

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

**Induktion einer potenten antitumoralen Immunantwort  
durch CpG-aktivierte dendritische Zellen:  
Vergleich zweier muriner Kolonkarzinom-Modelle.**

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

vorgelegt von  
Angelika Schlamp  
aus  
Landshut

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. S. Endres
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. D.J. Schendel Prof. Dr. Th. Brocker
Mitbetreuung durch den promoviertem Mitarbeiter:	PD Dr. med. G. Hartmann Dr. rer. nat. C. Brunner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	30. Juni 2005

Meinen Eltern gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
1.1	DIE DENDRITISCHE ZELLE ALS ZENTRALE SCHALTSTELLE DES IMMUNSYSTEMS.....	5
1.1.1	<i>Dendritische Zellen und ihre Rolle im Immunsystem</i> .....	6
1.1.2	<i>Dendritische Zellen im Einsatz</i> .....	8
1.1.3	<i>Dendritische Zellen und die antitumorale Immunantwort</i> .....	10
1.2	CPG-OLIGONUKLEOTIDE – IMMUNSTIMULATORISCHE DNA .....	12
1.2.1	<i>Historischer Überblick</i> .....	12
1.2.2	<i>Wirkung von CpG im Immunsystem</i> .....	13
1.3	THERAPIE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS .....	16
1.4	ZIELE DER ARBEIT.....	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
2.1	GERÄTE.....	19
2.2	CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL .....	20
2.2.1	<i>Reagenziensätze</i> .....	20
2.2.2	<i>Zellkulturmaterial</i> .....	20
2.2.3	<i>Zytokine und Chemokine</i> .....	20
2.2.4	<i>Oligodesoxynukleotide (ODN)</i> .....	21
2.2.5	<i>Puffer, Lösungen, Medien und Seren</i> .....	21
2.2.6	<i>Antikörper</i> .....	22
2.2.7	<i>Sonstige Materialien</i> .....	23
2.3	TUMOR-ZELLINIEN.....	24
2.3.1	<i>Kolonkarzinom-Zelllinie Colon-26</i> .....	24
2.3.2	<i>Nierenkarzinom-Zelllinie Renca</i> .....	24
2.3.3	<i>Kolonkarzinom-Zelllinie MC38</i> .....	24
2.4	MAUSSTÄMME .....	25
2.4.1	<i>BALB/c-Mausstamm</i> .....	25
2.4.2	<i>C57BL/6-Mausstamm</i> .....	25
2.4.3	<i>FVB-Mausstamm</i> .....	25
2.5	KULTURSYSTEME .....	26
2.5.1	<i>Generierung und Kultur muriner dendritischer Zellen</i> .....	26
2.5.2	<i>Kokultur dendritischer Zellen mit Tumorzellen</i> .....	28
2.5.3	<i>Kokultur muriner Lymphozyten mit allogenen dendritischen Zellen</i> .....	29
2.6	ANALYSEVERFAHREN .....	30
2.6.1	<i>Phasenkontrastmikroskopie</i> .....	30
2.6.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> .....	30
2.6.3	<i><sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay</i> .....	31
2.6.4	<i>Durchflusszytometrie (FACS)</i> .....	31
2.6.5	<i>In-vivo-Vakzinierungs-Assay</i> .....	32

2.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
3.1	OPTIMIERUNG DES PROTOKOLLS ZUR GENERIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN IN VITRO .....	36
3.1.1	<i>Anreicherung pluripotenter Vorläuferzellen aus dem Knochenmark .....</i>	<i>36</i>
3.1.2	<i>GM-CSF im Kulturmedium.....</i>	<i>37</i>
3.1.3	<i>IL-4 im Kulturmedium .....</i>	<i>37</i>
3.2	EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER REIFESTIMULI AUF DENDRITISCHE ZELLEN IN VITRO .....	38
3.2.1	<i>CpG-ODN 1826 ist der potenteste Reifestimulus dendritischer Zellen in vitro.....</i>	<i>38</i>
3.2.2	<i>Eine Kombination von CpG und LPS bewirkt eine vermehrte IL-12-Sekretion.....</i>	<i>42</i>
3.2.3	<i>Kontroll-CpG bewirkt keine Reifestimulation dendritischer Zellen in vitro.....</i>	<i>43</i>
3.3	INDUKTION EINER ANTITUMORALEN IMMUNANTWORT IN VIVO .....	45
3.3.1	<i>CpG-aktivierte dendritische Zellen induzieren eine potente Tumorphylaxe. ....</i>	<i>46</i>
3.3.2	<i>CpG-aktivierte DC induzieren eine potente therapeutische anti-Tumor-Wirkung. ....</i>	<i>47</i>
3.4	VERGLEICH DER ANTITUMORALEN IMMUNANTWORT ZWEIER MAUSSTÄMME IN VIVO .....	49
3.4.1	<i>Vergleich der Ergebnisse bei prophylaktischer Vakzinierung.....</i>	<i>50</i>
3.4.2	<i>Vergleich der Ergebnisse bei therapeutischer Vakzinierung.....</i>	<i>51</i>
3.5	VERGLEICH DER IMMUNZELLEN ZWEIER MAUSSTÄMME IN VITRO .....	52
3.5.1	<i>Dendritische Zellen aus C57BL/6-Mäusen exprimieren weniger MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche als dendritische Zellen aus BALB/c-Mäusen. ....</i>	<i>52</i>
3.5.2	<i>Die dendritischen Zellen beider Mausstämmen verhalten sich bezüglich der IL-12-Produktion gleich. ....</i>	<i>55</i>
3.5.3	<i>Die dendritischen Zellen beider Mausstämmen verhalten sich bezüglich der Stimulation der T-Zell-Proliferation gleich. ....</i>	<i>56</i>
3.5.4	<i>Die T-Zellen beider Mausstämmen verhalten sich bezüglich der Stimulierbarkeit durch allogene dendritische Zellen gleich. ....</i>	<i>57</i>
3.5.5	<i>Zusammenfassung des Vergleichs der beiden Mausstämmen.....</i>	<i>58</i>
3.6	CHARAKTERISIERUNG DER ANTITUMORALEN IMMUNANTWORT NACH VAKZINIERUNG MIT DENDRITISCHEN ZELLEN .....	59
3.6.1	<i>Die induzierte Immunantwort ist systemisch wirksam.....</i>	<i>59</i>
3.6.2	<i>Die induzierte Immunantwort bietet einen Langzeitschutz auch bei Re-Exposition. ....</i>	<i>60</i>
3.6.3	<i>Die induzierte Immunantwort ist spezifisch gegen Kokultur-Tumorzellen gerichtet. ....</i>	<i>61</i>
3.7	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	63
3.7.1	<i>Optimierung der Generierung dendritischer Zellen.....</i>	<i>63</i>
3.7.2	<i>Tumortherapie mit dendritischen Zellen bei verschiedenen Mausstämmen im Vergleich..</i>	<i>64</i>

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>
4.1	METHODIK ZUR GENERIERUNG UND KULTUR DENDRITISCHER ZELLEN .....	65
4.1.1	<i>Gewinnung dendritischer Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen .....</i>	<i>65</i>
4.1.2	<i>Rolle von GM-CSF .....</i>	<i>66</i>
4.1.3	<i>Rolle von IL-4 .....</i>	<i>66</i>
4.2	EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER STIMULI AUF DIE REIFE DENDRITISCHER ZELLEN .....	67
4.2.1	<i>Bedeutung des Reifezustandes dendritischer Zellen .....</i>	<i>67</i>
4.2.2	<i>TNF-<math>\alpha</math> als Reifestimulus .....</i>	<i>68</i>
4.2.3	<i>LPS als Reifestimulus .....</i>	<i>69</i>
4.2.4	<i>CpG-ODN als Reifestimulus .....</i>	<i>70</i>
4.3	PROTOKOLL ZUR TUMORVAKZINIERUNG.....	71
4.3.1	<i>Antigenpulsung dendritischer Zellen .....</i>	<i>71</i>
4.3.2	<i>Aktivierung der gepulsten dendritischen Zellen .....</i>	<i>72</i>
4.3.3	<i>Anwendung der Vakzine .....</i>	<i>73</i>
4.4	IMMUNANTWORT IN ZWEI MAUSSTÄMMEN .....	74
4.4.1	<i>Einfluss von Th1 und Th2 auf die Immunantwort .....</i>	<i>74</i>
4.4.2	<i>Einfluss antigenpräsentierender Moleküle auf die Induktion der Immunantwort .....</i>	<i>75</i>
4.5	CHARAKTERISIERUNG DER IMMUNANTWORT .....	76
4.5.1	<i>Systemische Wirksamkeit der DC-basierten Vakzinierung .....</i>	<i>76</i>
4.5.2	<i>Langzeit-Wirksamkeit der DC-basierten Vakzinierung .....</i>	<i>76</i>
4.5.3	<i>Antigenspezifität der DC-basierten Vakzinierung .....</i>	<i>77</i>
4.6	ANWENDUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN IN KLINISCHEN STUDIEN .....	78
4.6.1	<i>Probleme der Therapie mit dendritischen Zellen .....</i>	<i>78</i>
4.6.2	<i>Ausblick .....</i>	<i>80</i>
4.7	ZUKUNFT VON CpG-ODN IN DER IMMUNTHERAPIE.....	81
4.7.1	<i>CpG als Adjuvans bei Infektionen .....</i>	<i>81</i>
4.7.2	<i>CpG als Adjuvans bei Tumoren .....</i>	<i>82</i>
4.7.3	<i>Probleme der Therapie mit CpG-ODN .....</i>	<i>83</i>
4.7.4	<i>Unterschiede der CpG-ODN .....</i>	<i>83</i>
4.7.5	<i>Alternative Adjuvantien in der Tumorthherapie .....</i>	<i>84</i>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>



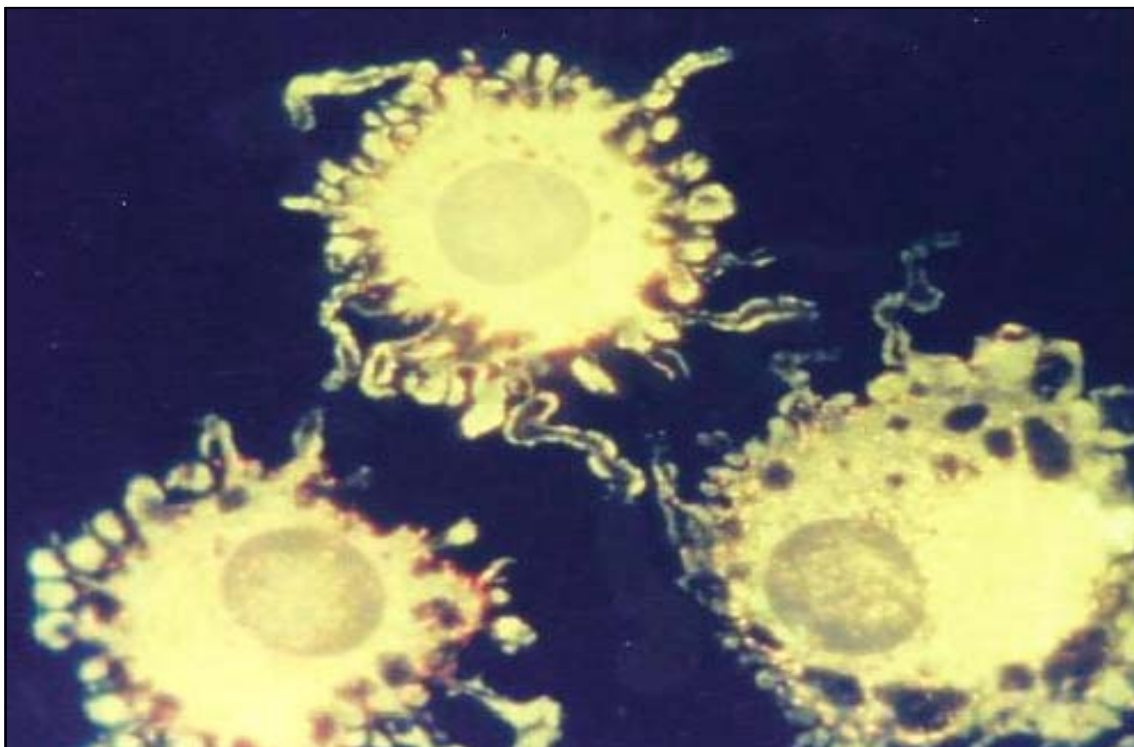


## 1 Einleitung

### 1.1 Die dendritische Zelle als zentrale Schaltstelle des Immunsystems

Die dendritische Zelle (DC) wurde als solche erstmals 1973 in der Milz von Mäusen beschrieben und morphologisch aufgrund der astartigen Ausläufer der Zellmembran (griechisch *dendros*: Baum) benannt (Steinman and Cohn 1973). Erst ab Mitte der Achtziger Jahre stellte man fest, dass die schon 1868 von Langerhans beschriebenen und nach ihm benannten Langerhanszellen der Haut zusammen mit den DC zu einer gemeinsamen Zellfamilie, nämlich den antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC), gehören (Schuler et al. 1985; Steinman 1991).

Doch erst nachdem man Methoden gefunden hatte, DC in relativ großer Menge aus Zellen des peripheren Blutes zu generieren (Inaba et al. 1992), konnte man diese Zellen genauer charakterisieren. Man erkannte schließlich, dass DC in ihrer Eigenschaft als antigenpräsentierenden Zellen eine wichtige Schlüsselrolle im Immunsystem spielen (Banchereau and Steinman 1998).



**Abbildung 1: Dendritische Zellen (DC) im Phasenkontrastmikroskop.** Gut zu erkennen sind die charakteristischen astartigen Ausläufer der Zellmembran, die der DC ihren Namen gaben. Abbildung aus dem Labor Prof. Endres.

### 1.1.1 Dendritische Zellen und ihre Rolle im Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einem Zusammenspiel nicht antigenspezifischer, angeborener Immunität mit antigenspezifischer, erworbener Immunität. Wichtige Komponenten des angeborenen Immunsystems sind Phagozyten, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), Komplementsystem und Interferone. Die Zellen des angeborenen Immunsystems können Pathogene aufgrund charakteristischer molekularer Muster rasch erkennen und das Gefahrensignal an Zellen des erworbenen Immunsystems weitergeben (Matzinger 1994). Im erworbenen Immunsystem ist es möglich, viele verschiedene Antikörper zu bilden und ein immunologisches Gedächtnis zu etablieren. Dieses hochkomplizierte System braucht eine regulierende Instanz, die antigenpräsentierenden Zellen (APC).

Dabei können nur DC in ihrer Eigenschaft als antigenpräsentierende Zellen primäre Immunantworten induzieren und so zur Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses führen (Steinman 1991; Hart 1997; Banchereau and Steinman 1998). DC in ihrer Vermittlerstellung zwischen angeborener und erworbener Immunität können, wie die Zellen des angeborenen Immunsystems, Pathogene erkennen und eine antigenspezifische Immunantwort induzieren.

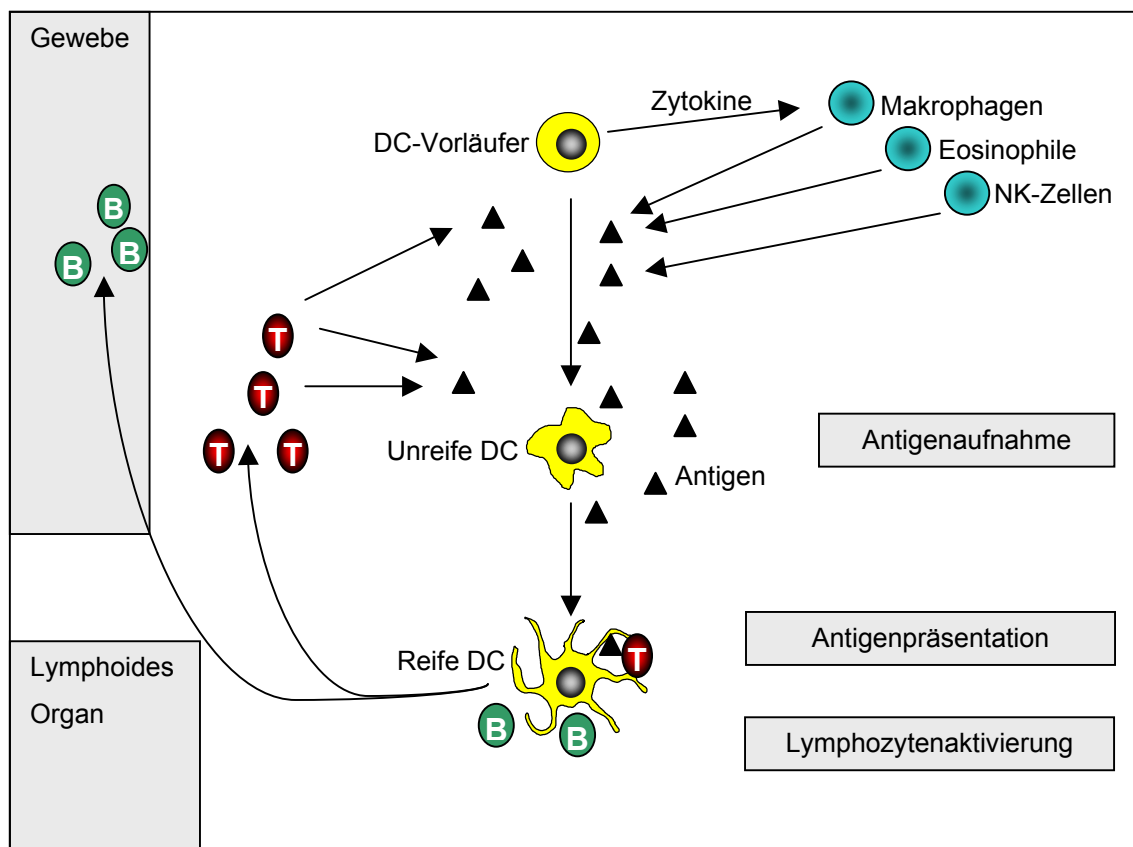
DC sind in nahezu allen Geweben des Körpers vorhanden, sie arbeiten als Schaltstelle zwischen äußerer Welt und den Effektorzellen des Immunsystems: Ständig nehmen die (noch inaktiven, auch noch nicht dendritisch aussehenden) Zellen Bestandteile ihrer Umgebung durch Endozytose oder Phagozytose auf und analysieren somit ihre Umwelt (Albert et al. 1998; Mellman and Steinman 2001). Die DC ist dabei in der Lage, exogene Antigene in Verbindung mit MHC-Komplexen zu präsentieren, sogar ohne diese vorher aufzunehmen (Santambrogio et al. 1999; Davoust and Banchereau 2000).

Sind im Gewebe Gefahrensignale vorhanden, so ist die DC in einzigartiger Weise dafür ausgestattet, diese wahrzunehmen: sie trägt auf ihrer Zelloberfläche multiple Rezeptoren und ist somit in der Lage, Gewebsschädigung, Eindringen von Bakterien oder Viren und Auftreten von Tumorzellen als Gefahrensignal zu detektieren. Geschieht dies, verändert sich die DC in dramatischer Weise.

Hat sie bisher Bestandteile aus ihrer Umgebung aufgenommen, in ihrem Inneren prozessiert und an MHC-Moleküle gebunden, verändert sich nun ihre Oberflächenstruktur, es bilden sich dendritische Zellausläufer, es werden bestimmte Oberflächenmoleküle exprimiert und Zytokine ausgeschüttet; die an MHC gebundenen Antigene werden auf der Zelloberfläche präsentiert (Stockwin et al. 2000).

Gelangen diese aktivierten DC in den Lymphknoten und treffen auf Lymphozyten, werden diese Lymphozyten gegen das präsentierte Antigen aktiviert und wandern aus dem Lymphknoten in den Körper, um dort ihre Arbeit als Effektorzellen des Immunsystems aufzunehmen (vgl. Abbildung 2). Es wird angenommen, dass DC bestimmte Zytokine sezernieren, die es ihnen ermöglichen, gerade mit naiven T-Zellen zu interagieren (Adema et al. 1997).

DC sind jedoch auch in der Lage, Toleranz gegen bestimmte Antigene zu induzieren, indem diese ohne die kostimulatorischen Moleküle den T-Zellen präsentiert werden (Adler et al. 1998; Steinman et al. 2000).



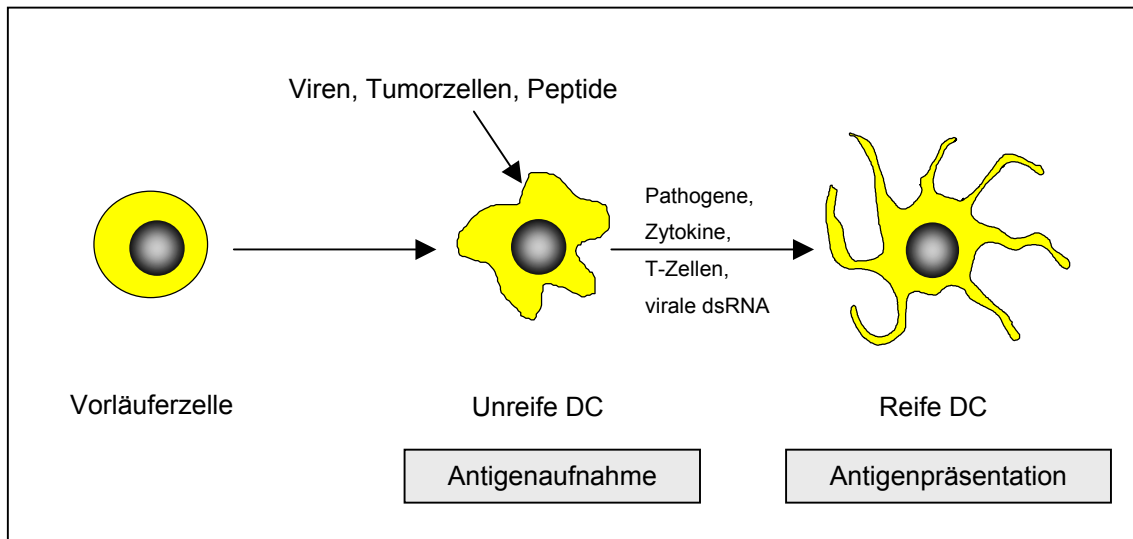
**Abbildung 2: Lebenszyklus dendritischer Zellen.** Unreife DC kommen in Kontakt mit Gefahrensignalen (▲), reifen aus und wandern in den Lymphknoten und präsentieren das aufgenommene Antigen den dort ansässigen Lymphozyten. Diese werden aktiviert und wandern als Effektorzellen des Immunsystems aus dem Lymphknoten. Eigene Abbildung nach (Banchereau and Steinman 1998).

### 1.1.2 Dendritische Zellen im Einsatz

Diese einzigartigen Fähigkeiten machen die DC zu einer äußerst interessanten Figur für alle Bereiche des Immunsystems; sei es die Therapie von bakteriellen oder viralen Infektionen, gegen die man eine Immunantwort induzieren möchte, oder von Autoimmunerkrankungen, wo DC aufgrund ihrer Fähigkeit, Toleranz gegen Antigen zu induzieren, bedeutend sind. Doch gerade auch für die Therapie von Tumoren werden die Möglichkeiten von DC genutzt, geht es dabei doch darum, das Immunsystem, das durch verschiedenste Escape-Mechanismen der Tumore unterwandert wird, dazu zu bringen, das Tumorantigen wieder also solches zu erkennen und somit eine effektive Immunantwort möglich zu machen.

DC werden dabei meist als Vakzine eingesetzt. Für die Herstellung einer Vakzine *in vitro* müssen zunächst DC generiert werden (z.B. beim Menschen aus monozytären Zellen des peripheren Blutes, bei der Maus aus Knochenmarksvorläuferzellen). Anschließend präsentiert man inaktiven DC das Antigen, gegen das man eine Immunantwort induzieren möchte: inaktivierte (z.B. bestrahlte) Tumorzellen, Tumorzell-Lysate (Fields et al. 1998; Nestle et al. 1998) oder Tumorpeptide (Celluzzi et al. 1996; Alters et al. 1998; Dalyot-Herman et al. 2000) werden von DC aufgenommen, prozessiert und an MHC gebunden. Alternativ kann auch mit RNA gearbeitet werden (Boczkowski et al. 1996; Gilboa et al. 1998).

Nun ist es wichtig, dass die DC aktiviert werden; das kann beispielsweise durch endogene Signale aus nekrotischen Zellen (Gallucci et al. 1999; Sauter et al. 2000), Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Brunner et al. 2000), durch aktivierte T-Zellen (Caux et al. 1994), LPS (Behboudi et al. 2000), bakterielle DNA (Sparwasser et al. 1998) oder virale Doppelstrang-RNA (Cella et al. 1999) geschehen. Erst durch die Aktivierung, also die Präsentation eines Gefahrensignals, bringt man die DC dazu, aufgenommenes Antigen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und eine Immunantwort gegen dieses Antigen zu induzieren. Nicht aktivierte, also unreife, DC können sogar zu Toleranz führen (Dhodapkar et al. 2001).



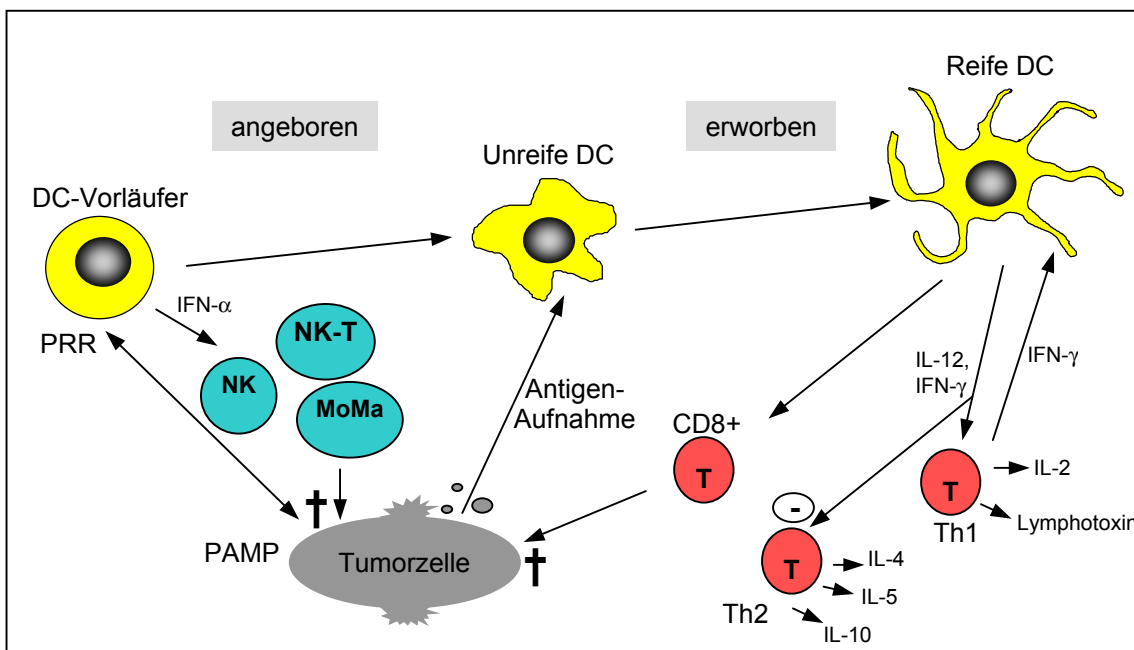
**Abbildung 3: Aktivierung von dendritischen Zellen.** DC nehmen ständig Antigen (z.B. Viren, Tumorzellen, Peptide) aus ihrer Umgebung auf. Erst durch die Aktivierung (z.B. durch Pathogene, Zytokine, T-Zellen, virale Doppelstrang-RNA) reifen die DC und präsentieren das Antigen auf ihrer Oberfläche. Eigene Abbildung.

Die durch die Vakzine induzierte Antitumor-Immunantwort sollte nicht nur durch die Beobachtung einer klinischen Antwort, sondern auch durch immunologisches Monitoring nachgewiesen werden.

### 1.1.3 Dendritische Zellen und die antitumorale Immunantwort

Wie funktioniert die antitumorale Immunantwort? Tumorzellen können durch T-Zellen erkannt und zerstört werden (Boon et al. 1994), allerdings müssen die T-Zellen vorher aktiviert werden. DC können T-Zellen durch die entsprechende Präsentation von Tumorantigenen auf ihrer Oberfläche so primen, dass die Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen möglich wird (Celluzzi et al. 1996).

DC-Vorläufer können über sog. *Pattern recognition receptors* (PRR) die *Pathogen associated molecular patterns* (PAMP) der Tumorzelle erkennen und reagieren mit einer Ausschüttung von Zytokinen wie IFN- $\alpha$ , wodurch Immunzellen aktiviert werden, die den Tumor angreifen. Noch unreife DC können Tumorantigen aufnehmen, das sie auf ihrem weiteren Weg zur reifen DC auf der Oberfläche präsentieren. Dadurch werden CD4- und CD8-positive T-Zellen aktiviert, beide notwendig zu einer effektiven Tumorantwort (vgl. Abbildung 4). In der DC-T-Zell-Interaktion spielen vor allem CD40/CD40L (Diehl et al. 2000; Kelleher and Beverley 2001) sowie verschiedene Zytokine wie IL-21 (Kasaian et al. 2002) oder IL-16 (Kaser et al. 1999) eine wesentliche Rolle.



**Abbildung 4: Wirkung von dendritischen Zellen bei der antitumoralen Immunantwort.** DC-Vorläufer aktivieren Immunzellen, die den Tumor angreifen. Durch Aufnahme und Präsentation von Tumorantigenen werden naive T-Zellen aktiviert. Eigene Abbildung.

CD4-Zellen können im Gegensatz zu CD8-Zellen Antigen nur dann erkennen, wenn es von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wird; für die Orchestrierung der zytotoxischen CD8-Zellen sind sie wesentlich. CD4-Zellen unterstützen das Ausmaß und die Dauer der Aktivität zytotoxischer T-Zellen, auch sind sie notwendig für die Infiltration eines Tumors mit CD8-Zellen (Marzo et al. 2000; Surman et al. 2000). Unter den CD4-positiven T-Zellen (oder Helferzellen) unterscheidet man nach ihrer Funktion Th1- und Th2-Zellen.

Die Bildung von Th1-Zellen, die eher dem spezifischen (oder erworbenen) Teil des Immunsystems zugeordnet werden, wird durch den Einfluss von IL-12, das z.B. von aktivierten DC produziert wird (Heufler et al. 1996) und IFN- $\gamma$  induziert; diese Zytokine hemmen auch gleichzeitig die Entstehung von Th2-Zellen. Th1-Zellen wiederum produzieren ihrerseits IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF und Lymphotoxin und induzieren zell-medierte Immunantworten.

Th2-Zellen entstehen hingegen vor allem unter IL-4-Einfluss und sezernieren ihrerseits die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10. Sie sind dem humoralen Anteil des Immunsystems zugeordnet und induzieren Proliferation und Differenzierung von B-Zellen.

Die Differenzierung in Th1- oder Th2-Zelle geschieht durch das Priming und ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren. Einer dieser Faktoren ist, wie oben beschrieben, die Zytokin-Umgebung, andere Möglichkeiten sind Peptidliganden, unterschiedliche Antigen-Dosen und unterschiedliche kostimulatorische Signale (Constant and Bottomly 1997; Despesse et al. 1999).

Essentiell für eine antitumorale Immunantwort ist die Induktion einer Th1-basierten Immunantwort; DC mit ihrer Fähigkeit, IL-12 zu produzieren, nehmen dabei eine wichtige Stellung ein.

## 1.2 CpG-Oligonukleotide – Immunstimulatorische DNA

Bis vor kurzem wurde die DNA, aufgebaut aus Nukleotiden, lediglich als Speichermedium der Erbinformation betrachtet; jedoch können DNA-Sequenzen auch wichtige funktionelle Rollen im Immunsystem erfüllen.

### 1.2.1 Historischer Überblick

Schon aus dem 18. Jahrhundert gibt es vereinzelt Berichte darüber, dass infektiöse Erkrankungen in einigen Fällen zur Regression maligner Tumoren führten. Der New Yorker Chirurg William Coley begann 1891, nachdem er zu seiner Überraschung beobachtet hatte, dass sich unter dem Einfluss einer bakteriellen Infektion im Bereich eines Sarkoms der Tumor zurückgebildet hatte, mit einer systematischen Untersuchung dieses Phänomens. Die lokale Injektion von Bakterien bzw. bakteriellen Lysaten war bei einem Teil der Tumorpatienten erfolgreich, die Sarkome bildeten sich zurück (Coley 1991; Wiemann and Starnes 1994). Nach dieser ersten erfolgreichen Immuntherapie von Tumoren rückte der Ansatz in der Folgezeit jedoch wieder in den Hintergrund: Die Ergebnisse von William Coley ließen sich nicht bestätigen (was wohl zu einem guten Teil an der fehlenden Standardisierbarkeit von bakteriellen Lysaten lag), und andere tumortherapeutische Verfahren wie die Chirurgie und die aufkommende Strahlentherapie gewannen vermehrt an Bedeutung.

In der Zwischenzeit konnte sich bei der Therapie von Tumoren der Harnblase die Anwendung von attenuierten Mykobakterien (*Bacille Calmette-Guérin*, BCG) etablieren (Alexandroff et al. 1999), und auch zur Rezidivprophylaxe bei Kolonkarzinom wurde BCG in Verbindung mit bestrahlten Tumorzellen erfolgreich eingesetzt (Vermorken et al. 1999; Harris et al. 2000). Als man das Lysat von BCG genauer untersuchte, stellte sich heraus, dass es die DNA-Fraktion war, welche therapeutisch aktiv war (Tokunaga et al. 1984; Yamamoto et al. 1988). Es zeigte sich auch, dass bakterielle DNA beispielsweise murine Lymphozyten stimulieren konnte (Messina et al. 1991). 1992 konnte nachgewiesen werden, dass zwar die bakterielle DNA, nicht jedoch die DNA von Wirbeltieren immunstimulatorische Aktivität aufweist; als aktive Sequenzen konnten sogenannte Palindromsequenzen (spiegelbildliche Sequenzen um ein zentrales Cytidin-Guanosin-Dinukleotid) identifiziert werden (Yamamoto et al. 1992).



In der Folge erkannte man jedoch, dass das CpG-Motiv (das p steht dabei für die Phosphatbindung) das eigentliche Substrat der immunstimulatorischen Wirkung darstellt und Palindromsequenzen nicht notwendig sind (Krieg and Stein 1995; Ballas et al. 1996; Krieg 1996).

### 1.2.2 Wirkung von CpG im Immunsystem

Die Unterschiede zwischen bakterieller und Vertebraten-DNA waren schon länger bekannt; möglicherweise werden CpG-Motive vom Vertebraten-Immunsystem als Erkennungsmerkmal für bakterielle DNA benutzt. CpG-Motive finden sich in bakterieller DNA in einer Frequenz von 1:16, während in Vertebraten-DNA die Frequenz bei lediglich 1:60 liegt; darüber hinaus sind die in Vertebraten-DNA vorhandenen CpG-Motive zu über 80% am Cytosin methyliert, während sich in bakterieller DNA keine Methylierungen finden. Die immunstimulatorische Wirkung von CpG-Oligonukleotiden wird konsequenterweise durch Methylierung am Cytosin reduziert (vgl. Abbildung 5).

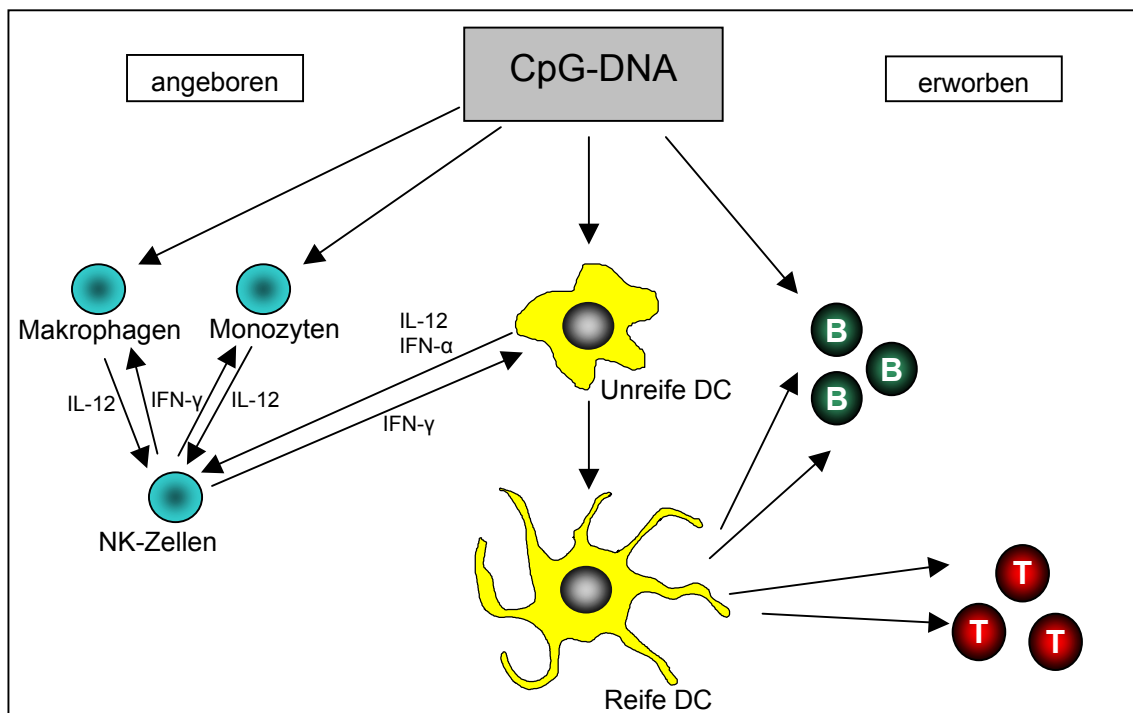
**Abbildung 5: Unterschiede zwischen bakterieller und Vertebraten-DNA.**

	Bakterielle DNA	Vertebraten-DNA
Methylierung am Cytosin des CpG	keine	80%
Häufigkeit von CpG-Motiven	6,25% (1:16)	1,7% (1:60)

Unmodifizierte Oligodesoxynukleotide (ODN) werden durch Nukleasen rasch abgebaut, so dass eine chemische Modifikation notwendig wird. Durch die Phosphorothioat-Modifikation (wobei ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt wird) ist es möglich, Oligonukleotide mit CpG-Motiven in vivo anzuwenden.

Vom Immunsystem werden CpG-Motive als molekulares Muster für intrazelluläre Bakterien oder Viren erkannt. Eine wichtige Rolle dabei spielen Toll-like Rezeptoren (TLR), eine Familie von phylogenetisch konservierten Transmembran-Proteinen. TLR sind Mediatoren des angeborenen Immunsystems und für die Erkennung Pathogen-assoziiierter Liganden (z.B. LPS, Lipoproteine, Peptidoglykane, virale RNA, Hitzeschockproteine) und die folgende Zell-Aktivierung zuständig. Die CG-Motive der CpG-ODN werden von TLR-9 erkannt, und die Wirkung über den NF-kappaB-Signalweg vermittelt (Hemmi et al. 2000; Bauer et al. 2001; Takeshita et al. 2001; Cornelié et al. 2004).

Es kommt konsekutiv zu einer T-Zell-Antwort vom Th1-Typ (Bildung von IL-12 und IFN- $\gamma$ ), die bei der Elimination von infizierten körpereigenen Zellen oder auch von Tumorzellen von Bedeutung ist (Chu et al. 1997; Heeg et al. 1998; Krieg et al. 1998; Parronchi et al. 1999; Chu et al. 2000). Diese Mustererkennung erfolgt durch die darauf spezialisierten DC, die die T-Zell-Antwort induzieren (Hartmann et al. 1999). Jedoch nicht nur DC, sondern auch andere Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten und Makrophagen werden durch CpG-Motive aktiviert. B-Zellen als Teil des spezifischen Immunsystems werden durch CpG-DNA direkt stimuliert. Dabei führen CpG-Motive zu einer polyklonalen Proliferation von B-Zellen, die Antikörperproduktion wird stimuliert (Krieg et al. 1995; Krieg 1999; Hartmann and Krieg 2000). Zudem kommt es zu einem Wechsel der Immunglobulin-Isotypen zu Formen, die für die Abwehr von infizierten Zellen besonders geeignet sind; in der Maus ist dies IgG2a (Chu et al. 1997). NK-Zellen und T-Zellen werden sekundär über die Zytokinsynthese von Zellen des angeborenen Immunsystems (zum Beispiel IL-12, INF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) kostimuliert (Ballas et al. 1996), und die Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen induziert (Cowdery et al. 1996; Chace et al. 1997); vgl. Abbildung 6.



**Abbildung 6: Wirkung von CpG-ODN im Immunsystem.** CpG werden als Muster einer mikrobiellen Infektion erkannt, was zur Induktion einer Th1-gewichteten Immunantwort führt. Monozyten und Makrophagen werden durch CpG-Motive aktiviert. CpG-Motive führen zu einer Stimulation von B-Zellen. NK-Zellen und T-Zellen werden über Zytokinsynthese von Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. IL-12, IFN- $\alpha$ ) kostimuliert. Eigene Abbildung.

Infolge dieser multimodalen Beeinflussung des Immunsystems durch CpG mit der Imitation des Gefahrensignals einer bakteriellen Infektion kommt es zu einer koordinierten Immunantwort, wie sie zur erfolgreichen Abwehr von mikrobiellen Eindringlingen erforderlich ist.

Aufgrund der immunstimulatorischen Wirkung von DNA mit CpG-Motiven werden vielfältige Einsatzmöglichkeiten in unterschiedlichen Gebieten untersucht (vgl. Abbildung 7).

#### Therapeutische Ansätze mit CpG-ODN

Tumoren	Infektionen	Allergien	Gentherapie
Aktivierung von DC in vitro Vakzineadjuvans von Tumorantigen Adjuvans monoklonaler Antikörper Therapie NK-sensitiver Tumoren	Vakzineadjuvans gegen Viren/ intrazelluläre Erreger Prophylaxe/Therapie von intrazellulären Erregern Therapie von chronischen Infektionen (HIV)	Induktion einer Th1-Antwort Adjuvans bei Desensibilisierung	Erhöhung des Gehalts an CpG-Motiven bzw. Deletion von CpG-Motiven in bakteriellen Plasmiden und viralen Vektoren

**Abbildung 7: Immuntherapie mit CpG-ODN.**

### 1.3 Therapie des Kolorektalen Karzinoms

In der Therapie von Tumoren haben sich bisher chirurgische Therapie, Chemotherapie und Strahlentherapie fest etablieren können. Vielfach konnten Tumoren erfolgreich therapiert, die Rezidivwahrscheinlichkeit gesenkt und das Überleben verlängert werden. Doch immer noch stellen viele Tumoren Problemfälle für die Therapie dar, gerade auch das Karzinom im Bereich von Kolon und Rektum.

Das kolorektale Karzinom ist eine häufige und immer noch häufig tödlich verlaufende Erkrankung. In Deutschland erkrankten 1993 etwa 82.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom, etwa 30.000 starben daran. Die Inzidenz liegt bei etwa 40 je 100.000 Einwohner und nimmt weiter zu; das kolorektale Karzinom ist damit in Deutschland das zweithäufigste Karzinom bei Männern (nach dem Bronchialkarzinom) und Frauen (nach dem Mammakarzinom). Über 90% der kolorektalen Karzinome treten nach dem 50. Lebensjahr auf, so dass das Alter einen der bedeutendsten Risikofaktoren darstellt.

Auch genetische Faktoren spielen eine Rolle: autosomal dominant vererbt werden die familiäre Adenomatöse Polypose (FAP) und der sogenannte *Hereditary non-polyposis colorectal cancer* (HNPCC). Patienten mit Colitis ulcerosa haben ein erhöhtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, diskutiert werden als Risikofaktoren fett- und fleischreiche Kost sowie Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum. Protektiv hingegen können obst- und gemüsereiche Diät, regelmäßige sportliche Aktivität, regelmäßige Einnahme von Aspirin oder nichtsteroidalen Antirheumatika sowie die Hormonersatztherapie in der Postmenopause wirken.

Erster therapeutischer Ansatz beim kolorektalen Karzinom ist meist die chirurgische Entfernung des Tumors. Zusätzlich finden adjuvante Chemotherapieschemata sowie selten Bestrahlung Anwendung. Als chemotherapeutische Substanz ist 5-Fluorouracil (5-FU) zusammen mit Folsäure etabliert, alternativ auch DACH-Platinsalze (Oxaliplatin) und Topoisomerase-Inhibitoren (Irinotecan). Thydylatsynthase-Inhibitoren (Raltitrexed) und fluorierete Thymidine werden ebenfalls diskutiert und in Studien untersucht.

Dennoch wird - aufgrund der hohen Inzidenz und der nach wie vor oftmals schlechten Prognose - nach Alternativen in der Therapie kolorektaler Karzinome gesucht. Neue Ansätze in der systemischen Therapie umfassen Inhibitoren von epidermalemem Wachstumsfak-

tor, VEGF-Inhibitoren, COX-2-Inhibitoren und Farnesyltransferase-Inhibitoren (Van Cutsem et al. 2002).

Die Immuntherapie bietet sich hier als Ergänzung oder Alternative zu bisherigen Strategien der Tumorthherapie an. Verschiedene Ansätze der Immuntherapie umfassen die Behandlung mit Zytokinen (Seymour et al. 1994), aktive spezifische Immunisierung mit autologen Tumorzellen (Vermorken et al. 1999), adoptive Immuntherapie und den Einsatz monoklonaler Antikörper (Riethmuller et al. 1998; Koda et al. 2001).

In dieser Arbeit wurde zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort in einem Kolonkarzinom-Mausmodell der Ansatz der Vakzinierung mit in vitro behandelten autologen DC gewählt.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Basierend auf den in der Einleitung geschilderten Verhältnissen, waren die Ziele der Arbeit:

1. Optimierung des Protokolls von Inaba (Inaba et al. 1992) zur Generierung muriner DC aus Knochenmark.
2. Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Reifestimuli auf die Aktivierung von DC *in vitro* mittels Flowzytometrie, IL-12-ELISA und <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay.
3. Prophylaktische und therapeutische Vakzinierung von Mäusen, basierend auf einem in unserem Labor etablierten Modell der DC-basierten Vakzinierung bei murinem Kolonkarzinom in BALB/c-Mäusen (Th2-gewichtet).
4. Etablierung eines Modells der DC-basierten Vakzinierung bei murinem Kolonkarzinom in C57BL/6-Mäusen (Th1-gewichtet).
5. Prophylaktische und therapeutische Vakzinierung im C57BL/6-Mausstamm, Vergleich der Ergebnisse mit dem BALB/c-Mausstamm.
6. Vergleich der DC aus beiden Mausstämmen *in vitro* mittels Flowzytometrie, IL-12-ELISA und <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay.
7. Charakterisierung der erzielten Immunantwort nach DC-basierter Vakzinierung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS®	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
FACS-Gerät FACSCalibur® mit CellQuest-Software und FACS-Gerät EPICS PROFILE II mit EPICS Elite Software	Becton Dickinson, Heidelberg Coulter, Hialeah, USA
ELISA-Reader MRX®	Dynatech Laboratories, San Diego, USA
96-Well MicroCell Harvester	Skatron, Transby, Norwegen
Liquid Scintillation Beta Counter®	Wallac, Turku, Finnland
Magnetic Particle Concentrator MPC®	Dynal, Oslo, Norwegen
Photometer Pharmingen Gene Quant®	Pharmingen, San Diego, USA
Phasenkontrastmikroskop Diaphot TMD®	Nikon, Japan
Laminar-Air-Flow-Werkbank	Heraeus, München
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart
Bestrahlung	Elektronenbeschleuniger des Instituts für Strahlentherapie, Medizinische Klinik Innenstadt der LMU München
Cryoson® Stickstofftank	Consarctic, Schöllkrippen

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

### 2.2.1 Reagenziensätze

Bezeichnung	Hersteller
IL-12-p40-ELISA	R & D Systems, Minneapolis, USA
sheep-anti-rat Dynabeads M-450® für magnetische Zellseparation	Dynal, Oslo, Schweden
Orthomune Reagens für Erythrozytenlyse	Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd
LAL-Test auf Endotoxinaktivität	BioWhittaker, Walkersville, MD, USA

### 2.2.2 Zellkulturmaterial

Bezeichnung	Hersteller
500/250/40 ml Cellstar® Zellkulturflasche	Omega Scientific, Tarzana, CA, USA
96-Well Rundbodenplatte	Falcon, New Jersey, GB
96-Well Flachbodenplatte	Falcon, New Jersey, GB
Pipettenspitzen	Bibby Sterilin, Stone Staffs, USA
Sterilfilter Minisart NML 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Zellstrainersieb 70/100 µm	Falcon, New Jersey, GB

### 2.2.3 Zytokine und Chemokine

Bezeichnung	Hersteller
mGM-CSF	Roche, Mannheim, Deutschland
IL-4	Peptotech, London, GB
TNF- $\alpha$	Peptotech, London, GB



### 2.2.4 Oligodesoxynukleotide (ODN)

Bezeichnung	Hersteller
ODN 1826 = 5' TCC ATG <u>ACG</u> TTC CTG <u>ACG</u> TT 3'	Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA, USA
ODN 1982 = 5' TCC AGG <u>ACT</u> TCT CTC <u>AGG</u> TT 3'	Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA, USA

Die verwendeten ODN waren komplett phosphothioat-modifiziert, wobei ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt wird, um den raschen Abbau durch Nukleasen zu verhindern. Der Endotoxingehalt wurde im LAL-Assay gemessen und lag stets unter dem Detektionslimit (0.03 EU/ml). Die ODN wurden in TE-Puffer gelöst und ihre genaue Konzentration mittels Photometrie bestimmt. Für die Arbeitslösung wurde die Stocklösung mit PBS auf 1 mg/ml verdünnt; die Stocklösung blieb PBS-frei, da ein negativer Einfluss des enthaltenen Phosphors auf die Versuchsergebnisse nicht auszuschließen ist.

### 2.2.5 Puffer, Lösungen, Medien und Seren

Bezeichnung	Hersteller
Phosphate buffered saline (PBS)	Boehringer, Mannheim
Tris-Hydrochlorid EDTA Puffer (TE-Puffer)	Boehringer, Mannheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Rattenserum	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	GibcoBRL, Paisley, GB
Gentamicin	Sigma, St. Louis, USA
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	Biochrom, Berlin
DME-Medium (DMEM)	BioWhittaker, Verviers, Frankreich

Zur Vermeidung unspezifischer Stimulation der Zellen wurden ausschließlich endotoxinarme Medien und Substanzen eingesetzt. Die Medien wurden mit 1% L-Glutamin, 1% Gentamicin sowie zusätzlich 10% FCS supplementiert - letzteres wurde zuvor 30 Minuten bei 56°C wärmebehandelt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren.

Für die Kultur der dendritischer Zellen, die Kokultur dendritischer Zellen mit Tumorzellen und die Kultur für den 3H-Proliferationsassay wurde RPMI 1640, für die Kultur der Tumorzellen hingegen DMEM verwendet.

Im Folgenden wird auf diese Medien jeweils als „Vollmedium-x%“ bezug genommen. Hierbei gibt die Prozentangabe Auskunft über Konzentration und Art des zugegebenen Serums.

## 2.2.6 Antikörper

Die Antikörper wurden sowohl für die negative Selektion von Zellen mittels Dynal-System (vgl. 2.5.1.1) wie auch für die Analyse der Oberflächenmoleküle mittels Flowzytometrie (vgl. 2.6.4) verwendet.

Bezeichnung	Marker	Spezifität	Klon	Isotyp	Hersteller
CD14	FITC	rat-anti-mouse	RmC5-3	rat IgG1	Pharmingen, San Diego, USA
CD4(L3T4)	FITC	rat-anti-mouse	GK1.5	rat IgG2b	Pharmingen, San Diego, USA
CD40	FITC	hamster-anti-mouse	HM40-3	hamster IgM	Pharmingen, San Diego, USA
CD45R/B220		rat-anti-mouse	RA3-6B2	rat IgG2a	Pharmingen, San Diego, USA
CD80	RPE	rat-anti-mouse	1G10	rat IgG2a	SBA, Birmingham, USA
CD86(B7-2)	FITC	rat-anti-mouse	GL1	rat IgG2a	Pharmingen, San Diego, USA
CD8a	FITC	rat-anti-mouse	53-6.7	rat IgG2a	Pharmingen, San Diego, USA
H2db-I	FITC	mouse-anti-mouse	KH95	mouse IgG2b	Pharmingen, San Diego, USA
H2Dd-I	FITC	mouse-anti-mouse	34-2-12	mouse IgG2a	Pharmingen, San Diego, USA
IgG2b	FITC	rat	A95-1		Pharmingen, San Diego, USA
IgG2b	RPE	rat	G2b-1-2		SBA, Birmingham, USA
Ly-6G(Gr-1)	FITC	rat-anti-mouse	RB6-8C5	rat IgG2b	Pharmingen, San Diego, USA
MHC-II	RPE	rat-anti-mouse	NIMR-4	rat IgG2b	SBA, Birmingham, USA
MOMA2	FITC	rat-anti-mouse	MOMA-2	rat IgG2b	Serotec, Oxford, GB

**2.2.7 Sonstige Materialien**

Bezeichnung	Hersteller
LPS ( <i>E. coli</i> 055:B5)	Sigma, St. Louis, USA
<sup>3</sup> H-Thymidin (1 mCi/ml)	Amersham Buchler, Braunschweig
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin	Sigma, St. Louis, USA
EDTA	Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Propidium Iodid	Sigma, St. Louis, USA
Szintillationsflüssigkeit für Beta-Counter	Wallac, Turku, Finnland
Isofluran 1-Chlor-2,2,2-Trifluorethyl-Difluormethylether (Forene®)	Abbott, Wiesbaden
1 ml Spritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
50 ml Polypropylen-Röhrchen	Omega Scientific, Tarzana, USA
5 ml Polypropylen-Röhrchen	Falcon, New Jersey, GB

## **2.3 Tumor-Zelllinien**

Bei allen verwendeten Zelllinien wurde während der gesamten Versuchsdauer regelmäßig die Mykoplasmenbildung überprüft - die Zellen erwiesen sich in dieser Hinsicht stets als negativ. Die Zelllinien wurden über den Cell Lines Service in Heidelberg bezogen.

### **2.3.1 Kolonkarzinom-Zelllinie Colon-26**

Diese Zelllinie stammt ursprünglich aus einer mit N-nitroso-N-methylurethan behandelten, 6 Monate alten BALB/c-Maus, und wirkt tumorigen in BALB/c und nu/nu-Mäusen.

### **2.3.2 Nierenkarzinom-Zelllinie Renca**

Das Nierenzellkarzinom Renca hatte sich spontan in BALB/c-Mäusen entwickelt und ist tumorigen in syngenen Mäusen.

### **2.3.3 Kolonkarzinom-Zelllinie MC38**

Hier handelt sich dabei um ein Adenokarzinom des Kolons, das durch Injektion von Dimethylhydralazin in C57BL/6-Mäusen induziert werden konnte. MC38 wirkt tumorigen in syngenen Mäusen.

## 2.4 Mausstämme

Die Tierversuche wurden genehmigt durch die Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag Aktenzeichen 211-2531-7/2000). Der geschlossene Tierstall der medizinischen Klinik entspricht den gesetzlichen Hygieneanforderungen, ausgebildete Tierpfleger versorgen maximal 6 Mäuse pro Käfig mit Pelletfutter und Wasser ad libidum. Die verwendeten Mäuse waren sämtlich weiblich, 6 bis 8 Wochen alt, und wurden nach einer Woche Akklimatisierung als Versuchstiere benutzt. Spätestens ein Jahr nach Beginn des jeweiligen Versuchs wurden die Tiere getötet. Bezogen wurden die Tiere bei der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln.

### 2.4.1 BALB/c-Mausstamm

Die BALB/c-Mäuse (Bagg albino/c) sind bekannt dafür, dass die Th1-Antwort bei ihnen vergleichsweise schwach ausgeprägt ist (Hsieh et al. 1995). Aus dem Knochenmark von Tibia und Femur dieser Mäuse wurden DC generiert, des weiteren wurden die Splenozyten für Versuche verwendet. BALB/c-Mäuse wurden sowohl prophylaktisch wie auch therapeutisch vakziniert.

### 2.4.2 C57BL/6-Mausstamm

Bei diesem Mausstamm ist beschrieben, dass eine Th1-Antwort bevorzugt wird (Heinzel et al. 1989). Auch bei diesen Mäusen wurden DC und T-Zellen in vitro untersucht sowie Vakzinierungsversuche durchgeführt.

### 2.4.3 FVB-Mausstamm

Aus diesen Mäusen wurden vorwiegend die T-Zellen aus der Milz, allogene zu BALB/c und C57BL/6, für den <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay verwendet. Außerdem wurden Versuche durchgeführt, bei denen T-Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen von FVB-DC stimuliert wurden.

## 2.5 Kultursysteme

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5%CO<sub>2</sub>-/Luft-Gemisch. Es wurde durchgehend Vollmedium-FCS10% verwendet.

Adhärenent wachsende Zelllinien wurden in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Zum Abernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium dekantiert und die Zellen mit 5% Trypsin-EDTA überschichtet, bis sich ein Großteil der Zellen unter Schwenken vom Boden ablöste. Dieser Prozess wurde anschließend mit kaltem Vollmedium-10% gestoppt, die Zellsuspension mit Vollmedium-10% aufgefüllt auf 50 ml und abzentrifugiert (400g, 6 Minuten, 20°C).

### 2.5.1 Generierung und Kultur muriner dendritischer Zellen

#### 2.5.1.1 Generierung muriner DC aus Knochenmark

Eine 6 bis 8 Wochen alte Maus wurde mit Isofluran anästhesiert und durch Exartikulation der Halswirbelsäule getötet. Nach Fixierung der Maus und Desinfektion der Hinterläufe mit Ethanol wurden durch Entfernung von Fell und Muskulatur Tibia und Femur freigelegt und in eine Kulturschale mit Kulturmedium auf Eis überführt.

An der Laminar-Air-Flow-Werkbank wurden die Knochen nachgereinigt, kurz in Ethanol getaucht und in frisches Kulturmedium überführt. Jeweils ein Knochen wurde auf einer Seite knapp unterhalb der Epiphyse eröffnet und mit etwa 5 ml Kulturmedium ausgespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch ein Zellstrainersieb (100 µm) filtriert und das Sieb mit 10 ml Kulturmedium nachgespült.

Nach Zentrifugation (350 g, 5 min, 4 °C, AC/DC 7) wurden die enthaltenen Erythrozyten durch Zugabe von 20 ml Erythrozyten-Lysepuffer und 10-minütige Inkubation lysiert. Nach erneuter Zentrifugation (350 g, 5 min, 4 °C, AC/DC 7) wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

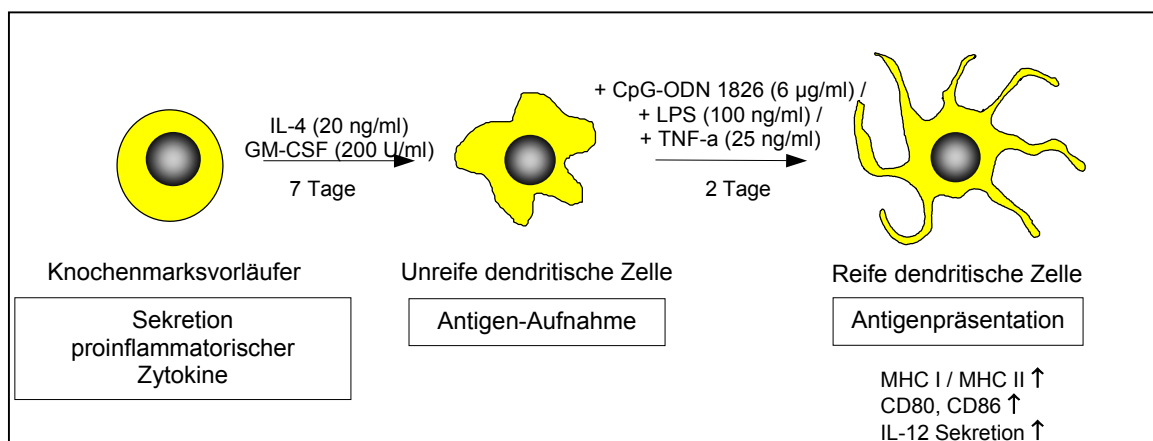
Durch Zugabe von *rat-anti-mouse* Antikörpern gegen Ly-6G, CD 45R, MHC II, CD 4 und CD 8 wurden Granulozyten, B-Zellen, Monozyten und T-Zellen markiert.

Nach Inkubation und Waschen wurden die markierten Zellen durch Zugabe von *sheep-anti-rat magnetic beads* gebunden und mit Hilfe des magnetischen Dynal-Zellseparators aus der Suspension gesogen: Dynabeads sind uniforme Polymer-Kügelchen mit einem Durchmesser von 4,5  $\mu\text{m}$  und eingebettetem magnetischem Material ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Während stetigem Schwenken über 30 Minuten bei 4°C binden die Dynabeads an zuvor antikörpermarkierte Zellen. Anschließend wird das Röhrchen in ein starkes Magnetfeld im Dynal MPC eingebracht, die markierten Zellen heften sich an die entsprechende Röhrchenwand. Nach magnetischer Zellseparation bleiben in diesem Ansatz 15-20% der Ausgangszellen übrig. Diese resultierenden Zellen, hauptsächlich DC-Vorläufer, wurden in Vollmedium-FCS10%, versetzt mit IL-4 und murinem GM-CSF, kultiviert.

### 2.5.1.2 Reifeinduktion muriner DC

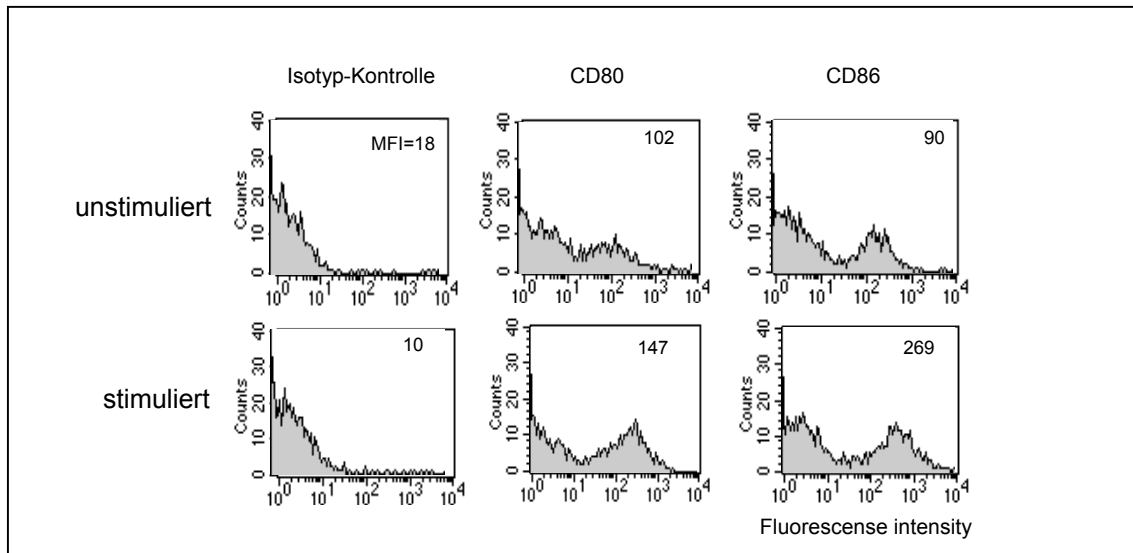
Zur Induktion der morphologischen Veränderungen, die zur effizienten Antigenpräsentation und voller kostimulatorischer Kapazität führen, benötigen dendritische Zellen ein spezielles Zytokin-Milieu. Nach siebentägiger Inkubation in Anwesenheit von IL-4 (20 ng/ml) und GM-CSF (200 U/ml) wurden daher die noch unreifen DC zunächst durch Waschen mit PBS von IL-4 und GM-CSF gereinigt sowie anschließend in neuem Vollmedium-FCS10% resuspendiert und dieses neben IL-4 und GM-CSF mit Reifestimulatoren versetzt. Zur Reifeinduktion wurden entweder TNF- $\alpha$  (25 ng/ml), LPS (100 ng/ml) oder CpG-ODN 1826 (6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verwendet.

Abbildung 8 zeigt schematisch Generierung und Stimulierung dendritischer Zellen.



**Abbildung 8: Generierung und Stimulierung dendritischer Zellen.** DC-Vorläufer werden aus murinem Knochenmark gewonnen und sieben Tage in Medium mit Zusatz von IL-4 und GM-CSF kultiviert. Anschließend erfolgt die Reifestimulation mittels CpG-ODN, LPS oder TNF- $\alpha$  für 48 Stunden.

Die erfolgreiche Stimulation dendritischer Zellen, ausgedrückt durch eine vermehrte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche, wird durch flowzytometrische Ergebnisse belegt (vgl. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Flowzytometrische Bestimmung von CD80 und CD86 auf der Oberfläche dendritischer Zellen.** Im Gegensatz zu unstimulierten DC zeigen stimulierte DC einen deutlichen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für CD80 und CD86. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mehreren Versuchen.

Als optimaler Zeitraum für die Stimulation erwies sich in Vorversuchen die Dauer von 48 Stunden; wurden die DC länger stimuliert, kam es zu einer vermehrten Apoptose (nachgewiesen durch Anfärbung mit Propidium Iodid).

## 2.5.2 Kokultur dendritischer Zellen mit Tumorzellen

Zur Produktion der Tumorstoffe wurden DC mit bestrahlten Tumorzellen kokultiviert. Dazu wurden, wie oben beschrieben, über Vorläuferzellen aus murinem Knochenmark DC generiert und in Vollmedium-FCS10%, versetzt mit IL-4 und mGM-CSF, kultiviert. Am Tag 7 wurden in einer 250 ml Kulturflasche DC in einem bestimmten Verhältnis mit zuvor mit 100 Gy bestrahlten Tumorzellen zusammengebracht. In drei unabhängigen Versuchen wurde das optimale Verhältnis der Zellen in der Kokultur untersucht. Dabei erwies sich ein Verhältnis von DC zu Tumorzellen von 5:1 einer 1:1-Mischung hinsichtlich der Induktion einer antitumoralen Immunantwort überlegen (ohne Abbildung).

Die DC wurden für insgesamt drei Tage mit bestrahlten Tumorzellen inkubiert, 48 Stunden vor Vakzinierung erfolgte die Aktivierung der DC (vgl. 2.5.1.2).



### 2.5.3 Kokultur muriner Lymphozyten mit allogenen dendritischen Zellen

#### 2.5.3.1 Präparation muriner Lymphozyten aus der Maus

Nach Töten der Maus (vgl. 2.5.1.1) wurde der Bauchraum eröffnet und die Milz steril herauspräpariert. Durch Filtrieren der Milz durch ein Zellstrainersieb (70  $\mu\text{m}$ ) wurden die Zellen aus dem Gewebsverband gelöst. Nach Zentrifugation (350 g, 5 min, 4 °C) wurden anschließend wiederum die Erythrozyten lysiert (vgl. 2.5.1).

Analog zur Vorgehensweise bei der DC-Isolation wurden hier die Granulozyten und B-Lymphozyten durch Inkubation mit *rat-anti-mouse* Antikörpern (Ly6G und CD 45 R) markiert und mit dem Dynal-System aus der Suspension entfernt. Übrig blieben zu über 95% reine T-Lymphozyten (ca. 60% CD4-positiv, ca. 30% CD8-positiv).

#### 2.5.3.2 Kokultur der murinen Lymphozyten mit allogenen dendritischen Zellen

Die 48-stündige Kokultur von DC und T-Lymphozyten wurde an Tag 10 nach Generierung der DC (und nach Reifestimulierung für 48 Stunden) in 96-Well-Platten mit je 200  $\mu\text{l}$  Vollmedium-FCS10% durchgeführt. Dabei wurden je 150.000 T-Zellen mit DC im Verhältnis DC zu T-Zellen von 1:10, 1:50 und 1:250 kultiviert. Auf Medienwechsel und Zytokinsupplementierung wurde während der Kokultur verzichtet.

## 2.6 Analyseverfahren

### 2.6.1 Phasenkontrastmikroskopie

Zur regelmäßigen optischen Darstellung der Vitalität und Proliferation der Zellen wurde die Phasenkontrastmikroskopie verwendet. Dabei entstehen beim Durchtritt von Licht durch verschiedene Materialien Gang- und Phasenunterschiede zwischen den Lichtwellen. Polarisationsfilter im Strahlengang wandeln diese Unterschiede in Helligkeitsdifferenzen um, was eine kontrastreiche Darstellung ermöglicht.

Charakteristische Oberflächenmoleküle dendritischer Zellen wurden mit gegen CD80, CD86 und MHC II Antikörpern angefärbt, nach Waschen in PBS und Zentrifugation wurden die Zellen in RPMI suspendiert und auf dem Objektträger fixiert. Avitale Zellen wurden durch Anfärbung mit Propidium Iodid kenntlich gemacht.

### 2.6.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Interleukin-12 ist ein disulfid-gelinktes heterodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, bestehend aus einer 40 kDa (p40)- und einer 35 kDa (p35)-Untereinheit; p40 und p35 haben selbst keine IL-12-Aktivität. In den vorgestellten Versuchen wurde der IL-12 p40 Assay von Quantikine R&D verwendet.

Dabei werden 96-Well-Flachbodenstrips mit einem zytokinspezifischem Antikörper beschickt, der an der Plastikoberfläche bindet. Der zu untersuchende Überstand wird in 100 µl Einheiten und in Duplikaten zu den gebundenen Antikörpern gegeben, wobei das zu untersuchende Zytokin proportional zu seiner Konzentration an die Antikörper bindet. Nach 30-minütiger Inkubationszeit und dreimaligem Waschen wird ein zweiter enzymmarkierter, ebenfalls zytokinspezifischer, jedoch an einem anderen Epitop bindender Antikörper zugegeben. Das gebundene Enzym vermittelt in Abhängigkeit seiner Konzentration und damit in Abhängigkeit der Zytokinkonzentration eine Farbreaktion, die photometrisch bestimmt werden kann. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher spezifischer Antikörper wird das Risiko der Kreuzreaktivität minimiert und damit eine möglichst spezifische Aussage über die Konzentration des untersuchten Zytokins ermöglicht.

### 2.6.3 <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay

Zum Nachweis der Proliferation von Lymphozyten wurde 1  $\mu$ Ci des radioaktiv markierten Nukleotids <sup>3</sup>H-Thymidin an Tag 3 der Kokultur der DC mit T-Lymphozyten (vgl. 2.5.3) zum Medium zugegeben. Der Einbau radioaktiven Thymidins in die DNA der Zellen ist dabei abhängig von der DNA-Neusynthese und dient somit als Marker der Zellproliferation: Je stärker eine Kultur proliferiert, desto mehr DNA wird synthetisiert, und desto mehr radioaktives Thymidin wird auch in die Zellen eingebaut. 24 Stunden nach der Zugabe von <sup>3</sup>H-Thymidin wurden die Zellkulturen mit Hilfe eines MicroCell Harvesters auf eine Filterplatte transferiert und dabei das nicht inkorporierte, radioaktive Thymidin abgesaugt. Nach Zugabe einer Szintillationsflüssigkeit wurde die inkorporierte Radioaktivität in einem Szintillationszähler als Zerfälle/min (cpm) bestimmt. Die Zunahme der Zellzahl ist danach direkt proportional der zellgebundenen Radioaktivität.

### 2.6.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Die Zellen werden dabei mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, die an entsprechende Oberflächenantigene binden. In einem Flüssigkeitsstrom werden die markierten Zellen einzeln durch zwei aufeinander folgende Laserstrahlen (Argon,  $\lambda_1=488$  nm,  $\lambda_2=635$  nm) geführt. Bestimmte Eigenschaften der Zellen (z.B. Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile) resultieren in einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch ausgewertet wird. Das Vorwärtsstreulicht wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht: Der Laserstrahl regt das Chromophor der zur Markierung der Zielstruktur verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden.

Ausgewertet wurde nach dem Prozentsatz der für einen bestimmten Marker positiven Zellen (% positiv) sowie nach der mittleren Intensität der gemessenen Fluoreszenz (*mean fluorescence intensity*), die sich proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle bzw. gebundener intrazellulärer Strukturen verhält.

Zur flowzytometrischen Analyse wurden in den dargestellten Versuchsreihen pro Färbung ca. 200.000 Zellen abzentrifugiert, mit 50 µl RPMI-Kulturmedium resuspendiert und mit je 5 µl Rat Serum versetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Nach 10minütiger Inkubation wurden die Zellen mit je 5 µl der RPE-(phycoerythrin-) markierten bzw. je 3 µl der FITC-(fluorescein-isocyanat-) markierten Antikörper gefärbt und unter Lichtausschluss für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS-FCS5% gewaschen, nochmals abzentrifugiert, resuspendiert und gemessen. Die Kontrollfärbung erfolgte mit fluoreszenzfarbstoffmarkiertem, isotypengleichem IgG (IgG2B).

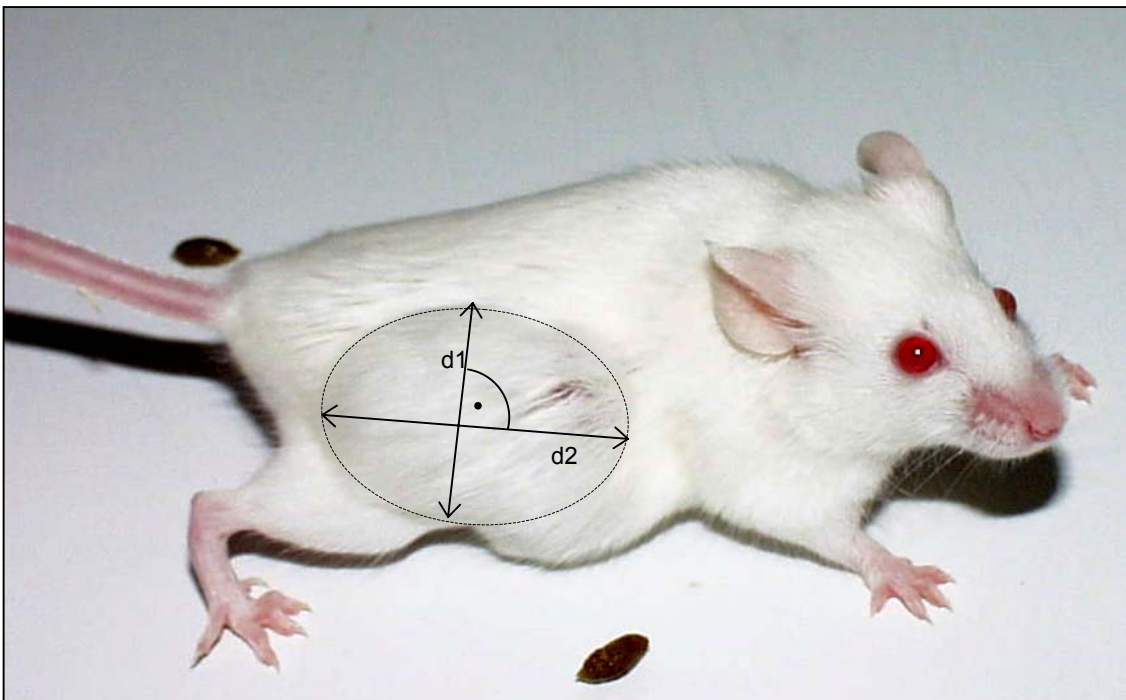
Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden im FACS-Gerät EPICS PROFILE II von Coulter bzw. im FACScalibur Gerät von Becton Dickinson gemessen und mit EPICS Elite- bzw. CellQuest-Software analysiert.

## **2.6.5 In-vivo-Vakzinierungs-Assay**

### 2.6.5.1 Subkutanes Tumormodell

Noch nicht vollständig konfluent wachsende Tumorzellen wurden durch Schütteln vom Boden der Kulturflaschen gelöst und durch dreimaliges Waschen mit HBSS von etwaig vorhandenen unspezifisch immunmodulierenden Substanzen (wie FCS) gereinigt. Die Zentrifugation erfolgte jeweils mit 350 g für 7 min (4°C, AC/DC 7). Die Zellen wurden gezählt und nicht trypangefärbte, vitale Tumorzellen in HBSS resuspendiert. Ziel dieses Waschvorgangs war die Reinigung der Zellen von eventuell immunstimulatorisch wirksamen Substanzen des Vollmediums. Die Applikation der Tumorzellsuspension in je 200 µl HBSS erfolgte subkutan in die rechte Flanke von mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>) narkotisierten Mäuse. Im prophylaktischen Ansatz erfolgte die Tumorchallenge mit jeweils 500.000 Tumorzellen, im therapeutischen Ansatz wurden jeweils 200.000 Tumorzellen injiziert.

Die Größe der halbkugelig wachsenden Tumoren wurde mittels eines Lineals bestimmt: es wurden jeweils zwei senkrecht aufeinanderstehende Durchmesser ermittelt und multipliziert. Wie in vielfachen Vorversuchen nachgewiesen, erfolgte das Tumorwachstum bei C26 und MC38 sehr homogen: eine Größe von  $400 \text{ mm}^2$  wurde nach durchschnittlich 20 Tagen erreicht. RenCa-Tumorzellen wuchsen etwas langsamer, nach 20 Tagen lag die Größe bei etwa  $300 \text{ mm}^2$ . Mäuse mit einer Tumorgröße von über  $500 \text{ mm}^2$  wurden getötet, ebenso Mäuse mit systemischer Erkrankung, die sich durch Gewichtsverlust, reduzierten Allgemeinzustand und Zittern bemerkbar machte. Abbildung 10 zeigt die Vermessung eines subkutan induzierten Tumors.

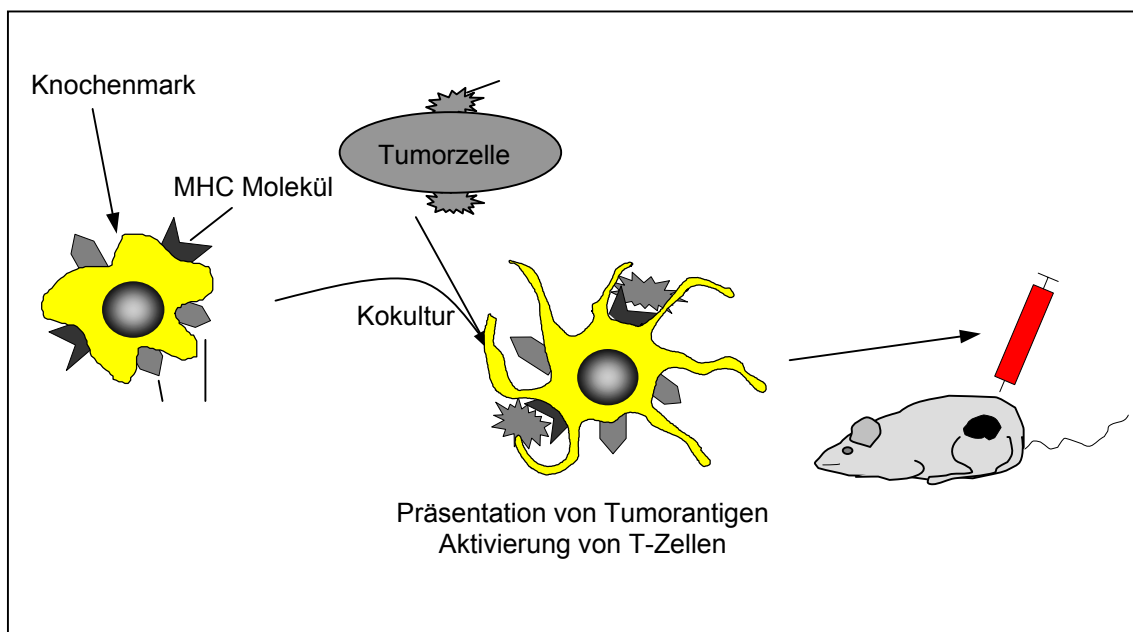


**Abbildung 10: BALB/c-Maus mit subkutan wachsendem Tumor.** Je 500.000 Tumorzellen der C26-Tumorzelllinie wurden s.c. in die rechte Flanke injiziert. Nach 20 Tagen misst der Tumor in diesem Beispiel  $16 \times 25 \text{ mm}$ , gemessen als längster Durchmesser ( $d1$ ) mal senkrecht darauf stehendem Durchmesser ( $d2$ ), also  $400 \text{ mm}^2$ .

### 2.6.5.2 Vakzinierung mit DC

Um die Fähigkeit der DC, Immunantworten *in vivo* zu induzieren, zu überprüfen, wurde ein Vakzinierungs-Assay eingesetzt (vgl. Abbildung 11). Prinzipiell erfolgte dieser Assay in zwei Ansätzen: prophylaktisch und therapeutisch. Bei ersterem wurde die Vakzine (je 1 Million DC nach Kokultur mit Tumorzellen und Aktivierung, vgl. 2.5.2) subkutan sieben Tage vor Tumorinduktion (vgl. 2.6.5.1) injiziert, während bei letzterem die Vakzinierung sieben Tage nach Tumorinduktion stattfand.

Mäuse aus beiden Gruppen, die nach Vakzinierung und Tumorinduktion tumorfrei geblieben waren, wurden Langzeitbeobachtungen bis zu 10 Wochen und systematischer Tumor-Rechallenge sowohl auf der ipsilateralen (gleiche Seite wie Vakzinierung) wie auch auf der kontralateralen Seite unterzogen.



**Abbildung 11: Graphische Darstellung des Vakzinierungsassays.** Unreife DC werden mit bestrahlten (100 Gy) Tumorzellen kokultiviert und aktiviert. Die subkutane Injektion erfolgt sieben Tage vor bzw. sieben Tage nach Tumorchallenge. Eigene Abbildung.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden jeweils als arithmetisches Mittel angegeben; die Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwertes (SEM, Standard Error of Mean) dargestellt. Mittels eines t-Tests für unabhängige Stichproben nach Student wurden die Ergebnisse auf Signifikanz geprüft. Bei  $p < 0.05$  (\*) wurde statistische Signifikanz angenommen,  $p < 0.01$  (\*\*) bezeichnet ein sehr signifikantes Ergebnis,  $p < 0.001$  (\*\*\*) ein höchst signifikantes Ergebnis. Ergibt sich aus der statistischen Analyse keine Signifikanz, so ist dies mit *ns* (nicht signifikant) gekennzeichnet. Sämtliche Berechnungen wurden mit Hilfe der Analysefunktion von Microsoft EXCEL© erstellt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Optimierung des Protokolls zur Generierung dendritischer Zellen in vitro**

Wie zuvor beschrieben, sollen in unserem Ansatz zunächst murine DC aus Knochenmarksvorläuferzellen generiert werden. Anschließend werden sie mit Antigen beladen und zur Reifung gebracht (und damit aktiviert), bevor sie als Tumorstoffe injiziert werden.

##### **3.1.1 Anreicherung pluripotenter Vorläuferzellen aus dem Knochenmark**

Modifiziert nach vorbeschriebenem Protokoll (Inaba et al. 1992) wurden DC aus Knochenmarksvorläuferzellen generiert. Die Methodik ist unter 2.5.1.1 ausführlich beschrieben; wesentlich ist bei der Generierung von DC dabei die magnetische Selektion von Granulozyten, B- und T-Lymphozyten. Die Knochenmarkszell-Suspension enthält vor der magnetischen Depletion - flowzytometrisch gemessen - zu jeweils ca. einem Drittel Granulozyten und B-Lymphozyten, T-Lymphozyten machen etwa 3% aus, während Monozyten und Makrophagen bei etwa 10% liegen. Der Anteil der DC (gemessen anhand der Moleküle CD80 und CD86) liegt vor Depletion bei etwas unter einem Prozent (Daten ohne Abbildung). Nach der Depletion sind noch ca. 20-25% der Ausgangszellzahl vorhanden.

Nach Depletion und sieben Tagen Kultur in GM-CSF und IL-4 konnten DC bis auf 60-70% angereichert werden, der Anteil der CD80-/CD86-positiven DC betrug ca. 50%, nach Zusatz von LPS oder CpG-ODN 1826 lag er in den letzten 48 Stunden der Kultur bei über 80%.



### 3.1.2 GM-CSF im Kulturmedium

Wichtiger Zusatz im Kulturmedium bei der Generierung von DC ist GM-CSF. GM-CSF induziert die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen/Monozyten, Granulozyten und von DC (Inaba et al. 1992). In Vorarbeiten waren bereits GM-CSF verschiedener Hersteller (Boehringer, Bachem, Peprotech) verglichen worden (Seiderer 2002), wobei sich das Produkt von Boehringer (jetzt Roche) als am besten geeignet hinsichtlich der Proliferationsinduktion erwies. Dieses Produkt wurde daher auch in dieser Arbeit verwendet.

In drei unabhängigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die bereits vorher verwendete GM-CSF-Konzentration von 200 U/ml (Seiderer 2002) bezüglich der Generierung von DC einer Konzentration von 100 U/ml überlegen ist. Die Expression kostimulatorischer Moleküle wird durch die höhere GM-CSF-Dosis signifikant gesteigert.

### 3.1.3 IL-4 im Kulturmedium

IL-4 ist ebenso ein Faktor, der die Proliferation und Differenzierung von DC günstig beeinflusst. In Vorarbeiten waren verschiedene Konzentrationen von IL-4 untersucht worden (Seiderer 2002), wobei sich im Vergleich 5 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml eine Konzentration von 20 ng/ml als günstig hinsichtlich der Generierung von DC erwiesen hatte.

Drei unabhängige Versuche mit IL-4 in den Konzentrationen 5 ng/ml, 20 ng/ml und 80 ng/ml konnten dies bestätigen, wobei die Ergebnisse für 20 ng/ml und 80 ng/ml sich bezüglich der Expression von CD80 und CD86 nicht signifikant unterschieden. Mit zunehmender Konzentration führt IL-4 dabei zu einer Abnahme der Gesamtzellzahl.

Im Vergleich der Kultur ohne IL-4 und mit IL-4 in einer Konzentration von 20 ng/ml zeigte sich bei den IL-4-defizienten DC eine tendenziell, jedoch nicht signifikant geringere Expression kostimulatorischer und antigenpräsentierender Moleküle auf der Zelloberfläche. Bezüglich der Produktion von IL-12 bzw. der Stimulationskapazität gegenüber alloge-  
nen T-Zellen konnte ebenfalls nur eine Tendenz, kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.





### 3.2 Einfluss unterschiedlicher Reifestimuli auf dendritische Zellen in vitro

Als etablierte Reifestimuli für dendritische Zellen sind unter anderem  $\text{TNF-}\alpha$ , LPS und bestimmte CpG-ODN beschrieben. Im folgenden werden  $\text{TNF-}\alpha$ , LPS und CpG-ODN 1826 hinsichtlich ihrer Potenz als Reifestimuli für DC verglichen.

Die Reife der DC wurde in vitro mittels Flowzytometrie überprüft: mit zunehmender Reife werden die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in höherem Ausmaß exprimiert. Als weitere funktionelle in-vitro-Tests wurden in dieser Arbeit die Fähigkeit der DC, IL-12 zu sezernieren (mittels IL-12-ELISA), bzw. die Fähigkeit der DC, allogene T-Zellen zu stimulieren (mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay), evaluiert.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen jeweils die Ergebnisse aus neun unabhängigen Versuchen, wobei BALB/c-DC jeweils im Basis-Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert und anschließend mit einem der Stimuli über 48 Stunden aktiviert wurden. Die Auswertung erfolgte mittels Flowzytometrie, IL-12-ELISA und  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay.

Aufgetragen sind auf der y-Achse jeweils die relativen Prozentangaben basierend auf der statistischen Auswertung der neun Versuche. Als 100% wurden in jedem Versuch zur Relativierung von dimensionalen Unterschieden die Ergebnisse des Ansatzes "BALB/c + GM-CSF + IL-4 + CpG-ODN 1826" gesetzt. Farblich wurde in jeder der Grafiken wie folgt codiert:

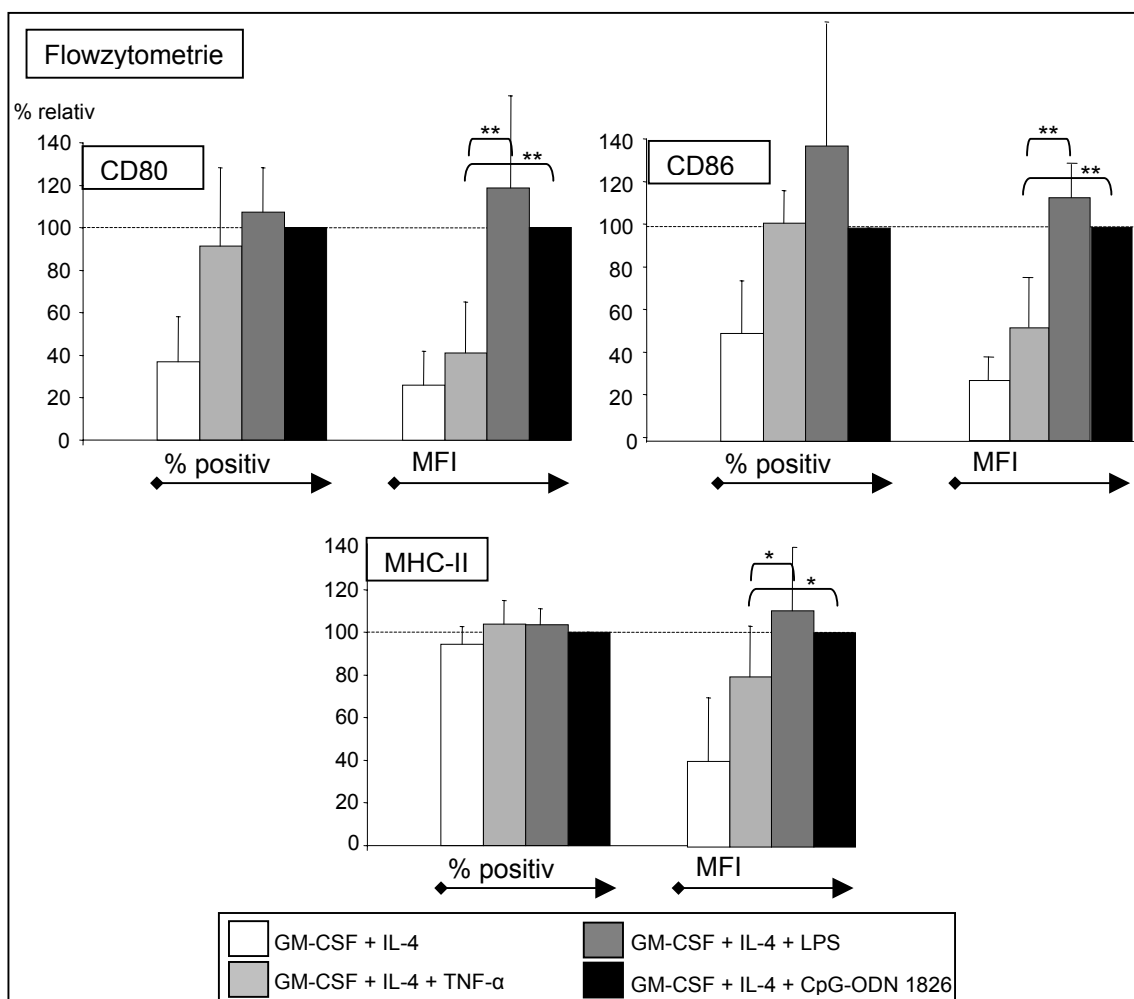
	GM-CSF + IL-4
	GM-CSF + IL-4 + $\text{TNF-}\alpha$
	GM-CSF + IL-4 + LPS
	GM-CSF + IL-4 + CpG-ODN 1826

#### 3.2.1 CpG-ODN 1826 ist der potenteste Reifestimulus dendritischer Zellen in vitro.

Vorab waren bereits CpG-ODN 1826 und  $\text{TNF-}\alpha$  hinsichtlich der Stimulationspotenz verglichen worden (Brunner et al. 2000), wobei die Stimulation der DC mit CpG-ODN 1826 effektiver möglich war. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit in mehrfachen Versuchen in vitro bestätigt werden, wobei zusätzlich noch LPS in seiner Funktion als Reifestimulus untersucht wurde.

### 3.2.1.1 CpG-ODN 1826 und LPS bewirken eine vermehrte Expression von CD80 und CD86 im Vergleich zu TNF- $\alpha$ .

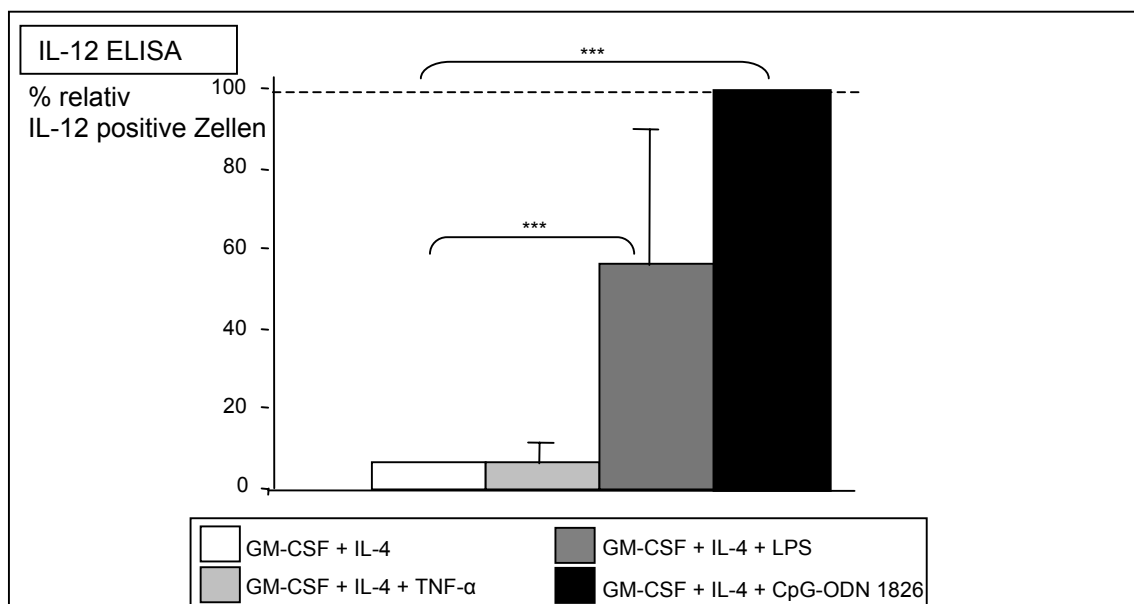
Die Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchungen (vgl. 2.6.4) zeigen, dass alle Stimuli im Vergleich zum Basismedium zu einer vermehrten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wie auch des antigenpräsentierenden Moleküls MHC-II führen. Der Effekt ist bei MHC-II am geringsten ausgeprägt und insgesamt deutlicher, wenn man die MFI, die *mean fluorescence intensity*, betrachtet. CpG-ODN 1826 wie auch LPS führen hinsichtlich der MFI bei den kostimulatorischen Molekülen zu einer auch im Vergleich zu TNF- $\alpha$  hoch signifikanten Mehr-Expression (vgl. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Effekt verschiedener Reifestimuli auf dendritische Zellen: Ergebnisse der Flowzytometrie.** CpG-ODN 1826 und LPS bewirken eine vermehrte Expression von CD80, CD86 und MHC auf der Oberfläche von DC aus BALB/c-Mäusen. Aufgetragen sind auf der y-Achse jeweils die relativen Prozentangaben basierend auf der statistischen Auswertung der neun Versuche. Als 100% wurden in jedem Versuch zur Relativierung von dimensional Unterschieden die Ergebnisse des Ansatzes "BALB/c+GM-CSF+IL-4+CpG-ODN1826" gesetzt. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.2.1.2 CpG-ODN 1826 induziert mehr IL-12-Sekretion als LPS und TNF- $\alpha$

Stimuliert man DC über 48 Stunden mit CpG-ODN 1826, LPS oder TNF- $\alpha$  und bestimmt anschließend die IL-12-Sekretion mittels ELISA-Technik (vgl. 2.6.2), so erweist sich hier CpG-ODN 1826 als potentester Stimulus. Im Vergleich zu TNF- $\alpha$ , das nicht in der Lage ist, über das Basisniveau hinaus die Produktion von IL-12 zu steigern, wird unter dem Einfluss von LPS etwa siebenmal mehr IL-12 gebildet ( $p < 0.001$ ), unter dem Einfluss von CpG-ODN 1826 zeigt sich sogar eine etwa 12fach erhöhte IL-12-Produktion ( $p < 0.001$ , vgl. Abbildung 13).

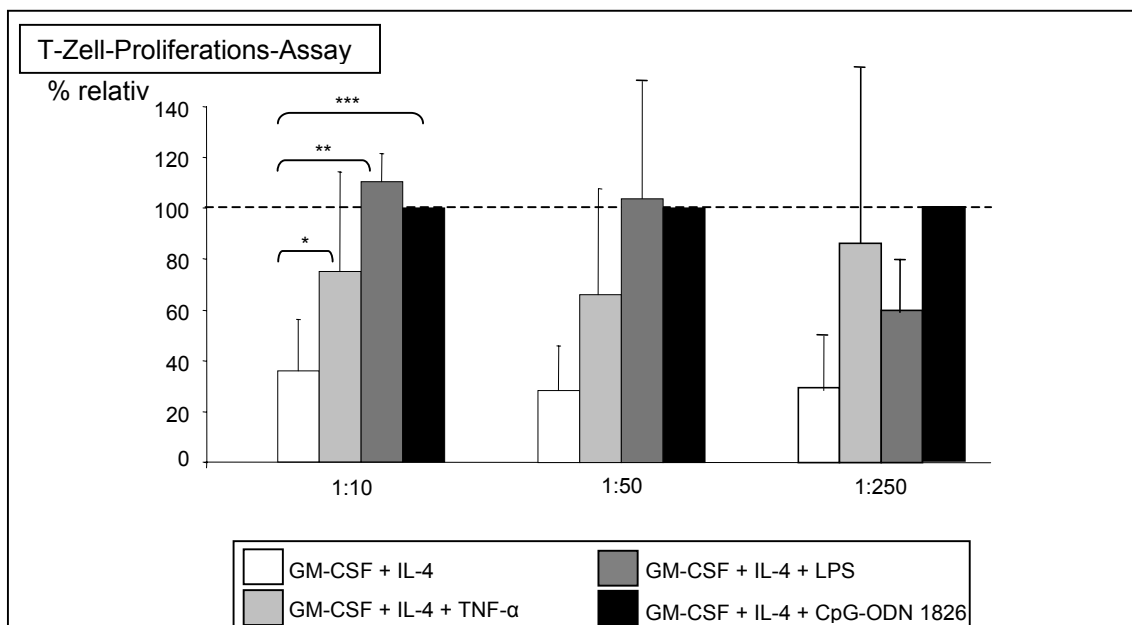


**Abbildung 13: Effekt verschiedener Reifestimuli auf dendritische Zellen: Ergebnisse des IL-12-ELISA.** Hierbei zeigt CpG-ODN den größten Effekt, gefolgt von LPS, während TNF- $\alpha$  über das Basismedium hinaus keine Stimulation der IL-12-Sekretion zeigt. Aufgetragen sind auf der y-Achse jeweils die relativen Prozentangaben basierend auf der statistischen Auswertung der neun Versuche. Als 100% wurden in jedem Versuch zur Relativierung von dimensionalen Unterschieden die Ergebnisse des Ansatzes "BALB/c+GM-CSF+IL-4+CpG-ODN1826" gesetzt. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.2.1.3 CpG-ODN 1826 und LPS sind TNF- $\alpha$ hinsichtlich der Stimulation der Proliferation allogener T-Zellen überlegen.

In diesem Ansatz wurden, wie unter 2.5.3.2 beschrieben, allogene T-Zellen mit unterschiedlich reifestimulierten DC (GM-CSF + IL-4 alleine bzw. mit Zusatz von TNF- $\alpha$ , LPS oder CpG-ODN 1826) kokultiviert und mittels eines  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassays die Stimulation der Proliferation der allogeneren T-Zellen bestimmt.

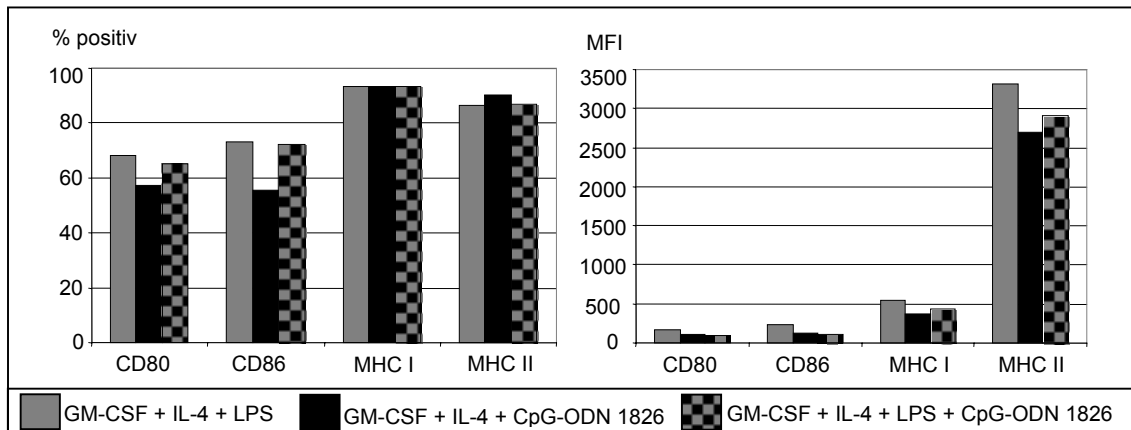
DC wurden dabei im Verhältnis 1:10, 1:50 und 1:250 zu den T-Zellen gegeben. TNF- $\alpha$  erreicht eine signifikante ( $p=0.047$ ) Steigerung der T-Zell-Proliferation gegenüber der Basisstimulation, LPS ( $p=0.0017$ ) und CpG-ODN 1826 ( $p=0.001$ ) zeigen sich TNF- $\alpha$  hier ebenfalls signifikant überlegen. CpG-ODN erweist sich gerade in der höchsten Verdünnung von 1:250 hier als die potenteste Substanz hinsichtlich der Aktivierung von T-Zellen (vgl. Abbildung 14).



**Abbildung 14: Effekt verschiedener Reifestimuli auf dendritische Zellen: Ergebnis des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassays.** Aufgetragen sind auf der y-Achse jeweils die relativen Prozentangaben basierend auf der statistischen Auswertung der neun Versuche. Als 100% wurden in jedem Versuch zur Relativierung von dimensional Unterschieden die Ergebnisse des Ansatzes "BALB/c+GM-CSF+IL-4+CpG-ODN1826" gesetzt. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

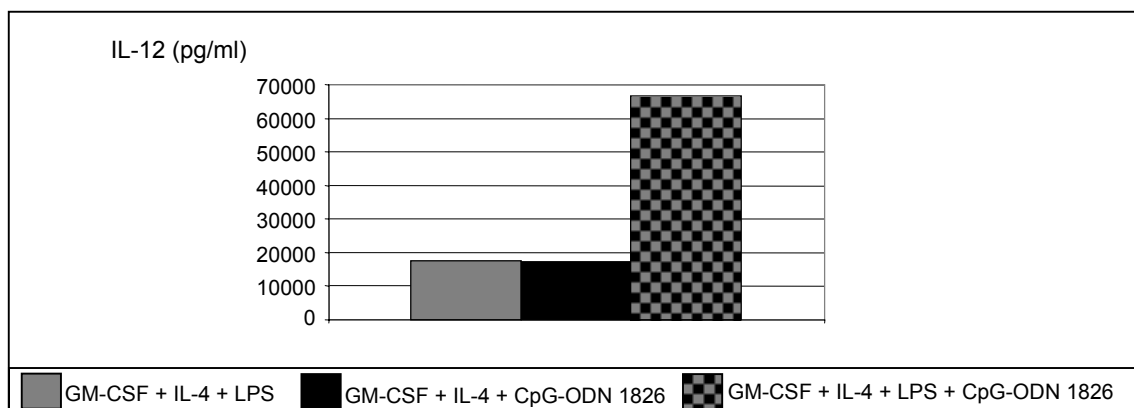
### 3.2.2 Eine Kombination von CpG und LPS bewirkt eine vermehrte IL-12-Sekretion.

Nachdem CpG-ODN 1826 wie auch LPS sich in oben beschriebenen Versuchen beide als potente Reifestimuli erwiesen hatten, wurde überprüft, ob eine Kombination beider Substanzen synergistische Effekte ergibt. Dabei zeigten sich in der flowzytometrischen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede bezüglich CD80, CD86 und MHC (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Kombination von CpG-ODN 1826 mit LPS als Reifestimulus für dendritische Zellen: Ergebnis der Flowzytometrie.** CpG-ODN 1826 + LPS bewirkt keine vermehrte Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC I und II. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

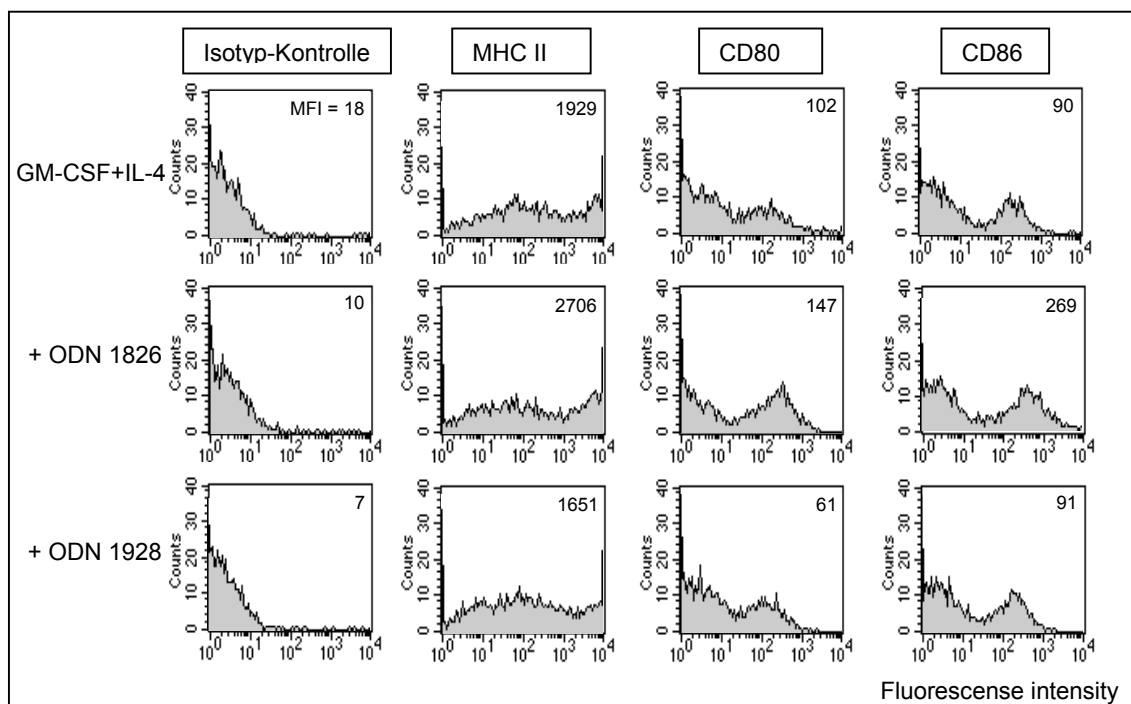
Im IL-12-ELISA jedoch konnte eine deutliche Steigerung der IL-12-Sekretion der so behandelten DC festgestellt werden. Die Kombination von CpG-ODN 1826 mit LPS führte dabei zu einer dreifach erhöhten IL-12-Produktion gegenüber einer alleinigen Stimulation mit LPS oder CpG-ODN 1826 (vgl. Abbildung 16).



**Abbildung 16: Kombination von CpG-ODN 1826 mit LPS als Reifestimulus für dendritische Zellen: Ergebnis des IL-12-ELISA.** CpG-ODN 1826 + LPS als Reifestimulus bewirken in Kombination eine höhere IL-12-Produktion als die Einzelsubstanzen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

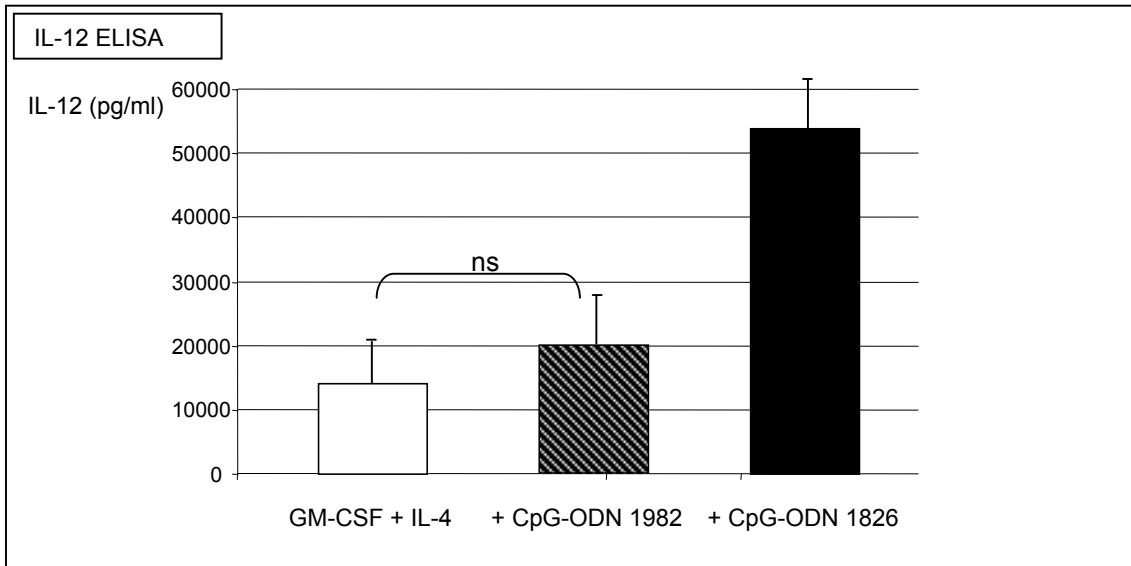
### 3.2.3 Kontroll-CpG bewirkt keine Reifestimulation dendritischer Zellen *in vitro*.

Nachdem die Potenz von CpG-ODN 1826 als Stimulus für DC in den oben beschriebenen Versuchen etabliert war, wurde weiter untersucht, ob wirklich die vermuteten CG-Sequenzen für diesen Effekt verantwortlich sind. In drei unabhängigen Versuchen wurde statt des Oligonukleotids CpG-ODN 1826 das CpG-ODN 1982, in dem (im Vergleich zu CpG-ODN 1826) die wesentlichen CG-Sequenzen durch CT- bzw. GG-Sequenzen ersetzt sind, verwendet. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass dieses Oligonukleotid nicht in der Lage ist, die Reifung von DC zu induzieren (vgl. Abbildung 17).



**Abbildung 17: Wirkung von CpG-ODN 1928 auf murine dendritische Zellen: Flowzytometrisches Ergebnis.** Während CpG-ODN 1826 zu einer vermehrten Expression von MHC II, CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche führt, bewirkt CpG-ODN 1928 keine Stimulation von DC. Gezeigt ist ein Versuch aus zwei unabhängigen Versuchen.

Analog zeigte sich auch in der Auswertung des IL-12-ELISA, dass das Kontroll-CpG-ODN nicht in der Lage ist, eine signifikante Erhöhung der IL-12-Produktion der DC gegenüber dem Basisniveau zu induzieren (vgl. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Wirkung von CpG-ODN 1928 auf murine dendritische Zellen: Ergebnis des IL-12-ELISA.** Während CpG-ODN 1826 zu einer deutlichen Steigerung der IL-12-Sekretion führt, bewirkt CpG-ODN 1928 keine signifikante Steigerung der IL-12-Sekretion. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. ns=nicht signifikant.



### 3.3 Induktion einer antitumoralen Immunantwort in vivo

Die Reifestimulation der DC hat großen Einfluss auf die Tumorantwort in vivo, so dass CpG- und LPS-aktivierte DC konsekutiv eine potentere Immunantwort gegen Tumoren induzieren sollten (Brunner et al. 2000).

Jeweils zwei bis drei unabhängige Versuche zeigten, dass DC, die lediglich mit Tumorzellen kokultiviert, jedoch nicht stimuliert wurden, nur eine sehr geringe tumorprotektive Wirkung haben. Die Vakzinierung mit CpG-aktivierten DC, die jedoch keiner Tumorzell-Kokultur unterzogen wurden, führt ebenso zu keinem potenten protektiven Effekt. Wurden Mäuse lediglich mit bestrahlten Tumorzellen vakziniert, konnte ebenfalls keine Hemmung des Tumorwachstums gezeigt werden.

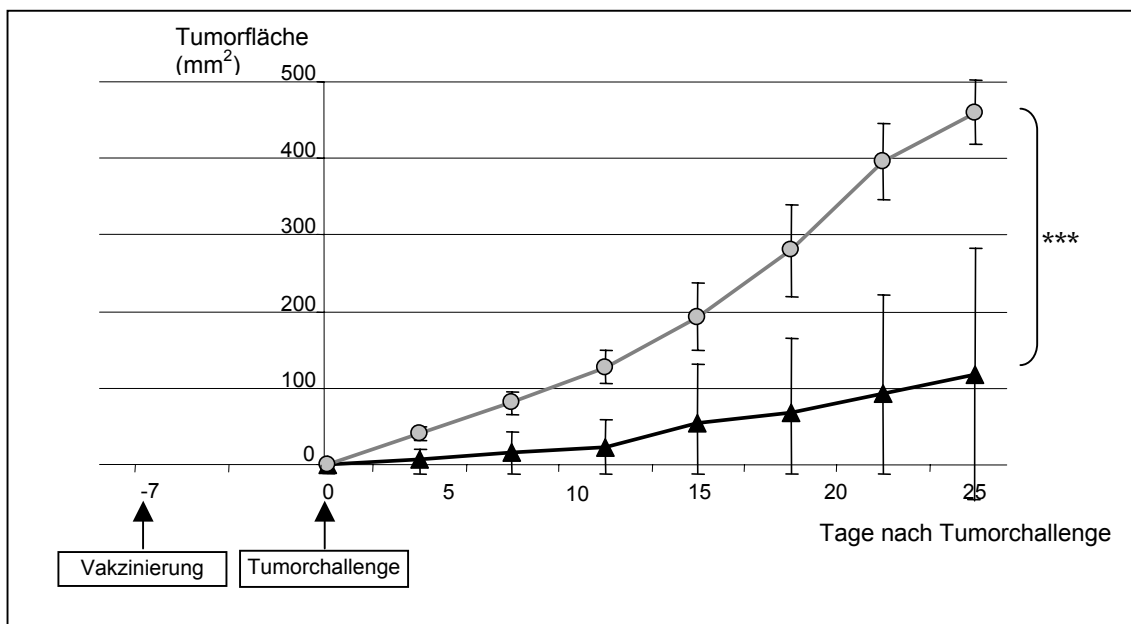
Für die im folgenden dargestellten In-vivo-Vakzinierungsversuche wurden also DC verwendet, die mit bestrahlten Tumorzellen kokultiviert und mit CpG-ODN 1826 aktiviert wurden. LPS wurde trotz ähnlicher Stimulationspotenz in vitro (vgl. 3.2.1) wegen der nicht gegebenen Anwendbarkeit der Substanz in vivo verworfen.

Das Prinzip der Vakzinierungsassays wurde unter 2.6.5 dargestellt, die Vakzinierung erfolgte entweder prophylaktisch (sieben Tage vor Tumorchallenge) oder therapeutisch (sieben Tage nach Tumorchallenge).

### 3.3.1 CpG-aktivierte dendritische Zellen induzieren eine potente Tumorphylaxe.

Im Rahmen der Versuche zur prophylaktischen Tumorzellvaksinierung konnte gezeigt werden, dass bei Vakzinierung mit CpG-aktivierten DC im Mittel bei drei von fünf Mäusen, also bei 60% der Tiere, ein Anwachsen der Tumorzellen völlig verhindert werden konnte, das Tumorzellwachstum bei den übrigen Mäusen wurde stark verzögert (vgl. Abbildung 19). Die Hemmung des Tumorzellwachstums war dabei höchst signifikant ( $p < 0.001$ ).

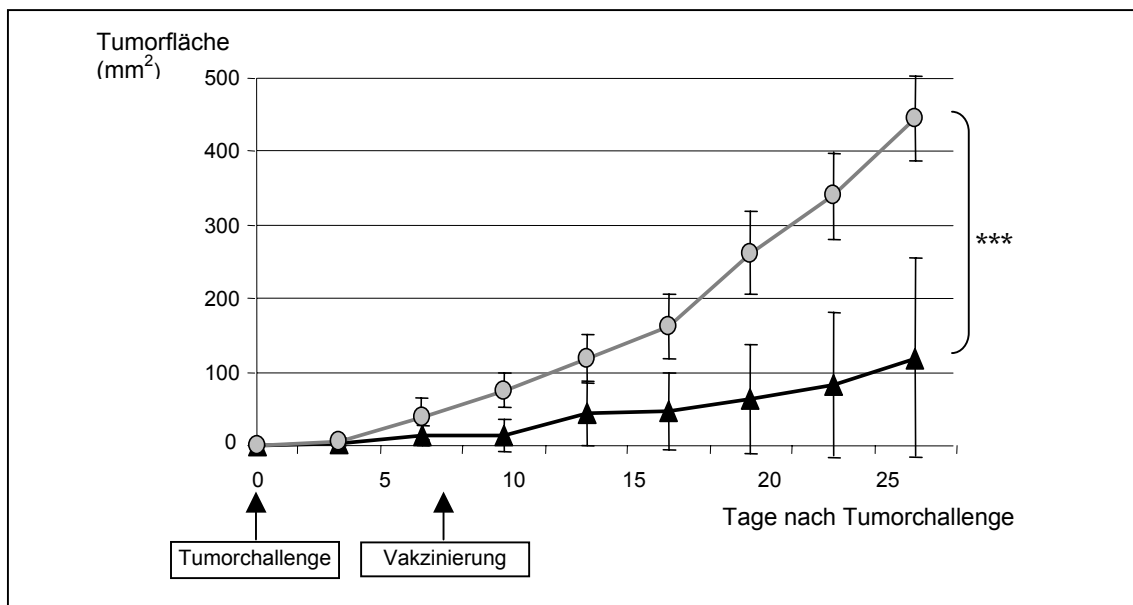
Bei unbehandelten Tieren hingegen wuchsen die Tumoren ungehemmt und sehr homogen innerhalb von etwa 20 Tagen bis zu einer Größe von ca. 4-5 cm<sup>2</sup>; diese Tiere verstarben an den Folgen der generalisierten Tumorerkrankung bzw. wurden euthanasiert.



**Abbildung 19: Ergebnisse der prophylaktischen Vakzinierung mit CpG-aktivierten dendritischen Zellen in BALB/c-Mäusen.** Die schwarze Kurve (▲) repräsentiert den Mittelwert aus insgesamt 20 prophylaktisch vakzinierter Versuchstieren, die graue Kurve (○) den Mittelwert aus 20 nicht-vakzinierter Kontrolltieren. Gezeigt ist die statistische Auswertung aus vier unabhängigen Versuchen. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

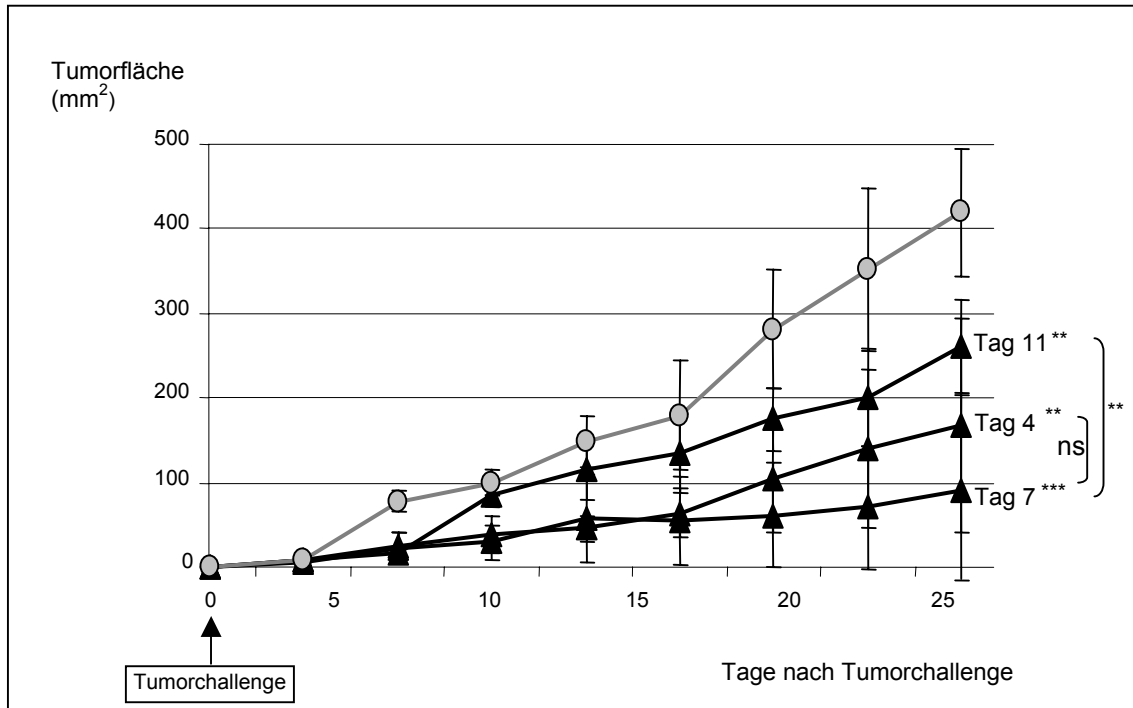
### 3.3.2 CpG-aktivierte DC induzieren eine potente therapeutische anti-Tumor-Wirkung.

Die subkutan induzierten Tumoren waren zum Zeitpunkt der therapeutischen Vakzinierung nach sieben Tagen durchschnittlich bereits vier Quadratmillimeter groß und somit gut zu tasten. Dennoch konnten diese bereits manifesten Tumoren bei durchschnittlich zwei von fünf Mäusen mit CpG-aktivierten DC erfolgreich therapiert werden. 40% der Tiere wurden somit von bereits ausgebildeten Tumoren befreit, in den übrigen Mäusen konnte eine Hemmung des Tumorwachstums beobachtet werden. Die Tumoren in der Kontrollgruppe wuchsen wiederum ungehemmt (vgl. Abbildung 20). Auch im therapeutischen Ansatz konnte eine höchst signifikante Hemmung des Tumorwachstums beobachtet werden ( $p < 0.001$ ).



**Abbildung 20: Ergebnisse der therapeutischen Vakzinierung mit CpG-aktivierten dendritischen Zellen in BALB/c-Mäusen.** Die schwarze Kurve (▲) repräsentiert den Mittelwert aus insgesamt 15 therapeutisch vakzinierten Versuchstieren, die graue Kurve (○) den Mittelwert aus 15 nicht-vakzinierten Kontrolltieren. Gezeigt ist die statistische Auswertung aus drei unabhängigen Versuchen. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Drei unabhängige Versuche wurden zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der therapeutischen Vakzinierung durchgeführt. Dabei konnte bei einem Vergleich von Mäusen, die an Tag 4, Tag 7 oder Tag 11 nach Tumorchallenge vakziniert wurden, beobachtet werden, dass die Vakzinierung an Tag 7 nach Tumorchallenge den größten Erfolg zeigt (vgl. Abbildung 21).



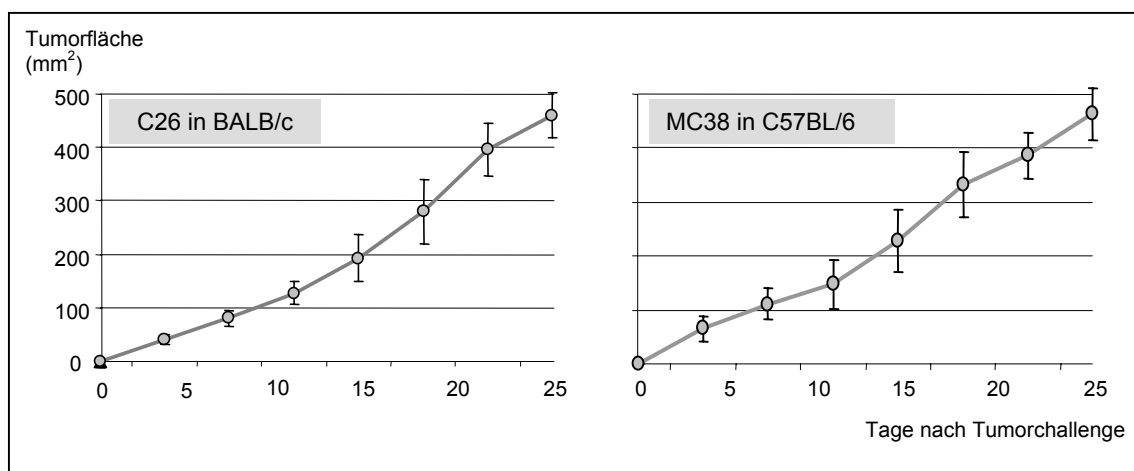
**Abbildung 21: Ermittlung des optimalen Zeitpunkts für die therapeutische Vakzinierung mit dendritischen Zellen in BALB/c-Mäusen.** Die Vakzinierung an Tag 7 nach Tumorchallenge ist effektiver als an Tag 4 oder Tag 11 nach Tumorchallenge. Die schwarzen Kurven (▲) repräsentieren jeweils den Mittelwert aus 10 therapeutisch vakzinierten Versuchstieren, die graue Kurve (○) den Mittelwert aus 10 nicht-vakzinierten Kontrolltieren. Gezeigt ist die statistische Auswertung aus zwei unabhängigen Versuchen. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . ns = nicht signifikant.

### 3.4 Vergleich der antitumoralen Immunantwort zweier Mausstämme *in vivo*

Die Ergebnisse des Vakzinierungsassays zeigen, dass die Strategie zur Generierung und Aktivierung der DC und zur Durchführung der Vakzinierungsassays erfolgreich etabliert und optimiert werden konnte.

Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden sämtlich in BALB/c-Mäusen erreicht. BALB/c ist ein Mausstamm, bei dem die Immunantwort Th2-basiert ist (Hsieh et al. 1995), das heißt, bei dem eine antitumorale Immunantwort (die Th1-gewichtet ist) schlechter induzierbar sein sollte. Es soll im folgenden untersucht werden, ob die Ergebnisse der prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierung in einem Mausstamm, dessen Immunsystem eine Th1-Antwort präferiert, besser sind.

Als Th1-gewichteter Mausstamm wurde der C57BL/6-Stamm verwendet (Heinzel et al. 1989). Da die in unserem Modell etablierte Tumorzelllinie C26 nur in BALB/c-Mäusen tumorigen wirkt, musste eine zweite Tumorzelllinie für die C57BL/6-Mäuse herangezogen werden. Hierfür wurde MC38 verwendet, ebenfalls ein murines Kolonkarzinom, das bei Injektion von ebenfalls 500.000 (prophylaktischer Ansatz) bzw. 200.000 Zellen (therapeutischer Ansatz) ein homogenes und der C26-Linie analog schnelles und aggressives Wachstum zeigt (vgl. Abbildung 22).

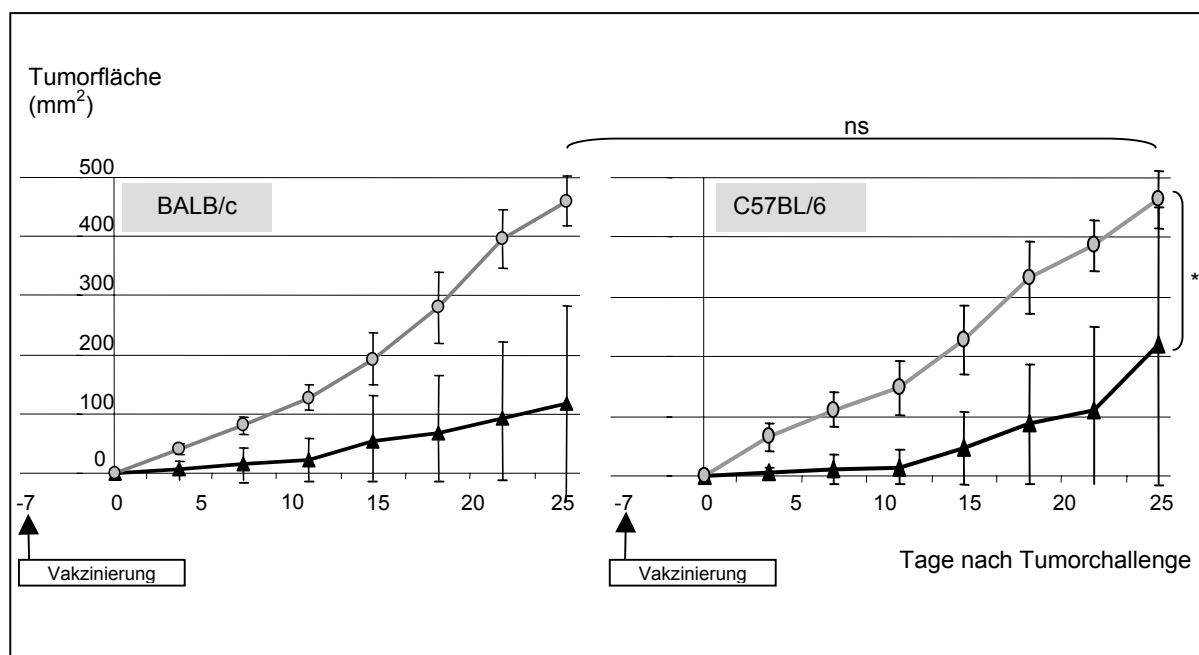


**Abbildung 22: Wachstumskurve von C26- und MC38-Tumoren in BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäusen.** Nach subkutaner Injektion von je 500.000 Tumorzellen zeigen beide Tumorzell-Linien vergleichbares homogenes Wachstum. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung.

### 3.4.1 Vergleich der Ergebnisse bei prophylaktischer Vakzinierung

In beiden Mausstämmen wurden prophylaktische Vakzinierungsassays durchgeführt, die DC wurden dabei mit CpG-ODN 1826 als erwiesenen potentem Aktivator, der auch DC aus C57BL/6 am effektivsten aktivieren konnte (vgl. 3.2.1), stimuliert.

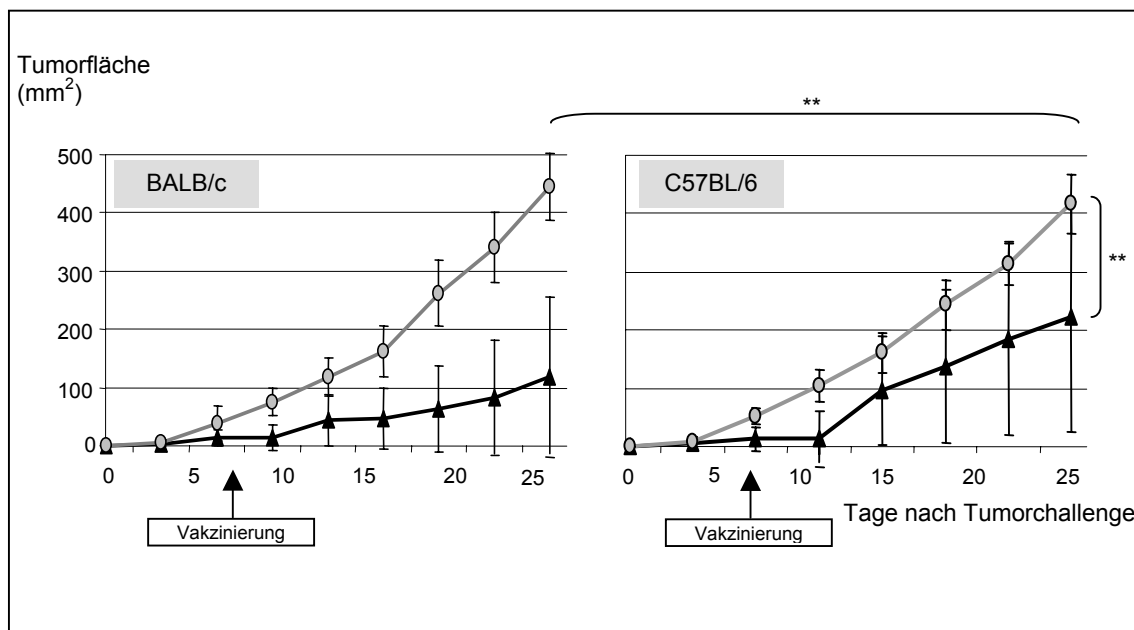
Die Auswertung vier unabhängiger Versuche ergab dabei, dass hinsichtlich der tumorfrei bleibenden Mäuse in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte: In beiden Gruppen blieben jeweils 60% der Mäuse tumorfrei. Tendenziell wurde bei C57BL/6-Mäusen ein progredienteres Tumorstadium beobachtet (vgl. Abbildung 23).



**Abbildung 23: Vergleich von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen hinsichtlich der prophylaktischen Vakzinierung.** Die schwarzen Kurven (▲) repräsentieren jeweils den Mittelwert aus 20 prophylaktisch vakziniertere Versuchstieren, die graue Kurve (○) den Mittelwert aus je 20 nicht-vakziniertere Kontrolltieren. Es ergeben sich dabei keine signifikanten Unterschiede im Vakzinierungserfolg in den beiden Mausstämmen. Gezeigt ist die statistische Auswertung vier unabhängiger Versuche. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . ns = nicht signifikant.

### 3.4.2 Vergleich der Ergebnisse bei therapeutischer Vakzinierung

Drei unabhängige Versuche wurden im therapeutischen Vakzinierungsansatz durchgeführt. Auch hier wurden beide Mausstämme mit CpG-aktivierten DC behandelt. Während bei den BALB/c-Mäusen ca. 40% tumorfrei blieben bzw. sich ein bereits vorhandener Tumor zurückbildete, war der Vakzinierungserfolg bei C57BL/6-Mäusen signifikant geringer ( $p=0.018$ ; vgl. Abbildung 24).



**Abbildung 24: Vergleich von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen hinsichtlich der therapeutischen Vakzinierung.** Die schwarzen Kurven (▲) repräsentieren jeweils den Mittelwert aus 15 therapeutisch vakziniertere Versuchstieren, die graue Kurve (○) den Mittelwert aus je 15 nicht-vakziniertere Kontrolltieren. Gezeigt ist die statistische Auswertung drei unabhängiger Versuche. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.5 Vergleich der Immunzellen zweier Mausstämme in vitro

Die Ergebnisse der In-vivo-Vakzinierungsassays entsprechen also nicht der zuvor gehegten Vermutung, dass die Tumorstimmulierung in (Th1-gewichteten) C57BL/6-Mäusen effektiver möglich sein müsste als in (Th2-gewichteten) BALB/c-Mäusen. Vielmehr erweisen sich die Ergebnisse als durchaus vergleichbar, wobei die Vakzinierung tendenziell in BALB/c-Mäusen erfolgreicher war.

Die DC beider Mausstämme werden im folgenden in vitro verglichen, mit den bereits etablierten Methoden der flowzytometrischen Bestimmung der Oberflächenmarker und der funktionellen Methoden des IL-12-ELISA und des <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassays. In den folgenden Grafiken sind wiederum relative Prozentangaben aus insgesamt neun unabhängigen Versuchen aufgetragen. Wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, wurde jeweils das Ergebnis aus dem Ansatz "BALB/c + GM-CSF + IL-4 + CpG-ODN 1826" als 100% gesetzt.

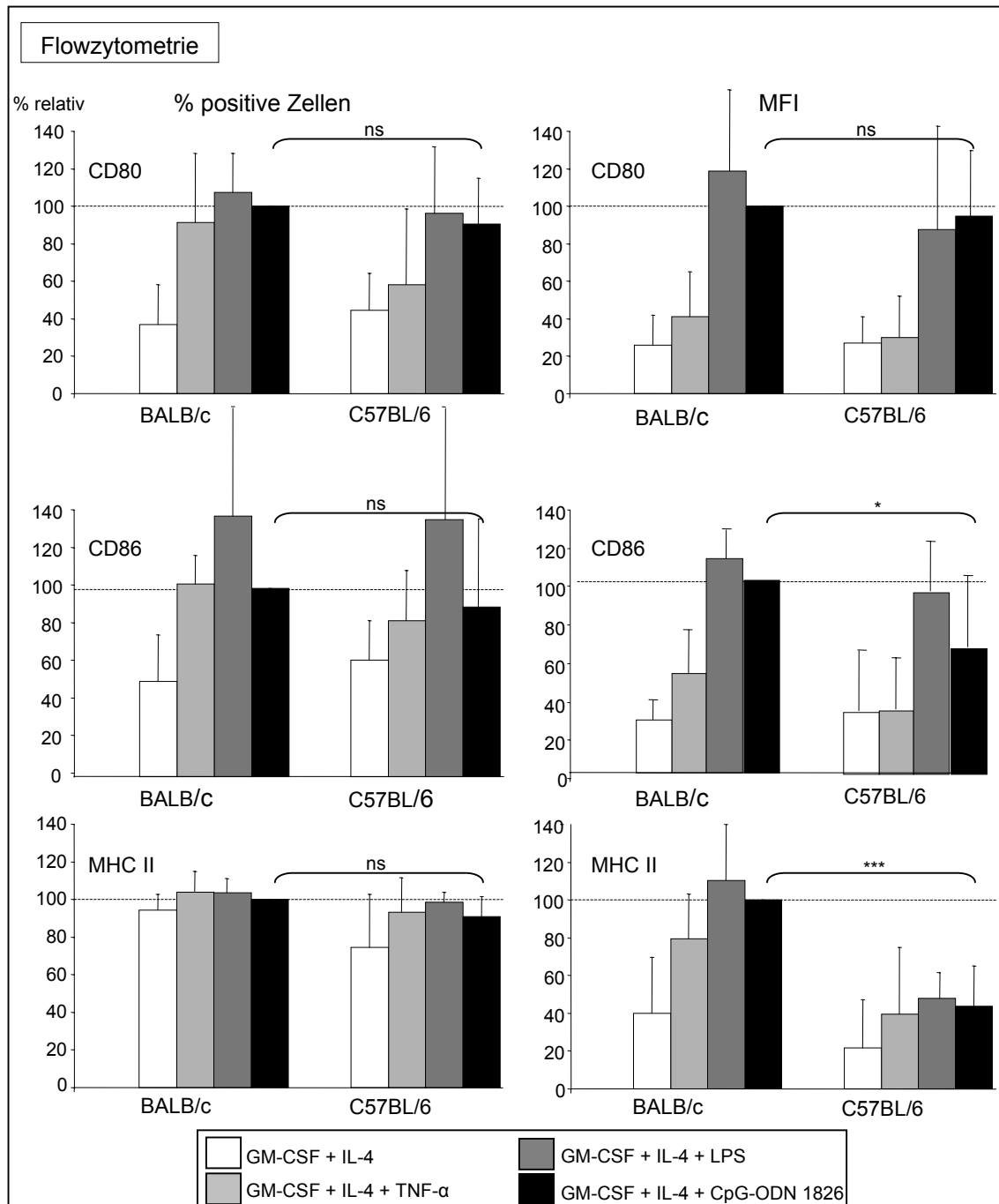
#### 3.5.1 Dendritische Zellen aus C57BL/6-Mäusen exprimieren weniger MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche als dendritische Zellen aus BALB/c-Mäusen.

Auch bei den DC der C57BL/6-Mäuse konnte in der flowzytometrischen Analyse erwartungsgemäß die Überlegenheit von CpG-ODN 1826 bzw. LPS gegenüber TNF- $\alpha$  als Reifestimulus bestätigt werden. Dabei zeigte sich bei jeweils gleicher Stimulation im Vergleich der DC der beiden Mausstämme ein weitgehend identischer Prozentsatz der für die Oberflächenmoleküle CD80, CD86 und MHC positiven Zellen. Die Überlegenheit von CpG-ODN 1826 und LPS gegenüber TNF- $\alpha$  konnte auch bei C57BL/6-DC bestätigt werden.

Betrachtete man hingegen die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität MFI, so zeigte sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der antigenpräsentierenden Moleküle: MHC war signifikant weniger dicht auf den TNF- $\alpha$ - ( $p=0.02$ ) und höchst signifikant weniger dicht auf den LPS- ( $p=0.001$ ) oder CpG-ODN 1826-stimulierten DC ( $p<0.001$ ) aus C57BL/6-Mäusen exprimiert. Auch die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 war bei den CpG-stimulierten DC aus C57BL/6 signifikant geringer als bei BALB/c-DC ( $p=0.011$ ), während die CD80-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den DC der beiden Mausstämme aufwies (vgl. Abbildung 25).

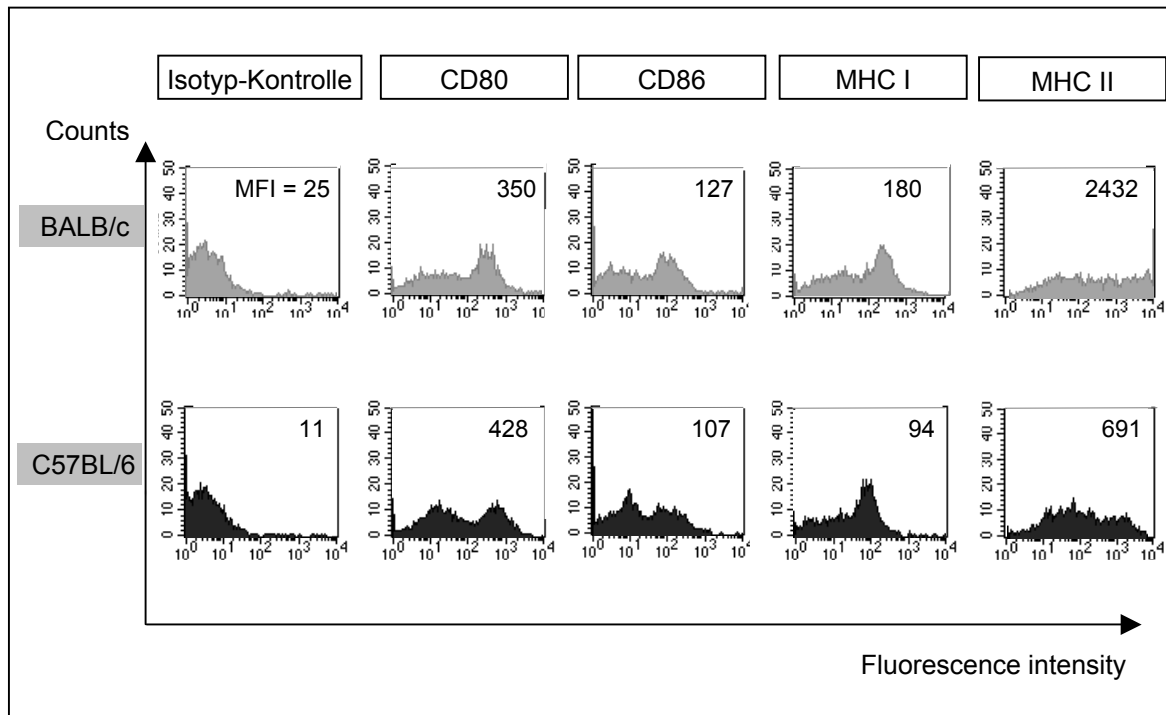
Die Signifikanzanalyse ist in der Grafik jeweils für die CpG-aktivierten DC ausgeführt, da für die in-vivo-Versuche ebenfalls CpG-aktivierte DC verwendet wurden.





**Abbildung 25: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen: Ergebnisse der Flowzytometrie (1).** Während sich bei der prozentualen Verteilung der untersuchten Marker keine Unterschiede ergeben, zeigt sich eine signifikant geringere Expression (MFI) von MHC II auf der Zelloberfläche von DC aus C57BL/6-Mäusen. Aufgetragen sind auf der y-Achse jeweils die relativen Prozentangaben basierend auf der statistischen Auswertung der neun Versuche. Als 100% wurden in jedem Versuch zur Relativierung von dimensional Unterschieden die Ergebnisse des Ansatzes "BALB/c+GM-CSF+IL-4+CpG-ODN1826" gesetzt. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung. Signifikanzniveau: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . ns=nicht signifikant.

Zur Verdeutlichung ist das Ergebnis in Abbildung 26 anhand der flowzytometrischen Originaldaten dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass (in diesem Fall CpG-ODN 1826-stimulierte) DC aus C57BL/6-Mäusen deutlich weniger MHC-I und MHC-II auf ihrer Oberfläche exprimieren.

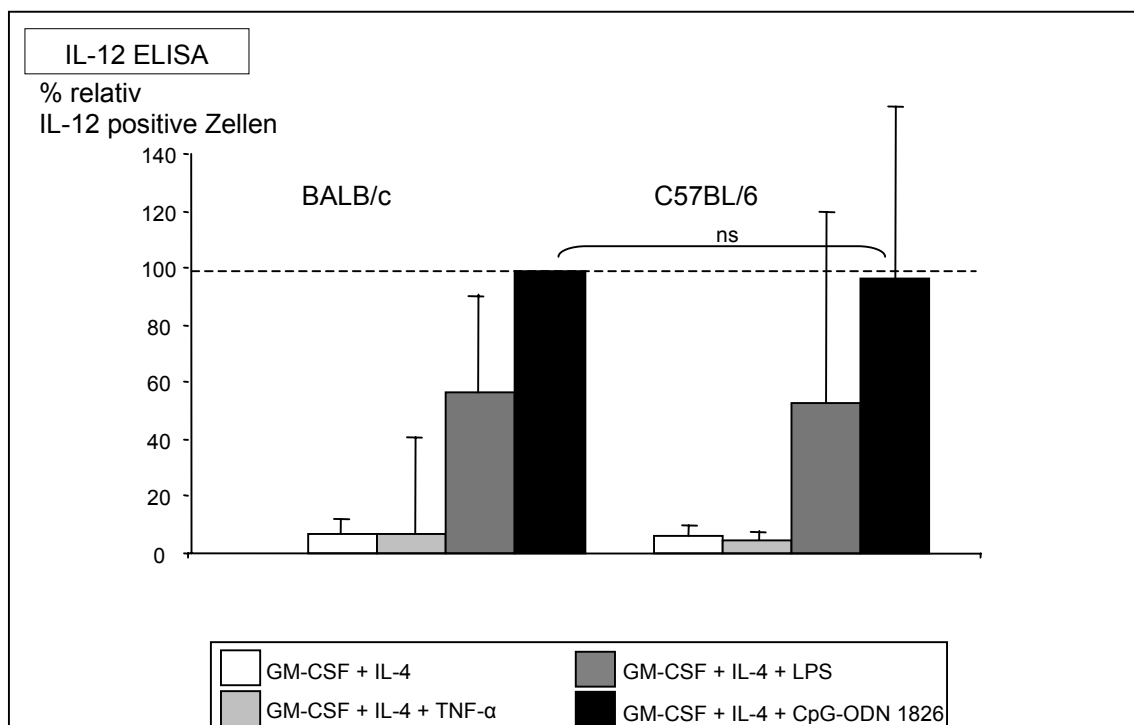


**Abbildung 26: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen: Ergebnisse der Flowzytometrie (2).** Es zeigt sich eine signifikant geringere Expression (MFI) von MHC I und MHC II auf der Zelloberfläche von DC aus C57BL/6-Mäusen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus neun unabhängigen Versuchen.

### 3.5.2 Die dendritischen Zellen beider Mausstämme verhalten sich bezüglich der IL-12-Produktion gleich.

Die DC beider Mausstämme wurden auch hinsichtlich ihrer IL-12-Sekretion verglichen; im IL-12-ELISA konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils gleich stimulierten DC gezeigt werden.

Auch hier bestätigte sich bei C57BL/6-DC das Ergebnis von BALB/c-DC, dass TNF- $\alpha$  nicht über das Niveau des Basismediums hinaus in der Lage war, eine IL-12-Produktion zu induzieren (vgl. 3.2.1.2). Zusatz von LPS konnte die IL-12-Sekretion um etwa das siebenfache steigern, unter Stimulation mit CpG-ODN 1826 konnte eine etwa 12fache Steigerung der IL-12-Produktion beobachtet werden (vgl. Abbildung 27).

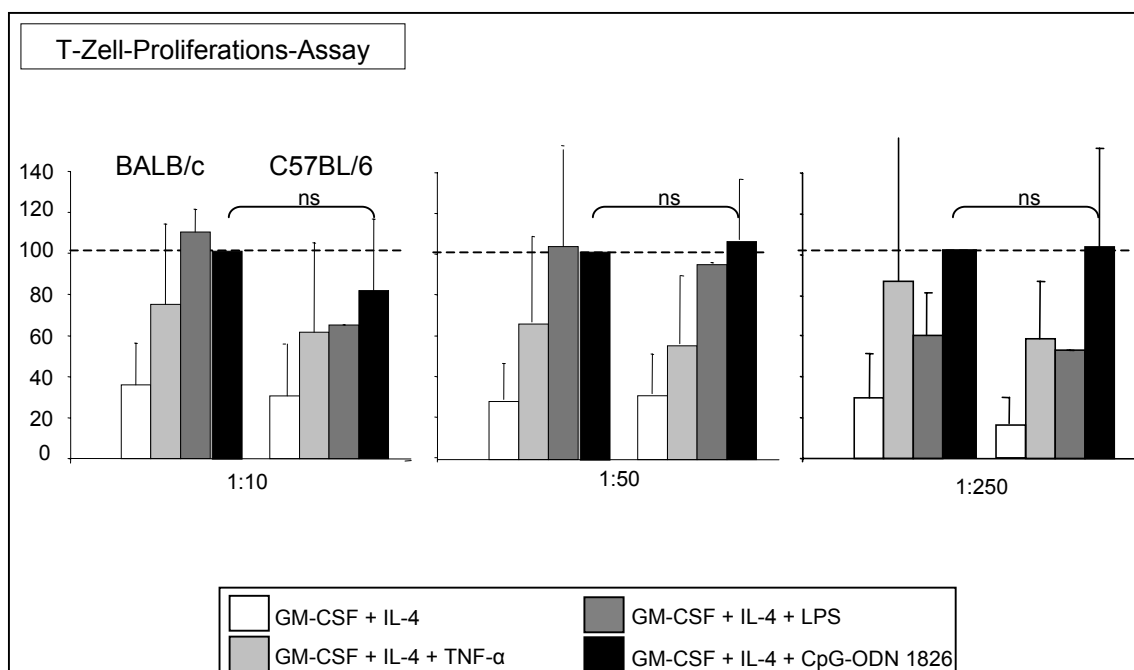


**Abbildung 27: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen: Ergebnisse des IL-12-ELISA.** Hierbei ergeben sich hinsichtlich der IL-12-Produktion keine signifikanten Unterschiede. Aufgetragen sind auf der y-Achse jeweils die relativen Prozentangaben basierend auf der statistischen Auswertung der neun Versuche. Als 100% wurden in jedem Versuch zur Relativierung von dimensional Unterschieden die Ergebnisse des Ansatzes "BALB/c+GM-CSF+IL-4+CpG-ODN1826" gesetzt. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung.

### 3.5.3 Die dendritischen Zellen beider Mausstämme verhalten sich bezüglich der Stimulation der T-Zell-Proliferation gleich.

Ebenso wurden die DC beider Mausstämme hinsichtlich ihrer T-Zell-stimulatorischen Kapazität verglichen. Wie unter 2.6.3 beschrieben, wurde dazu ein  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay verwendet. Wiederum ergab sich bezüglich der induzierten T-Zell-Proliferation durch jeweils gleich stimulierte DC beider Mausstämme kein signifikanter Unterschied.

CpG-ODN zeigte sich gerade in der geringsten DC-zu-T-Zell-Ratio als potentester Stimulus im Vergleich zu LPS und TNF- $\alpha$  (vgl. Abbildung 28).



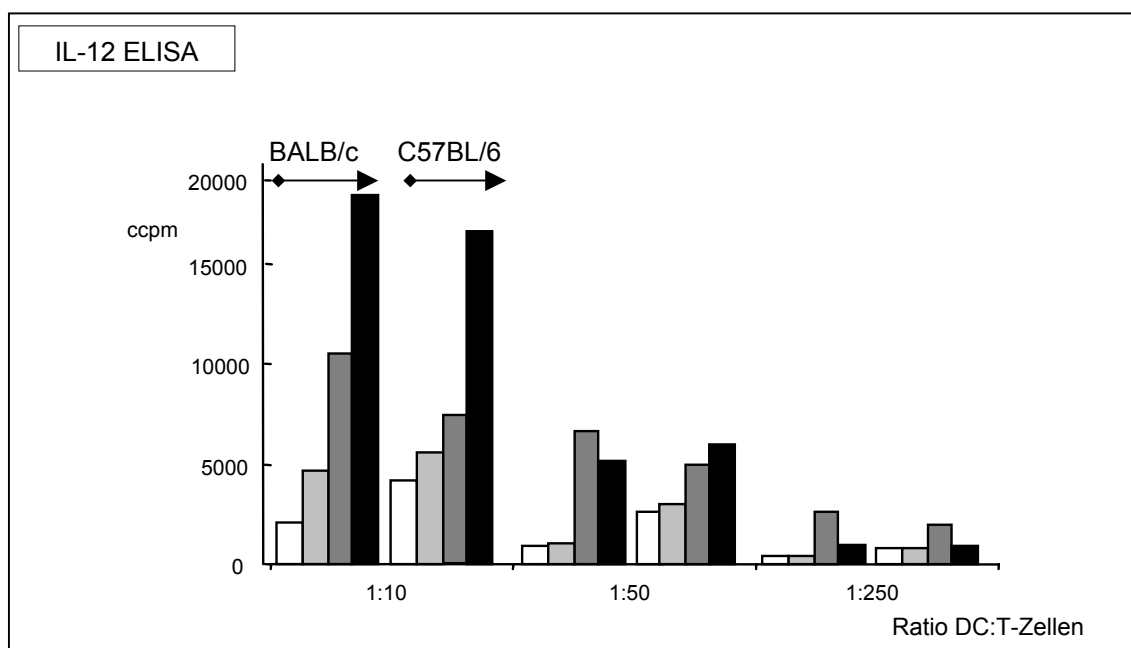
**Abbildung 28: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57 BL/6-Mäusen: Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay.** Die DC beider Mausstämme zeigen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsstimulation allogener T-Zellen. Aufgetragen sind auf der y-Achse jeweils die relativen Prozentangaben basierend auf der statistischen Auswertung der neun Versuche. Als 100% wurden in jedem Versuch zur Relativierung von dimensional Unterschieden die Ergebnisse des Ansatzes "BALB/c+GM-CSF+IL-4+CpG-ODN1826" gesetzt. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung.

### 3.5.4 Die T-Zellen beider Mausstämme verhalten sich bezüglich der Stimulierbarkeit durch allogene dendritische Zellen gleich.

Nachdem die Unterschiede der DC im nach bekanntem Muster durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay nicht signifikant waren (vgl. 3.5.3), wurde nun der Ansatz umgekehrt und es wurden die T-Zellen betrachtet: Die T-Zellen beider Mausstämme wurden hinsichtlich ihrer Stimulierbarkeit durch allogene DC untersucht.

Dabei wurden DC aus einem dritten, zu BALB/c und C57BL/6 allogenen Mausstamm (einer FVB-Maus) in unterschiedlichen Verhältnissen mit T-Zellen aus BALB/c bzw. C57BL/6 zusammengebracht und die Proliferation der T-Zellen ausgewertet. Auch dabei ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen (vgl. Abbildung 29).

Auch FVB-DC zeigten nach Zusatz von CpG-ODN 1826 die größte Stimulation der T-Zell-Proliferation. Interessanterweise war dabei jedoch in der niedrigsten Konzentration von 1:250 LPS dem CpG-ODN 1826 leicht unterlegen.



**Abbildung 29: Vergleich von T-Zellen aus BALB/c- und C57 BL/6-Mäusen: Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay.** BALB/c- und C57BL/6-T-Zellen werden durch allogene FVB-DC nicht signifikant unterschiedlich stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.5.5 Zusammenfassung des Vergleichs der beiden Mausstämme

Nach unserer Eingangshypothese hätte der Th1-gewichtete Mausstamm C57BL/6 dem Th2-gewichteten Mausstamm BALB/c hinsichtlich des Vakzinierungserfolges überlegen sein müssen. Die Experimente zeigten jedoch sehr ähnliche Ergebnisse, bei C57BL/6-Mäusen war der Vakzinierungserfolg sogar geringer als bei BALB/c-Mäusen.

Eine weitere detaillierte Untersuchung der DC und auch der T-Zellen beider Stämme zeigte wie oben beschrieben vergleichbare Ergebnisse, mit einer ganz wesentlichen Ausnahme: Die antigenpräsentierenden Moleküle MHC I und MHC II waren auf der Oberfläche von DC aus C57BL/6-Mäusen deutlich geringer exprimiert. Auf diesen interessanten Unterschied wird im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse noch genauer eingegangen.

### **3.6 Charakterisierung der antitumoralen Immunantwort nach Vakzinierung mit dendritischen Zellen**

Ein weiterer wesentlicher Punkt dieser Arbeit war es, die beobachtete In-vivo-Immunantwort nach Vakzinierung mit CpG-aktivierten DC zu charakterisieren. Die Untersuchungen erfolgten dabei in dem schon länger etablierten Modell mit BALB/c-Mäusen und der C26-Kolonkarzinom-Zelllinie.

#### **3.6.1 Die induzierte Immunantwort ist systemisch wirksam.**

Im in dieser Arbeit verwendeten Ansatz wurde die Vakzine stets auf der gleichen Seite wie die Tumorzellen injiziert. Um auszuschließen, dass dieser lokale Zusammenhang für den Vakzinierungserfolg verantwortlich ist, wurde die Vakzine in mehrfachen Versuchen auf der kontralateralen Seite injiziert.

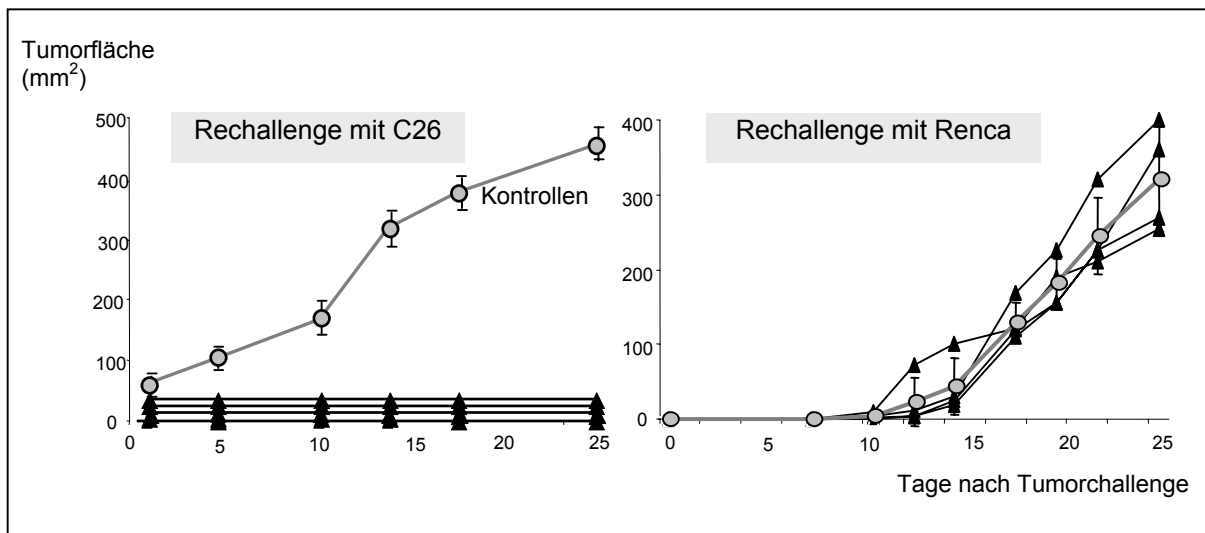
Es konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur die ipsilaterale Vakzinierung, sondern auch die Injektion der Vakzine auf der kontralateralen Seite eine Induktion der Antitumor-Immunantwort zur Folge hatte. Dabei erfolgte nach dem beschriebenen Schema der prophylaktischen bzw. therapeutischen Vakzinierung die Gabe von stimulierten und kokulti-vierten DC auf der dem Tumor abgewandten Seite. Im Vergleich mit Mäusen, bei denen die Vakzinierung wie gewohnt ipsilateral erfolgte, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die induzierte Immunantwort führt demnach zu systemischer Wirksamkeit und ist unabhängig vom lokalen Bezug zum Tumor.

### 3.6.2 Die induzierte Immunantwort bietet einen Langzeitschutz auch bei Re-Exposition.

Mäuse, die entweder nach prophylaktischer oder therapeutischer Vakzinierung tumorfrei geblieben waren, wurden ohne erneute Vakzinierung einer wiederholten Tumorchallenge ausgesetzt.

Dabei wurden sowohl ipsilateral als auch kontralateral (die Injektions-Seite spielte dabei wie zuvor beschrieben keine Rolle) bis zu 15 Wochen nach der einmaligen Vakzinierung erneut jeweils 500.000 Tumorzellen gespritzt. Keine einmalig erfolgreich vakzinierte Maus entwickelte daraufhin einen Tumor, der in nicht vakzinierten Kontrollmäusen gleichzeitig ungehindert wuchs.

Injiziert man diesen, gegen C26 inzwischen immunen, Mäusen jedoch Zellen eines anderen Karzinoms (in diesem Fall das in BALB/c tumorigene Nierenzellkarzinom Renca), wuchsen diese Tumoren ungehindert. Durch die DC-basierte Vakzinierung wird also ein immunologisches Gedächtnis induziert; die Immunantwort bietet anhaltenden Schutz gegen Tumorstadium auch bei Re-Exposition gegen den Tumor (vgl. Abbildung 30).

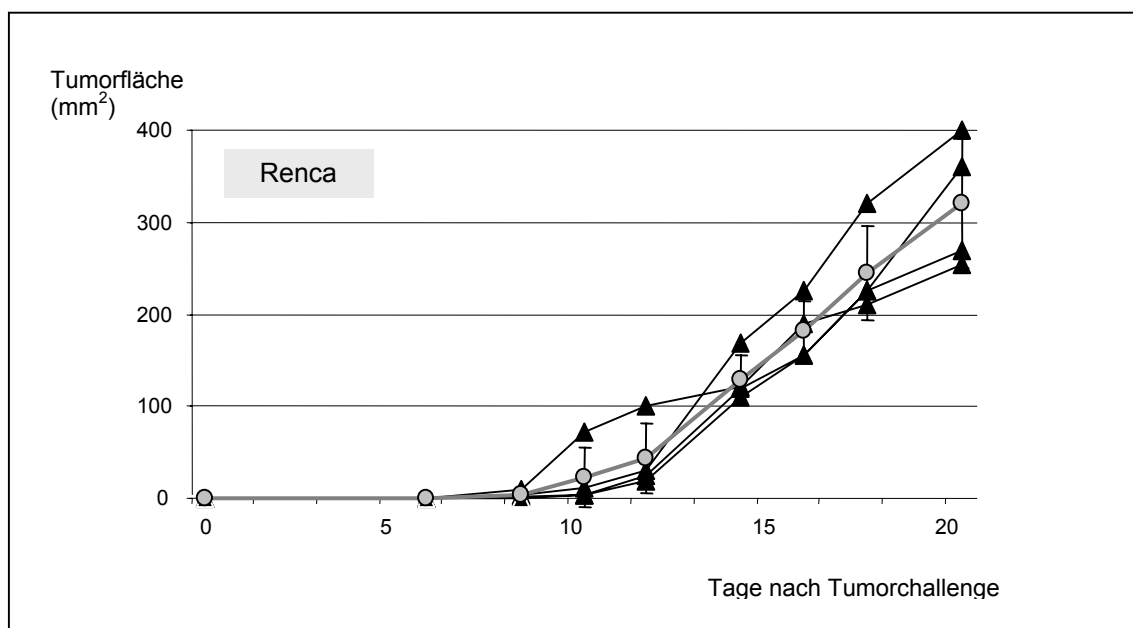


**Abbildung 30: Induktion von Langzeitimmunität gegen C26-Tumorzellen, jedoch nicht gegen Renca-Tumorzellen in vakzinierten Mäusen, die C26 abgestoßen hatten.** Vakzinierten Mäuse, die C26-Tumoren bereits abgestoßen hatten, wurden bis zu 15 Wochen nach einmaliger Vakzinierung C26- bzw. Renca-Tumorzellen injiziert. Jede Kurve (▲) repräsentiert eine Maus, außer der Kurve für die Kontrollen (○, n=5). Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus drei unabhängigen Experimenten.



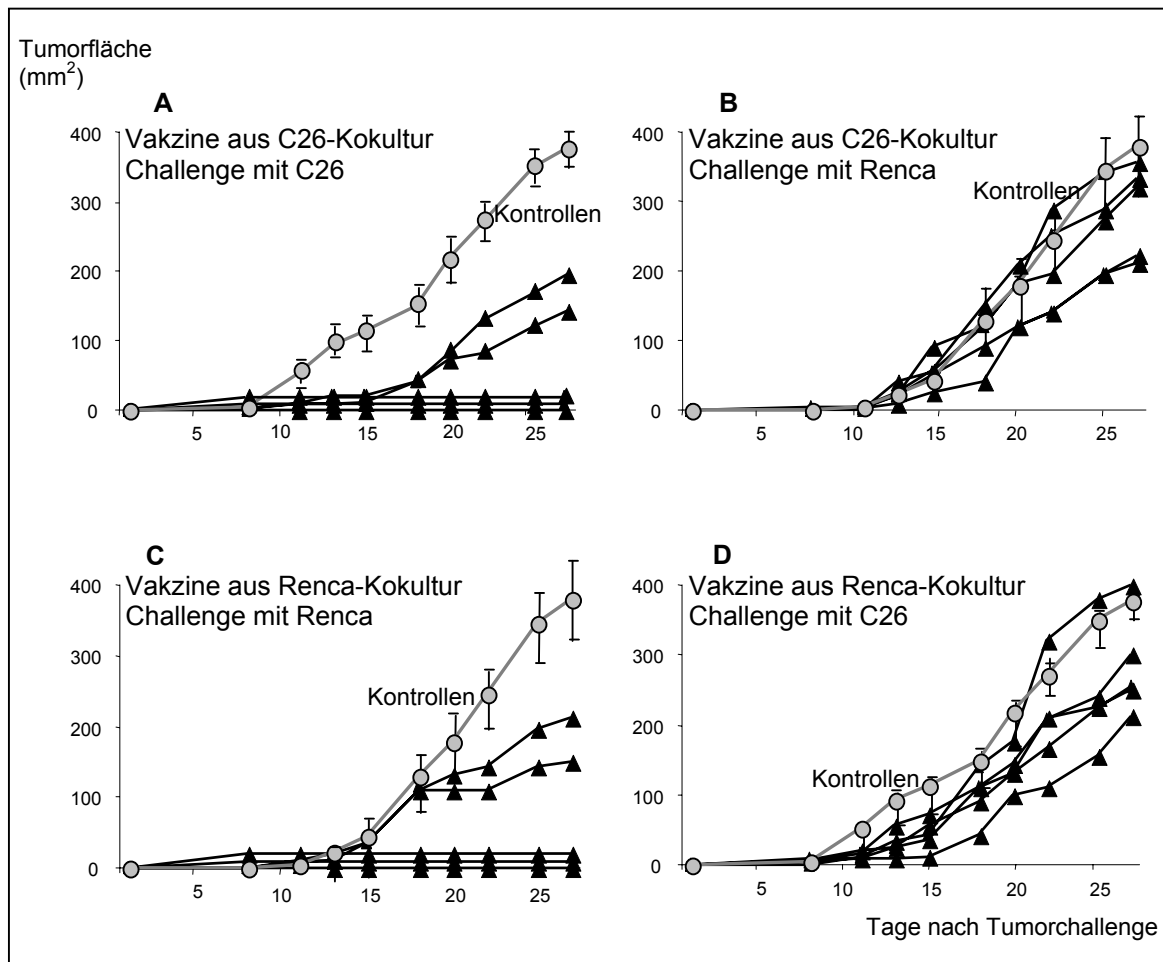
### 3.6.3 Die induzierte Immunantwort ist spezifisch gegen Kokultur-Tumorzellen gerichtet.

Zur Überprüfung der Tumorspezifität der Immunantwort wurde eine dritte Tumorzelllinie etabliert: das murine Nierenzellkarzinom Renca. In mehreren Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass auch diese Tumorzelllinie in 100% der Mäuse zur Entwicklung eines Tumors führte, allerdings wuchsen diese Tumoren etwas langsamer und inhomogener als die zuvor benutzten C26 und MC38. Nach etwa 20 Tagen wurde eine Tumorgöße von etwa 300 mm<sup>2</sup> erreicht (vgl. Abbildung 31).



**Abbildung 31: Wachstumskurve der Renca-Tumoren.** Jeweils 500.000 Tumorzellen wurden subkutan injiziert. Die graue Kurve (○) zeigt den Mittelwert aus vier Kontrolltieren mit der Standardabweichung, die schwarzen Kurven (▲) repräsentieren jeweils ein Versuchstier. Fehlerbalken bezeichnen jeweils die Standardabweichung.

In diesem Ansatz wurden Mäuse mit DC vakziniert, die vorher entweder mit C26 oder mit Renca kokultiviert worden waren. Nur die DC aus der Kokultur mit den Tumorzellen der späteren Challenge konnten eine wirksame Immunantwort induzieren, bei Vakzinierung mit DC aus der „falschen“ Kokultur ergab sich kein protektiver Effekt im Vergleich zu den Kontrollgruppen (vgl. Abbildung 32).



**Abbildung 32: Spezifität der Anti-Tumorimmunantwort nach Vakzinierung mit dendritischen Zellen.** Nur DC aus der Kokultur mit C26 können eine Immunantwort gegen C26 induzieren (A), sind jedoch gegen eine Challenge mit Renca-Zellen unwirksam (B). Analog induzieren DC aus der Kokultur mit Renca nur eine Immunantwort gegen Renca (C), nicht jedoch gegen C26 (D). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen; die grauen Kurven (○) zeigen den Mittelwert aus fünf Kontrolltieren, die schwarzen Kurven (▲) repräsentieren jeweils ein Versuchstier.

## 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 3.7.1 Optimierung der Generierung dendritischer Zellen

Mittels magnetischer Depletion von B- und T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten aus der Knochenmarkszellsuspension konnte nach sieben Tagen Kultur eine Anreicherung CD80-/CD86-positiver DC von ca. 60%, nach Stimulation mit LPS oder CpG-ODN 1826 für 48 Stunden von über 80% erreicht werden. Damit konnte das bereits modifizierte und etablierte Protokoll von Inaba (Inaba et al. 1992) weiter verbessert werden.

Die Zellen wurden in Medium, versetzt mit GM-CSF und IL-4, kultiviert. Als optimale Dosis von GM-CSF erwies sich der Zusatz von 200 U/ml, die optimale Dosis von IL-4 lag bei 20 ng/ml. In dieser Dosierung konnte durch IL-4 der Anteil an Makrophagen vermindert und die Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC auf den DC erhöht werden. Ein inhibitorischer Effekt des Th2-Zytokins IL-4 auf die IL-12-Sekretion konnte nicht nachgewiesen werden.

Zur Reifeinduktion der DC wurden verschiedene Stimuli verwendet. Dabei erwiesen sich CpG-ODN 1826 und LPS als potentere Stimuli im Vergleich zu TNF- $\alpha$ . In der flowzytometrischen Bestimmung zeigte sich, dass CpG-ODN 1826 und LPS vor allem die MFI von CD80, CD86 und MHC II steigern. Hinsichtlich der IL-12-Sekretion ist der Effekt von CpG-ODN 1826 und LPS gegenüber TNF- $\alpha$  sogar noch deutlicher. Vergleicht man DC, die mit einem dieser drei Stimuli inkubiert wurden, hinsichtlich ihrer Fähigkeit, allogene T-Zellen zur Proliferation zu induzieren, zeigt sich auch hier die Überlegenheit von CpG-ODN 1826 und LPS gegenüber TNF- $\alpha$ . Dabei ist CpG-ODN 1826 gerade in der geringen DC-zu-T-Zell-Ratio von 1:250 auch LPS überlegen. Eine Kombination von CpG-ODN 1826 und LPS zeigt in der flowzytometrischen Messung keinen synergistischen Effekt, hinsichtlich der Induktion der IL-12-Sekretion ergibt sich jedoch ein synergistisches Potential. Verwendet man statt CpG-ODN 1826 ein identisches Oligonukleotid, bei dem lediglich die CG-Sequenzen ersetzt worden sind, ergibt sich kein stimulatorischer Effekt auf DC.

Vergleicht man DC aus BALB/c-Mäusen mit C57BL/6-DC hinsichtlich der beschriebenen in-vitro-Parameter, so ergeben sich im Ausmaß der IL-12-Sekretion bzw. auch in der Proliferationsstimulation von T-Zellen keine signifikanten Unterschiede. Auch der Prozentanteil positiver Zellen in der Flowzytometrie ist für CD80, CD86 und MHC I und II vergleichbar. Die mittlere Fluoreszenzintensität MFI ist für MHC I und II bei DC aus C57BL/6-Mäusen aber signifikant niedriger als bei DC aus BALB/c-Mäusen.

### **3.7.2 Tumorthherapie mit dendritischen Zellen bei verschiedenen Mausstämmen im Vergleich**

Für die Vakzinierungsassays in vivo wurden DC verwendet, die mit CpG-ODN 1826 stimuliert und mit bestrahlten Tumorzellen kokultiviert wurden. Versuche mit DC, die entweder nicht stimuliert oder aber nicht mit bestrahlten Tumorzellen kokultiviert worden waren, zeigten einen sehr geringen tumorprotektiven Effekt. Ebenso kam es nach Vakzinierung lediglich mit bestrahlten Tumorzellen zu keiner Anti-Tumor-Immunantwort.

Bei BALB/c-Mäusen, denen subkutan C26-Tumorzellen injiziert wurden, zeigte sich nach Vakzinierung mit stimulierten und kokultivierten DC, dass im prophylaktischen Ansatz 60% der Mäuse tumorfrei blieben. Im therapeutischen Ansatz konnten 40% der Mäuse von ihren Tumoren geheilt werden. In beiden Ansätzen konnte in den vakzinierten Mäusen, die dennoch Tumoren entwickelten, eine Hemmung des Tumorwachstums beobachtet werden.

Im Vergleich der Mausstämme BALB/c und C57BL/6 zeigte sich, dass der Vakzinierungserfolg in den Th1-gewichteten C57BL/6-Mäusen - entgegen der theoretischen Erwartungen - tendenziell sowohl im prophylaktischen wie auch im therapeutischen Ansatz schlechter war als bei Th2-gewichteten BALB/c-Mäusen.

Die Anti-Tumor-Immunantwort in den Mäusen erwies sich als systemisch wirksam, also unabhängig vom Ort der Tumorinduktion bzw. Vakzinierung. Durch die Vakzinierung wurde ein Langzeit-Memory-Effekt induziert; die Mäuse waren nach einmaliger Vakzinierung über einen langen Zeitraum immun gegen mehrfache Tumorchallenge. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die induzierte Immunantwort in den Mäusen tumorspezifisch war; wurden den Mäusen Zellen einer anderen Tumorzell-Linie injiziert, wuchsen diese "fremden" Tumoren ungehemmt.

## **4 Diskussion**

Analog zur Gliederung des Ergebnisteils soll hier zunächst auf die Methodik der Generierung muriner DC aus Knochenmarksvorläuferzellen, auf die Kultur und Reifung der DC bzw. das Protokoll der Tumorstimmulierung eingegangen werden. Anschließend wird sich die Diskussion mit der genaueren Charakterisierung der durch die DC-basierte Vakzinierung induzierten Immunantwort beschäftigen, um dann abschließend einen Ausblick über die Zukunft der DC-basierten Vakzinierung bzw. von CpG-ODN in der Immuntherapie zu geben.

### **4.1 Methodik zur Generierung und Kultur dendritischer Zellen**

#### **4.1.1 Gewinnung dendritischer Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen**

Dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokoll zur Generierung von DC aus Knochenmarksvorläuferzellen liegt die Arbeit von Inaba (Inaba et al. 1992) zugrunde. Wesentlicher Schritt in der Modifikation dieses Protokolls war die magnetische Depletion von Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten aus der Knochenmarkssuspension. Dadurch war die Anreicherung von DC sehr viel effektiver möglich als durch das vorsichtige Waschen der Zellkultur in den ersten Tagen. Durch Optimierung des Zusatzes von GM-CSF und IL-4 konnten effektiv DC generiert und kultiviert werden (vgl. 3.1). Der Prozentsatz CD80-/CD86-positiver DC lag dabei nach sieben Tagen Kultur in IL-4 (20 ng/ml) und GM-CSF (200 U/ml) bei etwa 60%, nach Zugabe von CpG-ODN konnte dieser Anteil auf über 80% gesteigert werden.

Wie beim Menschen ist auch bei Mäusen eine Generierung von DC nicht nur aus dem Knochenmark, sondern auch aus Monozyten des peripheren Blutes möglich. Diese DC haben *in vitro* und auch in ihrer Eigenschaft als Tumorstimmulierung *in vivo* ähnliche Eigenschaften wie DC aus Knochenmarksvorläuferzellen (Schreurs et al. 1999), so dass sich hier neue Möglichkeiten der DC-Gewinnung in Mäusen ergeben.

#### 4.1.2 Rolle von GM-CSF

Als wichtige Bestandteile der Kulturlösung sind für die Generierung von DC GM-CSF und IL-4 zu nennen. GM-CSF als Wachstumsfaktor stimuliert dabei das Wachstum aller myeloiden Zellreihen, also nicht nur von Granulozyten und Makrophagen, sondern eben auch von DC (Caux et al. 1992). Eine Konzentration von 200 U/ml erwies sich in unseren Versuchen einer geringeren Konzentration von 100 U/ml überlegen und wurde deshalb zur Kultivierung von DC eingesetzt (vgl. 2.5.1.1).

GM-CSF lässt sich nicht nur *in vitro* zur Generierung von DC einsetzen, sondern entfaltet auch bei systemischer Anwendung beim Menschen eine proliferations- und aktivitätssteigernden Wirkung auf DC (Demir et al. 2003; Kiertscher et al. 2003) und kann somit als Adjuvans bei der Tumorthherapie eingesetzt werden.

#### 4.1.3 Rolle von IL-4

Neben dem GM-CSF erweist sich IL-4 als wichtiger Zusatz im Medium bei der Generierung und Kultur von DC. Für IL-4, ein klassisches Zytokin der Th2-Antwort, wird *in vivo* eine Hemmung von IL-12, das für eine Th1-Antwort nötig ist, angenommen. Dabei ist jedoch keine direkte gegenseitige Suppression von IL-4 und IL-12 beschrieben (Seder et al. 1993; Constant and Bottomly 1997); teils wird auch eine Steigerung der IL-12-Sekretion durch IL-4 *in vitro* beobachtet, wenn IL4 während der Stimulation von DC anwesend ist (Ebner et al. 2001). IL-4 inhibiert bei der Kultur von DC die Bildung und Proliferation von CD14<sup>+</sup> Zellen und führt so zu einer Anreicherung von DC in der Kultur, außerdem verlängert es die Lebensdauer von DC (Rougier et al. 1998). Auch IL-4 ist für die systemische Anwendung untersucht worden und führt, zusammen mit GM-CSF, auch *in vivo* zur Proliferation und Aktivierung von DC (Kiertscher et al. 2003).

In dieser Arbeit konnte eine inhibierende Wirkung von IL-4 auf IL-12 nicht belegt werden, auch bei Dosissteigerung zeigte sich keine Beeinflussung der IL-12-Sekretion. Eine zunehmende Konzentration von IL-4 führte zu einer Abnahme der Gesamt-Zellzahl; eine signifikant vermehrte Expression von kostimulatorischen und antigenpräsentierenden Molekülen auf der Zelloberfläche konnte unter IL-4-Zusatz im Vergleich zu Medium ohne IL-4 nicht beobachtet werden, ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der IL-12-Produktion sowie der Stimulation allogener T-Zellen (vgl. 3.1.3).

## 4.2 Einfluss unterschiedlicher Stimuli auf die Reife dendritischer Zellen

### 4.2.1 Bedeutung des Reifezustandes dendritischer Zellen

Unreife DC nehmen Antigen auf und prozessieren es, das Priming (und damit die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort) erfolgt jedoch durch reife DC (Banchereau and Steinman 1998). Unreife DC können die T-Zell-Proliferation inhibieren und induzieren die Bildung IL-10-sezernierender, regulatorischer T-Zellen (Jonuleit et al. 2000). So können unreife DC durch antigenspezifische T-Zell-Inhibierung sogar zu Toleranz bestimmter Antigene führen (Dhodapkar et al. 2001; Jonuleit et al. 2001). Die Bedeutung von IL-10 zeigt sich auch in der Tatsache, dass mit IL-10 behandelte DC eine T-Zell-Inhibierung und damit Toleranz induzieren (Steinbrink et al. 1997).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die antitumorale Wirkung der DC-basierten Vakzine in vivo mit dem Reifegrad der DC in vitro korreliert (Labeur et al. 1999; Brunner et al. 2000). Mit höherem Reifegrad wird die Expression kostimulatorischer und antigenpräsentierender Moleküle auf der Oberfläche der DC hochreguliert; reife DC sind in höherem Maß als unreife DC in der Lage, in vitro T-Zellen zu stimulieren. Darüber hinaus bilden reife DC mehr IL-12, wesentliches Zytokin für die Th1-basierte antitumorale Immunantwort (Macatonia et al. 1995; Jonuleit et al. 2000). Dabei produzieren noch unreife DC, die bereits dem Reifestimulus ausgesetzt sind, mehr IL-12 als maximal ausgereifte DC; die IL-12-Produktion kann durch IL-10 (ein klassisches Th2-Zytokin) inhibiert werden (Ebner et al. 2001).

IL-12 ist für die antitumorale, Th1-basierte Immunantwort ein zentrales Zytokin. Es induziert die Sekretion von IFN- $\gamma$  aus NK- und T-Zellen (Seder et al. 1993), stellt einen Wachstumsfaktor für aktivierte NK-Zellen dar und steigert deren zytotoxische Wirkung und unterstützt die Generierung von zytotoxischen T-Zellen (Trinchieri 1995). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass CpG-ODN als potentester Reifestimulus eine höhere IL-12-Produktion induzieren konnte als LPS oder TNF- $\alpha$  (vgl. 3.2.1.2). Analog dazu zeigten CpG-stimulierte DC in unseren Versuchen die potenteste antitumorale Wirkung, verglichen mit LPS- oder TNF- $\alpha$ -stimulierten DC. Eine Kombination von CpG-ODN 1826 mit LPS in vitro als Reifestimulus führte dabei zu einem synergistischen Effekt und einer weiteren Steigerung der IL-12-Produktion (vgl. 3.2.2), so dass sich hier weitere Möglichkeiten der DC-Stimulation mit konsekutiv möglicherweise besserem Vakzinierungserfolg eröffnen.

Es sind einige klinische Studien zu erwähnen, die eine Vakzine aus unreifen DC verwenden und damit in wenigen Fällen antigenspezifische Immunantworten induzieren konnten (Lodge et al. 2000; Takahashi et al. 2003), jedoch ist nach den vorhandenen Befunden anzunehmen, dass Vakzinierungsstrategien mit reifen DC mehr Erfolg versprechen (Rieser et al. 1999; Thurner et al. 1999; Bedrosian et al. 2003).

Ein optimaler Reifestimulus sollte die DC in die Lage versetzen, eine potente Th1-basierte Immunantwort zu induzieren, und er sollte idealerweise zur Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten auch problemlos *in vivo* angewendet werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Stimulation der DC *in vitro* TNF- $\alpha$ , LPS und CpG-ODN 1826 direkt miteinander verglichen. Alternative Stimuli für die Reifung von DC *in vitro*, die ebenfalls gute Ergebnisse hinsichtlich Phänotyp und Funktionalität zeigten, sind beispielsweise CD40L (Labeur et al. 1999), OK-432 mit Prostaglandin E2 (Sato et al. 2003), Hsp70 (Ueda et al. 2004) oder Hsp70-like peptide 1 (Wan et al. 2004).

#### 4.2.2 TNF- $\alpha$ als Reifestimulus

TNF- $\alpha$ , ein häufig benutzter Reifestimulus für DC, ist für die Anwendung *in vivo* zu toxisch. Bei der Anwendung *in vitro* zeigte sich TNF- $\alpha$  in dieser Arbeit als weniger potenter Faktor für die Reifestimulation von DC als LPS oder CpG-ODN 1826: Zwar konnten unter TNF- $\alpha$  vergleichbar viele CD80-/CD86-positive Zellen in der Flowzytometrie nachgewiesen werden wie unter LPS oder CpG-ODN 1826; die Dichte dieser kostimulatorischen Moleküle war jedoch geringer als unter den beiden anderen Stimuli (vgl. 3.2.1.1). Bezüglich der IL-12-Produktion konnte mit TNF- $\alpha$  keine Stimulation über das Basismedium hinaus erreicht werden (vgl. 3.2.1.2), und auch bei der Stimulation allogener T-Zellen zeigten sich TNF- $\alpha$ -aktivierte DC unterlegen (vgl. 3.2.1.3). Parallele Ergebnisse finden sich auch in Arbeiten anderer Autoren (Brunner et al. 2000).

Auch für die Induktion einer antitumoralen Immunantwort *in vivo* sind TNF- $\alpha$ -stimulierte DC weniger geeignet als LPS- oder CpG-ODN 1826-stimulierte DC (Brunner et al. 2000). Interessanterweise gibt es Hinweise, dass TNF- $\alpha$ -gereifte DC tendenziell eher zu einer Th2-Antwort führen, im Gegensatz zu z.B. LPS (Kikuchi et al. 2003); für eine potente antitumorale Immunreaktion ist jedoch eine Th1-basierte Reaktion des Immunsystems entscheidend.



### 4.2.3 LPS als Reifestimulus

LPS ist für die Anwendung in vivo ebenfalls zu toxisch, wobei die Toxizität von LPS durch Zusatz von CpG-ODN noch verstärkt wird (Cowdery et al. 1996). Als Stimulus für DC in vitro ist es nach den Befunden vorliegender Arbeit jedoch gut geeignet: Ähnlich potent wie CpG-ODN 1826 führt es zu einer Hochregulation der Expression kostimulatorischer Moleküle und MHC, bei der Induktion der IL-12-Sekretion zeigt sich LPS jedoch dem CpG-ODN unterlegen, ebenso wie bei der Stimulierung der T-Zell-Proliferation, hier gerade bei der geringsten DC-zu-T-Zell-Ratio von 1:250 (vgl. 3.2.1).

Andere Arbeiten in vitro zeigen, dass DC durch LPS oder CpG-ODN ähnlich stimuliert und zur IL-12-Bildung angeregt werden (Atkins et al. 2003). Nach einer Stimulation mit LPS produzieren DC nur vorübergehend IL-12, werden nach einiger Zeit jedoch refraktär, so dass nach einer ersten Th1-Induktion dann eher Th2-Antworten induziert werden (Langenkamp et al. 2000). Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine zu lange Stimulationsdauer für DC eher von nachteiligem Effekt ist. Vorversuche zu dieser Arbeit zeigen, dass wie für CpG-ODN auch für LPS eine Stimulation von 48 Stunden optimal für die DC ist.

Versuche im humanen System haben gezeigt, dass CpG und LPS unterschiedliche Muster der Aktivierung in humanen Monozyten bewirken (Hartmann and Krieg 1999). Dabei reagieren DC aus dem peripheren Blut gut auf CpG-ODN als Reifestimulus, schlecht hingegen auf LPS, DC aus Monozyten zeigen jedoch umgekehrt eine gute Antwort auf CpG-ODN, nicht jedoch auf LPS (Hartmann et al. 1999).

LPS vermittelt seine Wirkung - wie auch CpG-ODN - über *Toll like receptors* und den NF-kappaB Pathway (Rescigno et al. 1998). LPS aus E.coli, wie es auch in vorliegender Arbeit verwendet wurde, agiert dabei über den TLR-4 und induziert die Bildung von IFN- $\gamma$  sowie die Produktion von IL-12 in DC. IL-4, IL-5 oder IL-13 werden dabei nicht oder nur in geringem Maß gebildet, die induzierte Immunantwort ist somit Th1-basiert (Pulendran et al. 2001).

#### 4.2.4 CpG-ODN als Reifestimulus

CpG-ODN wirken als potente Reifestimuli auf DC (Jakob et al. 1998; Sparwasser et al. 1998), was auch in den Ergebnissen vorliegender Arbeit bestätigt werden konnte (vgl. 3.2.1). Die Wirkung auf DC resultiert in einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und von antigenpräsentierenden MHC-Molekülen auf der Oberfläche. Die DC produzieren vermehrt IL-12 und sind in der Lage, die Proliferation von allogenen T-Zellen anzuregen. Gerade in der IL-12-Sekretion und der Stimulation der T-Zell-Proliferation auch bei geringer DC-zu-T-Zell-Ratio zeigt sich CpG-ODN 1826 dem TNF- $\alpha$  und auch LPS überlegen (vgl. 3.2.1).

CpG-ODN induzieren die Reifung von DC, zusätzlich zeigt sich, dass die spontane Apoptose von DC verhindert wird (Park et al. 2002), transient kann eine Verbesserung der Antigenprozessierung und eine Verlängerung der Halbwertszeit von Peptid-MHC-Komplexen beobachtet werden. Allerdings werden bei längerer Stimulation keine MHC-Komplexe mehr gebildet (Askew et al. 2000). Analog zu Befunden für LPS zeigt sich auch hier, dass eine zu lange Stimulation von DC nachteilige Wirkung hat. Als optimal erwies sich in dieser Arbeit eine Stimulationsdauer von 48 Stunden, danach kam es zur vermehrten Apoptose von DC.

Bei der Anwendung *in vivo*, die für CpG-ODN relativ problemlos möglich ist (Lipford et al. 1997; Krieg et al. 1999), können CpG-ODN sowohl angeborenes wie auch erworbenes Immunsystem induzieren. Dabei ist die unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivierung von B-Zellen oder NK-Zellen *in vivo* abhängig von den das CG-Motiv flankierenden Basen und vom DNA-Backbone. In Mäusen zeigte beispielsweise CpG-ODN 1585 eine potente Induktion auf die Aktivität von NK-Zellen, während das Zytokinmilieu oder B-Zellen relativ wenig beeinflusst wurden. CpG-ODN 1826 hingegen, das auch in vorliegender Arbeit verwendet wurde, induziert die Zytokinbildung nach dem Th1-Muster und eine erhöhte Aktivität von B-Zellen (Ballas et al. 2001). Unter 4.7 wird näher auf die vielfältigen Möglichkeiten der CpG-ODN im Rahmen der Immuntherapie eingegangen.

### 4.3 Protokoll zur Tumorstimmung

#### 4.3.1 Antigenpulsung dendritischer Zellen

Nächster Schritt in der Herstellung der Tumorstimmung ist nach der Generierung dendritischer Zellen die Beladung bzw. Pulsung der (noch unreifen) DC mit Tumorstimmung. Wie schon unter 1.1.2 angedeutet, gibt es vielfältige Möglichkeiten, diese Beladung zu erreichen. Arbeitet man dabei nicht mit spezifischen Tumorstimmung (z.B. MAGE-3, CEA) oder RNA, sondern mit ganzen Tumorstimmung, bieten sich zur Antigenbeladung die Kokultur der Tumorstimmung mit unreifen DC bzw. die Fusion von Tumorstimmung mit DC an.

Eine Fusion von Tumorstimmung und DC kann durch unterschiedliche Methoden erzielt werden, neben PEG-induzierter Fusion (Gong et al. 1997) bieten Gentransfer (Phan et al. 2003) oder Elektrofusion (Trevor et al. 2004) neue Ansätze, wodurch die Gewinnung fusionierter Zellen mit sehr viel höherem Effizienzgrad möglich wird. Dennoch ist die Fusion von DC mit Tumorstimmung im Vergleich zu einer Kokultur von DC mit Tumorstimmung ein relativ aufwendiges Verfahren. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Methode der Kokultur der Zellfusion hinsichtlich der Antigenbeladung nicht nachsteht (Celluzzi and Faló 1998; Seiderer 2002).

In dieser Arbeit wurde durch die insgesamt dreitägige Kokultur der DC mit bestrahlten Tumorstimmung weder eine Inhibition der Expression kostimulatorischer und antigenpräsentierender Moleküle noch der IL-12-Synthese oder der T-Zell-Stimulation der DC beobachtet. Die bestrahlten Tumorstimmung hatten also keinen immunsuppressiven Effekt. Auch nachfolgende Arbeiten zeigen, dass mit bestrahlten Tumorstimmung gepulste DC als Vakzine erfolgreich eingesetzt werden können (Liu et al. 2004).

Werden DC nicht mit Antigen beladen, können diese ungepulsten DC auch einen antitumoralen Effekt vermitteln, der dann jedoch nicht CD8-abhängig, sondern über NK-Zellen vermittelt wird (van den Broeke et al. 2003). Eigene Vorversuche zeigten, dass ungepulste DC zwar einen geringen tumorhemmenden Effekt hatten, die Ergebnisse waren jedoch nicht mit dem tumorprotektiven Effekt der antigengepulsten DC vergleichbar.

### 4.3.2 Aktivierung der gepulsten dendritischen Zellen

Der nächste Schritt in unserem Protokoll umfasst die Aktivierung der (mittlerweile mit Antigen beladenen) DC mit einem Reifestimulus. Dabei wurde für die In-vivo-Assays CpG-ODN 1826, das sich in unseren Versuchen in vitro als der potenteste DC-Stimulus herausgestellt hatte, verwendet.

Einige Arbeiten mit nicht aktivierten, lediglich mit GM-CSF (Gong et al. 1997) bzw. GM-CSF und IL-4 (Celluzzi and Falo 1998) kultivierten, DC als Vakzine erzielten dennoch gute Erfolge. Die Ursache dieses guten Vakzinierungserfolgs mit unreifen DC ist unklar. Als eine Möglichkeit wurde diskutiert, dass der bekannt Th1-basierte (Heinzel et al. 1989) Mausstamm C57BL/6 verwendet wurde bzw. dass langsam wachsende Tumoren (MC38 bzw. 3LL) induziert wurden (Seiderer 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass - entgegen dieser Vermutung - MC38 eine zu C26 identische, aggressive Wachstumskurve zeigt, und die Vakzinierung mit CpG-gepulsten DC in C57BL/6 nicht erfolgreicher war als in BALB/c (vgl. 3.4).

Alleine aus der Divergenz dieser Befunde ergibt sich bereits, dass eine sorgfältige vergleichende Evaluation der unterschiedlichen Vakzinierungsprotokolle notwendig ist.

Aufgrund der beschriebenen Korrelation der antitumoralen Immunantwort mit dem Reifegrad der DC wurden in dieser Arbeit CpG-aktivierte DC verwendet. CpG-ODN 1826 hatte sich in vitro als potentester Stimulus für die Aktivierung von DC herausgestellt, so dass auch von einer potenten Induktion der antitumoralen Immunantwort auszugehen war (Labeur et al. 1999; Brunner et al. 2000).

### 4.3.3 Anwendung der Vakzine

Die Applikation der Vakzine ist eine weitere grundsätzliche Frage. In der Literatur wird beschrieben, dass DC nach intravenöser Injektion vor allem in die Milz wandern, während sie nach subkutaner Injektion vor allem in die T-Zell-Bereiche der drainierenden Lymphknoten migrieren (Eggert et al. 1999). Auch eine intratumorale Gabe von DC wurde im murinen Modell erfolgreich durchgeführt (Candido et al. 2001; Schmidt et al. 2003). Arbeiten am Menschen zeigten widersprüchliche Ergebnisse. So ergab sich in einer Arbeit kein Unterschied hinsichtlich der T-Zell-Antwort bei intravenöser, intradermaler oder intralymphatischer Applikation von DC beim Menschen, die IFN- $\gamma$ -Produktion war jedoch bei intradermaler und intralymphatischer Injektion am ausgeprägtesten (Fong et al. 2001). Weiter zeigten sich beim Vergleich intravenöser, intradermaler und intranodaler Injektion bei intranodaler Injektion die besten T-Zell-Antworten (Bedrosian et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit im murinen Modell wurde die Vakzine subkutan gespritzt, was eine Migration der DC in die drainierenden Lymphknoten zur Folge haben sollte. Gerade bei der Maus ist diese Methode in der Anwendung einfacher und komplikationsärmer als die intravenöse Injektion.

Ein interessanter Befund ist, dass zu dicht aufeinanderfolgende DC-Vakzinierung zu verminderter CTL-Aktivität führen kann, in einem Fall nach 6 Wochen bei wöchentlicher Anwendung in Mäusen (Serody et al. 2000). Teilweise scheint jedoch eine mehrfache Gabe von DC nötig zu sein, wenn eine zu kurze Dauer der Immunität beobachtet wird; Restimulation mit DC zeigte dabei gute Erfolge hinsichtlich des immunologischen Gedächtnisses (Ludewig et al. 1999).

In dieser Arbeit zeigte sich, dass im therapeutischen Ansatz eine zu frühe Vakzinierung nach Tumorinduktion keinen Vorteil bringt. Bei Vakzinierung an Tag 4 nach Tumorchallenge war, wie auch bei Vakzinierung an Tag 11, der Vakzinierungserfolg signifikant geringer als bei Vakzinierung an Tag 7 (vgl. 3.3.1). Daraus lässt sich ableiten, dass der Tumor erst eine gewisse Immunogenität erreichen muss, bis eine therapeutische Vakzine erfolgreich eingreifen kann. Hat der Tumor jedoch eine bestimmte Größe überschritten, scheint er der Immuntherapie mit DC-basierter Vakzinierung nicht mehr genügend zugänglich. Auch diese Faktoren spielen eine große Rolle für den Erfolg einer Vakzinierungsstrategie.

## 4.4 Immunantwort in zwei Mausstämmen

Die antitumorale Immunantwort zweier Mausstämmen wurde in vorliegender Arbeit in vivo verglichen, die Immunzellen anschließend vergleichend in vitro untersucht.

### 4.4.1 Einfluss von Th1 und Th2 auf die Immunantwort

Auf die Bedeutung der Th1- bzw. Th2-Zellen wurde bereits unter 1.1.3 eingegangen. Kurz zusammengefasst sind Th1-Zellen dem erworbenen Immunsystem zugeordnet und entstehen unter dem Einfluss von IL-12 und IFN- $\gamma$ . Th1-Zellen produzieren IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF und Lymphotoxin und induzieren zell-mediierte Immunantworten. Th2-Zellen hingegen entstehen unter IL-4-Einfluss und sezernieren IL-4, IL-5 und IL-10. Sie sind dem humoralen Anteil des Immunsystems zugeordnet und induzieren Proliferation und Differenzierung von B-Zellen. IL-10 ist dabei potentiell immunsuppressiv wirksam (Dummer et al. 1995).

Für eine erfolgreiche antitumorale Immunantwort ist eine Th1-basierte T-Zell-Antwort entscheidend. Die Immuntherapie von Tumoren in Mausstämmen, die Th1-gewichtet sind, sollte also leichter zum Erfolg führen als in Th2-gewichteten Mäusen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese These zu untersuchen. C57BL/6-Mäuse waren dabei die Vertreter der Th1-Seite, BALB/c-Mäuse die Vertreter der Th2-Seite. Es ist beschrieben, dass DC aus C57BL/6 mehr IL-12 produzieren, sowie deren T-Zellen auch mehr IFN- $\gamma$  sezernieren; BALB/c-Splenozyten hingegen produzieren mehr IL-4 (Liu et al. 2000).

Beide Mausstämmen wurden mit CpG-aktivierten, mit bestrahlten Tumorzellen kokultivierten DC vakziniert. Der Assay erfolgte entweder prophylaktisch oder therapeutisch. Die verwendeten Tumoren (C26 für BALB/c und MC38 für C57BL/6) zeigten ein identisches, aggressives Größenwachstum nach subkutaner Injektion (vgl. 3.4). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass trotz Th1-Wichtung die Vakzinierung in C57BL/6- nicht erfolgreicher war als in BALB/c-Mäusen, im Gegenteil waren C57BL/6-Mäuse schlechter zu behandeln.

#### 4.4.2 Einfluss antigenpräsentierender Moleküle auf die Induktion der Immunantwort

Um einen Hinweis auf den Mechanismus der DC-Therapie zu bekommen, wurden die DC beider Mausstämme *in vitro* unter unterschiedlicher Stimulation verglichen; als Reifestimuli wurden wiederum TNF- $\alpha$ , LPS und CpG-ODN 1826 verwendet (vgl. 3.2). Hinsichtlich der Expression von Oberflächenmolekülen in der Flowzytometrie, hinsichtlich IL-Produktion und hinsichtlich der Stimulation von allogenen T-Zellen zeigten die untersuchten DC keine signifikanten Unterschiede. Auffällig war jedoch, dass die Dichte (*mean fluorescence intensity*) von MHC-Molekülen auf der Oberfläche von DC aus C57BL/6 signifikant geringer war als auf DC aus BALB/c. Eine Untersuchung der T-Zellen ergab, dass eine Stimulation der T-Zell-Proliferation durch allogene DC in beiden Mausstämmen in gleichem Maße möglich war.

Angesichts dieser erhobenen Befunde liegt die These nahe, dass eine geringe Expression von antigenpräsentierenden Molekülen Einfluss auf die Ausprägung der antitumoralen Immunantwort hat. DC, die weniger MHC-Komplexe auf der Oberfläche exprimieren, könnten Antigen weniger effizient präsentieren als DC mit einer Überexpression von MHC auf der Oberfläche. Für Tumorzellen ist beispielsweise bekannt, dass eine höhere Dichte von MHC auf Tumorzellen durchaus die Antigenpräsentation fördert und den Tumor immunogener machen kann (Remedi et al. 2003).

Die mangelnde Dichte antigenpräsentierender Moleküle auf der Oberfläche der C57BL/6-DC könnte also die Ursache für den schlechteren Vakzinierungserfolg sein. Interessant ist dabei die gedankliche Verbindung zu einer früheren Arbeit (Gong et al. 1997), bei der C57BL/6-Mäuse sehr erfolgreich mit DC gegen das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Kolonkarzinom MC38 vakziniert werden konnten. Denkbar ist, dass dieser Erfolg durch die Methode der Fusion der DC mit Tumorzellen möglich wurde, durch die das Antigen effektiver präsentiert werden konnte. Die einfache Kokultur könnte bei DC, welche nur eine geringe Dichte antigenpräsentierender Moleküle aufweisen (wie DC aus C57BL/6), hinsichtlich der Antigenpräsentation schlicht nicht ausreichend sein.

## 4.5 Charakterisierung der Immunantwort

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der erzielten antitumoralen Immunantwort. Dass durch die DC-basierte Vakzinierung erfolgreiche Immunantworten induziert werden konnten, machen die Ergebnisse der durchgeführten In-vivo-Vakzinierungsassays deutlich.

### 4.5.1 Systemische Wirksamkeit der DC-basierten Vakzinierung

Wie zuvor beschrieben, wandern subkutan injizierte DC vor allem in die drainierenden Lymphknoten (Eggert et al. 1999). Im in dieser Arbeit verwendeten Vakzinierungsprotokoll wurde die Vakzine ipsilateral zum induzierten Tumor injiziert (Vakzine und Tumorzellen jeweils in die rechte Flanke der Maus), so dass sich die Frage stellte, ob die antitumorale Wirkung lediglich ein lokaler Effekt ist.

Die Ergebnisse der dazu durchgeführten Versuche (vgl. 3.6.1) zeigten jedoch, dass die tumorprotektive Wirkung auch dann gegeben war, wenn Vakzine und Tumorzellen jeweils auf der Gegenseite injiziert wurden. Die injizierten DC interagieren offensichtlich mit den T-Zellen im drainierenden Lymphknoten und induzieren damit eine systemische Anti-Tumor-Antwort.

### 4.5.2 Langzeit-Wirksamkeit der DC-basierten Vakzinierung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (vgl. 3.6.2) zeigen, dass die Immunität gegen die injizierten Tumorzellen bei einmalig erfolgreich vakzinierten Tieren auch über lange Zeit aufrecht erhalten werden konnte. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von insgesamt 15 Wochen beobachtet, während derer sie mehrfach eine Challenge mit Tumorzellen erhielten. Keines der Tiere entwickelte einen Tumor, obwohl nur eine einmalige Vakzinierung erfolgte. Eine einmalige Vakzinierung mit CpG-gepulsten DC war ausreichend, um eine langanhaltende Immunität gegen den Tumor zu garantieren.

Injizierte man diesen gegen C26 immunen Tieren Tumorzellen eines anderen Karzinoms, konnten diese ungehindert anwachsen, was belegt, dass die erzielte Immunität nur gegen die Tumorzellen besteht, mit denen die DC während der Zeit der Kokultur in Kontakt waren.



Dass DC-basierte Vakzinierung ein immunologisches Gedächtnis induzieren kann, ist mehrfach belegt (Mayordomo et al. 1995; Paglia et al. 1996; Zitvogel et al. 1996; Goldszmid et al. 2003), teils konnte auch der Nachweis von Gedächtnis-T-Zellen geführt werden (Xiang et al. 1998; Veiga-Fernandes et al. 2000). Wird ein Nachlassen der Immunantwort beobachtet, kann eine Restimulation mit DC die Bildung des Gedächtnisses induzieren (Ludewig et al. 1999).

#### **4.5.3 Antigenpezifität der DC-basierten Vakzinierung**

Ziel einer Vakzinierung mit antigengepulsten DC ist es, eine spezifisch gegen dieses Antigen gerichtete Immunantwort zu induzieren, vermittelt über T-Zellen und das erworbene Immunsystem. NK-Zellen als Zellen des angeborenen Immunsystems spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der antitumoralen Immunantwort (Cerwenka and Lanier 2001; Wu and Lanier 2003), wobei diese dann nicht antigenspezifisch ist.

Um dies nachzuweisen und eine unspezifische Immunantwort (z.B. über NK-Zellen) auszuschließen, wurden in dieser Arbeit Mäuse mit C26- oder Rencagepulsten DC vakziniert, und anschließend C26- oder Rencazellen injiziert (vgl. 3.6.3). Erwartungsgemäß zeigte sich ein Vakzinierungserfolg gegen einen Tumor nur bei den Tieren, die mit DC aus einer Kokultur mit eben diesem Tumor behandelt worden waren, während bei den mit der nicht korrespondierenden Vakzine behandelten Tieren die Tumoren unverändert wuchsen. Eine antigenspezifische Wirkung DC-basierter Vakzine konnte auch in der Literatur bereits nachgewiesen werden (Nestle et al. 1998; Song et al. 2000).

## 4.6 Anwendung von dendritischen Zellen in klinischen Studien

Die Anwendung von DC-basierten Vakzinen als Alternative oder Ergänzung zu etablierten Tumorthérapien wird in klinischen Studien erprobt. Abbildung 33 zeigt eine Auswahl klinischer DC-Vakzine-Studien an verschiedenen Tumoren.

Tumor	Autoren
B-Lymphom	(Hsu et al. 1996; Timmerman et al. 2002)
CML (bcr-abl)	(Takahashi et al. 2003)
GI-Tumoren (CEA)	(Matsuda et al. 2004; Ueda et al. 2004)
GI-Tumoren (MAGE-3)	(Sadanaga et al. 2001)
Glioblastom	(Yu et al. 2001)
Malignes Melanom	(Nestle et al. 1998; Banchereau et al. 2001; Lau et al. 2001)
Mammakarzinom (p53)	(Svane et al. 2004)
Multiples Myelom	(Reichardt and Brossart 2004)
Nierenzellkarzinom	(Holzl et al. 1999)
Prostatakarzinom	(Murphy et al. 1999; Burch et al. 2000; Lodge et al. 2000; Fong et al. 2001)
Zervikale Tumoren	(Ferrara et al. 2003)

**Abbildung 33: Zusammenstellung klinischer Studien zu DC-basierter Vakzinierung.**

Bei genauerer Durchsicht der verschiedenen klinischen Studien zeigt sich, dass nur in Einzelfällen eine partielle Regression von Tumoren zu beobachten ist. Ein tieferes Verständnis der Wirkung von DC und eine genaue vergleichende Evaluation der Studienergebnisse und der Studienprotokolle ist notwendig.

### 4.6.1 Probleme der Therapie mit dendritischen Zellen

Das wesentliche Problem humaner Studien ist die mangelnde Vergleichbarkeit. Weder DC-Präparation noch Vakzinierungsprotokolle sind standardisiert. Es werden unterschiedliche Methoden des immunologischen Monitoring verwendet, des weiteren auch unterschiedliche, oft zu weiche Kriterien für die Bestimmung der *clinical response* (Nestle 2000; Cranmer et al. 2004). Die Determinierung der optimalen Zelldosis, der Verwendung reifer oder unreifer DC, der optimalen Antigenpräparation, der optimalen Anwendungsrouten und des optimalen immunologischen Monitoring stehen noch aus. Außerdem sind auch Schwierigkeiten zu überwinden, die der Tumor dem Immunsystem durch Escape-Mechanismen bietet.

Diese Escape-Mechanismen stellen ein persistentes Problem bei jeder Art antitumorale Immuntherapie dar. Von Tumorzellen sezernierte Substanzen können DC in ihrer Funktionalität und Reifung behindern: Tumorzell-Überstand (Kiertscher et al. 2000), VEGF (Gabilovich et al. 1996), IL-10 (Chaux et al. 1996; Enk et al. 1997; Nestle et al. 1997; Troy et al. 1998), PSA aus Prostatakarzinomen (Aalamian et al. 2003), Bombesin-like Peptide (Makarenkova et al. 2003), COX-2 und Prostaglandine (Pockaj et al. 2004).

Da Tumoren auf vielfältige Weise das Immunsystem beeinträchtigen können, bietet die chirurgische Entfernung des Primärtumors - auch bei bereits vorhandenen Metastasen - eine gute Basis. Es scheint, dass dadurch wichtige immunologische Funktionen, wie z.B. die T-Zell-Antwort, verbessert werden können (Danna et al. 2004).

Bei jeder Form von Immuntherapie befürchtet man die Aktivierung des Immunsystems nicht nur gegen das gewünschte Antigen, sondern auch gegen körpereigene Antigene. Diese Art der Nebenwirkung ist auch bei DC-basierter Vakzinierung möglich, jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet worden. Einige Arbeiten konnten Autoimmunreaktionen in Mäusen beschreiben (Ludewig et al. 2000; Jones et al. 2002), bei Menschen wurde eine Melanozytendestruktion (Vitiligo) durch eine Melanomvakzine beobachtet (Yee et al. 2000), weitere mögliche Nebenwirkungen umfassen die Bildung antinukleärer Antikörper (ANA) und antithyreoidaler Antikörper sowie anaphylaktische Reaktionen (Nestle et al. 2001). Derartige Reaktionen treten extrem selten auf. In den bisherigen klinischen Studien konnte keine maximale Immunstimulation erzielt werden, so dass mit einer erhöhten Wirkung auch mit mehr Nebenwirkungen zu rechnen sein könnte.

#### 4.6.2 Ausblick

DC-basierte Tumorstimmung könnte auch in Zukunft eine große Rolle spielen. Dabei bieten sich ausgehend von den durchgeführten Studien Verbesserungsmöglichkeiten an: Kombinationen DC-basierter Stimmung mit Adjuvantien *in vivo* zeigten in Tierversuchen gute Ergebnisse, so die Kombination mit systemischem CpG-ODN (Heckelsmiller et al. 2002; Heckelsmiller et al. 2002) oder IL-12 (Silla et al. 1999; Tatsumi et al. 2001).

Betrachtet man die DC-basierte Stimmung als Teil der etablierten Tumorstherapie, so sind Interaktionen zu bedenken: eine zusätzliche Bestrahlung des Tumors kann sich positiv auswirken, da dadurch eine proinflammatorische Umgebung geschaffen wird; vermehrt ausgeschüttetes IFN- $\gamma$  etwa unterstützt die T-Zell-Antwort (Ganss et al. 2002). Vorsicht ist jedoch mit immunsuppressiven Therapeutika geboten, so behindern Steroide die Reifung und Funktionalität von DC, was beim Einsatz von Calcineurin-Inhibitoren nicht zu beobachten ist (Woltman et al. 2000). Ifosfamid führt ebenfalls - durch Depletion von intrazellulärem Glutathion - zu reduzierter DC-Funktion (Kuppner et al. 2003). Hier zeigt sich, dass DC-basierte Stimmung im Zusammenhang mit zusätzlich angewandten Therapie-schemata gesehen werden muss.

Darüber hinaus bieten sich DC-basierte Stimmestrategien nicht nur in der Tumorstherapie an; auch bei infektiösen Erkrankungen verspricht das Konzept erfolgreiche alternative Behandlungsmethoden, z.B. im Bereich der HIV-Therapie (Brown et al. 2003; Lu et al. 2003)

Wichtig scheint auch, im Licht oben beschriebenen Einflusses des Reifegrades der DC auf die antitumorale Potenz, eine sorgfältige Korrelation der *in vivo* gewonnenen Daten mit den Ergebnissen *in vitro*.

## 4.7 Zukunft von CpG-ODN in der Immuntherapie

CpG-ODN haben in ihrem Einsatz als Immunmodulatoren ein immenses Potential. Nicht nur als Stimulus *in vitro* von Nutzen, können sie auch problemlos *in vivo* eingesetzt werden, wobei sie nicht nur im Feld der Tumorthherapie, sondern auch als Adjuvans z.B. bei infektiösen Erkrankungen bereits erfolgreich bei Primaten getestet werden.

### 4.7.1 CpG als Adjuvans bei Infektionen

Als potentes Adjuvans zur Vakzinierung gegen Hepatitis B bei Mäusen (Davis et al. 1998) und Orang Utans (Davis et al. 2000) wurden CpG-ODN erfolgreich eingesetzt; in einer Phase-I-Studie am Menschen zeigte sich diese Kombination als immunogen und gut verträglich (Halperin et al. 2003). Auch bei der Entwicklung einer Malaria-Vakzine können CpG-ODN möglicherweise als sinnvolles Adjuvans eingesetzt werden (Su et al. 2003; Coban et al. 2004; Kumar et al. 2004), ebenso wie bei der Vakzinierung gegen Toxoplasmose (Spencer et al. 2004). Bei der klassischen Th2-Infektion der Leishmaniose können CpG-ODN zu einem Switch der Immunantwort zu Th1 führen (Zimmermann et al. 1998; Mendez et al. 2003); das gleiche Phänomen des Th2- zu Th1-Switch kann bei Asthma bronchiale von Nutzen sein (Kline et al. 1998). Behandlung mit CpG-ODN kann Mäuse vor einer nachfolgenden Infektion mit intrazellulären Bakterien schützen (Elkins et al. 1999). Auch im Fall einer Infektion mit Herpes-simplex-Virus führten CpG-ODN nach Verabreichung zusammen mit Antigenen zu einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort (Gierynska et al. 2002). Bei einer HIV-Infektion wurde nach Behandlung mit CpG-ODN beobachtet, dass die Replikation von HIV reaktiviert wird, was latente Reservoirs des HI-Virus im Körper einer Therapie leichter zugänglich machen könnte (Scheller et al. 2004).

Nicht nur in der Tumorthherapie, sondern auch bei infektiösen Erkrankungen bzw. bei der Entwicklung effizienter Vakzinen könnten also CpG-ODN eine große Rolle spielen.

#### 4.7.2 CpG als Adjuvans bei Tumoren

BCG als historisches Adjuvans und "Vorläufer" der CpG-ODN hat in Studien beim Blasenkarzinom (Alexandroff et al. 1999) oder Kolonkarzinom (Vermorken et al. 1999) Wirksamkeit bewiesen, jedoch zeigen Patienten in fortgeschrittenem Stadium schlechtes Ansprechen auf die BCG-Therapie. Hier bieten sich CpG-ODN als mögliche bessere Alternative an (Weiner et al. 1997; Davis et al. 1998). Studien in vitro zeigten, dass BCG - anders als CpG-ODN - keine reine Th1-Antwort induzieren, sondern die Immunantwort durch gleichzeitige Induktion von IL-12 und IL-10 eine Mischung aus Th1 und Th2 darstellt (Atkins et al. 2003).

CpG-ODN stimulieren dabei nicht nur DC, sondern wirken auch indirekt auf T-Zellen und B-Zellen (Krieg et al. 1995; Krieg 1999; Hartmann and Krieg 2000), so dass sie umfassend in das Immunsystem eingreifen und zu einer potenten, Th1-basierten Immunantwort führen können.

Mehrere Studien zeigen, dass CpG-ODN in vivo zu einer effizienten antitumoralen Immunantwort führen können: z.B. bei murinem Neuroblastom (Carpentier et al. 1999), murinem intrakranielles Gliom (Carpentier et al. 2000), muriner B-CLL (Decker et al. 2000) oder muriner Leukämie (Blazar et al. 2001). Dabei wurden CpG-ODN auch in der Tumorthherapie nicht nur als Einzelsubstanz, sondern auch als Adjuvans z.B. zu einer Vakzine mit synthetischen Tumorpeptiden (Davila and Celis 2000; Chen et al. 2004) oder zu einem monoklonalen Antikörper bei murinem Lymphom (Wooldridge et al. 1997) verwendet. Derzeit werden CpG-ODN in Phase I-/II-Studien am Menschen getestet, z.B. bei Non-Hodgkin-Lymphom oder Malignem Melanom (Paul 2003).

Ist - etwa durch Tumor-Escapemechanismen - eine T-Zell-Toleranz etabliert, kann persistente TLR-Aktivierung dennoch zu einer Immunantwort führen (Yang et al. 2004). In diesem Zusammenhang könnten sich CpG-ODN als benefitär erweisen. Ebenso kann eine intratumorale Injektion von CpG-ODN die Immunogenität eines Tumors fördern (Lonsdorf et al. 2003).

### 4.7.3 Probleme der Therapie mit CpG-ODN

Die vorliegende Arbeit befasst sich lediglich mit der Wirkung von CpG-ODN *in vitro*. Doch gerade wegen der immer größer werdenden Bedeutung der systemischen Anwendung von CpG-ODN ist die Frage nach eventuellen Nebenwirkungen wichtig. Hierbei finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass die systemische Anwendung von CpG-ODN wenig systemische Nebenwirkungen zeigt (Lipford et al. 1997; Krieg et al. 1999). CpG-ODN führen *in vivo* zu einer sehr geringen Induktion von TNF- $\alpha$  (Hartmann and Krieg 1999). In Tierversuchen wurde nach Injektion von CpG-ODN teils eine lokale Lymphadenopathie (Lipford et al. 2000) bzw. eine Splenomegalie (Storni et al. 2004) beobachtet. Die tägliche Gabe von CpG-ODN führte in einer anderen Arbeit nach einer Woche zur Zerstörung der Struktur der Lymphfollikel, zur Inhibierung follikulärer DC und B-Zellen des Keimzentrums und der humoralen Immunantwort; nach 20 Tagen kam es bei den Mäusen zu multifokaler Lebernekrose und hämorrhagischem Aszites (Heikenwalder et al. 2004). Die systemische Anwendung von CpG-ODN im humanen System muss also trotz wahrscheinlich geringer Toxizität genau überprüft werden; Fragen der Dosierung und Anwendungsfrequenz sind dabei zu klären. Erste Phase-I- und Phase-II-Studien zeigen am Menschen eine gute Verträglichkeit der systemischen Anwendung von CpG-ODN (Halperin et al. 2003).

### 4.7.4 Unterschiede der CpG-ODN

Grundsätzlich unterscheidet man CpG-A und CpG-B als die beiden großen Gruppen dieser ODN. Dabei wirken CpG-A-ODN auf plasmazytoide DC und induzieren die IFN- $\gamma$ -Produktion, CpG-B-ODN induzieren demgegenüber nur wenig IFN- $\gamma$ -Bildung und stimulieren vor allem B-Zellen. Die unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivierung verschiedener Komponenten des Immunsystems *in vivo* ist dabei abhängig von den das CG-Motiv flankierenden Basen und vom DNA-Backbone. Durch unterschiedliches Design kann man die Wirkung von CpG-ODN beeinflussen, neue Varianten von CpG (CpG-C) können sowohl die IFN- $\gamma$ -Bildung als auch die Stimulation von B-Zellen bewirken (Hartmann et al. 2003). Die Testung von CpG-ODN *in vitro* dient als guter Prädiktor für Wirkung von CpG-ODN *in vivo* (Hartmann et al. 2000).

CpG-ODN können auch durch veränderte pharmakologische Formulierungen für die Anwendung in der Praxis optimiert werden: So werden durch eine Verpackung von CpG-

ODN in *virus like particles* Nebenwirkungen reduziert und Pharmakodynamik wie auch Immunogenität im murinen Modell verbessert (Storni et al. 2004). Liposomales CpG wird ebenfalls erfolgreich an Mäusen eingesetzt (Ishii et al. 2003).

Veränderungen der Basenfolge können ebenso zu profunden Veränderungen in der Funktionalität von ODN führen: so wird durch einen base switch von C zu G (GpG) die Th1-Antwort inhibiert, was einen Einsatz in der Therapie von Autoimmunreaktionen möglich erscheinen lässt (Ho et al. 2003).

#### 4.7.5 Alternative Adjuvantien in der Tumorthherapie

Neben CpG-ODN werden auch andere Adjuvantien in der Tumorthherapie erfolgreich eingesetzt. In Erprobung sind beispielsweise DETOX bei malignem Melanom (Schultz et al. 1995) oder QS21/MPL bei MAGE-3-positiven Tumoren (Vantomme et al. 2004). OK-432 kann auch als Reifestimulus für DC in vitro verwendet werden, besonders in Kombination mit Prostaglandin E2 (Sato et al. 2003), bei der systemischen Anwendung beim Kolonkarzinom führt OK-432 zu einer Erhöhung des intratumoralen 5-FU-Spiegels (Amano et al. 2000).

Bei einem Vergleich verschiedener etablierter Adjuvantien (Weeratna et al. 2000) zeigten CpG-ODN und MPL eine gemischte Th1-/Th2-Antwort, Freud's complete und incomplete Adjuvans, Alum und Titermax Gold eine Th2-basierte Antwort. Bei einer Kombination von CpG mit einem zweiten Adjuvans konnte die Induktion einer potenten Th1-Antwort beobachtet werden. Dies zeigt eine mögliche Perspektive der CpG-basierten Immuntherapie. Auch eine Kombination von CpG-ODN mit Substanzen wie IL-13 (Ishii et al. 2003) oder GM-CSF (Liu et al. 1998) kann zur Induktion einer potenteren Immunantwort beitragen.

CpG-ODN bieten in der Immuntherapie verschiedenster Erkrankungen, gerade auch in der Tumorthherapie, immense Möglichkeiten, sei es in vitro beispielsweise als Stimulus für die DC-Reifung, sei es in vivo als Einzelsubstanz oder als Adjuvans für Vakzinestrategien. In der Zukunft wird sich die Bedeutung dieser synthetisch herzustellenden, wenig toxischen Substanz sicher noch vergrößern.



## 5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) bieten aufgrund ihrer antigenpräsentierenden Funktion und der Fähigkeit zur Induktion einer potenten Immunantwort einen äußerst interessanten Ansatz in der Immuntherapie von Tumoren.

Mit zunehmendem Reifegrad der DC zeigen sich Unterschiede in Phänotyp und Funktionalität: Reife DC exprimieren auf ihrer Oberfläche mehr kostimulatorische (CD80, CD86) sowie antigenpräsentierende (MHC I, MHC II) Moleküle als unreife DC, sie produzieren mehr IL-12, das für die Induktion einer Th1-Immunantwort wesentlich ist, und sie können T-Zellen in höherem Ausmaß zur Proliferation anregen.

Die Generierung und Kultur von DC aus murinen Knochenmarksvorläuferzellen war dabei nach unserem optimierten Protokoll sehr effizient möglich.

In ihrer Eigenschaft als Reifestimuli für DC wurden in dieser Arbeit TNF- $\alpha$ , LPS und CpG-ODN 1826 erstmals direkt *in vitro* miteinander verglichen. Während TNF- $\alpha$  dabei in allen Analyse-Assays deutlich unterlegen ist, zeigen sich LPS und CpG-ODN als potente Reifestimuli für DC *in vitro*. Dabei ist CpG-ODN 1826 dem LPS in der Induktion der IL-12-Produktion sowie auch in der Induktion der T-Zell-Proliferation gerade in geringen DC-zu-T-Zell-Verhältnissen überlegen. Dazu ist CpG-ODN 1826 *in vivo* anwendbar, während TNF- $\alpha$  wie auch LPS für die Anwendung *in vivo* zu toxisch sind. Für unsere Vakzinierungsversuche griffen wir daher auf CpG-ODN 1826 als Reifestimulus für DC zurück.

Im Protokoll für die Vakzinierung erwies sich die einfache, dreitägige Kokultur von DC mit bestrahlten Tumorzellen als sehr effektive Methode der Antigenbeladung. Die bestrahlten Tumorzellen zeigten dabei keinen inhibierenden Effekt auf die Funktionalität der DC.

Durch Vakzinierung mit CpG-stimulierten und mit bestrahlten Tumorzellen kokultivierten DC konnte *in vivo* eine prophylaktische Tumorprotektion bei 60% der Versuchstiere erreicht werden, im therapeutischen Ansatz konnten 40% der Tiere von bereits etablierten Tumoren geheilt werden. Das Tumorstadium bei den restlichen vakzinierten Tieren wurde gehemmt; in den Versuchstieren der Kontrollgruppen zeigte sich ein einheitlich aggressives Tumorstadium, das zum Tod der Tiere an Tag 20 bis 25 führte.

Die durch die DC-basierte Vakzinierung nach diesem Protokoll hervorgerufene Immunantwort zeigte sich als systemisch wirksam auch bei tumorferner Vakzinierung. Darüber hinaus erwiesen sich einmalig vakzinierter, tumorfrei gebliebene Tiere auch über einen langen Zeitraum von 15 Wochen als resistent gegenüber weiterer Challenge mit Tumorzellen, was die Induktion eines immunologischen Gedächtnisses durch die DC-basierte Vakzinierung belegt. Die erzielte Immunität war dabei jedoch spezifisch gegen die Tumorzellen der Kokultur wirksam, Tumorzellen eines anderen Karzinoms wuchsen in vakzinierter Tieren ungehindert; eine unspezifische Immunstimulation durch die DC-basierte Vakzinierung nach unserem Protokoll konnte also ausgeschlossen werden.

Durch die Etablierung eines Kolonkarzinom-Modells in einem weiteren Mausstamm konnte in dieser Arbeit die Effizienz der DC-basierten Vakzinierung in zwei Mausstämmen direkt verglichen werden. Erstmals konnte dabei ein möglicher Einfluss der DC-Eigenschaften auf den Vakzinierungserfolg gezeigt werden: Je dichter die Expression antigenpräsentierender Moleküle auf der Zelloberfläche der DC ist, umso effektiver scheint die Antigenpräsentation und damit die Induktion einer potenten antitumoralen Immunantwort möglich zu sein. Die Dichte kostimulatorischer Moleküle scheint dabei hingegen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Durch Stimulierung der DC mit CpG-ODN ist eine Erhöhung der Dichte antigenpräsentierender Moleküle erreichbar.

Die genannten Erkenntnisse aus dieser Arbeit bieten wertvolle Hinweise für die Entwicklung effektiverer Vakzinierungsprotokolle für klinische Studien. Das verbesserte Verständnis der DC-Funktionalität ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer effektiven, DC-basierten Vakzinestrategie am Menschen.

## 6 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AC/DC	<i>Acceleration/deceleration</i> (Beschleunigung/Verzögerung der Zentrifuge)
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
BALB/c	Bagg albino/c (Albinomaus mit eingeschränkter Th1-Antwort)
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Ci	Curie (Einheit)
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytidin Phosphat Guanosin
CTL	<i>Cytotoxic T cells</i>
Da	Dalton (Einheit)
DC	Dendritische Zelle
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FU	Fluoro-Uracil
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
k	Kilo
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
mGM-CSF	<i>Murine Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotid
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPE	Phycoerythrin aus <i>Porphyidium cruentum</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subcutan
TE-Puffer	Tris-Hydrochlorid EDTA Puffer
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Units (Einheiten)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dendritische Zellen (DC) im Phasenkontrastmikroskop .....	5
Abbildung 2: Lebenszyklus dendritischer Zellen. ....	7
Abbildung 3: Aktivierung von dendritischen Zellen. ....	9
Abbildung 4: Wirkung von dendritischen Zellen bei der antitumoralen Immunantwort .....	10
Abbildung 5: Unterschiede zwischen bakterieller und Vertebraten-DNA. ....	13
Abbildung 6: Wirkung von CpG-ODN im Immunsystem. ....	14
Abbildung 7: Immuntherapie mit CpG-ODN. ....	15
Abbildung 8: Generierung und Stimulierung dendritischer Zellen. ....	27
Abbildung 9: Flowzytometrische Bestimmung von CD80 und CD86 auf der Oberfläche dendritischer Zellen. ....	28
Abbildung 10: BALB/c-Maus mit subkutan wachsendem Tumor. ....	33
Abbildung 11: Graphische Darstellung des Vakzinierungsassays. ....	34
Abbildung 12: Effekt verschiedener Reifestimuli auf dendritische Zellen: Ergebnisse der Flowzytometrie. ....	39
Abbildung 13: Effekt verschiedener Reifestimuli auf dendritische Zellen: Ergebnisse des IL-12-ELISA. ....	40
Abbildung 14: Effekt verschiedener Reifestimuli auf dendritische Zellen: Ergebnis des <sup>3</sup> H-Thymidin-Proliferationsassays. ....	41
Abbildung 15: Kombination von CpG-ODN 1826 mit LPS als Reifestimulus für dendritische Zellen: Ergebnis der Flowzytometrie. ....	42
Abbildung 16: Kombination von CpG-ODN 1826 mit LPS als Reifestimulus für dendritische Zellen: Ergebnis des IL-12-ELISA. ....	42
Abbildung 17: Wirkung von CpG-ODN 1928 auf murine dendritische Zellen: Flowzytometrisches Ergebnis. ....	43
Abbildung 18: Wirkung von CpG-ODN 1928 auf murine dendritische Zellen: Ergebnis des IL-12-ELISA. ....	44
Abbildung 19: Ergebnisse der prophylaktischen Vakzinierung mit CpG-aktivierten dendritischen Zellen in BALB/c-Mäusen. ....	46
Abbildung 20: Ergebnisse der therapeutischen Vakzinierung mit CpG-aktivierten dendritischen Zellen in BALB/c-Mäusen. ....	47
Abbildung 21: Ermittlung des optimalen Zeitpunkts für die therapeutische Vakzinierung mit dendritischen Zellen in BALB/c-Mäusen. ....	48
Abbildung 22: Wachstumskurve von C26- und MC38-Tumoren in BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäusen. ...	49
Abbildung 23: Vergleich von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen hinsichtlich der prophylaktischen Vakzinierung. ....	50
Abbildung 24: Vergleich von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen hinsichtlich der therapeutischen Vakzinierung. ....	51

---

Abbildung 25: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen: Ergebnisse der Flowzytometrie (1) .....	53
Abbildung 26: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen: Ergebnisse der Flowzytometrie (2) .....	54
Abbildung 27: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen: Ergebnisse des IL-12-ELISA .....	55
Abbildung 28: Vergleich von dendritischen Zellen aus BALB/c- und C57 BL/6-Mäusen: Ergebnisse des <sup>3</sup> H-Thymidin-Proliferationsassay .....	56
Abbildung 29: Vergleich von T-Zellen aus BALB/c- und C57 BL/6-Mäusen: Ergebnisse des <sup>3</sup> H-Thymidin-Proliferationsassay .....	57
Abbildung 30: Induktion von Langzeitimmunität gegen C26-Tumorzellen, jedoch nicht gegen Renca-Tumorzellen in vakzinierten Mäusen, die C26 abgestoßen hatten .....	60
Abbildung 31: Wachstumskurve der Renca-Tumoren .....	61
Abbildung 32: Spezifität der Anti-Tumorimmunantwort nach Vakzinierung mit dendritischen Zellen .....	62
Abbildung 33: Zusammenstellung klinischer Studien zu DC-basierter Vakzinierung .....	78

## 8 Literaturverzeichnis

- Aalamian, M., I. L. Tourkova, G. S. Chatta, H. Lilja, E. Huland, H. Huland, G. V. Shurin and M. R. Shurin (2003). Inhibition of dendropoiesis by tumor derived and purified prostate specific antigen. *J Urol* 170(5): 2026-30.
- Adema, G. J., F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K. B. Bacon and C. G. Figdor (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387(6634): 713-7.
- Adler, A. J., D. W. Marsh, G. S. Yochum, J. L. Guzzo, A. Nigam, W. G. Nelson and D. M. Pardoll (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.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein and N. Bhardwaj (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188(7): 1359-68.
- Alexandroff, A. B., A. M. Jackson, M. A. O'Donnell and K. James (1999). BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 353(9165): 1689-94.
- Alters, S. E., J. R. Gadea, M. Sorich, G. O'Donoghue, S. Talib and R. Philip (1998). Dendritic cells pulsed with CEA peptide induce CEA-specific CTL with restricted TCR repertoire. *J Immunother* 21(1): 17-26.
- Amano, M., M. Sekimoto, T. Monden, N. Tomita, M. Ohue, A. Haba, I. Sakita, Y. Tamaki and M. Monden (2000). Selective augmentations of intratumoral 5-fluorouracil concentration by local immunotherapy with OK-432 and fibrinogen. *Dis Colon Rectum* 43(3): 402-7.
- Askew, D., R. S. Chu, A. M. Krieg and C. V. Harding (2000). CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J Immunol* 165(12): 6889-95.
- Atkins, H., B. R. Davies, J. A. Kirby and J. D. Kelly (2003). Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing oligonucleotides: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 89(12): 2312-9.
- Ballas, Z. K., A. M. Krieg, T. Warren, W. Rasmussen, H. L. Davis, M. Waldschmidt and G. J. Weiner (2001). Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 167(9): 4878-86.
- Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen and A. M. Krieg (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., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman and J. Fay (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61(17): 6451-8.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-52.

- Bauer, S., C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner and G. B. Lipford (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.
- Bedrosian, I., R. Mick, S. Xu, H. Nisenbaum, M. Faries, P. Zhang, P. A. Cohen, G. Koski and B. J. Czerniecki (2003). Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* 21(20): 3826-35.
- Behboudi, S., D. Chao, P. Klenerman and J. Austyn (2000). The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology* 99(3): 361-6.
- Blazar, B. R., A. M. Krieg and P. A. Taylor (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., S. K. Nair, D. Snyder and E. Gilboa (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., J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen and A. Van Pel (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12: 337-65.
- Brown, K., W. Gao, S. Alber, A. Trichel, M. Murphey-Corb, S. C. Watkins, A. Gambotto and S. M. Barratt-Boyes (2003). Adenovirus-transduced dendritic cells injected into skin or lymph node prime potent simian immunodeficiency virus-specific T cell immunity in monkeys. *J Immunol* 171(12): 6875-82.
- Brunner, C., J. Seiderer, A. Schlamp, M. Bidlingmaier, A. Eigler, W. Haimerl, H. A. Lehr, A. M. Krieg, G. Hartmann and S. Endres (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.
- Burch, P. A., J. K. Breen, J. C. Buckner, D. A. Gastineau, J. A. Kaur, R. L. Laus, D. J. Padley, M. V. Peshwa, H. C. Pitot, R. L. Richardson, B. J. Smits, P. Sopapan, G. Strang, F. H. Valone and S. Vuk-Pavlovic (2000). Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6(6): 2175-82.
- Candido, K. A., K. Shimizu, J. C. McLaughlin, R. Kunkel, J. A. Fuller, B. G. Redman, E. K. Thomas, B. J. Nickoloff and J. J. Mule (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., L. Chen, F. Maltonti and J. Y. Delattre (1999). Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 59(21): 5429-32.
- Carpentier, A. F., J. Xie, K. Mokhtari and J. Y. Delattre (2000). Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 6(6): 2469-73.
- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt and J. Banchereau (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360(6401): 258-61.

- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180(4): 1263-72.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen and A. Lanzavecchia (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 189(5): 821-9.
- Celluzzi, C. M. and L. D. Falo, 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.
- Celluzzi, C. M., J. I. Mayordomo, W. J. Storkus, M. T. Lotze and L. D. Falo, Jr. (1996). Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 183(1): 283-7.
- Cerwenka, A. and L. L. Lanier (2001). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 181: 158-69.
- Chace, J. H., N. A. Hooker, K. L. Mildenstein, A. M. Krieg and J. S. Cowdery (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., M. Moutet, J. Faivre, F. Martin and M. Martin (1996). Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* 74(5): 975-83.
- Chen, Y. F., C. W. Lin, Y. P. Tsao and S. L. Chen (2004). Cytotoxic-T-lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice. *J Virol* 78(3): 1333-43.
- Chu, R. S., D. Askew and C. V. Harding (2000). CpG DNA switches on Th1 immunity and modulates antigen-presenting cell function. *Curr Top Microbiol Immunol* 247: 199-210.
- Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann and C. V. Harding (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186(10): 1623-31.
- Coban, C., K. J. Ishii, A. W. Stowers, D. B. Keister, D. M. Klinman and N. Kumar (2004). Effect of CpG oligodeoxynucleotides on the immunogenicity of Pfs25, a Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine antigen. *Infect Immun* 72(1): 584-8.
- 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.
- Constant, S. L. and K. Bottomly (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15: 297-322.
- Cornelie, S., J. Hoebeke, A. M. Schacht, B. Bertin, J. Vicogne, M. Capron and G. Riveau (2004). Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J Biol Chem* 279(15): 15124-9.
- Cowdery, J. S., J. H. Chace, A. K. Yi and A. M. Krieg (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 156(12): 4570-5.
- Cranmer, L. D., K. T. Trevor and E. M. Hersh (2004). Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 53(4): 275-306.



- Dalyot-Herman, N., O. F. Bathe and T. R. Malek (2000). Reversal of CD8<sup>+</sup> T cell ignorance and induction of anti-tumor immunity by peptide-pulsed APC. *J Immunol* 165(12): 6731-7.
- Danna, E. A., P. Sinha, M. Gilbert, V. K. Clements, B. A. Pulaski and S. Ostrand-Rosenberg (2004). Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease. *Cancer Res* 64(6): 2205-11.
- Davila, E. and E. Celis (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, R. R. Weeratna, Jumintarto, D. D. Iskandriati, S. S. Chamzah, A. A. Ma'ruf, C. C. Nente, D. D. Pawitri, A. M. Krieg, Heriyanto, W. Smits and D. D. Sajuthi (2000). CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 18(18): 1920-4.
- Davis, H. L., R. Weeratna, T. J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr, A. M. Krieg and R. Weeranta (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.
- Davoust, J. and J. Banchereau (2000). Naked antigen-presenting molecules on dendritic cells. *Nat Cell Biol* 2(3): E46-8.
- Decker, T., F. Schneller, T. Sparwasser, T. Tretter, G. B. Lipford, H. Wagner and C. Peschel (2000). Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 95(3): 999-1006.
- Delespesse, G., Y. Ohshima, L. P. Yang, C. Demeure and M. Sarfati (1999). OX40-Mediated cosignal enhances the maturation of naive human CD4<sup>+</sup> T cells into high IL-4-producing effectors. *Int Arch Allergy Immunol* 118(2-4): 384-6.
- Demir, G., H. O. Klein and N. Tuzuner (2003). Low dose daily rhGM-CSF application activates monocytes and dendritic cells in vivo. *Leuk Res* 27(12): 1105-8.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovskiy, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193(2): 233-8.
- Diehl, L., A. T. Den Boer, E. I. van der Voort, C. J. Melief, R. Offringa and R. E. Toes (2000). The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. *J Mol Med* 78(7): 363-71.
- Dummer, W., J. C. Becker, A. Schwaaf, M. Leverkus, T. Moll and E. B. Brocker (1995). Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 5(1): 67-8.
- Ebner, S., G. Ratzinger, B. Krosbacher, M. Schmuth, A. Weiss, D. Reider, R. A. Kroczyk, M. Herold, C. Heufler, P. Fritsch and N. Romani (2001). Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol* 166(1): 633-41.
- Eggert, A. A., M. W. Schreurs, O. C. Boerman, W. J. Oyen, A. J. de Boer, C. J. Punt, C. G. Figdor and G. J. Adema (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., T. R. Rhinehart-Jones, S. Stibitz, J. S. Conover and D. M. Klinman (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., H. Jonuleit, J. Saloga and J. Knop (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73(3): 309-16.
- Ferrara, A., M. Nonn, P. Sehr, C. Schreckenberger, M. Pawlita, M. Durst, A. Schneider and A. M. Kaufmann (2003). Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 129(9): 521-30.
- Fields, R. C., K. Shimizu and J. J. Mule (1998). Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9482-7.
- Fong, L., D. Brockstedt, C. Benike, L. Wu and E. G. Engleman (2001). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 166(6): 4254-9.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh and D. P. Carbone (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., M. Lolkema and P. Matzinger (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5(11): 1249-55.
- Ganss, R., E. Ryschich, E. Klar, B. Arnold and G. J. Hammerling (2002). Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 62(5): 1462-70.
- Gierynska, M., U. Kumaraguru, S. K. Eo, S. Lee, A. Krieg and B. T. Rouse (2002). Induction of CD8 T-cell-specific systemic and mucosal immunity against herpes simplex virus with CpG-peptide complexes. *J Virol* 76(13): 6568-76.
- Gilboa, E., S. K. Nair and H. K. Lysterly (1998). Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 46(2): 82-7.
- Goldszmid, R. S., J. Idoyaga, A. I. Bravo, R. Steinman, J. Mordoh and R. Wainstok (2003). Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 171(11): 5940-7.
- Gong, J., D. Chen, M. Kashiwaba and D. Kufe (1997). Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 3(5): 558-61.
- Halperin, S. A., G. Van Nest, B. Smith, S. Abtahi, H. Whiley and J. J. Eiden (2003). A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 21(19-20): 2461-7.
- Harris, J. E., L. Ryan, H. C. Hoover, Jr., R. K. Stuart, M. M. Oken, A. B. Benson, 3rd, E. Mansour, D. G. Haller, J. Manola and M. G. Hanna, 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.

- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90(9): 3245-87.
- Hartmann, G., J. Battiany, H. Poeck, M. Wagner, M. Kerkmann, N. Lubenow, S. Rothenfusser and S. Endres (2003). Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33(6): 1633-41.
- Hartmann, G. and A. M. Krieg (1999). CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther* 6(5): 893-903.
- Hartmann, G. and A. M. Krieg (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164(2): 944-53.
- Hartmann, G., R. D. Weeratna, Z. K. Ballas, P. Payette, S. Blackwell, I. Suparto, W. L. Rasmussen, M. Waldschmidt, D. Sajuthi, R. H. Purcell, H. L. Davis and A. M. Krieg (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., G. J. Weiner and A. M. Krieg (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.
- Heckelsmiller, K., S. Beck, K. Rall, B. Sipos, A. Schlamp, E. Tuma, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann (2002). Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 32(11): 3235-45.
- Heckelsmiller, K., K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann (2002). Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 169(7): 3892-9.
- Heeg, K., T. Sparwasser, G. B. Lipford, H. Hacker, S. Zimmermann and H. Wagner (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.
- Heikenwalder, M., M. Polymenidou, T. Junt, C. Sigurdson, H. Wagner, S. Akira, R. Zinkernagel and A. Aguzzi (2004). Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 10(2): 187-92.
- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman and R. M. Locksley (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169(1): 59-72.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-5.
- Heufler, C., F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R. M. Steinman, N. Romani and G. Schuler (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.
- Ho, P. P., P. Fontoura, P. J. Ruiz, L. Steinman and H. Garren (2003). An immunomodulatory GpG oligonucleotide for the treatment of autoimmunity via the innate and adaptive immune systems. *J Immunol* 171(9): 4920-6.

- Holtl, L., C. Rieser, C. Papesh, R. Ramoner, M. Herold, H. Klocker, C. Radmayr, A. Stenzl, G. Bartsch and M. Thurnher (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., S. E. Macatonia, A. O'Garra and K. M. Murphy (1995). T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med* 181(2): 713-21.
- Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman and R. Levy (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2(1): 52-8.
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu and R. M. Steinman (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.
- Ishii, K. J., K. Kawakami, I. Gursel, J. Conover, B. H. Joshi, D. M. Klinman and R. K. Puri (2003). Antitumor therapy with bacterial DNA and toxin: complete regression of established tumor induced by liposomal CpG oligodeoxynucleotides plus interleukin-13 cytotoxin. *Clin Cancer Res* 9(17): 6516-22.
- Jakob, T., P. S. Walker, A. M. Krieg, M. C. Udey and J. C. Vogel (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.
- Jones, D. E., J. M. Palmer, A. D. Burt, C. Walker, A. J. Robe and J. A. Kirby (2002). Bacterial motif DNA as an adjuvant for the breakdown of immune self-tolerance to pyruvate dehydrogenase complex. *Hepatology* 36(3): 679-86.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192(9): 1213-22.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink and A. H. Enk (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 22(7): 394-400.
- Kasaian, M. T., M. J. Whitters, L. L. Carter, L. D. Lowe, J. M. Jussif, B. Deng, K. A. Johnson, J. S. Witek, M. Senices, R. F. Konz, A. L. Wurster, D. D. Donaldson, M. Collins, D. A. Young and M. J. Grusby (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.
- Kaser, A., S. Dunzendorfer, F. A. Offner, T. Ryan, A. Schwabegger, W. W. Cruikshank, C. J. Wiedermann and H. Tilg (1999). A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol* 163(6): 3232-8.
- Kelleher, M. and P. C. Beverley (2001). Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8+ T cells in vitro, whereas CD40 ligation is essential. *J Immunol* 167(11): 6247-55.
- Kiertcher, S. M., B. J. Gitlitz, R. A. Figlin and M. D. Roth (2003). Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4 expand and activate type-1 dendritic cells (DC1) when administered in vivo to cancer patients. *Int J Cancer* 107(2): 256-61.

- Kiertcher, S. M., J. Luo, S. M. Dubinett and M. D. Roth (2000). Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 164(3): 1269-76.
- Kikuchi, K., Y. Yanagawa, T. Aranami, C. Iwabuchi, K. Iwabuchi and K. Onoe (2003). Tumour necrosis factor-alpha but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology* 108(1): 42-9.
- Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne and A. M. Krieg (1998). Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 160(6): 2555-9.
- Koda, K., M. C. Glassy, M. E. McKnight, J. Yasutomi, N. Saito, M. Dan and N. Nakajima (2001). Immunotherapy for recurrent colorectal cancers with human monoclonal antibody SK-1. *Anticancer Res* 21(1B): 621-7.
- 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. (1999). Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1489(1): 107-16.
- Krieg, A. M., L. Love-Homan, A. K. Yi and J. T. Harty (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 C. A. Stein (1995). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or anti-protein? *Antisense Res Dev* 5(4): 241.
- Krieg, A. M., A. K. Yi and G. Hartmann (1999). Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA. *Pharmacol Ther* 84(2): 113-20.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374(6522): 546-9.
- Kumar, S., T. R. Jones, M. S. Oakley, H. Zheng, S. P. Kuppasamy, A. Taye, A. M. Krieg, A. W. Stowers, D. C. Kaslow and S. L. Hoffman (2004). CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. *Infect Immun* 72(2): 949-57.
- Kuppner, M. C., A. Scharner, V. Milani, C. Von Hesler, K. E. Tschop, O. Heinz and R. D. Issels (2003). Ifosfamide impairs the allostimulatory capacity of human dendritic cells by intracellular glutathione depletion. *Blood* 102(10): 3668-74.
- Labeur, M. S., B. Roters, B. Pers, A. Mehling, T. A. Luger, T. Schwarz and S. Grabbe (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., M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1(4): 311-6.
- Lau, R., F. Wang, G. Jeffery, V. Marty, J. Kuniyoshi, E. Bade, M. E. Ryback and J. Weber (2001). Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24(1): 66-78.
- Lipford, G. B., T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E. S. Koch, K. Heeg and H. Wagner (1997). Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* 27(12): 3420-6.

- Lipford, G. B., T. Sparwasser, S. Zimmermann, K. Heeg and H. Wagner (2000). CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol* 165(3): 1228-35.
- Liu, H. M., S. E. Newbrough, S. K. Bhatia, C. E. Dahle, A. M. Krieg and G. J. Weiner (1998). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92(10): 3730-6.
- Liu, K. J., L. F. Lu, H. T. Cheng, Y. M. Hung, S. R. Shiou, J. Whang-Peng and S. H. Juang (2004). Concurrent delivery of tumor antigens and activation signals to dendritic cells by irradiated CD40 ligand-transfected tumor cells resulted in efficient activation of specific CD8+ T cells. *Cancer Gene Ther* 11(2): 135-47.
- Liu, T., H. Nishimura, T. Matsuguchi and Y. Yoshikai (2000). Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57 BL/6 mice. *Cell Immunol* 202(1): 31-40.
- Lodge, P. A., L. A. Jones, R. A. Bader, G. P. Murphy and M. L. Salgaller (2000). Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res* 60(4): 829-33.
- Lonsdorf, A. S., H. Kuekrek, B. V. Stern, B. O. Boehm, P. V. Lehmann and M. Tary-Lehmann (2003). Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol* 171(8): 3941-6.
- Lu, W., X. Wu, Y. Lu, W. Guo and J. M. Andrieu (2003). Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nat Med* 9(1): 27-32.
- Ludewig, B., A. F. Ochsenbein, B. Odermatt, D. Paulin, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (2000). Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 191(5): 795-804.
- Ludewig, B., S. Oehen, F. Barchiesi, R. A. Schwendener, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1999). Protective antiviral cytotoxic T cell memory is most efficiently maintained by restimulation via dendritic cells. *J Immunol* 163(4): 1839-44.
- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy and A. O'Garra (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154(10): 5071-9.
- Makarenkova, V. P., G. V. Shurin, I. L. Tourkova, L. Balkir, G. Pirtskhalaishvili, L. Perez, V. Gerein, J. M. Siegfried and M. R. Shurin (2003). Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. *J Neuroimmunol* 145(1-2): 55-67.
- Marzo, A. L., B. F. Kinnear, R. A. Lake, J. J. Frelinger, E. J. Collins, B. W. Robinson and B. Scott (2000). Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 165(11): 6047-55.
- Matsuda, K., T. Tsunoda, H. Tanaka, Y. Umamo, H. Tanimura, I. Nukaya, K. Takesako and H. Yamaue (2004). Enhancement of cytotoxic T-lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.*
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.

- Mayordomo, J. I., T. Zorina, W. J. Storkus, L. Zitvogel, C. Celluzzi, L. D. Falo, C. J. Melief, S. T. Ildstad, W. M. Kast, A. B. Deleo and et al. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1(12): 1297-302.
- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106(3): 255-8.
- Mendez, S., K. Tabbara, Y. Belkaid, S. Bertholet, D. Verthelyi, D. Klinman, R. A. Seder and D. L. Sacks (2003). Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous Leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infect Immun* 71(9): 5121-9.
- Messina, J. P., G. S. Gilkeson and D. S. Pisetsky (1991). Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 147(6): 1759-64.
- Murphy, G. P., B. A. Tjoa, S. J. Simmons, J. Jarisch, V. A. Bowes, H. Ragde, M. Rogers, A. Elgamal, G. M. Kenny, O. E. Cobb, R. C. Ireton, M. J. Troychak, M. L. Salgaller and A. L. Boynton (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. (2000). Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* 19(56): 6673-9.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4(3): 328-32.
- Nestle, F. O., J. Banchereau and D. Hart (2001). Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 7(7): 761-5.
- Nestle, F. O., G. Burg, J. Fah, T. Wrone-Smith and B. J. Nickoloff (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.
- Paglia, P., C. Chiodoni, M. Rodolfo and M. P. Colombo (1996). Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 183(1): 317-22.
- Park, Y., S. W. Lee and Y. C. Sung (2002). Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *J Immunol* 168(1): 5-8.
- Parronchi, P., F. Brugnolo, F. Annunziato, C. Manuelli, S. Sampognaro, C. Mavilia, S. Romagnani and E. Maggi (1999). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 163(11): 5946-53.
- Paul, S. (2003). Technology evaluation: CpG-7909, Coley. *Curr Opin Mol Ther* 5(5): 553-9.
- Phan, V., F. Errington, S. C. Cheong, T. Kottke, M. Gough, S. Altmann, A. Brandenburger, S. Emery, S. Strome, A. Bateman, B. Bonnotte, A. Melcher and R. Vile (2003). A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat Med* 9(9): 1215-9.
- Pockaj, B. A., G. D. Basu, L. B. Pathangey, R. J. Gray, J. L. Hernandez, S. J. Gendler and P. Mukherjee (2004). Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxy-

- genase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 11(3): 328-39.
- Pulendran, B., P. Kumar, C. W. Cutler, M. Mohamadzadeh, T. Van Dyke and J. Banchereau (2001). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167(9): 5067-76.
- Reichardt, V. L. and P. Brossart (2004). DC-based immunotherapy of B-cell malignancies. *Cytotherapy* 6(1): 62-7.
- Remedi, M. M., G. Bonacci, M. A. Vides and A. C. Donadio (2003). Immune control of tumors by antigen presentation improvement. *Tumour Biol* 24(5): 228-35.
- Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold and P. Ricciardi-Castagnoli (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188(11): 2175-80.
- Rieser, C., R. Ramoner, L. Holtl, H. Rogatsch, C. Papesh, A. Stenzl, G. Bartsch and M. Thurnher (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.
- Riethmuller, G., E. Holz, G. Schlimok, W. Schmiegel, R. Raab, K. Hoffken, R. Gruber, I. Funke, H. Pichlmaier, H. Hirche, P. Buggisch, J. Witte and R. Pichlmayr (1998). Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 16(5): 1788-94.
- Rougier, N., D. Schmitt and C. Vincent (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., H. Nagashima, K. Mashino, K. Tahara, H. Yamaguchi, M. Ohta, T. Fujie, F. Tanaka, H. Inoue, K. Takesako, T. Akiyoshi and M. Mori (2001). Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 7(8): 2277-84.
- Santambrogio, L., A. K. Sato, F. R. Fischer, M. E. Dorf and L. J. Stern (1999). Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15050-5.
- Sato, M., T. Takayama, H. Tanaka, J. Konishi, T. Suzuki, T. Kaiga and H. Tahara (2003). Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2). *Cancer Sci* 94(12): 1091-8.
- Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan and N. Bhardwaj (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191(3): 423-34.
- Scheller, C., A. Ullrich, K. McPherson, B. Hefele, J. Knoferle, S. Lamla, A. R. Olbrich, H. Stocker, K. Arasteh, V. Ter Meulen, A. Rethwilm, E. Koutsilieris and U. Dittmer (2004). CpG-oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells. *J Biol Chem*.
- Schmidt, T., C. Ziske, A. Marten, S. Endres, K. Tiemann, V. Schmitz, M. Gorschluter, C. Schneider, T. Sauerbruch and I. G. Schmidt-Wolf (2003). Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model. *Cancer Res* 63(24): 8962-7.



- Schreurs, M. W., A. A. Eggert, A. J. de Boer, C. G. Figdor and G. J. Adema (1999). Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 29(9): 2835-41.
- Schuler, G., N. Romani and R. M. Steinman (1985). A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *J Invest Dermatol* 85(1 Suppl): 99s-106s.
- Schultz, N., R. Oratz, D. Chen, A. Zeleniuch-Jacquotte, G. Abeles and J. C. Bystryk (1995). Effect of DETOX as an adjuvant for melanoma vaccine. *Vaccine* 13(5): 503-8.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher and W. E. Paul (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 10188-92.
- Seiderer, J. (2002). Einfluss von CpG-Oligonukleotiden auf die anti-tumorale Potenz dendritischer Zellen am Beispiel eines murinen Kolonkarzinom-Modells. *Dissertation-sarbeit*.
- Serody, J. S., E. J. Collins, R. M. Tisch, J. J. Kuhns and J. A. Frelinger (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.
- Seymour, M. T., M. L. Seevin and D. J. Kerr (1994). Randomized trial assessing the addition of interferon alpha-2a to fluorouracil and leucovorin in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14: 2280-2288.
- Silla, S., F. Fallarino, T. Boon and C. Uyttenhove (1999). Enhancement by IL-12 of the cytolytic T lymphocyte (CTL) response of mice immunized with tumor-specific peptides in an adjuvant containing QS21 and MPL. *Eur Cytokine Netw* 10(2): 181-90.
- Song, W., Y. Tong, H. Carpenter, H. L. Kong and R. G. Crystal (2000). Persistent, antigen-specific, therapeutic antitumor immunity by dendritic cells genetically modified with an adenoviral vector to express a model tumor antigen. *Gene Ther* 7(24): 2080-6.
- Sparwasser, T., E. S. Koch, R. M. Vabulas, K. Heeg, G. B. Lipford, J. W. Ellwart and H. Wagner (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28(6): 2045-54.
- Spencer, J. A., B. F. Smith, A. J. Guarino, B. L. Blagburn and H. J. Baker (2004). The use of CpG as an adjuvant to *Toxoplasma gondii* vaccination. *Parasitol Res* 92(4): 313-6.
- Steinbrink, K., M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop and A. H. Enk (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159(10): 4772-80.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-96.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman and K. Inaba (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191(3): 411-6.
- Stockwin, L. H., D. McGonagle, I. G. Martin and G. E. Blair (2000). Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol Cell Biol* 78(2): 91-102.

- Storni, T., C. Ruedl, K. Schwarz, R. A. Schwendener, W. A. Renner and M. F. Bachmann (2004). Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol* 172(3): 1777-85.
- Su, Z., M. F. Tam, D. Jankovic and M. M. Stevenson (2003). Vaccination with novel immunostimulatory adjuvants against blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 71(9): 5178-87.
- Surman, D. R., M. E. Dudley, W. W. Overwijk and N. P. Restifo (2000). Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen. *J Immunol* 164(2): 562-5.
- Svane, I. M., A. E. Pedersen, H. E. Johnsen, D. Nielsen, C. Kamby, E. Gaarsdal, K. Nikolajsen, S. Buus and M. H. Claesson (2004). Vaccination with p53-peptide-pulsed dendritic cells, of patients with advanced breast cancer: report from a phase I study. *Cancer Immunol Immunother.*
- Takahashi, T., Y. Tanaka, M. Nieda, T. Azuma, S. Chiba, T. Juji, Y. Shibata and H. Hirai (2003). Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res* 27(9): 795-802.
- Takeshita, F., C. A. Leifer, I. Gursel, K. J. Ishii, S. Takeshita, M. Gursel and D. M. Klinman (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 167(7): 3555-8.
- Tatsumi, T., T. Takehara, T. Kanto, T. Miyagi, N. Kuzushita, Y. Sugimoto, M. Jinushi, A. Kasahara, Y. Sasaki, M. Hori and N. Hayashi (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.
- Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190(11): 1669-78.
- Timmerman, J. M., D. K. Czerwinski, T. A. Davis, F. J. Hsu, C. Benike, Z. M. Hao, B. Taidi, R. Rajapaksa, C. B. Caspar, C. Y. Okada, A. van Beckhoven, T. M. Liles, E. G. Engleman and R. Levy (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99(5): 1517-26.
- Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo 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.
- Trevor, K. T., C. Cover, Y. W. Ruiz, E. T. Akporiaye, E. M. Hersh, D. Landais, R. R. Taylor, A. D. King and R. E. Walters (2004). Generation of dendritic cell-tumor cell hybrids by electrofusion for clinical vaccine application. *Cancer Immunol Immunother.*
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251-76.
- Troy, A., P. Davidson, C. Atkinson and D. Hart (1998). Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol* 160(1): 214-9.

- Ueda, G., Y. Tamura, I. Hirai, K. Kamiguchi, S. Ichimiya, T. Torigoe, H. Hiratsuka, H. Sunakawa and N. Sato (2004). Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci* 95(3): 248-253.
- Ueda, Y., T. Itoh, I. Nukaya, I. Kawashima, K. Okugawa, Y. Yano, Y. Yamamoto, K. Naitoh, K. Shimizu, K. Imura, N. Fuji, H. Fujiwara, T. Ochiai, H. Itoi, T. Sonoyama, A. Hagiwara, K. Takesako and H. Yamagishi (2004). Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. *Int J Oncol* 24(4): 909-17.
- Van Cutsem, E., C. Verslype and I. Demedts (2002). The treatment of advanced colorectal cancer: where are we now and where do we go? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(2): 319-30.
- van den Broeke, L. T., E. Daschbach, E. K. Thomas, G. Andringa and J. A. Berzofsky (2003). Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J Immunol* 171(11): 5842-52.
- Vantomme, V., C. Dantinne, N. Amrani, P. Permanne, D. Gheysen, C. Bruck, G. Stoter, C. M. Britten, U. Keilholz, C. H. Lamers, M. Marchand, M. Delire and M. Gueguen (2004). Immunologic analysis of a phase I/II study of vaccination with MAGE-3 protein combined with the AS02B adjuvant in patients with MAGE-3-positive tumors. *J Immunother* 27(2): 124-35.
- Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean and B. Rocha (2000). Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1(1): 47-53.
- Vermorken, J. B., A. M. Claessen, H. van Tinteren, H. E. Gall, R. Ezinga, S. Meijer, R. J. Scheper, C. J. Meijer, E. Bloemena, J. H. Ransom, M. G. Hanna, Jr. and H. M. Pinedo (1999). Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 353(9150): 345-50.
- Wan, T., X. Zhou, G. Chen, H. An, T. Chen, W. Zhang, S. Liu, Y. Jiang, F. Yang, Y. Wu and X. Cao (2004). Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood* 103(5): 1747-54.
- Weeratna, R. D., M. J. McCluskie, Y. Xu and H. L. Davis (2000). CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 18(17): 1755-62.
- Weiner, G. J., H. M. Liu, J. E. Wooldridge, C. E. Dahle and A. M. Krieg (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10833-7.
- Wiemann, B. and C. O. Starnes (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 64(3): 529-64.
- Woltman, A. M., J. W. de Fijter, S. W. Kamerling, L. C. Paul, M. R. Daha and C. van Kooten (2000). The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 30(7): 1807-12.
- Wooldridge, J. E., Z. Ballas, A. M. Krieg and G. J. Weiner (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 89(8): 2994-8.

- Wu, J. and L. L. Lanier (2003). Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 90: 127-56.
- Xiang, R., H. N. Lode, T. Dreier, S. D. Gillies and R. A. Reisfeld (1998). Induction of persistent tumor-protective immunity in mice cured of established colon carcinoma metastases. *Cancer Res* 58(17): 3918-25.
- Yamamoto, S., E. Kuramoto, S. Shimada and T. Tokunaga (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.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano and T. Tokunaga (1992). Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 148(12): 4072-6.
- Yang, Y., C. T. Huang, X. Huang and D. M. Pardoll (2004). Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol* 5(5): 508-15.
- Yee, C., J. A. Thompson, P. Roche, D. R. Byrd, P. P. Lee, M. Piepkorn, K. Kenyon, M. M. Davis, S. R. Riddell and P. D. Greenberg (2000). Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med* 192(11): 1637-44.
- Yu, J. S., C. J. Wheeler, P. M. Zeltzer, H. Ying, D. N. Finger, P. K. Lee, W. H. Yong, F. Incardona, R. C. Thompson, M. S. Riedinger, W. Zhang, R. M. Prins and K. L. Black (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.
- Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner and K. Heeg (1998). CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160(8): 3627-30.
- Zitvogel, L., J. I. Mayordomo, T. Tjandrawan, A. B. DeLeo, M. R. Clarke, M. T. Lotze and W. J. Storkus (1996). Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 183(1): 87-97.

## 9 Lebenslauf

- 30.10.1975      Angelika Schlamp, geboren in Landshut als Tochter von Anna und Franz Xaver Schlamp
- 1982-1986      Besuch der Konradin-Grundschule in Landshut-Auloh
- 1986-1995      Besuch des Zisterzienserinnen-Gymnasiums Seligenthal in Landshut
- 1995            Hochschulreife, Note: 1,1
- 1996            Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, unterstützt durch ein Stipendium der Bayerischen Begabtenförderung
- März 1998      Ärztliche Vorprüfung, Note: 1,3
- März 1999      Erster Teil der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0
- Juli 1999        Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- März 2001      Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,3
- 2001-2002      Praktisches Jahr  
1. Tertial - Innere Medizin:  
Brigham and Womens Hospital und Mount Auburn Hospital,  
Harvard Medical School, Boston, USA  
2. Tertial - Chirurgie:  
Brigham and Womens Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA  
Krankenhaus München-Harlaching, LMU München  
3. Tertial - Anästhesie:  
Royal Melbourne Hospital, University of Melbourne, Australien  
Klinikum Großhadern, LMU München
- April 2002      Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0  
Gesamtnote 1,16
- September 2002 - Februar 2004      Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Poliklinik Innenstadt, Klinikum der LMU München  
(Direktor: Prof. Dr. D. Schlöndorff)
- seit Mai 2004      Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik Innenstadt, Abteilung für Endokrinologie, Klinikum der LMU München  
(Direktor: Prof. Dr. M. Reincke)
- Oktober 2003      Veröffentlichung des Buches "Anamnese und Körperliche Untersuchung" (J. Seiderer, A. Schlamp)

## 10 Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

- 2000 Brunner C., J. Seiderer, **A. Schlamp**, M. Bidlingmaier, A. Eigler, W. Haimerl, H.A. Lehr, A. Krieg, G. Hartmann and S. Endres (2000). Enhanced dendritic cell maturation by tumor necrosis factor- $\alpha$  or CpG DNA drives T cell-activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 165(11): 6278-86.
- 2002 Heckelsmiller K., S. Beck, K. Rall, B. Sipos, **A. Schlamp**, E. Tuma, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann (2002). Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 32(11): 3235-45.
- 2002 Heckelsmiller K., K. Rall, S. Beck, **A. Schlamp**, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann (2002). Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 169(7): 3892-9.

### Vorträge

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen in einem Vortrag vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

- 1999 6<sup>th</sup> International Workshop on Langerhans Cells, New York, USA:  
Brunner C., J. Seiderer, M. Bidlingmaier, **A. Schlamp**, K. Akgöbek, A. Eigler, A. Krieg, G. Hartmann and S. Endres. Dendritic cell maturation enhances T-cell-activating potential in vitro and protection against experimental murine colon carcinoma in vivo.
- 1999 Research Festival, Munich, Germany:  
**A. Schlamp**, J. Seiderer, K. Heckelsmiller, K. Rall, S. Endres and G. Hartmann. Dendritic cells pulsed with irradiated colon carcinoma cells and activated with CpG oligonucleotides induce an effective, tumor-specific and long-lasting immune response.
- 2000 Joint Annual Meeting of Immunology, Düsseldorf, Germany:  
**A. Schlamp**, J. Seiderer, K. Heckelsmiller, K. Rall, S. Endres and G. Hartmann. Dendritic cells pulsed with irradiated colon carcinoma cells and activated with CpG oligonucleotides induce an effective, tumor-specific and long-lasting immune response.

Poster

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen als Poster vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

- 1999 Research Festival, Munich, Germany:  
Seiderer J., C. Brunner, M. Bidlingmaier, **A. Schlamp**, K. Akgöbek, A. Eigler, H.A. Lehr, G. Hartmann and S. Endres. Dendritic cell maturation enhances T-cell-activating potential in vitro and protection against experimental murine colon carcinoma in vivo.
- 1999 Congress on Biological Therapy of Cancer, Munich, Germany:  
Brunner C., **A. Schlamp**, J. Seiderer, M. Bidlingmaier, K. Akgöbek, A. Eigler, G. Hartmann and S. Endres. TNF- $\alpha$  and CpG-oligodeoxynucleotide-enhanced dendritic cell maturation and protection against experimental murine colon carcinoma. *Eur J Cancer* 35 Suppl 5:30.
- 2000 Complexity in Medicine, Cologne, Germany:  
**Schlamp A.**, J. Seiderer, K. Heckelsmiller, K. Rall, S. Endres and G. Hartmann. Dendritic cells pulsed with irradiated colon carcinoma cells and activated with CpG oligonucleotides induce an effective, tumor-specific and long-lasting immune response. *J Mol Med* 78(7): B35-57.
- 2003 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Nürnberg, Germany:  
Schneider P., S. Beck, K. Heckelsmiller, K. Rall, B. Sipos, **A. Schlamp**, S. Rothenfusser, G. Hartmann, S. Endres. Kombination von antigenbeladenen dendritischen Zellen, CpG-Oligonukleotiden und Chemotherapie zur Behandlung von Tumoren im murinen Kolonkarzinom-Modell. *Z Gastroenterol* 41: 733-880.