

**UNTERSUCHUNGEN ZU MECHANISMEN DER
TRIOMZELL – INDUZIERTEN TUMORABSTOßUNG**

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

vorgelegt von

Nicolas Graf

2003

Aus dem GSF-Institut für Molekulare Immunologie
Vorstand Prof. Dr. rer. nat. Dolores Schendel

**UNTERSUCHUNGEN ZU MECHANISMEN DER
TRIOMZELL – INDUZIERTEN TUMORABSTOßUNG**

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

vorgelegt von

Nicolas Graf

aus

Benediktbeuern

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

1. Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Wank

2. Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Mack

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 2003

für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
I EINFÜHRUNG	1
1 Die Bedeutung der Onkologie für Gesellschaft und Forschung	1
2 Tumorimmunologie	3
2.1 Die Antitumorantwort des Immunsystems	3
2.2 Tumorantigene	5
2.3 Tumorzellen können sich der Immunantwort entziehen	7
3 Immuntherapeutische Strategien zur Krebsbekämpfung	8
3.1 Passive Immuntherapie: monoklonale und bispezifische Antikörper	8
3.2 Aktive Immuntherapie: Vakzinierung mit Tumorantigenen und modifizierten Tumorzellen	8
3.3 Der Triomzellansatz: aktive Immuntherapie	11
3.4 Suizidgentherapie: Aktivierung des Immunsystems durch gezielte, medikamentöse Abtötung Suizidgen-transduzierter Tumorzellen	12
4 Fragestellung	14
II MATERIAL UND METHODEN	16
1 Zellkultur	16
1.1 Verwendete Zellen	16
1.2 Zellkulturbedingungen	17
1.3 Kryokonservierung	17
1.4 Transfektion	18
1.5 Transduktion	19

1.6	Reklonierung	20
2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	20
2.1	Nachweis der GM-CSF-Produktion	21
2.2	Detektion des Idiotyps	21
3	In-vivo-Versuche	22
3.1	Präimmunsierungsversuche	22
3.2	Therapieversuche	23
3.3	Milzpräparation	24
3.4	Statistische Auswertung	24
III	ERGEBNISSE	25
1	Versuche mit HSV-tk-Gen-transduzierten Lymphomzellen (A20-TK) .	25
1.1	Ganciclovirsensitivität und „Bystander“-Effekt in vitro	25
1.2	In-vivo-Versuche mit A20-TK-Zellen	27
2	Versuche mit HSV-tk-Gen-transduzierten Triomzellen (BiV-TK)	29
2.1	Präimmunsisierung mit BiV-TK-Zellen und GCV	29
2.2	Milzpräparationen aus immunisierten Mäusen	31
3	Versuche zur Tumorabstoßung mit GM-CSF-transfizierten Triomzellen	32
3.1	Therapieversuche mit BiVneg-BNG	32
3.2	Therapieversuche nach Blockade des Fc γ -Rezeptors	33
3.3	Therapieversuche mit simultaner Applikation von BiV-BNG- und A20-BNG- bzw. BiV-BNG- und BiV-Zellen	35
3.4	Die Rolle der Applikationsroute bei Präimmunsisierung und Therapie	37
3.5	Präimmunsisierung und Therapie in IL-4-defizienten Mäusen	38

IV	DISKUSSION	41
1	Suizidgentherapie bei Lymphomen	42
1.1	Ausgangslage	42
1.2	Mechanismen der Tumorabstoßung im HSV-tk-System	43
1.3	Immunisierung mit HSV-tk-transduzierten A20-Zellen	44
1.4	Ausblick	46
2	Persistenz xenogener Vakzinezellen in vivo	47
3	Tumorabstoßung mit GM-CSF-transfizierten Triomzellen	48
3.1	Ausgangslage	48
3.2	Mechanismen der Tumorabstoßung nach Gabe einer GM-CSF- modifizierten Vakzine	49
3.3	Immunisierung mit GM-CSF-transfizierten Triomzellen.....	50
3.4	Ausblick	53
V	ZUSAMMENFASSUNG	55
VI	LITERATUR	57
VII	DANKSAGUNG	70
	LEBENS LAUF	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity = Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
APC	Antigen Presenting Cell =Antigenpräsentierende Zelle
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Cs	Cäsium
CD	Cluster of Differentiation = Differenzierungsantigenantigen
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
d	Tag
DC	Dendritische Zelle(n)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay = Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
Fa.	Firma
FcR	Fc-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
GCV	Ganciclovir
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GvH-Erkrankung	„Graft versus Host“-Erkrankung
Gy	Gray
HBV	Hepatitis B-Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
HSV-tk	Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase
ICAM	Intercellular adhesion molecule = Interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Id	Idiotyp
IFN	Interferon

IL	Interleukin
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LFA	Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen
MHC	Major Histocompatibility Complex = Haupt-Gewebekompatibilitäts-Komplex
mRNA	messenger RNA
NK-Zelle(n)	Natürliche Killerzelle(n)
PBS	Phosphate Buffered Saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Pox	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TAP	Transporter associated with antigen presentation = mit Antigenpräsentation assoziierter Transporter
TH-Zelle(n)	T-Helferzelle(n)
TCR	T-Zell-Rezeptor
U	Unit
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

I EINFÜHRUNG

1 Die Bedeutung der Onkologie für Gesellschaft und Forschung

Die Inzidenz bösartiger Erkrankungen (Neuerkrankungen pro Jahr) beträgt in Deutschland derzeit ca. 400 pro 100 000 Einwohner und rangiert damit an zweiter Stelle hinter den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (Claasen et al., 1998). Malignome sind zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Da Krebs in den meisten Fällen eine Erkrankung des höheren Alters darstellt, ist zu erwarten, dass die Bedeutung der Onkologie aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung in den kommenden Jahren weiter zunehmen wird.

Die „klassischen“ Konzepte der Krebsbehandlung, nämlich operative, Strahlen- und Chemotherapie, wurden in den letzten 25 Jahren stetig verbessert. Inzwischen ist es möglich, einige Malignome auch im fortgeschrittenen Stadium zu heilen. Als Beispiele seien das Chorionkarzinom bei der Frau und das Seminom beim Mann angeführt. Allerdings sind der Anwendung dieser etablierten Verfahren auch Grenzen gesetzt. Die chirurgische und radiologische Therapie beispielsweise haben zwar in den letzten Jahren aufgrund technischer Neuerungen große Fortschritte erzielt, das Einsatzgebiet bleibt jedoch auf lokoregionale Tumoren beschränkt. Demgegenüber wird durch die Chemotherapie eine systemische Behandlung des Patienten erreicht, so dass neben dem Primärtumor auch Metastasen erfasst werden. Ein großer Nachteil dieser Therapieform ist jedoch das breite Nebenwirkungsspektrum: Übelkeit und Erbrechen, Haarausfall und Müdigkeit schränken die Lebensqualität der Patienten erheblich ein. Nicht selten kommt es zusätzlich zu einer medikamentös bedingten Leukopenie, die mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht.

Letztlich ist Tumorwachstum als Resistenz gegenüber den bisher erwähnten Therapieformen zu verstehen. Die Entwicklung neuer Strategien zur Krebsbekämpfung ist daher zu einem bedeutenden Ziel für die medizinische Forschung geworden. Insbesondere Studien im Bereich der Gen- und Immuntherapie haben dabei zu vielversprechenden Resultaten geführt (Adams et

Emerson, 1998). Diese Therapiestrategien lassen sich grundsätzlich in vier Gruppen unterteilen:

1. *Interferenzstrategien*. In diesem Ansatz interagieren DNA-Oligonukleotide, sogenannte „Antisense“-Moleküle, mit der DNA bzw. mRNA bekannter Onkogene, z.B. bcl-2 in Non-Hodkin-Lymphomen (Webb et al., 1997), und inhibieren deren Translation. Desweiteren kann man sich die Eigenschaft bestimmter RNA-Moleküle („Ribozyme“) zunutze machen, die mRNA zerschneiden. Dadurch konnte in einer Studie die Expression des bcr-abl-Fusionsproteins, ein Onkogenprodukt bei chronisch-myeloischer Leukämie, unterbunden werden (Snyder et al., 1993).
2. *Insertionstrategien*. Diese beinhalten die Einführung eines neuen Gens oder einer Ersatzkopie für ein mutiertes bzw. deletiertes Gen in das Genom der Zielzelle. So konnte beispielsweise durch Transduktion des Tumorsuppressorgens p53 in eine Leukämiezelllinie eine Zunahme der Apoptose beobachtet werden (Wills et al., 1994).
3. *Stimulierung des Immunsystems*. Ziel dieser Strategie ist es unter anderem, die Immunogenität von Tumorzellen durch Transfektion mit Genen zu erhöhen, die für Zytokine, MHC- oder kostimulierende Moleküle kodieren (Pardoll, 2000). Dies führt optimalerweise zu einer verbesserten T-Zell-Antwort gegen den Tumor. Weitere Ansatzpunkte sind die Entwicklung monoklonaler und bispezifischer Antikörper sowie die Modifizierung dendritischer Zellen.
4. *Suizidgene*. Mit dem Transfer eines Suizidgens in eine Zelle kann in dieser zu einem späteren Zeitpunkt durch Gabe eines passenden Medikaments Apoptose induziert werden. Verwendung fand dieser Ansatz bisher unter anderem bei der Kontrolle der „Graft-versus-Host“(GvH)-Erkrankung (Bonini et al., 1997). In dieser Studie wurden Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-tk)-transduzierte Spenderleukozyten gezielt mit Ganciclovir (GCV) abgetötet, wenn es zu einer GvH-Erkrankung kam.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den beiden letztgenannten Ansätzen. Auf sie wird daher weiter unten nochmals genauer eingegangen. Doch zunächst soll ein Überblick über die Wechselwirkungen zwischen Tumorzelle und Immunsystem gegeben werden.

2 Tumorimmunologie

2.1 Die Antitumorantwort des Immunsystems

Die Abwehr von Tumorzellen durch das Immunsystem kann sowohl durch zelluläre als auch humorale Mechanismen vermittelt werden.

Die spezifische zelluläre Zytotoxizität wird durch Subpopulationen der T-Zellen vermittelt: CD8- und CD4- Zellen erkennen MHC I- bzw. MHC II-restringierte Antigene. Dieser Mechanismus wird als hauptverantwortlich für die Tumorabwehr durch das Immunsystem angesehen. Die Erkennung und Abtötung von Tumorzellen ohne vorangegangenen Antigenkontakt erfolgt durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen), wobei diese Form der Immunantwort jedoch nicht spezifisch auf Tumorantigene gerichtet ist (unspezifische zelluläre Zytotoxizität).

Aktivierete B-Zell-Klone vermitteln über die Produktion antigenspezifischer Antikörper die humorale Immunantwort. Durch Komplementaktivierung, Opsonisierung und antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) können Tumorzellen abgetötet werden. Diese Mechanismen spielen im Rahmen der Tumorabstoßung aber eine eher untergeordnete Rolle.

Wie bereits erwähnt wurde, kommt dem T-Zell-System bei der Abwehr von Tumoren die größte Bedeutung zu. Der entscheidende erste Schritt der adaptiven Immunantwort ist dabei die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) (Janeway und Travers, 1997). APC besitzen die Fähigkeit zur Aufnahme und Prozessierung von Tumorantigenen, die schließlich in Peptidform über MHC-Moleküle den T-Zellen präsentiert werden (Abb.1).

Eine frühe Wechselwirkung der T-Zellen mit APC wird durch Adhäsionsmoleküle, z.B. ICAM-1 auf APC und LFA-1 auf T-Zellen, herbeigeführt. Weiterhin treten die naiven T-Zellen über ihre antigenspezifischen Rezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren (TCR), und die Korezeptoren CD4 bzw. CD8 mit dem MHC-Peptid-Komplex in Kontakt. Für eine klonale Expansion einer antigenspezifischen T-Zelle wird allerdings noch ein zweites, kostimulierendes Signal benötigt, das von derselben APC geliefert werden muss, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt. Zu den

kostimulierenden Molekülen auf Seiten der APC zählen u.a. die B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). CD28 ist der Ligand von B7 und befindet sich auf der T-Zelle. Ein Fehlen der B7-CD28-Interaktion resultiert in der Anergie der T-Zelle, einem Zustand, in dem die T-Zelle auf eine Aktivierung nicht mehr reagiert.

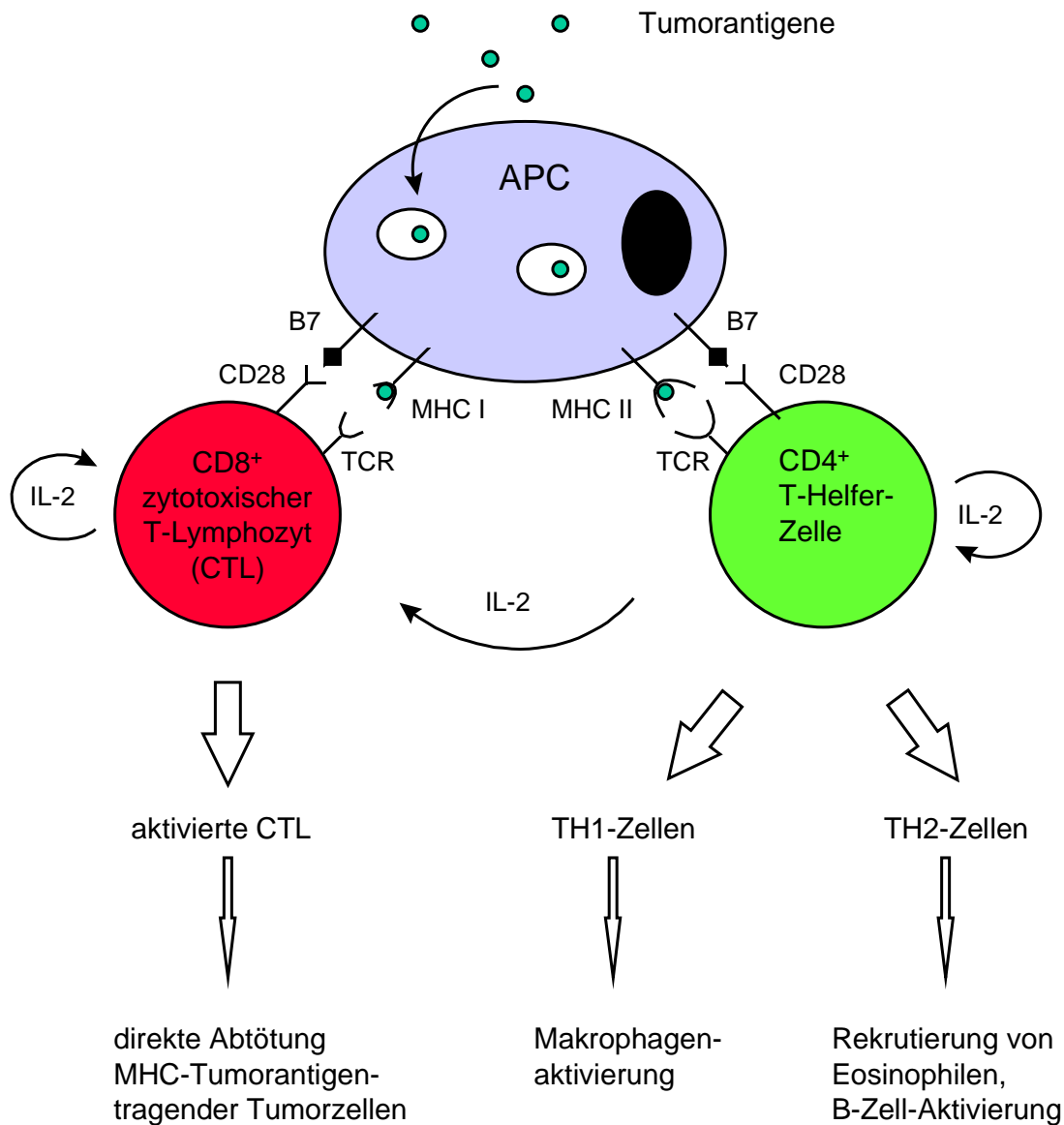


Abb.1: Zelluläre Interaktionen bei der Antitumorantwort von T-Zellen (Erläuterung im Text).

Nach Aktivierung kommt es zur Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 seitens der aktivierten T-Zelle. Letztere fördern also selbst ihre Proliferation und die Differenzierung ihrer Nachkommen zu Effektor-T-Zellen. Die wichtigste Funktion der

Effektor-T-Zellen ist das Töten der Tumorzellen durch zytotoxische CD8-Zellen (CTL), die MHC-Tumorantigen-Komplexe auf Tumorzellen erkennen und daraufhin in der Tumorzelle Apoptose induzieren oder sie direkt lysieren. Hierfür ist keine Kostimulation mehr erforderlich. Die CD4-Zellen differenzieren zu T-Helferzellen. Als Th1-Zellen sezernieren sie u.a. IFN- γ und aktivieren damit Makrophagen, die sich über Bildung reaktiver Metabolite an der Tumorabwehr beteiligen. Als Th2-Zellen produzieren sie überwiegend IL-4, welches zum einen die humorale Achse des Immunsystems aktiviert und zum anderen zu einer Rekrutierung eosinophiler Granulozyten führt, die cytotoxische Granula enthalten.

Bei der Aktivierung der CD8-Zellen durch APC ist das kostimulierende Signal häufig nicht stark genug ausgeprägt. CD4-Zellen können in dieser Situation durch ihre IL-2-Produktion eine Anergie der CD8-Zellen verhindern. In einer älteren Modellvorstellung (Janeway und Travers, 1997) ist dafür die zeitliche und räumliche Präsenz aller beteiligten Zellen nötig: APC bringt CD4- und CD8-Zelle zusammen, woraufhin die CD4-Zelle durch ihre IL-2-Produktion die CD8-Zelle aktiviert (Abb.1). In letzter Zeit mehren sich allerdings die Hinweise darauf, dass diese Interaktion auch sequenziell stattfinden kann (Ridge et al.,1998). In diesem „dynamischen“ Modell kommt es zunächst zu einer wechselseitigen Aktivierung zwischen APC und CD4-Zelle, welche die APC dazu befähigt, CD8-Zellen direkt einen Kostimulus zu verabreichen (in Abb.1 nicht eingezeichnet), ohne dass hierfür die Anwesenheit der CD4-Zelle nötig wäre.

2.2 Tumorantigene

Eine notwendige Voraussetzung für die Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunantwort sind Antigene, die über MHC-Moleküle präsentiert werden. Die Suche nach Tumor-assoziierten-Antigenen (TAA) ist daher für die Krebsforschung von herausragender Bedeutung. Die TAA lassen sich in folgende Kategorien einteilen (Pardoll, 1998):

- Einige Tumorantigene werden nur von der Tumorzelle exprimiert und sind Produkte einer Mutation oder einer Genumlagerung. Sie werden über MHC I-

Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Beispielsweise konnte in einem Melanom ein Antigen als Abkömmling einer Mutation des β -Catenin-Gens identifiziert werden (Rubinfeld et al., 1997). Veränderungen im β -Catenin-Protein spielen durch veränderte Bindungseigenschaften mit E-Cadherinen eine Rolle bei der Tumorgenese.

- Embryonale Gene werden im adulten Gewebe nicht exprimiert. In einigen Tumoren sind sie jedoch aktiviert, und ihre Genprodukte fungieren dadurch als Antigene. Ein gut charakterisiertes Beispiel ist die MAGE-Genfamilie in Melanomen, in denen MAGE1-Peptide melanomspezifischen CD8-Zellen präsentiert werden (Huang et al., 1996).
- Überraschenderweise können auch nicht mutierte Peptide von T-Zellen, von denen normalerweise Toleranz gegenüber solchen Peptiden zu erwarten wäre, spezifisch erkannt werden. Hierzu zählen beispielsweise die melanozytenspezifischen Differenzierungsantigene MART1 (MHC I-restringiertes Antigen) und Tyrosinase (MHC II-restringiertes Antigen) (Coulie, 1997).
- Auch Onkogen- und Tumorsuppressorgenprodukte können humorale und zelluläre Immunabwehrmechanismen hervorrufen. In einem Tiermodell führte der adoptive Transfer p53-Peptid-spezifischer CTL bei Tumoren, die p53 überexprimierten, zu signifikanter Tumorzerstörung (Vierboom et al., 1997).
- Eine Reihe von Krebserkrankungen ist mit viralen Infektionen assoziiert. So werden u.a. das Hepatitis B-Virus (HBV) bzw. das Humane Papillom-Virus (HPV) als ätiologische Faktoren für das hepatozelluläre-Ca bzw. Zervix-Ca angesehen. Deren Tumorzellen tragen an ihrer Zelloberfläche virale Proteine, im Falle von HPV-induzierten Tumoren z.B. das E7-Protein, gegen die eine spezifische Immunantwort generiert werden kann (Ressing et al., 1996).
- Eine letzte Gruppe von Antigenen stellen die Immunglobulin-Idiotypen der B-Zell-Lymphome dar. Dabei handelt es sich nicht nur um ein tumorassoziiertes, sondern sogar um ein tumorspezifisches Antigen. Aufgrund dieser Tatsache werden B-Zell-Lymphome häufig als Modellfall bei der Entwicklung immuntherapeutischer Strategien herangezogen. Der Idiotyp liegt in membranständiger oder löslicher Form vor und wird nach Prozessierung sowohl über MHC I- als auch über MHC II-Moleküle präsentiert (King et al., 1993).

2.3 Tumorzellen können sich der Immunabwehr entziehen

Offenbar ist das Immunsystem häufig nicht in der Lage, eine effektive, endogene Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren. Es wurden daher verschiedene Mechanismen postuliert, durch die Tumorzellen der Immunabwehr entgehen können.

1. *Abnahme der Immunogenität der Tumorzellen.* Auf vielfältige Weise können Tumorzellen die Präsentation ihrer Tumorantigene unterbinden. Durch Selektion entstehen Zellvarianten, die ihr Antigen entweder verloren oder durch Mutation so verändert haben (Uyttenhove et al., 1983), dass sie von den T-Lymphozyten nicht mehr erkannt werden. Desweiteren können Defekte in der Prozessierungs- und Präsentationsmaschinerie der Tumorzelle auftreten. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Tumorzellen eines Nierenzellkarzinoms kein TAP1- und LMP2-Protein synthetisierten (Dovhey et al., 2000). Beide Proteine sind als Transportprotein bzw. als Proteasomkomponente an der Prozessierung der Tumorantigene beteiligt. Auch eine verminderte oder aufgehobene Expression von MHC-Molekülen führt letztlich zu einer verringerten Antigenpräsentation (Hui et al., 1984).

2. *Tumorinduzierte Immunsuppression.* Tumorzellen haben die Fähigkeit, in T-Zellen Anergie und Apoptose zu induzieren, auch wenn sie selbst MHC-Tumorantigen-Komplexe an ihrer Oberfläche tragen. Dies wird zum einen durch Expression inhibitorischer Moleküle wie z.B. des Fas-Liganden (Hahne et al., 1996) erreicht, der in Fas-positiven T-Zellen zur Apoptose führt. Zum anderen kann die Tumorzelle durch Herunterregulierung der B7-Moleküle Toleranz bzw. Anergie auf Seiten der T-Zellen induzieren (Pardoll, 1998). Die B7-CD28-Interaktion wird als kostimulierendes Signal zur Aktivierung naiver T-Zellen benötigt (siehe Abb.1) und ist somit Voraussetzung für Zellproliferation, Effektorfunktion und Zytokinsekretion. Ein Ausbleiben der Interaktion lässt die spezifische T-Zelle trotz TCR-MHC-Interaktion in einem inaktiven Zustand zurück.

3 Immuntherapeutische Strategien zur Krebsbekämpfung

Die Antitumorantwort des Organismus wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Tumorzellen, APC und Effektorzellen (CTL, Th-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen) hervorgerufen. Ziel der Immuntherapie ist es nun, die Interaktionen der beteiligten Zellen derart zu verstärken, dass Tumorwachstum verhindert werden kann.

3.1 *Passive Immuntherapie: monoklonale und bispezifische Antikörper*

Tumorspezifische monoklonale Antikörper vermitteln Tumorzellyse entweder durch Komplementaktivierung oder durch antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). So wird Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen das CD20-B-Zell-Antigen, begleitend zur Chemotherapie gegen B-Zell-Lymphome eingesetzt (Coiffier et al., 2002).

Bispezifische Antikörper sind so konstruiert, dass sie sowohl Tumorantigene als auch Antigene auf der Oberfläche von Effektorzellen, z.B. CD3 auf T-Zellen oder CD16 auf NK-Zellen, simultan binden können. Die Abwehrzellen treten dadurch mit den Tumorzellen in Kontakt und können ihre Effektorfunktion wahrnehmen. Löffler und Mitarbeiter konstruierten beispielsweise einen Antikörper mit Bindungsspezifität für das T-Zell-Antigen CD3 und den B-Zell-Marker CD19, der von einer großen Zahl von B-Zell-Neoplasien exprimiert wird. In vitro konnte eine starke, gegen CD19-positive Lymphomzellen gerichtete, zelluläre Zytotoxizität nicht-stimulierter T-Lymphozyten gezeigt werden (Löffler et al., 2000).

3.2 *Aktive Immuntherapie: Vakzinierung mit Tumorantigenen und modifizierten Tumorzellen*

Das Konzept der Immunisierung gegen Krebszellen beruht auf folgender Vorstellung: Wird ein Tumorantigen dem Immunsystem auf eine „immunogene“ Art und Weise

präsentiert, so folgt die Ausbildung einer therapeutisch wirksamen, systemischen Antitumorimmunität.

Einige tumorassoziierte Antigene sind bereits identifiziert worden. In Form von Proteinen oder rekombinanter DNA bilden sie die Basis bei der Entwicklung antigenspezifischer Immunisierungsstrategien. Der Idiotyp (Id) des B-Zell-Lymphoms ist ein Beispiel für ein gut charakterisiertes, tumorspezifisches Antigen. In einem Mausmodell konnten lymphomtragende Mäuse vor Tumorwachstum geschützt werden, wenn ihnen idiotypisches IgM, gekoppelt an das immunogene Trägerprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), verabreicht wurde. Ohne Trägermolekül war die Therapie ineffektiv (George et al., 1988). In einem anderen Ansatz wurde klonierte DNA für die V-Gene des Idiotyps direkt injiziert (Hawkins et al., 1993), auf die das Immunsystem mit der Bildung anti-idiotypischer Antikörper reagierte.

Auch die immunstimulierende Wirkung von Zytokinen, wie etwa des hämatopoetischen Wachstumsfaktors GM-CSF, hat man sich zunutze gemacht. Ob durch Gabe eines Fusionsproteins, bestehend aus Idiotyp und GM-CSF (Tao und Levy, 1993), durch die Injektion eines Expressionsvektors für das Id/GM-CSF-Fusionsprotein (Syrengeles und Levy, 1999) oder durch die Vakzinierung mit Lymphomzellen, die ein Id/GM-CSF-Fusionsprotein produzierten (Selmayr et al., 1999): in allen Fällen wurde Tumorimmunität induziert.

Da bei den meisten Neoplasien noch keine TAA bekannt sind, verwendet man ganze autologe bzw. allogene Tumorzellen bzw. deren Lysate als Antigenquelle. Dies hat den Vorteil, dass ein großes Repertoire an nicht identifizierten Tumorantigenen miterfasst wird.

Um die Immunogenität der Tumorzellen zu erhöhen, wurden sie in früheren Ansätzen mit bakteriellen Adjuvantien wie BCG (Bacillus Calmette-Guerin) oder *Corynebacterium parvum* vermischt (Pardoll, 2000). Die erste Studie mit genetisch veränderten Tumorzellen veröffentlichten Lindenmann und Klein im Jahre 1967. Sie infizierten Tumorzellen mit Influenzaviren und verwendeten daraufhin die Tumorzelllysate als Impfstoff. In den letzten 20 Jahren hat sich der Gentransfer immunologisch aktiver Moleküle mittels Transduktion bzw. Transfektion durchgesetzt. Zu ihnen zählen v.a. die MHC- und kostimulierenden Moleküle sowie Zytokine.

1. *MHC-Gene.* Mit der Einführung von MHC-Genen in Tumorzellen soll eine Verstärkung der Antigenpräsentation bezweckt werden. In einem murinen Tumormodell führte die erhöhte Expression von MHC I-Molekülen – vermutlich über eine CTL-Aktivierung - zu verminderter Tumorigenität (Wallich et al., 1985). Im Gegensatz dazu kann aber eine erhöhte Expression von Selbst-MHC I die Tumorigenität paradoxerweise erhöhen (Karre et al., 1986). Dies wird auf eine Inhibition von NK-Zellen zurückgeführt. Ferner hat das Einbringen allogener MHC I-Moleküle Tumorabstoßung zur Folge, wobei hier der xenogene Charakter des MHC I zusätzlich immunogen wirkt (Itaya et al., 1987).

Alternativ kann durch das Einschleusen von MHC II-Genen eine systemische, CD4-Zell-vermittelte Immunantwort induziert werden (Ostrand-Rosenberg et al., 1991).

2. *Kostimulierende Moleküle.* Auf die entscheidende Rolle der B7-CD28-Interaktion für die T-Zell-Aktivierung und damit die Tumorabstoßung wurde bereits hingewiesen. Durch die Transfektion der Tumorzellen mit B7-Genen werden diese selbst zu potenten APC, und der Präsentationsweg über professionelle APC wird dadurch umgangen. Beispielsweise führte die Vakzinierung mit B7-transfizierten Melanomzellen über Kostimulation von CD8-Zellen zur Abstoßung des Tumors (Townsend und Allison, 1993).

3. *Zytokine.* Bei Zytokinen handelt es sich um Substanzen, die von einer Vielzahl von Zellarten produziert und sezerniert werden und die als interzelluläre Mediatoren andere Zellen aktivieren bzw. deren Eigenschaften verändern. Zu ihnen zählen u.a. Interferone, Interleukine und Wachstumsfaktoren. In der Tumorummunologie sind sie an zwei Abwehrmechanismen maßgeblich beteiligt: Sie unterstützen zum einen die über Makrophagen und NK-Zellen vermittelte lokale Entzündung und zum anderen die Ausbildung einer systemischen Immunität durch T-Zellen (Pardoll, 2000). Die genetische Modifizierung von Tumorzellen mit Zytokingenen hat nun den Vorteil, dass erstens eine länger anhaltende Zytokinfreisetzung ermöglicht wird und zweitens eine hohe Zytokinkonzentration in Tumornähe erreicht wird. Diese ist funktionell entscheidend, denn eine systemische Gabe von Zytokinen ergibt zwar höhere Blutkonzentrationen als eine lokale Verabreichung, hat aber nicht den gleichen biologischen Erfolg. Die Zytokinproduktion „vor Ort“ durch Tumorzellen reduziert ferner das Problem toxischer Nebenwirkungen, die bei hohen systemischen Konzentrationen auftreten (Schmidt-Wolf und Schmidt-Wolf, 1995).

Der Wachstumsfaktor GM-CSF erwies sich in einem Vergleich mit sieben verschiedenen Zytokinen hinsichtlich der Fähigkeit, eine potente, systemische und lang andauernde Antitumorantwort gegen die schwach immunogene Melanomzelllinie B16 zu induzieren, am effektivsten (Dranoff et al., 1993). Weitere Studien mit unterschiedlichen Tumoren, u.a. dem Nierenzell-Karzinom (Nishisaka et al., 1999) und dem murinen B-Zell-Lymphom A20 (Levitsky et al., 1996), bestätigten diese Beobachtung. Neben der proliferativen Wirkung auf die myeloischen Zellen in Knochenmark und Blut hat GM-CSF auch wichtige Einflüsse auf das Immunsystem (Marty and Extra, 1996; Mellstedt et al., 1999):

- Stimulierung von APC, v.a. dendritischen Zellen: Proliferation, Differenzierung und Migration in die regionalen Lymphknoten; Steigerung der Phagozytosefähigkeit,
- Verstärkung der Expression von MHC II- und B7-Molekülen an der Oberfläche von APC,
- Verstärkung der Proliferation von T-Zellen in Kombination mit IL-2,
- Funktionsverstärkung enddifferenzierter Effektorzellen: Aktivierung von Monozyten und Neutrophilen.

3.3 *Der Triomzellansatz: aktive Immuntherapie*

Mocikat et al. (1997) war es mit der Herstellung der Triomzelllinie BiV gelungen, Tumorantigene des murinen A20-Lymphoms, einschließlich des Idiotyps, spezifisch an APC heranzuführen. Die Triomzelle entsteht durch Fusion der Tumorzelle mit einem Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper exprimiert, der gegen APC-Oberflächenmoleküle, z.B. FcR, gerichtet ist. Die Triomzelle enthält potentiell alle Antigene der parentalen Tumorzelle und exprimiert darüber hinaus die anti-FcR-Spezifität, zum Teil in Form eines bivalenten Antikörpers, in dem der Ig-Idiotyp mit dem FcR-Bindungsarm gepaart ist (Abb.2). Nach Aufnahme und Prozessierung des bispezifischen Antikörpers bzw. der gesamten Triomzelle werden idiotypische Peptidfragmente sowie weitere Tumorantigene schließlich auf MHC-Moleküle geladen und präsentiert.

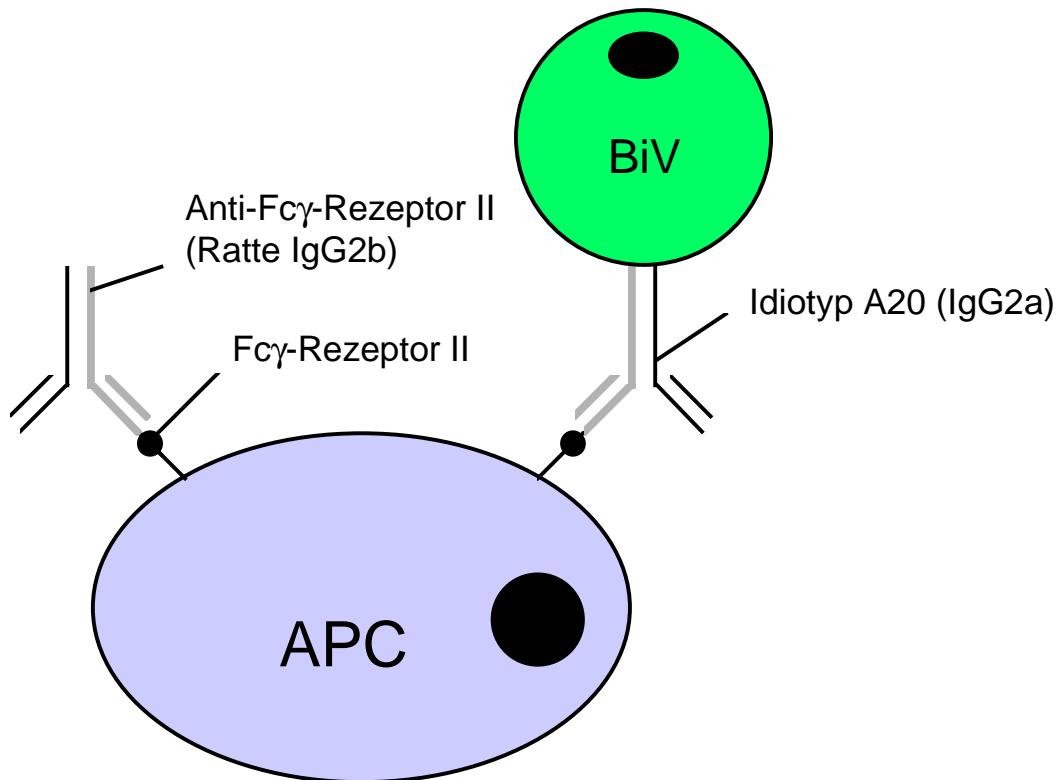


Abb.2: Prinzip des Triomzellansatzes. Über anti-Fc γ RII-Bindungsarme werden der Idiotyp und andere Tumorantigene an die antigenpräsentierende Zelle herangeführt. Der Antikörper liegt in löslicher Form und in membranständiger Form vor.

Dabei zeigte sich, dass die Immunisierung mit BiV-Zellen 100% der Tiere vor dem Anwachsen des Tumors schützen konnte. Im Gegensatz dazu erbrachte die Gabe des bispezifischen Antikörpers in löslicher, nicht zellgebundener Form nur einen geringen Schutz.

3.4 Suizidtherapie: Aktivierung des Immunsystems durch gezielte, medikamentöse Abtötung Suizidgen-transduzierter Tumorzellen

Suizidgene kodieren für Enzyme, die unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise nach Verabreichung eines Medikaments, toxisch für die suizidtragende Zelle sind. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-tk)/Ganciclovir (GCV)-System (Lal et al., 2000). Das Pharmakon GCV, das zur Behandlung von HSV-Infektionen entwickelt wurde, ist ein Nukleosidanalogen, das von der viralen Thymidinkinase monophosphoryliert wird. Nach weiterer

Phosphorylierung durch normale, zelluläre Enzyme entfaltet es seine toxische Wirkung durch Inhibition der DNA-Polymerase. In der betroffenen Zelle hat dies Apoptose zur Folge. Die virale Thymidinkinase hat bezüglich der Monophosphorylierung eine etwa 1000-fach höhere Aktivität als die zelluläre Thymidinkinase, so dass GCV für nicht infizierte Zellen so gut wie nicht toxisch ist (Freeman et al., 1996). Folglich besteht die Möglichkeit, eine Tumorzelle, in die das Gen für HSV-tk eingeschleust worden ist, mittels GCV-Gabe gezielt abzutöten (Abb.3).

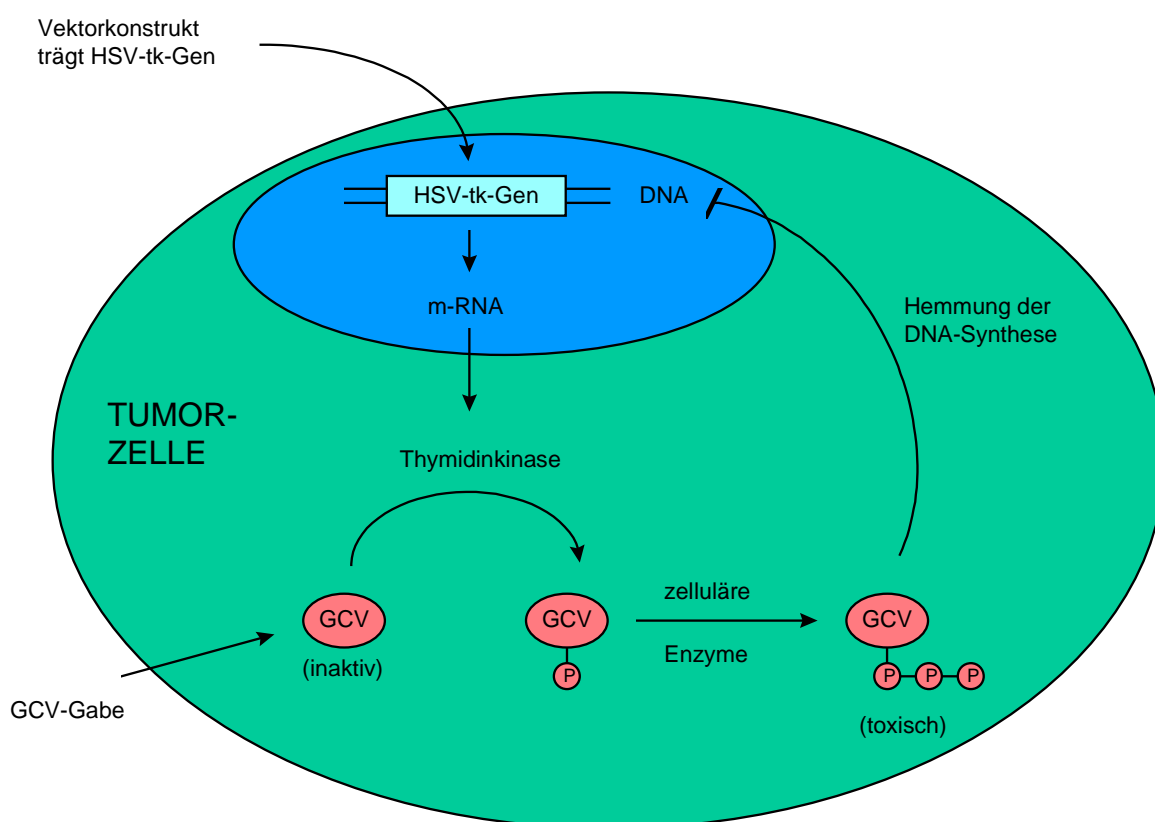


Abb.3: Prinzip der Suizidtherapie. Nach Einschleusen des HSV-tk-Gens synthetisiert die Tumorzelle die virale Thymidinkinase, die GCV in einen toxischen Metaboliten umsetzt. Die Hemmung der DNA-Synthese führt zur Apoptose der Tumorzelle.

In einer präklinischen Studie wurden Zellen, die retrovirale Vektoren mit dem HSV-tk-Gen produzierten, direkt in Rattengliome injiziert. Bei 11 von 14 Tieren konnte eine komplette Regression des Tumors nach Verabreichung von GCV beobachtet werden (Culver et al., 1992). Interessanterweise mussten hierfür nur 10% aller Tumorzellen

das virale Thymidinkinasegen tragen, ein Phänomen, das als „Bystander“-Effekt bezeichnet wurde. Letzterem liegt zum einen eine akute Entzündung unter Beteiligung von Makrophagen zugrunde, zum anderen können die abgetöteten Tumorzellen eine Antitumorimmunantwort durch T-Zellen hervorrufen, da GCV nicht immunsuppressiv wirkt (Freeman et al., 1997). Auch in klinischen Studien, beispielsweise zur Behandlung des Ovarialkarzinoms, konnten Teilerfolge mit dem HSV-tk/GCV-Ansatz erzielt werden (Freeman et al., 1995).

4 Fragestellung

1. *Versuche mit HSV-tk-Gen-transduzierten Lymphomzellen (A20-TK)*. Durch Einbringen des HSV-tk-Gens in Tumorzellen können diese gezielt durch GCV abgetötet werden, wobei auch nicht-transduzierte, angrenzende Zellen betroffen sind („Bystander“-Effekt). In Bezug auf die Anwendbarkeit des HSV-tk/GCV-Systems im Lymphommodell A20 ergaben sich hieraus folgende Fragen:

- Zeigen HSV-tk-transduzierte Lymphomzellen einen „Bystander“-Effekt *in vitro*?
- Lassen sich A20-TK-Zellen *in vivo* durch GCV effizient abtöten? Und wenn ja: hat dies eine langanhaltende Antitumorimmunität zur Folge?

2. *Versuche mit HSV-tk-Gen-transduzierten Triomzellen (BiV-TK)*. BiV-Zellen führen sowohl in Präimmunisierungs- wie Therapieversuchen zu einem effektiven Tumorschutz (Mocikat et al., 1997). Trotz Xenogenität sind BiV-Zellen jedoch bis zu 11 Wochen nach Immunisierung *in vivo* nachweisbar (Graf et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte mittels genetischer Markierung von BiV mit dem HSV-tk-Gen folgenden Fragen nachgegangen werden:

- Lassen sich BiV-TK-Zellen *in vivo* durch GCV effizient abtöten?
- Ist GCV in der Lage, durch Rückholung transduzierter BiV-Zellen deren Tumorprotektion aufzuheben bzw. einzuschränken? Spielt dabei der Zeitpunkt der GCV-Applikation eine Rolle?

3. *Versuche mit GM-CSF-Gen-transfizierten Triomzellen (BiV-BNG)*. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Triomzell-vermittelte Tumorabstoßung und der GM-CSF-Gentransfer synergistisch wirken (Strehl et al., 1999) und einen besseren Tumorschutz erzielen als der Triomzell-Effekt allein. Allerdings galt dies nur für Präimmunisierungsversuche und Experimente, in denen Immunisierungs- und Tumorzellen simultan verabreicht wurden. In Therapieversuchen jedoch, in denen der Tumor bereits etabliert war, blieben BiV-BNG-Zellen überraschenderweise wirkungslos. Zum besseren Verständnis der therapeutischen Wirkungslosigkeit von BiV-BNG wurden daher folgende Fragestellungen untersucht:

- Welche Auswirkungen hat eine Blockierung der Triomzell-vermittelten Redirektion von Tumorantigenen gegen APC? Hierfür wurde zum einen eine GM-CSF-Gen-modifizierte BiV-Variante (BiVneg-BNG), welche die Anti-FcR-Spezifität verloren hat, zum anderen ein Fc γ -Rezeptor II- blockierender Antikörper (2.4G2) verwendet.
- Kann BiV-BNG den therapeutischen Effekt unmodifizierter Triomzellen (BiV) bzw. GM-CSF-Gen-transfizierter Lymphomzellen (A20-BNG) aufheben?
- Spielt die Applikationsroute der Immunisierungszellen, d.h. subkutane versus intraperitoneale Injektion, eine Rolle?
- Welche Aussagen lassen sich bezüglich der Beteiligung der T-Helferzell-Subpopulationen Th1 bzw. Th2 an der Tumorabwehr durch Triomzellen treffen?

II MATERIAL UND METHODEN

1 Zellkultur

1.1 Verwendete Zellen

Als Tumormodell wurden murine B-Zell-Lymphomzellen vom Typ A20 (IgG2a; Kim et al., 1979; ATTC TIB-208) verwendet.

BiV-Zellen (Mocikat et al., 1997) entstanden durch Fusion des murinen Lymphoms A20 mit dem Hybridom 2.4G2 (Ratte-anti-Maus-Fc γ RII; Unkeless, 1979, ATTC HB-197).

Die BiVneg-Variante (Mocikat et al., 1997) besitzt keine anti-FcR-Aktivität, enthält aber den A20-Idiotyp.

Aus der Transfektion von A20- bzw. BiV- Zellen mit dem Expressionsvektor BCMGSNeo-GM-CSF, der die cDNA für muGM-CSF kodiert, gingen die Zelllinien A20-BNG und BiV-BNG (Strehl et al., 1999) hervor. A20-BNG produziert 121 ng/ml GM-CSF pro 10^6 Zellen innerhalb von 24 Stunden. Die Syntheseleistung von BiV-BNG beträgt 482 ng/ml/ 10^6 Zellen in 24 Stunden. Der Vektor BCMGSNeo-GM-CSF wurde im Folgenden auch für die Transfektion der BiVneg-Zellen verwendet.

In dem BCMGSNeo-Vektor (Karasuyama, 1990) unterliegt die Expressionskassette der Kontrolle durch einen CMV-Promotor. Der Vektor enthält neben dem neo^R-Gen ein Fragment der DNA des bovinen Papillomvirus, welches eine stabile Replikation des Plasmids ermöglicht. Das neo^R-Protein vermittelt die Resistenz gegenüber Geneticin (Fa. Gibco), einem Neomycin-Analogon, und ermöglicht somit die Selektion transfizierter Zellen.

Für den Suizidgentransfer wurden STK-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Evi Weissinger, GSF, München) als Verpackungszelllinien herangezogen. Das von den STK-Zellen produzierte Retrovirusgenom (SFCMM-2;

Verzelleti et al., 1998) kodiert unter anderem für ein HSV-tk/neo^R-Fusionsprotein unter der Kontrolle eines HSV-tk-Promotors.

1.2 Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in RPMI 1640 (Gibco) mit folgenden Zusätzen (alle Gibco):

- 10% FKS
- 2 mM Glutamin
- 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
- nichtessentielle Aminosäuren
- 50 µM β-Mercaptoethanol

STK-Zellen wurden in RPMI oder DMEM mit folgenden Zusätzen gehalten:

- 10% FKS
- 2 mM Glutamin
- 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

1.3 Kryokonservierung

Vor der Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen auf 10cm²-Petrischalen expandiert, abzentrifugiert und in je 1 ml Medium, bestehend aus 90% FKS und 10% DMSO, aufgenommen. Auf ein Kryoröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden) entfielen dabei ca. 4-5x10⁶ Zellen. Anschließend wurden die Röhrchen in Styropor verpackt und über Nacht langsam auf –80°C gekühlt. Die dauerhafte Konservierung erfolgte dann durch Umsetzung in flüssigen Stickstoff bei –196°C.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad erwärmt und das Konservierungsmedium langsam ausgewaschen. Danach wurden die Zellen in ihrem bevorzugtem Medium einige Tage lang kultiviert.

Das Pharmakon Ganciclovir (Fa. Roche, Grenzach-Whylen) wurde in Aliquots à 50mg/ml bei –20°C gelagert.

1.4 Transfektion

Die Transfektion der BiVneg-Zellen mit dem Plasmid BCMGSNeo-GM-CSF wurde mittels Elektroporation durchgeführt („Gene-Pulser“, Fa. BIO-RAD).

Zunächst wurden 2×10^6 exponentiell wachsende Zellen abzentrifugiert (ca. 170 x g, 5 Minuten), in 700 μ l Medium aufgenommen und in die Elektroporationsküvette gegeben. Nach Zugabe von 1 μ g Plasmid wurden die Zellen einem Stromstoß (Spannung 230 V; Kapazität 960 μ F; Zeitkonstante 18,8 ms) ausgesetzt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis folgte die Aufnahme in 20 ml Normalmedium. Pro Loch einer 96-Loch-Platte (Fa. Greiner) wurden 10^4 Zellen in je 100 μ l ausgebracht. Aufgrund der Verwendung des neo^R-Gens als Selektionsmarker wurde das Antibiotikum Geneticin zur Selektion transfizierter Zellen herangezogen. Dabei wurde die eingesetzte Geneticinkonzentration schrittweise erhöht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Geneticinkonzentrationen zur Selektion auf das neo^R-Gen nach Transfektion von BiVneg mit BCMGS-Neo-GM-CSF

Tage nach Transfektion	Geneticinkonzentration
2-4	0,10 mg/ml
5-7	0,25 mg/ml
ab 7	0,50 mg/ml

Vorversuche hatten ergeben, dass eine Konzentration von 0,5 mg/ml Geneticin zur Abtötung der BiVneg-Zellen in vitro führt. Diese Konzentration wurde in der weiteren Kultivierung beibehalten.

Zum Nachweis der GM-CSF-Produktion der transfizierten Zellen wurde ein ELISA (siehe 2.1) durchgeführt. Die durch Transfektion hervorgegangene Zelllinie wurde als BiVneg -BNG bezeichnet.

1.5 Transduktion

Der Suizidgenstransfer des HSV-tk- Gens erfolgte durch Kokultur von A20- bzw. BiV-Zellen mit den Virusproduzenten (STK-Zellen).

Zur Expansion wurden die STK-Zellen in 250ml-Kulturflaschen gehalten. Vor dem Ansetzen der Kokultur wurden die Zellen mit 100 Gray bestrahlt (Cs137-Strahlenquelle „Gammacell 40“, Fa. Atomic Energy of Canada Ltd.) und nach Aufnahme in Normalmedium auf 15cm²-Petrischalen à 5-6x10⁶ Zellen aufgeteilt. Nach Adhärenz der Virusproduzenten am Schalenboden begann die Infektion durch Zugabe von 7,5x10⁶ A20- bzw. BiV-Zellen in 15 ml Normalmedium, welches zusätzlich 8 µg/ml Polybrene enthielt. Nach 48 Stunden Kokultur wurden die wachsenden Zellen auf 96-Loch-Platten à 10⁴ Zellen pro Loch ausplattiert. Zur Selektion kam erneut Geneticin zur Anwendung. Der Selektionsbeginn sowie die verwendeten Konzentrationen sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Selektionsbeginn, angegeben als Tag nach Infektion, und eingesetzte Geneticinkonzentration bei der Transduktion von A20 bzw. BiV mit HSV-tk

<i>Zelllinie</i>	<i>Selektionsbeginn</i>	<i>Geneticinkonzentration</i>
A20	Ab Tag 4	0,5 mg/ml
BiV	Tag 4-19	0,5 mg/ml
BiV	Ab Tag 20	0,7 mg/ml

Um festzustellen, ob die transduzierten Zellen auch das HSV-tk-Gen enthielten, wurden sie mit Ganciclovir (Fa. Merck) in einer in Vorversuchen ermittelten Konzentration von 10 µg/ml versetzt.

Die aus der Transduktion hervorgegangenen Zellen werden im Folgenden als A20-TK und BiV-TK bezeichnet.

1.6 Reklonierung

Die transfizierten bzw. transduzierten Zellen wurden schließlich rekloniert, um den monoklonalen Charakter der Zellen zu garantieren. Hierfür wurden Verdünnungsreihen mit jeweils 0,5 und 1 Zelle pro Loch einer 96-Loch-Platte mit je 200 µl Normalmedium angefertigt. Eine Woche später wurde mit 0,5 mg/ml Geneticin die Selektion begonnen.

2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Beschichtung wurde eine Lösung aus 0,1 M Bicarbonatpuffer (pH 9,2 bei Nachweis des Idiotyps, pH 8,2 bei Zytokinnachweis) und 5 µg/ml Fänger-Antikörper angesetzt. Je 50 µl des Ansatzes wurden auf 96-Loch-Platten (Maxisorp, Fa. Nunc) ausgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.1 Nachweis der GM-CSF-Produktion

Die Blockierung beim GMCSF-ELISA erfolgte mit 400 µl PBS/FKS (10%) pro Loch für 1 Stunde. Danach wurde zwei Stunden mit der Probe (50 µl), 45 Minuten mit dem abgreifenden, biotinylierten Antikörper (50 µl; Verdünnung 1:1000 in PBS/10% FKS) und 30 Minuten mit Avidinperoxidase (50 µl; Verdünnung 1:1000 in PBS/10% FKS) inkubiert. Als Negativkontrolle diente PBS/10% FKS. Die dazwischen liegenden Waschschriffe wurden mit PBS/Tween20 (0,05%; Fa. Schuchardt, München) durchgeführt.

Zur Auslösung der Farbreaktion wurde eine Tablette o-Phenylendiaminhydrochlorid (Fa. Sigma, Osterode) in 15 ml Substratpuffer (Tris-Citrat, pH 5) gelöst und nach Zugabe von 5 µl Wasserstoffperoxid je 100 µl des Ansatzes in die zu entwickelnden Kavitäten gegeben. Die Ablesung der Extinktion erfolgte an „Easy Reader SFplus“ (SLT Labinstruments, Altdorf).

Zur quantitativen GM-CSF-Bestimmung wurde Kulturüberstand verwendet, der nach 24-stündiger Inkubation von 10^6 BiVneg-BNG-Zellen in 1 ml Selektionsmedium

gewonnen wurde. Die zu untersuchenden Überstände sowie die Standardkontrolle wurden in einer Verdünnungsreihe (log 3) ausgebracht. Als Standardpositivkontrolle kam sowohl in qualitativen wie in quantitativen ELISAs rekombinantes murines GM-CSF (Fa. Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA) zur Anwendung. Die erhaltenen Extinktionen wurde auf Millimeterpapier aufgetragen und die Zytokinproduktion der Klone wie folgt berechnet:

$$c = c_0 \times V^{a/n}$$

c_0 : Anfangskonzentration der Standardlösung (50 ng/ml)

a : Abstand zwischen Standardkurve und Klonkurve (in cm)

n : Abstand zwischen den Verdünnungsstufen (2 cm)

V : Verdünnungsfaktor (3)

Die verwendeten Fänger- und Detektionsantikörper sind in Tabelle 3 angegeben. Der Antikörper 6C10 wurde freundlicherweise von E. Kremmer, GSF, Institut für Molekulare Immunologie, München, bereitgestellt.

2.2 Detektion des Idiotyps

Zum Nachweis des Idiotyps wurden die Platten zunächst mit 400 μ l PBS/Milchpulver (1%) pro Loch blockiert. Danach wurde zwei Stunden mit der Probe (50 μ l), 45 Minuten mit dem abgreifenden, biotinylierten bzw. bereits peroxidase markierten Antikörper (50 μ l; Verdünnung 1:1000 in PBS/10% FKS) und 30 Minuten mit Avidinperoxidase (50 μ l; Verdünnung 1:1000 in PBS/10% FKS) inkubiert. Als Negativkontrolle diente PBS/Milchpulver (1%). Die jeweils dazwischen liegenden Waschvorgänge wurden mit PBS durchgeführt. Die Auslösung der Farbreaktion wurde wie oben beschrieben eingeleitet.

Die verwendeten Fänger- und Detektionsantikörper sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Im ELISA verwendete Fänger- und Detektionsantikörper

	<i>Fänger-Antikörper</i>	<i>Detektions-Antikörper</i>
GM-CSF	Ratte-anti-Maus-GM-CSF (Pharmingen, Hamburg)	Ratte-anti-Maus-GM-CSF, biotinyliert (Pharmingen, Hamburg)
BiV- Immuno- globulin	Ratte-anti-Maus-A20Id (6C10)	Maus-anti-Ratte-IgG2b, biotinyliert (TIB174) (ATTC, Rockville, MD, USA)
Idiotyp (A20)	Ratte-anti-Maus-A20Id (6C10)	Ratte-anti-Maus-IgG (H+L), Peroxidase- markiert (Dianova, Hamburg)

3 In-vivo-Versuche

Für alle Tierversuche lag die Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor.

Als Versuchstiere wurden etwa 10-12 Wochen alte weibliche BALB/c-Inzuchtstämme (Fa. Bomholtgard, Ry, Dänemark) sowie 10-14 Wochen alte männliche und weibliche IL4-defiziente BALB/c-Stämme (freundlicherweise bereitgestellt von T. Blankenstein, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) verwendet. Die Anzahl der Tiere pro Käfig lag dabei zwischen 3 und 6 Tieren.

Vor der Injektion wurden die Zellen gezählt und in PBS gewaschen. Je nach Versuchsprotokoll wurden einige der Zellen vor dem Waschgang mit 20 Gray in einer Cs137-Strahlenquelle bestrahlt. Im Anschluss wurden sie bei subkutaner Injektion in 200 µl PBS, bei intraperitonealer und intravenöser Applikation in 300 µl PBS aufgenommen.

Ganciclovir wurde jeweils in 100 µl PBS aufgenommen und getrennt von den Vakzinezellen intraperitoneal verabreicht. Im Gegensatz dazu wurde lösliches GM-CSF (Fa. Pharmingen) mit den Zellen in einem gemeinsamen Volumen s.c. injiziert.

3.1 Präimmunisierungsversuche

Die Vakzinezellen wurden 28 und 7 Tage vor der Tumorgabe i.p. injiziert. Der Tag der Tumorgabe wurde, wenn nicht anders vermerkt, in allen Versuchen als Tag 0 angegeben (siehe Abb.4). Um die Induktion einer dauerhaften Immunität zu

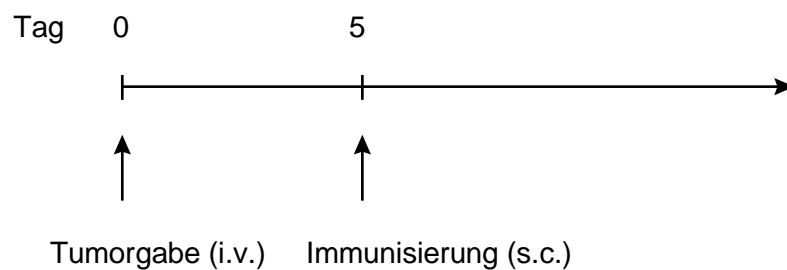


Abb. 5: Applikationsschema bei Therapieversuchen

3.3 Milzpräparation

Nach zweifacher Immunisierung (siehe 3.1) mit BiV-TK-Zellen und begleitender GCV-Gabe wurde den Tieren am Tag 0 die Milz entnommen und diese mechanisch zerkleinert. Nach Absetzen von Gewebetrümmern sowie Abzentrifugieren der Parenchymzellen und Hämolysen (Ammoniumchlorid) wurden die überlebenden Zellen gezählt und auf 96-Loch-Platten à 2×10^5 Zellen pro Loch ausgebracht. Nach Expansion in Normalmedium wurden sie mit Ganciclovir auf das Vorhandensein des HSV-tk-Gens getestet.

3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Überlebenskurven wurde der Logranktest verwendet.

III ERGEBNISSE

1 Versuche mit HSV-tk-Gen-transduzierten Lymphomzellen (A20-TK)

Die Verwendung HSV-tk-transduzierter Lymphomzellen als Vakzinezellen beruht auf der Vorstellung, eine Immunantwort durch GCV-vermittelte Abtötung transduzierter Zellen mit nachfolgender Tumorantigenfreisetzung in Gang zu setzen. Versuche mit HSV-tk-transduzierten Nierenzellkarzinomzellen haben bereits gezeigt, dass sich dadurch tumorspezifische CTL generieren lassen, die zu einer langanhaltenden Tumorprotektion führen (Yamamoto et al., 1997).

1.1 Ganciclovirsensitivität und „Bystander“-Effekt *in vitro*

Zunächst wurde in einem Vorversuch diejenige Ganciclovirkonzentration ermittelt, die zur Abtötung von Wildtyp-A20-Zellen *in vitro* führte. Hierzu wurden die Zellen in Normalmedium aufgenommen und mit 0, 0,1, 1, 10 und 100 µg/ml GCV versetzt. Lediglich bei der Zugabe von 100µg/ml kam es zu einem kompletten Absterben der Zellen innerhalb von 4 Tagen.

Um das Vorhandensein des HSV-tk-Gens in den transduzierten A20-Zellen (A20-TK) und deren Empfindlichkeit auf GCV nachzuweisen, wurden A20-TK-Zellen ebenfalls den obengenannten Ganciclovirkonzentrationen ausgesetzt. Die Zellen starben innerhalb von 4 (10 und 100 µg/ml GCV) bzw. 7 (1 µg/ml GCV) Tagen und zeigten dabei mikroskopisch die typischen Kennzeichen der Apoptose: Kondensierung des Chromatins, Wasserverlust und Auflösung in apoptotische Vesikel. Eine GCV-Konzentration von 0,1 µg/ml hatte auf die Vitalität der Zellen keinen Einfluss. Im Folgenden wurde daher vor In-vivo-Versuchen stets eine In-vitro-Kontrolle der A20-TK-Zellen mit 10 µg/ml GCV durchgeführt, um die Aktivität der Thymidinkinase zu überprüfen. Diese Vorgehensweise wurde auch bei den BiV-TK-Zellen angewendet, die eine identische Empfindlichkeit gegenüber GCV aufwiesen.

Die Produktion des Idiotyps in A20-TK-Zellen bzw. BiV-TK-Zellen wurde im ELISA nachgewiesen.

In-vitro-Beobachtungen einer Ovarialkarzinom-Zelllinie haben gezeigt, dass zur kompletten Abtötung dieser Tumorzellpopulation mit GCV nur 10% der Zellen das virale Thymidinkinase-Gen tragen müssen (Freeman et al., 1996). Neben den transduzierten Zellen können also auch benachbarte Wildtypumorzellen durch das HSV-tk/GCV-System abgetötet werden, was als „Bystander“-Effekt bezeichnet wird. Zur Untersuchung des „Bystander“-Effekts in dem murinen Lymphommodell A20 wurden A20-TK- und A20-Zellen gemeinsam in unterschiedlichen Verhältnissen kultiviert und mit 10 bzw. 20 µg/ml GCV versetzt. Wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, konnte ein nur sehr schwach ausgeprägter „Bystandereffekt“ beobachtet werden. Um das Wachstum der parentalen Lymphomzellen zu verhindern, mussten mindestens 99% der Tumorzellen das TK-Gen tragen. Zusätzlich war eine GCV-Konzentration von 20 µg/ml nötig.

Tab.5: Bystandereffekt von A20-TK-Zellen in vitro. Verschiedene Verhältnisse von A20-TK- und A20-Zellen wurden mit GCV versetzt und die toxischen Effekte auf A20 beobachtet.

Verhältnis A20-TK : A20	GCV-Konzentration	Wachstumsverhalten von A20
100 : 0	10 µg/ml	kein Wachstum
	20 µg/ml	kein Wachstum
99,9 : 0,1	10 µg/ml	Wachstumsverzögerung
	20 µg/ml	kein Wachstum
99 : 1	10 µg/ml	Wachstumsverzögerung
	20 µg/ml	kein Wachstum
90 : 10	10 µg/ml	Wachstum
	20 µg/ml	Wachstumsverzögerung
70 : 30	10 µg/ml	Wachstum
	20 µg/ml	Wachstum
50 : 50	10 µg/ml	Wachstum
	20 µg/ml	Wachstum
30 : 70	10 µg/ml	Wachstum
	20 µg/ml	Wachstum
0 : 100	10 µg/ml	Wachstum
	20 µg/ml	Wachstum

1.2 In-vivo-Versuche mit A20-TK-Zellen

Zur Vorbereitung der In-vivo-Versuche wurde die Toxizität von GCV im lebenden Organismus untersucht. Von den eingesetzten Mengen (1; 1,2; 1,5; 2 mg/Tag für 10 Tage) erwies sich einzig die Konzentration von 1 mg/Tag als nicht letal (Abb.6).

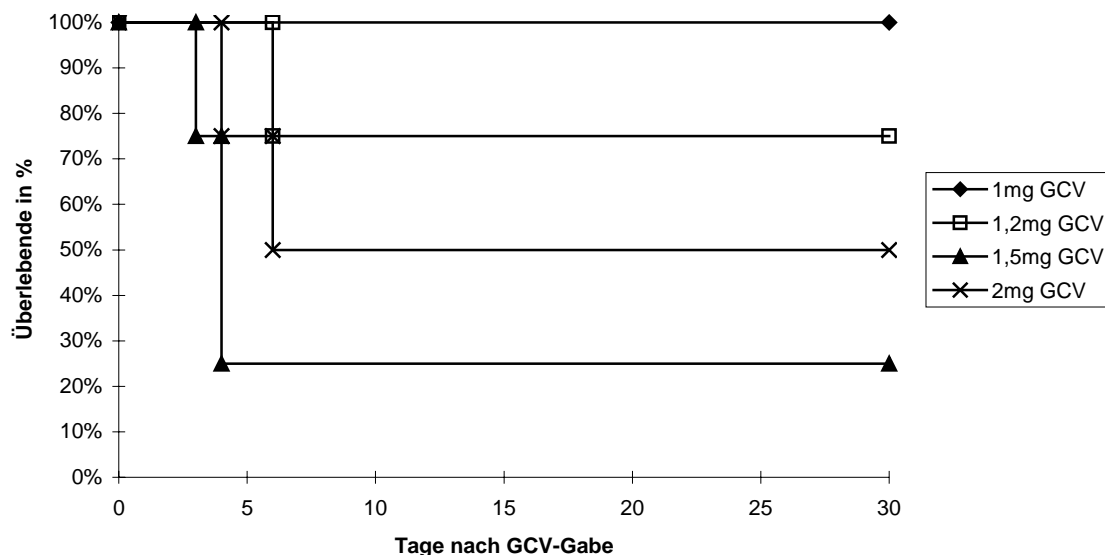


Abb.6: Toxizität von GCV in vivo. Ganciclovir in unterschiedlichen Mengen wurde ab Tag 0 einmal täglich 10 Tage lang intraperitoneal verabreicht.

Vor Beginn der Präimmunisierungsversuche wurde weiterhin der Frage nachgegangen, ob und ab welcher Dosis A20-TK-Zellen in der Lage waren, Tumoren zu etablieren. Dazu wurden den Mäusen ansteigende Dosen (5×10^5 , 10^6 und 5×10^6) A20-TK-Zellen intraperitoneal injiziert. Es zeigte sich, dass eine Zellzahl von 5×10^6 nötig war, um bei allen Versuchstieren einen Tumor hervorzurufen (Abb.7). Diese Dosis liegt etwa um den Faktor 6 höher als die entsprechende letale Dosis parentaler A20-Zellen (8×10^5 A20-Zellen).

Zum einen stellte sich nun die Frage, ob ein Anwachsen des Tumors nach Gabe einer letalen A20-TK- Dosis durch GCV verhindert werden konnte. Zum anderen sollte die Induktion einer systemischen Immunantwort mittels einer späteren Tumorreinokulation überprüft werden.

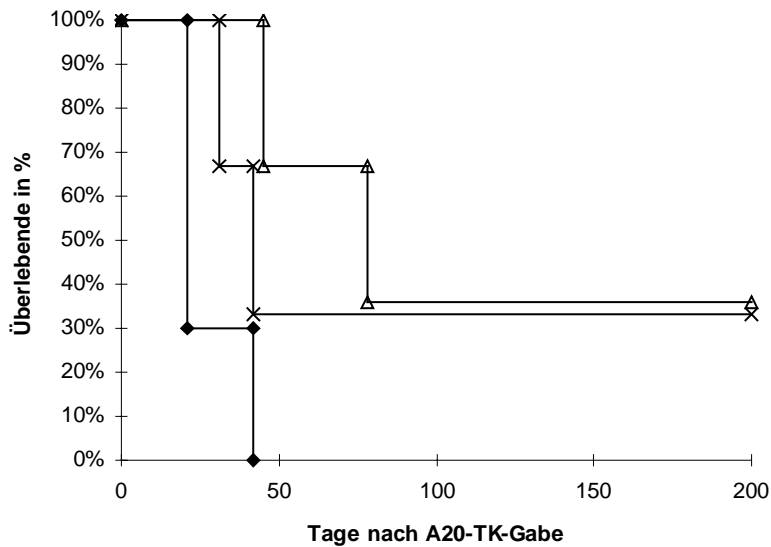


Abb.7: Tumorwachstum nach intraperitonealer A20-TK-Injektion verschiedener Dosierungen: 5×10^5 (Δ), 10^6 (x) und 5×10^6 (\blacklozenge) A20-TK-Zellen

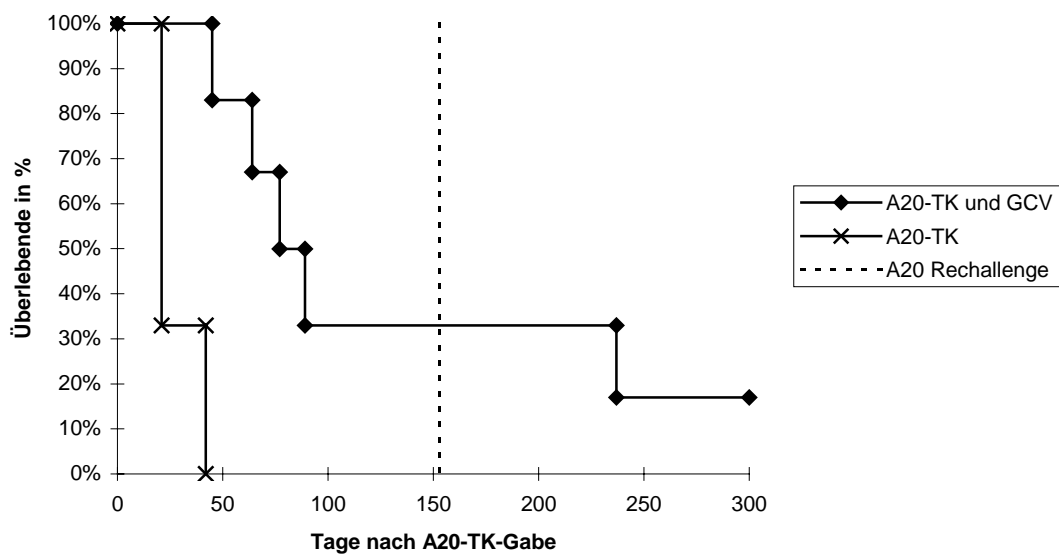


Abb.8: Präimmunisierung mit A20-TK-Zellen und GCV (Erläuterung im Text).

Dazu wurde den Mäusen einmalig eine letale A20-TK-Dosis (5×10^6 Zellen am Tag 0) und je nach Gruppe zusätzlich von Tag -1 bis Tag 8 täglich 1 mg GCV i.p. verabreicht. Am Tag 153 erfolgte eine Reinokulation mit Wildtyp-Lymphomzellen (8×10^5 A20-Zellen i.p.).

Wie aus Abb.8 ersichtlich wird, konnte ein Anwachsen des Tumors in 33% der Fälle durch GCV unterbunden werden ($p < 0,01$). Von den überlebenden Mäusen starb nach neuerlicher Wildtyp-tumor-Gabe die Hälfte der Tiere, so dass sich insgesamt

eine geringe, aber dennoch signifikante Verbesserung bezüglich der Überlebensdauer ergab ($p < 0,025$).

2 Versuche mit HSV-tk-transduzierten Triomzellen (BiV-TK)

Das Prinzip des Triomzellansatzes (Mocikat et al., 1997) besteht in der Heranführung des tumorspezifischen Id und anderer Tumor-assoziiertes Antigene eines Lymphoms an antigenpräsentierende Zellen. Ermöglicht wird dies durch den bispezifischen Charakter des Antikörpermoleküls: der eine Arm besteht aus der IgG2a-Kette des Mauslymphoms A20, der andere Arm ist eine Ratte-IgG2b-Kette, deren variabler Teil spezifisch an Fc γ RII bindet. Dadurch wird der Idiotyp an Fc γ RII-tragende Zellen wie Makrophagen herangeführt. Nach rezeptorvermittelter Internalisierung und Prozessierung des Antikörpermoleküls kommt es schließlich zur Präsentation der Tumorantigene durch APC. Wie sich später zeigte (Kronenberger et al., 2002), vermag auch das auf der Triomzelle exprimierte monospezifische anti-Fc γ R-Immunglobulin Tumorantigene, vielleicht auch die gesamte Tumorzelle, welche alle Tumorantigene beinhaltet, gegen APC zu dirigieren.

In Präimmunisierungsversuchen mit BiV, dem aus A20 generierten Triom, konnte bereits ein Schutz der Mäuse vor Tumorwachstum gezeigt werden (Mocikat et al., 1997). Die Transduktion von BiV mit dem HSV-tk-Gen ergab die Zelllinie BiV-TK. Mittels ELISA wurde gezeigt, dass BiV-TK das bispezifische BiV-Protein exprimiert, das neben dem Idiotyp den APC-Bindungsarm enthält.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, inwieweit die triomzellvermittelte Protektion durch Eliminierung von BiV-TK-Zellen mittels GCV zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgehoben werden kann. Zudem sollte eine mögliche Persistenz der Triomzellen in vakzinierten Mäusen mit Hilfe dieser genetischen Markierung untersucht werden.

2.1 Präimmunisierung mit BiV-TK-Zellen und GCV

Zur Präimmunisierung wurden den Mäusen im Abstand von 3 Wochen je 10^5 BiV-TK-Zellen i.p. injiziert. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung folgte die Gabe

einer letalen A20-Dosis (3×10^5 Zellen an d0). Je nach Versuchsgruppe wurde zusätzlich 1 mg GCV pro Tag i.p. für 10 Tage entweder zeitgleich mit den Immunisierungen (d-28 und d-7) oder etwa zum Zeitpunkt der Tumorgabe (je eine Gruppe an d-1 bzw. an d10) verabreicht. Eine Gruppe erhielt kein GCV.

In allen Immunisierungsgruppen konnte eine signifikante Verbesserung des Überlebens gezeigt werden, allerdings variierten die Überlebensraten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Ganciclovirbehandlung (Abb.9).

Die Protektion war umso höher, je näher der Beginn der GCV-Behandlung am Zeitpunkt der Tumorapplikation lag. Der Behandlungsstart am Tag vor der Tumorgabe führte dabei zu der höchsten Überlebensrate ($p < 0,01$), ein vergleichbarer Erfolg wurde durch GCV-Gabe am Tag 10 erzielt. Zur besseren Übersicht sind diese beiden Gruppen in Abb.9 zu einer Gruppe zusammengefasst. Der Tumorschutz der Mäuse, die kein GCV erhalten hatten, lag mit 50% überlebenden Tieren etwas darunter. Eine sehr frühe (d -7 und d -28) Elimination der BiV-TK-Zellen war jedoch mit einem deutlich geringerem Überleben der Tiere verbunden ($p < 0,025$). Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend deuten, dass Triomzellen vor allem in der Frühphase der Immunisierung ihren protektiven Effekt ausüben.

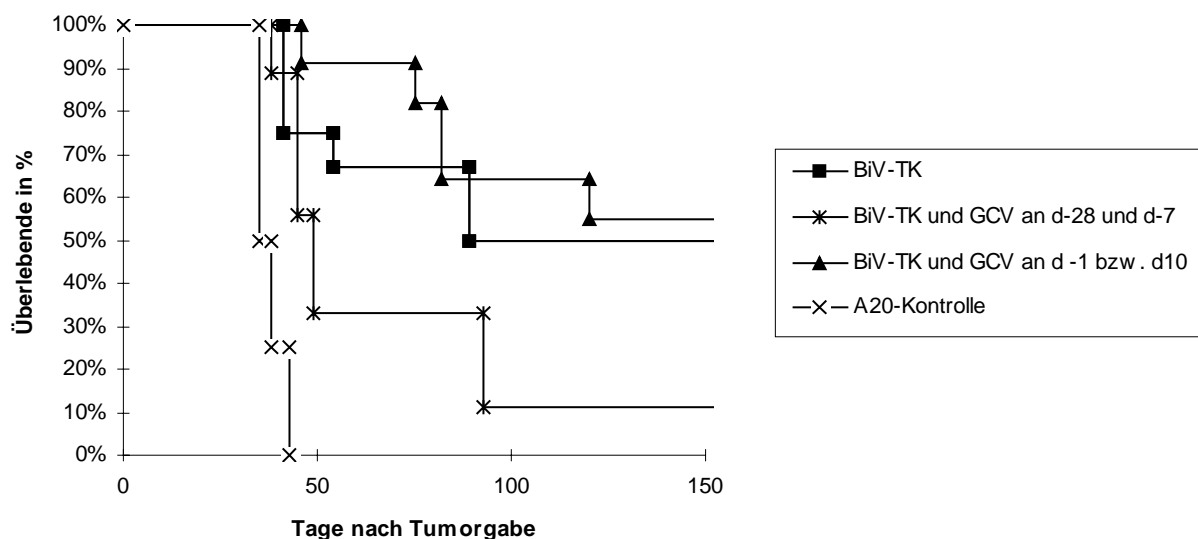


Abb.9: Präimmunisierung mit BiV-TK-Zellen und begleitender GCV-Gabe (1 mg GCV täglich für 10 Tage) sowie anschließender A20-Gabe. In der Legende ist jeweils der erste Tag der GCV-Gabe angegeben.

2.2 Milzpräparationen aus immunisierten Mäusen

Wie eingangs bereits erwähnt wurde, entstand die Triomzelllinie BiV durch Fusion von A20-Zellen mit dem Ratten-Hybridom 2.4G2 (Mocikat et al., 1997). Der xenogene Charakter von BiV ist neben der anti-Fc γ RII-Spezifität für den Tumorschutz mitverantwortlich (Kronenberger et al., 2002). Überraschenderweise können trotz Xenogenität BiV-Zellen in den Milzorganen immunisierter Mäuse bis zu 79 Tage post iniectionem nachgewiesen werden (Graf et al., 2003). Offenbar verbleibt ein Teil der BiV-Zellen im Wirtsorganismus ohne abgestoßen zu werden. Möglicherweise stellt diese Persistenz der Triomzellen einen weiteren wichtigen Faktor bei der Tumorprotektion in vivo dar.

Um die Rolle persistierender Triomzellen bei der Tumorabwehr näher zu untersuchen, wurde bei einigen Tieren die Milz nach zweifacher Immunisierung mit BiV-TK-Zellen und begleitender Ganciclovirbehandlung (1 mg GCV für 10 Tage ab Tag -29 und Tag -8) an Tag 0 entnommen. Die isolierten Milzzellen wurden auf 96-Loch-Platten ausgebracht und in vitro kultiviert. In durchschnittlich 38% der Löcher fanden sich Zellen, die sehr langsam proliferierten und die Morphologie von BiV-Zellen aufwiesen. Die Zugabe von GCV in einer nur für BiV-TK-Zellen toxischen Konzentration führte zum Absterben der Zellen innerhalb von 3 Tagen. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen um Triomzellen handelte, die in vitro sensitiv für GCV waren. Wenn Milzen von Mäusen, die zuvor nicht transduzierte Triomzellen erhalten hatten, in der gleichen Weise untersucht wurden, konnten derartige Zellen in 54% der Löcher gefunden werden.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass nur ein Teil der transduzierten Triomzellen durch GCV in vivo eliminierbar ist. Dies ist nicht unerwartet, da sich auch A20-TK-Zellen in vivo nur unvollständig durch GCV abtöten lassen. In Anbetracht der Tatsache, dass der Suizid durch das HSV-TK/GCV-System proliferationsabhängig ist, könnte die verringerte Eliminierbarkeit von BiV-TK in vivo mit einer begrenzten Zellteilungsrate in vivo zusammenhängen.

3 Versuche zur Tumorabstoßung mit GM-CSF-transfizierten Triomzellen

Das Einbringen von Zytokin-Genen, insbesondere von GM-CSF, in Tumorzellen und die Verwendung der genetisch veränderten Zellen zur Vakzinierung ist schon seit längerem als wirksame Strategie zur Tumorbekämpfung bekannt. Dies konnte auch für GM-CSF-transfizierte A20-Zellen (A20-BNG) gezeigt werden (Strehl et al., 1999), die sowohl in Präimmunisierungs- als auch in Therapieversuchen zu einer deutlichen Tumorprotektion führten. In der gleichen Studie erwies sich auch die Transfektion von BiV-Zellen mit GM-CSF (BiV-BNG) in der Präimmunisierung als erfolgreich. Die Therapie mit BiV-BNG jedoch führte überraschenderweise nur zu einer marginalen Überlebensverlängerung gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Therapieansatz blieb damit weit hinter den Ergebnissen zurück, die mit A20-BNG und nicht-transfizierten BiV-Zellen erreicht wurden.

Das Ziel der folgenden Versuche war es, Einblicke in die Ursachen der Wirkungslosigkeit der mit GM-CSF transfizierten Triomzellen in der Tumorabwehr zu gewinnen.

3.1 Therapieversuche mit BiVneg-BNG

Bei BiVneg handelt es sich um eine Variante von BiV mit defektem Bindungsarm für den Fc γ -Rezeptor II, wodurch die Heranführung von Tumorantigenen an APC auf diesem Wege unterbleibt. Aufgrund des xenogenen Charakters der Triomzellen ist aber dennoch ein gewisser Tumorschutz bei Präimmunisierung erreichbar (Mocikat et al., 1997; Kronenberger et al., 2002).

Das Einbringen des GM-CSF-Gens in BiVneg ergab die Zelllinie BiVneg-BNG mit einer GM-CSF-Syntheseleistung von 870 ng/ml/10⁶ Zellen innerhalb von 24 Stunden. Um Hinweise auf die Wechselwirkung zwischen GM-CSF und dem Bindungsverhalten von BiV an APC zu erlangen, wurde der Therapieerfolg von BiV-BNG (482 ng/ml/10⁶ Zellen) und BiVneg-BNG miteinander verglichen (Abb.10).

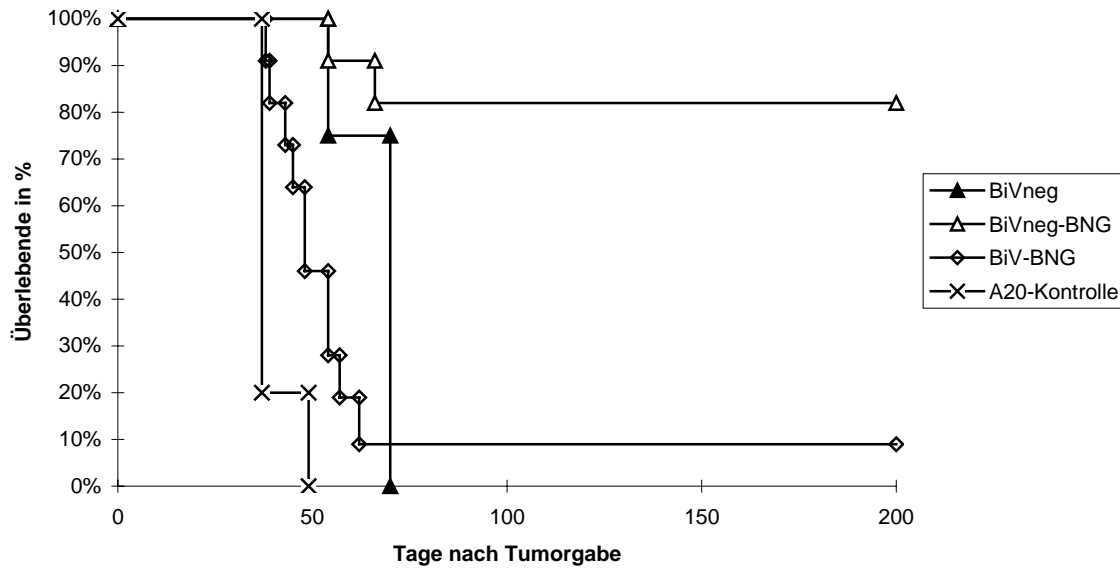


Abb.10: Vergleich des Therapieerfolges nach Applikation von BiVneg-BNG, BiV-BNG- und BiVneg-Zellen nach vorheriger A20-Gabe.

Das Ergebnis fiel deutlich aus: Tumorstadium wurde bei Verwendung von BiV-BNG nur in 9% der Fälle verhindert. Nur eine Verzögerung des Tumorstadiums wurde bei der Behandlung mit BiVneg-Zellen beobachtet. In dieser Versuchsgruppe starben alle Mäuse. Im Gegensatz dazu konnte die Verabreichung von BiVneg-BNG 83% der Mäuse vor Tumorstadium schützen ($p < 0,005$). Den gleichen Effekt hatte im Übrigen die Verabreichung von A20-BNG-Zellen (121ng/ml/10⁶ Zellen; Strehl et al., 1999).

3.2 Therapieversuche nach Blockade des Fcγ-Rezeptors

Wie bereits erwähnt wurde, zeichnet sich der von BiVneg-Zellen synthetisierte Antikörper durch die fehlende Bindungsspezifität für den Fcγ-Rezeptor aus. Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion des BiV-Proteins mit dem Fc-Rezeptor zu verhindern, bestand in dessen Blockade mittels eines Antikörpers. Hierfür wurde der Antikörper 2.4G2 (freundlicherweise bereitgestellt von U. Kummer, GSF, München) verwendet. Es sollte also nun die Auswirkung einer Blockierung der Fc-Rezeptor-Funktion auf den Therapieerfolg mit BiV-BNG und A20-BNG studiert werden.

Gemäß dem Therapieschema wurden den Tieren 5 Tage nach intravenöser Injektion der Tumorzellen die Immunisierungszellen subkutan gespritzt. Die A20-BNG-Zellen wurden dabei - wie auch in allen folgenden Versuchen - unmittelbar vor der Injektion mit 20 Gy bestrahlt. Zusätzlich wurde einigen Tieren je 1mg des Blockierungsantikörpers 2.4G2 an den Tagen 4 und 9 intraperitoneal verabreicht (Abb.11).

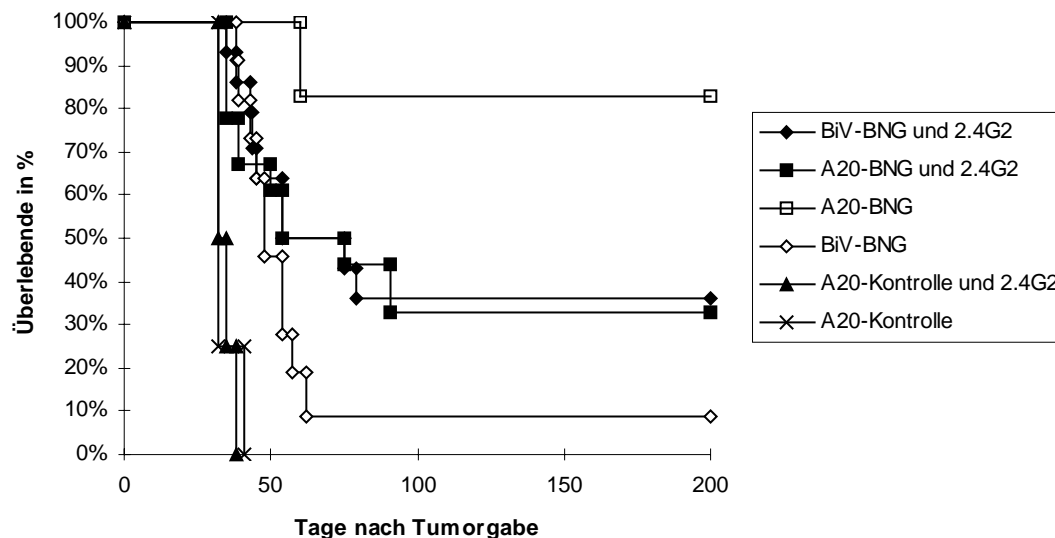


Abb.11: Therapieerfolg nach Applikation von A20-BNG- bzw. BiV-BNG-Zellen bei gleichzeitiger Blockierung des Fc γ -Rezeptors II mit dem Antikörper 2.4G2 nach A20-Gabe.

Die Überlebensrate von 83% bei therapeutischer Gabe von A20-BNG-Zellen ($p < 0,01$) bestätigte die Beobachtung von Strehl et al., 1999, wonach GM-CSF-transfizierte A20-Zellen auch nach Etablierung des Tumors zu einem deutlichen Tumorschutz führen. Nach Gabe des 2.4G2-Antikörpers nahm die Tumorphotektion zwar statistisch signifikant ab ($p < 0,05$), aber dennoch überlebten immerhin 33% der Mäuse ($p < 0,005$). Die Blockade des Fc-Rezeptors verringerte also den therapeutischen Effekt von A20-BNG. Dies war überraschend, da für die Wirksamkeit einer GM-CSF-transfizierten Vakzine Fc-Rezeptoren nicht erforderlich sein sollten. Interessanterweise wurde bei der Therapie mit BiV-BNG-Zellen ein statistisch verlängertes Überleben erreicht, wenn der Fc-Rezeptor vorher blockiert worden war ($p < 0,005$). Im Gegensatz dazu konnte eine alleinige BiV-BNG-Gabe nur 9% der Mäuse vor Tumorzustand schützen.

3.3 Therapieversuche mit simultaner Applikation von BiV-BNG- und A20-BNG- bzw. BiV-BNG- und BiV-Zellen

Die Fähigkeit von Triom- und GM-CSF-transfizierten Lymphomzellen, eine systemische Immunantwort gegen das Mauslymphom A20 auch im Therapieansatz zu induzieren, war bereits gezeigt worden. Erstaunlicherweise stellte sich bei der Applikation von BiV-BNG-Zellen in der Therapiesituation kein Tumorschutz ein. Es ergab sich nun die Frage, ob BiV-BNG-Zellen in der Lage waren, den Therapieerfolg von A20-BNG- und BiV-Zellen zu beeinträchtigen.

Hierfür bekamen die Mäuse zu gleichen Teilen (je 5×10^6 Zellen) BiV-BNG- und A20-BNG-Zellen ipsilateral subkutan am Tag 5 nach Tumorgabe injiziert. Die Vorgehensweise bei der Mischung von BiV-BNG- mit BiV-Zellen erfolgte analog, wobei die alleinige Gabe von A20-BNG- bzw. BiV-Zellen dem Vergleich diente (Abb.12).

Wie aus Abb.12 zu ersehen ist, hatte die Applikation von BiV-BNG keinen Einfluss auf den Therapieerfolg der A20-BNG- und BiV-Zellen. Die Überlebensrate von 83% bei alleiniger A20-BNG-Gabe wurde durch die Simultanapplikation mit BiV-BNG um nur 8% auf 75% gesenkt, im Falle der Therapie mit BiV-Zellen wurde mit 67% überlebenden Tieren sogar ein identisches Ergebnis erzielt. In beiden Fällen wurde somit trotz BiV-BNG-Gabe eine statistisch signifikante Verbesserung des Überlebens erreicht ($p < 0,005$).

In der gleichen Versuchsanordnung wurde des weiteren untersucht, ob neben A20-BNG auch die Kombination von löslichem GM-CSF mit bestrahlten, nicht-transfizierten Lymphomzellen therapeutisch wirksam ist. GM-CSF wurde dazu gemeinsam mit den bestrahlten A20-Zellen (Tag 5) und zudem 3 weitere Tage in unterschiedlicher Konzentration (10^4 bzw. 10^5 U) subkutan injiziert. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse gesondert in Abb.13 dargestellt.

Die simultane therapeutische Gabe bestrahlter Lymphomzellen mit GM-CSF-Protein konnte keine Maus vor Tumorwachstum schützen. Diese Beobachtung erwies sich als von der verwendeten GM-CSF-Konzentration unabhängig: sowohl die Injektion von 10^4 als auch von 10^5 Einheiten pro Tag hatte keinen protektiven Effekt. Wenn die verabreichten Immunisierungszellen den Wachstumsfaktor indes selbst

synthetisierten (A20-BNG), konnte ein deutlicher Tumorschutz erreicht werden. Dies kann dahingehend gedeutet werden, dass GM-CSF seine Wirkung im Rahmen der Tumorabstoßung vor allem auf parakrinem Wege entfaltet, wohingegen eine systemische Gabe wirkungslos bleibt.

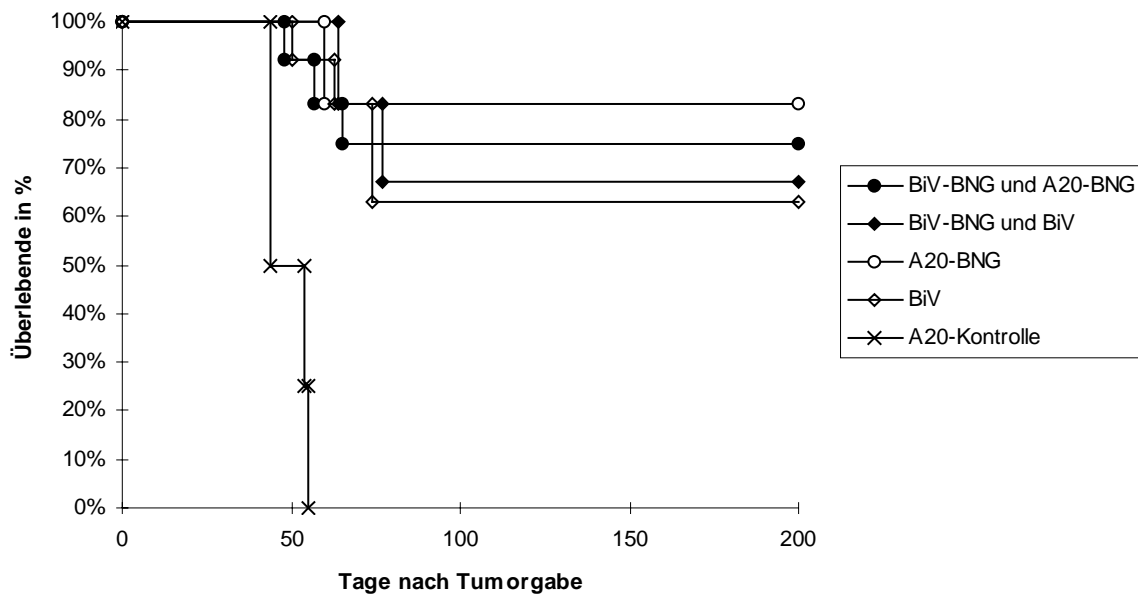


Abb.12: Therapieversuch mit simultaner Applikation von BiV-BNG und A20-BNG bzw. BiV-BNG- und BiV-Zellen nach A20-Gabe.

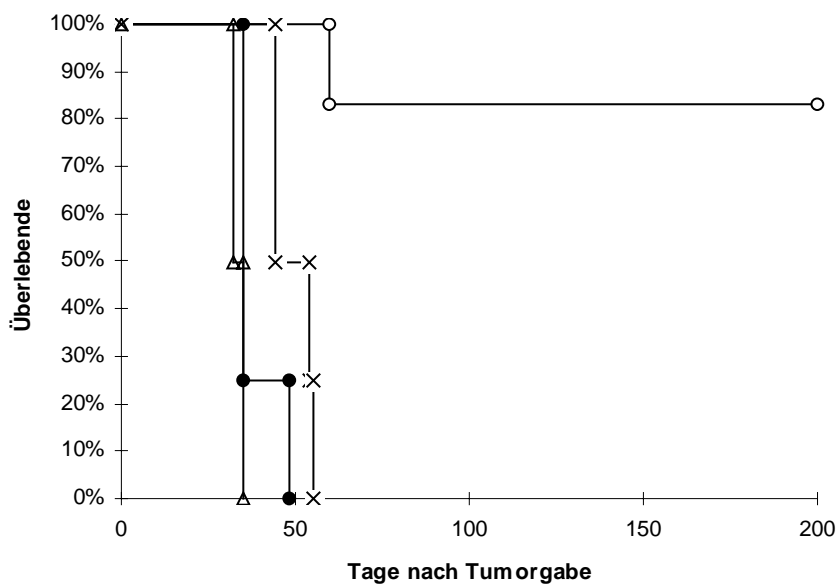


Abb.13: Therapie mit bestrahlten A20-Zellen in Kombination mit löslichem GM-CSF-Protein (hier: 10^5 Einheiten pro Tag) nach A20-Gabe. Zum Vergleich ist nochmals die Überlebenskurve bei der Therapie mit A20-BNG-Zellen eingezeichnet.

3.4 Die Rolle der Applikationsroute bei Präimmunisierung und Therapie

Die bisherigen Untersuchungen zur Tumorabstoßung durch Triomzellen waren bezüglich des Versuchsprotokolls stets nach dem gleichen Schema erfolgt. Bei Präimmunisierungsversuchen wurden die Vakzinezellen intraperitoneal verabreicht, bei therapeutischer Gabe hingegen subkutan. Bei Verwendung von BiV-BNG-Zellen konnte nach Präimmunisierung Schutz gegenüber A20 beobachtet werden, welcher bei therapeutischer Gabe ausblieb. Dies warf die Frage auf, ob das Mislingen der Therapie mit BiV-BNG-Zellen durch die subkutane Injektion bedingt war.

Um die Rolle der Applikationsroute näher zu untersuchen, wurde das Versuchsprotokoll der Präimmunisierungsversuche nun dahingehend abgeändert, dass alle Immunisierungszellen nicht intraperitoneal, sondern subkutan verabreicht wurden (Abb.14). Ob die erworbene Immunität auch von Dauer war, wurde durch eine Reinokulation am Tag 157 ermittelt. Die verwendeten Zellzahlen sind in Tab.4 des Methodenteils aufgelistet.

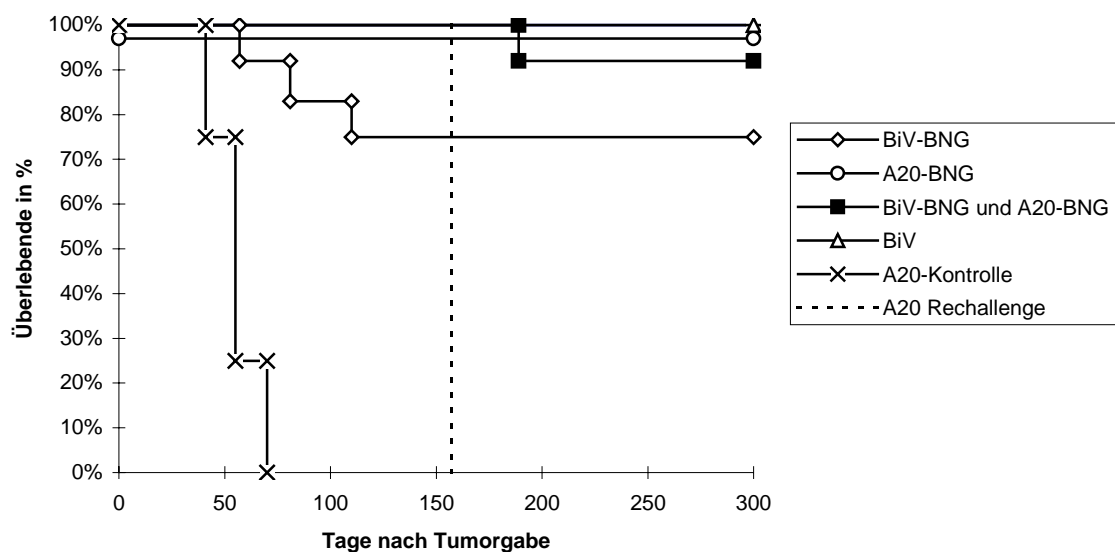


Abb.14: Präimmunisierung mit subkutaner Applikation der Zellen (BiV; BiV-BNG; A20-BNG; A20-BNG und BiV-BNG simultan) und anschließende A20-Gabe.

In allen Versuchsgruppen konnte das Überleben der Mäuse statistisch signifikant verlängert werden ($p < 0,005$). Nach Verabfolgung der BiV- und A20-BNG-Zellen wurden alle Mäuse dauerhaft vor Tumorwachstum geschützt. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen bei intraperitonealer Applikation in der Präimmunisierung (Mocikat et al., 1997 und Strehl et al., 1999). Ähnlich erfolgreich

war die simultane Gabe von BiV-BNG- und A20-BNG-Zellen, bei der lediglich 8% der Tiere nach Reinokulation starben. Schließlich führten BiV-BNG-Zellen in 75% der Fälle zu einer dauerhaften Immunität gegenüber A20, was wiederum dem Ergebnis bei i.p.-Injektion entsprach (Strehl et al., 1999).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die subkutane Applikationsroute im Vergleich zu der intraperitonealen Route keinerlei Veränderung bezüglich der Überlebensrate mit sich brachte.

3.5 Präimmunisierung und Therapie in IL-4-defizienten Mäusen

Das Zytokin Interleukin-4 (IL-4) ist wesentlich an der Regulierung der CD4-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt, indem es die Polarisierung bzw. Differenzierung der Vorläufer-T-Helferzellen zu Th2-Zellen fördert. Durch Disruption des IL-4-Genortes konnte eine signifikante Reduktion der Immunantwort vom Th2-Typ gezeigt werden (Kuhn et al., 1991).

Es sollten nun die Auswirkungen der Abwesenheit von IL-4, eines Parameters der Th2-Antwort also, auf die Immunantwort gegen das A20-Lymphom bei unterschiedlichen Immunisierungsansätzen studiert werden. Dazu wurden sowohl Präimmunisierungs- als auch Therapieversuche in IL-4-defizienten Mäusen durchgeführt und mit den Resultaten verglichen, die mit Wildtypmäusen erzielt worden waren.

Die Präimmunisierungen erfolgten nach dem üblichen Zeitschema durch subkutane Injektion von BiV-BNG-, A20-BNG- und BiV-Zellen. An Tag 126 wurde den überlebenden Tieren nochmals eine letale Tumordosis (Reinokulation) verabfolgt (Abb.15).

Mithilfe der beiden GM-CSF-transfizierten Zelllinien A20-BNG ($p < 0,025$) bzw. BiV-BNG ($p < 0,05$) wurde ein statistisch signifikanter, anhaltender Tumorschutz erreicht. Die Überlebensraten von 100% bzw. 67% waren mit den Ergebnissen identisch, die bei der Präimmunisierung von Wildtypmäusen beobachtet worden waren (Strehl et al., 1999). Die Abwesenheit von IL-4 hatte somit keine Auswirkung auf die Ausbildung einer dauerhaften Immunität. Ein anderes Bild zeichnete sich jedoch in

der Versuchsgruppe ab, die mit BiV-Zellen immunisiert wurde. Zwar konnte auch hier eine dauerhafte Immunität erzielt werden ($p < 0,05$); die Überlebensrate von 50% bedeutete allerdings eine Halbierung des Immunisierungserfolges bei Wildtypmäusen (Mocikat et al., 1997). Eine Beteiligung von IL-4 an der Vermittlung der Immunität kann also in diesem Fall in Betracht gezogen werden.

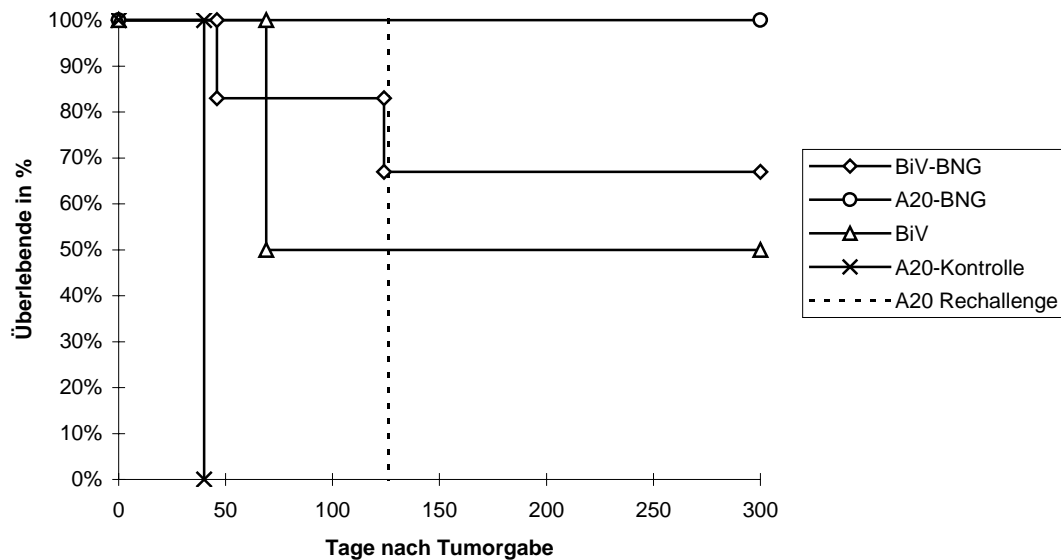


Abb.15: Präimmunisierung mit BiV-BNG-, A20-BNG- und BiV-Zellen in IL-4-defizienten Mäusen und anschließender A20-Gabe.

In den Therapieversuchen (Abb.16) kamen die Unterschiede bezüglich der Überlebensraten zwischen Wildtyp- und IL-4-defizienten Mäusen hingegen deutlich zum Vorschein. Konnten A20-BNG-Zellen bei den Erstgenannten in 100% der Fälle vor Tumorwachstum schützen, so überlebten in Abwesenheit von IL-4 nur noch 42% ($p < 0,01$) der Tiere. Ähnlich wurde bei Gabe von BiV-Zellen ein geringerer Therapieerfolg beobachtet: hier ging die Überlebensrate von 67% auf 17% zurück ($p < 0,025$). Interessanterweise führte die Injektion von BiV-BNG-Zellen mit 37% lebender Mäuse an Tag 200 zu einer statistisch signifikanten Verbesserung des Überlebens ($p < 0,025$), was bei Wildtypmäusen nicht gelungen war (Strehl et al., 1999). Dort konnte nämlich nur eine von zwölf Mäusen vor letalem Tumorwachstum geschützt werden. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, daß IL-4 auch hemmende Effekte auf die Immunantwort gegen das A20-Lymphom ausüben kann.

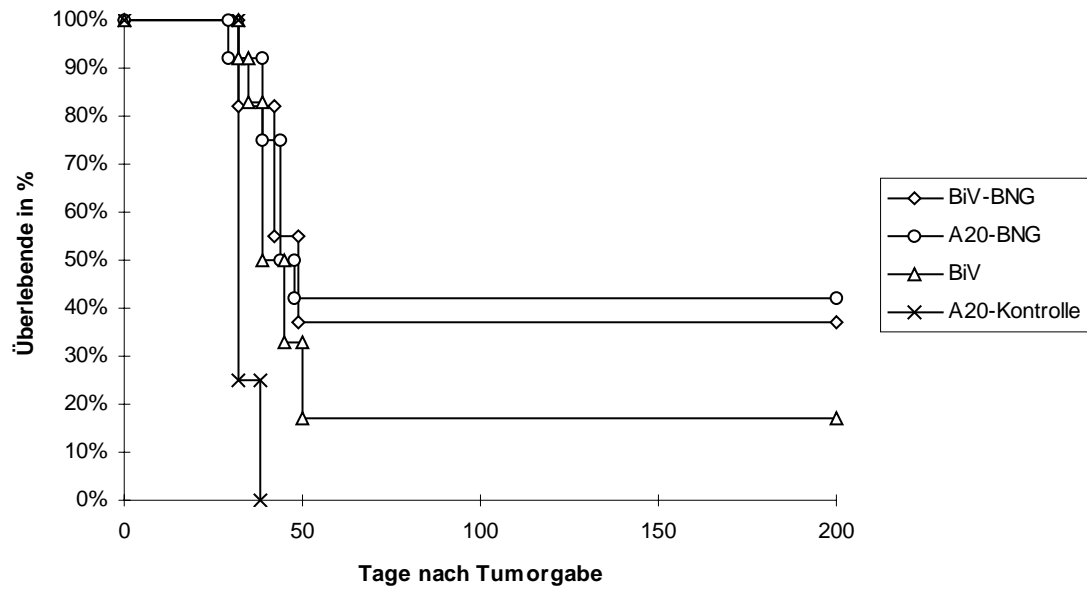


Abb.16: Therapie mit BiV-BNG-, A20-BNG- und BiV-Zellen nach A20-Gabe in IL-4-defizienten Mäusen.

IV DISKUSSION

Die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen einen bestimmten Tumor hat zwei unabdingbare Voraussetzungen. Erstens müssen Tumorantigene vorhanden sein, die auf immunogene Art und Weise dem Immunsystem präsentiert werden. Dies kann entweder durch antigenpräsentierende Zellen (APC), zu denen beispielsweise die dendritischen Zellen (DC) gehören, oder durch die Tumorzellen selbst geschehen. Zweitens müssen die Tumorantigene von den spezifischen Abwehrzellen (CD4- und CD8-Zellen) erkannt werden, was optimalerweise ihre Aktivierung und Differenzierung zu T-Helfer- und T-Killer-Zellen nach sich zieht. Allerdings können sich Tumorzellen einer effektiven Immunantwort dadurch entziehen, indem sie die Präsentation ihrer Antigene und/oder die Aktivierung der T-Zellen verhindern.

Ziel der Immuntherapie ist es nun einerseits, die Tumorzellen dem Immunsystem als fremd erkennbar zu machen, sie also gewissermaßen zu „enttarnen“. Andererseits besteht die Möglichkeit, die Effektorfunktionen der spezifischen Abwehrzellen und damit die Abstoßung des Tumors zu verstärken. Das kann durch Vakzinierung mit gentechnisch modifizierten Tumorzellen, die ein Zytokin- (z.B. GM-CSF) oder Suizidgen (z.B. HSV-tk) tragen, gelingen. Während GM-CSF vor allem die Antigenpräsentation durch APC fördert, kann durch gezielte Abtötung HSV-tk-produzierender Tumorzellen mit GCV die Menge freier Tumorantigene erhöht werden.

Die Verwendung ganzer Tumorzellen als Antigenquelle zur Immunisierung liegt darin begründet, dass bisher nur wenige Tumorantigene bekannt sind. Die BiV-Zelle ist als Triom von A20 in der Lage, diese polyvalenten Tumorantigene an APC zu dirigieren und eine systemische Immunantwort zu induzieren.

1 Suizidgentherapie bei Lymphomen

1.1 Ausgangslage

Ein großes Problem der heutigen Krebstherapie mit Zytostatika ist deren mangelnde Fähigkeit, zwischen normalen und malignen Zellen zu differenzieren. Da ihr prinzipieller Ansatzpunkt die Hemmung bzw. Abtötung proliferierender Zellen ist, schließt ihr Wirkspektrum auch nicht-maligne, proliferierende Gewebe (u.a. hämatopoetische Stammzellen, Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts) mit ein. Die Folge sind zum Teil ernsthafte Nebenwirkungen. Ein entscheidender Vorteil der Modifizierung neoplastischer Zellen mit Suizidgenen ist, dass den Tumorzellen neben einem proliferationspezifischen Merkmal ein tumorspezifisches verliehen wird, welches sie für ein bestimmtes Pharmakon gezielt zugänglich macht. Beispielsweise können Tumorzellen, deren Genom nach Gentransfer für die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-tk) kodiert, mit Ganciclovir (GCV) abgetötet werden.

Die Anwendbarkeit des HSV-tk/GCV-System für die Tumorthherapie wird schon seit vielen Jahren mittels verschiedener Ansätze in präklinischen Tiermodellen getestet: Nach Einschleusen des TK-Gens *in vitro* werden die transduzierten Tumorzellen alleine oder als Gemisch mit Wildtyp-Tumorzellen zur Untersuchung des „Bystander“-Effekts, verabreicht. Mitunter werden auch modifizierte Tumorzellen in bereits bestehende Wildtypumoren injiziert. Nach GCV-Gabe kann dann die Rückholbarkeit der TK-Zellen sowie die Abstoßung von Wildtyp-Tumorzellen untersucht werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Tumorzellen retroviral *in vivo* zu transduzieren. Hierzu werden Verpackungszellen, die HSV-tk-Gen-haltige Retroviren produzieren, in die Tumoren gespritzt.

Als eine der Ersten konnten Moolten und Mitarbeiter zeigen, dass aus HSV-tk-transduzierten Sarkomzellen bestehende Tumorzellpopulationen in einem murinen Modell sich nach GCV-Therapie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* komplett zurückbildeten (Moolten, 1986). Eine Reihe weiterer Studien schloss sich diesen Beobachtungen mit unterschiedlichen Erfolgen an. Zu den untersuchten

Tumormodellen gehörten unter anderem Lymphome (Moolten et al., 1990), Hirntumoren (Barba et al., 1994; Sandmair et al., 2000a), Kolon-Karzinom (Gagandeep et al., 1996), Nierenzell-Karzinom (Yamamoto et al., 1997) und Pankreas-Karzinom (Makinen et al., 2000). In klinischen Studien wurde das HSV-tk/GCV-Modell vor allem in der Therapie maligner Hirntumoren erprobt, deren Ergebnisse die Erwartungen jedoch nur eingeschränkt (Sandmair et al., 2000b) oder gar nicht (Rainov, 2000) erfüllen konnten. Als problematisch erwiesen sich in erster Linie die mangelnde Transduktionseffizienz von Tumorzellen sowie die unzureichende Penetration von GCV durch die Blut-Hirn-Schranke.

1.2 Mechanismen der Tumorabstoßung im HSV-tk/GCV-System

Die ursprüngliche Idee der Suizidgentherapie war in der sogenannten „Mosaiktheorie“ formuliert worden (Moolten et al., 1986). Die prophylaktische Einführung verschiedener Suizidgene in Gewebe mit erhöhtem Entartungsrisiko, beispielsweise Hämatopoesezellen bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS), würde diese im Falle einer späteren Entartung für die entsprechenden Chemotherapeutika sensitivieren. Im Rahmen dieser Studien konnte beobachtet werden, dass durch Pharmakongabe neben den suizidgenhaltigen Zellen auch angrenzende, nicht-modifizierte Wildtyp-Tumorzellen starben. Dieses Phänomen wurde daher als „Bystander“-Effekt bezeichnet.

Für das Zustandekommen des „Bystander“-Effektes werden vor allem zwei Mechanismen verantwortlich gemacht.

Zum einen ist es denkbar, dass triphosphorylierte – und damit toxische – Ganciclovirmetabolite über interzelluläre Kanäle, die sogenannten „gap-junctions“, von einer Zelle zur nächsten transportiert werden. Auf diese Weise können auch Zellen, die keine Thymidinkinase exprimieren, Apoptose induzieren. So konnte in vitro eine Verbesserung des „Bystander“-Effekts durch Transfektion verschiedener Connexin-Gene, die für Kanalproteine kodieren, in Gliosarkomzellen (Estin et al., 1999), Uterus-Karzinomzellen (Tanaka et al., 2001) und Pankreas-Karzinomzellen (Carrio et al., 2001) erreicht werden. Ebenso lässt sich der „Bystander“-Effekt durch pharmakologische Modulation der interzellulären Kommunikation steigern bzw.

hemmen (Robe et al., 2000). Alternativ kommt ein Transport toxischer Metabolite durch Phagozytose apoptotischer Vesikel durch benachbarte Zellen in Betracht, der elektronenmikroskopisch beobachtet werden konnte (Freeman et al., 1993).

Zum anderen ließen Infiltrationen mit Makrophagen, CD4- und CD8-Zellen, die regelmäßig in HSV-tk/GCV-behandelten Tumorgeweben gefunden wurden, auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Abstoßung nicht-transduzierter Zellen schließen (Caruso et al., 1993; Barba et al., 1994). Der immunologische Mechanismus des „Bystander“-Effekts lässt sich in zwei Komponenten unterteilen: die akute Entzündung sowie die Ausbildung einer T-Zell-vermittelten Antitumorantwort (Freeman et al., 1997). Nach GCV-Verabreichung setzen die HSV-tk-Gen-modifizierten Tumorzellen Zytokine (v.a. TNF, IL-1 und IL-6) frei, und es kommt zur hämorrhagischen Nekrose des Tumorgewebes durch tumorinfiltrierende Leukozyten. Es folgt die Einwanderung mononukleärer Zellen, die ihrerseits vermehrt immunstimulatorische Oberflächenmoleküle wie B7 und ICAM exprimieren (Ramesh et al., 1996). Im Anschluss wird dann über Präsentation von Tumorantigenen durch APC gegenüber T-Zellen, aber auch durch die modifizierten Tumorzellen selbst, die vermehrt MHC I an ihrer Oberfläche exprimieren (Yamamoto et al., 1997), eine spezifische Anti-Tumorantwort generiert. Die Beteiligung der spezifischen zellulären Immunabwehr am „Bystander“-Effekt wurde in einer Vielzahl von Studien unterstrichen. In einem murinen Kolonkarzinommodell waren nach Koinjektion von TK-positiven und Wildtyp-Tumorzellen athymische Balb/c-Mäuse im Gegensatz zu ihren immunkompetenten Artgenossen nicht in der Lage, die Tumoren abzustoßen (Gagandeep et al., 1996). Analoge Untersuchungen mit hepatozellulären Karzinomzellen kamen zu dem gleichen Ergebnis (Kuriyama et al., 1999). Zudem konnten Mäuse nach Rückholung HSV/tk-Gen-modifizierter Tumorzellen mit GCV nach erneuter Wildtyp-Tumorzellgabe vor Tumorwachstum geschützt werden (Yamamoto et al., 1997; Mullen et al., 1998; Kuriyama et al., 1999). Demnach ist das HSV-tk/GCV-System auch in der Lage, eine spezifische, langanhaltende Tumormunität zu erzeugen.

1.3 Immunisierung mit HSV-tk-transduzierten A20-Zellen

In dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit der Suizidgentherapie mit dem HSV-tk/GCV-System in der Therapie des murinen Lymphoms A20 untersucht. Neben dem „Bystander“-Effekt in vitro richtete sich dabei besonderes Augenmerk auf die Rückholbarkeit der transduzierten A20-Zellen (A20-TK) in vivo sowie auf eine daraus resultierende systemische Immunantwort.

A20-TK-Zellen erwiesen sich in vitro als Ganciclovir-sensitiv und starben innerhalb von 3 Tagen. Das Absterben der transduzierten Zellen in vitro hatte jedoch nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum der parentalen Tumorzellen. Der „Bystander“-Effekt in vitro war somit eingeschränkt. Bisher durchgeführte Studien zu anderen B-Zell-Neoplasien kamen diesbezüglich zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während die Abtötung HSV-tk-Gen-modifizierter, EBV-induzierter Lymphome mit GCV ebenfalls keine Auswirkung auf das Überleben der parentalen Tumorzellen hatte (Rogers et al., 1996), zeigten Plasmazytomzellen einen deutlichen „Bystander“-Effekt (Dilber et al., 1996). Für die Ausbildung eines „Bystander“-Effektes in vitro ist aufgrund der Abwesenheit von Immunzellen vor allem die interzelluläre Kommunikation verantwortlich (Freeman et al., 1996). Diese „metabolische Kooperation“ hängt nicht nur von der Anzahl der „gap-junctions“, sondern auch von der Dichte der Zellen in vitro ab (Moolten et al., 1986). Eine hohe Zelldichte war bei In-vitro-Versuchen mit A20-TK-Zellen stets vorhanden. Das Ausbleiben eines „Bystander“-Effektes bei A20-TK in vitro könnte somit auf einen nicht ausreichenden Austausch toxischer Metabolite zurückzuführen sein.

In vivo zeigte sich, dass die Verabreichung von GCV nach intraperitonealer Injektion einer letalen A20-TK-Dosis nur ein Drittel der Tiere vor Tumorwachstum schützte. Eine ähnlich schlechte Sensitivität HSV-tk-Gen-modifizierter Tumorzellen für GCV in vivo wurde auch in anderen Lymphomen (Moolten et al., 1990b; Beck et al., 1995; Rogers et al., 1996) beobachtet. Andererseits konnte in einem transgenen Lymphom-Modell eine Tumorverkleinerung nach GCV-Applikation erreicht werden (Moolten et al., 1990a). Als Ursache für die Resistenz der modifizierten Tumorzellen gegenüber GCV in vivo käme beispielsweise ein Verlust des HSV-tk-Gens in Betracht. In gastrointestinalen Tumorzelllinien und dem oben erwähnten, transgenen Lymphom konnten in GCV-resistenten Tumoren partielle und komplette Thymidinkinase-

Genverluste nachgewiesen werden (Yang et al., 1998; Moolten et al., 1990a). In vielen Fällen jedoch scheint die GCV-Resistenz nicht durch Gendeletion, sondern durch Störungen auf verschiedenen Ebenen des HSV-tk/GCV-Mechanismus bedingt zu sein. So führen multiple Methylierungen der DNA-Basen einerseits zur Inhibition der Thymidinkinase-Transkription (Degreve et al., 2000). Andererseits kann die GCV-vermittelte Zytotoxizität durch Onkogenprodukte (Beltinger et al., 2000) oder DNA-Reparaturmechanismen (Tomicic et al., 2001) unterbunden werden. Zudem wäre es denkbar, dass TK-positive Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus eintreten und sie dadurch vor GCV-Toxizität, welche zellzyklusabhängig ist, geschützt sind. Tumorwachstum käme in solchen Fällen durch Proliferation von Zellen zustande, die ihr HSV-tk-Gen verloren haben (Verzellei et al., 1998).

Bei der Hälfte der überlebenden Tiere kam es nach späterer Wildtyp-Tumorgabe zu einer Abstoßung der Tumorzellen. Unter der Voraussetzung, dass die modifizierten A20-Zellen effizient abgetötet werden, ist also zumindest teilweise die Induktion einer Immunantwort gegen den Tumor möglich. Dies kann durch Freisetzung von Tumorantigenen erklärt werden, die nach GCV-Applikation in Form löslicher Moleküle oder apoptotischer Vesikel von APC aufgenommen werden und T-Zellen präsentiert werden (Freeman et al., 1997). Wie sich in Depletionsversuchen herausstellte, sind vor allem CD8-Zellen, in geringerem Maße auch CD4-Zellen, für den Tumorschutz verantwortlich (Yamamoto et al., 1997; Mullen et al., 1998).

1.4 Ausblick

Die schlechte Rückholbarkeit der TK-transduzierten A20-Zellen in vivo schränkt die Anwendbarkeit des HSV-tk/GCV-Systems in diesem Tumormodell erheblich ein. Gelänge eine komplette Abtötung Suizidgen-markierter A20-Zellen, so ließe sich der beobachtete protektive Effekt besser ausschöpfen. Dies könnte durchaus unter Verwendung eines anderen „Suizid“-Systems erreicht werden. Rogers et al. (1996) verglichen das HSV-tk/GCV-Schema mit dem Cytosin-Deaminase(CD)/5-Fluorocytosin(5-FC)-System in EBV-positiven Lymphomzellen. Im Gegensatz zu HSV-tk-modifizierten Zellen konnte bei CD-markierten Zellen ein „Bystander-Effekt“ in vitro beobachtet werden. Auch in vivo führte das CD/5-FC-Schema häufiger zu einer kompletten Tumorregression.

Zudem könnte das Einschleusen von Zytokingenen den Vakzinierungseffekt verbessern. Beispielsweise führten Modifikationen von HSV-tk-Gen-veränderten Tumorzellen mit GM-CSF-, IL-4- bzw. IFN- α -Genen in präklinischen Modellen zu einer besseren Tumorprotektion (Jones et al., 2000; Benedetti et al., 1997; Santodonato et al., 1996).

Schließlich könnte die Effektivität durch Hinzuziehen konventioneller Tumorthérapien gesteigert werden, beispielsweise durch Kombinationsschemata aus HSV-tk/GCV-Gentherapie und Strahlen- (Vlachaki et al., 2001), Chemo- (Rainov et al., 2001) bzw. chirurgischer Therapie (Niranjan et al., 2000).

2 Persistenz xenogener Vakzinezellen in vivo

Eine erfolgreiche Tumorabstoßung durch Triomzellen basiert auf drei Voraussetzungen (Mocikat et al., 1997; Kronenberger et al., 2002): erstens auf der Verwendung ganzer BiV-Zellen als Antigenquelle, zweitens auf der Aufnahme von Antigenen durch Fc γ -Rezeptor-tragende APC und drittens auf der Xenogenität der Triomzellen.

Trotz ihres xenogenen Charakters waren BiV-Zellen in Milzorganen immunisierter Mäuse noch etliche Wochen nach Immunisierung nachweisbar (Graf et al., 2003). Offenbar werden nicht alle Triomzellen nach ihrer Injektion lysiert; vielmehr verbleiben sie in vivo, ohne jedoch Tumoren zu bilden (Mocikat et al., 1997). Es wäre vorstellbar, dass sie auf diese Weise im Sinne einer persistierenden Antigenquelle zu einem langanhaltenden Tumorschutz beitragen. Diese Befunde ähneln Beobachtungen in anderen murinen Lymphommodellen (Khazaie et al., 1994; Morecki et al., 1996), in denen die Persistenz nicht tumorigener Vakzinezellen, vermutlich unter Kontrolle durch CD8-Zellen (Müller et al., 1998), mit der Antitumorimmunität korrelierte.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass HSV-tk-Gen-transduzierte BiV-Zellen in vivo nur teilweise durch GCV eliminierbar waren. Da nur proliferierende Zellen sensibel für GCV sind, liegt die Vermutung nahe, dass die persistierenden Vakzinezellen post iniectionem schon nach wenigen Zellteilungen in die G0-Phase des Zellzyklus eintreten und sich dadurch einer Abtötung durch GCV

entziehen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die nach Immunisierung aus den Milzorganen isolierten BiV-TK-Zellen *in vitro* außerordentlich langsam proliferierten.

Eine frühzeitige Eliminierung der BiV-TK-Zellen während der Immunisierungsphase war mit einem verminderten Antitumoreffekt verbunden, wenngleich nicht alle Zellen, wie oben beschrieben, durch GCV abgetötet wurden. Die nach GCV-Applikation verbliebene Anzahl an Triomzellen war also nicht in der Lage, einen ausreichenden Tumorschutz zu induzieren. Im Gegensatz dazu hatte eine späte Rückholung vier bzw. fünf Wochen nach Immunisierung keinen Einfluss auf die Tumormunität. Dies könnte damit zusammenhängen, dass sich die BiV-TK-Zellen zu einem solch späten Zeitpunkt nicht mehr teilen und dadurch vor GCV geschützt sind. Ebenso ist es denkbar, dass die Induktion einer Immunantwort dann bereits abgeschlossen ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Persistenz xenogener Vakzinezellen neben den eingangs beschriebenen Bedingungen eine weitere Voraussetzung für eine effiziente Tumorprotektion darstellen könnte.

3 Tumorabstoßung mit GM-CSF-transfizierten Triomzellen

3.1 Ausgangslage

GM-CSF wurde zunächst als Wachstumsfaktor für Stammzellen der Granulozyten- und Makrophagenlinie beschrieben (Metcalf, 1985). Darüber hinaus ist GM-CSF an der Differenzierung, Proliferation und Aktivierung einer Reihe weiterer immunologisch aktiver Zellen beteiligt. Bei der Immunisierung gegen Tumoren macht man sich diese immunmodulatorischen Eigenschaften auf unterschiedliche Art und Weise zunutze:

- Als lösliches Molekül verstärkt GM-CSF beispielsweise die Immunantwort gegen tumorassoziierte Selbstantigene, z.B. HER2/neu (Disis et al., 1999).
- GM-CSF-Fusionsproteine führen GM-CSF und Antigen simultan an APC heran und konnten so in einem murinen Lymphommodell eine systemische Immunantwort induzieren (Selmayr et al., 1999)

- Von dem Einsatz von DNA-Vakzinen verspricht man sich – ermöglicht durch die intrazelluläre Synthese des Zielantigens - eine effektivere Präsentation des Antigens über MHC I. Auch hier zeigte sich in einem murinen Lymphommodell, dass sich durch Konstruktion eines Vektors bestehend aus Id- und GM-CSF-Gen und anschließender Immunisierung ein höherer Anti-Id-Antikörper-Titer erzielen ließ als bei alleiniger Id-DNA-Gabe (Syrengeles and Levy, 1999).
- Die Transfektion des GM-CSF-Gens in Tumorzellen bietet gegenüber der systemischen Verabreichung den Vorteil einer lokalen, länger anhaltenden Zytokinproduktion mit physiologisch relevanten Konzentrationen in Tumornähe. Auf diese Weise können APC vor Ort aktiviert werden. Die Effektivität dieses Ansatzes wurde erstmals von Dranoff und Mitarbeitern (1993) für ein murines Melanommodell beschrieben. Untersuchungen mit Tumorzellen der Hämatopoese erbrachten ebenso vielversprechende Ergebnisse (Dunussi-Joannopoulos et al., 1997; Stripecke et al., 1998; Fujii et al., 1999), u.a. auch beim murinen Lymphom A20 (Levitsky et al., 1996; Strehl et al., 1999).

3.2 Mechanismen der Tumorabstoßung nach Gabe einer GM-CSF-modifizierten Vakzine

Der verstärkten Antitumorimmunität durch GM-CSF liegen mehrere Mechanismen zugrunde. Besonderes Augenmerk richtet sich hierbei auf die dendritischen Zellen (DC), deren Reifung und Wachstum GM-CSF fördert. Dendritische Zellen nehmen als potente APC Tumorantigene via Phagozytose auf und laden sie nach Prozessierung als Peptidfragmente auf ihre membranständigen MHC I- und MHC II-Moleküle. Nach Wanderung in die lymphatischen Organe werden die Tumorantigene dort schließlich B- und T-Zellen präsentiert - ein entscheidender Vorgang für die Induktion einer systemischen Immunantwort (Banchereau and Steinman, 1998). Für deren Ausbildung ist neben der MHC-TCR-Interaktion zwischen DC und T-Zelle eine effektive Kostimulation unerlässlich. Diese wird durch Interaktion zwischen Molekülen der B7-Familie (DC) und CD28 (T-Zelle) ermöglicht. Diesbezüglich ist GM-CSF von Bedeutung, da es die Expression von B7 auf DC erhöht und dadurch die Kostimulation verbessert.

Darüber hinaus stimuliert GM-CSF die Proliferation von Eosinophilen, Neutrophilen und Makrophagen, deren Phagozytosefähigkeit über Hochregulierung der Fc-Rezeptoren gesteigert wird. Aktivierte Makrophagen unterstützen die Tumorabwehr zusätzlich durch Sekretion immunologisch aktiver Moleküle wie IL-1, TNF- α , Metalloproteinasen und Antiangiogenesefaktoren (Mach and Dranoff, 2000).

GM-CSF-sezernierende Tumorzellen rekrutieren DC über das Chemokin MIP-1 α (Kielian et al., 1999) und erleichtern deren Migration durch vermehrte Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen.

Schließlich übt GM-CSF aktivierende Einflüsse auf Th1- und Th2-Zellen aus. Obwohl für die Antitumorimmunität in den meisten Fällen die Th1-Antwort verantwortlich gemacht wird (Nishimura et al., 2000), scheinen jedoch auch Th2-Zellen dabei eine gewisse Rolle zu spielen (Schüler et al., 1999).

3.3 Immunisierung mit GM-CSF-transfizierten Triomzellen

Die Generierung des Tumorschutzes durch die Triomzelllinie BiV beruht zum Teil auf ihrem xenogenen Charakter, vor allem jedoch auf der Eigenschaft des bispezifischen Antikörpermoleküls, Tumorantigene über seine Fc γ -Rezeptor II-Spezifität an APC heranzuführen. Damit dies effektiv geschieht, muß es an der Membranoberfläche von BiV exprimiert sein (Kronenberger et al., 2002); liegt es hingegen als lösliches, nicht-membrangebundenes Molekül vor, bleibt eine effektive Antitumorantwort aus. Nach Internalisierung des BiV-Proteins samt Triomzelle werden die aufgenommenen Tumorantigene nach Prozessierung dem Immunsystem präsentiert. Hierfür ist auf Seiten des Immunsystems wiederum das Vorhandensein von CD4- und CD8-Zellen notwendig (Mocikat et al., 1997).

Vor dem Hintergrund der aktivierenden Einflüsse von GM-CSF auf APC einerseits, und der Schlüsselrolle der APC im Triomzellansatz andererseits, erfolgte die Transfektion von BiV mit dem GM-CSF-Gen (Strehl et al., 1999). Tatsächlich schützten im Rahmen von Präimmunisierungs- und Simultanversuchen GM-CSF-Gen-transfizierte Triomzellen (BiV-BNG) effektiver vor Tumorwachstum als GM-CSF-Gen-transfizierte Lymphomzellen (A20-BNG). Im Therapieansatz jedoch, bei dem die immunisierenden Zellen bei bereits etabliertem Tumor verabfolgt werden, erwies sich BiV-BNG überraschenderweise als wirkungslos: der Synergismus zwischen

Triomzelle und GM-CSF war aufgehoben. In der vorliegenden Arbeit wurde den Ursachen des Therapieversagens von BiV-BNG nachgegangen.

Die therapeutische Applikation von BiVneg-BNG, einer mit dem GM-CSF-Gen transfizierten Variante von BiV mit defektem Bindungsarm für den Fc γ -Rezeptor, hatte eine deutliche Tumorphrotektion zur Folge. Durch Unterbindung der Interaktion zwischen dem bispezifischen BiV-Protein und dem Fc γ -Rezeptor II, und damit der rezeptorvermittelten Internalisierung der Triomzelle, konnte ein effizienter Tumorschutz hergestellt werden. Hierfür war allerdings das Vorhandensein des GM-CSF-Gens Voraussetzung, denn unmodifizierte BiVneg-Zellen blieben wirkungslos. Wie wird dieser Tumorschutz vermittelt? Die Heranführung von Tumorantigenen über das bispezifische BiV-Protein an APC durch BiVneg-BNG-Zellen ist aufgrund des defekten Bindungsarmes nicht möglich. Es ist zu vermuten, dass die Rekrutierung von APC in diesem Fall durch GM-CSF geschehen muß, da nur GM-CSF-Gen-transfizierte BiVneg-Zellen (BiVneg-BNG), nicht jedoch Wildtyp-BiVneg-Zellen, die Mäuse vor Tumorwachstum schützten. Anschließend werden Tumorantigene durch APC aufgenommen und präsentiert. „Funktionell“ betrachtet ist BiVneg-BNG also mit GM-CSF-Gen-transfizierten Lymphomzellen (A20-BNG) vergleichbar: beide tragen Tumorantigene des Lymphoms A20 und produzieren GM-CSF. Dieser Überlegung entsprechend zeigten bestrahlte A20-BNG-Zellen im Therapieversuch mit 83% überlebenden Tieren den gleichen Erfolg wie BiVneg-BNG-Zellen. Dieser Befund erklärt zwar nicht, warum BiV-BNG-Zellen therapeutisch unwirksam ist. Jedoch liefert er einen Hinweis darauf, dass es im Therapieansatz eine sich gegenseitig hemmende Interaktion zwischen dem *intakten* BiV-Protein bzw. dessen Wirkmechanismus und GM-CSF bzw. dessen Signaltransduktionsweg geben könnte (Abb.17 und 18).

Durch die Fc γ -Rezeptor-Blockade konnte eine gewisse Antitumorantwort (35% Überlebende) mit BiV-BNG induziert werden, wohingegen ohne 2.4G2-Gabe nahezu alle Mäuse (9% Überlebende) starben. Die Verwendung von BiV-BNG-Zellen erreichte in diesem Therapieansatz den gleichen Tumorschutz wie A20-BNG-Zellen. Da die Interaktion zwischen intaktem BiV-Protein und Fc γ -Rezeptor unterbunden wurde, sind auch in diesem Fall BiV-BNG und A20-BNG „funktionell“ – also im Sinne der Möglichkeit, eine systemische Immunantwort zu induzieren – gleichgestellt. Ebenso kommt es nicht zu der oben postulierten hemmenden Wechselwirkung

zwischen dem BiV-Protein und GM-CSF, was den identischen therapeutischen Effekt von BiV-BNG und A20-BNG erklären könnte.

Abb.17: Wechselwirkung zwischen BiV-BNG und APC im Therapieansatz. Die gleichzeitige Bindung von GM-CSF und intaktem BiV-Protein an APC resultiert in einer Hemmung der APC.

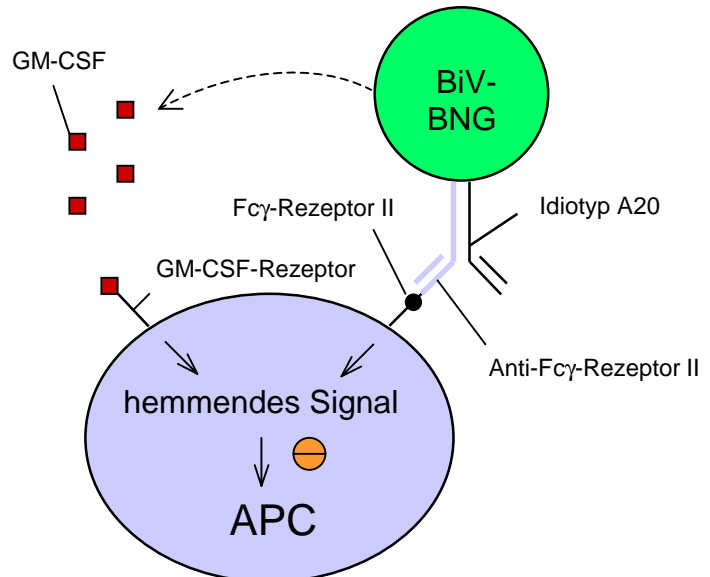
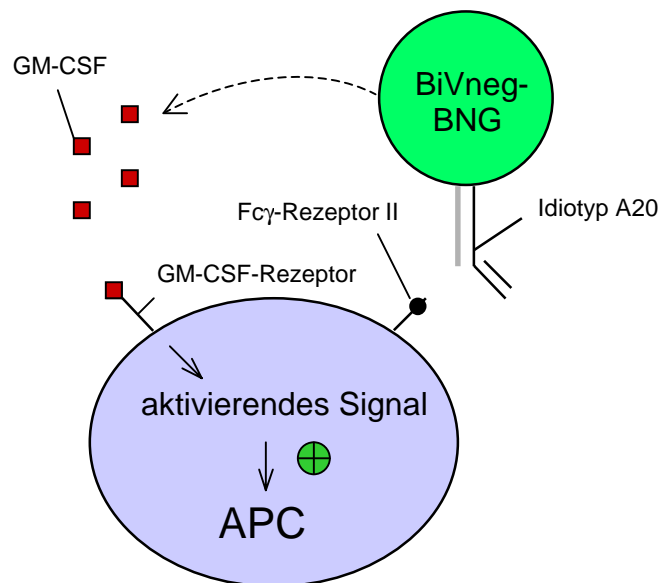


Abb.18: Wechselwirkung zwischen BiVneg-BNG und APC im Therapieansatz. Das defekte BiV-Protein vermag APC nicht zu binden, eine hemmende Interaktion mit GM-CSF unterbleibt und die APC wird aktiviert.



Der tumorprotektive Effekt von A20-BNG und BiV wurde durch gleichzeitige therapeutische Verabreichung von BiV-BNG nicht aufgehoben. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass der hemmende Einfluss von BiV-BNG auf die betroffene APC beschränkt ist. APC, die mit BiV-BNG nicht in Wechselwirkung treten, können weiterhin aktiviert werden und über Interaktion mit BiV bzw. A20-BNG zur Tumorabwehr führen.

Die Applikationsroute als mögliche Ursache der Wirkungslosigkeit von BiV-BNG im Therapieansatz konnte durch Änderung des Präimmunisierungsprotokolls ausgeschlossen werden. Sowohl intraperitoneale als auch subkutane Injektion der Immunisierungszellen schützten die Tiere effektiv vor Tumorwachstum.

Es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um das Therapieversagen von BiV-BNG im Therapieansatz besser verstehen zu können.

Zum einen ist es denkbar, dass BiV-BNG die Balance zwischen der Th1- und Th2-Antwort zu Gunsten von Th2 verschiebt. Im Gegensatz zur tumorprotektiven Th1-Antwort verschlechtern Th2-Zytokine wie IL-4 die Tumorabstoßung im Triomzellansatz (Strehl et al., 1999), vermutlich durch Suppression der IL-12-Produktion durch APC, welche die Differenzierung zu Th1 stimuliert. Entsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit bei therapeutischer Verwendung von BiV-BNG-Zellen eine Verbesserung der Überlebensrate IL-4-defizienter Mäuse gegenüber Wildtypmäusen gezeigt werden.

Zum anderen sind kinetische Aspekte der Immunantwort zu beachten. Vielleicht bleibt BiV-BNG einfach zu wenig Zeit, eine effektive Antitumorantwort zu induzieren. Mithilfe von Messungen der Immunantwort in mit BiV-BNG-Zellen präimmunisierten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten wird dieser Sachverhalt derzeit in der AG Mocikat untersucht.

3.4 Ausblick

Die Fortschritte in der Immuntherapie maligner Erkrankungen mit Zytokin-modifizierten Tumorzellen geben zu der Hoffnung Anlass, dass diese Therapieform auch zukünftig weiter an Bedeutung gewinnen wird. Neben den vorklinischen Untersuchungen werden vor allem die Ergebnisse klinischer Studien für ihre Weiterentwicklung entscheidend sein. Zelluläre Vakzine auf GM-CSF-Basis wurden bereits für mehrere Tumorerkrankungen in Phase I- und II-Studien erprobt (Borrello and Pardoll, 2002). Hierzu wurden im Wesentlichen entweder GM-CSF-Gen-tragende autologe (Simons et al., 1997) oder allogene Tumorzellen (Jaffee et al., 2001) verwendet. Zusammengefasst ergaben diese Studien eine im allgemeinen gute Verträglichkeit, als Nebenwirkungen traten vor allem Hautrötung, Schwellungen

und Juckreiz auf. Die biologische Aktivität wurde durch ausgedehnte Infiltration an der Stelle der Immunisierung mit dendritischen Zellen, Eosinophilen und T-Lymphozyten dokumentiert. Als Nachteil erwies sich jedoch die zeit- und kostenaufwendige Transduktion der Tumorzellen mit dem GM-CSF-Gen. Die gleichzeitige Verabreichung von GM-CSF-produzierenden, allogenen „Bystander“-Zellen mit nicht-modifizierten autologen Tumorzellen umgeht dieses Hindernis auf elegante Weise (Borrello et al., 1999) und wird derzeit bei Myelom-Patienten in einer klinischen Studie untersucht.

Die Daten präklinischer Modelle haben gezeigt, dass immuntherapeutische Ansätze vor allem bei kleinen Tumormassen bzw. im Bereich der „minimal residual disease“, beispielsweise Residuen nach lokaler Resektion oder Bestrahlung sowie Mikrometastasen, wirksam sind. Um auch größere Tumorzellzahlen effektiv bekämpfen zu können, bedarf es daher einer Integration der Vakzinierungsstrategien mit den konventionellen Therapieformen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Neue Therapieansätze zur Krebsbehandlung aus dem Bereich der Gen- und Immuntherapie haben als Ergänzung zu den konventionellen Behandlungsmethoden besondere Bedeutung erlangt. Zu ihnen zählen u.a. die Suizidgentherapie und die Verwendung Zytokin-Gen-modifizierter Tumorzellvakzine. Beide Strategien wurden in der vorliegenden Arbeit herangezogen, um eine Immunantwort gegen das murine B-Zell-Lymphom A20 zu erzeugen.

1. *Versuche mit HSV-tk-Gen-transduzierten Lymphomzellen.* Das Prinzip der Suizidgentherapie mit dem HSV-tk/GCV-System beruht auf der Transduktion des HSV-tk-Gens in Tumorzellen, die dadurch gezielt durch GCV abgetötet werden können. Dabei werden auch nicht-transduzierte, angrenzende Zellen miterfasst („Bystander“-Effekt).

Ganciclovirsensible, HSV-tk-Gen-transduzierte A20-Zellen (A20-TK) zeigten in vitro einen eingeschränkten „Bystander“-Effekt. In vivo konnten A20-TK-Zellen nur bei jeder dritten Maus vollständig durch GCV eliminiert werden, wobei sich jedoch bei der Hälfte der überlebenden Tiere eine dauerhafte, systemische Antitumorantwort induzieren ließ.

2. *Versuche mit HSV-tk-Gen-transduzierten Triomzellen.* Die Triomzelle BiV, hervorgegangen aus der Fusion des Lymphoms A20 mit der Hybridomzelllinie 2.4G2, dirigiert Tumorantigene über die Expression eines anti-Fc-Rezeptor-Antikörpers an APC und führt auf diese Weise zur Tumorabstoßung. Trotz Xenogenität sind BiV-Zellen jedoch bis zu 11 Wochen nach Immunisierung in vivo nachweisbar.

Auch HSV-tk-Gen-transduzierte BiV-Zellen (BiV-TK) konnten trotz GCV-Verabreichung vier Wochen post iniectionem in den Milzen immunisierter Mäuse nachgewiesen werden, allerdings in niedriger Frequenz.

Obwohl nicht alle BiV-TK-Zellen durch GCV in vivo eliminiert werden, hatte eine frühzeitige Rückholung der Zellen einen verminderten Antitumoreffekt zur Folge. Im Gegensatz dazu beeinflusste eine späte GCV-Gabe die Tumorabstoßung nicht. Dies deutet darauf hin, dass für einen potenten Tumorschutz die langdauernde

Verfügbarkeit von Vakzinezellen im Sinne einer persistierenden Antigenquelle erforderlich sein könnte.

3. *Versuche mit GM-CSF-Gen-transfizierten Triomzellen.* GM-CSF-Gen-transfizierte Triomzellen (BiV-BNG) schützten in Präimmunisierungsversuchen effektiver vor Tumorwachstum als Wildtyp-BiV-Zellen, bei therapeutischer Applikation wurde der Antitumoreffekt jedoch überraschenderweise aufgehoben.

Durch Blockierung der Triomzell-vermittelten Tumorantigen-Heranzuführung an APC durch BiVneg-BNG bzw. den Antikörper 2.4G2 konnte die ursprüngliche Antitumorantwort vollständig bzw. teilweise wiederhergestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine hemmende Interaktion zwischen intaktem BiV-Protein und GM-CSF, resultierend in einer Hemmung der APC. Offenbar beschränkt sich die Hemmung nur auf die betroffene APC, denn BiV-BNG hob den Therapieeffekt von A20-BNG bzw. BiV bei simultaner Applikation nicht auf. Die Applikationsroute als mögliche Ursache der Wirkungslosigkeit von BiV-BNG im Therapieansatz wurde durch Änderung des Präimmunisierungsprotokolls ausgeschlossen. Da IL-4-defiziente Mäuse bei therapeutischer BiV-BNG-Gabe eine bessere Überlebensrate erreichten als Wildtypmäuse, könnte der aufgehobene Therapieeffekt von BiV-BNG mit einer Verschiebung des Th1/Th2-Verhältnisses zu Gunsten einer Th2-Antwort zusammenhängen.

VI LITERATUR

Adams S and Emerson S (1998): Gene therapy for leukaemia and lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 12 (3): 631-648

Banchereau J and Steinman R (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252

Barba D, Hardin J, Sadelain M and Gage F (1994): Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4348-4352

Beck C, Cayeux S, Lupton S, Dörken B and Blankenstein T (1995): The Thymidine Kinase/Ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells. *Hum Gene Ther* 6: 1525-1530

Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Uckert W and Debatin KM (2000): Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Res* 60 (12): 3212-3217

Benedetti S, Dimeco F, Pollo B, Cirenei N, Colombo BM, Buzzone MG, Cattaneo E, Vescovi A, Didonato S, Colombo MP and Finocchiaro G (1997): Limited efficacy of the HSV-tk/GCV system for gene therapy of malignant gliomas and perspectives for the combined transduction of the interleukin-4 gene. *Hum Gene Ther* 8 (11): 1345-1353

Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S et al. (1997): HSV-tk gene transfer into donor leukocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276: 1719-1724

Borrello I, Sotomayor EM, Cooke S and Levitsky HI (1999): A universal granulocyte macrophage-colony stimulating factor-producing bystander cell line for use in the formulation of autologous tumor cellbased vaccines. *Hum Gene Ther* 10 (12): 1983-1991

Borrello I and Pardoll D (2002): GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13: 185-193

Carrio M, Mazo A, Lopez-Iglesias C, Estivill X and Fillat C (2001): Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int J Cancer* 94 (1): 81-88

Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL and Klatzmann D (1993): Regression of macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7024-7028

Classen M, Diehl V, Kochsiek K (1998): Innere Medizin. 4. Auflage, Verlag Urban & Schwarzenberg.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P and Gisselbrecht C (2002): CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346 (4): 235-242

Coulie P (1997): Human tumour antigens recognized by T cells: new perspectives for anti-cancer vaccines? *Mol Med Today* 3 (6): 261-268

Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM (1992): In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552

Degreve B, De Clercq E and Balzarini J (2000): Selection of HSV-1 TK gene transfected murine mammary carcinoma cells resistant to (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and ganciclovir (GCV). *Gene Ther* 7 (18): 1543-1552

Dilber M, Abedi M, Björkstrand B, Christensson B, Gahrton G, Xanthopoulos K and Smith C (1996): Suicide gene therapy for plasma cell tumors. *Blood* 88 (6): 2192-2200

Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR and Cheever MA (1999): Generation of immunity to the HER2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res* 5: 1289-1297

Dovhey SE, Ghosh NS, Wright KL (2000): Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 60 (20): 5789-5796

Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D and Mulligan R (1993): Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci* 90: 3539-3543

Dunussi-Joannopoulos K, Weinstein HJ, Arceci RJ and Croop JM (1997): Gene therapy with B7.1 and GM-CSF vaccines in a murine AML model. *J Padiatr Hematol Oncol* 19 (6): 536-540

Esrin D, Li M, Spray D and Wu JK (1999): Connexins are expressed in primary brain tumors and enhance the bystander effect in gene therapy. *Neurosurgery* 44 (2): 361-369

Freeman SM, Aboud CN, Wharthenby KA et al. (1993): The "bystander effect": tumour regression when a fraction of the tumour mass is genetically modified. *Cancer Res* 53: 5274-5283

Freeman SM, Mc Cune C, Robinson W, Abboud CN, Abraham GN, Angel C and Marrogi A (1995): The treatment of ovarian cancer with a gene modified cancer vaccine: a phase I study. *Hum Gene Ther* 6 (7): 927-939

Freeman SM, Whartenby JL, Abboud CN, Marrogi AJ (1996): In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Seminars in Oncology* 23 (1): 31-45

Freeman SM, Ramesh R, Marrogi AJ (1997): Immune system in suicide-gene therapy. *Lancet* 349: 2-3

Fujii S, Hamada H, Fujimoto K, Shimomura T and Kawakita M (1999): Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine-expressing tumor cells are associated with the enhanced survival of mice bearing syngeneic tumors. *Blood* 93: 4328-4335

Gagandeep S, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ and Kinsella AR (1996): Prodrug-activated gene therapy: Involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther* 3 (2): 83-88

George AJ, Folkard SG, Hamblin TJ, Stevenson FK (1988): Idiotypic vaccination as a treatment for a B cell lymphoma. *J Immunol* 141 (6): 2168-2174

Graf N, Adam C and Mocikat R (2003): Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo. *Int J Cancer* 105 (2): 217-220

Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J (1996): Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor escape. *Science* 274: 1363-1366

Hawkins R, Winter G, Hamblin TJ, Stevenson F, Russell S (1993): A genetic approach to idiotypic vaccination. *J Immunotherapy* 14: 273-278

Huang LQ, Bresseur F, Serrano A, De Plaen E, van der Bruggen P, Boon T, Van Pel A (1996): Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma. *J Immunol* 162 (11): 6849-6854

Hui K, Grosveld F, Festenstein H (1984): Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 311: 750-752

Itaya T, Yamagiwa S, Okada F, Oikawa T, Kuzumaki N, Takeichi N, Hosokawa M and Kobayashi H (1987): Xenogenization of a mouse lung carcinoma (3LL) by transfection with an allogeneic class I major histocompatibility complex gene (H-2Ld). *Cancer Res* 47: 3136-3140

Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Scheppers K, Sauter PR et al. (2001): Novel allogenic granulocyte macrophage-colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 19 (1): 145-156

Janeway C, Travers P (1997): Immunologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

Jones RK, Pope IM, Kinsella AR, Watson AJ and Christmas SE (2000): Combined suicide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene therapy induces complete tumor regression and generates antitumor immunity. *Cancer Gene Ther* 7 (12): 1519-1528

Karasuyama H, Kudo A and Melchers F (1990): The proteins encoded by the V_{preB} and Λ_{5} pre-B cell-specific gene can associate with each other and the μ heavy chain. *J Exp Med* 172: 969-972

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G and Kiessling R (1986): Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* 319: 675-678

Khazaie K, Prifti S, Beckhove P, Griesbach A, Russel S, Collins M and Schirmacher V (1994): Persistence of dormant tumor cells in the bone marrow of tumor cell-vaccinated mice correlates with long-term immunological protection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (16): 7430-7434

Kielian T, Nagai E, Ikubo A, Rasmussen C and Suzuki T (1999): Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor released by adenovirally transduced CT26 cells leads to the local expression of macrophage inflammatory protein 1 α and accumulation of dendritic cells at vaccination sites in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 48: 123-131

Kim KJ, Kanellopoulos-Langevin C, Merwin RM, Sachs DH, Asofsky R (1979): Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* 122 (2): 549-554

King CA, Wills MR, Hamblin TJ, Stevenson FK (1993): Idiotypic IgM on a B-cell surface requires processing for recognition by anti-idiotypic T-cells. *Cell Immunol* 147: 411-424

Kronenberger K, Dieckmann A, Selmayr M, Strehl J, Wahl U, Lindhofer H, Kraal G and Mocikat R (2002): Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells. *Blood* 99: 1327-1331

Kuhn R, Rajewsky K and Muller W (1991): Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254: 707-710

Kuriyama S, Kikukawa M, Masui K, Okuda H, Nakatani T, Akahane T, Mitoro A, Tominaga K, Tsujinoue H, Yoshiji H, Okamoto S, Fukui H and Ikenaka K (1999): Cancer gene therapy with HSV-tk/GCV system depends on T-cell-mediated immune responses and causes apoptotic death of tumor cells in vivo. *Int J Cancer* 83 (3): 374-380

Lal S, Lauer UM, Niethammer D, Beck JF and Schlegel PG (2000): Suicide genes: past, present and future perspectives. *Immunol Today* 21 (1): 48-54

Levitsky H, Montgomery J, Ahmadzadeh M, Staveley-O`Carroll, Guarnieri F, Longo DL and Kwak L (1996): Immunization with Granulocyte-Macrophage

Colony-Stimulating Factor-Transduced, but not B7-1-Transduced, Lymphoma Cells primes Idiotype-Specific T Cells and Generates Potent Systemic Antitumor Immunity. *J Immunol* 156: 3858-3865

Lindenmann J and Klein PA (1967): Viral oncolysis increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J Exp Med* 126: 93-108

Löffler A, Kufer P, Lutterbuse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, Riethmüller G, Dorken B, Bargou RC (2000): A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95 (6): 2098-2103

Makinen K, Loimas S, Wahlfors J, Alhava E, Janne J (2000): Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer. *J Gene Med* 2 (5): 361-367

Marty M and Extra JM (1996): Fundamentals: what is GM-CSF? In Marty M (Hrsg.): *Manual of GM-CSF, Blackwell Science, Oxford*

Mellstedt H, Fragerberg J, Frödin JE, Henriksson L, Hjelm-Skoog AL, Liljefors M, Ragnhammar P, Shetye J and Österborg A (1999): Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol* 6: 169-175

Metcalf D (1985): The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* 229: 16-22

Mocikat R, Selmayr M, Thierfelder S and Lindhofer H (1997): Trioma-based vaccination against B-cell lymphoma confers long-lasting tumor immunity. *Cancer Res* 57: 2346-2349

Moolten F (1986): Tumor Chemosensitivity Conferred by Inserted Herpes Thymidine Kinase Genes: Paradigm for a Prospective Cancer Control Strategy. *Cancer Res* 46: 5276-5281

Moolten F, Wells J, Heyman R and Evans R (1990a): Lymphoma Regression Induced by Ganciclovir in Mice Bearing a Herpes Thymidine Kinase Transgene. *Hum Gene Ther* 1: 125-134

Moolten F and Wells JM (1990b): Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 82 (4): 297-300

Morecki S, Pugatsch T, Levi S, Moshel Y and Slavin S (1996): Tumor-cell vaccination induces tumor dormancy in a murine model of B-cell leukaemia/lymphoma (BCL1). *Int J Cancer* 65 (2): 204-208

Müller M, Gounari F, Prifti S, Hacker HJ, Schirmacher V and Khazaie K (1998): EblacZ tumor dormancy in bone marrow and lymph nodes: active control of proliferating tumor cells by CD8+ immune T cells. *Cancer Res* 58 (23): 5439-5446

Mullen C, Anderson L, Woods K, Nishino M and Petropoulos D (1998): Ganciclovir chemoablation of Herpes Thymidine Kinase suicide gene-modified tumors produces tumor necrosis and induces systemic immune responses. *Hum Gene Ther* 9: 2019-2030

Niranjan A, Moriuchi S, Lunsford LD, Kondziolka D, Flickinger JC, Fellows W, Rajendiran S, Tamura M, Cohen JB and Glorioso JC (2000): Effective treatment of experimental glioblastoma by HSV vector-mediated TNF alpha and HSV-tk gene transfer in combination with radiosurgery and ganciclovir administration. *Mol Ther* 2 (2): 114-120

Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T and Nishimura S (2000): The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl: S52-61

Nishisaka N, Maini A, Kinoshita Y, Yasumoto R, Kishimoto T, Jones RF et al. (1999): Immunotherapy for lung metastases of murine renal cell carcinoma: synergy

between radiation and cytokine-producing tumor vaccines. *J Immunother* 22: 308-314

Ostrand-Rosenberg S, Roby C, Clements VK and Cole GA (1991): Tumor-specific immunity can be enhanced by transfection of tumor cells with syngeneic MHC-class-II genes or allogeneic MHC-class-I-genes. *Int J Cancer Suppl* (6): 61-68

Pardoll D (1998): Cancer vaccines. *Nature Medicine Vaccine Supplement* 4 (5): 525-531

Pardoll D (2000): Therapeutic vaccination for cancer. *Clinical Immunology* 95 (1): S44-S62

Rainov NG (2000): A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 11 (17): 2389-2401

Rainov NG, Fels C, Droege JW, Schafer C, Kramm CM and Chou TC (2001): Temozolamide enhances herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of malignant glioma. *Cancer Gene Ther* 8 (9): 662-668

Ramesh R, Munshi A, Abboud CN, Marrogi AJ and Freeman SM (1996): Expression of costimulatory molecules: B7 and ICAM up-regulation after treatment with a suicide gene. *Cancer Gene Ther* 3 (6): 373-384

Ressing ME, van Driel WJ, Celis E, Sette A, Brandt MP, Hartman M, Anholts JD, Schreuder GM, ter Harmsel WB, Fleuren GJ, Trimbos BJ, Kast WM and Melief CJ (1996): Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res* 56: 582-588

Ridge JP, Di Rosa F and Matzinger P (1998): A conditional dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393: 474-478

Robe PA, Princen F, Martin D, Malgrange B, Stevenaert A, Moonen G, Gielen J, Merville M and Bours V (2000): Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetic acid, and cytosine arabinoside. *Biochem Pharmacol* 60 (2): 241-249

Rogers RP, Ge JQ, Holley-Guthrie E, Hoganson DK, Comstock KE, Olsen JC and Kenney S (1996): Killing Epstein-Barr virus-positive B lymphocytes by gene therapy: comparing the efficacy of cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase. *Hum Gene Ther* 7 (18): 2235-2245

Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P (1997): Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-1792

Sandmair AM, Turunen M, Tynnela K, Loimas S, Vainio P, Vanninen R, Vapalahti M, Bjerkvig R, Janne J and Yla-Herttuala S (2000a): Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions. *Cancer Gene Ther* 7 (3): 413-421

Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M, Hursikainen H, Tynnela K, Turunen M, Vanninen R, Lehtolainen P, Paljarvi L, Johansson R, Vapalahti, Yla-Herttuala S (2000b): Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther* 11 (16): 2197-2205

Santodonato L, Ferrantini M, Gabriele L, Proietti E, Venditti M, Musini P, Modesti A, Modica A, Lupton SD and Belardelli F (1996): Cure of mice with established Friend leukemia cell tumors by a combined therapy with tumor cells expressing both interferon- α 1 and herpes simplex thymidine kinase followed by ganciclovir. *Hum Gene Ther* 7: 1-10

Schmidt-Wolf GD and Schmidt-Wolf IGH (1995): Cytokines and gene therapy. *Immunol Today* 8 (4): 173-175

Schüler T, Qin Z, Ibe S, Noben-Trauth and Blankenstein T (1999): T Helper Cell Type 1-associated and cytotoxic T Lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin-4-deficient mice. *J Exp Med* 189 (5): 803-810

Selmayr M, Strehl J, Kremer JP, Kremmer E, Döneke A, Hallek M, Menzel H, Thielemans K, Thierfelder S and Mocikat R (1999): Induction of tumor immunity by autologous B lymphoma cells expressing a genetically engineered idiotype. *Gene Therapy* 6: 778-784

Simons JW, Jaffee EM, Weber CE, Levitsky HI, Nelson WG, Carducci MA et al. (1997): Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte macrophage-colony stimulating factor gene transfer. *Cancer Res* 57 (8): 1537-1546

Snyder D, Wu Y, Wang J et al. (1993): Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line. *Blood* 82: 200

Stripecke R, Skelton DC, Gruber T, Afar D, Pattengale PK, Witte ON et al. (1998): Immune response to Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia induced by expression of CD80, interleukin 2, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Hum Gene Ther* 9: 2049-2062

Syrengeles A and Levy R (1999): DNA vaccination against the idiotype of a murine B cell lymphoma: mechanism of tumor protection. *J Immunol* 162: 4790-4795

Tao MH and Levy R (1993): Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature* 362: 755-758

Tanaka T, Yamasaki H and Mesnil M (2001): Stimulation of intercellular communication of poor-communicating cells by gap-junction-competent cells enhances the HSV-TK/GCV bystander effect in vitro. *Int J Cancer* 91 (4): 538-542

Tomicic MT, Thust R, Sobol RW and Kaina B (2001): DNA Polymerase beta mediates protection of mammalian cells against Ganciclovir-induced cytotoxicity and DNA breakage. *Cancer Res* 61 (20): 7399-7403

Townsend SE and Allison JP (1993): Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259: 368-370

Unkeless JC (1979): Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med*. 150 (3): 580-596.

Uyttenhove C, Maryanski J and Boon T (1983): Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J Exp Med* 57 (3): 1040-1052

Van Pel A, van der Bruggen P, Coulie P, Brichard V, Lethe B, van den Eynde B, Uyttenhove C, Renauld JC, Boon T (1995): Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T-lymphocytes. *Immunol Rev* 145: 229-250

Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, van der Voort EI, van Hall T, van der Broek L, Fleuren GJ, Kenemans P, Kast WM, Melief CJ (1997): Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 186: 695-704

Verzeletti S, Bonini C, Markt S, Nobili N, Ciceri F, Traversari C and Bordignon C (1998): Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. *Hum Gene Ther* 9: 2243-2251

Vlachaki MT, Chhikara M, Aguilar L, Zhu X, Chiu KJ, Woo S, The BS, Thompson TC, Butler EB and Aguilar-Cordova E (2001): Enhanced therapeutic effect of multiple injections of HSV-TK + GCV gene therapy in combination with ionising radiation in a mouse mammary tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51 (4): 1008-1017

Wallich R, Bulbuc N, Hammerling GJ, Katzav, Segal S and Feldman M (1985): Abrogation of metastatic properties of tumor cells by de novo expression of H-2k antigens following H-2 gene transfection. *Nature* 315: 301-305

Warren TL and Weiner GJ (2000): Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development. *Curr Opin Hematol* 7: 168-173

Webb A, Cunningham D, Cotter F et al. (1997): BCL-2 antisense therapy in patients with Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 349: 1137-1141

Wills KN, Maneval DC, Harris MP et al. (1994): Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding human p53 for gene therapy of cancer. *Human Gene Therapy* 5: 1079-1088

Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M and Shimada T (1997): Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther* 4 (2): 91-96

Yang L, Hwang R, Chiang Y, Gordon EM, Anderson WF and Parekh D (1998): Mechanisms for ganciclovir resistance in gastrointestinal tumor cells transduced with a retroviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Clin Cancer Res* 4 (3): 731-741

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1998 bis September 2000 am Institut für Molekulare Immunologie des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF) in München (Großhadern) erstellt. Prof. Dr. med. Ralph Mocikat hatte die Fachvertretung für die Fakultät für Humanmedizin.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit

Graf N, Adam C and Mocikat R (2003): Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo. *Int J Cancer* 105 (2): 217-220

VII DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt und ermöglicht haben.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ralph Mocikat danken, der mir während der gesamten Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Sowohl seine exzellente fachliche Betreuung als auch „philosophische“ Gespräche über Wissenschaftstheorie und Sprache haben mein Verständnis für wissenschaftliche Fragestellungen sehr gefördert.

Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. rer. nat. Dolores Schendel, die die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF ermöglichte.

Ohne technische Assistenz und Hilfestellung bei den Tierexperimenten wäre diese Dissertation in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Hierfür bedanke ich mich sehr herzlich bei Hannelore Jennen, Julika Jasny, Ulrike Bamberger und Michael Hagemann.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen Dr. med. John Strehl, Dr. rer. nat. Ulrich Wahl, Dr. rer. nat. Konrad Kronenberger und Dr. rer. nat. Bernhard Frankenberger für ihre Hilfsbereitschaft und die lockere Arbeitsatmosphäre bedanken.

LEBENS LAUF**Persönliche Daten**

Name	Nicolas Alexander Graf
Geboren	1. Juni 1975 in Benediktbeuern
Anschrift	Merianstr. 30b, 80637 München
Familienstand	ledig

Schulbildung

1981-1985	Dom-Pedro-Grundschule, München
1985-1994	Willi-Graf-Gymnasium, München
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4)

Zivildienst

August 1994 – Oktober 1995	Pflegedienst, Krankenhaus München-Schwabing
----------------------------	---

Hochschulbildung

November 1995 – April 2003	Studiengang Humanmedizin an der LMU München
September 1997	Ärztliche Vorprüfung
September 1998	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2000 – Juni 2001	Studienaufenthalt an der University of Aberdeen, UK
September 2001	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Gesamtnote: „gut“ (1,66)

Praktisches Jahr

April – August 2002	Innere Medizin: Poliklinik, LMU München
August – November 2002	Chirurgie: Policlinico Sant'Orsola, Università di Bologna
November – März 2003	Radiologie: Klinikum Innenstadt, LMU München

Stipendien

November 1997	Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
August 2002	Erasmusstipendium für die Università di Bologna