Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Immuntherapie von autochthonen gastrointestinalen Tumoren mit dendritischen Zellen und CpG-Oligonukleotiden

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Philip von der Borch

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. S. Endres
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. F. Kolligs
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Hans-Joachim Stemmler
	PD Dr. med. Udo Kummer
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Dr. rer. nat. C. Bourquin
	Dr. rer. nat. M. Schneider
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	17. Dezember 2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Überblick 1

1.2. Grundzüge des Immunsystems 1

1.2.1. Angeborenes Immunsystem: natürliche Killerzellen 2

1.2.2. Adaptives Immunsystem: T-Zellen 2

1.3. Dendritische Zellen 3

1.4. Immuntoleranz 5

1.5. *Toll-like*-Rezeptoren und CpG-Oligonukleotide 7

1.6. Migration von Immunzellen 7

1.7. Experimentelle Ansätze in der Tumorimmunologie 8

1.7.1. Tumorimmunologie in der Klinik 8

1.7.2. Tumorimmunologie am Mausmodell 9

1.7.2.1. CEA424-TAg transgene Mäuse: orthotopes, stufenweise entstehendes Magenkarzinom 10

1.7.2.2. Subkutan injizierte Tumoren 10

1.7.2.3. Immunmilieu („Microenvironment“) 11

1.8. Fragestellung und Zielsetzung 13

2. Material und Methoden 14

2.1. Material 14

2.1.1. Geräte 14

2.1.2. Chemikalien 14

2.1.3. Reagenziensätze 15

2.1.4. Materialien für die Zellkultur 15

2.1.5. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzien 16

2.1.6. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen 16

2.1.7. Zelllinien 17

2.1.8. Nanopartikel 17

2.2. Methoden 17

2.2.1. Zellkultur 17

2.2.1.1. Kulturbedingungen 17
2.2.1.2. Zellmanipulation 18
2.2.1.3. Zellzählung 18
2.2.1.4. Kultur der mGC-Zelllinien 18
2.2.1.5. Herstellung von dendritischen Zellen 18
2.2.2. Bestrahlung von Tumorzellen 19
2.2.3. Dendritische Zellvakzine 19
2.2.4. *Magnetic-activated cell sorting* (MACS) 20
2.2.5. Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) 20
2.2.5.1. Oberflächenmarker 20
2.2.5.2. Proliferationsassay 21
2.2.6. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) 21
2.2.7. Mäuse 22
2.2.7.1. Behördliche Genehmigung 22
2.2.7.2. Injektionen 22
2.2.7.3. Tumormessungen 23
2.2.7.4. Wiegen 23
2.2.7.5. Narkose 23
2.2.7.6. Organentnahme 24
2.2.8. Histologie 26
2.2.9. Statistische Analyse 26
3. Ergebnisse 28
3.1. Immuntherapie: vom subkutanen Modell zum autochthonen Tumor 28
3.1.1. Etablierung einer wirksamen Immuntherapie subkutaner mGC3-Tumoren 28
3.1.1.1. CpG-A 28
3.1.1.2. Prophylaktischer Ansatz 29
3.1.1.3. Therapeutischer Ansatz 35
3.1.2. Therapie der CEA424-TAg-Mäuse 38
3.1.2.1. Immunkompetenz von Mäusen mit dem CEA424-TAg-Tumor 38
3.1.2.2. Adoptiver Transfer 39

3.2. Wirkung von *Toll-like*-Rezeptor-Liganden auf Immunzellen aus dem Gastrointestinaltrakt 45
3.2.1. *In vitro*-Versuche 45
3.2.1.1. Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten reagieren auf Stimulation wie jene aus Milz oder peripheren Lymphknoten 45
3.2.1.2. Charakterisierung der Effektorzellen aus Peyer'schen Plaques 48
3.3. Gelatine-Nanopartikel als Träger für CpG-Oligonukleotide 53
3.3.1. Aufnahme in dendritische Zellen 53
3.3.2. Zytokinproduktion durch dendritische Zellen 55
4. Diskussion 58
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse 58
4.1.1. Dendritische Zellen und CpG-B gegen subkutane und orthotope TAg-Tumoren 58
4.1.2. Untersuchung von Immunzellen im Gastrointestinaltrakt 59
4.1.3. Verwendung von Gelatine-Nanopartikeln als Vektor für die Applikation therapeutischer Oligonukleotide 59
4.2. Vorteile des transgenen Mausmodells 59
4.2.1. Die Suche nach dem optimalen Versuchsmodell 59
4.2.2. Mausmodelle von spontanen Tumoren 61
4.3. *Tumor immune escape* 62
4.3.1. „Tarnen, verstecken und inaktivieren" 62
4.3.2. Die Rolle der Immuntoleranz im transgenen Modell 64
4.3.3. Weg aus der Toleranz 66
4.4. Migration von Immunzellen in gastrointestinale Karzinome 66
4.4.1. *Tissue targeting* als Chance für die Tumorimmunologie 66
4.4.2. Dendritische Zellen aus darmassoziiertem lymphatischem Gewebe 67
4.4.3. Nanopartikel als Vehikel zur Applikation von CpG-Oligonukleotiden 67
4.5. Ausblick 68
4.5.1. Dendritische Zellen 68
4.5.2. Effektorzellen 69
4.5.3. *Tissue targeting* 69

4.5.4. Multimodaler Ansatz 70

5. Zusammenfassung 72

6. Literaturverzeichnis 74

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme 88

8. Danksagung 90

9. Veröffentlichungen 91

10. Lebenslauf 93

1. Einleitung

1.1. Überblick

Im Laufe von Jahrmillionen hat sich in den komplexen Mehrzellern eine Maschinerie von spezialisierten Abwehrzellen entwickelt, die hochspezifisch und beeindruckend effizient eine Vielzahl von exogenen Gefahren beseitigen kann: das Immunsystem.

Inzwischen haben wir gelernt, dass dieses Immunsystem nicht nur gegen Eindringlinge von außen effektiv ist. Eine zerstörerische Immunantwort gegen körpereigene Zellen oder andere Gewebebestandteile ist einerseits die Ursache für sogenannte Autoimmunkrankheiten. Andererseits vernichtet das Immunsystem aber auch entartete Zellen, die täglich in unserem Körper entstehen und verhindert so, dass aus ihnen lebensbedrohliche Tumoren hervorgehen. Dies wird zum Beispiel durch die Tatsache evident, dass immundefiziente Mäuse (Dighe et al., 1994) oder Menschen unter Immunsuppression (Euvrard et al., 2003) vermehrt Malignome entwickeln. Einen klaren Beweis für die Immunreaktion auf Malignome liefern auch sogenannte paraneoplastische Syndrome. Die Immunantwort kann hierbei zum Beispiel durch von Tumorzellen überexprimierte körpereigene Proteine provoziert werden, die sonst ausschließlich in Nervenzellen vorkommen. In manchen Fällen von Ovarial- oder Brustkrebs entstehen so im Zuge der induzierten Immunantwort paraneoplastische neuronale Schädigungen (Albert et al., 1998a).

In einigen experimentellen Ansätzen zeigte sich die effektive und spezifische Immunreaktion in der Krebstherapie einer konventionellen Chemotherapie besonders in Verträglichkeit und Rezidivfreiheit, bisweilen aber auch in der Effektivität überlegen.

1.2. Grundzüge des Immunsystems

Unser Immunsystem ist die Summe und das Zusammenspiel verschiedener Populationen von hochspezialisierten Zellen. Grob unterteilt man es in den phylogenetisch älteren, unspezifischen, „angeborenen“ und den später hinzugekommenen, spezifischen, „adaptiven“ Teil. Beide sind eng miteinander verwoben.

Neben diesen spezialisierten Zellen kooperieren auch alle kernhaltigen Zellen des Körpers mit dem Immunsystem – indem sie sich beispielsweise durch Merkmale auf ihrer Oberfläche als „körpereigen“ und unschädlich identifizieren. Hierbei spielen die Moleküle *major*

histocompatibility complex (MHC), eine entscheidende Rolle. Auf MHC Typ-I (MHC-I) werden zu kleineren Peptiden verdaute, ehemals intrazellulär lokalisierte Proteine nach außen hin „präsentiert“ – so werden Peptidfragmente innerhalb aller Zellen dem Immunsystem zugänglich.

Im Folgenden sollen nur die für vorliegende Arbeit besonders wichtigen Grundlagen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zusammengefasst werden.

1.2.1. Angeborenes Immunsystem: natürliche Killerzellen

Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Diese sind in der Lage, schon beim ersten Kontakt körpereigene und körperfremde Stoffe zu phagozytieren oder auch – im Falle der natürlichen Killerzellen – andere Zellen zu lysieren, gesteuert durch komplexe Interaktion von stimulierenden und hemmenden Faktoren. Verliert beispielsweise eine Zelle an ihrer Oberfläche die Expression von MHC-I-Molekülen, so ist dies ein Zeichen für einen abnormalen oder krankhaften Vorgang in der Zelle und wirkt stimulierend auf natürliche Killerzellen, die mit dieser Zelle in Kontakt kommen (Lanier, 2008). Solche Zellen werden also vom Immunsystem in der Regel erkannt und direkt eliminiert.

1.2.2. Adaptives Immunsystem: T-Zellen

Die Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind hochspezifisch und sehr effektiv – sie bedürfen aber der Aktivierung. Die prominentesten Vertreter dieses Teils unserer Immunabwehr sind die T- und B-Lymphozyten. Während die Kernaufgabe letzterer vor allem in der humoralen Immunantwort (Antikörperproduktion) zu sehen ist, übernehmen T-Zellen, besonders $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, die gegen Zellen gerichtete Immunität. Daher gilt letzteren ein besonderes Interesse in der Tumorimmunologie.

Zur Vorstellung der Mechanismen der Aktivierung dieser T-Zellen auf einen Antigen-Reiz hin verwenden Schwartz et al. (Schwartz et al., 2003) ein vereinfachtes, aber sehr anschauliches Modell mit drei „Signalen“, die einer T-Zelle von außen übermittelt werden können. Signal 1 – die „Spezifität“ – wird immer dann ausgelöst, wenn eine T-Zelle das für ihren T-Zell-Rezeptor spezifische Epitop auf einem MHC präsentiert vorfindet. Dieses Signal alleine führt zur Induktion von Toleranz (siehe 1.4). Signal 2 – sogenannte Co-Stimulation – ist tatsächlich am ehesten eine feine Balance von stimulatorischen und inhibitorischen Signalen, die auf die T-Zelle einwirken. Ein stimulatorisches Signal stellt zum Beispiel oft die

Aktivierung des Oberflächenmarkers CD28 auf T-Zellen durch CD80 und/oder CD86 auf der aktivierenden Zelle dar. Empfängt eine T-Zelle neben dem adäquaten Signal 1 ein stimulatorisches Signal 2, so führt dies zu klonaler Vermehrung dieser Zelle, verbunden mit der Differenzierung zu Effektorzellen und „Gedächtnis"-Vorläuferzellen.

Neben Spezifität (Signal 1) und Immunogenität (Signal 2) wurde in den letzten Jahren noch eine dritte Art gefunden, auf die das Schicksal der T-Zellen und damit die Art der Immunantwort beeinflusst werden kann: Das sogenannte Signal 3 bestimmt die Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen in T_H1 oder T_H2-Subtypen (Kapsenberg, 2003) – oder auch in regulatorische T-Zellen (Mahnke et al., 2005) sowie die neu entdeckten Interleukin (IL)-17 produzierenden T-Zellen (Veldhoen et al., 2006). Ein „Signal 3", das die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen bewirkt, geben zum Beispiel die Zytokine IL-10 (Steinbrink et al., 1997) und TGF-β (Sato et al., 2003) (siehe 1.4). T_H2-Zellen werden induziert durch die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und IL-25 und bewirken wiederum selbst eine humorale Immunantwort durch Stimulierung von B-Zellen zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern und durch die Hemmung einer T_H1-Antwort.

T_H1-Zellen werden durch Zytokine wie Interferon (IFN)-γ (Vieira et al., 2000), IFN-α/β (Luft et al., 2002), IL-12p70, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-β oder IL-18 (Lebre et al., 2003) induziert. Diese Zytokine können also als „Signal 3" in Richtung einer zellulären Immunantwort gesehen werden, denn T_H1-Zellen aktivieren wiederum durch Zytokine wie IFN-γ und IL-2 andere T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen; die Produktion von MHC-Molekülen und die Peptidprozessierung wird gesteigert. B-Zellen werden zum Klassenwechsel zur Produktion von opsonisierenden Antikörpern angeregt und die Entwicklung einer T_H2-Antwort wird inhibiert. Die aber wohl für uns wichtigste Auswirkung eines T_H1-gerichteten dritten Signals ist die „Lizensierung" durch T-Helferzellen zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten, die für das auf der stimulierenden Antigen-präsentierenden Zelle kreuzpräsentierte Antigen spezifisch sind. Mit diesen hocheffektiven „Killerzellen" steht und fällt der Erfolg von vielen Ansätzen der spezifischen Tumorimmunologie.

1.3. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen Wächter, Vor- und Außenposten des adaptiven Immunsystems, sie sind mehr als jede andere Zelle in der Lage, gerichtete Immunantworten zu initiieren (Delemarre et al., 1990; Delemarre et al., 1990b; Jung et al., 2002). Dendritische Zellen entstehen aus zirkulierenden Vorläuferzellen aus dem

Knochenmark. Am Ende ihrer Differenzierung verlassen sie die Blutbahn und migrieren im naiven, unreifen Zustand in die Gewebe des Körpers, zum Beispiel der Haut und der Schleimhäute (Trombetta et al., 2005). Je nach ihrem Zustand sind dendritische Zellen in der Lage, T-Zellen Signal 1, 2 und 3 zu geben; damit sind sie sozusagen „Herren über die Armee der T-Zellen“. Denn ihre Fähigkeit, auf Stimuli in ihrer Umgebung zu reagieren, beeinflusst in großem Maße das Schicksal der für den gleichen Stimulus spezifischen T-Zellen (Reis e Sousa, 2006).

Signal 1, die Antigen-Spezifität, vermitteln dendritische Zellen durch die Präsentation von Antigenen auf ihren MHC-I-Molekülen. Zellen beladen ihre MHC-I-Moleküle normalerweise nur mit zu Peptiden verdauten Proteinen aus ihrem eigenen Zytoplasma. Die dendritischen Zellen eigene Fähigkeit, aus ihrer Umgebung Antigene aufzunehmen, diese zu prozessieren und auf ihren eigenen MHC-I-Molekülen zu präsentieren ist einzigartig, und wird „Kreuzpräsentation“ genannt (Albert et al., 1998b; Sigal et al., 1999).

Im Ruhezustand geben unreife dendritische Zellen kein stimulierendes Signal 2. So werden T-Zellen, die für das präsentierte Antigen spezifisch sind (also Signal 1 erhalten), entweder deletiert, anerg oder zu regulatorischen Zellen umfunktioniert (siehe 1.4) (Steinman et al., 2002; Steinman et al., 2003). Durch verschiedene „Gefahrensignale“ werden dendritische Zellen aktiviert und damit zur Co-Stimulation und einem immunogenen Signal 2 angeregt. Diese Aktivierung kann durch unterschiedlichste Stimuli erfolgen – durch mikrobielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide oder CpG-Oligonukleotidsequenzen (siehe 1.5), durch C-Typ Lektine, durch intrazytoplasmatische NOD-ähnliche Rezeptoren, durch andere Zellen wie T-, NK-, NKT- und γδ-T-Zellen (Münz et al., 2005), durch Zellprodukte wie CD40-Ligand, durch Zytokine wie IL-1β, TNF, IL-6 und Prostaglandin (PG) E2 und durch Produkte sterbender Zellen (Gallucci et al., 1999). Nach Aktivierung durch einen dieser Stoffe beginnt die dendritische Zelle nach neueren Erkenntnissen eine verstärkte Aufnahme und Prozessierung von umgebenden Antigenen für einige Stunden (Delamarre et al., 2003; Gil-Torregrosa et al., 2004; Inaba et al., 2000; Kaliński et al., 1999; Reis e Sousa, 2006; Trombetta et al., 2003; West et al., 2004), bevor daraufhin die Antigenaufnahme dauerhaft beendet wird und die nunmehr aktivierte Zelle ihre Migration in die drainierenden Lymphknoten beginnt.

Hier erfüllt die dendritische Zelle nun ihre Bestimmung, auf die sie optimal vorbereitet ist: Sie setzt sich in von naiven T-Zellen stark frequentierte Bereiche des sekundären lymphatischen Organs (z. B. des Lymphknoten). Dort präsentiert sie auf ihren vielen dendritischen Zellausläufern (Steinman et al., 1988) mit zahlreichen MHC-Komplexen (Lemos et al., 2003;

Lemos et al., 2004) die internalisierten Antigene zusammen mit ebenfalls hochregulierter Co-Stimulation durch CD86 (Dilioglou et al., 2003). Eine Vielzahl naiver T-Zellen hat hier also die Gelegenheit, mit ihrem T-Zell Rezeptor die von der dendritischen Zelle präsentierten Antigene effizient „abzutasten“. Falls sie hier ihr spezifisches Antigen finden (Signal 1), werden sie durch die Co-Stimulation (Signal 2) der dendritischen Zelle aktiviert und bilden ihre Helfer- oder Effektorfunktionen aus.

So wird verständlich, dass Tumorimmunologen dendritischen Zellen nach ihrer Entdeckung ganz besondere Aufmerksamkeit widmeten. Dendritische Zellen können zellexterne Antigene (also auch Tumorantigene) kreuzpräsentieren und nach Stimulation (siehe 1.5) kann von dendritischen Zellen eine für diese Antigene spezifische zelluläre Immunantwort effektiv eingeleitet werden.

1.4. Immuntoleranz

Wie in vielen anderen biologischen Systemen bedarf eine so gewaltige und potentiell zerstörerische Kraft wie das Immunsystem der Zügelung, damit möglichst keine körpereigenen und lebensnotwendigen Zellen oder Gewebe angegriffen werden. Dieses Phänomen nennen wir Immuntoleranz.

Klassischerweise werden zwei Arten immunologischer Toleranz unterschieden – die zentrale und die periphere. Zentrale Toleranz entsteht in der sogenannten „Thymusschule“. Im Thymus werden hier in der Kindheit sämtliche entstehenden T-Zellen zwei Selektionszyklen unterworfen. Da die Thymozyten als Vorläufer der T-Lymphozyten durch genetische Rekombination sehr unterschiedliche T-Zell-Rezeptoren ausbilden, werden in einem ersten Schritt diejenigen Zellen positiv selektioniert, die erfolgreich an MHC-Komplexe anderer Körperzellen binden können. Die Möglichkeit dieses Andockens ist erste grundlegende Voraussetzung für die Funktion der Zelle. Der zweite wichtige Schritt in der „Schulung“ der T-Lymphozyten besteht darin, dass all die Thymozyten mit einem T-Zell-Rezeptor, der mit auf MHC-Molekülen geladenen körpereigenen Peptidsequenzen reagiert, unschädlich gemacht werden. In den meisten Fällen resultiert daraus eines von drei Schicksalen für die T-Zelle: dass sie in die Apoptose geht (Palmer, 2003), seltener wird sie anerg (Hämmerling et al., 1991) oder ändert ihren Rezeptor ab (McGargill et al., 2000; Wang et al., 1998).

Neben dieser eher passiven Formen der Immuntoleranz begann erst in den letzten Jahren die intensive Erforschung von aktiven professionellen immunmodulierenden Zellen: den regulatorischen T-Zellen. Die mannigfaltigen Subtypen dieser regulatorischen Zellen sind

das Thema vieler aktueller Forschungsbemühungen, zu ihnen zählen $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Zellen, IL-10-produzierende Tr1-Zellen, TGF-β-produzierende Typ3-Helferzellen, $CD8^+$-Suppressor Zellen, natürliche Killer-T-Zellen, $CD4^-CD8^-$ T-Zellen und γδ-T-Zellen. Der wohl wichtigste Vertreter der regulatorischen T-Zellen, die $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zelle, hat die Wichtigkeit ihrer Rolle im Immunsystem durch Versuche in Mäusen mit Mangel an IL-2, CD25 und Foxp3 bewiesen (Fontenot et al., 2005). Foxp3-Knockout-Mäuse entwickelten multiple, schwere Autoimmunphänomene in der Abwesenheit regulatorischer T-Zellen (Kim et al., 2007) und auch in Menschen führen Mutationen in Foxp3 zu einem Syndrom systemischer Autoimmunität (IPEX) (Gambineri et al., 2003). So werden in der Thymusschule Autoimmunkrankheiten größtenteils verhindert, da die meisten autoreaktiven T-Zellen schon im Thymus negativ selektioniert werden und der Großteil der übrigen zu regulatorischen T-Zellen wird. Dieser Vorgang wird zentrale Toleranz genannt und bewirkt die weitestgehende Abwesenheit autoreaktiver T-Zellen.

Im Thymus wird unter der Regie des *Autoimmune Regulator*-Gens auch die Transkription vieler thymusfremder organspezifischer Gene veranlasst (Anderson et al., 2002; Liston et al., 2003). So kommen die Thymozyten auch mit recht speziellen, nur in bestimmten Zellen produzierten Proteinen – wie zum Beispiel Insulin, Thyreoglobulin oder auch Teilen von Myelin – in Kontakt und das Immunsystem lernt, diese zu tolerieren. Das erhöht die Effektivität zentraler Toleranz erheblich. Dennoch sind weitere Formen von Toleranz nötig, um die Häufigkeit von Autoimmunreaktionen klein zu halten – diese fassen wir unter dem Begriff „periphere Toleranz“ zusammen.

Zur peripheren Toleranz gehört auch, wenn dendritische Zellen ohne adäquaten Reifestimulus tolerogen wirken (Finkelman et al., 1996). Dies geschieht, wenn sie (zumeist körpereigene) Proteine (Signal 1) ohne Co-Stimulation (Signal 2) präsentieren. T-Zellen, deren T-Zell Rezeptor für diese Peptide spezifisch ist, beginnen sich zwar zu teilen, werden dann aber deletiert (Steinman et al., 2003). Die Verabreichung reifer dendritischer Zellen vermittelt Immunität – zum Beispiel bei Influenza (Dhodapkar et al., 1999). Es wurde jedoch überzeugend demonstriert, dass mit dem gleichen Influenza-Matrixprotein beladene – unreife – dendrische Zellen hingegen antigen-spezifisch die Effektorfunktion von $CD8^+$-Zellen inhibieren und IL-10-produzierende Zellen induzieren können (darunter auch sogenannte adaptive regulatorische T-Zellen (Barrat et al., 2002)). Daraufhin fanden sich zwar mehr Matrixprotein-spezifische T-Zellen im Blut der Probanden, nach der Injektion unreifer dendritischer Zellen zeigten diese jedoch geringere IFN-γ-Produktion und deutlich gehemmte zytotoxische Effektivität (Dhodapkar et al., 2001). Dieser Versuch zeigt, dass Toleranz auch in der Peripherie erzeugt werden kann. Umgekehrt zeigt er auch, wie wichtig ein

Reifestimulus ist, damit dendritische Zellen ihre immunogene Wirkung – zum Beispiel auch in der Tumorimmunologie – entfalten.

1.5. *Toll-like*-Rezeptoren und CpG-Oligonukleotide

So genannte CpG-Oligonukleotide zählen zu den Faktoren, die eine Reifung von dendritischen Zellen induzieren können. In murinen dendritischen Zellen ist ein *Toll-like*-Rezeptor vorhanden, welcher diese unmethylierten DNA-Sequenzen als *pathogen-associated molecular pattern* erkennt und zur Maturierung der dendritischen Zelle führt. Die Bezeichnung verdanken CpG-Oligonukleotidsequenzen der Tatsache, dass unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotide in ihr vorkommen. Diese sind in Vertebraten-DNA wesentlich seltener als in bakterieller. CpG hat seine immunstimulatorische Effektivität als Adjuvans sowohl in antiinfektiösen wie antitumoralen Impfungen vielfach unter Beweis gestellt (Higgins et al., 2007).

Eine Eigenart der Wirkungen von CpG-Oligonukleotidsequenzen hatte dabei besonderen Einfluss auf die vorliegende Arbeit. Ballas et al. haben gezeigt, dass verschiedenartige CpG-Oligonukleotide eine jeweils unterschiedliche Aktivierung des murinen Immunsystems bewirken können (Ballas et al., 2001). Eine solche Klasse von CpG-Motiven, die später als „CpG-B“ bezeichnet wurde, bewirkte vornehmlich B-Zell-Aktivierung und ein auf eine T_H1-Antwort ausgerichtetes Zytokinprofil. Bisherige Tumorexperimente in unserer Abteilung hatten diese Gruppe von CpG-Oligonukleotiden verwendet, hier speziell die Sequenz 1826. Die andere Gruppe von CpG-Sequenzen, später „CpG-A“, bewirkte in Mäusen eine starke Aktivierung von NK-Zellen und die vermehrte Bildung und Sekretion von IFN-γ in murinen Splenozyten. Die von Ballas et al. verwendete CpG-Sequenz 1585 war effektiv gegen B16-Melanomzellen, die keine MHC-Expression aufwiesen, dieser Effekt war B- und T-zellunabhängig und das CpG-B-Motiv 1826 war in diesem Setting weniger effektiv. In der Tumorimmunologie spielt es also eine wichtige Rolle, die richtige Art von CpG zu verwenden – in Abhängigkeit von der Art des Tumors kann diese Wahl das Ansprechen auf die Therapie wesentlich beeinflussen.

1.6. Migration von Immunzellen

Die Vorstellung von einer ubiquitären Immunantwort auf ein Antigen weicht in den letzten Jahren der eines kompartimentalisierteren Modells. Mit anderen Worten bedeutet dies, dass eine Immunisierung in verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedliche und vor allem

gewebespezifische Immunreaktionen auf das gleiche Antigen hervorrufen kann. So zeigten zum Beispiel Mullins et al., dass sowohl eine subkutane als auch intravenöse Immunisierung mit peptid-beladenen dendritischen Zellen die Ausbildung von Tumormetastasen in der Lunge verhindern kann. Gegen subkutane Metastasen des gleichen Tumors ist aber nur der subkutane und nicht der intravenöse Applikationsweg der Vakzine effektiv. Durch Entnahme von peripheren Lymphknoten bzw. Milz konnte gezeigt werden, dass diese Organe jeweils notwendig für die subkutane bzw. intrapulmonale Immunreaktion waren (Mullins et al., 2003).

In dieser Arbeit beschäftigen wir uns mit Neoplasien des Gastrointestinaltrakts, die ableitenden Lymphwege führen in diesem Fall in der Regel zu den mesenterialen Lymphknoten, einem Teil des sogenannten *gut-associated lymphatic tissue*. Dieses sekundäre lymphatische Organ ist neben den Peyer'schen Plaques Anlaufstelle für aktivierte dendritische Zellen aus dem Gastrointestinaltrakt, welche hier lymphatische Effektorzellen aktivieren können. Es wurde gezeigt, dass dendritische Zellen aus dem Gastrointestinaltrakt T- und B-Zellen so beeinflussen können, dass diese wiederum das $\alpha 4\beta 7$-Integrin exprimieren (Stagg et al., 2002). $\alpha 4\beta 7$, auch *Lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule* (LPAM) genannt, ist ein Integrin, das an *mucosal addressin cell adhesion molecule* 1 binden kann. Letzteres ist vorwiegend auf intestinaler Mucosa zu finden. Mit anderen Worten können dendritische Zellen, die mit Antigen beladen aus dem Gastrointestinaltrakt in die mesenterischen Lymphknoten migriert sind, Lymphozyten durch LPAM einen Phänotyp geben, der diese wieder zurück in den Gastrointestinaltrakt lenkt (sogenanntes *tissue targeting*). Dies erscheint im Rahmen einer Infektion des Darms sinnvoll und effizient – im Rahmen der Immuntherapie von gastrointestinalen Tumoren vielversprechend: tumorspezifische zytotoxische T-Zellen könnten zum Beispiel durch Aktivierung mit dendritischen Zellen aus dem Gastrointestinaltrakt spezifisch in den Darm geleitet werden und eine gewebespezifische Immunität bewirken.

1.7. Experimentelle Ansätze in der Tumorimmunologie

1.7.1. Tumorimmunologie in der Klinik

Ein Chirurg namens Coley injizierte Ende des 19. Jahrhunderts Patienten mit inoperablen Sarkomen eine nicht gut definierte Mischung von Bakterienextrakten, „*Coley's Toxins*" genannt. Zwar erzielte er damit immerhin eine 10-prozentige Heilungsquote (Coley, 1991), seine Ergebnisse waren dennoch entweder heftig umstritten, oder noch schlimmer, kaum beachtet, weil es lange keinen Ansatz zur Erklärung seiner Erfolge gab (Wiemann et al., 1994). Inzwischen wissen wir, dass diese „Toxine" viele immunmodulatorische Komponenten

hatten, darunter Endotoxine, bakterielle Zellwandbestandteile und DNA. Viele betrachten inzwischen Coleys „Vakzinierungen“ als Beginn der Immuntherapie von Malignomen.

Danach hat sich unser Verstädnis des Immunsystems zunächst schleppend, in den letzten Jahrzehnten jedoch rasant weiterentwickelt. Die erste Anwendung spezifischer Immuntherapie mit Hilfe autologer Tumorantigen-gepulster dendritischer Zellen am Menschen fand 1996 statt, als Hsu et al. vier Patienten mit non-Hodgkin-Lymphom behandelten (Hsu et al., 1996). Drei davon sprachen auf die Behandlung an, davon eine komplette Langzeit-Remission. Statt der hierbei verwendeten frisch durch Percoll-Gradienten gewonnenen dendritischen Zellen benutzten Nestle et al. vor zehn Jahren in einer Pilotstudie erstmals am Menschen in vitro unter GM-CSF und IL-4 expandierte Antigen-gepulste dendritische Zellen zur Therapie fortgeschrittener Melanome. Trotz ihrer eigentlich infausten Prognose zeigten 5 der 16 Patienten ein Ansprechen auf die Therapie, mit zwei kompletten und drei partiellen Remissionen des aggressiven Tumors (Nestle et al., 1998).

Schadendorf et al. verglichen in einer randomisierten Phase III-Studie an über 100 Patienten autologe Peptid-gepulste dendritische Zell-Therapie mit der Standard-Chemotherapie bei metastasiertem Melanom (Schadendorf et al., 2006). Dabei erwies sich die Immuntherapie der Chemotherapie nicht als überlegen – aber als ebenbürtig. In einer Subgruppenanalyse zeigte sich daraufhin ein signifikanter ($p = 0,01$) Überlebensvorteil von Patienten mit dem Haplotyp HLA-A2+B44-, solange sie Immuntherapie erhielten. Im Chemotherapie-Arm spielte der HLA-Haplotyp keine Rolle ($p = 0,57$). Das ist ein weiteres Indiz, dass es noch viele Entdeckungen in der Immuntherapie zu machen gibt, die wichtige therapeutische Konsequenzen haben werden.

Das Interesse und die Zahl wissenschaftlicher Arbeiten auf dem Gebiet der Tumorimmunologie haben sich in den letzten Jahrzehnten vervielfacht, alle mit dem gemeinsamen Ziel der effektiven Bekämpfung einer der häufigsten Todesursachen weltweit. Auf dem Weg dorthin haben vor allem Tiermodelle entscheidende Beiträge geleistet.

1.7.2. Tumorimmunologie am Mausmodell

Nach der Erkenntnis, dass das Immunssytem im Tiermodell Tumoren bekämpfen kann (Foley, 1953), begann intensive Forschung auf diesem Gebiet. Es fanden sich Tumorzelllinien – wie das C26-Kolonkarzinom oder das B16-Melanom – die vermehrt für tumorimmunologische Forschung verwendet wurden. An beiden wurden von vielzähligen Arbeitsgruppen in den letzten Jahrzehnten sehr unterschiedliche immunologische

Therapieansätze erforscht. Darunter waren virale, DNA-, dendritische Zell-, Tumorzell- und Peptidvakzine sowie der adoptive Transfer sensibilisierter Immunozyten (Kochenderfer et al., 2007).

1.7.2.1. CEA424-TAg transgene Mäuse: orthotopes, stufenweise entstehendes Magenkarzinom

Nicht nur die Therapieansätze, auch die Tiermodelle, an denen wir sie erproben, werden ständig fortentwickelt, um durch immer realitätsnähere Modelle immer direkter übertragbare Ergebnisse in unserer Forschung zu erhalten. In unseren Versuchen verwenden wir eine Mauslinie, die durch ein Onkogen in ihrem Erbgut zuverlässig Magenkarzinome entwickelt. Um dies zu erreichen, wurde der DNA-Vektor für *SV40 large T-antigen* (TAg) hinter einen 424 Basenpaare langen Promotor des Karzinoembryonalen Antigens (CEA) geschaltet. Mäuse mit C57Bl/6-Hintergrund wurden mit diesem Vektor transfiziert. CEA wird spezifisch im Gastrointestinaltrakt exprimiert, was in diesem Fall zur Transkription des T-Antigen, einem Onkogen, führt und diese als CEA424-TAg Mäuse bezeichneten Tiere entwickeln unter dem Einfluss des TAg-Onkogens regelhaft ab Tag 37 zu Magenkarzinomen fortschreitende Dysplasien im Pylorusbereich (Thompson et al., 2000). Diese Karzinome entstehen stufenweise von normaler Schleimhaut über prämaligne Dysplasien bis hin zum invasiven Karzinom und stellen daher ein sehr realitätsnahes Modell für die Entwicklung von Magenmalignomen im Menschen dar. Einige Zelllinien (z. B. mGC3 und mGC8) wurden von diesen CEA424-TAg Magenkarzinomen abgeleitet. Diese erlauben eine schrittweise Optimierung immuntherapeutischer Strategien, die schließlich am orthotop wachsenden Tumor erprobt werden können.

1.7.2.2. Subkutan injizierte Tumoren

Aus Zelllinien abgeleitete, maligne subkutan injizierte Tumoren haben für die Forschung viele Vorteile. Sie sind leicht verfügbar, können gezielt und zugänglich platziert und damit in ihrer Größe direkt gemessen werden. Effekte der eingesetzten Therapien sind direkt sichtbar, was einer schnellen und effizienten Entwicklung von wirksamen Strategien führt.

Da unsere Abteilung sich mit der Therapie von Malignomen des Gastrointestinaltrakts beschäftigt, wurde zum Beispiel das C26-Kolonkarzinommodell verwendet. Heckelsmiller et al. demonstrierten den kurativen Effekt mit Tumorantigen beladener aktivierter dendritischer Zellen zusammen mit CpG-Oligonukleotiden im subkutanen Modell bei BALB/c-Mäusen (Heckelsmiller et al., 2002a). Dabei wurden C26-Zellen aus einer geklonten Kultur den Mäusen subkutan implantiert und dann mit Hilfe von dendritischen Zellen und CpG-

Oligonukleotiden erfolgreich therapiert. In diesem Modell war die Immuntherapie äußerst wirkungsvoll, effektiver sogar als die Standard-Chemotherapie kolorektaler Karzinome. Dabei war die Immuntherapie besser verträglich und die therapierten Mäuse waren in der Lage, erneut implantierte Tumoren auch nach einer Latenzzeit wieder abzustoßen.

Die C26-Zelllinie besteht seit über 30 Jahren und ist sehr gut untersucht. Tumoren aus dieser Zelllinie bestehen aus den Tochterzellen eines einzigen, genau definierten Zellklons. Versuche mit diesen Tumoren sind dadurch sehr gut reproduzierbar. Die Kehrseite davon ist jedoch, dass in der klinischen Realität auch aus dem gleichen Ursprungsgewebe sehr verschiedene Arten von Tumoren ausgehen können, mit sehr unterschiedlichem Ansprechen auf Therapieversuche und damit die Verallgemeinerungsfähigkeit der Ergebnisse mit klonierten Zelllinien eingeschränkt wird.

Die aus CEA424-TAg-Mäusen isolierten Zelllinien mGC3 und mGC8 sind nicht kloniert sondern stellen ein heterogenes Zellgemisch dar. Durch sie kann also die Übertragbarkeit der ermutigenden Ergebnisse von Heckelsmiller et al. auf die klinische Situation am Menschen weiter gesteigert werden.

1.7.2.3. Immunmilieu („Microenvironment“)

Die Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts ist ständig einer Fülle von Antigenen ausgesetzt, reagiert jedoch in aller Regel nicht mit einer Entzündung auf die Fremdkörper. Billionen Bakterien cohabitieren ohne Immunreaktion in der Mukosa des Darmtraktes, gelangt aber nur ein Bruchteil von ihnen in subkutanes Gewebe, reagiert ein gesunder Wirt mit der vollen Breite immunologischer Abwehrmechanismen. Die subkutane Injektion von C26-Zellen bleibt also den Beweis schuldig, ob in der „realen Situation“ das immunprivilegierte Milieu der Darmschleimhaut für eine effektive Immuntherapie des Tumors überwunden werden kann (Iweala et al., 2006). Außerdem zeigt sich für ektop implantierte Tumoren ein vom natürlichen Verlauf abweichendes Verhalten, zum Beispiel in der weit weniger vorhandenen Metastasierung von subkutan implantierten Mamma-, Nierenzell- oder Kolonkarzinomen (Naito et al., 1987).

Manche Arbeitsgruppen versuchen, diesen Kritikpunkt durch Injektionen der Tumorzellen möglichst nah an ihr natives Milieu zu überwinden, zum Beispiel durch Injektion von C26-Zellen in den Appendix der Mäuse oder durch Injektion von Pankreaskarzinomzellen in die Nähe der Bauchspeicheldrüse (z. B. (Hwang et al., 2008; Zhu et al., 2008)). Während dieser

Ansatz als realitätsnäher als das subkutane Modell gesehen wird, kann die Aussagekraft durch Modelle spontan wachsender Tumoren noch weiter gesteigert werden.

1.8. Fragestellung und Zielsetzung

Immuntherapie von malignen Tumoren ist ein vielversprechendes aber auch komplexes Gebiet. Es bedarf des detaillierten Studiums seiner Funktion an möglichst kliniknahen Modellen – von der Reife und Aussagekraft der Modelle hängt der spätere Erfolg beim Patienten ab. An die sehr guten Ergebnisse im subkutan injizierten Modell sollte durch Verwendung der neuen CEA424-TAg Mauslinie aufgesetzt werden, in der Tiere ein autochthones Magenkarzinom entwickeln.

Aufgabe dieser Arbeit war, den Erfolg im subkutanen Kolonkarzinommodell schrittweise auf autochthone Tumoren zu übertragen und dabei Wege zu erforschen, die Immuntherapie gezielt auf den Gastrointestinaltrakt zu richten. Hierfür sollten zunächst subkutan implantierte aus Zelllinien des Magenkarzinoms wachsende Tumoren durch Immuntherapie mit dendritischen Zellen und CpG therapiert werden. Die hierfür verwendeten aus Tumoren von CEA424-TAg transgenen Mäusen etablierten mGC3-Zellen stellen im Gegensatz zu häufig verwendeten klonierten Zelllinien ein heterogenes Zellgemisch dar und sind damit bereits einen Schritt näher an der Situation am Menschen. Die dabei gemachten Erfahrungen sollten für die erfolgreiche Therapie der Tumoren in CEA424-TAg transgenen Mäusen herangezogen werden. In diesen Tieren entstehen die Malignome langsam über dysplastische, prämaligne Vorstufen, statt aus der Zellkultur subkutan implantiert zu werden, und befinden sich von Anfang an in ihrem natürlichen Milieu – der immunprivilegierten Magenschleimhaut. Ein Effekt der Immuntherapie auch in diesem aussagekräftigeren Modell war sehr erstrebenswert, der Weg dorthin versprach außerdem weitere Erkenntnisse über die beteiligten Immunmechanismen.

So sollte der Effekt unseres Ansatzes der Immuntherapie auf das *tissue targeting* der Immunzellen untersucht werden mit dem Ziel, in Zukunft eine möglichst auf den Gastrointestinaltrakt gerichtete Immunantwort zu erzielen. Hierfür sollten auch neue Applikationswege von CpG-Oligonukleotiden (Nanopartikel) erforscht werden, die neben verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften auch das Potential oraler Applikation boten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Brutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Cryostat	Fa. Leica (Heidelberg, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Flow Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Multifuge 3L-R	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Multifuge 4KR	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Neubauer-Zählkammer	Fa. Optik Labor Frischknecht (Balgach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
QuadroMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Schüttler (Vibrax)	Fa. Merck/Serono Diagnostics (Genf, CH)
Vortex Genie 2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortex VF2	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Systeme (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2. Chemikalien

Aqua ad injectabilia	Fa. B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Atipamezol (Antisedan®)	Fa. Pfizer (New York, NY, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Fentanyl (Fentanyl®)	Fa. Hexal (Holzkirchen, D)
Flumazenil (Anexate®)	Fa. DeltaSelect (Dreieich, D)
Isofluran (Forene®)	Fa. Abbott (Wiesbaden, D)

Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke Innenstadt LMU (München, D)
Medetomidin (Dormitor®)	Fa. Pfizer (New York, NY, USA)
Midazolam (Dormicum®)	Fa. Ratiopharm (Ulm/Donautal, D)
Naloxon (Naloselect®)	Fa. DeltaSelect (Dreieich, D)
Natriumchlorid (NaCl 0,9%)	Fa. Baxter S. A. (Lessines, B)
PharmLyse Lysereagenz	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Tissue-Tek Kryomedium	Fa. Sakura (Zoeterwonde, NL)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin	Fa. PAA (Pasching, A)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.3. Reagenziensätze

MACS-Zellisolation:

CD8a (Ly-2) MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD11c (N418) MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Durchflusszytometrische Zellproliferationsmessung:

Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit	Fa. Invitrogen (Eugene, OR, USA)

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:

IL-6 (murin)	Fa. Biosource (Camarillo, CA, USA)
IL-12p40 (murin)	Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
IL-12p70 (murin)	Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
IP-10 (murin)	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
TNF-α (murin)	Fa. eBioscience (San Diego, CA, USA)

2.1.4. Materialien für die Zellkultur

Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. Gibco BRL (Paisley, GB)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco BRL (Paisley, GB)
FCS-Gold	Fa. PAA (Pasching, A)
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Fa. PAA (Pasching, A)
Kollagenase-D	Fa. Boehringer (Mannheim, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Pasching, A)
Natrium-Pyruvat	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM-NEAA)	Fa. Gibco BRL (Paisley, GB)
Normales Affenserum	Fa. Chemikon (Temecula, CA, USA)
Phosphate-buffered saline (PBS)	Fa. PAA (Pasching, A)
Penicillin	Fa. PAA (Pasching, A)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	

1640 Medium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Pasching, A)

Einweg-Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, D), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), Gilson (Den Haag, NL), Greiner (Frickenhausen, D) und Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

2.1.5. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzien

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interferon-γ	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
Interleukin-4	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Resiquimod	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)

2.1.6. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Zellkultur:

DC-Medium:
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 Vol % FCS
in RPMI 1640-Medium

mGC-Medium:
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 Vol % FCS Gold
2,5 mg/l Na-Pyruvat
1 Vol % MEM-NEAA
in RPMI 1640-Medium

Gefrierlösung (2x)
(Verdünnung 1:1 mit mGC3-Medium):
40 Vol % FCS
20 Vol % DMSO
in RPMI 1640-Medium

MACS-Puffer:
2 mM EDTA
0,5 Vol % BSA
pH 7,2
in PBS

Erythrozyten-Lyse:
PharmLyse (10x) 1:10
in PBS

ELISA:
Coating buffer:

Wash buffer:

0,2 M Natriumphosphat
pH 6,5
in aqua dest.

0,05 Vol % Tween 20
pH 7,0
in PBS

Assay diluent:
10 Vol % FCS
pH 7,0
in PBS

Block buffer:
1 Vol % BSA
pH 7,0
in PBS

2.1.7. Zelllinien

Aus den spontan entstehenden Magenkarzinomen der in 2.2.7 beschriebenen Mäuse wurden von Nöckel et al. in der Arbeitsgruppe von Kammerer und Zimmermann mehrere Tumorzelllinien isoliert (Nöckel et al., 2006). Drei dieser nicht-klonierten Zelllinien wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (424GC, mGC3 und mGC8). Um spätere Experimente vergleichbar zu machen, wurden alle in dieser Arbeit gezeigten Versuche mit der mGC3-Zelllinie durchgeführt. Für diese zeigte sich eine TD_{100} (niedrigste Tumorzellzahl, bei der alle Mäuse einen subkutanen Tumor entwickeln) von $3x10^5$ Tumorzellen (Nöckel et al., 2004). In unseren Versuchen haben sämtliche untherapierten Mäuse, die mit mGC3-Zellen injiziert wurden, einen progressiven Tumor entwickelt und sind tumorbedingt gestorben oder euthanasiert worden.

2.1.8. Nanopartikel

Die in dieser Arbeit verwendeten Gelatine-Nanopartikel wurden freundlicherweise von Dr. Klaus Zwiorek aus der Arbeitsgruppe von Dr. Conrad Coester hergestellt und uns überlassen. Die verwendeten Partikel hatten einen ungefähren Durchmesser von 300 nm. Der Herstellungsprozess ist publiziert (Zwiorek et al., 2005; Zwiorek et al., 2007).

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kulturbedingungen

Die Zellkulturen befanden sich in einem Begasungsbrutschrank unter konstanten Umweltbedingungen bei 37°C und einem Gemisch aus 95% Raumluft mit 5% CO_2 bei 95% Luftfeuchtigkeit.

2.2.1.2. Zellmanipulation

Sämtliche Manipulationen außer der Färbung unmittelbar vor durchflusszytometrischer Messung wurden unter sterilen Kautelen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.2.1.3. Zellzählung

Die Zählung von Zellen wurde nach Trypanblauausschlusstest in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Hierbei wurden nur Zellen gezählt, die keinen Farbstoff aufnahmen.

2.2.1.4. Kultur der mGC-Zelllinien

Die Tumorzellen wurden in mGC-Medium bei 37°C, 5% CO_2 und 95% rel. Luftfeuchte unter sterilen Bedingungen kultiviert. Kontamination mit Mykoplasmen wurde ausgeschlossen. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium inklusive etwaiger nicht-adhärenter Zellen abgeschüttet und die Kulturflasche mit reiner PBS ausgewaschen. Danach wurde entweder 1 ml Trypsinlösung (1x) oder 5 ml 1,5 mM EDTA in PBS für eine bzw. fünf Minuten über die Zellen gegeben. Durch Beklopfen konnte so der Zellrasen relativ schonend vom Untergrund abgelöst und die Zellen nach einem Waschvorgang auf zwei neue Kulturflaschen verteilt werden. Die bei anderen Tumorzelllinien verwendete Scraper-Technik führte bei mGC3 zu ca. 90% toten Zellen im Trypanblautest.

2.2.1.5. Herstellung von dendritischen Zellen

Nach Entnahme von Femora und Tibiae aus C57Bl/6-Mäusen (siehe 2.2.7.6) wurden diese unter sterilen Bedingungen ca. eine Minute mit Isopropanol benetzt, danach in NaCl gewaschen und der Markraum wurde an den Epiphysen mit einer Schere eröffnet. Daraufhin wurden die Knochenmarkszellen durch Einbringen einer mit DC-Medium gefüllten Spritze mit 27G-Kanüle herausgewaschen und durch einen 40 µm-Zellsieb gefiltert. Nach Abzentrifugieren der Zellen (400 g, 4°C, 7 min) und Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Die Zellen wurden danach einmal mit 50 ml PBS gewaschen.

Zuletzt wurde das Zellpellet in DC-Medium aufgenommen, die Knochenmarkszellen gezählt (siehe 2.2.1.3) und auf die gewünschte Konzentration gebracht. Zur Generierung von myeloiden dendritischen Zellen wurden 1 Mio. Zellen pro ml in DC-Vollmedium gebracht und unter Zusatz von GM-CSF (200 U/ml) und Interleukin-4 (20 ng/ml) sechs Tage maturiert

(Jansen et al., 1989; Romani et al., 1994). An Tag 4 der Kultur wurde noch einmal die Hälfte des Ausgangsvolumens an frischem Medium plus GM-CSF/IL-4 zugegeben. Am Tag 6 der Kultur schließlich wurden die ausdifferenzierten myeloiden dendritischen Zellen geerntet durch Abpipettieren des Überstandes und nachfolgendem Ausspülen der Kulturflasche mit kaltem PBS, um auch leicht adhärente Zellen abzulösen.

2.2.2. Bestrahlung von Tumorzellen

Vor der Koinkubation mit dendritischen Zellen wurden mGC3-Tumorzellen zur Verhinderung von deren Zellteilung mit 100 Gray bestrahlt. Dazu wurden nach Abschütten des mGC-Medium und Waschen der Flasche mit PBS die Zellen mit 5 ml 4°C kaltem 1,5 mM EDTA in PBS bedeckt und für fünf Minuten im Brutschank inkubiert. Nach leichtem Beklopfen wurden die nun losgelösten Zellen erneut in PBS gewaschen und zurück in mGC-Medium überführt. Daraufhin wurden sie in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München, D) mit 100 Gray Gamma-Strahlen bestrahlt. Diese Dosis führte zur Proliferationshemmung, jedoch nicht zur Lyse der Tumorzellen.

2.2.3. Dendritische Zellvakzine

Es gibt verschiedene Ansätze, die Präsentation von Tumorantigenen durch dendritische Zellen zu erwirken. Dazu gehören die Beladung mit Peptiden (Chen et al., 2001), die Hybridbildung aus dendritischen und Tumorzellen (Kokhaei et al., 2003) und die Beladung von dendritischen Zellen mit apoptotischen oder nekrotischen ganzen Tumorzellen. In dieser Arbeit haben wir uns für letzteres Verfahren entschieden, da durch Beladung mit ganzen Tumorzellen die Antigenbreite der Immunantwort erhöht wird (Fay et al., 2006). Daher wurden nach sechs Tagen Kultur die aus Knochenmark hergestellten dendritischen Zellen (siehe 2.2.1.5) geerntet und mit bestrahlten mGC3-Zellen (siehe 2.2.2) im Verhältnis 5:1 für 24 Stunden koinkubiert. Nachdem die ausdifferenzierten aber immaturen dendritischen Zellen Gelegenheit hatten, Antigen aus mGC3-Zellen aufzunehmen und zu prozessieren, wurde dem Medium 3 µg/ml CpG-B als Reifestimulus 8 bis 12 Stunden vor Vakzinierung zugesetzt (Camporeale et al., 2003; Langenkamp et al., 2000).

Für eine Vakzinierung mit dendritischen Zellen wurden 200.000 solcher Antigen-gepulster CpG-aktivierter dendritischer Zellen pro Maus in 100 µl HBSS subkutan in die dem Tumor kontralaterale Flanke (wo nicht anders vermerkt) verabreicht (Heckelsmiller et al., 2002a). Zusätzlich waren in der Spritze 100 µg CpG-B gelöst. Bei etablierten Tumoren wurden

außerdem 100 µg CpG-B in 100 µl HBSS peritumoral subkutan bei jeder Vakzinierung verabreicht.

2.2.4. *Magnetic-activated cell sorting* (MACS)

Magnetic-activated cell sorting (MACS) ist eine Methode für die Isolation lebender und funktionell aktiver Zellen durch Markierung von Oberflächenmolekülen mit Antikörpern mit magnetischen „*Beads*“. Dabei werden die zu sortierenden Zellen nach Herstellerangaben in MACS-Puffer bei 4°C für 15 Minuten koinkubiert mit den in unserem Fall gegen CD11c spezifischen *Bead*-Antikörpern, was zur Bindung der *Beads* an $CD11c^+$ dendritische Zellen führt. Daraufhin wurde die Zellsuspension durch sogenannte Säulen in einem starken magnetischen Feld geführt, wobei die *Bead*-markierte „Positivfraktion“ in der Säule verbleibt und die nicht markierten Zellen ungehindert hindurchfließen. Bei unseren Versuchen wurde dieser Prozess zur Aufreinigung dendritischer Zellen über MS und LS-Säulen von Miltenyi Biotec zweimal wiederholt, sodass eine Reinheit von über 99,8 % CD11c-positiver Zellen im darauffolgenden Eluat nach Aufhebung des magnetischen Feldes erreicht wurde.

2.2.5. Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS)

Bei der Durchflusszytometrie fließen zu messende Zellen in einem dünnen Strahl an einem oder mehreren Farblasern vorbei. Dabei kann aus der Streuung der Laserstrahlen die Größe sowie die Granularität der Zellen erschlossen werden. Zusätzlich werden die Zellen je nach Bedarf durch Antikörper markiert, die Fluoreszenzfarbstoffe tragen. Diese haben ein Exzitationsspektrum in der Nähe der Wellenlänge der Farblaser und ein längerwelliges Emissionsspektrum, welches wiederum vom FACS-Gerät gemessen werden kann. Durch die verschiedenen Spektren können verschiedene Antikörper mit mehreren Farbstoffen gleichzeitig verwendet werden und so viele Informationen gleichzeitig über ein und dieselbe Zelle gewonnen werden. Zum Ausschluss unspezifischer Bindung (z. B. am Fc-Teil) wurde bei jeder Färbung eine Kontrolle mit ebenfalls fluoreszierenden Antikörpern des gleichen Isotyps durchgeführt, deren Spezifität jedoch keine Bindung in den untersuchten Zellen erwarten lässt (z. B. Antikörper gegen Ratten-Antigene).

2.2.5.1. Oberflächenmarker

Für FACS-Analysen wurden 2 x 10^5 bis 1 x 10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 200 µl Medium oder PBS resuspendiert und gefärbt. Dabei wurden die Zellen 30 min auf Eis unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) inkubiert,

anschließend mit PBS gewaschen, nach erneuter Abzentrifugation im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert und erneut gewaschen. Zur FACS-Messung wurden die Zellen schließlich in 500 µl PBS aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

2.2.5.2. Proliferationsassay

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit dem Farbstoff 5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) in einer Konzentration von 5 µM für 15 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Intensität der Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie hängt von der intrazellulären Konzentration des Farbstoffs ab. Bei einer Zellteilung wird das Zytoplasma und damit das CFSE auf die beiden Tochterzellen verteilt, wodurch die Signalintensität auf etwa die Hälfte abfällt. So wird eine Aussage darüber möglich, wie viele der vorhandenen Zellen sich geteilt haben.

2.2.6. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Ein ELISA dient der quantitativen und qualitativen Bestimmung von Proteinen, in diesem Fall derer im Serum untersuchter Mäuse. Hierfür werden geeignete Platten (z. B. 96-Well Platten mit flachem Boden) über Nacht bei 4°C mit spezifischen Antikörpern für das gesuchte Protein im speziellen *coating buffer* (s. 2.1.6) beschichtet. Am nächsten Tag werden alle Wells gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Daraufhin werden alle Wells für etwa zwei Stunden mit dem proteinhaltigen *assay diluent* beschickt, um sämtliche etwaigen unspezifischen Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach erneutem Waschen werden die zu untersuchenden Proben sowie eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des gesuchten Proteins in den Wells vorgelegt. Nach zwei Stunden Inkubation hat das Zielprotein an die Antikörperbeschichtung gebunden. Daraufhin werden die Wells dreimal gewaschen und ein weiterer für das Protein spezifischer, biotinylierter Antikörper zugegeben. Nach 30 Minuten erfolgt ein weiterer Waschzyklus, wonach ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben wird. Das Streptavidin bindet nun, auch mehrfach, an die biotinylierten Antikörper. Nach einem letzten Waschschritt wird die Vorstufe eines Farbstoffes hinzugegeben, die von der gebundenen Peroxidase umgewandelt wird und zur Färbung der Flüssigkeit proportional zur Menge an Zielprotein führt. Mit einem speziellen Gerät (ELISA-Reader) kann die daraus folgende Lichtextinktion quantifiziert und mit der Reihe aus standardisierten Proteinkonzentrationen verglichen werden. Daraus lässt sich dann die in den Wells enthaltene Konzentration des gesuchten Proteins errechnen.

2.2.7. Mäuse

Ziel-Tumorwirt unserer immuntherapeutischen Versuchsansätze sind die von Thompson et al. erzeugten C57Bl/6-Mäuse, die transgen für das Onkogen „*SV40 large T-antigen*“ hinter einem 424 Basenpaare langem humanen CEA-Promotor sind (kurz CEA424-TAg-Mäuse genannt) (Thompson et al., 2000). Diese transgenen Mäuse entwickeln zu 100% ab etwa Lebtag 37 Zelldysplasien im Pylorusbereich, die bis Tag 50 zu multifokalen Magenschleimhaut-Karzinomen fortschreiten. Diese Mäuse haben eine Lebenserwartung von 100-130 Tagen und sterben nach pathologischer Gewichtsabnahme an der totalen Passagebehinderung im Pylorus.

Für die Vorversuche im subkutanen mGC3-Modell wurden sechs bis acht Wochen alte nicht-transgene naive C57Bl/6-Weibchen mit dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet. Diese wurden von der Fa. Harlan-Winkelmann (Borchen, D) bezogen. Bei Versuchen mit TAg-Mäusen wurden als Kontrollen soweit verfügbar nicht-transgene Mäuse aus dem gleichen Wurf verwendet.

2.2.7.1. Behördliche Genehmigung

Sämtliche Tierversuche wurden nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

2.2.7.2. Injektionen

Für alle Injektionen wurden Kanülen der Größe 27G verwendet.

Subkutan

Die Nadel wurde im sehr flachen Winkel gerade so weit unter die Haut des Versuchstieres platziert, dass nach der Injektion eine dauerhafte Vorwölbung entstand und nichts aus dem Stichkanal zurück trat. Die maximale subkutane Injektionsmenge betrug in diesen Versuchen 100 µl.

Intraperitoneal

Das Tier wurde mit dem Kopf tief in Rückenlage gehalten, um ein Ausweichen des Darms vor der Nadel zu erleichtern, die dann paramedial im 30°-Winkel ca. 5 mm tief vorgeschoben wurde. Hier wurden bis zu 500 µl injiziert.

Intravenös

Intravenöse Injektionen wurden entweder retroorbital nach Isoflurannarkose oder nach Rotlichtbestrahlung in die Schwanzvene durchgeführt. Maximales Volumen war hier 300 µl.

Tumorinduktion

Um eine exakte Platzierung und Injektionsmenge der injizierten Tumorzellen zu gewährleisten, wurden die Tiere für jede Tumorinduktion durch Injektionsnarkose anästhesiert (siehe 2.2.7.5). Die mGC3-Zellen wurden in 50 µl Injektionsvolumen subkutan in die rechte dorsale Flanke injiziert, die Zellzahl betrug wo nicht anders angegeben $3x10^6$ Zellen (zehnfache TD_{100}, siehe 2.1.7).

Stand vor Tumorinduktion die Zuordnung der Mäuse zu Therapie- und Kontrollgruppen bereits fest (bei prophylaktischer Tumortherapie), so erhielten die Tiere streng abwechselnd aus diesen beiden Gruppen ihre Injektion von Tumorzellen. So wurde sichergestellt, dass sich etwaige inhomogene Verteilung der Tumorzellen in den Spritzen oder innerhalb einer Spritze nicht auf das Versuchsergebnis auswirken konnten. Trotzdem wurden die Tumorzellen in der Spritze so weit wie möglich durch Beklopfen und Passage kleiner Luftblasen durch den Spritzenkonus vor jeder Injektion resuspendiert und gemischt.

2.2.7.3. Tumormessungen

Der Zustand der Mäuse wurde täglich durch Tierpfleger überwacht und die subkutanen Tumoren der Versuchstiere wurden dreimal pro Woche mit Hilfe eines Messschiebers in den beiden größten Dimensionen in der tangentialen Ebene vermessen. Eine Tiefenmessung des Tumors war nicht praktikabel. Als Abbruchkriterium wurde in Anlehnung an ähnliche Versuche eine gemessene Tumorfläche von 225 mm^2 festgelegt.

2.2.7.4. Wiegen

Bei jeder Tumormessung wurden die Mäuse gewogen, um die Erfüllung von Abbruchkriterien zu überwachen.

2.2.7.5. Narkose

Inhalationsnarkose

Bei kurzen Eingriffen wie Blutentnahmen oder direkt vor der Euthanasierung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurde eine kurzfristige Inhalationsnarkose mit Isofluran

durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse für einige Sekunden in ein verschlossenes Glasgefäß gegeben, in dem ein mit flüssigem Isofluran getränktes Tuch lag. Die Tiefe der Narkose wurde durch Beobachtung der Versuchstiere (Bewegung und Atemfrequenz) beurteilt. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Mäuse aus dem Gefäß entnommen. Die Anästhesie hielt etwa eine Minute lang an.

Injektionsnarkose

Für längere Eingriffe, und solche, bei denen besondere Präzision nötig ist (wie zum Beispiel bei der Tumorinduktion) wurde eine gut steuerbare Kombinationsnarkose mit dem Tiernarkotikum Medetomidin (α_2-Agonist, 0,5 mg/kg KG), dem Benzodiazepin Midazolam (5 mg/kg KG) und dem Opiat Fentanyl (0,05 mg/kg KG) verwendet. Die Dosis wurde i.p. appliziert, nach ca. 5 Minuten war eine ausreichende Narkosetiefe erreicht.

Da keine wesentliche Schmerzsymptomatik zu erwarten war und die volle Narkosezeit von 1,5-3 Stunden nicht benötigt wurde sowie mit erhöhten Risiken (v. a. Auskühlung) einhergehen würde, wurden die Anästhetika nach der Prozedur antagonisiert. Dafür wurden Atipamezol (α_2-Blocker, 2,5 mg/kg KG), Benzodiazepinantagonist Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Opiat-Antagonist Naloxon (1,2 mg/kg KG) verwendet, sie wurden s.c. verabreicht und bewirkten ein langsames Erwachen des Versuchstieres über etwa 2 Minuten.

2.2.7.6. Organentnahme

Für alle Organentnahmen wurden die Mäuse durch Isoflurannarkose (siehe 2.2.7.5) betäubt und durch zervikale Dislokation euthanasiert. Daraufhin wurde das gesamte Fell der Maus mit Ethanol oder 70 Vol % Isopropanol benetzt und das Fell so weit wie jeweils nötig abpräpariert.

Femur und Tibia für Knochenmark

Die Hüftgelenke der Tiere wurden vorsichtig von medial freipräpariert und exartikuliert. Danach wurden die Muskeln der gesamten Hinterläufe von den Knochen abpräpariert und der Bandapparat des Kniegelenks vorsichtig durchtrennt, ohne den Knochen zu eröffnen. Die Knochen wurden zunächst für etwa eine Minute in reinem Ethanol getränkt und dann in gekühltem, sterilem HBSS (siehe 2.1.4) zur Weiterverarbeitung transportiert.

Milz

Nach der Abpräparation des Fells wurde die Bauchhöhle eröffnet, die Milz mobilisiert und der Milzhilus distal durchtrennt. Die Milz wurde daraufhin sofort mechanisch zerkleinert und in steriles DC-Medium überführt.

Periphere Lymphknoten

Präpariert wurden axilläre, inguinale sowie popliteale Lymphknoten und ebenfalls in sterilem DC-Medium transportiert.

Mesenteriale Lymphknoten

Am Stamm des Mesenteriums findet sich ein Paket von zumeist drei bis vier makroskopisch erkennbaren Lymphknoten. Diese wurden *en bloc* entnommen, in DC-Medium überführt und makroskopisch zerpflückt.

Peyer'sche Plaques

Das von Kadaoui und Corthésy veröffentlichte Protokoll zur Isolation von Peyer'schen Plaques wurde von uns weiterentwickelt, um eine möglichst reine Zellsuspension von Lymphozyten zu erhalten (Kadaoui et al., 2004). Hierfür wurden die Peyer'schen Plaques im Dünndarm aufgesucht und nach dem „Wegstreifen" von Darminhalt eng umschrieben herausgeschnitten. Daraufhin wurden die Präparate direkt mit einem scharfen Strahl von PBS aus einer Spritze mit 20G-Kanüle auf einem 40 µm-Filter gewaschen. Daraufhin wurden die noch unzerkleinerten Gewebestücke für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 5 ml 0,5 mg/ml Kollagenase D verdaut. Nach einem Waschvorgang wurden die Präparate mit zwei Pinzetten mechanisch zerkleinert und in Leukozytenmedium durch eine 20G-Kanüle in eine 5 ml-Spritze aufgezogen. Die so gewonnene Suspension wurde sukzessive durch Filter mit 70µm und 40µm Porengröße aufgereinigt, abzentrifugiert (5 Minuten, 400G, 4°C) und in DC-Medium resuspendiert.

Magenkarzinom

Das orthotope Magenkarzinom wurde von uns nur zu histologischen Zwecken entnommen, daher erfolgte nach Eröffnung der Bauchhöle eine *en-bloc*-Exzision des oberen Gastrointestinaltrakts vom distalen Ende des Ösophagus bis etwa zum Pars descendens des Duodenum. Direkt nach Entnahme wurde das Präparat längs entlang der kleinen Kurvatur des Magens aufgeschnitten, Magen- und Darminhalt entfernt und mit PBS gespült. Das Präparat wurde daraufhin auf ein kleines beschriftetes Stück Alufolie verbracht, mit Tissue-

Tek (siehe 2.1.2) bedeckt, in die Alufolie eingewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Präparate bis zu den histologischen Schnitten bei -80°C gelagert.

Subkutaner mGC-Tumor

Auch subkutane mGC-Tumoren wurden histologischen Aufarbeitung entnommen. Die Identifikation und Isolation von Tumorgewebe fiel zumeist leicht, da der mGC3-Tumor oft abgekapselt und nur selten infiltrierend im subkutanen Gewebe wächst. Nach der Entnahme des Tumors und der weitgehenden Befreiung von Fell- und anderen Geweberesten wurde er ebenfalls mit Tissue-Tek bedeckt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu den Schnitten gelagert.

2.2.8. Histologie

Die in Tissue-Tek eingelegten und bei -80 °C asservierten Gewebeproben wurden zunächst an der senkrecht von der Haut gemessen stärksten Stelle geschnitten, um möglichst standardisierte Schnitte zu erhalten. Danach wurden im Cryostat 5 µm starke Sektionen angefertigt und für 48 Stunden luftgetrocknet. Nach Fixierung in Aceton wurden die Gewebe mit 10-prozentigem normalem Affenserum geblockt. Ratten anti-Maus CD8-Antikörper (BD Pharmingen), biotinylierte F(ab)2 Affen anti-Ratten IgG-Antikörper und Rhodamin red X-Streptavidin (Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK) wurden für eine Stunde in TRIS-gepufferter normaler Kochsalzlösung koinkubiert. Die Gewebe wurden daraufhin mit Hämalaun gegengefärbt. Die Zahl der infiltrierenden Zellen wurde durch systematische Auszählung nicht-überlappender Gesichtsfelder des gesamten Tumorquerschnitts bestimmt. Dabei wurde ein Lichtmikroskop mit Hilfe von Ölimmersion mit 40-facher Vergrößerung verwendet (Carl Zeiss). Ein Gesichtsfeld überblickte eine Fläche von 0,25 mm^2. Nekrotische Areale und Blutgefäße wurden von der Zählung ausgeschlossen, die von zwei verblindeten, unabhängigen Untersuchern durchgeführt wurde.

2.2.9. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Unterschiede in Tumorgrößen erfolgte durch den Mann-Whitney Test für jeden einzelnen Zeitpunkt, zur Bewertung unterschiedlicher Überlebenszeiten wurde der *log-rank*-Test herangezogen, zur Auswertung der Lymphozyteninfiltrationen in Geweben wurde der *Student's t-test* herangezogen. Bei Angaben von Mittelwerten wurde die Streuung jeweils als Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Statistische Signifikanz mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p<0,05$, $p<0,01$ oder $p<0,001$ werden mit *, ** bzw. *** markiert.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Daten und die Niederschrift dieser Arbeit erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Office (Microsoft Corporation, CA, USA), GIMP (*open source*), Adobe Illustrator (Adobe Systems Inc., NJ, USA) und Bibus (*open source*).

3. Ergebnisse

3.1. Immuntherapie: vom subkutanen Modell zum autochthonen Tumor

3.1.1. Etablierung einer wirksamen Immuntherapie subkutaner mGC3-Tumoren

Die Kombinationstherapie aus Antigen-gepulsten dendritischen Zellen in Verbindung mit CpG-B hat sich in unserem Labor im subkutanen C26-Kolonkarzinommodell als hochwirksam erwiesen (Heckelsmiller et al., 2002a). Diese Ergebnisse sollten nun zunächst auf ein subkutanes Modell mit aus CEA424-TAg-Tumoren isolierten ungeklonten Zellkulturen (mGC3) übertragen werden. Mit subkutan implantierten Tumoren zu beginnen bevor wir die Therapie am orthotopen Tumor erprobten hatte zwei Vorteile: Zum einen sind subkutane Tumoren zugänglicher und damit leichter messbar, zum anderen ist ein subkutaner Tumor näher an der von Heckelsmiller et al. beschriebenen Situation, in der die Kombination aus dendritischen Zellen und CpG-B sehr erfolgreich war.

3.1.1.1. CpG-A

Der Effekt der Vakzinierung mit dendritischen Zellen und CpG-B ist abhängig von $CD8^+$ T-Zellen (Heckelsmiller et al., 2002a). Native mGC3-Zellen zeigten in Kultur eine sehr niedrige Expression des *major histocompatibility complex I* (MHC-I). In Anbetracht der Tatsache, dass MHC-I ein entscheidender Rezeptor für eine effektive Lyse durch T-Effektorzellen ist, untersuchten wir, ob die Expression von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen zumindest in vitro stimuliert werden konnte. mGC3-Zellen wurden zu diesem Zweck über unterschiedliche Zeiträume mit verschiedenen Konzentrationen von Interferon-Gamma (IFN-γ) stimuliert (Abbildung 3.1). Nach der maximalen Inkubationszeit von 16 Stunden zeigte sich eine messbare Produktion von MHC-I auf der Oberfläche der mGC3-Zellen.

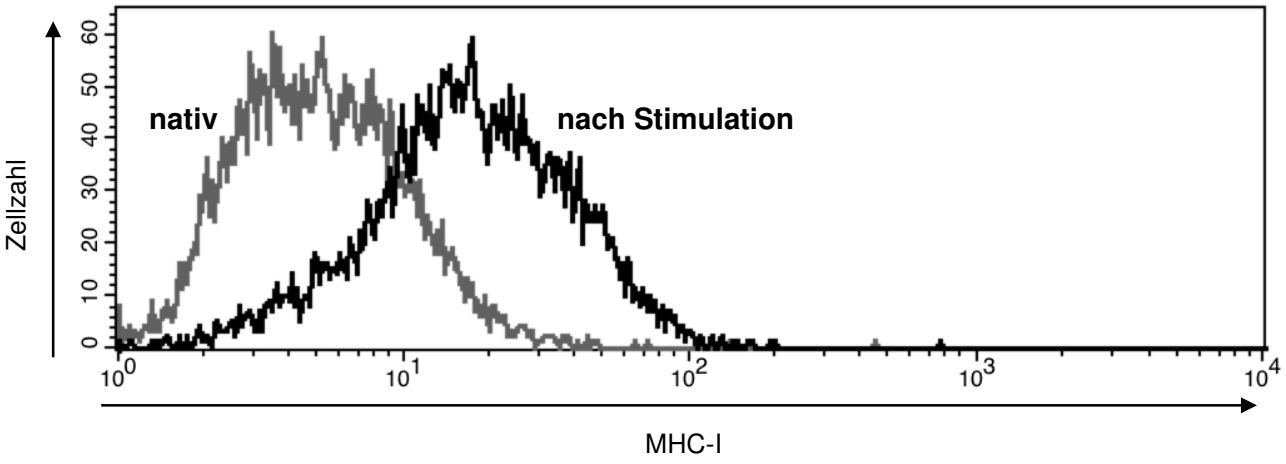

Abbildung 3.1: mGC3-Zellen in Kultur exprimieren erst nach Stimulation signifikante Mengen von MHC-I auf ihrer Oberfläche.

mGC3-Zellen aus der Kultur wurden für 16 Stunden mit 50ng/ml IFN-γ stimuliert (schwarz), anschließend auf MHC-I-Expression gefärbt und im FACS mit unstimulierten (grau) verglichen.

3.1.1.2. Prophylaktischer Ansatz

Kombination von dendritischer Zellvakzine mit CpG-B und CpG-A

Der natürliche Verlauf nach subkutaner Injektion lebender mGC3-Zellen in C57BL/6 Mäusen besteht in allen unseren Versuchen im progredienten Tumorwachstum und führt je nach injizierter mGC3-Zellzahl innerhalb von etwa 40 bis 100 Tagen nach Tumorchallenge zum Tod des Tieres. Eine spontane Abstoßung – also fehlendes Heranwachsen eines Tumors nach Injektion lebender Zellen – ist in untherapierten Tieren in unserem Labor nie vorgekommen.

Um zu erproben, ob dieser hochmaligne Tumor einer Vakzinierung durch dendritische Zellen mit CpG als Adjuvans überhaupt zugänglich ist, wurde zunächst eine Maximaltherapie durchgeführt. Diese beinhaltete eine prophylaktische Immunisierung mit Antigen-gepulsten und CpG-B-aktivierten dendritischen Zellen, zusätzliche Injektionen von CpG-B und außerdem die peritumorale Gabe von CpG-A (Abbildung 3.2). Durch diesen Ansatz wird sowohl eine T-Zell- als auch eine NK-Zell-vermittelte Immunreaktion stimuliert. Behandelte Tiere zeigten ein deutlich verzögertes Tumorwachstum, vier Tiere blieben in den beobachteten 300 Tagen tumorfrei.

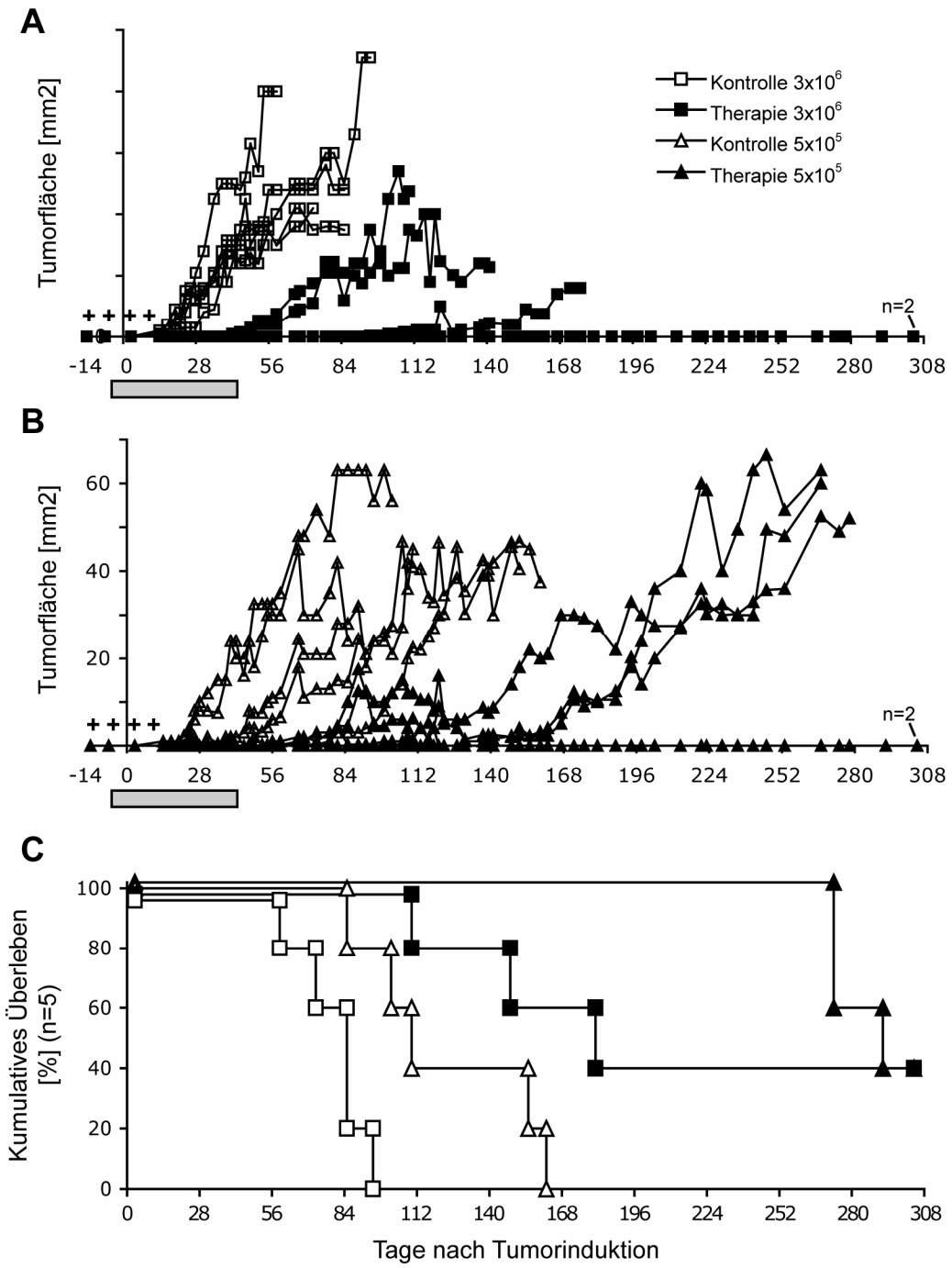

Abbildung 3.2: Prophylaktische Immunisierung mit CpG-A, CpG-B und dendritischen Zellen reduziert das Tumorwachstum und verlängert das Überleben.

Zehn Mäuse wurden ab zwei Wochen vor der geplanten Tumorinduktion im Wochenabstand insgesamt vier Mal mit tumorgepulsten aktivierten dendritischen Zellen immunisiert (**+**). Dies geschah vor der Tumorchallenge kontralateral, danach peritumoral. Zusätzlich erhielten die Mäuse eine Injektion mit CpG-A (grauer Balken) im Tumorgebiet an den Tagen -2, 0, 3, 7, 14, 21, 28 und 35 vor bzw. nach Tumorinduktion. Bei fünf immunisierten und fünf Kontrollmäusen wurden 3×10^6 Zellen injiziert (Tumorwachstum in **A**), zwei weitere Gruppen mit je fünf Mäusen erhielten eine kleinere Zellzahl von 5×10^5 Zellen (**B**). Das Überleben der Tiere ist in **C** dargestellt. Die Unterschiede in Tumorgrößen sind in **A** ab Tag 14 signifikant ($p = 0{,}008$), in **B** ab Tag 31 ($p = 0{,}032$). Der Überlebensvorteil beider Therapiegruppen gegenüber den jeweiligen Kontrollen ist signifikant mit je $p = 0{,}002$.

Vergleich der Wirksamkeit von CpG-A mit der Kombination aus dendritischen Zellen und CpG-B

Nachdem sich die kombinierte Immuntherapie bei beiden getesteten Tumorchallenge-Dosen als wirksam erwies, sollten die Ergebnisse in einem weiteren Versuch bestätigt und die Rollen der einzelnen Komponenten der kombinierten Therapie weiter erforscht werden.

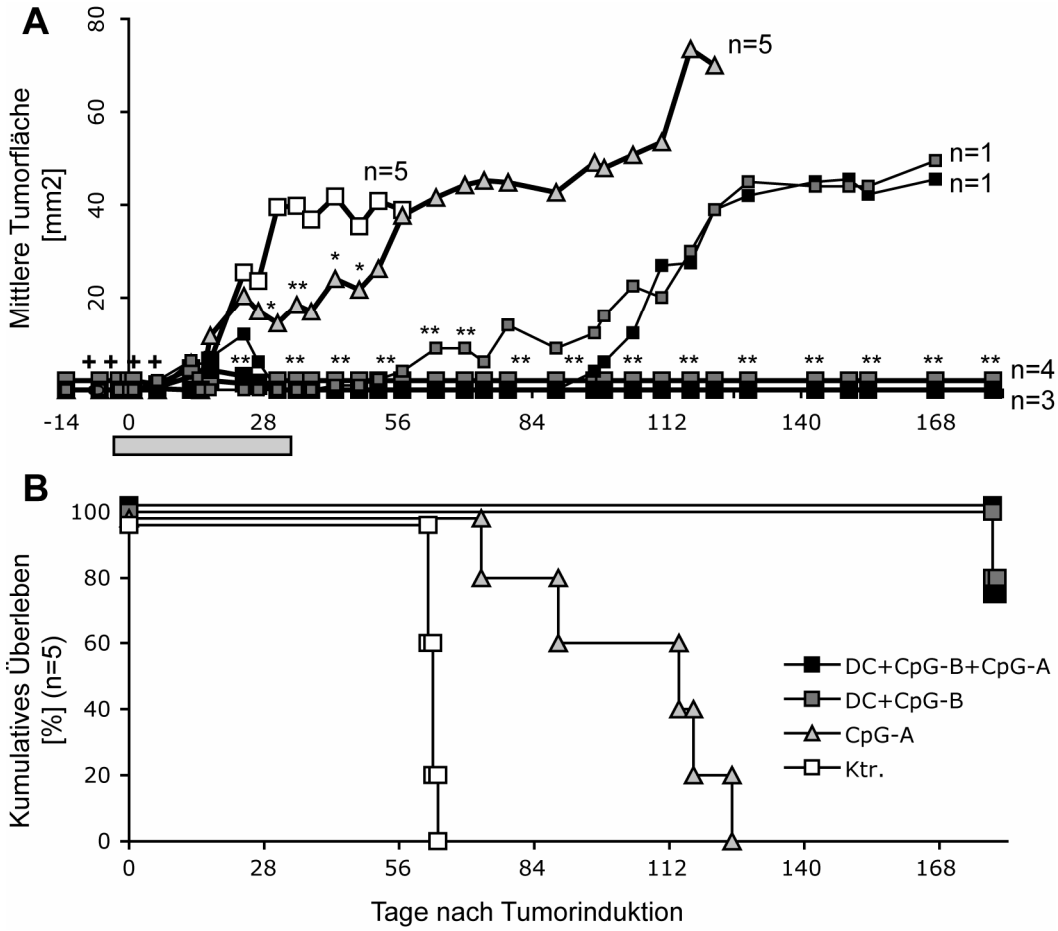

Abbildung 3.3: Prophylaktische Immunisierung mit DC und CpG-B verhindert das Tumorwachstum auch ohne CpG-A.

Analog zum vorigen Versuch wurden Mäuse entweder prophylaktisch mit DC und CpG-B immunisiert (**+**), mit CpG-A peritumoral behandelt (grauer Balken) oder beides. Die Tumorinduktion erfolgte an Tag 0 mit 1 x 10^7 mGC3-Zellen. **A** zeigt Tumorgrößen, **B** das Überleben der Tiere. Da in zwei Gruppen jeweils nur eine Maus einen Tumor entwickelte, wurden in **A** diese Mäuse von der übrigen Gruppe getrennt aufgeführt. Der Überlebensvorteil aller Therapiegruppen war gegenüber den Kontrollen signifikant, die Kombination aus DC, CpG-B und CpG-A mit p = 0,005, DC und CpG-B mit p = 0,002 und CpG-A allein mit p = 0,002.

Hierzu wurden nun also bei konstanter Zellzahl der Tumorinduktion die Effekte jeweils von dendritischen Zellen mit CpG-B und CpG-A allein untersucht. Obwohl Injektionen mit CpG-A peritumoral das Tumorwachstum verzögern und das Überleben verlängern, sind sie einer spezifischen Therapie mit dendritischen Zellen und CpG-B unterlegen. Durch diese konnten hier sieben von neun Mäusen den Tumor dauerhaft abstoßen (Abbildung 3.3). Die Dreifachkombination von dendritischen Zellen, CpG-B und CpG-A erbrachte keinen zusätzlichen Vorteil.

In beiden bisher vorgestellten Tumorversuchen zeigt sich außerdem, dass vakzinierte Mäuse, die dennoch einen Tumor entwickeln signifikant später nach der Tumorchallenge einen palpablen Tumor entwickeln als Kontrolltiere (Tabelle 3.1). Außerdem wird in Tabelle 3.1 ersichtlich, dass in unseren Versuchen der Zeitpunkt der Entwicklung subkutaner Tumoren mit der injizierten Zellzahl korreliert.

	Kontrollgruppe		Therapiegruppe	
Tumorchallenge	**Tumor-inzidenz**	**Tag nach Tumorchallenge**	**Tumor-inzidenz**	**Tag nach Tumorchallenge**
5×10^5	5 von 5	14-66 (17)	3 von 5	47-130 (54)
3×10^6	5 von 5	14 (14)	3 von 5	42-95 (42)
10×10^6	5 von 5	6-13 (6)	1 von 5	43 (n=1)

Tabelle 3.1: Prophylaktische Immuntherapie verlängert das tumorfreie Überleben

Auch in Mäusen, die den Tumor nicht völlig abgestoßen haben, wird die Inzidenz der mGC3-Tumoren durch die Therapie hinausgezögert. Die Tabelle zeigt die Zahl der Tage nach Tumorchallenge, an denen in den jeweiligen Gruppen erstmals die progredient zum Tod führenden Tumoren subkutan palpabel wurden. Die Werte in Klammern stellen den Median der Tage der Tumorinzidenzen dar.

Memory-Effekt der Vakzinierung

Die fehlende MHC-Expression auf mGC3 hätte zur Annahme führen können, dass keine effektive T-Effektorzellantwort gegen diesen Tumor induziert wird. Dagegen sprach nun aber der weit ausgeprägtere therapeutische Effekt der spezifischen Kombinationstherapie aus dendritischen Zellen und CpG-B gegenüber reiner Verabreichung von CpG-A. Wir untersuchten daraufhin, ob erfolgreich gegen mGC3 vakzinierte Mäuse auch eine langfristige Immunität erhalten haben.

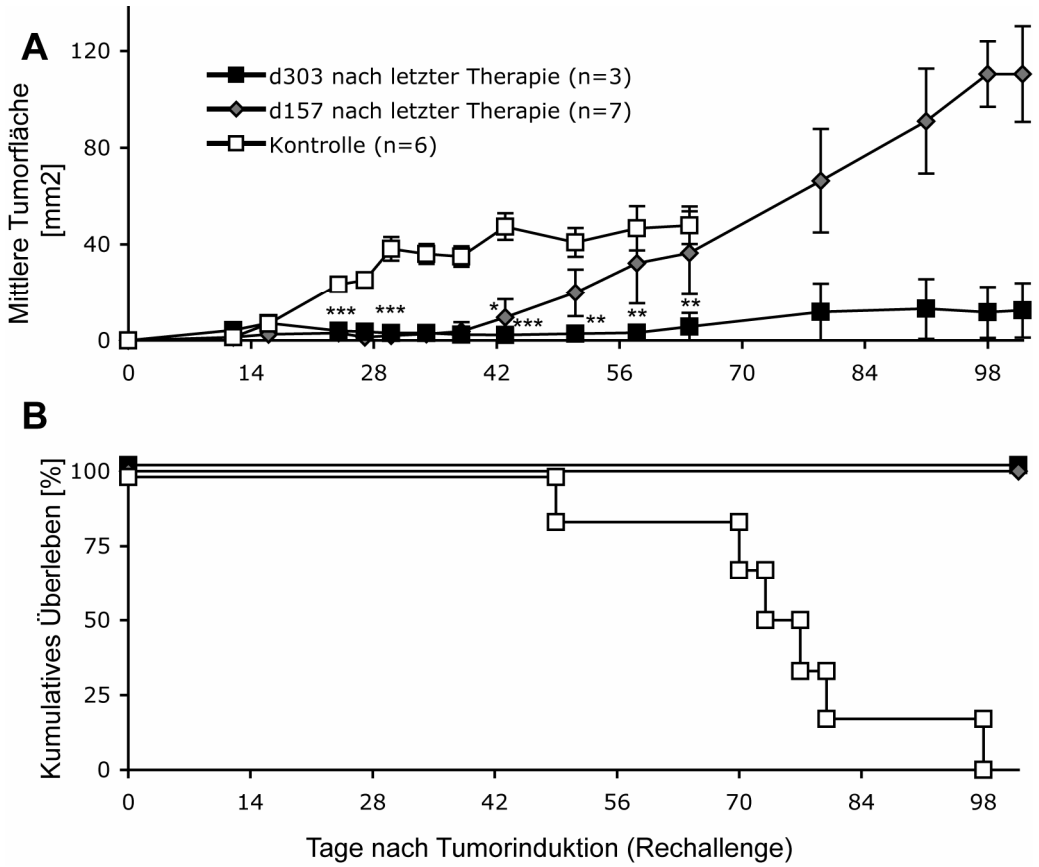

Abbildung 3.4: Vakzinierung mit DC+CpG-B verleiht einen dauerhaften Schutz gegen subkutane mGC3-Tumoren im *Rechallenge*.

Drei Mäuse wurden 303 Tage und sieben Mäuse 157 Tage nach der letzten Vakzinierung mit DC/CpG-B erneut mit je 3×10^6 subkutan injizierten mGC3-Zellen konfrontiert. Eine Boosterung oder erneute Applikation von CpG erfolgte nicht. **A** zeigt die Tumorgrößen individueller Mäuse nach erneuter Tumorinduktion. Kurven enden, wenn mindestens zwei Mäuse gestorben sind. An Tag 102 wurden die fünf tumorfreien Mäuse für einen adoptiven Transfer herangezogen und daher euthanasiert. **B** zeigt das kumulative Überleben in den Versuchsgruppen bis zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers. Das Überleben der Tiere mit Rechallenge an Tag 303 ist mit $p = 0{,}011$ signifikant gegenüber Kontrollen verlängert, das der Tiere an Tag 157 mit $p < 0{,}001$.

Für diesen Beweis wurden die Mäuse aus den vorherigen Versuchen herangezogen, die nach dendritischer Zellvakzine und CpG-B erfolgreich den mGC3-Tumor abgestoßen hatten. 157 bzw. 303 Tage nach der letzten Vakzinierung wurden diesen Mäusen erneut mGC3-Tumorzellen injiziert und der Verlauf wurde dokumentiert (Abbildung 3.4).

Fünf der sieben Tiere, die 157 Tage nach der letzten dendritischen Zellvakzine mit mGC3-Tumorzellen konfrontiert wurden, stießen den Tumor ab. Die restlichen beiden Versuchstiere wie auch die drei Mäuse, denen 303 Tage nach der letzten Therapie erneut vitale Tumorzellen injiziert wurden, zeigten wie in den vorherigen Versuchen deutlich verlängertes tumorfreies Überleben (Tabelle 3.2). Diese Befunde beweisen eine Gedächtnis-Antwort der vakzinierten Tiere sowohl fünf als auch zehn Monate nach der letzten spezifischen Immuntherapie.

Tag der Rechallenge nach letzter Vakzinierung	**Tumorinzidenz**	**Tage bis zur klinischen Manifestation nach aktueller Tumorchallenge (Median)**
Keine Vakzinierung	6 von 6	12-16 (12)
157	2 von 7	34, 91 (63)
303	3 von 3	12-51 (43)

Tabelle 3.2: Die Memory-Antwort immunisierter Tiere verlängert das krankheitsfreie Überleben, sofern der Tumor nicht insgesamt abgestoßen wird.

3.1.1.3. Therapeutischer Ansatz

Einfluss des Zeitpunkts des Therapiebeginns auf das Tumorwachstum

Nach dem Beweis, dass mGC3-Tumoren grundsätzlich auf dendritische Zellvakzine und CpG-B ansprechen, wollten wir den Zeitpunkt der Vakzinierung vom prophylaktischen in das klinisch relevantere therapeutische Setting verschieben. Nun wurde also mit der spezifischen Immunisierung durch dendritische Zellen und CpG-B erst begonnen, als alle Mäuse palpable und damit klinisch manifeste subkutane Tumoren aufwiesen.

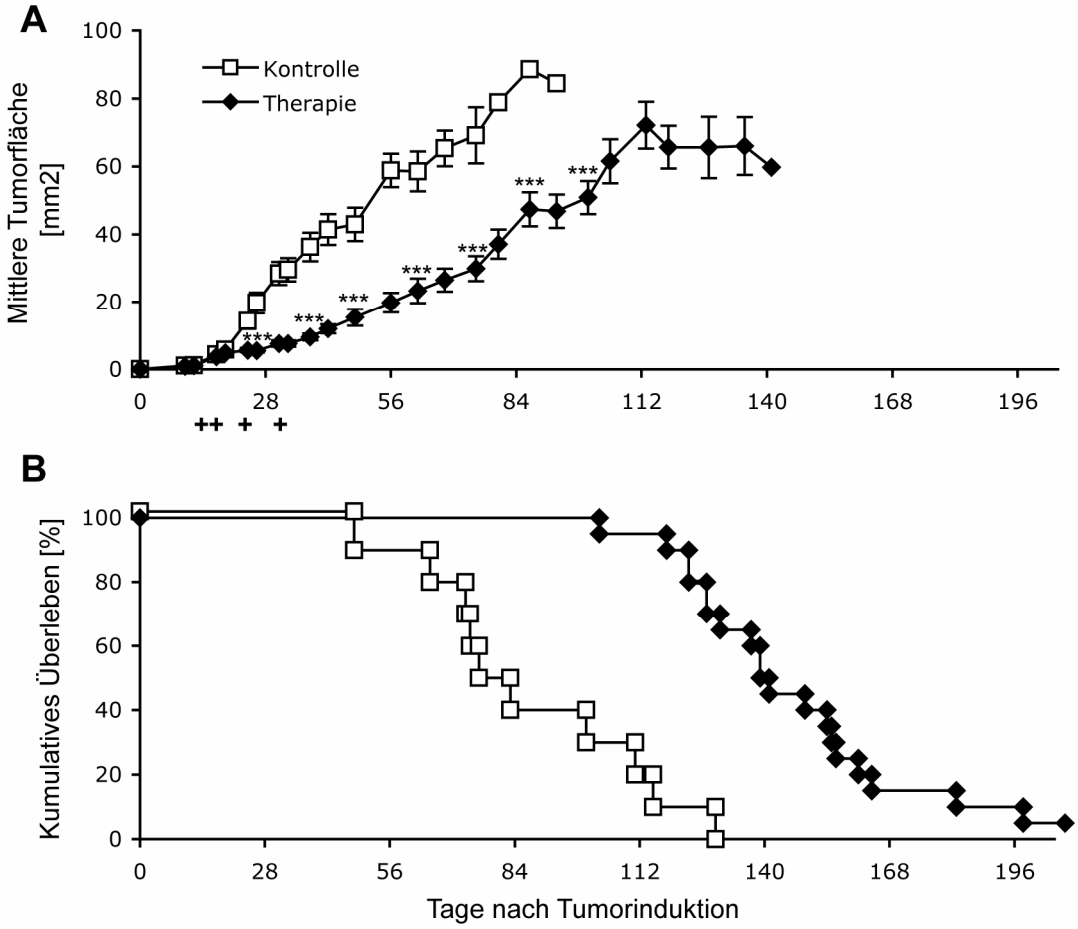

Abbildung 3.5: Frühzeitige DC-Immunisierung mit CpG hemmt das Wachstum etablierter Tumoren

Je 3 x 10^6 mGC3-Zellen wurden 30 Mäusen subkutan injiziert. Die erste Vakzinierung mit je 200.000 Antigen-gepulsten CpG-B-aktivierten dendritischen Zellen erfolgte an Tag 14 nach Tumorinduktion, weitere Injektionen an Tag 17, 24 und 31 (**+**). **A** zeigt die mittleren Tumorgrößen in Therapiegruppe (n = 20) und Kontrolle (n = 10). In **B** ist das kumulative Überleben der Versuchstiere aufgetragen. Eine Maus der Therapiegruppe stieß den Tumor ab und blieb dauerhaft tumorfrei. Der Überlebensvorteil der Therapietiere war signifikant mit $p < 0{,}001$.

Obwohl die Kombinationstherapie mit dendritischen Zellen und CpG-B zu signifikant verzögertem Progress und verlängertem Überleben führt, erwiesen sich etablierte subkutane mGC3-Tumoren als therapieresistenter gegenüber Immuntherapie (Abbildung 3.5). Weitere drei Versuche mit mGC3 und der ebenfalls aus CEA424-TAg-Tumoren isolierten Zelllinie mGC8 in unterschiedlichen Zellzahlen, bei denen die Therapie zu noch späteren Zeitpunkten begonnen wurde, zeigten, dass der Effekt der dendritischen Zellvakzine mit CpG-B um so größer ist, je früher mit der Therapie begonnen wird.

Ipsilaterale statt kontralaterale Applikation der dendritischen Zellen

In einem weiteren Versuch erprobten wir den Effekt einer ipsilateralen Injektion der dendritischen Zellvakzine zusammen mit CpG-B auf mGC3-Tumoren. So wurde die Vakzine nicht in die kontralaterale Flanke sondern peritumoral subkutan verabreicht. Es zeigte sich kein erkennbarer Unterschied in der Wirkung zwischen ipsilateraler und kontralateraler Injektion der dendritischen Zellen (Daten nicht gezeigt). Dieser fehlende Unterschied weist wie die in Kapitel 3.1.1.2 gezeigte langfristige Immunität gegen den mGC3-Tumor auf eine systemische und spezifische Immunantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen hin.

Cyclophosphamid

Eine weitere Hypothese, die den eingeschränkten therapeutischen Effekt der Immuntherapie erklären könnte, wäre eine Induktion von Immuntoleranz durch den Tumor (Kawaida et al., 2005). Die Tatsache, dass die bisherigen Versuche in naiven Mäusen durchgeführt wurden, die vor der Tumorchallenge nicht mit Tumorantigenen (und speziell dem T-Antigen) in Kontakt gekommen waren, schloss eine zentrale Toleranz bei Wildtyp-Mäusen weitgehend aus. Hingegen wäre eine periphere Toleranzinduktion – zum Beispiel durch vom Tumor induzierte regulatorische T-Zellen – eine denkbare Erklärung für die beobachtete Immunresistenz der subkutanen mGC3-Tumoren.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren beschrieben, wie regulatorische T-Zellen in Mäusen depletiert werden können. Eine interessante und relativ neue Methode beschreibt die Verwendung des Zytostatikums Cyclophosphamid in niedriger Dosierung. Hierfür ist ein relativ spezifischer dezimierender Effekt auf FoxP3-positive regulatorische T-Zellen beschrieben (Ghiringhelli et al., 2004; Loeffler et al., 2005; Lutsiak et al., 2005).

Effekte von Cyclophosphamid im therapeutischen Setting

Wir haben Cyclophosphamid in der Dosierung 100 mg/kg (Lutsiak et al., 2005) alleine und in Kombination mit der spezifischen Kombinationstherapie aus dendritischen Zellen und CpG-B zur Behandlung subkutaner mGC3-Tumoren eingesetzt. Es zeigte sich in keiner Gruppe ein Unterschied in Tumorgröße oder Überleben nach der Verabreichung von Cyclophosphamid. Niedrig dosiertes Cyclophosphamid hat also in unserem Modell keinen Einfluss auf die Tumortherapie.

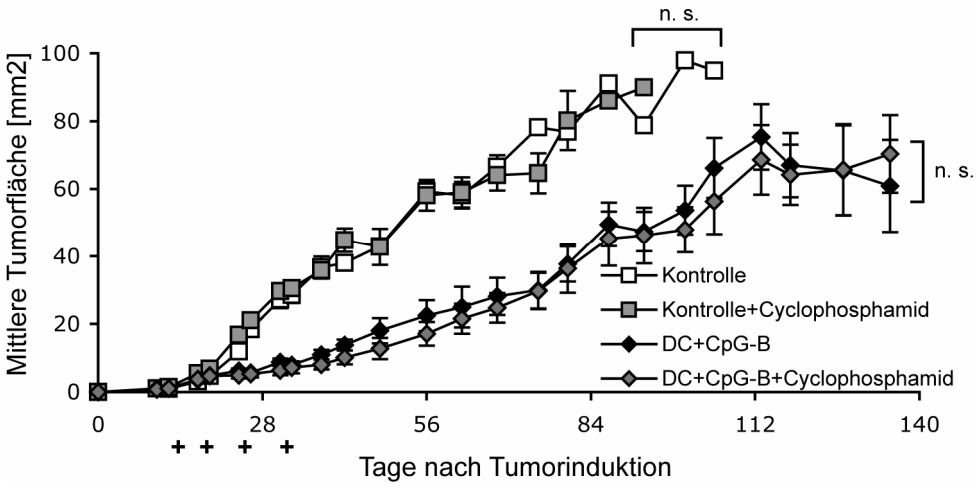

Abbildung 3.6: Cyclophosphamid beeinflusst nicht das Ergebnis der Tumortherapie

Die Abbildung zeigt Subgruppen aus dem in Abbildung 3.5 gezeigten Versuch. Die spezifische Therapie mit dendritischen Zellen und CpG-B begann an Tag 14 nach Tumorinduktion. Jeweils zwei Tage vor jedem Therapiezeitpunkt wurde je der einen Hälfte der Kontrollmäuse (n = 10) und der Therapiemäuse (n = 20) jeweils 2 mg (100 mg/kg) Cyclophosphamid i.p. verabreicht. Die Abbildung zeigt die mittleren Tumorgrößen in Therapie- und Kontrollgruppen.

3.1.2. Therapie der CEA424-TAg-Mäuse

3.1.2.1. Immunkompetenz von Mäusen mit dem CEA424-TAg-Tumor

Wir hatten festgestellt, dass subkutane mGC3-Tumoren gut auf prophylaktische, jedoch wesentlich schlechter auf therapeutische Immunisierung ansprachen. Eine mögliche Erklärung war eine Immunsuppression durch den Tumor. Für viele fortgeschrittene Tumoren ist gezeigt worden, dass sie das Immunsystem global schwächen und damit auch die antitumorale Immunantwort behindern können (Reiman et al., 2007). Wir injizierten einer transgenen Maus mit lange etabliertem autochthonen CEA424-TAg-Tumor (Lebtag 89) sowie einer Wildtyp-Kontrolle CpG-B subkutan, um die Auswirkungen des TAg-Tumors auf das Immunsystem zu untersuchen (Abbildung 3.7).

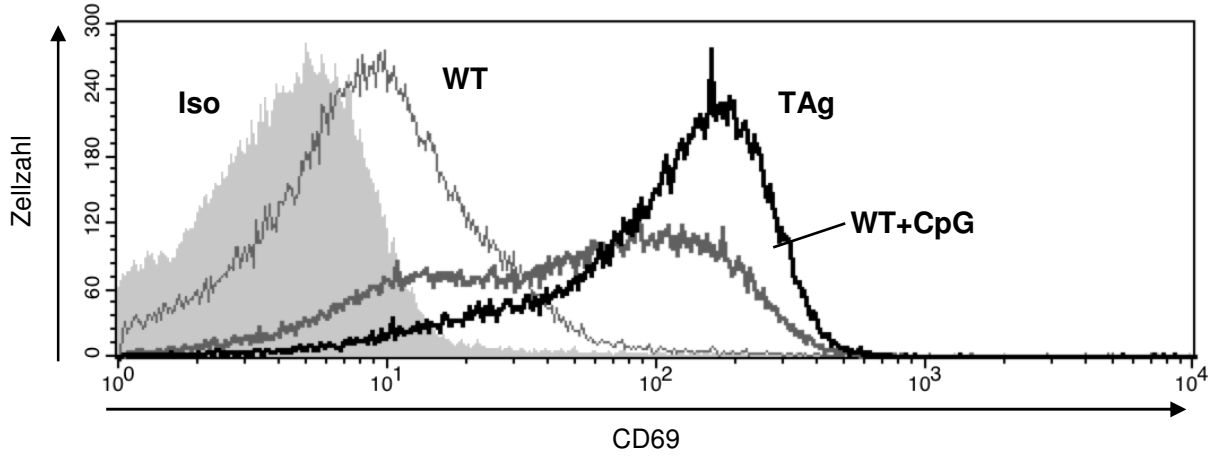

Abbildung 3.7: Lymphozyten und dendritische Zellen CEA424-TAg-tumortragender Mäuse lassen sich durch CpG in vivo aktivieren

Je einer Wildtyp-Maus sowie einer transgenen Maus mit etabliertem orthotopem TAg-Tumor (Lebtag 89) wurden je 100 µg CpG-B subkutan verabreicht. 2h sowie 24h danach wurde den Mäusen Blut abgenommen, sowie nach Euthanisierung 24h nach CpG-Gabe die Milzen entnommen. Daraufhin wurden in der Durchflusszytometrie Aktivierungsmarker auf DC, NK-, T- und B-Zellen bestimmt sowie die Konzentration von IL-12 und IFN-α im Serum verglichen. Die Abbildung zeigt beispielhaft ein Histogramm der CD69-Fluoreszenz auf B-Zellen (hellgrau unterlegt: Isotyp-Färbung: **Iso**, dunkelgrau dünn: unbehandelte Wildtyp-Maus: **WT**, dunkelgrau fett: CpG-behandelte Wildtyp-Maus: **WT+CpG**, schwarz fett: CpG-behandelte TAg-Maus: **TAg**). Die Ergebnisse waren vergleichbar für alle untersuchten Zelltypen sowie für die Zytokinkonzentrationen im Serum (Daten nicht gezeigt).

CD69 ist ein Oberflächenmolekül auf Lymphozyten, das als Marker für die Aktivierung von Lymphozyten herangezogen werden kann. Bei Stimulation mit CpG-B wurde CD69 auf den T- und B-Zellen sowohl tumortragender CEA424-TAg-Mäuse wie auch bei Wildtyp-Kontrolltieren vermehrt exprimiert (Abbildung 3.7). Ähnliche Ergebnisse fanden wir in Aktivierungsmarkern von dendritischen Zellen sowie natürlichen Killerzellen, außerdem auch

im Serum-Zytokinprofil der untersuchten Mäuse (Daten nicht gezeigt). Dies macht eine globale Immunsuppression als Ursache für das mangelnde Ansprechen der Tumoren auf Therapie unwahrscheinlich.

3.1.2.2. Adoptiver Transfer

Die bisherigen Versuche an Wildtyp-C57Bl/6-Mäusen im subkutanen Modell haben gezeigt, dass etablierte mGC-Tumoren schwieriger mit Immuntherapie zu behandeln sind als oft verwendete schneller wachsende Tumoren. Auch vorhergehende Versuche in unserer Arbeitsgruppe, durch dendritische Zellen und CpG-B-Vakzinierung in TAg-Mäusen eine antitumorale Antwort zu erzeugen, waren erfolglos. Diese Ergebnisse weisen auf eine starke periphere und zentrale Immuntoleranz in den CEA424-TAg transgenen Mäusen hin. Wir waren nun aber in der Lage, eine spezifische, dauerhafte und effektive Immunantwort gegen mGC3 in Wildtyp-Mäusen zu induzieren. Wir wollten untersuchen, ob sich diese Immunität durch einen adoptiven Transfer von Leukozyten immunisierter Tiere auf andere Wildtyp-Mäuse oder auch auf die CEA424-TAg-Mäuse übertragen lässt.

Subkutanes Modell

Für den adoptiven Transfer wurden Milzzellen von Mäusen verwendet, die nach prophylaktischer und therapeutischer Immunisierung einen subkutanen mGC3-Tumor vollständig abstießen und auch etwa ein halbes Jahr danach ohne weitere Therapie nach erneuter Injektion von mGC3-Zellen („Rechallenge“) tumorfrei blieben (Tabelle 3.3). Diese Milzzellen wurden naiven Wildtyp-Mäusen zwei Tage vor subkutaner mGC3-Tumorinduktion i.v. und i.p. verabreicht. Wie Abbildung 3.8 zeigt, genügen die Milzzellen immunisierter Mäuse, um das Wachstum subkutaner mGC3-Tumoren zu verlangsamen und den Tod der Tiere als primären Endpunkt signifikant hinauszuzögern. Eine Maus blieb nach adoptivem Transfer von Splenozyten einer immunisierten Spendermaus sogar gänzlich tumorfrei trotz Injektion einer letalen Dosis von mGC3-Zellen. Dies bestätigt das im Rechallenge demonstrierte immunologische Gedächtnis und belegt zusätzlich, dass die Immunität durch Lymphozyten vermittelt ist.

	DC-Vakzine	1. Tumor-challenge	Beobachtung	2. Tumor-challenge	Beobachtung	Adoptiver Transfer
Lebtag	28-49	41		228		331

Tabelle 3.3: Übersicht des zeitlichen Verlaufs der Immunisierung der Spendermäuse für den Versuch in Abbildung 3.8

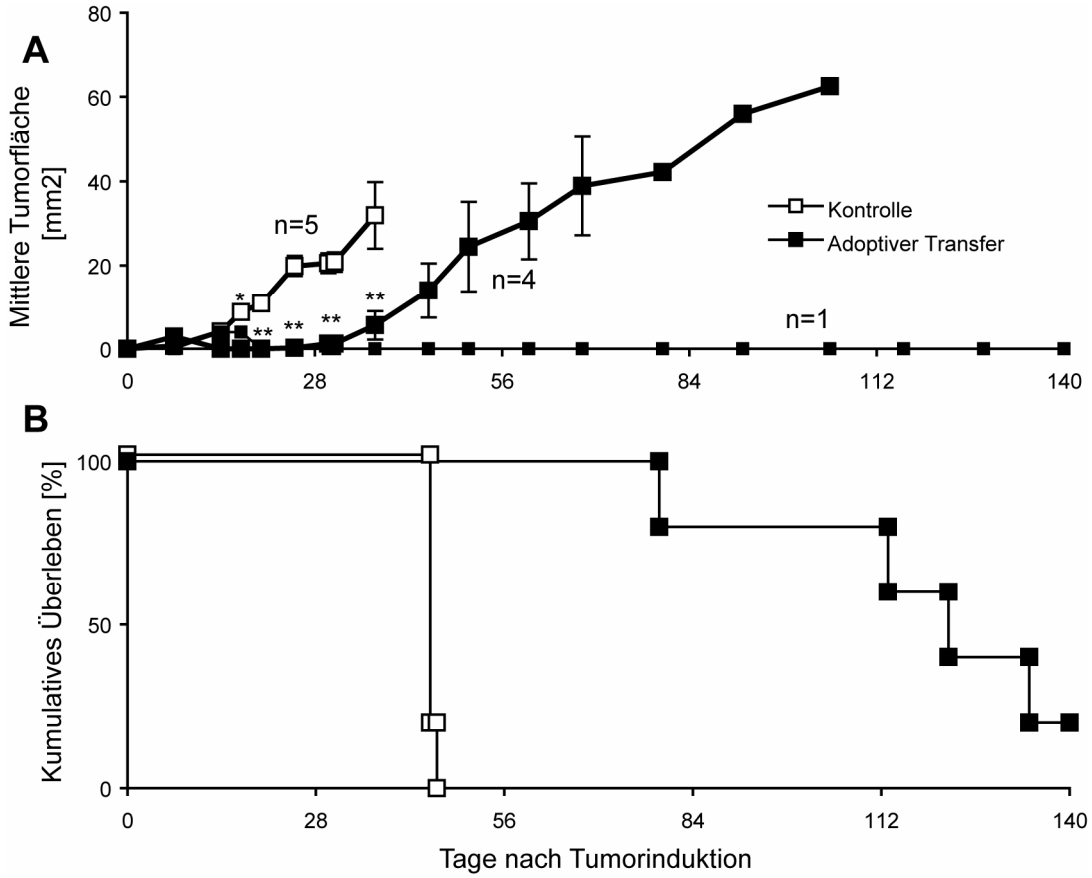

Abbildung 3.8: Der adoptive Transfer von Splenozyten immunisierter Mäuse ist effektiv gegen subkutane mGC3-Tumoren

Zwei Tage vor Induktion subkutaner mGC3-Tumoren (3×10^6 Zellen) erhielten fünf naive C57Bl/6-Mäuse jeweils die Hälfte aller Splenozyten (min. 36 bis max. 65×10^6 Zellen) einer immunisierten Spendermaus. Abbildung **A** zeigt die gemessenen Tumorgrößen ab Tumorinduktion (Tag 0), eine tumorfreie Maus der Therapiegruppe wurde aus der Mittelwertsdarstellung herausgenommen (für Standardfehler des Mittelwerts und Signifikanz normal mitgerechnet). **B** zeigt das kumulative Überleben beider Versuchsgruppen, das für Versuchstiere nach adoptivem Transfer signifikant verlängert war ($p = 0{,}002$).

CEA424-TAg-Mäuse – subkutane Markertumoren

Fünf transgene Mäuse aus zeitlich nah aneinander liegenden Würfen erhielten an ihrem 38. bis 43. Lebenstag Splenozyten aus gegen mGC3 immunisierten naiven Mäusen. Zwei Tage später wurden diesen transgenen Tieren sowie fünf weiteren aus den gleichen Würfen zusätzlich subkutan $3x10^6$ mGC3-Zellen injiziert. Der Wachstumsverlauf der subkutanen Tumoren ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

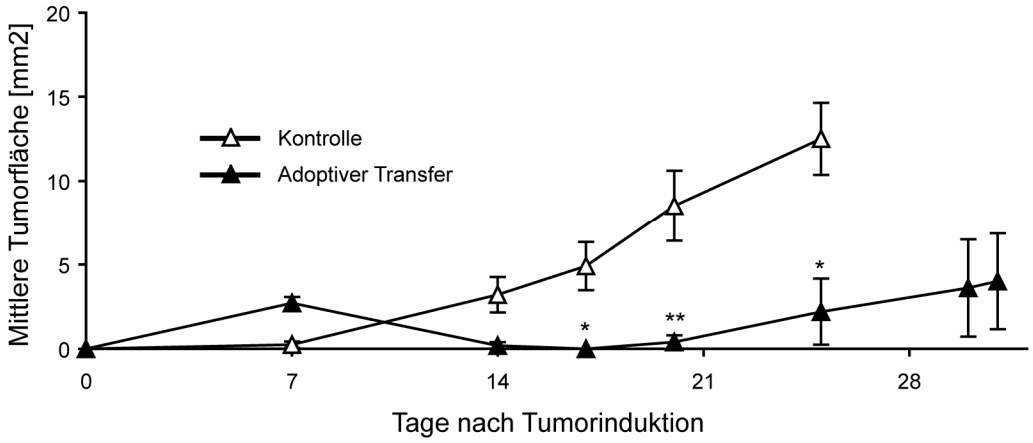

Abbildung 3.9: Auch in CEA424-TAg-Mäusen zeigt sich der adoptive Transfer effektiv gegen subkutan injizierte mGC3-Tumoren

Die Abbildung zeigt die mittleren Tumorgrößen von zehn TAg-Mäusen nach subkutaner Induktion von Tumoren durch je 3×10^6 mGC3-Zellen. Fünf Mäuse erhielten zwei Tage vor Tumorchallenge einen adoptiven Transfer mit je 36 bis 65×10^6 Splenozyten von immunisierten Spendermäusen.

Wir entschlossen uns in diesem aufwändigen und langwierigen Experiment die subkutanen und orthotopen Tumoren histologisch aufzuarbeiten, da dies eine detailliertere und umfangreichere Aussage über die Effekte des adoptiven Transfers ermöglichen würde als der primäre Endpunkt Überleben. Nachdem zwei Tiere aus der Kontrollgruppe überraschend an ihrem 72. Lebtag (Tag 29 nach subkutaner Tumorinduktion) verstarben, entschlossen wir uns, bereits an Tag 31 nach Tumorchallenge sämtliche Mäuse zu euthanasieren, subkutane wie orthotope Tumoren zu entnehmen und histologisch aufzuarbeiten.

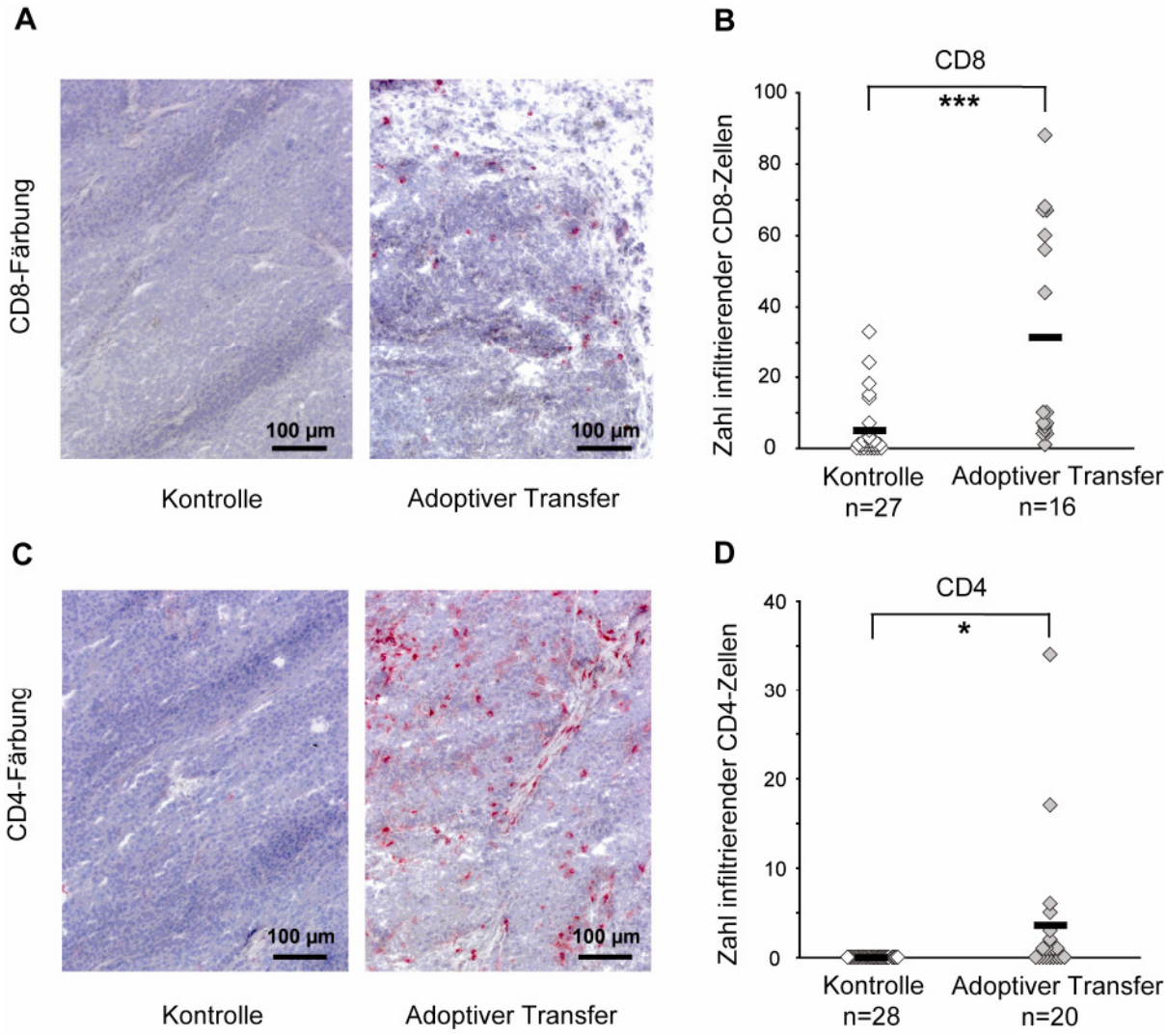

Abbildung 3.10: TAg-Mäuse zeigen eine vermehrte Infiltration subkutaner mGC3-Tumoren mit CD8-positiven T-Zellen nach adoptivem Transfer

Aus den drei bis dahin überlebenden Kontrollmäusen und den fünf Mäusen mit adoptivem Transfer wurden die subkutan induzierten mGC3-Tumoren entfernt. Wie auch im analogen Versuch bei naiven Mäusen (siehe Abbildung 3.8) war in einer der therapierten Mäuse kein subkutaner Tumor auffindbar. Abbildungen **A** und **C** zeigen Hämalaun-gefärbte histologische Schnitte der subkutanen Tumoren von Tieren aus der Kontroll- und Therapiegruppe. In **A** wurden $CD8^+$-Zellen spezifisch rot angefärbt, in **C** $CD4^+$-Zellen. Abbildungen **B** und **D** zeigen zugehörige Auszählungen von mikroskopischen Gesichtsfeldern mit dem jeweiligen Mittelwert. Bei der histologischen Beurteilung wurde die Gruppenzugehörigkeit der Präparate verblindet, um einen Rosenthal-Effekt bei der Befundung auszuschließen.

Auch 33 Tage nach adoptivem Transfer sind die subkutanen Tumoren in behandelten CEA424-TAg-Mäusen nicht nur wie in Abbildung 3.9 gezeigt kleiner als in Kontrolltieren, sie sind auch signifikant stärker durch T-Lymphozyten infiltriert (Abbildung 3.10). Wie im Vorversuch mit naiven Tieren (Abbildung 3.8) bereits gesehen war auch in einer der fünf CEA424-TAg-Mäuse der adoptive Transfer hinreichend, um die Manifestation eines klinisch, chirurgisch oder sogar histologisch nachweisbaren subkutanen Tumors trotz letaler mGC3-Zelldosis zu verhindern.

CEA424-TAg-Mäuse – Orthotoper Tumor

Auch die orthotop entstehenden Tumoren der 73 bis 78 Tage alten transgenen Mäuse wurden histologisch aufgearbeitet. Hierzu wurde bei allen Mäusen der obere Gastrointestinaltrakt von der Kardia bis zur Ampulla duodeni en bloc entnommen und an der kleinen Kurvatur entlang aufgeschnitten.

In einer der fünf durch adoptiven Transfer von Lymphozyten immunisierter Spendermäuse behandelten Mäuse fand sich auch mikroskopisch kein Tumor in der Pylorusregion. In den übrigen vier Tieren der Therapiegruppe wiesen die Karzinome und die angrenzende Submucosa eine signifikant stärkere $CD8^+$-T-Zell-Infiltration auf als die Kontrolltiere (Abbildung 3.11). Mehrere Nekroseareale, wie in Abbildung 3.11G dargestellt, waren ausschließlich in den Magenkarzinomen therapierter Tiere zu finden. In der Zusammenschau legt dies den Verdacht auf aktive Abstoßungsvorgänge nach dem adoptiven Transfer nahe. Trotz des verminderten Wachstums der subkutanen Markertumore und der deutlich erhöhten Infiltration mit Nekrosen stellten wir jedoch keinen signifikanten Unterschied in den histologisch gemessenen Größen des orthotopen Tumors fest.

Im Tumor selbst waren wenige der zytotoxischen T-Lymphozyten zu finden, trotz einer deutlichen Infiltration der Submucosa. Angesichts dieser Erkenntnis galt unser besonderes Interesse den Mechanismen der immunologischen Vorgänge im Gastrointestinaltrakt, um Wege zu erforschen, die Effektorzellen effizienter und in größeren Zahlen an ihren Wirkort zu leiten.

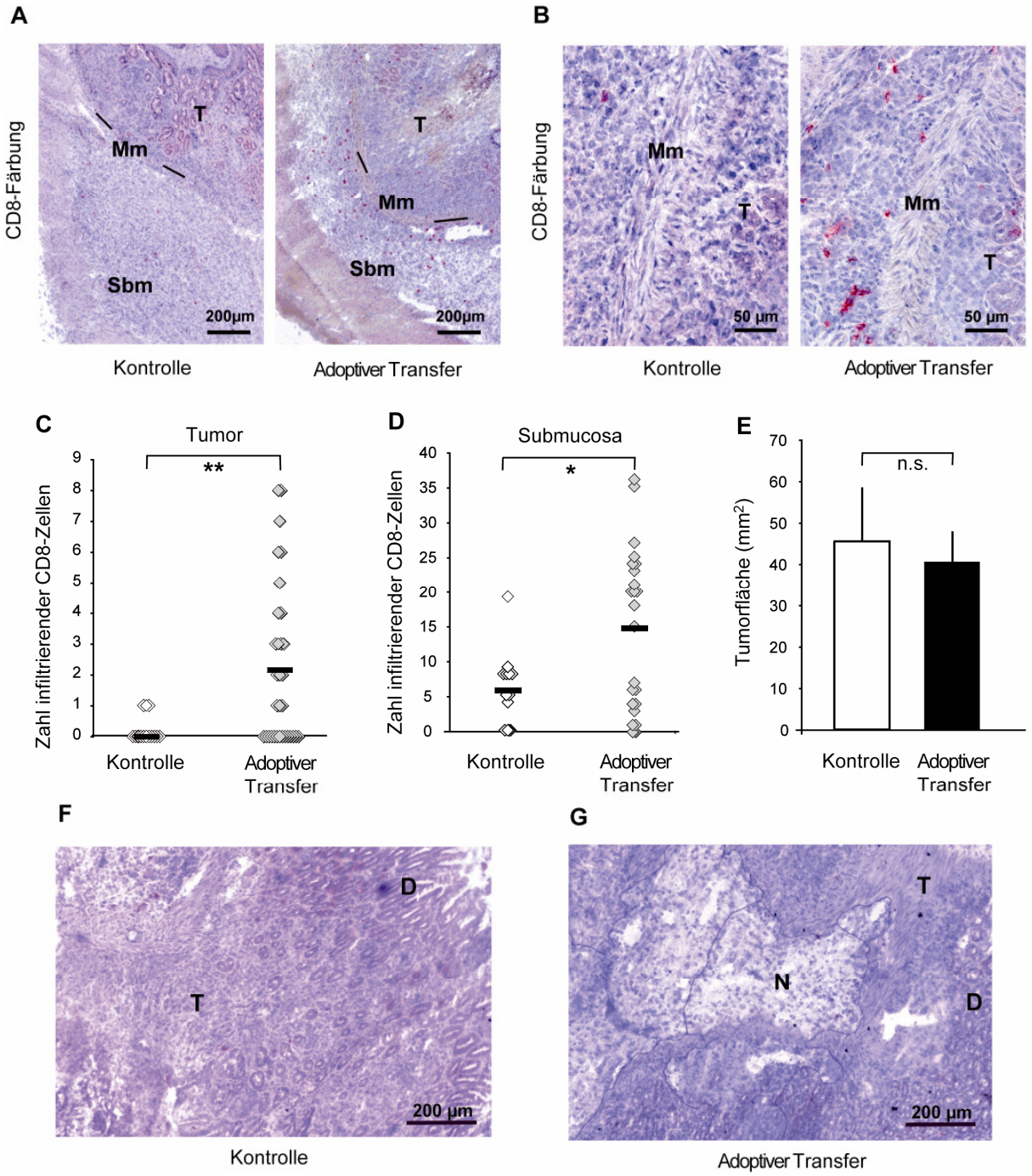

Abbildung 3.11: Die orthotopen Magentumore im Pylorusbereich transgener Mäuse sind nach adoptivem Transfer stärker mit T-Lymphozyten infiltriert.

Abbildungen **A** und **B** zeigen histologische mit Hämalaun und spezifischer CD8-Färbung (rot) behandelte Schnitte durch orthotope Tumoren und angrenzendes Gewebe von therapierten und Kontrolltieren in unterschiedlicher Vergrößerung (**Sbm**: Tela submucosa, **Mm**: Lamina muscularis mucosae, **T**: Tumor). In **C** und **D** sind Auszählungen der T-Zellen je Gesichtsfeld in Tumor bzw. Submucosa mit jeweiligem Mittelwert dargestellt. **E** zeigt den Durchschnitt der gemessenen maximalen Tumorflächen. **F** zeigt beispielhaft das invasive Wachstum des Tumors, in **G** ist eines der Nekroseareale (**N**) dargestellt, die wir nur im Tumorgewebe therapierter Tiere fanden (**D**: differenzierte Magenschleimhaut).

3.2. Wirkung von *Toll-like*-Rezeptor-Liganden auf Immunzellen aus dem Gastrointestinaltrakt

Die Tumoren der TAg-Mäuse sind einer Immuntherapie grundsätzlich zugänglich, dies beweisen die in Kapitel 3.1 vorgestellten Versuche. Die entartete Magenschleimhaut mit adoptivem Transfer behandelter Tiere war deutlich weniger von Immunzellen infiltriert als tiefere Schichten. Aktive *Tumor immune escape*-Vorgänge wären als Erklärung hierfür denkbar, jedoch stellt der Gastrointestinaltrakt wie eingangs beschrieben auch ein immunprivilegiertes Kompartiment dar (Iweala et al., 2006). Wir setzten uns daher zum Ziel, die Immunantwort in Schleimhäuten des Gastrointestinaltrakts genauer zu untersuchen. Hierfür erschien es vielversprechend, die dort vorhandenen Immunzellen zu analysieren und herauszufinden, wie wir in unserem Modell eine stärkere Migration von Immunzellen in dieses Kompartiment erwirken können.

3.2.1. *In vitro*-Versuche

3.2.1.1. Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten reagieren auf Stimulation wie jene aus Milz oder peripheren Lymphknoten

Als gut zugängliches sekundäres lymphatisches Organ, in dem Antigen-Präsentation im Fall des in-situ-Magenkarzinoms wahrscheinlich ist, boten sich die mesenterischen Lymphknoten (MLN) an. In einem ersten Schritt wurde die Reaktion der Lymphozyten des *gut-associated lymphatic tissue* auf Stimulation mit der von T- und B-Zellen aus anderen Immunmilieus, nämlich Milz und peripheren (axillären, inguinalen und poplitealen) Lymphknoten (PLN) verglichen.

Zur Stimulation wurden CpG-B und Resiquimod als *Toll-like* Rezeptor-Liganden (Rezeptor 9 und 7) verwendet, sowie für T-Zellen direkt stimulierende Antikörper gegen CD3. Da dendritische und B-Zellen *Toll-like* Rezeptoren 7 und 9 besitzen, T-Zellen jedoch nicht, ist deren Stimulation durch *Toll-like* Rezeptor-Liganden als indirekter Effekt zu werten.

CD69, auch bekannt als Activation Inducer Molecule, wird unter Anderem auf T- und B-Zellen nach Aktivierung verstärkt exprimiert und in der Literatur verbreitet als Aktivierungsmarker eingesetzt. In Vorversuchen haben wir jedoch gefunden, dass CD25 (α-Kette des Interleukin-2 Rezeptor) im Vergleich mit CD69 einen verzögerten aber gleichförmigen Anstieg bei Aktivierung der Zelle zeigt (CD69 erreichte bereits nach vier Stunden ein Maximum, während CD25 über sechs Stunden weiter anstieg, Daten nicht

gezeigt). Da unsere Messzeiträume im Bereich von Tagen und nicht Stunden lagen, entschieden wir uns für CD25 als Aktivierungsmarker.

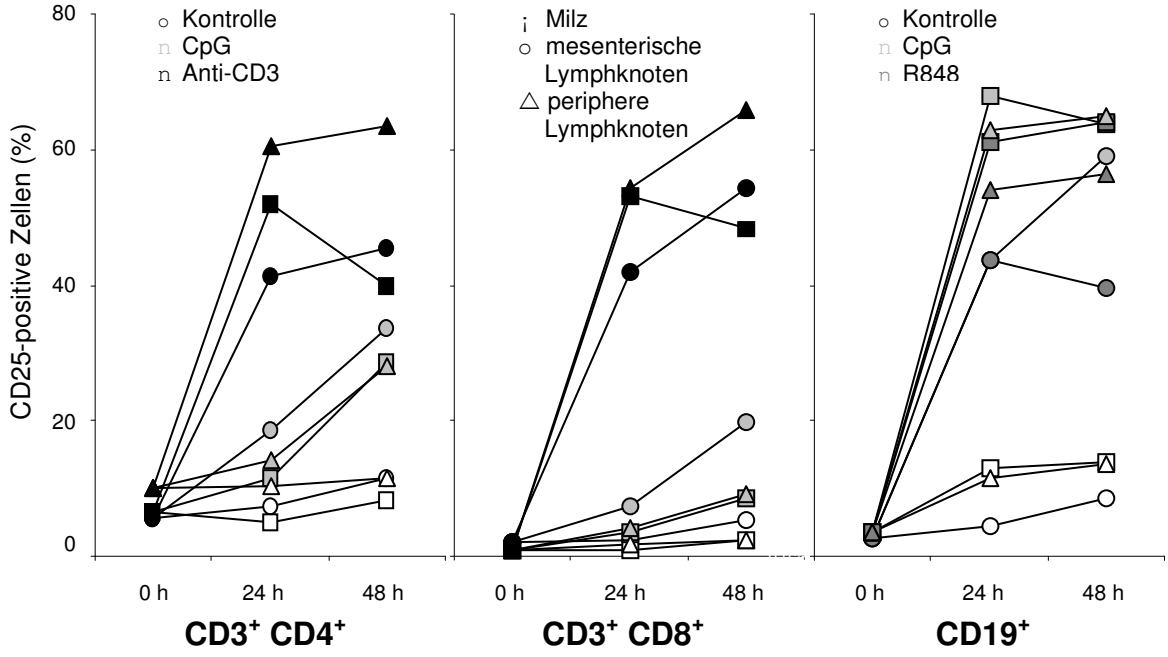

Abbildung 3.12: Lymphozyten aus MLN lassen sich durch Anti-CD3 und TLR-Liganden stimulieren

Zellen aus Milz (¡), mesenterischen (o) und peripheren Lymphknoten (△) wurden aus naiven Mäusen gewonnen und mit oder ohne Stimulation in Leukozytenmedium in Kultur genommen. Weiß gefüllte Symbole zeigen unstimulierte Zellen, hellgraue (n) 6µg/ml CpG, dunkelgraue (n) 0,5 µg/ml Resiquimod und schwarze (n) 1 µg/ml Anti-CD3-Stimulation. Die Zellen wurden per FACS-Färbung in $CD3^+CD4^+$ T-Zellen, $CD3^+CD8^+$ T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen unterschieden und ihre Aktivierung anhand der Expression von CD25 auf der Oberfläche gemessen. Die Daten sind repräsentativ für drei Versuche mit identischem Readout.

In Abbildung 3.12 ist ersichtlich, dass sowohl T- als auch B-Zellen auf adäquaten Reiz (Anti-CD3 für T-Zellen, CpG und Resiquimod für B-Zellen) mit aktiviertem Phänotyp reagieren. Dies geschah weitgehend gleichförmig in Milz, mesenterischen und peripheren Lymphknoten.

Ein weiteres wichtiges Kriterium neben der Aktivierung ist das Proliferationsverhalten der Lymphozyten auf einen Stimulus hin. Dazu wurden Zellen aus den verschiedenen lymphatischen Organen mit dem Zellfarbstoff CFSE gefärbt und in Kultur genommen. Bei der Zellteilung wird das zytoplasmatische CFSE auf beide Tochterzellen aufgeteilt und die

Fluoreszenzintensität vermindert sich. Wie die Daten in Abbildung 3.13 zeigen, reagieren T- und B-Zellen aus allen Organen gleichförmig mit Proliferation auf adäquaten Stimulus (Anti-CD3 bzw. *Toll-like* Rezeptor 9 und 7-Liganden CpG und Resiquimod).

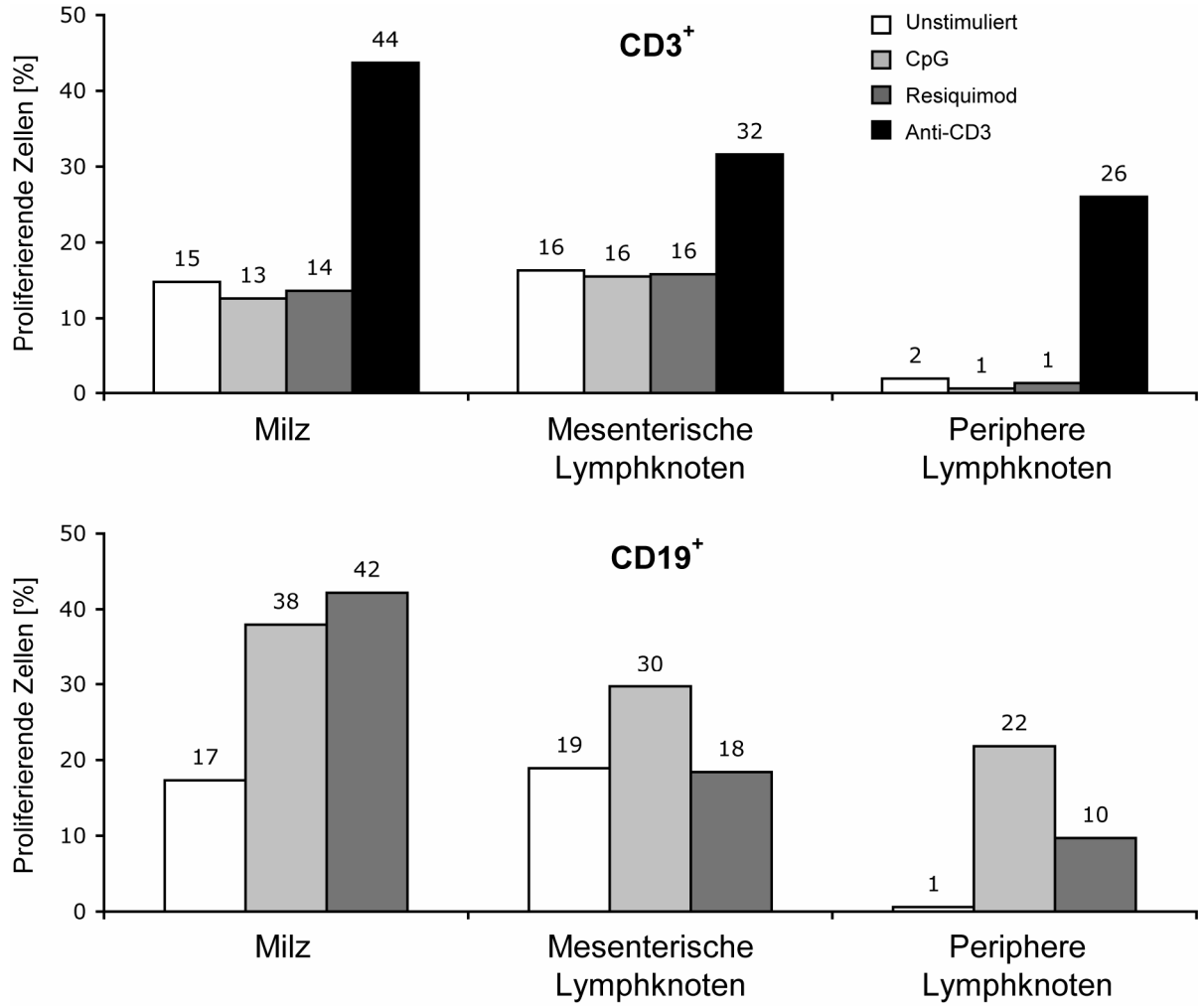

Abbildung 3.13: Lymphozyten aus MLN proliferieren nach Stimulation ähnlich wie Lymphozyten aus Milz und PLN.

Je 7x10^5 Zellen pro Ansatz wurden mit CFSE markiert und 72 Stunden lang inkubiert. Abbildungen **A** und **B** fassen die Anteile proliferierender Zellen in den CD3$^+$ (T-Zell-) und CD19$^+$ (B-Zell-) Populationen unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen zusammen.

3.2.1.2. Charakterisierung der Effektorzellen aus Peyer'schen Plaques

An vorderster Front in der Immunabwehr des Verdauungstrakts stehen die sogenannten Peyer'schen Plaques (Junt et al., 2008). Sie liegen dem Mesenterium gegenüber im Darm verteilt und sind im Gegensatz zu anderen sekundären lymphatischen Organen ständig einer Fülle von fremden Antigenen in der Nahrung ausgesetzt. Als wichtige Schaltstelle des *gut-associated lymphatic tissue* enthalten sie unter anderem Lymphozyten, M-Zellen und dendritische Zellen, die über Entzündung oder Toleranz gegenüber den Antigenen im Darmlumen entscheiden (Ramiro-Puig et al., 2008). Wir entwickelten ein optimiertes Verfahren der Entnahme und Aufbereitung von Peyer'schen Plaques, um Zellen daraus gewinnen und untersuchen zu können.

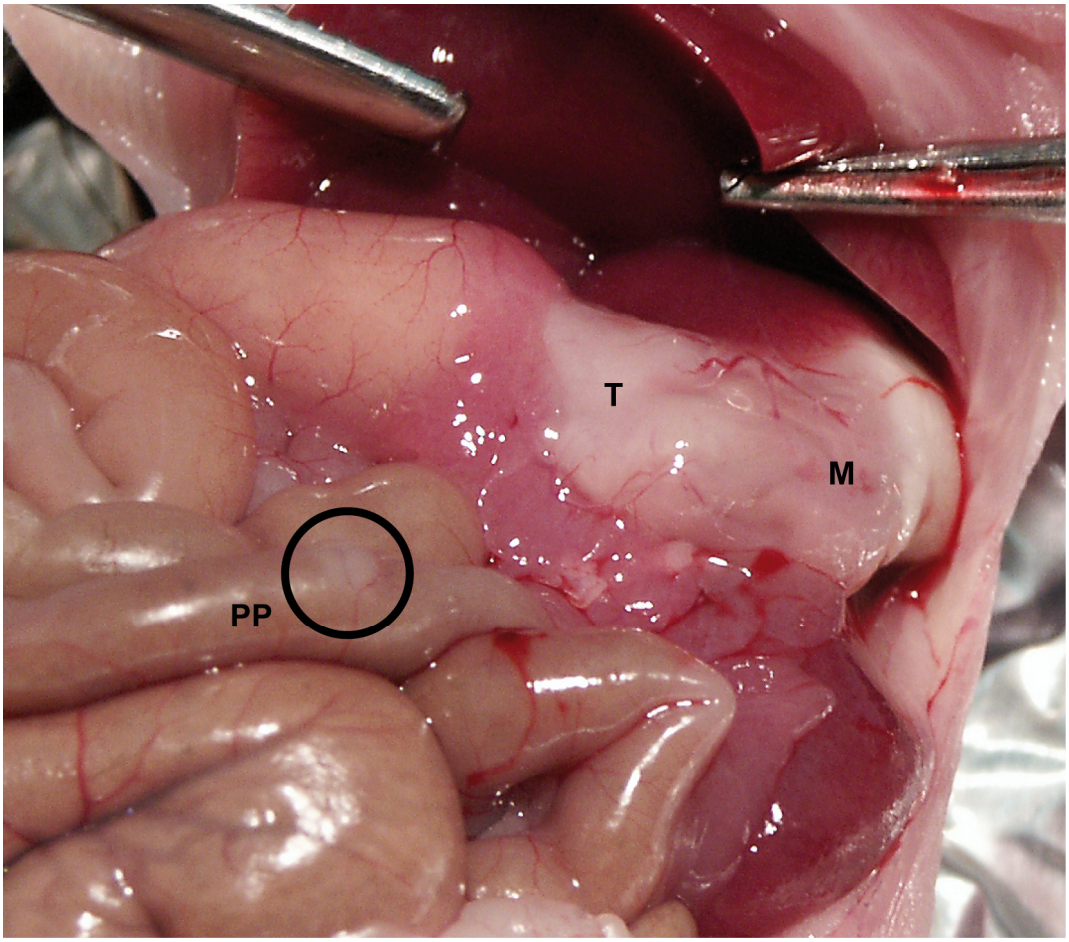

Abbildung 3.14: Situs am Beispiel einer CEA424-TAg-Maus
Die Abbildung zeigt den Blick auf die eröffnete Bauchhöhle einer 92 Tage alten CEA424-TAg-Maus. Die Pinzetten heben die Leber an, man sieht rechts den Magen (**M**) mit dem weißlich imponierenden Tumor (**T**) im Pylorusbereich. **PP** markiert einen der sichtbaren Peyer'schen Plaques.

Das Ursprungsgewebe Antigen-präsentierender Zellen hat maßgeblichen Einfluss auf das *Imprinting* und damit die Gewebespezifität, die diese Zellen aktivierten Lymphozyten verleihen (Mora et al., 2005). Daher lohnt der Versuch, T-Zellen und dendritische Zellen aus Peyer'schen Plaques zu isolieren, um diese Zellen zum *tissue targeting* unserer Immuntherapie auf den Gastrointestinaltrakt zu benutzen. Wir zeigten die deutliche Expression des LPAM-Integrins auf gewebeansässigen T-Zellen und isolierten plasmazytoide wie myeloide dendritische Zellen aus Peyer'schen Plaques (Abbildung 3.15).

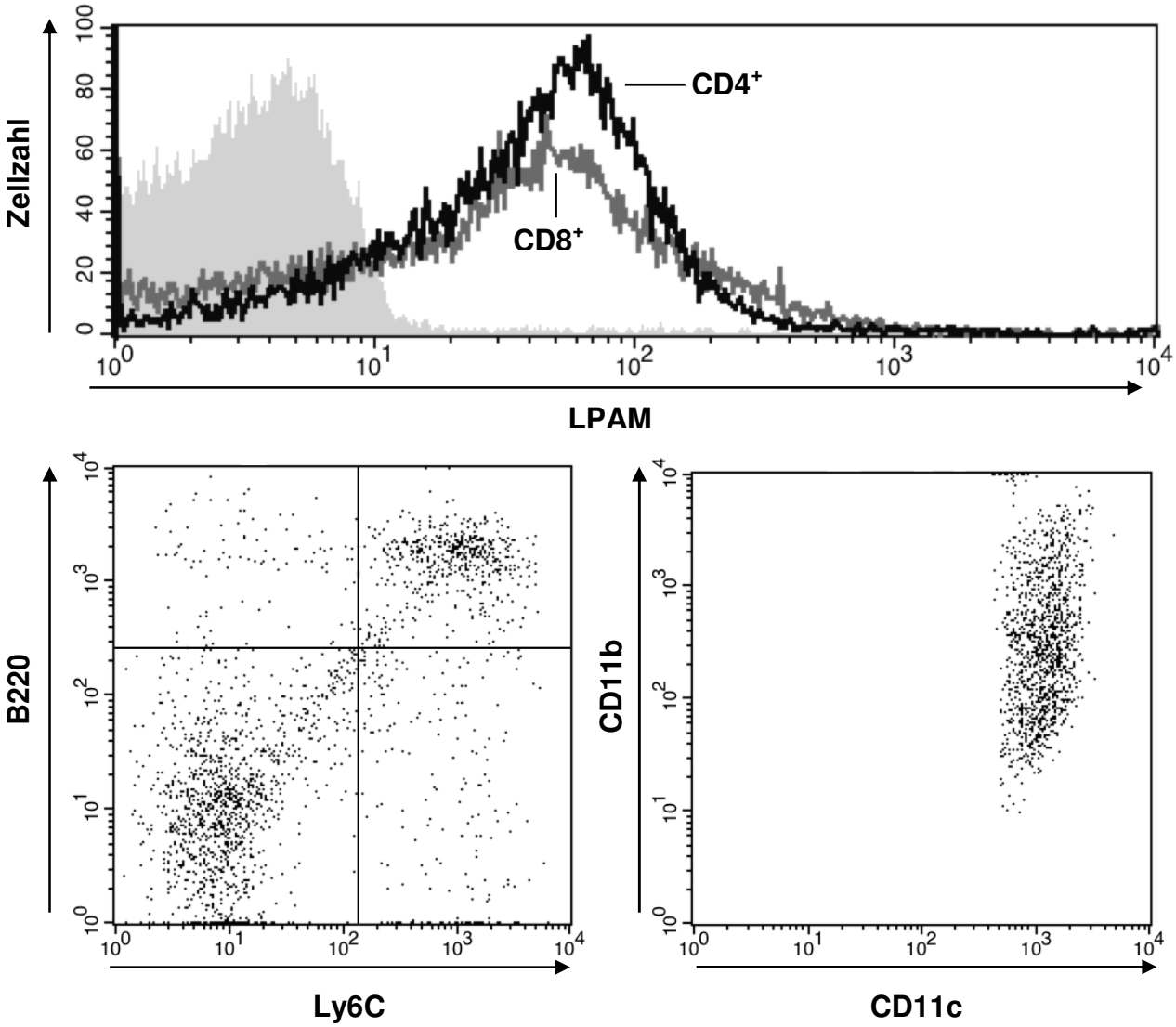

Abbildung 3.15: Phänotyp von Zellen in murinen Peyer'schen Plaques.
Einer naiven Maus wurden 6 Peyer'sche Plaques entnommen, die Zellen isoliert, mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Abbildung **A** zeigt die Expression des LPAM-Integrins auf $CD3^+CD4^+$ T-Zellen (schwarz) und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen (dunkelgrau) gegenüber der Isotyp-Kontrolle (hellgrau). In Abbildung **B** sind die Marker B220 und Ly6C im $CD11c^+$ Gate aufgetragen. Die dreifach positive Population ($CD11c^+B220^+Ly6C^+$) stellt plasmazytoide dendritische Zellen dar, während die $B220^-Ly6C^-$ Population weitgehend CD11b positiv (in Abbildung **C** gezeigt) und damit myeloiden Ursprungs ist. Mit diesen Gates ergeben sich in den Quadranten insgesamt ca. 3.000 myeloide und 1.000 plasmazytoide dendritische Zellen pro Maus.

Die Aufreinigung von ex vivo isolierten dendritischen Zellen ist zwar gelungen, nach Sortierung durch MACS blieben aber nur etwa 3.000 myeloide und 1.000 plasmazytoide dendritische Zellen aus den Peyer'schen Plaques einer Maus. In Anbetracht der von uns für Immunisierungen vorgesehenen Zellzahl von 200.000 dendritischen Zellen wäre eine Verwendung von direkt aus Peyer'schen Plaques isolierten dendritischen Zellen daher nicht praktikabel.

Migration CFSE-markierter, aktivierter dendritischer Zellen nach i.p.-Injektion

Da wir die für die dendritische Zellvakzine nötige Zellzahl nur durch die etablierte Knochenmarkskultur erzeugen konnten, wollten wir herausfinden, ob eine i.p.-Injektion von den dendritischen Zellen aus Kultur eine bevorzugte Migration der Zellen in lymphatische Organe des Gastrointestinaltrakts bewirken kann. Könnte man auf diesem Weg Antigen-gepulste, aktivierte dendritische Zellen bevorzugt in mesenterische Lymphknoten oder Peyer'sche Plaques befördern, wäre so ein besseres *tissue targeting* unserer Therapie denkbar. Versuchsmäusen wurden je $5x10^6$ mit CFSE markierte dendritische Zellen intraperitoneal injiziert, am nächsten Tag die Milzen, mesenterischen und peripheren Lymphknoten sowie die Peyer'schen Plaques entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei fanden wir die dendritischen Zellen in allen injizierten Tieren wieder, fanden jedoch keine spezifische Anreicherung in den sekundären lymphatischen Organen des Gastrointestinaltrakts (Abbildung 3.16). Auch durch den intraperitonealen Applikationsweg dendritischer Zellen scheint nach diesen Ergebnissen also kein effektives *tissue targeting* der Immunantwort möglich.

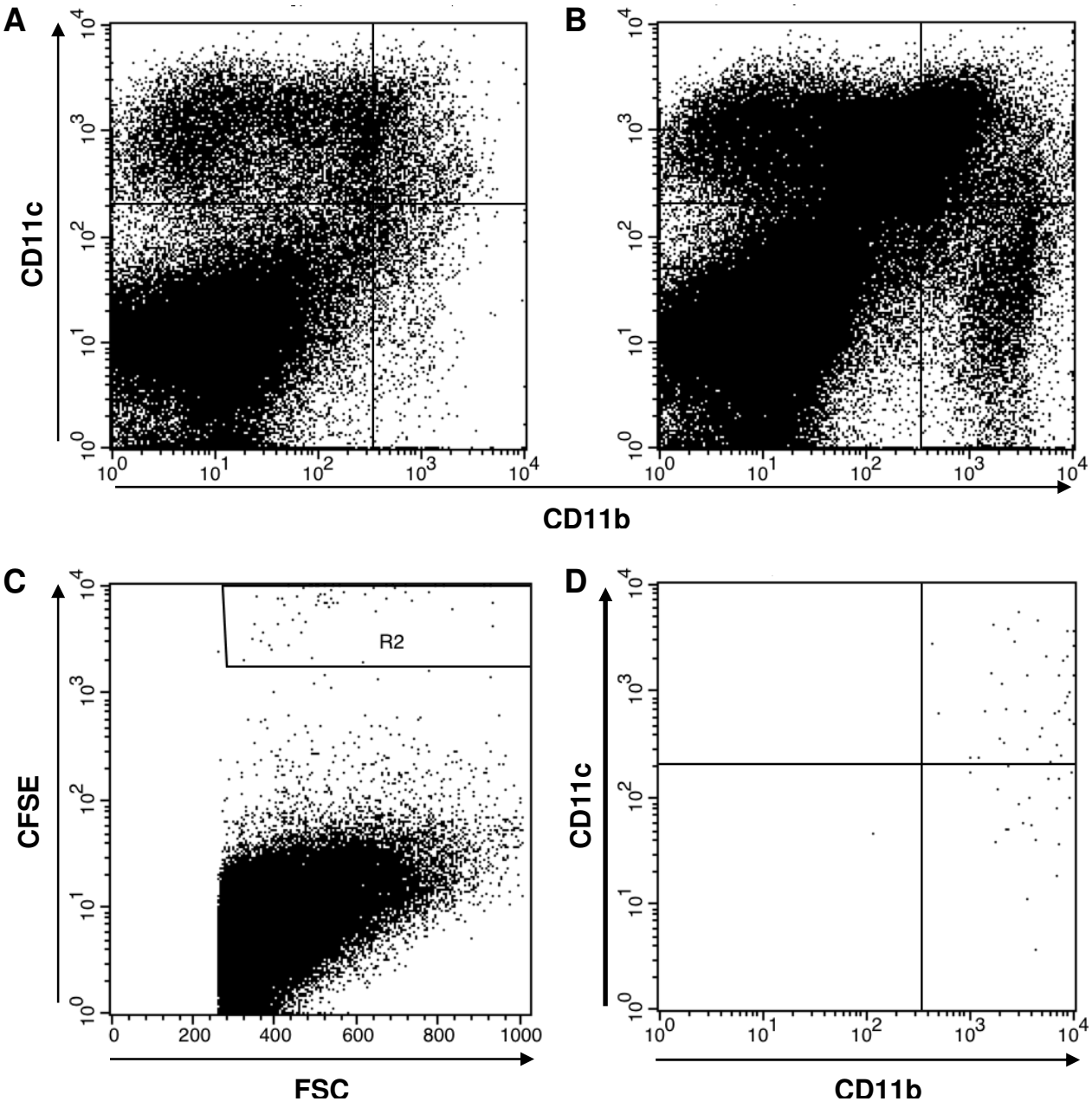
A
B
CD11c
CD11b
C
D
R2
CFSE
FSC
CD11c
CD11b
E
780
60
50
40
30
20
10
0
774
39
18
16
13
5
5
3
2
2
2
1
1
0
0
0
Kontrollmaus
Maus 1
Maus 2
Maus 3
Milz (ca. 800.000)
MLN (ca. 800.000)
PLN (ca. 550.000)
PP (ca. 800.000)

Abbildung 3.16: Intraperitoneale Injektion von dendritischen Zellen aus Kultur führt zur Migration der Zellen in lymphatische Organe, jedoch nicht bevorzugt in den Gastrointestinaltrakt.

Drei naiven Mäusen wurden mit CFSE markierte dendritische Zellen aus GMCSF/IL-4-Kultur i.p. verabreicht. 24 Stunden später wurden diese Mäuse sowie eine weitere Maus, der nur Trägerflüssigkeit verabreicht wurde, euthanasiert und jeweils die Milzen, mesenterische und periphere Lymphknoten sowie Peyer'sche Plaques entnommen. **A** zeigt eine CD11b- und CD11c-Färbung der lebenden Zellen aus den mesenterischen Lymphknoten der Kontrollmaus, **B** die einer mit gefärbten dendritischen Zellen aus Kultur injizierten Maus. **C** veranschaulicht das Gate der CFSE-positiven Zellen anhand der mesenterischen Lymphknoten einer injizierten Maus. **D** zeigt diese Zellen in der CD11b und CD11c-Färbung und beweist, dass die gefundenen CFSE-positiven (injizierten) Zellen fast alle $CD11b^+$ sind, größtenteils $CD11b^+CD11c^+$ (myeloide dendritische Zellen). **E** zeigt eine Zählung der gefundenen $CFSE^+CD11b^+CD11c^+$-Zellen in den untersuchten Organen aller Tiere, in Klammern die Zahl der aufgenommenen lebenden Zellen aus diesen Organen. Die Daten sind repräsentativ für zwei gleichartige Versuche.

3.3. Gelatine-Nanopartikel als Träger für CpG-Oligonukleotide

Nachdem unsere Bemühungen, die Immunantwort durch exogen zugeführte dendritische Zellen auf die Gewebe des Gastrointestinaltrakts zu lenken sich als wenig aussichtsreich erwiesen, wollten wir ein anderes Konzept erforschen. Statt der Verwendung von *in vitro* mit CpG aktivierten dendritischen Zellen suchten wir nun einen Applikationsweg, der uns erlaubt, bereits vorhandene endogene dendritische Zellen der Versuchstiere im Milieu des Gastrointestinaltrakts mit den stimulierenden Oligonukleotiden zu erreichen. Hierfür verwendeten wir Gelatine-Nanopartikel von etwa 300 nm Durchmesser, die uns im Rahmen einer Kooperation von Dr. Klaus Zwiorek aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Conrad Coester zur Verfügung gestellt wurden.

3.3.1. Aufnahme in dendritische Zellen

Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde bereits gezeigt, dass die Gelatine-Nanopartikel in dendritische Zellen aufgenommen werden (Zwiorek et al., 2007). Um diese Aufnahme jedoch zum einen besser quantifizieren und zum anderen gleichzeitig andere Oberflächenmarker der dendritischen Zelle bestimmen zu können, haben wir die Aufnahme von Nanopartikeln in der Durchflusszytometrie gemessen.

Hierfür verwendeten wir mit Rhodamin oder Alexa Fluor 488 gefärbte Nanopartikel und durch GM-CSF und IL-4 differenzierte myeloide dendritische Zellen. Je 200.000 dendritische Zellen aus der Kultur wurden mit ansteigenden Mengen (**A**-**E**) von Nanopartikeln versetzt. In der Durchflusszytometrie sahen wir eine dosisabhängige Aufnahme von Nanopartikeln im FITC-Kanal (Abbildung 3.17). Außerdem fiel auf, dass die Nanopartikel-aufnehmenden dendritischen Zellpopulationen auch einen höheren side-scatter des Laser-Lichts (ein Maß für die Granularität der Zellen) produzierten (nicht gezeigt).

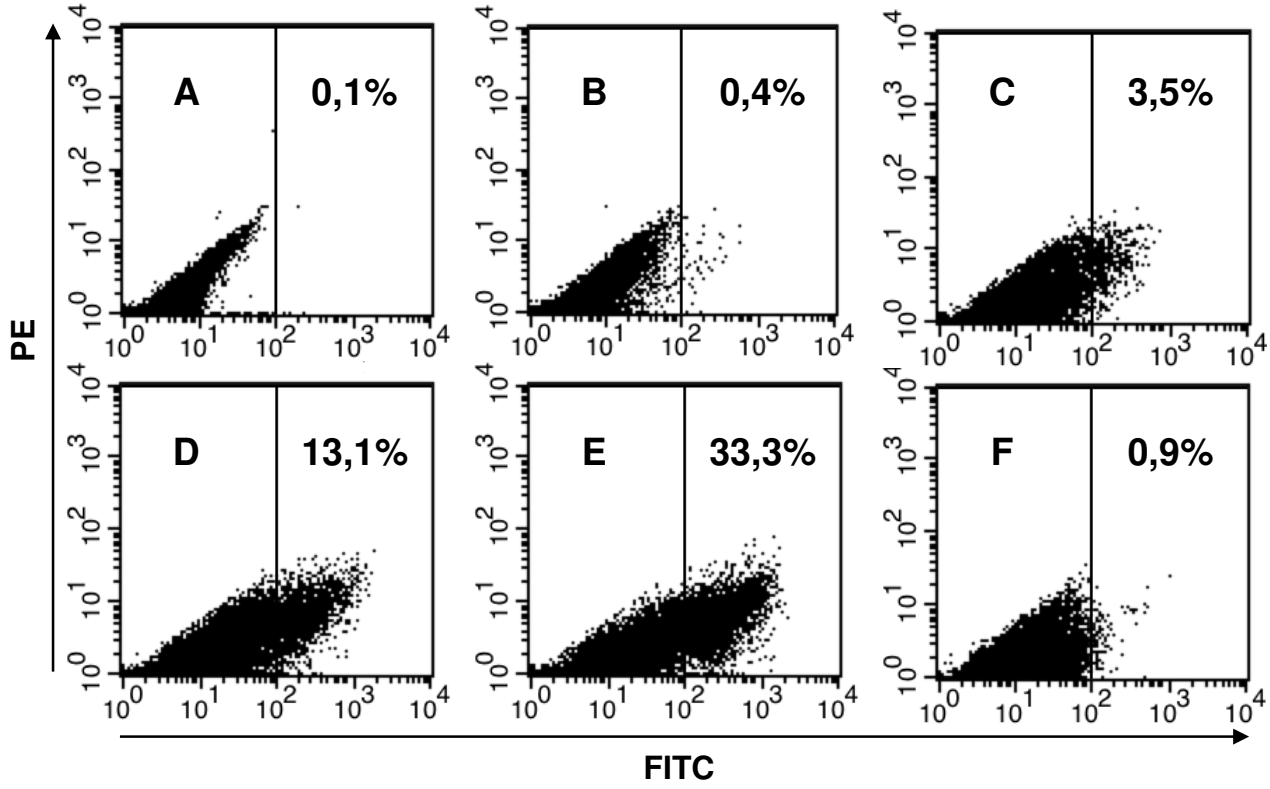

Abbildung 3.17: Die Aufnahme von gefärbten Nanopartikeln lässt sich gut im FACS darstellen.

Die Abbildung verdeutlicht, wie die Aufnahme von Nanopartikeln in dendritische Zellen durchflusszytometrisch gemessen wurde. Hierfür wurden keine (**A**), 3 µg (**B**), 10 µg (**C**), 30 µg (**D**) oder 100 µg (**E**) Rhodamin-gefärbte Nanopartikel mit je 1.500.000 myeloiden dendritischen Zellen aus GM-CSF/IL-4-Kultur über vier Stunden bei 37°C koinkubiert. **F** zeigt das FACS nach vierstündiger Koinkubation mit 30µg Nanopartikeln bei 4°C („auf Eis").

Die Tatsache, dass die Koinkubation von Nanopartikeln und dendritischen Zellen bei 4°C die Aufnahme von Nanopartikeln stark einschränkte (Abbildung 3.17 **F**), weist auf einen aktiven Prozess hin. Es lag also nahe, als nächstes die Kinetik der Aufnahme der Nanopartikel zu untersuchen. Hierfür wurde eine konstante Konzentration von Nanopartikeln über verschiedene Zeiträume mit einer konstanten Menge von dendritischen Zellen koinkubiert. In diesem Versuch wurde außerdem durch mehrfache MACS-Aufreinigung auf 99,4% CD11c-positive Zellen sichergestellt, dass die beobachtete Aufnahme der Nanopartikel durch dendritische Zellen erfolgt.

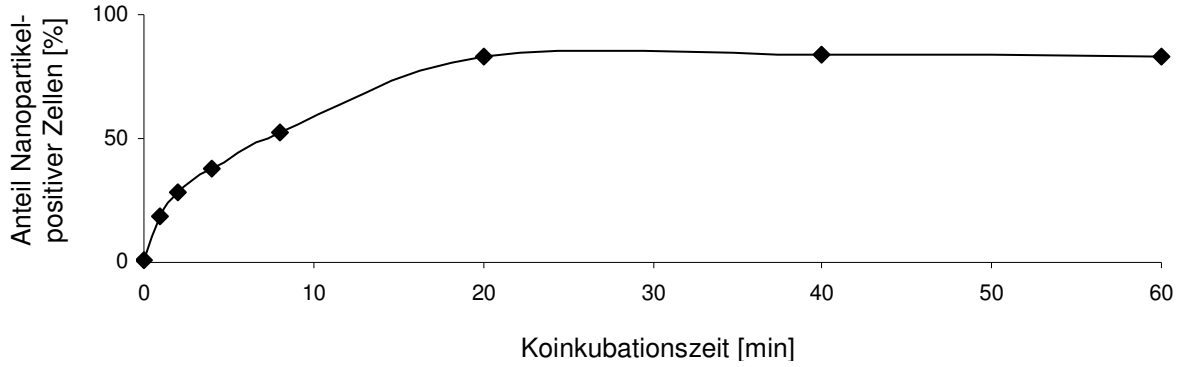

Abbildung 3.18: Nanopartikel werden schnell in dendritische Zellen aufgenommen

Je 12µg Alexa-Fluor-markierte Nanopartikel wurden zu je 200.000 MACS-gesorteten CD11c-positiven dendritischen Zellen gegeben. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 37°C wurden die Zellen gewaschen und durchflusszytometrisch der Anteil von Zellen bestimmt, die Nanopartikel aufgenommen hatten.

Die in Abbildung 3.18 gezeigten Daten sind repräsentativ für drei Versuche. Wir haben außerdem untersucht, ob die Beladung der Nanopartikel mit Oligonukleotiden die Kinetik der Aufnahme in dendritische Zellen ändert. Hierbei stellten wir fest, dass weder die Beladung mit dem stimulatorischen CpG-B Oligonukleotid noch einem strukturgleichen inaktiven Kontroll-Oligonukleotid ohne CpG-Motiv einen Einfluss auf die Aufnahme der Partikel hat (Daten nicht gezeigt).

3.3.2. Zytokinproduktion durch dendritische Zellen

Für eine effektive Immunstimulation durch mit CpG-Oligonukleotiden beladene Nanopartikel ist nicht nur die Aufnahme in dendritische Zellen, sondern auch die adäquate Prozessierung und nachfolgende intrazelluläre Signalkaskade entscheidend. Um beurteilen zu können, ob die Immunstimulation durch CpG-B auch nach dessen Bindung an Nanopartikel effektiv funktioniert, haben wir die Sekretion der immunstimulatorischen Mediatoren Interleukin-6 und Interleukin-12 durch dendritische Zellen nach Inkubation mit ungebundenen und Nanopartikel-gebundenen CpG-B-Oligonukleotiden verglichen.

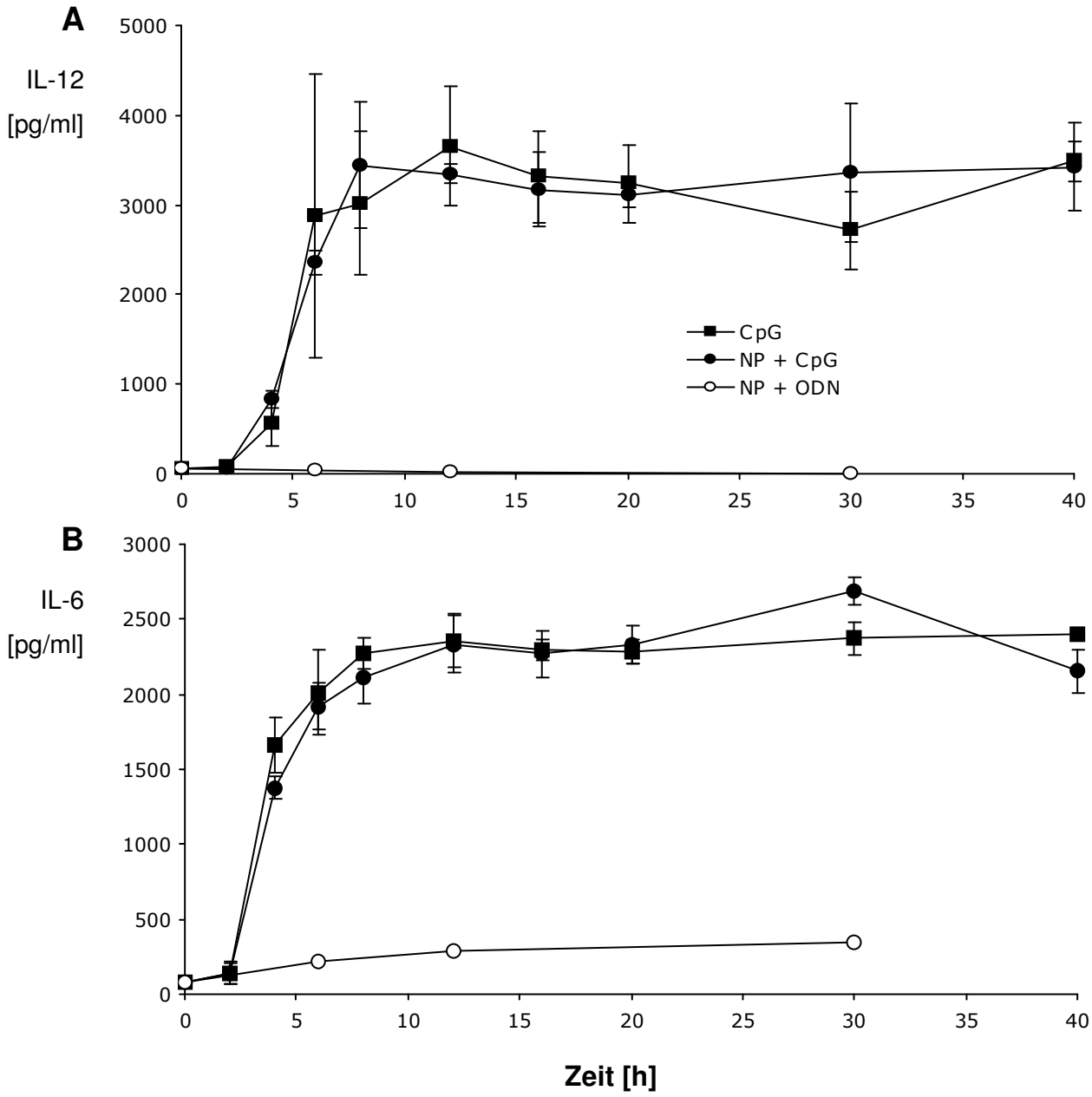

Abbildung 3.19: Nanopartikel-gebundenes und freies CpG-B führt zu gleich guter Aktivierung dendritischer Zellen

Je 200.000 dendritische Zellen aus GM-CSF/IL-4-Kultur wurden mit 3µg/ml CpG-Oligonukleotid 1826 oder Kontroll-Nukleotid 1982, 60 µg/ml NP, oder jeweils gebundenen Oligonukleotiden in der gleichen Konzentration über verschiedene Zeiträume koinkubiert. Die Kontrollen (keine Stimulation, Kontroll-Motiv 1982 allein, Nanopartikel allein) zeigten fast identischen Verlauf zu den gezeigten mit Kontrollmotiv beladenen Nanopartikeln und wurden zur Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die Abbildung zeigt jeweils die Mittelwerte (und Standardabweichungen) aus drei unabhängigen biologischen Ansätzen, die zum gleichen Zeitpunkt angesetzt wurden. Die Daten sind außerdem repräsentativ für zwei gleichartige Experimente.

Das Verhältnis von Nanopartikeln zu Oligonukleotiden (20 zu 1 w/w) wurde so gewählt, dass kein messbarer Anteil von Oligonukleotiden im Überstand zu erwarten war (Zwiorek et al., 2007) .

Bei der Koinkubation von freien wie auf Nanopartikeln geladenen CpG-Oligonukleotiden zeigten dendritische Zellen nach vier Stunden eine deutliche Interleukin-12- und Interleukin-6-Sekretion, die nach etwa zwölf Stunden ihr Maximum erreichte (Abbildung 3.19). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass an Nanopartikel gebundene CpG-Oligonukleotide in dendritische Zellen aufgenommen werden und zumindest in vitro eine gleich gute Immunstimulation bewirken wie ungebundene CpG-Motive. Die erheblich größeren Nanopartikel erscheinen daher vielversprechend für gezielte und lokalisierte Immunstimulation mit reduzierten systemischen Nebenwirkungen.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1. Dendritische Zellen und CpG-B gegen subkutane und orthotope TAg-Tumoren

Die CEA424-TAg-Mäuse bieten in Kombination mit den aus ihnen isolierten Tumorzelllinien ein vielseitiges und realitätsnahes Modell für die Erforschung antitumoraler Immuntherapie. Die subkutane Injektion von mGC3-Zellen erlaubt die gut zugängliche Überwachung des Therapieerfolgs im subkutanen Milieu, die klinisch und histologisch verglichen werden kann mit einem orthotopen, über Vorstufen langsam entartenden Karzinom im gleichen Wirt.

Zunächst bewiesen wir, dass eine Immunantwort durch die Injektion von tumorzellbeladenen, aktivierten dendritischen Zellen zusammen mit CpG hervorgerufen werden kann, die gegen das sonst tödliche subkutan injizierte Tumorzellgemisch effektiv ist. Dabei fanden wir, dass dieser Effekt bei der Verwendung spezifischer Kombinationstherapie aus dendritischen Zellen und CpG-B trotz der mangelnden *in vitro* Präsentation von MHC-I auf der Oberfläche der Tumorzellen ausgeprägter ist als bei Verwendung von CpG-A. Unsere Kombinationstherapie war im prophylaktischen wie auch therapeutischen Setting mit etablierten Tumoren effektiv, wobei sich zeigte, dass ein früherer Therapiezeitpunkt eine günstigere Prognose nach sich zieht. Dieses Ergebnis wurde nicht verändert durch die Anwendung von niedrigdosiertem Cyclophosphamid zur selektiven Elimination von regulatorischen T-Zellen.

In der Folge bewiesen wir, dass die durch unsere Vakzine verliehene Immunität dauerhaft anhält und auch nach einem halben Jahr ohne Booster subkutane Tumore noch effizient abstoßen kann. Des Weiteren haben wir demonstriert, dass ein adoptiver Transfer der Splenozyten vakzinierter Mäuse diese Immunität naiven Empfängermäusen verleihen kann und ohne weitere Immunisierung zum signifikant verzögerten Wachstum oder zur dauerhaften Abstoßung des sonst tödlichen Tumors führt.

Schließlich erzeugten wir ebenfalls durch adoptiven Transfer den ersten messbaren therapeutischen Erfolg unserer Vakzine im transgenen TAg-Mausmodell. Gerade hier zeigte sich die Stärke unseres Modells, da uns zum einen die sichere Kontrolle des Therapieerfolgs des adoptiven Transfers im subkutanen Tumor möglich war, zum anderen aber auch die

histologische Aufarbeitung des subkutanen sowie des gastrischen Gewebes. Dies erlaubt wertvolle Erkenntnisse über die gewebeabhängig unterschiedliche lymphozytäre Infiltration der gleichen Tumorart in verschiedenen Geweben des gleichen Wirts.

4.1.2. Untersuchung von Immunzellen im Gastrointestinaltrakt

Die vergleichsweise große Zahl von Effektor-T-Zellen in der Submucosa um das orthotope Magenkarzinom herum bei relativ geringer Infiltration des Tumors selbst unterstreicht, dass eine weitere Verbesserung des *tissue targeting* unserer Immuntherapie lohnenswert erscheint. Mit der Untersuchung der Lymphozyten im darmassoziierten lymphatischen Gewebe auf ihre Stimulierbarkeit durch unsere Liganden, die Untersuchung des Migrationsverhaltens intraperitoneal injizierter dendritischer Zellen sowie die Isolation und Charakterisierung von dendritischen Zellen aus Peyer'schein Plaques haben wir Werkzeuge etabliert, die uns bei der weiteren Erforschung der Immunprozesse im Gastrointestinaltrakt helfen werden.

4.1.3. Verwendung von Gelatine-Nanopartikeln als Vektor für die Applikation therapeutischer Oligonukleotide

Die gezielte und begrenzte Applikation von CpG würde zum einen systemische Effekte minimieren, zum anderen die direkte Immunstimulation der bereits im Zielgebiet ansässigen Immunzellen ermöglichen. In einem ersten Schritt hierfür untersuchten wir die Wirkung von an Gelatine-Nanopartikel gebundenen CpG-Partikel auf myeloide dendritische Zellen *in vitro*. Hierbei zeigte sich eine schnelle, aktive Aufnahme der Gelatinepartikel durch die Zellen und eine dem ungebundenen CpG gleichförmige Zytokinproduktion als Maß der Immunaktivierung der dendritischen Zellen.

4.2. Vorteile des transgenen Mausmodells

4.2.1. Die Suche nach dem optimalen Versuchsmodell

Im Jahre 1999 hat Krebs erstmals die Herz-Kreislauferkrankungen als häufigste Todesursache abgelöst seit Beginn der Aufzeichnungen in den USA in 1930 (Jemal et al., 2006). Seit damals ist die Mortalität von Herz-Kreislauferkrankungen um 60 %, die von Schlaganfällen um 70 %, die von Krebserkrankungen um 0 % gesunken (Talmadge et al., 2007). Angesichts vielversprechender Ergebnisse vor allem in Tiermodellen in der Grundlagenforschung der immunologischen Krebstherapie (Krieg, 2007) überrascht es, dass

sich die Erkenntnisse auf diesem Gebiet nicht in ähnlich deutlichen Mortalitätsreduktionen wie bei den anderen Krankheiten niederschlagen. Ein Teil der Antwort ist vermutlich die hohe Komplexität sowohl der Malignome als auch der Immunsysteme von Maus und Mensch. Um also die Übertragung von Ergebnissen vom einen System auf das andere zu erleichtern oder überhaupt erst zu ermöglichen, brauchen wir realitätsnahe Modelle, die uns wichtige Schritte vom experimentellen Modell zur klinischen Realität ermöglichen.

Einer dieser Schritte ist der von einer wohldefinierten, klonierten Zelllinie wie dem C26-Kolonkarzinom hin zu einem heterogenen Zellgemisch wie dem mGC3-Magenkarzinom (Ostrand-Rosenberg, 2004). Gleichzeitig fand hierbei ein Wechsel von einem schnell wachsenden Tumor wie C26 (Tod nach wenigen Wochen) zu einem langsam wachsenden wie mGC3 (Tod erst nach Monaten auch ohne Behandlung) statt. Auch dies ist ein Schritt in Richtung der klinichsen Situation am Patienten, denn im Allgemeinen ist bei langsam wachsenden Tumoren von einer geringeren Immunogenität durch vermehrte Toleranzinduktion auszugehen („*sneaking through*“) (Bonmassar et al., 1974; Yu et al., 2006). So fanden Sawanobori et al. beispielsweise *myeloid-derived suppressor cells*, also vom Knochenmark abgeleitete immunsuppressive Zellen, erst 40 Tage nach Induktion in subkutanen Tumoren bei Mäusen (Sawanobori et al., 2008). Zu diesem Zeitpunkt sind mit schnell wachsenden Tumoren wie C26 inokulierte Tiere ohne Behandlung bereits verstorben.

Zwei unüberwindbare Kritikpunkte haben alle subkutanen Modelle gastrointestinaler Tumoren gemeinsam: Das tumorfremde und immunogene Milieu des subkutanen Gewebes zum einen und die Technik der für das *microenvironment* doch recht traumatischen Tumorinokulation zum anderen. Wie Schreiber et al. gezeigt haben, führt die subkutane Implantation der Tumorzellen zu massiver Koagulationsnekrose und akuter entzündlicher Reaktion, aus der nur ein dünner der Vaskularisation naher „Tumorrand“ übrig bleibt und dann heranwächst (Schreiber et al., 2006). Da der Großteil der verabreichten Tumorzellen nekrotisch und resorbiert wird, könnte man dies durchaus als eine unabsichtliche Vakzinierung mit Tumorlysat gleichzeitig mit der Tumorchallenge sehen (Singh et al., 1992). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war schließlich die Erzielung eines antitumoralen Effekts im spontan und orthotop entstehenden Magenkarzinom der CEA424-TAg-Mäuse, welches auch diese Kritikpunkte ausräumt und damit einen weiteren wichtigen Schritt auf dem Weg zur Situation am Menschen darstellt.

4.2.2. Mausmodelle von spontanen Tumoren

Auf Grund der genannten Vorteile transgener Mäuse mit autochthon entstehenden Karzinomen wurden einige solche Mausmodelle generiert, zumeist mit Onkogenen aus dem SV40 oder dem Polyoma-Virus unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors. Diese Modelle umfassen Prostata- (Greenberg et al., 1995; Masumori et al., 2001), Mamma- (Chen et al., 2003; Guy et al., 1992; Xia et al., 2003), Pankreas- (Mukherjee et al., 2000; Mukherjee et al., 2001), Ovarialkarzinome (Connolly et al., 2003) sowie Melanome (Bradl et al., 1991).

In den meisten dieser Modelle entwickelte sich recht früh eine Toleranz gegen das T-Antigen. Beispielsweise in einem transgenen Prostatakarzinom-Modell (*transgenic adenocarcinoma of mouse prostate*, TRAMP), in dem das T-Antigen hinter das Ratten-Probasin regulatorische Element geschaltet ist, konnten Degl'Innocenti et al. fünf Wochen nach Geburt der Tiere noch durch spezifische Immunisierung mit Peptid-gepulsten aktivierten dendritischen Zellen eine zytotoxische Reaktion erzielen, wenn auch eine schwächere als in Wildtyp-Tieren (Degl'Innocenti et al., 2005). Ab Lebenswoche sieben fällt die erreichbare lytische Aktivität der T-Zellen nach dendritischer Zellvakzine, ab Woche elf ist in diesen Mäusen keine aktive Immunisierung gegen das T-Antigen mehr möglich. In unseren Experimenten erfolgte die Immunisierung der transgenen Tiere an Lebtag 38 bis 43, also in der sechsten bis siebten Lebenswoche, daher passiv durch adoptiven Transfer.

In manchen Modellen konnte das Tumorwachstum effektiv durch das Immunsystem kontrolliert werden. Dabei gilt es zu bedenken, dass auch nach der Immuntherapie die Expression des Onkogens in den Zielgeweben fortbesteht – das Immunsystem überlebender Tiere muss also fortwährend gegen entartende Zellen aktiv bleiben. Transgene Mäuse, die mit einem Konstrukt aus SV40-T-Antigen hinter einem Ratten-Insulin-Promotor 1 transfiziert wurden, entwickeln analog zum CEA424-TAg-Modell regelhaft pankreatische Insulinome (Ye et al., 1994). Hier konnte bei frühzeitiger (fünfte Lebenswoche) Immunisierung durch Injektion T-Antigen exprimierender B6/WT-19-Zellen ein Gleichgewicht zwischen auf Grund des Onkogens immer wieder entartenden Inselzellen und der Unterdrückung dieser Zellen durch das Immunsystem geschaffen werden. Dadurch überlebten die Mäuse über zwei Jahre – ohne durch übermäßige Zerstörung von Inselzellen einen Diabetes mellitus zu entwickeln. Dieser Effekt war mit der Anwesenheit für Epitop IV des T-Antigens spezifischer $CD8^+$ T-Zellen vergesellschaftet (Otahal et al., 2006). Adoptiv transferierte T-Zellen mit für Epitop I spezifischem T-Zell-Rezeptor wurden hingegen schnell durch Deletion oder Inaktivierung

tolerisiert. Der Mechanismus der Toleranz kann also von Epitop zu Epitop verschieden sein, selbst wenn die Epitope Teil desselben Proteins sind.

4.3. *Tumor immune escape*

Im CEA424-TAg- und mGC3-Modell hat der Tumor wesentlich mehr Gelegenheit, Abwehrmechanismen gegen das Immunsystem des Wirts aufzubauen als im schnell wachsenden C26-Modell. Da dies aber auch die regelhafte Situation in der Klinik ist, bietet das CEA424-TAg-Modell große Chancen, diese Mechanismen weiter zu untersuchen und ihnen gegebenenfalls entgegenzuwirken.

4.3.1. „Tarnen, verstecken und inaktivieren“

Als Folge genetischer Instabilität entstehen in Tumoren regelhaft von gesunden Zellen abweichende Proteinexpressionsprofile (Fearon et al., 1990). Dies äußert sich nicht nur in der Neuexpression von Tumorantigenen, durch Hyper- und Hypomethylierung wird die Expression von hunderten von Genen oft um viele Zehnerpotenzen verändert (Jones et al., 2002). Dies allein bewirkt eine erhöhte Immunogenität der Zelle. Dies wiederum kann zum einen zur Elimination von Tumorzellen führen, die besonders viel Antigen exprimieren (Khong et al., 2002). Als anderen Kompensationsmechanismus zeigen viele Tumorzelllinien eine erniedrigte MHC-I-Expression, wodurch die im Tumor vorhandenen Antigene vermindert an der Zelloberfläche präsentiert werden (Cabrera et al., 1996; Esteban et al., 1989; Natali et al., 1983; Whitwell et al., 1984). Damit werden die Tumoren weniger anfällig dafür, von spezifischen zytotoxischen T-Zellen eliminiert zu werden.

Wir haben gezeigt, dass auch mGC3-Zellen in Kultur eine sehr geringe Zahl von MHC-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche aufweisen. Diese Modulation zeigte sich *in vitro* reversibel durch Stimulation mit Interferon-γ. Dieser zwar weit verbreitete und sicher zum *immune escape* dienende Mechanismus tritt also auch in unserem Modell auf, hatte aber scheinbar keinen signifikanten Einfluss auf die Erkennung und Eradizierung subkutaner mGC3-Tumoren. Diese Hypothese wird durch folgende Tatsachen gestützt:

- CpG-B und spezifische Vakzinierung führen vor allem zu T-Zell-vermittelter Immunantwort und waren wesentlich effektiver in der Tumortherapie als CpG-A, das eher unspezifische NK-Zell-Aktivierung bewirkt

- Fünf und zehn Monate nach initialer Tumorchallenge wurden mGC3-Zellen in immunen Mäusen ohne weitere Boosterung wieder abgestoßen oder signifikant im Wachstum verzögert. Diese Gedächtnisantwort weist stark auf T-Zell-Vermittlung hin.

- In unserem Labor wurde durch Zytotoxizitäts-Assay die spezifische Lyse von mGC3-Zellen durch T-Zellen immunisierter Tiere demonstriert.

Mögliche Erklärungen für die augenscheinlich trotz geringer MHC-I-Expression doch T-Zell-vermittelte Immunität wären die gezeigte Hochregulation von MHC-I auf IFN-γ sowie die unlängst entdeckte sogenannte *bystander elimination* durch Stroma-Zellen, die Tumorantigen präsentieren (Spiotto et al., 2004).

Tumorzellen verwenden typischerweise aber noch viele weitere Mechanismen, die sie vor Entdeckung und Eliminierung durch das Immunsystem schützen, die in der vorliegenden Arbeit nicht erforscht wurden aber geeignet wären, das schlechtere Ansprechen der Tumorvakzine im therapeutischen Setting zu erklären (Drake et al., 2006; Rabinovich et al., 2007; Smyth et al., 2001). Eine hohe Aktivität von *Stat3* in Tumorzellen wurde sowohl für die Hemmung der Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-α, IFN-β und IP-10, wie auch für die vermehrte Sekretion von Faktoren wie VEGF (Gabrilovich et al., 1996), TGF-β und IL-10 (Gerlini et al., 2004) verantwortlich gemacht, was in der Summe zu einem immunsuppressiven und proangiogenetischen Milieu um den Tumor herum führt (Wang et al., 2004).

Am Beispiel von TGF-β wurde gezeigt, dass die Transfektion einer hoch immunogenen Tumorzelllinie mit cDNA für TGF-β1 bewirkt, dass der Tumor nicht mehr abgestoßen wird (Torre-Amione et al., 1990). Dabei wirkt TGF-β negativ auf die Expression von Perforin, Granzym A und B, Fas-Ligand und IFN-γ (Thomas et al., 2005). Umgekehrt kann eine T-Zell-spezifische Blockade der Wirkung von TGF-β eine ansonsten unterdrückte tumor-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort in vivo erlauben (Gorelik et al., 2001). Beispielhaft für die Wirkung von IL-10 kann ein Versuch von Vicari et al. gesehen werden, in dem tumorinfiltrierende dendritische Zellen selbst nach potenter Stimulation durch CpG nicht in der Lage waren, IL-12 zu produzieren, solange nicht zusätzlich IL-10-Rezeptor-Antikörper verabreicht wurden (Vicari et al., 2002).

Etablierte Tumoren werden außerdem von einem sogenannten Tumorstroma umgeben, das zumeist ebenfalls ein nicht-entzündliches Milieu darstellt. Dieses kann einerseits wie oben

erwähnt durch eigene Antigen-Präsentation zu *bystander elimination* führen, andererseits kann das Bindegewebe um die Tumoren, Desmoplasie genannt, auch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Nährstoffe bereitstellen, die das Tumorwachstum und die Angiogenese unterhalten (Mueller et al., 2004). Dazu zählen aus dem Knochenmark stammende unreife Gr-1$^+$/CD11b$^+$ Zellen, die im Tumor zu sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen differenzieren (Bronte et al., 1998; Pekarek et al., 1995; Seung et al., 1995).

Diese *tumor escape*-Vorgänge während des Tumorwachstums lassen einige Autoren schließen, dass die Forschung auch und gerade an etablierten Tumoren (z. B. 1 cm Durchmesser in Mäusen oder mindestens 14 Tage lang gewachsen) durchgeführt werden sollte, da hier injizierte Tumoren zumindest histologisch ununterscheidbar von spontanen werden und damit in vielen Modellen sehr therapieresistent geworden sind (Schreiber et al., 2006; Yu et al., 2006). Im subkutanen C26-Modell war in unserer Arbeitsgruppe eine Heilung solcher großen Tumoren durch Immuntherapie möglich, bei mGC3-Tumoren wie auch im aus der Klinik bekannten Regelfall bereits nicht mehr. Eine Aufklärung der Ursachen dafür und ein Erfolg im realitätsnäheren CEA424-TAg-Modell wäre für die Zukunft sicherlich aufschlussreich.

4.3.2. Die Rolle der Immuntoleranz im transgenen Modell

Mehrere für SV40/T-Antigen transgene Mäuslinien zeigen eine zentrale Toleranz für das Onkogen. Im *transgenic adenocarcinoma of mouse prostate*-Modell beispielsweise wurde eine niedrige aber messbare Expression von SV40/TAg im Thymus gefunden, die zur klonalen Deletion der dafür spezifischen T-Zellen führte (Zheng et al., 2002). Dieses Phänomen trat auf, obwohl das T-Antigen nicht ubiquitär in allen Zellen exprimiert wurde, sondern hinter einen Probasin-Promotor, der Prostata-spezifisch exprimiert wird, geschaltet wurde. In unserem Modell sorgt ein humaner CEA-Promotor für eine Expression in murinem Pylorus und Dünndarm, auch hier kommt also trotz gewebespezifischer Expression des Tumorantigens eine Expression in der Thymusschule und damit eine klonale Deletion dafür spezifischer T-Zellen in Frage. In anderen Modellen mit für das T-Antigen transgenen Mäusen wurden ähnliche Phänomene gefunden, die zentrale und periphere Toleranz gegenüber dem T-Antigen bewirken (Romieu et al., 1998; Schell et al., 1999; Willimsky et al., 2007). Bei systematischer, früher Elimination T-Antigen-spezifischer T-Zellen im Thymus, wie sie bei zentraler Toleranz vorkommt, wird die Immunisierung wesentlich erschwert. Zwar verwendeten wir die Beladung dendritischer Zellen mit ganzen Tumorzellen, die ja potentiell weit mehr als nur das eine Tumorantigen enthalten, dennoch konnte in unseren CEA424-

TAg-Mäusen keiner unserer aktiven Immunisierungsansätze einen Überlebensvorteil bewirken.

Zentrale Toleranz allein würde aber nicht alle von uns beobachteten Phänomene erklären. Bei den naiven Mäusen, die einen subkutan implantierten mGC3-Tumor erhielten, ist eine zentrale Toleranz dem T-Antigen gegenüber ausgeschlossen. Dennoch erwies sich wie in den Ergebnissen gezeigt die Therapie langsam wachsender, etablierter subkutaner mGC3-Tumoren als wesentlich schwieriger als im C26-Modell.

Dieses Phänomen könnte einerseits mit den in 4.3.1 diskutierten *tumor immune* escape-Mechanismen zusammenhängen, wie zum Beispiel Tarnung durch MHC-I-Herunterregulation, Verstecken im Tumorstroma und Inaktivieren durch TGF-β. Zum anderen wäre aber auch eine aktive Immunsuppression durch tumorinduzierte regulatorische T-Zellen denkbar. In menschlichen Magenkarzinomen (Ichihara et al., 2003; Mizukami et al., 2008) und in den ableitenden Lymphknoten (Kawaida et al., 2005) wurden vermehrt regulatorische T-Zellen gefunden, die in vitro die Proliferation von $CD4^+CD25^-$ Zellen (T-Helferzellen) hemmen und deren Menge die Prognose der Patienten bestimmt (Sasada et al., 2003). In Folgeversuchen in unserer Arbeitsgruppe fanden wir jedoch nur eine geringe Zahl von $FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen in CEA424-TAg-Tumoren. So ist auch erklärt, warum die Gabe von niedrig dosiertem Cyclophosphamid zur Elimination dieser Zellen zu keiner Änderung des Therapieerfolgs geführt hat (Ghiringhelli et al., 2004; Hermans et al., 2003; Ikezawa et al., 2005; Lutsiak et al., 2005).

Nicht nur $FoxP3^+$-Zellen können immunsuppressiv wirken. Chen et al. zeigten bereits 1994, dass oral verabreichte Antigene zur Induktion von für dieses Antigen spezifischen strukturell unauffälligen T_H1-Zellen führte. Diese Zellen sezernierten jedoch TGF-β, IL-10 und IL-4 (Chen et al., 1994). Später wurde gezeigt, dass diese oral induzierte Toleranz von dendritischen Zellen vermittelt wird, die das Antigen ohne Co-Stimulation in mesenterischen Lymphknoten präsentieren und so wie in der Einleitung beschrieben zu T-Zell-Deletion, -Anergie oder -Toleranz führen (Sotomayor et al., 2001; Worbs et al., 2006). Es liegt nahe, dass dieser Mechanismus der Antigenpräsentation ohne Co-Stimulation gastraler Antigene einer Immuntherapie besonders vom orthotopen Magenkarzinom – selbst bei Vorhandensein starker Tumorantigene – entgegenwirkt.

4.3.3. Weg aus der Toleranz

Um die in den letzten beiden Kapiteln aufgezählten Mechanismen der Toleranz zu überwinden, setzten wir einen adoptiven Transfer der Lymphozyten immunisierter Spendertiere in tumortragende Versuchstiere ein. Dieser Transfer hat gezeigt, dass eine wirksame und dauerhafte prophylaktische Immunität gegen den Tumor allein durch die Übertragung von Lymphozyten verliehen werden kann. Zusätzlich fanden wir, dass auch in den transgenen Tieren, die gegen den TAg-Tumor tolerisiert sind, ein deutlich vermehrtes T-Zell-Infiltrat auch im etablierten, orthotopen Tumor nach adoptivem Transfer nachweisbar war. Zusammen mit dem verhinderten oder deutlich verlangsamten Wachstum der gleichzeitig subkutan implantierten Markertumore sind das starke Anzeichen für eine Wirksamkeit des adoptiven Transfers. Das bedeutet, dass dieser Tumor für zytotoxische T-Lymphozyten zugänglich ist und erkannt werden kann und dass transferierte Lymphozyten nicht tolerisiert werden.

Deichman et al. fanden bereits im Jahre 1969, dass „durch sporadische Aktivierung eines SV40 T-Onkogens hervorgerufene primäre murine Tumoren verhindert werden können, wenn die Tiere vor Tumorentwicklung immunisiert werden“ (Deichman, 1969). Das Immunsystem ist also primär in der Lage, diese Tumoren zu bekämpfen. Unsere Versuche haben gezeigt, dass die toleranzinduzierenden Abwehrmechanismen des Tumors spätestens durch den adoptiven Transfer überwunden werden können.

4.4. Migration von Immunzellen in gastrointestinale Karzinome

4.4.1. *Tissue targeting* als Chance für die Tumorimmunologie

Experimente der Gruppe um von Andrian et al. zeigten Vielversprechendes: die grundsätzliche Empfänglichkeit von Effektorzellen für gewebespezifisches *imprinting*. Damit ist gemeint, dass die Gewebespezifität vor allem von der Herkunft der dendritischen Zelle abhängt, mit der die Effektorzelle zuletzt Kontakt hatte, unabhängig von vorangegangenem *imprinting* (Mora et al., 2005). Das gilt auch für Gedächtniszellen. Diese Erkenntnis schafft eine Grundlage für unsere Beobachtung, dass die orthotopen Tumoren der transgenen Mäuse nach adoptivem Transfer vermehrt von T-Zellen durchsetzt waren. Dies geschah im Magen, obwohl die Spendertiere durch subkutane Vakzinierungen und Tumorchallenges immunisiert wurden, was nach allem Dafürhalten einen von E- und P-Selektin-Liganden geprägten auf die Haut gerichteten Phänotyp der T-Zellen erwarten ließe. Das Vorhandensein von Lymphozyteninfiltraten in der gastrischen Submucosa und im

Magenkarzinom nach adoptivem Transfer ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass diese Zellen nach Erkennung ihrer Antigenspezifität spezifisch in das Tumorgebiet migrieren.

4.4.2. Dendritische Zellen aus darmassoziiertem lymphatischem Gewebe

Noch wichtiger für die Migration der Effektorzellen als die augenblickliche Expression von Integrinen wie LPAM oder Selektinen scheint also das *imprinting* durch die zuletzt kontaktierte dendritische Zelle. Viele Autoren berichten, dass dendritische Zellen aus Peyer'schen Plaques T-Zellen einen auf den Darm gerichteten Phänotyp verleihen (Dudda et al., 2004; Mora et al., 2003; Stagg et al., 2002). Die dendritischen Zellen in diesen *in vitro*-Versuchen stammen aus Mäusen, denen zuvor ein Flt3-Ligand sezernierender B16-Tumor gesetzt wurde. Flt3-Ligand führt zur Expansion von dendritischen Zellen (Maraskovsky et al., 1996; Shurin et al., 1997), wodurch eine Gewinnung auch von größeren Mengen *ex vivo* möglich wurde. Da uns diese Zellen zum Zeitpunkt der Experimente nicht zur Verfügung standen, konnten wir keine Vakzinierungen mit *ex vivo* isolierten dendritischen Zellen aus Peyer'schen Plaques durchführen. Diese hätten gute Aussichten, die Effektivität der Therapie zu steigern.

4.4.3. Nanopartikel als Vehikel zur Applikation von CpG-Oligonukleotiden

Anstatt ortsansässige antigen-präsentierende Zellen zu gewinnen und *in vitro* zu stimulieren wollten wir dann Wege erforschen, die bereits *in situ* vorhandenen Zellen direkt zu stimulieren. Nachdem unsere initialen Versuche, CpG oral zu verabreichen zu keinem messbaren Anstieg der Zytokinausschüttung und Aktivierung von Lymphozyten im Magen führten, lag eine Zerstörung der doch recht empfindlichen Oligonukleotide im unwirtlichen Milieu des Magens sehr nahe. Daher suchten wir nach einem Weg, die CpG-Nukleotide davor zu schützen, ohne ihre Funktion zu beeinträchtigen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Conrad Coester aus der Biopharmazie erprobten wir zu diesem Zweck Gelatine-Nanopartikel als Träger für CpG-Oligonukleotide.

Die Aufnahme der Nanopartikel in dendritische Zellen, die wir wie in Kapitel 3.3.1 gezeigt haben, wurde durch Fluoreszenzmikroskopie von Zwiorek et al. aus der Arbeitsgruppe von Dr. Coester bestätigt (Zwiorek et al., 2007). Durch unsere FACS-Analyse konnten wir anhand von Oberflächenmarkern der Zellen zusätzlich zeigen, dass die Aktivierung der Zellen der von freien CpG-Oligonukleotiden entspricht. Unsere Zytokinmessungen via ELISA (siehe Kapitel 3.3.2) belegten diese Erkenntnis weiter: Dendritische Zellen schütteten bei

Stimulation mit gebundenen wie ungebundenen CpG-Oligonukleotiden in gleichem Maße proinflammatorische Zytokine aus.

Die Hoffnung, dass an Nanopartikel gebundene CpG-Oligonukleotide besser geschützt wären und zu einer messbaren entzündlichen Reaktion im Magen führen würden, bewahrheitete sich leider nicht. Hingegen fanden sich sehr vielversprechende Effekte von mit CpG beladenen Nanopartikeln, die i.v. oder subkutan injiziert wurden. Bei i.v.-Applikation fanden sich bei beladenen Nanopartikeln zum Beispiel dreimal höhere Konzentrationen von IL-12p70 als Entzündungszytokin als bei Injektion von reinen CpG-Oligonukleotiden (Zwiorek et al., 2007). Bei subkutaner Verabreichung konnte in unserer Gruppe gezeigt werden, dass mit NP-CpG eine effektive systemische Immunisierung gegen Ovalbumin sowie gegen Ovalbumin-exprimierende Tumoren möglich ist (Bourquin et al., 2008). Bemerkenswert ist dabei, dass dadurch eine systemische inflammatorische Antwort auf CpG (proinflammatorische Zytokine im Serum, Aktivierung von Immunzellen in sekundären lymphatischen Organen, Splenomegalie) im Gegensatz zur s.c.-Verabreichung freier CpG-Oligonukleotide ausblieb. Versuche mit fluoreszierenden CpG-Molekülen zeigten, dass während freies CpG schnell in den ganzen Körper der Maus propagiert, die an Nanopartikel gebundenen Oligonukleotide von antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und selektiv in die drainierenden Lymphknoten befördert wurden – ein Meilenstein auf dem Weg zum *tissue targeting*.

4.5. Ausblick

Mit den CEA424-TAg-Mäusen besitzen wir nun ein aussagekräftiges und zugängliches Modell, in dem wir mit unserer Vakzinierung bereits erste vielversprechende Erfolge erzielen konnten. Diese Ergebnisse und die von uns etablierten Werkzeuge bilden ein aussichtsreiches Fundament für die Erprobung und die Ausreifung weiterer Therapieansätze.

4.5.1. Dendritische Zellen

In einer innovativen Versuchsreihe benutzten Tang et al. einen viralen Vektor, der zur Sekretion eines Fusionsproteins aus Tumorantigen und CD40-Ligand führte (Tang et al., 2004). Damit konnten im Mausmodell dendritische Zellen aktiviert und zur Migration gebracht werden, die Toleranz gegen das Antigen wurde überwunden und die Mäuse wurden langfristig gegen Tumorantigen-produzierende Tumoren immun. An der klinischen Umsetzung dieses Konzepts wird derzeit gearbeitet. Ein recht ähnlicher Ansatz von Steinman et al. hat sich ebenfalls als vielversprechend erwiesen (Bonifaz et al., 2004). Diese

Gruppe hat Ovalbumin an einen monoklonalen Antikörper gegen den auf dendritischen Zellen vorhandenen DEC-205-Rezeptor gekoppelt und damit stärkere und länger anhaltende Immunreaktionen erwirkt als mit konventionellen Methoden.

Zu den weiteren erwähnenswerten Ansätzen der Immuntherapie mit dendritischen Zellen zählt die Einführung von Tumor-Ribonukleinsäure in wirtseigene dendritische Zellen durch Elektroporation, mit vielversprechenden Ergebnissen (Kyte et al., 2006; Kyte et al., 2007). Weiterhin die Fusion von Tumorzellen mit dendritischen Zellen (Rosenblatt et al., 2005), selbst die Ausreifung leukämischer Blasten zu dendritischen Zellen wurde versucht (Houtenbos et al., 2005; Li et al., 2006).

4.5.2. Effektorzellen

Der von uns angewandte adoptive Transfer wird bereits erfolgreich am Menschen getestet. Autologe tumorinflitrierende und -reaktive T-Zellen von Patienten mit metastasiertem Melanom wurden von Dudley et al. *in vitro* expandiert und nach Lymphodepletion durch Cyclophosphamid und Fludaribin infundiert (Dudley et al., 2005). 18 der 35 Patienten sprachen auf die Therapie an, drei davon zeigten anhaltende komplette Tumorremission über mindestens zwei Jahre.

Durch so genanntes *T-cell receptor engineering* kann die Zahl und Spezifität der transferierten Effektorzellen in einem adoptiven Transfer noch gesteigert werden. Dabei werden T-Zellen mit Genen für speziell gegen bestimmte Tumorantigene gerichteten und dafür optimierten T-Zell-Rezeptoren transfiziert, bevor sie adoptiv transferiert werden. Dies könnte dank des gut definierten T-Antigens auch in unserem Modell eingesetzt werden. Dieser Ansatz hat bisher nicht nur im Mausmodell, sondern auch in einer klinischen Phase-I-Studie aussichtsreiche Ergebnisse gezeigt (de Witte et al., 2008).

4.5.3. *Tissue targeting*

Nach adoptivem Transfer mit spezifischen T-Lymphozyten immunisierter Spendermäuse haben CEA424-TAg-Mäuse in unseren Versuchen eine wirksame Immunantwort gegen ihre subkutanen Markertumore aufbauen können. Dabei zeigten sich diese deutlich stärker mit Effektor-T-Zellen infiltriert als die orthotopen Magentumore, die auch keine messbare Größenregredienz gegenüber unbehandelten Tieren zeigten. Ein Zusammenhang zwischen dem Migrationsverhalten der Lymphozyten in den Tumor und dem Therapieerfolg liegt nahe,

es ist nun erforderlich zu untersuchen, welche Faktoren für die mangelnde Infiltration der Tumoren verantwortlich sind und wie man diese überwinden kann.

Chemokine sind maßgeblich für die Migration, aber auch die Effektorfunktion und Proliferation von Lymphozyten (Segerer et al., 2005). Die Erforschung des Zytokinmilieus im orthotopen Tumorgewebe der CEA424-TAg-Mäuse könnte Gründe für die mangelnde Infiltration aufzeigen, speziell da die Befunde mit den subkutanen Markertumoren im gleichen Versuchstier verglichen werden können. Je nach dem Ergebnis dieser Untersuchungen könnten Antikörper gegen bestimmte Chemokine erprobt werden oder auch die direkte Injektion von Immunstimulanzien wie CpG in das Zielgebiet zur Änderung dieses Zytokinprofils. Hier könnten sich die Gelatine-Nanopartikel als nützlich erweisen. In weiteren subkutanen Experimenten hat unsere Arbeitsgruppe demonstrieren können, dass mit CpG-Oligonukleotiden beladene Nanopartikel bei lokaler Applikation eine effektive Immunantwort hervorrufen können, mit deutlich geringerer systemischer Inflammationsreaktion als bei ungebundenen Oligonukleotiden (Bourquin et al., 2008).

4.5.4. Multimodaler Ansatz

Diese Ansätze und vor allem auch deren Kombination eröffnen viele spannende neue Möglichkeiten der Immuntherapie von Krebs. Und dennoch ist das nur ein Teil des Arsenals, das uns inzwischen in der Onkologie zur Verfügung steht. Im Rahmen eines multimodalen Konzepts – mit Chemotherapie, Antiangiogenese, Anti-Tumor-Escape (Anti IL-10 (Moore et al., 2001), IL-13 (Terabe et al., 2000), TGF-beta (Li et al., 2006) und VEGF (Gabrilovich, 2004)) mit zusätzlicher Immunstimulation (Anti-PD-L1 (Melero et al., 2007), Anti-CTLA-4 (Peggs et al., 2006), Anti-CD137-Agonist (Maus et al., 2002)), ablativer Therapie (Ma et al., 2003), Chemo-Immunotherapie (Anthrazykline oder Proteasominhibitoren zusammen mit dendritischen Zellen oder FLT3-Ligand) – werden es Tumoren in Zukunft immer schwerer haben.

In der Natur der Sache liegt wie so häufig, dass diese neuartigen Therapien nur an terminal kranken Patienten erprobt werden können – mit großen, oft metastasierten Tumoren und lange tolerisiertem und allgemein geschwächtem Immunsystem. Wie auch die vorliegende Arbeit demonstriert, sollte man sich jedoch durch mangelndes Ansprechen unter diesen Bedingungen nicht von grundsätzlich richtigen Therapiekonzepten abbringen lassen. In unserer Arbeitsgruppe werden daher nun die Ergebnisse des adoptiven Transfers weiter bestätigt und erste Versuche im Hinblick auf den harten Endpunkt „Überleben“ der transgenen Tiere begonnen.

In Anbetracht der vielen Erfolge in unterschiedlichen Tiermodellen spricht vieles dafür, dass das Immunsystem grundsätzlich in der Lage ist, spezifisch und hocheffektiv jede Art von Tumor zu bekämpfen. Doch gleichzeitig mit seiner Macht demonstriert das Immunsystem fortwährend seine Komplexität. Dass wir seit 1930 die Krankheit Krebs noch nicht so weit zurückgedrängt haben wie Herz-Kreislauferkrankungen und Schlaganfälle mag zumindest was die Immuntherapie betrifft nicht an mangelnder Kraft des Immunsystems liegen, sondern an unserem mangelnden aber wachsenden Verständnis, es richtig einzusetzen.

5. Zusammenfassung

Eine Hauptaufgabe des Immunsystems ist es, maligne Zellen im Körper zu erkennen und zu eradizieren. In Tumoren entwickeln sich Mechanismen zur Umgehung der Erkennung durch das Immunsystem oder zur Inaktivierung seiner Effektorfunktion. Die spezifische Therapie mit einer dendritischen Zellvakzine und immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden ist ein Ansatz, diese Abwehrmechanismen von Malignomen zu überwinden. Mit diesem sind in unserer Arbeitsgruppe vielversprechende Erfolge in subkutanen Modellen gastrointestinaler Tumore bei Mäusen gelungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Fortentwicklung dieser therapeutischen Strategie, um autochthon gewachsene, etablierte Tumoren effektiv zu therapieren. Hierfür verwendeten wir eine für das Onkogen SV40-*large-T-antigen* transgene Mauslinie, die mit hundertprozentiger Penetranz Tumoren der Magenschleimhaut im Pylorusbereich entwickelt.

Wir benutzten zunächst die aus diesen Magentumoren isolierte Zelllinie mGC3, um unsere Therapie an subkutan wachsenden Tumoren in Wildtyp-Mäusen zu etablieren. Alle Versuchstiere zeigten ein signifikant reduziertes oder ausbleibendes Tumorwachstum nach prophylaktischer Vakzine. Letztere bestand aus dendritischen Zellen, die mit bestrahlten ganzen Tumorzellen beladen und mit CpG-Oligonukleotiden als Adjuvans verabreicht wurden. Insgesamt 11 von 19 Mäusen stießen den für alle Kontrolltiere letalen Tumor unter Therapie ab. Selbst ohne weiteren Booster oder Adjuvans blieb bei erneuter Injektion der zehnfachen letalen Tumordosis ein halbes Jahr später die Hälfte dieser Mäuse tumorfrei über den gesamten Beobachtungszeitraum von über 100 Tagen. Auch wenn die letzte Therapie mehr als 300 Tage zurück lag, zeigten alle therapierten Mäuse zumindest ein deutlich verzögertes Tumorwachstum.

Die für das SV40-*large-T-antigen* transgenen Mäuse zeigen eine starke zentrale Immuntoleranz, die wir in aktiven Immuntherapieansätzen bisher nicht durchbrechen konnten. Deshalb transferierten wir Splenozyten immunisierter Wildtyp-Tiere in die transgenen Mäuse, wodurch uns hier erstmals ein therapeutischer Effekt gelang: Subkutan implantierte Tumore zeigten signifikant vermindertes oder ausbleibendes Wachstum auch in transgenen Tieren. In subkutanen wie autochthonen Tumoren desselben Wirts konnten wir signifikant vermehrte Infiltrationen durch Effektorzellen nach der spezifischen Immuntherapie nachweisen. Es gelang jedoch nicht, durch unsere Therapie die Größe autochthoner Tumore zu verringern oder das Überleben der transgenen Tiere zu verbessern.

Zuletzt erprobten wir ein neuartiges Trägersystem für immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide, um diese zielgerichtet applizieren zu können (*tissue targeting*). Kationische Gelatine-Nanopartikel zeigten sich dabei als effektive Träger für Oligonukleotide *in vitro* wie auch *in vivo*.

Mit dieser Arbeit wurden wichtige Schritte vom subkutanen zum autochthonen Tumormodell auf dem Weg zu einer effektiven Immuntherapie gastrointestinaler Tumore unternommen. Insbesondere erlaubt unser neu etabliertes Modell die vergleichende Untersuchung von subkutan injizierten und autochthon wachsenden Tumoren der gleichen Tumorart im selben Tier.

6. Literaturverzeichnis

Albert M. L., Darnell J. C., Bender A., Francisco L. M., Bhardwaj N. and Darnell R. B. (1998a): "Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration". Nat Med **4**: pp. 1321-1324

Albert M. L., Pearce S. F., Francisco L. M., Sauter B., Roy P., Silverstein R. L. and Bhardwaj N. (1998b): "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.". J Exp Med **188**: pp. 1359-1368

Anderson M. S., Venanzi E. S., Klein L., Chen Z., Berzins S. P., Turley S. J., von Boehmer H., Bronson R., Dierich A., Benoist C. and Mathis D. (2002): "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.". Science **298**: pp. 1395-1401

Ballas Z. K., Krieg A. M., Warren T., Rasmussen W., Davis H. L., Waldschmidt M. and Weiner G. J. (2001): "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs". J Immunol **167**: pp. 4878-4886

Barrat F. J., Cua D. J., Boonstra A., Richards D. F., Crain C., Savelkoul H. F., de Waal-Malefyt R., Coffman R. L., Hawrylowicz C. M. and O'Garra A. (2002): "In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines". J Exp Med **195**: pp. 603-616

Bonifaz L. C., Bonnyay D. P., Charalambous A., Darguste D. I., Fujii S., Soares H., Brimnes M. K., Moltedo B., Moran T. M. and Steinman R. M. (2004): "In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination". J Exp Med **199**: pp. 815-824

Bonmassar E., Menconi E., Goldin A. and Cudkowicz G. (1974): "Escape of small numbers of allogeneic lymphoma cells from immune surveillance". J Natl Cancer Inst **53**: pp. 475-479

Bourquin C., Anz D., Zwiorek K., Lanz A., Fuchs S., Weigel S., Wurzenberger C., von der Borch P., Golic M., Moder S., Winter G., Coester C. and Endres S. (2008): "Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity.". J Immunol **181**: pp. 2990-2998

Bradl M., Klein-Szanto A., Porter S. and Mintz B. (1991): "Malignant melanoma in transgenic mice". Proc Natl Acad Sci U S A **88**: pp. 164-168

Bronte V., Wang M., Overwijk W. W., Surman D. R., Pericle F., Rosenberg S. A. and Restifo N. P. (1998): "Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells.". J Immunol **161**: pp. 5313-5320

Cabrera T., Angustias Fernandez M., Sierra A., Garrido A., Herruzo A., Escobedo A., Fabra A. and Garrido F. (1996): "High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas.". Hum Immunol **50**: pp. 127-134

Camporeale A., Boni A., Iezzi G., Degl'Innocenti E., Grioni M., Mondino A. and Bellone M. (2003): "Critical impact of the kinetics of dendritic cells activation on the in vivo induction of tumor-specific T lymphocytes". Cancer Res **63**: pp. 3688-3694

Chen D., Xia J., Tanaka Y., Chen H., Koido S., Wernet O., Mukherjee P., Gendler S. J., Kufe D. and Gong J. (2003): "Immunotherapy of spontaneous mammary carcinoma with fusions of dendritic cells and mucin 1-positive carcinoma cells". Immunology **109**: pp. 300-307

Chen Y., Kuchroo V. K., Inobe J., Hafler D. A. and Weiner H. L. (1994): "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.". Science **265**: pp. 1237-1240

Chen Z., Moyana T., Saxena A., Warrington R., Jia Z. and Xiang J. (2001): "Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells". Int J Cancer **93**: pp. 539-548

Coley W. B. (1991): "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893.". Clin Orthop Relat Res : pp. 3-11

Connolly D. C., Bao R., Nikitin A. Y., Stephens K. C., Poole T. W., Hua X., Harris S. S., Vanderhyden B. C. and Hamilton T. C. (2003): "Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIIR promoter develop epithelial ovarian cancer". Cancer Res **63**: pp. 1389-1397

Degl'Innocenti E., Grioni M., Boni A., Camporeale A., Bertilaccio M. T. S., Freschi M., Monno A., Arcelloni C., Greenberg N. M. and Bellone M. (2005): "Peripheral T cell tolerance occurs early during spontaneous prostate cancer development and can be rescued by dendritic cell immunization". Eur J Immunol **35**: pp. 66-75

Deichman G. I. (1969): "Immunological aspects of carcinogenesis by deoxyribonucleic acid tumor viruses". Adv Cancer Res **12**: pp. 101-136

Delamarre L., Holcombe H. and Mellman I. (2003): "Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation.". J Exp Med **198**: pp. 111-122

Delemarre F. G., Kors N. and van Rooijen N. (1990b): "The in situ immune response in popliteal lymph nodes of mice after macrophage depletion. Differential effects of

macrophages on thymus-dependent and thymus-independent immune responses.". Immunobiology **180**: pp. 395-404

Delemarre F. G., Kors N. and van Rooijen N. (1990): "Elimination of spleen and of lymph node macrophages and its difference in the effect on the immune response to particulate antigens.". Immunobiology **182**: pp. 70-78

Dhodapkar M. V., Steinman R. M., Krasovsky J., Munz C. and Bhardwaj N. (2001): "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells". J Exp Med **193**: pp. 233-238

Dhodapkar M. V., Steinman R. M., Sapp M., Desai H., Fossella C., Krasovsky J., Donahoe S. M., Dunbar P. R., Cerundolo V., Nixon D. F. and Bhardwaj N. (1999): "Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells". J Clin Invest **104**: pp. 173-180

Dighe A. S., Richards E., Old L. J. and Schreiber R. D. (1994): "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors". Immunity **1**: pp. 447-456

Dilioglou S., Cruse J. M. and Lewis R. E. (2003): "Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells.". Exp Mol Pathol **75**: pp. 217-227

Drake C. G., Jaffee E. and Pardoll D. M. (2006): "Mechanisms of immune evasion by tumors". Adv Immunol **90**: pp. 51-81

Dudda J. C., Simon J. C. and Martin S. (2004): "Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets.". J Immunol **172**: pp. 857-863

Dudley M. E., Wunderlich J. R., Yang J. C., Sherry R. M., Topalian S. L., Restifo N. P., Royal R. E., Kammula U., White D. E., Mavroukakis S. A., Rogers L. J., Gracia G. J., Jones S. A., Mangiameli D. P., Pelletier M. M., Gea-Banacloche J., Robinson M. R., Berman D. M., Filie A. C., Abati A. and Rosenberg S. A. (2005): "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma.". J Clin Oncol **23**: pp. 2346-2357

Esteban F., Concha A., Huelin C., Pérez-Ayala M., Pedrinaci S., Ruiz-Cabello F. and Garrido F. (1989): "Histocompatibility antigens in primary and metastatic squamous cell carcinoma of the larynx.". Int J Cancer **43**: pp. 436-442

Euvrard S., Kanitakis J. and Claudy A. (2003): "Skin cancers after organ transplantation". N Engl J Med **348**: pp. 1681-1691

Fay J. W., Palucka A. K., Paczesny S., Dhodapkar M., Johnston D. A., Burkeholder S., Ueno H. and Banchereau J. (2006): "Long-term outcomes in patients with metastatic

melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34(+) progenitor-derived dendritic cells". Cancer Immunol Immunother **55**: pp. 1209-1218

Fearon E. R. and Vogelstein B. (1990): "A genetic model for colorectal tumorigenesis.". Cell **61**: pp. 759-767

Finkelman F. D., Lees A., Birnbaum R., Gause W. C. and Morris S. C. (1996): "Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion.". J Immunol **157**: pp. 1406-1414

Foley E. J. (1953): "Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin". Cancer Res **13**: pp. 835-837

Fontenot J. D. and Rudensky A. Y. (2005): "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3". Nat Immunol **6**: pp. 331-337

Gabrilovich D. (2004): "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects.". Nat Rev Immunol **4**: pp. 941-952

Gabrilovich D. I., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D. and Carbone D. P. (1996): "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells". Nat Med **2**: pp. 1096-1103

Gallucci S., Lolkema M. and Matzinger P. (1999): "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells". Nat Med **5**: pp. 1249-1255

Gambineri E., Torgerson T. R. and Ochs H. D. (2003): "Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis". Curr Opin Rheumatol **15**: pp. 430-435

Gerlini G., Tun-Kyi A., Dudli C., Burg G., Pimpinelli N. and Nestle F. O. (2004): "Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions". Am J Pathol **165**: pp. 1853-1863

Ghiringhelli F., Larmonier N., Schmitt E., Parcellier A., Cathelin D., Garrido C., Chauffert B., Solary E., Bonnotte B. and Martin F. (2004): "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative". Eur J Immunol **34**: pp. 336-344

Gil-Torregrosa B. C., Lennon-Duménil A. M., Kessler B., Guermonprez P., Ploegh H. L., Fruci D., van Endert P. and Amigorena S. (2004): "Control of cross-presentation during dendritic cell maturation.". Eur J Immunol **34**: pp. 398-407

Gorelik L. and Flavell R. A. (2001): "Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells.". Nat Med **7**: pp. 1118-1122

Greenberg N. M., DeMayo F., Finegold M. J., Medina D., Tilley W. D., Aspinall J. O., Cunha G. R., Donjacour A. A., Matusik R. J. and Rosen J. M. (1995): "Prostate cancer in a transgenic mouse". Proc Natl Acad Sci U S A **92**: pp. 3439-3443

Guy C. T., Cardiff R. D. and Muller W. J. (1992): "Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease". Mol Cell Biol **12**: pp. 954-961

Heckelsmiller K., Beck S., Rall K., Sipos B., Schlamp A., Tuma E., Rothenfusser S., Endres S. and Hartmann G. (2002a): "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy". Eur J Immunol **32**: pp. 3235-3245

Hermans I. F., Chong T. W., Palmowski M. J., Harris A. L. and Cerundolo V. (2003): "Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model". Cancer Res **63**: pp. 8408-8413

Higgins D., Marshall J. D., Traquina P., Van Nest G. and Livingston B. D. (2007): "Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant". Expert Rev Vaccines **6**: pp. 747-759

Houtenbos I., Westers T. M., Ossenkoppele G. J. and van de Loosdrecht A. A. (2005): "Employing the immunological synapse in AML: development of leukemic dendritic cells for active specific immunization". Immunobiology **210**: pp. 249-257

Hsu F. J., Benike C., Fagnoni F., Liles T. M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E. G. and Levy R. (1996): "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells". Nat Med **2**: pp. 52-58

Hwang R. F., Moore T., Arumugam T., Ramachandran V., Amos K. D., Rivera A., Ji B., Evans D. B. and Logsdon C. D. (2008): "Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression.". Cancer Res **68**: pp. 918-926

Hämmerling G. J., Schönrich G., Momburg F., Auphan N., Malissen M., Malissen B., Schmitt-Verhulst A. M. and Arnold B. (1991): "Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen.". Immunol Rev **122**: pp. 47-67

Ichihara F., Kono K., Takahashi A., Kawaida H., Sugai H. and Fujii H. (2003): "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers". Clin Cancer Res **9**: pp. 4404-4408

Ikezawa Y., Nakazawa M., Tamura C., Takahashi K., Minami M. and Ikezawa Z. (2005): "Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25+ CD4+ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity". J Dermatol Sci **39**: pp. 105-112

Inaba K., Turley S., Iyoda T., Yamaide F., Shimoyama S., Reis e Sousa C., Germain R. N., Mellman I. and Steinman R. M. (2000): "The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli". J Exp Med **191**: pp. 927-936

Iweala O. I. and Nagler C. R. (2006): "Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora.". Immunol Rev **213**: pp. 82-100

Jansen J. H., Wientjens G. J., Fibbe W. E., Willemze R. and Kluin-Nelemans H. C. (1989): "Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4". J Exp Med **170**: pp. 577-582

Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C. and Thun M. J. (2006): "Cancer statistics, 2006". CA Cancer J Clin **56**: pp. 106-130

Jones P. A. and Baylin S. B. (2002): "The fundamental role of epigenetic events in cancer.". Nat Rev Genet **3**: pp. 415-428

Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los Santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K., Zavala F., Pamer E. G., Littman D. R. and Lang R. A. (2002): "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens.". Immunity **17**: pp. 211-220

Junt T., Scandella E. and Ludewig B. (2008): "Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence.". Nat Rev Immunol **8**: pp. 764-775

Kadaoui K. A. and Corthésy B. (2004): “Isolation of dendritic cells from mouse Peyer’s patches using magnetic cell sorting”. MACS & more **8**: pp. 10-12

Kaliński P., Hilkens C. M., Wierenga E. A. and Kapsenberg M. L. (1999): "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal.". Immunol Today **20**: pp. 561-567

Kapsenberg M. L. (2003): "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.". Nat Rev Immunol **3**: pp. 984-993

Kawaida H., Kono K., Takahashi A., Sugai H., Mimura K., Miyagawa N., Omata H., Ooi A. and Fujii H. (2005): "Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer". J Surg Res **124**: pp. 151-157

Khong H. T. and Restifo N. P. (2002): "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes.". Nat Immunol **3**: pp. 999-1005

Kim J. M., Rasmussen J. P. and Rudensky A. Y. (2007): "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice". Nat Immunol **8**: pp. 191-197

Kochenderfer J. N. and Gress R. E. (2007): "A comparison and critical analysis of preclinical anticancer vaccination strategies". Exp Biol Med (Maywood) **232**: pp. 1130-1141

Kokhaei P., Rezvany M. R., Virving L., Choudhury A., Rabbani H., Osterborg A. and Mellstedt H. (2003): "Dendritic cells loaded with apoptotic tumour cells induce a stronger T-cell response than dendritic cell-tumour hybrids in B-CLL". Leukemia **17**: pp. 894-899

Krieg A. M. (2007): "Development of TLR9 agonists for cancer therapy". J Clin Invest **117**: pp. 1184-1194

Kyte J. A. and Gaudernack G. (2006): "Immuno-gene therapy of cancer with tumour-mRNA transfected dendritic cells". Cancer Immunol Immunother **55**: pp. 1432-1442

Kyte J. A., Kvalheim G., Lislerud K., thor Straten P., Dueland S., Aamdal S. and Gaudernack G. (2007): "T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells". Cancer Immunol Immunother **56**: pp. 659-675

Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A. and Sallusto F. (2000): "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells". Nat Immunol **1**: pp. 311-316

Lanier L. L. (2008): "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition". Nat Immunol **9**: pp. 495-502

Lebre M. C., Antons J. C., Kalinski P., Schuitemaker J. H. N., van Capel T. M. M., Kapsenberg M. L. and De Jong E. C. (2003): "Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18.". J Invest Dermatol **120**: pp. 990-997

Lemos M. P., Esquivel F., Scott P. and Laufer T. M. (2004): "MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of Leishmania major.". J Exp Med **199**: pp. 725-730

Lemos M. P., Fan L., Lo D. and Laufer T. M. (2003): "CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cell-restricted MHC class II controls Th1 CD4+ T cell immunity.". J Immunol **171**: pp. 5077-5084

Li L., Giannopoulos K., Reinhardt P., Tabarkiewicz J., Schmitt A., Greiner J., Rolinski J., Hus I., Dmoszynska A., Wiesneth M. and Schmitt M. (2006): "Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts". Int J Oncol **28**: pp. 855-861

Li M. O., Wan Y. Y., Sanjabi S., Robertson A. L. and Flavell R. A. (2006): "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses.". Annu Rev Immunol **24**: pp. 99-146

Liston A., Lesage S., Wilson J., Peltonen L. and Goodnow C. C. (2003): "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells.". Nat Immunol **4**: pp. 350-354

Loeffler M., Krüger J. A. and Reisfeld R. A. (2005): "Immunostimulatory effects of low-dose cyclophosphamide are controlled by inducible nitric oxide synthase". Cancer Res **65**: pp. 5027-5030

Luft T., Luetjens P., Hochrein H., Toy T., Masterman K., Rizkalla M., Maliszewski C., Shortman K., Cebon J. and Maraskovsky E. (2002): "IFN-alpha enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells.". Int Immunol **14**: pp. 367-380

Lutsiak M. E. C., Semnani R. T., De Pascalis R., Kashmiri S. V. S., Schlom J. and Sabzevari H. (2005): "Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide". Blood **105**: pp. 2862-2868

Ma J., Urba W. J., Si L., Wang Y., Fox B. A. and Hu H. (2003): "Anti-tumor T cell response and protective immunity in mice that received sublethal irradiation and immune reconstitution.". Eur J Immunol **33**: pp. 2123-2132

Mahnke K. and Enk A. H. (2005): "Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells?". Curr Top Microbiol Immunol **293**: pp. 133-150

Maraskovsky E., Brasel K., Teepe M., Roux E. R., Lyman S. D., Shortman K. and McKenna H. J. (1996): "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified.". J Exp Med **184**: pp. 1953-1962

Masumori N., Thomas T. Z., Chaurand P., Case T., Paul M., Kasper S., Caprioli R. M., Tsukamoto T., Shappell S. B. and Matusik R. J. (2001): "A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential". Cancer Res **61**: pp. 2239-2249

Maus M. V., Thomas A. K., Leonard D. G. B., Allman D., Addya K., Schlienger K., Riley J. L. and June C. H. (2002): "Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB.". Nat Biotechnol **20**: pp. 143-148

McGargill M. A., Derbinski J. M. and Hogquist K. A. (2000): "Receptor editing in developing T cells.". Nat Immunol **1**: pp. 336-341

Melero I., Hervas-Stubbs S., Glennie M., Pardoll D. M. and Chen L. (2007): "Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy.". Nat Rev Cancer **7**: pp. 95-106

Mizukami Y., Kono K., Kawaguchi Y., Akaike H., Kamimura K., Sugai H. and Fujii H. (2008): "CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3(+) regulatory T cells in gastric cancer". Int J Cancer :

Moore K. W., de Waal Malefyt R., Coffman R. L. and O'Garra A. (2001): "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.". Annu Rev Immunol **19**: pp. 683-765

Mora J. R., Bono M. R., Manjunath N., Weninger W., Cavanagh L. L., Rosemblatt M. and Von Andrian U. H. (2003): "Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells.". Nature **424**: pp. 88-93

Mora J. R., Cheng G., Picarella D., Briskin M., Buchanan N. and von Andrian U. H. (2005): "Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues". J Exp Med **201**: pp. 303-316

Mueller M. M. and Fusenig N. E. (2004): "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer.". Nat Rev Cancer **4**: pp. 839-849

Mukherjee P., Ginardi A. R., Madsen C. S., Sterner C. J., Adriance M. C., Tevethia M. J. and Gendler S. J. (2000): "Mice with spontaneous pancreatic cancer naturally develop MUC-1-specific CTLs that eradicate tumors when adoptively transferred". J Immunol **165**: pp. 3451-3460

Mukherjee P., Ginardi A. R., Madsen C. S., Tinder T. L., Jacobs F., Parker J., Agrawal B., Longenecker B. M. and Gendler S. J. (2001): "MUC1-specific CTLs are non-functional within a pancreatic tumor microenvironment". Glycoconj J **18**: pp. 931-942

Mullins D. W., Sheasley S. L., Ream R. M., Bullock T. N. J., Fu Y. and Engelhard V. H. (2003): "Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control". J Exp Med **198**: pp. 1023-1034

Münz C., Steinman R. M. and Fujii S. (2005): "Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity". J Exp Med **202**: pp. 203-207

Naito S., von Eschenbach A. C. and Fidler I. J. (1987): "Different growth pattern and biologic behavior of human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice". J Natl Cancer Inst **78**: pp. 377-385

Natali P. G., Cavaliere R., Bigotti A., Nicotra M. R., Russo C., Ng A. K., Giacomini P. and Ferrone S. (1983): "Antigenic heterogeneity of surgically removed primary and autologous metastatic human melanoma lesions.". J Immunol **130**: pp. 1462-1466

Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G. and Schadendorf D. (1998): "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells". Nat Med **4**: pp. 328-332

Nöckel J., van den Engel N. K., Leithauser F., Winter H., Hatz R., Zimmermann R. and Kammerer R. (2004): „Characterization of a novel murine *in vivo* model, designed to evaluate the potential of immunotherapy of gastric carcinoma". Poster auf dem *19th Annual Meeting of the International Society for Biological Therapy of Cancer*

Nöckel J., van den Engel N. K., Winter H., Hatz R. A., Zimmermann W. and Kammerer R. (2006): "Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene". BMC Cancer **6**: p. 57

Ostrand-Rosenberg S. (2004): "Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines". Curr Opin Immunol **16**: pp. 143-150

Otahal P., Schell T. D., Hutchinson S. C., Knowles B. B. and Tevethia S. S. (2006): "Early immunization induces persistent tumor-infiltrating CD8+ T cells against an immunodominant epitope and promotes lifelong control of pancreatic tumor progression in SV40 tumor antigen transgenic mice". J Immunol **177**: pp. 3089-3099

Palmer E. (2003): "Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire.". Nat Rev Immunol **3**: pp. 383-391

Peggs K. S., Quezada S. A., Korman A. J. and Allison J. P. (2006): "Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy.". Curr Opin Immunol **18**: pp. 206-213

Pekarek L. A., Starr B. A., Toledano A. Y. and Schreiber H. (1995): "Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes.". J Exp Med **181**: pp. 435-440

Rabinovich G. A., Gabrilovich D. and Sotomayor E. M. (2007): "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells". Annu Rev Immunol **25**: pp. 267-296

Ramiro-Puig E., Pérez-Cano F. J., Castellote C., Franch A. and Castell M. (2008): "[The bowel: a key component of the immune system]". Rev Esp Enferm Dig **100**: pp. 29-34

Reiman J. M., Kmieciak M., Manjili M. H. and Knutson K. L. (2007): "Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression". Semin Cancer Biol **17**: pp. 275-287

Reis e Sousa C. (2006): "Dendritic cells in a mature age.". Nat Rev Immunol **6**: pp. 476-483

Romani N., Gruner S., Brang D., Kämpgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P. O., Steinman R. M. and Schuler G. (1994): "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood". J Exp Med **180**: pp. 83-93

Romieu R., Baratin M., Kayibanda M., Lacabanne V., Ziol M., Guillet J. G. and Viguier M. (1998): "Passive but not active CD8+ T cell-based immunotherapy interferes with liver tumor progression in a transgenic mouse model". J Immunol **161**: pp. 5133-5137

Rosenblatt J., Kufe D. and Avigan D. (2005): "Dendritic cell fusion vaccines for cancer immunotherapy". Expert Opin Biol Ther **5**: pp. 703-715

Sasada T., Kimura M., Yoshida Y., Kanai M. and Takabayashi A. (2003): "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression". Cancer **98**: pp. 1089-1099

Sato K., Yamashita N., Yamashita N., Baba M. and Matsuyama T. (2003): "Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse.". Immunity **18**: pp. 367-379

Sawanobori Y., Ueha S., Kurachi M., Shimaoka T., Talmadge J. E., Abe J., Shono Y., Kitabatake M., Kakimi K., Mukaida N. and Matsushima K. (2008): "Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice". Blood **111**: pp. 5457-5466

Schadendorf D., Ugurel S., Schuler-Thurner B., Nestle F. O., Enk A., Bröcker E., Grabbe S., Rittgen W., Edler L., Sucker A., Zimpfer-Rechner C., Berger T., Kamarashev J., Burg G., Jonuleit H., Tüttenberg A., Becker J. C., Keikavoussi P., Kämpgen E., Schuler G. (2006): "Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG". Ann Oncol **17**: pp. 563-570

Schell T. D., Mylin L. M., Georgoff I., Teresky A. K., Levine A. J. and Tevethia S. S. (1999): "Cytotoxic T-lymphocyte epitope immunodominance in the control of choroid plexus tumors in simian virus 40 large T antigen transgenic mice". J Virol **73**: pp. 5981-5993

Schreiber K., Rowley D. A., Riethmüller G. and Schreiber H. (2006): "Cancer immunotherapy and preclinical studies: why we are not wasting our time with animal experiments". Hematol Oncol Clin North Am **20**: pp. 567-584

Schwartz R. H., Mueller D. L. and Paul W. E. (publisher) (2003): „Fundamental Immunology“. Lippincott Williams & Wilkins

Segerer S. and Nelson P. J. (2005): "Chemokines in renal diseases.". ScientificWorldJournal **5**: pp. 835-844

Seung L. P., Seung S. K. and Schreiber H. (1995): "Antigenic cancer cells that escape immune destruction are stimulated by host cells.". Cancer Res **55**: pp. 5094-5100

Shurin M. R., Pandharipande P. P., Zorina T. D., Haluszczak C., Subbotin V. M., Hunter O., Brumfield A., Storkus W. J., Maraskovsky E. and Lotze M. T. (1997): "FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice.". Cell Immunol **179**: pp. 174-184

Sigal L. J., Crotty S., Andino R. and Rock K. L. (1999): "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen.". Nature **398**: pp. 77-80

Singh S., Ross S. R., Acena M., Rowley D. A. and Schreiber H. (1992): "Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells". J Exp Med **175**: pp. 139-146

Smyth M. J., Godfrey D. I. and Trapani J. A. (2001): "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy". Nat Immunol **2**: pp. 293-299

Sotomayor E. M., Borrello I., Rattis F. M., Cuenca A. G., Abrams J., Staveley-O'Carroll K. and Levitsky H. I. (2001): "Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression". Blood **98**: pp. 1070-1077

Spiotto M. T., Rowley D. A. and Schreiber H. (2004): "Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors.". Nat Med **10**: pp. 294-298

Stagg A. J., Kamm M. A. and Knight S. C. (2002): "Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin". Eur J Immunol **32**: pp. 1445-1454

Steinbrink K., Wölfl M., Jonuleit H., Knop J. and Enk A. H. (1997): "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.". J Immunol **159**: pp. 4772-4780

Steinman R. M. and Inaba K. (1988): "The binding of antigen presenting cells to T lymphocytes.". Adv Exp Med Biol **237**: pp. 31-41

Steinman R. M. and Nussenzweig M. C. (2002): "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.". Proc Natl Acad Sci U S A **99**: pp. 351-358

Steinman R. M., Hawiger D. and Nussenzweig M. C. (2003): "Tolerogenic dendritic cells.". Annu Rev Immunol **21**: pp. 685-711

Talmadge J. E., Singh R. K., Fidler I. J. and Raz A. (2007): "Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer". Am J Pathol **170**: pp. 793-804

Tang Y., Zhang L., Yuan J., Akbulut H., Maynard J., Linton P. and Deisseroth A. (2004): "Multistep process through which adenoviral vector vaccine overcomes anergy to tumor-associated antigens". Blood **104**: pp. 2704-2713

Terabe M., Matsui S., Noben-Trauth N., Chen H., Watson C., Donaldson D. D., Carbone D. P., Paul W. E. and Berzofsky J. A. (2000): "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway.". Nat Immunol **1**: pp. 515-520

Thomas D. A. and Massagué J. (2005): "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance.". Cancer Cell **8**: pp. 369-380

Thompson J., Epting T., Schwarzkopf G., Singhofen A., Eades-Perner A. M., van Der Putten H. and Zimmermann W. (2000): "A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy". Int J Cancer **86**: pp. 863-869

Torre-Amione G., Beauchamp R. D., Koeppen H., Park B. H., Schreiber H., Moses H. L. and Rowley D. A. (1990): "A highly immunogenic tumor transfected with a murine

transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance.". Proc Natl Acad Sci U S A **87**: pp. 1486-1490

Trombetta E. S. and Mellman I. (2005): "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo.". Annu Rev Immunol **23**: pp. 975-1028

Trombetta E. S., Ebersold M., Garrett W., Pypaert M. and Mellman I. (2003): "Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation". Science **299**: pp. 1400-1403

Veldhoen M., Hocking R. J., Atkins C. J., Locksley R. M. and Stockinger B. (2006): "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.". Immunity **24**: pp. 179-189

Vicari A. P., Chiodoni C., Vaure C., Aït-Yahia S., Dercamp C., Matsos F., Reynard O., Taverne C., Merle P., Colombo M. P., O'Garra A., Trinchieri G. and Caux C. (2002): "Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody.". J Exp Med **196**: pp. 541-549

Vieira P. L., de Jong E. C., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L. and Kaliński P. (2000): "Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction.". J Immunol **164**: pp. 4507-4512

Wang F., Huang C. Y. and Kanagawa O. (1998): "Rapid deletion of rearranged T cell antigen receptor (TCR) Valpha-Jalpha segment by secondary rearrangement in the thymus: role of continuous rearrangement of TCR alpha chain gene and positive selection in the T cell repertoire formation.". Proc Natl Acad Sci U S A **95**: pp. 11834-11839

Wang T., Niu G., Kortylewski M., Burdelya L., Shain K., Zhang S., Bhattacharya R., Gabrilovich D., Heller R., Coppola D., Dalton W., Jove R., Pardoll D. and Yu H. (2004): "Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells.". Nat Med **10**: pp. 48-54

West M. A., Wallin R. P. A., Matthews S. P., Svensson H. G., Zaru R., Ljunggren H., Prescott A. R. and Watts C. (2004): "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling.". Science **305**: pp. 1153-1157

Whitwell H. L., Hughes H. P., Moore M. and Ahmed A. (1984): "Expression of major histocompatibility antigens and leucocyte infiltration in benign and malignant human breast disease.". Br J Cancer **49**: pp. 161-172

Wiemann B. and Starnes C. O. (1994): "Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective.". Pharmacol Ther **64**: pp. 529-564

Willimsky G. and Blankenstein T. (2007): "The adaptive immune response to sporadic cancer". Immunol Rev **220**: pp. 102-112

de Witte M. A., Jorritsma A., Kaiser A., van den Boom M. D., Dokter M., Bendle G. M., Haanen J. B. A. G. and Schumacher T. N. M. (2008): "Requirements for effective antitumor responses of TCR transduced T cells.". J Immunol **181**: pp. 5128-5136

Worbs T., Bode U., Yan S., Hoffmann M. W., Hintzen G., Bernhardt G., Förster R. and Pabst O. (2006): "Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells". J Exp Med **203**: pp. 519-527

Xia J., Tanaka Y., Koido S., Liu C., Mukherjee P., Gendler S. J. and Gong J. (2003): "Prevention of spontaneous breast carcinoma by prophylactic vaccination with dendritic/tumor fusion cells". J Immunol **170**: pp. 1980-1986

Ye X., McCarrick J., Jewett L. and Knowles B. B. (1994): "Timely immunization subverts the development of peripheral nonresponsiveness and suppresses tumor development in simian virus 40 tumor antigen-transgenic mice". Proc Natl Acad Sci U S A **91**: pp. 3916-3920

Yu P., Rowley D. A., Fu Y. and Schreiber H. (2006): "The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors". Curr Opin Immunol **18**: pp. 226-231

Zheng X., Gao J., Zhang H., Geiger T. L., Liu Y. and Zheng P. (2002): "Clonal deletion of simian virus 40 large T antigen-specific T cells in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate mice: an important role for clonal deletion in shaping the repertoire of T cells specific for antigens overexpressed in solid tumors". J Immunol **169**: pp. 4761-4769

Zhu Y., Tibensky I., Schmidt J., Ryschich E. and Märten A. (2008): "Interferon-alpha enhances antitumor effect of chemotherapy in an orthotopic mouse model for pancreatic adenocarcinoma.". J Immunother **31**: pp. 599-606

Zwiorek K., Bourquin C., Battiany J., Winter G., Endres S., Hartmann G. and Coester C. (2007): "Delivery by Cationic Gelatin Nanoparticles Strongly Increases the Immunostimulatory Effects of CpG Oligonucleotides". Pharm Res :

Zwiorek K., Kloeckner J., Wagner E. and Coester C. (2005): "Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system". J Pharm Pharm Sci **7**: pp. 22-28

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Allophycocyanin
B16	Klonierte Melanomzelllinie mit C57Bl/6 Maushintergrund
BALB/c	Eine häufig verwendete Albino-Mauslinie
BSA	Bovines Serum-Albumin
C26	Klonierte Kolonkarzinomzelllinie mit BALB/c Maushintergrund
C57Bl/6	“C57 Black 6”, eine häufig verwendete Mauslinie
CD	*Cluster of differentiation*
CEA	Karzino-Embryonales Antigen
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
FACS	*Fluorescence-activated cell sorter*
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HBSS	*Hank’s balanced saline solution*IFN Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	*Interferon-γ inducible protein* 10
LPAM	*Lymphocyte Peyer’s patch adhesion molecule*
MACS	*Magnetic-activated cell sorting*
mGC	Heterogenes Zellgemisch aus Magenkarzinomzellen (*murine gastric cancer*)
MHC	*Major histocompatibility complex*
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PG	Prostaglandin
TGF-β	*Transforming growth factor* β
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

8. Danksagung

Zunächst möchte ich meiner Familie danken, besonders meiner Mutter, die mit ihrer unermüdlichen Unterstützung nicht nur diese Arbeit, sondern mein ganzes Studium überhaupt erst möglich gemacht hat.

Als nächstes gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres, der es nach wie vor wie kein zweiter vermag, eine freundliche, geradezu familiäre Atmosphäre in der Abteilung zu schaffen und damit jedermanns Arbeit zu beflügeln. In meiner experimentellen Zeit war er mir Mentor, Förderer und Wegbereiter, unter anderem auch zu wissenschaftlichen Kongressen. In der Zeit danach habe ich dank des von ihm in mich gesetzten Vertrauens zusätzlich noch viele wertvolle Erfahrungen in der außerordentlich angenehmen Zusammenarbeit sammeln dürfen. Ich bin Professor Endres überaus dankbar.

Ich danke außerordentlich für den geduldigen Rat, die Vision und Führung durch meine Betreuerin Frau PD Dr. Dr. Carole Bourquin, die unsere Arbeitsgruppe zur offenen und gut funktionierenden Einheit machte und es immer wieder verstand, aus den vielen Ideen die für mich lohnendsten Experimente zu destillieren.

Meinem ersten Betreuer, Dr. Martin Schneider, danke ich besonders für die Einarbeitung und die frühe Bahnung einer vernünftigen Struktur meiner Arbeitsabläufe, die mich sicherlich vor einiger Mehrarbeit bewahrt hat.

Weiterer Dank gilt Dr. David Anz, dessen fortwährender Forschungselan eine Inspiration, seine tatkräftige Unterstützung vor allem bei der Histologie eine große Hilfe für meine Arbeit waren. Ich danke meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe – ganz besonders Cornelia Wurzenberger, aber auch Susanne Schreiber, Andreas Völkl, Susanne Wenk und Nadja Sandholzer – für ihre Hilfe und die äußerst angenehme Zusammenarbeit.

Ferner danke ich herzlich unseren Partnern Dr. Robert Kammerer und Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann für die Bereitstellung der Maus- und Zelllinien und viele fruchtbare gemeinsame Beratungsgespräche. Außerdem gebührt mein Dank Dr. Klaus Zwiorek und Dr. Conrad Coester für die freundliche Herstellung und Überlassung der Nanopartikel.

9. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. Bourquin C., Anz D., Zwiorek K., Lanz A., Fuchs S., Weigel S., Wurzenberger C., **von der Borch P.**, Golic M., Moder S., Winter G., Coester C. and Endres S. (2008): "Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity". J Immunol 181: pp. 2990-2998

2. Bourquin C., **von der Borch P.**, Zoglmeier C., Denzel A., Sandholzer N., Weigel S., Zimmermann W., Kammerer R., Endres S.: „Efficient eradication of subcutaneous but not of autochthonous gastric tumors in the SV40TAg mouse model by adoptive T-cell transfer". Manuskript eingereicht.

Poster

1. Bourquin C., **von der Borch P.**, Wurzenberger C., Schneider M., Kammerer R., Zimmermann W., Endres S.: „CpG oligonucleotides and dendritic cell vaccination for immunotherapy in a mouse model of gastric cancer". Poster auf dem Workshop „Microbial antigens – influence on immune responses – generation of autoimmunity" in Murnau, 2. bis 3.12.2005

2. **von der Borch P.**, Wurzenberger C., Anz D., Schneider P., Schneider M., Kammerer R., Zimmermann W., Endres S., Bourquin C.: "CpG and Dendritic Cell Vaccination in a Gastric Cancer Model Derived from Tag Transgenic Mice". Poster auf dem 1. gemeinsamen Kongress der Europäischen Nationalen Gesellschaften für Immunologie in Paris, 6. bis 9.9.2006

3. **von der Borch P.**, Dimitriadis K., Mucha S., Hohenester S., Niess H., Greiner D., Sonne C.: „Creating Mentality: Inception of a Mentoring Program at the LMU Medical School". Poster auf dem Residents' Research Day 2008 der University of Chicago in Chicago, USA, 3.6.2008

4. **von der Borch P.**, Dimitriadis K., Hof M., Niedermayer S., Reincke M., Fischer M. R.: „Studierenden-zentrierter Aufbau eines Mentorenprogramms an der Medizinischen Fakultät

der LMU: Bedarfsanalyse und Konzeption“. Posterpreisgewinner auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung in Greifswald, 2. bis 5.10.2008

Vorträge

1. Dimitriadis K., **von der Borch P.**, Störmann S., Meinel F., Reincke M., Fischer M. R.: „Mentoring medical students: A novel student-centered program yields promising evaluation results“. Vortrag auf dem internationalen Kongress “Research in Medical Education: Chances and Challenges” in Heidelberg, 20. bis 22.5.2009

2. Störmann S., **von der Borch P.**, Dimitriadis K., Meinel F., Reincke M., Fischer M. R.: „Mentoring relationships: An innovative approach to finding the perfect match“. Vortrag auf dem internationalen Kongress “Research in Medical Education: Chances and Challenges” in Heidelberg, 20. bis 22.5.2009

10. Lebenslauf

Philip Marten Julius Freiherr von der Borch, geboren 24. Februar 1982 in München.

Schulbildung

1987 bis 1993	Wilhelmschule, Gebeleschule und Isar-Volksschule, alle in München
1993 bis 1995	Luitpold-Gymnasium München
1995 bis 1998	Deutsche Schule Toulouse, Frankreich
1998 bis 1999	Prior Lake Senior High School, Minnesota, USA
2001 bis 2007	Deutsche Schule Toulouse, Frankreich, Abitur: sehr gut (1,0)

Studium

2001 bis 2008	Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: gut (2,3) 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: gut (2,0)

Dissertation

2004 bis 2007	Experimentelle Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Tumorimmunologie (PD Dr. Dr. Carole Bourquin) der Abteilung für Klinische Pharmakologie (Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres)

Berufstätigkeit

April 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der LMU im Projektmanagement bei der Antragsstellung für die Förderung als Spitzencluster (BMBF) (100%)
Seit Juni 2008	Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München, Pneumologie (Leitung: Prof. Dr. R. M. Huber) (50%)
	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Medizinischen Fakultät der LMU (50%), Aufbau eines Mentorenprogramms für alle Studierenden der Medizin, Initiation und Koordination der ersten „Doktorarbeitstage Medizin“ im Juni 2009

Stipendien

2001 bis 2008	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
2005	Promotionsstipendium „Molekulare Medizin“ im Rahmen der Förderung für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU
2006	Reisestipendium der DFG für den 1. Internationalen Kongress der europäischen Gesellschaften für Immunologie in Paris
2007	Stipendium für einen PJ-Aufenthalt in Chicago im Rahmen der *Munich-Harvard-Alliance for Medical Education*
2008	Posterpreis auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung