

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Kombination von immunstimulatorischer DNA und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren  
in der Therapie eines murinen Kolonkarzinommodells**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Philip Schneider

aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Chr. J. Bruns  
Priv. Doz. Dr. med. M. Storr

Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:

Prof. Dr. med. G. Hartmann  
Dr. med. S. Rothenfuß

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2006

## **Meinen Eltern in Dankbarkeit**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	CpG-Oligonukleotide.....	1
1.1.1	CpG-Oligonukleotide als Gefahrensignal für das Immunsystem.....	1
1.1.2	Modulation des Immunsystems durch verschiedenartige CpG-Klassen .....	2
1.1.1	CpG-ODN wird von einem <i>Toll-like</i> -Rezeptor erkannt.....	3
1.2	Dendritische Zellen .....	4
1.2.1	Myeloide dendritische Zellen .....	4
1.2.2	Plasmazytoide dendritische Zellen .....	6
1.3	Therapie von kolorektalen Karzinomen .....	7
1.3.1	Bisher verwendete Therapieansätze .....	7
1.3.2	Einsatz von Cyclooxygenase-2-Inhibitoren.....	8
1.4	Fragestellung .....	12
1.4.1	Untersuchung der tumorinfiltrierenden Leukozyten .....	12
1.4.2	Untersuchung der Immunzellen <i>in vitro</i> .....	12
1.4.3	Therapie mit CpG-ODN und einem COX-2-Inhibitor im murinen Kolonkarzinommodell .....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1	Mäuse und Haltungsbedingungen.....	14
2.2	Kulturmedien und Tumorzelllinie.....	14
2.2.1	Kulturmedien .....	14
2.2.2	Tumorzelllinie und Gewinnung von Tumorüberstand.....	15
2.3	Tumormodell.....	15
2.4	Verwendete therapeutische Mittel.....	16
2.4.1	Oligonukleotide .....	16
2.4.2	Chemikalien.....	17
2.5	Leukozytengewinnung.....	18
2.5.1	Leukozytenaufbereitung aus Tumorgewebe.....	18
2.5.2	Leukozytenaufbereitung aus Milzgewebe.....	18
2.6	Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus Knochenmark.....	19

2.7	Messmethoden.....	21
2.7.1	Durchflusszytometrie.....	21
2.7.2	Quantitative Zytokinbestimmung aus Zellkulturüberständen .....	22
2.8	Statistische Analyse.....	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
3.1	Nachweis von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten im Tumorgewebe .....	25
3.2	Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf murine plasmazytoide dendritische Zellen.....	29
3.3	Wirkung von Tumorüberstand und Prostaglandin E <sub>2</sub> auf murine plasmazytoide dendritische Zellen.....	31
3.4	Wirkung von Tumorüberstand und Prostaglandin E <sub>2</sub> auf murine Leukozyten aus der Milz.....	34
3.4.1	Wirkung von Tumorüberstand auf die Produktion von Interferon- $\gamma$ und Interleukin-12p70 in murinen Leukozyten aus der Milz.....	34
3.4.2	Wirkung von Tumorüberstand auf die Produktion von Interleukin-10 in murinen Leukozyten aus der Milz.....	37
3.5	Wirkung von Prostaglandin E <sub>2</sub> auf murine Leukozyten aus der Milz.....	39
3.5.1	Wirkung von Prostaglandin E <sub>2</sub> auf die Produktion von Interferon- $\gamma$ und Interleukin-12p70 in murinen Leukozyten aus der Milz.....	39
3.5.2	Wirkung von Prostaglandin E <sub>2</sub> auf die Produktion von Interleukin-10 in murinen Leukozyten aus der Milz.....	42
3.6	Messung von Prostaglandin E <sub>2</sub> im Tumorüberstand.....	43
3.7	Wirkung von intraperitoneal verabreichtem Parecoxib in Kombination mit CpG-Oligonukleotiden in einem murinen Kolonkarzinom-Modell .....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1	Nachweis von dendritischen Zellen und T-Zellen im Tumorgewebe .....	48
4.1.1	Diskussion der angewandten Methoden: Tumorzellaufbereitung.....	48
4.1.2	Plasmazytoide dendritische Zellen liegen im Tumorgewebe vor und verlassen diesen nach lokaler Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden .....	48
4.1.3	T-Zellen wandern nach lokaler CpG-Applikation in das Tumorgewebe ein .....	51

4.2	Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf murine plasmazytoide dendritische Zellen.....	52
4.2.1	Diskussion der angewandten Methoden: Kultivierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen und muriner Interferon- $\alpha$ -ELISA .....	52
4.2.2	CpG-Typ A-ODN induziert große Mengen an Interferon- $\alpha$ in murinen plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	53
4.3	Tumorüberstand und Prostaglandin E <sub>2</sub> schwächen die Interferon- $\alpha$ -Produktion in murinen plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	54
4.4	Die Wirkung von Tumorüberstand und Prostaglandin E <sub>2</sub> auf murine Leukozyten aus der Milz .....	57
4.4.1	Tumorüberstand und Prostaglandin E <sub>2</sub> hemmen die CpG-induzierte Produktion von Interferon- $\gamma$ und Interleukin-12p70 in murinen Leukozyten aus der Milz .....	57
4.4.2	Tumorüberstand und Prostaglandin E <sub>2</sub> haben gleichgerichtete Effekte mit CpG 2216, jedoch entgegengesetzte Effekte mit CpG 1826 bezüglich der Interleukin-10-Produktion in murinen Leukozyten aus der Milz .....	59
4.5	Prostaglandin E <sub>2</sub> befindet sich in großen Mengen im Tumorüberstand .....	61
4.6	<i>In vivo</i> -Anwendung von Cyclooxygenase-2-Inhibitoren.....	62
5	Zusammenfassung .....	65
6	Literaturverzeichnis .....	68

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Veröffentlichungen

Danksagung

Lebenslauf





## 1 Einleitung

### 1.1 CpG-Oligonukleotide

#### 1.1.1 CpG-Oligonukleotide als Gefahrensignal für das Immunsystem

Die Proteinsynthese der Zellen basiert auf der Entschlüsselung des zellulären Genoms, kodiert in der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Lange Zeit wurde die DNA nur als ein solcher Informationsspeicher angesehen bis im Jahre 1984 Tokunaga entdeckte, dass ihr auch eine immunstimulierende Wirkung zukommt [Tokunaga, 1984]. Diesem Befund ging die Entdeckung von Coley im Jahre 1891 voraus, dass sich ein Sarkom nach einer bakteriellen Infektion im Bereich des Tumors zurückbildet [Coley, 1991]. Er generierte bakterielle Lysate aus Streptokokkus und Serratia und begann diese Lysate in die Nähe von Tumoren zu injizieren. Bei einem Teil der Patienten beobachtete er auch hier eine Rückbildung des Tumors. Erst ein knappes Jahrhundert später trennte Tokunaga die verschiedenen Fraktionen eines bakteriellen Lysates (BCG = Bacillus Calmette-Guerin) auf und stellte fest, dass bakterielle DNA für diese immunmodulierenden Effekte verantwortlich ist. 1992 wies Yamamoto Unterschiede bakterieller DNA zu der von Vertebraten nach, die die immunstimulatorische Aktivität nicht erbrachte [Yamamoto, 1992].

Arthur Krieg konnte 1995 die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA zurückführen auf ein zentrales Cytidin-Guanosin-Dinukleotid, das in einen bestimmten Basenkontext eingebettet ist (CpG-Motiv, p steht für eine Phosphat-Bindung) [Krieg, 1995]. Ein solches CpG-Motiv besteht mindestens aus einer Folge von 6 Basen (z. B. 5'...GACGTT...3'). Es war bereits bekannt, dass in vertebraler DNA die statistische Verteilung zwei aufeinanderfolgender Basen von 1 zu 16 für das Motif C-G nicht zutrifft, sondern diese Basenfolge nur mit einer Häufigkeit von 1 zu 60 zu finden ist. Hinzu kommt, dass bakterielle DNA am Cytidin nicht methyliert ist. Die DNA von Vertebraten hingegen ist am Cytidin meist methyliert. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass bakterielle DNA durch das Vorhandensein von unmethylierten CpG-Motiven vom vertebralen Immunsystem als ein Gefahrensignal erkannt werden kann. In den letzten Jahren ist es gelungen, synthetische Oligodeoxynukleotide (ODN) mit CpG-Motiven herzustellen, die die gleiche immunstimulatorische Wirkung wie bakterielle DNA ha-

ben. Die Hypothese, dass das CpG-Motif für die immunstimulatorische Wirkung verantwortlich ist, konnte nun auch mit nicht-verunreinigter DNA belegt werden.

Um synthetische Oligonukleotide in klinischen Studien einsetzen zu können, musste ein Weg gefunden werden, den raschen Abbau durch Nukleasen zu verhindern. Dies gelang über eine Phosphorothioat-Modifikation des DNA-Gerüsts. Ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe wurde durch ein Schwefelatom ersetzt. Dies verbesserte die Stabilität der Oligonukleotide und fügte ihnen darüber hinaus eine eigene immunstimulatorische Komponente hinzu [Krieg, 1996].

### 1.1.2 Modulation des Immunsystems durch verschiedenartige CpG-Klassen

Durch Modifikation der die CpG-Dinukleotide flankierenden Basen lassen sich CpG-ODN mit unterschiedlicher Wirkung erstellen. Bisher sind drei Typen von ODN bekannt, die sich hinsichtlich der Wirkung auf ihre Zielzellen unterscheiden.

1. CpG-Typ A-ODN ist charakterisiert durch poly-Guanosin-Enden und eine Palindromsequenz (spiegelbildliche Sequenz um ein zentrales CpG-Dinukleotid), die weitere CpG-Dinukleotide enthält. Es wird vermutet, dass durch gegenseitige Anlagerung der ODN über ihre poly-G-Enden und Palindromsequenzen partikuläre Strukturen entstehen [Hartmann, 2000; Kerkmann, 2005]. Dadurch werden sie von ihrer Zielzelle, der plasmazytoiden dendritischen Zelle (PDC), als virusartig erkannt. Dieses ODN zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, eine sehr hohe Interferon- $\alpha$ -Produktion in PDCs zu induzieren und somit eine Virusinfektion zu imitieren. Dem folgt eine Aktivierung und Interferon- $\gamma$ -Produktion (IFN- $\gamma$ ) von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und  $\gamma\delta$  T-Zellen. Im humanen System ist CpG-ODN 2216 am wirksamsten, im murinen System erwies sich CpG-ODN 1585 hinsichtlich der Aktivierung von NK-Zellen als wirksamer.
2. CpG-Typ B-ODN bewirkt eine Aktivierung und Ausreifung der PDCs, ist aber nicht befähigt, hohe Dosen an IFN- $\alpha$  zu induzieren. Die Zielzelle für CpG-Typ B-ODN ist die B-Zelle, die dadurch zur Proliferation und Sekretion hoher Mengen an Interleukin-10 (IL-10) und IL-6 angeregt wird. Ferner wird vermehrt IL-12 synthetisiert, wodurch eine bakterielle Infektion imitiert wird. Wie auch bei PDCs

werden auf B-Zellen Aktivierungsmarker wie CD80 und CD86 verstärkt exprimiert. Außerdem wird nach CpG-B-Zugabe ein verlängertes Überleben der B-Zellen in Kultur beobachtet. Besonders wirksam ist im Menschen das CpG-ODN 2006, in der Maus das CpG-ODN 1826 [Bauer, 2001].

3. CpG-Typ C-ODN zeichnen sich durch vereinigte Eigenschaften von CpG-Typ A- und Typ B-ODN aus [Hartmann, 2003b]. Sie besitzen ein ‚TCGTCG‘-Motiv am 5'-Ende und eine zentrale Palindrom-Sequenz wie CpG-Typ A-ODN. Dadurch werden sowohl B-Zellen aktiviert, als auch PDCs zur IFN- $\alpha$ -Produktion angeregt. Bislang fehlen Belege für die Wirksamkeit im murinen System.

### 1.1.1 CpG-ODN wird von einem *Toll-like-Rezeptor* erkannt

Das Immunsystem lässt sich in zwei Komponenten unterteilen. Das angeborene Immunsystem bietet eine unspezifische Abwehr gegenüber Fremdorganismen. Ihm untergliedert sind Abwehrzellen wie Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen sowie zellunabhängige Faktoren wie das Komplementsystem. Die angeborene Immunantwort erfolgt bei Kontakt mit Fremdanigen sehr schnell und veranlasst die beteiligten Zellen, Antigen zu phagozytieren, Entzündungsmediatoren auszuschütten und das Antigen zu präsentieren. Die beiden letzten Mechanismen dienen dazu, das erworbene Immunsystem bei seiner antigenspezifischen Immunantwort zu unterstützen.

Erworbene Immunität ist die zweite Komponente des humanen Immunsystems. Ihm sind hauptsächlich B- und T-Lymphozyten untergliedert. Durch somatische Rekombination und zufällige Mutationen exprimiert jede dieser Zellen einen strukturell einzigartigen Rezeptor, der spezifisch für die Erkennung seines Antigens ist. Die Vielfalt dieser antigenerkennenden Rezeptoren im menschlichen Körper ist so groß, dass für nahezu jedes Antigen ein erkennender Lymphozyt existiert. Bei Kontakt mit „seinem“ Antigen beginnt der Lymphozyt zu proliferieren und führt daraufhin seine spezifische Effektorfunktion aus. Es entsteht eine Vielzahl von Klonen, die das Antigen spezifisch erkennen und bekämpfen können. Da die Entwicklung dieser Immunantwort jedoch bis zu fünf Tage dauern kann, ist das Einspringen des angeborenen Immunsystems während dieser Periode unerlässlich.

Das entwicklungsgeschichtlich wesentlich ältere angeborene Immunsystem bedient sich bei der Erkennung von Pathogenen sogenannter *pattern recognition receptors* (PRR). Diese sind keimbahnkodierte Rezeptoren, die den Vorteil haben, dass sie genetisch an die nachfolgende Generation weitergegeben werden. PRR erkennen pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)), die im Wirtsorganismus nicht vorkommen. Eine Klasse dieser PRR sind *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs). Dem Toll-Protein wurde ursprünglich eine Rolle in der Abwehr von Infektionen in der *Drosophila-Fliege* zugeschrieben. Bei Analysen des menschlichen Genoms wurde ein homologer Rezeptor gefunden, der mit TLR1 bezeichnet wurde. Bald darauf wurden weitere TLRs gefunden wie der TLR2, der Rezeptor für Peptidoglykan, TLR4, der Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS) und der TLR9, der Rezeptor für bakterielle DNA und CpG-ODN. Gabe von CpG-ODN löste in TLR9-defizienten Mäusen keine inflammatorische Reaktion aus. Ebenso blieb bei einer toxischen Dosis von CpG-ODN bei diesen Mäusen ein Effekt aus.

Im humanen System ist TLR9 bisher nur auf PDCs und B-Zellen nachgewiesen worden. Im murinen System befindet sich TLR9 jedoch zusätzlich auch auf Monozyten und Makrophagen. Die Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Zellen in beiden Systemen müssen berücksichtigt werden bei der Evaluierung der Übertragbarkeit vom murinen auf das humane System.

## 1.2 Dendritische Zellen

### 1.2.1 Myeloide dendritische Zellen

Myeloide dendritische Zellen (MDC) sind aus Knochenmark stammende Leukozyten, die darauf spezialisiert sind, Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und den T-Zellen zu präsentieren. Im unreifen Stadium fungieren sie im peripheren Gewebe als Wächter des Immunsystems, indem sie ständig Antigen aus der Umgebung aufnehmen. Kontakt mit mikrobiellen Produkten oder Gewebeschaden veranlasst sie zur Migration in den drainierenden Lymphknoten. Auf der Oberfläche der DCs (dendritischen Zellen) werden die antigenen Produkte nach Prozessierung in Peptide auf *major histocompatibility complex* (MHC) Molekülen präsentiert. Durch gleichzeitige Hochregulierung von kostimulatori-

schen Molekülen wird eine effektive Interaktion mit T-Zellen ermöglicht. Die nun reifen DCs sind befähigt, im Lymphknoten eine Immunantwort durch T-Zellen zu induzieren, die das Oberflächenantigen spezifisch erkennen.

Jedoch sind DCs auch befähigt, Immuntoleranz zu induzieren. Hierbei muss zentrale von peripherer Toleranz unterschieden werden. DCs im Thymus überprüfen dort gebildete T-Zellen auf ihre Spezifität zur Antigenerkennung und leiten bei T-Zellen, die potenziell körpereigenes Antigen erkennen, die Apoptose ein. DCs des Thymus unterscheiden sich von DCs der Peripherie. Sie werden aus Vorläuferzellen des Thymus gebildet und reifen und sterben im Thymus. Außerdem ist ihre Fähigkeit zur Migration eingeschränkt, da ihre Aufgabe weniger die Suche und Aufnahme von Fremdanitgenen ist, sondern die Präsentation von Eigenantigenen. Doch auch DCs der Peripherie müssen befähigt sein, Toleranz zu induzieren, da jede Aufnahme von Fremdanitgenen gleichzeitig mit der Aufnahme großer Mengen an Eigenantigenen einhergeht. Ob eine DC Toleranz oder Immunität induziert, hängt von ihrem Aktivierungsgrad ab [Steinman, 2003]. Vollständig aktivierte DCs beenden die Antigenaufnahme und spezialisieren sich auf die Präsentation des Antigenes. Deshalb exprimieren sie hohe Mengen an MHC-II und kostimulatorischen Molekülen, auf denen die Peptide gebunden sind. Toleranzinduzierende DCs sind ebenfalls reife, aber inaktive DCs (*quiescent DC*). Sie sind fähig, Antigen aufzunehmen und exprimieren nur geringe Mengen an MHC-II.

Antigenpräsentierende Zellen (APC) präsentieren gewöhnlich exogenes antigenes Peptid auf MHC-II Molekülen, wohingegen endogenes Antigen (Eigenkomponenten oder Virusmaterial) auf MHC-I Molekülen präsentiert wird. Über einen bisher unbekannt Mechanismus können DCs diese Eigenschaften teilweise umgehen. Durch Kreuz-Präsentation kann somit exogenes Antigen auf MHC-I Molekülen präsentiert werden [Kurts, 2001; Belz, 2002]. Damit kann beispielsweise eine antivirale, zytotoxische T-Zell-Antwort induziert werden, ohne dass die APC selbst vom Virus infiziert ist. Außerdem kann Toleranz hergestellt werden über fremdes Antigen, das auf MHC-II Molekülen präsentiert wird. Wahrscheinlich sind Fehlfunktionen im zuletzt genannten Mechanismus für die Entstehung von Allergien verantwortlich.

Gefahrensignale (*danger signals*) bezeichnen die immunstimulierenden Signale, die ausgehen von Gewebeschaden und mikrobiellen Stimuli wie CpG-ODN, doppelsträn-

gige virale Ribonukleinsäure (RNA), LPS oder Hitze-Schock-Proteine. DCs können eine Vielzahl dieser Signale mittels PRR erkennen. Außerdem sind sie in der Lage, zwischen Gewebeschaden, der durch den normalen Prozess der Apoptose ausgelöst worden ist, und Nekrose zu unterscheiden. In beiden Fällen wird Antigen der toten Zellen aufgenommen und prozessiert, aber nur Antigen aus nekrotischem Material aktiviert die DCs. Durch oben beschriebene Funktionen bilden DCs eine Schnittstelle zwischen angeborenem Immunsystem (Antigenerkennung mittels genetisch konservierter PRR) und erworbenem Immunsystem (Präsentation von MHC-II-gebundenem Antigen und Erkennung durch T-Zell-Rezeptoren).

Abhängig von der Art des Antigens können DCs eine T-Helfer-Zell 1 ( $T_H1$ ) oder eine  $T_H2$ -Antwort induzieren. Durch verschiedene Zytokine wie IL-12p70 oder IL-4 können CD4 T-Zellen zur Produktion weiterer Zytokine veranlasst werden.  $T_H1$ -Zellen produzieren große Mengen an IFN- $\gamma$  und unterstützen eine Makrophagen-vermittelte Immunantwort, während  $T_H2$  Zellen charakteristischerweise IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren und die Funktion von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen unterstützen.

### 1.2.2 Plasmazytoide dendritische Zellen

PDCs sind charakterisiert durch Produktion großer Mengen an Typ I-Interferon (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ). Typ I-Interferone sind bekannt für ihre immunmodulatorischen, antitumoralen und zellwachstumshemmenden Eigenschaften. Somit sind PDCs wichtige Mitspieler in der Abwehr von Virusinfektionen und anderer Pathogene. Nach Antigenaufnahme migrieren PDCs in den drainierenden Lymphknoten und sezernieren IFN- $\alpha$ . Dadurch werden unreife T-Zellen dazu veranlasst, vermehrt IL-12-Rezeptoren zu exprimieren. Dies bewirkt eine Sensitivierung für IL-12, das von MDCs und PDCs gebildet wird [Hochrein, 2001; Krug, 2001; Dalod, 2002]. Die Fähigkeit von PDCs zur Stimulation allogener T-Zellen ist geringer als bei MDCs [Boonstra, 2003], sie können aber durch Aktivierung mit CpG-ODN, CD40-Ligand und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) ihr T-Zell-stimulierendes Potential entfalten [Brawand, 2002]. Auf diesen Reiz hin können sie eine  $T_H2$ -Immunantwort induzieren [Ebner, 2002].

## 1.3 Therapie von kolorektalen Karzinomen

### 1.3.1 Bisher verwendete Therapieansätze

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten malignen Krebserkrankungen in Deutschland und ist die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland. In den meisten Fällen erfolgt die Diagnose erst sehr spät. Primäres Ziel der Therapie bei kolorektalen Karzinomen ist die möglichst vollständige, operative Entfernung. Abhängig vom Tumorstadium und der operativen Technik entwickeln sich aber in 10 bis 30 % der Fälle lokoregionale Tumorrezidive. In den meisten Fällen ist postoperativ eine Chemotherapie indiziert. Der Wirkstoff 5-Fluorouracil (5-FU) - als Monotherapeutikum oder später in Kombination mit Folinsäure (5-FU/FA) - bildete über 30 Jahre lang den Standard in der Darmkrebstherapie. Erst in den letzten Jahren wurden neue Therapiemöglichkeiten mit einer Reihe neuer, hochwirksamer Substanzen geschaffen. So werden jetzt die Wirkstoffe Oxaliplatin und Capecitabine in der Darmkrebsbehandlung eingesetzt. Gute Erfolge werden auch mit Irinotecan erreicht. In Kombination mit 5-FU eingesetzt, werden mit den neuen Medikamenten deutlich gesteigerte Ansprech- und Tumorrückbildungsraten beobachtet [Cunningham, 2001]. Außerdem verlängerten sich die Überlebensraten auch in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien bei verbesserter Lebensqualität. Doch trotz der Fortschritte, die im Bereich der Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms gemacht worden sind, ist eine kurative Therapie von bereits metastasierten Tumoren (UICC Stadium IV) nicht möglich. Die 5-Jahresüberlebensrate bei Kolonkarzinomen liegt für dieses Stadium nur bei 5 %, für die Stadien I bis III zwischen 80 und 45 %.

Allerdings wurden auch Fälle von spontaner Tumorregression beschrieben. Das Immunsystem ist also maßgeblich an der Tumorabwehr beteiligt, wird aber oft von diesem in eine Anergie versetzt. Neue Immuntherapiemodelle sind zur Zeit in klinischer Erprobung. Ein Beispiel ist Bevacizumab [Salesi, 2005]. Der monoklonale Antikörper, der sich gegen den von Tumoren gebildeten vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) richtet, hemmt die Angiogenese und damit das Tumorwachstum sowie eine Metastasierung. In Kombination mit intravenös appliziertem 5-Fluorouracil/Folinsäure oder 5-FU/FS/Irinotecan hat es sich als hochwirksames Medikament zur Erstbehandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms erwiesen. Hierdurch kann die Überle-

benszeit um durchschnittlich fünf Monate verlängert werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Blockade der über den EGF-Rezeptor vermittelten Wachstumssignale. Dies ist durch Bindung eines spezifischen Antikörpers wie Cetuximab, der an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors bindet, möglich [Cunningham, 2004]. Ebenfalls als wirksam erwies sich Gefitinib, das die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne selektiv inhibiert [Ogino, 2005].

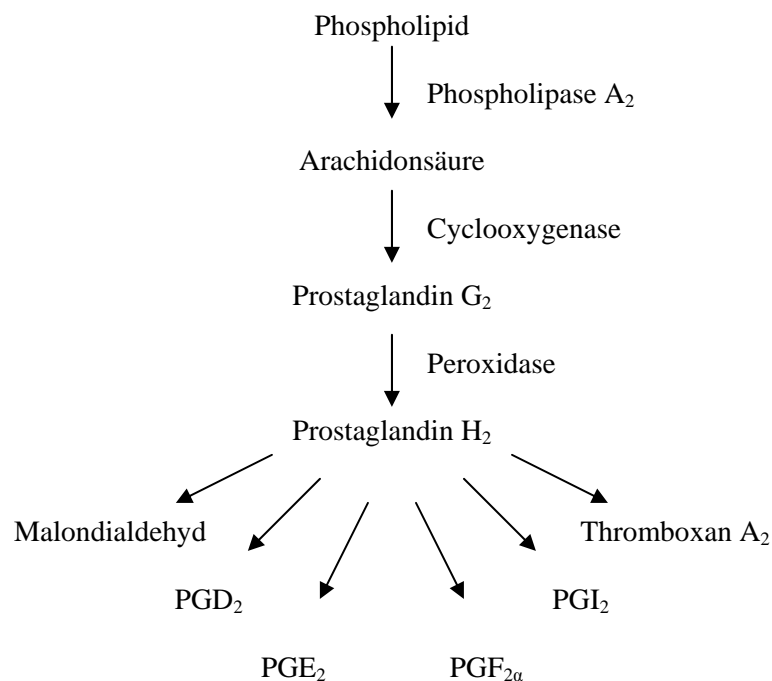
Ein weiterer Ansatz ist die aktive spezifische Immunisierung mit autologen Tumorzellen. Hierbei wird angenommen, dass in gesundem Gewebe bestimmte Antigene nicht oder, im Vergleich zum Tumorgewebe, weniger stark exprimiert werden. Bei dieser Therapie wird versucht, die Immunantwort gegen tumorassoziiertes Antigen mit Adjuvantien wie BCG zu stimulieren. Es wurde aus einer randomisierten Studie berichtet, dass mit einer autologen Tumorzellvakzine postoperativ eine signifikante klinische Verbesserung für Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II erzielt werden konnte [Hanna, 2001]. Dagegen zeigten Untersuchungen von Harris et al. an 412 Patienten mit Kolonkarzinom (297 in Stadium II, 115 in Stadium III), dass Injektionen mit autologen Tumorzellen in Kombination mit BCG, beginnend in der vierten Woche nach Tumorresektion und dreimal wöchentlich injiziert, keine signifikante Verbesserung der 5-Jahresüberlebensrate mit sich brachten [Harris, 2000]. In diesen Untersuchungen konnte nur ein längeres tumorfreies Intervall nach der Tumorresektion nachgewiesen werden.

### **1.3.2 Einsatz von Cyclooxygenase-2-Inhibitoren**

Ursprünglich wurden nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen in der Rheumatologie eingesetzt. NSAR wirken durch Hemmung einer Cyclooxygenase, von der bis in die frühen 90er Jahre nur eine Isoform bekannt war. Allerdings ließ sich damals nicht erklären, warum manche dieser Medikamente stärkere Nebenwirkungen mit sich brachten als andere. Erst nach der Entdeckung eines zweiten Isoenzym, das somit Cyclooxygenase-2 (COX-2) genannt wurde, konnten die unterschiedlichen Auswirkungen erklärt werden. Die COX-1 bewirkt die physiologische Synthese von Prostaglandinen (PGs) vor allem in Magen, Niere und Thrombozyten und wird konstitutiv exprimiert (Abb. 1). Daher greifen Medikamente, die dieses Enzym inhibieren, in die Schleimproduktion des Magens und in die Gerin-



nung ein. Die physiologische Expression von COX-2 ist nur auf wenige Gewebe wie Magen-Darm-Trakt, Gehirn, Rückenmark, Niere und Thrombozyten beschränkt. Infolge von Entzündungsreizen, Schmerzreaktionen oder anderen Gewebeschädigungen kann die Expression von COX-2 innerhalb von wenigen Stunden bis auf das Hundertfache ansteigen und produziert Prostaglandine im Rahmen von Entzündungsreaktionen [Fu, 1990; Gierse, 1996]. Verantwortlich für diesen Anstieg sind unter anderem proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8. Mit der Produktion neuer Inhibitoren, die spezifisch die COX-2 hemmen, ist es möglich, die inflammatorisch hervorgerufene Prostaglandinproduktion zu unterbinden und die physiologische Prostaglandinproduktion in Magen und Thrombozyten unbeeinflusst zu lassen.



**Abb. 1: Biosynthese von Prostaglandinen.** Arachidonsäure wird aus Phospholipiden durch die Phospholipase A<sub>2</sub> abgespalten. COX-1 und COX-2 haben eine Cyclooxygenase- und Peroxidase-Aktivität. Über zwei Reaktionsschritte wird PGH<sub>2</sub> gebildet, das durch spezifische Isomerasen in zahlreiche Eikosanoide umgewandelt werden kann. Als eines der Wichtigsten gilt das Prostaglandin E<sub>2</sub> (nach Howe et al [Howe, 2001]).

Bereits in vielen Studien konnte der Effekt von NSAR in der Tumorprävention und -entstehung demonstriert werden. Ursächlich hierfür ist vor allem eine Überexpression von COX-2 im Tumorgewebe - bei kolorektalen Karzinomen sogar in über 80 % der Fälle [Eberhart, 1994; Sano, 1995]. So zeigten zahlreiche epidemiologische Studien, dass regelmäßige Einnahme von NSAR die Mortalitätsrate von Kolonkarzinomen senkte [Thun, 1991; Giovannucci, 1994]. Weitere Studien belegten, dass NSAR effektiv die Rückbildung bereits bestehender Polypen bei der Familiären Adenomatösen Polyposis Coli (FAP) induzieren [Giardiello, 1993]. Auch die Spiegel von PGE<sub>2</sub> in karzinomatösem Kolongewebe sind signifikant erhöht im Vergleich zu normalem Darmgewebe [Bennett, 1977; Rigas, 1993]. Häufig korrelieren erhöhte COX-2-Expression und erhöhte PGE<sub>2</sub>-Spiegel im Gewebe mit Tumorgröße, erhöhter p53-Expression, verstärkter Invasivität, erhöhtem metastatischem Potential der Tumorzellen sowie mit einer schlechteren klinischen Prognose [Fujita, 1998; Chen, 2001a]. Die COX-2-spezifischen Effekte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Es wird angenommen, dass es Tumoren unter anderem durch die Produktion von PGE<sub>2</sub> ermöglicht wird, sich suffizient vor dem Immunsystem zu schützen, da PGE<sub>2</sub> eine immunsupprimierende Wirkung vor allem auf APCs aufweist. Es wurde gezeigt, dass eine physiologische PGE<sub>2</sub>-Konzentration ausreicht, damit Darmpolypen mit einem Durchmesser bis zu 1 mm heranwachsen können. Für Polypen mit einem Durchmesser von mehr als 1 mm sind allerdings erhöhte PGE<sub>2</sub>-Werte und damit eine Überexpression von COX-2 notwendig [Takeda, 2003]. Manche Effekte wie Zellproliferation, verminderte Apoptosefähigkeit, Stimulierung der Angiogenese, größeres invasives Zellwachstum und vermehrte Produktion von Mutagenen sind hingegen der direkten Wirkung der COX-2 zuzuschreiben. Zellen müssen sich an eine COX-2-Überexpression adaptieren, da eine erhöhte Konzentration von COX-2 den Zellzyklus stoppt [Trifan, 1999]. Vermutlich können sich Zellen durch eine genetische Veränderung (p53-Mutation, HER-2/neu-Expression) an diese Anforderungen anpassen. Somit unterliegen sie den mutagenen Eigenschaften der COX-2. COX-2-Inhibitoren allein bewirken keine Tumorheilung, können aber die Wirkungen antitumoral wirksamer Substanzen wie Zytostatika, CpG-ODN usw. verstärken.

**Tabelle 1: Direkte und indirekte durch COX-2 vermittelte Effekte**

<b>System</b>	<b>Wirkung</b>
Zellproliferation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durch PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2</sub> proliferativer Effekt auf Endo- und Epithelzellen</li> <li>- Indirekte Wirkung durch die Steigerung der Transkription von Aromatasen → Östrogen als anaboles Hormon wird vermehrt gebildet</li> </ul>
Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verminderung der Apoptose</li> <li>- Senkung der Konzentration von Arachidonsäure als Apoptoseinduktor</li> <li>- Verzögerung des Zellzyklus</li> </ul>
Angiogenese	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Steigerung der Produktion von VEGF, bFGF, TGF-1, PDGF, Endothelin-1 → <i>proangiogenic factors</i></li> <li>- Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) vermittelt die Wanderung von mikrovaskulären, endothelialen Zellen</li> </ul>
Invasivität	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zusammenhang zwischen Invasivität bzw. Anzahl der Metastasen und der Prostaglandinproduktion/COX-2-Expression (bei benignen Tumoren kein COX-2 nachweisbar)</li> <li>- Steigerung von Enzymen, die die Basalmembran zersetzen können</li> </ul>
Immunsystem (durch PGE <sub>2</sub> vermittelt)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antiproliferativer Effekt auf B- und T-Zellen</li> <li>- Hemmung der Synthese von z. B. IL-12, TNF-α ; Steigerung von IL-10</li> <li>- Verringerung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen</li> <li>- Hemmung der Antigenprozessierung von DCs, Toleranzentstehung</li> </ul>
Mutagenität	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durch PGE<sub>2</sub> Hemmung der zellulären Differenzierung (PGE<sub>2</sub> kann direkt im Kern die Gentranskription modulieren)</li> <li>- Malondialdehyd (MDA) als Substrat des PGH<sub>2</sub> ist ein potentes Mutagen</li> </ul>

## 1.4 Fragestellung

### 1.4.1 Untersuchung der tumorinfiltrierenden Leukozyten

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst untersucht werden, ob PDCs und MDCs in das Tumorgewebe einwandern, und ob sich die Gabe von CpG-ODN in die lokale Umgebung des Tumors auf die Anzahl der DCs auswirkt. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die peritumorale Gabe von CpG-ODN eine wirkungsvolle Immunantwort auszulösen vermochte [Heckelsmiller, 2002b]. Eine Depletion von CD8 T-Zellen konnte den gegen den Tumor gerichteten Effekt rückgängig machen. Daher kann von einer Beteiligung von zytotoxischen T-Zellen an der Immunantwort ausgegangen werden. Da ferner anzunehmen ist, dass die T-Zellen nach Stimulation mit Antigen von DCs *geprimed* werden, soll außerdem die Anzahl von CD4 und CD8 T-Zellen im Tumor vor und nach peritumorale Applikation von CpG-ODN untersucht werden.

### 1.4.2 Untersuchung der Immunzellen *in vitro*

Zunächst wird die Wirkung der verwendeten CpG-Oligonukleotide auf murine PDCs im Hinblick auf die IFN- $\alpha$ -Produktion untersucht. Die in den Tumor eingewanderten PDCs können ohne zusätzliche Stimulation mit CpG-ODN keine ausreichende Immunantwort induzieren. Eine Erklärung hierfür sind vom Tumor sezernierte Mediatoren, die hemmend auf Immunzellen wirken. Um diesen humoralen Einfluss zu simulieren, wurden die Effekte von Tumorüberstand auf murine PDCs und Leukozyten aus der Milz hinsichtlich der Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-12p70 und IL-10 untersucht. Unter der Annahme, dass PGE<sub>2</sub> der wichtigste immunsupprimierende Mediator im Tumorüberstand ist, wird anschließend die Zugabe von PGE<sub>2</sub> zu den Immunzellen mit der Wirkung des Tumorüberstands verglichen. Ein weiteres Ziel ist es, die immunsuppressiven Eigenschaften des Tumorüberstands durch Kultivierung der Tumorzellen mit einem COX-2-spezifischen Inhibitor zu vermindern, der die Produktion von PGE<sub>2</sub> wirksam zu inhibieren vermag.

### **1.4.3 Therapie mit CpG-ODN und einem COX-2-Inhibitor im murinen Kolonkarzinommodell**

Nach den Ergebnissen *in vitro* wird im Folgenden in einem murinen Tumormodell die peritumorale Gabe von CpG-Oligonukleotiden mit einem COX-2-Inhibitor kombiniert, um die antitumoralen Eigenschaften des CpG-ODN weiter zu verbessern. Hiermit werden die vorher *in vitro* gemachten Erkenntnisse, dass COX-2-Inhibitoren die Produktion von immunsuppressivem PGE<sub>2</sub> inhibieren können, im murinen System umgesetzt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mäuse und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden weibliche Balb/c Mäuse, eine weit verbreitete Inzuchtlinie, die eine ausgeprägte T<sub>H</sub>2-Antwort zeigt, verwendet. Im Alter von 6 bis 8 Wochen wurden die Tiere von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, D) bezogen und frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung für die Versuche herangezogen. Die Haltung erfolgte in einem geschlossenen, den Hygieneanforderungen entsprechenden Tierstall im Universitätsklinikum. Die Betreuung sowie Fütterung mit Pelletfutter und Wasser *ad libitum* erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. In der Regel wurden maximal 6 Mäuse pro Käfig gehalten. Der zwölfstündige hell/dunkel Rhythmus war mittels einer Zeitschaltuhr geregelt und, soweit möglich, wurden Versuche nur tagsüber durchgeführt. Die durchschnittliche Lebenserwartung von weiblichen Balb/c Mäusen beträgt bei konventionellen Bedingungen 575 Tage [Storer, 1966] und unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen 816±32 Tage [Festing, 1971]. Die Mäuse erreichten dieses Alter aber nicht, da sie nach Versuchsablauf getötet wurden. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 2.2 Kulturmedien und Tumorzelllinie

#### 2.2.1 Kulturmedien

Für die Kultivierung der Tumorzelllinie wurde *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM High Glucose) von PAA (Pasching, AT) verwendet. Für die Generierung von PDCs wurde RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, D) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) von Biochrom verwendet. Beide Komponenten eigneten sich am besten für die Generierung von PDCs, da die Menge an Endotoxin unter der Detektionsgrenze liegt. Für alle anderen Kulturen wurde RPMI 1640 von PAA und FCS von GibcoBRL (Paisley, GB) verwendet. Jedem Kulturmedium wurden 1,5 mM L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt. Zur Vermeidung unspezifischer Stimulation der Zellen wurden ausschließlich endotoxinarme Medien und Substanzen eingesetzt. Um Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde das verwendete FCS bei 56 °C

für 30 min hitzebehandelt. Für die Injektion von Tumorzellen in Mäuse wurde serumfreies Hank's Medium (HBSS (*Hank's balanced salts solution*), GibcoBRL) verwendet.

### 2.2.2 Tumorzelllinie und Gewinnung von Tumorüberstand

Die verwendete Zelllinie C-26, eine murine Kolonkarzinomzelllinie, die ursprünglich aus einer mit N-nitroso-N-methylurethan behandelten Balb/c Maus gewonnen wurde, wurde von Cell Lines Service (Heidelberg, D) bezogen. Die Zelllinie war während der gesamten Versuchsdauer mykoplasmenfrei. Die Zellen wurden bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % in einem Heraeus Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) kultiviert. Zur Gewinnung des Tumorüberstands wurden  $2 \cdot 10^5$ /ml Zellen mit oder ohne einen Cyclooxygenase-Hemmer für 48 Stunden kultiviert. Dazu wurde der selektive COX-2-Hemmer NS-398 (Cayman Chemicals, MI, USA) in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Anschließend wurde der zellfreie Überstand entnommen und für weitere Versuche bei -20 °C aufgehoben.

### 2.3 Tumormodell

Zur Induktion von subkutanen Tumoren wurden noch nicht konfluent wachsende Tumorzellen jeweils zweimal in der Kulturflasche mit Hank's Medium gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die verbliebenen adhärennten Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, Newton, NC, USA) abgeschabt und bei 400 g für 8 min in Hank's Medium abzentrifugiert (Multifuge 3 L-R, Heraeus, Hanau, D). Die Zellen wurden zwei Mal mit FCS-freiem Hank's Medium gewaschen, um Substanzen mit immunstimulierender Wirkung, die sich in FCS-haltigem Medium befinden, zu entfernen. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt und mit Hank's Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml lebenden Zellen eingestellt. Durch Trypanblaufärbung konnte gezeigt werden, dass nach Ablösen der Zellen mehr als 90 % der Zellen vital blieben. Um eine Verletzung der Tiere durch Bewegungen zu vermeiden, wurden die Mäuse kurzzeitig mit Isofluran betäubt. Während der Narkose wurden die Tumoren durch Injektion von  $2 \times 10^5$  teilungsfähigen Tumorzellen, gelöst in 200 µl serumfreiem Hank's Medium, induziert. Bereits wenige Sekunden nach der Injektion erwachten die Mäuse, so dass eine Antagonisierung der Narkose nicht erforderlich war.

Die Tumorgröße (Länge der Tumoren in mm x Breite in mm) wurde drei Mal wöchentlich mit einer Schubleere gemessen. Bei den induzierten Tumoren war die Tiefenmessung durch die Größenentwicklung im Laufe der Therapie oft nicht durchführbar oder hätte zu einer starken Belastung der Versuchstiere geführt. Daher wurde auf die Tiefenmessung und damit auf die Möglichkeit einer Volumenfeststellung verzichtet. Als Abbruchkriterien für einen Versuch galten starke Gewichtsabnahme der Mäuse um 20 % des Körpergewichts innerhalb zweier aufeinanderfolgender Messungen, starke Verhaltensauffälligkeiten, sowie das Überschreiten der Tumorgröße von 400 mm<sup>2</sup>.

### 2.4 Verwendete therapeutische Mittel

#### 2.4.1 Oligonukleotide

Alle CpG-Oligonukleotide wurden von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Für *in vivo* Applikation in Mäusen wurde das Oligodeoxynukleotid CpG 1826 5' TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT 3' verwendet.

Für *in vitro* Studien wurden folgende in Tabelle 2 aufgelisteten CpG-ODN verwendet:

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten CpG-ODN.** Große Buchstaben stellen Phosphorothioatbindungen dar, kleine Buchstaben stehen für Phosphodiesterbindungen am 3' Ende.

<i>Oligodeoxynukleotide</i>	<i>Motive</i>
CpG-ODN 1826	5' TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT 3'
CpG-ODN 2216	5' GGg gga cga tcg tcG GGG Gg 3'
CpG-ODN 2006	5' TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT 3'
CpG-ODN M354	5' TCG TCG TTT TGT CGT TCG AAC GAC GTT GAT 3'
CpG-ODN M362	5' TCG TCG TCG TTC GAA CGA CGT TGA T 3'



Dabei handelt es sich bis auf CpG 2216 in allen Fällen um Oligonukleotide, die durch Phosphorothioat-Bindungen stabilisiert wurden. Bei CpG 2216 handelt es sich um ein Chimär, das nur am Ende Phosphorothioatgruppen besitzt. Die verwendeten ODN-Lösungen waren endotoxinfrei. Für die Erstellung einer 15-20 mg/ml Stocklösung wurden die ODN in TE-Puffer (Tris-Hydrochlorid-Ethylendiamintetraacetat-Puffer) gelöst und die genaue Konzentration an CpG-ODN mit Hilfe eines Photometers (Pharmingen Gene Quant, Pharmingen, Heidelberg, D) ermittelt. Für die Anfertigung der Arbeitslösungen wurde die Stocklösung auf 1 mg/ml mit *phosphate-buffered saline* (PBS, PAA) verdünnt. Die Lagerung der Stammlösungen und aliquotierten Arbeitslösungen erfolgte bei -20 °C. Wenn nicht anders angegeben, wurde den Tieren je 100 µl der Arbeitslösung (=100 µg CpG-ODN/Maus) subkutan injiziert. Bei Anwendung *in vitro* wurden die ODN in einer Konzentration von 6 µg/ml eingesetzt.

### 2.4.2 Chemikalien

Um eine 1 mM Stammlösung von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich, Steinheim, D) zu erhalten, wurde 1 mg in 2,84 ml Ethanol aufgenommen. Bei Anwendung in Kultur reichte die Konzentration von 50 nM bis 10 µM. Um spezifisch die Cyclooxygenase-2 zu hemmen, wurde für *in vitro* Studien der stark lipophile COX-2-Inhibitor NS-398 verwendet. Es wurde eine Stammlösung angefertigt, indem 1 mg in 3180 µl DMSO (Dimethyl-Sulfoxid, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) gelöst wurden. Dies entsprach einer 1 mM Lösung. In Kultur wurde NS-398 mit 10 µM eingesetzt. Um zu verhindern, dass den Mäusen toxisch wirkendes DMSO injiziert wird, wurde für *in vivo* Studien ein wasserlöslicher COX-2-Inhibitor verwendet. Dynastat 40 mg (Wirkstoff Parecoxib) wurde freundlicherweise von Pharmacia (Erlangen, D) zur Verfügung gestellt. Das inaktive *Prodrug* Parecoxib-Natrium wurde intraperitoneal injiziert. Nach Umwandlung in den aktiven Wirkstoff Valdecoxib in der Leber gelangt es in den systemischen Kreislauf. Eingesetzt wurde Dynastat in einer Konzentration von 1 mg/ml. Eine Maus erhielt 100 µl (entspricht 100 µg Parecoxib-Na) täglich ab dem Zeitpunkt der Tumorinduktion.

### 2.5 Leukozytengewinnung

#### 2.5.1 Leukozytenaufbereitung aus Tumorgewebe

15 Tage nach Tumorinduktion wurde eine 6 bis 8 Wochen alte Maus mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Exartikulation getötet. Nach Fixation der Maus und Desinfektion des tumornahen Gebietes wurde der Tumor entnommen und in ein Gefäß mit Kulturmedium auf Eis gegeben. Nach wiederholtem Waschen in serumfreiem Hank's Medium wurde das Tumorgewebe in einer Schale mit 4 ml Medium zerkleinert. Anschließend wurde das Tumormaterial in ein verschließbares Gefäß gegeben und mit 1 ml Kollagenase A (Roche, Mannheim, D) vermischt. Für diese Arbeitsschritte wurde serumfreies Medium verwendet, um eine Inaktivierung der Enzyme durch FCS zu vermeiden. In einem Brutschrank inkubierte das Gemisch für 40-50 Minuten auf einer automatischen Wippe (Desaga DE24, Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht, D). Nach Ablauf der Zeit wurde das Tumormaterial in ein 70 µm Zellsieb (Falcon *Cellstrainer*, Becton Dickinson, NJ, USA) überführt und durch abwechselndes Zerreiben des Gewebes am Sieb und Nachspülen mit Medium zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Zwei Waschschrte wurden durchgeführt mit Zentrifugation bei 400 g für 8 Minuten bei 4 °C und anschließendem Resuspendieren mit Medium. Nach dem letzten Waschschrte wurde das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und eine Zellzählung wurde durchgeführt. Die Leukozytenextraktion aus der Tumorzellsuspension erfolgte nach dem Protokoll von Lympholyte-M<sup>®</sup> (Cederlane, Ca, USA). Hierzu wurde die Zellsuspension auf 20 x 10<sup>6</sup>/ml Zellen verdünnt und maximal 6 ml davon wurden auf 4 ml Lympholyte-M geschichtet. Die Gradientenzentrifugation erfolgte bei 20 °C mit 1200 g für 20 Minuten. Der Leukozytenring, der sich an der Schichtgrenze gebildet hatte, wurde mit einer Pipette abgenommen und zwei Mal mit Medium gewaschen. Eine erneute Zellzählung wurde durchgeführt und die Leukozytensuspension wurde für die Durchflusszytometrie auf eine Konzentration von 1 x 10<sup>6</sup>/ml Zellen gebracht.

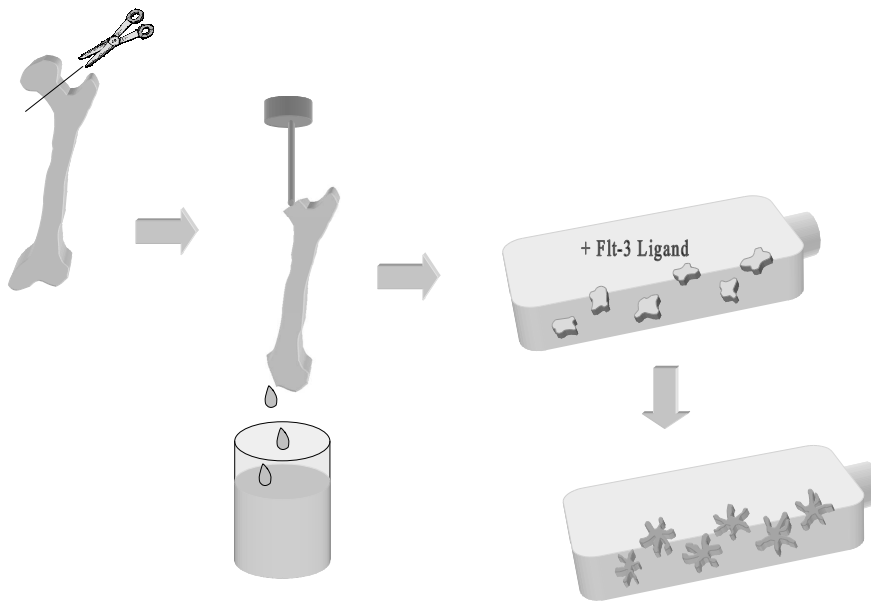
#### 2.5.2 Leukozytenaufbereitung aus Milzgewebe

Eine 6 bis 8 Wochen alte Maus wurde mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Exartikulation getötet. Nach Fixation der Maus und Desinfektion des Rumpfes wurde ein Hautschnitt durchgeführt und die Milz entnommen. Nach der Entfernung von

umliegendem Fettgewebe wurde das Organ in ein Gefäß mit Kulturmedium auf Eis gegeben. Weitere Arbeiten wurden steril unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (LaminAir HB 2472 S, Heraeus, München, D) durchgeführt. Die Milz wurde in ein 70 µm Zellsieb (*Cellstrainer*) gegeben. Durch Zerreiben der Milz mit der Pipette und Nachspülen mit 20 ml Medium wurden die Zellen in einem *Blue cap* aufgefangen. Die Zellsuspension wurde mit 400 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Inkubation mit 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer (Ortho-mune Lysereagenz in PBS, Ortho-Clinical Diagnostics, Neckarsgünd, D) für 5 Minuten wurden die Erythrozyten lysiert. Die Reaktion wurde mit 30 ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension wurde nach erneuter Zentrifugation auf eine Konzentration von  $20 \times 10^6$ /ml Zellen gebracht. Die Leukozyten wurden mit Hilfe von Lympholyte-M aus der Zellsuspension extrahiert. Die somit gewonnene Leukozytensuspension wurde auf  $1 \times 10^6$ /ml Zellen verdünnt und für durchflusszytometrische Messungen oder weitere Kultivierung verwendet.

### **2.6 Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus Knochenmark**

Sechs Wochen alte Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Exartikulation getötet. Nach Fixation der Maus und Desinfektion der Hinterläufe mit Isopropanol wurden Femur und Tibia beidseits freigelegt. Das Femur wurde aus der Hüftpfanne luxiert und von der Tibia getrennt. Die Knochen wurden von umgebenden Muskeln befreit und anschließend in ein Gefäß mit Medium auf Eis überführt. Weitere Arbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt. Die Knochen wurden kurz in Ethanol getaucht und anschließend in frisches Medium gelegt. Mit einer Schere wurden die Knochen an beide Enden eröffnet. Mit etwa 5 ml Kulturmedium pro Knochen wurden die Knochenmarkzellen herausgespült und durch ein 40 µm Zellsieb (*Cellstrainer*) filtriert. Schließlich wurde das Sieb mit 20 ml Medium nachgespült (Abbildung 2).



**Abb. 2:** Schema zur Gewinnung von plasmazytoiden dendritischen Zellen.

Die somit erhaltene Zellsuspension wurde bei 4 °C mit 400 g für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen, um die verbliebenen Erythrozyten zu entfernen. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion mit 30 ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension wurde nach erneuter Zentrifugation auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$ /ml Zellen gebracht. Hierzu wurden RPMI mit 10 % FCS von Biochrom verwendet. Um die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen zu PDCs zu erwirken, wurde rekombinanter humaner Flt-3 Ligand (rh Flt-3/Flk2 Ligand, NSO-derived, R&D Systems, MN, USA) in einer Konzentration von 20 ng/ml zu der Zellsuspension zugegeben. Rekonstituiert wurde der Flt-3 Ligand laut beiliegendem Protokoll mit PBS und 0,1 % humanem Serumalbumin (Biotest Pharma, Dreieich, D). Studien in unserem Labor haben ergeben, dass auch bei murinen Zellen der humane Ligand dem murinen Liganden überlegen ist. Die Zellen wurden in einer Kulturflasche für 9 Tage im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Reinheit der PDCs durch Expression von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die verbliebenen Zellen wurden je nach Versuchsbedingung in der Gegenwart verschiedener Stimuli für weitere 48 Stunden im Brutschrank kultiviert. Nach der Kultivierung wurde der zellfreie Überstand zur quantitativen Ermittlung von Zytokinen abgenommen.

### 2.7 Messmethoden

#### 2.7.1 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie mittels eines *fluorescence-activated cell sorters* (FACS) beruht auf der Analyse von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen einzelner Zellen. Die Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geführt. Anhand der Absorption und Ablenkung des Lasers kann auf die Zellgröße und -granularität rückgeschlossen werden. Um über Oberflächeneigenschaften Aufschluss zu bekommen, werden Fluorochrom-gebundene Antikörper verwendet, die spezifisch an bestimmte Oberflächenmoleküle binden. Die von zwei verschiedenen Laserstrahlen (Argonlaser mit 488 nm, Diodenlaser mit 635 nm) angeregten Farbstoffe emittieren Lichtquanten, die nach Filterung durch ein Bandpassfilter von unterschiedlichen Detektoren erfasst und analysiert werden. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung kann aber elektronisch kompensiert werden. Ebenso kann mit Hilfe von Isotypen, unspezifisch bindende Antikörper der jeweiligen Farbe, die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Oberflächenmerkmalen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an dem Zellsorter FACS-Calibur (Pharmingen/Becton Dickinson, Heidelberg, D) durchgeführt. Für FACS-Analysen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Medium für 30 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss mit der im jeweiligen Protokoll angegebenen Menge an Antikörpern inkubiert und anschließend einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Die folgenden an Antikörper gebundenen Fluorochrome wurden verwendet: FITC (Fluorescein-Isocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin Chlorophyll-A-Protein) oder APC (Allophycocyanin). Tabelle 3 liefert eine Aufstellung der verwendeten Antikörper.

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrischen Messungen**

<i>Antikörper</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Herkunft</i>
CD3 FITC	IgG <sub>1*</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
CD5 FITC	IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
CD19 FITC	IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
Pan-NK FITC	IgM, $\kappa$	BD/Pharminingen
CD4 FITC	IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
Ly6G/C PE	IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
CD45RA PE	IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
CD8a PE	IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
CD11b PerCP	IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
CD3 PerCP	IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	BD/Pharminingen
CD11c APC	IgG <sub>1*</sub> , $\lambda$	BD/Pharminingen

Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest Software.

### 2.7.2 Quantitative Zytokinbestimmung aus Zellkulturüberständen

Die Quantifizierung bestimmter Proteine in zellfreiem Kulturüberstand erfolgte mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Hierzu wurden für murines IFN- $\gamma$ , IL-10 und IL12p70 die murinen OptEIA Kits von Becton Dickinson/Pharminingen gemäß den beiliegenden Protokollen verwendet. Die Bestimmung von PGE<sub>2</sub> im Überstand erfolgte mit dem PGE<sub>2</sub> ELISA Kit von R&D Systems gemäß dem beiliegenden Protokoll. Die Quantifizierung ist aufgrund eines mitgelieferten Standards bekannter Konzentration möglich.

IFN- $\alpha$  aus Überständen von PDC-Kulturen wurde über einen selbst etablierten ELISA bestimmt, dessen Protokoll freundlicherweise Dr. Hubertus Hochrein (München, D) zur Verfügung gestellt hat [O'Keefe, 2003]. Die dafür verwendeten Komponenten sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Table 4: Auflistung der für den murinen IFN- $\alpha$ -ELISA verwendeten Substanzen**

<b>Komponenten</b>	<b>Arbeitskonzentration</b>	<b>Herkunft</b>
Ratte-Anti-Maus IFN- $\alpha$ Monoklonaler Antikörper	1 $\mu$ g/ml 50 $\mu$ l/Well	PBL Biomedical Labs (Piscataway, NJ, USA)
Hase-Anti-Maus IFN- $\alpha$ Polyklonaler Antikörper	2 x 10 <sup>2</sup> U/ml 50 $\mu$ l/Well	PBL Biomedical Labs
Rekombinantes murines IFN- $\alpha$	10 <sup>3</sup> U/ml – 16 U/ml 50 $\mu$ l/Well	PBL Biomedical Labs
Esel-Anti-Hase IgG Peroxidase F(ab') Fragment	100 ng/ml 50 $\mu$ l/Well	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
TMB Substrat Set	100 $\mu$ l/Well	BD/Pharmingen (San Jose, CA, USA)

Im Folgenden wird das Vorgehen zur Bestimmung von murinem IFN- $\alpha$  beschrieben.

Am ersten Tag wurden 50  $\mu$ l des *Capture*-Antikörpers in jedes Well der ELISA-Platte (Nunc Maxisorp, Wiesbaden, D) gegeben. Um eine sichere Bindung des Antikörpers an die Oberfläche der Wells zu gewährleisten, inkubierte die Platte über Nacht bei 4 °C in einer Kältekammer.

Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Wells abgeschüttet. Um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, wurden fünf Waschschrte mit je 200  $\mu$ l PBS mit 0,05 % Tween-20 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Anschließend wurden Stellen, die eventuell nicht mit Antikörper benetzt waren, mit 200  $\mu$ l/Well *Blocking-buffer* (PBS mit 10 % FCS) für zwei Stunden bei 4 °C geblockt. Nach fünf weiteren Waschschrten wurden jeweils 50  $\mu$ l der Proben in entsprechenden Verdünnungen aufgetragen. In die beiden ersten Reihen der Platte wurde der Interferon- $\alpha$  Standard in absteigenden Konzentrationen von 1000 U/ml – 0 U/ml zugegeben. Die Platte inkubierte wieder über Nacht in der Kältekammer.

Am letzten Tag wurde nach fünf Waschschrten der Detektions-Antikörper mit 50  $\mu$ l/Well zugegeben und inkubierte für drei Stunden bei 4 °C. Wieder wurden die Wells fünf Mal gewaschen, bevor der IgG-Peroxidase gebundene Antikörper mit

50 µl/Well für drei Stunden hinzugegeben wurde. Um nun sämtliche nicht-gebundenen Bestandteile zu entfernen, wurden zehn Waschschrirte durchgeführt. Anschließend wurden jedem Well 100 µl des TMB Substrats hinzugegeben. Wenn sich bei Raumtemperatur die Farben in der Standard-Reihe optimal entwickelt haben, wurde die Reaktion mit 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Extinktion wurde im ELISA-Reader bestimmt.

Alle spektrometrischen ELISA-Messungen erfolgten in dem ELISA-Reader MRX (Dynatech Laboratories, San Diego, USA).

### 2.8 Statistische Analyse

Bei mehrfachen Versuchen wurden die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben. Zusätzlich wurde die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of means*, SEM) dargestellt. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Studentsche t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $p < 0,05$  angenommen. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten sowie die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels des Programms Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, CA, USA). Die Auswertung der Signifikanz der Kaplan-Meier-Überlebenskurven erfolgte mit dem Logrank-Test mit Hilfe des Programms SPSS (SPSS Inc., IL, USA).



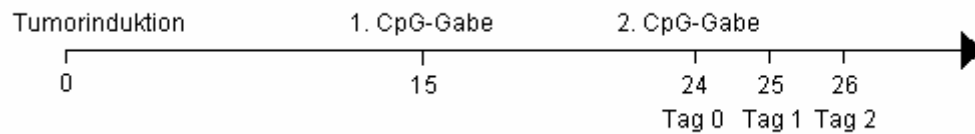
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Nachweis von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten im Tumorgewebe

Anfängliches Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, auf welche Weise peritumoral appliziertes CpG-ODN wirkt. Studien meiner Vorgänger hatten gezeigt, dass CpG-ODN-Applikation in die unmittelbare Nähe von subkutan induzierten Tumoren einen hemmenden Effekt auf das Wachstum dieser Tumoren hat [Heckelsmiller, 2002b]. In diesen Versuchen konnte das Wachstum kleiner Tumoren fünf Tage nach deren Induktion mit einer wöchentlichen Gabe von 100 µg CpG-ODN 1826 kontrolliert werden. Die Etablierung einer Immunvakzine mit dendritischen Zellen und CpG-ODN folgte und es konnten große Tumoren damit kontrolliert und zur Abstoßung gebracht werden [Heckelsmiller, 2002a].

CpG-ODN wirkt über TLR9 auf dendritische Zellen. Da dendritische Zellen eine durch CD8 T-Zellen vermittelte zytotoxische Immunantwort induzieren können, wurde zunächst untersucht, ob im Tumor PDCs, MDCs, CD4 und CD8 T-Zellen vorkommen, und ob CpG-ODN in dieser Zusammensetzung eine Veränderung bewirkt.

15 Tage nach Induktion eines Tumors mit der Tumorzelllinie C-26 wurde Mäusen peritumoral 100 µg CpG-ODN 1826 injiziert. Nach weiteren neun Tagen fand eine zweite Injektion von CpG-ODN statt. Ab diesem Tag wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen die Leukozytenpopulationen im Tumorgewebe untersucht (Schema siehe Abbildung 3). Durch zweimalige Gabe von CpG-ODN konnte ein Langzeiteffekt (sieben Tage) von einem Kurzzeiteffekt (24 bzw. 48 Stunden) der Immunstimulation unterschieden werden. Da an Tag 0 entnommene Tumoren nur einmalig neun Tage zuvor mit CpG-ODN behandelt wurden, lässt sich hier der längerfristige Effekt des CpG-ODN ermitteln. Die an Tag 1 und 2 entnommenen Tumoren wurden hingegen insgesamt zwei Mal mit CpG-ODN behandelt und können einen 24 Stunden- bzw. einen 48 Stunden-Effekt aufdecken.

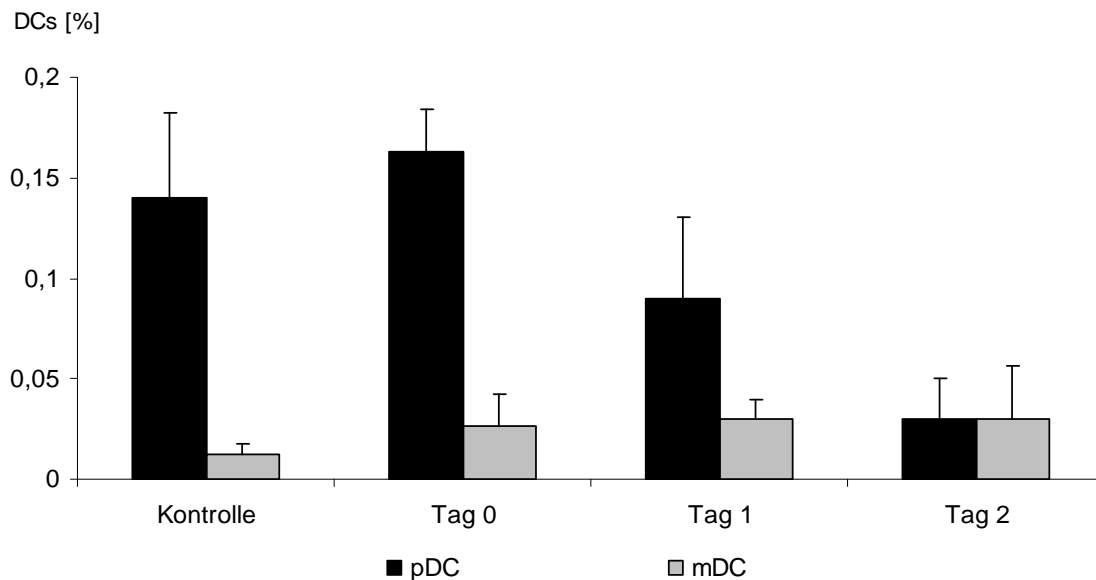


**Abb. 3: Versuchsschema.** Tumoren wurden an Tag 15 mit CpG-ODN behandelt. An Tag 24 wurden 3 Mäuse geopfert und deren Tumoren auf ihre Leukozytenpopulationen hin untersucht. Die Mäuse der anderen Gruppen wurden an diesem Tag ein zweites Mal mit CpG-ODN behandelt und am darauffolgenden bzw. am 2. Tag getötet.

Da es zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch keine eindeutig zuzuweisenden Antikörper gegen Oberflächenbestandteile von PDCs und MDCs gab, erfolgte die Darstellung der DC-Subtypen im FACS mittels Ausschlussdiagnostik. Hierzu wurde eine *Lineage*-Mischung (Lin) hergestellt, die FITC-gebundene Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD3, CD5, CD19 und Pan-NK enthielt. Damit wurden T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen markiert und anschließend negativ selektiert. PDCs wurden als Lin<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup> und CD11c<sup>low</sup>, MDCs wurden als Lin<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup> und CD11c<sup>high</sup> identifiziert. Erst kürzlich wurde ein muriner Antikörper 120G8 identifiziert, der selektiv an PDCs bindet [Asselin-Paturel, 2003]. Damit könnte in Zukunft die Darstellung und Sortierung von murinen PDCs erheblich erleichtert werden.

Nach Herstellen einer Einzelzellsuspension und Entfernung von Tumorzellen und Erythrozyten mittels Gradientenzentrifugation wurden die im Tumor vorliegenden Leukozyten gewonnen. Im FACS wurde der prozentuale Anteil der zu untersuchenden Zellen zur gesamten Leukozytenpopulation untersucht. Eine quantitative Anreicherung der Zellen ist mit dieser Methode allerdings nicht zu erfassen, da das Verhältnis der Menge der Leukozyten zur Gesamtmenge der Tumorzellen nicht erfasst werden konnte. Der Anteil der dendritischen Zellen innerhalb der Leukozytenpopulation ist mit weniger als 0,2 % sehr gering (Abb. 4). Die Anzahl der PDCs im Tumorgewebe an Tag 0 der CpG-ODN-Gabe verglichen zur nicht mit CpG behandelten Kontrollgruppe bleibt gleich. Die Gabe von CpG-ODN neun Tage zuvor wirkt sich damit nicht mehr auf den prozentualen Anteil der PDCs aus. Jedoch sinkt deren Anteil ein, respektive zwei Tage nach CpG-Gabe kontinuierlich ab. Im Gegensatz zu den PDCs ist der intratumorale Anteil der MDCs in der Leukozytenpopulation mit weniger als 0,02 % zu Beginn we-

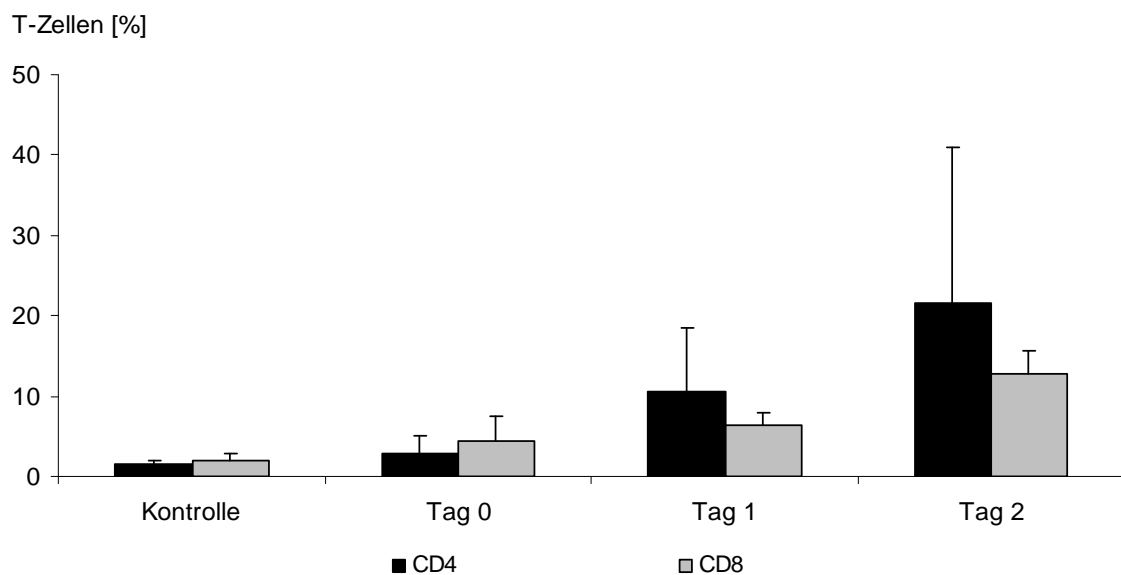
sentlich geringer und erhöht sich innerhalb von neun Tagen nach peritumorale CpG-Gabe nicht signifikant. Keine Änderung ist zu erkennen wenn die Gabe von CpG 24 bzw. 48 Stunden zuvor erfolgte.



**Abb. 4: DC-Subtypen im murinen Kolonkarzinom.** Mäusen wurde subkutan ein Tumor mit  $2 \cdot 10^5$  Zellen der Kolonkarzinomzelllinie C-26 induziert. Die erste CpG-Gabe erfolgte an Tag 15, die zweite Gabe an Tag 24 nach Tumorinduktion. Am Tag der letzten CpG-Gabe (Tag 0) bzw. an den beiden darauffolgenden Tagen wurden die Tumoren entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die DCs wurden im FACS anhand charakteristischer Oberflächenmarker nachgewiesen. Gezeigt werden Daten aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Es ist bekannt, dass murine und humane DCs *in vivo* und *in vitro* nach Kontakt mit Tumoren inaktiviert und in einen unreifen Zustand versetzt werden [Vicari, 2002]. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass bereits ohne CpG-Gabe sowohl PDCs als auch MDCs im Tumorgewebe vorliegen. DCs präsentieren Antigen auf MHC-Molekülen. Daraufhin werden CD4 T-Zellen aktiviert und beginnen mit der Sekretion von Zytokinen, die entweder eine  $T_H1$ -gerichtete oder  $T_H2$ -gerichtete Immunantwort induzieren. Auch CD8 T-Zellen sind an der antitumoralen Immunantwort beteiligt, da sie antigenspezifisch eine Zellyse bewirken können. Nachdem gezeigt werden konnte, dass DCs im Tumor existieren, sollte untersucht werden, ob auch die Effektorzellen, die durch DCs aktiviert werden, nach CpG-Gabe vermehrt in den Tumor migrieren.

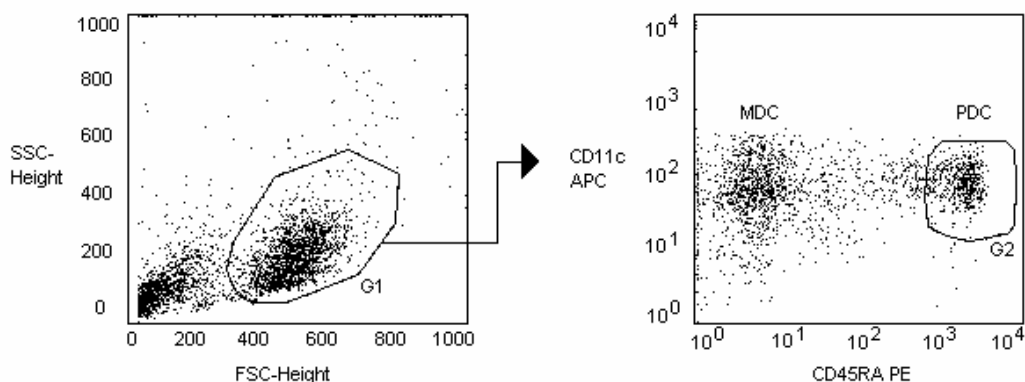
An Tag 0 ist der Anteil der CD4 und CD8 T-Zellen mit weniger als 2 % der Leukozyten sehr gering. Die Wirkung der CpG-Gabe ist nach 9 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu unverändert. Doch 24 bzw. 48 Stunden nach CpG-Gabe findet eine relative Anhäufung beider Zellpopulationen statt (Abb. 5). CD4 T-Zellen erreichen einen Anteil von bis zu 20 % an Tag 2, die Zahl der CD8 T-Zellen bleibt mit 13 % etwas niedriger. Dies lässt den Schluss zu, dass CpG-ODN die Einwanderung von T-Lymphozyten zu bewirken vermag. Dieser Effekt ist jedoch nur kurzwährend.



**Abb. 5: T-Zell-Subtypen im murinen Kolonkarzinom.** Mäusen wurde subkutan ein Tumor mit  $2 \cdot 10^5$  Zellen der Kolonkarzinomzelllinie C-26 induziert. Die erste CpG-Gabe erfolgte an Tag 15, die zweite Gabe an Tag 24 nach Tumorinduktion. Am Tag der letzten CpG-Gabe (Tag 0) bzw. an den beiden darauffolgenden Tagen wurden die Tumoren entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Mittels Gradientenzentrifugation wurden die Leukozyten extrahiert. Die CD4 und CD8 T-Zellen wurden im FACS anhand charakteristischer Oberflächenmarker nachgewiesen und deren prozentualer Anteil an der Leukozytenpopulation bestimmt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.2 Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf murine plasmazytoide dendritische Zellen

Da PDCs die wichtigsten Produzenten von IFN- $\alpha$  sind und dieses eine T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunantwort induziert, die effektiv in der Bekämpfung von Tumoren ist, soll in den folgenden Versuchen zunächst untersucht werden, inwiefern sich die Zugabe verschiedener Stimuli auf die IFN- $\alpha$ -Produktion auswirkt. Nach einem neuen Verfahren wurden PDCs aus Knochenmarkszellen mit Hilfe des Wachstumshormons Flt-3 Ligand erzeugt [Gilliet, 2002]. Zur Bestimmung des Anteils an PDCs in der Kultur wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen entnommen und für die Untersuchung im FACS mit CD11c(APC)- und CD45RA(PE)-Antikörpern gefärbt. In Vorstudien zeigte sich, dass der Großteil der gewonnenen Zellen CD11c exprimiert und die Verunreinigung mit nicht-dendritischen Zellen sehr gering ist. Daher wurde auf eine Anfärbung anderer Zellen wie nach der oben beschriebenen Methode verzichtet, um Kompensationseinstellungen mit hohem Zellverlust am FACS zu minimieren. Da zu dem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch keine Möglichkeit zur optimalen Aufreinigung der Zellen erhältlich war, ist die Population der PDCs vermischt mit MDCs (Abb. 6), die sich gleichzeitig ausdifferenzieren haben, jedoch nicht an der IFN- $\alpha$ -Produktion beteiligt sind.



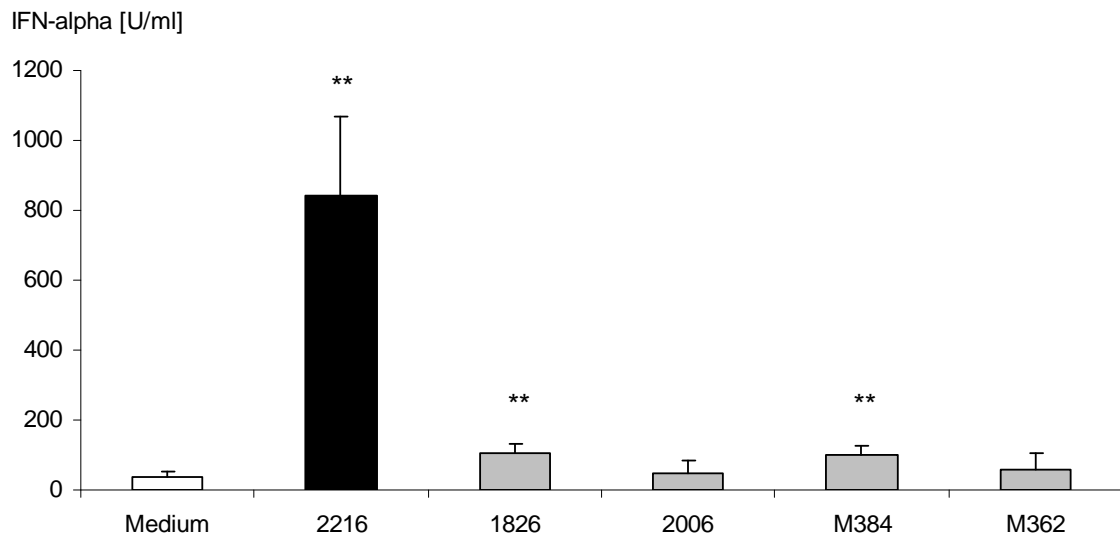
**Abb. 6: Reinheit der PDCs.** Nach Kultivierung der Knochenmarkszellen einer Maus für 9 Tage mit Flt-3 Ligand wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen für die Darstellung des Anteils der PDCs in der Kultur entnommen. Insgesamt wurden 16.320 Ereignisse gezählt, davon ist eine Population mit 8356 Zellen abgrenzbar (G1). Bei Auftragen gegen die DC-Marker lassen sich die PDCs ein-

### 3 ERGEBNISSE

---

deutig von den MDCs unterscheiden. Der PDC-Anteil an den Zellen beträgt hier 23,7 % (G2). Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ( $n=1$ ).

Zur Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener ODN wurden diese mit 6  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben und IFN- $\alpha$  aus den Überständen gemessen (Abb. 7). Wie auch bei humanen PDCs induziert CpG-ODN 2216 mit 844 U/ml die höchsten Konzentrationen an IFN- $\alpha$ . Die CpG-Typ B-ODN induzieren weitaus weniger IFN- $\alpha$ , wobei die murine Variante CpG-ODN 1826 die PDCs zu einer doppelt so hohen (103 U/ml) IFN- $\alpha$ -Produktion veranlasst wie das humane ODN 2006 (49 U/ml). Die Typ C-ODN M384 und M362 regen PDCs zur Produktion nur geringer Mengen an IFN- $\alpha$  an (100 U/ml, 58 U/ml bzw. 87 U/ml). Da auch bei murinen PDCs CpG-ODN 2216 die größte Auswirkung auf die IFN- $\alpha$ -Produktion hat, werden weitere *in vitro* Studien vornehmlich mit diesem ODN durchgeführt.



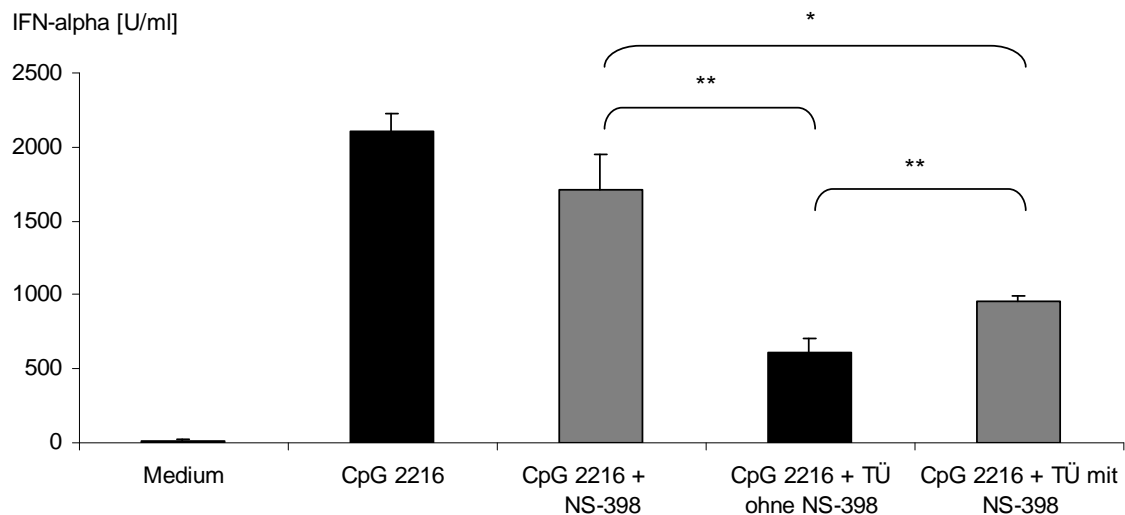
**Abb. 7: Wirkung verschiedener CpG-Oligonukleotide auf *in vitro* generierte PDCs.** Knochenmarkszellen aus Tibia und Femur der Mäuse wurden mit 20 ng/ml Flt-3 Ligand für 9 Tage kultiviert. Anschließend wurden jeweils 6  $\mu\text{g/ml}$  der folgenden CpG-ODN für 48 h zugegeben: 2216, 1826, 2006, M384 und M362. Die zellfreien Überstände wurden entnommen und IFN- $\alpha$  wurde mit Hilfe eines ELISA nachgewiesen. Gezeigt werden Daten aus jeweils 4 unabhängigen Experimenten (\*\* =  $p < 0,01$  gegenüber Medium).

#### **3.3 Wirkung von Tumorüberstand und Prostaglandin E<sub>2</sub> auf murine plasmazytoide dendritische Zellen**

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich der therapeutische Effekt des CpG-ODN noch verbessern lässt. Im zentralen Blickpunkt steht darin die Rolle der Cyclooxygenase und einer seiner wichtigsten Metabolite, Prostaglandin E<sub>2</sub>, in der Tumorentstehung.

Da APCs eine wichtige Rolle in der antitumoralen Immunantwort zukommt und sie Haupteffektorzellen der CpG-ODN-vermittelten inflammatorischen Wirkung sind, soll im Folgenden die Wirkung von tumorsezernierten Zytokinen auf diese Zellen untersucht werden. Einer C-26-Zelllinie wurde zellfreier Tumorüberstand (TÜ) entnommen, nachdem sie für 48 h mit 10 µM NS-398 oder dessen Lösungsmittel Ethanol als Kontrolle inkubiert wurde. PDCs wurden generiert und für 48 h koinkubiert mit CpG-ODN 2216 und 10 % Tumorüberstand. Als Zeichen der Aktivität der PDCs wurde IFN-α im Überstand gemessen. CpG-ODN 2216 induziert große Mengen an IFN-α (Abb. 8). Die zusätzliche Gabe von 1 µM NS-398 als Kontrolle für direkte, unspezifische Effekte des COX-2-Hemmers wirkt sich kaum auf die IFN-α-Produktion der PDCs aus. Wird dem Medium der PDCs 10 % Tumorüberstand zugefügt, ist der aktivierende Effekt des CpG-ODN deutlich abgeschwächt (35,6 % des Kontrollwertes). Wurde der TÜ allerdings in Anwesenheit von NS-398 produziert, ist dessen immunsupprimierende Wirkung vermindert. Die Aktivierbarkeit der PDCs durch CpG-ODN konnte teilweise (auf 55 % des Kontrollwertes) wiederhergestellt werden.

### 3 ERGEBNISSE



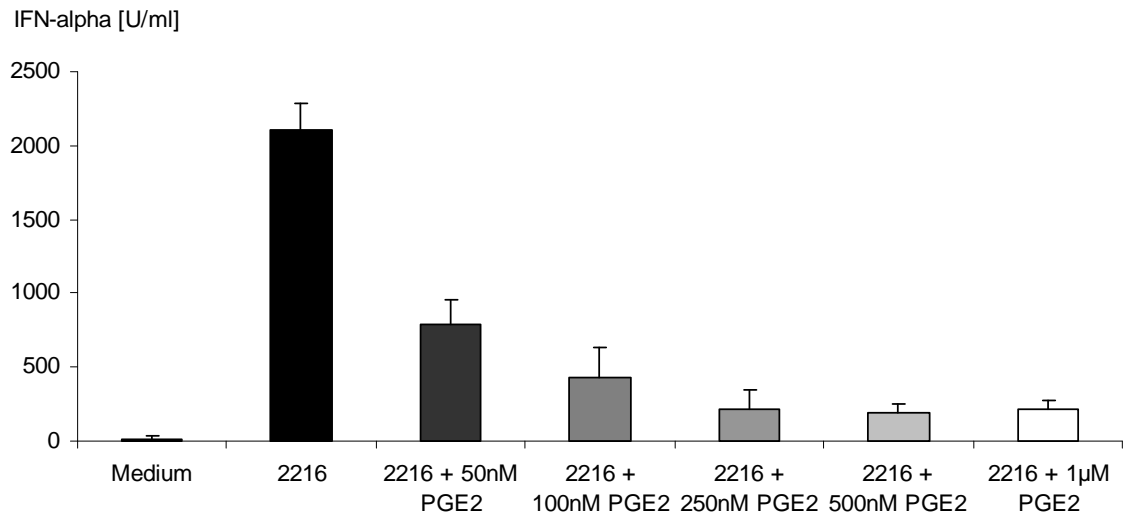
**Abb. 8: Tumorüberstand hemmt die CpG-induzierte Produktion von IFN- $\alpha$  in murinen PDCs.** Knochenmarkszellen aus Tibia und Femur der Mäuse wurden mit 20 ng/ml Flt-3 Ligand für 9 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h ohne Stimulus, mit CpG 2216 und entweder mit 1  $\mu$ M NS-398 oder 10 % Tumorüberstand inkubiert. Die Generierung des Tumorüberstands erfolgte in Anwesenheit von 10  $\mu$ M NS-398 oder nur dessen Lösungsmittel Ethanol in gleicher Menge. Ein muriner IFN- $\alpha$ -ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

Da der COX-2-Hemmer vor allem die Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> unterbindet, lässt sich der hemmende Einfluss des Tü auf PDCs vor allem auf dieses Zytokin zurückführen. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde rekombinantes PGE<sub>2</sub> in verschiedenen Konzentrationen zu CpG-ODN 2216-stimulierten PDCs gegeben und wieder IFN- $\alpha$  als Zeichen der Aktivität herangezogen (Abb. 9). Zu erkennen ist eine inhibitorische Wirkung des Prostaglandins, die bereits in einer sehr geringen Konzentration von 50 nM stark die Produktion von IFN- $\alpha$  beeinflusst. Höhere Mengen senken die sezernierte IFN- $\alpha$  Menge auf bis zu 10 % des Ausgangswertes, bis bei ungefähr 500 nM PGE<sub>2</sub> die maximale Inhibition erreicht ist.



### 3 ERGEBNISSE

---



**Abb. 9: Prostaglandin  $E_2$  hemmt die CpG-induzierte Produktion von IFN- $\alpha$  in murinen PDC.** Knochenmarkszellen aus Tibia und Femur der Mäuse wurden mit 20 ng/ml Flt-3 Ligand für 9 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h ohne Stimulus, mit CpG 2216 und Prostaglandin  $E_2$  in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. Ein muriner IFN- $\alpha$ -ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt.

PDCs sind befähigt in großen Mengen IFN- $\alpha$  zu produzieren. Dessen antivirale Wirkung besteht unter anderem darin, in Zellen die Expression von MHC-I-Oberflächenmolekülen zu bewirken. Damit spielt es eine wichtige Rolle in der Abwehr von Tumoren. Tumoren, die kein MHC-I exprimieren, sind vor einer zytotoxischen CD8 T-Zellantwort weitgehend geschützt. Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen und Makrophagen, vermögen solche Zellen zwar teilweise zu erkennen und zu lysieren. Doch eine effektivere Wirkung geht von CD8 T-Zellen aus, da diese antigenspezifisch eine gegen den Tumor gerichtete Wirkung entfalten können. Dazu benötigen sie allerdings die Expression von Antigen auf MHC-I-Molekülen der Tumorzellen. Diese kann durch IFN- $\alpha$  hervorgerufen werden.

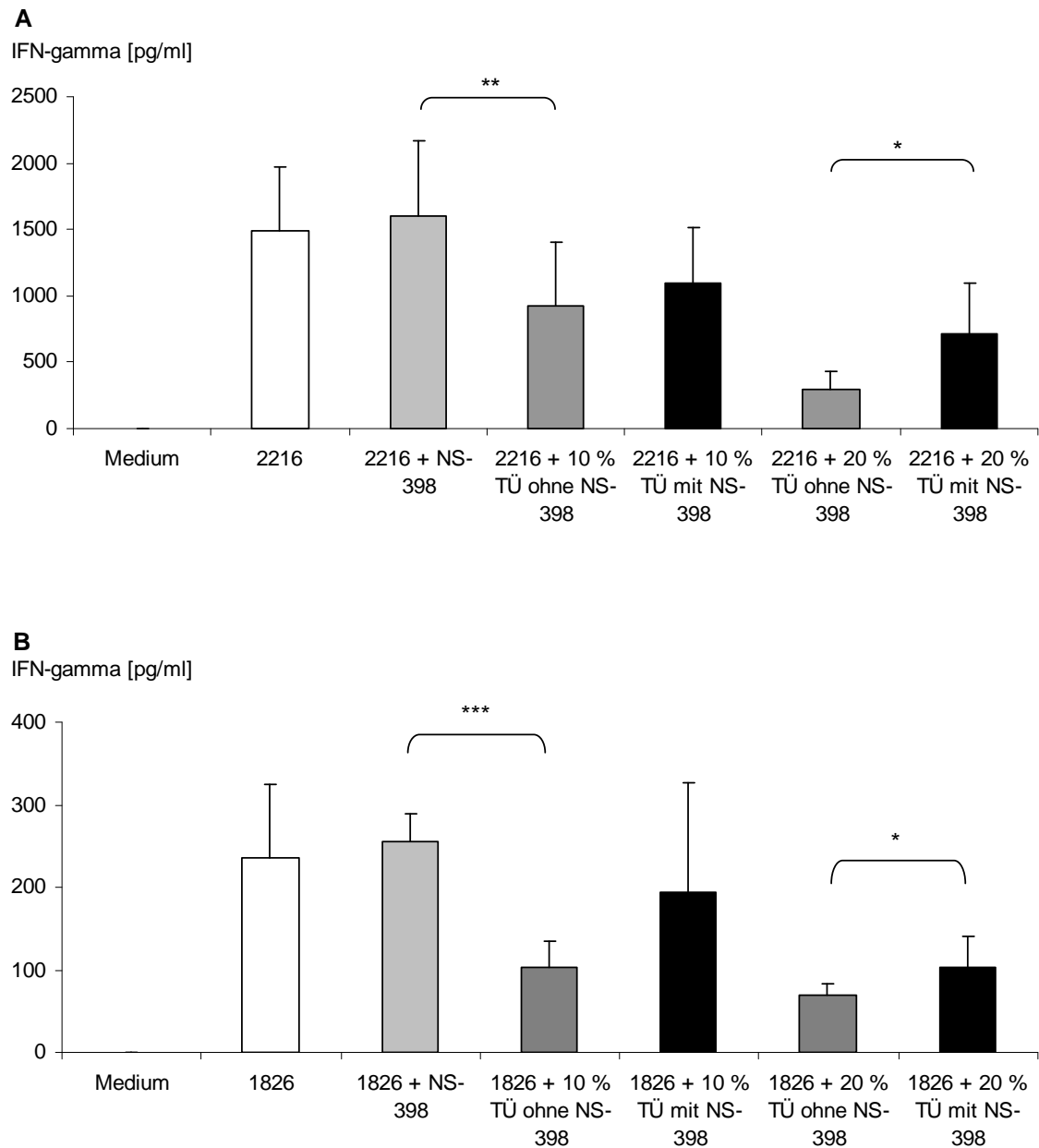
#### **3.4 Wirkung von Tumorüberstand und Prostaglandin E<sub>2</sub> auf murine Leukozyten aus der Milz**

##### **3.4.1 Wirkung von Tumorüberstand auf die Produktion von Interferon- $\gamma$ und Interleukin-12p70 in murinen Leukozyten aus der Milz**

IL-12 ist ein Zytokin, das von B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet wird und auch als NK-Zell-aktivierender Faktor bezeichnet wird [Reis e Sousa, 1997; Banchereau, 1998]. Es vermittelt die Entwicklung von CD4 T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen und stimuliert T-Lymphozyten und NK-Zellen zur Synthese von IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  veranlasst eine Hochregulierung von MHC-Molekülen und induziert ebenfalls eine T<sub>H</sub>1-gerichtete Immunantwort. Die Vermutung sollte bestätigt werden, dass Tumoren die Fähigkeit besitzen, die Synthese von Zytokinen zu hemmen um damit eine parakrine Aktivierung des Immunsystems zu unterbinden.

Im folgenden Versuch wurden Leukozyten aus der Milz von Balb/c-Mäusen gewonnen und 48 h mit 10 bzw. 20 % Tumorüberstand inkubiert, um dessen Effekte auf gemischte Leukozytenpopulationen zu untersuchen. CpG 2216 bewirkt die Produktion großer Mengen an IFN- $\gamma$ , die durch Zugabe von NS-398 nicht beeinflusst wird (Abb. 10 A). Wird zu Beginn der Kultivierung 10 % des Mediums mit Tumorüberstand ersetzt, ist eine Hemmung der IFN- $\gamma$ -Produktion erkennbar (62,3 % des Ausgangswertes). Durch Erhöhung der Konzentration des Tumorüberstands auf 20 % des Volumens, ist dieser Effekt noch zu steigern (19,7 % des Ausgangswertes). Wurde der Tumorüberstand in Anwesenheit von NS-398 generiert, ist dessen Hemmung auf die murinen Leukozyten abgeschwächt. Die Fähigkeit des CpG-Typ B-ODN 1826, IFN- $\gamma$  in Leukozyten zu induzieren, ist im Vergleich zu CpG 2216 geringer (Abb. 10 B). Doch auch die stimulierende Wirkung von CpG 1826 kann durch Tumorüberstand vermindert werden. Auch hier ist eine Verminderung der IFN- $\gamma$ -Produktion in Abhängigkeit der Konzentration des Tumorüberstands erkennbar. Die hemmende Wirkung des mit NS-398 generierten Tumorüberstands ist geringer.

### 3 ERGEBNISSE

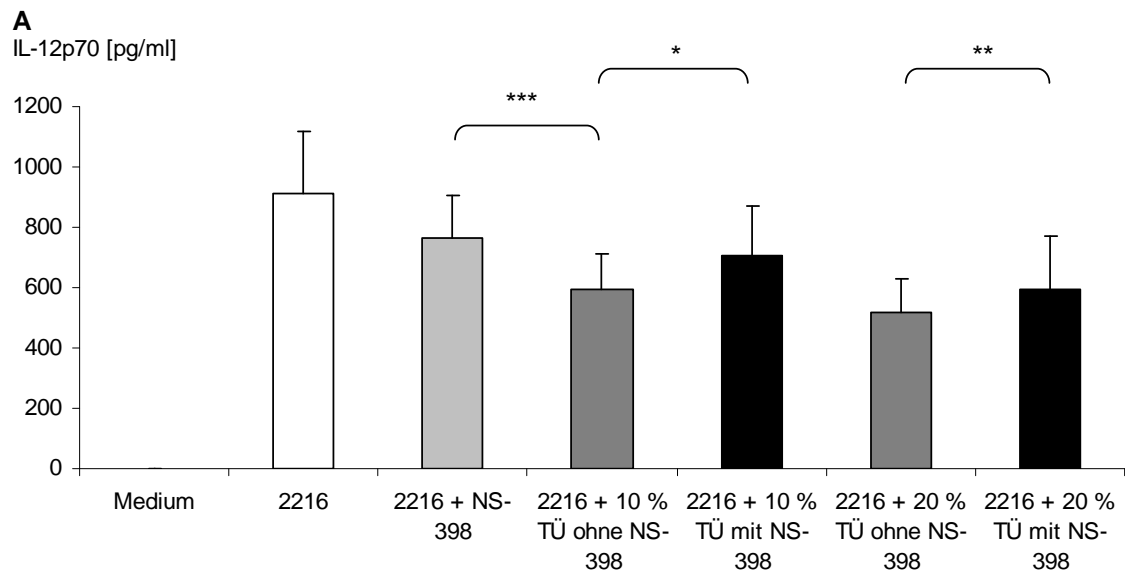


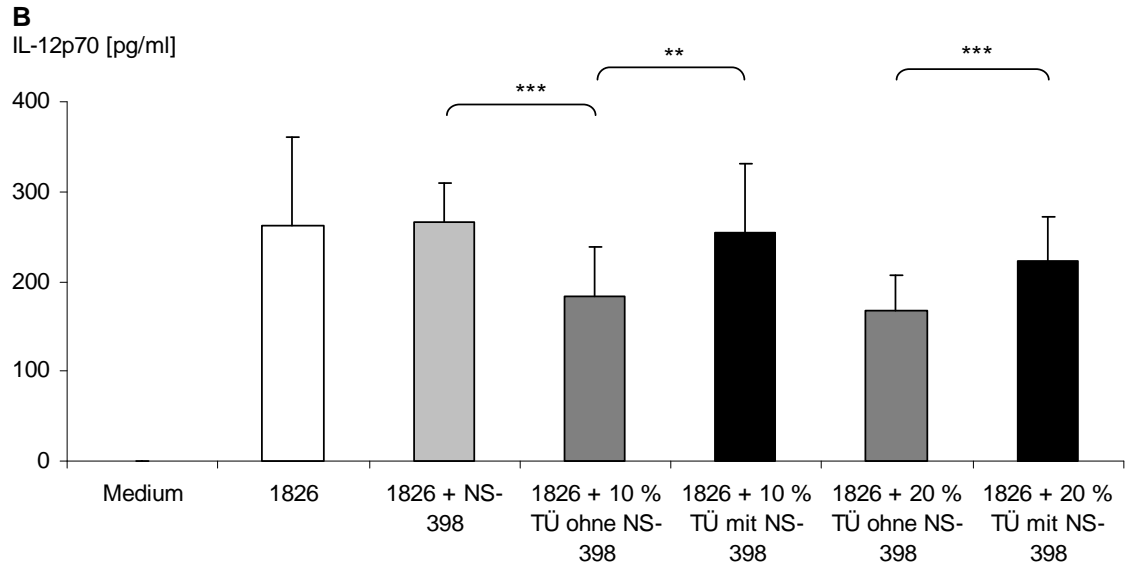
**Abb. 10: Tumoriüberstand hemmt die CpG-induzierte Produktion von IFN- $\gamma$  in Leukozyten aus der Milz.** Leukozyten wurden aus muriner Milz gewonnen und für 48 h ohne Stimulus, mit CpG 2216 (A) oder CpG 1826 (B) und entweder mit 1  $\mu$ M NS-398 oder 10 bzw. 20 % Tumoriüberstand inkubiert. Die Generierung des Tumoriüberstands erfolgte in Anwesenheit von 10  $\mu$ M NS-398 oder nur dessen Lösungsmittel Ethanol in gleicher Menge. Ein muriner IFN- $\gamma$ -ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Im Hinblick auf die Unterdrückung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort wurde desweiteren die Produktion von IL-12p70 bestimmt. Hier zeigten sich ähnlich Effekte wie bei der Mes-

### 3 ERGEBNISSE

sung von IFN- $\gamma$ . CpG 2216 induziert große Mengen an IL-12p70 (Abb. 11 A). Die Sekretion dieses Zytokins wird in ähnlichem Maße durch Tumorüberstand gehemmt (65,6 % des Ausgangswertes). Die Erhöhung des Anteils an Tumorüberstand auf 20 % hemmt die Sekretion von IL-12p70 aber nur noch auf 56,7 % des Ausgangswertes. CpG 1826 vermag im Vergleich zu CpG 2216 eine geringere Ausschüttung von IL-12p70 zu induzieren, doch die Effekte bei Kokultivierung mit Tumorüberstand sind ähnlich (Abb. 11 B) wie bei dem CpG-Typ A-ODN. 10 % TÛ hemmen die Produktion von IL-12p70 um 30 %, die Verdopplung der Menge an TÛ auf 20 % vermindert die IL-12p70-Produktion nur um weitere 6 %.





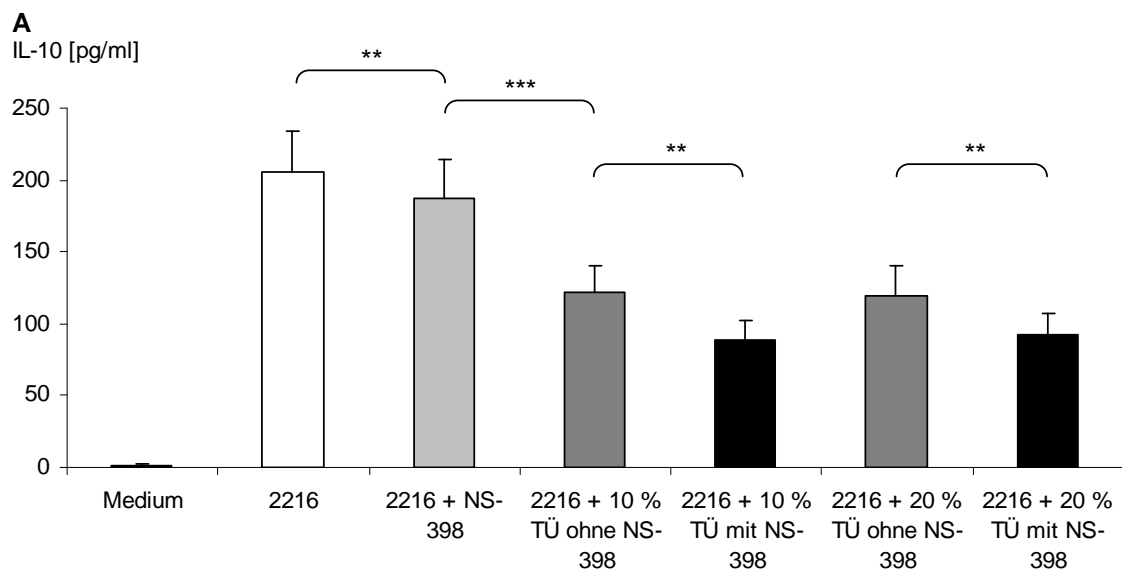
**Abb. 11: Tumorüberstand hemmt die CpG-induzierte Produktion von IL-12p70 in Leukozyten aus der Milz.** Leukozyten wurden aus muriner Milz gewonnen und für 48 h ohne Stimulus, mit CpG 2216 (A) oder CpG 1826 (B) und entweder mit 1  $\mu$ M NS-398 oder 10 bzw. 20 % Tumorüberstand inkubiert. Die Generierung des Tumorüberstands erfolgte in Anwesenheit von 10  $\mu$ M NS-398 oder nur dessen Lösungsmittel Ethanol in gleicher Menge. Ein muriner IL-12p70-ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

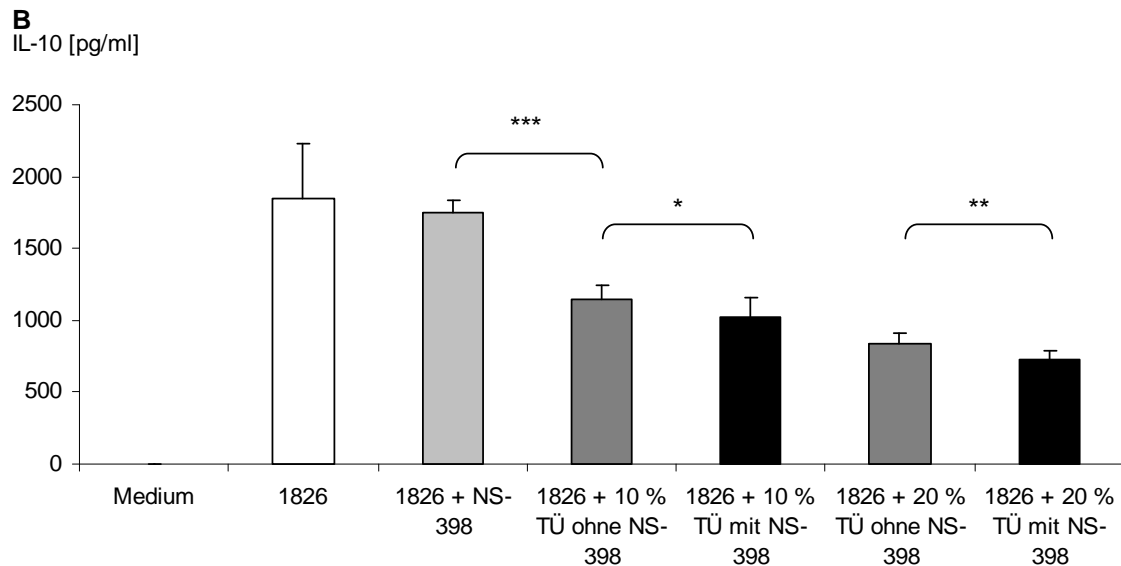
### 3.4.2 Wirkung von Tumorüberstand auf die Produktion von Interleukin-10 in murinen Leukozyten aus der Milz

IL-10 gilt als immunsupprimierendes Zytokin [Ludewig, 1995; Chouaib, 1997; Vicari, 2002]. Es unterbindet die Entwicklung von T-Zellen in  $T_H1$ -Zellen und wirkt somit antagonistisch zu  $IFN-\gamma$  und IL-12p70. Es kann von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen gebildet werden und induziert eine humoral gerichtete  $T_H2$ -Immunantwort. Im Immunsystem herrscht ein Gleichgewicht zwischen  $T_H1$ -gerichteter und  $T_H2$ -gerichteter Immunantwort. Je mehr dieses Gleichgewicht durch Zytokine wie IL-10 oder  $PGE_2$  zugunsten einer  $T_H2$ -Immunantwort verschoben ist, desto schwieriger ist es, diesen Zyklus zu unterbrechen, da die jeweiligen Zytokine über Regelmechanismen ihre Wirkung verstärken und unterhalten.

### 3 ERGEBNISSE

Es wurde untersucht, ob PGE<sub>2</sub> die Sekretion von IL-10 fördert und damit immun-supprimierende Eigenschaften hervorruft. Die Überstände der Milz-Leukozyten wurden wie oben beschrieben gewonnenen und auf IL-10 untersucht. CpG-ODN 2216 als Initiator einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort vermochte nur geringe Mengen an IL-10 zu induzieren (Abb. 12 B). Tumorüberstand hemmte die durch CpG 2216 induzierte Produktion von IL-10 auf 58,7 % (10 % TÛ) bzw. 43,3 % (20 % TÛ) des Ausgangswertes. Die Generierung von Tumorüberstand in Anwesenheit eines Cyclooxygenase-2-Inhibitors zeigte einen signifikanten weiteren Rückgang der IL-10-Produktion verglichen zum reinen Tumorüberstand. Ebenso zeigt sich ein Unterschied bei Verwendung von CpG 1826 (Abb. 12 B). Die gemessenen IL-10-Konzentration lagen mit CpG 1826 deutlich höher als bei CpG 2216. Auch hier hatte die Anwesenheit von NS-398 während der TÛ-Generierung einen verstärkenden Effekt auf die Hemmung der IL-10-Produktion.





**Abb. 12: Tumorüberstand hemmt die CpG-induzierte Produktion von IL-10 in Leukozyten aus der Milz.** Leukozyten wurden aus muriner Milz gewonnen und für 48 h ohne Stimulus, mit CpG 2216 (A) oder CpG 1826 (B) und entweder mit 1 µM NS-398 oder 10 bzw. 20 % Tumorüberstand inkubiert. Die Generierung des Tumorüberstands erfolgte in Anwesenheit von 10 µM NS-398 oder nur dessen Lösungsmittel Ethanol in gleicher Menge. Ein muriner IL-10-ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

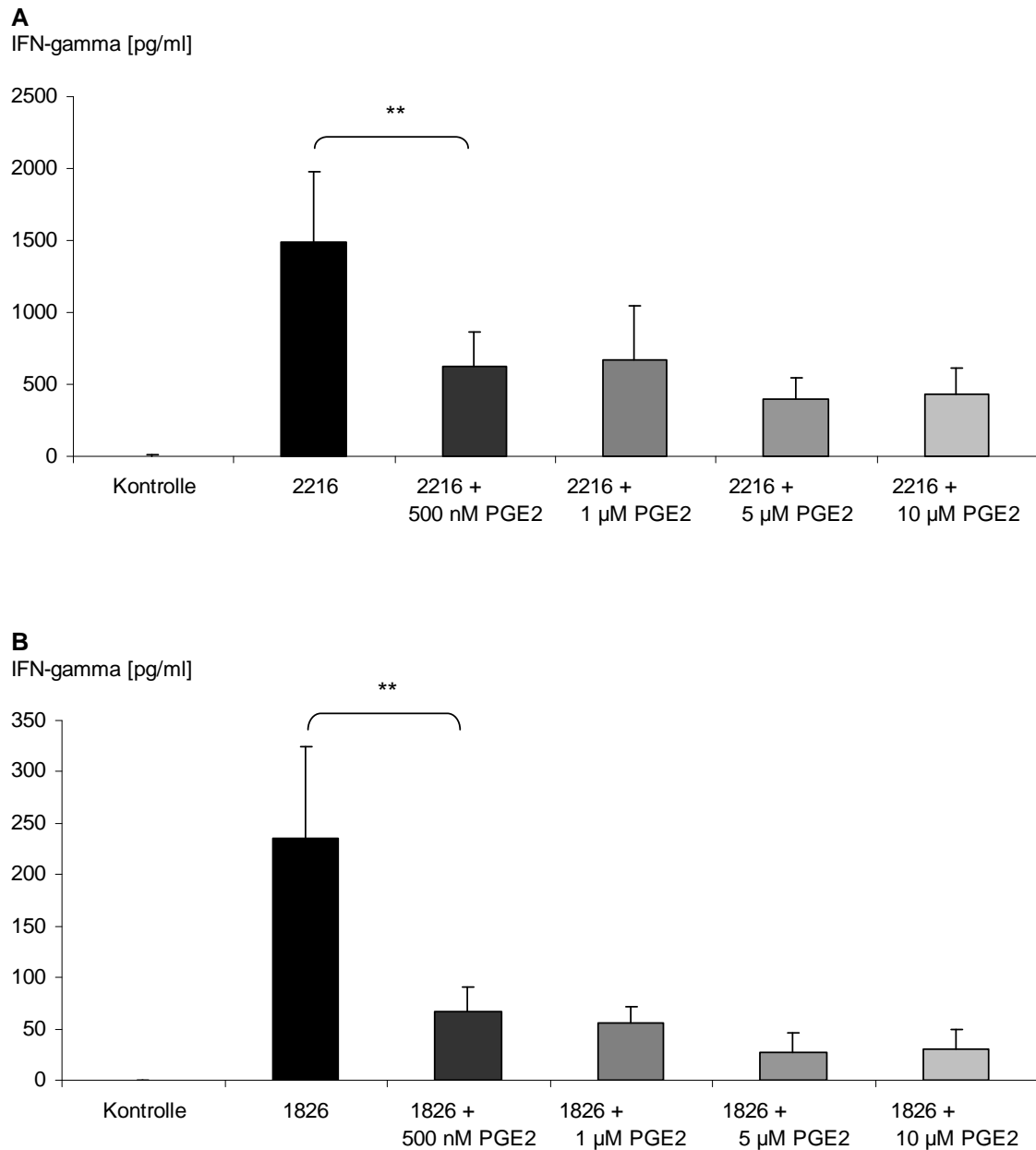
### 3.5 Wirkung von Prostaglandin E<sub>2</sub> auf murine Leukozyten aus der Milz

#### 3.5.1 Wirkung von Prostaglandin E<sub>2</sub> auf die Produktion von Interferon-γ und Interleukin-12p70 in murinen Leukozyten aus der Milz

Aufgrund der Erkenntnisse, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> als hauptsächliches Produkt des Cyclooxygenase-Stoffwechsels anfällt, wurde untersucht, ob die oben beschriebenen Effekte des Tumorüberstands mit rekombinantem PGE<sub>2</sub> nachgestellt werden können. Hierzu wurden wieder murine Leukozyten aus der Milz gewonnen und für 48 h mit CpG 2216 (Abb. 13 A) oder CpG 1826 (Abb. 13 B) inkubiert. Zusätzlich wurde in aufsteigenden Konzentrationen von 500 nM bis 10 µM Prostaglandin E<sub>2</sub> zugegeben. Bei der darauf folgenden quantitativen Messung von IFN-γ aus dem zellfreien Überstand fiel auf, dass bereits Mengen von 500 nM PGE<sub>2</sub> die IFN-γ Produktion stark hemmen. Höhere Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> verstärkten diese Wirkung kaum mehr. Eindrücklich

### 3 ERGEBNISSE

ist der Effekt für CpG-ODN 1826. Hier geht die IFN- $\gamma$ -Produktion bis auf weniger als 10 % zurück.

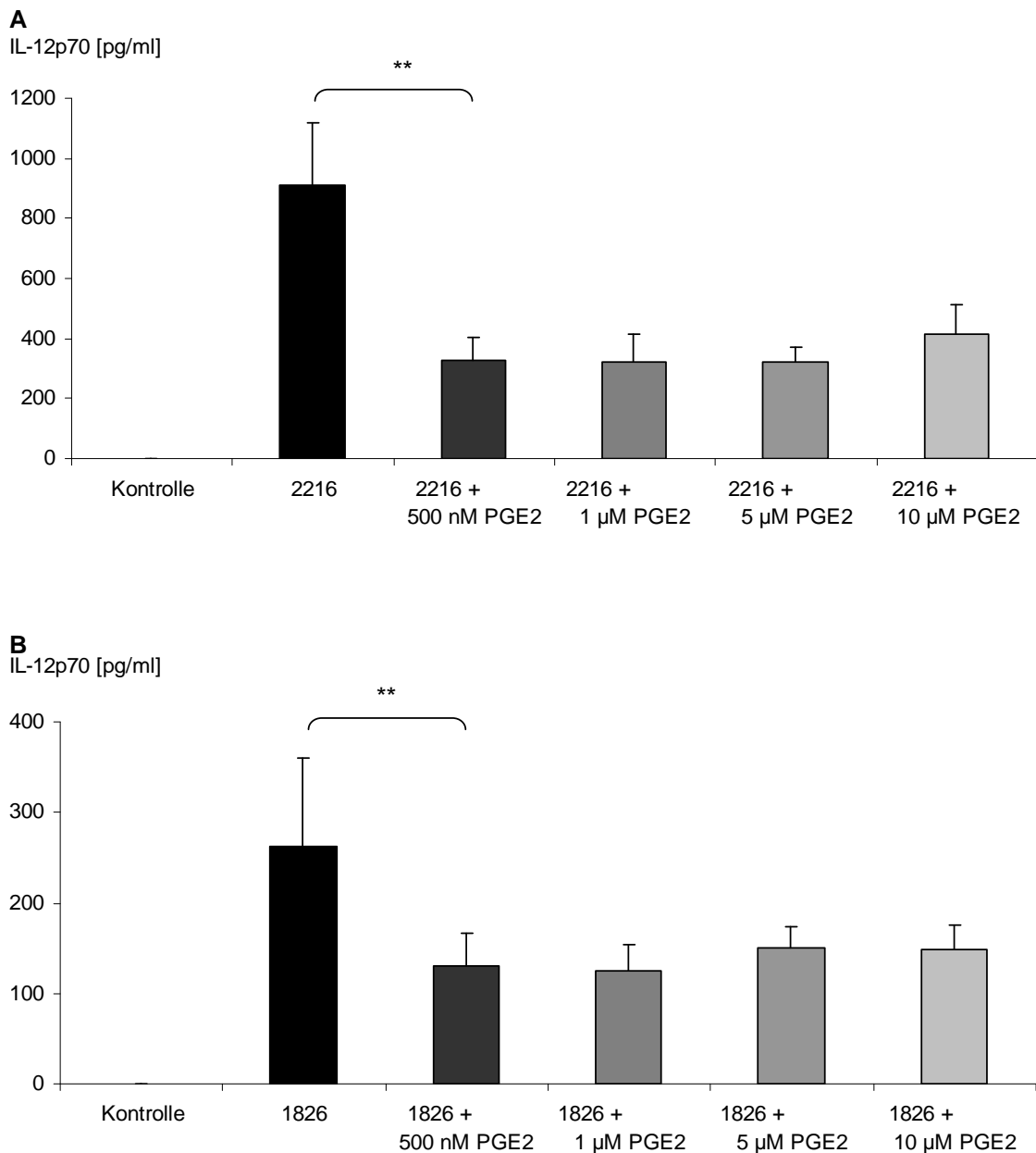


**Abb. 13: Prostaglandin  $E_2$  hemmt die CpG-induzierte Produktion von IFN- $\gamma$  in Leukozyten aus der Milz.** Leukozyten wurden aus muriner Milz gewonnen und für 48 h ohne Stimulus, mit CpG-ODN 2216 (A) oder CpG-ODN 1826 (B) und aufsteigenden Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> inkubiert. Ein muriner IFN- $\gamma$ -ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten (\*\* =  $p < 0,01$ ).



### 3 ERGEBNISSE

Bei der quantitativen Analyse von IL-12p70 aus dem Überstand zeigte sich mit 500 nM PGE<sub>2</sub> ebenfalls ein erheblicher Rückgang der CpG-vermittelten IL-12p70-Produktion um 64,8 % (CpG 2216, Abb. 14 A) bzw. 50,2 % (CpG 1826, Abb. 14 B). Auch hier konnte mit ansteigenden Konzentrationen kein titrierbarer Effekt des PGE<sub>2</sub> gezeigt werden. Dies deutet auf eine bereits maximale Hemmung der Zytokinproduktion mit 500 nM PGE<sub>2</sub> hin.



**Abb. 14: Prostaglandin E<sub>2</sub> hemmt die CpG-induzierte Produktion von IL-12p70 in Leukozyten aus der Milz.** Leukozyten wurden aus muriner Milz gewonnen und für 48 h ohne

### 3 ERGEBNISSE

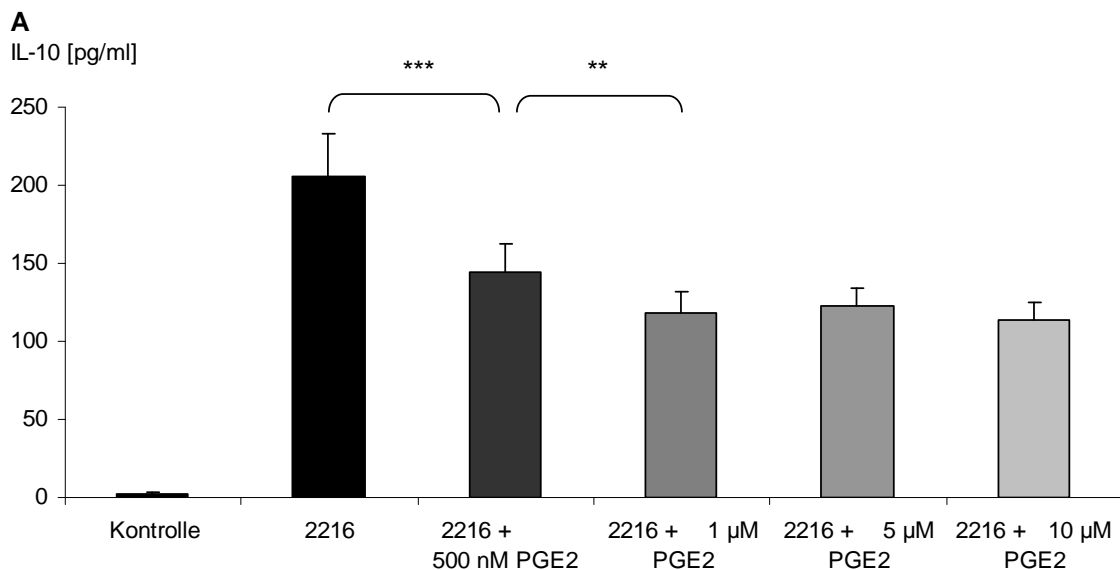
---

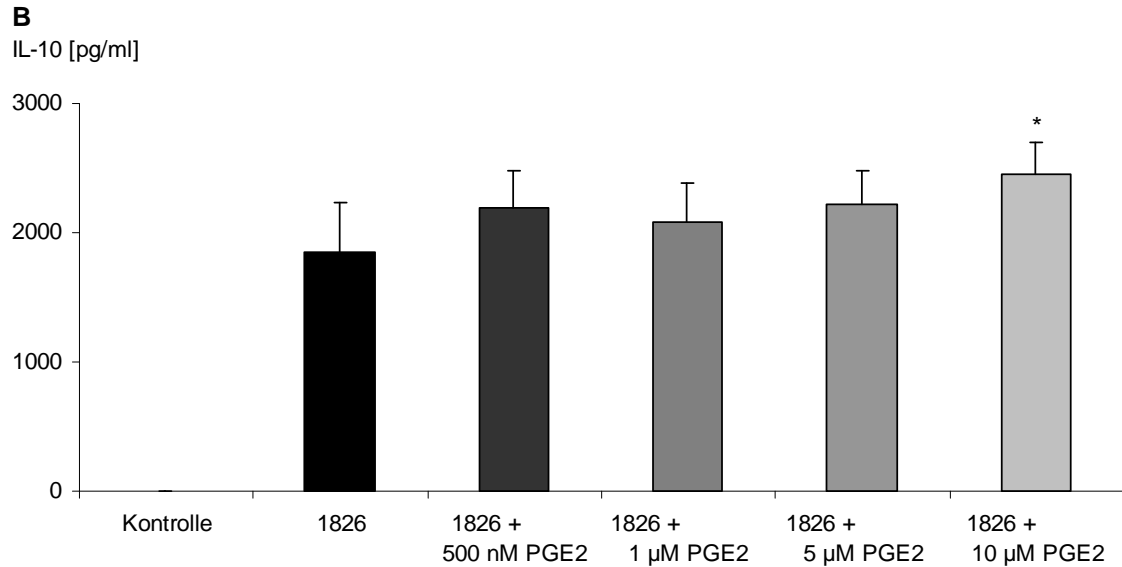
Stimulus, mit CpG-ODN 2216 (A) oder CpG-ODN 1826 (B) und aufsteigenden Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> inkubiert. Ein muriner IL-12p70-ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten (\*\* =  $p < 0,01$ ).

#### 3.5.2 Wirkung von Prostaglandin E<sub>2</sub> auf die Produktion von Interleukin-10 in murinen Leukozyten aus der Milz

Wie bei IFN- $\gamma$  und IL-12p70 wurde die durch CpG 2216 induzierte Produktion von IL-10 in Kokultur mit PGE<sub>2</sub> untersucht (Abb. 15 A). 500 nM PGE<sub>2</sub> in der Kultur verursachten einen Rückgang der IL-10-Produktion um 30 %, die Verdopplung der Konzentration von PGE<sub>2</sub> auf 1  $\mu$ M senkte die IL-10-Produktion um weitere 13 %. Höhere Konzentrationen konnten diesen Effekt nicht mehr verstärken.

Im Gegensatz zu CpG 2216 war für CpG 1826 eine Erhöhung der IL-10-Produktion zu beobachten (Abb. 15 B). Mit einer Konzentration von 500 nM PGE<sub>2</sub> in der Kultur konnte die IL-10-Menge um 18,7 % erhöht werden. Bei einer drastischen Steigerung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration auf 10  $\mu$ M wurde ein signifikanter Anstieg um 32,1 % erreicht.



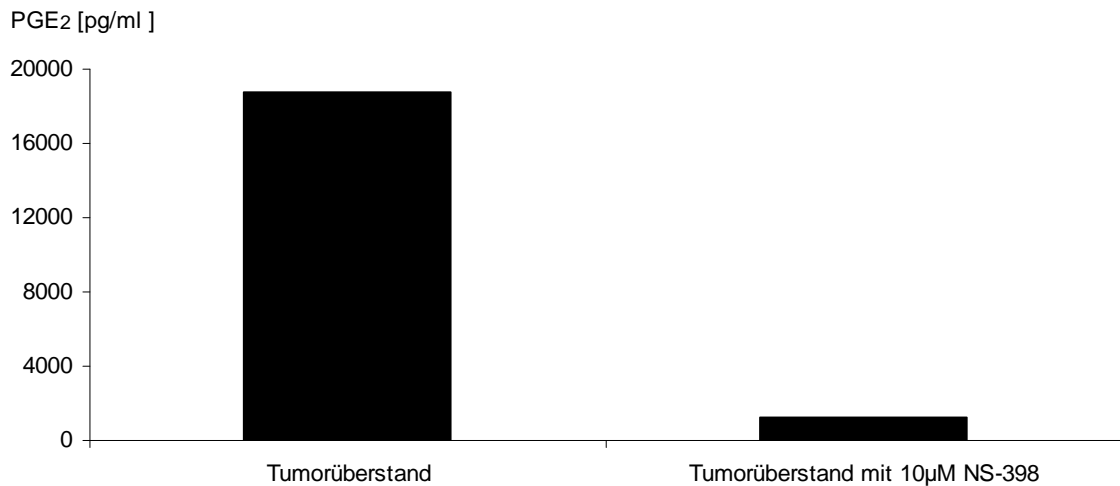


**Abb. 15: Prostaglandin E<sub>2</sub> hemmt die CpG 2216-induzierte Produktion von IL-10, aber steigert die CpG 1826-induzierte Produktion von IL-10 in Leukozyten aus der Milz.** Leukozyten wurden aus muriner Milz gewonnen und für 48 h ohne Stimulus, mit CpG 2216 (A) oder CpG 1826 (B) und aufsteigenden Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> inkubiert. Ein muriner IL-10-ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten (A: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; B: \* =  $p < 0,05$  im Vergleich zu „CpG 1826“).

### 3.6 Messung von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Tumorüberstand

In der Literatur wird beschrieben, dass Tumorzellen Prostaglandin E<sub>2</sub> bilden können [Falkowski, 2003]. Unter anderem haben COX-2-Inhibitoren eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen. Doch eine weitere wichtige Wirkung ist die Inhibierung der Produktion von PGE<sub>2</sub>. Um zu testen, ob die vorliegende Tumorzelllinie C-26 PGE<sub>2</sub> sezerniert, wurde eine quantitative PGE<sub>2</sub>-Bestimmung mittels eines ELISA durchgeführt. Hierfür wurde der bisher verwendete Tumorüberstand verwendet. Während die Kultivierung der Tumorzellen ohne COX-2-Inhibitor für 48 h hohe Werte an PGE<sub>2</sub> liefert (18,8 ng/ml PGE<sub>2</sub>), wird bei Kultivierung dieser Tumorzellen mit dem COX-2-Inhibitor NS-398 nur eine geringe Menge an PGE<sub>2</sub> gemessen (1,2 ng/ml PGE<sub>2</sub>, Abb. 16). Die Hemmung der in den Tumorzellen vorliegenden Cyclooxygenase-2 bewirkt somit auch eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion. Da in den oben beschriebenen Versuchen zellfreier Tumorüberstand verwendet wurde, können die hemmenden Effekte des Tumor-

überstands und die bedingte Umkehrung des Effekts durch Kokultur mit NS-398 größtenteils auf die Wirkung von PGE<sub>2</sub> zurückgeführt werden. Dies konnte durch die alleinige Gabe von rekombinantem PGE<sub>2</sub> und seiner, dem Tumorüberstand ähnlichen, Auswirkungen auf murine Leukozyten belegt werden.



**Abb. 16:** Die PGE<sub>2</sub>-Produktion von Tumorzellen kann mit NS-398 inhibiert werden. Tumorzellen wurden für 48 h in Anwesenheit von 10 µM NS-398 oder dessen Lösungsmittel Ethanol in gleicher Menge inkubiert. Im zellfreien Überstand wurde PGE<sub>2</sub> quantitativ mit Hilfe eines ELISA nachgewiesen. Gezeigt sind die Werte am Beispiel des für die Versuche verwendeten Tumorüberstands (n=1).

#### **3.7 Wirkung von intraperitoneal verabreichtem Parecoxib in Kombination mit CpG-Oligonukleotiden in einem murinen Kolonkarzinom-Modell**

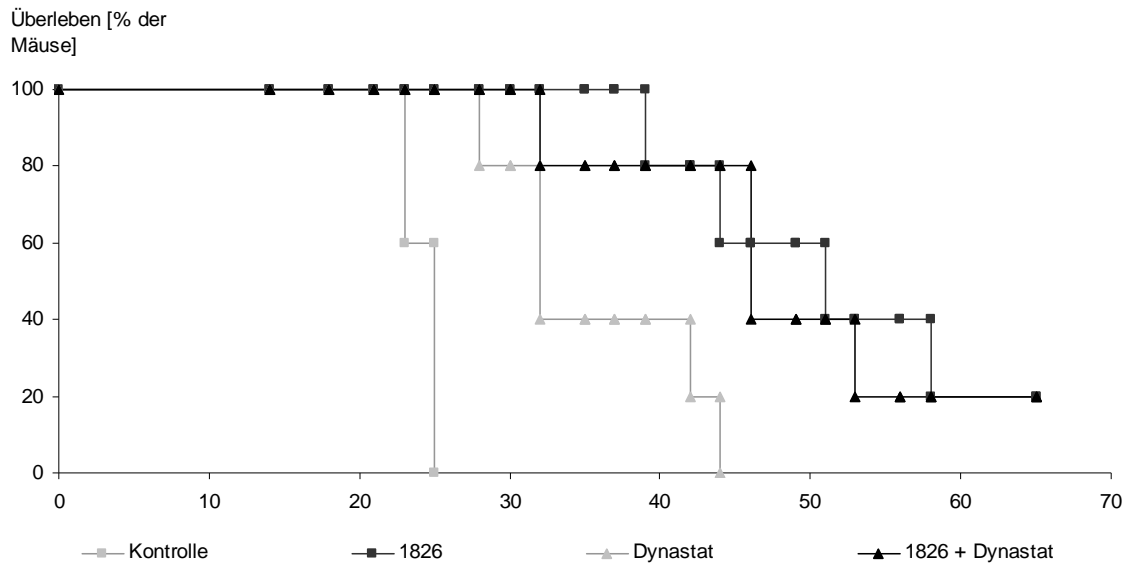
Nach den Erfolgen *in vitro* sollte nun die Kombination von peritumoral appliziertem CpG-ODN und einem COX-2-Inhibitor erprobt werden. COX-2-Inhibitoren sind stark lipophile Substanzen. Um eine toxische Wirkung durch ein lipophiles Lösemittel wie Ethanol oder DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) zu vermeiden, wurde der hydrophile, wasserlösliche COX-2-Inhibitor Dynastat verwendet. Dynastat wird in seiner inaktiven Form Parecoxib-Natrium appliziert und in der Leber zu dem lipophilen, aktiven Meta-

boliten Valdecoxib metabolisiert. Von dort erreicht Valdecoxib über den Blutweg den gesamten Körper.

Mäusen wurde ein Tumor mit der Tumorzelllinie C-26 subkutan in die rechte Flanke induziert. Ab dem Tag der Tumorinduktion wurde Dynastat täglich intraperitoneal appliziert. Die Messung der Tumorgröße erfolgte ab Tag 14. Ab diesem Tag wurde die wöchentliche, peritumorale Applikation von CpG 1826 begonnen. Gewicht und Tumorgröße der Mäuse wurden drei Mal pro Woche erhoben.

Alle Mäuse der untherapierten Kontrollgruppe verstarben zwischen Tag 23 und Tag 25 nach Tumorinduktion (Abb. 17). Dies zeigt das aggressive Wachstum dieser Zelllinie. Der Tumor wuchs innerhalb von drei Wochen auf eine durchschnittliche Größe von  $117 \text{ mm}^2$  an. In der Gruppe, die mit Dynastat behandelt wurde, wuchs der Tumor im Durchschnitt so schnell wie in der Kontrollgruppe (Abb. 18). Jedoch befanden sich die Mäuse in einem wesentlich besseren Allgemeinzustand und zeigten dadurch einen Überlebensvorteil. Die erste Maus starb an Tag 30, die letzte an Tag 46 nach Tumorinduktion. Alleinige Gabe von Dynastat hatte keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Tumorwachstums. Durch verschiedene Mechanismen wie Schmerzunterdrückung, Hemmung des infiltrativen Wachstums oder der Metastasierung konnte aber die Lebenserwartung der Mäuse verglichen mit der unbehandelten Gruppe signifikant verbessert werden ( $p = 0,003$ ).

### 3 ERGEBNISSE



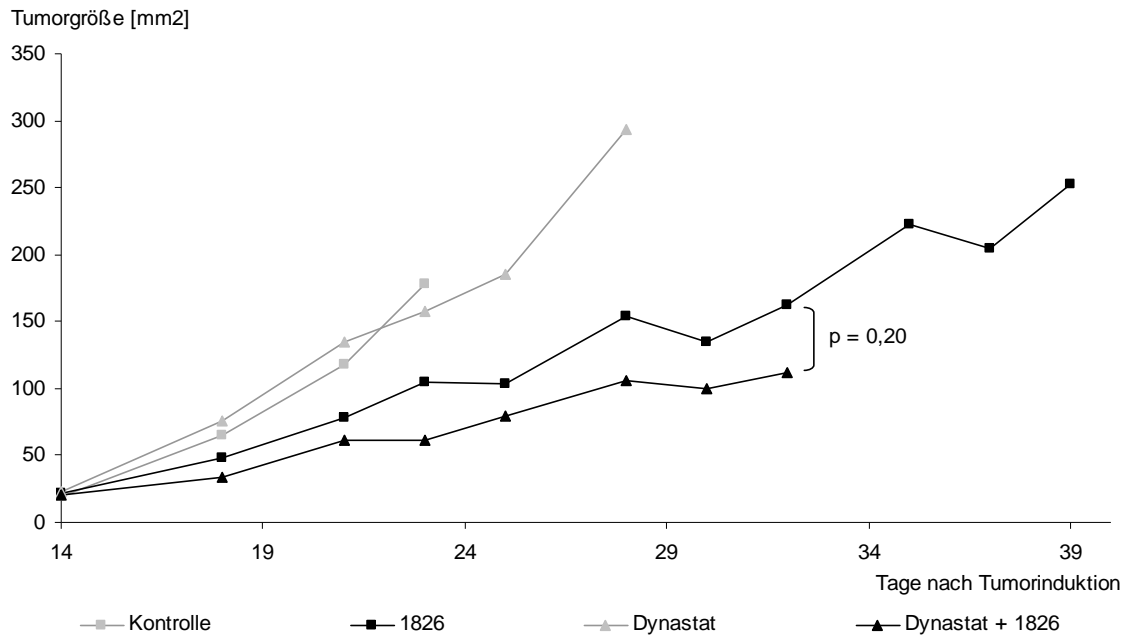
**Abb. 17: Überleben der tumortragenden Mäuse.** Mäusen wurde subkutan ein Tumor induziert. Dieser wurde ab dem Tag der Tumorinduktion mit 0,1 mg/d Dynastat und/oder ab Tag 14 nach Tumorinduktion mit 100 µg/Woche CpG 1826 therapiert. In den Gruppen, die mit CpG 1826 therapiert wurden, überlebte jeweils eine Maus bis Abschluss des Experiments an Tag 100. Gezeigt werden Daten aus jeweils 5 unabhängigen Experimenten.

Die peritumorale Gabe von CpG ist bereits in unserem Labor untersucht worden. Bei Beginn der Therapie um den Tag 5 nach Tumorinduktion konnte eine vollständige Tumorrogression gezeigt werden. Bei Verzögerung des Therapiebeginns ist es schwieriger, das Wachstum der Tumoren zu kontrollieren. In diesem Versuch sollte die alleinige Gabe von CpG mit der kombinierten Gabe von CpG und Dynastat verglichen werden. Daher wurde der Beginn der CpG-Therapie auf Tag 14 nach Tumorinduktion gelegt, um eine komplette Regression der Tumoren zu vermeiden und damit eine Unterscheidung der beiden Therapieformen zu ermöglichen.

In der CpG-therapierten Gruppe wuchs der Tumor deutlich langsamer als in der Kontrollgruppe. Die erste Maus verstarb am Tag 39. Eine Maus konnte trotz des späten Beginns der CpG-Therapie komplett den Tumor abstoßen und wies eine Lebenserwartung von mehr als 100 Tagen auf. Ebenso konnte in der Gruppe mit der Therapiekombination aus CpG und Dynastat eine Maus als geheilt betrachtet werden. Im Durchschnitt entsprach die Lebenserwartung der Tiere der letztgenannten Gruppe denen der mit CpG-therapierten Gruppe. Eine Steigerung der Lebenserwartung konnte somit durch zusätzliche Gabe eines COX-2-Hemmers nicht erreicht werden. Die durchschnittliche Größe

### 3 ERGEBNISSE

des Tumors in dieser Gruppe war stets kleiner als in der zugehörigen Kontrollgruppe mit alleiniger CpG-Therapie. Dieser Effekt zeigt jedoch keine statistische Signifikanz.



**Abb. 18: Verlauf der Tumorgröße.** Mäusen wurde subkutan ein Tumor induziert. Dieser wurde ab dem Tag der Tumorinduktion mit 0,1 mg/d Dynastat und/oder ab Tag 14 nach Tumorinduktion mit 100 µg/Woche CpG 1826 therapiert. Jede Kurve ist bis zum Ableben der ersten Maus in der jeweiligen Gruppe dargestellt. Gezeigt werden Daten aus jeweils 5 unabhängigen Experimenten.

### 4 Diskussion

#### 4.1 Nachweis von dendritischen Zellen und T-Zellen im Tumorgewebe

##### 4.1.1 Diskussion der angewandten Methoden: Tumorzellaufbereitung

Um die eingewanderten Leukozyten aus dem Tumorgewebe zu isolieren, wurde der Tumor zerkleinert und durch Kollagenase angedaut. Dies erleichterte die Extraktion der Zellen, die zum Teil an dem Tumorgewebe adhärten. Für die Aufreinigung der Leukozyten mittels Gradientenzentrifugation war es unerlässlich, eine homogene Einzellsuspension einzusetzen, da ein Verklumpen der Zellen eine Änderung der mittleren Dichte nach sich gezogen hätte und somit entweder nicht-leukozytäre Zellen an der Grenzschicht hängen geblieben wären oder verklumpte Leukozyten durch die Grenzschicht zentrifugiert worden wären. Daher wurde versucht, die Agglutination der Zellen durch Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zu vermindern, was weitgehend befriedigende Ergebnisse lieferte. In einem Teil der Versuche waren noch geringe Spuren von Tumorzellen in der zu untersuchenden Leukozytenpopulation vorhanden. Diese Zellen konnten allerdings im FACS durch FSC (*forward scatter*) und SSC (*side scatter*) größtenteils von der Population der Leukozyten unterschieden werden.

##### 4.1.2 Plasmazytoide dendritische Zellen liegen im Tumorgewebe vor und verlassen diesen nach lokaler Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden

Der Nachweis der Existenz von PDCs und MDCs im Tumor bestätigt Vermutungen, dass diese Zellen zwar im Tumor präsent sind, aber von diesem in einen Zustand der Anergie versetzt werden. Bei der Immuntherapie meiner Vorgänger war es notwendig CpG-ODN in die den Tumor tragende Flanke zu injizieren, um eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu erhalten [Heckelsmiller, 2002b]. Es ist dem Immunsystem also möglich, den Tumor zu bekämpfen, sobald es ihn als lokale Infektion erkennt. Durch Simulieren einer Infektion durch die Applikation von CpG-ODN in seine direkte Umgebung wird die Bekämpfung des Tumors erst ermöglicht. Die Applikation von dendritischen Zellen alleine in den Tumorrandbereich blieb ohne Erfolg.



In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass PDCs in humanen Kopf- und Hals-Tumoren zu finden sind [Hartmann, 2003a]. Es war nicht möglich, die tumorinfiltrierenden PDCs mit Hilfe von CpG zur Produktion von IFN- $\alpha$  anzuregen. Darüber hinaus zeigten diese PDCs eine herabregulierte TLR9-Expression. PDCs aus dem drainierenden Lymphknoten konnten allerdings durch CpG zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimuliert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Setzen eines immunstimulatorischen Reizes die PDCs nicht im Tumor verbleiben, sondern aus dem Tumor abwandern. Wahrscheinlich beginnen sie nach Kontakt mit einer ausreichenden Menge an Antigen in den Lymphknoten zu migrieren, um in den T-Zell-Gezeiten große Mengen an IFN- $\alpha$  zu produzieren [Cella, 1999]. Nach Stimulation mit CpG ist ihre Aufgabe die Aktivierung anderer Immunzellen in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort im Lymphknoten [Boonstra, 2003]. In Abwesenheit mikrobieller Stimuli wie CpG unterstützen PDCs die Entwicklung regulatorischer T-Zellen und wirken bei der Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Antwort mit. Dies könnte auch im Tumorgewebe der Fall sein, weshalb es für Tumoren sinnvoll ist, PDCs zu rekrutieren und damit eine effiziente Immunantwort zu unterdrücken [Liu, 2000; Zou, 2001].

Wie auch in einigen anderen Studien zeigen die vorliegenden Daten, dass bereits ohne CpG-Gabe MDCs im Tumorgewebe vorliegen. Es wird allerdings kontrovers diskutiert, ob die Einwanderung von MDCs in den Tumor mit einem positiven Effekt belegt ist [Furihata, 1993; Ishigami, 1998; Hillenbrand, 1999] oder mit einem negativen Verlauf korreliert [Thurnher, 1996]. Bell et al zeigten, dass unreife MDCs im Tumorgewebe eines Mammakarzinoms vorliegen, während reife oder aktivierte MDCs sich im Randbereich des Tumors gruppierten [Bell, 1999; Suzuki, 2002].

Aufgrund des ungehemmten Wachstums einiger Tumoren wie dem in dieser Arbeit verwendeten C-26-Modell ist anzunehmen, dass in den Tumor eingewanderte APCs ihre immunstimulierenden Fähigkeiten verloren haben. Vicari et al zeigten in einem ähnlichen Ansatz, dass MDCs in einem induzierten C-26-Tumor vorliegen, aber nur geringe Mengen oder gar kein CD40, CD86 und MHC-II exprimieren [Vicari, 2002]. Diese inaktiven DCs waren refraktär gegenüber Stimulation mit LPS, IFN- $\gamma$  und CD40-Ligand. Um diese DCs in einen aktivierten Zustand zu bringen, war es notwendig, sie *in vivo* gleichzeitig mit lokal appliziertem CpG und systemisch verabreichtem Anti-IL-10-Rezeptor Antikörper zu stimulieren. Der Tumorüberstand der verwendeten Zelllinie

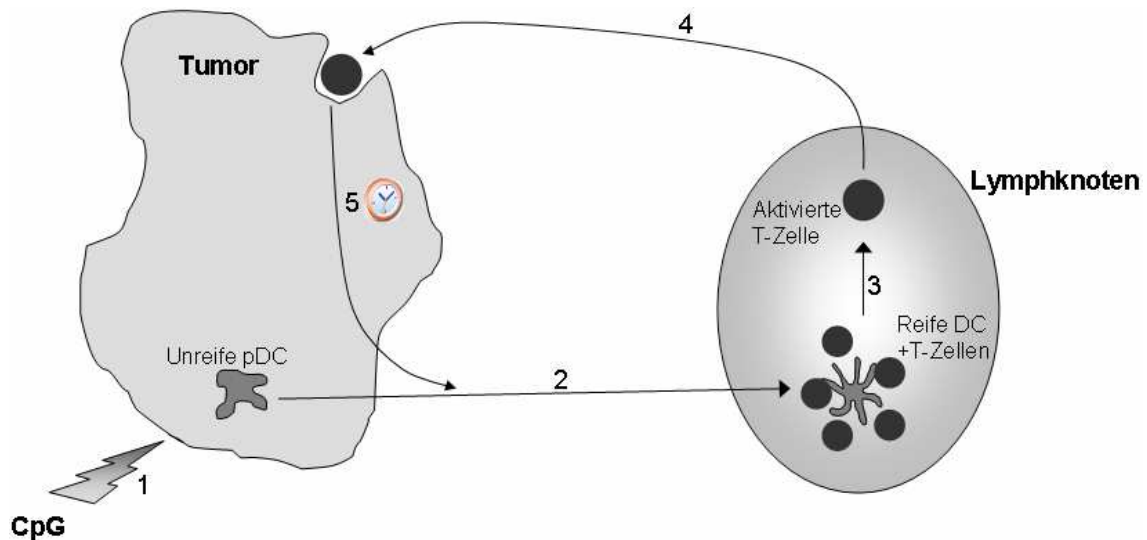
enthielt in hohen Mengen IL-10, was die Notwendigkeit der Kombination des Anti-IL-10-Rezeptor Antikörpers mit der CpG-vermittelten Immunstimulation erklärt. In unserem Modell zeigte sich allerdings bei nahezu allen Mäusen eine vollständige Tumorregrression nach alleiniger peritumorale Gabe von CpG-ODN. Eine Überprüfung der von uns verwendeten Zelllinie C-26 und einer Einzelzellsuspension eines primären, in der Maus gewachsenen Tumors zeigte zudem keine nachweisbaren Mengen an IL-10 (Daten nicht gezeigt). Ferner muss erwähnt werden, dass in unserem Modell die CpG-Therapie zwei Tage früher begann und die Menge des verwendeten CpG 20-fach höher war als in der Studie von Vicari und Mitarbeitern.

Die Hemmung einer tumorgerichteten Immunantwort wird durch den Tumor selbst erreicht, indem eine Anergie von tumorspezifischen T-Zellen und dendritischen Zellen induziert wird. Dieser Mechanismus imitiert die Toleranzinduktion in peripherem Gewebe, bei der dendritische Zellen eine maßgebliche Rolle spielen. Sofern die DC nicht durch Fremdartigen aktiviert wird, nimmt sie ständig Selbstantigen aus toten oder apoptotischen Zellen auf und präsentiert sie den T-Zellen [Steinman, 2003]. Bei T-Zellen, die auf das Selbstantigen reagieren, wird Apoptose eingeleitet. Erst der Kontakt mit größeren Mengen Fremdartigen oder das Setzen eines Entzündungsreizes aktiviert die DC und unterbricht ihre tolerogenen Eigenschaften.

Die Toleranz des Immunsystems gegenüber den Tumoren bewirken diese sowohl durch geringe Expression von MHC-Oberflächenmolekülen, als auch durch die Ausschüttung von  $T_H1$ -hemmenden Zytokinen wie IL-6, M-CSF [Menetrier-Caux, 1998], VEGF [Gabrilovich, 1996], IL-10 [Kim, 1995; Allavena, 1998], Prostaglandin  $E_2$  und TGF- $\beta$  [Tada, 1991; Alleva, 1994; Chouaib, 1997]. Die zytokin- und kontaktabhängige Immunsuppression einiger Tumoren erklärt auch die Ergebnisse meiner Vorgänger, warum die alleinige Injektion von dendritischen Zellen in den Tumorrandbereich ohne Erfolg blieb. Erst die Injektion von CpG-ODN in die direkte Nähe des Tumors setzt einen unspezifischen Entzündungsreiz. Damit verlieren die DCs ihre regulatorischen Eigenschaften und nehmen die Funktion von aktiven APCs auf.

### 4.1.3 T-Zellen wandern nach lokaler CpG-Applikation in das Tumorgewebe ein

Im Lymphknoten aktivieren dendritische Zellen T-Zellen mittels IFN- $\alpha$  und IL-12 (PDCs) und Antigenpräsentation auf MHC-II (MDCs). In der Arbeit von Heckelsmiller et al blieb nach Depletion der CD8 T-Zellen der antitumorale Effekt des CpG-ODN aus. Demnach ist es wichtig, dass die durch DCs aktivierten zytotoxischen T-Zellen in den Tumor gelangen. Nach Untersuchung des Tumors auf Vorhandensein von CD4 und CD8 T-Zellen trifft dies für beide Zelltypen zu (Abb. 19). Bis zum zweiten Tag nach CpG-Gabe steigt die Anzahl beider T-Zell-Subtypen kontinuierlich an. Da murine T-Zellen kein TLR9 exprimieren, sind sie nicht die primären Effektorzellen der CpG-Therapie. Vielmehr ist die Aktivierung durch dendritische Zellen notwendig, um eine antitumorale Immunantwort zu induzieren. Zum einen ist die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-12p70 in PDCs für die Aktivierung von CD8 T-Zellen verantwortlich. Dies ist gleichbedeutend mit einer Induktion einer T<sub>H</sub>1-Antwort [Boonstra, 2003]. Andererseits exprimieren murine MDCs im Gegensatz zu humanen MDCs ebenfalls TLR9. Daher muss davon ausgegangen werden, dass auch sie direkt an der durch CpG-ODN vermittelten Aktivierung der T-Zellen beteiligt sind.



**Abb. 19:** Nach Setzung des immunstimulatorischen Reizes mittels CpG-ODN (1) wird die unreife PDC aktiviert, woraufhin sie in den drainierenden Lymphknoten migriert (2). Dort präsentiert sie fremde Antigen und aktiviert damit unter anderem CD4 und CD8 T-Zellen (3). Diese verlassen daraufhin den Lymphknoten und wandern in Tumorgewebe ein, welches sie als fremd erkennen und abbauen können (4). Nach einiger Zeit hat der Tumor mit Hilfe verschiedener

*immunsupprimierender Zytokine die T-Zellen wieder in einen inaktiven Zustand versetzt (5). Sie verlassen den Tumor und migrieren wieder in den Lymphknoten.*

Die sezernierten Zytokine der durch DCs aktivierten CD4 T-Zellen vermitteln je nach Art der Stimulation eine T<sub>H</sub>1- oder eine T<sub>H</sub>2-Antwort. Damit wird ihnen eine wichtige Rolle in der Tumorabwehr zugeschrieben, da sie befähigt sind, ihrerseits CD8 T-Zellen zu aktivieren [Hung, 1998; Nishimura, 1999]. Diese wiederum wirken zytotoxisch und verstärken die tumorgerichtete Immunantwort durch Produktion diverser Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) [North, 1996; Delespesse, 1997].

### **4.2 Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf murine plasmazytoide dendritische Zellen**

#### **4.2.1 Diskussion der angewandten Methoden: Kultivierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen und muriner Interferon- $\alpha$ -ELISA**

Die Generierung von PDCs wurde das erste Mal von Brasel et al beschrieben [Brasel, 2000]. Die Differenzierung der Knochenmark-Vorläuferzellen in PDCs erfolgte durch Stimulation mit Flt-3 Ligand, einem Wachstumsfaktor im hämatopoetischen System. Während Beschreibungen anderer Arbeitsgruppen prozentuale Anteile der PDCs von bis zu 50 % beschrieben [Gilliet, 2002], fiel die hier durchgeführte Knochenmarkkultur meist mehr zugunsten der MDCs aus. Der Anteil der PDCs schwankte zwischen 20 und 35 % der Zellen.

Bei der Generierung der PDCs aus Vorläuferzellen des Knochenmarks spielt die Beschaffenheit des Kulturmediums eine wichtige Rolle. Zum einen dürfen nur Komponenten mit geringster Endotoxinbeimengung verwendet werden, da jede Form von Endotoxin (vornehmlich LPS) die Entwicklung von PDCs hemmt und gleichzeitig die Entstehung von MDCs fördert. Zum anderen scheint bei der PDC-Kultivierung die Verwendung des richtigen FCS von großem Stellenwert zu sein, da es chargenabhängig über den Erfolg der Kultur entscheiden kann. Veränderungen der Kulturbedingungen wie das Benutzen von Medium und FCS anderer Firmen und Zusätze wie Glucose,

Ethanol oder L-Glutamat zur Kultur erbrachten allerdings keine signifikanten Unterschiede. Dies zeigt, dass das System zur Generierung von murinen PDCs sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen ist.

Trotz der verhältnismäßig geringen Anzahl von PDCs in der Kultur war jedoch die Detektion von murinem IFN- $\alpha$  möglich. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche war kein kommerzieller IFN- $\alpha$ -ELISA erhältlich. Daher musste die Zusammenstellung der verwendeten Stoffe nach einem Protokoll von H. Hochrein erfolgen. Aufgrund des verwendeten Standards wurde die Menge an IFN- $\alpha$  in Units/ml angegeben. Unter Berücksichtigung der Aktivität des verwendeten Standards von  $4,3 \times 10^6$  U/ml ergeben sich für 100 Units eine Menge von 23,3 ng/ml. Damit induziert CpG-ODN 2216 in  $2 \times 10^5$  Zellen eine Menge von 197 ng/ml IFN- $\alpha$ . Verglichen mit IFN- $\alpha$ -ELISAs im humanen System sind diese Werte extrem hoch (durchschnittlich 4-8 ng/ml IFN- $\alpha$  aus  $2 \times 10^5$  humanen PDCs [Hartmann, 2003b]).

Dieser Effekt könnte auf eine PDC-MDC-Interaktion zurückzuführen sein. Murine MDCs exprimieren, im Gegensatz zu humanen MDCs, ebenfalls TLR9 und sprechen damit direkt auf CpG-ODN an. Die gleichzeitige Aktivierung von MDCs durch CpG-ODN bewirkt die Sekretion verschiedener Zytokine wie IFN- $\gamma$ , die ihrerseits auf die PDCs stimulierend wirken und so die PDC-vermittelte IFN- $\alpha$ -Sekretion potenzieren können.

### **4.2.2 CpG-Typ A-ODN induziert große Mengen an Interferon- $\alpha$ in murinen plasmazytoiden dendritischen Zellen**

Im humanen System existieren drei verschiedene Klassen von Oligonukleotiden, die Immunzellen auf unterschiedliche Weise stimulieren. Humane PDCs und B-Zellen sind die einzigen Immunzellen, die TLR9 exprimieren und damit direkt auf CpG-ODN ansprechen. CpG-Typ A-ODN wie CpG 2216 stimulieren vornehmlich PDCs zur Produktion von IFN- $\alpha$ , was zu starker Aktivierung und IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen führt. Die Zielzelle von CpG-Typ B-ODN wie CpG-ODN 2006 ist vornehmlich die B-Zelle, die zur Ausreifung und Immunglobulinsynthese aktiviert wird. Allerdings bewirken CpG-Typ B-ODN auch ein verlängertes Überleben und die Ausreifung von PDCs. Eine Zwischenstellung nehmen die Typ C ODN ein, die sowohl PDCs

zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimulieren als auch B-Zellen zur Ausreifung zu Plasmazellen aktivieren [Hartmann, 2003b].

Die Wirksamkeit verschiedener CpG-ODN wurde auf murinen PDCs in Kultur untersucht. CpG 2216 induziert große Mengen an murinem IFN- $\alpha$ . Dies entspricht den Beobachtungen im humanen System. Das Motiv „ATCGTC“ des ODN 2216 ist für die optimale Erkennung in humanen PDCs konzipiert. Allerdings besitzt das murine CpG-Typ A-ODN 1585 auch NK-Zell-aktivierende Eigenschaften und weist eine geringere PDC-Stimulation als CpG 2216 auf [Ballas, 2001]. Die CpG-Typ B-ODN wie 2006 und dessen murine Form 1826 haben erwartungsgemäß eine geringere Wirkung auf murine PDCs. Das CpG-ODN 1826 weist eine andere Basensequenz als CpG-ODN 2006 auf. Dies bewirkt eine optimale Immunstimulation im murinen System und bewirkt nachweislich eine doppelt so hohe IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs.

Im Gegensatz zu Erkenntnissen aus dem humanen System bleibt die große IFN- $\alpha$ -induzierende Wirkung von Typ C ODN im murinen System aus. Möglicherweise muss, wie bei den anderen CpG-ODN, eine optimale Sequenz zur Stimulation des Immunsystems der Maus gefunden werden. Es ist aber auch möglich, dass Typ C-ODN aufgrund verschiedener Einflüsse ihre charakteristische Aktivität im murinen System nicht entfalten können. Es bleibt zu testen, ob die B-Zell-aktivierenden Eigenschaften dieser ODN auf murine B-Zellen ebenfalls eingeschränkt sind, oder ob diese Oligonukleotide wie beim Menschen auch B-Zellen in hohem Maße aktivieren können.

### **4.3 Tumorüberstand und Prostaglandin E<sub>2</sub> schwächen die Interferon- $\alpha$ -Produktion in murinen plasmazytoiden dendritischen Zellen**

Heckelsmiller et al zeigten, dass die frühe CpG-Therapie bei kleinen Tumoren die meist vollständige Regression des Tumors bewirkt. Ein neues Konzept zur Generierung von MDCs *in vitro* und deren Ausreifung durch Zugabe von bestrahlten Tumorzellen und CpG-ODN wurde für die Behandlung von großen Tumoren etabliert und erfolgreich getestet [Heckelsmiller, 2002a]. Die Übertragbarkeit auf das humane System ist allerdings nicht ohne Weiteres möglich, da die Behandlung von Tumoren im Menschen sich als schwieriger erweist [Trefzer, 2001]. Daher werden unterschiedliche Verfahren er-

probt, um die Wirksamkeit von CpG-ODN im menschlichen System zu verbessern und durch niedrigere Dosierung toxische Nebenwirkungen zu minimieren. Verschiedene Studien beschrieben eine Verbesserung des immunstimulatorischen Effekts von CpG-ODN durch Kombination mit Toxinen, Antikörpern oder Chemotherapie [Vicari, 2002; Ishii, 2003; van Ojik, 2003; Weigel, 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Cyclooxygenase-2 in Tumorzellen und der Effekt von Prostaglandin E<sub>2</sub>, eines seiner wichtigsten Produkte, in der Entstehung und Abwehr von Tumoren untersucht.

Viele Tumoren exprimieren verstärkt Cyclooxygenase-2, ein Enzym, dessen Expression im Menschen erst durch Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren, Zytokine, Karzinogene und andere Faktoren heraufreguliert wird. Verschiedene Studien zeigten, dass die Expression von COX-2 mit stärkerer Invasivität des Tumors und einer erniedrigten Lebenserwartung des Patienten korreliert [Sheehan, 1999; Stoehlmacher, 2003]. Im Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen vermindert die regelmäßige Einnahme von COX-Inhibitoren das Tumorwachstum und wirkt präventiv auf die Entstehung von Neoplasien [Church, 2003; Rahme, 2003].

Da dendritischen Zellen eine wichtige Funktion in der Abwehr von Tumoren zukommt, wurde von Sharma et al untersucht, ob die COX-2-Expression sich hemmend auf die immunstimulatorischen Eigenschaften der MDCs auswirkt [Sharma, 2003]. Tatsächlich geht die erhöhte COX-2-Expression mit einem inaktiveren Phänotyp, verminderter Fähigkeit zur Antigenpräsentation und verringerter Produktion von proinflammatorischen Zytokinen einher. Ferner konnte dies auf eine vermehrte Produktion von PGE<sub>2</sub> zurückgeführt werden. Da der antitumorale Effekt von CpG-ODN vor allem mit der Aktivierung von PDCs und deren Fähigkeit, hohe Mengen an IFN- $\alpha$  zu bilden, zu begründen ist, wurde untersucht, welche kontaktunabhängigen Wirkungen Tumoren auf diese Zellpopulation haben.

Tumorüberstand der Zelllinie C-26 hat einen stark hemmenden Effekt auf die PDC-vermittelte IFN- $\alpha$ -Produktion. Um zu testen, ob dieser Effekt auf die Aktivität der Cyclooxygenase-2 zurückzuführen ist, wurde den Tumorzellen zu Beginn der Kultivierung der COX-2-Inhibitor NS-398 zugegeben. Der hemmende Effekt des T $\bar{U}$  auf die IFN- $\alpha$ -Produktion ließ sich dadurch teilweise abschwächen. Jedoch ließ sich die im-

munsupprimierende Wirkung des Tumorüberstands nicht vollständig aufheben, was durch das Vorhandensein von COX-2-unabhängigen Faktoren wie TGF- $\beta$  oder VEGF zu erklären wäre.

Prostaglandin E<sub>2</sub> ist das Hauptprodukt der Cyclooxygenase-2. Unter der Annahme, dass das Zytokin für die immunmodulatorischen Eigenschaften des Tumorüberstands maßgeblich verantwortlich ist, wurde rekombinantes PGE<sub>2</sub> zu murinen, mit CpG aktivierten PDCs gegeben. Es zeigte sich ein stark inhibitorischer Effekt auf die Produktion von IFN- $\alpha$ , der mit der PGE<sub>2</sub>-Konzentration korrelierte. Es ist bereits bekannt, dass PGE<sub>2</sub> die MHC-II-Expression auf MDCs reduziert, wodurch deren stimulatorisches Potential gegenüber T-Zellen vermindert ist [Harizi, 2001]. Interessanterweise wurde beschrieben, dass die DC-Kultur endogen gebildetes PGE<sub>2</sub> enthielt, das von DCs gebildet worden sein musste. Erfolgreiche Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion durch Indomethacin legte den Verdacht nahe, dass COX-1 für dessen Produktion verantwortlich war und demonstriert die Eigenschaften der COX-1 als *housekeeping enzyme*. Die Zugabe des COX-2-spezifischen Inhibitors NS-398 zu den MDCs ließ die IL-12-Produktion ansteigen. In einer anderen Publikation zeigten Harizi et al, dass die PGE<sub>2</sub>-vermittelte Inhibition der DCs und deren Produktion von IL-12 durch IL-10 vermittelt ist [Harizi, 2002].

Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass PGE<sub>2</sub> durch die Induktion von IL-10 in Monozyten und die Inhibition der Synthese von bioaktivem IL-12p70 die Immunantwort in eine T<sub>H</sub>2-Antwort wandelt [Groux, 1998; Kalinski, 2001]. Dies ist in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, da die Unterdrückung einer T<sub>H</sub>1-Antwort mit verminderter Sekretion von IFN- $\alpha$  einhergeht. Ob PGE<sub>2</sub> einen direkten Effekt auf PDCs hat oder ob die Hemmung der von MDCs produzierten Zytokine einen negativen *feedback loop* auslöst, konnte nicht beantwortet werden, da Methoden zur Aufreinigung und Trennung beider Zellpopulationen nicht zur Verfügung standen.



### **4.4 Die Wirkung von Tumorüberstand und Prostaglandin E<sub>2</sub> auf murine Leukozyten aus der Milz**

#### **4.4.1 Tumorüberstand und Prostaglandin E<sub>2</sub> hemmen die CpG-induzierte Produktion von Interferon- $\gamma$ und Interleukin-12p70 in murinen Leukozyten aus der Milz**

Bei der immunologischen Erkennung von Tumoren und viralen Infektionen wird eine T<sub>H</sub>1-gerichtete Immunantwort ausgelöst. Daran sind eine Vielzahl von Immunzellen beteiligt. PDCs wandern nach Antigenkontakt in den drainierenden Lymphknoten und produzieren IFN- $\alpha$  und IL-12. Erkenntnisse, dass IL-12 wichtig für die antitumorale Immunantwort ist, wurden unter anderem von Melero et al gewonnen, die DCs mit einem für IL-12 kodierenden Adenovirus transfiziert haben. Diese DCs waren durch die endogene Zytokinproduktion in der Lage, den Tumor wirksam zu bekämpfen [Melero, 1999]. Aufgrund seiner Fähigkeit, die Ausdifferenzierung von CD4 T-Zellen in T<sub>H</sub>1-Zellen zu bewirken und wirkungsvoll NK-Zellen zu aktivieren, ist IL-12 wichtig für die Initiation einer tumorgerichteten Immunantwort. Es wird hauptsächlich von B-Zellen, Makrophagen und PDCs gebildet und bewirkt in T-Lymphozyten und NK-Zellen die Sekretion von IFN- $\gamma$ . Dieses wirkt wiederum stimulierend auf andere Immunzellen wie Monozyten, die daraufhin aktiviert werden und sich in Makrophagen ausdifferenzieren. Aktivierte Makrophagen sezernieren ihrerseits Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12.

Es ist jedoch bekannt, dass Makrophagen neben ihrer zytotoxischen Eigenschaften auch einen immunsupprimierenden Einfluss auf T-Lymphozyten [Varesio, 1980] und NK-Zellen [Young, 1986] haben. Dieser Effekt ist unter anderem auf sezerniertes Prostaglandin und IL-10 aus Makrophagen zurückzuführen. PGE<sub>2</sub> ist ein potenter Induktor von IL-10, das von einer Vielzahl von Zellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Zellen gebildet wird. Wie PGE<sub>2</sub> inhibiert auch IL-10 die Produktion von IL-12 in dendritischen Zellen und vermindert deren stimulatorisches Potential [Fiorentino, 1991]. Durch diese Mechanismen wird der normalerweise sich selbst verstärkende Prozess der Initiation einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort durchbrochen.

Es wurde untersucht, ob wichtige inflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-12p70 durch Mediatoren im Tumorüberstand vermindert sezerniert werden. Ohne Stimulation mit CpG-ODN waren in der Gesamtzahl der Milzzellen keine Mengen an IFN- $\gamma$  und IL-12 detektierbar. Um messbare Werte dieser Zytokine zu erhalten, war die Stimulation mit CpG-ODN notwendig. CpG 2216 stimulierte Milz-Leukozyten zur Produktion dieser beiden Mediatoren weitaus mehr als CpG 1826. Dies ist in Übereinstimmung mit den charakteristischen Eigenschaften der beiden Oligonukleotide. CpG 2216 als starker Initiator einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort ist befähigt, die Produktion T<sub>H</sub>1-stimulierender Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-12 zu bewirken. CpG 1826 besitzt eine schwächere T<sub>H</sub>1-stimulierende Komponente. Erwartungsgemäß hemmt Tumorüberstand die Produktion beider Zytokine nach Stimulation mit CpG 2216 oder CpG 1826. Dass der Effekt zum größten Teil auf die COX-2-abhängige Produktion von PGE<sub>2</sub> zurückzuführen ist, zeigt die geringere supprimierende Wirkung des mit NS-398 kultivierten Tumorüberstands. Ferner zeigte sich eine von der Konzentration des verwendeten Tumorüberstands abhängige Immunsuppression. Da die Zellen in verhältnismäßig viel Kulturmedium gehalten wurden, ist die Konzentration der Mediatoren wahrscheinlich deutlich geringer als im lebenden Tumorgewebe. Deshalb ist anzunehmen, dass *in vivo* die Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-12 von tumorinfiltrierenden Leukozyten nahezu komplett gehemmt wird.

Zur Bestätigung der Vermutung, dass die beobachteten Effekte auf den wichtigsten Mediator der Cyclooxygenase-2 zurückzuführen sind, wurde PGE<sub>2</sub> in ansteigenden Konzentrationen zu den Milz-Leukozyten gegeben. Wie vermutet sind die Mengen an IFN- $\gamma$  und IL-12 in der Kultur nach Zugabe von PGE<sub>2</sub> vermindert. Allerdings lässt sich, im Gegensatz zum Tumorüberstand, kein titrierbarer Effekt zeigen. Dies kann daran liegen, dass die geringste verwendete Menge an PGE<sub>2</sub> von 500 nM bereits an alle Rezeptoren gesättigt gebunden ist.

Es besteht die Möglichkeit, dass geringe Mengen an PGE<sub>2</sub> die Sekretion weiterer immunmodulatorischer Mediatoren (endogenes PGE<sub>2</sub>, IL-10) bewirken, die die immunsupprimierende Wirkung potenzieren. Allerdings zeigte die Arbeitsgruppe um Chen, dass CpG-ODN Milz-Leukozyten ebenfalls zur PGE<sub>2</sub>-Produktion aktiviert [Chen, 2001b]. Außerdem wurde durch CpG die Expression von COX-2-mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*) und COX-2-Protein in den Leukozyten bewirkt. Dies wurde auf die

CpG-bedingte Aktivierung von NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor  $\kappa$ B*) zurückgeführt, das die Induktion von COX-2 bewirkt. Damit werden messbare Mengen an PGE<sub>2</sub> in der Milz-Leukozytenpopulation gebildet. Dieses endogen produzierte PGE<sub>2</sub> schwächt die Wirkung von CpG-ODN ab und reguliert so dessen proinflammatorische Effekte.

### **4.4.2 Tumorüberstand und Prostaglandin E<sub>2</sub> haben gleichgerichtete Effekte mit CpG 2216, jedoch entgegengesetzte Effekte mit CpG 1826 bezüglich der Interleukin-10-Produktion in murinen Leukozyten aus der Milz**

CpG-ODN 2216 bewirkt in Milz-Leukozyten eine mäßige Ausschüttung von IL-10. Durch die Zugabe von 10 % Tumorüberstand wird die IL-10-Produktion signifikant gehemmt. Da die Zugabe von NS-398 zu den Tumorzellen diesen Effekt weiter verstärkt, kann die Hemmung der IL-10-Produktion nicht allein auf PGE<sub>2</sub> zurückgeführt werden. Die Zugabe des COX-2-Inhibitors zu den Tumorzellen bewirkt eine geringere Menge an PGE<sub>2</sub> im Tumorüberstand. Da jedoch gezeigt wurde, dass bereits geringe Mengen von PGE<sub>2</sub> die IL-10-Produktion hoch signifikant vermindern, ist es wahrscheinlich, dass andere Mediatoren im Tumorüberstand die IL-10-Produktion mitbeeinflussen und die Wirkung von Prostaglandin E<sub>2</sub> unterstützen. Die Möglichkeit, dass PGE<sub>2</sub> in den Leukozyten unabhängig von COX-2 gebildet wird, konnte durch die Versuche von Chen et al ausgeschlossen werden.

Die verminderte IL-10-Produktion nach PGE<sub>2</sub>-Zugabe steht zunächst im Widerspruch zur synergistischen Funktion von PGE<sub>2</sub> und IL-10. Aman et al haben jedoch herausgefunden, dass IFN- $\alpha$  die Produktion von IL-10 in CD4 T-Zellen und Monozyten bewirken kann [Aman, 1996]. Da PDCs die hauptsächlichen Produzenten von Typ I-Interferonen sind, kommt ihnen damit zur T<sub>H</sub>1-stimulierenden Funktion zusätzlich eine Rolle in der T<sub>H</sub>2-Immunantwort zu. Feng et al zeigten, dass dieser Effekt auf CD4 T-Zellen beschränkt ist [Feng, 2002]. Typ I-Interferone stimulieren die IL-10-Produktion in aktivierten T-Zellen, aber hemmen die IL-10 mRNA und Protein-Produktion in Makrophagen.

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> die IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs hemmt. Aufgrund dieser Fakten ist der kontroverse Effekt von Prostaglandin auf die IL-10-Produktion in Leukozyten aus der Milz zu erklären. Die verminderte IFN- $\alpha$ -

Produktion durch PGE<sub>2</sub> bewirkt eine geringere IL-10-Produktion in CD4 T-Zellen. Obwohl Harizi et al die immunstimulatorische Komponente von Prostaglandin E<sub>2</sub> vor allem auf die Induktion von IL-10 zurückführten [Harizi, 2002], konnte die Arbeitsgruppe um Kuroda einen direkten, von IL-10 unabhängigen Effekt von PGE<sub>2</sub> nachweisen [Kuroda, 2000]. PGE<sub>2</sub>-vermittelte Inhibierung von IFN- $\gamma$  in Milzzellen konnte nicht durch Blockade von IL-10, IL-4 oder TGF- $\beta$  mittels Antikörper aufgehoben werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Hemmung von IFN- $\gamma$  durch PGE<sub>2</sub> in Milzzellen aus Balb/c-Mäusen stärker als bei anderen Mausstämmen (C57Bl/6, C3H/HeN) war. Dieser Effekt war durch verminderte IL-12p70-Produktion durch antigenpräsentierende Zellen zu erklären. Während in dieser Studie die Leukozyten durch SAC (Staphylococcus aureus Cowan-I) stimuliert wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit ein vergleichbarer Effekt mit CpG-ODN gezeigt werden. Da der Tumorüberstand einen Anteil von 10 % in den verwendeten Leukozyten-Überständen hat, wäre es denkbar, dass vom Tumor sezerniertes IL-10 die gemessenen IL-10-Werte beeinflusst hätte. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da kein IL-10 im Tumorüberstand detektierbar war.

Mit CpG 1826 ergeben sich nach Zugabe von 10 % Tumorüberstand zur Leukozytenkultur vergleichbare Ergebnisse wie für CpG 2216. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass - bezüglich der Produktion von IL-10 - die Fähigkeit von CpG 1826 die des CpG 2216 übertrifft. Dafür ist die stärker ausgeprägte Aktivierbarkeit einer T<sub>H</sub>2-Antwort durch CpG-Typ B-Oligonukleotide verantwortlich. CD4 T-Zellen werden nach Kontakt mit CpG-ODN 1826 aktiviert und produzieren vermehrt T<sub>H</sub>2-Zytokine wie IL-10. Der hemmende Effekt des Tumorüberstands konnte in den Versuchen mit CpG 1826 mit dem COX-2-spezifischen Inhibitor NS-398 verstärkt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung der IL-10-Produktion nicht ausschließlich auf Produkte der COX-2 zurückzuführen ist. Vielmehr zeigen die Daten mit CpG 2216, dass eine Zugabe des COX-2-Inhibitors alleine bereits eine signifikante Hemmung der IL-10-Produktion bewirkt. Da diese Beobachtung mit CpG 1826 jedoch nicht gemacht werden konnte, lässt sich die IL-10-Verminderung durch die alleinige Anwesenheit des NS-398 nicht ausreichend erklären. Vielmehr müssen noch andere im Tumorüberstand enthaltene Mediatoren wie TGF- $\beta$  oder IL-6 dafür verantwortlich sein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit CpG 2216 bewirkt PGE<sub>2</sub> in Kombination mit CpG-ODN 1826 eine geringgradige Erhöhung der IL-10-Produktion. Diese ist jedoch

erst ab einer Menge von 10  $\mu\text{M}$   $\text{PGE}_2$  signifikant. CpG 1826 bewirkt in PDCs eine geringere Sekretion von Typ I-Interferonen und induziert darüber hinaus verstärkt eine  $\text{T}_\text{H}2$ -gerichtete Immunantwort. Damit ist der entgegengesetzte Effekt zum CpG 2216 zu erklären. CD4 T-Zellen werden durch Kombination von  $\text{PGE}_2$  und CpG-Typ B-ODN zur Synthese  $\text{T}_\text{H}2$ -stimulierender Zytokine angeregt. Die Fähigkeit der CpG-Typ B-ODN, in PDCs die IFN- $\alpha$ -Produktion zu induzieren, ist deutlich geringer. Damit ist auch der immunsupprimierende Effekt von  $\text{PGE}_2$  auf die PDCs deutlich geringer ausgeprägt.

### **4.5 Prostaglandin $\text{E}_2$ befindet sich in großen Mengen im Tumorüberstand**

Die bisher gewonnenen Ergebnisse gingen von der Annahme aus, dass  $\text{PGE}_2$  im Tumorüberstand vorkommt. Darüber hinaus wurde vorausgesetzt, dass die Tumorzelllinie das Enzym COX-2 heraufreguliert hat. Den Nachweis von COX-2-Protein und von COX-2-kodierender mRNA in der Tumorzelllinie C-26 erbrachten Falkowski et al [Falkowski, 2003]. Ferner wurde der zytotoxische Effekt von Diclofenac, einem unspezifischen Cyclooxygenase-Hemmer, auf die Zelllinie untersucht. In großen Mengen von bis zu 1000  $\mu\text{M}$  Diclofenac in der Zellkultur zeigte sich ein zytotoxischer Effekt des Cyclooxygenase-Hemmers und eine Hemmung des Tumorzell-Wachstums. Dieser Effekt wurde auch in einer anderen Studie beschrieben [Williams, 2000].

Da verschiedene COX-2-Hemmer eine unterschiedliche Zytotoxizität aufweisen und diese auch in nicht-COX-2-exprimierenden Tumorzelllinien zu beobachten ist, konnte aber eine COX-2-vermittelte Abhängigkeit des zytotoxischen Effektes ausgeschlossen werden. In der oben angeführten Studie wurden tumortragende Mäuse mit Celecoxib, einem spezifischen COX-2-Inhibitor, behandelt. Während die Behandlung mit Celecoxib das Tumorstadium verminderte, zeigten sich hier keine zytotoxischen Effekte auf gesundes Darmgewebe. Außerdem waren die gemessenen Plasmaspiegel von Celecoxib mit 1,5 - 3,5  $\mu\text{M}$  zehnfach niedriger als die Konzentration, bei der ein zytotoxischer Effekt auf die Tumorzellen beobachtet wurde. Daraus schlossen Williams et al, dass die antitumoralen Effekte von COX-2-Inhibitoren nicht auf ihre direkte Zytotoxizität, son-

dem auf eine Beeinflussung der Interaktion von Tumorzellen und umgebenden Gewebe zurückzuführen ist.

Die  $IC_{50}$  (mittlere inhibitorische Konzentration) für den spezifischen COX-2-Inhibitor NS-398 wurde bezüglich der Hemmung der Cyclooxygenase-2 mit  $1,77 \mu\text{M}$  angegeben. Daher wurde mit  $10 \mu\text{M}$  NS-398 in der Tumorzellkultur eine Konzentration gewählt, die geringe zytotoxische Effekte mit sich bringt, aber die COX-2 in Tumorzellen effektiv hemmt. Die Messung von  $\text{PGE}_2$  im Tumorüberstand ergab ohne Zugabe von NS-398 Werte im Bereich von  $18 \text{ ng/ml}$ . Die Zugabe von NS-398 senkte die  $\text{PGE}_2$ -Produktion der Tumorzellen um rund 85 %. Sombroek et al untersuchten die Eigenschaften von Tumorüberstand, der aus primären Tumoren stammte [Sombroek, 2002]. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Prostanoiden die dominierende Rolle in den Schutzmechanismen primärer Tumoren bilden, während Tumorzelllinien die Fähigkeit zur Sekretion weitgehend verloren haben. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit weisen hingegen darauf hin, dass Tumorzellen einer Zelllinie durchaus in der Lage sind, Prostaglandin in hohen Mengen zu sezernieren. Die Hemmung dieser Sekretion durch NS-398 ist darauf zurückzuführen, dass  $\text{PGE}_2$  von der in C-26-Zellen verstärkt exprimierten COX-2 gebildet wird.

### 4.6 *In vivo*-Anwendung von Cyclooxygenase-2-Inhibitoren

In unserer Arbeitsgruppe konnten mit der alleinigen peritumoralen Applikation von CpG-ODN erfolgreich Tumoren zur Regression gebracht werden. Allerdings war der antitumorale Effekt beschränkt auf kleine Tumoren. Da die C-26-Zellen eine sehr schnell wachsende Tumorzelllinie sind, konnte nur bis zu sieben Tage nach Tumorduktion eine vollständige Remission der Tumoren erreicht werden. Um zu testen, ob die Koadministration des COX-2-Inhibitors Parecoxib die Wirkung von CpG 1826 verstärken kann, wurde daher erst 14 Tage nach der Injektion der Tumorzellen mit der CpG-Therapie begonnen. Innerhalb dieser Zeitspanne ist das Tumorstadium soweit fortgeschritten, dass CpG alleine keine vollständige Regression des Tumors bewirken konnte, was ansonsten einen zusätzlichen antitumoralen Effekt von Parecoxib verdeckt hätte.

Dennoch zeigten sowohl in der mit CpG behandelten Gruppe als auch in der Gruppe, die kombiniert mit CpG und Parecoxib behandelt wurde, jeweils eine Maus eine komplette Regression des Tumors.

Hinsichtlich der Tumorgröße weist die Behandlung mit Parecoxib keinen Vorteil zur unbehandelten Gruppe auf. Die Tumorgröße nimmt wie in der Kontrollgruppe stetig zu. Da die Mäuse, die versterben, meist den größten Tumor in der Gruppe tragen, würde mit dem Tod jeder Maus die Kurve der Tumorgröße erheblichen Schwankungen unterliegen. Deshalb wurden die Werte nur bis zum Tod der jeweils ersten Maus einer Gruppe angezeigt. Das Tumorwachstum der Gruppen, die mit CpG behandelt wurden, ist im Vergleich zu ihren beiden Kontrollgruppen deutlich geringer. Allerdings zeigt sich im Hinblick auf die Tumorgröße kein deutlicher Vorteil der kombinierten Therapie im Vergleich zur Monotherapie mit CpG. Obwohl die Kurve der Gruppe, die mit CpG und Parecoxib behandelt wurde, kontinuierlich unter der Gruppe der nur mit CpG behandelten Mäuse liegt, ließ sich keine statistische Signifikanz zwischen beiden Gruppen ermitteln. Es wurden Nachversuche unter den selben Bedingungen durchgeführt. Doch auch nach Erhöhung der Anzahl der Mäuse auf 10 pro Gruppe zeigte sich, dass der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ist.

Im Gegensatz dazu werden in der Literatur teilweise erheblich positivere Effekte für die Therapie mit COX-2-Inhibitoren beschrieben [Williams, 2000; Yao, 2003]. Allerdings handelt es sich in unserem Kolonkarzinom-Modell um Tumoren, die aufgrund ihres schnellen und invasiven Wachstums schwerer als Tumoren langsam wachsender Zelllinien zu therapieren sind. Bei Williams und Mitarbeitern beispielsweise konnte das Tumorwachstum noch mit Beginn der Therapie nach 30 Tagen nach Tumorinduktion kontrolliert werden, während in unserem Modell die mittlere Lebenserwartung der unbehandelten Mäuse nach Tumorinduktion nur zwischen 20 und 30 Tage beträgt.

Der COX-2-Inhibitor Dynastat wurde aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften gewählt. Dies ermöglicht die leichte Applikation *in vivo* und ermöglicht, im Gegensatz zur oralen Verabreichung im Futter, die Kontrolle der verabreichten Menge. Das Prodrug Parecoxib wird in der Leber zu Valdecoxib über Cytochrom P450 (CYP) aktiviert. Da auch viele Tumoren CYP exprimieren, werden neue antitumoral wirkende Substanzen erprobt, die direkt im Tumorgewebe aktiviert werden können [Oyama, 2004]. Der Vor-

teil dieser Substanzen wäre, dass der aktive Wirkstoff direkt im Tumorgewebe gebildet würde und niedrigere Gesamtmengen benötigt würden, um toxische Konzentrationen vor Ort zu erzielen. Ob die Tumorzelllinie C-26 die benötigten Enzyme CYP2D6 und CYP2C19 exprimiert, ist nicht untersucht worden.

Wird die Wirkung der COX-2-Inhibition bezüglich des Überlebens der Mäuse betrachtet, so ist für die mit CpG behandelten Gruppen kein Unterschied erkennbar. Im Gegensatz zum Verlauf der Tumorgröße stellt sich allerdings für die Gruppe, die nur mit Dynastat behandelt wurde, ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe heraus ( $p = 0,003$ ).

Dynastat wird vornehmlich in der Schmerztherapie angewandt. Ob es auch geeignet ist, tumoreigene COX-2 zu inaktivieren, ist nicht geklärt. Diverse Studien zeigten recht unterschiedliche Eigenschaften der einzelnen COX-2-Inhibitoren. So unterscheiden sich beispielsweise Celecoxib und Rofecoxib hinsichtlich ihrer Wirkung auf kolorektale Adenome und Karzinome [Rahme, 2003]. Auch das zytotoxische Potential der beiden COX-2-Hemmer Celecoxib und SC-58125 weist Unterschiede auf, wie Williams et al in oben beschriebenen Versuchen demonstrieren konnten. Es ist möglich, dass Parecoxib nicht optimal die Cyclooxygenase-2 in Tumoren hemmen kann.

Außerdem ist es möglich, dass die Menge des verwendeten Wirkstoffes zu gering gewählt wurde. Einem Menschen von durchschnittlich 80 kg Körpergewicht (KG) werden als Schmerztherapie ca. 0,5 mg/kg KG Dynastat infundiert. Eine Maus mit durchschnittlich 25 g Körpergewicht erhielt 4 mg/kg KG. Obwohl die Menge knapp das 10-fache der empfohlenen Menge zur Schmerztherapie betrug, ist es möglich, dass zur unterstützten Krebstherapie die Konzentration noch wesentlich höher gewählt werden muss. *In vitro* Versuche hinsichtlich PGE<sub>2</sub>-Produktion waren aufgrund der Inaktivität des *Prodrug* Parecoxib nicht möglich. Nachdem das Überleben der mit Dynastat behandelten Gruppe aber erheblich verlängert war, kann davon ausgegangen werden, dass Dynastat eine Rolle in der Tumorabwehr spielt. Welcher Art diese Effekte sind, bleibt weiter abzuklären.



### 5 Zusammenfassung

Die Therapie von subkutan gesetzten Tumoren aus der Kolonkarzinom-Zelllinie Colon-26 bei Mäusen mit CpG-ODN lieferte erfolgversprechende Ergebnisse, die die Frage aufwarfen, ob CpG-ODN direkt auf tumorinfiltrierende Leukozyten wirkt. Die Analyse der intratumoral vorkommenden dendritischen Zellen ergab, dass bereits ohne Stimulation mit CpG-ODN PDCs im Tumor vorliegen. Die Applikation von CpG bewirkt über einen Zeitraum von mehreren Tagen das Verschwinden der DCs, was mit einer Abwanderung dieser Zellen in den drainierenden Lymphknoten zu erklären ist. Bei Untersuchung der CD4 und CD8 T-Zellen im Tumor konnte gezeigt werden, dass die Gabe von CpG einen deutlichen Anstieg in deren Vorkommen verursacht. Der immunstimulatorische Reiz ist notwendig, um die Einwanderung der T-Zellen zu initiieren.

Der Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Klassen von Oligonukleotiden auf murine PDCs erbrachte, dass CpG-Typ A-ODN, wie im menschlichen Modell, hohe Mengen an IFN- $\alpha$  in PDCs zu induzieren vermag. CpG-Typ B-ODN induzieren nur geringe Mengen an IFN- $\alpha$ . Im Gegensatz zu den Wirkungen von CpG-Typ C-ODN im humanen System werden murine PDCs zur Sekretion nur geringer Mengen an IFN- $\alpha$  aktiviert.

Zur Untersuchung der Wirkung von tumorsezernierten Mediatoren auf murine Zellen wurde Tumorüberstand in 10 bzw. 20 %-iger Konzentration in den Kulturen eingesetzt. Auf PDCs hemmte Tumorüberstand die durch CpG induzierte Produktion von IFN- $\alpha$ . Die Koinkubation der Tumorzellen mit einem COX-2-Inhibitor konnte die immun-supprimierende Wirkung des Tumorüberstands jedoch signifikant reduzieren. Die alleinige Zugabe des COX-2-Inhibitors zu den PDCs hatte keinen signifikanten Einfluss auf die IFN- $\alpha$ -Produktion.

Aufgrund der Vermutung, dass PGE<sub>2</sub> der hauptsächlich vorkommende Faktor im Tumorüberstand ist, wurde PGE<sub>2</sub> in verschiedenen Konzentrationen zu den PDCs hinzugegeben. Hier fand sich ebenfalls eine der PGE<sub>2</sub>-Konzentration entsprechende Hemmung der IFN- $\alpha$ -Produktion.

Sowohl für IFN- $\gamma$  als auch für IL-12p70 in Leukozytenkulturen aus muriner Milz zeigte sich bei Koinkubation der Leukozyten mit CpG und Tumorüberstand eine starke Verringerung der Sekretion. Die gleiche Wirkung erbrachte die Zugabe von exogenem PGE<sub>2</sub> zu den Kulturen. Generierung des Tumorüberstands in Anwesenheit eines COX-2-Inhibitors zeigte eine signifikante Abschwächung der hemmenden Wirkung des Tumorüberstands.

Die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde daraufhin in Milz-Leukozyten untersucht. Entgegen der Vermutung, dass Tumorüberstand die Produktion des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 bewirken könnte, zeigte sich eine signifikante Hemmung der CpG-vermittelten IL-10-Produktion nach Zugabe von Tumorüberstand zu den Leukozyten.

Im letzten Abschnitt wurden die Erkenntnisse der gewonnenen Daten auf ein subkutanes Tumormodell in der Maus übertragen. Die Applikation von Dynastat, einem injizierbaren, wasserlöslichen COX-2-Hemmer, verbesserte die Lebenserwartung der tumortragenden Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die zusätzliche Gabe von Dynastat zur CpG-Therapie konnte aber das Überleben der Mäuse im Vergleich zu der Gruppe, die nur CpG-ODN erhielt, nicht beeinflussen.

### *Schlussfolgerung*

Die *in vitro* Experimente zeigen, dass ein COX-2-spezifischer Inhibitor die immunsuppressive Wirkung des Tumorüberstands signifikant vermindern kann. Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf ein murines Kolonkarzinommodell kann jedoch die anti-tumoralen Eigenschaften des CpG-ODN nicht weiter verbessern.



## 6 Literaturverzeichnis

- Allavena, P., L. Piemonti, et al. (1998). "IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages." Eur J Immunol **28**(1): 359-69.
- Alleva, D. G., C. J. Burger, et al. (1994). "Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2." J Immunol **153**(4): 1674-86.
- Aman, M. J., T. Tretter, et al. (1996). "Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes." Blood **87**(11): 4731-6.
- Asselin-Paturel, C., G. Brizard, et al. (2003). "Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody." J Immunol **171**(12): 6466-77.
- Ballas, Z. K., A. M. Krieg, et al. (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." J Immunol **167**(9): 4878-86.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bauer, S., C. J. Kirschning, et al. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-42.
- Bell, D., P. Chomarat, et al. (1999). "In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas." J Exp Med **190**(10): 1417-26.
- Belz, G. T., F. R. Carbone, et al. (2002). "Cross-presentation of antigens by dendritic cells." Crit Rev Immunol **22**(5-6): 439-48.
- Bennett, A., M. D. Tacca, et al. (1977). "Prostaglandins from tumours of human large bowel." Br J Cancer **35**(6): 881-4.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-9.
- Brasel, K., T. De Smedt, et al. (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-39.
- Brawand, P., D. R. Fitzpatrick, et al. (2002). "Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs." J Immunol **169**(12): 6711-9.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Chen, W. S., S. J. Wei, et al. (2001a). "Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac." Int J Cancer **91**(6): 894-9.
- Chen, Y., J. Zhang, et al. (2001b). "CpG-ODN induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production." Int Immunol **13**(8): 1013-20.
- Chouaib, S., C. Asselin-Paturel, et al. (1997). "The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction." Immunol Today **18**(10): 493-7.
- Church, R. D., J. W. Fleshman, et al. (2003). "Cyclo-oxygenase 2 inhibition in colorectal cancer therapy." Br J Surg **90**(9): 1055-67.

- Coley, W. B. (1991). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893." Clin Orthop(262): 3-11.
- Cunningham, D., Y. Humblet, et al. (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 337-45.
- Cunningham, D. and R. D. James (2001). "Integrating the oral fluoropyrimidines into the management of advanced colorectal cancer." Eur J Cancer **37**(7): 826-34.
- Dalod, M., T. P. Salazar-Mather, et al. (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." J Exp Med **195**(4): 517-28.
- Delespesse, G., C. E. Demeure, et al. (1997). "In vitro maturation of naive human CD4+ T lymphocytes into Th1, Th2 effectors." Int Arch Allergy Immunol **113**(1-3): 157-9.
- Eberhart, C. E., R. J. Coffey, et al. (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." Gastroenterology **107**(4): 1183-8.
- Ebner, S., S. Hofer, et al. (2002). "A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern." J Immunol **168**(12): 6199-207.
- Falkowski, M., S. Skogstad, et al. (2003). "The effect of cyclooxygenase inhibitor diclofenac on experimental murine colon carcinoma." Anticancer Res **23**(3B): 2303-8.
- Feng, X., D. Yau, et al. (2002). "Type I interferons inhibit interleukin-10 production in activated human monocytes and stimulate IL-10 in T cells: implications for Th1-mediated diseases." J Interferon Cytokine Res **22**(3): 311-9.
- Festing, M. F. and D. K. Blackmore (1971). "Life span of specified-pathogen-free (MRC category 4) mice and rats." Lab Anim **5**(2): 179-92.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, et al. (1991). "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells." J Immunol **146**(10): 3444-51.
- Fu, J. Y., J. L. Masferrer, et al. (1990). "The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes." J Biol Chem **265**(28): 16737-40.
- Fujita, T., M. Matsui, et al. (1998). "Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas." Cancer Res **58**(21): 4823-6.
- Furihata, M., Y. Ohtsuki, et al. (1993). "Prognostic significance of simultaneous infiltration of HLA-DR-positive dendritic cells and tumor infiltrating lymphocytes into human esophageal carcinoma." Tohoku J Exp Med **169**(3): 187-95.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, et al. (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1096-103.
- Giardiello, F. M., S. R. Hamilton, et al. (1993). "Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis." N Engl J Med **328**(18): 1313-6.
- Gierse, J. K., J. J. McDonald, et al. (1996). "A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors." J Biol Chem **271**(26): 15810-4.

- Gilliet, M., A. Boonstra, et al. (2002). "The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* **195**(7): 953-8.
- Giovannucci, E., E. B. Rimm, et al. (1994). "Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals." *Ann Intern Med* **121**(4): 241-6.
- Groux, H., M. Bigler, et al. (1998). "Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells." *J Immunol* **160**(7): 3188-93.
- Hanna, M. G., Jr., H. C. Hoover, Jr., et al. (2001). "Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise." *Vaccine* **19**(17-19): 2576-82.
- Harizi, H., M. Juzan, et al. (2001). "Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells." *Cell Immunol* **209**(1): 19-28.
- Harizi, H., M. Juzan, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions." *J Immunol* **168**(5): 2255-63.
- Harris, J. E., L. Ryan, et al. (2000). "Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283." *J Clin Oncol* **18**(1): 148-57.
- Hartmann, E., B. Wollenberg, et al. (2003a). "Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer." *Cancer Res* **63**(19): 6478-87.
- Hartmann, G., J. Battiany, et al. (2003b). "Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **33**(6): 1633-41.
- Hartmann, G. and A. M. Krieg (2000). "Mechanism and function of a newly identified CpG-ODN motif in human primary B cells." *J Immunol* **164**(2): 944-53.
- Heckelsmiller, K., S. Beck, et al. (2002a). "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy." *Eur J Immunol* **32**(11): 3235-45.
- Heckelsmiller, K., K. Rall, et al. (2002b). "Peritumoral CpG-ODN elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model." *J Immunol* **169**(7): 3892-9.
- Hillenbrand, E. E., A. M. Neville, et al. (1999). "Immunohistochemical localization of CD1a-positive putative dendritic cells in human breast tumours." *Br J Cancer* **79**(5-6): 940-4.
- Hochrein, H., K. Shortman, et al. (2001). "Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets." *J Immunol* **166**(9): 5448-55.
- Howe, L. R., K. Subbaramaiah, et al. (2001). "Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **8**(2): 97-114.
- Hung, K., R. Hayashi, et al. (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." *J Exp Med* **188**(12): 2357-68.
- Ishigami, S., T. Aikou, et al. (1998). "Prognostic value of HLA-DR expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer." *Oncology* **55**(1): 65-9.
- Ishii, K. J., K. Kawakami, et al. (2003). "Antitumor therapy with bacterial DNA and toxin: complete regression of established tumor induced by liposomal CpG oligodeoxynucleotides plus interleukin-13 cytotoxin." *Clin Cancer Res* **9**(17): 6516-22.

- Kalinski, P., P. L. Vieira, et al. (2001). "Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer." Blood **97**(11): 3466-9.
- Kerkmann, M., L. T. Costa, et al. (2005). "Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells." J Biol Chem **280**(9): 8086-93.
- Kim, J., R. L. Modlin, et al. (1995). "IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response." J Immunol **155**(4): 2240-7.
- Krieg, A. M., S. Matson, et al. (1996). "Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **6**(2): 133-9.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.
- Krug, A., A. Towarowski, et al. (2001). "Toll-like receptor expression reveals CpG-ODN as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." Eur J Immunol **31**(10): 3026-37.
- Kuroda, E., T. Sugiura, et al. (2000). "Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E2 among mouse strains: a possible mechanism to polarize Th2 type response in BALB/c mice." J Immunol **164**(5): 2386-95.
- Kurts, C., M. Cannarile, et al. (2001). "Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo." J Immunol **166**(3): 1439-42.
- Liu, Y. J. and B. Blom (2000). "Introduction: TH2-inducing DC2 for immunotherapy." Blood **95**(8): 2482-3.
- Ludewig, B., D. Graf, et al. (1995). "Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10." Eur J Immunol **25**(7): 1943-50.
- Melero, I., M. Duarte, et al. (1999). "Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of established murine transplantable colon adenocarcinomas." Gene Ther **6**(10): 1779-84.
- Menetrier-Caux, C., G. Montmain, et al. (1998). "Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor." Blood **92**(12): 4778-91.
- Nishimura, T., K. Iwakabe, et al. (1999). "Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo." J Exp Med **190**(5): 617-27.
- North, M. E., K. Ivory, et al. (1996). "Intracellular cytokine production by human CD4+ and CD8+ T cells from normal and immunodeficient donors using directly conjugated anti-cytokine antibodies and three-colour flow cytometry." Clin Exp Immunol **105**(3): 517-22.
- O'Keefe, M., H. Hochrein, et al. (2003). "Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors." Blood **101**(4): 1453-9.
- Ogino, S., J. A. Meyerhardt, et al. (2005). "Molecular alterations in tumors and response to combination chemotherapy with gefitinib for advanced colorectal cancer." Clin Cancer Res **11**(18): 6650-6.
- Oyama, T., N. Kagawa, et al. (2004). "Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development." Front Biosci **9**: 1967-76.

- Rahme, E., A. N. Barkun, et al. (2003). "The cyclooxygenase-2-selective inhibitors rofecoxib and celecoxib prevent colorectal neoplasia occurrence and recurrence." Gastroenterology **125**(2): 404-12.
- Reis e Sousa, C., S. Hieny, et al. (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-29.
- Rigas, B., I. S. Goldman, et al. (1993). "Altered eicosanoid levels in human colon cancer." J Lab Clin Med **122**(5): 518-23.
- Salesi, N., G. Bossone, et al. (2005). "Clinical experience with bevacizumab in colorectal cancer." Anticancer Res **25**(5): 3619-23.
- Sano, H., Y. Kawahito, et al. (1995). "Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer." Cancer Res **55**(17): 3785-9.
- Sharma, S., M. Stolina, et al. (2003). "Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function." Clin Cancer Res **9**(3): 961-8.
- Sheehan, K. M., K. Sheahan, et al. (1999). "The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer." Jama **282**(13): 1254-7.
- Sombroek, C. C., A. G. Stam, et al. (2002). "Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation." J Immunol **168**(9): 4333-43.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Stoehlmacher, J. and H. J. Lenz (2003). "Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer." Semin Oncol **30**(3 Suppl 6): 10-6.
- Storer, J. B. (1966). "Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mouse strains." J Gerontol **21**(3): 404-9.
- Suzuki, A., A. Masuda, et al. (2002). "Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma." J Pathol **196**(1): 37-43.
- Tada, T., S. Ohzeki, et al. (1991). "Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state." J Immunol **146**(3): 1077-82.
- Takeda, H., M. Sonoshita, et al. (2003). "Cooperation of Cyclooxygenase 1 and Cyclooxygenase 2 in Intestinal Polyposis." Cancer Res **63**(16): 4872-4877.
- Thun, M. J., M. M. Namboodiri, et al. (1991). "Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer." N Engl J Med **325**(23): 1593-6.
- Thurnher, M., C. Radmayr, et al. (1996). "Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells." Int J Cancer **68**(1): 1-7.
- Tokunaga, T., H. Yamamoto, et al. (1984). "Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity." J Natl Cancer Inst **72**(4): 955-62.
- Trefzer, U. (2001). "Preliminary results of a phase I trial of intralesional injection of CpG-ODN in basal cell carcinoma and melanoma." Abstract collection of the 2nd International Symposium "Activating Immunity with CpG Oligos", Amelia Island, Florida, USA.
- Trifan, O. C., R. M. Smith, et al. (1999). "Overexpression of cyclooxygenase-2 induces cell cycle arrest. Evidence for a prostaglandin-independent mechanism." J Biol Chem **274**(48): 34141-7.
- van Ojik, H. H., L. Bevaart, et al. (2003). "CpG-A and B oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of antibody therapy by activating different effector cell populations." Cancer Res **63**(17): 5595-600.



- Varesio, L. and H. T. Holden (1980). "Regulation of lymphocyte activation: macrophage-dependent suppression of T lymphocyte protein synthesis." J Immunol **125**(4): 1694-701.
- Vicari, A. P., C. Chiodoni, et al. (2002). "Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody." J Exp Med **196**(4): 541-9.
- Weigel, B. J., D. A. Rodeberg, et al. (2003). "CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma." Clin Cancer Res **9**(8): 3105-14.
- Williams, C. S., A. J. Watson, et al. (2000). "Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models." Cancer Res **60**(21): 6045-51.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, et al. (1992). "DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth." Microbiol Immunol **36**(9): 983-97.
- Yao, M., S. Kargman, et al. (2003). "Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice." Cancer Res **63**(3): 586-92.
- Young, M. R., E. Wheeler, et al. (1986). "Macrophage-mediated suppression of natural killer cell activity in mice bearing Lewis lung carcinoma." J Natl Cancer Inst **76**(4): 745-50.
- Zou, W., V. Machelon, et al. (2001). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-46.

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
Balb/c	Bagg albino/c: Albinomaus mit eingeschränkter T <sub>H</sub> 1-Immunantwort
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Differenzierungsantigene
CpG	Cytosin verbunden mit Guanin über eine Phosphatverbindung
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FA	Folinsäure
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
Flt-3 Ligand	<i>Fms-like tyrosine kinase-3</i>
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FS	Folinsäure
5-FU	5-Fluorouracil
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HBSS	<i>Hank's balanced salts solution</i>
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
Lin	<i>Lineage</i> , „Abstammung“
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MDA	Malondialdehyd
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

---

NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodeoxynukleotid
p	Statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	<i>Standard error of means</i>
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub> 1	CD4 T-Zellen zur Unterstützung einer zytotoxischen Immunantwort
T <sub>H</sub> 2	CD4 T-Zellen zur Unterstützung einer humoralen Immunantwort
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TÜ	Tumorüberstand
U	<i>Units</i> , Einheiten

## Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden:

1. Schneider P, Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Tuma E, Rothenfußer S, Endres S, Hartmann G  
*Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. 90<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting of the American Association of Immunologists 2003, Denver, FASEB Journal Volume 17, Number 7, April 2003*
2. Schneider P, Beck S, Heckelsmiller K, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Rothenfußer S, Hartmann G, Endres S  
Kombination von antigenbeladenen dendritischen Zellen, CpG-Oligonukleotiden und Chemotherapie zur Behandlung von Tumoren im murinen Kolonkarzinom-Modell. 58. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2003, Nürnberg, German Journal of Gastroenterology, August 2003, S. 840

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Abteilung, die Überlassung des Themas sowie die sehr gute fachliche und über fachliche Belange hinausgehende Betreuung. Ganz besonders möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, internationale Kongresse zu besuchen. Vor allem aber herrschte unter seiner Leitung ein hervorragendes Arbeitsklima, in dem mit Freude gearbeitet werden konnte.

Ich danke außerdem meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. med. Gunther Hartmann für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, die hervorragende Betreuung, die fruchtbaren Diskussionen und die Verbesserungsvorschläge für die Doktorarbeit.

Herrn Sebastian Beck danke ich für die Einführung in das murine Kolontumormodell und Herrn Dr. Simon Rothenfuß, Herrn Dr. Klaus Heckelsmiller und Herrn Dr. Veit Hornung für viele wertvolle Hinweise und Ratschläge.

Allen anderen Kollegen aus der Klinischen Pharmakologie, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für eine wunderbare Zeit im Labor.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

**Philip Christian Schneider**

Geboren am 11.08.1978 in München

### Schulische Ausbildung

---

1984-1988	Grundschule, Garching b. München
1988-1997	Werner-Heisenberg-Gymnasium, Garching b. München
1997	Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife

### Zivildienst

---

1997-1998	Zivildienst im städt. Krankenhaus München-Bogenhausen
-----------	---

### Akademische Ausbildung

---

10/1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/2000	Ärztliche Vorprüfung, LMU, München
08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU, München
08/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU, München
10/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU, München

### Famulaturen

03/2001	<b>Innere Medizin</b> - Krankenhaus III. Orden, München
09/2001	<b>Anaesthesie, Chirurgie</b> - Stellenbosch Hospital, Südafrika
11/2001	<b>Allgemeinchirurgie, Anaesthesie, Pädiatrie, Gynäkologie und Geburtshilfe</b> - Paarl Hospital, Südafrika
01/2002	<b>Neurologie und pädiatrische Neurologie</b> - Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika
03/2002	<b>Family medicine</b> , Ambulanz - Dr. Jan Hill, Stellenbosch Hospital, Südafrika

### Praktisches Jahr

10/2004	<b>Anaesthesie</b> - North York General Hospital, Toronto, Kanada
12/2004	<b>Anaesthesie</b> - Universitätsklinikum Großhadern, München
02/2005	<b>Innere Medizin</b> - Krankenhaus München-Schwabing, München
05/2005	<b>Chirurgie</b> - Krankenhaus München-Harlaching, München

### **Wissenschaftliche Tätigkeit**

---

09/2002 - 03/2004    **Dissertation** bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres,  
Abteilung für Klinische Pharmakologie, LMU, München  
*Thema:* Die Kombination von immunstimulatorischer DNA und  
Cyclooxygenase-2-Inhibitoren in der Therapie eines murinen  
Kolonkarzinommodells

### **Berufliche Tätigkeit**

---

01/2006 – heute    Assistenzarzt in der 1. Medizinischen Abteilung, Krankenhaus  
des 3. Ordens, München