie CpG-ODN 2006) im murinen Tumormodell untersucht. Hierbei zeigte eine peritumorale Gabe von CpG-ODN 2006 bei gleichem Therapieschema ähnliche Erfolge wie das murine CpG-ODN 1826 ($p=0,09$ an Tag 31, da Stichprobenumfang mit $n=4$ sehr klein). Auch hier wurde der therapeutische Effekt durch die kontralaterale Injektion aufgehoben und führte sogar zu einer Lebensverkürzung gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine tägliche peritumorale Therapie mit CpG-ODN 2216 reichte zwar zunächst aus, um das Tumorwachstum zu kontrollieren, die Mäuse verstarben nach Therapieende aber am erneut wachsenden Tumor. Dieses ODN ist für eine besonders starke NK-Zell-Aktivierung bekannt, die zunächst eine Wachstumskontrolle ermöglicht. Diese Wachstumsverlangsamung blieb dagegen aus, wenn die tägliche Therapie auf der vom Tumor entfernt liegenden Seite erfolgte. In dieser Gruppe kam es ebenfalls zu einer verkürzten Überlebenszeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 3.3).

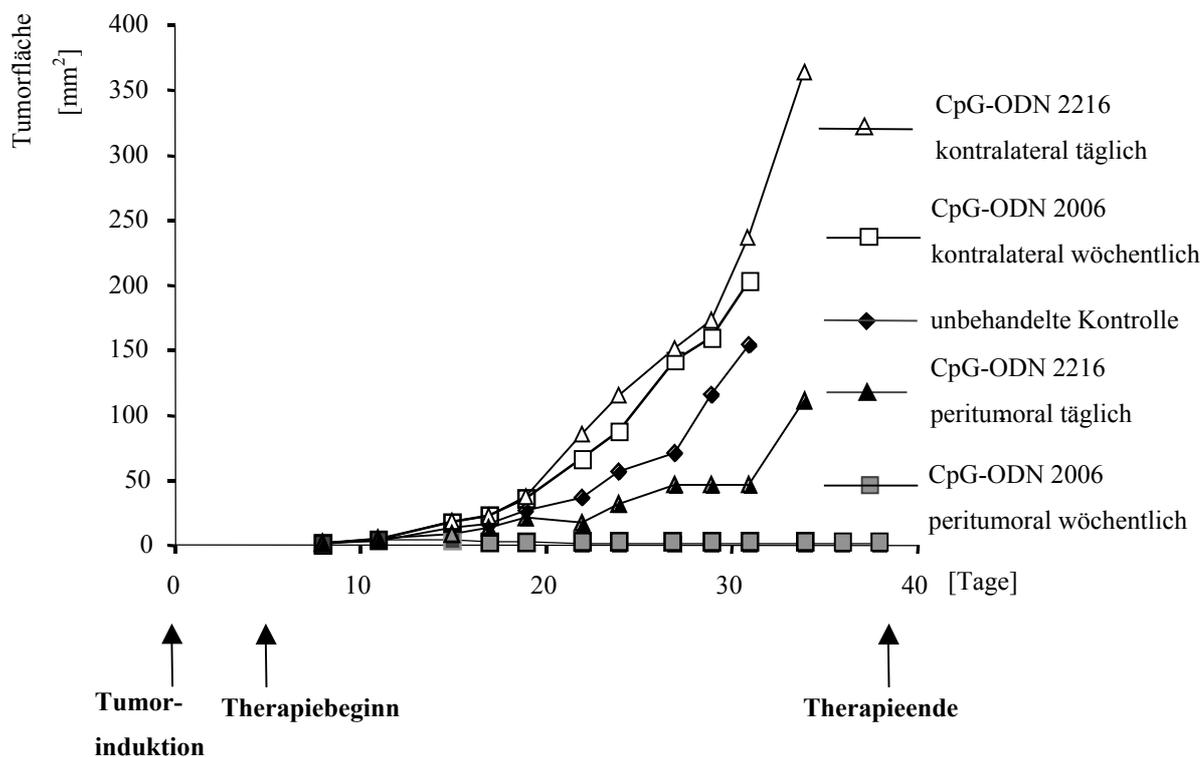


Abb. 3.3 Wirkung „humaner“ ODN im murinen System

Mäusen wurden C26-Tumoren an Tag 0 induziert. Beginnend an Tag 5 wurden die Tiere, ausgenommen die Kontrollgruppe (◆, n=8), entweder täglich mit jeweils 100 µg CpG-ODN 2216 peritumoral (▲, n=4) oder kontralateral (△, n=4) oder wöchentlich mit jeweils 100 µg CpG-ODN 2006 peritumoral (■, n=4) oder kontralateral (□, n=4.) behandelt.

In einer weiteren Studie wurde der therapeutische Effekt einer Kombination aus CpG-ODN 2216 - bekannt für seine starke NK-Zell-Aktivierung - mit CpG-ODN 2006 untersucht. Begonnen wurde mit einer mehrmaligen Gabe von CpG-ODN 2216, was zu einer Aktivierung von unspezifischen NK-Zellen führen sollte, gefolgt von einer wiederholten Behandlung mit CpG-ODN 2006. Dieses Therapieschema zeigte jedoch auch unter Verwendung der entsprechenden murinen Motive CpG-ODN 1585 bzw. CpG-ODN 1826 keinerlei Vorteil gegenüber einer Monotherapie mit CpG-ODN 1826 oder 2006 (keine Abbildung).

3.1.4 Hemmung des Tumorwachstums nach Verschiebung des Therapiebeginns

Bei den ersten Versuchen mit Therapiebeginn an Tag 5 nach Tumorinduktion handelte es sich um gerade palpable Tumoren mit einer Fläche kleiner 10 mm^2 . Unter peritumoraler Therapie mit CpG-ODN 1826, begonnen an Tag 5 nach Tumorinduktion, kam es bei 9 von 11 Mäusen zu einer kompletten Tumorabstoßung. Der Unterschied der Tumorgröße im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war hierbei an Tag 22, beim Tod der ersten Maus in der Kontrollgruppe, sehr deutlich ($p < 0,001$). Der Therapieerfolg blieb wie erwartet nach Injektion des Kontroll-ODN 1982 aus ($p = 0,55$ an Tag 22). Uns interessierte nun, wie sich die peritumorale Therapie in der Behandlung größerer Tumoren verhielt, also ob es möglich war, den Therapiebeginn auf einen späteren Zeitpunkt nach Tumorinduktion zu verschieben. Beginnend an Tag 10 nach Tumorinduktion, zeigte sich immer noch eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums ($p < 0,001$ an Tag 22), wobei 5 Mäuse den Tumor vollständig abstießen. Die durchschnittliche Tumorgröße betrug hier zu Beginn der Therapie 23 mm^2 und stieg bei den Tieren, die den Tumor abstießen, während der Therapie auf durchschnittlich 41 mm^2 (maximal 81 mm^2) an, bevor die Tumorgröße wieder zurückging (Abb. 3.4 A). Der beeindruckende Effekt der peritumoralen Therapie wird deutlich, wenn man die Überlebenszeiten der einzelnen Mäuse nach Therapieende an Tag 38 betrachtet. So überlebten in der Gruppe, die den Tumor unter peritumoraler Therapie mit CpG-ODN 1826 mit Therapiebeginn an Tag 5 nach Tumorinduktion abgestoßen hatte, 9 von 11 Mäusen über Tag 100 hinaus, während in der unbehandelten Kontrollgruppe alle 11 Tiere am Tumor zugrundegingen. Die Injektion mit dem Kontroll-ODN 1982 brachte keinen Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollgruppe. Nach Verschiebung des Therapiebeginns auf Tag 10 überlebten immernoch 5 von 11 Mäusen über Tag 100 hinaus (Abb. 3.4 B).

A.

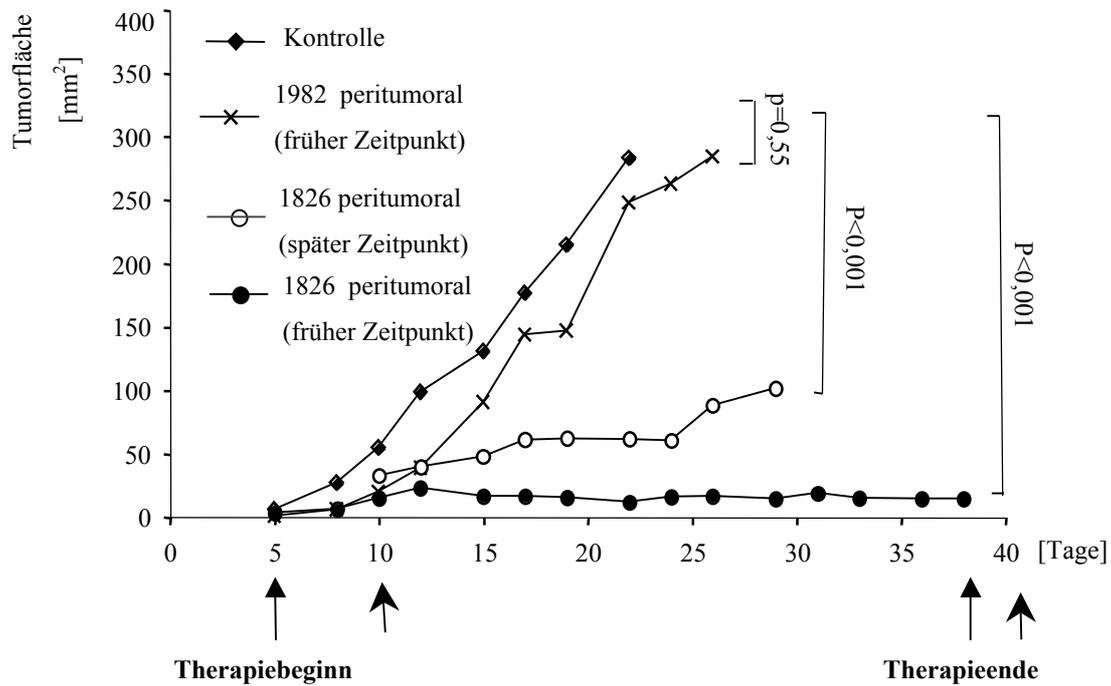


Abb. 3.4 A. Tumorwachstum von Mäusen nach peritumoraler CpG-ODN-Therapie begonnen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumorinduktion

A. Die Tumorinduktion erfolgte an Tag 0. Wöchentliche peritumorale CpG-ODN-Injektionen wurde an Tag 5 (●, n=11) oder alternativ an Tag 10 (○, n=11) begonnen und bis Tag 38 bzw. Tag 43 fortgesetzt. Die Injektion des Kontroll-ODN 1982 erfolgte ebenfalls peritumoral beginnend an Tag 5 (×, n=5). Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse (◆, n=11). Die durchschnittliche Tumorgöße ist bis zum Tod der ersten Maus einer Gruppe bzw. bis zum Therapieende an Tag 38 bzw. 43 dargestellt. Die langen Pfeile markieren Start und Ende der frühen Therapie, die kurzen Pfeile die späte Therapie.

B.

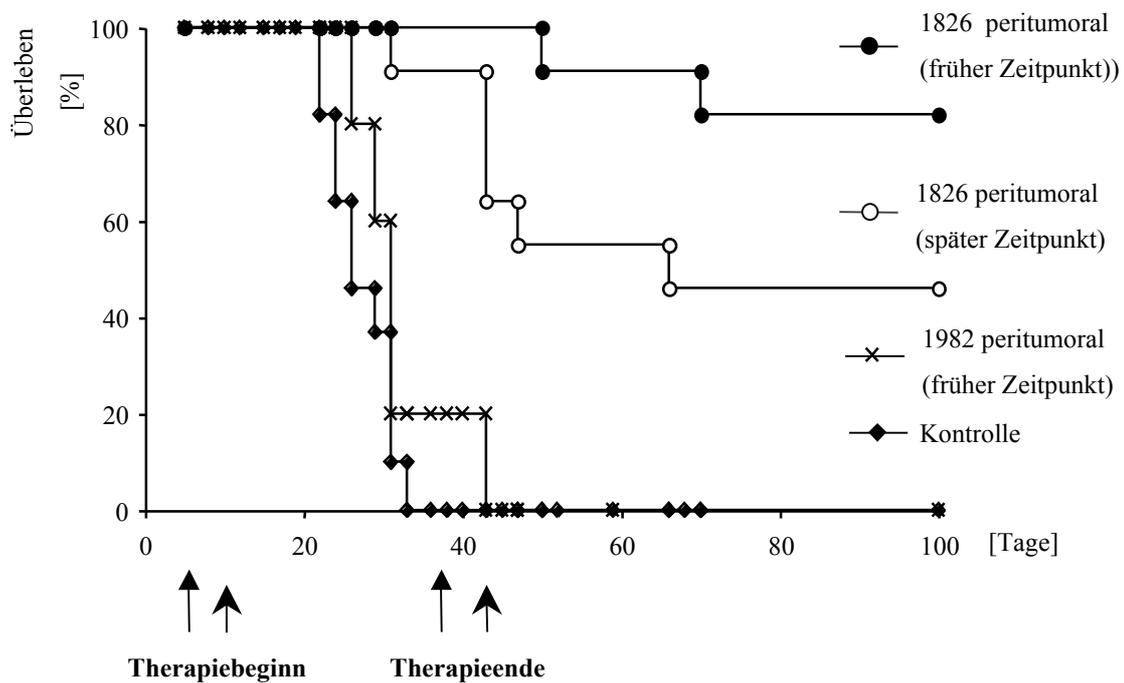


Abb. 3.4 B. Überleben von Mäusen nach peritumoraler CpG-ODN-Therapie begonnen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumorinduktion

B. Kaplan-Meier-Kurve derselben Gruppen wie unter A. beschrieben. Das Überleben der Tiere wurde bis Tag 100 festgehalten. Mäuse, die bis Tag 100 überlebten blieben für mindestens 6 Monate (Ende der Studie) rezidivfrei.

3.2 Untersuchung der lytischen Aktivität muriner Splenozyten *in vitro*

3.2.1 Erhöhung der lytischen Aktivität durch CpG-ODN

Um das Zusammenspiel zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem, bzw. die Entwicklung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort näher zu untersuchen, wurde die lytische Aktivität von Splenozyten gegenüber C26-Tumorzellen *in vitro* getestet. Als Kontrolle dienten jeweils Milzzellen von tumorfreien altersentsprechenden Mäusen, deren Tumorzelllyse (% tote = TO-PRO-3/CFSE doppelt positive Zellen) mit verschiedenen anderen Gruppen verglichen wurde. Splenozyten von tumortragenden Mäusen, die keine Behandlung mit CpG-ODN erhalten hatten, zeigten dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe keine höhere Lyse von C26-Zellen (nicht in Abbildung).

Dagegen wiesen Splenozyten von Tumormäusen während peritumorale Therapie mit CpG-ODN 1826 eine deutlich höhere lytische Aktivität gegenüber den spezifischen Zielzellen auf. Eine ähnlich hohe Aktivität fand sich jedoch auch bei Mäusen, die keinen Tumor induziert bekommen hatten, aber genauso wöchentliche subkutane Injektionen von CpG-ODN erhielten (Abb. 3.5).

3.2.2 Antigen-unspezifische Tumorzelllyse zu Beginn der Therapie

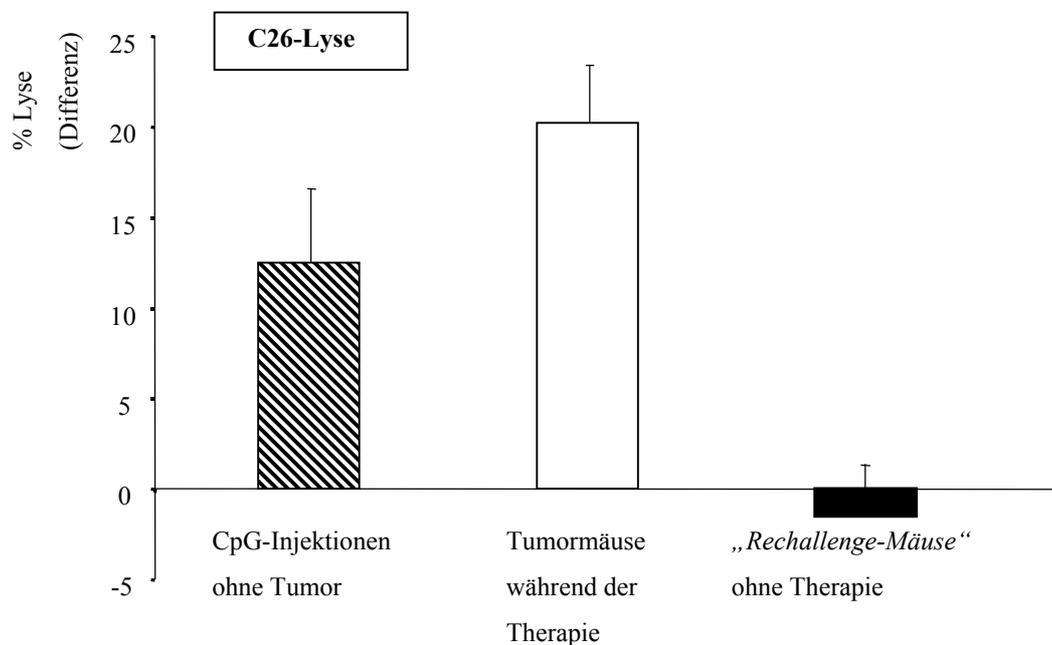
Die Effektivität einer peritumoralen Therapie mit CpG-ODN 1826 war nicht auf eine bestimmte Tumorart beschränkt. So wurde in von dieser Arbeit unabhängigen Studien bei Tieren, die an der einen Flanke einen C26-Tumor und an der anderen einen Renca-Tumor trugen, bei alleiniger Behandlung des C26-Tumors auch in Bezug auf den kontralateral liegenden Renca-Tumor eine Wachstumshemmung und somit eine Lebensverlängerung beobachtet. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass zu Therapiebeginn unspezifische Zellen des angeborenen Immunsystems eine bedeutende Rolle spielten. Untersuchungen *in vitro* gaben weitere Hinweise auf eine durch CpG-ODN induzierte Aktivierung des unspezifischen angeborenen Immunsystems. So zeigten Splenozyten aus tumorfreien Mäusen, die mit CpG-ODN 1826 behandelt wurden, eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen höhere Lyse von C26- ebenso wie von Renca-Tumorzellen (Abb. 3.5). Milzzellen von Mäusen, die einen C26-Tumor trugen wiesen während peritumorale Therapie mit CpG-ODN 1826 neben der lytischen Aktivität gegenüber den spezifischen C26-Tumorzellen auch eine im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöhte Lyse von Renca-Zellen auf.

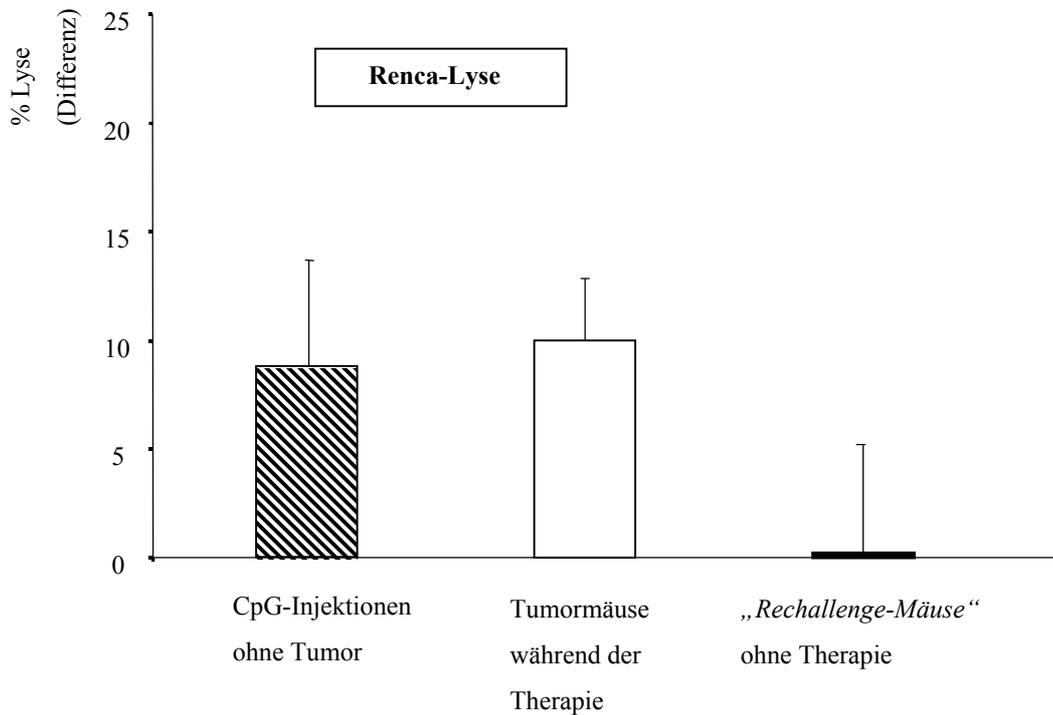
Wurden zum anderen Splenozyten von Mäusen untersucht, die den Tumor aufgrund einer Therapie mit CpG-ODN zurückgebildet hatten und nach 2 bis 3 Monaten erneut Tumorzellen derselben Art injiziert bekamen („*Rechallenge*“), so konnte eine spontane Tumorzelllyse weder gegenüber C26- noch gegenüber Renca-Zellen festgestellt werden. Diese Tiere hatten für einen Zeitraum von mindestens 2 Monaten keine Injektionen mit CpG-ODN erhalten. Eine direkte lytische Aktivität von Splenozyten gegenüber C26-Zellen kam also nur vor bei Mäusen, die zum Zeitpunkt der Milzpräparation wöchentlich mit CpG-ODN therapiert wurden. Diese Aktivität war dabei unabhängig von einer vorangegangenen Exposition gegenüber Tumorantigen, was gegen eine Lyse

durch antigenspezifische T-Zellen und für eine Lyse von Tumorzellen durch CpG-ODN-aktivierte Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sprach.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch CpG-ODN induzierte Immunantwort, die zur Abstoßung des C26-Tumors führt, zu Beginn einen unspezifischen Teil mit einschließt, der eine Teilaktivität gegenüber einem andersartigen Tumor aufweist. Für diese Erklärung sprach auch eine Erhöhung der IFN- γ -Konzentration im Serum. IFN- γ gilt als Indikator für die Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. NK-Zellen. Verglichen wurden hierzu Serum-IFN- γ -Spiegel mit CpG-ODN behandelter mit denen unbehandelter Tiere gemessen mit Hilfe des ELISA. Dabei stellte sich eine Induktion von IFN- γ heraus, die abhängig von einer Injektion von CpG-ODN aber unabhängig von der Präsenz eines Tumors war (keine Abbildung).

A.



B.**Abb. 3.5 Effektorzellen des angeborenen Immunsystems in der Lyse von Tumorzellen**

A. Untersucht wurde die lytische Aktivität von Splenozyten gegenüber **C26-Zellen** innerhalb der ersten 20 Stunden nach Präparation. Drei verschiedene Gruppen wurden verglichen: tumorfreie Mäuse, die Injektionen mit CpG-ODN 1826 erhielten (gestreifter Balken, n=5), Tumormäuse unter peritumoraler Therapie (weißer Balken, n=8) und Mäuse, die einen C26-Tumor nach peritumoraler Behandlung mit CpG-ODN 1826 abgestoßen hatten und zwei Monate nach der letzten CpG-Gabe dieselbe Menge an Tumorzellen injiziert bekamen (schwarzer Balken, n=6). Aufgetragen ist die Differenz (in % lysierte Tumorzellen) zwischen der jeweiligen Gruppe und einer tumorfreien unbehandelten Kontrollgruppe.

B. Untersucht wurde die lytische Aktivität derselben Splenozyten wie in **A.** beschrieben gegenüber **Renca-Zellen** ebenfalls 20 Stunden nach Präparation. Es wurden dieselben Gruppen sowie dieselbe Anzahl an Tieren pro Gruppe verglichen wie in **A.**

Eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen den verwendeten Tumorarten lässt sich allerdings nicht ausschließen, da Splenozyten aus Tieren, die einen C26-Tumor trugen, auch ohne Therapie eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Lyse von Renca-Zellen aufwiesen (nicht in Abbildung).

3.2.3 Einfluss des angeborenen Immunsystems tumorfreier Mäuse auf die lytische Aktivität

In Anlehnung an die *in vivo*-Ergebnisse mit dem humanen CpG-ODN 2006 sollte in zwei unabhängigen Experimenten untersucht werden, inwieweit dieses ODN *in vitro* ähnliche Resultate erzielt wie das murine CpG-ODN 1826. Hierzu wurde tumorfreien Mäusen zweimal CpG-ODN 2006 s.c. injiziert und einen Tag nach der letzten Injektion die Milzen präpariert. Mit Hilfe magnetischer *DynalBeads* wurden Ly6G/Ly6C-, CD45R- oder CD8-positive Zellen depletiert. Nach 20 Stunden Inkubation mit CFSE-gefärbten C26-Tumorzellen zeigte die CD45R-depletierte Fraktion die stärkste Tumorzelllyse, gefolgt von der CD8-depletierten und der Ly6G-depletierten Fraktion. Obwohl nur zwei unabhängige Experimente durchgeführt wurden, lässt sich dennoch eine Tendenz erkennen. So spielen CD45R-positive Zellen, von denen B-Lymphozyten den Hauptanteil darstellen, die geringste Rolle bei der Tumorzelllyse. Auch CD8-positive Zellen, größtenteils T-Lymphozyten, scheinen zu so einem frühen Zeitpunkt, an dem eher eine unspezifische Immunantwort zu erwarten ist, kaum von Bedeutung zu sein. Es liegt nun nahe anzunehmen, dass NK-Zellen den größten Beitrag zur Zelllyse machen, da ihr Anteil durch Depletion der beiden eben erwähnten Zelltypen ansteigt und durch eine Depletion Ly6G/Ly6C-positiver Zellen nur geringgradig reduziert wird (Abb. 3.6).

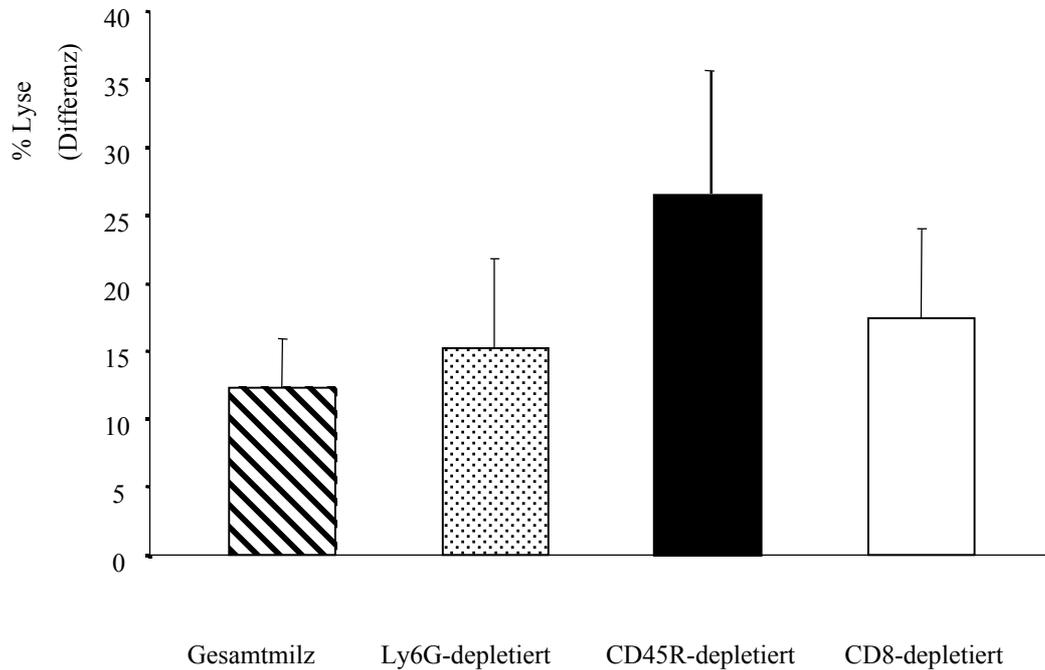


Abb.3.6 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der CpG-ODN-Therapie

Tumorfreie „naive“ Mäuse (n=2) erhielten zwei subkutane Injektionen mit CpG-ODN 2006. Ein Tag nach der zweiten Injektion erfolgte die Präparation der Milzen und die Depletion der einzelnen Fraktionen unter Verwendung unkonjugierter Primärantikörper und an diese bindender magnetischer *DynalBeads*. Die jeweilige gebundene Fraktion wurde verworfen. Die zytotoxische Aktivität gegenüber CFSE-markierten C26-Zellen wurde nach 20 Stunden Inkubation ermittelt. Aufgetragen ist die Differenz (in % lysierte Tumorzellen) zwischen der jeweiligen behandelten Gruppe und einer unbehandelten tumorfreien Kontrollgruppe.

3.2.4 Entwicklung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort unter peritumoraler Therapie mit CpG-ODN

Um die Ausbildung einer Antigen-spezifischen Gedächtnisantwort unter peritumoraler Therapie mit CpG-ODN 1826 nachzuweisen, wurden in einer dieser Arbeit vorausgegangenen Studie Mäusen, die einen C26-Tumor abgestoßen hatten, nach 3 Monaten dieselben Tumorzellen in gleicher Menge injiziert. Diese Tiere hatten seit Therapieende (3 Monate zuvor) keine CpG-Injektionen erhalten und blieben auch jetzt ohne Therapie. 88 % der Tiere entwickelten keinen palpablen Tumor und blieben über einen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen tumorfrei. Im Gegensatz hierzu waren

Mäuse, die zuvor einen andersartigen Tumor abgestoßen hatten (Renca-Nierenzellkarzinom), nicht gegen die Induktion eines C26-Tumors geschützt. Dies spricht dafür, dass Tiere im Laufe einer peritumoralen CpG-ODN-Therapie eine Tumorantigen-spezifische Gedächtnisantwort ausbildeten.

Um die Entwicklung einer Antigen-spezifischen Immunantwort *in vitro* zu untersuchen, wurden spezifische T-Zellen zunächst expandiert, bevor deren lytische Aktivität ermittelt wurde. Hierzu wurde Mäusen, die einen C26-Tumor abgestoßen und über 2 bis 3 Monate keine Therapie mit CpG-ODN erhalten hatten, erneut dieselbe Menge an Tumorzellen injiziert. Nach 7 bis 10 Tagen wurden die Mäuse getötet, die Milzen präpariert und die Splenozyten für 5 Tage mit bestrahlten C26-Zellen (100 Gray) in einem Verhältnis von 10 zu 1 kokultiviert. Dabei wurden dem üblichen Vollmedium nach 24 Stunden 10 IU/ml murines IL-2 zugefügt, um ein T-Zell-favorisierendes Milieu zu schaffen. Nach 5 Tagen wurden CFSE-gefärbte C26-Zellen hinzugefügt und die Zelllyse nach 20 Stunden anhand der CFSE/TO-PRO-3-Iodid-doppelt positiven Zellen bestimmt. Die mikroskopische Betrachtung der Kokultur ließ schon zuvor eine Tendenz erkennen, die durch die Bestimmung der lytischen Aktivität im Durchflusszytometer bestätigt werden konnte (Abb. 3.7). Beobachtet wurde außerdem eine deutliche Zellproliferation in der Kultur, die durch Zellzählung nachgewiesen werden konnte. Unter morphologischen Gesichtspunkten handelte es sich bei diesen Zellen am ehesten um T-Lymphozyten. Nach Färbung von Oberflächenantigenen und Analyse im FACS konnte in einer Stichprobe eine Erhöhung des Anteils an CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten (gleichzeitig CD3-positiv) festgestellt werden. Im Durchflusszytometer wurde eine starke Lyse von Tumorzellen im Vergleich zu Splenozyten aus tumorfreien unbehandelten Kontrollmäusen nachgewiesen ($p=0.05$). Dieser Effekt war Tumorantigen-spezifisch, da praktisch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf die Lyse von Renca-Zellen festgestellt werden konnte ($p=0,81$) (Abb. 3.8). Unter Verwendung dieses Protokolls, d.h. nach einer Kokultur mit spezifischem Antigen in Form von bestrahlten Tumorzellen, konnte keine erhöhte Lyse von C26-Zellen gemessen werden, wenn die Splenozyten von Tumormäusen stammten, die sich in der ersten Phase der CpG-ODN-Therapie befanden, was für das Fehlen von Gedächtnis-T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt während des Therapieverlaufs spricht (nicht in Abbildung).

Auch unter Anwendung des radioaktiven ^{51}Cr *-release-assays* war tendenziell ein Unterschied zwischen der anti-Tumor-Aktivität von „*Rechallenge-Mäusen*“ und unbehandelten Kontrollmäusen zu erkennen. Hierbei zeigte sich jedoch meist ein zu geringer Abstand zwischen der maximal möglichen und der spontanen Freisetzung des Chroms durch die Zielzellen nach Inkubationszeiten, die länger waren als 4 Stunden und damit von besonderem Interesse für diese Fragestellung. Das Problem dieser Methode lag in einer sehr hohen spontanen Chrom-Freisetzung durch die verwendeten C26-Tumorzellen.

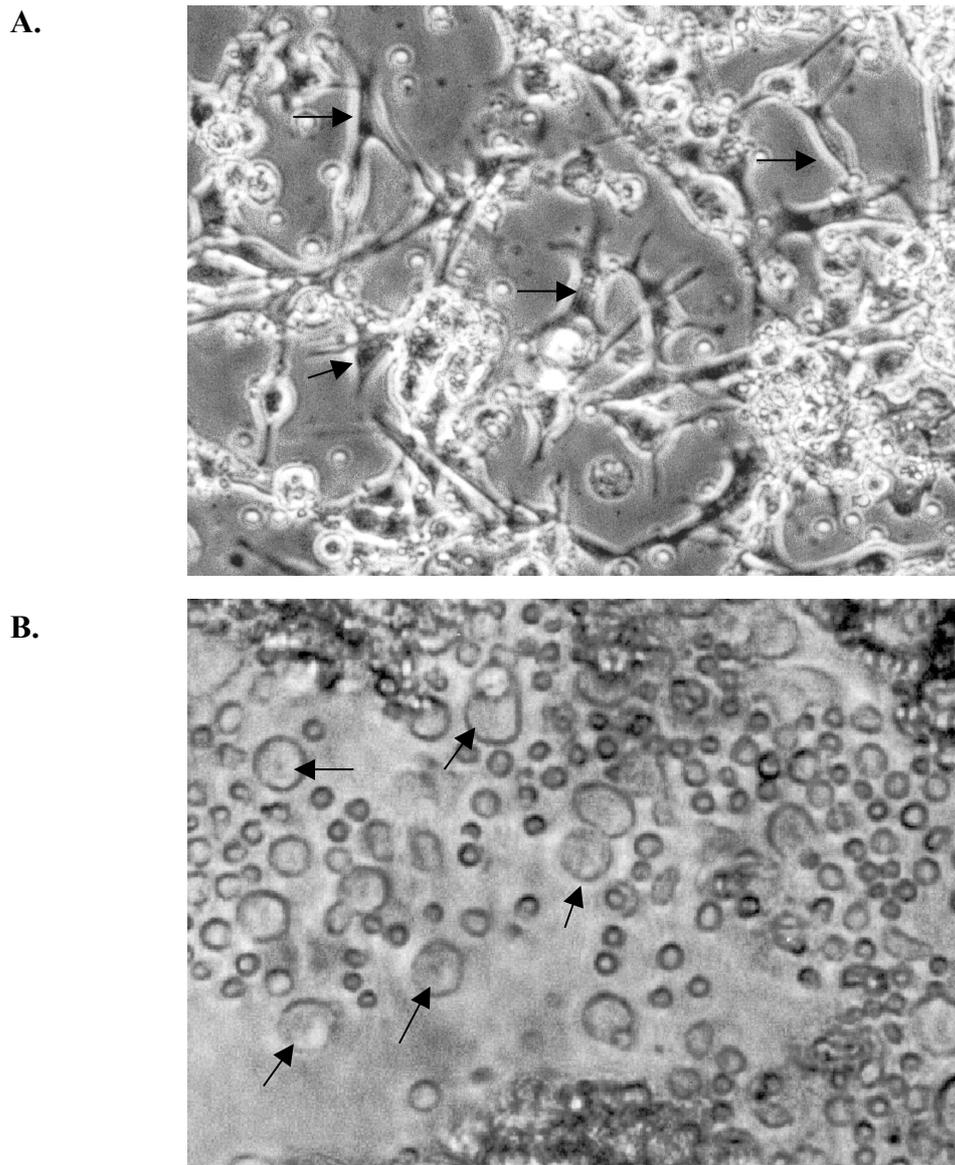


Abb. 3.7 Mikroskopisches Bild bestrahlter C26-Zellen in Kokultur mit Splenozyten

In **A.** sind nach Kokultur mit Splenozyten unbehandelter Kontrollmäuse deutlich lebende adhärenente Tumorzellen zu erkennen (Pfeile). In **B.** wurden Splenozyten von „*Rechallenge-Mäusen*“ verwendet, nach 5 Tagen Cokultur sind keine lebenden Tumorzellen mehr zu erkennen. Die Pfeile zeigen vergrößerte tote C26-Zellen. Diesen Zellen entsprachen 98 % TO-PRO-3-Iodid positive (lysierte) Zellen in der Durchflusszytometrie. Hier ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

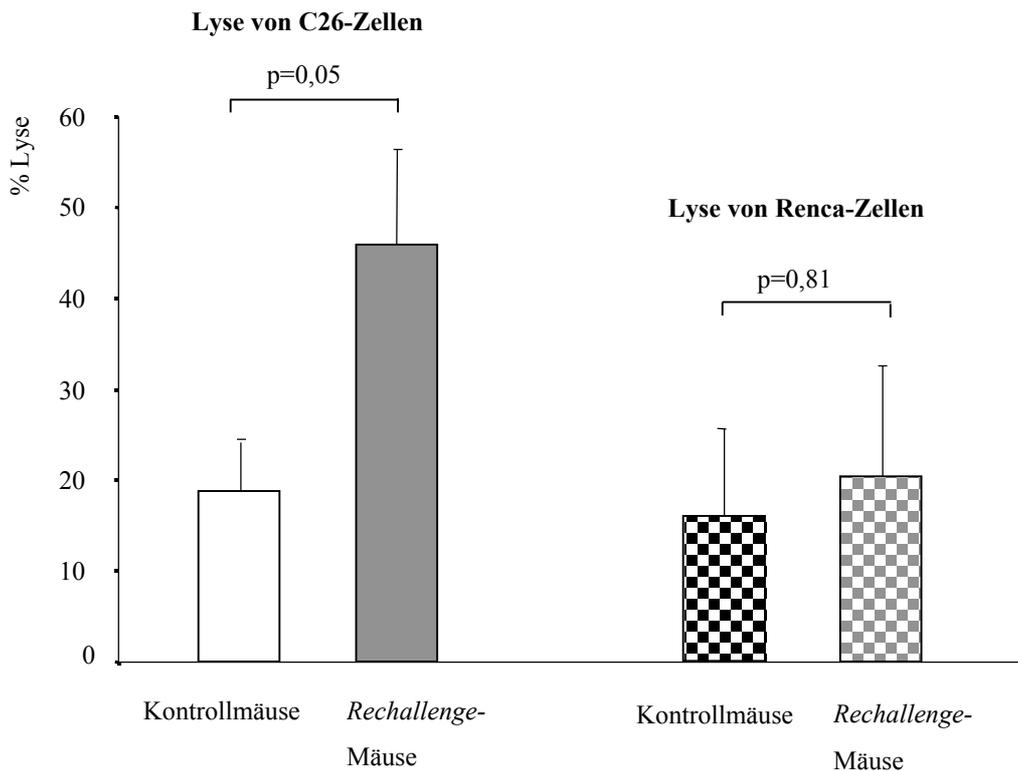


Abb. 3.8 Ausbildung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort

Nach 5 Tagen Inkubation mit bestrahlten C26-Zellen wurden CFSE-gefärbte Tumorzellen zugefügt und die lytische Aktivität bestimmt. Bei den Effektorzellen handelt es sich zum einen um Splenozyten aus Mäusen nach negativem *Rechallenge* (grauer Balken, n=6) zum anderen um Splenozyten aus altersentsprechenden Kontrollmäusen (weißer Balken, n=6). Im rechten Teil der Abbildung wurden dieselben Effektorzellen mit Renca-Zellen inkubiert (karierte Balken, n=4). Aufgetragen sind in dieser Abbildung die Absolutwerte in Prozent der Zellyse.

3.2.5 Bedeutung der CD8-T-Zellen für die Entwicklung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort

Als nächstes interessierte nun, welche Art von Effektorzellen die größte Rolle bei der Tumorzellyse spielte. Hierzu wurden Milzzellen aus Mäusen, die eine Immunität gegenüber erneuter Tumorinduktion entwickelt hatten, durch magnetische Zellseparation von CD8-positiven Zellen befreit und die verbleibenden Zellen anschließend auf ihre lytische Aktivität gegenüber Tumorzellen geprüft. Durch die Depletion von CD8-positiven Zellen konnte die höhere lytische Aktivität in der

Gruppe der *Rechallenge*-Mäuse, nicht aber die Hintergrundaktivität von Splenozyten der Kontrollgruppe aufgehoben werden (Abb. 3.9). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch bei Depletion CD4-positiver Zellen. Durch die Elimination dieser Zellen wird jedoch das Helferzell-Milieu unterdrückt, das zur Aktivierung von CD8-Gedächtniszellen *in vitro* notwendig ist. Diese Beobachtung spricht deshalb nicht für eine vergleichbare Abhängigkeit der Tumorzelllyse von CD4-Zellen. Wie erwartet zeigte auch die Depletion nur Wirkung, wenn die Effektorzellen vorher mit Antigen in Form von bestrahlten C26-Tumorzellen kokultiviert worden waren. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Mäuse, die einen C26-Tumor unter peritumoraler CpG-ODN-Therapie abgestoßen hatten, eine Antigen-spezifische Gedächtnis-CD8-T-Zell-Antwort ausgebildet haben, die sie vor erneuter Tumorinduktion schützt.

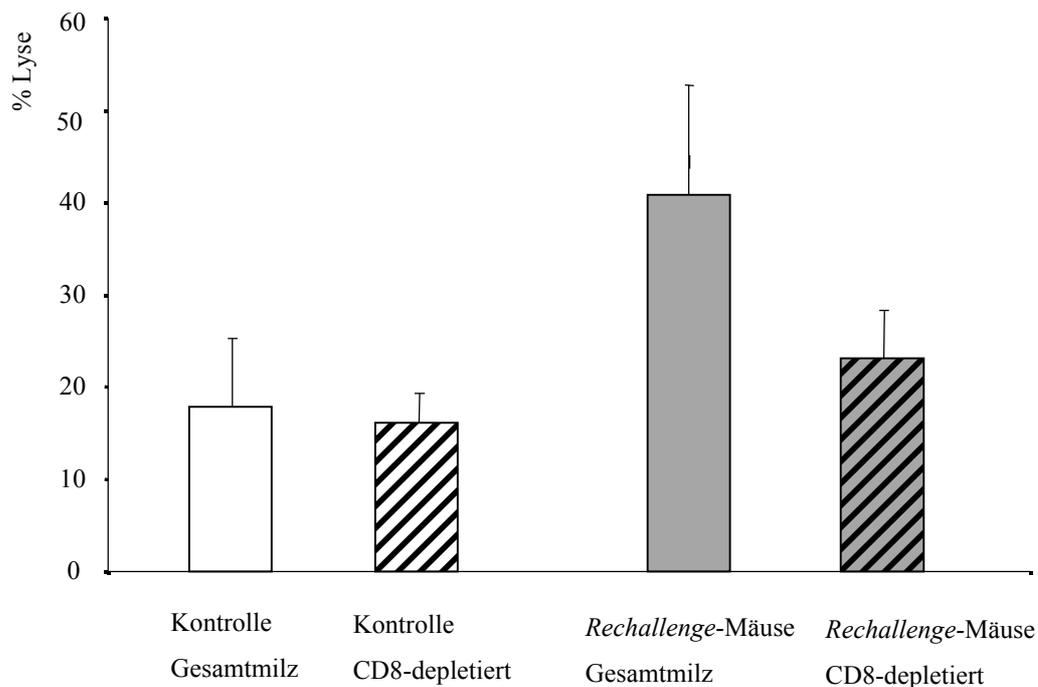


Abb. 3.9 CD8-T-Zellen sind für die Lyse der Tumorzellen verantwortlich

Splenozyten aus *Rechallenge*-Mäusen und altersentsprechenden Kontrollen wurden isoliert und CD8-positive Zellen depletiert. Die restlichen Splenozyten sowie Gesamtmilzzellen wurden für 5 Tage mit bestrahlten C26-Zellen kokultiviert, bevor die lytische Aktivität gegenüber neu zugegebenen CFSE-gefärbten C26-Zellen bestimmt wurde. Die lytische Aktivität konnte durch eine CD8-Depletion im Vergleich zu Gesamtmilzzellen deutlich reduziert werden (n=4). Es handelt sich hierbei um die Zusammenfassung von 4 unabhängigen Experimenten.

3.3 Charakterisierung der Immunantwort *in vivo*

Wie oben gezeigt ist eine peritumorale CpG-ODN-Therapie mit der Entwicklung von CD8-positiven Gedächtniszellen assoziiert, die vor einer erneuten Tumorinduktion mit denselben Tumorzellen schützt. Es lag nun die Frage nahe, ob CD8-T-Zellen nicht nur vor erneuter Tumorinduktion schützen, sondern auch an der Abstoßung etablierter Tumoren unter peritumorale CpG-ODN-Therapie beteiligt waren. Hierzu wurden den Mäusen zur Depletion der jeweiligen Zellpopulation einen Tag vor Therapiebeginn je 500 µg, einen Tag nach Therapiebeginn und danach dreimal alle 5 Tage 100 µg mAB (anti-CD4 mAB GK1.4 oder anti-CD8 mAB RmCD8) intraperitoneal verabreicht. Mäuse, die einen C26-Tumor trugen, erhielten wöchentliche peritumorale Injektionen mit CpG-ODN 1826. In der Gruppe, bei der CD8-T-Zellen depletiert wurden, war die Kontrolle des Tumorwachstum nur schwach und eine herabgesetzte Überlebenszeit ähnlich der von unbehandelten Kontrollmäusen wurde beobachtet. Im Gegensatz dazu waren alle Mäuse, bei denen CD4-T-Zellen depletiert wurden, imstande den Tumor komplett abzustößen. Diese Tiere blieben über einen Beobachtungszeitraum von mehr als 100 Tagen rezidivfrei. Im Verlauf zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der durchschnittlichen Tumorgöße an Tag 20 bei CD4-depletierten Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p=0,04$). Dieser Unterschied bestand praktisch nicht bei CD8-depletierten Tieren ($p=0,19$) (Abb. 3.10). Alle CD8-depletierten Mäuse starben trotz CpG-ODN-Therapie. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass CD8-T-Zellen nicht aber CD4-T-Zellen für die anti-Tumor-Aktivität einer peritumoralen CpG-ODN-Therapie verantwortlich sind.

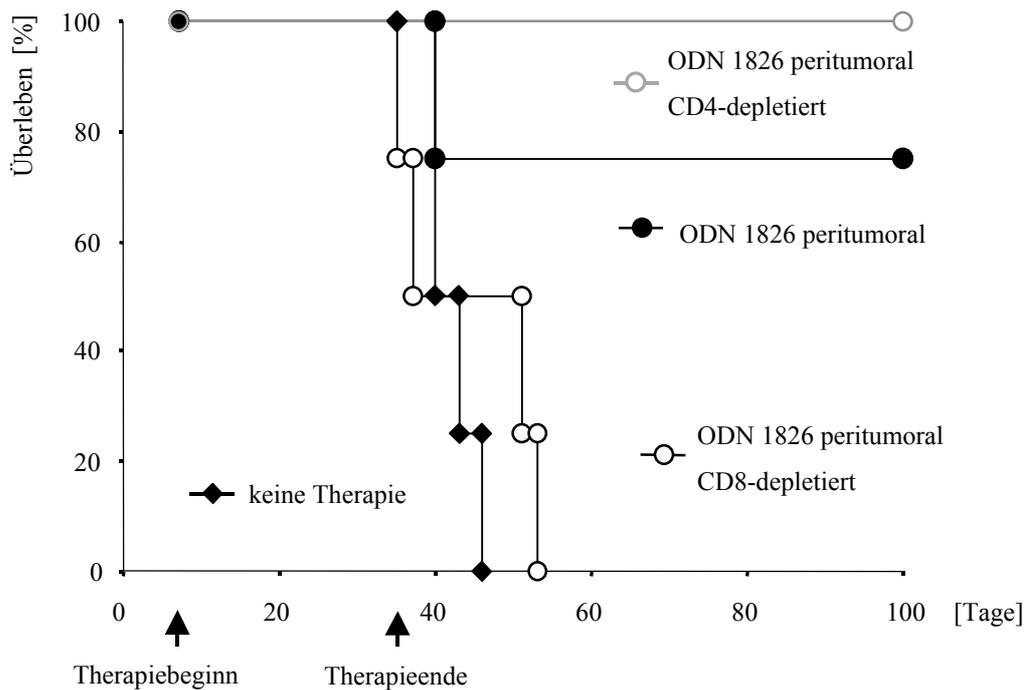


Abb. 3.10 Depletion von CD8-T-Zellen hebt den therapeutischen Effekt einer peritumoralen CpG-ODN-Therapie auf

Therapeutischer Ansatz: Die Tumorinduktion erfolgte an Tag 0. Wöchentliche peritumorale Injektionen mit CpG-ODN 1826 wurden an Tag 7 bei CD8-depletierten Mäusen (○, n=4), CD4-depletierten Mäusen (○, n=4) oder Mäusen ohne T-Zell-Depletion (●, n=4) begonnen. Unbehandelte Kontrollmäuse sind durch ◆ gekennzeichnet (n = 4). Die Depletion erfolgte jeweils einen Tag vor Therapiebeginn, einen Tag nach Therapiebeginn sowie danach dreimal alle 5 Tage durch intraperitoneale Injektion von blockierenden Antikörpern.

Obwohl sich CD8-T-Zellen bereits als notwendig herausgestellt haben, können andere Typen von Immunzellen, wie unspezifische Effektorzellen des angeborenen Immunsystems an der anti-Tumor-Aktivität einer peritumoralen CpG-ODN-Therapie beteiligt sein. Nachdem im therapeutischen Ansatz bei etablierten Tumoren der Einfluss unspezifischer Effektorzellen (nach Depletion von CD8-T-Zellen) nicht erkennbar war, untersuchten wir diesen im prophylaktischen Ansatz. Die anti-Tumor-Aktivität einer prophylaktischen Vakzine, bestehend aus CpG-ODN und bestrahlten C26-Tumorzellen, war in CD8-depletierten Mäusen deutlich reduziert ($p < 0,001$). Dennoch war das Tumorwachstum in diesen Mäusen bedeutend langsamer als bei unbehandelten CD8-depletierten Kontrollmäusen ($p = 0,01$) (Abb. 3.11).

Die verbleibende anti-Tumor-Aktivität nach Depletion von CD8-T-Zellen ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Aktivierung unspezifischer Effektorzellen durch CpG-ODN zurückzuführen. Der Großteil der anti-Tumor-Aktivität nach CpG-ODN-Therapie ist jedoch durch CD8-T-Lymphozyten vermittelt.

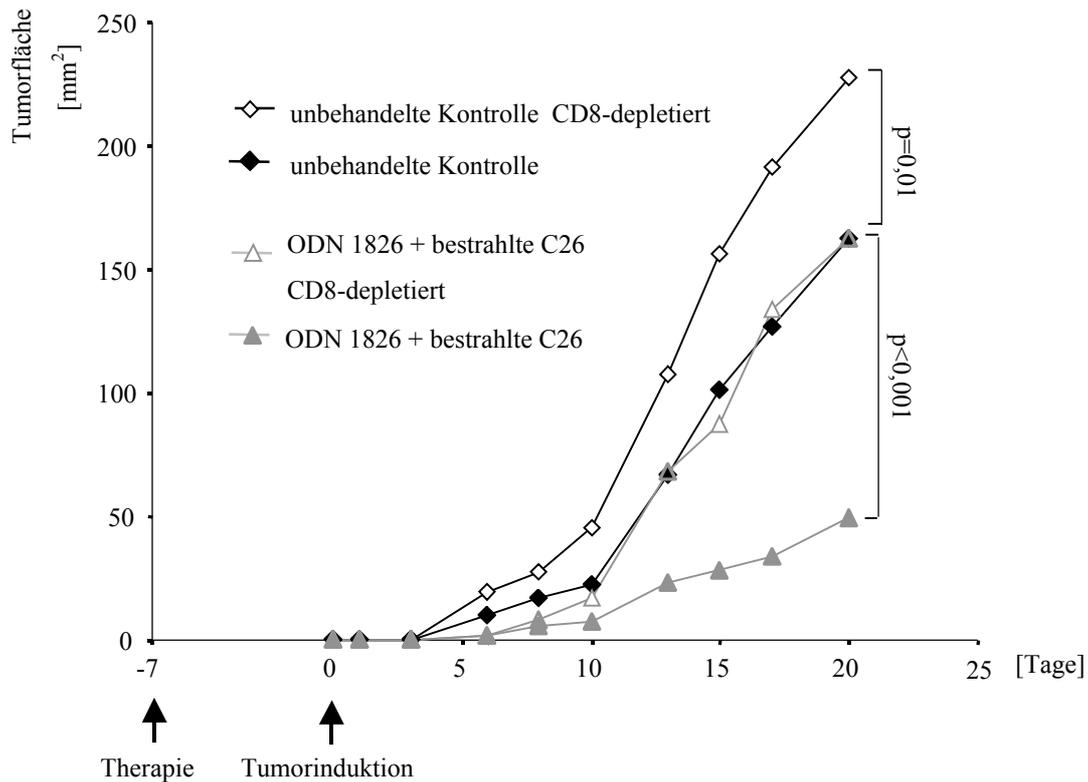


Abb. 3.11 Einfluss unspezifischer Effektorzellen

Prophylaktischer Ansatz: CD8-depletierte oder nicht-depletierte Mäuse blieben entweder unbehandelt (◆, n=5; CD8-depletiert: ◇, n=5) oder erhielten 7 Tage vor Tumorinduktion eine Injektion mit CpG-ODN 1826 (100 µg) in Kombination mit bestrahlten C26-Zellen (▲, n=5; CD8-depletiert: △, n=5). Die mittlere Tumorfläche (mm²) ist bis Tag 20 aufgetragen. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ist durch p-Werte angegeben.

3.4 Verbesserung einer auf dendritischen Zellen basierenden Immuntherapie

3.4.1 Vergleich einer Therapie mit peritumoralem CpG-ODN und einer Therapie mit reifen aktivierten dendritischen Zellen

Die verschiedenen Methoden, Tumoren mit einer manifesten Infektion in Verbindung zu bringen und damit für das Immunsystem erkennbar zu machen, scheitern häufig an der Toxizität von mikrobiellen Bestandteilen, die *in vivo* verabreicht werden. Eine elegante Methode dieses Problem zu umgehen ist es DC zu verwenden, die schon vorher *in vitro* aktiviert wurden. In früheren Studien konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass DC, die mit Tumorantigen beladen und mit CpG-ODN *in vitro* aktiviert worden waren, Mäuse vor einer nachfolgenden Tumorinduktion schützen oder sie von sehr kleinen Tumoren heilen konnten. Bei diesem Ansatz war die Tumorgöße zu Therapiebeginn der limitierende Faktor für einen dauerhaften Therapieerfolg. Da wir annahmen, dass das Immunsystem imstande sein könnte sehr große Tumoren abzustößeln, wenn eine Situation geschaffen würde, die einer manifesten Infektion ähnlicher wäre, entschlossen wir uns DC mit CpG-ODN *in vivo* zu kombinieren.

In einer ersten Studie wurde an Tag 17 bei einer durchschnittlichen Tumorgöße von 40 mm² mit der Therapie begonnen. Wurden antigenbeladene ausgereifte DC alleine an Tag 17 und an Tag 22 injiziert, so zeigte sich weder bei peritumoraler noch bei kontralateraler Anwendung ein Therapieerfolg. Wie aus den vorherigen Ansätzen zu erwarten, kam es bei diesen Tumorgößen wenigstens noch zu einer Wachstumsverlangsamung während einer peritumoralen Therapie mit CpG-ODN 1826 alleine. Auf eine Behandlung mit CpG-ODN auf der dem Tumor gegenüberliegenden Flanke wurde in diesem Fall verzichtet, da den vorhergehenden Studien zufolge kein Erfolg zu erwarten war. Kombinierte man aber *in vitro* aktivierte DC mit CpG-ODN 1826 auf der vom Tumor entfernten Seite, so konnte das Tumorstadium gut kontrolliert werden, wobei sich ein Wachstumsstillstand bis 1 Woche nach der zweiten und gleichzeitig letzten Injektion zeigte (Abb. 3.12).

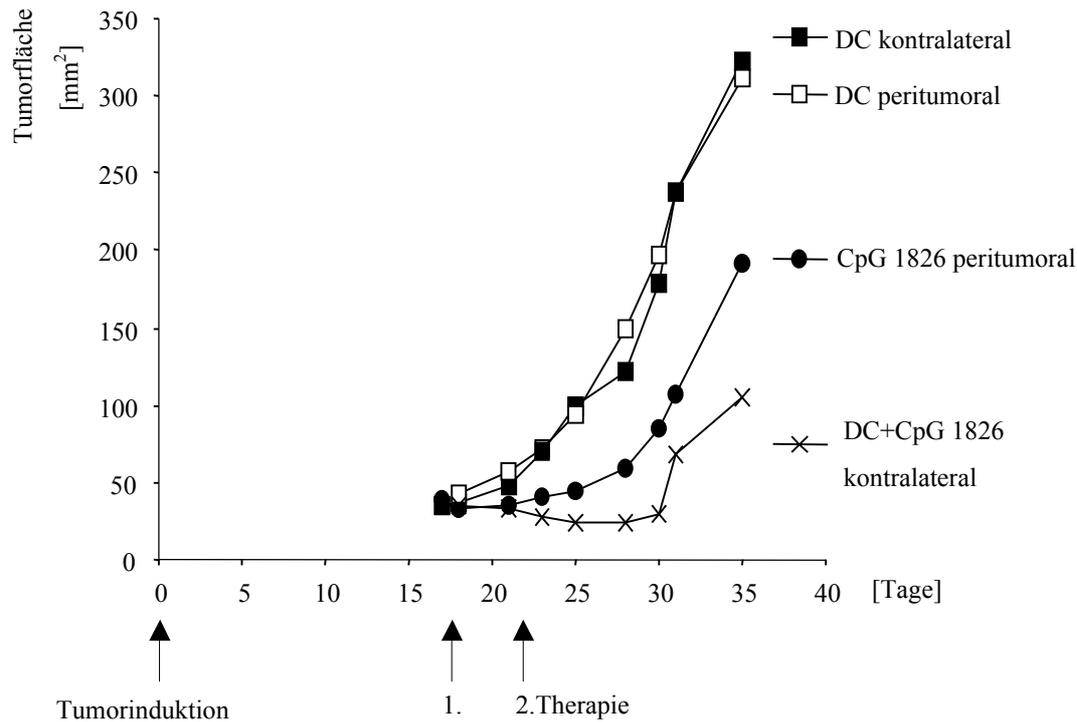


Abb. 3.12 Effektivität einer Kombinationstherapie bei entfernten Tumoren

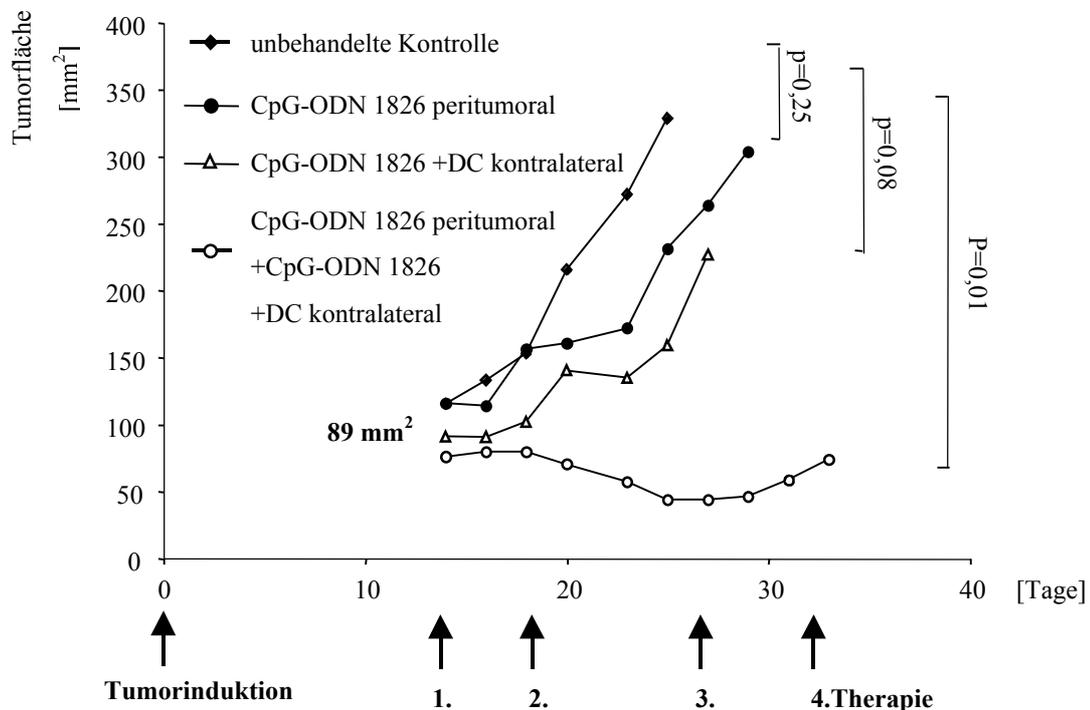
Die Tumorinduktion erfolgte an Tag 0. Eine zweimalige Therapie erfolgte an Tag 17 und Tag 22 entweder alleine mit *in vitro* aktivierten DC kontralateral (■, n=4) oder peritumoral (□, n=4), als Vergleich mit den vorherigen Studien mit peritumoralem CpG-ODN 1826 (●, n=4) und als neuer Ansatz mit einer Kombination aus CpG-ODN und DC (×, n=4). Die Kombinationstherapie wurde dabei an vom Tumor entfernter Stelle injiziert und zeigte in diesem Ansatz den besten Erfolg.

3.4.2 Abstoßung etablierter Tumoren durch peritumorale Injektion von CpG-ODN in Kombination mit kontralateraler Koinjektion von CpG-ODN und dendritischen Zellen

Durch eine peritumorale Therapie mit CpG-ODN 1826 war es möglich Mäuse von kleinen etablierten Tumoren zu heilen. Als nächstes wurde daher untersucht, ob eine gleichzeitige peritumorale CpG-Injektion die therapeutische Aktivität einer DC-basierten Tumorstoffimpfung verbessern könnte. Eine alleinige peritumorale Therapie mit CpG-ODN 1826 bei einem Therapiebeginn an Tag 14 (mittlere Tumorgöße von 89 mm^2) bewirkte hierbei nur eine geringe Verlangsamung des Tumorwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p=0,25$ an Tag 25). Mit einer Kombination von kontralateralen DC mit CpG-ODN war eine Kontrolle von Tumoren

während der ersten zwei Injektionen möglich ($p=0,08$ an Tag 25), die Tumoren begannen dann aber trotz einer dritten und vierten Behandlung weiter zu wachsen. Nur wenn eine kontralaterale Koinjektion von DC und CpG-ODN mit einer gleichzeitigen CpG-ODN-Injektion in den Tumorrandbereich kombiniert wurde, war eine längere Wachstumskontrolle möglich ($p=0,01$ an Tag 25) (Abb. 3.13 A). Um zu untersuchen ob der anti-Tumor-Effekt von CD8-T-Zellen abhängig war, wurden diese in einer weiteren Studie während des Therapieverlaufs depletiert. Trotz Anwendung der maximalen Therapie (kontralateral DC plus CpG-ODN kombiniert mit peritumoralem CpG-ODN) wuchsen die Tumoren in CD8-depletierten Mäusen genauso aggressiv wie in der unbehandelten Kontrollgruppe und führten schließlich zum Tod aller Tiere dieser Gruppe. Nach vier wöchentlichen Injektionen stießen dagegen 5 von 7 Mäusen unter Maximaltherapie den Tumor bis Tag 55 vollständig ab und blieben tumorfrei bis zum Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 100 (Abb. 3.13 B).

A.



B

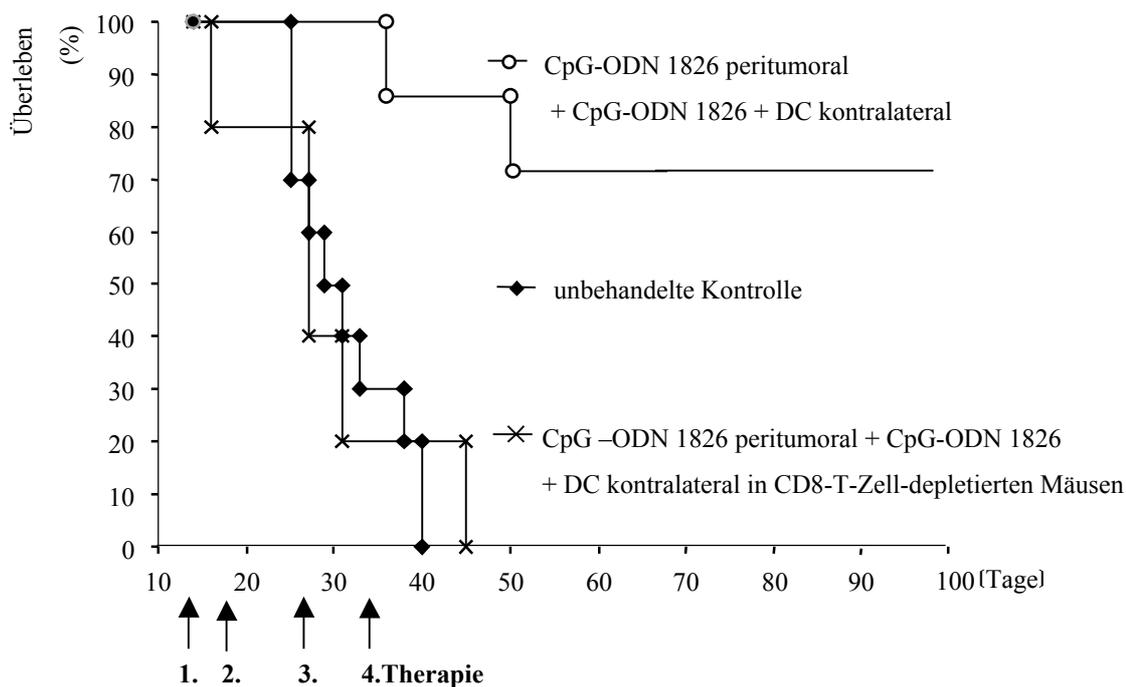


Abb. 3.13 Die peritumorale Injektion von CpG-ODN führt in Kombination mit kontralateraler Koinjektion von DC und CpG zur Abstoßung etablierter Tumoren

A. Mäuse blieben unbehandelt (◆, n=4), wurden mit CpG-ODN 1826 peritumoral (●, n=4), mit reifen Antigen-gepulsten DC koinjiziert mit CpG-ODN in die kontralaterale Flanke (△, n=4) oder mit einer Kombination aus peritumoralem CpG und kontralateraler Koinjektion von CpG mit antigenbeladenen DC (○, n=4) behandelt. Insgesamt erfolgten 4 Injektionen in wöchentlichen Abständen mit Beginn an Tag 14 (durch Pfeile gekennzeichnet). Die mittleren Tumorgößen pro Gruppe sind aufgetragen bis die erste Maus jeder Gruppe eine Tumorgöße von 400 mm² erreichte bzw. verstarb.

B. Kaplan-Meier-Kurve der Tiere unter “Maximaltherapie” (CpG-ODN peritumoral kombiniert mit kontralateraler Koinjektion von DC und CpG-ODN: ○, n=7) und unter “Maximaltherapie” nach CD8-Depletion (×, n=4.) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (◆, n=10) über einen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen.

Da die Tumorgöße zu Therapiebeginn den limitierenden Faktor darstellt, wurde als nächstes der Therapieeffekt bei größeren Tumoren untersucht. Wurde an Tag 12 bei einer durchschnittlichen Tumorgöße von 80 mm² mit der Therapie begonnen, gelang es mit einer fünfmaligen Gabe von CpG-ODN 1826 alleine in den Tumorrandbereich zwar das Wachstum aufzuhalten, die Tumoren begannen aber nach Therapieende an Tag 32 erneut zu wachsen. Zur Untersuchung maximal großer Tumoren wurde der Therapiebeginn auf Tag 22 verschoben. Zu diesem Zeitpunkt betrug die durch-

schnittliche TumorgroÙe 220 mm². Begonnen wurde mit einer peritumoralen Injektion von CpG-ODN 1826 gefolgt von zweimaliger Koinjektion von DC und CpG-ODN 1826 kontralateral kombiniert mit CpG-ODN 1826 peritumoral („Maximaltherapie“), sowie zuletzt zwei erneuten alleinigen peritumoralen CpG-ODN-Gaben. Die einzelnen Injektionen erfolgten jeweils in einem Abstand von 5 Tagen. In einer Gruppe von 7 Mäusen konnte zumindest für den Zeitraum der Therapie ein Stillstand im Wachstum dieser großen Tumoren erzielt werden (Abb. 3.14). Bei zwei Mäusen wurde ein sehr starker Tumorrückgang beobachtet, bevor diese aus ungeklärter Ursache verstarben (nicht in Abbildung).

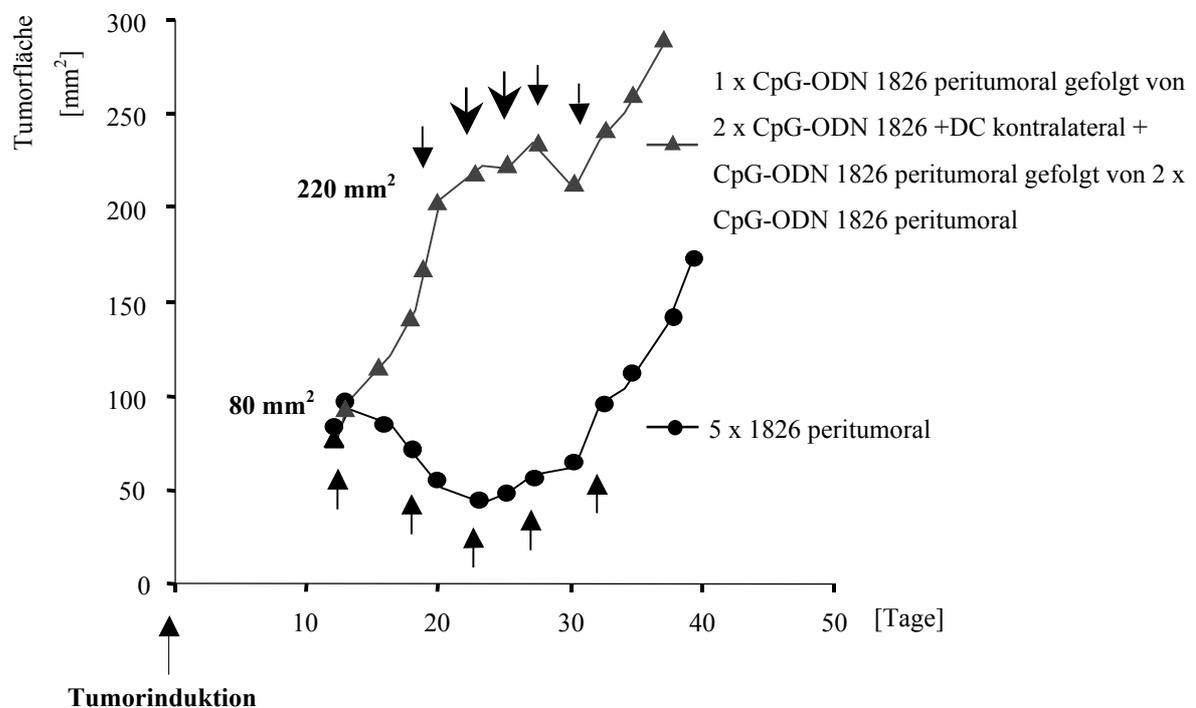


Abb. 3.14 Kombinationstherapie macht Kontrolle maximal großer Tumoren möglich.

Die Tumorinduktion erfolgte wie üblich an Tag 0. Eine Gruppe von Mäusen wurde beginnend bei einer durchschnittlichen TumorgroÙe von 80 mm² an Tag 12 fünf Mal peritumoral mit CpG-ODN 1826 alleine behandelt (↑, n=4). Bei einer zweiten Gruppe wurde der Therapiebeginn auf Tag 22 mit einer durchschnittlichen TumorgroÙe von 220 mm² verschoben. Das Therapieschema bestand hierbei aus einer alleinigen peritumoralen CpG-Gabe zu Beginn (↑), gefolgt von zweimaliger Injektion einer Kombination aus DC und CpG-ODN 1826 kontralateral mit peritumoralem CpG-ODN 1826 (↓, n=5).

4 Diskussion

4.1 CpG-ODN und ihre Wirkung im subkutanen Tumormodell

4.1.1 Abhängigkeit vom Injektionsort und Parallelen zur Entzündungsreaktion – das „*Danger-Modell*“

In Einklang mit Beobachtungen von vor über hundert Jahren, bei denen es zur lokalisierten spontanen Abstoßung von Tumoren kam, wenn gleichzeitig eine bakterielle Infektion im Bereich des Tumors ablief, gelang es im ersten Teil dieser Arbeit, mit Hilfe immunstimulatorischer Oligonukleotide einen Rückgang etablierter Tumore zu erreichen. CpG-ODN, als alleiniges Adjuvans in den Tumorrandbereich injiziert, führte zur Induktion einer Immunantwort, die ausreichte, um Mäuse von einem Tumor zu heilen. Im Gegensatz hierzu hatten Tiere, die eine Behandlung nur auf der dem Tumor gegenüberliegenden Seite erhielten, nur einen geringfügigen Vorteil in Bezug auf die Überlebenszeit verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies korreliert mit den Anstrengungen auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumoren, Strategien zu entwickeln mit denen es gelingt das Immunsystem dazu zu bringen, dass es einen malignen Prozess mit einer Infektion in Verbindung bringt und daraufhin eine Tumor-Antigenspezifische T-Zell-Antwort induziert.

Über 50 Jahre lang waren Immunologen davon überzeugt, dass das Immunsystem funktioniert, indem es Selbst von Fremd unterscheidet. Dieses „*Self-Non-Self*“-Modell wurde erstmals 1959 mit der Aussage beschrieben, dass Lymphozyten durch das Erkennen ihnen fremder „Dinge“ aktiviert werden. Aufgrund neuer Entdeckungen war es in den folgenden Jahren zahlreichen Abwandlungen unterworfen, so das erste Mal 1969 als beschrieben wurde, dass B-Zellen, die ihr Antigen erkennen in Abwesenheit eines zweiten Signals durch eine Helferzelle zugrundegehen. Sechs Jahre später rückte die Rolle der T-Zellen mehr in den Mittelpunkt des Interesses als festgestellt wurde, dass auch diese ein zweites Signal, von nun an Kostimulation genannt, von einer APC benötigen, um am Leben zu bleiben. Wenn Immunantworten nun aber von Zellen eingeleitet werden, die nicht antigenspezifisch sind, könnten sich Reaktionen auch gegen körpereigenes Gewebe richten. Aus diesem Grunde wurde die Frage der kostimulierenden Zellen lange ignoriert, bis *Janeway* 1989 eine Erklärung fand. Er schlug vor, dass APC solange in einem Ruhezustand verharren, bis sie über bestimmte

Rezeptoren die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs) aktiviert würden, die konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) auf Bakterien erkennen. Einmal aktiviert regulierten diese kostimulatorische Moleküle hoch, prozessierten bakterielle Antigene und präsentierten diese vorbeikommenden T-Zellen. Damit war es ihnen möglich „infektiöses Nichtselbst“ (INS) von „nichtinfektiösem Selbst“ zu unterscheiden. Doch auch mit diesem Modell blieben so wichtige Fragen offen, wie das Zustandekommen von Transplantatabstoßung oder Autoimmunerkrankungen. Auf der Suche nach Erklärungen für diese Phänomene fügte *Polly Matzinger* den beschriebenen Modellen einen neuen Zelltyp und neue Signale hinzu. 1994 beschrieb sie erstmals das „*Danger-Modell*“, indem sie vorschlug, dass APC durch Gefahrensignale aus gestressten oder durch Pathogene, Toxine oder mechanische Belastung beschädigten Zellen aktiviert werden. Zahlreiche potentielle Alarmsignale sind seitdem beschrieben worden. Da Zellen, die den physiologischen Zelltod (Apoptose) sterben, durch *Scavenger*-Rezeptoren aufgenommen werden und nekrotische Zellen ihren Inhalt freisetzen, könnte im letzteren Fall praktisch jedes intrazelluläre Produkt als Signal dienen, sobald es in den Extrazellulärraum gelangt. Das Erkennen von Selbst ist somit keine Garantie für Toleranz mehr und die Tatsache körperfremd zu sein ist nicht zwingend mit der Induktion einer Immunantwort verbunden (Matzinger 2002). Obwohl sie sich grundsätzlich in Details unterscheiden haben die verschiedenen Modelle auch einiges gemeinsam.

Die vorliegende Arbeit stützt sich in vielerlei Hinsicht auf Merkmale eines erweiterten INS-Modells. Dieses wurde in letzter Zeit vor allem durch Charakterisierung der verschiedenen TLRs, die als PRRs für Bakterien und Pilze fungieren, untermauert. Diese TLRs können sowohl exogene als auch endogene Moleküle erkennen und stellen damit eine Verbindung zum *Danger-Modell* her. Die Versuche der vorliegenden Arbeit lassen sich in diesem Modell wie folgt interpretieren: CpG-ODN täuscht das Vorliegen einer Infektion vor und kann entweder zusammen mit fremden Tumoranteilen oder aber auch mit Hilfe endogener Gefahrensignale aus nekrotischen oder andersartig beschädigten Zellen eine spezifische T-Zell-Antwort induzieren.

Im allgemeinen erweisen sich immuntherapeutische Ansätze eher im prophylaktischen als im therapeutischen Ansatz als erfolgreich. So kam es auch in unserem Modell zu einer Wachstumsverlangsamung von C26-Tumoren, wenn Tiere 7 Tage vor

Tumorinduktion eine einmalige Gabe von CpG-ODN 1826 erhalten hatten. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche Antigengabe in Form bestrahlter Tumorzellen noch verstärkt werden und kam nicht zustande bei Injektion des Kontroll-ODN 1982. Mit einer CpG-Monotherapie konnten in der vorliegenden Arbeit aber besonders im therapeutischen Modell bedeutende Erfolge erzielt werden. Ein vitaler wachsender Tumor erwies sich dabei als zwingend notwendig und konnte auch durch Antigen in Form bestrahlter Tumorzellen nicht ersetzt werden. Eine effektive anti-Tumor-Antwort scheint also von der Kolo-kalisation des wachsenden Tumors mit einem Indikator für bakterielle Infektion (CpG ODN) abzuhängen.

Mediatoren wie immunstimulatorische bakterielle DNA könnten sich auch auf anderem Wege als effektiv erweisen: bekanntermaßen weisen solide Tumoren eine veränderte Vaskularisierung mit einem Verlust der Gefäßhierarchie und der Leukozytenadhäsion auf. Die Ziele einer gezielten Therapie bestehen also neben einer Hemmung der Angiogenese in der Förderung der Chemotaxis von Lymphozyten. Eingesetzt in der Therapie des Harnblasenkarzinoms erhöht lokal appliziertes BCG die Infiltration mononukleärer Zellen in die oberflächlichen Schichten der Harnblase (Luo 1999).

4.1.2 Bedeutung des CpG-Motivs – die zwei Typen von CpG-ODN

In der Gruppe der Mäuse, die wöchentliche peritumorale Injektionen mit CpG-ODN 1826 erhielten, hatten in einer ersten Studie 5 von 6 Tieren bis Therapieende an Tag 38 den Tumor vollständig abgestoßen und blieben mindestens über einen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen rezidivfrei. Im Gegensatz hierzu blieben peritumorale Injektionen mit dem Kontroll-ODN 1982, bei dem das CpG-Motiv durch andere Basen ersetzt wurde, wie schon im prophylaktischen Modell beschrieben, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe ohne Effekt. Die Abhängigkeit des Therapieerfolgs vom Vorhandensein eines CpG-Motivs konnte damit auch in diesem Modell bestätigt werden.

Man geht davon aus, dass nur solche Zellen, die TLR9 in Endosomen exprimieren, durch CpG-ODN direkt aktiviert werden können. Im menschlichen System scheint die TLR9-Expression auf B-Zellen und PDC beschränkt zu sein. Studien in Mäusen haben jedoch gezeigt, dass sowohl Makrophagen als auch Mikrogliazellen des ZNS den

Rezeptor exprimieren (Carpentier 2000). Unterschiede im Reaktionsmuster und der Reaktionsfähigkeit zwischen Mensch und Maus sind also zu erwarten.

Weiterhin hat sich herausgestellt, dass es mindestens zwei verschiedene Klassen von CpG-DNA gibt. Neben einer Phosphothioat-Modifizierung des ODN-Gerüsts, die synthetisch hergestellten CpG-ODN eine höhere Stabilität gegenüber Nukleasen verschafft, lassen sich durch die Wahl der die CpG-Dinukleotide flankierenden Basen ganz unterschiedliche Wirkungen erzielen. Bei CpG-A befindet sich das CpG-Motiv innerhalb des nativen Phosphodiester-Gerüsts und ist bekannt dafür, dass es nur eine schwache B-Zell- aber eine umso stärkere NK-Zell-Aktivierung sowie IFN- α -Expression durch PDC induziert (CpG-A nach Krieg und Hartmann, D-type ODN nach Klinman et al.). Die potentesten Vertreter dieser Gruppe, die durch ihre Zytokininduktion am ehesten eine Virusinfektion imitiert, sind ODN 2216 im humanen und ODN 1585 im murinen System.

Die Funktion der NK-Zellen wird durch ein Gleichgewicht zwischen gegensätzlichen Signalen reguliert. Zum einen werden diese durch aktivierende Rezeptoren vermittelt, die Liganden auf Tumorzellen und virusinfizierten Zellen erkennen, zum anderen durch inhibierende Rezeptoren, die spezifisch für körpereigene Moleküle der MHC I-Klasse sind. In letzter Zeit wurden verschiedene NK-Zell-Rezeptoren charakterisiert, die definierte, auf Tumoren häufig überexprimierte Antigene erkennen (Cerwenka 2001; Smyth 2001). Mit Hilfe dieser aktivierenden Rezeptoren sollte es NK-Zellen gelingen eine MHC I-vermittelte Inhibierung zu überwinden und Tumoren sowie Virusinfektionen zu bekämpfen. Die Beobachtung verschiedener humaner Karzinomarten *in vivo* machte diese Hoffnung allerdings zunichte. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass NK-Zellen den Ort des Primärtumors erst gar nicht erreichen, zum anderen produzieren viele Tumoren immunsuppressive Zytokine oder exprimieren Fas-Ligand, wodurch NK- und T-Zellen eliminiert werden. Außerdem exprimieren bei weitem nicht alle Tumorzellen aktivierende Liganden und so könnten eben solche, denen diese fehlen, verstärkt proliferieren oder NK-Zellen für erstere unzugänglich machen, indem sie die entsprechenden Rezeptoren blockieren. Schließlich sind Veränderungen auf Rezeptorebene möglich oder es könnten zusätzliche kostimulatorische Moleküle für eine NK-Zell-Aktivierung nötig sein. Eben diese

Problematik könnte durch eine durch CpG-ODN Typ A induzierte Aktivierung beseitigt werden.

Im Gegensatz hierzu ist das CpG-Motiv der anderen Klasse durch ein nukleaseresistentes Phosphothioat-Gerüst stabilisiert und führt zu einer starken B-Zell-Aktivierung und einer nur sehr geringen IFN- α -Expression (CpG-B nach Krieg und Hartmann, K-type ODN nach Klinman et al.). Durch Förderung der IL-12-Synthese imitiert diese Gruppe eine Infektion mit intrazellulären Bakterien und wird vertreten durch ODN 2006 im humanen und ODN 1826 im murinen System.

Für Bindungs- und Aufnahmemechanismen scheint wiederum die Modifizierungsart des DNA-Gerüsts von Bedeutung zu sein. So wiesen ODN mit Phosphothioat-Modifikation die höchste Bindungs- und Aufnahmekapazität durch murine Splenozyten auf (Zhao 1993). Neben dem Immuneffekt, der durch die CpG-Sequenz selbst ausgelöst wird ist ein Effekt durch Poly-G-Sequenzen beschrieben (Ballas 1996). So sind in verschiedenen Mausmodellen dramatische Unterschiede bezüglich der anti-Tumor-Antwort in Abhängigkeit von der jeweiligen Basenfolge beschrieben worden. Man spricht heute von NK-Zell-optimierten CpG-ODN, wenn diese ein chimäres Gerüst in Kombination mit Poly-G-Enden aufweisen. Sie sind potente Aktivatoren der lytischen Aktivität von NK-Zellen, haben aber nur einen sehr geringen oder gar keinen Effekt auf Zytokinsekretion und B-Zell-Proliferation, entsprechend der beschriebenen CpG-ODN Gruppe A. Mit einem Vertreter dieser Gruppe, dem schon erwähnten CpG-ODN 1585 gelang die Abstoßung eines murinen Melanoms (Ballas 2001). Der therapeutische Erfolg blieb bei Verwendung von CpG-ODN 1826 aus, obwohl man von diesem Vertreter der Gruppe B eine potente antitumorale Aktivität erwartet hätte. Beim Vergleich mit einem Lymphommodell, in dem sich umgekehrt CpG-ODN 1826 als wirksam erwies, stellte sich heraus, dass es mit CpG-ODN 1826 nicht aber mit CpG-ODN 1585 zur Induktion einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort kam. Auch hier waren NK-Zellen zwar notwendig aber im Gegensatz zum Melanommodell zum Tumorrückgang nicht ausreichend (Hartmann and Krieg 2000; Ballas 2001).

Ähnliche Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich zweier subkutaner Tumormodelle gemacht. So entwickelten Mäuse, die nach peritumorale Therapie mit CpG-ODN 1826 einen C-26-Tumor abgestoßen hatten, bei erneuter

Injektion keinen Tumor mehr, was für die Entwicklung einer Gedächtnisantwort spricht. Zusammenfassend wird deutlich, dass die Selektion der optimalen CpG-ODN für die Immuntherapie von Krebspatienten von der sorgfältigen Analyse der zellulären Wirkmechanismen verschiedener CpG-Motive sowie vom Verstehen der Abläufe, die auf zellulärer Ebene für die anti-Tumor-Aktivität in einem ganz bestimmten Tumor nötig sind, abhängt.

4.1.3 Unterschiede zwischen humanem und murinem System in Bezug auf das CpG-Motiv

Aufgrund deutlicher Unterschiede im humanen und murinen Immunsystem im Hinblick auf die CpG-ODN Effekte sollte man zurückhaltend sein mit Vorhersagen bezüglich der anti-Tumor-Aktivität einer peritumoralen CpG-ODN-Therapie im Patienten. Verschiedene Punkte müssen berücksichtigt werden, wenn man die peritumorale Monotherapie vom Mausmodell in die Klinik überträgt. Als erstes müssen die geeigneten CpG-ODN gewählt werden, da das optimale CpG-Motiv im murinen System ein anderes ist als im humanen System.

Im Mausmodell wurde als optimales CpG-Motiv ein unmethyliertes CpG-Dinukleotid beschrieben, das am 5' Ende von zwei Purinen und am 3' Ende von zwei Pyrimidinen flankiert wird, wobei sich als am effektivsten die Sequenz 5'-GACGTT-3' herausstellte. DNA, die dieses Motiv beinhaltet, aktiviert murine Makrophagen und stimuliert murine DC und B-Zellen. Viele solcher ODN mit starker immunstimulatorischer Aktivität im murinen System, zeigen nur eine sehr geringe Aktivität im humanen System. Diese Beobachtung zusammen mit solchen, die das Phosphodiester- mit dem Phosphothioat-Gerüst vergleichen, weist auf Unterschiede im genauen Mechanismus der CpG-Erkennung hin. So stellte sich heraus, dass im humanen System folgende Charakteristika zur Potenz von Phosphothioat-CpG-ODN beitragen:

- 1.) ein TpC Dinukleotid am 5' Ende gefolgt vom humanen CpG-Motiv 5'-GTCGTT-3'
- 2.) zwei zusätzliche humane CpG-Motive innerhalb der Sequenz
- 3.) Trennung von anhängenden CpG-Motiven durch TpT.

Das ODN 2006 erfüllte alle drei Kriterien und erwies sich als exzellentes Adjuvans für die Induktion einer Immunantwort in Schimpansen sowie für die Aktivierung humaner Immunzellen *in vitro* (Jones 1999; Davis 2000; Hartmann 2000).

In einer Studie dieser Arbeit wurde die Wirkung potenter humaner CpG-ODN sowohl der Gruppe A (CpG-ODN 2216) als auch der Gruppe B (CpG-ODN 2006) im murinen Tumormodell untersucht. Widererwarten zeigte eine peritumorale Gabe von CpG-ODN 2006 bei gleichem Therapieschema ähnliche Erfolge wie das murine CpG-ODN 1826. Dies könnte dafür sprechen, dass, anders als in der Literatur beschrieben, keine strikte Spezifität vorliegt, sondern eben auch andere Faktoren wie Tumorart oder Studienaufbau Einfluß auf den Therapieerfolg nehmen. Interessant war auch, dass eine tägliche peritumorale Therapie mit CpG-ODN 2216 zwar zunächst ausreichte, um das Tumorwachstum zu kontrollieren, die Mäuse nach Therapieende aber schließlich am erneut wachsenden Tumor verstarben. Dies könnte dafür sprechen, dass innerhalb sehr kurzer Zeit eine NK-Zell-Antwort induziert wird, die zunächst noch eine Kontrolle über den Tumor ermöglicht. Da die Ausbildung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort, wie in der Literatur beschrieben, bei CpG-ODN der Gruppe A ausbleibt, kommt es aber nicht zur kompletten Tumorabstoßung (Ballas 2001).

In einer weiteren Studie wurde der therapeutische Effekt einer Kombination beider Typen von CpG-ODN untersucht. In Anlehnung an die oben beschriebenen Charakteristika wurde mit einer mehrmaligen Gabe von CpG-ODN 2216 begonnen. Dieses sollte zu einer unspezifischen Aktivierung von NK-Zellen führen. Die wiederholte Behandlung mit CpG-ODN 2006 sollte schließlich einen Beitrag zur Induktion einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort leisten. Durch eine eben solche Kombination aus CpG-ODN 2006 und CpG-ODN 1585 war es einer anderen Arbeitsgruppe gelungen, Mäuse vor einer nachfolgenden Induktion von AML zu schützen und das Langzeitüberleben zu erhöhen (Blazar 2001). Dieses Therapieschema zeigte in der vorliegenden Arbeit jedoch auch unter Verwendung der entsprechenden murinen Motive CpG-ODN 1585 bzw. CpG-ODN 1826 keinerlei Vorteil gegenüber einer Monotherapie mit dem jeweiligen CpG-ODN der Gruppe B. Bei einem solchen Kombinationsansatz müsste bei einem Einsatz im Patienten zudem die steigende Gefahr toxischer Nebenwirkungen und die dadurch möglicherweise herabgesetzte tolerable Dosis berücksichtigt werden.

4.1.4 Tumorgröße zu Therapiebeginn als limitierender Faktor für die Effektivität einer CpG-Monotherapie

Bei den meisten Krebspatienten ist die Tumorlast größer als in Tiermodellen, die verwendet werden, um Immuntherapien zu testen. Nachdem in den vorliegenden Studien die Effektivität einer peritumoralen Monotherapie mit CpG-ODN nach einer Verschiebung des Therapiebeginns und damit mit steigender Tumorausgangsgröße abnahm, ist es eher unwahrscheinlich, dass peritumorales CpG-ODN ausreichen wird, Patienten von großen etablierten Tumoren zu heilen. Da es aber bei Therapiebeginn an Tag 10 nach Tumorinduktion immer noch zu einer deutlichen Wachstumshemmung und bei einigen Tieren sogar zur kompletten Tumorabstoßung kam, sind Erfolge zu erwarten mit CpG-ODN als Ergänzung zu anderen immuntherapeutischen Ansätzen oder auch Standardverfahren wie Chemo- oder Strahlentherapie.

Im Vergleich zu *Alum*, das vor über 75 Jahren entwickelt wurde und immer noch das einzige für den Menschen zugelassene Adjuvans ist, hätte CpG-ODN zahlreiche Vorteile. So induziert *Alum* eher eine Th2-Antwort und verhindert dadurch die nicht nur im Falle einer Tumorerkrankung erwünschte Zell-vermittelte Immunität und Aktivierung der CD8⁺ CTL (Schirmbeck 1994). Für CpG-ODN konnte dagegen gezeigt werden, dass sie eher eine Th1-Antwort induzieren und wenn sie in Kombination mit *Alum* verwendet werden sogar eine vorbestehende Th2-Antwort überwinden können (Davis 1998). Dieser Effekt kam dabei selbst in jungen Mäusen zustande, bei denen die Induktion einer Th1-Antwort normalerweise große Schwierigkeiten bereitet. Zusätzlich hat CpG-ODN gegenüber *Alum* den Vorteil, dass es mit attenuierten oder multivalenten Impfstoffen kombiniert werden kann. Eine Kombination aus beiden Adjuvantien könnte helfen eine abgeschwächte oder nicht vorhandene Antwortfähigkeit gegenüber einer Vakzine zu erhöhen (Hartmann 2000). In ersten klinischen Studien hat CpG-ODN eine geringe Toxizität bei sehr hohen tolerablen Dosen gezeigt (Agrawal 1996). Abgesehen davon könnten Phosphothioat-ODN mit relativ geringem Aufwand, kostengünstig und in großen Mengen produziert werden und somit leicht in klinischen Studien als Adjuvans für eine Immuntherapie von Krebs, Infektionskrankheiten und Allergien (Th2-Übergewicht) zum Einsatz kommen. Der limitierte therapeutische Effekt bei einer systemischen Gabe von CpG-ODN macht jedoch weitere Modifikationen für eine klinische Applikation in solchen Fällen nötig, in denen eine lokale Injektion nicht möglich ist.

4.2 Charakterisierung der Immunantwort – Zusammenspiel von Effektorzellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems

4.2.1 Charakterisierung der Immunantwort *in vitro*

In der Literatur gibt es ebenso wie in den vorliegenden Experimenten zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen bei der Immunantwort gegen Tumoren. So erwiesen sich CD4-Helferzellen als notwendig für die Induktion einer tumorspezifischen CTL-Antwort *in vitro* wie auch *in vivo* in der Maus (Schild 1987; Toes 1999; Ossendorp 2000). In einem Ansatz in dem ein adoptiver Transfer mit spezifischen CD8-T-Zellen durchgeführt wurde, war zwar kein Kotransfer von antigenspezifischen CD4-T-Zellen zur Generierung von CTL nötig, diese hatten jedoch einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der CD8-T-Zellzahlen sowie deren IFN- γ -Produktion und Tumordinfiltration (Marzo 2000). Andere Studien zeigten, dass eine Tumorabstoßung in Abhängigkeit vom jeweiligen Modell, sowohl durch NK-Zellen als auch durch CD8-T-Zellen vermittelt werden kann. So kam es in einem murinen Neuroblastom-Modell zu einer durch CpG-ODN induzierten NK-Zell-abhängigen Tumorabstoßung bzw. zumindest zu einer Wachstumshemmung (Carpentier 1999). Dieselbe NK-Zell-Abhängigkeit konnte durch eine andere Arbeitsgruppe für weitere Tumorarten bestätigt werden, wobei es zusätzlich zur Induktion einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort kam (Kawarada 2001). Was den therapeutischen Einsatz von CpG-ODN betrifft, so muss berücksichtigt werden, dass die Art der Effektorzellen nicht nur vom jeweiligen Tumormodell und seiner Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Zellarten abhängig ist, sondern auch je nach CpG-Motiv unterschiedliche Zellen in besonderem Maße aktiviert werden (Ballas 2001).

Die Ergebnisse aus den vorliegenden Studien am C26-Kolonkarzinom- sowie am Renca-Nierenzellkarzinom-Modell deuten auf eine Beteiligung sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems hin. So weisen Splenozyten aus Mäusen mit einem C26-Tumor während der peritumoralen Therapie mit CpG-ODN 1826 eine erhöhte lytische Aktivität gegenüber beiden Tumorzellarten auf. Es handelt sich dabei also zu einem frühen Zeitpunkt während der Therapie um einen tumorspezifischen Effekt der durch CpG-ODN vermittelt wird. Hierfür sprechen auch Ergebnisse aus tumorfreien Mäusen, bei denen durch die subkutane Injektion von CpG-ODN eine ähnlich hohe lytische Aktivität der Splenozyten erreicht werden konnte. Diese Annahme

wird gestützt durch Untersuchungen des Mäuseserums. Auch in Abwesenheit eines Tumorantigens wird durch die Produktion von IFN- γ die Aktivierung der angeborenen Effektorzellen, wie etwa der NK-Zellen, gesteigert. Der IFN- γ -Spiegel in behandelten und unbehandelten tumorfreen sowie tumortragenden Mäusen wurde einen Tag nach Injektion von CpG-ODN 1826 verglichen. Hierbei wurde in beiden Gruppen eine CpG-ODN abhängige, Tumorantigen-unabhängige Erhöhung der IFN- γ -Produktion im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit vorausgehenden Studien bei Mäusen, die zwei verschiedene Tumorarten gleichzeitig trugen, unter peritumorale CpG-ODN-Therapie eine Kreuzreaktion beobachtet, die auch Auswirkungen auf den unbehandelten Tumor der Gegenseite hatte. Eine solche unspezifische Reaktion trat nicht auf bei *Rechallenge*-Mäusen, die keine Therapie erhielten. Außerdem war im prophylaktischen Modell in Abwesenheit von CD8-T-Zellen eine anti-Tumor-Aktivität zu beobachten. Eine durch CpG-ODN vermittelte Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems wurde schon von anderen Gruppen beschrieben, bei denen es zu erhöhten IL-12- und IFN- γ -Spiegeln und einem Schutz vor intrazellulären Pathogenen kam (Krieg 1998; Zimmermann 1998; Elkins 1999).

Weiterhin interessierte in dieser Arbeit, ob die peritumorale CpG-ODN-Therapie zur Entwicklung einer antigenspezifischen Gedächtnisantwort führte. Splenozyten aus Mäusen, die den Tumor abgestoßen hatten und nach 3 Monaten ohne eine weitere Therapie erneut dieselben Tumorzellen injiziert bekamen, wiesen keine direkte lytische Aktivität gegenüber Zielzellen auf. Erst nach einer mehrtägigen Kokultur mit den spezifischen Antigenen in Form bestrahlter Tumorzellen und unter Verwendung eines T-Zell-favorisierenden Kulturmediums (IL-2 substituiert) zeigte sich eine deutlich erhöhte Tumorzelllyse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt erwies sich *in vitro* als in hohem Maße abhängig von CD8-T-Zellen und zeigte sich nicht gegenüber andersartigen Tumorzellen.

Auch in der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Effektorzellen des angeborenen Immunsystems die Entwicklung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort unterstützen. Ein mögliches Zytokin, das in dieser Verbindung eine Rolle zu spielen scheint ist das erst kürzlich beschriebene IL-21. Als Produkt aktivierter T-Zellen erhöht

es zytotoxische Aktivität sowie IFN- γ -Produktion aktivierter NK-Zellen, antagonisiert aber zugleich deren Überleben und begrenzt dadurch die Aktivitätsdauer. Zusätzlich blockiert es die durch IL-15 induzierte Expansion ruhender NK-Zellen und verhindert somit die Initiierung weiterer angeborener Immunantworten, fördert aber gleichzeitig Proliferation, IFN- γ -Produktion und zytotoxische Aktivität von CD8-Effektorzellen. IL-21 scheint also den Übergang von angeborener in Richtung adaptiver Immunantwort zu fördern (Kasaian 2002).

4.2.2 Entwicklung einer CD8-abhängigen Immunantwort *in vivo*

Das *Priming* antigenspezifischer T-Zellen ist essentiell für die Initiierung einer erfolgreichen anti-Tumor-Antwort. Der Effekt der T-Helferzellen beim *Priming* spezifischer CTL wird durch die Interaktion von CD40 mit CD40-Ligand vermittelt. Hierdurch können naive periphere CTL situationsabhängig aktiviert werden oder lernen, das betreffende Antigen zu tolerieren. Zahlreiche Studien unterstützen die Annahme, dass Tumoren der immunologischen Abstoßung entgehen, indem sie im Immunsystem des Patienten einen Zustand generalisierter Immunsuppression erzeugen. Diese Erklärung mag ausreichen für Tumoren in fortgeschrittenem Stadium, kann aber das Versagen von Vakzinierungen im frühen Stadium nur unzureichend erklären.

Alternativ ist beschrieben worden, dass antigenspezifische T-Zellen durch Treffen auf ihr tumorspezifisches Antigen in einen Zustand der Toleranz gegenüber peripherem Tumorgewebe versetzt werden können (Staveley-O'Carroll 1998). Diese periphere Toleranzinduktion ist sowohl von CD4- als auch von CD8-T-Zellen beschrieben worden. Sie kommt einer Tolerisierung gegenüber körpereigenen peripheren Gewebeanantigenen gleich, die sich außerhalb der lymphatischen Organe befinden. Die Möglichkeit einer solchen außerhalb des Thymus stattfindenden Deletion von für Selbst-Antigene spezifischen CD8-T-Zellen, ist unverzichtbar. Da solche Gewebe normalerweise nicht direkt für naive CD8-Zellen zugänglich sind, würde es ohne diesen Mechanismus zur Ansammlung naiver autoreaktiver T-Zellen kommen (Forster 1996; Kurts 1997). Da Tumoren im Anfangsstadium im Normalfall nicht mit einer Entzündungsreaktion oder einer andersartigen Aktivierung des Immunsystems einhergehen, könnten sie durch ihre große Ähnlichkeit zu dem körpereigenen Gewebe, von dem sie ihren Ursprung nehmen, vom tolerisierenden Zustand der APC profitieren

und damit eine Erklärung für die weit verbreiteten Misserfolge therapeutischer Interventionen bieten. Durch die Schaffung eines proinflammatorischen Milieus in der unmittelbaren Tumorumgebung könnten so in der vorliegenden Arbeit die geeigneten kostimulatorischen Signale für lokale APC geliefert werden.

In den vorliegenden Experimenten kam es im Verlauf einer peritumoralen CpG-Therapie neben der Aktivierung der angeborenen Immunantwort auch zur Entwicklung tumorspezifischer T-Zellen. So blieben Mäuse nach Tumorabstoßung rezidivfrei und waren in vorausgegangenen Studien vor erneuter Tumorinduktion mit denselben Zellen, nicht aber mit einer anderen Tumorart, geschützt. CD8-T-Zellen erwiesen sich als zwingend notwendig für eine Tumorabstoßung, da der therapeutische Erfolg bei deren Fehlen komplett ausblieb. CD4-T-Zellen waren zum Zeitpunkt des Therapiebeginns nicht mehr nötig, so dass alle CD4-depletierten Mäuse den Tumor unter peritumoraler Therapie mit CpG-ODN 1826 abstießen.

4.3 Kombination von dendritischen Zellen und CpG-ODN in der Immuntherapie

4.3.1 Kombination zweier potenter Ansätze in der Therapie maximal großer Tumoren

Die Hauptfunktion der meisten Immunadjuvantien ist die Stimulation von APC. Einige der potentesten Adjuvantien im Mausmodell kommen beim Menschen aufgrund von toxischen Nebenwirkungen nicht zum Einsatz. Zudem fördert das im humanen System anerkannte *Alum* die Ausbildung einer Th2-Antwort, was nicht der Vorstellung von einer wirksamen antitumoralen Immunantwort entspricht. Die *ex vivo* Ausreifung und Aktivierung dendritischer Zellen und deren anschließende Verwendung als Vakzine stellt daher einen erfolgversprechenden Weg dar, mit dem es gelingt, die Toxizität im Patienten zu umgehen.

In einem prophylaktischen Ansatz war in unserer Arbeitsgruppe bereits durch mit CpG-ODN 1826 *in vitro* aktivierte murine DC bei aggressiv wachsenden Tumoren eine effiziente antitumorale Immunität induziert worden (Brunner 2000). In therapeutischen Studien zeigten sowohl ausgereifte DC (Labeur 1999; Brunner 2000; Tatsumi 2001) als auch CpG-ODN für sich alleine einen Effekt bei etablierten Tumoren im Tiermodell

(Kawarada 2001). Der limitierende Faktor in allen genannten Studien ist jedoch die Tumorgröße zu Therapiebeginn. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass das Immunsystem selbst in der Lage ist, große etablierte Tumoren abzustößen, ohne dass die Tiere offensichtliche toxische Nebenwirkungen zeigten. Die Tumoren hatten in diesen Studien eine Größe, bei der herkömmliche Chemotherapien keine Wirkung mehr zeigen. Diese überraschende anti-Tumor-Antwort konnte durch eine Koinjektion reifer antigengepulster DC mit CpG-ODN 1826 an einer vom Tumor entfernten Stelle kombiniert mit einer Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich, erzielt werden.

Die Tatsache, dass es durch alleinige Koinjektion von DC mit CpG-ODN in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke möglich war, Tumoren von mehr als 1 cm Durchmesser vorübergehend im Wachstum zu kontrollieren, eröffnet neue therapeutische Optionen. So ergibt sich die Möglichkeit einer effektiven Therapie in Situationen in denen der Primärtumor an einem für die Injektion unzugänglichen Ort sitzt. Andererseits könnten mit dieser Therapieform auch Metastasen erreicht werden, die sich entweder weit vom Primärtumor entfernt angesiedelt haben oder noch so klein sind, dass sie bisher unerkannt bleiben konnten und somit für eine lokale Injektion nicht zugänglich sind. Weder mit CpG-ODN 1826 noch mit reifen Antigen-gepulsten DC alleine kam es bei Injektion an vom Tumor entfernter Stelle zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums.

Mit der Tumorgröße nimmt auch die Toleranzinduktion durch den Tumor in der Peripherie zu, was zu einer reduzierten anti-Tumor-Aktivität von T-Zellen führt, die an entfernter Stelle durch eine DC-basierte Vakzine aktiviert worden waren. Andererseits setzt ein größerer Tumor lokal mehr inhibierende Faktor frei, die ein T-Zell-*Priming* im drainierenden Lymphknoten uneffektiv machen. Durch die Kombination beider Ansätze kann CpG-ODN dafür sorgen, dass T-Zellen vom Ort der DC-Vakzine in das Tumorgebiet einwandern und kann eine Toleranzinduktion oder Anergie von T-Zellen verhindern helfen. Durch das *Priming* von T-Zellen durch eine potente DC-Vakzine an vom Tumor entfernt liegender Stelle verliert das Versagen eines T-Zell-*Priming* in der Tumorumgebung an Bedeutung. Die vorliegende Arbeit macht deutlich, dass beide Ansätze sich gegenseitig ergänzen können, was in einer exzellenten anti-Tumor-Antwort resultiert.

4.3.2 Bedeutung von Generierung und Reifungsgrad dendritischer Zellen für den Therapieerfolg

Trotz zahlreicher Studien herrscht heute immernoch keine Einigung über den optimalen Reifegrad, die Art des Antigens und die Form der Beladung von DC sowie die Applikationsform einer auf DC basierenden Vakzine. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe war bereits erfolgreich an der Optimierung bisheriger Vakzinierungsstrategien gearbeitet worden. So gelang mit Hilfe biomagnetischer Depletion eine effizientere Isolation pluripotenter Vorläuferzellen aus dem Knochenmark als bisher in der Literatur bekannt. Der Zusatz des Zytokins IL-4 führte zur verbesserten Anreicherung dendritischer Zellen *in vitro*, indem es wie bereits in der Literatur bekannt zur Reduktion des Monozytenanteils in der Kultur führte (Rougier 1998).

Was die Ausreifung der DC *in vitro* angeht, so werden in der Literatur mehrere Protokolle beschrieben. Im allgemeinen hat sich jedoch gezeigt, dass die Verwendung reifer DC als Tumorstoffimpfung der unreifer DC überlegen ist (Labeur 1999; Rieser 1999; Dhodapkar 2001). Es soll keinen Unterschied im Bezug auf den Aktivierungszustand geben, wenn man das Kulturmedium entweder mit hohen Dosen an GM-CSF alleine oder mit niedrigen Dosen in Kombination mit IL-4 substituiert (Lutz 2000). Unreife DC, die mit geringen Konzentrationen an GM-CSF ohne Zusatz von IL-4 kultiviert wurden, erwiesen sich als resistent gegenüber Ausreifung und verlängerten das Überleben eines allogenen Transplantats. Bei der Untersuchung der therapeutischen Effektivität *in vivo* kam es zu einer signifikanten Verschlechterung bei Verwendung von DC, die ohne IL-4 ausgereift worden waren. Dadurch wird einmal mehr deutlich, dass der therapeutische Erfolg in einem bestimmten Tumormodell nicht nur vom Reifegrad und den damit verbundenen Eigenschaften der jeweiligen DC abhängt, sondern auch davon, auf welchem Wege die Ausreifung erfolgte.

In früheren Studien konnte in unserer Arbeitsgruppe erstmals eine signifikante Korrelation des immunologischen Reifegrades dendritischer Zellen zur IL-12-Synthese und T-Zell-Proliferation *in vitro* sowie zur antitumoralen Potenz *in vivo* aufgezeigt werden. CpG-ODN 1826 erwies sich dabei als starker Stimulus, der der bereits untersuchten proinflammatorischen Wirkung von TNF- α deutlich überlegen war. Letzteres kann ohnehin ebenso wie LPS aufgrund seiner starken systemischen Toxizität

in vivo im humanen System nicht zur Anwendung kommen. Diese Beobachtungen sind insbesondere für die therapeutische Anwendung von Bedeutung, da vielmehr der immunologische Reifegrad dendritischer Zellen und nicht etwa deren quantitative Menge den entscheidenden Parameter für eine effiziente antigenspezifische T-Zell-Aktivierung darstellt (Brunner 2000; Jonuleit 2000).

Im Hinblick auf eine Verwendung dendritischer Zellen als Tumorstoffe muss jedoch berücksichtigt werden, dass das für die Ausreifung so wichtige IL-4 ein zentrales Zytokin der Th2-Immunantwort darstellt und somit die Bildung des proinflammatorischen Zytokins IL-12 antagonisieren kann (Koch 1996). IL-12 wird von DC gebildet und ist von zentraler Bedeutung für die Induktion einer für die Tumorstoffung wichtigen Th1-Antwort und der damit verbundenen Stimulation von NK-Zellen, zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten sowie IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten. Es gilt also zu verhindern, dass der Zusatz von IL-4 gleichzeitig zu einer unerwünschten Supprimierung der IL-12-Synthese führt.

Weiterhin dürfen Hinweise auf eine dynamische Regulation der Generation von Effektor- und Gedächtniszellen während einer Immunantwort nicht vernachlässigt werden. So stellten Forscher der Arbeitsgruppe *Langenkamp et al.* in ihren Studien fest, dass DC nach Stimulation mit LPS nur vorübergehend IL-12 produzierten und refraktär gegenüber weiterer Stimulation wurden. Diese Erschöpfung der Zytokinproduktion wirkte sich auf den darauffolgenden Polarisationsprozess der T-Zellen aus. So induzierten DC kurz nach ihrer Stimulation starke Th1-Antworten, während dieselben Zellen zu einem späteren Zeitpunkt vor allem Th2- und nicht-polarisierte Gedächtniszellen induzierten. Die Bedingungen für T-Zell-*Priming* können sich also während einer Immunantwort innerhalb des Lymphknotens ändern (Langenkamp 2000). Die Unfähigkeit zu reagieren bzw. die Erschöpfung der Zytokinproduktion erwies sich als generelles Phänomen, das sich auf verschiedene Reifungsstimuli erstreckt und auch für andere Zelllinien außer DC zutreffen kann. Diese Ergebnisse legen nahe, dass nicht der DC-Subtyp, sondern die Kinetik des Aktivierungsprozesses über die Art der induzierten Immunantwort entscheiden. Andere Faktoren wie die Konzentration des jeweiligen Antigens oder kostimulatorischer Moleküle tragen zur Entscheidungsfindung bei.

4.3.3 Wege der Antigenbeladung und Vakzinierungsprotokoll dendritischer Zellen

Es werden verschiedene Methoden bezüglich der Beladung von DC mit Antigen *in vitro* in der Literatur beschrieben. So wurde die Methode der Fusion dendritischer Zellen mit inaktivierten Tumorzellen (Gong 1997) direkt mit dem Verfahren der Kokultur (Celluzzi 1998) verglichen. Dabei konnte *in vivo* kein Unterschied in der Induktion antitumoraler Immunität nachgewiesen werden, so dass die einfachere Methode der Kokultivierung mit bestrahlten Tumorzellen vorgezogen wurde. Für die Applikationsform der Vakzine hat sich gezeigt, dass sich i.v. injizierte DC hauptsächlich in der Milz ansammeln, während s.c. applizierte DC in die T-Zellregionen der drainierenden Lymphknoten wandern. Nur nach subkutaner Therapie in einem B16-Melanommodell kam es zu einer Wachstumsverlangsamung des Tumors, verbessertem Überleben sowie gesteigerter antitumoraler zytotoxischer T-Zellaktivität (Eggert 1999). Studien mit Peptid-gepulsten DC zeigten außerdem, dass die Applikationsform den anatomischen Ort und den Zeitpunkt einer CTL-Antwort aber nicht deren Stärke beeinflusste (Serody 2000).

4.3.4 Zukunft der DC-Vakzine im humanen System – Unterschiede zwischen Mensch und Maus sowie subkutanem und orthotopem Tumormodell

Zunächst sollte erwähnt werden, dass die Experimente der vorliegenden Arbeit mit der aggressiv wachsenden Kolonkarzinomzelllinie C26 an Balb/c Mäusen durchgeführt wurden, die bekannt sind für die deutliche Bevorzugung einer Th2-Antwort (Hsieh 1995). Dennoch gelang es den Mäusen unter Therapie mit DC und CpG-ODN an entfernter Stelle kombiniert mit CpG-ODN im Tumorrandbereich, etablierte Tumoren abzustößten oder zumindest deren Wachstum zu verlangsamen. Immunantworten mit antitumoralem Effekt sind im allgemeinen vom Th1-Typ, so dass es sich bei einem schnell proliferierenden Tumor in einem Balb/c-Modell um suboptimale Bedingungen handelt und man nicht von vornherein einen so guten therapeutischen Effekt erwarten würde. Die schnelle Entwicklung der Tumoren nach subkutaner Induktion reduziert allerdings sicherlich das Auftreten von Mutationen, das bei Tumorpatienten so verbreitet ist und erleichtert damit eventuell die Therapie indem es die Zahl der Tumorantigene begrenzt. Im humanen System können außerdem erhebliche Unterschiede bestehen zwischen der Antigenexpression auf dem Primärtumor und auf

von diesem ausgehenden Metastasen (Klein 2000). Diese Tatsache ist für eine potentielle Anwendung dendritischer Zellen im humanen System nicht unbedeutend. Erste klinische Phase I- und II-Studien am malignen Melanom (Nestle 1998; Lau 2001), Prostatakarzinom (Murphy 1999), B-Zell-Lymphom (Hsu 1996), Nierenzellkarzinom (Holtl 1999), Glioblastom (Yu 2001) oder auch gastrointestinalen Tumoren (Sadanaga 2001) konnten nur in Einzelfällen eine partielle Tumorregression zeigen. Angesichts fehlender kontrollierter klinischer Studien ist eine quantitative Bewertung der antitumoralen Immuntherapie beim Menschen schwierig, jedoch deuten die bisherigen Studien im Vergleich zum experimentellen (murinen) System auf einen bislang limitierten klinischen Erfolg hin.

In Übereinstimmung mit Beschreibungen in der Literatur zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation des immunologischen Reifegrades dendritischer Zellen mit deren antitumoraler Aktivität *in vivo*, was mit dem bislang bekannten Verständnis um die Physiologie und immunologische Funktion dieser Zellen gut erklärbar ist. So sind unreife DC spezialisiert für die Antigenaufnahme und -prozessierung, ihnen fehlen jedoch die zur T-Zell-Aktivierung notwendigen Signale. Im Gegensatz hierzu besitzen terminal ausdifferenzierte oder reife DC mehr als andere APC die Fähigkeit zum *Priming* von T-Zellen (Banchereau 1998). Wie schon ausführlich beschrieben unterliegen dendritische Zellen *in vivo* jedoch häufig einer funktionellen Supprimierung durch vom Tumor sezernierte inhibierende Substanzen (Alleva 1994; Gabrilovich 1996; Enk 1997), die eine effiziente antitumorale Immunantwort unmöglich macht. Dabei kommt es zu einem deutlichen Verlust kostimulatorischer (CD80/CD86) und Antigen-präsentierender Moleküle (Nestle 1997).

Neben einem Versagen der Immuntherapie darf aber auch die Gefahr der Induktion einer überschießenden Immunantwort nicht außer Acht gelassen werden. Viele der in der Immuntherapie verwendeten Tumor-assoziierten Antigene (z.B. CEA, Her2/neu) werden auch von gesundem körpereigenen Gewebe exprimiert, so dass eine Vakzine auf Basis dendritischer Zellen theoretisch die Gefahr schwerer Autoimmunerkrankungen mit sich bringt. Entgegen allen Befürchtungen und experimentellen Beobachtungen, konnten jedoch in den bisher beschriebenen klinischen Studien keine schweren systemischen Reaktionen festgestellt werden. Mögliche autoreaktive Nebenwirkungen blieben meist auf die Organe beschränkt von denen die Tumoren ihren

Ursprung genommen hatten. So kam es beispielsweise bei Behandlung eines malignen Melanoms durch Destruktion der Melanozyten zu einer ausgeprägten Vitiligo (Yee 2000; Nestle 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten weder durch *in vitro* ausgereifte DC noch durch CpG-ODN als Einzelsubstanz oder der vielversprechenden Kombination aus beiden offensichtliche systemische Nebenwirkungen beobachtet werden.

Bei einer direkten Übertragung von Ergebnissen aus murinen Studien auf den Menschen muss, neben dem ausführlich beschriebenen Unterschied in der Art der direkt beeinflussten Zellen und der Sequenz der spezifischen CpG ODN, das Augenmerk auch in besonderem Maße auf die verschiedenen DC-Subtypen gerichtet werden (Shortman 2002). Die überwiegende Mehrzahl von in experimentellen Mausmodellen verwendeten DC stammen von Knochenmarkvorläuferzellen ab. Die meisten *in vitro*- wie *in vivo*-Studien im humanen System beinhalten dagegen DC, die in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 aus adhärennten Monozyten des peripheren Blutes generiert wurden. Die Entwicklung eines Protokolls zur Generierung und Charakterisierung Monozyten-abgeleiteter Maus-DC stellte somit ein wichtiges Instrument zur Untersuchung fundamentaler Aspekte der DC-Biologie dar und kann bei der Suche nach dem für die Induktion einer antitumoralen Immunität am besten geeigneten DC-Subtyp helfen (Schreurs 1999).

In der vorliegenden Arbeit war es in einem Th2-favorisierenden Mausmodell gelungen, ein schnell proliferierendes subkutan induziertes C26-Kolonkarzinom mit einer CpG-ODN-Monotherapie oder einer Kombinationstherapie aus CpG ODN und DC zu heilen. Es liegt nun die Frage nahe, ob ein solcher Therapieeffekt auch bei Tumoren zu erzielen ist, die orthotop, also im Kolon selbst induziert wurden.

Neben der natürlichen Darmflora, die physiologischerweise eine erhöhte Konzentration an bakterieller DNA mit sich bringt sowie einer unterschiedlichen Enzymzusammensetzung vor Ort, weist auch das darmeigene Immunsystem einige Besonderheiten auf, die dem der Haut ähnlich sind. Beide sind vorrangige Ziele für Pathogen-Invasion und Tumorformation als Reaktion auf genotoxische Stressfaktoren wie UV-Licht oder darmassoziierte Karzinogene. Sowohl der Darm als auch die Haut besitzen eine besondere Art residenter T-Zellen, die als intraepitheliale Lymphozyten (IELs)

bezeichnet werden. Innerhalb dieser Zellpopulation ist der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen um ein vielfaches höher als im peripheren Blut. Letztere verfügen über eine besonders starke Fähigkeit zur Interaktion mit NK-Zellen. Es liegt deshalb nahe zu vermuten, dass die NK-Zell-vermittelte Immunantwort in Darmmukosa und Haut eine größere Rolle bei der anti-Tumor-Antwort spielt als an anderen Stellen des Körpers. Bekannterweise unterscheidet sich das Vorkommen der DC-Subtypen von Organ zu Organ. Nur in mukosalem lymphatischem Gewebe wurde ein DC-Typ identifiziert, der über im Vergleich zu nicht-mukosalem Gewebe einzigartige immuninduktive Fähigkeiten verfügt (Anjuere 1999; Iwasaki 2001). Eine zu geringe Verfügbarkeit potenter DC könnte den therapeutischen Erfolg jedoch einschränken. So kommen im gesunden Kolongewebe dreimal so viele DC vor wie im Tumorrandbereich von primären Kolontumoren und 18-mal so viele wie in metastasierten Tumoren (Schwaab 2001).

Erste klinische Studien zeigten bereits die Induktion einer mukosalen Immunantwort durch den Einsatz eines bakteriellen Stimulus. Durch eine intratumorale Injektion von OK-432, einem Lyophilisat aus *Streptococcus pyogenes*, ließ sich die 5-FU-Konzentration im Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalen Karzinomen erhöhen. Die Erhöhung korrelierte mit einer Invasion von Makrophagen in das Tumorgebiet und zeigt damit eine Reaktion des mukosalen Immunsystems auf diesen bakteriellen, koloskopisch induzierten Stimulus (Amano 2000).

In Anlehnung an diese ersten Ergebnisse bleibt nun zu untersuchen, ob eine lokal in den Darm applizierte CpG-ODN-Therapie oder eine Kombinationstherapie aus CpG-ODN und DC zu einer ähnlichen tumorspezifischen Immunität führt.

5 Zusammenfassung

Eine Infektion mit mikrobiellen Erregern ist die klassische Situation, in der es zu einem schnellen Auftreten einer effektiven Immunabwehr kommt. In der vorliegenden Arbeit wurden CpG-Oligodesoxynukleotide verwendet, um eine bakterielle Infektion in Tumornähe zu imitieren.

Aufgabe dieser Arbeit war es, in einem murinen Tumormodell den in vorausgegangen Studien bereits gezeigten therapeutischen Effekt einer *in vivo*-Applikation von CpG-Oligonukleotiden alleine und in Kombination mit dendritischen Zellen näher zu untersuchen. So sollte der Mechanismus, der zu einer effektiven anti-Tumor-Aktivität führt, durch die Charakterisierung der Immunantwort *in vitro* und *in vivo* aufgedeckt werden.

In den dieser Fragestellung zu Grunde liegenden Versuchen erwies sich die Monotherapie mit CpG-Oligonukleotiden als wenig effektiv im prophylaktischen Modell jedoch als hoch wirksam gegen etablierte Tumoren im therapeutischen Modell. Tiere, die den Tumor nach peritumorale CpG-Therapie vollständig abgestoßen hatten, blieben rezidivfrei und waren vor einer erneuten Injektion mit denselben Tumorzellen geschützt.

Erste *in vitro*-Untersuchungen wiesen auf eine frühe Beteiligung des unspezifischen angeborenen Immunsystems unter wöchentlicher peritumorale Therapie mit CpG-Oligonukleotiden hin. Die lytische Aktivität muriner Splenozyten war hierbei unabhängig von einer vorangegangenen Exposition gegenüber Tumorantigenen und konnte auch in tumorfreien Mäusen während CpG-Therapie beobachtet werden. Zusammen mit der Tatsache, dass die lytische Aktivität nicht auf eine bestimmte Tumorart beschränkt war, sprachen diese Ergebnisse gegen eine Lyse durch Antigen-spezifische T-Zellen und für eine Lyse von Tumorzellen durch CpG-Oligonukleotid-aktivierte Effektorzellen des angeborenen Immunsystems.

Auch die zuvor *in vivo* beobachtete Ausbildung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort konnte schließlich *in vitro* bestätigt werden: Splenozyten aus Mäusen, die unter Therapie mit CpG-Oligonukleotiden einen Tumor abgestoßen hatten, zeigten nach

Restimulation mit dem spezifischen Tumorantigen *in vitro* eine deutlich höhere Tumorzelllyse als solche aus unbehandelten Kontrollmäusen. Dieser Effekt trat bei Verwendung einer Kontrollzelllinie nicht auf und konnte durch eine Depletion von CD8-T-Zellen im Vergleich zu Gesamtsplenozyten deutlich reduziert werden. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass Mäuse, die einen Tumor unter peritumoraler Therapie mit CpG-Oligonukleotiden abgestoßen hatten, eine Antigen-spezifische von Gedächtnis-CD8-T-Zellen abhängige Immunantwort ausbildeten, die sie vor erneuter Tumorinduktion schützte.

In vivo erwiesen sich CD4-T-Zellen zum Zeitpunkt des Therapiebeginns als nicht mehr notwendig für eine Abstoßung des Tumors. Dagegen verstarben alle Tiere, bei denen CD8-T-Zellen depletiert worden waren. Hinweise auf die gleichzeitige Beteiligung unspezifischer Effektorzellen ergaben sich im prophylaktischen Modell.

Auf Grund der Unterschiede zwischen murinem und humanem Immunsystem, ist eine direkte Übertragung der Ergebnisse aus dem Mausmodell in die Klinik nicht möglich. Dennoch kann man aus der vorliegenden Arbeit einige wichtige Rückschlüsse ziehen. Bei der Abstoßung großer etablierter Tumoren kommt es zur Ausbildung einer tumorspezifischen CD8-abhängigen Gedächtnisantwort. Das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunität macht die eindrucksvolle therapeutische Aktivität einer Kombinationstherapie aus CpG-Oligonukleotiden und dendritischen Zellen möglich. Die in der vorliegenden Arbeit näher charakterisierte Immuntherapieform ist damit anderen bisher angewandten Verfahren an Aktivität überlegen, was sich in der kompletten Ausheilung sehr großer etablierter Tumoren zeigt. Die Charakterisierung der Immunantwort leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der anti-Tumor-Wirkung von CpG-Oligonukleotiden und liefert somit Hinweise für eine Anwendung in klinischen Studien.

6 Literaturverzeichnis

- Aderem, A. and Ulevitch, R. J. (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* 406(6797): 782-7.
- Adler, A. J., Marsh, D. W., Yochum, G. S., Guzzo, J. L., Nigam, A., Nelson, W. G. and Pardoll, D. M. (1998). "CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells." *J Exp Med* 187(10): 1555-64.
- Agrawal, S. (1996). "Antisense oligonucleotides: towards clinical trials." *Trends Biotechnol* 14(10): 376-87.
- Akira, S. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Adv Immunol* 78: 1-56.
- Alleva, D. G., Burger, C. J. and Elgert, K. D. (1994). "Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2." *J Immunol* 153(4): 1674-86.
- Amano, M., Sekimoto, M., Monden, T., Tomita, N., Ohue, M., Haba, A., Sakita, I., Tamaki, Y. and Monden, M. (2000). "Selective augmentations of intratumoral 5-fluorouracil concentration by local immunotherapy with OK-432 and fibrinogen." *Dis Colon Rectum* 43(3): 402-7.
- Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I. and de Gramont, A. (2004). "Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer." *N Engl J Med* 350(23): 2343-51.
- Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M. L., del Hoyo, G. M., Wright, N. and Ardavin, C. (1999). "Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse." *Blood* 93(2): 590-8.
- Armitage, R. J., Namen, A. E., Sassenfeld, H. M. and Grabstein, K. H. (1990). "Regulation of human T cell proliferation by IL-7." *J Immunol* 144(3): 938-41.
- Ballas, Z. K., Krieg, A. M., Warren, T., Rasmussen, W., Davis, H. L., Waldschmidt, M. and Weiner, G. J. (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." *J Immunol* 167(9): 4878-86.
- Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L. and Krieg, A. M. (1996). "Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA." *J Immunol* 157(5): 1840-5.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.

- Banchereau, J., Schuler-Thurner, B., Palucka, A. K. and Schuler, G. (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." *Cell* 106(3): 271-4.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-52.
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G. B. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9237-42.
- Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G. B., Wagner, H. and Heeg, K. (1999). "CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells." *Eur J Immunol* 29(4): 1209-18.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature* 393(6684): 478-80.
- Berliner-Klinische-Wochenschrift (23. März 1868). *Berliner Klinische Wochenschrift*: S. 137 f.
- Bird, A. P., Taggart, M. H., Nicholls, R. D. and Higgs, D. R. (1987). "Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene." *Embo J* 6(4): 999-1004.
- Blazar, B. R., Krieg, A. M. and Taylor, P. A. (2001). "Synthetic unmethylated cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides are potent stimulators of antileukemia responses in naive and bone marrow transplant recipients." *Blood* 98(4): 1217-25.
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. and Gilboa, E. (1996). "Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo." *J Exp Med* 184(2): 465-72.
- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A. (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* 12: 337-65.
- Boon, T., Coulie, P., Marchand, M., Weynants, P., Wolfel, T. and Brichard, V. (1994). "Genes coding for tumor rejection antigens: perspectives for specific immunotherapy." *Important Adv Oncol*: 53-69.
- Braun, S., Gerhartz, H. H. and Schmetzer, H. M. (2000). "Lymphokine-activated killer (LAK) cells and cytokines synergize to kill clonal cells in acute myeloid leukemia (AML) in vitro." *Haematologia* 30(4): 271-88.
- Bronte, V., Chappell, D. B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P. and Restifo, N. P. (1999). "Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation." *J Immunol* 162(10): 5728-37.

- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H. A., Krieg, A. M., Hartmann, G. and Endres, S. (2000). "Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate- guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti- tumor immune responses in vivo." *J Immunol* 165(11): 6278-86.
- Candido, K. A., Shimizu, K., McLaughlin, J. C., Kunkel, R., Fuller, J. A., Redman, B. G., Thomas, E. K., Nickoloff, B. J. and Mule, J. J. (2001). "Local administration of dendritic cells inhibits established breast tumor growth: implications for apoptosis-inducing agents." *Cancer Res* 61(1): 228-36.
- Carpentier, A. F., Chen, L., Maltonti, F. and Delattre, J. Y. (1999). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice." *Cancer Res* 59(21): 5429-32.
- Carpentier, A. F., Xie, J., Mokhtari, K. and Delattre, J. Y. (2000). "Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs." *Clin Cancer Res* 6(6): 2469-73.
- Celluzzi, C. M. and Falo, L. D., Jr. (1998). "Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection." *J Immunol* 160(7): 3081-5.
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L. (2001). "Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity." *Immunol Rev* 181: 158-69.
- Chace, J. H., Hooker, N. A., Mildenstein, K. L., Krieg, A. M. and Cowdery, J. S. (1997). "Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12." *Clin Immunol Immunopathol* 84(2): 185-93.
- Chaux, P., Hammann, A., Martin, F. and Martin, M. (1993). "Surface phenotype and functions of tumor-infiltrating dendritic cells: CD8 expression by a cell subpopulation." *Eur J Immunol* 23(10): 2517-25.
- Chiodoni, C., Paglia, P., Stoppacciaro, A., Rodolfo, M., Parenza, M. and Colombo, M. P. (1999). "Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response." *J Exp Med* 190(1): 125-33.
- Coley, W. B. (1991). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893." *Clin Orthop*(262): 3-11.
- Cowdery, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K. and Krieg, A. M. (1996). "Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides." *J Immunol* 156(12): 4570-5.
- Davila, E. and Celis, E. (2000). "Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine- containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity." *J Immunol* 165(1): 539-47.

- Davis, H. L., Suparto, II, Weeratna, R. R., Jumintarto, Iskandriati, D. D., Chamzah, S. S., Ma'ruf, A. A., Nente, C. C., Pawitri, D. D., Krieg, A. M., Heriyanto, Smits, W. and Sajuthi, D. D. (2000). "CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans." *Vaccine* 18(18): 1920-4.
- Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., Krieg, A. M. and Weeranta, R. (1998). "CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen." *J Immunol* 160(2): 870-6.
- Decker, T., Schneller, F., Sparwasser, T., Tretter, T., Lipford, G. B., Wagner, H. and Peschel, C. (2000). "Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells." *Blood* 95(3): 999-1006.
- Deutsche-Krebsgesellschaft (2001).
- Deutsche-Urologisch-Internistische-Multicenter-Gruppe (2002). "Interleukin-2 und Interferon- α 2a- neue Hoffnung für Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom zur kombinierten Immun- und Chemotherapie." *Onkologie*.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. and Bhardwaj, N. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." *J Exp Med* 193(2): 233-8.
- Dubois, B., Vanbervliet, B., Fayette, J., Massacrier, C., Van Kooten, C., Briere, F., Banchereau, J. and Caux, C. (1997). "Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes." *J Exp Med* 185(5): 941-51.
- Dummer, W., Becker, J. C., Schwaaf, A., Leverkus, M., Moll, T. and Brocker, E. B. (1995). "Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma." *Melanoma Res* 5(1): 67-8.
- Egeter, O., Mocikat, R., Ghoreschi, K., Dieckmann, A. and Rocken, M. (2000). "Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice." *Cancer Res* 60(6): 1515-20.
- Eggert, A. A., Schreurs, M. W., Boerman, O. C., Oyen, W. J., de Boer, A. J., Punt, C. J., Figdor, C. G. and Adema, G. J. (1999). "Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration." *Cancer Res* 59(14): 3340-5.
- Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., Stibitz, S., Conover, J. S. and Klinman, D. M. (1999). "Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria." *J Immunol* 162(4): 2291-8.
- Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J. and Knop, J. (1997). "Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma." *Int J Cancer* 73(3): 309-16.

- Enk, A. H., Saloga, J., Becker, D., M. B. P. and Knop, J. (1994). "Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo." *J Exp Med* 179(4): 1397-402.
- Flanigan, R. C., Salmon, S. E., Blumenstein, B. A., Bearman, S. I., Roy, V., McGrath, P. C., Caton, J. R., Jr., Munshi, N. and Crawford, E. D. (2001). "Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer." *N Engl J Med* 345(23): 1655-9.
- Folprecht, G. and Kohne, C. H. (2004). "The role of new agents in the treatment of colorectal cancer." *Oncology* 66(1): 1-17.
- Forster, I. and Lieberam, I. (1996). "Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolescent mice." *Eur J Immunol* 26(12): 3194-202.
- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. and Carbone, D. P. (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." *Nat Med* 2(10): 1096-103.
- Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." *Nat Med* 5(11): 1249-55.
- Geldhof, A. B., Moser, M., Lespagnard, L., Thielemans, K. and De Baetselier, P. (1998). "Interleukin-12-activated natural killer cells recognize B7 costimulatory molecules on tumor cells and autologous dendritic cells." *Blood* 91(1): 196-206.
- Gong, J., Avigan, D., Chen, D., Wu, Z., Koido, S., Kashiwaba, M. and Kufe, D. (2000). "Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2715-8.
- Gong, J., Chen, L., Chen, D., Kashiwaba, M., Manome, Y., Tanaka, T. and Kufe, D. (1997). "Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells." *Gene Ther* 4(10): 1023-8.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. and Liu, Y. J. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* 185(6): 1101-11.
- Hanna, M. G., Jr., Hoover, H. C., Jr., Vermorken, J. B., Harris, J. E. and Pinedo, H. M. (2001). "Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise." *Vaccine* 19(17-19): 2576-82.
- Harris, J. E., Ryan, L., Hoover, H. C., Jr., Stuart, R. K., Oken, M. M., Benson, A. B., 3rd, Mansour, E., Haller, D. G., Manola, J. and Hanna, M. G., Jr. (2000). "Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283." *J Clin Oncol* 18(1): 148-57.
- Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000). "Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells." *J Immunol* 164(2): 944-53.

- Hartmann, G., Weeratna, R. D., Ballas, Z. K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W. L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R. H., Davis, H. L. and Krieg, A. M. (2000). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." *J Immunol* 164(3): 1617-24.
- Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M. (1999). "CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9305-10.
- Heeg, K., Sparwasser, T., Lipford, G. B., Hacker, H., Zimmermann, S. and Wagner, H. (1998). "Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(7): 464-9.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* 408(6813): 740-5.
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N. and Schuler, G. (1996). "Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells." *Eur J Immunol* 26(3): 659-68.
- Holtl, L., Rieser, C., Papesh, C., Ramoner, R., Herold, M., Klocker, H., Radmayr, C., Stenzl, A., Bartsch, G. and Thurnher, M. (1999). "Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells." *J Urol* 161(3): 777-82.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., O'Garra, A. and Murphy, K. M. (1995). "T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro." *J Exp Med* 181(2): 713-21.
- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G. and Levy, R. (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen- pulsed dendritic cells." *Nat Med* 2(1): 52-8.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R. and Kabbinavar, F. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." *N Engl J Med* 350(23): 2335-42.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R. M. (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* 176(6): 1693-702.
- Iwasaki, A. and Kelsall, B. L. (2001). "Unique functions of CD11b⁺, CD8 alpha⁺, and double-negative Peyer's patch dendritic cells." *J Immunol* 166(8): 4884-90.
- Jahrsdorfer, B., Hartmann, G., Racila, E., Jackson, W., Muhlenhoff, L., Meinhardt, G., Endres, S., Link, B. K., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (2001). "CpG DNA

- increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens." *J Leukoc Biol* 69(1): 81-8.
- Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C. and Vogel, J. C. (1998). "Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA." *J Immunol* 161(6): 3042-9.
- Jehle, E. C., Bokemeyer, C., Budach, W. and al., e. (2003). "Kolonkarzinome, Rektumkarzinom, Analkarzinom." Interdisziplinäres Tumorzentrum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Jones, T. R., Obaldia, N., 3rd, Gramzinski, R. A., Charoenvit, Y., Kolodny, N., Kitov, S., Davis, H. L., Krieg, A. M. and Hoffman, S. L. (1999). "Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys." *Vaccine* 17(23-24): 3065-71.
- Jonuleit, H., Giesecke, A., Kandemir, A., Paragnik, L., Knop, J. and Enk, A. H. (2000). "Induction of tumor peptide-specific cytotoxic T cells under serum-free conditions by mature human dendritic cells." *Arch Dermatol Res* 292(7): 325-32.
- Kasaian, M. T., Whitters, M. J., Carter, L. L., Lowe, L. D., Jussif, J. M., Deng, B., Johnson, K. A., Witek, J. S., Senices, M., Konz, R. F., Wurster, A. L., Donaldson, D. D., Collins, M., Young, D. A. and Grusby, M. J. (2002). "IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity." *Immunity* 16(4): 559-69.
- Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B. and Hammerling, G. J. (2001). "NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides." *J Immunol* 167(9): 5247-53.
- Klein, C. A. (2000). "The biology and analysis of single disseminated tumour cells." *Trends Cell Biol* 10(11): 489-93.
- Kline, J. N., Waldschmidt, T. J., Businga, T. R., Lemish, J. E., Weinstock, J. V., Thorne, P. S. and Krieg, A. M. (1998). "Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma." *J Immunol* 160(6): 2555-9.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N. and Schuler, G. (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." *J Exp Med* 184(2): 741-6.
- Koido, S., Kashiwaba, M., Chen, D., Gendler, S., Kufe, D. and Gong, J. (2000). "Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA." *J Immunol* 165(10): 5713-9.
- Krieg, A. M. (1996). "An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA." *J Lab Clin Med* 128(2): 128-33.

- Krieg, A. M., Love-Homan, L., Yi, A. K. and Harty, J. T. (1998). "CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge." *J Immunol* 161(5): 2428-34.
- Krieg, A. M. and Stein, C. A. (1995). "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or anti-protein?" *Antisense Res Dev* 5(4): 241.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Schorr, J. and Davis, H. L. (1998). "The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines." *Trends Microbiol* 6(1): 23-7.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G. (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* 31(7): 2154-63.
- Kufe, D. W. (2000). "Smallpox, polio and now a cancer vaccine?" *Nat Med* 6(3): 252-3.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." *J Exp Med* 186(2): 239-45.
- Labeur, M. S., Roters, B., Pers, B., Mehling, A., Luger, T. A., Schwarz, T. and Grabbe, S. (1999). "Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage." *J Immunol* 162(1): 168-75.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." *Nat Immunol* 1(4): 311-6.
- Lau, R., Wang, F., Jeffery, G., Marty, V., Kuniyoshi, J., Bade, E., Ryback, M. E. and Weber, J. (2001). "Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma." *J Immunother* 24(1): 66-78.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-83.
- Liang, H., Nishioka, Y., Reich, C. F., Pisetsky, D. S. and Lipsky, P. E. (1996). "Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides." *J Clin Invest* 98(5): 1119-29.
- Lipford, G. B., Bendigs, S., Heeg, K. and Wagner, H. (2000). "Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines." *Immunology* 101(1): 46-52.
- Lipford, G. B., Sparwasser, T., Bauer, M., Zimmermann, S., Koch, E. S., Heeg, K. and Wagner, H. (1997). "Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines." *Eur J Immunol* 27(12): 3420-6.

- Liu, H. M., Newbrough, S. E., Bhatia, S. K., Dahle, C. E., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (1998). "Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Blood* 92(10): 3730-6.
- Lucas, A. D. and Halliday, G. M. (1999). "Progressor but not regressor skin tumours inhibit Langerhans' cell migration from epidermis to local lymph nodes." *Immunology* 97(1): 130-7.
- Luo, Y., Chen, X., Downs, T. M., DeWolf, W. C. and O'Donnell, M. A. (1999). "IFN-alpha 2B enhances Th1 cytokine responses in bladder cancer patients receiving *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin immunotherapy." *J Immunol* 162(4): 2399-405.
- Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L., Kukutsch, N. A., Rossner, S., Schuler, G. and Austyn, J. M. (2000). "Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo." *Eur J Immunol* 30(7): 1813-22.
- Mamounas, E. P., Wieand, H. S., Jones, J., Wickerham, D. L. and Wolmark, N. (1997). "Future directions in the adjuvant treatment of colon cancer." *Oncology (Huntingt)* 11(9 Suppl 10): 44-7.
- Marzo, A. L., Kinnear, B. F., Lake, R. A., Frelinger, J. J., Collins, E. J., Robinson, B. W. and Scott, B. (2000). "Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity." *J Immunol* 165(11): 6047-55.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." *Science* 296(5566): 301-5.
- McLellan, A. D., Starling, G. C., Williams, L. A., Hock, B. D. and Hart, D. N. (1995). "Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule." *Eur J Immunol* 25(7): 2064-8.
- Medzhitov, R. (2001). "CpG DNA: security code for host defense." *Nat Immunol* 2(1): 15-6.
- Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* 106(3): 255-8.
- Messina, J. P., Gilkeson, G. S. and Pisetsky, D. S. (1991). "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA." *J Immunol* 147(6): 1759-64.
- Murphy, G. P., Tjoa, B. A., Simmons, S. J., Jarisch, J., Bowes, V. A., Ragde, H., Rogers, M., Elgamal, A., Kenny, G. M., Cobb, O. E., Ireton, R. C., Troychak, M. J., Salgaller, M. L. and Boynton, A. L. (1999). "Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease." *Prostate* 38(1): 73-8.

-
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. and Schadendorf, D. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* 4(3): 328-32.
- Nestle, F. O., Banchereau, J. and Hart, D. (2001). "Dendritic cells: On the move from bench to bedside." *Nat Med* 7(7): 761-5.
- Nestle, F. O., Burg, G., Fah, J., Wrone-Smith, T. and Nickoloff, B. J. (1997). "Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells." *Am J Pathol* 150(2): 641-51.
- Old, L. J. (1992). "Tumor immunology: the first century." *Curr Opin Immunol* 4(5): 603-7.
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J. and Lund-Johansen, F. (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12551-6.
- Ossendorp, F., Toes, R. E., Offringa, R., van der Burg, S. H. and Melief, C. J. (2000). "Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity." *Immunol Lett* 74(1): 75-9.
- Pitot, H. C. and Goldberg, R. M. (2001). "Future directions in adjuvant therapy for stage III colon carcinoma." *Oncology (Huntingt)* 15(3 Suppl 5): 31-6.
- Pulendran, B., Smith, J. L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E. and Maliszewski, C. R. (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3): 1036-41.
- Richardson, P., Hideshima, T. and Anderson, K. (2002). "Thalidomide: emerging role in cancer medicine." *Annu Rev Med* 53: 629-57.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F. and Matzinger, P. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* 393(6684): 474-8.
- Rieser, C., Ramoner, R., Holtl, L., Rogatsch, H., Papesh, C., Stenzl, A., Bartsch, G. and Thurnher, M. (1999). "Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma." *Urol Int* 63(3): 151-9.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. and Liu, Y. J. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." *Science* 283(5405): 1183-6.
- Robert-Koch-Institut (2002).
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., White, D. E. and Steinberg, S. M. (1998). "Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose

- interleukin-2: identification of the antigens mediating response." *Ann Surg* 228(3): 307-19.
- Rougier, N., Schmitt, D. and Vincent, C. (1998). "IL-4 addition during differentiation of CD34 progenitors delays maturation of dendritic cells while promoting their survival." *Eur J Cell Biol* 75(3): 287-93.
- Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., Yamaguchi, H., Ohta, M., Fujie, T., Tanaka, F., Inoue, H., Takesako, K., Akiyoshi, T. and Mori, M. (2001). "Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas." *Clin Cancer Res* 7(8): 2277-84.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* 182(2): 389-400.
- Salup, R. R., Herberman, R. B., Chirigos, M. A., Back, T. and Wiltout, R. H. (1985). "Therapy of peritoneal murine cancer with biological response modifiers." *J Immunopharmacol* 7(4): 417-36.
- Sasamura, H., Takahashi, A., Miyao, N., Yanase, M., Masumori, N., Kitamura, H., Itoh, N. and Tsukamoto, T. (2002). "Inhibitory effect on expression of angiogenic factors by antiangiogenic agents in renal cell carcinoma." *Br J Cancer* 86(5): 768-73.
- Schalhorn, A., Siebeck, M. and Bumm, R. (2001). "Kolonkarzinome." *Tumorzentrum München: Manual Gastrointestinale Tumore* 6. Auflage, München.
- Schild, H. J., Kyewski, B., Von Hoegen, P. and Schirmacher, V. (1987). "CD4+ helper T cells are required for resistance to a highly metastatic murine tumor." *Eur J Immunol* 17(12): 1863-6.
- Schirmbeck, R. and Reimann, J. (1994). "Targeting of exogenous protein antigens to a novel endosomal processing pathway for class I-restricted presentation." *Behring Inst Mitt*(95): 14-22.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. and Melief, C. J. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature* 393(6684): 480-3.
- Schreurs, M. W., Eggert, A. A., de Boer, A. J., Figdor, C. G. and Adema, G. J. (1999). "Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells." *Eur J Immunol* 29(9): 2835-41.
- Schuler, G. and Steinman, R. M. (1997). "Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors." *J Exp Med* 186(8): 1183-7.
- Schwaab, T., Weiss, J. E., Schned, A. R. and Barth Jr, R. J. (2001). "Dendritic Cell Infiltration in Colon Cancer." *J Immunother* 24(2): 130-137.

- Serody, J. S., Collins, E. J., Tisch, R. M., Kuhns, J. J. and Frelinger, J. A. (2000). "T cell activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery." *J Immunol* 164(9): 4961-7.
- Shimizu, K., Fields, R. C., Giedlin, M. and Mule, J. J. (1999). "Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2268-73.
- Shortman, K. and Liu, Y. J. (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nature Rev Immunol* 2(3): 151-61.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* 284(5421): 1835-7.
- Smith, A. J., Nissan, A., Lanouette, N. M., Shi, W., Guillem, J. G., Wong, W. D., Thaler, H. and Cohen, A. M. (2000). "Prokinetic effect of erythromycin after colorectal surgery: randomized, placebo-controlled, double-blind study." *Dis Colon Rectum* 43(3): 333-7.
- Smyth, M. J., Crowe, N. Y. and Godfrey, D. I. (2001). "NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma." *Int Immunol* 13(4): 459-63.
- Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W. and Wagner, H. (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." *Eur J Immunol* 28(6): 2045-54.
- Sparwasser, T. and Lipford, G. B. (2000). "Consequences of bacterial CpG DNA-driven activation of antigen-presenting cells." *Curr Top Microbiol Immunol* 247: 59-75.
- Sparwasser, T., Vabulas, R. M., Villmow, B., Lipford, G. B. and Wagner, H. (2000). "Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins." *Eur J Immunol* 30(12): 3591-7.
- Staib, L., Link, K. H. and Beger, H. G. (2001). "Toxicity and effects of adjuvant therapy in colon cancer: results of the German prospective, controlled randomized multicenter trial FOGT-1." *J Gastrointest Surg* 5(3): 275-81.
- Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D. and Levitsky, H. (1998). "Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3): 1178-83.
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A. H. (1999). "Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells." *Blood* 93(5): 1634-42.

- Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J. and Enk, A. H. (1997). "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells." *J Immunol* 159(10): 4772-80.
- Storer, J. B. (1966). "Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mouse strains." *J Gerontol* 21(3): 404-9.
- Sun, S., Zhang, X., Tough, D. F. and Sprent, J. (1998). "Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA." *J Exp Med* 188(12): 2335-42.
- Tatsumi, T., Takehara, T., Kanto, T., Miyagi, T., Kuzushita, N., Sugimoto, Y., Jinushi, M., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M. and Hayashi, N. (2001). "Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 61(20): 7563-7.
- Tebbutt, N. C., Cattell, E., Midgley, R., Cunningham, D. and Kerr, D. (2002). "Systemic treatment of colorectal cancer." *Eur J Cancer* 38(7): 1000-15.
- Turner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A. and Schuler, G. (1999). "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application." *J Immunol Methods* 223(1): 1-15.
- Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R. and Melief, C. J. (1999). "CD4 T cells and their role in antitumor immune responses." *J Exp Med* 189(5): 753-6.
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T. and et al. (1984). "Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity." *J Natl Cancer Inst* 72(4): 955-62.
- Ulevitch, R. J. and Tobias, P. S. (1995). "Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin." *Annu Rev Immunol* 13: 437-57.
- Vabulas, R. M., Pircher, H., Lipford, G. B., Hacker, H. and Wagner, H. (2000). "CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses." *J Immunol* 164(5): 2372-8.
- Van Laar, J. A., Rustum, Y. M., Van der Wilt, C. L., Smid, K., Kuiper, C. M., Pinedo, H. M. and Peters, G. J. (1996). "Tumor size and origin determine the antitumor activity of cisplatin or 5-fluorouracil and its modulation by leucovorin in murine colon carcinomas." *Cancer Chemother Pharmacol* 39(1-2): 79-89.
- Vendetti, S., Chai, J. G., Dyson, J., Simpson, E., Lombardi, G. and Lechler, R. (2000). "Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells." *J Immunol* 165(3): 1175-81.
- Wang, Z., Karras, J. G., Colarusso, T. P., Foote, L. C. and Rothstein, T. L. (1997). "Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis." *Cell Immunol* 180(2): 162-7.

- Weeratna, R. D., Brazolot Millan, C. L., McCluskie, M. J. and Davis, H. L. (2001). "CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice." *FEMS Immunol Med Microbiol* 32(1): 65-71.
- Weeratna, R. D., McCluskie, M. J., Xu, Y. and Davis, H. L. (2000). "CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants." *Vaccine* 18(17): 1755-62.
- Weighardt, H., Feterowski, C., Veit, M., Rump, M., Wagner, H. and Holzmann, B. (2000). "Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response." *J Immunol* 165(8): 4537-43.
- Wiemann, B. and Starnes, C. O. (1994). "Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective." *Pharmacol Ther* 64(3): 529-64.
- Wolmark, N., Rockette, H., Mamounas, E., Jones, J., Wieand, S., Wickerham, D. L., Bear, H. D., Atkins, J. N., Dimitrov, N. V., Glass, A. G., Fisher, E. R. and Fisher, B. (1999). "Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04." *J Clin Oncol* 17(11): 3553-9.
- Wooldridge, J. E., Ballas, Z., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (1997). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma." *Blood* 89(8): 2994-8.
- Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S. and Tokunaga, T. (1988). "In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG." *Jpn J Cancer Res* 79(7): 866-73.
- Yawalkar, N., Brand, C. U. and Braathen, L. R. (1996). "IL-12 gene expression in human skin-derived CD1a+ dendritic lymph cells." *Arch Dermatol Res* 288(2): 79-84.
- Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R. and Greenberg, P. D. (2000). "Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo." *J Exp Med* 192(11): 1637-44.
- Yi, A. K., Chang, M., Peckham, D. W., Krieg, A. M. and Ashman, R. F. (1998). "CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry." *J Immunol* 160(12): 5898-906.
- Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S. and Krieg, A. M. (1996). "Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway." *J Immunol* 157(12): 5394-402.

-
- Yi, A. K. and Krieg, A. M. (1998). "CpG DNA rescue from anti-IgM-induced WEHI-231 B lymphoma apoptosis via modulation of I kappa B alpha and I kappa B beta and sustained activation of nuclear factor-kappa B/c-Rel." *J Immunol* 160(3): 1240-5.
- Yi, A. K., Peckham, D. W., Ashman, R. F. and Krieg, A. M. (1999). "CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway." *Int Immunol* 11(12): 2015-24.
- Yu, J. S., Wheeler, C. J., Zeltzer, P. M., Ying, H., Finger, D. N., Lee, P. K., Yong, W. H., Incardona, F., Thompson, R. C., Riedinger, M. S., Zhang, W., Prins, R. M. and Black, K. L. (2001). "Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration." *Cancer Res* 61(3): 842-7.
- Zhao, Q., Matson, S., Herrera, C. J., Fisher, E., Yu, H. and Krieg, A. M. (1993). "Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides." *Antisense Res Dev* 3(1): 53-66.
- Zhou, L. J. and Tedder, T. F. (1995). "A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells." *Blood* 86(9): 3295-301.
- Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H. and Heeg, K. (1998). "CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis." *J Immunol* 160(8): 3627-30.
- Zinkernagel, R. M. (2001). "Immunity against solid tumors?" *Int J Cancer* 93(1): 1-5.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität
AP-1	Aktivierungsprotein-1
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zellen
Balb/c	Bagg albino/c (Albinomaus mit eingeschränkter Th1-Antwort)
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
°C	Grad in Celsius
C26	Murine Kolonkarzinom-Zelllinie C26
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CEA	Karzino-embryonales Antigen (Tumor-assoziiertes Antigen)
CFSE	(5-(and-6-)carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CpG-DNA	CpG-haltige DNA
CpG-ODN	CpG-haltige Oligodesoxynukleotide
⁵¹ Cr	Chrom-51
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (CD8 ⁺)
DC	Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfonsäureoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
5-FU	5-Fluorouracil
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>
Gy	Gray (1 Gray = 1 J/kg)
HBSS	<i>Hank's buffered salinesolution</i>
Her2/neu	(Tumor-assoziiertes Antigen)

ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Leucovorin
mAb	Monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetische Zellseparation
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDC	Myeloide dendritische Zelle
mg	Milligramm
mGM-CSF	<i>Murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC I	<i>Major histocompatibility complex I</i>
MHC II	<i>Major histocompatibility complex II</i>
ml	Milliliter
MyD88	<i>Myeloid differentiation marker 88</i>
μ g	Mikrogramm
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid (0,9%-ige Lösung)
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
ODN	Oligodesoxynukleotide
OX40L	OX40-Liganden
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm: 10^{-12} Gramm

RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Phycoerythrin
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
s.c.	Subkutan
SEM	<i>Standard error of mean</i> (Standardfehler)
SSC	<i>Sideward scatter</i>
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TE Puffer	Tris-Hydrochlorid EDTA Puffer
TGF- β	<i>Tumor growth factor β</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i>
Th2	<i>T helper cell type 2</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNF- β	Tumor-Nekrose-Faktor- β
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
U	<i>Units</i> (Einheiten)
VEGF	Vascular

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres für die großzügige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas. Für seine Offenheit, seine sehr gute fachliche und über fachliche Belange hinausgehende Betreuung sowie die Möglichkeit zum Besuch von nationalen und internationalen Kongressen bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet.

Danken möchte ich insbesondere auch Herrn PD Dr. med. Gunther Hartmann für seine fachliche Unterstützung und hilfreichen Anregungen, sowie für seine stets vorhandene Geduld und Diskussionsbereitschaft. Bei meinem Kollegen Dr. hum. biol. Dipl.-Biol. Klaus Heckelsmiller möchte ich mich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, die kontinuierliche Betreuung der Arbeit sowie für die hervorragende und fruchtbare Teamarbeit bedanken, die mir sehr viel Freude bereitet hat. Frau Rosemarie Kiefl danke ich für ihre großzügige Hilfe im Labor. Für seine hilfreiche Kooperation bin ich Herrn Dipl.-Phys. Wolfgang Haimerl (Institut für Strahlentherapie, LMU München, Klinikum Innenstadt) zu Dank verpflichtet.

Frau Angelika Schlamp danke ich für die Einführung in das murine Tumormodell und Herrn Dr. Simon Rothenfusser und Herrn Dr. Veit Hornung für viele wertvolle Hinweise und Ratschläge.

Allen anderen Kollegen aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, für die gute Arbeitsatmosphäre und für eine insgesamt unvergessliche Zeit.

Wissenschaftliche Publikationen

A. Publikationen

1. Heckelsmiller K., **Rall K.**, Beck S., Schlamp A., Seiderer J., Jahrsdorfer B., Krug A., Rothenfusser S., Endres S., Hartmann G.

Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma

Journal of Immunology 2002 Oct. 1;169 (7): 3892-9, PMID: 12244187

2. Heckelsmiller K., Beck S., **Rall K.**, Sipos B., Schlamp A., Tuma E., Rothenfusser S., Endres S., Hartmann G.

Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immunotherapy cures large murine tumors that resist chemotherapy

European Journal of Immunology 2002 Nov.; 32(11): 3235-45, PMID: 12555669

B. Abstracts und Poster

2000

1. Heckelsmiller K., **Rall K.**, Schlamp A., Seiderer J., Endres S., Hartmann G.

Peritumoral CpG monotherapy leads to rejection of local and distant established tumors and to long-term memory,

Joint Annual Meeting 2000 of the German and Dutch Societies of Immunology, Düsseldorf; *Immunobiology* 203 (2000) 1-3, Seiten 404-405

2001

2. Heckelsmiller K., **Rall K.**, Schlamp A., Hornung V., Rothenfusser S., Endres S., Hartmann G.

Cure of established tumors by repeated peritumoral injection of CpG ODN is associated with the induction of tumor-specific CD4 and CD8 T cell responses

11th International Congress of Immunology 2001, Stockholm, Schweden;

Scandinavian Journal of Immunology Volume 54, Supplement 1, July/August 2001, Seite 135

3. Heckelsmiller K., **Rall K.**, Schlamp A., Rothenfusser S., Seiderer J., Hornung V., Endres S., Hartmann G.

Immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide zur Therapie etablierter Tumore in einem murinen Modell des Kolonkarzinoms

Gastroenterologie 2001, 56. Tagung der Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Münster 2001; *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2001; 39, Seite 688

4. Heckelsmiller K., **Rall K.**, Schlamp A., Endres S., Hartmann G.

CpG-ODN in vivo potently enhance dendritic cell based tumor therapy in a murine model of colon carcinoma

32nd Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2001, Dresden; *Immunobiology* 204 (2001) 1-2, Seite 133

5. **Rall K.**, Heckelsmiller K., Schlamp A., Endres S., Hartmann G.

Effective immunotherapy of large established tumors with CpG oligonucleotides and dendritic cells in murine tumor models

2nd International Symposium „Activating Immunity with CpG Oligos“, Amelia Island, Florida, USA (Erhalt eines *Travel award*)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kristin Katharina Rall

Geburtsdatum: 27.04.1977

Geburtsort: Reutlingen

Schulbildung

1983 – 1986 Wilhelm-Busch-Grundschule in Hösel (NRW)

1986 / 1987 4. Klasse der Grundschule „Im Sonnigen Winkel“ in Stuttgart

1987 - 1996 Eberhard-Ludwigs-Gymnasium, Stuttgart
Abitur 1996, Gesamtnote: 1,1

Hochschulausbildung

April 1997 - April 1999 Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Vorklinischer Studienabschnitt

März 1999 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

April 1999 – Juni 2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinischer Studienabschnitt

März 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2003 – März 2004 Praktisches Jahr an der LMU München, an der Mount Sinai Medical School, New York, USA und an der Northern Clinical School, Sydney, Australien

Juni 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung