

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Immuntherapie von Tumoren:  
der *Toll-like* Rezeptor 7-Ligand Resiquimod als Adjuvans einer  
dendritischen Zellvakzine**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andreas Völkl

aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichtersteller: PD. Dr. med. vet. Robert Kammerer  
Prof. Dr. rer. nat. Helga Maria Schmetzer

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Dr. med. Carole Bourquin  
(Arbeitsgruppenleiterin)

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2008

Meinen Eltern in Dankbarkeit



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Geschichte der Immuntherapie – Meilensteine auf dem Weg in die moderne Medizin .....	1
1.2 <i>Pattern-recognition</i> Rezeptoren .....	4
1.2.1 <i>Pattern-recognition</i> Rezeptoren als Erkennungsmechanismen angeborener Immunität.....	4
1.2.2 Der <i>Toll</i> -Rezeptor der <i>Drosophila</i> .....	5
1.2.3 Vom <i>Toll</i> -Rezeptor der <i>Drosophila</i> zu den <i>Toll-like</i> Rezeptoren in Säugetieren	5
1.2.4 <i>Toll-like</i> Rezeptoren und ihre Liganden .....	6
1.3 Dendritische Zellvakzinen .....	9
1.3.1 Eigenschaften von dendritischen Zellen .....	9
1.3.2 CpG ODN als Adjuvans einer dendritischen Zellvakzine im murinen Tumormodell .....	10
1.4 Die <i>Immune response modifier</i> Imiquimod und Resiquimod .....	11
1.5 Der Status quo: Grenzen von TLR9-Liganden in der Anwendung am Menschen	12
1.6 Fragestellung .....	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte .....	14
2.1.1 Geräte .....	14
2.1.2 Chemikalien .....	14
2.1.3 Reagenziensätze .....	15
2.1.4 Materialien für die Zellkultur.....	15
2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen .....	16
2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....	17
2.1.8 Oligodesoxynukleotide .....	18
2.1.9 Peptide .....	18
2.1.10 Zelllinien .....	18
2.2 Zellulär-immunologische Methoden .....	19
2.2.1 Zellkultur .....	19
2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen .....	19
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	19
2.2.1.3 Bestrahlung von Tumorzellen .....	19
2.2.1.4 Kultivierung der C26 Kolonkarzinomzelllinie .....	19
2.2.1.5 Generierung von <i>Bone-marrow-derived DC</i> .....	20
2.2.1.6 Kokultur von dendritischen Zellen und Tumorzellen .....	20
2.2.1.7 <i>In vitro</i> -Aktivierung der dendritischen Zellen .....	21

---

2.2.1.8 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus entnommenen Milzen.....	21
2.2.1.9 Herstellung einer stabilen Wasser-Öl-Emulsion als Retardformulierung ....	21
2.2.1.10 Herstellung von Nukleotid-Polyarginin-Komplexen .....	21
2.2.2 Durchflusszytometrie (Flowzytometrie).....	22
2.2.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip .....	22
2.2.2.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen .....	23
2.2.2.3 Bestimmung von intrazellulären Molekülen.....	24
2.2.2.4 Messung der spezifischen Lyse von Targetzellen <i>in vivo</i> .....	25
2.2.2.5 Pentamere MHC-I-Moleküle.....	26
2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung.....	26
2.2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay .....	27
2.2.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip .....	27
2.2.4.2 Zytokinmessung .....	28
2.2.4.3 Bestimmung von Immunglobulinen im Serum.....	29
2.3 Subkutanes C26 Tumormodell .....	29
2.3.1 Versuchstiere und behördliche Genehmigung.....	29
2.3.2 Induktion subkutaner C26 Kolonkarzinomtumore (Tumorchallenge).....	30
2.3.3 Therapie und Zielgrößen.....	30
2.4 Statistische Analyse.....	32
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Pharmakodynamik von R-848 (Resiquimod) <i>in vivo</i> .....	33
3.1.1 Immunstimulatorischer Effekt von R-848 bei subkutaner Injektion .....	33
3.1.1.1 R-848 induziert hohe T <sub>H</sub> 1-Zytokinspiegel im Serum .....	33
3.1.1.2 Generalisierte Aktivierung von Splenozyten <i>in vivo</i> durch Resiquimod .....	34
3.1.2 Subkutane Anwendung von Resiquimod in retardierter Form .....	36
3.2 Wirkung von R-848 im C26 Kolonkarzinommodell .....	37
3.2.1 Charakterisierung der tumorzellgepulsten dendritischen Zellvakzine.....	37
3.2.2 R-848 im konventionellen etablierten Therapieregime ohne signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum.....	38
3.2.2 Signifikante Reduktion des Tumorwachstums durch R-848 im intensivierten Therapieregime .....	41
3.2.3 DC-Vakzine-unabhängiger Antitumoreffekt von R-848 im modifizierten intensivierten Therapieregime .....	44
3.3 Immunmonitoring der zellvermittelten Antitumorantwort.....	47
3.3.1 Nachweis tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen durch pentamere MHC-I-Moleküle .....	47
3.3.2 Detektion AH1-spezifischer T- Zellen durch intrazelluläres Interferon- $\gamma$ .....	48

---

3.3.3 Spezifische Lyse CFSE-markierter Targetzellen <i>in vivo</i> .....	49
3.4 Resiquimod-induzierte Toleranzentwicklung .....	50
3.4.1 Toleranzinduktion durch R-848 <i>in vivo</i> .....	50
3.4.1.1 Initial verstärkte und verlängerte Zytokinantwort durch mehrmalige Resiquimod-Injektionen .....	50
3.4.1.2 Später reduzierte Zytokininduktion durch R-848 nach wiederholter Applikation .....	50
3.4.1.3 Verminderte Ansprechbarkeit auf Resiquimod nach einmaliger Anwendung.....	52
3.4.1.4 Dauerhaft herabgesetzte Ansprechbarkeit auf Resiquimod nach einmaliger Anwendung .....	52
3.4.2 Toleranzeffekt von R-848 <i>in vitro</i> .....	55
3.4.2.1 Wirkung auf natives Knochenmark .....	55
3.4.2.2 Wirkung auf myeloide dendritische Zellen .....	56
3.4.2.3 Verminderte Stimulierbarkeit durch Liganden anderer <i>Toll-like</i> Rezeptoren	58
3.5 Einzelsträngige RNA als Vakzine-Adjuvans .....	59
3.5.1 Immunstimulatorische Wirkung von Polyuridin .....	59
3.5.1.1 Fehlende Zytokininduktion und Milzzellaktivierung bei subkutaner Anwendung.....	60
3.5.1.2 Systemische Teilaktivierung durch Polyuridin nach intravenöser Anwendung.....	61
3.5.2 Adjuvans-Wirkung von Polyuridin bei Immunisierung mit Ovalbumin.....	62
3.5.2.1 Polyuridin/Polyarginin steigert die Ovalbumin-spezifische Antikörperproduktion.....	63
3.5.2.2 Erhöhung der Interferon- $\gamma$ Produktion <i>ex vivo</i> restimulierter Splenozyten durch Polyuridin/Polyarginin-Komplex.....	63
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>65</b>
4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.....	65
4.1.1 Antitumoreffekt von Resiquimod .....	65
4.1.2 Toleranzentwicklung nach Anwendung von Resiquimod.....	66
4.1.3 Adjuvans-Wirkung von Polyuridin bei Immunisierung mit Ovalbumin.....	66
4.2 Einordnung der Ergebnisse im Kontext der Literatur .....	67
4.2.1 Resiquimod als potentes Immunstimulans .....	67
4.2.2 Antitumoreffekt von Resiquimod .....	67
4.2.2.1 Klinischer Erfolg im Tiermodell.....	67
4.2.2.2 Potentieller Einfluss von R-848 auf Mechanismen zellvermittelter Immunität .....	68

---

4.2.2.3 Die mögliche Bedeutung von regulatorischen T-Zellen .....	69
4.2.2.4 Das „Inflammasome“ als intrazellulärer Rezeptor von Imidazoquinolonen .	70
4.2.3 Endotoxintoleranz als bekanntes Phänomen.....	71
4.2.4 Molekulare Mechanismen der Endotoxintoleranz .....	71
4.2.5 Kreuztoleranz von TLR4 mit anderen <i>Toll-like</i> Rezeptoren .....	72
4.2.6 Toleranzinduktion durch TLR7-Liganden.....	73
4.2.6.1 Herunterregulation von TLR7 und IRAK-1 sowie Beteiligung transkriptioneller Mechanismen .....	73
4.2.6.2 Mögliche Rolle negativer Regulationsmechanismen auf die Toleranzinduktion via TLR7 .....	74
4.2.7 Biologische Wirkungen von Einzelstrang-RNA .....	76
4.2.7.1 Immunstimulatorisches Potenzial von Einzelstrang-RNA .....	76
4.2.7.2 Einzelsträngige RNA als Vakzine-Adjuvans.....	77
4.2.7.3 Bedeutung der intrazytosolischen RNA-Rezeptoren RIG-I und MDA-5.....	78
4.3 Klinische Relevanz.....	79
4.3.1 Imiquimod in der klinischen Anwendung.....	79
4.3.2 Potentielle Anwendungsmöglichkeiten von Resiquimod oder anderen <i>Immune response modifiers</i> .....	79
4.3.2.1 Systemische Wirksamkeit von Resiquimod .....	79
4.3.2.2 Einsatz von Resiquimod in klinischen Studien.....	80
4.3.2.3 Prinzipielle Erwägungen zum künftigen Einsatzspektrum von TLR7/8- Liganden .....	81
4.3.3 Chancen und Risiken der therapeutischen Beeinflussung des TLR-Systems .	81
4.3.4 Zukunftsperspektiven von RNA-Technologie.....	82
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme</b>	<b>98</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>101</b>
<b>9. Veröffentlichungen</b>	<b>102</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>104</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Geschichte der Immuntherapie – Meilensteine auf dem Weg in die moderne Medizin

Selten in der Geschichte hat ein Verfahren die Medizin derart verändert wie die Einführung der Immuntherapie. Edward Jenners bahnbrechende Erkenntnis im Jahre 1796, dass die willkürliche Infektion mit *Cowpox* Virus eine milde Form der Pocken hervorrief und gleichzeitig vor der nachfolgenden Infektion mit dem gefährlichen *Smallpox* Virus schützte, revolutionierte die damalige medizinische Praxis. Diese erste Form der Impfung begründete letztlich die moderne Immuntherapie der Neuzeit und lieferte den Beweis für die Beeinflussbarkeit körpereigener Abwehrmechanismen. Der beispiellose Erfolg der Pockenimpfung, der 1977 in der Eradikation der natürlich vorkommenden Pockeninfektion kulminierte, führte zu einer konzeptionellen Neuausrichtung der Medizin hin zu erhöhtem Augenmerk auf den Aspekt der Krankheitsprävention. Parallel wurde deshalb eine Vielzahl weiterer Impfungen entwickelt mit dem Ziel, den damaligen Geißeln der Menschheit wie Typhus, Cholera, Pest, Tuberkulose, aber auch Masern oder Poliomyelitis Herr zu werden. Die besten Ergebnisse wurden dabei vor allem gegen Erreger erzielt, die häufig selbstlimitierende Erkrankungen, gefolgt von lang andauernder Immunität, hervorrufen.

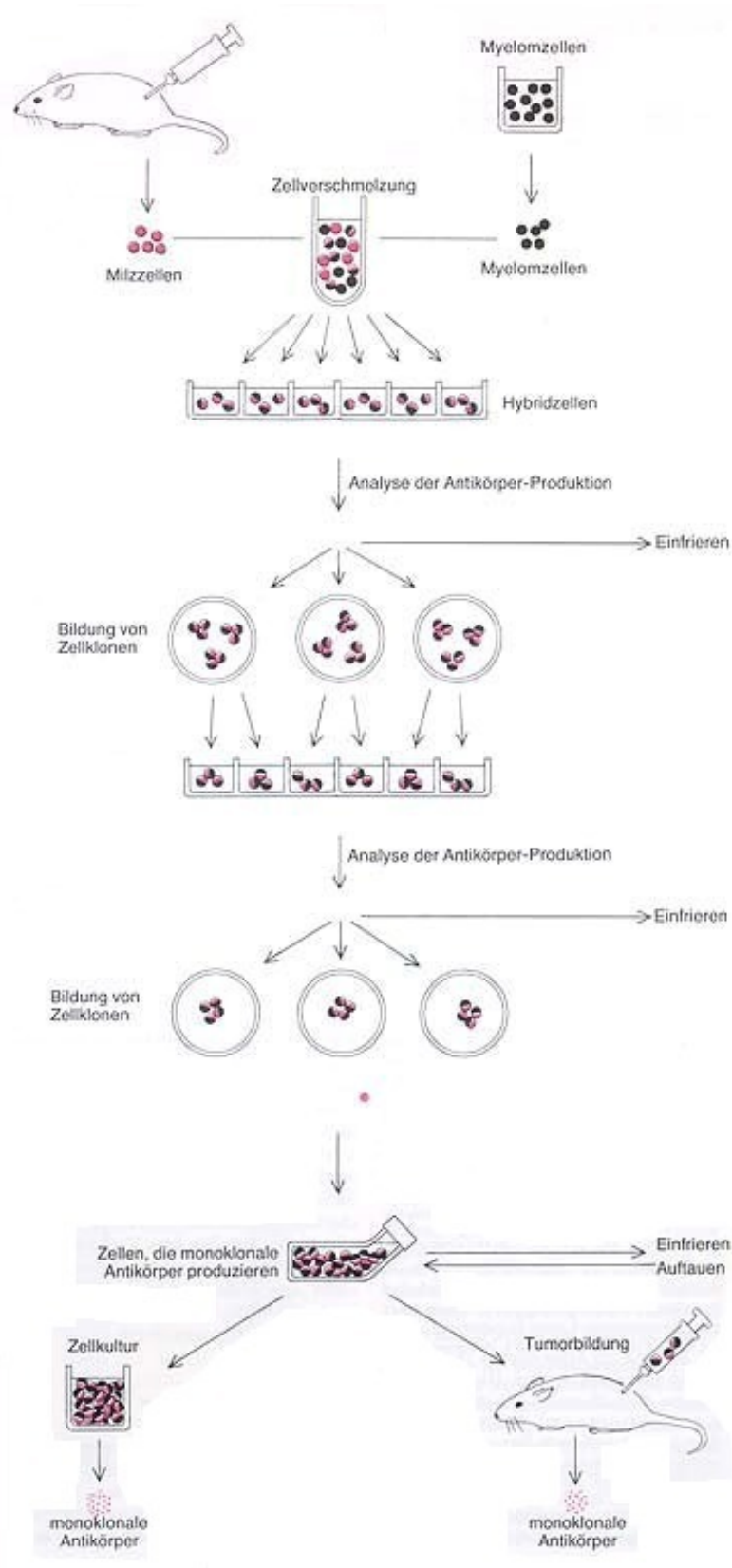
Voraussetzung für die Herstellung geeigneter Impfstoffe war jedoch die Isolation der Pathogene sowie der sichere Umgang mit toten bzw. attenuierten Erregern. Wichtige Etappen auf diesem Weg sind in Tabelle 1 dargestellt. Von Jenner (Vacciniavirus zur Pockenimpfung, 1796) über Louis Pasteur (attenuierte Erreger, ca. 1880), Paul Ehrlich (Identifizierung von Antikörpern, 1891), Jonas Salk und Albert Sabin (Polioimpfstoffe, 1954-55) führte die Linie zu George Köhler und Cesar Milstein, die durch ihre bahnbrechende Entwicklung der Hybridomatechnik 1975 den Grundstein für die hocheffiziente Immuntherapie mittels monoklonalen Antikörpern legten (Köhler & Milstein, 1975) (Abb. 1).

Die Vorstellung, dass auch Krebserkrankungen durch aktive Immunisierung behandelt werden können, entstand in den 1890er Jahren mit den wissenschaftlichen Aufsätzen von Paul Ehrlich und William Coley (Coley, 1896; Ehrlich, zitiert in 1956). Ehrlich postulierte darin die Möglichkeit des Einsatzes von spezifischen, gegen maligne transformierte Epithelzellen gerichteten Antiseren. Der New Yorker Chirurg William Coley hingegen versuchte als Pionier Patienten mit inoperablen Sarkomen mit bakteriellen Lysaten zu behandeln. Durch intratumorale Injektion konnte er erstaunliche

Heilungsraten erzielen. Seine Ansätze gerieten jedoch alsbald in Vergessenheit da andere Ärzte seine Erfolge nicht reproduzieren konnten und „modernere“, besser standardisierbare Verfahren wie die Strahlentherapie in den Mittelpunkt des Interesses rückten. Erst knapp 100 Jahre später erwachte neues Interesse an der Immuntherapie maligner Neoplasien, begünstigt durch Untersuchungen zur Antitumor-Wirkung von Bacille Calmette-Guérin (BCG), einem schwach virulenten Stamm von *Mycobacterium bovis*. Aufgrund des klinischen Erfolges konnte sich die intravesikale Applikation von BCG seit ihrer Einführung 1976 durch Morales als Standardtherapie früher Tumorstadien des Blasenkarzinoms etablieren (Morales, 1976), wobei der genaue Wirkmechanismus anfangs noch unbekannt war. Erst das in den letzten zehn Jahren entstandene präzise Wissen über Erkennungsmechanismen angeborener Immunität sowie deren Rolle für die Initiierung adaptiver Immunprozesse ermöglichte generell das rationale Design wirkungsvoller Antitumor-Vakzinierungen.

**Tabelle 1: Meilensteine der Immuntherapie**

1796	Edward Jenner führt die Impfung mit Vacciniavirus ( <i>Cowpox</i> ) zur Prävention einer nachfolgenden Pockeninfektion mit <i>Smallpox</i> ein
1879 – 1886	Louis Pasteur präsentiert den ersten künstlich im Labor abgeschwächten Infektionserreger (Hühner Cholera Bakterium) und entwickelt kurz danach einen attenuierten Tollwuterreger zur aktiven Immunisierung
1888	Emile Roux und Alexandre Yersin isolieren das Diphtherietoxin
1890	Emil von Behring und Shibasabo Kitasato aus dem Labor von Robert Koch finden heraus, dass sich durch die Injektion von Diphtherietoxin in Tiere ein Serum herstellen lässt, das Menschen einen passiven Diphtherie-Impfschutz verleiht
1891	Paul Ehrlich identifiziert Antikörper als Träger der humoralen Immunität
1896	William Coley veröffentlicht einen Fallreport, in dem er inoperable Sarkome erfolgreich mit bakteriellen Lysaten behandelt hatte
1900	Paul Ehrlich stellt die These auf, dass Moleküle, die mit Tumoren reagieren, eine Schlüsselrolle in der Krebstherapie spielen könnten und nimmt damit die Idee der antikörpervermittelten passiven Immuntherapie vorweg
1954 – 1955	Jonas Salk und Albert Sabin stellen Tot- bzw. attenuierte Lebendimpfstoffe gegen Polio vor, die bald darauf zur Elimination der Poliomyelitis führen
1965	Erstmalige Anwendung von IgG anti-D (anti-RH) als Rhesusprophylaxe zur Vermeidung mütterlicher RH-Immunisierung mit nachfolgender Gefahr der Ausbildung einer Erythroblastosis fetalis
1975	George Köhler und Cesar Milstein entwickeln die Hybridomatechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper
1977	Das <i>Smallpox</i> Virus wird von der WHO als durch Impfung eradiziert erklärt
1986	Der erste monoklonale Antikörper, Muronomab-CD3 (Orthoclone OKT3) wird von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen
1986 – 2000	Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) und Interferone werden für die Behandlung von Neoplasien, Hepatitis und Multiple Sklerose zugelassen
1997	Der erste humanisierte monoklonale Antikörper, Daclizumab (Zenapax) wird von der FDA zugelassen



Bundesministerium für Bildung und Forschung, 2006

**Abb. 1. Hybridomatechnik nach Köhler & Milstein**

Durch die Verschmelzung mit Myelomzellen zu Hybridzellen werden durch vorherige Immunisierung gewonnene Plasmazellen immortalisiert. Die Isolation der durch Fusion entstandenen Hybridzellen erfolgt auf Selektivnährböden. Anschließend werden aus diesen Zellen in mehreren Schritten einzelne Zellklone gebildet und diese auf ihre Antikörperproduktion hin überprüft.

## 1.2 *Pattern-recognition* Rezeptoren

### 1.2.1 *Pattern-recognition* Rezeptoren als Erkennungsmechanismen angeborener Immunität

Als bedeutender Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems haben sich im Laufe der Evolution bestimmte Rezeptorfamilien zur Detektion mikrobieller Gefahrensignale herauskristallisiert. Unter der permanenten Bedrohung durch eine Vielzahl heterogener Mikroorganismen haben sich sogenannte *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR) als entwicklungs geschichtlich frühe Form der Immunabwehr etabliert. PRR werden von vielen Zelltypen, insbesondere Antigen-präsentierenden Zellen, exprimiert und erkennen hochkonservierte Strukturen von zahlreichen Mikroorganismen, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet werden. Strukturell sehr heterogen sind diese molekularen Erkennungsmuster jedoch durch einige typische gemeinsame Eigenschaften charakterisiert:

- (1) PAMP sind spezifisch für Pathogene und kommen im Wirtsorganismus nicht vor.
- (2) Die durch das angeborene Immunsystem erkannten Strukturen sind essentiell für den Überlebensvorteil des Pathogens und können daher trotz Selektionsdruck durch den Wirt nicht mutieren.
- (3) Bei den erkannten Strukturen handelt es sich in der Regel um invariante Strukturen, die von einem breitem Spektrum an pathogenen Keimen geteilt werden.

Darüber hinaus erfolgt im Unterschied zur verzögerten Proliferationsantwort adaptiver Immunprozesse über PRR zusätzlich eine unmittelbare Reaktion. Die Erkennung von eindringenden Pathogenen löst eine schnelle Zytokinproduktion und Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen aus, was zur Aktivierung anderer Immunzellen führt.

Wie man heute weiß, erfüllen unter anderem Mitglieder der Familie der Lektin-Rezeptoren (Banchereau, 2000), der Scavenger-Rezeptoren (Peiser, 2002) als auch der *Toll-like* Rezeptoren (TLR) (Barton, 2002) die Kriterien oben beschriebener PRR. Mit der Identifikation von PRR als Erkennungsmechanismus des angeborenen Immunsystems wurde in den letzten Jahren ein grundlegender Fortschritt im immunologischen Verständnis erzielt. Ihre Entdeckung trug dabei entscheidend zur heutigen Vorstellung von der engen Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität bei.

### 1.2.2 Der *Toll*-Rezeptor der *Drosophila*

Charles Janeway postulierte bereits 1992 die Existenz dieser *Pattern-recognition* Rezeptoren als Herzstück angeborener Immunität (Janeway, 1992). Neben der Initiation der raschen Komponente angeborener Immunantworten schrieb er schon damals besagten Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Induktion adaptiver Immunantworten zu. Die Entdeckung der Struktur und Funktion des *Toll*-Rezeptors in *Drosophila* (Lemaitre, 1996; Williams, 1997) sowie die Identifikation eines *Toll*-Rezeptor-Homologs als verantwortliches Gen für LPS-Sensitivität in zwei natürlichen Maus-Mutanten (Poltorak, 1998; Hoshino, 1999; Qureshi, 1999) brachten eine erste experimentelle Bestätigung der Existenz solcher Erkennungsmechanismen.

### 1.2.3 Vom *Toll*-Rezeptor der *Drosophila* zu den *Toll-like* Rezeptoren in Säugetieren

*Toll*-Rezeptoren sind evolutionär hochkonservierte Transmembranproteine des Typ I, deren Funktion zuerst im Zusammenhang mit der dorsoventralen Ausrichtung in der Embryonalentwicklung der *Drosophila* beschrieben wurde (Hashimoto, 1988). Durch Zufall wurde später eine wichtige Rolle dieses Rezeptors in der Abwehr von Pilzinfektionen entdeckt (Lemaitre, 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein *Toll*-verwandtes Protein namens *18-wheeler* eine bedeutende Funktion in der antibakteriellen Abwehr der Fruchtfliege einnimmt (Williams, 1997). Bei der Durchsicht von humanen Gendatenbanken wurde kurze Zeit danach eine dem *Drosophila-Toll*-Gen verwandte Sequenz im menschlichen Genom identifiziert, welche später humaner TLR1 getauft wurde (Nomura, 1994; Taguchi, 1996). Auf ihrer Suche nach Erkennungsstrukturen des angeborenen, humanen Immunsystems identifizierten Janeway und Mitarbeiter das erste strukturhomologe Protein des *Drosophila-Toll* im humanen System - hTLR4 (Medzhitov, 1997). Erste funktionelle Untersuchungen bestätigten die Bedeutung dieser Proteinklasse auch für den Menschen. So führte TLR4-Überexpression in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur Produktion proinflammatorischer Mediatoren. Darüber hinaus wurde die postulierte Rolle in der Induktion adaptiver Immunantworten bekräftigt, da Zelllinien, die dieses Protein stark exprimierten, zur Aktivierung von naiven T-Zellen führten.

Ähnliche Strukturhomologe wurden in der Folge auch in anderen Säugetiergattungen, insbesondere Mäusen, identifiziert. Den Beweis, der TLR4 zum Prototyp unter den PRR machte, lieferte die Beobachtung, dass TLR4 dem murinen LPS-Signalkomplex angehört. Poltorak *et al.* konnten als erste zeigen, dass Mäuse mit spontaner Mutation des TLR4-Gens nicht auf LPS-Stimulation reagierten und somit eine sonst tödliche

Endotoxin-Gabe schadlos überstanden (Poltorak, 1998). Diese Beobachtung wurde später an TLR4-*Knock-out*-Mäusen durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Hoshino, 1999; Qureshi, 1999).

Die Erkenntnis der realen Existenz vorher postulierter PRR markierte einen Paradigmenwechsel auf dem Gebiet der Immunologie, der die Vorstellung von der Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem revolutionierte.

#### 1.2.4 *Toll-like* Rezeptoren und ihre Liganden

Mittlerweile sind dreizehn strukturhomologe TLR beschrieben, die aber, was ihre Funktionalität und Verteilung auf Immunzellen angeht, einzelne speziesspezifische Unterschiede aufweisen.

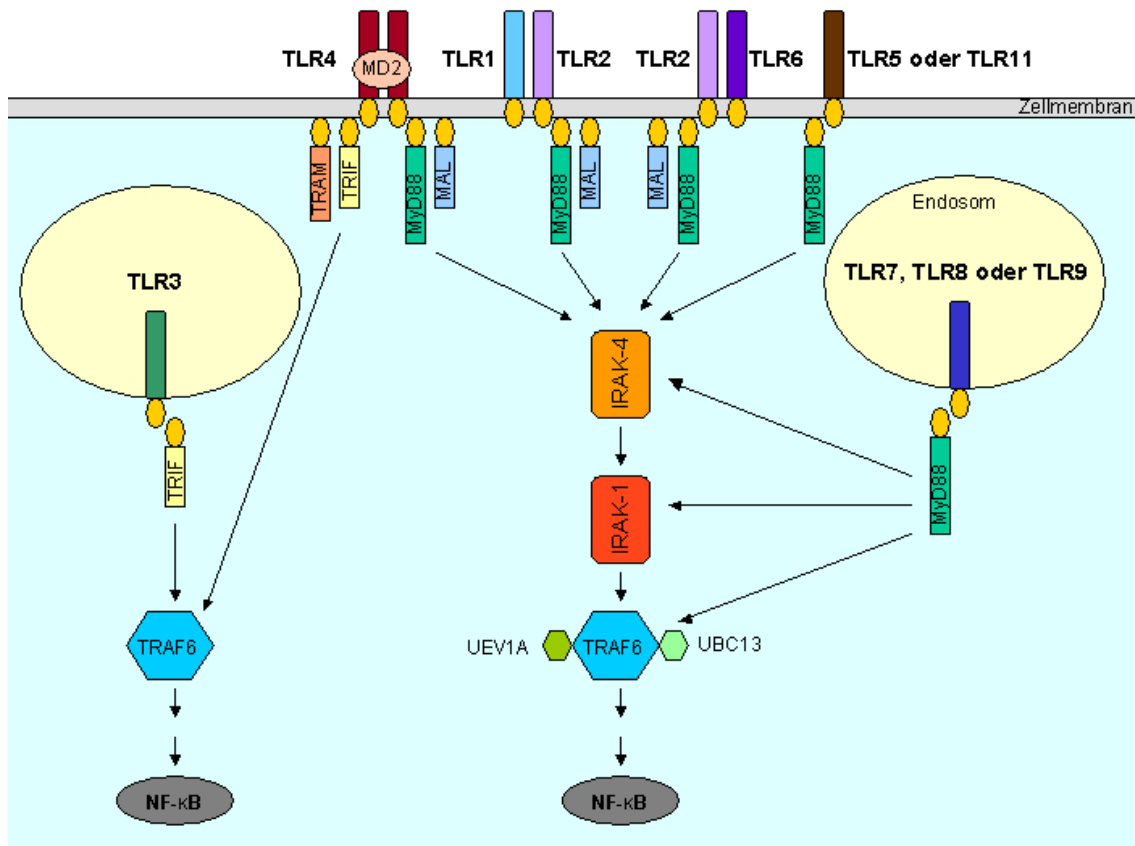
Bis dato wurden für fast alle TLR-Proteine Agonisten von meist mikrobiellem Ursprung identifiziert. Durch den Prozess der Rezeptorheterodimerisierung wird das Repertoire an Strukturen, die durch TLR erkannt werden, zusätzlich erhöht. So können manche TLR untereinander in Wechselwirkung treten und dadurch zusätzliche PAMP detektieren (Ozinsky, 2000). Neuere Untersuchungen haben ferner ergeben, dass zahlreiche TLR auch auf endogene Bestandteile reagieren, die z.B. von beanspruchten oder geschädigten Zellen freigesetzt werden. Unter dieser Gruppe lassen sich unter anderem Hitzeschockproteine, fragmentierte Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronectin oder Hyaluronan, aber auch Chromatin sowie RNA- und DNA-Fragmente (Übersichtsartikel Marshak-Rothstein, 2006) subsumieren.

Eine kurze Übersicht über die Familie der *Toll-like* Rezeptoren und eine Auswahl wichtiger exogener Liganden ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die Wirkung der diversen Liganden wird über die jeweils passenden TLR vermittelt, deren Aktivierung jedoch in weiten Teilen in gemeinsame Signaltransduktionswege mündet. Formal können *Toll-like* Rezeptoren in Oberflächenrezeptoren (TLR1/2, 4, 5) sowie endosomale Rezeptoren (TLR3, 7/8, 9) gegliedert werden. An der Zelloberfläche gelegene Rezeptoren erkennen Bestandteile bakterieller Zellwände, endosomale Rezeptoren dagegen sind in der Lage, virale RNA bzw. bakterielle DNA-Motive zu detektieren. Funktionell verwandte TLR nutzen dabei häufig sehr ähnliche intrazelluläre Signalkaskaden. Besonders enge Beziehungen bestehen zwischen TLR1/2 und 4, während TLR3 in seiner Signalübertragung vergleichsweise wenig mit *signalling pathways* anderer TLR interagiert (Abb. 2).

**Tabelle 2: Toll-like Rezeptoren (TLR) und wichtige exogene Liganden**

TLR	PAMP	Herkunft	Referenz
TLR1	funktionell assoz. mit TLR2		
TLR2	Lipoproteine	Gram-pos. Bakterien	(Takeuchi, 1999)
	Zyosan	Hefen	(Ozinsky, 2000)
	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i> (MALP-2)	Mykoplasmen	(Takeuchi, 2000)
	Lipoarabinomannan (LAM)	Mykobakterien	(Underhill, 1999)
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren	(Alexopoulou, 2001)
TLR4	LPS	Gram-neg. Bakterien	(Poltorak, 1998; Hoshino, 1999)
	Protein F	RSV	(Kurt-Jones, 2000)
TLR5	Flagellin	Gram-neg. Bakterien	(Hayashi, 2001)
TLR6	funktionell assoz. mit TLR2		
TLR7	einzelsträngige RNA	Viren	(Diebold, 2004; Heil, 2004)
	Guanosinanaloga (Loxoribine, Imiquimod, Resiquimod)	synthetische Moleküle	(Hemmi, 2002)
TLR8 (nicht funktionell im murinen System)	einzelsträngige RNA	Viren	(Heil, 2004)
	Resiquimod (R-848)	synthetische Moleküle	(Jurk, 2002)
TLR9	CpG ODN	Bakterien, Viren	(Hemmi, 2000)
TLR10 (nur human)	nicht bekannt	nicht bekannt	
TLR11	Profilin	uropathogene <i>E. coli</i> <i>Toxoplasma gondii</i>	(Zhang, 2004) (Yarovinsky, 2005)
TLR12 (nur murin)	nicht bekannt	nicht bekannt	
TLR13 (nur murin)	nicht bekannt	nicht bekannt	



### Abb. 2. Übersicht zum *Toll-like* Rezeptor *signalling*

Schematische Darstellung wichtiger Signaltransduktionswege über *Toll-like* Rezeptoren und deren Interferenz zwischen den jeweiligen TLR.

IRAK-1/4: IL-1R-assozierte Kinase 1/4; MAL: *MyD88 adaptor-like*; MyD88: *Myeloid differentiation factor 88*; NF-κB: *Nuclear factor kappa B*; TRAF 6: TNFR-assoziierter Faktor 6; TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*; TRIF: *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β*; UBC13: Ubiquitin-konjugierendes Enzym 13; UEV1A, Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 Variante 1



## 1.3 Dendritische Zellvakzinen

### 1.3.1 Eigenschaften von dendritischen Zellen

Eine spezielle Methode zur Induktion von Immunantworten ist die Verwendung von dendritischen Zellen (DC). DC nehmen als Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität eine zentrale Stellung innerhalb des Immunsystems ein, indem sie Gefahrensignale über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, insbesondere *Toll-like* Rezeptoren, erkennen und Immunantworten initiieren.

Dabei existieren zwei große Subpopulationen an DC: plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) und myeloide dendritische Zellen (MDC). PDC sind von ihrer Morphologie her kleine, lymphozytenähnliche Zellen (plasmazellähnlich, daher „plasmazytoid“), die über die Sekretion von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) überwiegend Effektorfunktionen besitzen. Myeloide dendritische Zellen bilden dagegen den klassischen Prototyp Antigenpräsentierender Zellen. Während ihres unreifen Stadiums sind gewebebeständige MDC äußerst effizient in der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen, die sie als Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC-Kontext präsentieren. Die Detektion von Gefahrensignalen führt zur Ausreifung, wodurch die Fähigkeit zur Antigenprozessierung durch stabile Antigenpräsentation ersetzt wird. Gleichzeitig wandern sie in den drainierenden Lymphknoten, wo sie unter Hochregulation kostimulatorischer Moleküle mit naiven B- und T-Zellen interagieren. In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad sind sie dort in der Lage, entweder Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen hervorzurufen oder eine spezifische Immunantwort zu initiieren. Eine Immunantwort wird nur generiert, wenn T-Zellen, die ihr spezifisches Peptid auf der DC im MHC-Kontext erkennen (Signal I), gleichzeitig durch kostimulatorische Moleküle aktiviert werden (Signal II). Unreife DC liefern der T-Zelle lediglich das spezifische Antigen (Signal I) ohne adäquate Kostimulation (Signal II), so dass Toleranz bzw. Anergie gegenüber diesem Antigen resultiert (Labeur, 1999; Banchereau, 2000). Erst durch voll ausgereifte DC, die zusätzlich ein adäquates zweites Signal bieten, kommt es zu einer effektiven T-Zell-vermittelten Immunantwort (Shortman, 2001).

Entsprechend basieren die meisten Vakzinierungsprotokolle auf der Verwendung myeloider dendritischer Zellen. Die Möglichkeit, dendritische Zellen in großen Mengen und in relativ kurzer Zeit *in vitro* zu generieren, machen sie im besonderen Maße zu einer interessanten therapeutischen Option als „natürliches Adjuvans“. MDC werden daher seit längerem in zahlreichen klinischen Studien als zelluläres Impfadjuvans gegen Tumoren eingesetzt (Fong, 2000).

### 1.3.2 CpG ODN als Adjuvans einer dendritischen Zellvakzine im murinen Tumormodell

Ausgehend vom bereits erwähnten Therapieerfolg der intravesikalen BCG-Instillation beim Blasenkarzinom wurden als Ergebnis langjähriger Forschung schließlich unmethylierte, Cytidin-Guanosin (CG)-Dinukleotid-haltige Oligodesoxynukleotide (CpG ODN) als TLR9-Ligand identifiziert. Wichtige Beiträge hierzu leisteten vor allem Tokunaga und Mitarbeiter, die das reduzierte Tumorstadium nach BCG-Impfung auf Stimulation des Immunsystems zurückführen konnten (Tokunaga, 1984; Tokunaga, 1988), Yamamoto *et al.*, die zeigten, dass bakterielle DNA immunstimulatorisch wirkt (Yamamoto, 1992a; Yamamoto, 1992b) und Arthur Krieg und Mitarbeiter, denen es erstmals gelang, optimal stimulierende CpG-Motive zu charakterisieren (Krieg, 1995). Als Rezeptor wurde nach längerer erfolgloser Suche im Jahr 2000 TLR9 identifiziert (Hemmi, 2000).

Die starken biologischen Wirkungen von CpG-Motiv-haltigen Nukleinsäuren ermutigten zahlreiche Forschergruppen, neue Ansätze mit CpG-DNA zu untersuchen. Bald wurde deutlich, dass CpG ein starkes systemisches T<sub>H</sub>1-Zytokinmilieu schafft, das sich durch hohe IFN- $\gamma$ - und IL-12-Spiegel auszeichnet (Klinman, 1996). Dadurch bedingt konnte insbesondere in Infektionsmodellen in prophylaktischen (Krieg, 1998) und therapeutischen Settings (Zimmermann, 1998) eine starke antimikrobielle Wirkung von CpG-DNA demonstriert werden. So schützt CpG ODN Mäuse vor letalen Infektionsdosen mit intrazellulären Erregern wie Leishmanien oder Listerien (Zimmermann, 1998; Elkins, 1999). Darüber hinaus haben mittlerweile zahlreiche Studien gezeigt, dass CpG-DNA ein potentes Adjuvans darstellt, um humoral und zellulär spezifische Immunantworten gegen ein weites Spektrum an Antigenen hervorzurufen (Übersichtsartikel Weiner, 2000).

Insbesondere der Aspekt der Immunisierung gegen Tumorantigene wurde in der Folgezeit im murinen System intensiv erforscht. Seitdem wurden mehrere Arbeiten veröffentlicht, die CpG ODN im Mausmodell als Adjuvans einer Tumorstoffimpfung untersucht haben. Hierbei erwies sich CpG-DNA sowohl in prophylaktischen als auch therapeutischen Impfstrategien als wirksam. CpG ODN wurde mit unterschiedlicher Formulierung des Antigens (Tumorpeptide, Tumorproteine, ganze Tumorzellen) in *in vivo*- (Heckelsmiller, 2002a; Heckelsmiller, 2002b) aber auch *ex vivo*-Ansätzen (Brunner, 2000) erfolgreich eingesetzt. CpG-aktivierte DC ermöglichen in sekundären lymphatischen Organen eine effektive Kreuzpräsentation von Antigenen und fördern somit eine starke Antwort IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen. Der *in vivo*-Nachweis für die Wirksamkeit im Rahmen einer Tumorstoffimpfung war von Heckelsmiller *et al.* im subkutanen C26 Kolonkarzinommodell in Balb/c Mäusen geführt worden. In

diesem Tiermodell wurde gezeigt, dass die Verwendung von CpG ODN als Adjuvans einer tumorzellgepulsten dendritischen Zellvakzine zur Rückbildung der Tumoren führte. Dabei war die Anwendung der DC-Vakzine plus CpG ODN tumorfern in Kombination mit peritumoralem CpG Oligonukleotid alleine in der Lage, selbst große etablierte Tumoren zu heilen (Heckelsmiller, 2002a; Heckelsmiller, 2002b).

## 1.4 Die *Immune response modifier* Imiquimod und Resiquimod

Ein neuer Impuls auf dem Gebiet der Immuntherapie wurde in jüngerer Vergangenheit durch die Entdeckung der Substanzklasse der *Immune response modifier* gesetzt. Bereits in den 1980er Jahren entstand aus experimentellen Untersuchungen zu Strukturen von künstlich hergestellten Nukleosidanaloga der erste Vertreter der *Immune response modifier*. Dieser zählte zur Gruppe der Guanosinanaloga, deren chemische Familie in der Folge als die der Imidazoquinolone bezeichnet wurde.

Das immunstimulatorische Potenzial einzelner Mitglieder der Imidazoquinolon-Familie (v.a. Imiquimod und Resiquimod) wurde später für diverse Aspekte adaptiver Immunität belegt. Zusammen mit Herpes simplex Virus (HSV) Glykoprotein verabreicht, verstärkt Imiquimod den Schutz vor nachfolgender Infektion mit HSV im Tiermodell (Bernstein, 1993). Aber auch im Rahmen der Vakzinierung bei persistierender HSV-Infektion konnte ein therapeutischer Effekt dokumentiert werden (Bernstein, 1995). Die Adjuvans-Wirkung von Imiquimod bestand dabei in der Verstärkung einer zellvermittelten Immunantwort (Harrison, 1988; Harrison, 1994). Zusätzlich wurde bereits früh eine Antitumorwirkung von Imiquimod in Mäusen beobachtet. Schon 1992 beschrieben Sidky und Mitarbeiter erstmals die inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von MC 26 Kolonkarzinomzellen nach oraler Applikation (Sidky, 1992). Später führte Imiquimod in einem weiteren Modell zur Eradikation von FCB Tumorzellen und schützte die Tiere vor nachfolgender Rechallenge, was als Ausdruck für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses zu werten war (Slade, 1998). Nach erfolgreichem Einsatz in klinischen Studien hat Imiquimod unter dem Handelsnamen Aldara zur topischen Anwendung mittlerweile die Zulassung für die Behandlung von genitalen und perianalen Warzen, hervorgerufen durch humanes Papillomavirus (HPV), von aktinischer Keratose des Gesichts und der Kopfhaut sowie von oberflächlichem, bioptisch gesichertem Basaliom erhalten. Ähnlich wie bei Einführung der intravesikalen BCG-Instillation zur Behandlung des Blasenkarzinoms war der exakte Wirkmechanismus zum Zeitpunkt der Erstzulassung jedoch noch unklar.

Resiquimod (R-848) stellt ein potenteres und besser lösliches Analogon von Imiquimod dar (Garland, 2003; Jones, 2003), das verglichen mit Imiquimod in gleichen Dosen eine 50 bis 100-fach gesteigerte Zytokinantwort hervorruft (Tomai, 1995). Wie Imiquimod schafft es ein  $T_H1$ -Zytokinmilieu (Wagner, 1999), wobei die Produktion von  $IFN-\alpha$  und IL-12 durch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen eine bedeutende Rolle spielt (Ahonen, 1999; Wagner, 1999). Darüber hinaus regt Resiquimod B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion und Hochregulation von MHC-II Komplexen an der Zelloberfläche an (Bishop, 2001). Als Adjuvans im Rahmen eines Vakzinierungsmodells in Mäusen konnte gezeigt werden, dass R-848 die Produktion von  $T_H1$ -spezifischem IgG2 fördert und gleichzeitig  $T_H2$ -spezifisches IgE senkt (Vasilakos, 2000). Darüber hinaus ist Resiquimod in der Lage, eine vorbestehende  $T_H2$ -Antwort in Richtung eines  $T_H1$ -Musters umzulenken (Vasilakos, 2000; Brugnolo, 2003).

Die Aufklärung des Wirkmechanismus von Imiquimod und Resiquimod gelang schließlich 2002. Hemmi *et al.* konnten zeigen, dass der Effekt der *Immune response modifier* auf Immunzellen über *Toll-like* Rezeptor 7 (TLR7) vermittelt wird (Hemmi, 2002). Jurk und Mitarbeiter wiesen im selben Jahr nach, dass Resiquimod (R-848) im humanen System gleichzeitig einen Liganden für TLR8 darstellt (Jurk, 2002). Die immunstimulatorische Wirkung wird dabei intrazellulär durch Aktivierung des MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*)-abhängigen Signalwegs erzielt (Hemmi, 2002; Akira, 2003; Edwards, 2003; Lee, 2003). Mit der Substanzklasse der synthetisch hergestellten *Immune response modifier* wurden somit die ersten bekannten Liganden für TLR7 (Imiquimod, Resiquimod) und TLR8 (Resiquimod) identifiziert.

## 1.5 Der Status quo: Grenzen von TLR9-Liganden in der Anwendung am Menschen

Die Entdeckung von *Toll-like* Rezeptoren als wichtigem Erkennungsmechanismus angeborener Immunität mit Identifikation der entsprechenden Liganden markiert einen Durchbruch im Verständnis der Immunologie, der die Vorstellung von der Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem revolutionierte. Als Teil der Gruppe von *pattern-recognition* Rezeptoren, die endogene und exogene Gefahrensignale detektieren, bilden sie ein bedeutendes Bindeglied in der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität.

Ausgehend von ersten Erfolgen der Immuntherapie von Tumoren mit BCG wurde über die Identifikation von CpG Motiven als wirksamem Bestandteil innerhalb bakterieller

DNA mit dem rationalen Design einer Tumorstoffimpfung begonnen. Erste Versuche an Mäusen zeigten dabei in DC-basierten Impfstrategien vielversprechende Ergebnisse. Anschließend klinische Studien konnten jedoch bisher keinen ähnlich durchschlagenden Erfolg erzielen. Ein Hauptgrund hierfür könnte in der Rekrutierung unterschiedlicher Zielpopulationen durch CpG-DNA in beiden Spezies zu suchen sein.

Für den Menschen sind mittlerweile beide großen DC-Klassen gut charakterisiert (Liu, 2001). Plasmazytoide DC exprimieren TLR9, wodurch sie auf CpG-Stimulation reagieren. Myeloide DC dagegen besitzen kein TLR9, weshalb sie nicht direkt durch CpG ODN aktiviert werden können. Murine MDC exprimieren im Unterschied zu humanen jedoch sehr wohl TLR9 (Edwards, 2003). Gerade myeloide dendritische Zellen werden zudem als entscheidende Population für die Induktion einer effektiven Immunantwort angesehen. Eine mögliche Limitation von CpG in der Anwendung am Menschen könnte somit aufgrund unterschiedlicher TLR-Expression in der fehlenden Ansprechbarkeit der ausschlaggebenden Zielzellpopulation bestehen.

Maus und Mensch gemeinsam ist dagegen die Expression von funktionellem TLR7 auf MDC (Krug, 2001; Hornung, 2002; Ito, 2002). Mit Imiquimod und Resiquimod waren gleichzeitig erstmals selektive Liganden identifiziert worden, die über diesen Rezeptor potente  $T_H1$ -Immunantworten induzieren konnten.

## 1.6 Fragestellung

Vor diesem Hintergrund, in der Vorstellung einer durch vergleichbare TLR-Expression besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen, sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Antitumorwirkung von Resiquimod (R-848) untersucht werden. Im Speziellen sollte dabei vorrangig die Frage beantwortet werden, ob R-848 als Adjuvans einer tumorzellgepulsten dendritischen Zellimpfung ähnlich wirksam sein konnte wie CpG-DNA, da TLR7-Liganden für den Menschen *a priori* besser geeignet schienen als TLR9-Agonisten. Als Tumormodell diente das subkutane C26 Kolonkarzinommodell in Balb/c Mäusen, in dem gezeigt worden war, dass die Verwendung von CpG ODN zur vollständigen Rückbildung der Tumoren führte (Heckelsmiller, 2002a).

Da zeitgleich mit dem Beginn dieser Arbeit zudem Einzelstrang-RNA als natürlicher Ligand von TLR7 beschrieben wurde (Diebold, 2004; Heil, 2004), sollte im zweiten Teil der Arbeit das immunstimulatorische Potenzial von Einzelstrang-RNA sowie dessen Rolle als potentiell Impfadjuvans beleuchtet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Digitalkamera Mikroskop (AxioCam MRm)	Fa. Zeiss (Jena, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Luminometer (Mithras LB 940)	Fa. BertholdTechnologies (Bad Wildbad, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Multifuge 3L-R	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Multifuge 4KR	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Neubauer Zählkammer	Fa. Optik Labor Frischknecht (Balgach, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
QuadroMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Schüttler (Vibrax)	Fa. Merck/Serono Diagnostics (Genf, CH)
Vortex Genie 2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortex VF2	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

#### 2.1.2 Chemikalien

Aqua ad injectabilia	Fa. B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Isofluran (Forene®)	Fa. Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheker Innenstadt Universität München
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumchlorid (NaCl 0.9%)	Fa. Baxter S. A. (Lessines, B)
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PharmLyse (10x) Lysereagenz	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Saponin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Schwefelsäure (2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TMB Substrate Reagent Set	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin (10x)	Fa. PAA (Pasching, A)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

## 2.1.3 Reagenziensätze

Zellisolation mittels MACS-Methode:

CD45R/B220 MicroBeads Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Zellproliferationsmessung mittels FACS:

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

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA (Sets):

murin IFN- $\gamma$  Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

murin IL-6 Fa. Biosource (Camarillo, CA, USA)

murin IL-10 Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

murin IL-12p40 Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

murin IL-12 p70 Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

murin IP-10 Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

Bestimmung von murinem INF- $\alpha$  mittels ELISA (Einzelantikörper):

capture:

Anti-IFN- $\alpha$  (RMMA-1) Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)

detection:

Anti-IFN- $\alpha$  (Polyclonal, rabbit anti mouse) Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)

HRP:

F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (Donkey anti rabbit) Fa. Biomeda (Foster City, CA, USA)

Bestimmung von Immunglobulinklassen mittels ELISA (Einzelantikörper):

Anti-IgG (Polyclonal, goat anti mouse) Fa. Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)

Anti-IgG1 (Polyclonal, goat anti mouse) Fa. Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)

Anti-IgG2a (KLH/G2a-1-1) Fa. Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)

Anti-IgM (1B4B1) Fa. Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)

## 2.1.4 Materialien für die Zellkultur

$\beta$ -Mercaptoethanol Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Bovines Serum Albumin (BSA) Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

*Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) high glucose

Fa. PAA (Pasching, A)

Fötales Kälberserum (FCS)

Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)

*Hank's balanced salt solution* (HBSS)

Fa. PAA (Pasching, A)

*Hepes Buffer*

(Hydroxyethylpiperazinethanschwefelsre) Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

L-Glutamin

Fa. PAA (Pasching, A)

MEM-NEAA (Nicht-essentielle Aminosäuren)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Natrium-Pyruvat (Na Pyr)	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Pasching, A)
Penicillin	Fa. PAA (Pasching, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium mit stabilem Glutamin	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Pasching, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, D), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), Gilson (Den Haag, NL) Greiner (Frickenhausen, D), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, D) und Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

### 2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen

Concanavalin A (Con A)	Fa. Merck/Calbiochem (Nottingham, GB)
CpG ODN (1826)	Fa. Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, D)
Flagellin (Herkunft: <i>Salmonella typhimurium</i> )	Fa. Qbiogene/Alexis Biochemicals (Heidelberg, D)
Flt-3Ligand (Flt-3L) <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)	Fa. PreproTech Inc. (NJ, USA)
Inkomplettes Freund's Adjuvans (IFA)	Fa. PreproTech Inc. (NJ, USA)
Interleukin-4 (IL-4)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ionomycin Calcium	Fa. PreproTech Inc. (NJ, USA)
Komplettes Freund's Adjuvans (CFA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Lipopolysaccharid (LPS) (Herkunft: <i>Salmonella typhimurium</i> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Malp-2 (Herkunft: <i>Mycoplasma fermentans</i> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ovalbumin (OVA)	Fa. Qbiogene/Alexis Biochemicals (Heidelberg, D)
Polyarginin (pR)	Fa. Merck/Calbiochem (Nottingham, GB)
Polyguanosin (pG)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Poly I:C (pl:C)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Polyuridin (pU)	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)
Resiquimod (R-848)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)
	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)



## 2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

RPMI-Vollmedium:

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

DMEM-Vollmedium:

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

RPMI complete:

100 IU/ ml Penicillin  
100 µg/ ml Streptomycin  
1 Vol % Na-Pyr  
1 Vol % MEM-NEAA  
10 Vol % FCS  
1/1000 β-Mercaptoethanol  
(Vorverdünnung 45µl / 12ml PBS)  
in RPMI 1640-Medium mit stabilem  
Glutamin

DMEM complete:

100 IU/ ml Penicillin  
100 µg/ ml Streptomycin  
1,5 mM L-Glutamin  
1 Vol % Na-Pyr  
1 Vol % MEM-NEAA  
1 Vol % Mausserum  
1/1000 β-Mercaptoethanol  
(Vorverdünnung 45µl / 12ml PBS)  
in DMEM-Medium

MACS-Puffer:

2 mM EDTA  
0,5 Vol % BSA  
pH 7,2  
in PBS

Erythrozyten-Lysepuffer:

PharmLyse (10x) 1:10  
in PBS

Lösungen für ELISA und FACS:Coating buffer:

0,2 M Natriumphosphat  
pH 6,5  
in Wasser

Wash buffer (ELISA):

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

Assay diluent:

10 Vol % FCS  
pH 7,0  
in PBS

block buffer:

1 Vol % BSA  
pH 7,0  
in PBS

Waschpuffer (FACS):

0,1 Vol % NaN<sub>3</sub>  
0,1 Vol % BSA  
pH 7,0  
in PBS

Permeabilisierungspuffer:

0,02 Vol % NaN<sub>3</sub>  
0,5 Vol % BSA  
0,5 Vol % Saponin  
pH 7,0  
in PBS

Fixierungspuffer:

2 Vol % PFA  
pH 7,0  
in PBS

### 2.1.7 Antikörper und pentamere MHC-I-Komplexe

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten FACS-Antikörper:

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Herkunft
Anti CD3e	CD3e	145-2C11	BD/ Pharmingen
Anti CD4	CD4 (L3T4)	GK1.5	BD/ Pharmingen
Anti CD8a	CD8a (Ly-2)	53-6.7	BD/ Pharmingen
Anti CD11b	CD11b (Mac-1)	M1/70	BD/ Pharmingen
Anti CD11c	CD11c	HL3	BD/ Pharmingen
Anti CD45R/B220	CD45R/B220	RA3-6B2	BD/ Pharmingen
Anti CD49b	CD49b/PanNK	DX5	BD/ Pharmingen
Anti CD69	CD69	H1.2F3	BD/ Pharmingen
Anti CD86	CD86 (B7-2)	GL1	BD/ Pharmingen
Anti IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$	XMG1.2	BD/ Pharmingen
Anti MHC-II	MHC-II	NIMR-4	Southern Biotech

Folgende Pentamere wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Bezeichnung	Peptid-Sequenz (N $\rightarrow$ C)	Herkunft
AH	SPSYVYHQF	Proimmune

### 2.1.8 Oligodesoxynukleotide

Als Referenz für die Ergebnisse mit Resiquimod (R-848) wurde als Positivkontrolle sowohl *in vivo* als auch *in vitro* CpG ODN 1826 als optimal stimulierende Sequenz im Balb/c Background eingesetzt. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide:

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	Referenz
ODN 1826	TCC ATG <b>ACG</b> TTC <b>ACG</b> TT	(Yi, 1998; Brunner, 2000)

### 2.1.9 Peptide

Die HLA-restringierten Peptide wurden durch Metabion (Gesellschaft für angewandte Biotechnologie, Martinsried, D) synthetisiert. Die Reinheit der Peptide übertraf 95 %, wie durch anschließende HPLC-Analyse validiert wurde. Die lyophilisierten Peptide wurden bis zu ihrem Einsatz in 30 % DMSO-Lösung bei - 20 °C aufbewahrt.

Bezeichnung	Peptid-Sequenz (N $\rightarrow$ C)	Referenz
AH1	SPSYVYHQF	(Huang, 1996)

### 2.1.10 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Zelllinie	Zellart	Herkunft	Referenz
C26	Murine Kolonkarzinom-Zelllinie (Balb/c), positiv für MHC-I	National Cancer Institute (NCI), USA	(Huang, 1996)

## 2.2 Zellulär-immunologische Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO<sub>2</sub>/ Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

#### 2.2.1.3 Bestrahlung von Tumorzellen

Zur Verhinderung von Zellteilungen in C26 Tumorzellen, die mit DC koinkubiert werden sollten, wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst, in ca. 5 ml Medium aufgenommen und mit 100 Gray in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München, D) bestrahlt. Diese Dosis führte dabei zur Inaktivierung der Tumorzellen, nicht jedoch zu deren Lyse.

#### 2.2.1.4 Kultivierung der C26 Kolonkarzinomzelllinie

Die Tumorzelllinie wurde in 25 - 75 ml Kulturflaschen in DMEM-Vollmedium mit 10% FCS kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Dreimal wöchentlich wurden die Tumorzellen passagiert, d.h. die adhärennt wachsenden Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin und mehrmaliges Abspülen vom Flaschenboden gelöst, nach Abzentrifugieren (400 g, 20°C, 7 min) mit Hilfe einer 20G Kanüle resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:2 neu ausgesät. Eine mögliche Kontamination der Zelllinie mit Mykoplasmen wurde ausgeschlossen.

### 2.2.1.5 Generierung von Bone-marrow-derived DC

Balb/c Mäuse wurden unter Kurznarkose mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet, dann zur Präparation auf einer Unterlage fixiert und mit Isopropanol übergossen. Anschließend wurden die Knochen der Hinterläufe (Femur und Tibia) mit sterilem Besteck entnommen und grob von Geweberesten gereinigt. Unter sterilen Bedingungen unter der Flow wurden nun die Knochen ca. eine Minute in Isopropanol eingelegt, danach in NaCl abgewaschen und der Markraum mit einer Schere eröffnet, indem die Knochenenden beidseits abgeschnitten wurden.

Als nächstes wurden die Knochenmarkszellen mit RPMI-Vollmedium mit Hilfe einer 20 ml Spritze mit 27G Kanüle gründlich ausgespült und durch ein 40 µm Zellsieb gefiltert. Nach Abzentrifugieren der Zellen (400 g, 4°C, 7 min) und Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Danach erfolgte das Auffüllen des 50 ml Falcons mit PBS und erneutes Abzentrifugieren. Zuletzt wurde das Zellpellet im gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Knochenmarkszellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Konzentration gebracht.

Zur Generierung von myeloiden DC wurden 1 Mio. Zellen pro ml in RPMI-Vollmedium gebracht und unter Zusatz von GM-CSF (200 U/ml) und Interleukin-4 (20 ng/ml) sechs Tage maturiert. An Tag 4 der Kultur wurde noch einmal die Hälfte des Ausgangsvolumens an frischem Medium plus GM-CSF/IL-4 zugegeben. Am Tag 6 der Kultur schließlich wurden die ausdifferenzierten MDC geerntet durch Abpipettieren des Überstandes und nachfolgendem Ausspülen der Kulturflasche mit kaltem PBS, um auch leicht adhärente Zellen abzulösen. Um plasmazytoide DC zu erhalten, wurden die Knochenmarkszellen in einer Konzentration von 2-3 Mio./ml in RPMI *complete* unter Zusatz von humanem Flt3Ligand (10 µg/ml) 1:500 ausgesät. Anschließend wurden diese unter ruhigen Bedingungen (*don't shake or stir!*) für acht Tage im Brutschrank maturiert und schließlich analog den myeloiden DC geerntet.

### 2.2.1.6 Kokultur von dendritischen Zellen und Tumorzellen

Um eine Präsentation typischer Antigene der C26-Kolonkarzinomzelllinie zu erreichen, wurden durch Bestrahlung inaktivierte Tumorzellen zu differenzierten unreifen dendritischen Zellen gegeben. Hierzu wurden die bestrahlten Tumorzellen im Verhältnis 1:5 zu den BMDC aus GM-CSF/IL-4 Kultur gegeben und in frischem RPMI-Vollmedium neu ausgesät.

#### 2.2.1.7 In vitro-Aktivierung der dendritischen Zellen

24 Stunden nach Zugabe der bestrahlten Tumorzellen wurden die myeloiden DC mit 6 µg/ml CpG 1826 für 18,5 Stunden aktiviert, bevor sie zur Immunisierung eingesetzt wurden.

#### 2.2.1.8 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus entnommenen Milzen

Zur Isolation von Splenozyten wurden die Milzen zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend die Zellen mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebs vereinzelt. Nach Abzentrifugieren der Zellen (400 g, 4°C, 7 min) und Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5-10 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte das Auffüllen des 50 ml Falcons mit PBS und erneutes Abzentrifugieren. Meistens musste der Lyseschritt im Anschluss noch einmal wiederholt werden, um eine vollständige Lyse der noch verbliebenen Erythrozyten zu erzielen. Das auf diese Weise gewonnene Zellpellet wurde dann entweder mit Medium auf die gewünschte Konzentration gebracht (meist 2 Mio./ml) und in Kultur genommen oder zur FACS-Färbung in PBS resuspendiert.

#### 2.2.1.9 Herstellung einer stabilen Wasser-Öl-Emulsion als Retardformulierung

In einem einfachen Versuchsansatz zur kontrollierten Freisetzung von Resiquimod wurde R-848 mit *inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA)* als ölige Phase emulgiert. Eine stabile R-848/IFA Wasser-Öl-Emulsion wurde hergestellt, indem in PBS gelöstes R-848 und IFA im Volumenverhältnis 1:1 mehrere Minuten lang durch eine 27G Kanüle gezogen wurde.

#### 2.2.1.10 Herstellung von Nukleotid-Polyarginin-Komplexen

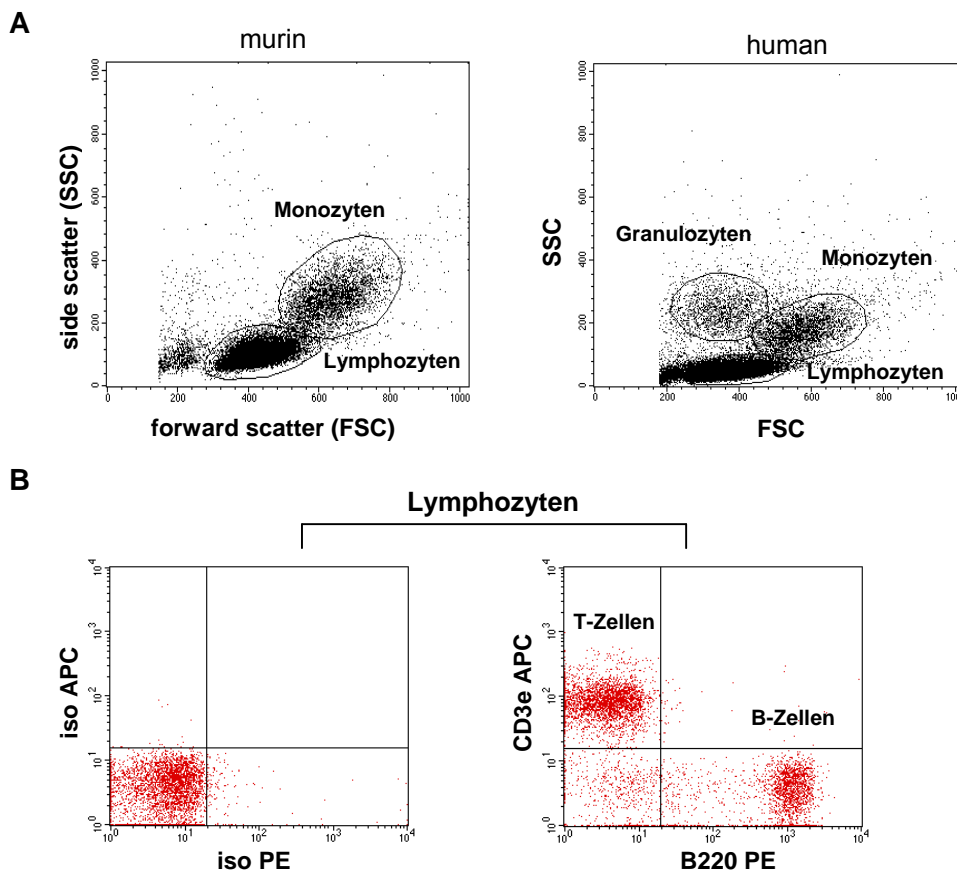
Zur Erzeugung stabiler Komplexe wurden RNA- und DNA-Moleküle im Verhältnis 1:2 mit Polyarginin zusammengebracht. Die Mischung der Nukleotide mit dem Trägerpolypeptid wurde immer frisch hergestellt und zur besseren Komplexbildung 15 min auf Eis inkubiert.

## 2.2.2 Durchflusszytometrie (Flowzytometrie)

### 2.2.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Bei der Durchflusszytometrie mit einem *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS) werden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Oberflächenantigene markiert und das durch Laserstrahl hervorgerufene Streulicht und Fluoreszenzmuster analysiert.

### Funktionsprinzip Durchflusszytometrie (FACS)

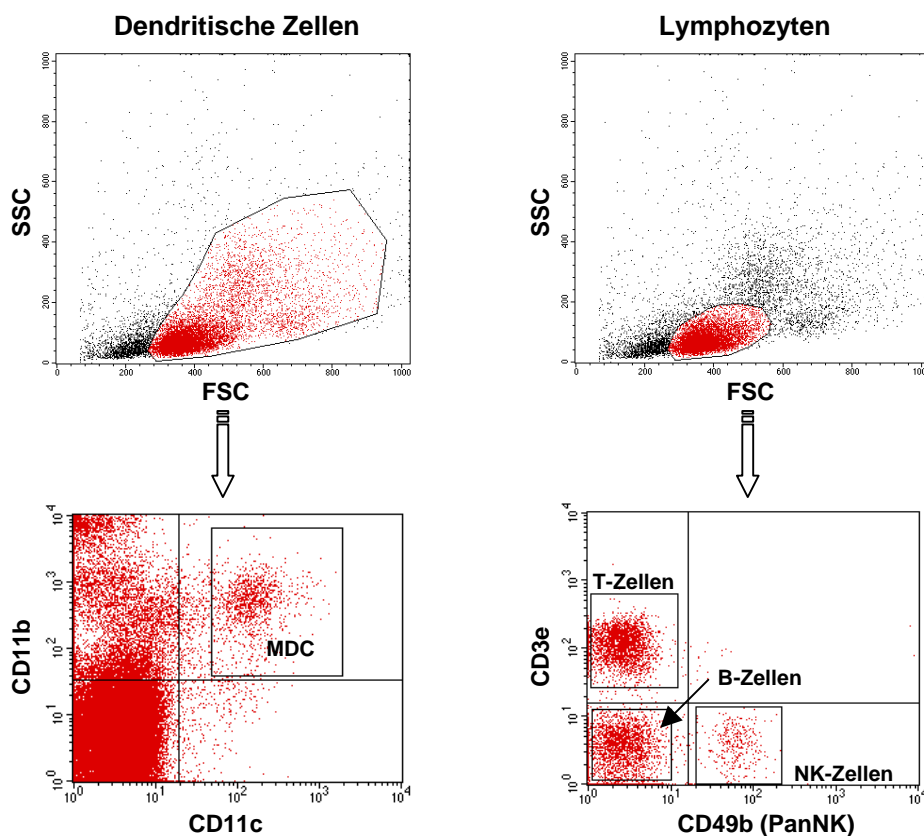


### Abb. 3. Flowzytometrie mittels *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS)

**A** Anhand von Größe (Vorwärtsstreulicht = forward scatter (FSC)) und intrazellulärer Granularität (Seitwärtsstreulicht = side scatter (SSC)) können einzelne Zellpopulationen unterschieden werden. Die gewünschte Population kann mit Hilfe dieser Kriterien durch geeignetes Gating (Kreise) ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. **B** Gating auf Lymphozyten: durch Fluorochromfärbung verschiedener Oberflächenmerkmale gelingt die Aufschlüsselung der homogenen Lymphozytenpopulation in T- (CD3e+) und B-Zellen (B220+) (re Bild). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Subpopulation wird dabei immer in Relation zur Signalintensität der unspezifischen Isotypkontrolle (CD3e-, B220-)(li Bild) definiert. Dadurch lassen sich Zellen in ihren Eigenschaften qualitativ und quantitativ vergleichen.

### 2.2.2.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden  $2 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 200  $\mu$ l Medium oder PBS resuspendiert und gefärbt. Dabei wurden die Zellen 30 min auf Eis unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) inkubiert, anschließend mit PBS einmal gewaschen und nach erneuter Abzentrifugation im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur FACS-Messung wurden die Zellen schließlich in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert. Abb. 4 zeigt das in der vorliegenden Arbeit verwendete Gating auf Milzzellsuspensionen mit Definition der einzelnen Zellpopulationen anhand von typischen Oberflächenmerkmalen.



**Abb. 4. Gating auf Splenozyten**

In der Folge verwendete Gates für MDC, T-, NK- und B-Zellen: MDC (CD11c+/CD11b+), T-Zellen (CD3e+/CD49b-), NK-Zellen (CD3e-/CD49b+), B-Zellen (CD3e-/CD49b-)

### 2.2.2.3 Bestimmung von intrazellulären Molekülen

Zur Messung intrazellulärer Moleküle wurden die Zellen nach der konventionellen Oberflächenfärbung mit 200 µl zweiprozentigem Paraformaldehyd (Fixierungspuffer) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 200 µl Saponin-haltiger Lösung (Permeabilisierungspuffer) für 20 min permeabilisiert und der entsprechende Fluoreszenz-Antikörper für die intrazelluläre Messung hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 25 min bei RT wurden die Zellen vor der Messung im Durchflusszytometer zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Analyse wurde dann wie oben beschrieben durchgeführt.

Im speziellen Fall der Detektion AH1-Peptid-spezifischer T-Zellen durch Bestimmung von intrazellulärem IFN- $\gamma$  wurden Splenozyten immunisierter Tiere *in vitro* restimuliert. Nach Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden hierzu pro Maus jeweils 5 Mio. Milzzellen in 1 ml Medium in zwei Vertiefungen einer 24 well-Platte gegeben. Jeweils ein Ansatz wurde mit 5 µg/ml AH1-Peptid für fünf Stunden restimuliert, während der zweite Ansatz unstimuliert blieb. Als Positivkontrolle erfolgte die unspezifische Stimulation einer zusätzlichen Probe mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin. Während der letzten vier Stunden wurde zu allen Ansätzen 1 µg/ml Brefeldin A hinzugefügt, welches durch Blockade des Golgi-Apparats die Sekretion von Proteinen hemmt. Dadurch kann das von den spezifisch gegen das Peptid gerichteten T-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  intrazellulär nachgewiesen werden. Nach der Restimulation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und in jeweils 100 µl PBS zur FACS-Färbung resuspendiert. Oberflächen- und Intrazellulärfärbung wurden im Anschluss wie oben beschrieben durchgeführt, der verwendete FITC-markierte Antikörper gegen IFN- $\gamma$  dabei in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und deren dazugehörige maximale Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:**

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Fluorescein-Isocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
Phycoerithrin (PE)	565 nm	575 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm



#### 2.2.2.4 Messung der spezifischen Lyse von Targetzellen *in vivo*

Mit Hilfe des *in vivo*-Zytotoxizitäts-Assays kann die zytotoxische Immunantwort in immunisierten Tieren untersucht werden.

Dazu werden naive Splenozyten *in vitro* mit Antigen in Form eines Peptids beladen, das auf diese Weise im MHC-I-Komplex präsentiert wird. In vorher gegen dieses Antigen erfolgreich immunisierten Tieren werden diese Zellen durch zytotoxische Zellen des Immunsystems selektiv angegriffen und zerstört. Um diese antigenspezifische Zytolyse nachweisen zu können, wird eine Fraktion naiver Splenozyten mit Peptid beladen, während ein zweiter Teil der Milzzellen unbeladen bleibt. Zusätzlich werden die peptidbeladenen Zellen mit Hilfe des Farbstoffes 5-(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) angefärbt (CFSE<sup>high</sup>). Dieser bindet spontan und irreversibel sowohl intrazelluläre als auch oberflächliche Moleküle und ist durch seine Fluoreszenz im Durchflusszytometer im FITC-Kanal detektierbar. Auch die unbeladenen Zellen werden mit CFSE gefärbt, allerdings in einer zehnfach stärkeren Verdünnung (CFSE<sup>low</sup>). Dadurch lassen sich beide Population aufgrund der unterschiedlichen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) unterscheiden.

Nach intravenöser Injektion beider Zellpopulationen in immunisierte Tiere werden peptidbeladene Zellen durch das Immunsystem selektiv zerstört, wodurch das Verhältnis von peptidbeladenen zu unbeladenen Zellen abnimmt. In unbehandelten Kontrolltieren bleibt dieser Quotient jedoch konstant. Zielgröße dieses Assays ist die spezifische Lyse, die in Relation zu nicht immunisierten Kontrolltieren mit Hilfe folgender Formel berechnet wird:  $100 - (100 \times \text{bereinigte Überlebensprozentzahl})$ . Die bereinigte Überlebensprozentzahl ergibt sich hierbei aus dem Verhältnis  $(\text{CFSE}^{\text{high}} / \text{CFSE}^{\text{low}}) / \text{Mittelwert dieses Quotienten der Kontrolltiere}$  (Salio, 2004).

Zu diesem Zweck wurden die Splenozyten einer naiven Balb/c Maus nach Erylyse in zwei Fraktionen aufgeteilt, von denen eine mit 100 µg/ml AH1-Peptid 60 min bei 37°C in einem Volumen von 500 µl inkubiert wurde. Beide Fraktionen wurden danach zweimal mit HBSS gewaschen. Der Anteil peptidbeladener Zellen wurde anschließend mit 15 µl 1mM CFSE gefärbt (CFSE<sup>high</sup>), während der unbeladene mit 15 µl 0,1 mM CFSE markiert wurde (CFSE<sup>low</sup>). Beide Färbungen fanden in einem Volumen von 1 ml für 15 min bei Raumtemperatur statt. Nach einmaligem Waschen in HBSS wurden die Fraktionen im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 10 Millionen Zellen intravenös injiziert. 18 Stunden nach Injektion wurden die Tiere getötet, die Milzen entnommen und die Splenozyten als Einzelzellsuspensionen präpariert. Im Anschluss wurden die Zellen am FACS analysiert und die daraus ermittelbare spezifische Lyse CFSE-gelabelter Targetzellen quantifiziert.

### 2.2.2.5 Pentamere MHC-I-Moleküle

Eine erst vor kürzerer Zeit entwickelte Methode zur Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen ist die sogenannte Tetramer-Technik (Altman, 1996). Hierfür werden mit unterschiedlichen Expressionssystemen lösliche MHC-I-Moleküle generiert. Anschließend werden die Moleküle gereinigt, konzentriert und biotinyliert. Entsprechend ihrer jeweiligen HLA-Subtypenzugehörigkeit werden die synthetisierten MHC-I-Moleküle mit korrespondierenden Peptiden beladen und nachfolgend mit Streptavidin tetramerisiert. Analog verläuft die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Pentamere. Die so generierten Peptid-beladenen tetra- bzw. pentameren MHC-I-Moleküle können mit Fluorochromen markiert und anschließend für Analysen am FACS eingesetzt werden.

Zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen wird die Tatsache genutzt, dass diese ihr Zielpeptid erkennen, wenn es in MHC-Komplexen präsentiert wird. Dabei erkennen zytotoxische T-Zellen (CTL) ihr spezifisches Peptid über MHC-I-, T-Helfer-Zellen dagegen über MHC-II-Komplexe.

Die Anfärbung Peptid-spezifischer T-Zellen mit MHC-Peptid-Komplexen beruht also auf der stabilen Pentamer-Bindung an die entsprechenden T-Zell-Rezeptoren. Dieses Verfahren stellt eine äußerst genaue Methode für die direkte Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen aus peripherem Blut oder gemischten Zellkulturen dar.

Für die Färbung mit MHC-I - AH1-Pentameren wurden je 2 Millionen Splenozyten der immunisierten Tiere in ein FACS-Röhrchen überführt und in 50 µl Waschpuffer resuspendiert. Jede Probe wurde mit 10 µl fluoreszenzmarkiertem Pentamer für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem Waschschrift mit Waschpuffer wurde die Oberflächenfärbung mit PerCP-markiertem anti-CD8-Antikörper für 20 min bei 4°C durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen.

### 2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung

Bei der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert wurden, werden sie gewaschen und anschließend in MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten

eingbracht und somit alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden.

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechendem Hersteller-Protokoll verwendet.

Die Aufreinigung von plasmazytoiden DC aus Flt3L Kultur wurde mit B220 Beads durch Positivselektion über eine LS-Säule durchgeführt. Die Reinheit, per FACS-Analyse bestimmt, betrug dabei >95%.

## 2.2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay

### 2.2.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Methode des *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) basiert auf der Antikörper-vermittelten Detektion von Proteinen, die durch Koppelung mit einem Enzym und anschließender Farbreaktion nachgewiesen werden.

Hierzu werden geeignete 96-Well Platten mit einem ersten sogenannten *capture antibody* vorbeschichtet (*coating*). Dies geschieht, indem der entsprechende Antikörper in der vorgegebenen Verdünnung in *coating buffer* in allen Wells vorgelegt und meist über Nacht bei 4 °C inkubiert wird. Am Folgetag wird dann nach Waschen (um überschüssigen, nicht gebundenen *capture antibody* zu entfernen) die Platte für ca. zwei Stunden mit proteinhaltiger Lösung (*assay diluent*) geblockt, um in der Folge eine unspezifische Proteinbindung der Proben zu vermeiden. Anschließend werden zellfreie Kulturüberstände oder Serumproben, ggf. verdünnt mit *assay diluent*, neben einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge in Wells pipettiert. Während der zweistündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an die Antikörper. Nach drei Waschschritten zur Entfernung ungebundenen Proteins wird nun ein zweiter, biotinylierter Antikörper (*detection antibody*) zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. 30 min später folgt ein weiterer Waschvorgang. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben,

welches an Biotin bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des Konjugates durch einen weiteren Waschschrift, gibt man die Substratlösung hinzu. Gebundenes Enzym setzt diese nun zu Farbstoff um. Die Farbtintensität, die proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist, und deren damit verbundene Extinktion wird dann mittels eines ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe besteht die Möglichkeit, die genaue in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen.

Während der Inkubationszeiten zwischen den einzelnen Arbeitsschritten ist es dabei erforderlich, die ELISA-Platten immer mit Folie abzukleben, um ein Eintrocknen insbesondere der Antikörper zu verhindern.

#### 2.2.4.2 Zytokinmessung

##### 2.2.4.2.1 Kommerzielle Kits

Zur Bestimmung verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen oder Serumproben wurden ultrasensitive *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) angewandt. Für alle bestimmten Zytokine mit Ausnahme von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) wurden dabei kommerziell verfügbare Kits verwendet und ELISAs gemäß der entsprechenden Hersteller-Protokolle durchgeführt. Proben wurden hierbei in der Regel in einer Verdünnung von 1:2 aufgetragen.

##### 2.2.4.2.2 Interferon- $\alpha$ Bestimmung

Zum Nachweis von murinem IFN- $\alpha$  in Zellüberständen und Serum wurde dagegen ein eigens dafür zusammengestellter ELISA verwendet und nach nachfolgend beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Der *capture antibody* wurde dazu 1:100 in *coating buffer* verdünnt, 50  $\mu$ l/Well in eine 96-Well *half area* ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschriften mit 150  $\mu$ l/Well *wash buffer* wurden die Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit *assay diluent* geblockt. Im Anschluss erfolgte nach erneutem Waschen (3x) das Auftragen von Proben und Standardverdünnungsreihe (50  $\mu$ l/Well). Nach einer Inkubationszeit von 2 h RT wurde nach nochmaligem Waschen (5x) 50  $\mu$ l/Well *detection antibody* (1:4000 in *assay diluent*) für weitere 1,5 h zugegeben. Danach wurde erneut gewaschen (3x) und Horseradish Peroxidase (HRP) 1:4000 in

*assay diluent* (50 µl/Well) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei RT wurde im finalen Waschschrift (5x) diesmal auf eine Einwirkzeit des Waschpuffers von jeweils mindestens einer Minute geachtet. Zum Abschluss wurde die verbliebene Flüssigkeit durch Ausklopfen der Platten auf saugfähigem Papier entfernt und Substratlösung (50 µl/Well) zugegeben. Nach ca. 20 - 30 min im Dunkeln wurde die Farbentwicklung mit 2N Schwefelsäure gestoppt (25 µl/Well) und die Extinktionswerte (OD = optical density) mittels ELISA-Reader gemessen. Proben wurden für diesen ELISA pur oder in einer Verdünnung von 1:2 aufgetragen.

#### 2.2.4.3 Bestimmung von Immunglobulinen im Serum

Zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper unterschiedlicher Immunglobulinklassen in Serumproben wurde ein möglichst einfaches ELISA-Verfahren entwickelt.

Hierzu wurden 96-well ELISA-Platten mit Antigen (Ovalbumin 10µg/ml in PBS) vorbeschichtet, über Nacht bei 4 °C inkubiert und nach dreimaligem Waschen (150 µl/Well *wash buffer*) mit 150 µl/Well *block buffer* für 1 h geblockt. Danach erfolgte das Auftragen der Serumproben (50 µl/Well) 1:100 verdünnt in PBS. Nach erneuter Inkubationszeit von 1 h und einem weiteren Waschschrift (3x) wurde HRP-gekoppelter Antikörper gegen murines Immunglobulin zugegeben. Die *detection antibodies* für IgM, Gesamt-IgG sowie IgG1 wurden dabei in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS, zum Nachweis von IgG2a 1:4000 eingesetzt (50 µl/Well). Eine Stunde später erfolgte nach finalelem Waschschrift (3x) die Zugabe von Substratlösung (50 µl/Well). Nach 10 – 20 min wurde die Farbentwicklung mit 2 N Schwefelsäure gestoppt (25 µl/Well) und die Extinktionswerte (OD) mittels ELISA-Reader gemessen.

Bei fehlender Standardverdünnungsreihe konnte auf diese Weise der Titer antigenspezifischer Immunglobuline im Serum zumindest semiquantitativ, d.h. in Relation der Vergleichsgruppen zueinander, bestimmt werden.

## 2.3 Subkutanes C26 Tumormodell

### 2.3.1 Versuchstiere und behördliche Genehmigung

Als Versuchstiere wurden zwischen sechs und acht Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse (Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln, D) verwendet. Alle Tierversuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie mit behördlicher Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

### 2.3.2 Induktion subkutaner C26 Kolonkarzinomtumore (Tumorchallenge)

Für die Induktion von experimentellen Tumoren wurden Versuchstieren unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran  $2 \times 10^5$  vitale C26 Kolonkarzinomzellen subkutan in die Flanke injiziert. In dieser Dosis entwickelte sich ein ab dem 5. - 7. Tag palpabler Tumor. Als Maß für die Querschnittsfläche des Tumors wurde das Produkt aus größtem Querdurchmesser (mm) mal darauf senkrechtem Durchmesser (mm) dreimal wöchentlich bestimmt. Die Tiere wurden getötet (Isoflurannarkose und zervikale Dislokation) sobald die Tumorfläche  $225 \text{ mm}^2$  überschritt. Bei der Vorstudie zeigte sich, dass die Mäuse ohne Tumorzellen durch den schnell wachsenden Tumor im Mittel 30 Tage nach Injektion der Tumorzellen getötet werden müssen (Brunner, 2000).

### 2.3.3 Therapie und Zielgrößen

Zielgrößen der Therapie waren Tumorgröße und Mortalität (aufgetragen als Kaplan-Meier-Graph). Mäuse, bei denen es unter der Therapie zu einer vollständigen Tumorrückbildung kam, wurden acht weitere Wochen auf Tumorfreiheit kontrolliert. Die erste Behandlung erfolgte in der Mehrzahl der Fälle an Tag 10 (Tag 7 bis Tag 14) nach Tumorinduktion bei einer Tumorfläche von durchschnittlich  $25 \text{ mm}^2$  und wurde im Verlauf jeden 7. Tag wiederholt.

Für die Vakzinierung ohne dendritische Zellen wurden entweder CpG-Oligonukleotid oder R-848 (Resiquimod) alleine peritumoral und gleichzeitig dieselbe Dosis kontralateral (tumorfrem) s.c. injiziert. Die komplette dendritische Zellvakzine hingegen enthielt CpG ODN bzw. R-848 peritumoral plus eine Mischung aus CpG oder R-848 und  $2 \times 10^5$  tumorzellgepulsten CpG-aktivierten dendritischen Zellen tumorfrem (Abb.6). Als CpG-Oligonukleotid wurde die Sequenz 1826 (5'-TCC ATG **ACG** TTC **ACG** TT-3') eingesetzt (Yi, 1998; Brunner, 2000), pro Applikationszeitpunkt  $100 \mu\text{g}$ , suspendiert in  $100 \mu\text{l}$  PBS. Die Einzeldosis für R-848 betrug jeweils  $20 \mu\text{g}$  pro Injektion, ebenfalls gelöst in PBS. Die tumorzellgepulsten CpG ODN-aktivierten dendritischen Zellen wurden generiert, indem GM-CSF/IL-4 BMDC (s.o.) an Tag 6 geerntet, mit bestrahlten ( $100 \text{ Gy}$ ;  $\gamma$ -Strahler) C26-Tumorzellen (Verhältnis 5:1) koinkubiert und an Tag 7 während der letzten 24 h zusätzlich mit CpG ODN ( $6 \mu\text{g/ml}$ ) aktiviert wurden (Abb. 5). Die Therapie erfolgte dann schließlich an Tag 8 der Kultur.

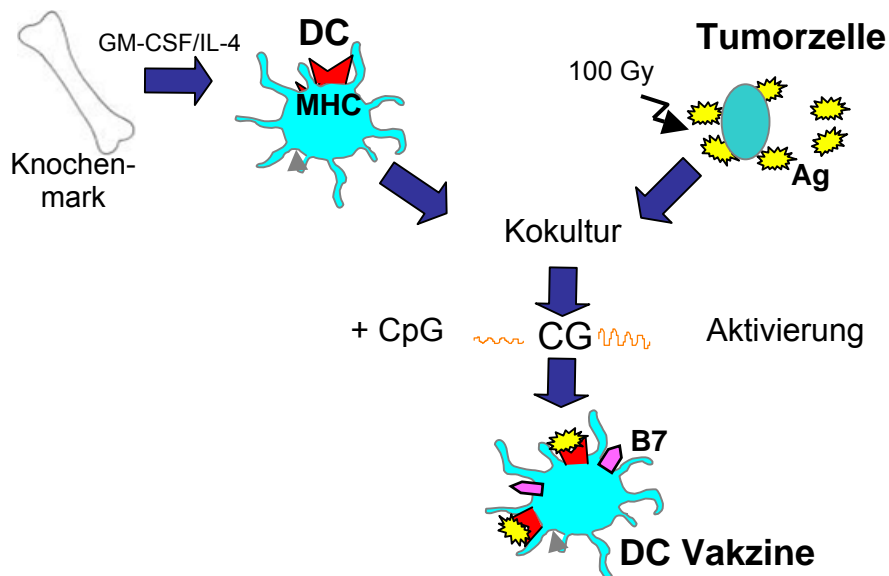
Für die Therapie mit Oligonukleotid oder R-848 alleine wurde die Lösung in einer 27G-Kanüle subkutan in das unmittelbar dem Tumorrand benachbarte gesunde Gewebe injiziert (während der Injektion bildet sich ein sichtbares subkutanes Flüssigkeitsdepot).

Bei der dendritischen Zellvakzine wurden die CpG-aktivierten DC durch Abpipettieren des Überstandes nach vorsichtigem Schütteln der Kulturflasche geerntet, anschließend gewaschen und in HBSS (*Hank's balanced salt solution*) resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension (ca. 1 Mio./ml) wurden unmittelbar vor der Injektion 100 µg CpG ODN bzw. 20 µg R-848 pro Maus zugegeben und schließlich 200 µl des jeweiligen Gemisches mit einer 27G-Kanüle tumorfern (kontralaterale Flanke) gespritzt.

Der Gesamtzustand der Mäuse wurde dreimal wöchentlich (ab Tag 9 täglich) nach einer Bewertungstabelle beurteilt (Tabelle 4). Versuchstiere, die einen Wert über 2 (mittlere Belastung) erreichten, wurden getötet.

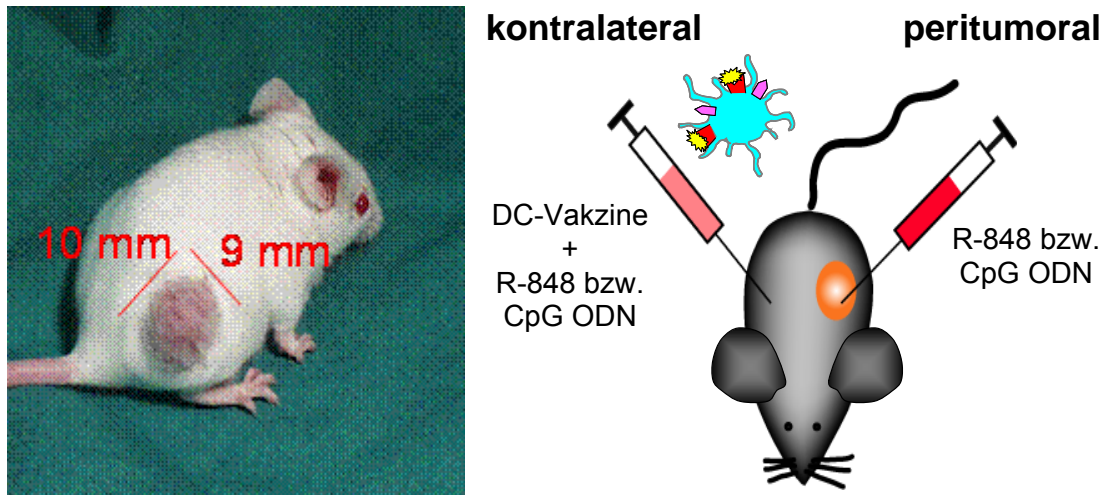
**Tabelle 4: Bewertungsschema für die Belastung der Versuchstiere**

Score	Schweregrad der Belastung	Beschreibung
0	keine	glattes Fell, normales Verhalten
1	leicht	Piloerektion, motorische Aktivität gedämpft, normales Muster provozierten Verhaltens
2	mittel	gesträubtes Fell, Sekretion aus Augen und Nase, intermittierende Buckelhaltung, provoziertes Verhalten gedämpft
3	stark	permanente Buckelhaltung, erschwerte Atmung, keine Reaktion gegenüber äußeren Einflüssen



**Abb. 5. Dendritische Zellvakzine**

*Bone-marrow-derived* DC (BMDC) werden 24 h lang mit bestrahlten C26 Tumorzellen koinkubiert und anschließend weitere 24 h mit CpG ODN 1826 stimuliert. Während der Kokultur prozessieren die DC Tumorantigen, das sie nach Aktivierung in Verbindung mit kostimulatorischen Molekülen (B7) stabil präsentieren.



**Abb. 6. C26 Kolonkarzinom Mausmodell**

C26 Tumorzellen werden subkutan am Tag 0 injiziert. Die Behandlung wird an Tag 10 begonnen, wenn die Tumoren eine Größe von ungefähr  $20 \text{ mm}^2$  erreicht haben. Die DC-Vakzine stammt von knochenmarksgenerierten DC (*bone-marrow-derived DC*), die 24 h mit bestrahlten C26 Tumorzellen koinkubiert und anschließend für weitere 24 h mit CpG ODN 1826 stimuliert werden. Für die Immuntherapie werden  $2,0 \times 10^5$  aktivierte DC in die kontralaterale Flanke injiziert, zusammen mit  $20 \mu\text{g}$  R-848 oder  $100 \mu\text{g}$  CpG ODN. Zusätzlich werden  $20 \mu\text{g}$  R-848 bzw.  $100 \mu\text{g}$  CpG ODN peritumoral verabreicht. Dieses Therapieschema wird an den Tagen 15 und 22 wiederholt.

## 2.4 Statistische Analyse

Bei allen *in vivo* und *in vitro* Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der gemessenen Einzelwerte dargestellt werden. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $< 0,05$  bzw.  $p < 0,01$  angenommen und ist durch Markierung mit \* bzw. \*\* angezeigt. Bei Tumorversuchen wurde der *log-rank*-Test (Überlebenszeiten), der Mann-Whitney Test (Tumorgrößen) sowie der Student t-Test (*ex vivo* Versuche) verwendet. Eine Beratung erfolgte durch das statistische Beratungslabor, Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA) und Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., NJ, USA).



## 3. Ergebnisse

### 3.1 Pharmakodynamik von R-848 (Resiquimod) *in vivo*

#### 3.1.1 Immunstimulatorischer Effekt von R-848 bei subkutaner Injektion

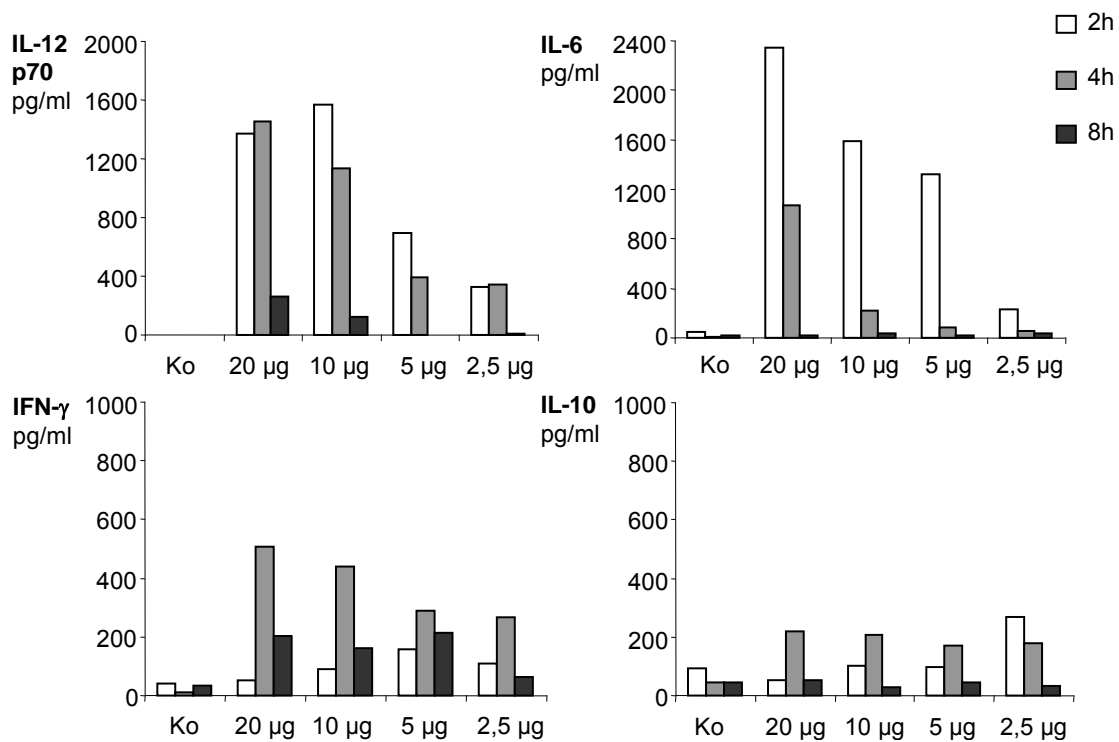
Ausgehend von den beschriebenen Fähigkeiten von R-848 (Resiquimod) zur Schaffung eines potenten  $T_H1$ -Zytokinmilieus (Wagner, 1999; Vasilakos, 2000; Hemmi, 2002; Ito, 2002) sowie zur Umkehrung einer vorbestehenden  $T_H2$  in eine  $T_H1$  Immunantwort (Vasilakos, 2000), sollte im ersten Schritt untersucht werden, welche Dosis R-848 zur wirkungsvollen Immunstimulation notwendig sein würde. Systemische Effekte in Mäusen waren bei wöchentlicher subkutaner Gabe von 2 bis 200  $\mu\text{g}$  R-848 erreicht worden (Vasilakos, 2000). In einem ersten *in vivo* Versuch sollte daher das generelle immunstimulatorische Potenzial ansteigender R-848-Dosen auf Ebene der Zytokininduktion (ELISA) sowie der Milzzellaktivierung (FACS) bestimmt werden.

##### 3.1.1.1 R-848 induziert hohe $T_H1$ -Zytokinspiegel im Serum

Abb. 7A zeigt die ELISA-Ergebnisse der gepoolten Serumproben. Dort stellte sich R-848 als extrem potente Substanz zur Generierung relevanter  $T_H1$ -Zytokinspiegel dar. Schon für die niedrigste Dosisstufe von 2,5  $\mu\text{g}$  R-848 konnten messbare Serumspiegel für alle drei bestimmten  $T_H1$ -Zytokine (IL-12p70, IL-6, IFN- $\gamma$ ) detektiert werden. Mit ansteigender Dosis bis 10  $\mu\text{g}$  R-848 erhöhten sich diese Spiegel. Darüber hinaus konnte jedoch bei zunehmender Toxizität keine weitere wesentliche Steigerung erzielt werden. Insbesondere für IL-12p70, dem wichtigsten Faktor zur  $T_H1$ -Polarisation, schien bereits bei einer Dosis von 20  $\mu\text{g}$  ein gewisser Deckeneffekt erreicht.

Zusätzlich sollte geklärt werden, ob R-848 gleichzeitig gegenregulatorisch Interleukin-10 induziert. Bei IL-10 handelt es sich um ein antiinflammatorisches Zytokin (Yamano, 2001; Oberholzer, 2002), das vorwiegend von regulatorischen T-Zellen (Tregs), die eine Immunantwort unterdrücken, produziert wird (Till, 2004). Dabei konnte für alle verabreichten Dosen lediglich ein moderater Anstieg von IL-10 im Serum festgestellt werden. Darüber hinaus war in der Vergangenheit gezeigt worden, dass R-848 die Produktion der  $T_H2$ -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 effektiv antagonisiert (Wagner, 1999).

## A

**Abb. 7A. Hohe T<sub>H</sub>1-Zytokinspiegel nach subkutaner Gabe von R-848**

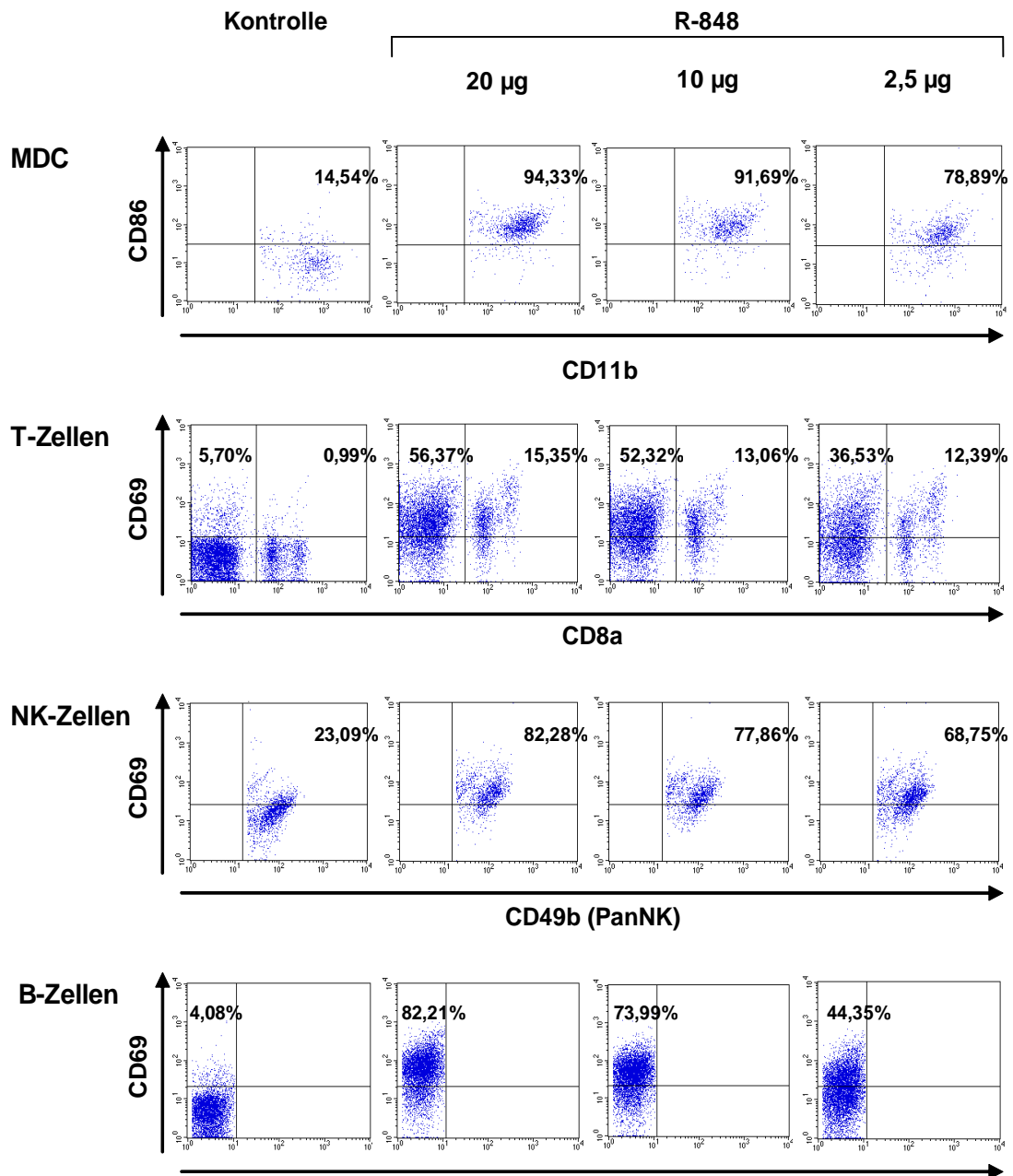
Mäusen wurde 2,5 - 20  $\mu$ g R-848 s.c. injiziert. 2 h, 4 h und 8 h p.i. wurde Blut abgenommen und die Zytokine (3 Mäuse pro Gruppe, gepoolte Seren) durch ELISA bestimmt.; Ko: Kontrolle

**3.1.1.2 Generalisierte Aktivierung von Splenozyten in vivo durch Resiquimod**

Abb. 7B stellt die unspezifisch immunstimulatorische Wirkung ansteigender R-848-Dosen auf die unterschiedlichen Zellpopulationen der Milz dar. Myeloide DC zeigten sich dabei extrem empfindlich gegenüber kleinsten Mengen an Resiquimod, gemessen an der Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7.2). Bereits die niedrigste Dosis von 2,5  $\mu$ g bewirkte eine Steigerung auf das Fünffache der Grundexpression (>78%), höhere Dosen eine praktisch vollständige Aktivierung (94%). Bei B-Zellen konnte man ebenso ein starkes, dosisabhängiges Ansprechen feststellen. Nach 20  $\mu$ g R-848 waren über 80% der B-Zellen in der Milz aktiviert, nach 2,5  $\mu$ g immerhin noch etwa 45%. NK-Zellen zeigten ebenfalls eine deutliche CD69-Hochregulation, allerdings ausgehend von einer höheren konstitutiven Grundexpression. T-Zellen schließlich zeichneten sich durch Aktivierbarkeit sowohl der CD8<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>-</sup> Subpopulation aus. Insgesamt lag der Prozentsatz der aktivierten T-Zellen nach maximaler Stimulation etwas unterhalb der B-Zellen (70% vs. > 80%), aber dennoch führte die subkutane Injektion von R-848 innerhalb weniger Stunden zu einer starken T-Zell-Aktivierung.

R-848 in der Dosierung von 20  $\mu\text{g}$  subkutan verabreicht war folglich in der Lage, relevante Serumspiegel der  $T_H1$ -Zytokine IL-12p70, IL-6 und IFN- $\gamma$  bei moderatem IL-10 zu induzieren. Darüber hinaus führte es in kürzester Zeit zu einer starken Aktivierung eines breiten Spektrums an Immunzellen.

B



**Abb. 7B. Immunstimulatorische Wirkung von R-848 auf Milzzellen**

Versuchsordnung wie Abb. 7A. Im Anschluss an die letzte Blutabnahme nach 8 h wurden die Tiere getötet und die Splenozyten mittels Flowzytometrie hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades analysiert: Expressionslevel von CD86 (B7.2) auf MDC sowie CD69 auf T-, NK-, B-Zellen

### 3.1.2 Subkutane Anwendung von Resiquimod in retardierter Form

Aufgrund der raschen Kinetik der beobachteten pharmakologischen Wirkungen von R-848 nach subkutaner Applikation, sollte im nächsten Schritt eine einfache Retardformulierung entwickelt werden, die eine verzögerte, kontinuierliche Freisetzung der Substanz erlaubt. So sollten zum einen die Serumspiegel der T<sub>H</sub>1-Zytokine, insbesondere von IL-12p70, länger aufrechterhalten werden und zum anderen durch die verzögerte Freisetzung die Toxizität von R-848 vermindert und somit höhere Einzeldosen ermöglicht werden.

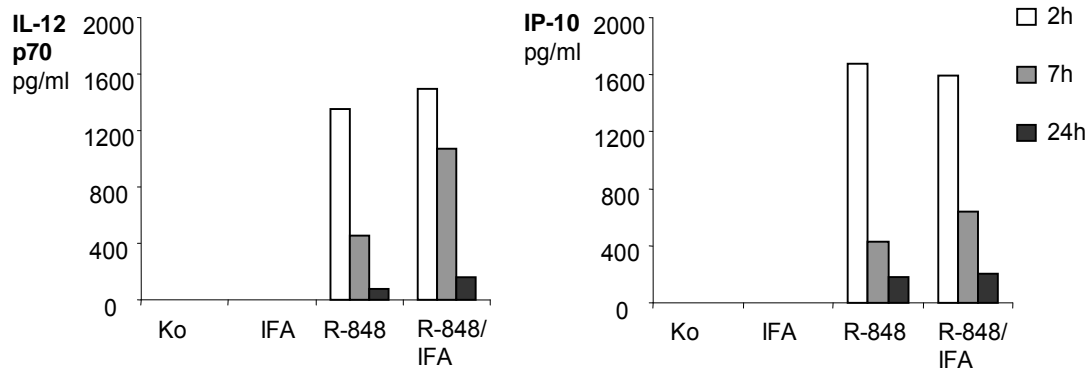
Als einfacher Versuchsansatz zur kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen bot sich die Herstellung einer stabilen Wasser-Öl-Emulsion an, bei der eingeschlossene Moleküle langsamer nach außen diffundieren. Hierfür wurde das gut wasserlösliche Resiquimod in Emulsion mit *inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA)* gebracht.

Unter diesen geänderten Bedingungen zeigten sich allerdings kaum Unterschiede in der Pharmakodynamik (Abb. 8). Der Zytokinpeak wurde unabhängig von der Art der Formulierung bereits zum frühesten gemessenen Zeitpunkt nach zwei Stunden erreicht. Einzig der 7h-Wert von IL-12p70 differierte zwischen beiden Gruppen auffällig. Während der Serumspiegel unter konventioneller Therapie mit R-848 bereits auf Werte um 400 pg/ml abgesunken war, konnte er durch die Retardformulierung noch auf einem Niveau von > 1000 pg/ml gehalten werden. Ein solche Tendenz war nach 24 h nicht mehr erkennbar. Bezüglich IP-10 (*Interferon- $\gamma$ -inducible protein*) ließ sich definitiv kein Vorteil der Retardformulierung erkennen. Auch was klinische Hinweise auf die Toxizität anging, ergaben sich zunächst keine relevanten Unterschiede. Alle Mäuse zeigten in ihrem Verhalten eine stark reduzierte Aktivität in zusammengekauerter Haltung mit erheblicher Piloerektion. Diese setzte ca. 45 min nach der subkutanen Gabe ein und hielt etwa 1,5 - 2 h an. Danach erholten sich die Versuchstiere beider Behandlungsgruppen vollständig. Zusätzlich bestätigte sich erneut, dass auch durch die nochmals gesteigerte Einzeldosis von 40  $\mu$ g R-848 keine weitere Erhöhung des Serumspiegels von IL-12p70 möglich war (Deckeneffekt).

Die FACS-Analyse der Splenozyten 72 h nach Stimulation ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Ergebnisse nicht dargestellt). Vielmehr glich das Aktivierungsmuster der untersuchten Zellpopulationen dem Resultat 8 h nach Gabe von 20  $\mu$ g R-848 (Abb. 7B).

Die einfache Retardformulierung von R-848/IFA als stabile 1:1 Wasser-Öl-Emulsion bot somit nicht die erhoffte Möglichkeit zu einer ausreichend verzögerten, kontinuierlichen

Zytokinwirkung über einen längeren Zeitraum. Eine Überlegenheit gegenüber der normalen subkutanen Gabe von R-848, gelöst in PBS, konnte nicht belegt werden.



### Abb. 8. Retardformulierung von R-848 *in vivo*

40 µg gelöstes R-848 alleine oder in Emulsion mit IFA wurde s.c. injiziert. 2 h, 7 h und 24 h später wurde Blut abgenommen und die Zytokine im Serum (3 Mäuse pro Gruppe, gepoolte Seren) mittels ELISA gemessen. Ko: Kontrolle, IFA: inkomplettes Freund's Adjuvans

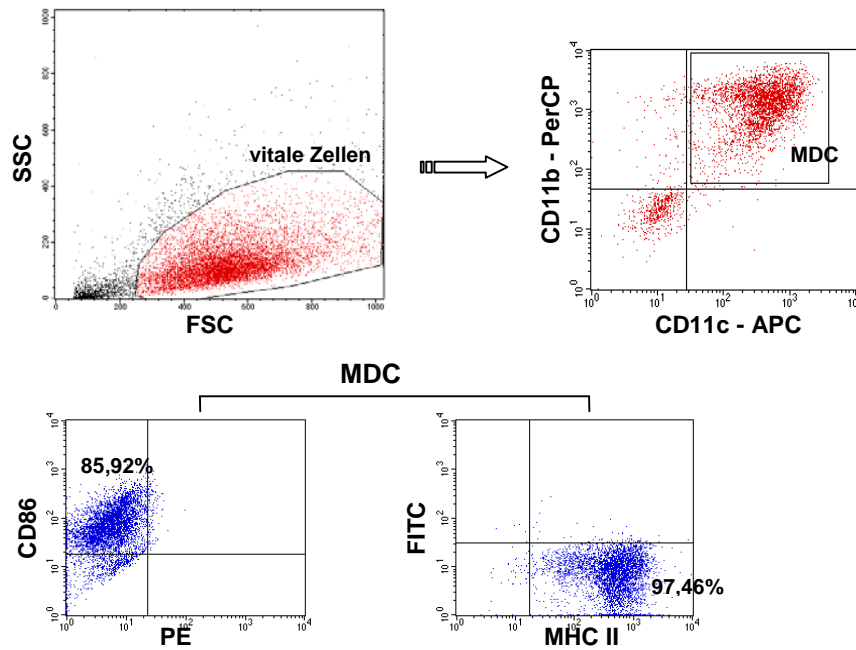
## 3.2 Wirkung von R-848 im C26 Kolonkarzinommodell

### 3.2.1 Charakterisierung der tumorzellgepulsten dendritischen Zellvakzine

Vor dem Hintergrund des hohen immunstimulatorischen Potenzials von R-848 mit Induktion starker  $T_H1$ -Immunantworten stellte sich die Frage nach der Wirksamkeit von R-848 als Adjuvans einer Tumorzellvakzine im subkutanen C26 Kolonkarzinom Tumormodell.

Zentrales Element der Immuntherapie blieb die dendritische Zellvakzine. Als Qualitätskontrolle im Rahmen aller Tumorversuche wurden deshalb die C26 koinkubierten, CpG ODN-stimulierten dendritischen Zellen jeder verabreichten DC-Vakzine hinsichtlich ihrer Reinheit und ihres Aktivierungsgrades mittels Flowzytometrie phänotypisch charakterisiert. Ein typisches Ergebnis hierfür ist in Abb. 9 dargestellt.

Mit einer Reinheit von in der Regel >90% sowie vor allem einem durchwegs sehr hohen Aktivierungsgrad lagen die Ergebnisse hierfür im oberen Bereich dessen, was anderweitig in der Literatur beschrieben ist.



### Abb. 9. Dendritische Zellvakzine

Tumorzellgepulste GM-CSF/IL-4 BMDC wurden mittels Flowzytometrie phänotypisch charakterisiert. Dabei wurden alle vitalen Zellen auf ihre Oberflächenexpression von CD11c und CD11b hin untersucht. Als myeloide dendritische Zellen (MDC) wurden alle CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen definiert und nachfolgend deren Aktivierungsgrad analysiert. Marker hierfür waren die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD86 (B7.2) sowie die Hochregulation von MHC-II Molekülen. Die Abbildung zeigt ein für alle verabreichten DC-Vakzinen repräsentatives Ergebnis.

#### 3.2.2 R-848 im konventionellen etablierten Therapieregime ohne signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum

Anhand des beschriebenen etablierten Therapiemodells (Abb. 6) mit einmaliger Verabreichung des TLR-Agonisten kontralateral und peritumoral gleichzeitig mit der DC-Vakzine wurde der TLR7/8-Ligand R-848 erstmals in seiner Wirkung auf Tumorwachstum und Überleben untersucht. Parallel sollte überprüft werden, ob R-848 alleine, d.h. ohne dendritische Zellvakzine, einen eigenen antineoplastischen Effekt entfalten würde.

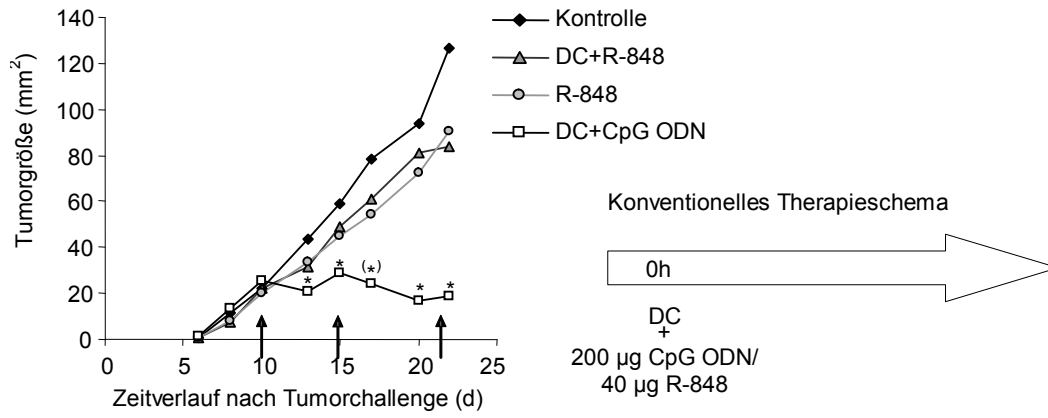
In diesem ersten Versuch ließ sich kein eindeutig positiver Einfluss von R-848 auf Tumorwachstum und Gesamtüberleben dokumentieren und zwar unabhängig davon, ob mit oder ohne dendritischer Zellvakzine verabreicht. CpG ODN dagegen konnte das Tumorwachstum in allen Fällen signifikant reduzieren und führte bei zwei von vier Mäusen zur kompletten Tumorrückbildung und langfristigen Heilung ( $\geq 100$  Tage Beobachtungszeitraum)(Abb. 10).

Abb. 10A zeigt die mittlere Tumorgrößenentwicklung der Behandlungsgruppen. Die durchschnittliche Tumorgröße wurde in allen Experimenten maximal so lange dargestellt bis das zweite Tier einer Therapiegruppe gestorben war. Bei PBS behandelten Kontrolltieren war ein ungebremst schnelles Tumorwachstum zu erkennen, das bis Tag 22 zu einer mittleren Tumorgröße von 120 mm<sup>2</sup> führte. Die beiden Therapiegruppen mit R-848 – einmal mit und einmal ohne dendritische Zellvakzine – wiesen zwar ebenfalls ein kontinuierlich progredientes Tumorwachstum auf. Allerdings lag dieses stets etwas unterhalb der Kontrolle mit Tumoren von 85 mm<sup>2</sup> an Tag 22. Zu keinem der bestimmten Zeitpunkte konnte dabei jedoch Signifikanz erreicht werden. Bei CpG ODN behandelten Mäusen hingegen konnte das Tumorwachstum erwartungsgemäß signifikant reduziert werden mit einer durchschnittlichen Tumorendgröße von 20 mm<sup>2</sup> an Tag 22 ( $p=0,016$ ).

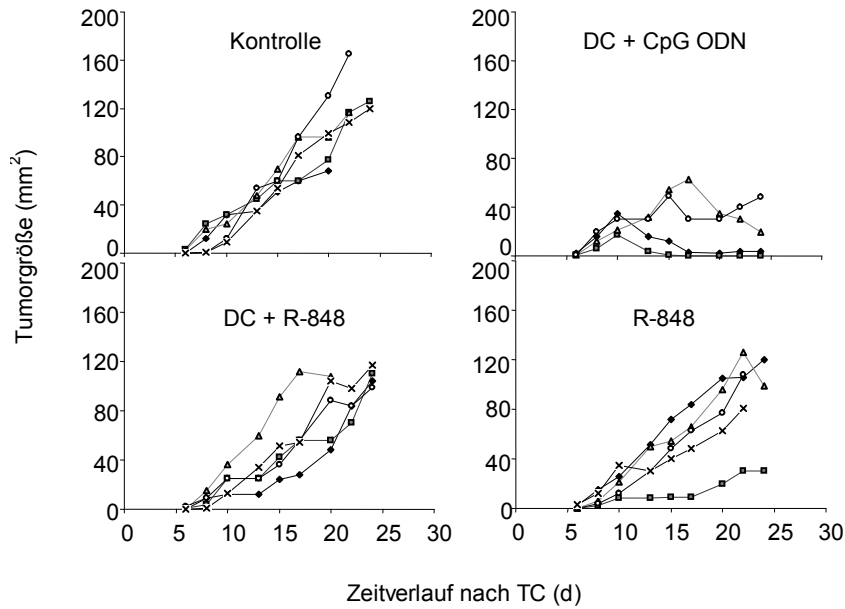
Bei der Betrachtung der Einzeltiere der jeweiligen Therapiegruppen (Abb. 10B) fällt auf, dass die Tumoren der Kontrollgruppe ein sehr homogenes Wachstum zeigten. In der Gruppe der kombinierten Anwendung von DC-Vakzine und R-848 waren die Tumoren ebenfalls rasch progredient, allerdings mit etwas heterogenerem Verlauf. Auch nach der alleinigen Gabe von R-848 nahmen die Tumoren schnell an Größe zu, wobei dort jedoch eines von fünf Tieren eine deutlich verzögerte Tumorprogression aufwies. Die Kombination aus DC-Vakzine und CpG ODN dagegen war bei allen Tieren in der Lage, das Tumorwachstum zu inhibieren und führte bei zwei von vier Mäusen sogar nach 17 Tagen zur kompletten Remission und vollständigen Heilung (Beobachtungszeitraum 100 Tage).

Dadurch offenbarte sich im Gesamtüberleben eine deutliche Überlegenheit der etablierten Standardtherapie aus DC-Vakzine und CpG ODN gegenüber Kontrolle ( $p=0,017$ ) und R-848 ( $p=0,058$ ); für R-848 bestand kein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber PBS behandelten Kontrolltieren (Abb. 10C).

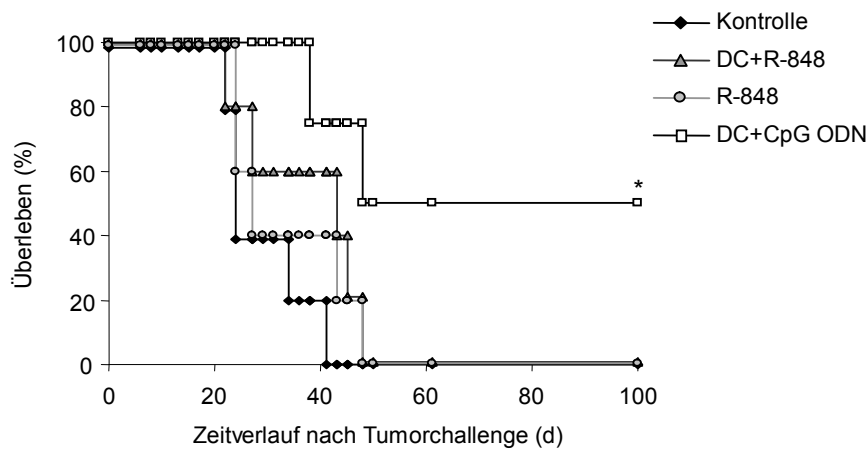
**A Mittlere Tumorgößen**



**B Einzeltiere**



**C Gesamtüberleben**





**Abb. 10. R-848 im konventionellen Therapieprotokoll ohne Effekt auf das Tumorwachstum**

**A** Durchschnittliche Tumorentwicklung unter Therapie mit DC-Vakzine und 100 µg CpG ODN oder 20 µg R-848 tumorfern (kontralateral) plus 100 µg CpG ODN / 20 µg R-848 peritumoral. Alternativ alleinige Applikation von je 20 µg R-848 peritumoral und kontralateral. Die Therapie (Pfeile) wurde an den Tagen 10, 15 und 22 nach Tumorchallenge durchgeführt. **B** Individuelle Tumorgrößen der Einzeltiere der jeweiligen Behandlungsgruppen. **C** Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier.; \* p < 0,05 gegenüber Kontrolle

### 3.2.2 Signifikante Reduktion des Tumorwachstums durch R-848 im intensivierten Therapieregime

Ausgehend von der hohen immunstimulatorischen Potenz bei gleichzeitig jedoch nur schwachem Antitumoreffekt im Rahmen der konventionellen Immuntherapie stellte sich die Frage, ob die festgestellte rasche Kinetik der pharmakologischen Wirkungen von R-848 dabei ursächlich eine Rolle spielte. Nach einmaliger Gabe von 20-40 µg R-848 erreichten die Serumspiegel der gemessenen T<sub>H</sub>1-Zytokine IL-12p70 und IL-6 schon nach ein bis zwei Stunden ihr jeweiliges Maximum, fielen danach aber rapide ab, so dass bereits nach 8 h keine nennenswerten Mengen mehr detektiert werden konnten. Durch 200 µg CpG ODN konnte dagegen eine wesentlich stärkere (höhere Absolutwerte) und längere Immunantwort auf der Ebene der Zytokinspiegel (v.a. IL-12p70) induziert werden (Abb. 11). Aufgrund dieser Beobachtung und angesichts der Tatsache, dass für 20 µg R-848 als Einzeldosis (ED) ein gewisser Deckeneffekt in punkto Zytokininduktion erreicht schien, entstand die Überlegung, wiederholte R-848-Injektionen um den Zeitpunkt der Vakzinierung herum vorzunehmen. So sollte im Idealfall ein mit CpG ODN vergleichbares Zytokinmilieu geschaffen werden, um ein möglichst effizientes Priming von zytotoxischen T-Zellen *in vivo* zu ermöglichen. Deshalb wurde das Therapieprotokoll dahingehend verändert, dass zur Therapie zunächst die DC-Vakzine plus 20 µg R-848 tumorfern gegeben wurde und im weiteren Verlauf nach jeweils 4 h, 6 h, 24 h und 48 h zusätzliche R-848-Gaben (ED 20 µg) peritumoral erfolgten.

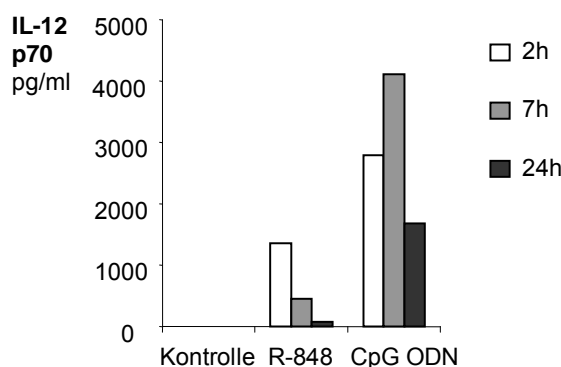
Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich, dass das intensivierte Therapieregime in der Lage war, das Tumorwachstum im Vergleich zu Kontrolle und dendritischer Zellvakzine alleine signifikant zu verlangsamen. Darüber hinaus gelang es sogar, eine kurzzeitige Regression der Tumoren in der mit R-848 behandelten Gruppe zu erreichen (Abb. 12).

In der Kontrollgruppe wuchsen die Tumoren gewohnt rapide bis 130 mm<sup>2</sup> an Tag 22 (Abb. 12A). Die Kurve der nur mit der dendritischen Zellvakzine behandelten Tiere verlief anfangs parallel dazu. Ab Tag 15 allerdings zeigte sich eine gegenüber der

Kontrollgruppe tendenziell verminderte Größenzunahme, so dass bis Tag 22 lediglich 80 mm<sup>2</sup> erreicht wurden. Durch die intensivierete Gabe von R-848 ergänzend zur DC-Vakzine ließ sich dagegen das Tumorstadium von Anfang an wirksam inhibieren. Bereits ab Tag 12 konnte eine sichtbare Reduktion der Tumorstadium festgestellt werden, die ab Tag 16 Signifikanz erreichte ( $p=0,028$ ). An Tag 18, drei Tage nach der zweiten Therapie, wurde sogar eine leichte Regression der durchschnittlichen Tumorstadium beobachtet. Erst ab Tag 20 ließ sich ein dann beschleunigtes Tumorstadium erkennen, das bis Tag 22, dem Zeitpunkt der dritten Vakzinierung, schließlich zu Tumoren von 60 mm<sup>2</sup> geführt hatte.

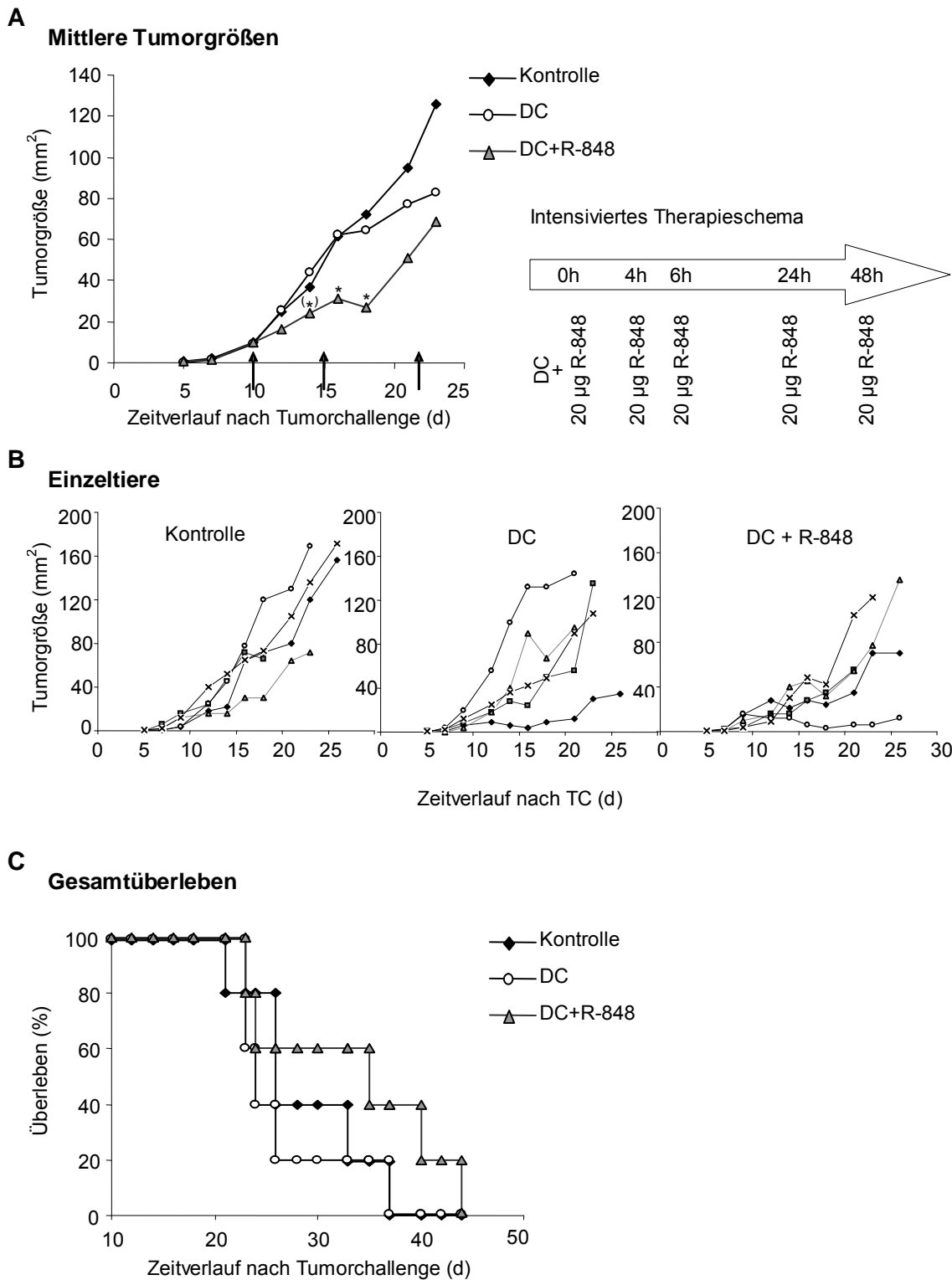
Beim Vergleich der individuellen Tumorstadium (Abb. 12B) zeichnete sich die Kontrollgruppe erneut durch ein relativ homogenes schnelles Tumorstadium aus. In der Gruppe mit alleiniger DC-Vakzinierung fiel dieses sehr viel heterogener aus. Vier von fünf Mäusen entwickelten dabei bis Tag 22 große Tumoren mit  $\geq 100$  mm<sup>2</sup>, bei einem Tier wurde das Tumorstadium allerdings deutlich verlangsamt (30 mm<sup>2</sup>, d 22). Durch die intensivierete Therapie mit R-848 ließ sich im Gegensatz dazu bis Tag 18 eine durchwegs effiziente Verminderung der Tumorstadium bei allen behandelten Mäusen erzielen. Bei vier von fünf Tieren kam es darüber hinaus sogar zum vorübergehenden Rückgang der Tumorstadium um Tag 15 bis 18. Ein Versuchstier konnte dabei dauerhaft in Remission gehalten werden ( $< 10$  mm<sup>2</sup>, d 22), bei allen anderen setzte jedoch um Tag 20 ein beschleunigtes Tumorstadium ein, das durch eine weitere Vakzinierung an Tag 22 schließlich nicht mehr zu kontrollieren war.

Für das Gesamtüberleben war dennoch trotz zwischenzeitlich deutlich vermindertem Tumorstadium kein signifikanter Überlebensvorteil für die mit R-848 behandelte Gruppe erkennbar ( $p=0,287$ )(Abb. 12C).



**Abb. 11. Höhere und länger anhaltende Zytokinspiegel durch CpG ODN verglichen mit R-848**

40 µg R-848 bzw. 100 µg CpG ODN wurden s.c. injiziert. Nach 2 h, 7 h und 24 h wurde Blut abgenommen und IL-12p70 im Serum (3 Mäuse pro Gruppe, gepoolte Seren) mittels ELISA gemessen.



**Abb. 12. Reduktion des Tumorwachstums durch Resiquimod im intensivierten Therapieschema**

**A** Durchschnittliche Tumorentwicklung (5 Mäuse pro Gruppe) unter Therapie mit DC-Vakzine alleine oder in Kombination mit je 20 µg R-848 kontralateral und peritumoral. Die Therapie (Pfeile) wurde an den Tagen 10, 15 und 22 nach Tumorchallenge durchgeführt. **B** Individuelle Tumorgößen der Einzeltiere der jeweiligen Behandlungsgruppen. **C** Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier.; \* p < 0,05 gegenüber Kontrolle

### 3.2.3 DC-Vakzine-unabhängiger Antitumoreffekt von R-848 im modifizierten intensivierten Therapieregime

Basierend auf dem erstmalig beobachteten Antitumoreffekt von R-848 durch das intensivierte Therapieregime wurde in der Folge versucht, das Therapieprotokoll weiter zu optimieren. Der vorherige Versuch hatte gezeigt, dass R-848 seine Wirkung vor allem in einer frühen Phase der Behandlung entfaltete. Die ersten beiden Therapien konnten das Tumorstadium noch effizient kontrollieren, die letzte Therapie hatte aber auf die Tumorstadium keine Einwirkung mehr. Dies konnte einerseits mit der insgesamt wesentlich geringeren Tumorstadium im Frühstadium zusammenhängen oder andererseits auch damit, dass der einwöchige Abstand zwischen zweiter und dritter Vakzinierung zu groß war, um eine robuste Immunantwort gegen den Tumor aufrechtzuerhalten. Für diese Möglichkeit sprach vor allem die Tatsache, dass etwa fünf Tage nach der zweiten Therapie eine beschleunigte Tumorstadium eingetreten war. Somit lag es nahe, zum einen die Therapieabstände zu verringern und zum anderen die Behandlung bei kleineren Tumorstadium zu beginnen. Zudem galt es einen möglichen eigenständigen Antitumoreffekt von R-848, ähnlich dem von Imiquimod, unabhängig von der DC-Vakzine zu untersuchen. Die Verkürzung der Therapieintervalle auf vier Tage machte dabei aus Toxizitätsgründen für die Positivkontrolle eine Halbierung der bisherigen CpG-Dosis erforderlich.

Die Kombination aus DC-Vakzine und R-848 war diesmal überraschender Weise nicht in der Lage, das Tumorstadium signifikant zu reduzieren. Durch die Behandlung mit R-848 ohne DC-Vakzine konnte dagegen eine eindeutige Hemmung erzielt werden, allerdings ohne eine Schrumpfung oder gar komplette Rückbildung der Tumoren zu bewirken (Abb. 13).

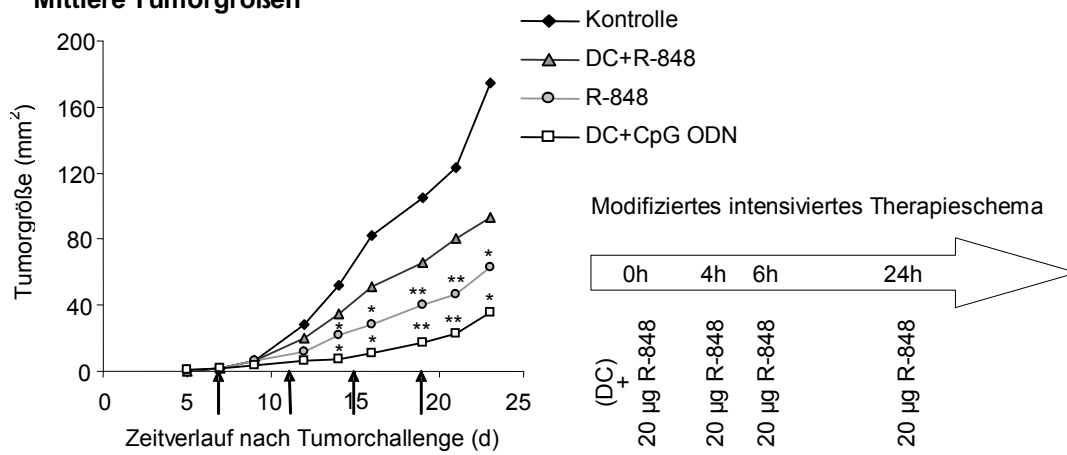
Der Blick auf den Kurvenverlauf der gemittelten Tumorstadium zeigt als Referenz wiederum das rapid progrediente Wachstum der Kontrolle in Abgrenzung zur verminderten Größenzunahme der jeweiligen Therapiegruppen (Abb. 13A). In allen Behandlungsgruppen wurde der therapeutische Effekt bereits ab Tag 12, d. h. einen Tag nach der zweiten Vakzinierung, erkennbar. Dabei nahm das Tumorstadium überall einen stetigen Verlauf mit allerdings unterschiedlicher Progredienz. Den geringsten Einfluss auf den natürlichen Verlauf hatte die Kombination aus DC-Vakzine und R-848. Sie führte zwar tendenziell zur Verlangsamung des Tumorstadiums, erreichte aber diesmal kein Signifikanzniveau ( $p=0,200$ ; ca.  $100 \text{ mm}^2$ , d 23). R-848 alleine gegeben verzögerte dagegen das Wachstum stärker als in Kombination mit DC-Vakzine und zwar ab Tag 14 signifikant von der Kontrolle verschieden ( $p=0,032$ ). Den stärksten Antitumoreffekt demonstrierte erneut CpG ODN. Obwohl es die

Tumorprogression am wirkungsvollsten hemmen konnte ( $p=0,008$ ;  $40 \text{ mm}^2$ , d 23), besaß es jedoch in der halbierten Dosierung nicht das therapeutische Potential, bereits etablierte Tumoren zur Rückbildung zu bringen und zu heilen.

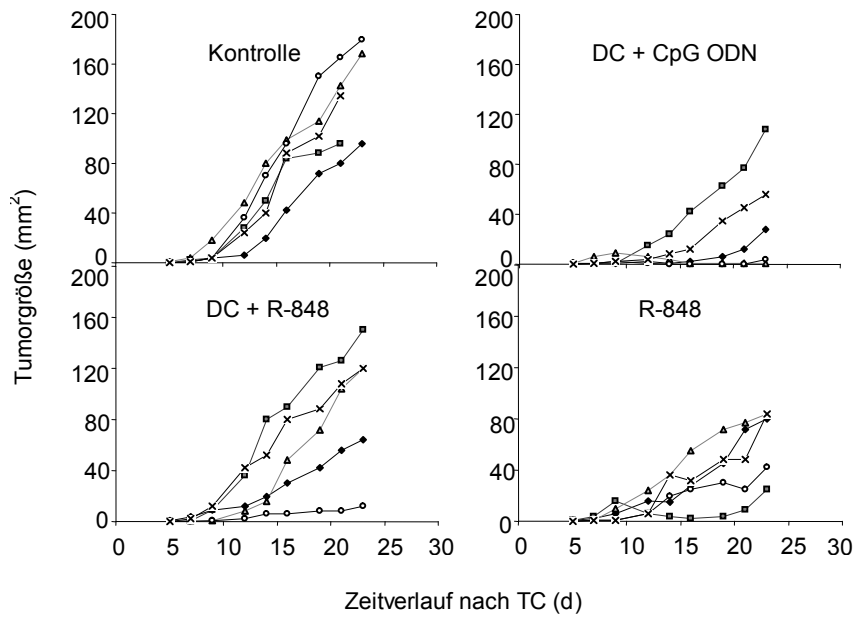
Bei der Betrachtung der individuellen Tumorgrößen (Abb. 13B) fällt diesmal in der Gruppe der DC-Vakzine plus R-848 auf, dass zwei von fünf Mäusen zumindest partiell auf die Therapie ansprachen. Bei einem Tier wurde das Tumorwachstum deutlich verlangsamt ( $60 \text{ mm}^2$ , d 22), beim zweiten sogar lange Zeit effektiv kontrolliert ( $10 \text{ mm}^2$ , d 22). Die alleinige Gabe von R-848 war dieser Referenzgruppe jedoch deutlich überlegen durch eine effektive Kontrolle des Tumorwachstums bei allen Versuchstieren verglichen mit der Kontrolle. Drei von fünf Mäusen zeigten im Verlauf eine zumindest vorübergehende Tumorregression, bei einem Versuchstier wurde erstmals sogar kurzfristig eine vollständige Rückbildung des Tumors erreicht. Die Tumorfreiheit hielt allerdings nur wenige Tage an, dann entwickelte sich ein Rezidiv. Unter Therapie mit DC-Vakzine und CpG ODN in der reduzierten Dosis ergab sich ein ähnliches Bild. Zwar gelang es länger, das Tumorwachstum wirkungsvoll zu kontrollieren und drei von fünf Tieren vorübergehend in Remission zu bringen. Aber anders als die etablierte Standardtherapie in wöchentlichen Abständen war das viertägige Therapieschema nicht in der Lage, eine dauerhafte Heilung zu erzielen. Alle drei Mäuse mit vorübergehender Tumorfreiheit entwickelten im Verlauf Rezidive.

In diesem Versuch ließ sich somit erstmals ein signifikanter Antitumoreffekt von R-848 unabhängig von der Gabe einer DC-Vakzine nachweisen. Außerdem gelang es im Tiermodell zum ersten Mal, einen etablierten Tumor durch Resiquimod kurzfristig zur vollständigen Rückbildung zu bringen. Für das Gesamtüberleben (Abb. 13C) ergab sich aufgrund der fehlenden Heilungsmöglichkeit jedoch kein signifikanter Überlebensvorteil für eine der Behandlungsgruppen (CpG ODN:  $p=0,121$ ; R-848:  $p=0,676$ ).

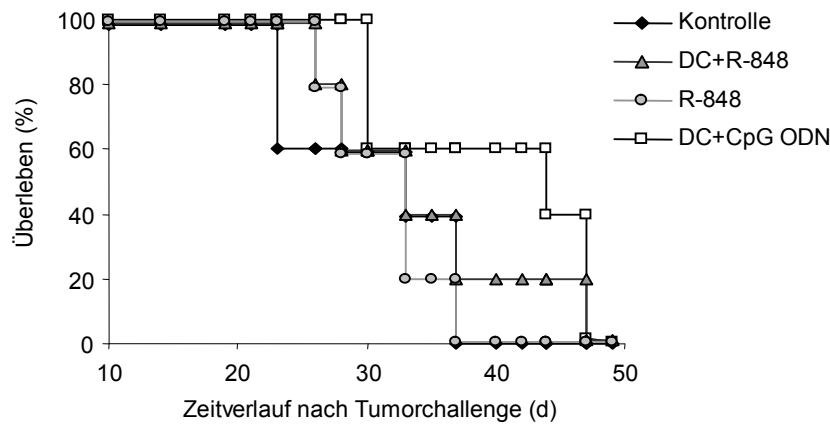
**A Mittlere Tumorgößen**



**B Einzeltiere**



**C Gesamtüberleben**



**Abb. 13. DC-Vakzine-unabhängige Reduktion des Tumorwachstums durch R-848 im modifizierten intensivierten Therapieregime**

**A** Durchschnittliche Tumorentwicklung (5 Mäuse pro Gruppe) unter Therapie mit DC-Vakzine in Kombination mit je 50 µg CpG ODN oder 20 µg R-848 kontralateral sowie weiteren 50 µg CpG ODN oder 20 µg R-848 peritumoral. Die Therapie (Pfeile) wurde an den Tagen 7, 11, 15 und 19 nach Tumorchallenge durchgeführt.

**B** Individuelle Tumorgrößen der Einzeltiere der jeweiligen Behandlungsgruppen.

**C** Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier.; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  gegenüber Kontrolle

### 3.3 Immunmonitoring der zellvermittelten Antitumorantwort

#### 3.3.1 Nachweis tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen durch pentamere MHC-I-Moleküle

Der beobachtete klinische Effekt (Hemmung des Tumorwachstums) von R-848 sollte nun im nächsten Schritt nach Möglichkeit auf zellulärer Ebene nachvollzogen werden. Für die Wirksamkeit der etablierten Standardtherapie mit CpG ODN hatte sich dabei das Vorhandensein zytotoxischer T-Zellen (CTL) als essentiell herausgestellt (Heckelsmiller, 2002b). CD8<sup>+</sup> CTL stellen klassische Effektorzellen adaptiver Immunantworten dar und bilden in Verbindung mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) die entscheidende Zellpopulation zur Kontrolle von Tumorwachstum durch Zelllyse. Im folgenden sollte der Nachweis tumorspezifischer CTL versucht werden, die in der Lage waren, ein definiertes Tumorantigen zu erkennen.

Für die chemisch induzierte C26 Kolonkarzinom Zelllinie ist hierfür das AH1-Peptid (SPSYVYHQF) als immundominantes Epitop beschrieben (Huang, 1996). Dabei handelt es sich um ein MHC-I Peptid, das sich vom Hüllprotein gp70 eines endogenen murinen Leukämievirus (MuLV) retroviralen Ursprungs ableitet. Eine Immunantwort gegen den C26 Tumor musste folglich mit hoher Wahrscheinlichkeit gegen das AH1-Peptid gerichtet sein. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten pentameren AH1/MHC-I-Molekülen (Pentamere), die an den T-Zell-Rezeptor AH1-spezifischer T-Zellen binden, wurden die tumorspezifischen CTL quantifiziert.

Es stellte sich heraus, dass bei den nicht tumortragenden Mäusen (-C26) lediglich die tumorzellgepulste DC-Vakzine plus CpG ODN in der Lage war, die Anzahl der AH1-spezifischen CTL signifikant zu erhöhen ( $p=0,016$ )(Abb.14A). Eine Steigerung durch die Kombination der DC-Vakzine mit R-848 konnte nicht belegt werden. Auch die isolierte Gabe von R-848 konnte erwartungsgemäß keine tumorspezifischen CTL induzieren, da dafür sowohl das Antigen (C26-Zellen) als auch die gegen Tumorantigene gerichtete DC-Vakzine fehlte. In der Gruppe der tumortragenden Tiere (+C26) konnte dagegen für die Kombination aus DC-Vakzine und R-848 eine zwar

geringe, aber signifikante Vermehrung der Pentamer-positiven CTL im Vergleich zur C26-Kontrolle festgestellt werden ( $p=0,011$ ). R-848 alleine konnte auch in tumortragenden Tieren keine tumorspezifischen T-Zellen generieren.

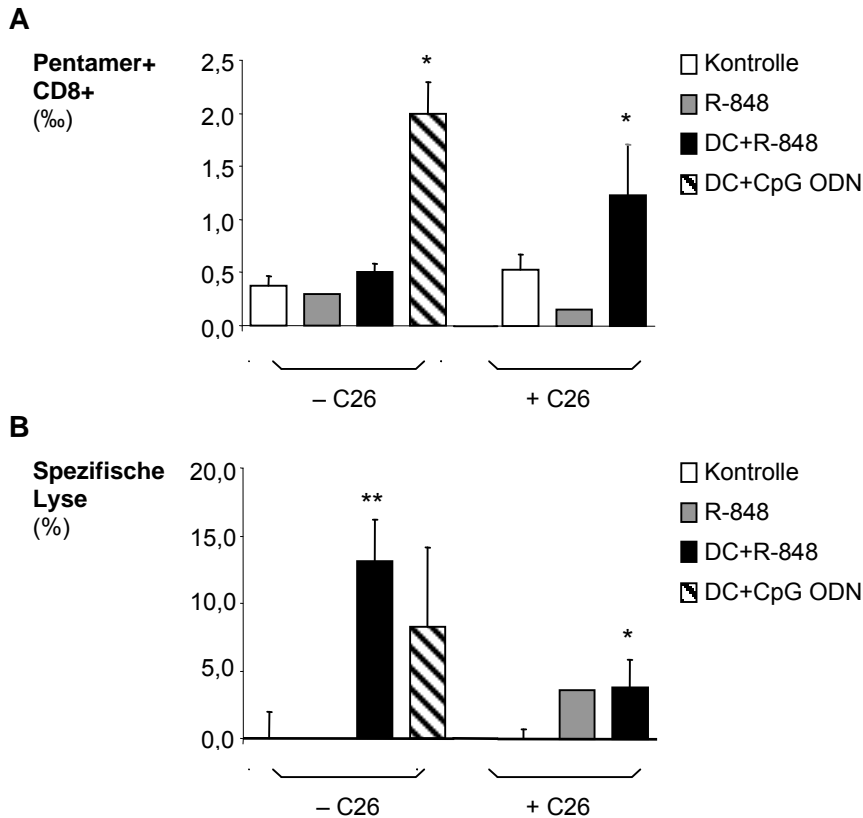
Es ließ sich also vor allem für die etablierte Standardvakzinierung aus tumorzellgepulsten DC und CpG ODN eine deutliche Induktion von AH1-spezifischen CTL konstatieren. Die Kombination aus DC-Vakzine und R-848 konnte dagegen nur einen vergleichsweise geringen Effekt erzielen. Insbesondere aber für die isolierte Gabe von R-848 korrelierte der im Tumorversuch beobachtete klinische Erfolg nicht mit dem Nachweis AH1-spezifischer CTL.

### 3.3.2 Detektion AH1-spezifischer T- Zellen durch intrazelluläres Interferon- $\gamma$

Parallel zum quantitativen Nachweis von AH1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen wurde ein erster funktioneller Test der *in vivo* geprimten CTL *in vitro* durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der für die Pentamer-Bestimmung gewonnenen Milzzellen in Kultur genommen und für kurze Zeit mit AH1-Peptid restimuliert. T-Zellen, die dabei das für ihren T-Zell-Rezeptor passende Peptid erkannten, wurden so zur Interferon-Bildung angeregt. Die Anzahl der Interferon- $\gamma$ -produzierenden CTL wurde im Anschluss mittels Flowzytometrie durch Intrazellulärfärbung gemessen.

Hierbei konnte jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Anzahl AH1-positiver Zellen sowie konsekutiver IFN- $\gamma$ -Produktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da die Zytokinproduktion der restimulierten Splenozyten insgesamt auf sehr niedrigem Niveau lag und sich nicht klar vom unspezifischen Hintergrund abgrenzen ließ, waren die Ergebnisse somit nicht als Beleg für deren funktionelle Aktivität im Sinne einer AH1-spezifischen Immunantwort verwertbar.





#### Abb. 14. Immunmonitoring der zellvermittelten Antitumorantwort

Mäuse wurden zweimal in wöchentlichem Abstand immunisiert. Ein Teil der Tiere erhielt die tumorzellgepulste dendritische Zellvakzine ( $2 \times 10^5$  DC) in Kombination mit 200  $\mu$ g CpG ODN oder 20  $\mu$ g R-848 s.c. Für die mit R-848 behandelten Mäuse (mit oder ohne DC-Vakzine) erfolgten Nachinjektionen von R-848 (ED 20  $\mu$ g) 4 h und 6 h nach initialer Applikation. Zur Simulation des Einflusses der Tumoren auf die Immunantwort wurden einigen Tieren zeitgleich mit der zweiten Immunisierung vitale Tumorzellen s.c. in die kontralaterale Flanke injiziert (+C26). Die Mäuse wurden an Tag 14 getötet und die Milzzellen mittels FACS untersucht.

**A** Tumorspezifische zytotoxische T-Zellen (%): Identifizierung durch an CD8+ Lymphozyten gebundene pentamere AH1/MHC-I-Moleküle (Pentamere). **B** Spezifische Lyse CFSE-gelabelter Targetzellen *in vivo*: CFSE-markierte Splenozyten unterschiedlicher Fluoreszenzintensität (CFSE<sup>high</sup>, CFSE<sup>low</sup>) wurden im Mischverhältnis 1:1 i.v. verabreicht. CFSE<sup>high</sup>-Zellen wurden mit AH1-Peptid beladen, CFSE<sup>low</sup>- blieben ohne Peptid. 24 h p.i. wurden die Mäuse getötet, die Zellpopulationen unterschiedlicher CFSE-Signalintensität per FACS quantifiziert und daraus die spezifische Lyse (%) berechnet. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  gegenüber Kontrolle

#### 3.3.3 Spezifische Lyse CFSE-markierter Targetzellen *in vivo*

Als weiterer funktioneller Test für die Qualität der induzierten Immunantwort wurde die spezifische Lyse CFSE-markierter Zielzellen untersucht. Auf diese Weise gelingt der direkte Nachweis antigenspezifischer Zelllyse durch Effektorzellen *in vivo*.

Bei der Analyse zeigte sich, dass die spezifische Lyse in allen Vakzinierungsgruppen höher war als die der Kontrolle (Abb.14B). Den größten Effekt konnte dabei diesmal die Kombination aus DC-Vakzine und R-848 erzielen, gefolgt von CpG ODN. Im

Gegensatz zur Anzahl der tumorspezifischen CTL, die in tumortragenden Mäusen noch vermehrt war, wurde die lytische Aktivität der Effektorzellen jedoch durch die Gegenwart von Tumorzellen inhibiert. Als entscheidendes Novum konnte anhand dieses Readouts erstmals ein Korrelat für die antineoplastische Wirksamkeit von R-848 alleine nachgewiesen werden. Das Ausmaß der spezifische Lyse bewegte sich dabei in tumortragenden Tieren auf dem Niveau der Kombination mit DC-Vakzine.

### 3.4 Resiquimod-induzierte Toleranzentwicklung

#### 3.4.1 Toleranzinduktion durch R-848 *in vivo*

Parallel zum Immunmonitoring der zellvermittelten Antitumorantwort wurde die Wirkung der repetitiven Gabe von Resiquimod auf Zytokinebene untersucht. Es sollte überprüft werden, ob sich hierbei Anhaltspunkte für die verbesserte Wirksamkeit finden ließen.

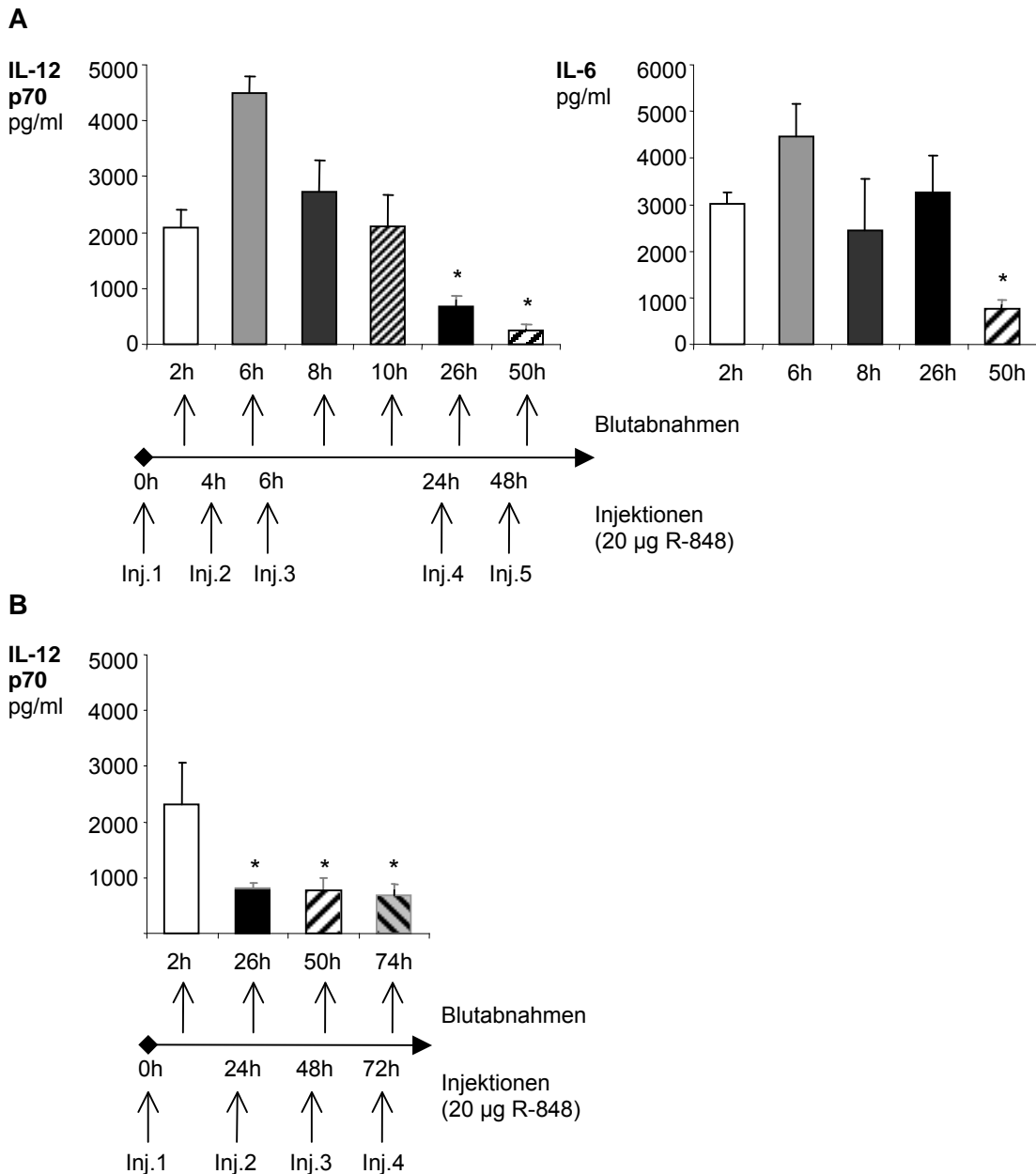
##### 3.4.1.1 *Initial verstärkte und verlängerte Zytokinantwort durch mehrmalige Resiquimod-Injektionen*

Die Annahme einer verstärkten und verlängerten Zytokinantwort durch die wiederholte Gabe von Resiquimod ließ sich dabei bestätigen. Anders als nach einmaliger Applikation, wo schon acht Stunden später keine nennenswerten Mengen mehr detektiert wurden (Abb. 7A), ließ sich der Zytokinspiegel durch die mehrmaligen Nachinjektionen noch 10 h nach der initialen Gabe auf hohem Niveau stabilisieren (Abb. 15A). Gleichzeitig konnten interessanterweise auch die Maximalwerte noch deutlich gesteigert werden. Während sich für Einzeldosen von 20 - 40 µg R-848 ein Deckeneffekt von 1500 bis 2000 pg/ml IL-12p70 einstellte, gelang durch die zweite Injektion eine Erhöhung auf mehr als das Doppelte. Dieser *boost* ließ sich in leicht vermindertem Maße auch für IL-6 feststellen.

##### 3.4.1.2 *Später reduzierte Zytokininduktion durch R-848 nach wiederholter Applikation*

Im Anschluss an die vierte Injektion 24 h nach Behandlungsbeginn wurde dann jedoch ein signifikant verminderter IL-12p70 Serumspiegel beobachtet, verglichen mit dem Referenzwert 2 h nach initialer Gabe ( $p=0,034$ ). Dieser Wirkungsverlust setzte sich verstärkt fort für den späteren Zeitpunkt nach 48 h, wo durch die normale Dosis R-848 kaum mehr IL-12p70 induziert wurde. Für IL-6 war der Verlauf des Zytokinprofils ähnlich, allerdings mit dem Unterschied, dass eine Wirkungsabschwächung erst später

sichtbar wurde. Nach 24 h konnten im Gegensatz zu IL-12p70 nach wie vor hohe IL-6-Spiegel detektiert werden. Erst nach der fünften verabreichten Dosis fiel auch hier das Niveau signifikant unter den Ausgangswert ( $p=0,047$ ).



### Abb. 15. Toleranzinduktion durch Resiquimod *in vivo*

**A** Mäuse erhielten fünf Injektionen R-848 (ED 20  $\mu$ g) s.c. analog dem intensivierten Therapieschema des Tumormodells. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut abgenommen und die Serumzytokine per ELISA bestimmt. **B** Insgesamt vier Injektionen R-848 (wie oben) erfolgten in 24 stündigen Intervallen. Blutabnahmen wurden 2 h p.i. durchgeführt und die Serumzytokine gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Einzelwerte. \*  $p < 0,05$  gegenüber Ausgangswert nach 2 h

### *3.4.1.3 Verminderte Ansprechbarkeit auf Resiquimod nach einmaliger Anwendung*

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die beobachtete Toleranzentwicklung vor allem auf den kurzen zeitlichen Abständen der einzelnen Injektionen oder der kumulativen Gesamtdosis R-848 beruhte. Da die Wirkungsabschwächung für IL-12p70 im intensivierten Therapieregime nach insgesamt vier Einzeldosen zutage getreten war, wurden diese deswegen konsequenterweise über einen längeren Zeitraum verteilt. Anstatt in enger Abfolge erhielten die Mäuse Resiquimod in 24-stündigen Intervallen.

Es zeigte sich, dass eine zweite R-848-Dosis 24 h nach Erstgabe nur mehr signifikant verminderte IL-12-Spiegel hervorrufen konnte ( $p=0,048$ ) (Abb. 15B). Dies galt in gleicher Weise auch für die späteren Zeitpunkte. Somit führte bereits die einmalige Anwendung von Resiquimod zu einer verminderten Ansprechbarkeit auf weitere Dosen 24 h nach initialer Stimulation.

### *3.4.1.4 Dauerhaft herabgesetzte Ansprechbarkeit auf Resiquimod nach einmaliger Anwendung*

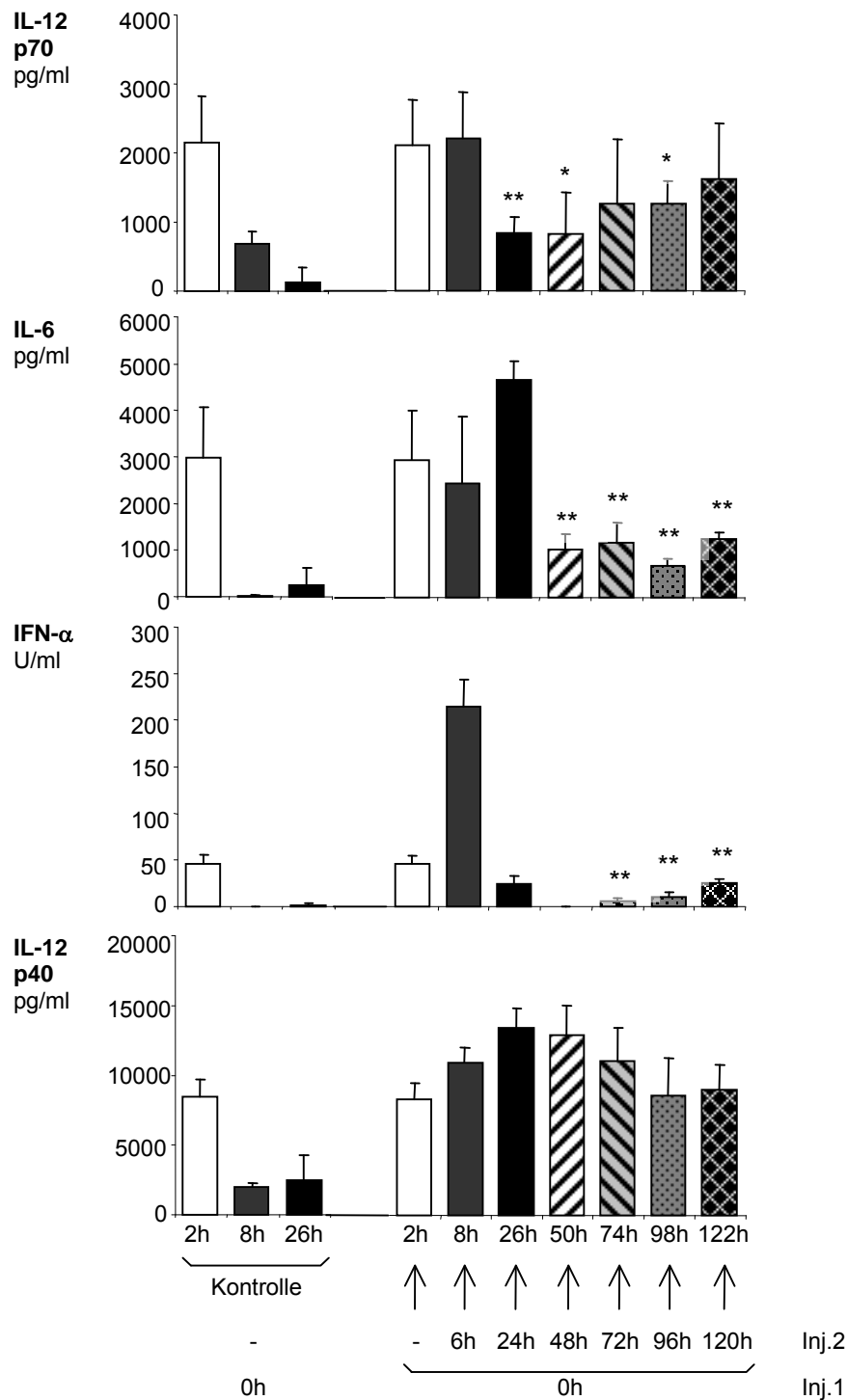
Als Konsequenz stellte sich die Frage nach der Dauer der reduzierten Empfindlichkeit. Für IL-12p70 ließ sich dabei erkennen, dass eine zweite Injektion 6 h nach der initialen Applikation noch annähernd die Werte nach Erstgabe hervorruft (Abb.16). Nach einem Intervall von 24 bzw. 48 h konnten diese jedoch nicht mehr erreicht werden ( $p=0,001$ ). Ab 72 h Therapiepause stiegen die gemessenen Zytokinspiegel wieder leicht an um an Tag 5 (120 h) wieder in die Nähe des Ausgangswertes zu gelangen. Der Verlauf des Zytokinprofils von IL-6 verhielt sich sehr ähnlich dazu, allerdings erneut mit im Vergleich zu IL-12p70 verzögerter Toleranzentwicklung (24 h vs. 48 h). Die Dauer der schließlich etablierten Toleranz war für IL-6 jedoch länger. Selbst nach fünf Tagen Therapieintervall konnten nur noch Zytokinmengen deutlich unter der Hälfte des Ausgangswertes gemessen werden.

Als weiteres frühes  $T_H1$ -Zytokin wurde Interferon alpha ( $IFN-\alpha$ ), ein Typ-I Interferon mit einer Vielzahl an Effektorfunktionen, bestimmt.  $IFN$  Typ-I steigert u.a. die Zytotoxizität von NK-Zellen (Ortaldo, 1983), fördert die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen durch die Induktion von IL-15 (Zhang, 1998), erhält aktivierte T-Zellen am Leben (Marrack, 1999) und begünstigt ferner Antikörperproduktion durch B-Zellen (Le Bon, 2001). Somit kommt  $IFN-\alpha$  auch eine potentiell entscheidende Rolle im Rahmen einer Antitumorantwort zu. Die einmalige Anwendung von Resiquimod führte zu deutlich messbaren Serumspiegeln, die durch eine zweite Injektion nach 6 h sogar auf mehr als

das Vierfache gesteigert werden konnten. Dieser *boost* gelang jedoch nur zum frühesten der bestimmten Zeitpunkte. Später trat stattdessen ebenso ein Wirkungsverlust ein von, der sich im Verlauf langsam zurückbildete.

IL-12p40 schließlich wies als einziges Zytokin keinerlei Toleranzentwicklung auf. Funktionell gesehen handelt es sich bei IL-12p40 um die biologisch inaktive p40 Untereinheit von IL-12p70. IL-12p70 wiederum stellt die bioaktive Form von IL-12 dar, welche sich aus einer p40 und einer p35 Untereinheit zusammensetzt. Der Regulationsschritt findet dabei v.a. auf der Expressionsebene der p35 Untereinheit statt (Snijders, 1996). Nach der wiederholten Gabe von R-848 stellte sich für IL-12p40 kein Wirkungsverlust ein; das Zytokinprofil verhielt sich vielmehr nahezu spiegelbildlich: Im selben Maße, in dem IL-12p70 zurückging, wurde die IL-12p40-Sekretion gesteigert.

Bei der Synopsis aller *in vivo* Befunde fällt auf, dass innerhalb einer sensitiven Phase von vier (IL-12p70) bis sechs (IFN- $\alpha$ ) Stunden nach initialer Applikation von Resiquimod durch eine weitere Gabe von R-848 ein *boost* der jeweiligen Zytokinmengen erreicht werden konnte. Im Anschluss an diese sensitive Phase, spätestens 48 h nach Verabreichung von 20  $\mu$ g R-848 s.c., etablierte sich jedoch ein Zustand stark herabgesetzter Ansprechbarkeit gegenüber weiterer Stimulation durch Resiquimod. Dieser Status erstreckte sich über mindestens fünf Tage mit erst allmählicher Rückbildung gegen Ende dieses Zeitraums.



**Abb. 16. Dauerhaft herabgesetzte Ansprechbarkeit auf Resiquimod nach einmaliger Anwendung**

Versuchstiere (4 Mäuse/Gruppe) erhielten jeweils zwei Injektionen R-848 (ED 20 µg) s.c. Die erste Gabe erfolgte zu Versuchsbeginn zum Zeitpunkt 0, die zweite Dosis wurde für die unterschiedlichen Gruppen nach 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 120 h verabreicht. Immer 2 h nach der zweiten Injektion wurde Blut abgenommen und die Zytokine im Serum bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Einzelwerte. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 gegenüber Referenzwert 2 h nach Erstgabe

### 3.4.2 Toleranzeffekt von R-848 *in vitro*

Ausgehend von den *in vivo*-Daten wurde versucht, diesen Effekt *in vitro* nachzustellen. Durch Reduktion des komplexen *in vivo*-Systems auf definierte Zellkulturbedingungen sollte leichter nachvollziehbar werden, welche Zellpopulationen ggf. entscheidend zur Ausbildung der Toleranz beitragen.

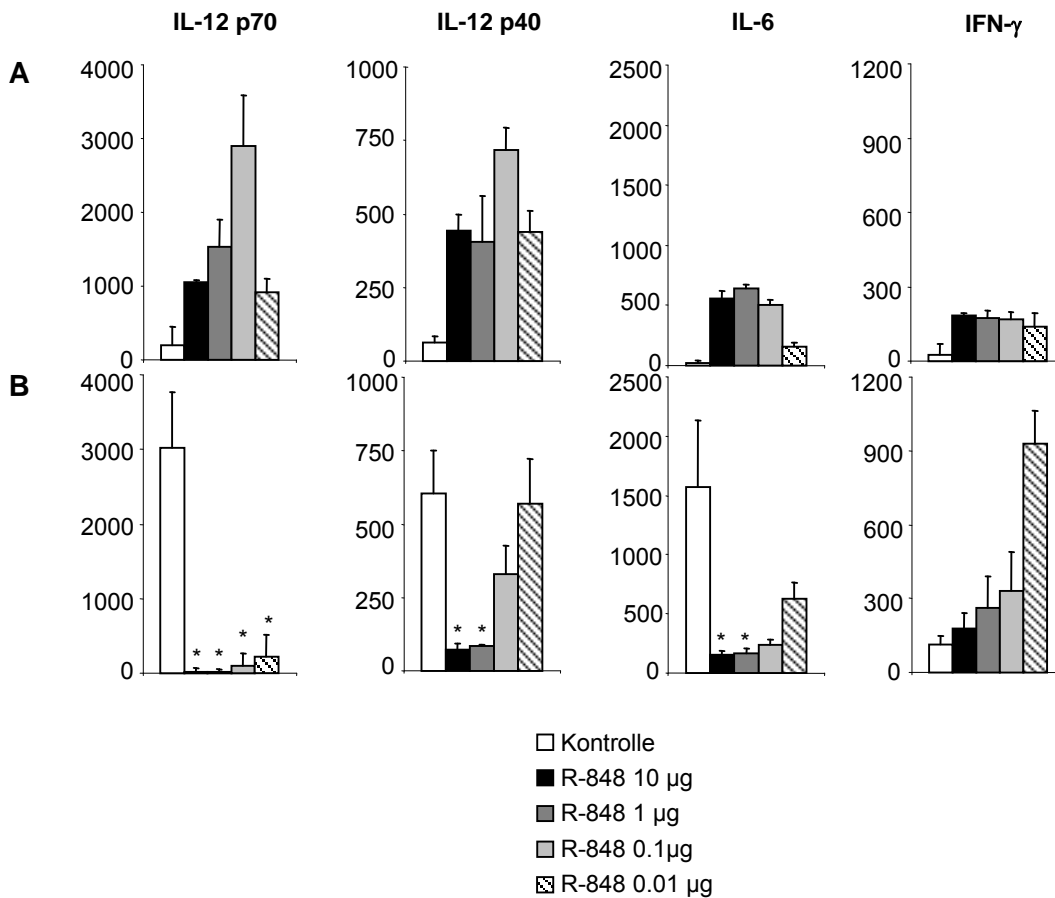
#### 3.4.2.1 Wirkung auf natives Knochenmark

Zunächst wurde dazu die Wirkung wiederholter R-848-Stimulation auf frisch isolierten Zellen durch Analyse der Zytokinproduktion im Zellüberstand mittels ELISA untersucht.

Für die proinflammatorischen  $T_H1$ -Zytokine IL-12p70, IL-12p40 und IL-6 ließ sich eine Toleranzentwicklung auch *in vitro* klar nachvollziehen. Am deutlichsten wurde dies für IL-12p70 mit fast aufgehobener Zytokinproduktion vorstimulierter Zellen im Anschluss an die Restimulation (Abb. 17). Gleichzeitig offenbarte sich für alle Zytokine eine Dosisabhängigkeit dieses Phänomens.

Als zusätzlicher Readout wurde IFN- $\gamma$  gewählt. IFN- $\gamma$  ist der einzige Vertreter des Typ-II IFN und wird v.a. von T-Zellen oder Natürlichen Killerzellen gebildet, die durch Antigene oder Zytokine stimuliert wurden. Nach intensiver Forschung wird es heute als das bedeutendste immunregulatorische Protein der IFN-Familie angesehen (Billiau, 1996). Es repräsentiert ein bereits sekundäres Zytokin einer  $T_H1$ -Immunantwort, das als Reaktion auf primäre  $T_H1$ -Zytokine, insbesondere IL-12p70, produziert wird (Kobayashi, 1989). Es indiziert somit eine schon stattgefundene  $T_H1$ -Polarisation. Daneben besitzt es selbst wichtige Effektorfunktionen. Nach Restimulation der Knochenmarkszellen konnte ebenfalls eine dosisabhängige Beeinflussung der IFN- $\gamma$ -Produktion beobachtet werden. Allerdings lagen diesmal alle mit R-848 vorstimulierten Bedingungen über der nach 24 h erstmals stimulierten Kontrolle. Eine abgestufte Toleranzinduktion war somit nur für die unterschiedlichen R-848-Dosen untereinander, nicht jedoch gegenüber der Kontrolle nachweisbar. Dies konnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass eine frühe Aktivierung der Zellen durch Resiquimod einen positiven Effekt auf Überleben und Vitalität der Zielzellen entfaltete.

## Knochenmark

**Abb. 17. Toleranzwirkung von Resiquimod auf natives Knochenmark**

Frisch isolierte Knochenmarkszellen (2 Mio./ml) wurden mit 0,01-10 µg/ml R-848 für sechs Stunden stimuliert. Anschließend wurden Überstände abgenommen (A), die Zellen einmal gewaschen und in frischem Medium resuspendiert. Nach insgesamt 24 h und einem weiteren Waschschrift erfolgte die Restimulation aller Wells mit 1 µg/ml R-848. Sechs Stunden später erneute Abnahme der Überstände (B). Alle Bedingungen wurden als biologische Triplikate durchgeführt und die Zytokine der Zellüberstände (in pg/ml) einzeln bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Einzelwerte.; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 gegenüber Kontrolle

**3.4.2.2 Wirkung auf myeloide dendritische Zellen**

Nachdem es also gelungen war, die Toleranzwirkung von Resiquimod *in vitro* nachzuvollziehen, sollte geklärt werden, welche Bedeutung dabei insbesondere dendritischen Zellen zukam. Dendritische Zellen stehen in diesem Zusammenhang vor allem deshalb im Fokus des Interesses, weil sie TLR7 exprimieren und gleichzeitig die Hauptproduzenten von IL-12 darstellen.

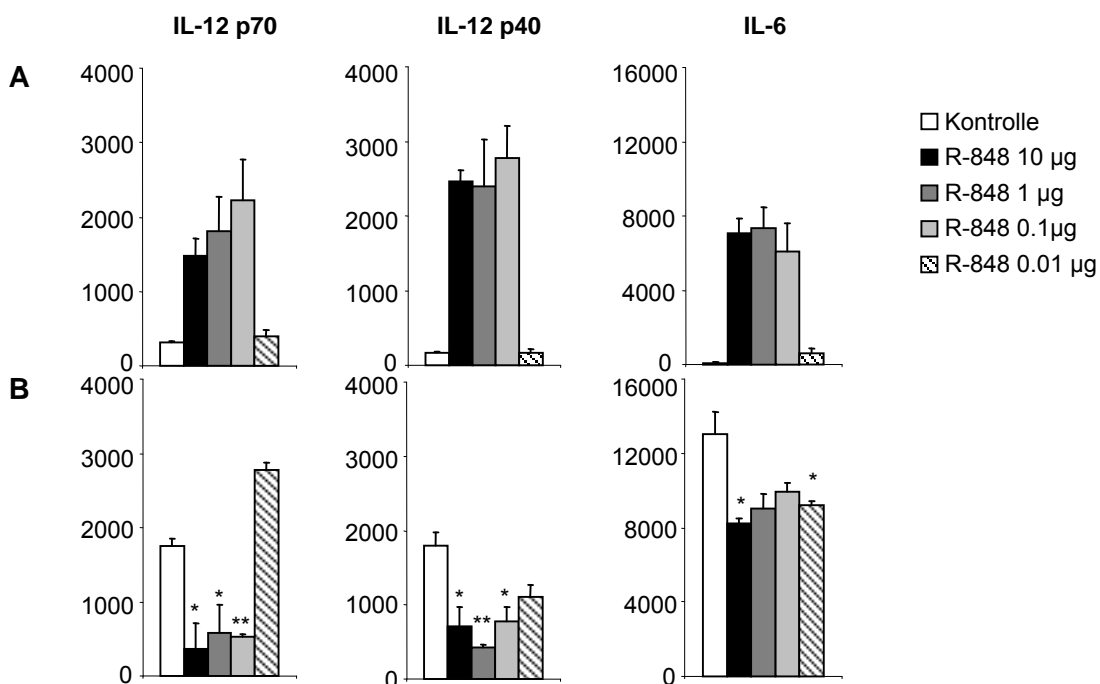
Als klassischer Vertreter der myeloiden dendritischen Zellen wurden GM-CSF/IL-4 generierte BMDC ausgewählt. Ebenso wie für Knochenmarkszellen konnte dabei ein



Toleranzeffekt für IL-12p70 und IL-12p40 mit gewisser Dosisabhängigkeit festgestellt werden (Abb. 18). Der auffälligste Unterschied bestand allerdings darin, dass nach 24 h noch keine so deutlich abgeschwächte Wirkung von Resiquimod auf die IL-6 Sekretion beobachtet werden konnte. Zwar war die Zytokinproduktion der vorbehandelten MDC im Vergleich zur vorher unstimulierten Kontrolle ebenfalls signifikant vermindert, aber interessanterweise immer noch im Bereich der Referenzwerte nach 6 h. Diese Tatsache korrelierte mit den Beobachtungen, nach denen eine Toleranzentwicklung für IL-6 im Gegensatz zu IL-12p70 *in vivo* erst nach 48 h belegt werden konnte.

Plasmazytoide dendritische Zellen aus aufgereinigter Flt3-Ligand-Kultur wurden auf ähnliche Art und Weise untersucht. Eine Toleranzinduktion durch Resiquimod konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden.

### MDC



**Abb. 18. Toleranzwirkung von Resiquimod auf Kultur-MDC**

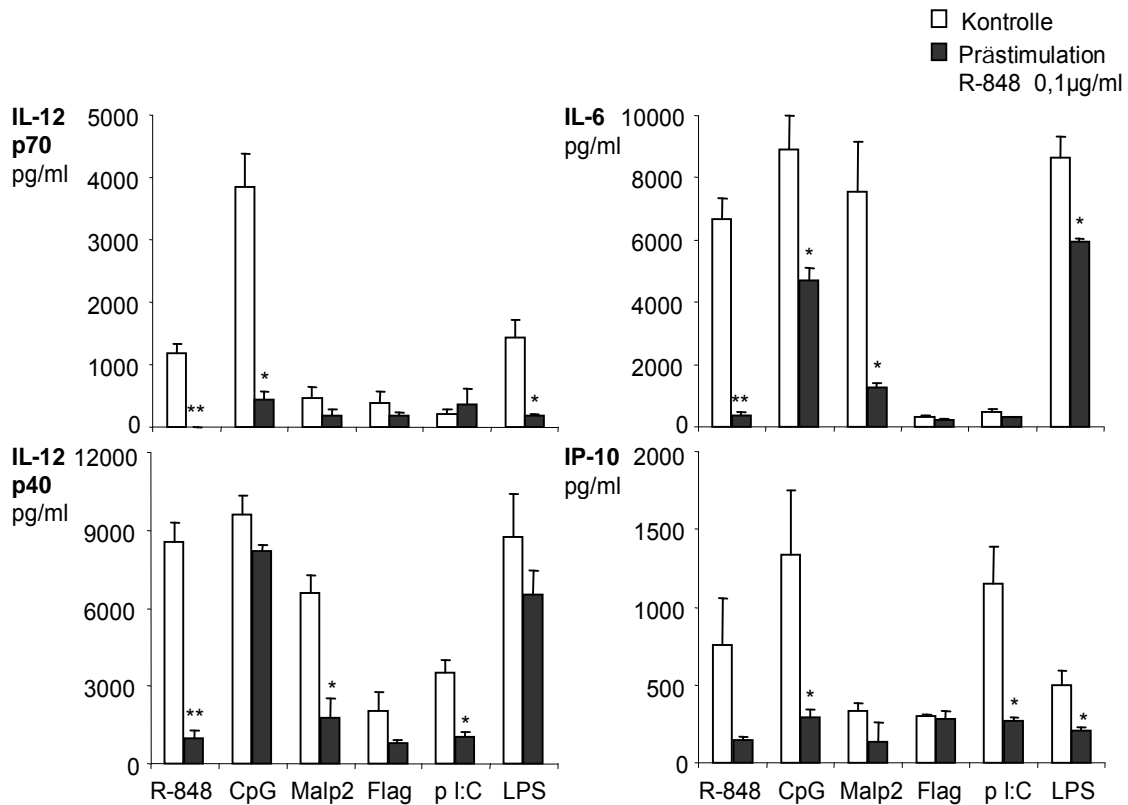
Frisch geerntete myeloide dendritische Zellen aus GM-CSF/IL-4-Kultur wurden analog den Knochenmarkszellen mit R-848 stimuliert. Versuchsbedingungen identisch wie in Abb. 17 beschrieben.

### 3.4.2.3 Verminderte Stimulierbarkeit durch Liganden anderer Toll-like Rezeptoren

Wesentlich zur Aufklärung des Mechanismus des Toleranzeffekts durch Resiquimod erschien die Frage, ob die Stimulation mit R-848 eine Kreuztoleranz gegenüber Liganden anderer TLR zur Folge hatte. Anhand einer solchen möglichst selektiven Kreuztoleranz sollten Anhaltspunkte für den Ort der Wirkungsunterbrechung auf zellulärer Ebene gefunden werden.

In dieser Versuchskonstellation konnte tatsächlich eine verminderte Stimulierbarkeit von mit R-848 vorbehandelten myeloiden DC gegenüber anderen TLR-Liganden festgestellt werden (Abb.19). Für die Positivkontrolle aus zweimaliger Stimulation mit Resiquimod wurde erneut eine stark reduzierte Freisetzung aller gemessenen Zytokine registriert. Aber auch die Empfindlichkeit gegenüber den meisten anderen TLR-Liganden war deutlich herabgesetzt. Insbesondere für CpG ODN und LPS ließ sich eine Kreuztoleranz fast überall statistisch signifikant nachvollziehen. Bei Malp2 gelang dies für IL-6 und IL-12p40 ( $p=0,023$  bzw.  $p=0,026$ ) und auch für Poly I:C ( $p$  I:C) wurde eine solche Wirkung teilweise sichtbar. Dabei beschränkte sich der Effekt allerdings auf die Zytokine IL-12p40 und IP-10, bei denen überhaupt relevante Spiegel detektiert werden konnten. Einzig für Flagellin (Flag) konnte ein solches Phänomen bei durchwegs sehr niedriger Zytokininduktion nicht belegt werden.

Diese Ergebnisse lieferten somit Hinweise auf eine deutlich herabgesetzte Sensitivität von mit R-848 vorbehandelten MDC gegenüber konsekutiver Stimulation mit diversen Liganden anderer TLR.



**Abb. 19. Kreuztoleranzinduktion auf BMDC durch Resiquimod gegenüber Liganden anderer TLR**

Myeloide DC aus GM-CSF/IL-4 Kultur (1 Mio./ml) wurden zur Hälfte mit 0,1 µg/ml R-848 vorstimuliert, Kontrollbedingungen blieben unstimuliert. 24 h später erfolgte nach einmaligem Waschen in Medium die Zugabe der verschiedenen TLR-Liganden: R-848 (TLR 7/8) 0,1 µg/ml, Malp2 (TLR 1/2) 50 ng/ml, Poly I:C (TLR 3) 200 µg/ml, LPS (TLR 4) 10 µg/ml, Flagellin (TLR 5) 1 µg/ml, CpG ODN (TLR 9) 5 µg/ml. Alle getesteten Bedingungen wurden als biologische Triplikate angelegt. Zellüberstände wurden nach 48 h abgenommen und Zytokine einzeln mittels ELISA bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Einzelwerte.;

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  gegenüber vorher unstimulierter Kontrollbedingung (weiße Balken)

Zeichenerklärung: Poly I:C = p I:C; Flagellin = Flag

### 3.5 Einzelsträngige RNA als Vakzine-Adjuvans

#### 3.5.1 Immunstimulatorische Wirkung von Polyuridin

Abgesehen vom speziellen Wirkungsspektrum von Resiquimod sollte zudem kurz das Potenzial anderer *Toll-like* Rezeptor 7-Liganden als Vakzine-Adjuvantien beleuchtet werden. Als Alternative zu den bisher beschriebenen synthetischen Molekülen der Imidazoquinolin-Familie bot sich einzelsträngige RNA als völlig neue Möglichkeit der Immunstimulation via TLR7 an. Anfang 2004 waren Guanosin- und Uridin-reiche Einzelstrang-RNA-Sequenzen als vermutlich natürliche Liganden für die *Toll-like* Rezeptoren 7 und 8 auf dendritischen Zellen *in vitro* identifiziert worden (Diebold, 2004;

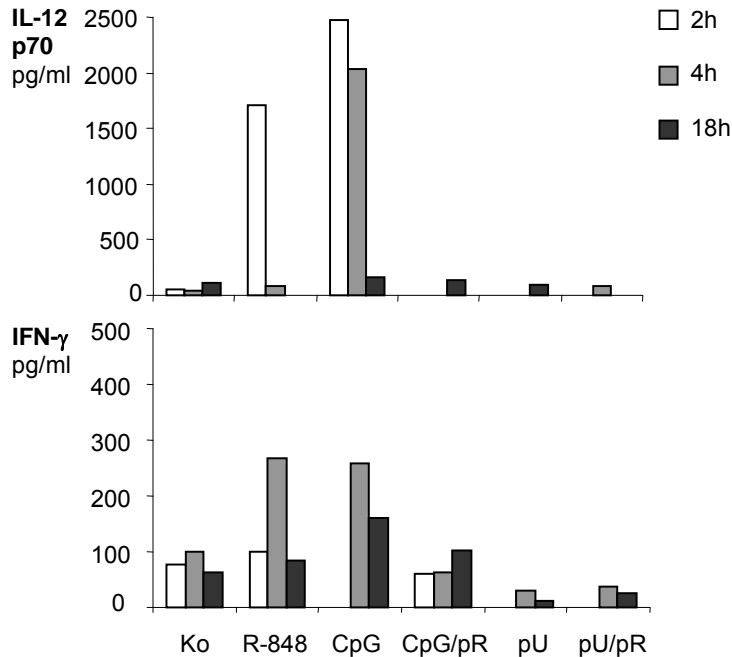
Heil, 2004). Der dabei festgestellte immunstimulatorische Effekt dieser neuen Klasse an TLR7 Liganden sollte daher auch *in vivo* überprüft werden.

### 3.5.1.1 Fehlende Zytokininduktion und Milzzellaktivierung bei subkutaner Anwendung

Zunächst wurde dazu die unspezifische immunstimulatorische Wirkung von Polyuridin (pU) anhand von Zytokininduktion (ELISA) und Milzzellaktivierung (FACS) untersucht. Mäusen wurde Polyuridin alleine oder gebunden an 200 µg Polyarginin (pR) subkutan injiziert. Kationische Polypeptide wie Polyarginin können negativ geladene Moleküle (RNA, DNA, Proteine) komplexieren und verbessern so die transmembranöse Aufnahme von Proteinen und Nukleotiden ins Zytosol (Rudolph, 2003; Noguchi, 2004). Auf diese Weise sollte eine Stabilisierung der freien RNA sowie ein erleichterter Transport in die jeweiligen Zielzellen ermöglicht werden. Als Referenz diente CpG ODN frei löslich oder ebenfalls in Verbindung mit Polyarginin.

Hierbei stellte sich heraus, dass Polyuridin in der angegebenen Dosis weder in der frei löslichen Form noch mit Polyarginin komplexiert Zytokine (IL-12p70, IFN- $\gamma$ ) induzierte (Abb. 20). Ebenso wenig ließ sich eine Aktivierung der verschiedenen Zellpopulationen der Milz im FACS feststellen (CD69+ T-, NK-, B-Zellen: Kontrolle 5,5%, 13,2%, 4,9%; pU 4,5%, 11,2%, 4,8%; pU/pR 4,3%, 6,5%, 3,8%). Durch freies CpG konnten dagegen erwartungsgemäß relevante Zytokinspiegel und eine deutliche Splenozytenaktivierung beobachtet werden (CD69+ T-, NK-, B-Zellen: 27,4%, 58,3%, 58,1%). Dies war jedoch interessanterweise für CpG plus Polyarginin nicht der Fall: der Zytokineffekt war durch Hinzufügen des Polypeptids komplett aufgehoben. Auch die Hochregulation von CD69 unterblieb unter diesen Umständen (CD69+ T-, NK-, B-Zellen: 5,3%, 15,8%, 6,9%). Dieser Aspekt stand in Übereinstimmung mit der Publikation von Lingnau *et al.*, die nachgewiesen hatten, dass die unspezifisch systemische Wirkung von CpG durch Komplexierung mit Polyarginin aufgehoben werden kann (Lingnau, 2002). Die Formierung eines subkutanen Depots begrenzte dabei den CpG-Effekt lokal.

Polyuridin war somit nach subkutaner Injektion nicht in der Lage, einen unspezifischen systemischen Effekt zu erzielen.



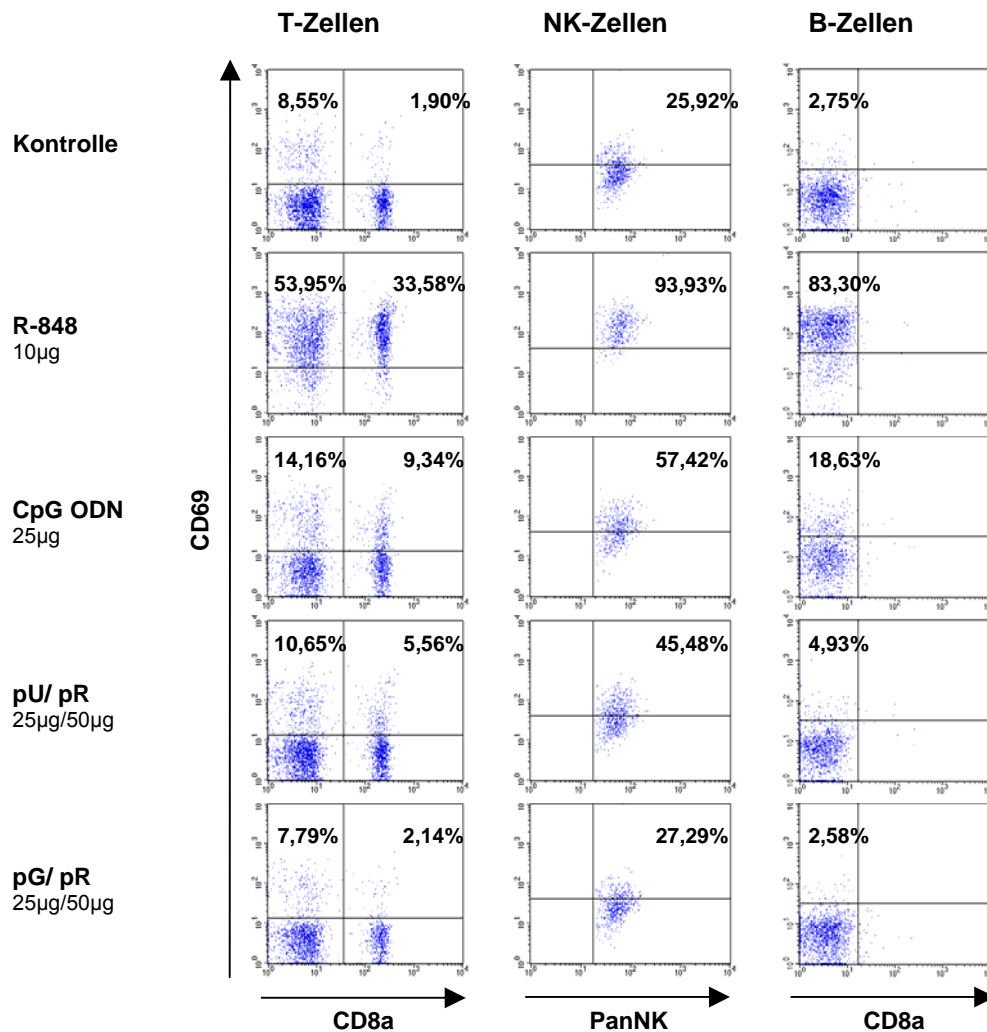
### Abb. 20. Fehlende Zytokininduktion durch Polyuridin

Versuchstiere (3 Mäuse/Gruppe) erhielten 100 µg Polyuridin (pU) bzw. 100 µg CpG ODN frei löslich oder komplexiert mit 200 µg Polyarginin (pR) s.c. im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Ko) oder 10 µg R-848. 2 h, 4 h und 18 h nach der Injektion wurde Blut entnommen und die Zytokine der gepoolten Serumproben mittels ELISA gemessen.

#### 3.5.1.2 Systemische Teilaktivierung durch Polyuridin nach intravenöser Anwendung

Um auszuschließen, dass die fehlende Wirksamkeit von Polyuridin nach subkutaner Gabe letztlich nur auf der stark limitierten Verteilung *in vivo* beruhte, wurde die bessere systemische Distribution durch intravenöse Anwendung sichergestellt. Dabei mussten die Dosierungen für CpG ODN sowie Polyuridin auf weniger toxische 25 µg angepasst werden. Die Blutabnahmen erfolgten nach einer Stunde sowie nach 3 h und 8 h. Im Anschluss wurden die Tiere getötet und die Splenozytenaktivierung mittels Flowzytometrie gemessen. Zytokine wurden erneut aus gepoolten Seren bestimmt.

Auch nach intravenöser Anwendung ließ sich nur eine schwache systemische Wirkung von Polyuridin-RNA feststellen. Zytokine (IL-12p70, IL-6, IP-10) konnten nach wie vor nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt), eine Aktivierung von Milzzellen war dagegen zumindest in begrenztem Umfang zu erkennen (Abb. 21). Die von Polyuridin erzielten Werte erreichten zwar nicht das Niveau von CpG oder R-848, lagen aber konstant über den Kontrollen. Somit ließ sich erstmals eine, wenn auch moderate, sequenzspezifische Immunstimulation durch Polyuridin-RNA *in vivo* belegen.



**Abb. 21. Immunstimulatorische Wirkung von Polyuridin nach intravenöser Anwendung**

Versuchstiere (3 Mäuse/Gruppe) erhielten jeweils 25 µg Polyuridin (pU) bzw. Polyguanosin (pG) komplexiert mit 50 µg Polyarginin (pR), alternativ 25 µg CpG ODN oder 10 µg R-848 i.v. Nach 8 h wurden die Tiere getötet und der Aktivierungsgrad unterschiedlicher Zellpopulationen der Milz im FACS analysiert: Expressionslevel von CD69 auf T-, NK-, B-Zellen

### 3.5.2 Adjuvans-Wirkung von Polyuridin bei Immunisierung mit Ovalbumin

Aus dem Nachweis eines gewissen immunstimulatorischen Potenzials von Polyuridin *in vivo* ergab sich die Frage, welche Bedeutung sich daraus im Rahmen eines Vakzinierungsmodells ableiten ließ. Analog einer früheren Arbeit von Lingnau *et al.*, die eine verstärkte und verlängerte Immunantwort bei aufgehobenem systemischen Zytokineffekt durch die Komplexierung von CpG ODN mit Polyarginin nach subkutaner Applikation gezeigt hatte, sollte eine mögliche Adjuvans-Wirkung von Polyuridin untersucht werden.

### 3.5.2.1 Polyuridin/Polyarginin steigert die Ovalbumin-spezifische Antikörperproduktion

Die Analyse der Serumproben zeigte einen insgesamt sehr guten Vakzinierungserfolg (Abb. 22A). Die Antikörpertiter immunisierter Mäuse ließen sich exzellent von naiven Tieren abgrenzen. Zusätzlich bestanden in allen bestimmten Immunglobulinklassen graduierbare Unterschiede zwischen Kontrollen und Vergleichsgruppen mit Adjuvans. Insbesondere für R-848, CpG und CpG/pR konnte vor allem beim Gesamt-IgG und IgG2a eine signifikante Erhöhung in Relation zur Kontrollgruppe (OVA) festgestellt werden. Die Kombination aus Polyuridin und Polyarginin erzielte besonders in den Ig-Klassen IgM und IgG2a ebenfalls eine deutliche Steigerung des Antikörpertiters, erreichte allerdings kein Signifikanzniveau (IgG2a:  $p=0,13$ ). Auffällig war zudem, dass Polyarginin mit Ovalbumin (OVA) ohne Adjuvans offenbar in einer verminderten Antikörperbildung resultierte. Vermutlich führte die Komplexierung von Ovalbumin zur lokalen Depotwirkung mit reduzierter Antigenfreisetzung und in der Folge verzögerter systemischer Immunantwort. Als Indiz hierfür kann gewertet werden, dass der hemmende Effekt eine Woche später nicht mehr zu beobachten war und die Antikörpertiter gleichauf mit der Kontrollgruppe (OVA) lagen (Daten nicht gezeigt).

In der Tendenz kann daher eine relevante Wirkung von Polyuridin als Impfadjuvans vermutet werden. Durch die wahrscheinlich relativ hohe Antigenität bzw. Impfdosis von Ovalbumin lässt sich diese allerdings unter den vorliegenden Versuchsbedingungen statistisch nicht eindeutig belegen.

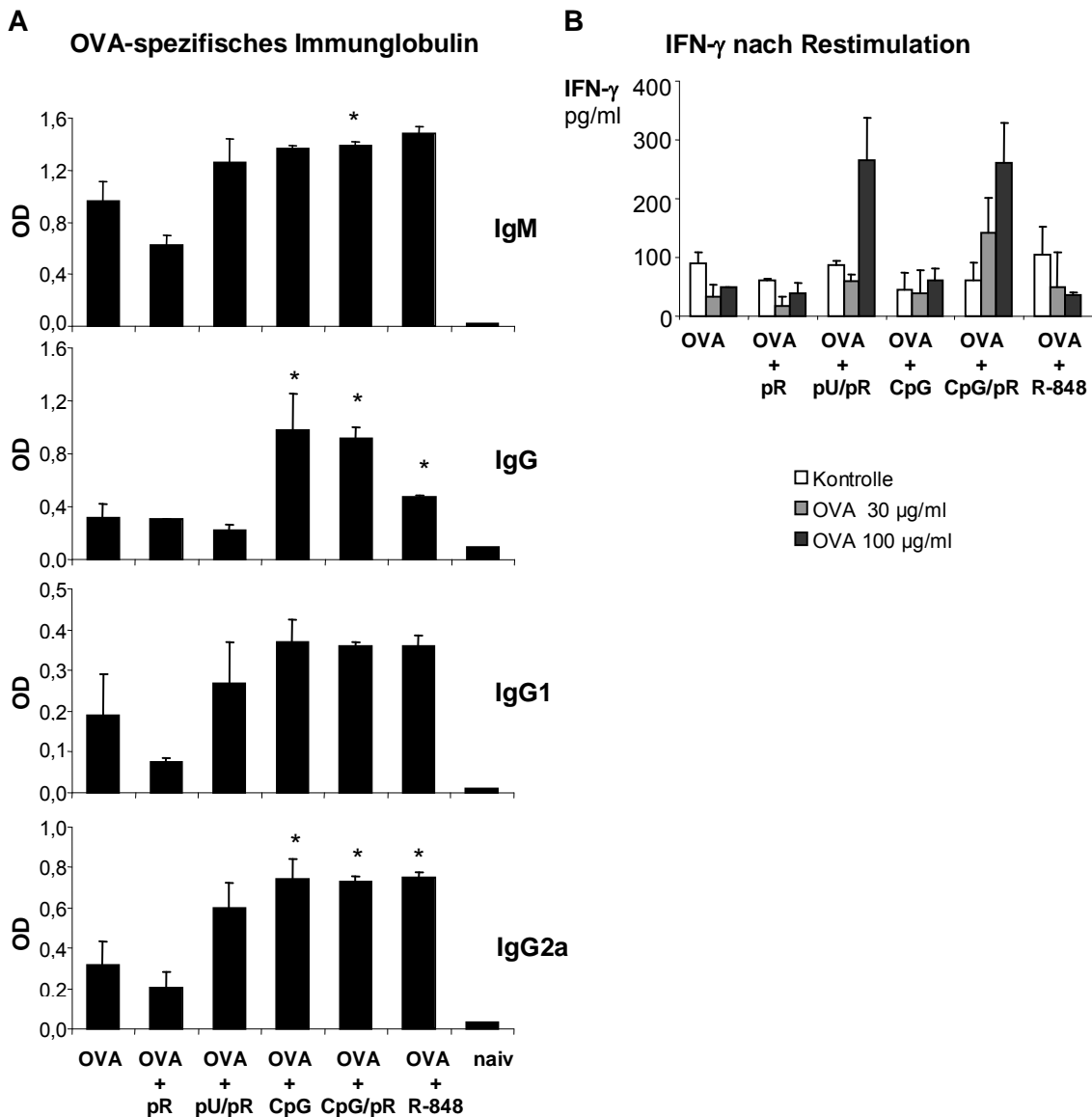
### 3.5.2.2 Erhöhung der Interferon- $\gamma$ Produktion ex vivo restimulierter Splenozyten durch Polyuridin/Polyarginin-Komplex

Als mittelbare Nachweismethode einer spezifischen Immunreaktion gegenüber Ovalbumin wurde zusätzlich zur Antikörperbestimmung eine *ex vivo* Restimulation von Milzzellen durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass nach Restimulation mit Ovalbumin ausschließlich Zellen der mit CpG/pR und pU/pR immunisierten Tiere relevante Mengen IFN- $\gamma$  produzierten (Abb. 22B). Anhand dieses Readouts ließ sich somit sogar eine Überlegenheit des Polyuridin/Polyarginin-Komplexes gegenüber freiem CpG oder R-848 konstatieren.

Für Polyuridin als einfachem Vertreter einzelsträngiger RNA konnte somit erstmals auch *in vivo* eine, wenn auch moderate, immunstimulatorische Potenz belegt werden. Darüber hinaus konnte anhand der Ergebnisse eines ersten Vakzinierungsmodells mit Ovalbumin eine Adjuvans-Wirkung zumindest angenommen werden. Insbesondere die

klinisch fehlende Toxizität von Polyuridin – im Gegensatz zu freiem CpG ODN oder Resiquimod – trägt dazu bei, Einzelstrang-RNA als attraktive Alternative für die Zukunft erscheinen zu lassen.



**Abb. 22. Adjuvans-Wirkung von Polyuridin bei Immunisierung mit Ovalbumin**

Mäuse (3 Tiere/Gruppe) wurden zweimal im Abstand von 14 Tagen mit je 100  $\mu\text{g}$  Ovalbumin (OVA) s.c. immunisiert. Kontrollgruppen erhielten OVA alleine oder in Verbindung mit 200  $\mu\text{g}$  Polyarginin (pR). In Vergleichsgruppen wurde dem Ovalbumin 20  $\mu\text{g}$  R-848, 50  $\mu\text{g}$  freies bzw. mit 100  $\mu\text{g}$  pR komplexiertes CpG ODN oder 100  $\mu\text{g}$  pU / 200  $\mu\text{g}$  pR als Adjuvans beigefügt.

**A** OVA-spezifisches Immunglobulin: Die Blutabnahme zur Bestimmung des Antikörpertiters wurde 3 W nach der ersten Vakzinierung durchgeführt. Die Messung OVA-spezifischen Immunglobulins erfolgte semiquantitativ mittels ELISA, wobei die Extinktionswerte (OD) der einzelnen Gruppen gegeneinander aufgetragen wurden.; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  gegenüber Kontrolle (OVA) **B** IFN- $\gamma$  nach Restimulation: Versuchstiere wurden nach 4 W getötet und frisch isolierte Milzzellen (2 Mio./ml) mit OVA (30 bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$ ) *ex vivo* restimuliert. Messung von IFN- $\gamma$  im Überstand nach 72 h per ELISA.

Alle Versuchsbedingungen wurden als biologische Triplikate angelegt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Einzelwerte dar.



## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

#### 4.1.1 Antitumoreffekt von Resiquimod

Ausgehend vom bekannt hohen immunstimulatorischen Potenzial in Verbindung mit der Fähigkeit zur Induktion starker humoraler  $T_H1$ -Immunantworten wurde in der vorliegenden Arbeit die Kapazität von Resiquimod (R-848) als Adjuvans einer Tumorstoffimpfung im C26 Kolonkarzinommodell untersucht.

Hierbei konnte erstmals ein signifikanter Antitumoreffekt von Resiquimod belegt werden. Die Inhibition des Tumorwachstums gelang sowohl in Verbindung mit einer tumorzellgepulsten dendritischen Zellvakzine als auch durch R-848 alleine. Anders als in diversen Impfprotokollen gegen Modellantigene vorgeschrieben, war für den Behandlungserfolg jedoch ein intensiviertes Therapieregime mit wiederholten Nachinjektionen von Resiquimod um den primären Applikationszeitpunkt der Vakzine erforderlich. Im Rahmen des Immunmonitoring konnte keine erhöhte Anzahl tumorspezifischer CTL als Ursache für den Antitumoreffekt festgestellt werden, im Gegensatz zur etablierten Standardtherapie mit CpG ODN. Die Ergebnisse für CpG standen dabei in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten im selben Tumormodell, die das Vorhandensein zytotoxischer T-Lymphozyten als essentiell für die Wirksamkeit der Vakzine beschrieben hatten (Heckelsmiller, 2002b). Dennoch gelang für R-848 der direkte *in vivo* - Nachweis einer spezifischen Lyse von Tumorzellen. Die hohe lytische Aktivität wurde für Resiquimod mit und ohne DC-Vakzine registriert und war in diesem Punkt der Therapie mit CpG ODN überlegen. Dass trotz dieser starken biologischen Wirkung keine CTL gesehen wurden, könnte mit der begrenzten Sensitivität des Nachweises Pentamer-positiver Zellen (Frequenzen tumorspezifischer CTL im Promillebereich) bei gleichzeitig schwachem Antigen zusammenhängen. Diese Art der Methodik berücksichtigt darüber hinaus lediglich die Anzahl antigenspezifischer Effektorzellen, nicht jedoch deren funktionellen Status. Somit scheint es denkbar, dass durch Resiquimod tumorspezifische CTL unterhalb der Nachweisgrenze induziert wurden, dass diese jedoch Tumorzellen hocheffizient lysieren können, möglicherweise in Synergie mit weiteren Mechanismen wie Antikörper-vermittelter Zytotoxizität.

#### 4.1.2 Toleranzentwicklung nach Anwendung von Resiquimod

Als wahrscheinlich entscheidende Limitation in der Anwendung von Resiquimod als effektives Vakzine-Adjuvans im Rahmen des Tumormodells stellte sich eine ausgeprägte Toleranzentwicklung heraus. Die einmalige Verabreichung von R-848 führte bereits nach wenigen Stunden zu einer stark verminderten Ansprechbarkeit für konsekutiv weitere Stimulationen, gemessen an der fast aufgehobenen Produktion bedeutender  $T_H1$ -Zytokine für eine Dauer von mindestens fünf Tagen. *In vitro* ließ sich dieses Tachyphylaxiephänomen insbesondere für MDC nachvollziehen. Zusätzlich wurde als Ausdruck einer Kreuztoleranz gleichzeitig eine stark herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber diversen Liganden anderer TLR festgestellt.

Spekulativ bleiben die zugrunde liegenden Mechanismen. Aus der Tatsache, dass während der Toleranzphase die IL-12p40-Induktion uneingeschränkt möglich war, konnte eine beeinträchtigte Biodistribution oder biologische Aktivität von R-848 praktisch ausgeschlossen werden. Da IL-12p40 und IL-12p70 größtenteils die gleichen Signaltransduktionswege nutzen, schien darüber hinaus eine veränderte Expression bzw. Sensitivität von Rezeptoren unwahrscheinlich. Was den Aspekt der Kreuztoleranz anbetrifft, so war insbesondere der Umstand, dass sich das Phänomen zumindest teilweise auch auf den TLR3-Ligand Poly I:C erstreckte, von Interesse. Denn da TLR3 kaum mit proximalen Signalwegen anderer TLR interferiert (Abb. 2), musste eine Unterbrechung sehr weit *downstream* erfolgen. Alternativ war nicht auszuschließen, dass der Effekt stattdessen auf einer generellen Funktionseinschränkung der stimulierten Zellen beruhte. In *in vivo* Versuchen war für Resiquimod klinisch stets eine relativ hohe Toxizität bei gleichzeitig enger therapeutischer Breite aufgefallen. Als möglicher Mechanismus könnte somit die Stimulation mit R-848 auch über eine Form zellulärer Erschöpfung zur Ausbildung des Tachyphylaxiephänomens geführt haben.

#### 4.1.3 Adjuvans-Wirkung von Polyuridin bei Immunisierung mit Ovalbumin

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von Einzelstrang-RNA als potentiellm Impfadjuvans evaluiert. Dazu wurde der TLR7-Ligand Polyuridin in Form eines Polyuridin/Polyarginin-Komplexes in einem Vakzinierungsprotokoll als Adjuvans zur Immunisierung gegen Ovalbumin eingesetzt. Damit konnte in der Tendenz eine sequenzspezifische Verstärkung der humoralen Immunantwort beobachtet werden. Die Verabreichung als Polyuridin/Polyarginin-Komplex erwies sich gleichzeitig als zuverlässige und sichere Anwendungsform ohne klinische Anzeichen von Toxizität, was Einzelstrang-RNA als potentiell attraktive Alternative für die Zukunft qualifiziert.

## 4.2 Einordnung der Ergebnisse im Kontext der Literatur

### 4.2.1 Resiquimod als potentes Immunstimulans

Wie in mehreren Arbeiten vorbeschrieben (Wagner, 1999; Tomai, 2000; Vasilakos, 2000), konnte die Fähigkeit zur Immunstimulation im verwendeten Tiermodell nachvollzogen werden. In Übereinstimmung mit publizierten Daten wurde im Rahmen der Dosisfindung die hohe Potenz von Resiquimod zur  $T_H1$ -Zytokininduktion bei gleichzeitig rascher Kinetik der pharmakologischen Wirkungen bestätigt. Die Arbeitsgruppe um Wagner und Mitarbeiter hatte zudem gezeigt, dass R-848 gleichzeitig die  $T_H2$ -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 über die Ausschüttung von IL-12 und IFN- $\alpha$  wirksam antagonisiert. Für IL-10, einem weiteren antiinflammatorischen  $T_H2$ -Zytokin, konnte in der vorliegenden Arbeit ein moderater, nicht strikt dosisabhängiger Anstieg im Serum registriert werden. Ein ähnliches Ergebnis ergaben in jüngster Vergangenheit Untersuchungen an B-Lymphozyten von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL). Nach wiederholter *in vitro* Stimulation mit dem Imidazoquinolon S28690 konnte dort die Induktion von IL-10 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Shi, 2007). In Anbetracht der niedrigen Serumspiegel schien diese Tatsache jedoch für das Tumormodell von insgesamt eher untergeordneter Bedeutung für den klinischen Erfolg der Vakzine. Darüber hinaus führte R-848 zur starken Aktivierung eines breiten Spektrums an Immunzellen (DC, B- / T- / NK-Zellen).

### 4.2.2 Antitumoreffekt von Resiquimod

#### 4.2.2.1 Klinischer Erfolg im Tiermodell

Anders als für die Muttersubstanz Imiquimod liegen für Resiquimod im Tiermodell bislang keine Daten für einen möglichen Antitumoreffekt vor. Die hohe Potenz von Resiquimod zur  $T_H1$ -Polarisation und Induktion starker Immunantworten legte jedoch eine solche Wirksamkeit nahe, zumal R-848 als löslicheres Analogon besser für eine systemische Applikation geeignet schien.

Mit einem intensivierten Therapieregime konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums erzielt werden. Der beobachtete Effekt war dabei unabhängig von der Verabreichung der DC-Vakzine. Eine ähnliche Wirkung hatten zuvor schon Sidky und Mitarbeiter für Imiquimod beschrieben (Sidky, 1992). Oral verabreicht führte es zur signifikanten Verlangsamung des Tumorwachstums in verschiedenen Tumormodellen, wobei gezeigt werden konnte,

dass ein Großteil des Effekts durch IFN- $\alpha$  mediiert wurde. Im Unterschied zu Sidky *et al.* konnten jedoch durch Resiquimod einzelne Tumoren zur Verkleinerung oder sogar vorübergehend zur kompletten Rückbildung gebracht werden.

#### 4.2.2.2 Potentieller Einfluss von R-848 auf Mechanismen zellvermittelter Immunität

Ausgehend vom beobachteten klinischen Erfolg wurde durch differentielles Immunmonitoring zusätzlich versucht, Anhaltspunkte für die inhibitorische Wirkung von Resiquimod auf das Tumorstadium auf zellulärer Ebene zu erhalten. Ein direkter antineoplastischer Effekt von R-848 auf Tumorzellen war dabei nicht zu erwarten. Denn anders als für Imiquimod, das zusätzlich unmittelbare proapoptische Wirkungen auf kutane Malignomzellen *in vitro* und *in vivo* ausübt, wurde eine solche Wirkweise für Resiquimod explizit nicht beschrieben (Schön, 2004).

Frühere Arbeiten zu R-848 hatten sich vor allem auf die Erforschung des Zytokinmilieus (Ahonen, 1999; Wagner, 1999) sowie die Beschreibung des T<sub>H</sub>1-bias auf humoraler Ebene (Vasilakos, 2000) fokussiert. Für eine effektive Antitumorantwort rückte jedoch insbesondere der Einfluss von Resiquimod auf Mechanismen zellvermittelter Immunität in den Mittelpunkt des Interesses. Deshalb wurde hierzu die Rolle der Einzelkomponenten DC-Vakzine und R-848 für die Induktion tumorspezifischer CTL sowie Verstärkung spezifischer Lyse von Targetzellen evaluiert.

Es stellte sich heraus, dass der Antitumoreffekt nicht auf einer messbar erhöhten Anzahl tumorspezifischer CTL basierte, im Unterschied zur etablierten Standardvakzine mit CpG ODN (Heckelsmiller, 2002a). Dies stand zudem scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen von Wille-Reece *et al.*, die in einem Vakzinierungsmodell gegen HIVgag-Protein in Primaten eine verstärkte CD8 T-Zell-Antwort durch Einsatz eines HIVgag/TLR7/8-Konjugats registriert hatten (Wille-Reece, 2005). In diesem Modell wurde allerdings das Vorhandensein spezifischer CTL lediglich anhand der T<sub>H</sub>1-Zytokinsekretion frisch isolierter PBMC postuliert, ein Nachweis für deren Antigen-spezifität in Form eines funktionellen Tests wurde nicht durchgeführt. Außerdem kommt erschwerend hinzu, dass es sich bei AH1 um ein wesentlich schwächeres Antigen handelt als bei HIVgag.

Trotz fehlendem Nachweis tumorspezifischer CTL konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit eine Verstärkung der zellvermittelten Immunität als entscheidender Faktor für die Wirkung von Resiquimod belegt werden. Im Tumormodell wurde die antigenspezifische Lyse von Targetzellen *in vivo* signifikant erhöht und zwar stärker als durch die Standardtherapie mit CpG ODN. Somit konnte gezeigt werden, dass R-848

unabhängig von der DC-Vakzine eine deutlich gesteigerte Immunantwort hervorruft, anders als in der Publikation von Weeratna *et al.*, wo bei der Impfung gegen das Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg) in Balb/c Mäusen keine Erhöhung der spezifischen Lyse festgestellt werden konnte (Weeratna, 2005). Die Immunisierung erfolgte dort allerdings nach einem anderen Protokoll. In einem analogen Schema mit 40 µg R-848 als Einzeldosis konnte im C26 Kolonkarzinom Tumormodell durch unsere Arbeitsgruppe auch noch kein positiver Therapieeffekt nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Erhöhung der tumorantigenspezifischen Lyse als Ausdruck einer gesteigerten zellvermittelten Immunantwort erst durch das intensivierte Therapieregime möglich wurde.

#### 4.2.2.3 Die mögliche Bedeutung von regulatorischen T-Zellen

Darüber hinaus könnten regulatorische T-Zellen (Tregs) in ihrer Funktion beeinflusst werden. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (natürlich vorkommende Tregs) besitzen Bedeutung in der Begrenzung inflammatorischer Prozesse bei überschießenden Immunantworten sowie in der Prävention von Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßung. Ihre immunsuppressive Wirkung wird über Zell-Zell-Kontakte (natürlich vorkommende Tregs) oder lösliche Faktoren wie TGF-β (*Transforming growth factor* β) und IL-10 (Antigen-induzierte Tregs) vermittelt. Gerade im murinen System haben sich Tregs in der Vergangenheit oftmals als limitierend für eine robuste Immunantwort gegen Tumorantigene erwiesen, da diese oft Selbst-Antigen-Charakter besitzen und somit zur Immuntoleranz führen. In verschiedenen Mausmodellen konnte demonstriert werden, dass durch Depletion von Tregs eine verstärkte zelluläre Antitumorantwort mit Ausbildung eines langdauernden immunologischen Gedächtnisses erzielt werden kann (Shimizu, 1999; Casares, 2003).

2003 konnten Pasare und Medzhitov erstmals zeigen, dass sich durch Bindung von TLR-Liganden an DC die Suppression durch regulatorische T-Zellen *in vitro* überwinden ließ (Pasare & Medzhitov, 2003). Ein Jahr später beschrieb die Arbeitsgruppe um Yang und Mitarbeiter die Notwendigkeit persistierender TLR-Signale zur Aufhebung Tregs-vermittelter Toleranz von CD8 T-Zellen *in vivo* (Yang, 2004). Durch Hinzufügen von LPS oder CpG als Adjuvans zu einer peptidgepulsten dendritischen Zellvakzine gelang es der Forschergruppe, in einem Lymphommodell mit tolerogenem Setting eine starke antineoplastische Immunantwort, vergleichbar einer vorherigen Depletion von Tregs, zu generieren.

Eine weitere bedeutende Beobachtung machten 2005 Peng *et al.* (Peng, 2005). Zunächst konnten sie erstmals nachweisen, dass TLR8 im humanen System als einziger *Toll-like* Rezeptor stabil auf beiden großen Subklassen regulatorischer T-Zellen exprimiert wird. Darüber hinaus gelang es ihnen, Guanosin-reiche Einzelstrang-RNA als notwendig und ausreichend für die direkte TLR8-vermittelte Aufhebung regulatorischer T-Zell-Funktionen zu identifizieren. Dieser Sachverhalt wurde dabei sowohl anhand von *in vitro* Versuchen mit Bestimmung der spezifischen Lyse an humanen Tregs als auch mittels adoptivem T-Zell-Transfer im murinen Tumormodell *in vivo* belegt.

Vor dem Hintergrund, dass anhaltende TLR-Stimulation somit sowohl indirekt durch DC-Aktivierung (Pasare & Medzhitov, 2003) als auch direkt via TLR8 (Peng, 2005) zur Überwindung Tregs-vermittelter Toleranz führen kann, schien denkbar, dass sich der antineoplastische Effekt von Resiquimod im intensivierten Therapieregime zumindest teilweise auf die Beeinflussung der suppressiven Funktion regulatorischer T-Zellen zurückführen ließ. In Zukunft wäre daher zu klären, ob Resiquimod beispielsweise lokal ein anderes Verteilungsmuster Tumorfiltrierender Lymphozyten bewirkt oder ob systemisch eine veränderte Funktion von Tregs die Folge ist.

#### 4.2.2.4 Das „Inflammasome“ als intrazellulärer Rezeptor von Imidazoquinolonen

Völlig neue Perspektiven bezüglich potentieller Wirkmechanismen von Resiquimod eröffnen daneben erste Untersuchungen zur Funktion kürzlich beschriebener Rezeptorkomplexe angeborener Immunität. Die Arbeitsgruppe um Kanneganti *et al.* konnte vor kurzem nachweisen, dass bakterielle RNA sowie die Imidazoquinolone Imiquimod und Resiquimod zur Aktivierung von Caspase-1 via Cryopyrin führen (Kanneganti, 2006). Cryopyrin, auch Nalp3 genannt, gehört zur Familie der NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-Rezeptoren, neben TLR eine weitere bedeutende Rezeptorklasse des angeborenen Immunsystems. Intrazellulär formt Cryopyrin einen Multi-Protein-Komplex, der als „Inflammasome“ bezeichnet wird und der das *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) sowie Caspase-1 enthält. Kanneganti und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Caspase-1-Aktivierung durch Imiquimod und Resiquimod innerhalb des „Inflammasomes“ unabhängig von TLR7 oder funktionellem MyD88 sowie konsekutiver NF- $\kappa$ B- bzw. MAPK-Aktivierung zustande kam. In diesem Licht scheint es folglich durchaus denkbar, dass Imidazoquinolone intrazellulär noch zusätzliche, unerforschte Wirkmechanismen besitzen, die nicht über TLR vermittelt werden.

#### 4.2.3 Endotoxintoleranz als bekanntes Phänomen

In der vorliegenden Arbeit wurde für R-848 eine ausgeprägte Toleranzentwicklung festgestellt. Ein ähnliches Phänomen ist in der Literatur bislang vor allem für LPS beschrieben.

LPS, auch Endotoxin genannt, ein Glykolipid der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien, zählt zu den potentesten bekannten Immunstimulanzien (Rietschel, 1992). Obwohl Zytokine unverzichtbar für die effiziente Kontrolle von Wachstum und Dissemination eindringender Pathogene sind, birgt eine dysbalancierte inflammatorische Reaktion erhebliche Gefahren für den Wirt. Schädigende Folgen bestehen unter anderem in den Auswirkungen einer gestörten Mikrozirkulation, die über Gewebsschädigung und septischem Schock mit Multiorganversagen schließlich zum Tod führen kann (Beutler, 1985; Danner, 1991). Das Phänomen der Endotoxintoleranz stellt somit vermutlich einen Schutzmechanismus des Wirts dar, um nachteilige Effekte einer überschießenden Entzündungsreaktion, ausgelöst durch Gram-negative Bakterien, zu begrenzen. Erstmals registriert wurde Endotoxintoleranz bereits Mitte des 20. Jahrhunderts mit der interessanten Beobachtung, dass die Vorexposition von Versuchstieren gegenüber niedrigen LPS-Dosen vor den Folgen nachfolgend hoher bis letaler Dosen schützt (Beeson, 1947; Greisman, 1966). Dieser Schutz war charakterisiert durch eine reduzierte inflammatorische Reaktion, die einer verminderten Ansprechbarkeit von Makrophagen zugeschrieben werden konnte (Granowitz, 1993). Ähnliche Ergebnisse konnten von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen in der Folge *in vitro* erzielt werden. Bei späteren Untersuchungen konnte LPS-Toleranz in der Klinik auch an Patienten mit Gram-negativer Sepsis beobachtet werden (Munoz, 1991). Der zugrunde liegende Mechanismus blieb jedoch im Kern trotz intensiver Nachforschungen unerkannt.

#### 4.2.4 Molekulare Mechanismen der Endotoxintoleranz

Mit der Identifikation von TLR4 als LPS-Rezeptor durch Poltorak und Hoshino wurde eine entscheidende Voraussetzung für weiteren Erkenntnisgewinn bezüglich des Wirkmechanismus auf molekularer Ebene geschaffen (Poltorak, 1998; Hoshino, 1999). Die Aufklärung der genauen intrazellulären Signaltransduktionswege von TLR4 war nachfolgend Gegenstand intensiver Forschung.

Heute weiß man, dass Endotoxintoleranz mit der Herunterregulation von TLR4 auf der Zelloberfläche assoziiert ist, deren Bedeutung jedoch unklar ist (Nomura, 2000). Denn zum einen demonstrierten Medvedev und Mitarbeiter, dass LPS-Toleranz auch in

einem Modell mit TLR4-Überexpression induziert werden konnte (Medvedev, 2001). Zum anderen wiesen Learn *et al.* unter prolongierter LPS-Stimulation die stabile Produktion antiinflammatorischer Proteine nach, was als Beleg für eine zumindest selektiv erhaltene Ansprechbarkeit für fortdauernde LPS-Exposition zu werten war (Learn, 2001). Darüber hinaus sind zahlreiche intrazelluläre Prozesse beteiligt: ein vermindertes Proteinlevel von IRAK-1 (Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase 1) (Li, 2000; Jacinto, 2002; Sato, 2002) und IRAK-4 (Hatao, 2004) sowie eine eingeschränkte LPS-induzierte Phosphorylierung der intrazellulären TIR (Toll-Interleukin-1 Rezeptor)-Domäne von TLR4, die kürzlich als wichtige Voraussetzung für eine ungehinderte Signalübertragung gesichert wurde (Medvedev, 2007). IRAK-1 und IRAK-4 besitzen eine Schlüsselfunktion für die MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*)-abhängige Induktion proinflammatorischer Zytokine. Hatao und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die prolongierte Stimulation via TLR2, 4 und 9 zur Reduktion von IRAK-4 führt, vermutlich durch Spaltung mittels einer durch NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa B*)-Aktivierung induzierten Protease (Hatao, 2004), und somit zur IRAK-1 übergeordneten Inhibierung der MyD88-abhängigen Signaltransduktion. Allerdings existiert für TLR4 gleichzeitig eine MyD88-unabhängige Signalübertragung via TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), die die Transkription Interferon-induzierbarer Gene kontrolliert. Dieser Signalweg ist während Endotoxintoleranz ebenfalls unterbrochen. Bislang gelang es jedoch nicht, diesem Sachverhalt ein bestimmtes Korrelat zuzuordnen.

Die exakten molekularen Mechanismen von Endotoxintoleranz sind daher im Detail bis heute noch nicht vollständig geklärt. Als gesichert kann die Bedeutung von IRAK-Downregulation im Bereich des MyD88-abhängigen *signalling* gelten. Zudem konnte ST2, einem eigenständigen Mitglied der Superfamilie der Toll-Interleukin-1 Rezeptoren (TIR), als negativem Regulator eine wesentliche Rolle zugeschrieben werden (Sweet, 2001; Brint, 2004).

#### 4.2.5 Kreuztoleranz von TLR4 mit anderen *Toll-like* Rezeptoren

Im Laufe der Zeit wurde bekannt, dass es sich bei Toleranz nicht um eine LPS-spezifische Erscheinung handelte. Analog wurden Zellen durch diverse andere TLR-Liganden refraktär für die spätere Restimulation mit derselben Substanz (TLR2: Sato, 2000; Lehner, 2001; Jacinto, 2002; TLR5: Mizel, 2002; TLR9: Yeo, 2003). Darüber hinaus fiel auf, dass Endotoxin Zellen nicht nur unempfindlich für weitere LPS-Dosen machte, sondern dass diese dadurch teilweise ebenso refraktär für andere Stimuli wurden. Dieses als Kreuztoleranz bezeichnete Phänomen wurde erstmals von



Medvedev und Mitarbeitern beschrieben. Sie konnten zeigen, dass die Vorstimulation mit IL-1 $\beta$ , nicht jedoch mit TNF- $\alpha$ , zur Desensibilisierung gegenüber LPS führte, was eine proximale Unterbrechung gemeinsamer Signaltransduktionswege nahe legte (Medvedev, 2000). Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch andere Forschergruppen, die eine Kreuztoleranz zwischen TLR4 und weiteren TLR nachwiesen (TLR4/TLR2: Sato, 2000; Lehner, 2001; Jacinto, 2002; TLR4/TLR9: Yeo, 2003; TLR4/TLR3: Jiang, 2005).

Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Zusammenspiels beteiligter Prozesse leisteten Sato *et al.* Sie wiesen nach, dass MALP-2 (*Macrophage-activating lipopeptide* 2) als TLR2-Ligand Kreuztoleranz gegenüber LPS selektiv im Bereich der MyD88-abhängigen Signaltransduktion hervorrufen konnte (Sato, 2002). Gleiches galt für den TLR7-Liganden R-848, während sich TLR3-vermittelte Kreuztoleranz auf den MyD88-unabhängigen Signalweg beschränkte. So konnte gezeigt werden, dass (Kreuz-)Toleranz jeweils unterschiedliche Aspekte der intrazellulären Signalvermittlung involviert, abhängig von der TLR-aktivierenden Substanz.

#### 4.2.6 Toleranzinduktion durch TLR7-Liganden

Ähnlich wie für diverse andere TLR-Liganden zuvor konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Toleranzentwicklung auch für TLR7 festgestellt werden. Parallele Untersuchungen mit dem *Immune response modifier* S28690 (TLR7/8-Ligand) demonstrierten zudem *in vitro* die Desensibilisierung von humanen PBMC und B-CLL Leukämiezellen gegenüber Restimulation mit derselben Substanz (Shi, 2007). Als wahrscheinlichen Mechanismus für die resultierende Untererregbarkeit hatten Sato und Mitarbeiter die Reduktion von IRAK-1 als entscheidenden Schritt suggeriert.

##### 4.2.6.1 Herunterregulation von TLR7 und IRAK-1 sowie Beteiligung transkriptioneller Mechanismen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ließen die Herunterregulation von IRAK-1 als mögliche Erklärung zu. Dafür sprach einerseits die Kinetik mit der Zeitspanne der Toleranzausbildung (4-6 h *in vivo*) und der Dauer des Zustandes (mind. 5 d *in vivo*), andererseits die Tatsache, dass keine vollständige Blockade aller TLR7-vermittelten Wirkungen resultierte, da *in vivo* während der Toleranzphase die Induktion der p40-Untereinheit von IL-12 uneingeschränkt möglich war.

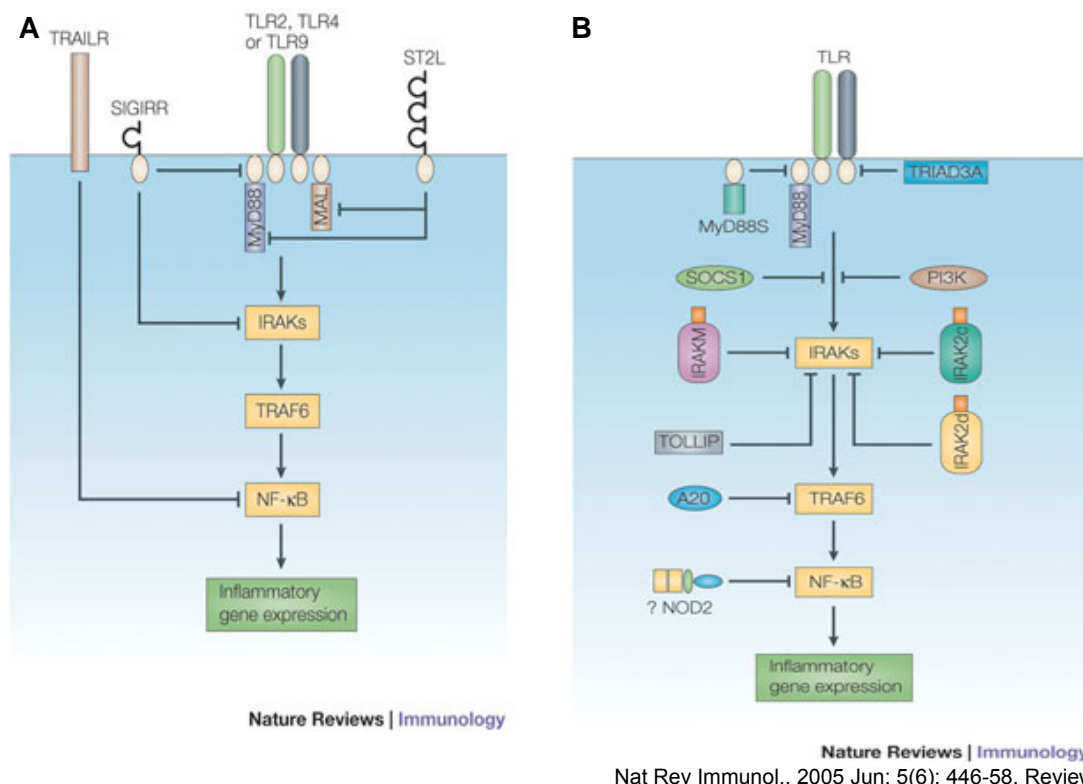
Untermauert wird diese Hypothese durch die Arbeit von Shi *et al.*, die zeigen konnten, dass es im Rahmen TLR7-vermittelter Toleranz auf B-CLL Zellen zur Verminderung von IRAK-1 kommt, bei gleichzeitig unveränderter IRAK-4 Expression. Darüber hinaus ließ sich eine Reduktion von TLR7 auf mRNA-Ebene beobachten, die jedoch auch nicht zum völligen Signalblock via TLR7 führte wie anhand erhaltener IL-6- und IL-10-Produktion sowie Aktivierung des MAPK Signalwegs geschlossen werden konnte. Ähnlich wie Hatao und Mitarbeiter konnten Shi *et al.* zusätzlich eine wesentliche Rolle transkriptioneller Mechanismen für die Induktion von Inhibitoren der Signalübertragung über TLR7 nach initialer NF- $\kappa$ B-Aktivierung belegen. Einen Hinweis auf die Beteiligung einer stimulationsassoziierten Geninduktion lieferte auch hier die Kinetik der Toleranz. Der Status der Untererregbarkeit entwickelte sich – übereinstimmend mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit – über einen Zeitraum von 6 - 8 Stunden und erstreckte sich auf mindestens fünf Tage bei PBMC, respektive drei bis fünf Tagen bei CLL Zellen.

Folglich bleibt also trotz IRAK-1 Herunterregulation eine gewisse Reaktivität gegenüber fortgesetzter TLR7-Stimulation bestehen, was im Sinne erhaltener Zellvitalität und gegen ein simples Tachyphylaxisphänomen argumentiert. Einerseits ist IRAK-1 für die Induktion vieler Zytokine nicht essentiell (Abb. 2), andererseits wird angesichts der eklatanten Diskrepanz in der Toleranzentwicklung zwischen IL-12p70 und IL-12p40 die differentielle Sekretion der beiden Zytokine durch Unterschiede im Signalweg nicht hinreichend erklärt. Stattdessen könnten hierfür posttranskriptionelle Mechanismen verantwortlich sein oder daneben möglicherweise das „Inflammasome“ als intrazellulärer Imidazoquinolon-Rezeptor eine Rolle spielen.

#### 4.2.6.2 Mögliche Rolle negativer Regulationsmechanismen auf die Toleranzinduktion via TLR7

Die Erklärung für die Toleranzentwicklung durch synthetische TLR7/8-Liganden ist sicherlich vielschichtig. Eine wesentliche Rolle transkriptioneller Mechanismen nach initialer NF- $\kappa$ B-Aktivierung konnte belegt werden, deren Bedeutung vermutlich auf der Induktion negativer Regulatoren TLR7-vermittelten *signallings* beruht. Bei diesen könnte es sich um Proteasen handeln, die den direkten Abbau von IRAK-1 oder anderen Molekülen katalysieren oder alternativ um spezifische Suppressoren proinflammatorischer Gentranskription. Für die Beantwortung dieser Frage scheint es daher bedeutsam, die mögliche Rolle unterschiedlicher bekannter Inhibitoren zu beleuchten. Neben transmembranösen Regulationsmechanismen (Abb. 23A) rücken dabei vor allem intrazelluläre Inhibitoren (Abb. 23B) in den Fokus.

Für TOLLIP (*Toll-interacting protein*) konnte zunächst keine veränderte Protein-Expression nach Stimulation mit R-848 festgestellt werden (Sato, 2002). Zahlreiche andere Moleküle sind jedoch beschrieben. So verhindert eine spezielle Splicing-Variante von MyD88 (MyD88s) die Rekrutierung von IRAK-4 (Burns, 2003) oder inhibitorisches IRAK-M unterbindet die Dissoziation von IRAK vom Signalkomplex (Kobayashi, 2002). Eine ähnliche Wirkung besitzen IRAK-2b und IRAK-2c. SOCS-1 (*suppressor of cytokine signalling 1*) hemmt die LPS-induzierte Aktivierung von Makrophagen (Kinjyo, 2002; Nakagawa, 2002), wobei die Interaktion mit IRAK-1 eine Rolle zu spielen scheint. Neben IRAK-1 als potentiellm Angriffspunkt ist die ubiquitäre Verteilung von SOCS-1 von Interesse. Aber auch PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase), A20 oder NOD2 sind potentielle Kandidaten. A20, ein Zinkfinger-Protein, wird von zahlreichen Zelltypen exprimiert und spaltet die Ubiquitin-Kette von TRAF 6 (TNFR-assoziiertes Faktor 6), die essentiell für die weitere Signaltransduktion ist. Dadurch kontrolliert A20 als bisher einziges bekanntes Molekül sowohl MyD88-abhängige als auch -unabhängige Signalwege. Genauere Untersuchungen dieser Regulationsmechanismen werden daher vermutlich entscheidend sein für ein zukünftig besseres Verständnis vom komplexen Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Faktoren, vermittelt über TLR.



### Abb. 23. Negative Regulationsmechanismen TLR-vermittelten *signalings*

Schematische Darstellung wichtiger transmembranöser (A) sowie intrazellulärer (B) negativer Regulationsprozesse in der Signalübermittlung via *Toll-like* Rezeptoren.

#### 4.2.7 Biologische Wirkungen von Einzelstrang-RNA

##### 4.2.7.1 Immunstimulatorisches Potenzial von Einzelstrang-RNA

Immunstimulatorische Wirkungen von RNA sind bereits seit längerem bekannt. 2001 schließlich konnten Alexopoulou und Mitarbeiter TLR3 als Rezeptor für virale Doppelstrang-RNA (dsRNA) identifizieren (Alexopoulou, 2001). Der Durchbruch für die Erklärung ähnlicher Effekte von Einzelstrang-RNA (ssRNA) gelang 2004 durch die Publikationen von Heil *et al.* und Diebold *et al.* (Diebold, 2004; Heil, 2004). Diebold und Mitarbeiter beschrieben darin Influenzavirus- sowie Polyuridin-ssRNA als natürliche Liganden für TLR7 (Diebold, 2004), Heil *et al.* Guanosin-Uridin (GU)-reiche Sequenzen, isoliert aus HIV-1 RNA (Heil, 2004). Gleichzeitig wurden RNA-Oligonukleotide auch als Agonisten für humanen TLR8 identifiziert (Heil, 2004).

Dabei fielen Heil *et al.* einzelne speziesspezifische Unterschiede in der Erkennung von ssRNA auf. So führte RNA40, die Wildtypvariante aus HIV-1, zur Aktivierung sowohl von murinen als auch humanen Immunzellen. RNA41, bei dem alle Uridin-Nukleotide von RNA40 durch Adenosin ausgetauscht waren (U-A), war dazu nicht in der Lage. Unterschiede zwischen beiden Spezies offenbarten sich jedoch bei RNA42, der G-A modifizierten Form von RNA40, die human immunstimulatorisch wirkte, murin dagegen nicht. Heil und Mitarbeiter folgerten daraus, dass zur Diskrimination Unterschiede in GU-Frequenz und Basenmodifikation existieren müssen, die in Ergänzung zur verschiedenen Kompartimentalisierung von Eigen- und Fremd-RNA als Gefahrensignal dienen. Bestätigt wurde diese These 2005 durch die Publikation von Hornung *et al.* (Hornung, 2005). Auf der Suche nach einer geeigneten Sequenz zum selektiven Knockdown von TLR9 mittels *small interfering RNA* (siRNA) machten sie die Beobachtung, dass einzelne siRNAs starke Induktoren von IFN- $\alpha$  in plasmazytoiden DC waren. In der Folge gelang es, aus den überlappenden Regionen zweier immunstimulatorisch wirkender siRNAs (nachfolgend als immunstimulatorische RNA (isRNA) bezeichnet) das Motiv 5'-GUCCUCAA-3' als entscheidende Sequenz zu isolieren. Dabei konnten Hornung *et al.* gleichzeitig zeigen, dass Immunstimulation, vermittelt über TLR7, und RNA *silencing* zwei unabhängige funktionelle Wirkungen von siRNA darstellen: sowohl Duplex als auch Sense-Strang von RNA9.2 waren im Gegensatz zum Antisense-Strang gleich potent in der Induktion von IFN- $\alpha$ , ausschließlich der Antisense-Strang hingegen bewirkte die Downregulation des Zielproteins TLR9. Der Nachweis eines gesicherten Motivs innerhalb von isRNA belegt eine Sequenzspezifität als bedeutende Komponente der Immunstimulation via TLR7. Die Beobachtung, dass RNA9.2 sowohl humane als auch murine Immunzellen aktiviert, legt dabei eine speziessübergreifende Erkennung solcher Motive nahe.

#### 4.2.7.2 Einzelsträngige RNA als Vakzine-Adjuvans

In der Folge wurde das immunstimulatorische Potenzial von RNA im Rahmen von diversen Vakzinierungsprotokollen untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konzentrierte sich dabei auf eine mögliche Adjuvans-Wirkung von isRNA bei der Immunisierung gegen Ovalbumin. Wir konnten schließlich zeigen, dass RNA9.2dr (= RNA9.2 mit doppeltem 5'-GUCCUCAA-3'-Motiv) sequenzabhängig die Produktion OVA-spezifischer IgG2a-Antikörper sowie antigenspezifischer CTL induziert und somit eine robuste T<sub>H</sub>1-Immunantwort in Mäusen hervorrufen kann (Bourquin, 2007). So gelang zum ersten Mal der zeitgleiche Nachweis von Effekten immunstimulatorischer RNA auf den angeborenen sowie adaptiven Arm des Immunsystems. Teilweise bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Hamm *et al.*, die ebenfalls eine potente Induktion antigenspezifischer CTL gegen Ovalbumin mit Hilfe von isRNA Oligonukleotiden (RNA40) beobachteten (Hamm, 2007). Die Immunantwort führte dort in einem Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* zur wirksamen Bekämpfung der OVA-exprimierenden intrazellulären Bakterien. Im Unterschied zu Bourquin *et al.* konnte jedoch in dieser Arbeit keine T<sub>H</sub>1-Polarisation der zusätzlich hervorgerufenen Antikörperantwort festgestellt werden. Parallel dazu untersuchten Scheel *et al.* Effekte von isRNA im Glioblastommodell in Mäusen (Scheel, 2006). Hierbei zeigte sich, dass immunstimulatorische mRNA (kodierend für *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidase oder CMV pp65 Protein) eine Tumorrogression mit Infiltration residualer Tumoren durch CD8<sup>+</sup> Zellen bewirkt. Der Antitumoreffekt war dabei unabhängig vom Ort der RNA-Injektion, was als Hinweis auf eine systemische Immunantwort zu werten war.

Erste Untersuchungen in Vakzinierungsmodellen brachten somit überwiegend ermutigende Ergebnisse, die isRNA als attraktive Substanzklasse auch für die klinische Anwendung erscheinen lassen. Durch Phosphorothioat-Modifikation zur Stabilisierung des RNA-Rückgrats konnte zudem die bisherige Hauptlimitation von RNA, der rapide Abbau durch RNasen, überwunden werden. Darüber hinaus stellt isRNA nach ersten tierexperimentellen Daten eine ausgesprochen sichere Form der Immunstimulation ohne sichtbare Zeichen von Toxizität dar. Eine Splenomegalie durch B-Zell-Proliferation, wie sie in Mäusen als gravierende Nebenwirkung durch CpG ODN ausgelöst wird, konnte nach Anwendung von RNA bislang nicht beobachtet werden (Scheel, 2006; Hamm, 2007).

#### 4.2.7.3 Bedeutung der intrazytosolischen RNA-Rezeptoren RIG-I und MDA-5

Eine völlig neue Dimension für das Verständnis von der Initiation antiviraler Immunantworten eröffnete kürzlich die Entdeckung der beiden RNA-Rezeptoren *Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)* und *Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)*. Anders als die im endosomalen Kompartiment von Immunzellen vorkommenden *Toll-like* Rezeptoren 3, 7 und 8 sind RIG-I und MDA5 nahezu ubiquitär im Zytosol eukaryoter Zellen lokalisiert. RIG-I erkennt bestimmte RNA-Viren (Flavi-, Paramyxo-, Orthomyxo- und Rhabdoviren) (Yoneyama, 2004), wohingegen MDA5 für die Abwehr gegen Vertreter der Picornavirus-Familie verantwortlich zeichnet (Kato, 2006). Während TLR nach neueren Erkenntnissen weitgehend verzichtbar für eine effiziente antivirale Abwehr sind (Ku, 2007), haben sich die zwei zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA5 als essentiell für die Kontrolle viraler Infektionen herausgestellt (Yoneyama, 2004). Erste Publikationen schrieben RIG-I und MDA5 eine entscheidende Rolle für die Erkennung viraler dsRNA zu (Yoneyama, 2004; Kato, 2006). Neuere Untersuchungen identifizierten schließlich 5'-Triphosphat RNA (3pRNA) als Liganden von RIG-I (Hornung, 2006; Pichlmair, 2006). Hornung und Mitarbeiter demonstrierten dabei, dass RIG-I direkt an das 5'-Triphosphat einiger viraler RNA Genome (sowohl dsRNA als auch ssRNA) bindet und so eine potente IFN- $\alpha$  Antwort in humanen Monozyten induziert (Hornung, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit ließen ferner den Schluss zu, dass die 5'-Triphosphat-Gruppe von 3pRNA als strukturelles Unterscheidungskriterium zwischen viraler und Wirt-RNA taugt, da gewöhnliche posttranskriptionelle Mechanismen in eukaryoten Zellen wie *capping* oder Basenmodifikation die Erkennung durch RIG-I verhindern. Folglich dient unmodifizierte 3pRNA wie sie in Viren vorkommt, die durch RIG-I erkannt werden, nicht jedoch in Viren, die durch MDA5 detektiert werden, als molekulares Erkennungsmerkmal für die Detektion viraler Infektionen durch RIG-I.

Diese neuen Erkenntnisse über ein anderes System viraler Erkennung eröffnen völlig neue Perspektiven für die Nutzung von RNA-Effekten unabhängig von TLR. Ein präziseres Wissen über intrazytosolische RNA-Detektion und deren Regulationsmechanismen sind hierfür jedoch erforderlich. Spekulativ bleibt daher die Hypothese, dass RIG-I aufgrund seiner ubiquitären Verteilung die lokale IFN- $\alpha$ -Produktion zur initialen antiviralen Abwehr vermittelt, während die in plasmazytoiden DC dominante Erkennung von viraler RNA durch TLR7 den systemischen Interferonspiegel im Verlauf der Infektion kontrolliert.

## 4.3 Klinische Relevanz

### 4.3.1 Imiquimod in der klinischen Anwendung

Seit seiner Erstzulassung 1997 befindet sich Imiquimod (Aldara®) als erste Substanz der synthetisch hergestellten *Immune response modifier* in breitem klinischen Einsatz. Ursprünglich zur Behandlung von genitalen und perianalen Warzen eingesetzt, hat Imiquimod mittlerweile auch die Zulassung für aktinische Keratose des Gesichts und der Kopfhaut sowie oberflächliches, bioptisch gesichertes Basaliom erhalten. Darüber hinaus existieren bereits zahlreiche weitere *off-label* Anwendungsgebiete, die derzeit parallel in klinischen Studien untersucht werden. Dabei handelt es sich vor allem um maligne kutane Läsionen, die aufgrund der topischen Applikation sowie dem direkten proapoptischen Effekt von Imiquimod auf Tumorzellen prädisponiert sind. Einen aktuellen Überblick über das Spektrum bisher publizierter Daten liefert der Übersichtsartikel von Navi und Huntley (Navi & Huntley, 2004). Darin tragen die Autoren Veröffentlichungen zum *off-label use* von Imiquimod bei Erkrankungen wie M. Bowen, invasivem Plattenepithelkarzinom, Lentigo maligna, metastasiertem Melanom oder Mycosis fungoides zusammen. Obwohl die dort präsentierten Ergebnisse zwar überwiegend auf Einzelfallberichte gestützt sind, zeigte jedoch insbesondere die Behandlung von Hautmetastasen bei Malignem Melanom erste ermutigende Ansätze. Neben dem festen Stellenwert bei ausgewählten (prä-)neoplastischen Hautläsionen existieren somit für Imiquimod zunehmend Argumente für zahlreiche weitere Anwendungsgebiete. Bei Vorliegen der Ergebnisse von derzeit laufenden klinischen Phase-III-Studien steht daher zu erwarten, dass sich das therapeutische Einsatzspektrum von Imiquimod in den nächsten Jahren noch erheblich erweitern wird.

### 4.3.2 Potentielle Anwendungsmöglichkeiten von Resiquimod oder anderen *Immune response modifiern*

#### 4.3.2.1 Systemische Wirksamkeit von Resiquimod

Trotz oder gerade wegen des großen klinischen Erfolges von Imiquimod existiert die Notwendigkeit zur Entwicklung weiterer artverwandter Substanzen. Als erster Vertreter der Imidazoquinolone hat es erst damit begonnen, seine Versprechen einzulösen. Eine Haupt-Anwendungsbeschränkung besteht jedoch in der topischer Applikationsform, weshalb sein Einsatz bisher für die Behandlung kutaner Malignome reserviert blieb. Resiquimod bietet dagegen als löslicheres Analogon den Vorteil der besseren systemischen Wirksamkeit. So scheint es eher geeignet, sein volles

immunmodulatorisches Potenzial ausschöpfen zu können. Dadurch könnte es künftig Bedeutung als Adjuvans bei der Impfung gegen schwache Immunogene, bei chronischen (Virus-)Infektionen sowie in immunkompromittierten Zielpersonen erlangen. Dabei rückt in klinischen Studien die Vakzinierung gegen definierte Tumorantigene zunehmend in den Fokus des Interesses, woraus die Notwendigkeit neuer, wirkungsvoller Adjuvantien resultiert. Resiquimod als extrem potentes T<sub>H</sub>1-Immunstimulans scheint hierfür *a priori* prädestiniert. Im murinen Kolonkarzinommodell bewirkt es eine Hemmung des Tumorwachstums. Wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert, liegt der Antitumorwirkung eine starke spezifische Lyse von Tumorzellen zugrunde. Neben der Induktion hocheffizienter tumorspezifischer CTL könnten daran noch andere Mechanismen wie zum Beispiel Antikörper-vermittelte Zytotoxizität beteiligt sein. Dies könnte von Vorteil sein für den klinischen Einsatz bei diversen Tumorerkrankungen, die kein MHC-I exprimieren und somit keinen Angriffspunkt für zytotoxische T-Zellen bieten.

#### 4.3.2.2 Einsatz von Resiquimod in klinischen Studien

Erste klinische Studien zu Sicherheit und Wirksamkeit konnten mittlerweile eine gute Verträglichkeit von R-848 belegen (Sauder, 2003). Allerdings wurde darin bisher nur die topische Wirksamkeit von Resiquimod gegenüber Warzen und genitalem Herpes berücksichtigt. Auf diesem Gebiet erwies sich Imiquimod als überlegen. Durch künftigen Einsatz als Adjuvans systemischer Vakzinierungen könnte Resiquimod jedoch an Bedeutung gewinnen. Zwei aktuelle klinische Studien widmen sich genau diesem Aspekt. In einer kanadischen Phase-I-Studie wird derzeit die Anwendung von R-848 im Rahmen der Impfprävention von Hepatitis B untersucht. Ziel ist die Optimierung der Impfantwort, gemessen an erhöhten Antikörpertitern sowie verstärkter T-Zell-Response 30 Tage nach Vakzinierung (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00175435). Parallel erfolgt in einer amerikanischen Pilotstudie die Testung von Resiquimod als Impfadjuvans bei Malignem Melanom. Dort soll die Wirksamkeit in Kombination mit NY-ESO-1b-Peptid-Vakzine als adjuvante Therapie bei chirurgisch vollständig entferntem Stadium II - IV Melanom untersucht werden (NCT00470379). Primäre Endpunkte sind dabei Anzahl und Schwere von hämatologischen wie nicht-hämatologischen Toxizitäten, inklusive Toxizitätsprofile aller Dosisstufen, sowie die immunologische Ansprechrate. Auf diese Weise sollen Sicherheit und Impfeffizienz der Vakzine bestimmt sowie erste deskriptive Daten zum Einfluss dieses Therapieregimes auf das krankheitsfreie Überleben gesammelt werden.



#### 4.3.2.3 Prinzipielle Erwägungen zum künftigen Einsatzspektrum von TLR7/8-Liganden

Ungeachtet der bisherigen Erprobung am Menschen erscheint das Potenzial von Resiquimod vielversprechend. Dabei gilt es unter anderem TLR8-vermittelte Effekte zu berücksichtigen, die aufgrund der fehlenden Funktionalität des Rezeptors im murinen System nicht untersucht werden können. Es existieren bereits fundierte Ergebnisse über positive Wirkungen am Menschen unter experimentellen Bedingungen (Gorden, 2005; Peng, 2005; Xu, 2006) mit starken Hinweisen auf deren physiologische Relevanz (Triantafilou, 2005; Levy, 2006).

Für eine sinnvolle Anwendung am Menschen stellt sich immer auch die Frage nach der Kombinierbarkeit mit anderen Behandlungsentitäten im Rahmen eines multimodalen Therapieansatzes. Neben neueren Biologicals wie Avastin und Cetuximab sind dies beim Kolonkarzinom 5-FU-, Irinotecan- und Oxaliplatin-basierte Chemotherapieregime. Tierexperimentell (Sidky, 1992; Ghiringhelli, 2004) wie an humanen Zellen *in vitro* (Shi, 2007) existieren dabei Anhaltspunkte für potentiell hochattraktive Synergieeffekte mit konventioneller Chemotherapie. Viele klinische Studien zur Kombination von Immun- und Chemotherapie betreffen dagegen bisher den technisch aufwendigen adoptiven Transfer von T-Zellen, überwiegend in Patientenkollektiven mit metastasiertem Melanom (Übersichtsartikel Muranski, 2006).

Parallel werden derzeit große Anstrengungen unternommen, selektivere Liganden mit spezifischerem Wirkungsprofil zu erzeugen, um Wirksamkeit und Verträglichkeit der *Immune response modifier* zu verbessern. Erste Erfolge dieser Strategie konnten tierexperimentell bereits beobachtet werden (Johnston, 2007).

#### 4.3.3 Chancen und Risiken der therapeutischen Beeinflussung des TLR-Systems

Mit dem zunehmend besseren Verständnis von der zentralen Bedeutung des *Toll-like* Rezeptor Systems erwuchs die Vorstellung, dessen Potenzial therapeutisch zu nutzen. Klinische Indikationen für TLR-Agonisten bestehen heute schon für ausgewählte (prä-) maligne sowie einzelne Viruserkrankungen. Weitere Anwendungsbereiche wie Hepatitis C oder HIV sind in Erprobung, darüber hinaus allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale, um dort den pathologisch fixierten T<sub>H</sub>2-Reaktionstyp in eine balancierte Immunantwort zu überführen. Außerdem werden mittlerweile gezielt Antagonisten TLR-vermittelter Signalübertragung erforscht. TLR4-Antagonisten zur Prävention von septischem Schock und Multiorganversagen befinden sich in klinischer Erprobung und auch die Blockade von TLR-Signalwegen im Rahmen diverser Autoimmunprozesse erscheint als lohnendes Ziel.

Die Manipulation von phylogenetisch hochkonservierten Prozessen birgt aber auch potentielle Gefahren. Theoretisch beinhaltet die Durchbrechung von immunologischer Toleranz das Risiko von Autoimmunkrankheiten. Zwar hat sich diese Befürchtung in der Realität bislang nicht erfüllt, ein Restrisiko verbleibt jedoch, zumal neuere Untersuchungen endogener RNA eine Rolle in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses zuschreiben konnten (Vollmer, 2005; Savarese, 2006). Abhängig von der Krankheitsentität kann artifizielle TLR-Stimulation zudem sehr unterschiedliche Auswirkungen haben. So führt wiederholte TLR7-Stimulation von CLL-Zellen zur verbesserten Wirksamkeit der Chemotherapie (Shi, 2007), wohingegen beim Multiplen Myelom eine Tumorzellproliferation ausgelöst wird (Bohnhorst, 2006). Obwohl es sich in beiden Fällen um klonale B-Zell-Erkrankungen handelt, resultiert ein gegenteiliger Effekt. Trotz großartiger Zukunftsaussichten stellt die Beeinflussung des TLR-Systems somit ein zweischneidiges Schwert dar (Übersichtsartikel Killeen, 2006). Gerade in der Onkologie scheint deshalb ein behutsamer Umgang geboten. Genauere Erkenntnisse über das exakte biologische Verhalten einzelner Tumorerkrankungen, insbesondere deren komplexe Interaktion mit dem Immunsystem, werden für die zukünftig erfolgreiche Anwendung erforderlich sein.

#### 4.3.4 Zukunftsperspektiven von RNA-Technologie

Ähnlich wie die Substanzklasse der synthetischen *Immune response modifier* besitzen bestimmte RNA-Sequenzen eine starke immunstimulatorische Wirkung. Erste tierexperimentelle Daten belegen dabei relevante antiinfektiöse und antineoplastische Effekte bei gleichzeitig sicherer Anwendungsform (Scheel, 2006; Hamm, 2007). Als zweites, ebenso bedeutendes Wirkprinzip von Einzelstrang-RNA sind kurze RNA-Fragmente, sogenannte *small interfering RNAs* (siRNAs), sequenzspezifisch zum selektiven Gen-Knockdown geeignet. Dabei handelt es sich um eine Form des posttranskriptionellen *gene silencing*, bei der transfizierte siRNA in Antisense-Manier die jeweilig passende mRNA bindet, deren Abbau fördert und somit die Translation in Protein verhindert. Dieses potentiell hochattraktive Verfahren kann anders als die im Moment noch mit vielen Risiken behaftete Gentherapie zudem als sehr sicher gelten. Denkbare Anwendungsgebiete sind zahlreich und umfassen beispielsweise chronische Infektionskrankheiten wie Hepatitis B und C, um dort die fortgesetzte Virusreplikation wirksam zu unterdrücken. Alles in allem bieten RNA-basierte Technologien Chancen für multiple Interventionsstrategien in der Zukunft. Insbesondere die klare funktionelle Trennung von Immunstimulation (isRNA) und Gen-Knockdown (siRNA) prädestiniert zu einer äußerst selektiven, zielgerichteten und gleichzeitig sicheren Anwendung.

## 5. Zusammenfassung

Mit Imiquimod (Aldara®) werden immunstimulatorisch wirkende *Toll-like* Rezeptor 7-Liganden bereits seit gut zehn Jahren für Indikationen wie HPV-Infektionen, aktinische Keratose und Basaliom erfolgreich in der Klinik eingesetzt. Für Resiquimod, dem potenteren und besser löslichen Analogon von Imiquimod, liegen bislang noch keine klinischen Untersuchungen vor. Doch gerade das, verglichen mit Imiquimod, 50- bis 100-fach wirksamere Resiquimod birgt ein hohes Potenzial für die Induktion systemischer Immunantworten gegen Tumoren. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher eine erste tierexperimentelle Untersuchung der Antitumorstärke des *Toll-like* Rezeptor 7/8-Liganden Resiquimod (R-848) im murinen C26 Kolonkarzinom Modell. Als Alternative zu den synthetischen Molekülen Imiquimod und Resiquimod wurde zudem einzelsträngige RNA (natürlicher *Toll-like* Rezeptor 7-Ligand) als grundlegend neue Möglichkeit der Immunstimulation via *Toll-like* Rezeptor 7 evaluiert.

Für Resiquimod konnte erstmals ein signifikanter Antitumoreffekt belegt werden, sowohl in Kombination mit einer dendritischen Zellvakzine als auch ohne. Dabei gelang eine Reduktion der mittleren Tumorgrößen um 65% bis Tag 18 gegenüber unbehandelten Kontrolltieren, in Einzelfällen sogar vorübergehend eine komplette Tumorrückbildung. Dafür war ein intensives Therapieregime mit wiederholten Nachinjektionen nach der ersten Applikation der Vakzine notwendig. Als Anhaltspunkt für den zugrunde liegenden Wirkmechanismus gelang der direkte *in vivo* - Nachweis einer antigenspezifischen Lyse von Tumorzellen. Eine wichtige Beobachtung für die fortgesetzte Anwendung von Resiquimod stellte eine ausgeprägte Toleranzentwicklung dar. Sie führte *in vivo* bereits nach 4 bis 6 Stunden zu einer stark verminderten Ansprechbarkeit für konsekutive Stimulationen über mindestens fünf Tage, gemessen an der fast aufgehobenen  $T_H1$ -Zytokinproduktion (Interleukin-12p70, Interleukin-6, Interferon- $\alpha$ ). *In vitro* ließ sich dieses Phänomen auf die geänderte Funktion myeloider DC zurückführen. Zusätzlich wurde als Ausdruck von Kreuztoleranz *in vitro* eine stark herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber diversen Liganden anderer *Toll-like* Rezeptoren registriert. Der natürliche *Toll-like* Rezeptor 7-Ligand Polyuridin wurde in Form eines Polyuridin-Polyarginin-Komplexes zur Immunisierung gegen Ovalbumin eingesetzt. Dabei konnte eine Verstärkung der humoralen Immunantwort (IgM, IgG2a) erzielt werden bei gleichzeitig zuverlässiger und sicherer Anwendungsform ohne klinische Anzeichen von Toxizität.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Mausmodell stützen eine klinische Untersuchung von Resiquimod als Adjuvans einer Tumorstoffimpfung. Zudem existieren experimentelle Daten, die bemerkenswerte Synergieeffekte zwischen konventioneller Chemotherapie und synthetischen *Toll-like* Rezeptor 7-Liganden demonstrieren. Die Entwicklung noch selektiverer Substanzen weckt darüber hinaus Hoffnungen, spezifischere Wirkungen erzielen und gleichzeitig verbliebene Probleme wie Tachyphylaxie oder erhöhte Toxizität überwinden zu können. Keine Anzeichen für Toxizität konnten in der vorliegenden Arbeit für den natürlichen Liganden Einzelstrang-RNA festgestellt werden. Erste tierexperimentelle Daten für RNA als Impfstoffadjuvans sind darüber hinaus vielversprechend und belegen relevante antiinfektiöse sowie antineoplastische Effekte. Die klare funktionelle Trennung von Immunstimulation (isRNA = immunstimulatorische RNA über *Toll-like* Rezeptor 7-Aktivierung) und Gen-Knockdown (siRNA = *small interfering* RNA), zweier isolierter Wirkprinzipien, prädestiniert dabei zu einer zielgerichteten und gleichzeitig sicheren Anwendung.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahonen, C. L.**, S. J. Gibson, R. M. Smith, L. K. Pederson, J. M. Lindh, M. A. Tomai and J. P. Vasilakos. Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. *Cell Immunol* 1999; 197:62-72
- Akira, S. and H. Hemmi.** Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85:85-95
- Alexopoulou, L.**, A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-8
- Altman, J. D.**, P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael and M. M. Davis. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274:94-6
- Banchereau, J.**, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811
- Barton, G. M. and R. Medzhitov.** Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:380-3
- Beeson, P. B.** Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development. *J Exp Med* 1947; 86:29
- Bernstein, D. I.**, C. J. Harrison, E. R. Tepe, A. Shahwan and R. L. Miller. Effect of imiquimod as an adjuvant for immunotherapy of genital HSV in guinea-pigs. *Vaccine* 1995; 13:72-6
- Bernstein, D. I.**, R. L. Miller and C. J. Harrison. Adjuvant effects of imiquimod on a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in guinea pigs. *J Infect Dis* 1993; 167:731-5
- Beutler, B.**, I. W. Milsark and A. C. Cerami. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; 229:869-71
- Billiau, A.** Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 1996; 62:61-130
- Bishop, G. A.**, L. M. Ramirez, M. Baccam, L. K. Busch, L. K. Pederson and M. A. Tomai. The immune response modifier resiquimod mimics CD40-induced B cell activation. *Cell Immunol* 2001; 208:9-17

- Bohnhorst, J.**, T. Rasmussen, S. H. Moen, M. Flottum, L. Knudsen, M. Borset, T. Espevik and A. Sundan. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2006; 20:1138-44
- Bourquin, C.**, L. Schmidt, V. Hornung, C. Wurzenberger, D. Anz, N. Sandholzer, S. Schreiber, A. Voelkl, G. Hartmann and S. Endres. Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response. *Blood* 2007; 109:2953-60
- Brint, E. K.**, D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A. N. McKenzie, L. A. O'Neill and F. Y. Liew. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004; 5:373-9
- Brugnolo, F.**, S. Sampognaro, F. Liotta, L. Cosmi, F. Annunziato, C. Manuelli, P. Campi, E. Maggi, S. Romagnani and P. Parronchi. The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4+ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:380-8
- Brunner, C.**, J. Seiderer, A. Schlamp, M. Bidlingmaier, A. Eigler, W. Haimerl, H. A. Lehr, A. M. Krieg, G. Hartmann and S. Endres. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 2000; 165:6278-86
- Burns, K.**, S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert and J. Tschopp. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 2003; 197:263-8
- Casares, N.**, L. Arribillaga, P. Sarobe, J. Dotor, A. Lopez-Diaz de Cerio, I. Melero, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta and J. J. Lasarte. CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol* 2003; 171:5931-9
- Coley, W. B.** Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and bacillus prodigious with a report of 160 cases. *Johns Hopkins Hosp. Bull.* 1896; 7:157-162
- Danner, R. L.**, R. J. Elin, J. M. Hosseini, R. A. Wesley, J. M. Reilly and J. E. Parillo. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991; 99:169-75
- Diebold, S. S.**, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira and C. Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303:1529-31
- Edwards, A. D.**, S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira and C. Reis e Sousa. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of

- TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 2003; 33:827-33
- Ehrlich, P.** On immunity with special reference to cell life: Croonian lecture. *The Collected Papers of Paul Ehrlich, Vol. II: Immunology and Cancer Research* 1956:148-192
- Elkins, K. L.,** T. R. Rhinehart-Jones, S. Stibitz, J. S. Conover and D. M. Klinman. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 1999; 162:2291-8
- Fong, L. and E. G. Engleman.** Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:245-73
- Garland, S. M.** Imiquimod. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:85-9
- Ghiringhelli, F.,** N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido, B. Chauffert, E. Solary, B. Bonnotte and F. Martin. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004; 34:336-44
- Gorden, K. B.,** K. S. Gorski, S. J. Gibson, R. M. Kedl, W. C. Kieper, X. Qiu, M. A. Tomai, S. S. Alkan and J. P. Vasilakos. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 2005; 174:1259-68
- Granowitz, E. V.,** R. Porat, J. W. Mier, S. F. Orencole, G. Kaplanski, E. A. Lynch, K. Ye, E. Vannier, S. M. Wolff and C. A. Dinarello. Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. *J Immunol* 1993; 151:1637-45
- Greisman, S. E.,** E. J. Young and W. E. Woodward. Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *J Exp Med* 1966; 124:983-1000
- Hamm, S.,** A. Heit, M. Koffler, K. M. Huster, S. Akira, D. H. Busch, H. Wagner and S. Bauer. Immunostimulatory RNA is a potent inducer of antigen-specific cytotoxic and humoral immune response in vivo. *Int Immunol* 2007; 19:297-304
- Harrison, C. J.,** L. Jenski, T. Voychegovski and D. I. Bernstein. Modification of immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection. *Antiviral Res* 1988; 10:209-23
- Harrison, C. J.,** R. L. Miller and D. I. Bernstein. Posttherapy suppression of genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and enhancement of HSV-specific T-cell memory by imiquimod in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2059-64
- Hashimoto, C.,** K. L. Hudson and K. V. Anderson. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269-79

- Hatao, F.**, M. Muroi, N. Hiki, T. Ogawa, Y. Mimura, M. Kaminishi and K. Tanamoto. Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. *J Leukoc Biol* 2004; 76:904-8
- Hayashi, F.**, K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-103
- Heckelsmiller, K.**, S. Beck, K. Rall, B. Sipos, A. Schlamp, E. Tuma, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002a; 32:3235-45
- Heckelsmiller, K.**, K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 2002b; 169:3892-9
- Heil, F.**, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-9
- Hemmi, H.**, T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200
- Hemmi, H.**, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5
- Hornung, V.**, J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres and G. Hartmann. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314:994-7
- Hornung, V.**, M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres and G. Hartmann. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11:263-70
- Hornung, V.**, S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-7
- Hoshino, K.**, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to



lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-52

**Huang, A. Y.**, P. H. Gulden, A. S. Woods, M. C. Thomas, C. D. Tong, W. Wang, V. H. Engelhard, G. Pasternack, R. Cotter, D. Hunt, D. M. Pardoll and E. M. Jaffee. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:9730-5

**Ito, T.**, R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira and S. Fukuhara. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002; 195:1507-12

**Jacinto, R.**, T. Hartung, C. McCall and L. Li. Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced tolerance and cross-tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* 2002; 168:6136-41

**Janeway, C. A.**, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; 13:11-6

**Jiang, W.**, R. Sun, H. Wei and Z. Tian. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:17077-82

**Johnston, D.**, B. Zaidi and J. C. Bystry. TLR7 imidazoquinoline ligand 3M-019 is a potent adjuvant for pure protein prototype vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56:1133-41

**Jones, T.** Resiquimod 3M. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4:214-8

Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford and S. Bauer. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3:499

**Kanneganti, T. D.**, N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira and G. Nunez. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006; 440:233-6

**Kato, H.**, O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441:101-5

**Killeen, S. D.**, J. H. Wang, E. J. Andrews and H. P. Redmond. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *Br J Cancer* 2006; 95:247-52

- Kinjo, I.**, T. Hanada, K. Inagaki-Ohara, H. Mori, D. Aki, M. Ohishi, H. Yoshida, M. Kubo and A. Yoshimura. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* 2002; 17:583-91
- Klinman, D. M.**, A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover and A. M. Krieg. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2879-83
- Kobayashi, K.**, L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov and R. A. Flavell. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110:191-202
- Kobayashi, M.**, L. Fitz, M. Ryan, R. M. Hewick, S. C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia and G. Trinchieri. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170:827-45
- Köhler, G. and C. Milstein.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7
- Krieg, A. M.**, L. Love-Homan, A. K. Yi and J. T. Harty. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 1998; 161:2428-34
- Krieg, A. M.**, A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-9
- Krug, A.**, A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31:3026-37
- Ku, C. L.**, H. von Bernuth, C. Picard, S. Y. Zhang, H. H. Chang, K. Yang, M. Chrabieh, A. C. Issekutz, C. K. Cunningham, J. Gallin, S. M. Holland, C. Roifman, S. Ehl, J. Smart, M. Tang, F. J. Barrat, O. Levy, D. McDonald, N. K. Day-Good, R. Miller, H. Takada, T. Hara, S. Al-Hajjar, A. Al-Ghonaïum, D. Speert, D. Sanlaville, X. Li, F. Geissmann, E. Vivier, L. Marodi, B. Z. Garty, H. Chapel, C. Rodriguez-Gallego, X. Bossuyt, L. Abel, A. Puel and J. L. Casanova. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007; 204:2407-22
- Kurt-Jones, E. A.**, L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson and R. W. Finberg. Pattern

recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.

*Nat Immunol* 2000; 1:398-401

**Labeur, M. S.**, B. Roters, B. Pers, A. Mehling, T. A. Luger, T. Schwarz and S. Grabbe.

Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999; 162:168-75

**Le Bon, A.**, G. Schiavoni, G. D'Agostino, I. Gresser, F. Belardelli and D. F. Tough.

Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14:461-70

**Learn, C. A.**, M. S. Boger, L. Li and C. E. McCall. The phosphatidylinositol 3-kinase

pathway selectively controls sIL-1RA not interleukin-1 $\beta$  production in the septic leukocytes. *J Biol Chem* 2001; 276:20234-9

**Lee, J.**, T. H. Chuang, V. Redecke, L. She, P. M. Pitha, D. A. Carson, E. Raz and H. B.

Cottam. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:6646-51

**Lehner, M. D.**, S. Morath, K. S. Michelsen, R. R. Schumann and T. Hartung. Induction

of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001; 166:5161-7

**Lemaitre, B.**, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann. The

dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-83

**Levy, O.**, E. E. Suter, R. L. Miller and M. R. Wessels. Unique efficacy of Toll-like

receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells. *Blood* 2006; 108:1284-90

**Li, L.**, S. Cousart, J. Hu and C. E. McCall. Characterization of interleukin-1 receptor-

associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem* 2000; 275:23340-5

**Lingnau, K.**, A. Egyed, C. Schellack, F. Mattner, M. Buschle and W. Schmidt. Poly-L-

arginine synergizes with oligodeoxynucleotides containing CpG-motifs (CpG-ODN) for enhanced and prolonged immune responses and prevents the CpG-ODN-induced systemic release of pro-inflammatory cytokines. *Vaccine* 2002; 20:3498-508

**Liu, Y. J.**, H. Kanzler, V. Soumelis and M. Gilliet. Dendritic cell lineage, plasticity and

cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; 2:585-9

**Marrack, P.**, J. Kappler and T. Mitchell. Type I interferons keep activated T cells alive.

*J Exp Med* 1999; 189:521-30

**Marshak-Rothstein, A.** Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev*

*Immunol* 2006; 6:823-35

- Medvedev, A. E.**, P. Henneke, A. Schromm, E. Lien, R. Ingalls, M. J. Fenton, D. T. Golenbock and S. N. Vogel. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* 2001; 167:2257-67
- Medvedev, A. E.**, K. M. Kopydlowski and S. N. Vogel. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000; 164:5564-74
- Medvedev, A. E.**, W. Piao, J. Shoenfelt, S. H. Rhee, H. Chen, S. Basu, L. M. Wahl, M. J. Fenton and S. N. Vogel. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2007; 282:16042-53
- Medzhitov, R.**, P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7
- Mizel, S. B. and J. A. Snipes.** Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. *J Biol Chem* 2002; 277:22414-20
- Morales, A.**, D. Eidinger and A. W. Bruce. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; 116:180-3
- Munoz, C.**, J. Carlet, C. Fitting, B. Misset, J. P. Bleriot and J. M. Cavillon. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991; 88:1747-54
- Muranski, P.**, A. Boni, C. Wrzesinski, D. E. Citrin, S. A. Rosenberg, R. Childs and N. P. Restifo. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3:668-81
- Nakagawa, R.**, T. Naka, H. Tsutsui, M. Fujimoto, A. Kimura, T. Abe, E. Seki, S. Sato, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, K. Yamanishi, I. Kawase, K. Nakanishi and T. Kishimoto. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 2002; 17:677-87
- Navi, D. and A. Huntley.** Imiquimod 5 percent cream and the treatment of cutaneous malignancy. *Dermatol Online J* 2004; 10:4
- Noguchi, H.**, M. Matsushita, T. Okitsu, A. Moriwaki, K. Tomizawa, S. Kang, S. T. Li, N. Kobayashi, S. Matsumoto, K. Tanaka, N. Tanaka and H. Matsui. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 2004; 10:305-9
- Nomura, F.**, S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda and S. Akira. Cutting edge: endotoxin tolerance in

mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164:3476-9

**Nomura, N.**, N. Miyajima, T. Sazuka, A. Tanaka, Y. Kawarabayasi, S. Sato, T. Nagase, N. Seki, K. Ishikawa and S. Tabata. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res* 1994; 1:27-35

**Oberholzer, A.**, C. Oberholzer, K. S. Bahjat, R. Ungaro, C. L. Tannahill, M. Murday, F. R. Bahjat, Z. Abouhamze, V. Tsai, D. LaFace, B. Hutchins, L. L. Moldawer and M. J. Clare-Salzler. Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168:3412-8

**Ortaldo, J. R.**, A. Mantovani, D. Hobbs, M. Rubinstein, S. Pestka and R. B. Herberman. Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 1983; 31:285-9

**Ozinsky, A.**, D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-71

**Pasare, C. and R. Medzhitov.** Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299:1033-6

**Peiser, L.**, S. Mukhopadhyay and S. Gordon. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:123-8

**Peng, G.**, Z. Guo, Y. Kiniwa, K. S. Voo, W. Peng, T. Fu, D. Y. Wang, Y. Li, H. Y. Wang and R. F. Wang. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005; 309:1380-4

**Pichlmair, A.**, O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber and C. Reis e Sousa. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314:997-1001

**Poltorak, A.**, X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-8

**Qureshi, S. T.**, L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros and D. Malo. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999; 189:615-25

**Rietschel, E. T. and H. Brade.** Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992; 267:54-61

- Rudolph, C.**, C. Plank, J. Lausier, U. Schillinger, R. H. Muller and J. Rosenecker. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J Biol Chem* 2003; 278:11411-8
- Salio, M.**, M. J. Palmowski, A. Atzberger, I. F. Hermans and V. Cerundolo. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 2004; 199:567-79
- Sato, S.**, F. Nomura, T. Kawai, O. Takeuchi, P. F. Muhlradt, K. Takeda and S. Akira. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000; 165:7096-101
- Sato, S.**, O. Takeuchi, T. Fujita, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int Immunol* 2002; 14:783-91
- Sauder, D. N.**, M. H. Smith, T. Senta-McMillian, I. Soria and T. C. Meng. Randomized, single-blind, placebo-controlled study of topical application of the immune response modulator resiquimod in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3846-52
- Savarese, E.**, O. W. Chae, S. Trowitzsch, G. Weber, B. Kastner, S. Akira, H. Wagner, R. M. Schmid, S. Bauer and A. Krug. U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* 2006; 107:3229-34
- Scheel, B.**, S. Aulwurm, J. Probst, L. Stitz, I. Hoerr, H. G. Rammensee, M. Weller and S. Pascolo. Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA. *Eur J Immunol* 2006; 36:2807-16
- Schön, M. P.**, B. G. Wienrich, C. Drewniok, A. B. Bong, J. Eberle, C. C. Geilen, H. Gollnick and M. Schon. Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Invest Dermatol* 2004; 122:1266-76
- Shi, Y.**, D. White, L. He, R. L. Miller and D. E. Spaner. Toll-like receptor-7 tolerizes malignant B cells and enhances killing by cytotoxic agents. *Cancer Res* 2007; 67:1823-31
- Shimizu, J.**, S. Yamazaki and S. Sakaguchi. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163:5211-8
- Shortman, K. and W. R. Heath.** Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; 2:988-9

- Sidky, Y. A.**, E. C. Borden, C. E. Weeks, M. J. Reiter, J. F. Hatcher and G. T. Bryan. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. *Cancer Res* 1992; 52:3528-33
- Slade, H. B.**, M. L. Owens, M. A. Tomai and R. L. Miller. Imiquimod 5% cream (Aldara). *Expert Opin Investig Drugs* 1998; 7:437-49
- Snijders, A.**, C. M. Hilkens, T. C. van der Pouw Kraan, M. Engel, L. A. Aarden and M. L. Kapsenberg. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J Immunol* 1996; 156:1207-12
- Sweet, M. J.**, B. P. Leung, D. Kang, M. Sogaard, K. Schulz, V. Trajkovic, C. C. Campbell, D. Xu and F. Y. Liew. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2001; 166:6633-9
- Taguchi, T.**, J. L. Mitcham, S. K. Dower, J. E. Sims and J. R. Testa. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996; 32:486-8
- Takeuchi, O.**, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-51
- Takeuchi, O.**, A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Muhlradt and S. Akira. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000; 164:554-7
- Till, S. J.**, J. N. Francis, K. Nouri-Aria and S. R. Durham. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1025-34; quiz 1035
- Tokunaga, T.**, H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo and et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:955-62
- Tokunaga, T.**, S. Yamamoto and K. Namba. A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79:682-6
- Tomai, M. A.**, S. J. Gibson, L. M. Imbertson, R. L. Miller, P. E. Myhre, M. J. Reiter, T. L. Wagner, C. B. Tamulinas, J. M. Beaurline, J. F. Gerster and et al. Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Res* 1995; 28:253-64

- Tomai, M. A.**, L. M. Imbertson, T. L. Stanczak, L. T. Tygrett and T. J. Waldschmidt. The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cell Immunol* 2000; 203:55-65
- Triantafilou, K.**, G. Orthopoulos, E. Vakakis, M. A. Ahmed, D. T. Golenbock, P. M. Lepper and M. Triantafilou. Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol* 2005; 7:1117-26
- Underhill, D. M.**, A. Ozinsky, K. D. Smith and A. Aderem. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14459-63
- Vasilakos, J. P.**, R. M. Smith, S. J. Gibson, J. M. Lindh, L. K. Pederson, M. J. Reiter, M. H. Smith and M. A. Tomai. Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN. *Cell Immunol* 2000; 204:64-74
- Vollmer, J.**, S. Tluk, C. Schmitz, S. Hamm, M. Jurk, A. Forsbach, S. Akira, K. M. Kelly, W. H. Reeves, S. Bauer and A. M. Krieg. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 2005; 202:1575-85
- Wagner, T. L.**, C. L. Ahonen, A. M. Couture, S. J. Gibson, R. L. Miller, R. M. Smith, M. J. Reiter, J. P. Vasilakos and M. A. Tomai. Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. *Cell Immunol* 1999; 191:10-9
- Weeratna, R. D.**, S. R. Makinen, M. J. McCluskie and H. L. Davis. TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine* 2005; 23:5263-70
- Weiner, G. J.** The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* 2000; 68:455-63
- Wille-Reece, U.**, B. J. Flynn, K. Lore, R. A. Koup, R. M. Kedl, J. J. Mattapallil, W. R. Weiss, M. Roederer and R. A. Seder. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:15190-4
- Williams, M. J.**, A. Rodriguez, D. A. Kimbrell and E. D. Eldon. The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *Embo J* 1997; 16:6120-30
- Xu, S.**, U. Koldovsky, M. Xu, D. Wang, E. Fitzpatrick, G. Son, G. Koski and B. J. Czerniecki. High-avidity antitumor T-cell generation by toll receptor 8-primed, myeloid-derived dendritic cells is mediated by IL-12 production. *Surgery* 2006; 140:170-8



- Yamamoto, S.**, T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano and T. Tokunaga. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 1992a; 148:4072-6
- Yamamoto, S.**, T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka and T. Tokunaga. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992b; 36:983-97
- Yamano, S.**, D. E. Scott, L. Y. Huang, M. Mikolajczyk, S. R. Pillemer, J. A. Chiorini, B. Golding and B. J. Baum. Protection from experimental endotoxemia by a recombinant adeno-associated virus encoding interleukin 10. *J Gene Med* 2001; 3:450-7
- Yang, Y.**, C. T. Huang, X. Huang and D. M. Pardoll. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol* 2004; 5:508-15
- Yarovinsky, F.**, D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh and A. Sher. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308:1626-9
- Yeo, S. J.**, J. G. Yoon, S. C. Hong and A. K. Yi. CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression. *J Immunol* 2003; 170:1052-61
- Yi, A. K.**, R. Tuetken, T. Redford, M. Waldschmidt, J. Kirsch and A. M. Krieg. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998; 160:4755-61
- Yoneyama, M.**, M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5:730-7
- Zhang, D.**, G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell and S. Ghosh. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303:1522-6
- Zhang, X.**, S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough and J. Sprent. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8:591-9
- Zimmermann, S.**, O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner and K. Heeg. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160:3627-30

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

3pRNA	5'-Triphosphat RNA
Ag	Antigen
APC	Allophycocyanin
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BMDC	<i>Bone-marrow-derived</i> dendritic cells
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum-Albumin
CFA	Komplettes Freund's Adjuvans
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CG	Cytosin-Guanin
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
d	Tag(e)
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
ED	Einzeldosis
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
5-FU	5-Fluorouracil
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
IFA	Inkomplettes Freund's Adjuvans

---

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	<i>Interferon-<math>\gamma</math> inducible protein 10</i>
IRAK 1/4	IL-1R-assoziierte Kinase 1/4
isRNA	Immunstimulatorische RNA
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAL = TIRAP (s.u.)	<i>MyD88 adaptor-like</i>
MALP-2	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
ODN	Oligodesoxynukleotid
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
Pentamere	Pentamere MHC-I-Komplexe
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PFA	Paraformaldehyd
pG	Polyguanosin
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
pl:C	Polyinosin-Polyguanosin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

pR	Polyarginin
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
pU	Polyuridin
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SIGIRR	<i>Single immunoglobulin IL-1-receptor-related molecule</i>
SOCS-1	<i>Suppressor of cytokine signalling 1</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub>	T-Helfer
TIR	Toll/ IL-1R-Domäne
TIRAP = Mal (s.o.)	<i>TIR domain containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
TOLLIP	<i>Toll-interacting protein</i>
TRAF 6	TNFR-assoziiertes Faktor 6
TRAILR	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i>

## 8. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die persönliche und herzliche Aufnahme in die hervorragende Atmosphäre der Klinischen Pharmakologie. Insbesondere möchte ich mich für die außerordentliche Unterstützung bei der Aufnahme in das Förderprogramm des Graduiertenkollegs „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ und die Möglichkeit zum Besuch des internationalen Immunologen-Kongresses 2006 in Paris bedanken.

Für die kontinuierlich enge Betreuung und die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meiner Betreuerin Dr. Dr. Carole Bourquin ausdrücklich danken. Meinen besonderen Dank möchte ich ferner Dr. Veit Hornung für zahlreiche gedankliche Anstöße und wertvolle praktische Hilfestellung aussprechen.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank den Mitdoktoranden Susanne Schreiber, Dipl.-Mol.-Med. Cornelia Wurzenberger und Philip von der Borch sowie den Medizinisch-technischen Assistentinnen Nadja Sandholzer und Susanne Wenk für die freundschaftliche Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.

## 9. Veröffentlichungen

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

1. Bourquin C, Schmidt L, Hornung V, Wurzenberger C, Anz D, Sandholzer N, Schreiber S, **Voelkl A**, Hartmann G, Endres S.  
Immunostimulatory RNA oligonucleotides can trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response.  
*Blood* 2007; 109:2953-60.

Manuskript in Vorbereitung:

R-848 induces *in vivo* tachyphylaxis through dendritic cells.

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

1. Bourquin C, **Voelkl A**, Endres S.  
R-848 (resiquimod) inhibits growth of established murine tumors in the C26 colon carcinoma model.  
*Expertenworkshop 2 "Inflammation" 2005*  
*Murnau am Staffelsee, Deutschland*
  
2. **Voelkl A**, Endres S, Bourquin C.  
R-848 (Resiquimod) slows tumor progression of established murine tumors in the C26 colon carcinoma model.  
*1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology 2006*  
*Paris, Frankreich*
  
3. Bourquin C, **Voelkl A**, Endres S.  
TLR7 ligands for tumor therapy.  
*Toll-like Receptor-based Drug Development 2006*  
*Bonn, Deutschland*
  
4. Endres S, Schmidt L, Hornung V, Wurzenberger C, Anz D, Sandholzer N, Schreiber S, **Voelkl A**, Hartmann G and Bourquin C.  
Inducing T cell and B cell responses with immunostimulatory RNA.  
*7. Weltkongress „Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – TSIS 2007“*  
*Klinikum Großhadern, LMU München, Deutschland*

## 10. Lebenslauf

### Andreas Franz-Xaver Völkl

---

geboren am 22. Februar 1980 in München  
als Sohn von Irmtraud Völkl und Dr. med. Siegfried Völkl

### Schulbildung

---

1986 – 1990	St.-Anna-Grundschule München
1990 – 1999	Luitpold-Gymnasium München (math.-nat.) Juni 1999 Abitur (Note 1,0)

### Zivildienst

---

09/1999 – 10/2000	Abteilung für Kardiologie Städtisches Krankenhaus München-Schwabing
-------------------	--

### Studium

---

WS 2000/01–SS 2007	Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München 09/02 Physikum (Note 2,0) 08/03 1. Staatsexamen (Note 2) 08/05 2. Staatsexamen (Note 1,0)
04/2006 – 03/2007	Praktisches Jahr: I. Tertial: Neurologie Krankenhaus München-Harlaching II. Tertial: Chirurgie Maria-Theresia-Klinik München III. Tertial: Innere Medizin Medizinische Klinik und Poliklinik II/III Großhadern Klinikum der Universität München Ludwig-Maximilians-Universität München 05/07 3. Staatsexamen (Note 1) Abschluss 05/07 (Gesamtnote 1,16)
Approbation:	06/07 durch Regierung von Oberbayern

### Promotion

---

seit 03/2004	Abteilung für Klinische Pharmakologie Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität Thema: <i>Immuntherapie von Tumoren: Wirkung von Resiquimod (R-848) als Adjuvans einer dendritischen Zellvakzine im C26 Kolonkarzinom Tumormodell</i>
--------------	---

### Stipendium

---

11/2005 – 03/2006	Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ Ludwig-Maximilians-Universität München Förderungsprogramm der Deutschen Forschungsgemeinschaft
-------------------	--