

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Klinikum der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

CpG-Oligonukleotid-basierte Immuntherapie von experimentellen Kolontumoren:
Synergistischer Effekt von Dendritischen Zellen und CpG-Oligonukleotiden

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

vorgelegt von
Klaus Heckelsmiller
aus Legau
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Endres
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Brocker Prof. Dr. Andreas Wagner
Mitbetreuer durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Gunther Hartmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN)	1
1.1.1	CpG-ODN als Gefahrensignal	1
1.1.2	Gezielte Modulation des Immunsystems	4
1.1.3	TLR9 als Rezeptor für bakterielle DNA	4
1.2	Dendritische Zellen	6
1.3	Therapien bei Kolontumoren	9
1.4	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Mäuse und Haltungsbedingungen	12
2.2	Zellkulturmedien und Zelllinien	12
2.2.1	Kulturmedien	12
2.2.2	Tumorzelllinien	13
2.2.3	Zelllinien zur Produktion von mGM-CSF	13
2.3	Tumormodell	14
2.4	Therapeutische Ansätze	16
2.4.1	Oligonukleotide	16
2.4.2	Dendritische Zellen	17
2.4.3	Weitere therapeutische Instrumente	19

2.5	<i>Ex vivo</i> Evaluierung der Immunantwort	20
2.5.1	Leukozytenisolation	20
2.5.2	FACS-Analyse von Oberflächenantigenen	21
2.5.3	Analyse der lytischen Aktivität	22
2.5.4	Serum IFN- γ -Bestimmung	23
2.5.5.1	Gewebepräparation und histologische Untersuchung	23
2.5.5.2	Immunhistologie	24
2.6	<i>In vivo</i> Evaluierung der Immunantwort	25
2.6.1	Zelltransfer	25
2.6.2	Zelldepletion	25
2.7	Statistik	25
3	Ergebnisse	26
3.1	CpG-ODN als Monotherapie	26
3.1.1	Abhängigkeit des Therapieerfolges vom Injektionsort	26
3.1.2	Verminderung einer Immunantwort durch IL-2	29
3.1.3	Intrazelluläres CpG-ODN in Tumorzellen	33
3.1.4	Induktion einer systemischen Immunantwort	33
3.1.4.1	Regression peripherer Tumoren	33
3.1.4.2	Induktion einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort	37
3.1.5	Aktivierung der angeborenen Immunantwort	40
3.1.5.1	Tumorunspezifische Effekte bei der Tumorregression	40
3.1.5.2	Einfluss von CpG-ODN auf den Plasmaspiegel von IFN- γ und die Expression von ICAM-1 und CD16/CD32 auf hämatopoetischen Zellen	41

3.2	Kombinierte Therapie von CpG-ODN und dendritischen Zellen	45
3.2.1	Verstärkung einer auf dendritischen Zellen basierenden Tumorthherapie durch Koinjektion von CpG-ODN	45
3.2.2	Verbesserung der Kombinationstherapie durch lokal appliziertes CpG-ODN	48
3.2.3	Erfordernis eines Tumorantigens	48
3.2.4	Abhängigkeit der Immunantwort von CD8-positiven Zellen und "effizient" ausgereiften dendritischen Zellen	51
3.2.5	Häufigkeit von T-Zellen und DEC205-positiven Zellen im Tumor und Tumorrandbereich	53
4	Diskussion	56
4.1	Monotherapie mit CpG-ODN	56
4.1.1	Einfluss des Injektionsortes auf den Behandlungserfolg	56
4.1.2	Induktion der angeborenen und adaptiven Immunantwort	58
4.2	Kombination von CpG-ODN und dendritischen Zellen	63
4.2.1	Verbesserung der therapeutischen Wirkung einer Therapie mit dendritischen Zellen durch CpG-ODN	63
4.2.2	Abhängigkeit des Therapieerfolges von der Ausreifung der dendritischen Zellen	66
4.3	Grenzen und Möglichkeiten der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Experimenten mit einem experimentellen, murinen, schnell wachsenden Tumor auf die klinische Anwendung	69
4.3.1	Entstehungsgeschwindigkeit von Tumoren	69
4.3.2	Unterschiede in der Aktivierbarkeit dendritischer Zellen	70
4.3.3	CpG-ODN, dendritische Zellen und Autoimmunität	71

5	Ausblick	75
6	Zusammenfassung	76
7	Literatur	78

Verzeichnung der verwendeten Abkürzungen

Danksagung

Veröffentlichungen

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN)

1.1.1 CpG-ODN als Gefahrensignal

Die DNA ist der Informationsspeicher für die Proteinsynthese aller Lebewesen. Während Cytidin-Guanosin (CG)-Dinukleotide in bakterieller und viraler DNA in der erwarteten Häufigkeit von 1 zu 16 auftreten, ist bei Vertebraten das Auftreten von CG-Dinukleotiden, mit nur 1 zu 60 CG-Dinukleotiden, stark supprimiert. In der vertebralen DNA sind die Cytidine in CG-Dinukleotiden meist methyliert und es treten bei nichtmethylierten CG-Dinukleotiden andere flankierende Basen als bei bakterieller DNA auf. Anhand dieser Unterscheidbarkeit zwischen Vertebraten- und Prokaryonten-DNA hat das vertebrale Immunsystem die Möglichkeit, prokaryontische DNA, sowie synthetisch hergestellte Oligonukleotide (ODN), die unmethylierte CpG (Cytidin-Phosphat-Guanosin)-Dinukleotide enthalten, als fremd und somit als mögliche Gefahr zu erkennen. Die Erkennung bakterieller DNA durch spezifische Rezeptoren ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Abb. 1, umgewandelt nach S. Rothenfusser¹).

Für die Therapie von Tumoren ist es erforderlich, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Ein viel versprechender Ansatz hierfür ist die Immuntherapie, die bereits in klinischen Studien durchgeführt wird. Synthetisch hergestellte CpG-ODN werden vom Immunsystem als fremd erkannt und dienen antigenpräsentierenden Zellen (APC) als Gefahrensignal². CpG-ODN kann somit als neuartiges Adjuvans in der Tumorforschung eingesetzt werden.

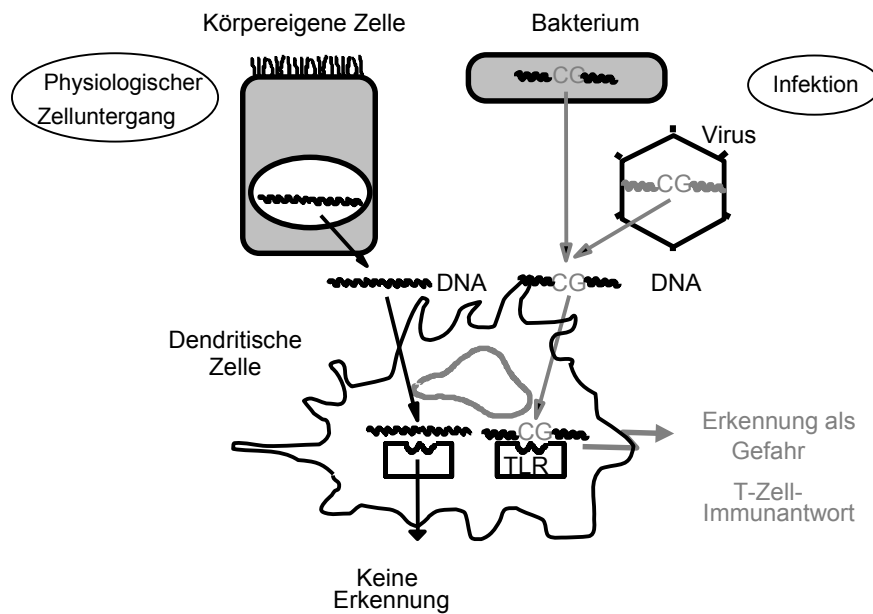


Abb. 1 Die Erkennung von CpG-DNA erfolgt durch dendritische Zellen (DC) (dargestellt) oder B-Zellen. Die in der DNA von Bakterien und Viren enthaltenen CpG-Motive werden als molekulares Muster für mikrobielle Erreger durch einen pathogene Strukturen erkennenden Rezeptor (TLR9 s. 1.2.3) erkannt und setzen DC in eine Art Alarmzustand. Aktivierte DC leiten eine T-Zell- und NK-Zell-vermittelte Antwort zur Abwehr von Pathogenen ein.

Den Grundstein für die therapeutische Nutzung von CpG-ODN legte bereits im Jahre 1893 der Chirurg William Coley, indem er die antitumorale Wirkung von Lysaten aus den Bakterien *Streptokokkus* und *Serratia* an primär nicht operablen Sarkomen mit Erfolg demonstrierte^{3, 4}. Seither sind unterschiedliche Strategien entwickelt worden, um die Gegenwart einer mikrobiellen Infektion nachzuahmen und so durch eine Stimulation des Immunsystems eine effektive, gegen den jeweiligen Tumor gerichtete Immunantwort zu erzielen. Allerdings setzte bislang die den mikrobiellen Substanzen zugrunde liegende Toxizität, vor allem die Toxizität von Zellwandbestandteilen, enge Grenzen für eine klinische Anwendung.

Erst annähernd 100 Jahre nach den Studien von Coley stellte Tokunaga 1984 bei bakterieller DNA aus Lysaten von Tuberkelbakterien (BCG, *Bacillus*

Calmette-Guérin) eine hohe antitumorale Wirkung bei Untersuchungen an Mäusen und Meerschweinchen fest ⁵. Yamamoto konnte 1992 den Nachweis erbringen, dass lediglich bakterielle DNA, nicht aber DNA von Wirbeltieren, eine immunstimulatorische Wirkung aufwies ⁶.

Schließlich entdeckte Krieg 1994, dass bereits synthetische Oligonukleotide, die unmethylierte CpG-Dinukleotide enthalten, murine B-Zellen zur Proliferation und sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* zur Sekretion von Immunglobulinen anregen. Die optimale B-Zell-Aktivierung wurde mit einem speziellen CpG-Motiv, bei dem unmethylierte CpG-Dinukleotide von zwei 5' Purinen und zwei 3' Pyrimidinen flankiert wurde, erreicht ².

Für die klinische Anwendung war es entscheidend, synthetische Oligonukleotide zu entwickeln, die nicht nur die immunstimulierende Wirkung von natürlichen CpG-Oligonukleotiden, sondern durch eine Phosphothioat-Modifizierung des DNA-Gerüsts auch eine höhere Stabilität gegenüber dem Abbau durch Nukleasen zeigten. Diese Stabilität in Kombination mit CpG-Motiven ist im humanen System mit einer hohen immunstimulatorischen Aktivität verbunden ⁷.

1.1.2 Gezielte Modulation des Immunsystems

Neben der Modifizierung des ODN-Gerüsts lassen sich durch die Wahl der die CpG-Dinukleotide flankierenden Basen unterschiedliche Wirkungen erzielen und so je nach therapeutischem Bedarf ein geeignetes CpG-ODN auswählen. CpG-ODN werden anhand der Zytokinproduktion in zwei Hauptgruppen eingeteilt. CpG-ODN vom Typ A imitieren durch Induktion des Zytokins IFN- α eine Virusinfektion (ODN 2216 im humanen, 1585 im murinen System). CpG-ODN vom Typ B fördern die Synthese von Interleukin-12 (IL-12) und imitieren die Gegenwart intrazellulärer Bakterien (CpG-ODN 2006 im humanen System, CpG-ODN 1826 im murinen System)⁸. Wie bei einer bakteriellen Infektion wird durch CpG-ODN vom Typ B auch eine Aktivierung der B-Zellen erzielt.

Durch die Kombinationsmöglichkeiten beider Gruppen von CpG-ODN sowie durch Variationen in der Stabilität der Oligonukleotide ergeben sich neue therapeutische Aspekte, die durch ein reines bakterielles oder virales Lysat nicht zu erzielen wären. Die gemeinsame Gabe von CpG-ODN vom Typ A, die durch eine starke Induktion von IFN- α eine sekundäre Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erzielen, und von CpG-ODN vom Typ B, die zu einer Stimulation von B-Zellen und naiver $\alpha\beta$ -T-Zellen führen, kann in Mäusen beispielsweise einen Schutz gegen die akute myelogene Leukämie (AML) bewirken⁹.

1.1.3 TLR9 als Rezeptor für bakterielle DNA

Die Erkennung von Pathogenen und CpG-ODN erfolgt durch eine Reihe von keimbahnkodierten Rezeptoren, die als "pattern recognition receptors" (PRRs) mikrobielle Muster erkennen. Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind PRRs, die unter anderem auch bei Säugetieren vorhanden sind. Sie wurden erstmals 1997 als humanes Homolog des Toll Proteins (Toll), einem Protein, das bei adulten *Drosophila* die angeborene Immunantwort induziert, beschrieben¹⁰. TLR spielen eine ausschlaggebende Rolle in der Erkennung von mikrobiellen Komponenten. Ähnliche zytoplasmatische Domänen erlauben den TLRs,

dieselben Signalmoleküle wie die Interleukin-1-Rezeptoren, z.B. MyD88, zu benutzen. Es hat sich inzwischen jedoch deutlich gezeigt, dass die mit TLRs assoziierten Signalwege nicht identisch sind und zu unterschiedlichen biologischen Antworten auf einen bakteriellen Stimulus führen ¹¹.

Die Klonierung und Charakterisierung eines humanen Homologs des Drosophila Toll Proteins (Toll), welches die adulte angeborene Immunantwort induziert, führte zu der Entdeckung weiterer Rezeptoren der TLR-Familie. Bakterielle DNA und CpG-ODN werden über ein Mitglied der TLR-Familie, dem TLR9 erkannt ¹²⁻¹⁵. Die Gabe von CpG-ODN bei TLR9-defizienten Mäusen löst keine inflammatorische Reaktion aus und TLR9-defiziente Mäuse zeigen keine Reaktion auf eine bei Wildtypmäusen tödliche CpG-ODN Dosis. TLR9 ist im humanen System nur auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) und B-Zellen zweifelsfrei nachgewiesen worden. Im murinen System dagegen finden sich TLR9 auch auf Monozyten und Makrophagen. Dadurch sind Unterschiede in der Aktivierbarkeit verschiedener Immunzellen beim Menschen und bei der Maus zu erklären. Diese Unterschiede sind bei der Beurteilung von immunologischen Reaktionen im murinen System und deren Übertragbarkeit auf den Menschen zu berücksichtigen. Das optimale CpG-Motiv für den humanen TLR9 ist GTCGTT, die optimale murine Sequenz hingegen GACGTT ¹².

Bisher ist TLR9 der einzige bekannte Rezeptor für CpG-ODN. Aufgrund der sich unterscheidenden Wirkungsmechanismen bei mindestens zwei Gruppen von CpG-ODN sind jedoch Korezeptoren oder modulierende Faktoren zu erwarten, die eine spezifische Erkennung der das CpG-Motiv flankierenden Basen ermöglichen.

1.2 Dendritische Zellen

DC sind potente, immunstimulierende APC, die für die Initiation einer primären Immunantwort verantwortlich sind^{16, 17}. Die Immunantwort des Menschen beruht auf der Verzahnung der antigenunspezifischen, angeborenen Immunantwort mit der antigenspezifischen, erworbenen Immunantwort. Die Hauptaufgabe des angeborenen Immunsystems der Säugetiere ist es, Pathogene und Gewebezerstörungen schnell zu erkennen und durch die Vermittlung eines Gefahrensignals an das adaptive Immunsystem dessen Aktivierung einzuleiten¹⁸. Durch die Neuordnung von Gensequenzen ist das adaptive Immunsystem in der Lage, eine große Zahl antigenspezifischer B-Zell- und T-Zell-Klone zu generieren. Dadurch wird eine wirksame und lang anhaltende Immunität gegenüber bestimmten antigentragenden Pathogenen erreicht. Die notwendige Regulierung dieses potenten Systems erfolgt durch APC.

DC sind die einzigen APC, die eine primäre Immunantwort induzieren können und dadurch die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses ermöglichen¹⁹. Zurzeit ist allerdings nicht geklärt, ob die einzigartige Fähigkeit der DC zur Induktion einer primären Immunantwort auf die Expression von DC-spezifischen Molekülen oder auf der hohen Dichte von MHC-Molekülen beruht, die für die T-Zell-DC-Interaktion notwendig sind. Die Dichte der MHC-Moleküle ist abhängig von der Aktivierung auf DC um das 10- bis 100fache höher als auf anderen APC, wie z.B. B-Zellen und Monozyten²⁰.

Des Weiteren können DC wichtig für die Induktion immunologischer Toleranz und die Regulation der T-Zell-Antwort sein¹⁸. So sind DC aus der Thymusdrüse an der Beseitigung von selbstreaktiven T-Lymphozyten beteiligt²¹.

Für den therapeutischen Einsatz gewinnt immer mehr die Initiierung einer spezifischen T-Zell-Antwort durch aktivierte DC an Bedeutung. So gelten vor allem *in vitro* generierte DC als Erfolg versprechend für die Tumorthherapie. Obwohl das Verständnis der DC Biologie noch viele Fragen offen lässt, wurden

aufgrund des erwarteten therapeutischen Potentials bereits klinische Studien am Melanom ^{22, 23}, Glioblastom ²⁴, Prostata-Karzinom ²⁵⁻²⁷, Lymphom ²⁸, Hypernephrom ²⁹ und am Kolontumor ³⁰ durchgeführt. Die durchgeführten Studien unterschieden sich sowohl im Reifegrad der DC, dem Injektionsort, in der Wahl des Antigens, als auch in der Art der verwendeten DC.

In neuen Studien wurden funktionell unterschiedlichen DC-Linien und Untergruppen gefunden ³¹⁻³⁴. DC werden mehrheitlich in DC myeloiden und lymphoiden Ursprungs unterteilt. Dabei zeigt sich, dass obwohl alle DC letztendlich aus Knochenmarkszellen stammen, sich doch eine Form von lymphoiden DC aus Vorläuferzellen im Thymus entwickelt ²¹. Die humanen pDC werden durch deren Expression von lymphoiden Markern wie CD123 (IL-3-Receptor) und dem Fehlen von myeloiden Markern wie CD11c inzwischen als diese Zellen lymphoiden Ursprungs angesehen ¹⁵.

Humane pDC sind die Hauptproduzenten von IFN- α und werden unter anderem durch CpG-ODN aktiviert. Im murinen System konnten erst kürzlich in Lymphknoten und in der Milz CD11c/Gr-1 positive Zellen nachgewiesen werden, die Charakteristika von pDC aufwiesen. Frisch isolierte Zellen überlebten schlecht unter Kulturbedingungen, überlebten aber bei Zugabe von CpG-ODN unter Ausbildung einer DC-ähnlichen Morphologie ³⁵.

Der "danger signal"-Hypothese zufolge hat sich das Immunsystem dazu entwickelt, professionelle APC als Gefahrensensor einzusetzen ³⁶. Als Rezeptoren dienen TLRs zur Erkennung pathogener Substanzen. Neben dem TLR9, der auf pDC CpG-ODN als bakterielle DNA erkennt, sind vor allem TLR2, der Rezeptor für Peptidoglykan und für Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien ³⁷, TLR4, der Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS), einem Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien ³⁸, und TLR5, dem Rezeptor für Flagellin, einem Bestandteil motiler Bakterien ³⁹, für die Gefahrenerkennung und die daraus resultierende Aktivierung der APC von immunologischer Bedeutung. DC, die durch TLR9 aktiviert werden, treten somit bei Infektionen oder dem direkten Erkennen von mikrobiellen Organismen auf.

Eine effektive Antigenpräsentation der DC erfolgt über MHC-Komplexe mit Hilfe von kostimulatorisch wirksamen Molekülen, die erst bei einer Aktivierung der DC exprimiert werden. So bewirken DC durch die späte bedarfsgesteuerte Aktivierung eine verstärkte Präsentation fremder Antigene. Die T-Zellen werden somit einerseits erst dann aktiviert, wenn ein zweites Signal das präsentierte Antigen als potentiell gefährlich erkennen lässt, und können andererseits bei der Präsentation von Antigenen durch nicht aktivierte DC deaktiviert werden.

Die Deaktivierung und Apoptoseinduktion potentieller tumorreaktiver T-Zellen ist einer der Schutzmechanismen von Tumoren. Die Erkennung des Tumors durch das Immunsystem als „eigen“ führt zu einer Inaktivierung oder Hemmung der T-Zellantwort. Neben der Induktion von Apoptose in T-Zellen ist auch die Induktion von Apoptose in tumorassoziierten DC im humanen und murinen System einer von mehreren Schutzmechanismen des Tumors⁴⁰. Im peripheren Blut und in den tumordrainierenden Lymphknoten von Krebspatienten ließ sich ein Rückgang von DC aufzeigen, der mit einer Akkumulation von unreifen hämatopoetischen Zellen einherging⁴⁰.

1.3 Therapien bei Kolontumoren

Gastrointestinale Tumoren gehören zu den häufigsten bösartigen Tumoren und sind für ca. ein Drittel der tumorbedingten Todesfälle in Deutschland verantwortlich. Kolonkarzinome stellen mit fast 50% der Neuerkrankungen und ca. 25% der durch gastrointestinale Tumoren bedingten Todesfälle die größte Gruppe dar. Kolontumoren bilden beim Menschen eine lebensbedrohliche Erkrankung, für die es bei Diagnose im fortgeschrittenen Stadium nur unzureichende Heilungsmöglichkeiten gibt.

Für Patienten mit neu diagnostiziertem Kolonkarzinom im Stadium III ist die "state of the art" Therapie eine Kombination von 5-Fluoruracil (5-FU) mit einer Niedrig- oder Hochdosisbehandlung Leucovorin (LV). In weltweit durchgeführten klinischen Studien haben neu entwickelte Medikamente jedoch verbesserte Toxizitätsprofile oder antitumorale Aktivitäten für Patienten mit fortgeschrittenen Kolonkarzinomen gezeigt. Uracil und Tegafur sowie Capecitabin (Xeloda) sind zwei Beispiele von neuen, oralen chemotherapeutischen Stoffen mit akzeptablen Nebeneffektprofilen, die sowohl in der adjuvanten Therapie als auch bei fortgeschrittenen Stadien einsetzbar sind ⁴¹. Auch Irinotecan und Oxiplatin etablieren sich als Behandlungsschema für die Erst- oder Folgebehandlung fortgeschrittener Kolonkarzinome, wobei deren neuer Wirkungsmechanismus sich als günstig für 5-FU-resistente Patienten erwiesen hat ⁴². Trotz der Fortschritte die im Bereich der Chemotherapeutika bei der Verringerung der Toxizität und der Erhöhung der Lebenserwartung erzielt wurden ist eine kurative Therapie der nicht-resektablen, metastasierenden Tumoren bisher nicht möglich. Mit 5-FU/Leukovorin konnte in einer kontrollierten randomisierten Studie an R0-resezierten Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II und Stadium III nur eine 4-Jahres-Überlebenszahl von 66,1 % erzielt werden ⁴³. Die Heilungserfolge durch Chemotherapeutika sind bei Patienten im Stadium II generell zweifelhaft ^{44, 45}. Diese Zahlen zeigen die Dringlichkeit von neuen Therapieansätzen.

Fälle von spontaner, vollständiger Tumorregression verdeutlichen, dass das Immunsystem in der Lage ist, den Tumor zu besiegen. Eine Vielzahl von neuen Therapieansätzen beruht deshalb auf einer erneuten Aktivierung des Immunsystems. Wie in randomisierten Studien nachgewiesen wurde, kann der gezielte Einsatz von monoklonalen Antikörpern die Prognose bei Lymphknotenmetastasen verbessern⁴⁶. Einer dieser Antikörper ist Panorex, ein muriner Antikörper gegen das 17-1A-Antigen. Da dieser Antikörper ein murines Fremdeiweiß ist, treten Nebenwirkungen wie z.B. anaphylaktische Reaktionen auf. In neuen Ansätzen werden deshalb verstärkt humane Antikörper, die gut toleriert werden, verwendet. Ein Beispiel dafür ist der monoklonale Antikörper SK-1, der gegen ein Glykoprotein gerichtet ist, das in den meisten Kolontumorgeweben exprimiert wird⁴⁷.

Ein hoffnungsvoller Ansatz ist die aktive spezifische Immunisierung mit autologen Tumorzellen. Die aktive spezifische Immunisierung geht von in Normalgewebe nicht exprimierten, oder im Vergleich zum Tumorgewebe weniger stark exprimierten Antigenen aus. Bei dieser Therapie wird versucht, die Immunantwort gegen tumorassoziiertes Antigen mit Adjuvantien wie BCG zu stimulieren. Kürzlich wurde anhand einer randomisierten, kontrollierten klinischen Studie belegt, dass mit einer autologen Tumorzellvakzine postoperativ eine signifikante klinische Verbesserung für Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II erzielt werden kann⁴⁸. Untersuchungen von Harris et. al. an 412 Patienten mit Kolonkarzinom (297 in Stadium II, 115 in Stadium III), die an einer randomisierten Studie teilnahmen, zeigten allerdings, dass Injektionen mit autologen Tumorzellen in Kombination mit BCG, beginnend in der vierten Woche nach Tumorresektion und dreimal wöchentlich injiziert, keine signifikante Verbesserung der 5-Jahresüberlebenszahl mit sich brachten⁴⁹. In diesen Untersuchungen konnte nur ein längeres tumorfreies Intervall nach der Tumorresektion nachgewiesen werden. Eine postoperative adjuvante Vakzine ist somit noch weit von der in diese Therapieform gesteckten Hoffnungen entfernt.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die direkte *in vivo* Stimulierung des Immunsystems durch CpG-ODN und deren Effekt auf subkutan induzierte Tumoren aus Kolonkarzinomzellen untersucht werden. Ein Ziel der Arbeit war, durch eine Stimulierung des Immunsystems eine Tumorregression zu erreichen.

Neben dem Therapieerfolg sollte durch *in vivo* und *in vitro* Versuche festgestellt werden, welche Zellen an der antitumoralen Wirkung beteiligt sind, und unter welchen Voraussetzungen sich eine lang anhaltende Immunität erreichen lässt. Um Aussagen über die Spezifität der Immunantwort zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Tumoren verwendet.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war festzustellen, mit welchen Methoden sich eine CpG-ODN-Therapie verbessern lässt, um eine Tumorregression großer etablierter Tumoren zu erzielen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Optimierung der Kombinationstherapie von CpG-ODN mit DC gelegt.

2. Material und Methoden

2.1 Mäuse und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden weibliche BALB/c Mäuse, eine weit verbreitete Inzuchtlinie die eine ausgeprägte Th2-Antwort zeigt⁵⁰, verwendet. Im Alter von 6 bis 8 Wochen wurden die Tiere von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen und frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung für die Versuche herangezogen. Die Haltung erfolgte in einem geschlossenen, den Hygieneanforderungen entsprechenden Tierstall der medizinischen Klinik. Die Betreuung, inklusive Fütterung mit Pelletfutter und Wasser *ad libidum* erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. In der Regel wurden maximal 6 Mäuse pro Käfig gehalten. Der zwölfstündige hell/dunkel Rhythmus war mittels einer Zeitschaltuhr geregelt und soweit möglich wurden Versuche nur tagsüber durchgeführt. Die durchschnittliche Lebenserwartung von weiblichen BALB/c Mäusen beträgt bei konventionellen Bedingungen 575 Tage⁵¹ und unter SPF (special pathogen free) Bedingungen $816 \pm 32,4$ Tagen⁵². Dieses Alter wurde in unseren Versuchen nie erreicht, da auch bei Langzeitversuchen die Mäuse spätestens ein Jahr nach Versuchsbeginn getötet wurden. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2 Zellkulturmedien und Zelllinien

2.2.1 Kulturmedien

Als Kulturmedien wurde Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) für Tumorzelllinien sowie RPMI zur Kultivierung von T-Zellen und DC verwendet. Die Kulturmedien wurden mit 20 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) supplementiert. Zur Vermeidung unspezifischer Stimulation wurden ausschließlich endotoxinarme Medien und Substanzen eingesetzt. Um Komplementfaktoren zu inaktivieren wurde das verwendete FCS bei 56 °C für 30 min hitzebehandelt.

2.2.2 Tumorzelllinien

Die verwendeten Zelllinien C26, eine murine Kolonkarzinomzelllinie, die ursprünglich aus einer mit N-nitroso-N-methylurethan behandelten BALB/c Maus gewonnen wurde⁵³, sowie Renca, eine aus BALB/c Mäusen gewonnene Adenokarzinomzelllinie der Niere, die sich spontan entwickelte⁵⁴, sind kommerziell erhältlich. Die Zelllinien wurden von Cell Lines Service, Heidelberg, bezogen und von uns auf Mykoplasmenkontamination überprüft. Beide Zelllinien waren während der gesamten Versuchsdauer mykoplasmenfrei. Die Zellen wurden bei 37 °C, 100 Prozent Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Heraeus Brutschrank (Heraeus, Hanau) kultiviert.

2.2.3 Zelllinien zur Produktion von murinem GM-CSF

Zur Produktion von mGM-CSF (murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor)-haltigem Überstand wurde die Zelllinie X-63, ein Geschenk von Herrn Prof. Thomas Brocker (Immunologie, München), in mittelgroßen Flaschen mit supplementiertem DMEM Medium ohne G418 Genticin Sulfat kultiviert. Sobald das Medium eine stärkere Gelbfärbung aufwies wurden die Zellen abzentrifugiert. Der mGM-CSF-haltige Überstand wurde auf dessen biologische Aktivität hin untersucht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand der Hochregulation der MHC-II-Expression während der Generation von aus dem Knochenmark abgeleiteten DC mittels FACS (fluoreszenzaktivierter Zellsorter)-Messung. Es wurden vier Konzentrationen von zugegebenem Überstand (2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %) getestet. Der Überstand wurde aliquotiert und für spätere Versuche bei -20 C° eingefroren. In flüssigem Stickstoff eingefrorene X-63 Zellen wurden bei Bedarf nach dem Auftauen für eine Passage in nicht G418-haltigem Medium kultiviert. Die Weiterkultivierung erfolgte mit 1 mg/ml G418 Genticin Sulfat (Gibco) als Selektionsmedium. Vor der letzten Passage wurden die Zellen gewaschen und in Medium ohne G418 kultiviert, um einen von G418 freien Überstand zu erhalten. Bei jeder neuen Kultivierung ist bei diesem Verfahren ein erneutes Austesten der biologischen Aktivität erforderlich.

2.3 Tumormodell

Zur Induktion von subkutanen Tumoren wurden noch nicht konfluent wachsende Tumorzellen jeweils zweimal in der Kulturflasche mit kaltem, nicht supplementiertem HANKS Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und bei 350 g für 7 min in HANKS Medium abzentrifugiert. Die Zellen wurden gründlich gewaschen, um eine immunstimulierende Wirkung von Substanzen, die sich in FCS-haltigem Medium befinden können, zu vermeiden. Die Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^6 lebenden Zellen pro ml mit HANKS Medium eingestellt. Durch Trypanblaufärbung konnte gezeigt werden, dass nach Ablösen der Zellen mehr als 90 % der Zellen vital blieben. Die Tumorinduktion erfolgte durch Injektion von 2×10^5 teilungsfähigen Tumorzellen in 200 μ l serumfreien HANKS Medium. Die injizierten Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Injektion in der logarithmischen Wachstumsphase. Injektionen wurden subkutan in die Flanke narkotisierter Mäuse appliziert.

Als Inhalationsnarkose wurde Forene®, ein den Wirkstoff Isofluran (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether) enthaltendes Inhalationsnarkotikum der Firma Abbott, Wiesbaden verwendet. Isofluran wirkt ausreichend analgetisch und stark muskelrelaxierend. Die Tiere wurden nur kurzzeitig mit Isofluran betäubt und erwachten in der Regel bereits einige Sekunden nach der subkutanen Injektion der Tumorzellen oder der Vakzine, sodass eine Antagonisierung des Narkotikums nicht erforderlich war. Die Inhalationsnarkose erfolgte, um eine Verletzung der Tiere durch Bewegung zu vermeiden und wäre zur reinen Schmerzvermeidung nicht erforderlich gewesen.

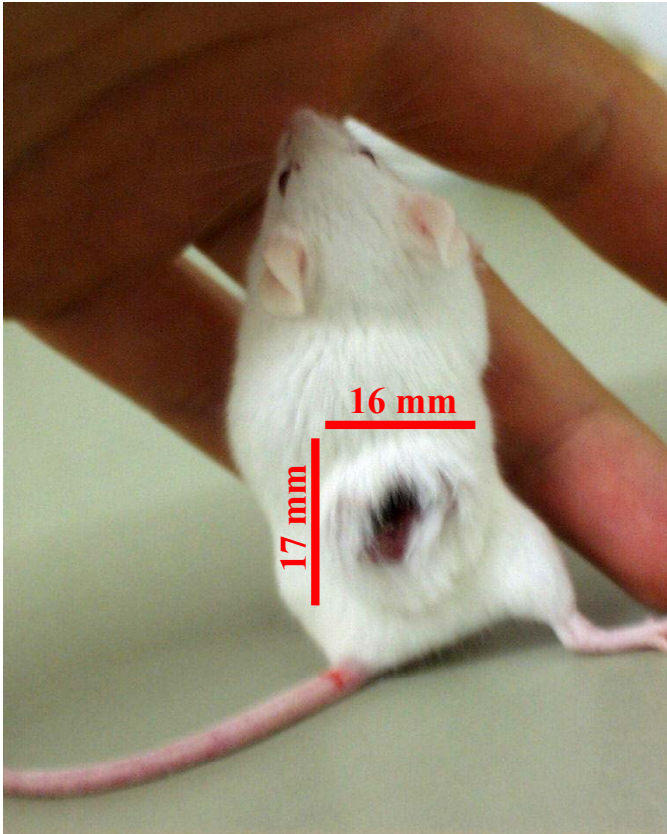


Abb. 2 Die Tumorinduktion führte bei den Tieren in den meisten Fällen zur Ausbildung eines einzelnen, solide wachsenden Tumors. In Einzelfällen bildeten sich zwei Tumoren. Bei größeren Tumoren bildeten sich von außen sichtbare, nekrotische Areale.

Die Tumorgöße (Länge der Tumoren in mm x Breite in mm) wurde dreimal wöchentlich gemessen. Bei den verwendeten Tumoren war die Tiefenmessung durch die Größenentwicklung im Laufe der Therapie oft nicht durchführbar oder hätte zu einer starken Belastung der Versuchstiere geführt. Auf die Tiefenmessung und damit auf die Möglichkeit einer Volumenfeststellung wurde daher verzichtet.

Als Abbruchkriterien für einen Versuch galt eine starke Gewichtsabnahme der Mäuse unter 18 g, starke Verhaltensauffälligkeiten, sowie das Erreichen oder das Überschreiten einer Tumorgöße von 400 mm².

2.4 Therapeutische Ansätze

2.4.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynucleotide (ODN) CpG-ODN 1826 5' TCCATGACCGTTCCTGACGTT 3' ⁵⁵ und das nicht-CpG Kontroll-ODN 1982 5' TCCAGGACTTCTCTCAGGTT 3' (gleiche Länge und Basenzusammensetzung) waren komplett mit Phosphothioaten modifiziert. Die verwendeten ODN waren endotoxinfrei; bzw. Endotoxine lagen unter dem Detektionslimit (<0.03 EU/ml; LAL-Test; BioWhittaker, Walkersville, MD). Die ODN wurden von der Coley Pharmaceutical Group (Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA) zur Verfügung gestellt.

Für die Erstellung einer 15-20 mg/ml Stammlösung wurden die ODN in TE-Puffer (Tris-Hydrochlorid EDTA Puffer) gelöst und die genaue Konzentration an CpG-ODN mit Hilfe eines Photometers (Pharmingen Gene Quant) ermittelt. Für die Stammlösung wurde kein PBS verwendet, da bei diversen molekularbiologischen Versuchen, wie z.B. dem Markieren von ODN mit radioaktivem Phosphor oder der Aufnahme von ODN bei Transfektionen, phosphorfreie Puffer benötigt werden. Für die Anfertigung der Arbeitslösungen wurde die Stocklösung auf 1 mg/ml mit PBS verdünnt. Stammlösungen und aliquotierte Arbeitslösungen wurden bei -20°C gelagert. Wenn nicht anders angegeben, wurden den Tieren je 100 µl der Arbeitslösung (=100 µg CpG-ODN/Tier) subkutan injiziert. Bei der Kombinationstherapie von DC und CpG-ODN wurde je 100 µg CpG-ODN aus der Stammlösung der DC-Vakzine zugesetzt, um weitere Injektionen zu vermeiden.

2.4.2 Dendritische Zellen

Mit geringen Abwandlungen erfolgte die Generierung von DC aus murinem Knochenmark wie in der Literatur beschrieben^{56, 57}. Eine 6 bis 8 Wochen alte Maus wurde mit Isofluran anästhesiert und durch Exartikulation der Halswirbelsäule getötet. Nach Fixierung der Maus und Desinfektion der Hinterläufe mit Ethanol wurden durch Entfernung von Fell und Muskulatur Tibia und Femur freigelegt und in eine Schale mit Kulturmedium auf Eis überführt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen nachgereinigt, kurz in Ethanol getaucht und in frisches Kulturmedium überführt. Jeder Knochen wurde auf beiden Seiten eröffnet und mit etwa 5 ml Kulturmedium ausgespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch ein Zellstrainersieb (70 µm) filtriert und das Sieb mit 10 ml Kulturmedium nachgespült. Nach kurzer Zentrifugation (350 g, 5 min, 4°C, AC/DC 7) wurden die Erythrozyten nach Zugabe von Lyse-Reagent (Ortho-clinical Diagnostics, Neckargemünd) für zehn Minuten lysiert. Durch Zugabe von Ratte-anti-Maus Antikörpern gegen CD45R (18 µl/10⁷ Zellen), Ly-6G, MHC-II, CD4 und CD8 (jeweils 6 µl/10⁷ Zellen), wurden Granulozyten, B-Zellen, Monozyten und T-Zellen markiert. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut gewaschen. Zu den antikörpermarkierten Zellen wurden mindestens 4 magnetische Schaf-anti-Ratte Dynabeads® M-450 (Dynal Biotech, Hamburg) pro Zelle gegeben. Dynabeads® M-450 sind uniforme Polymerkügelchen mit 4,5 µm Durchmesser, in die magnetisches Material (Fe₂O₃ und Fe₃O₄) eingebettet sind. Die Kügelchen wurden unter stetigem Schwenken in einem 50 ml Falcon-Röhrchen für 30 Minuten im Kühlraum bei ca. 6°C belassen. Dabei band sich der an die Dynabeads® gekoppelte Anti-Ratten-Antikörper an die mit primärem Antikörper markierten Zellen. Die an Dynabeads® gebundenen Zellen wurden in ein starkes Magnetfeld des Dynal MPC® (Magnetic Particle Concentrator) gegeben, wobei die markierten Zellen an die dem Magneten zugewandte Seite an der Innenseite des Röhrchens haften blieben und die ungebundenen Zellen in der Suspension entnommen werden konnten. Das Röhrchen mit den gebundenen Zellen wurde aus dem Magnetfeld entnommen. Die nun nicht mehr gebundenen Zellen wurden in 2 ml Kulturmedium resuspendiert,

wiederholt in den Dynal MPC® gegeben und die Suspension mit der ersten Suspension vereinigt. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt, um eine höhere Zellausbeute zu erhalten. Die gesamte Zellsuspension wurde in einem letzten Separationsschritt in dem Dynal MPC® aufgereinigt, um die markierte Zellen abzutrennen, die sich in der Suspension befinden. Nach der magnetischen Separation verbleiben ca. 15 - 20 % der Ausgangszellen für die Weiterkultivierung.

Die nach der Separation verbliebenen Zellen, hauptsächlich DC-Vorläuferzellen, wurden in einem ersten Versuch mit 11 ml supplementiertem Kulturmedium, versetzt mit 20 ng/ml murinem IL-4 (Interleukin-4) (PeproTech, London, GB) und 200 U mGM-CSF (Roche, Mannheim), für drei Tage in mittelgroßen Kulturflaschen kultiviert. Nach drei Tagen wurde erneut 11 ml supplementiertes Kulturmedium mit mGM-CSF und IL-4 zugegeben. Aufgrund der hohen Kosten des murinen IL-4 und des mGM-CSF wurde bei einigen Versuchen getestet, ob die Substanzen durch eine Zugabe von 5 % Überstand aus einer mGM-CSF produzierenden Kultur der X-63 Zellen ersetzt werden können. Laut Lutz et al.⁵⁸ ist bei hoher mGM-CSF Gabe kein IL-4 für die Generierung unreifer, noch in vollem Ausmaße zur Antigenpräsentation fähiger muriner DC notwendig.

Für Beladung der DC wurden die DC als Antigenquelle an Tag 8 der DC-Generation mit 100 gray (Gy) bestrahlt, und somit nicht mehr teilungsfähige C26-Zellen, bzw. als Kontrollzelllinie bestrahlte Renca-Zellen zugegeben. Das Verhältnis von DC zu bestrahlten Zellen war 1 zu 5. Die DC zeigten zu diesem Zeitpunkt durch die Kultivierung in mGM-CSF-haltigem Medium eine hohe MHC-II-Expression und fungieren als potente APC. Nach Inkubation der DC mit C26 über Nacht wurden die DC mit 6 µg/ml CpG-ODN 1826 für weitere 24 h aktiviert, was zu deren vollständigen Ausreifung führte (Abb. 3).

An Tag 10 wurden die DC für die Vakzine zweimal in serumfreiem HANKS Medium gewaschen und je nach Versuchsansatz und Tier zwischen 100.000 und 700.000 aktivierte, antigenbeladene DC in 200 µl serumfreiem HANKS Medium injiziert.

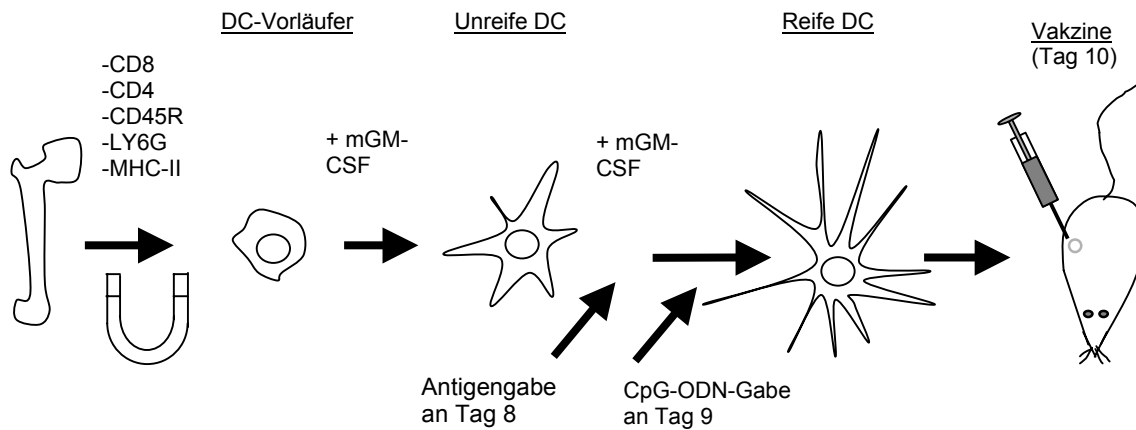


Abb. 3 An Tag 0 wurden aus dem Knochenmark durch Depletion von CD8-, CD4-, CD45R-, Ly6G- und MHC-II-positiven Zellen DC-Vorläuferzellen generiert. In Kulturmedium mit mGM-CSF (+ IL-4) ließen sich unreife DC mit starker Oberflächenexpression von MHC-II generieren. An Tag 8 nach Tumorinduktion wurden die DC zusammen mit Antigen in Form von bestrahlten Zellen kultiviert und an Tag 9 durch Gabe von CpG-ODN aktiviert. Die DC wurden 24 h nach Aktivierung mit CpG-ODN injiziert.

2.4.3. Weitere therapeutische Instrumente

Neben den therapeutischen Instrumenten CpG-ODN und DC untersuchten wir in Kombination mit CpG-ODN die Wirkung von IL-2 (TECIN™, Hoffmann la Roche, Nutley, NY, USA), von mGM-CSF (Boehringer, Mannheim), von bestrahlten C26-Zellen (100 Gy), von einer schockwellenverstärkten CpG-ODN-Aufnahme, sowie von apoptotischen Zellen.

Die Apoptoseinduktion der C26-Zellen erfolgte durch dreistündige Hitzebehandlung bei 43° C in einem Certomat® H (B. Braun, Melsungen). Je Maus und Injektionstag wurden 400.000 apoptotische Zellen in 200 µl HANKS Medium injiziert.

Eine Erhöhung der CpG-ODN-Aufnahme wurde mit dem EMSE Lithotripter, einem sich in der Testphase befindenden Schockwellengerät der Firma Dornier Medtech erzielt. Schockwellen sind akustische hochenergetische Druckwellen.

Durch die Druckwellen werden Gasbläschen induziert, die als Träger für eine aufzunehmenden Substanz dienen können⁵⁹. Die bestrahlten (100 Gy), teilungsunfähigen C26-Tumorzellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit oder ohne vorherige Hitzebehandlung zusammen mit CpG-ODN in einer sterilen, dünnwandigen 1,5 ml Polyethylenküvette aufgenommen und deren Öffnung luftdicht verschlossen. Die Küvette mit den C26-Zellen wurde in einem Wasserbad mittels Laserstrahlen auf den Fokus der Schallwellen eingestellt. Durch die Bündelung der Energie entsteht im Fokus ein Spitzendruck von 108 Megapascal. Nach einer Anstiegszeit der Welle von 80 Nanosekunden folgt ein geringerer, für die Aufnahme von Oligonukleotiden notwendiger Unterdruck von 15 Megapascal im Fokus mit einer effektiven Energie von 102 Millijoule in einem Durchmesser von 12 mm in der Fokusebene. Die technischen Angaben wurden von Herrn Dr. Überle von der Firma Dornier ermittelt und beziehen sich auf die hier verwendete Schockwellenintensität. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 2 Hz beschallt. Nach der Schockwellenbehandlung wurden Zellbestandteile und extrazelluläres CpG-ODN durch zweimaliges Waschen in serumfreiem HANKS entfernt. Je Maus und Injektionstag wurden 400.000 mit CpG-ODN beladene Zellen in 200 µl HANKS Medium injiziert.

2.5. Ex vivo Evaluierung der Immunantwort

2.5.1 Leukozytenisolation

Um ein vorzeitiges Verklumpen der Blutzellen zu vermeiden, wurde den Mäusen 100 I.E. Heparin-Natrium (Braun, Melsungen) in 200 µl PBS i.p. injiziert. Die Mäuse wurden eine Minute nach Heparin-gabe mit Isofluran narkotisiert und bei Eintreten der Narkose durch Dislokation der Halswirbel getötet. Der Brustkorb wurde geöffnet und mit einer Spritze und einer 24 G Microlance-Kanüle wurde 750 bis 1000 µl Vollblut aus dem schlagenden Herzen durch Intrakardialpunktion entnommen. Die Zellsuspension wurde mit 350g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen oder für die IFN- γ -Bestimmung (siehe Kapitel 2.5.4) verwendet.

Für die Präparation von Milzzellen wurde die gesamte Milz steril entnommen, von Fettgewebe befreit, in eine Petrischale überführt, mit einem Skalpell zerkleinert und die zerkleinerte Milz mit 20 ml Medium durch ein 70 µm Zellsieb (Falcon, Heidelberg) gespült. Durch Reiben der Milz mit der Pipette ließ sich die Ausbeute verbessern. Die Zellsuspension wurde mit 350g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Aus dem Zellpellet von Vollblut- oder Milzpräparation wurden die Erythrozyten durch Lyse entfernt. Dazu wurde das Zellpellet in Lyse-Reagent (Ortho-clinical Diagnostics) vorsichtig resuspendiert und auf Eis belassen. Für die Lyse von einem ml Vollblut oder für die Lyse der Milzzellen wurden je 20 ml Lyse-Reagent verwendet. Mit CpG-ODN behandelte Mäuse zeigten ein größeres Milzgewicht. Um eine einheitliche Lyse zu erhalten, wurde nach der Reinigung über das Zellsieb ein Teil der Milzzellen behandelter Mäuse verworfen. Nach 10 min wurden die Zellen abzentrifugiert und die Reaktion mit 2 ml Kompletmedium abgestoppt. Die Zellen wurden gezählt und danach für die Analyse der Oberflächenantigene oder für Zytotoxizitätsversuche verwendet.

2.5.2 FACS-Analyse von Oberflächenantigenen

Für FACS-Analysen wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen in 100 µl Medium für 30 min auf Eis unter Lichtausschluss mit jeweils 4 µl FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat), PE (Phycoerythrin), RPE (Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum*) oder CyChrome™ (Konjugat aus Phycoerythrin und einem 1,5 kD Zyanid) gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Es wurden FITC-gefärbte Antikörper gegen CD4, CD8, CD16/32, CD69, CD86, Ly6G (alle Pharmingen) und CD54 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA), PE-gefärbte Antikörper gegen CD3, CD45R, CD154 und DX5 (anti mouse Pan-NK cells) (alle von Pharmingen), RPE-gefärbte AK gegen CD80 und MHC-II (beide Southern Biotechnology), und CyChrome™ gefärbte Antikörper gegen CD3 und CD4 (beide Pharmingen) verwendet. Bei jeder Färbung wurde eine Kontrollfärbung mit fluoreszenzfarbstoffmarkiertem, isotypgleichen IgG (IgG2B) durchgeführt. Bei

einigen Versuchen, vor allem bei der Färbung der Oberflächenantigene von DC kam es zu einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz, die sich aber durch Zugabe von 10 % Rattenserum (Sigma) zu den zu färbenden Zellen 5 min vor Antikörperzugabe reduzieren ließ.

In einigen Versuchen wurde zusätzlich unmittelbar vor der Messung zur Anfärbung toter Zellen TO-PRO-3-iodide (Molecular Probes) zugegeben. Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden mit Hilfe eines mit zwei Lasern (Anregungswellenlänge 488 nm und 635 nm) ausgerüsteten FACS Calibur Gerätes (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen und mit der CellQuest Software analysiert.

2.5.3 Analyse der lytischen Aktivität

In einem nicht-radioaktiven Versuchsansatz wurden 25.000 C26 oder Renca-Zellen als Zielzellen zweimal in PBS gewaschen, in CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetat succinimidyle ester) (Molecular Probes, Eugene, OR) in einer Endkonzentration von 10 μ M resuspendiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zielzellen wurden dreimal gewaschen und Milzzellen wurden als Effektorzellen zugegeben. Nach 20 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit TO-PRO-3-iodide gefärbt. Für die durchflusszytometrische Bestimmung wurde das oben beschriebene Becton Dickinson FACS Calibur verwendet. Ziel- und Effektorzellen wurden erfasst, die toten CFSE/TO-PRO-3 iodide doppelt-positiven Zielzellen und die lytische Aktivität (= % tote C26-Zellen bei der behandelten Gruppe/ % tote C26-Zellen bei der Kontrollgruppe) bestimmt. Als Kontrolle wurden die Milzzellen von unbehandelten Mäusen, denen kein C26-Tumor induziert worden war, als Effektorzellen zu C26-Zellen gegeben und deren lytische Aktivität bestimmt.

2.5.4 Serum IFN- γ -Bestimmung

Zur Gewinnung von Serum wurde Blut von heparinisierten Mäusen bei 4 °C mit 350 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde zur Abtrennung störender Zellfragmente und Proteinaggregate für weitere 30 min bei 10.000 g in 1,5 ml Eppendorfgläsern bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) eingesetzt. Dabei erfolgte die Detektion und Bestimmung von IFN- γ mit dem OptEIA™ Maus IFN- γ -Set nach Anleitung des Herstellers (Pharmingen). Mikrowellplatten wurden mit 100 μ l einer den Anti-Maus IFN- γ -Antikörper enthaltenden Lösung beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden sorgfältig mit Waschpuffer gewaschen und mit PBS + 10 % FCS eine Stunde lang geblockt. Pro Well wurden 100 μ l der unterschiedlichen Konzentrationen der Standardkurve und unverdünntes Serum aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden gründlich gewaschen und mit 100 μ l Avidin-Meerrettichperoxidase-gekoppelten Anti-Maus IFN- γ -Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden siebenmal gewaschen, 100 μ l/well Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, bereits gebrauchsfertig mitgeliefert) zugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 min lang inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 50 μ l 1 M H₃PO₄ gestoppt und die Absorption mit einem ELISA-Reader ausgewertet.

2.5.5 Histologie

2.5.5.1. Gewebepräparation und histologische Untersuchung

Das Gewebe wurde großflächig von rasierten, unmittelbar vor dem Eingriff getöteten Mäusen entnommen, in O.C.T. Compound (Sakura Finetek) eingebettet, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für Histologie und Immunhistologie wurden 5 μ m dicke Schnitte angefertigt, luftgetrocknet und 10 min lang mit Aceton fixiert. Für routinemäßig

durchgeführte histologische Untersuchungen wurden die Schnitte mit Hematoxylin-Eosin gefärbt.

2.5.5.2 Immunhistologie

Die Immunhistologie und die direkt zur Immunhistologie gehörenden Hematoxylin-Eosin-Färbungen wurden von Herrn Dr. Bence Sipos (Abteilung Pathologie, Universität Kiel) durchgeführt. Dabei wurden gefrorene Schnitte für 20 min mit 5 % Rattenserum inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren. Für die Erkennung der T-Zellen wurden mäuse-spezifische Primärantikörper gegen CD4 (Klon H129.19) und CD8 (Klon 53-6.7), beide von Pharmingen, in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Für die Erkennung aktivierter DC wurde ein Primärantikörper gegen DEC205 (Serotek) 1:10 verdünnt eingesetzt. Die verwendeten Primärantikörper wurden 45 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und mit der APAAP (Alkalische Phosphatase anti Alkalische Phosphatase) Färbemethode von DAKO sekundär gefärbt. Anti-Ratten Antikörper (DAKO) und monoklonales Ratten-APAAP (DAKO) wurden jeweils für 2 x 10 min eingesetzt. Durch die Verwendung einer auf die alkalische Phosphatase beruhenden Färbung ließ sich das bei der gebräuchlicheren Meerrettichperoxidasefärbung auftretende Problem mit endogenen Peroxidasen vermeiden. Die Farbreaktion wurde mit einer Neufuchsin enthaltenden Entwicklungslösung generiert. Es erfolgte eine Hematoxylin-Gegenfärbung. Für die Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch eine Ratten-IgG2a-Isotypkontrolle ersetzt (Pharmingen). Die Zahl der DEC205-positiven Zellen wurde mit einem Axiolab Mikroskop von Zeiss mit Hilfe eines Okularrasters bestimmt. Es wurden jeweils drei nicht aneinander liegende Schnitte jedes Tumors analysiert.

2.6 In vivo Evaluierung der Immunantwort

2.6.1 Zelltransfer

Zur positiven und negativen Selektion von CD4- und CD8-positiven T-Zellen wurden zuerst Mäusemilzen steril entnommen und mittels vorsichtigem Spülen durch ein 70 µm Zellsieb (Falcon) eine Einzelzellsuspension erzielt. Die Einzelzellsuspension wurde nach Anweisung des Herstellers (Miltenyi, Bergisch Gladbach) mit magnetisch markierten Antikörpern gegen CD4 oder CD8 markiert und über eine Selektionssäule getrennt. Die Zellen wurden, nach Rücksprache mit dem Hersteller, zur Dissoziation der magnetischen Partikel über Nacht in FCS-haltigem Medium kultiviert, die magnetischen Partikel mitsamt der gebundenen T-Zellen depletiert und die Reinheit der verbliebenen Zellen per FACS bestimmt. Um einen immunmodulatorischen Einfluss von Serumresten auszuschließen wurden die Zellen zweimal in serumfreien HANKS Medium und zuletzt in PBS gewaschen. Je Transfer wurden 500.000 Zellen in 50 µl PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert.

2.6.2 Zelledepletion

Für die T-Zell-Depletion wurden Mäuse je 1 mg des anti-CD4 monoklonalen Antikörpers (mAb) GK1.4 oder des anti-DC8 mAb RmCD8 injiziert⁶⁰. Einen Tag vor Therapiebeginn wurden 500 µg mAb in 200 µl PBS, einen Tag nach Therapiebeginn und danach dreimal alle 5 Tage 100 µg mAb in 200 µl PBS i.p. verabreicht. Die Antikörper wurden von Herrn Dr. R. Mocikat (GSF München) zur Verfügung gestellt.

2.7 Statistik

Ein ungepaarter, doppelseitiger Student's T-Test wurde benutzt, um signifikante Unterschiede in der Tumorgroße bei einzelnen Gruppen festzustellen. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die Werte wurden mit \pm SEM angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Excel Programm.

3. Ergebnisse

3.1 CpG-ODN als Monotherapie

3.1.1 Abhängigkeit des Therapieerfolges vom Injektionsort

Es wurde untersucht, ob eine *in vivo* Gabe von CpG-ODN einen antitumoralen Effekt zeigt. In einem von meinen Vorgängern durchgeführten prophylaktischen Ansatz wurde Mäusen sieben Tage vor Tumorinduktion subkutan CpG-ODN 1826 (100 µg) injiziert. Die Injektion von CpG-ODN führte zu einer leichten Verlangsamung des Tumorwachstums. Das Tumorwachstum wurde weiter vermindert, wenn die Vakzine aus CpG-ODN und bestrahlten Tumorzellen (100 Gy) bestand. Auch bei diesem Versuchsansatz blieben nur 2 von 8 Mäusen tumorfrei, was die Aggressivität des verwendeten Tumormodells zeigt. Das in den prophylaktischen Ansätzen verwendete Tumormodell mit subkutanen C26-Tumoren wurde in den folgenden Experimenten weiterhin verwendet.

Im Allgemeinen ist es einfacher, einen Schutz vor Tumoren als eine erfolgreiche Behandlung etablierter Tumoren zu erreichen. Im Gegensatz dazu und zu den oben erwähnten Experimenten mit CpG-ODN in der Prophylaxe von Tumoren zeigte sich in den folgenden Experimenten bei einer Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich etablierter Tumoren eine hohe therapeutische Wirksamkeit.

Fünf Tage nach Induktion eines C26-Tumors wurde einmal wöchentlich 100 µg CpG-ODN jeweils zusammen mit oder ohne bestrahlte Tumorzellen injiziert. Bei Mäusen, denen CpG-ODN in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke (kontralateral) injiziert wurde, zeigte sich nur eine leichte Reduktion des Tumorwachstums. Dabei war es unabhängig, ob bestrahlte C26-Zellen als zusätzliches Antigen koinjiziert wurden oder nicht. Im Gegensatz dazu führte die alleinige Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich (peritumoral) zu einer kompletten Tumorregression bei 17 von 20 Mäusen.

Die Tumoren der Mäuse, die später den Tumor abstießen, wuchsen bis zu einer Durchschnittsgröße von 16 mm² an Tag 17, bevor die Tumorgröße zurückging und die Tumoren schließlich verschwanden. Eine zusätzliche Injektion von bestrahlten

Tumorzellen führte bei peritumorale Behandlung nicht zu einer Verbesserung der Therapie. Dies zeigt, dass zusätzliches exogen appliziertes Tumorantigen bei peritumorale CpG-ODN-Behandlung nicht notwendig ist. Es zeigt sich auch, dass sich die peritumorale Behandlung nicht durch eine vom Tumor entfernte Immuninduktion durch die Kombination von CpG-ODN mit Antigen ersetzen lässt (Abb. 4).

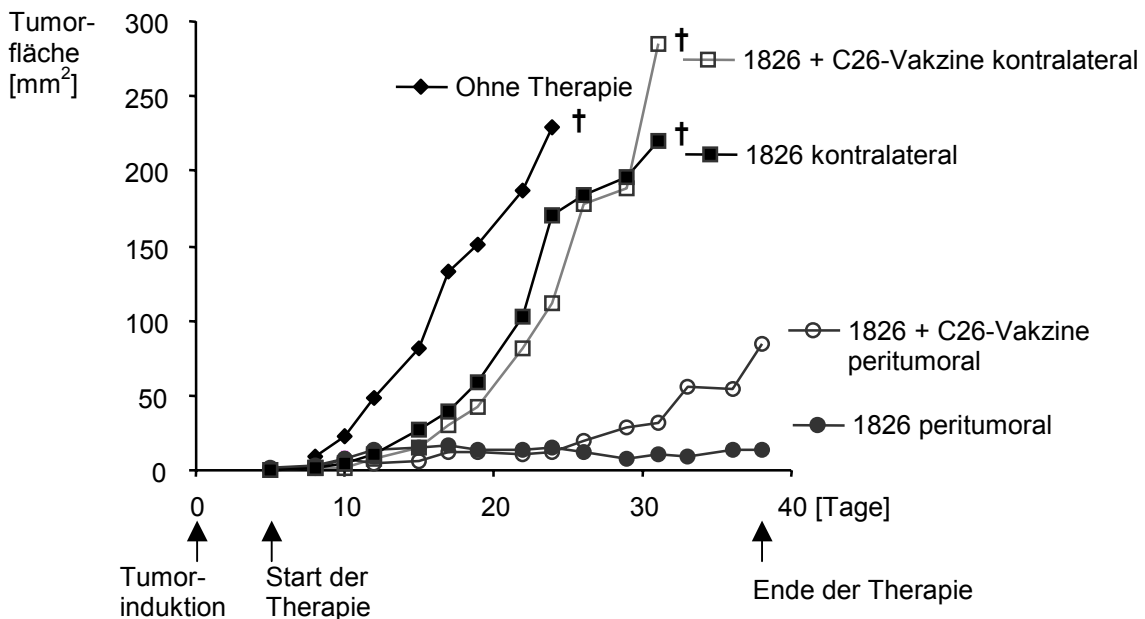


Abb. 4 Peritumorale CpG-ODN-Gabe führt zur Tumorregression. Mäusen wurden Tumoren an Tag 0 induziert. Beginnend an Tag 5 wurde den Tieren wöchentlich CpG-ODN oder CpG-ODN zusammen mit bestrahlten C26-Zellen injiziert. Die durchschnittliche TumorgroÙe ist bis zu dem Tag, an dem das erste Tier einer Gruppe starb, bzw. bis zum Therapieende an Tag 38 aufgetragen. Mäuse wurden mit peritumorale Injektion von CpG-ODN (●, $n = 20$), mit peritumorale Injektion von CpG-ODN und bestrahlten C26-Zellen (○, $n = 7$), mit kontralaterale Injektion von CpG-ODN (■, $n = 6$), oder mit kontralaterale Injektion von CpG-ODN und bestrahlten C26-Zellen (□, $n = 7$) therapiert. Unbehandelte Mäuse (◆, $n = 19$) dienten als Kontrollgruppe.

Nach Ende der Therapie an Tag 38 wurde das Überleben der Mäuse bis mindestens zum Tag 100 beobachtet. In der Gruppe der unbehandelten Mäuse starben 18 von 19 Mäusen. In der Gruppe der Mäuse mit peritumorale CpG-ODN-Behandlung überlebten 17 von 20 Mäusen.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die Effektivität der kontralateralen Therapie zu verbessern. Hierzu wurde zusätzlich kontralateral zu CpG-ODN mGM-CSF injiziert, was die Menge an DC-Vorläuferzellen in der dem Tumor gegenüberliegenden Flanke erhöht.

Murine und humane DC gehen *in vitro* wie auch *in vivo* nach Kontakt mit Tumoren in Apoptose ⁶¹. Die Injektion von CpG-ODN zusammen mit bestrahlten, nicht teilungsfähigen Tumorzellen und mGM-CSF in die dem Tumor gegenüberliegende Seite sollte die Aktivierung von DC in nicht unmittelbarer Tumornähe ermöglichen. Dadurch sollte die die DC hemmende Tumorumgebung umgangen werden. Im Gegensatz zu Liu et al. , die eine verstärkte prophylaktische Immunantwort von CpG-ODN in Kombination mit GM-CSF in einem murinen Lymphom bekamen ⁶², zeigte sich in dem therapeutischen Ansatz keine Verbesserung, sondern eine leichte Verschlechterung der CpG-ODN-Therapie durch zusätzliche Gabe von 100 U mGM-CSF. Zusätzliches mGM-CSF zeigte bei kontralateraler CpG-ODN-Injektion bei einem späten Einsatz der Vakzine nach 10 Tagen keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren (in beiden Gruppen starben innerhalb von 36 Tagen alle behandelten Tiere). Wurde mGM-CSF peritumoral mit CpG-ODN koinjiziert, entwickelte sich bei einer von fünf Mäusen ein starkes Tumorstadium, wohingegen es in der Vergleichsgruppe ohne mGM-CSF bei allen Tieren zu einer Tumorregression kam.

Abhängig vom Zahlenverhältnis von apoptotischen Zellen zu DC kann es zu einer Aktivierung oder einer Suppression von DC kommen. Um als Gefahr erkannt zu werden, müssen sich apoptotische Zellen in relativem Überschuss in der Mikroumgebung der DC befinden. Wenige apoptotische Zellen in der Mikroumgebung von DC führen nicht zu deren Aktivierung ⁶³. In keinem Experiment ergab die Zugabe von einem Anteil apoptotischer C26-Zellen zu einer CpG-ODN-Injektion eine verbesserte Immunantwort. Die verwendeten C26-Zellen erwiesen sich als stark apoptoseresistent gegen Hitze- und UV-Behandlung. Erst bei einer dreistündigen Hitzebehandlung bei 43°C zeigten 10 % der Zellen eine für apoptotische Zellen charakteristische

Membranveränderung. Der Nachweis erfolgte durch eine FACS-Analyse der Annexin/PI-gefärbten Zellen. Das Ausbleiben einer effizienten Immunantwort bei zusätzlicher Injektion apoptotischer Zellen könnte also abhängig von der geringen Zahl der apoptotischen Zellen sein. Eine mögliche Suppression durch die apoptotischen Zellen oder deren mögliche therapeutische Wirkung bei einem günstigeren Verhältnis von apoptotischen Zellen zu DC wurde wegen den anfänglich enttäuschenden Ergebnissen nicht weiter untersucht.

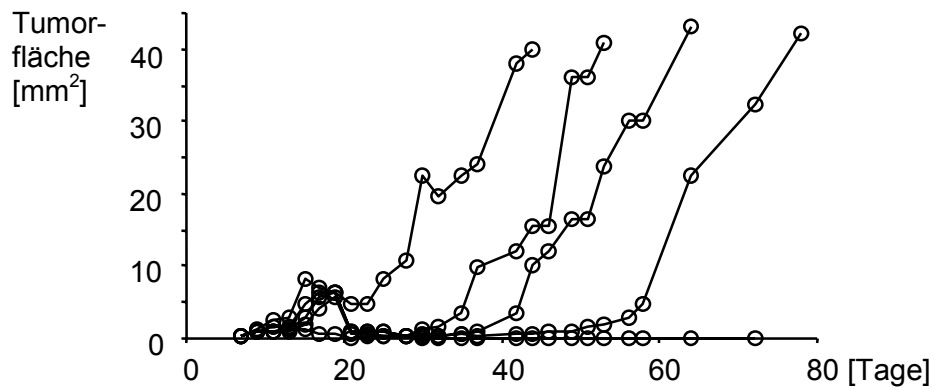
3.1.2 Verminderung einer Immunantwort durch IL-2

Peritumoral appliziertes IL-2 induziert die Produktion von IFN- γ und zeigte in einem von Vaage durchgeführten Versuch nahezu gleiche therapeutische Effekte wie peritumoral appliziertes IFN- γ , des Weiteren ließ sich die Aktivität von peritumoralem IL-2 durch Antikörper gegen IFN- γ blockieren⁶⁴. Es stellte sich daher die Frage, ob durch Injektionen von IL-2 eine CpG-ODN-Therapie verbessert werden kann. Im Gegensatz zu mGM-CSF, wurde bei einer versuchten zusätzlichen Stimulation durch IL-2 nicht nur wie mit mGM-CSF keine Ergebnisverbesserung erzielt, sondern ein starker Trend zur Therapieverschlechterung festgestellt. In zwei Versuchen wurde einer Gruppe Mäuse zusätzlich zu einer wöchentlichen Injektion mit CpG-ODN, bestrahlten C26-Zellen und mGM-CSF täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen 4.000 IU IL-2 in 100 μ l PBS injiziert. Während 7 von 10 Mäusen nach der Behandlung ohne IL-2 tumorfrei blieben, starben in der zusätzlich mit IL-2 behandelten Gruppe 7 von 10 Mäusen. Die Einzeltiere eines Versuches einer nur mit CpG-ODN behandelten Kontrollgruppe und der zusätzlich mit IL-2 behandelten Gruppe sind in Abbildung 4 aufgetragen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang trotz des nicht signifikanten Unterschiedes ($p = 0,08$) bei den beiden Gruppen zumindest der Therapieverlauf der einzelnen Mäuse sowie das verspätete, dann aber schlagartige Wachstum der Tumoren. Das verspätete Auftreten von Tumoren ist nicht auf das Verschleppen von Tumorzellen durch die IL-2 Injektion zu erklären, da die Injektionsnadeln bei jedem Tier gewechselt wurden. Allerdings

erhielten in dieser Studie die Mäuse, denen eine wöchentliche Injektion von CpG-ODN, bestrahlten C26-Zellen und GM-CSF verabreicht wurde, nicht 10-mal PBS injiziert und wurden somit auch nicht 10-mal narkotisiert. Auf die Gabe von PBS wurde hier verzichtet, da mit dieser Gruppe der Einfluss einer kombinierten Gabe von mGM-CSF und apoptotischen Zellen auf die CpG-ODN-Therapie untersucht wurde (Daten nicht gezeigt). Auch wenn eine erhöhte Stressinduktion, ein Verschleppen von Tumorzellen oder sonstige Belastung durch die Isofluran-Narkose unwahrscheinlich erscheint, muss bei Interesse an einer Evaluierung dieser Ergebnisse die ideale Kontrollgruppe getestet werden.

a)



b)

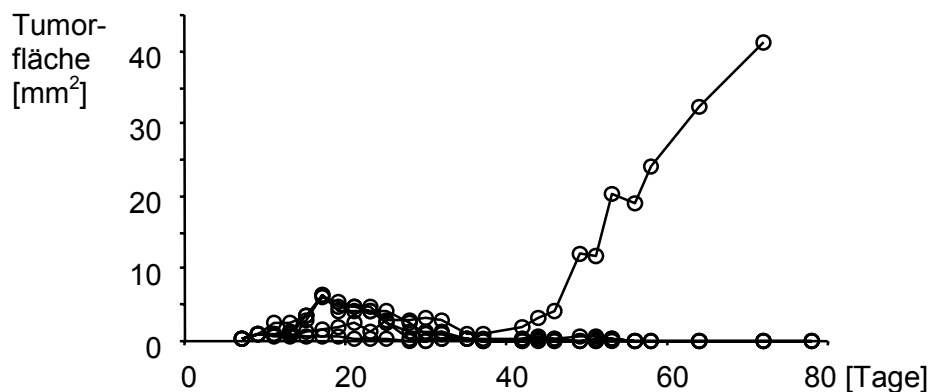


Abb. 5 Mäusen wurden Tumoren an Tag 0 induziert. Beginnend an Tag 5 wurde den Tieren wöchentlich CpG-ODN, bestrahlte C26-Zellen und mGM-CSF injiziert. a) Tiere erhielten von Tag 9 bis Tag 18 IL-2 peritumoral injiziert. b) keine zusätzliche Gabe von IL-2.

Da die Fragestellung der Interaktion von IL-2 und CpG-ODN nicht den Fokus dieser Arbeit bildete, wurde dieses Thema nicht weiter bearbeitet. Vielleicht hat sich in der Evolution bereits ein optimiertes Wechselspiel der Zytokine zur Abwehr eines Erregers entwickelt, sodass weitere Stimuli eine Immunhemmung bewirken können. Die ebenso gezeigte, wenn auch sehr leichte Verschlechterung der CpG-ODN-Therapie in Kombination mit mGM-CSF sowie mit apoptotischen Zellen (Kapitel 3.1.1) verdeutlicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen Abwägung von kombinierten Therapien bei der Behandlung des Menschen. Besonders im Hinblick auf die sich in der Klinik befindlichen Interleukine sollte für eine Kombination mit CpG-ODN dieser Punkt berücksichtigt werden.

3.1.3 Intrazelluläres CpG-ODN in Tumorzellen

DC transferieren die Signale, die sie von Ihrer Umgebung erhalten, zu den Zellen des adaptiven Immunsystems. Durch mechanische Methoden, wie dem Einsatz von Elektroporation oder von Schockwellen ist es möglich, die Konzentration von CpG-ODN in der Zelle zu erhöhen. Es galt herauszufinden, ob sich durch die gleichzeitige Gabe von bestrahlten und mit CpG-ODN beladenen Tumorzellen die antitumorale Wirkung von CpG-ODN verbessern lässt. Versuche mit FITC-markierten ODN zeigten allerdings, dass durch Elektroporation keine ausreichende Aufnahme der ODN zu erreichen war. Als Alternative zur Elektroporation wurde ein Schockwellengerät der Firma Dornier Medtech verwendet, das zurzeit in der Entwicklung ist. Durch Versuche von Frau Dr. Tschöp in der Abteilung für Klinische Pharmakologie konnte gezeigt werden, dass bei Anwendung von Schockwellen FITC-Dextran eine ähnliche Aufnahmekinetik aufweist wie FITC-markierte ODN⁶⁵. Wir verwendeten daher das kostengünstigere FITC-Dextran auf der Suche nach der besten Möglichkeit, die Menge an intrazellulärem CpG-ODN in den C26-Tumorzellen bei akzeptabler Überlebenszahl zu erhöhen. Bei optimaler Einstellung (Daten siehe Material und Methoden) ließ sich eine ca. 15fache Aufnahmesteigerung von FITC-Dextran erreichen, ohne die Zellen stark zu schädigen (Abbildung 6). Nach der Schockwellenaufnahme zeigten in allen Experimenten mehr als 90 %

der Zellen eine intakte Membranstruktur, was anhand einer Trypanfärbung mikroskopisch gezeigt wurde.

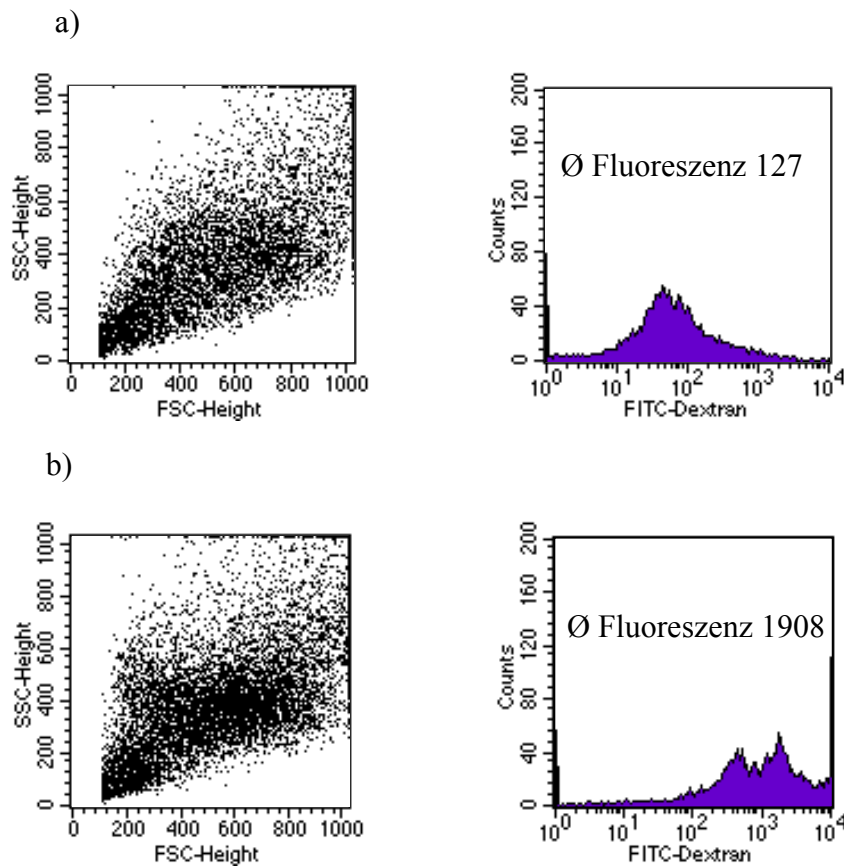


Abb. 6 Die Applikation von Schockwellen führte zu einer Akkumulation von FITC-Dextran in behandelten Zellen. Rechts ist die mittlere Fluoreszenzintensität dargestellt. Links lässt sich ein kaum verändertes Bild in der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung erkennen. Tote Zellen wären als größere Population an Zelltrümmern mit geringer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung zu beobachten.

a) Nicht mit dem Schockwellengerät behandelte C26-Zellen

b) bei 1000 Pulsen (2 Hz) mit einer Intensität von 9 (gerätespezifisch) ließ sich mittel FACS eine Fluoreszenzsteigerung um das 15fache feststellen. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge des intrazellulären FITC-Dextrans.

C26-Zellen waren im Vergleich zu anderen Zellen sehr robust bei der Schockwellenbehandlung. Die Zellzählung ergab einen Verlust von ca. 40% der ursprünglichen Zellzahl.

DC sind in der Lage, durch Internalisierung von "apoptotic bodies" eine T-Zell-Aktivierung oder deren funktionelle Blockade zu bewirken⁶³. Durch die Hitzebehandlung sollte ein Teil der C26-Zellen in Apoptose gehen und als „apoptotic bodies“ von DC aufgenommen werden. Die Beladung der C26-Zellen mit CpG-ODN sollte bei der Aufnahme der apoptotischen C26-Zellen zu einer Stimulierung des Immunsystems führen. Es konnte jedoch keine Steigerung der Immunstimulation durch eine Beladung von hitzebehandelten Tumorzellen mit CpG-ODN beobachtet werden. Dieselben Ergebnisse wurden mit bestrahlten, nicht hitzebehandelten Zellen erzielt. Da der TLR9 im Zellinneren lokalisiert ist, überrascht diese Beobachtung. Aufgrund der negativen therapeutischen Ergebnisse wurde diese Therapierichtung nicht weiter verfolgt.

3.1.4 Induktion einer systemischen Immunantwort

3.1.4.1 Regression peripherer Tumoren

Die Rückbildung bis zum vollständigen Verschwinden etablierter Tumoren, sowie das Langzeitüberleben von Mäusen nach peritumorale CpG-ODN-Behandlung ließen auf die Entwicklung einer systemischen Antitumor-Antwort schließen. Um diese Hypothese zu testen wurde Mäusen C26-Zellen in beide Flanken induziert. Fünf Tage nach Tumorinduktion wurde CpG-ODN in den Tumorrandbereich des linken Tumors injiziert, der rechte Tumor blieb unbehandelt. Wie aufgrund vorheriger Befunde erwartet, verschwand der Tumor auf der mit CpG-ODN behandelten Seite nach anfänglichem Anstieg der Tumorgroße (Abb. 7).

Es sprach jedoch auch der Tumor auf der nicht behandelten Flanke auf die Behandlung an. Dies zeigt, dass der Mechanismus, der für die Hemmung des Tumorwachstums auf der behandelten Seite verantwortlich ist, auch auf der unbehandelten Seite aktiv ist. Alle Mäuse mit Tumoren auf beiden Flanken und peritumorale CpG-ODN-Behandlung nur eines Tumors überlebten bis zum Ende der Therapie an Tag 38. Bei 11 von 16 behandelten Mäusen kam es zu einer vollständigen Regression der Tumoren, im Gegensatz zu der mit nur

einem Tumor induzierten Kontrollgruppe, in welcher 18 von 19 Mäusen bis Tag 38 starben.

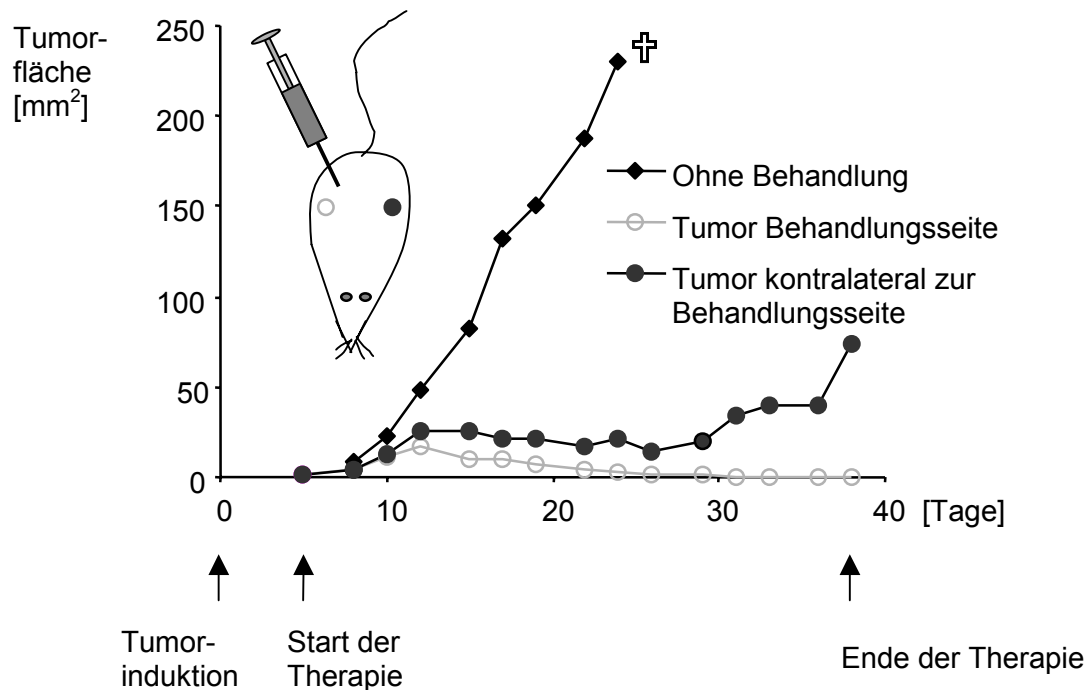


Abb. 7 Tumoren wurden in beiden Flanken induziert. Die Therapie erfolgte auf der rechten Flanke ($n = 16$). Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tiere (◆, $n = 19$). Aufgetragen ist die durchschnittliche TumorgroÙe der Tumoren der rechten (○) und der linken Flanke (●).

Eine systemische, antitumorale Immunantwort benötigt ein Tumorantigen. In einem weiteren Experiment wurde deshalb versucht, das am CpG-ODN-Injektionsort vorhandene Tumorantigen des behandelten teilungsfähigen Tumors durch bestrahlte teilungsunfähige C26-Zellen zu ersetzen. Wurde eine Vakzine aus CpG-ODN und bestrahlten Tumorzellen in die tumorfleie Flanke einer Maus mit nur einem Tumor (und so der halben Tumormasse) koinjiziert, zeigte sich nur eine geringe Erhöhung der Überlebenszeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen. Keine der fünf Mäuse, die neben der CpG-ODN-Injektion bestrahlte C26-Zellen als Antigen koinjiziert bekamen, lebte länger als 50 Tage nach Tumorinduktion (Abbildung 8).

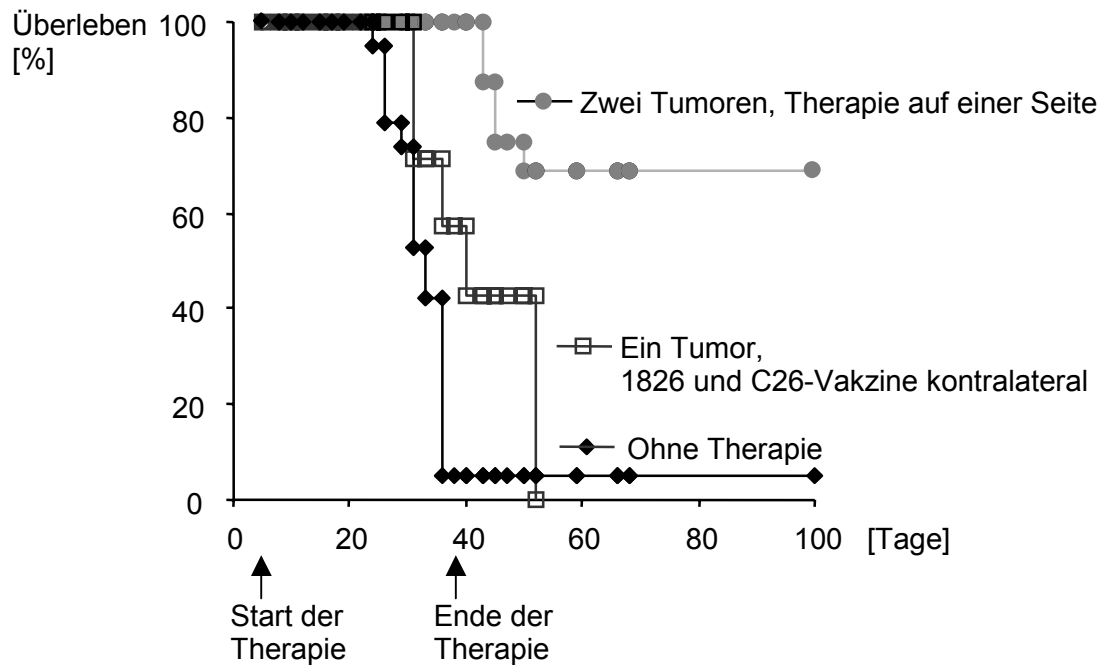


Abb. 8 Kaplan-Meier Kurve. Tumoren wurden in beiden Flanken induziert und eine Flanke mit CpG-ODN behandelt (●, $n = 16$). Alternativ wurde ein Tumor in einer Flanke induziert und die gegenüberliegende Flanke mit CpG-ODN und bestrahlten C26-Zellen behandelt (□, $n = 5$). Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tiere (◆, $n = 19$).

In diesem Modell musste CpG-ODN für die Entwicklung einer effektiven systemischen Immunantwort in der Nähe lebender Tumorzellen induziert werden. Dieses Modell zeigt, dass das lebende Tumorgewebe nicht einfach durch bestrahlte C26-Zellen als antigenliefernde Zellen ersetzt werden kann, und dass die peritumorale CpG-ODN-Behandlung eine systemische Immunantwort induziert, die sowohl gegen lokale Tumoren als auch gegen Tumoren, die von der Behandlungsstelle entfernt liegen, effektiv ist.

In einem zweiten Tumormodell wurden subkutan Renca-Zellen injiziert um festzustellen, ob der Therapieerfolg von CpG-ODN möglicherweise auf C26-Tumoren beschränkt ist. Nach Injektion von 2×10^5 Renca-Zellen wurden die Mäuse mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN wöchentlich, beginnend 5 Tage nach Tumorinduktion, behandelt. Zu diesem Zeitpunkt bildeten sich wie bei dem Tumormodell mit C26-Zellen bei über der Hälfte der untersuchten Tiere gut

tastbare Tumoren. Ohne Behandlung starben 11 von 13 Mäusen (= 85%), während in der Gruppe mit den CpG-ODN-behandelten Mäusen nur 3 von 16 Mäusen starben (= 19 %). Dieser Unterschied ist hoch signifikant ($p = 0,001$). Für das Tumormodell mit Renca-Zellen zeigte sich jedoch eine erhöhte Variabilität im Tumorwachstum innerhalb eines Versuchs. Ferner blieben mit 3 von 16 Mäusen deutlich mehr Mäuse tumorfrei als bei dem auf C26-Zellen basierenden Tumormodell.

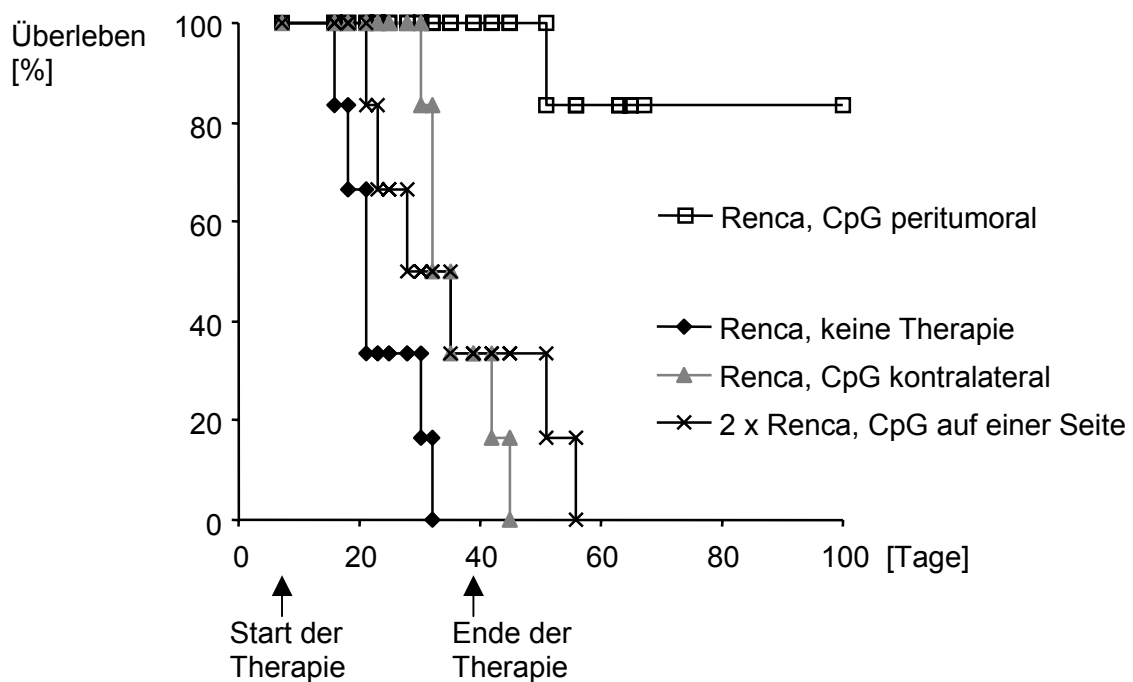


Abb. 9 Kaplan-Meier Kurve. Renca-Tumoren wurden in beiden Flanken induziert und nur eine Flanke mit CpG-ODN injiziert (x, $n = 6$). Alternativ wurde ein Renca-Tumor in einer Flanke induziert und peritumoral (\square , $n = 6$) oder kontralateral (\blacktriangle , $n = 6$) CpG-ODN injiziert. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tiere (\blacklozenge , $n = 6$).

Wurden der systemische Effekt einer peritumoralen CpG-ODN-Therapie untersucht und zwei Renca-Tumoren induziert, ließ sich das Ergebnis einer Tumorabstoßung des gegenüberliegenden Tumors nicht wiederholen (Abbildung 9).

Dies lässt vermuten, dass die Art des Tumors, bzw. die Art der Tumorabstoßung bei der Entwicklung einer erworbenen Immunantwort zu berücksichtigen ist.

3.1.4.2 Induktion einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort

Um eine erworbene, lang anhaltende Immunantwort nachzuweisen, wurde Mäusen, die einen C26- oder einen Renca-Tumor während der peritumoralen CpG-ODN-Behandlung abgestoßen hatten und für mehr als 3 Monate tumorfrei geblieben waren, erneut subkutan 2×10^5 C26- oder Renca-Tumorzellen injiziert. Diese Mäuse blieben ohne weitere Behandlung. In der Gruppe mit den Mäusen, die die C26-Tumoren abgestoßen hatten und erneut C26-Tumorzellen injiziert bekamen, überlebten 88 % der Mäuse (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu waren Mäuse, die einen Renca-Tumor abstießen, nicht gegen eine erneute Tumorbildung nach Injektion von C26-Zellen geschützt.

Aufgrund der festgestellten Gedächtnisantwort wurde der Einfluss von CD4- und CD8-positiven Zellen untersucht. Durch die *in vivo* Depletion von CD4- und CD8-Zellen mit CD4- und CD8-spezifischen Antikörpern bei jeweils vier Versuchstieren sollte untersucht werden, ob und welche T-Zellen für die Tumorregression erforderlich sind. Bei einer *in vivo* Depletion von CD4-Zellen bei wöchentlicher CpG-ODN-Behandlung wurde 20 Tage nach Tumorinduktion eine durchschnittliche Tumorgroße von $0,5 \text{ mm}^2$ gemessen. Diese Tumoren wurden zwei Monate nach Tumorinduktion vollständig abgestoßen. In CD8-depletierten Mäusen zeigte sich 20 Tage nach Tumorinduktion eine Tumorgroße von $18 \pm 6 \text{ mm}^2$. Alle CD8-depletierten Mäuse starben trotz CpG-ODN-Therapie. Beim Tod der ersten CD8-depletierten Maus am Tag 28 zeigte sich 7 Tage nach der letzten Antikörpergabe eine Depletion der CD8-Zellen von 90%.

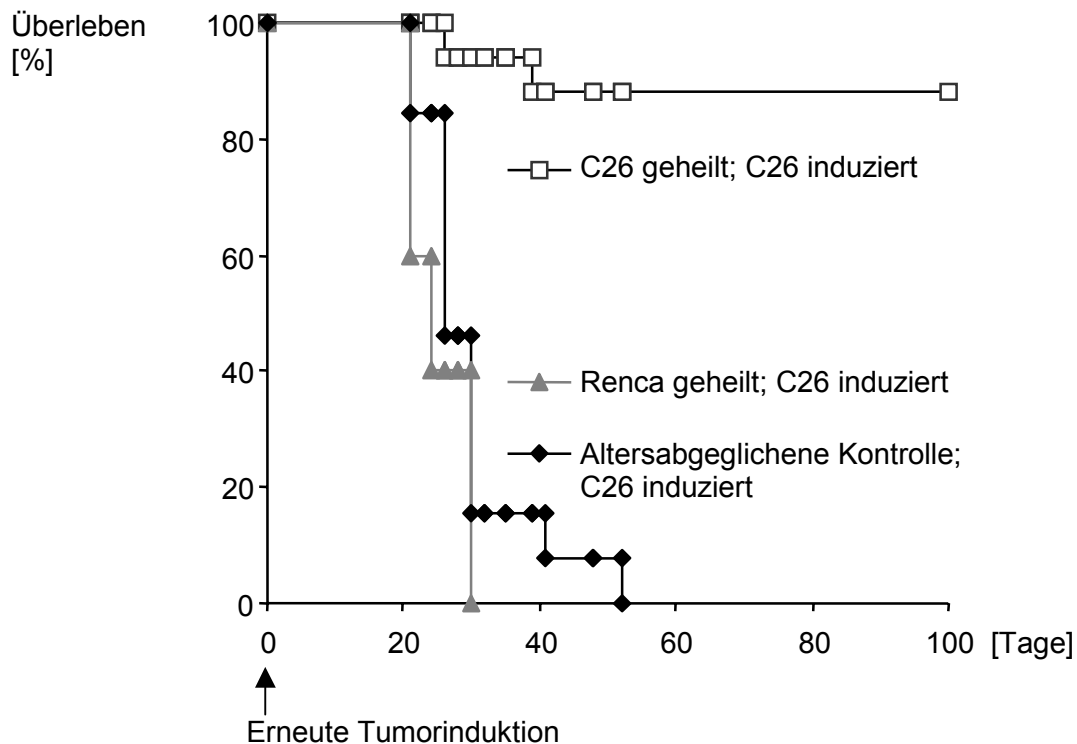


Abb. 10 Peritumorale CpG-ODN-Behandlung führt zu lang anhaltendem Schutz gegenüber erneuter Tumorinduktion. Mäuse die durch peritumorale CpG-ODN-Behandlung von einem C26-Tumor (□, $n = 17$) oder von einem Renca-Tumor (▲, $n = 5$) geheilt worden waren, wurden zwei Monate nach Therapieende erneut einer Injektion mit C26-Zellen unterworfen. Dabei erfolgte keine weitere Behandlung. Als Kontrollgruppe dienten noch nicht mit einem Tumor in Berührung gekommene unbehandelte, gleich alte Mäuse (◆, $n = 13$). Sie bekamen ebenfalls C26-Tumoren induziert. Das Überleben der Mäuse nach erneuter Tumorinduktion wurde über 100 Tage verfolgt.

Der Beginn der Depletion der T-Zellen erfolgte jeweils einen Tag vor der ersten CpG-ODN-Therapie. Dies lässt vermuten, dass CD4-Zellen zum Zeitpunkt der CpG-ODN-Behandlung nicht mehr für den therapeutischen Erfolg erforderlich sind. Dieses Ergebnis muss jedoch in weiteren Versuchen mit einer höheren Antikörperkonzentration bestätigt werden. Die Menge an Antikörpern, die für den Versuch eingesetzt werden konnte, war begrenzt und lag im unteren möglichen Bereich. Eine FACS-Messung an einem Tier zeigte, dass sich keine vollständige Depletion, sondern nur eine Depletion von 90 % der CD4-Zellen im

Blut und in der Milz erreichen ließ. Dies wirft die Frage auf, ob die verbleibenden 10% der CD4-Zellen für die Immunantwort erforderlich sind. Ein weiterer Diskussionspunkt bei der Depletion ist der Depletionszeitpunkt. Aufgrund der Limitierung an CD4-Antikörpern konnte nicht ermittelt werden, ob ein Kontakt von CD4-Zellen mit Tumorantigenen vor einer CpG-ODN-Behandlung für eine spätere erfolgreiche Immuntherapie erforderlich ist.

In einem Versuch wurden aus der Milz einer Maus, die zuvor C26-Tumoren abstieß, CD4- und CD8-positive Zellen entnommen und mit bestrahlten C26-Zellen weiterkultiviert. Diese Zellen wurden später in der Therapie eingesetzt. Die Zellen wurden 5 Tage nach Tumorinduktion in die Schwanzvene injiziert. Die antitumorale Wirkung von CD8-Zellen ließ sich nicht bestätigen. Drei von drei Mäusen starben sowohl in der Kontrollgruppe wie auch in der Gruppe, die *in vitro* kultivierte CD4-Zellen injiziert bekam. Zwei von drei Mäusen starben trotz Injektion von CD8-Zellen. Es wurde nicht näher untersucht, ob die niedrige Effektivität von intravenös injizierten CD8-positiven Zellen auf der fehlenden Aktivierung dieser Zellen oder auf anderen Mechanismen beruhte.

Sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* Versuche zeigten, dass während einer CpG-ODN-Therapie CD4-Zellen voraussichtlich keinen großen Einfluss auf die Immunantwort ausübten. Auch wenn die Rückinjektion von CD8-positiven Zellen nicht zu einer Tumorregression führte und somit nicht gezeigt werden konnte, dass CD8-positive Zellen allein für eine Tumorantwort ausreichend sind, zeigte die Depletion von CD8-Zellen, dass eine peritumorale CpG-ODN-Behandlung zu einer antigenspezifischen systemischen CD8-abhängigen T-Zell-Antwort führt.

Mäuse, die eine peritumorale CpG-ODN-Behandlung erhielten, bildeten also eine antigenspezifische T-Zell-Antwort mit lang anhaltendem immunologischem Gedächtnis. Mäuse, die C26-Tumoren nach CpG-ODN-Behandlung abgestoßen hatten, bildeten außerdem kein immunologisches Gedächtnis gegen eine Injektion mit Renca-Zellen aus. Eine weitere Beobachtung ist, dass es bei Mäusen, die Renca-Tumoren abstießen und nach zwei Monaten C26-Tumoren induziert bekamen, zu keiner Verlangsamung des Tumorwachstums

kam. Daher ist eine unspezifische, therapeutisch relevante Stimulierung des Immunsystems durch z.B. eine mögliche Akkumulation von CpG-ODN zum Zeitpunkt der erneuten Tumorinduktion auszuschließen.

Wurde Mäusen, die Renca-Tumoren nach einer CpG-ODN-Behandlung abgestoßen hatten, nach mehr als 3 Monaten erneut Renca-Tumoren injiziert, zeigte sich in diesem Modell keine lang anhaltende Immunität. Es kam weder zu einer größeren Anzahl an überlebenden Mäusen, noch zu einer Reduktion des Tumorwachstums. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.3, bei denen die Behandlung eines Renca-Tumors bei Mäusen, die Renca-Zellen in zwei Flanken injiziert bekamen, im Gegensatz zu C26 nicht zu einer Heilung des gegenüberliegenden Tumors führte. Bei einer Injektion der Renca-Tumoren mit CpG-ODN lässt sich bei diesen Versuchen somit keine adaptive Immunantwort feststellen.

3.1.5 Aktivierung der angeborenen Immunantwort

3.1.5.1 Tumorunspezifische Effekte bei der Tumorregression

Um den Einfluss der durch die Behandlung von C26-Tumoren induzierten Immunantwort auf einen unspezifischen Tumor zu untersuchen, wurde in eine Flanke ein C26-Tumor und in die andere Flanke ein Renca-Tumor induziert. CpG-ODN wurde nur in den Tumorrandbereich des C26-Tumors injiziert, nicht jedoch in die gegenüberliegende Flanke mit dem Renca-Tumor. Bei den C26-behandelten Mäusen kam es zu der erwarteten Regression der C26-Tumoren. Auch kam es im Vergleich zu Mäusen, die einen Renca-Tumor induziert bekamen und nur in der dem Tumor gegenüberliegenden Flanke behandelt wurden, zu einer Wachstumsverlangsamung der Renca-Tumoren und zu einer Lebensverlängerung. Dies lässt vermuten, dass die Immunantwort, die für die Regression der C26-Tumoren verantwortlich ist, eine tumorunabhängige Aktivität aufweist, die teilweise effektiv gegen Renca-Tumoren auf der unbehandelten Seite ist. Allerdings ist bei fünf untersuchten Tieren das Ergebnis nicht signifikant und alle Tiere starben trotz CpG-ODN-Behandlung an dem Renca-Tumor.

3.1.5.2 Einfluss von CpG-ODN auf den Plasmaspiegel von IFN- γ und die Expression von ICAM-1 und CD16/CD32 auf hämatopoetischen Zellen

Das angeborene Immunsystem kann durch Effektorzellen zur Tumorlyse beitragen und somit die tumorantigen-spezifische T-Zell-Antwort unterstützen. Auch in Abwesenheit eines Tumorantigens wird durch die Produktion von IFN- γ die Aktivierung der angeborenen Effektorzellen, wie z.B. der NK-Zellen, gesteigert. Der IFN- γ -Spiegel im Serum von unbehandelten und behandelten Mäusen wurde einen Tag nach CpG-ODN-Injektion verglichen. Es wurde zwischen Mäusen, die keine Tumorzellen injiziert bekamen und tumorinduzierten Mäusen unterschieden.

Die Injektion von CpG-ODN in tumorfreien Mäuse erhöhte den Plasmaspiegel von IFN- γ im Vergleich zu unbehandelten tumorfreien Kontrollmäusen (69 pg/ml mit CpG-ODN vs. 16 pg/ml Kontrolle; n = 3). Ähnliche Ergebnisse (IFN- γ -Spiegel 53 pg/ml mit CpG-ODN vs. 25 pg/ml Kontrolle; n = 3) wurden bei tumortragenden Mäusen erzielt, die CpG-ODN injiziert bekamen. Als Kontrollgruppe dienten hier tumortragende, unbehandelte Mäuse. Dieses Ergebnis zeigt eine CpG-ODN-abhängige, tumorantigenunabhängige IFN- γ -Produktion und somit eine antigenunabhängige Aktivierung des angeborenen Immunsystems.

Die Veränderungen in der Expression von Oberflächenmarkern der Leukozyten im Blut und in der Milz wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern untersucht. Durch die geringe Zahl an spezifischen T-Zellen im Blut und in der Milz von nicht T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen konnten in den Versuchen antigenspezifische T-Zellen nicht von unspezifischen T-Zellen unterschieden werden. Die Anfärbung über eine Tetramerfärbung war aufgrund des Mangels an spezifischen Antikörpern für die bei C26 bekannten Antigene nicht möglich.

In dem C26-Tumormodell änderte sich bei Gabe von CpG-ODN die Expression von ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1 auch CD54) und CD16/CD32 signifikant.

Die zweimalige Gabe von je 100 µg CpG-ODN führte in Leukozyten aus dem Blut in 3 von 4 und in Milzzellen in 7 von 7 FACS-Messungen zu einer Erhöhung der ICAM-1 Expression (s. Tabelle 1). Ausgewertet wurde die mittlere Fluoreszenzintensität, da eine Grundexpression von ICAM-1 auf Endothelzellen, B-Zellen, T-Zellen und Monozyten vorhanden ist. Die CpG-ODN-Therapie konnte somit nur zu einer Steigerung der bereits vorhandenen Expression führen und eine Unterscheidung von positiven oder negativen Zellen konnte somit nicht erfolgen.

	Kontrollmaus ohne Tumor	Tumortragende Kontrollmaus	Kontrollmaus + CpG	Tumortragende Maus + CpG
Blut	1 (n = 4)	1,1 (n = 1)	- (n = 0)	2,1 (n = 4)
Milz	1 (n = 7)	1,1 (n = 1)	1,6 (n = 1)	2,5 (n = 7)

Tabelle 1 CpG-ODN führt zu einer Erhöhung der ICAM-1-Expression in Leukozyten und Milzzellen. In der Tabelle ist die x-fache Erhöhung der ICAM-1-Expression im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne Tumor aufgetragen.

Neben der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 zeigte sich durch CpG-ODN eine signifikante Steigerung der Expression der Fc-Rezeptoren CD16/CD32. Es werden drei Familien von Rezeptoren, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16), für die Erkennung der konstanten IgG-Region unterschieden ⁶⁶. Durch die Erkennung der IgG-Antikörper auf Tumorzellen können NK-Zellen zu einer Lyse von Tumorzellen führen, ein Vorgang, der als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bezeichnet wird. Die ADCC wird ausgelöst, wenn auf der Oberfläche der Zelle gebundene Antikörper mit CD16 auf einer NK-Zelle in Kontakt treten ⁶⁷.

CD45R wird auf B-Zellen in allen Entwicklungsstadien, auf NK-Zellen und nicht-MHC-restringierten zytotoxischen T-Zellen, und auf apoptotischen T-Zellen von Mäusen, denen ein bakterielles Superantigen injiziert wurde, exprimiert ^{68, 69}. Wie bereits in unserer Arbeitsgruppe untersucht, stimuliert CpG-ODN in humanen B-Zellen die Proliferation und die Aufregulation der Oberflächenmoleküle CD86, CD40, CD54 und MHC-II. Dieser Effekt ist direkt und erfordert die Internalisierung der Oligonukleotide ⁷⁰. Als indirekten Effekt ließ sich durch CpG-ODN eine Aktivierung der NK-Zellen und der nicht MHC-II-restringierten T-Zellen beobachten ⁷¹. In dem C26-Modell wurde der Einfluss von CpG-ODN auf die CD16/CD32-Expression in den CD45R-exprimierenden Zellen (CD45R(+)), den B- und NK-Zellen, sowie in den CD45R nicht exprimierenden Zellen (CD45R(-)) untersucht. Unterschiede in der CD16/CD32-Expression zwischen tumorinduzierten und nicht tumorinduzierten Mäusen sollten ermittelt werden.

Die Expression von CD16/CD32 stieg bei den CD45R(+)-Zellen an, die einen relativ hohen Grundwert von 14 % CD16/CD32-positiver Zellen auch ohne CpG-ODN-Gabe aufwies, sowie bei den CD45R(-) Zellen, bei denen erst durch CpG-ODN-Gabe eine Hochregulation von CD16/CD32 erzielt wurde.

	Ohne CpG	Mit CpG
CD45R(+), CD16/CD32(+)	14 %	26 %
CD45R(-), CD16/CD32(+)	3 %	30 %
CD45R(+), CD16/CD32(-)	41 %	21 %
CD45R(-), CD16/CD32(-)	42 %	23 %

Tabelle 2 CpG-ODN führte zu einer Erhöhung der CD16/CD32-Expression in der CD45R(+) und CD45R(-) Gruppe im Blut. Einer nicht tumorinduzierten Maus wurde an Tag 1 und 5 je 100 µg CpG-ODN in PBS injiziert. An Tag 7 wurden die Oberflächenmoleküle per FACS untersucht. Angezeigt ist die prozentuale Häufigkeit an kernhaltigen Zellen im Blut. Tumorinduzierte Mäuse zeigten dasselbe Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

CD16/CD32 wird in T-Zellen nicht exprimiert. Auch die Gabe von CpG-ODN führte bei einem durchgeführten Experiment auf CD3-positiven Zellen wie erwartet nicht zu einer erhöhten CD16/CD32 Expression. CD45R wird nicht auf T-Zellen exprimiert. Im murinen Blut von BALB/c Mäusen sind ca. 20 % der Zellen CD3-positiv. Nach CpG-ODN-Injektion sind somit nahezu nur T-Zellen doppelt negativ für CD45R und CD16/CD32. In der verbliebenen, CD45R-negativen Gruppe der Neutrophilen, Monozyten und Granulozyten wurde CD16/CD32 nach CpG-ODN-Injektion in nahezu allen Zellen hochreguliert.

3.2 Kombinierte Therapie von CpG-ODN und dendritischen Zellen

3.2.1 Verstärkung einer auf dendritischen Zellen basierenden Tumortherapie durch Koinjektion von CpG-ODN

DC werden als potente APC bereits als Adjuvans der Natur in Impfstudien beim Menschen eingesetzt. In ersten Ergebnissen mit auf DC basierenden Studien für die Immuntherapie bei Tumoren induzierte die Behandlung mit DC, die ein Tumorantigen präsentieren, eine signifikante Immunantwort bei geringen Nebenwirkungen ⁷².

In bereits in der Abteilung für klinische Pharmakologie durchgeführten Versuchen wurden C26-Tumoren mit DC therapiert. Durch Kultivierung der DC mit CpG-ODN wurde die Reifung der DC, eine erhöhte IL-12-Ausschüttung und damit eine erhöhte T-Zell-Proliferation induziert. Die mit CpG-ODN aktivierten und mit Antigenen gepulsten DC zeigten eine protektive Immunantwort und bis zu drei Tage nach Tumorinduktion auch eine therapeutische Immunantwort ⁵⁷.

Die Aktivierung einer Th1-Antwort durch eine CpG-ODN-Monotherapie ließ vermuten, dass diese Th1-Antwort unterstützend für eine Therapie mit DC sei. Um diese Hypothese zu testen, wurde Mäusen ausgereifte, mit bestrahlten Tumorzellen kokultivierte und mit CpG-ODN aktivierte DC zusätzlich zu einer CpG-ODN-Therapie injiziert. Bei den injizierten DC wurde routinemäßig vor und nach Aktivierung durch CpG-ODN die Expression der Aktivierungsmarker CD80 und CD86, sowie des Reifemarkers MHC-II mittels FACS gemessen. Der Reifemarker MHC-II wurde bei allen DC durch die Kultivierungsbedingungen hochreguliert, während CpG-ODN erforderlich war, um einen Anstieg der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 zu erhalten (Abb.11). Durch die CpG-ODN-bedingte Reifung kam es zu einer geringen, nicht signifikanten Abnahme der MHC-II-Expression (Daten nicht gezeigt).

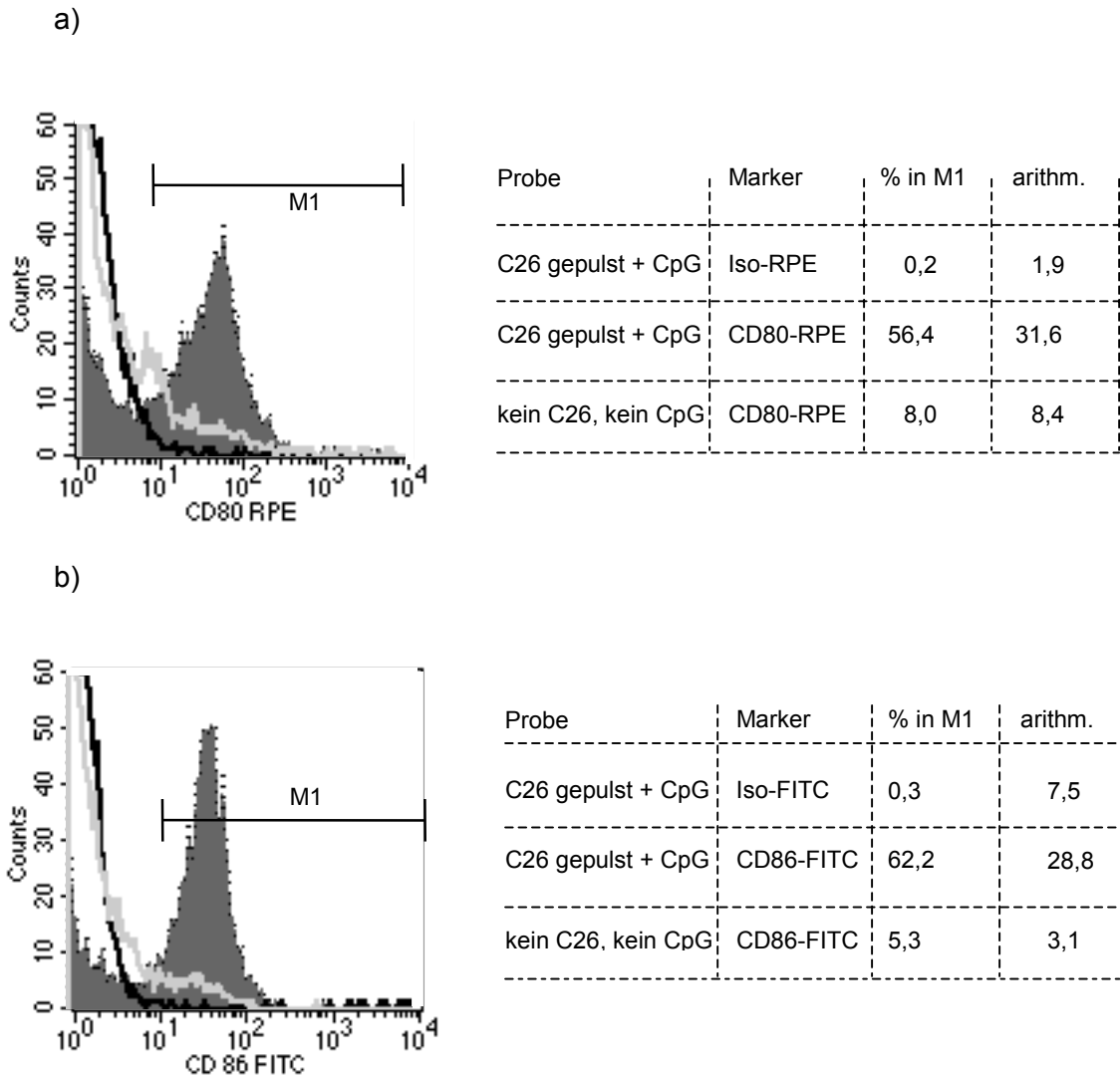


Abb. 11 Die Hintergrundfluoreszenz eines IgG 2a Isotyps für RPE (a) und FITC (b) ist jeweils mit einer schwarzen Linie dargestellt. Die hellgraue Kurve zeigt die Expression von CD80 (a) bzw. CD86 (b) von DC ohne CpG-ODN-Stimulation. Die dunkelgrau gefüllte Kurve zeigt die Expression von CD80 (a) bzw. CD86 (b) bei DC nach 24-stündiger Stimulation mit 6 µg/ml CpG-ODN.

In einem Experiment wurde Mäusen mit bereits etablierten Tumoren (durchschnittliche Tumorgroße = 80 mm²) kontralateral CpG-ODN 1826 (100 µg) oder 2 x 10⁵ mit C26-Zellen gepulste und 24 Stunden mit CpG-ODN 1826 aktivierte DC an Tag 12 und 19 nach Tumorinduktion injiziert. Alternativ wurde kontralateral CpG-ODN und aktivierte DC kombiniert injiziert. Weder die Injektion von CpG-ODN alleine noch die Injektion der aktivierten DC führte zu einer signifikanten Wachstumsverlangsamung der Tumoren. Im Gegensatz zu der alleinigen DC-Behandlung oder der alleinigen CpG-ODN-Behandlung

konnte mit einer Kombination dieser Therapien eine vollständige Inhibierung des Tumorwachstums während der Behandlungszeit erreicht werden.

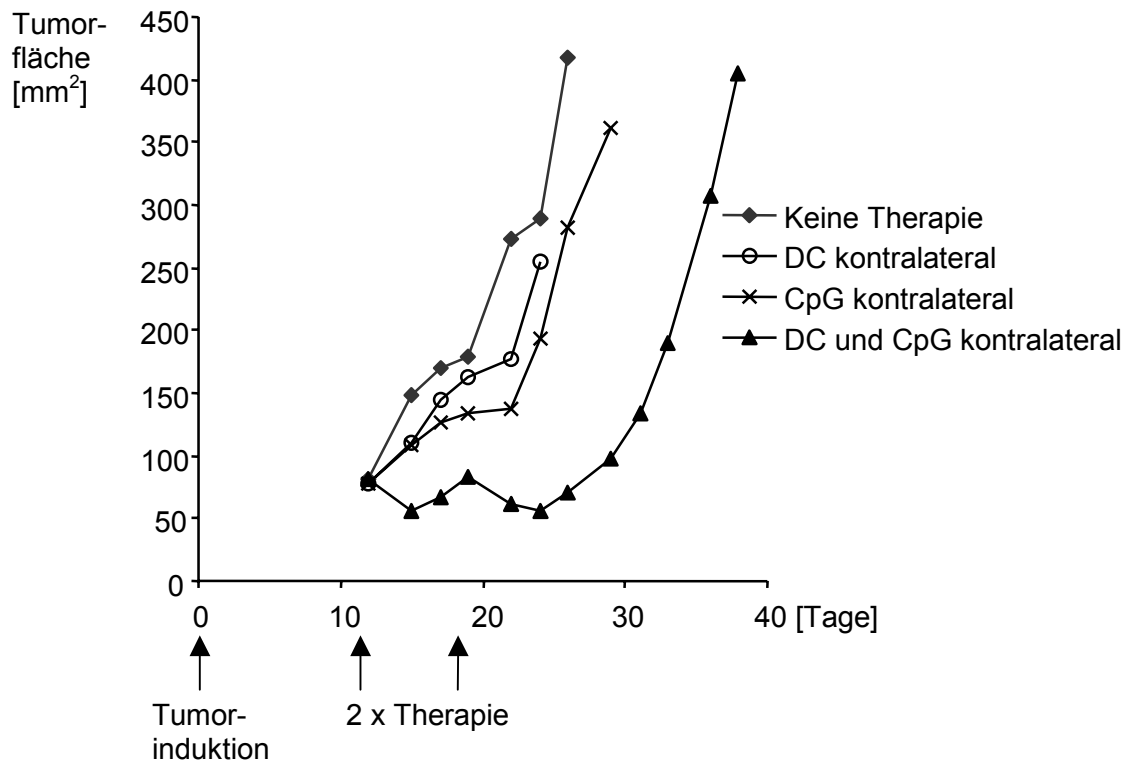


Abb. 12 CpG-ODN 1826 (×, n = 4), mit CpG-ODN aktivierte, antigenbeladene DC (○, n = 5), oder eine Kombination von mit CpG-ODN aktivierten, antigenbeladenen DC plus CpG-ODN (▲, n = 5) wurden kontralateral an Tag 12 und an Tag 17 nach Tumorinduktion injiziert. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tiere (◆, n = 4).

Dieses Experiment wurde mit kommerziell erhältlichem IL-4 (Peprotech) und mGM-CSF (Roche) durchgeführt (siehe Material und Methoden).

3.2.2 Verbesserung der Kombinationstherapie durch lokal appliziertes CpG-ODN

Die Koinjektion von CpG-ODN verbesserte den Antitumoreffekt einer vom Tumor entfernten DC-Vakzinierung. Sie reichte aber nicht aus, um eine Regression großer etablierter Tumoren zu induzieren. Daher sollte untersucht werden, ob eine wöchentliche Gabe einer DC-Vakzinierung über 4 Wochen für eine vollständige Tumorregression ausreichend ist, oder ob die vollständige Tumorregression nicht nur eine längere Behandlung mit DC und CpG-ODN, sondern zusätzlich einen Stimulus im Grenzbereich des Tumors erfordert. In einem Experiment wurden einer Gruppe von Mäusen zu dem bereits beschriebenen Modell einer kontralateralen CpG-ODN/DC-Kombination zusätzlich CpG-ODN in den Randbereich des Tumors injiziert. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien, in denen eine zeitweilige Stasis des Tumorwachstums erreicht wurde, ließ sich bei einer kontralateralen Injektion von CpG-ODN/DC in Kombination mit einer Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich in 5 von 8 Mäusen eine vollständige Tumorregression von Tumoren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von einem Zentimeter erzielen (Abbildung 14).

3.2.3 Erfordernis eines Tumorantigens

Durch CpG-ODN aktivierte DC führen zu einer erhöhten CD80/CD86 Expression und zu einer erhöhten Sekretion von IL-12⁵⁷. Die Expression der MHC-Komplexe ist bei DC um das 10- bis 100fache höher als in anderen APC²⁰, wobei die Hochregulierung der MHC-Komplexe nur bei aktivierten DC erfolgt. Stimulierte DC könnten so durch eine erhöhte Zytokinsynthese und die Hochregulation von Signalmolekülen für die T-Zell-Aktivierung auch ohne Antigen zu einer Veränderung der Immunantwort führen. In lymphoiden Organen werden Antigene von DC den CD4-positiven T-Zellen präsentiert. Diese regulieren eine Vielzahl von Effektoren, wie z.B. CD8-positiv zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und Eosinophile, die alle zu einer protektiven Immunantwort beitragen⁷³. Daher wurde untersucht,

ob mit CpG-ODN stimulierte DC, die nicht mit einem spezifischen Antigen kokultiviert wurden, eine Hemmung des Tumorwachstums bewirken können.

Die therapeutische Wirksamkeit von mit CpG-ODN aktivierten und mit Antigen kokultivierten Zellen ohne eine *in vivo* Gabe von CpG-ODN wurde mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen, um den Effekt dieser DC auf große Tumoren zu ermitteln. Wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben, verbessern CpG-ODN-aktivierte, antigengepulste DC die Wirkung von kontralateral injiziertem CpG-ODN. Um den Anteil des Antigens an der Immunantwort zu messen, wurden drei Gruppen, denen jeweils kontralateral CpG-ODN injiziert wurde, miteinander verglichen. In einer Gruppe wurde nur CpG-ODN ohne DC injiziert. In der zweiten Gruppe wurden mit CpG-ODN aktivierte und mit Renca gepulste DC zusammen mit CpG-ODN kontralateral injiziert, um einen antigenunabhängigen DC Effekt zu untersuchen. In der dritten Gruppe wurden die CpG-ODN-aktivierten DC mit C26-Zellen gepulst, um so einen antigenspezifischen Effekt beobachten zu können.

Die Koinjektion von mit Renca-Zellen kokultivierten DC führte bei einer kontralateralen durchgeführten CpG-ODN-Therapie zu keiner weiteren Verlangsamung des Tumorwachstums (Abb. 13). Wie in dem in Abbildung 12 beschriebenen Experiment ließen sich durch mit C26-Zellen kokultivierten, und mit CpG-ODN aktivierten DC bei dieser Tumorgröße keine therapeutischen Effekte erzielen. Nur die Kombination von mit C26-Zellen kokultivierten, und mit CpG-ODN aktivierten DC und CpG-ODN führte kontralateral zu einer Stasis des Tumorwachstums.

Das Tumorantigen ist also während der Ausreifung der DC für einen therapeutischen Effekt einer CpG-ODN/DC-Kombinationstherapie erforderlich.

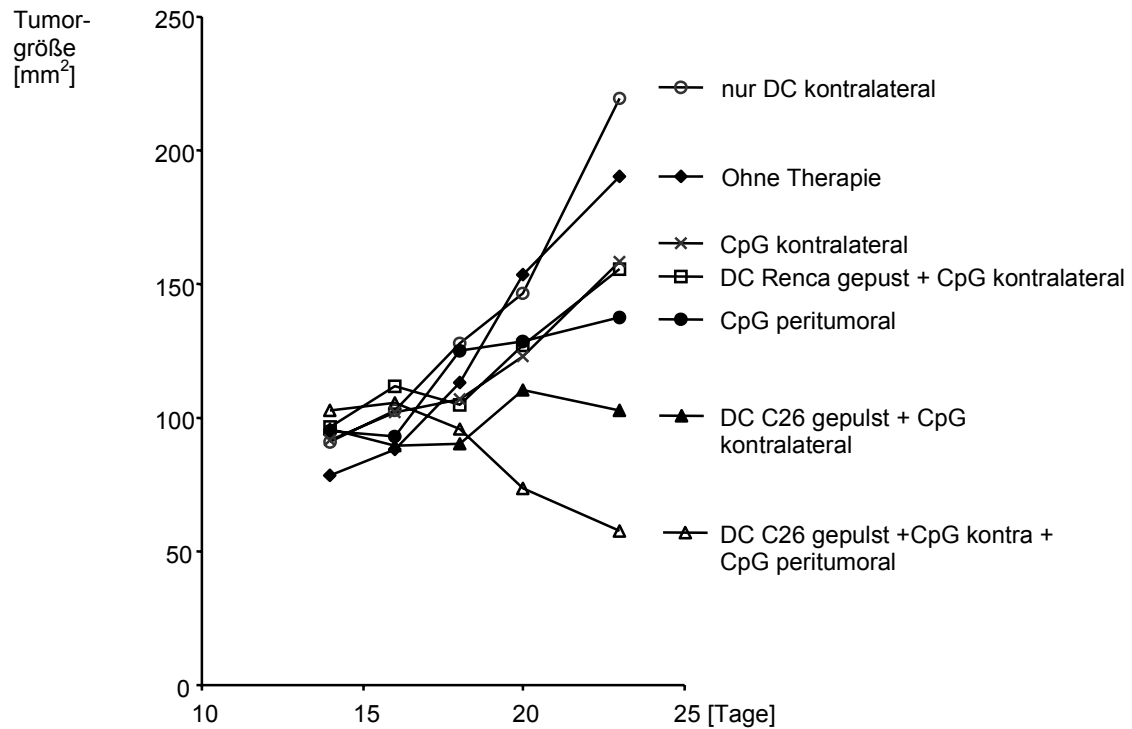


Abb. 13 Die therapeutische Wirkung von DC ist antigenspezifisch. Eine Kombination von mit Renca gepulsten und mit CpG-ODN aktivierten DC zeigte bei kontralateraler Injektion (\square , $n = 5$) keine verbesserte Wirkung im Vergleich zu kontralateral als Monotherapie injiziertem CpG-ODN (\times , $n = 5$). Wurden die DC jedoch mit C26-Zellen gepulst (\blacktriangle , $n = 7$), zeigte sich ein reduziertes Tumorwachstum. Eine peritumorale Injektion von CpG-ODN (\bullet , $n = 5$) führte zu keiner Therapieverbesserung bei großen etablierten Tumoren. Nur in der Gruppe, in der C26-gepulste und mit CpG-ODN aktivierte DC in Kombination mit peritumoralem CpG-ODN injiziert wurden, konnte das Tumorwachstums gehemmt werden (\triangle , $n = 6$). Die alleinige Therapie mit C26 gepulsten und mit CpG-ODN aktivierten DC blieb bei kontralateraler Injektion wirkungslos (\circ , $n = 5$). Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tiere (\blacklozenge , $n = 8$).

3.2.4 Abhängigkeit der Immunantwort von CD8-positiven Zellen und "effizient" ausgereiften dendritischen Zellen

Die Kulturbedingungen für die Ausreifung der DC sind entscheidend für den Therapieerfolg. Die therapeutische Wirksamkeit zweier auf DC und CpG-ODN beruhender Therapien wurde verglichen. Für den Vergleich wurden unterschiedlich ausgereifte DC jeweils mit CpG-ODN in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke koinjiziert und zusätzlich CpG-ODN in den Tumorrandbereich injiziert.

Eine effektive Tumorregression zeigten nur Mäuse, denen DC verabreicht wurden, die mit mGM-CSF und dem Reifestimulus IL-4 kultiviert wurden (s. Abbildung 14). Ohne die Zugabe von IL-4 bei der Ausreifung der DC zeigte eine von vier Mäusen eine komplette Tumorregression. In der Behandlungsgruppe, die mit mGM-CSF und IL-4 ausgereifte DC als Kombinationstherapie erhielten, zeigten vier von vier Mäusen eine vollständige Tumorregression. Zusätzlich zeigten zwei von zwei Mäusen, die aufgrund von histologischen Untersuchungen vorzeitig getötet wurden, eine mindestens 30prozentige Tumorregression. Die injizierten DC zeigten keine Unterschiede in der Expression des Reifemarker MHC-II und der Aktivierungsmarker CD80 und CD86.

Wurde eine CpG-ODN/DC Kombination in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke und zusätzlich CpG-ODN in den Randbereich des Tumors injiziert, ließ sich bei CD8-depletierten Mäusen keine Verzögerung des Tumorwachstums erzielen (Abb. 14). Die CpG-ODN/DC-Therapie ist demnach antigenspezifisch und CD8-abhängig. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Befunden von CpG-ODN als Monotherapie, bei denen nach Depletion von CD8-positiven Zellen kein therapeutischer Effekt erzielt werden konnte (siehe Kapitel 3.1.4.2).

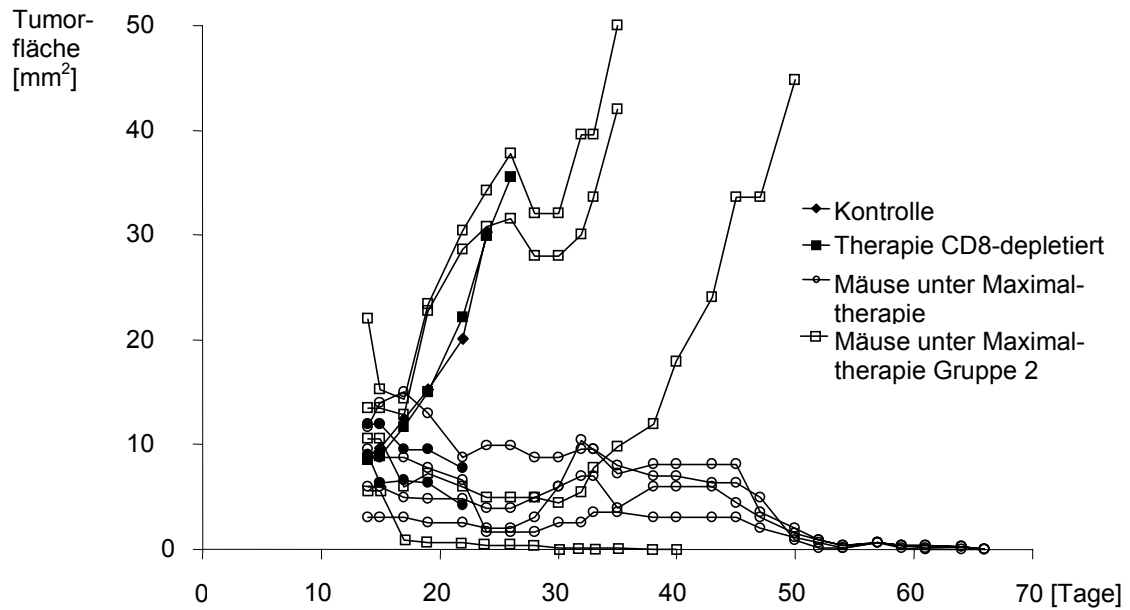


Abb. 14 Durch eine Kombination von mit C26-Zellen gepulsten und mit CpG-ODN aktivierten DC mit peritumoral injiziertem CpG-ODN (Maximaltherapie) ließen sich in einer Behandlungsgruppe bei 4 von 4 Mäusen (○) eine vollständige Tumorregression feststellen. Zwei Mäuse wurden nach einer Tumorregression von mehr als 30 % für histologische Untersuchungen geopfert (●).

Eine weitere Behandlungsgruppe (Gruppe 2) zeigte bei einer von 4 Mäusen eine komplette Tumorregression (□). Die DC dieser Gruppe wurden ohne den Zusatz von IL-4 kultiviert.

Die Tumorregression war abhängig von CD8-positiven Zellen, da eine Depletion mit monoklonalen Antikörpern gegen CD8 die therapeutische Wirkung bei gleicher Therapie aufgehoben hat (■, $n = 4$). Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tiere (◆, $n = 5$).

3.2.5 Häufigkeit von T-Zellen und DEC205-positiven Zellen im Tumor und Tumorrandbereich

Für histologische Untersuchungen wurden Tumoren von sechs behandelten Mäusen, die eine Tumorreduktion von mindestens 30 Prozent aufwiesen, und Tumoren von vier unbehandelten Kontrollmäusen entnommen. In der behandelten Gruppe wurde drei Mäusen kontralateral eine CpG-ODN/DC-Kombination injiziert. Weitere drei Mäuse bekamen kontralateral eine CpG-ODN/DC-Kombination und zusätzlich CpG-ODN in den Randbereich des Tumors injiziert.

Tumoren von unbehandelten Mäusen wiesen nur kleine fokale Nekrosen auf. Bei fünf von sechs behandelten Tieren kam es zu einer extensiven Tumorreduktion mit großen nekrotischen und apoptotischen Gebieten (Abb. 15 oben). Die Tumoren wurden jeweils zwei Tage nach der zweiten Immunisierung entnommen. Abgesehen von zwei Versuchstieren (Versuchstier Nr. 5 und Kontrollmaus Nr. 10 wurden für die Evaluierung in einem separaten Experiment behandelt und deren Tumorschnitte separat immunhistologisch gefärbt) stammen die Versuchstiere aus derselben Studie. Immunhistologische Färbungen von Tumoren, deren Tumorregression histologisch bestätigt wurde, zeigten, konsistent zu in der Literatur beschriebenen Untersuchungen bei einer CpG-ODN-Monotherapie ⁷⁴, keine Rekrutierung von CD4- oder CD8-positiven Zellen in den Tumorbereich (Tabelle 3).

Die Zahl der DEC205-positiven Zellen stieg von $0,75 \pm 0,29$ Zellen pro $0,64 \text{ mm}^2$ bei Tumorschnitten von unbehandelten Mäusen auf $5,38 \pm 1,58$ Zellen pro $0,64 \text{ mm}^2$ an (Tabelle 3). DEC205 ist an der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt ⁷⁵. Antigenprozessierende DC im Tumor oder im Tumorrandgebiet scheinen daher neben der Notwendigkeit von CD8-positiven Zellen eine Schlüsselfunktion in der CpG-ODN-induzierten Tumorreduktion zu besitzen.

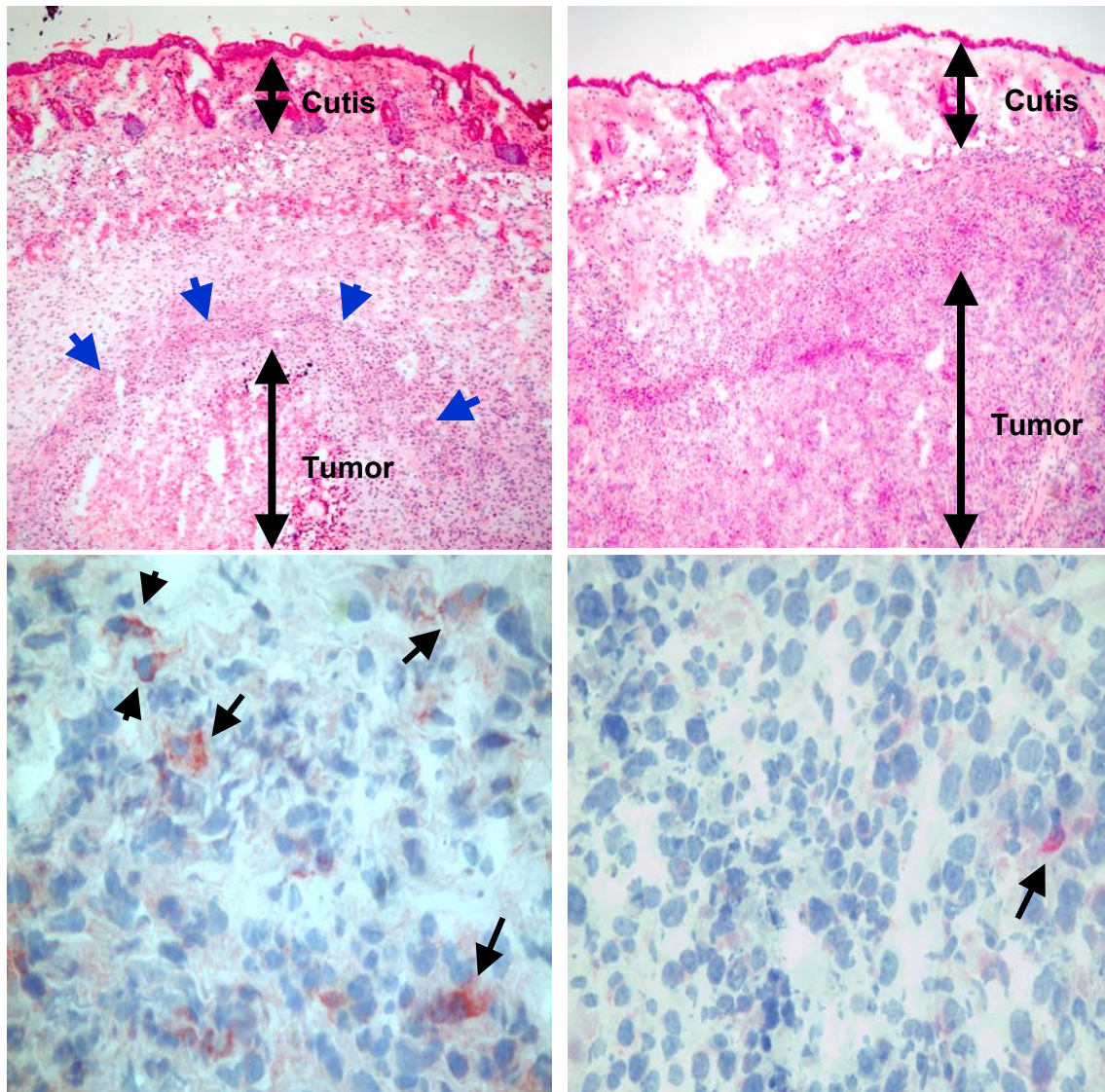


Abb. 15 Die obere Reihe zeigt Hematoxylin-Eosin-Färbungen in 50facher Vergrößerung. Oben links ist ein hochgradig regressiver Tumor mit zentraler Nekrose und nur im Randbereich lebendem Tumormaterial dargestellt. Es handelt sich um einen Tumor aus einer behandelten Maus. Oben rechts ist der Kontrolltumor mit undifferenziertem Tumorgewebe mit fokalen Nekrosen dargestellt. Die unteren Aufnahmen zeigen in 200facher Vergrößerung eine APAAP Immunfärbung von DEC205-positiven Zellen. DEC205-Zellen sind sekundär mit Neufuchsin rot gefärbt und hier mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Abbildung unten links zeigt einen Tumor einer behandelten Maus mit einer größeren Anzahl DEC205-positiver Zellen. Unten rechts ist der Tumor einer unbehandelten Kontrollmaus dargestellt.

Nr.	Behandlung	CD4	CD8	DEC205	Bemerkung
1	CpG/DC kontralateral	27, 44, 34 Mw 35 StAbw. 8,5	69, 62 Mw 65,5 StAbw 4,9	7,2 3,7	kein eindeutiger Tumor, eventuell. vereinzelte Tumor- zellen
2	„	27, 28, 36 Mw 30,3 StAbw 4,9	106,113,89 Mw 84 StAbw 28	0,5 1,1	Tu Ø 4 mm, fokale Nekrosen
3	„	23, 33, 37 Mw 31 StAbw 7	129, 75,73 Mw 92 StAbw 32	60?	Tumorrest Ø 1mm, fast vollständig nekrotisch
4	CpG peritumoral + CpG/DC kontra- lateral	30, 43 Mw 36,5 StAbw 6,5	111, 115, 114 Mw 113,3 StAbw 1,7	2,7 4,7	extensive Apoptose, fokale Nekrose, fibrotische Abkapselung, Tumorrest Ø 1.2 mm keine CD4,CD8, DEC205 Anfärbung im Tumorrest, nur peritumoral
5	„	33, 34 Mw 33,5 StAbw 0,5	54, 25 Mw 39,5 StAbw 14,5	6,3	kein eindeutiger Tumor, eventuell vereinzelte Tumorzellen
6	CpG peritumoral + CpG/DC kontra- lateral 2.Studie			0,3 0,1 0	Tu Ø 15 mm fokale Nekrosen
7	Kontrolle	5, 12, 10 Mw 9,1 StAbw 2,7	1, 0,3, 5 Mw 2,1 StAbw 2,5	0 1	Tu Ø 6 mm, fokale Nekrosen
8	„	32, 24, 52 Mw 36 StAbw 11,8	35, 58 Mw 46,5 StAbw 11,5	0,5 2	Tu Ø 6 mm, fokale Nekrosen
9	„	50, 42, 73 Mw 55 StAbw 16	107, 94 Mw 100,5 StAbw 5,5	1 0,5	Tu Ø 4.5 mm, fokale Nekrosen
10	Kontrolle 2. Studie			4,3 3 1,6	extensive Apoptose, fokale Nekrose, fibrotische Abkapselung, Tumorrest Ø 8 mm

Tabelle 3 Von zwei Behandlungsgruppen wurde der ganze Tumor auf 2-3 nicht benachbarten Schnittebenen ausgewertet. Angegeben sind die sich auf eine Fläche von 0,64 mm² beziehenden Zellzahlen der immunhistologisch gefärbten Zellen.

MW = Mittelwert, StAbw = Standardabweichung.

4. Diskussion

4.1 Monotherapie mit CpG-ODN

4.1.1 Der Injektionsort bestimmt den Behandlungserfolg

Mehr als 100 Jahre nach William Coley konnte anhand eines murinen Modells belegt werden, dass der Ort der CpG-ODN-Behandlung, ähnlich wie bei der Therapie mit bakteriellen Lysaten, mitentscheidend für den Erfolg einer Tumorthherapie ist. Das Immunsystem scheint den Tumor als mikrobielle lokale Infektion zu erkennen. Mikrobielle Infektionen bilden die klassischen Situationen, die mit dem raschen Anstoß einer effektiven Immunantwort verknüpft sind. Während einer Infektion ist die Kolokalisation von mikrobiellen Molekülen und fremden Antigenen entscheidend für die Initiation einer spezifischen T-Zellantwort. Der erste Teil dieser Arbeit zeigt, dass die Gabe von CpG-ODN in den Tumorrandbereich dem Immunsystem vorgibt, dass der Tumor bakteriellen Ursprungs sei. Diese Überlistung des Immunsystems scheint in dem vorgestellten Modell die Regression von experimentellen Kolontumoren in der Maus zu ermöglichen.

Eine subkutane Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich führte bei nahezu allen behandelten Mäusen zu einer vollständigen Tumorregression. Eine Injektion von CpG-ODN in die tumorfreie Flanke führte nur zu einem geringen Überlebensvorteil im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Auch ließ sich bei einer Injektion von CpG-ODN in die tumorfreie Flanke keine Steigerung der therapeutischen Wirksamkeit erreichen, wenn bestrahlte Tumorzellen als Antigenlieferanten koinjiziert wurden. Die Notwendigkeit, eine CpG-ODN-Injektion in den Tumorrandbereich, und nicht in weit von dem Tumorgewebe entferntes Gewebe zu setzen, betont die Schlüsselrolle, die der adäquaten Injektionsstelle für die CpG-ODN-Behandlung zukommt. Dies zeigt, dass das Immunsystem hochgradig effektiv in der Kontrolle des Tumorwachstums sein kann, solange der Tumor eine Kolokalisation mit CpG-ODN als einen Indikator einer bakteriellen Infektion aufweist.

Immuntherapeutische Ansätze gegen Tumoren waren bisher bei einem prophylaktischen Ansatz effizienter als in der Therapie bereits etablierter Tumoren. Zu unserer Überraschung war eine Monotherapie mit CpG-ODN ineffektiv in der Prophylaxe, aber hochaktiv bei der Therapie etablierter Tumoren. Bestrahlte Tumorzellen, die mit CpG-ODN koinjiziert wurden, führten zu keiner Immunantwort. Erst ein vitaler Tumor an der CpG-ODN-Injektionsstelle führte zu einer Induktion der Immunantwort.

Injektionen von CpG-ODN in den Tumorrandbereich induzierten in den Versuchen eine systemische Immunantwort, die neben etablierten Tumoren an der Injektionsstelle auch entfernte Tumoren heilen konnte. Das identische therapeutische Schema (CpG-ODN-Injektion in eine Flanke) vorausgesetzt, überlebten 70 % der Mäuse, denen zwei Tumoren, je ein Tumor in beiden Hinterflanken, gesetzt wurden. Bei diesen Mäusen, denen somit die doppelte Anzahl an Tumorzellen injiziert wurde, kam es zu einer kompletten Regression der zu Behandlungsbeginn palpablen Tumoren. Im Gegensatz dazu starben nahezu alle Mäuse mit nur einem Tumor, denen CpG-ODN nur in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke injiziert wurde. Im Hinblick auf eine chirurgische Resektion des Tumors scheint die Hilfe des vitalen Tumors für die Stimulation des Immunsystems nötig zu sein, um letztendlich ein Tumorrezidiv zu verhindern.

Von C26-Tumoren geheilte Mäuse entwickelten bei einer erneuten Injektion von C26-Zellen keine Tumoren. Diese Mäuse zeigten allerdings bei Injektion eines Kontrolltumors kein verändertes Tumorstadium im Vergleich zu naiven Mäusen. Dies kann als Beweis für eine antigenspezifische Immunantwort gesehen werden.

4.1.2 Induktion der angeborenen und adaptiven Immunantwort

Ähnlich wie bei einer bakteriellen Infektion führt bei einer CpG-ODN-basierter Therapie eine Kooperation von angeborener und erworbener Immunantwort zur Regression des Tumors. Für eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems spricht ein erhöhter Plasmaspiegel von IFN- γ , der sich unabhängig von der Exposition mit Tumorantigen zeigte.

Des Weiteren kam es auch bei Mäusen mit zwei Tumoren, einem C26-Kolonkarzinom und einem Renca-Nierenzellkarzinom, bei denen aber nur ein Tumor mit CpG-ODN im Tumorrandbereich behandelt wurde, zu einem verringerten Wachstum des unbehandelten Tumors. Dies ist nicht auf einen Effekt des erworbenen Immunsystems oder das Vorhandensein gemeinsamer Antigene zurückzuführen, da bei Mäusen, die einen Tumor bei der ersten CpG-ODN-Tumortherapie abgestoßen hatten, keine Verringerung des Tumorwachstum bei Injektion fremder Tumorzellen erfolgte. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Aktivierung der angeborenen Immunantwort transient ist und nur während eines eingeschränkten Zeitraumes nach CpG-ODN auftritt. Die CpG-ODN-vermittelte Aktivierung der angeborenen Immunantwort wurde auch schon von anderen Gruppen gezeigt, bei denen CpG-ODN einen erhöhten Spiegel von IL-12 und IFN- γ induzierte und gegen intrazelluläre Bakterien schützte^{76, 77}.

Bei der angeborenen und der erworbenen Immunantwort spielen Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren für Antikörper eine große Rolle. Durch CpG-ODN erhöhte sich auf hämatopoetischen Zellen die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und der Fc-Rezeptoren CD16/32. ICAM-1 spielt mit weiteren Liganden auf Endothelzellen neben Zytokinen und „homing“-Faktoren eine wichtige Rolle in der Leukozytenmigration zu Entzündungsorten. Aktivierte Leukozyten und Lymphozyten binden über die hochaffinen Integrine LFA-1, Mac-1 und VLA-1 an die Liganden ICAM-1 und VCAM-1, deren Expression auf endothelialen Zellen durch Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) erhöht wird. Arnold et. al. fanden eine reduzierte ICAM-1-Expression in ovariellen

Adenokarzinomen. Die ICAM-1-Expression der Tumoren korrelierte in dieser Studie mit dem Überleben der Patienten⁷⁸. Diese Korrelation zwischen ICAM-1-Expression und Überleben der Patienten legt nahezu überprüfen, ob durch die CpG-ODN-Injektion zusätzlich zu der Steigerung der ICAM-1-Expression in hämatopoetischen Zellen die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen und auf Tumorzellen erhöht wird. Ebenfalls durch die CpG-ODN-Injektion werden die Fc-Rezeptoren CD16/32 hochreguliert. Als Effektoren des angeborenen Immunsystems nützen NK-Zellen über die Erkennung von Antikörperrezeptoren das erworbene Immunsystem zur Bekämpfung körperfremde Zellen. CpG-ODN scheint durch die Hochregulation der Fc-Rezeptoren eine weitere Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem zu bilden.

Entscheidend für eine lang anhaltende Immunität sind jedoch die erworbene Immunantwort und die Bildung eines antigenspezifischen Gedächtnisses. Neben der Aktivierung des angeborenen Immunsystems entwickelten sich tumorspezifische T-Zellen als Antwort auf eine peritumorale CpG-ODN-Behandlung. Mäuse, bei denen es zu einer Regression des Tumors kam, blieben auch nach Therapieende tumorfrei und waren gegen die Tumorentwicklung bei erneuter Injektion von spezifischen Tumorzellen, nicht aber von unspezifischen Tumorzellen geschützt.

Die Ergebnisse, die *in vivo* eine spezifische Gedächtnisantwort belegen, konnten auch *in vitro* auf zellulärer Ebene bestätigt werden. Die peritumorale CpG-ODN-Therapie scheint somit ein abgestimmtes Repertoire von Immuneffektormechanismen der angeborenen und erworbenen Immunantwort zu aktivieren, was letztendlich zu einer Tumorregression führt.

Die Gabe von CpG-ODN führt zur indirekten Aktivierung sowohl antigenspezifischer CD4- und CD8- T-Zellen^{60, 79}. Es gibt Hinweise, dass CD4- und CD8-T Zellen wichtig sind für eine antitumorale Immunantwort⁸⁰⁻⁸⁵. Diese Arbeit zeigt bei einer *in vivo* Depletion von CD4- oder CD8-T-Zellen, dass CD8-T-Zellen erforderlich für die therapeutische Wirksamkeit einer CpG-ODN-Therapie sind. Eine Beteiligung von CD4-T-Zellen an der Immunantwort konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr ergab die Depletion von CD4-T-Zellen, dass

zum Zeitpunkt der Therapie CD4-positive Zellen nicht weiter erforderlich sind. Der Kontakt von CD4-Zellen mit Tumorantigen kann jedoch bereits vor der Therapie erfolgen und notwendig für eine später erfolgreiche CpG-ODN-Therapie sein. Auch ist es möglich, dass CD4-T-Zellen abhängig von der Tumorgröße oder der Art der untersuchten Tumoren eine entscheidende Rolle in der CpG-ODN-Therapie spielen.

Die Aktivierung von tumorantigenspezifischen T-Zellen ist essentiell für die Initiation einer erfolgreichen Immunantwort. Das Schicksal dieser Zellen während der Tumorprogression ist jedoch unbekannt. Die therapeutische Manipulation der Immunantwort gegenüber Tumoren könnte durch den Tumor selbst aktiv behindert werden, da Tumoren die Induktion einer Anergie von tumorspezifischen T-Zellen hervorrufen können⁸⁶. Dieser Mechanismus kann die Toleranzinduktion von peripherem Gewebe imitieren⁸⁰. Die Induktion peripherer Toleranz von antigenspezifischen CD4- und CD8-T-Zellen gegenüber außerhalb des lymphoiden Systems exprimierten Antigenen wurde in mehreren Modellen beschrieben⁸⁷⁻⁸⁹. In diesen Fällen ist die Toleranz durch eine Überkreuzpräsentation des Antigens durch nicht aktivierte, aus Knochenmarkszellen abgeleitete APC vermittelt^{88, 89}. Da die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren ursprünglich nicht mit Entzündungsreizen oder der Aktivierung des Immunsystems verbunden sind, können Tumorantigene eine ähnliche toleranzinduzierende Wirkung haben wie bei peripherem Gewebe beschrieben. Auf diese Weise können Tumoren die ihrem Ursprungsgewebe sehr ähnlich sind, Vorteile aus dem toleranzinduzierenden Stadium von aus Knochenmark abgeleiteten APC ziehen. Diese Toleranzentwicklung verhindert aber immuntherapeutische Interventionen, die nur auf der Induktion und Proliferation der T-Zellen in Tumorpatienten beruhen.

Die vorliegenden Studien zeigen, dass die Gegenwart von CpG-ODN in der Nähe des Tumors nicht nur eine Möglichkeit zur Anreicherung und Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen darstellt, sondern auch zur Überwindung der Toleranz tumorspezifischer T-Zellen beitragen kann, indem es die für die Kostimulation von lokalen APC notwendigen Signale induziert^{90, 91}. Diese Vermutung wird vor allem auch durch den Verlauf des Tumorwachstums nach

CpG-ODN-Gabe gestützt. Wurde eine CpG-ODN-Behandlung bei kleineren Tumoren bereits fünf Tage nach Tumorinduktion begonnen, setzte sich das Tumorwachstum bei den meisten Mäusen für weitere fünf Tage, wenn auch eingeschränkt fort. Mäuse, bei denen zu einem späteren Zeitpunkt mit der CpG-ODN-Therapie begonnen wurde, sprachen in den Fällen, in denen es zu einem Ansprechen auf die CpG-ODN-Therapie kam, ohne zeitliche Verzögerung auf die Therapie an. Dies weist auf die erneute Aktivierung bereits vorhandener T-Zellen hin.

Die Art des Tumors ist von Bedeutung für das Erreichen einer lang anhaltenden systemischen Immunantwort. So entwickelten sich Renca-Tumoren bei Mäusen, die Renca-Tumoren unter CpG-ODN-Behandlung abstießen, wie Tumoren von gleichaltrigen, unbehandelten Kontrollmäusen. Bei diesen Mäusen kam es zu keiner lang anhaltenden Immunität. Auch bei der Induktion von Renca-Tumoren in beiden Flanken bei Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich eines Tumors wurde nur eine Regression des behandelten Tumors beobachtet. Die Ergebnisse mit Renca-Zellen zeigten, dass eine Regression eines Tumors nach einer CpG-ODN-Therapie nicht immer eine Involvierung des erworbenen Immunsystems einschließt.

Die unterschiedliche Wirksamkeit von CpG-ODN bei der Therapie zweier Tumoren muss bei weiteren Studien mit CpG-ODN berücksichtigt werden. Die fehlende Bildung eines immunologischen Gedächtnisses ist nicht auf eine mangelnde Immunogenität des Renca-Tumors zurückzuführen. Wie in der Literatur beschrieben, werden Renca-Zellen gerade wegen ihrer Immunogenität zu Studienzwecken eingesetzt.

Andere Gruppen erzielten bei der Behandlung von i.p. induzierten Renca-Tumoren bei einer Kombination von IFN- α und IFN- γ bei immunkompetenten Mäusen eine Heilung in 77% der Fälle. Bei thymektomierten Mäusen kam es jedoch nur zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums. Die geheilten immunkompetenten Mäuse entwickelten bei dieser Therapie bei erneuter Tumoringjektion keinen Tumor⁹². Die Therapie mit diesen auch durch eine CpG-

ODN-Behandlung induzierten Zytokinen führte in diesem Modell zu einer Gedächtnisantwort.

Eine kombinierte IFN- α /IFN- γ -Therapie erhöht die Expression von Fas auf Renca-Tumoren. Renca-Zellen sind sensitiv gegenüber Fas/Fas-L-vermittelter Apoptose. Die Apoptoseinduktion ist neben der Perforin-vermittelten Lyse von NK-Zellen ein Wirkungsmechanismus der IFN- α /IFN- γ Therapie⁹³. Mögliche Unterschiede einer IFN- α /IFN- γ -Therapie und einer CpG-ODN-Therapie in der Apoptoseinduktion von Renca-Zellen könnten die unterschiedliche Gedächtnisantwort bewirken.

Renca-Zellen hemmen effektiv die Aktivierung von Renca-spezifischen T-Zellen *in vivo*, jedoch sind Renca-Zellen nicht direkt immunsuppressiv⁹⁴. Es ist noch nicht bekannt, ob durch eine IFN- α /IFN- γ -Therapie eine Aufhebung der Hemmung von Renca-spezifischen T-Zellen erfolgt. Ein Vergleich einer IFN- α /IFN- γ -Therapie mit einer CpG-ODN-Therapie könnte hier im Modellsystem Unterschiede in der Induktion einer systemischen Immunantwort aufzeigen.

Auch in Studien anderer Gruppen trat eine große Heterogenität in Bezug auf das Ansprechen bei unterschiedlichen Tumoren auf. So zeigte eine Studie von Ballas et. al., dass durch das NK-Zell-optimierte CpG-ODN 1585 die Regression bei Melanomen der Maus, nicht aber die Regression eines murinen EL4 Lymphoms erzielt werden konnte. Bei Gabe von CpG-ODN 1826 konnte jedoch die Regression des EL4 Lymphoms, nicht aber die Regression eines murinen Melanoms erzielt werden⁹⁵. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass jede Tumorart individuell auf ihr Ansprechen einer CpG-ODN-Therapie untersucht werden muss.

4.2 Kombination von CpG-ODN und dendritischen Zellen

4.2.1 Verbesserung der therapeutischen Wirkung einer Therapie mit dendritischen Zellen durch CpG-ODN

Durch *ex vivo* Stimulation antigengepulster DC mit Adjuvantien vor der Rückinjektion in den Patienten kann die Toxizität von Adjuvantien wie LPS begrenzt werden. In diesem Fall ist die Toxizität des immunstimulierenden Agens auf die kultivierten Zellen beschränkt und führt als solches nicht zu einer systemischen Toxizität im Menschen. Mehrere Studien zeigen die Möglichkeiten einer DC basierten Immuntherapie, jedoch ist die Manipulation von DC sowohl zeit- als auch kostenintensiv und von begrenzter Aktivität.

Da sich die Effektivität einer peritumoralen CpG-ODN-Monotherapie bei verzögertem Therapiebeginn verringerte, ist es unwahrscheinlich, dass eine CpG-ODN-Monotherapie für die Eliminierung größerer Tumoren bei Patienten ausreichend sein würde. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass eine Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich andere immuntherapeutische Ansätze oder konventionelle Behandlungen wie die chirurgische Entfernung der Tumoren, die Strahlen- sowie die Chemotherapie verbessern könnte. Im Besonderen ist in diesem Zusammenhang die Induktion einer systemischen Immunantwort durch peritumorale CpG-ODN-Gabe vor einer Operation (neoadjuvantes Setting) Erfolg versprechend. Die Induktion einer systemischen Immunantwort könnte es ermöglichen, durch Resektion nicht entfernte Tumorzellen und Mikrometastasen zu eliminieren und so ein Tumorrezidiv zu verhindern.

Man geht davon aus, dass eine Immuntherapie nur gegen eine begrenzte Zahl von Tumorzellen effektiv sein kann ⁹⁶. Sowohl die Behandlung mit antigengepulsten DC als auch, wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde, eine peritumorale Behandlung mit CpG-ODN als Monotherapie führt zu einer potenten, gegen den Tumor gerichteten, Immunantwort. Bei beiden Ansätzen ist für einen Behandlungserfolg jedoch die Tumorgroße bei Behandlungsbeginn von entscheidender Bedeutung.

Im zweiten Teil der Arbeit wird gezeigt, dass das Immunsystem bei einer Kombination von CpG-ODN mit antigengepulsten DC auch große etablierte Tumoren vollständig abstoßen kann.

In den durchgeführten Versuchen zeigte eine Therapie mit aktivierten und mit Antigen gepulsten DC bei Tumoren mit einer durchschnittlichen Tumorgroße von ca. 1 cm keine therapeutische Wirksamkeit. Wurde in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke CpG-ODN koinjiziert, kam es zu einer Immunantwort mit vorübergehender Stasis des Tumorwachstums. Weder die alleinige kontralaterale Injektion von CpG-ODN noch die kombinierte kontralaterale Injektion von CpG-ODN mit aktivierten, aber mit Renca-Zellen kokultivierten DC, führte zu einer Tumorstasis. Dies belegt die Antigenabhängigkeit einer kombinierten CpG-ODN/DC-Therapie. Die Kombination mit DC ermöglicht eine CpG-ODN-Therapie auch dann, wenn keine Möglichkeit der Injektion einer Vakzine in den Tumorrandbereich besteht. Eine kombinierte Injektion mit CpG-ODN könnte somit den Einsatz spezifischer, mit Antigen gepulster DC ermöglichen.

Die therapeutische Wirksamkeit der Kombination von kontralateral injiziertem CpG-ODN mit DC ließ sich durch eine zusätzliche Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich so weit steigern, dass es zu einer kompletten Regression von Tumoren mit einem Durchmesser von mehr als einem Zentimeter kam.

Eine wichtige Eigenschaft dendritischer Zellen ist neben ihrer Aktivierbarkeit auch ihre Mobilität. Neu entstandene DC wandern vom Knochenmark zu nichtlymphoiden Geweben, wo sie als residierende Zellen verweilen¹⁸. In nichtlymphoiden Geweben treten DC mit Antigenen in Kontakt. Die antigenbeladenen DC wandern über die afferenten Lymphgefäße in die T-Zellreichen Regionen lymphatischer Organe. In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine intradermale CpG-ODN-Injektion die Migration Langerhans'scher Zellen aus der Haut induziert⁹⁷.

In dieser Arbeit konnte mittels Injektion von CFSE-gefärbter DC keine Migration der injizierten DC nachgewiesen werden. Es konnte somit nicht gezeigt werden, ob *ex vivo* stimulierte DC nach subkutaner Injektion in den Tumor infiltrieren oder direkt in die lymphatischen Organe wandern. Eine Nachweismöglichkeit wäre der Einsatz von DC aus männlichen BALB/c Mäusen und deren Nachweis in lymphatischen Organen oder im Tumorbereich über die Erkennung der unterschiedlichen Geschlechtschromosome oder über eine quantitative PCR von Gewebelysaten. Dadurch könnte auf ein *in vitro* Anfärben der DC vor Injektion verzichtet werden. Durch die therapeutischen Erfolge ist allerdings auch ohne direkten Nachweis davon auszugehen, dass die Migration der DC in die lymphatischen Organe nicht vollständig ausbleibt, da nur in den lymphatischen Organen die hohe Kontaktdichte für einen effektiven DC/T-Zell-Kontakt gegeben ist. In der Literatur wird berichtet, dass subkutan injizierte DC im T-Zellbereich drainierender Lymphknoten akkumulieren ⁹⁸. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Kulturbedingungen einen starken Einfluss auf das Migrationsverhalten haben.

Nach einer CpG-ODN/DC-Therapie konnte eine Anreicherung an DEC205-positiven Zellen im Tumor und Tumorrandbereich behandelter Mäuse beobachtet werden. DEC205-positive-Zellen zeigen eine reduzierte Proteinprozessierung, aber eine erhöhte Kapazität zur T-Zell-Stimulation. Nach Aktivierung mit LPS steigt die Zahl an DEC205-positiven Zellen in den T-Zell-Arealen lymphatischer Organe an ⁹⁹.

Eine weitere Untersuchung dieser DEC205-positiven Zellen im Hinblick auf Migrationsverhalten und Antigenpräsentation wäre interessant. Dadurch könnte festgestellt werden, ob die beobachteten DEC205-positiven DC im Tumor für die Tumorreduktion von Bedeutung sind. In Studien an Patienten mit Kolontumoren wurde bei nahezu allen DC im Tumorbereich eine hohe Expression der Aktivierungsmarker HLA-DR, CD40 und CD86 gefunden. Die Gesamtzahl der DC im Tumorbereich ging jedoch stark zurück ¹⁰⁰. Mit einem Antikörper gegen DEC205 werden nur aktivierte DC nachweisen. Es wäre von Interesse, mit Hilfe weiterer Antikörper histologisch oder durch eine Analyse im

Durchflusszytometer an aufgetrenntem Tumormaterial die Zusammensetzung der DC im Tumorbereich zu bestimmen.

In vitro und *in vivo* Experimente belegen, dass CD8-positive Zellen für den therapeutischen Erfolg einer CpG-ODN-Therapie in dem untersuchten Modell einer CpG-ODC/DC Kombinationstherapie notwendig sind. Anhand der histologischen Schnitten zeigte sich jedoch, dass bei mit einer CpG-ODN/DC-Therapie therapierten Mäusen die Zahl der CD4- oder CD8-positiven Zellen unverändert blieb. Durch die unveränderte Zahl an CD4-positiven oder CD8-positiven Zellen lässt sich noch keine Aussage über den Aktivierungszustand der histologisch identifizierten Zellen machen. Der *in vivo* Nachweis von gegen den Tumor gerichteten T-Zellen muss noch erfolgen.

Bei den Untersuchungen der CpG-ODN/DC-Kombinationstherapie standen keine weiteren CD4-Antikörper für Depletionsversuche zur Verfügung. Es ist daher durchaus denkbar, dass der durch Injektion von aktivierten DC im Vergleich zu einer CpG-ODN-Monotherapie induzierte zusätzliche therapeutische Effekt CD4-abhängig ist.

4.2.2 Abhängigkeit des Therapieerfolges von der Ausreifung der dendritischen Zellen

Für die Evaluierung der optimalen Reifebedingungen wurden DC in Medium mit hoher mGM-CSF-Konzentration oder in Medium mit geringer mGM-CSF-Konzentration und zusätzlichem IL-4 kultiviert. Es zeigten sich keine Unterschiede in Morphologie der DC und der Expression von MHC-II, CD80 und CD86. Wurden die DC mit CpG-ODN aktiviert, zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Aktivierbarkeit der DC-Oberflächenmarker CD80 und CD86. Dieses Ergebnis schien zu bestätigen, dass zusätzliches IL-4 keinen Einfluss auf in Medium mit hoher mGM-CSF-Konzentration kultiviert, keinen Einfluss auf die Ausreifung muriner DC hat ⁵⁸.

Trotz dieser *in vitro* Bestätigung der Gleichartigkeit beider Kultivierungsbedingungen und der in der Literatur berichteten Gleichartigkeit der DC-Aktivität *in vivo*, kam es zu einer signifikanten Verschlechterung des Therapieverlaufs bei der Injektion von DC, deren Ausreifung ohne IL-4 im Medium erfolgte. Dieses Ergebnis zeigt die Notwendigkeit einer für die jeweilige Therapie optimierten Ausreifung der DC. Vielleicht ist je nach dem Zweck des Einsatzes die Art der Ausdifferenzierung der DC von entscheidender Bedeutung und hängt nicht nur von generellen Faktoren wie der Aktivierbarkeit von T-Zellen, der Expression von CD80/CD86 oder der Förderung einer Th1-Antwort ab.

Lu et. al. zeigte in einer früheren Arbeit, dass nur mit GM-CSF stimulierte Zellen als schwache Stimulatoren fungierten und eine verminderte Antwort von allogenen T-Zellen verursachten. Diese verringerte T-Zellantwort ging einher mit einer Hemmung der IL-2-Produktion¹⁰¹. Es bleibt herauszufinden, ob eine Erhöhung des GM-CSF-Gehaltes im Kulturmedium für eine Induktion einer effektiven Immunantwort ausreichend sein kann, oder ob bei einem Einsatz von DC in der Tumorthherapie Interleukine wie IL-4 erforderlich sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erneut, dass für den jeweiligen Ansatz eine optimale Ausreifung der DC erforderlich ist. Änderungen des Ausreifeprotokolls, wie der Verzicht auf die Gabe von IL-4 in das Kulturmedium, verschlechterten die Wirksamkeit der kombinierten CpG-ODN/DC-Therapie. Aufgrund der begrenzten Anzahl an genehmigten Versuchstieren wurde nicht weiter untersucht, ob es sich bei der Therapieverschlechterung um eine Verschiebung des zeitlichen therapeutischen Fensters handelte oder ob eine fehlende oder für die Therapie von Tumoren ungeeignete Ausreifung der DC erfolgte.

Vielleicht ist IL-4 als Th2-induzierendes Zytokin während der Kultivierung der DC notwendig, um eine Rückkopplung in Richtung einer darauf folgenden effektiveren Th1-Antwort zu induzieren. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass IL-4 die Phospholipase A2 hemmt. Dieses Enzym reguliert die Arachidonsäurekaskade, die in Prozessen wie Leukozytenmigration und NK-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle spielt¹⁰². Ein verbessertes Verständnis für die Mechanismen, die die Migration von DC und

die Aktivierung von T-Zellen durch DC *in vivo* regeln, sollte neue Einsatzmöglichkeiten für DC in Kombination mit CpG-ODN eröffnen.

Anhand der Aktivierung von DC mit LPS zeigten Langenkamp et. al., dass die induzierte IL-12-Produktion und die Th1-Polarisation nur transient erfolgten und die DC bei weiterer LPS-Gabe refraktär reagierten. Der Abfall der IL-12-Zytokinproduktion beeinflusst die T-Zell-Polarisierung, sodass LPS stimulierte DC kurz nach Stimulation mit LPS eine starke Th1-Reaktion hervorrufen, dieselben Zellen jedoch zu einem späteren Zeitpunkt bevorzugt Th2- und nichtpolarisierte T-Zellen aktivierten¹⁰³. Der Zeitpunkt der Injektion aktivierter DC muss deshalb bei jeder DC-basierten Therapie beachtet und je nach Ausreifeprotokoll neu bestimmt werden.

Eine Vakzinierung mit aktivierten DC kann somit bei einer zu hohen „Dosierung“ zu einer sekundären Hemmung einer DC-Antwort führen. So konnte z.B. an Mäusen, bei denen eine spezifische DC-Therapie eine CTL-Antwort gegen ein Peptid aus dem humanen Protoonkogen HER-2/neu induzierte, eine zu hohe „Dosierung“ belegt werden. Eine sechsmalige wöchentliche Injektion von peptidgepulsten DC führte hier zu einer verringerten Aktivität zytotoxischer T-Zellen. Eine Verringerung der Aktivität zytotoxischer T-Zellen trat jedoch bei Mäusen, die sechsmal DC alle drei Wochen injiziert bekamen, nicht auf¹⁰⁴.

Wichtig für jede medizinische Anwendung von Therapien mit DC ist die Auswahl der „optimalen“ DC für den Zieltumor, deren Potential T-Zellen zu aktivieren und deren Migrationsfähigkeit zu den lymphoiden Organen. *In vitro* gepulste DC können auch beim Primaten nach einer Rückinjektion in den drainierenden Lymphknoten akkumulieren¹⁰⁵ und dort oder in der Peripherie eine Immunantwort hemmen oder fördern. Beim Einsatz einer CpG-ODN oder DC-basierten Therapie muss aufgrund der späteren Th2-Polarisation untersucht werden, welche Rückkopplungsmechanismen die erwünschte Th1-Antwort behindern. Eine zusätzliche Gabe von Interleukinen, wie in dieser Arbeit von IL-2, könnte durch die Initiierung früher Rückkopplungsprozesse zu einer Limitierung der Wirksamkeit einer Therapie beitragen. Im C26-Modell konnte belegt werden, dass bei dem verwendeten Therapieprotokoll eine

Kombination von CpG-ODN und DC ohne Injektion weiterer Zytokine zu einer Aktivierung des Immunsystems und zu einer Regression von C26-Tumoren führt.

4.3 Grenzen und Möglichkeiten der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Experimenten mit einem experimentellen, murinen, schnell wachsenden Tumor auf die klinische Anwendung

4.3.1 Entstehungsgeschwindigkeit von Tumoren

Bei der Behandlung eines Tumors mit CpG-ODN kann es vorkommen, dass Antigene, die mit anderen Tumoren geteilt werden, nicht erkannt werden. Der geringe Erfolg der Immuntherapie kann darauf zurückzuführen sein, dass die für die Therapie verwendeten Antigene auf der Analyse aus von Metastasen gewonnenen Zelllinien oder primärer Tumoren beruht. Die Oberflächenantigene von Tumorzellen können jedoch extreme Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen im Endstadium aufweisen ¹⁰⁶. Bei einigen gastrointestinalen Tumoren und Tumoren des Endometriums kann ein Mikrosatelliten-Mutator-Phänotyp auftreten. Dabei zeigen die Tumorzellen eine hohe Anzahl an Mutationen im Genom ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Die Tumorentwicklung humaner Tumoren erfolgt in mehreren Stadien und erlaubt es dem Tumor als eigenes Gewebe erkannt zu werden. Es besteht hier die Möglichkeit, dass sich eine spezifische Immunantwort hemmende DC und regulatorische T-Zellen bilden. Die erste CpG-ODN-Behandlung der C26-Tumoren erfolgte jedoch schon 5 bis 15 Tage nach Tumorinduktion. Die schnelle Entwicklung der Tumoren vermindert das Auftreten von Mutationen. Daher ist anzunehmen, dass das Immunsystem nach seiner Aktivierung alle Tumorzellen erkennt. Bei einer klinischen Anwendung muss festgestellt werden, inwieweit es notwendig ist, mehrere Tumoren zu behandeln um eine breitere Erkennbarkeit von Tumorantigenen zu erreichen.

4.3.2 Unterschiede in der Aktivierbarkeit dendritischer Zellen

Die optimale CpG-ODN-Sequenz unterscheidet sich im humanen und murinen System in den Basen, die das Cytosin-Guanosin-Dinukleotid flankieren^{7, 70}. Murine CpG-Motive, darunter auch das in dieser Arbeit verwendete CpG-ODN 1826, wirken im humanen System nur schwach immunstimulatorisch. Diese Unterschiede beruhen auf geringfügig veränderte Bindungen der CpG-ODN an den TLR9-Rezeptor. Es muss daher ein auf die humanen Immunzellen ausgerichtetes CpG-ODN injiziert werden.

Gravierender für die Übertragbarkeit von Experimenten im murinen System auf den Menschen sind die Unterschiede der DC-Untergruppen und deren Aktivierbarkeit durch CpG-ODN^{8, 91, 110}. Außerdem wird in humanen hämatopoetischen Zellen nur auf pDC TLR9 exprimiert^{15, 31}. Während in der Maus auch aus Monozyten abgeleitete Zellen durch CpG-ODN aktiviert werden, kommt es beim Menschen nur zu einer direkten Aktivierung humaner B-Zellen und pDC. CpG-ODN führt also im humanen System im Vergleich zum murinen System zu einer selektiveren Aktivierung des Immunsystems.

Daher ist es schwierig, den Einsatz von CpG-ODN als potentes Adjuvans direkt in eine klinische Tumorthherapie umzusetzen. In einer Phase I Studie am Basaliom (Basalzellkarzinom, BCC) und am Melanom war bei den untersuchten Patienten keine komplette Tumorregression durch intratumorale Injektionen mit CpG-ODN 7909 feststellbar. Initial reagierten 2 von 4 BCC Patienten, die aber nach zwei Wochen eine Therapieresistenz auch gegen erhöhte CpG-ODN-Gaben entwickelten. In den Fällen, in denen sich ein initialer Therapieerfolg einstellte, entwickelten sich neue Tumoren und ein Patient verstarb an massiver Tumorprogression. In Melanompatienten zeigte sich eine teilweise oder komplette Regression der injizierten Metastasen, allerdings kam es zur Progression oder *de novo* Entwicklung von Tumoren in der Umgebung der CpG-ODN-Injektion¹¹¹. In Mäusestudien zeigten hingegen CpG-ODN eine hohe therapeutische Wirksamkeit gegen das Melanom B16.

In diesem Zusammenhang ist eine ältere Arbeit mit dem C26-Tumormodell zu berücksichtigen. Bei Mäusen, die eine BCG-Injektion erhielten, die wie eine CpG-ODN-Injektion die Induktion einer Th1-Antwort und eine Tumorregression bewirken sollte, brachte hier eine operative Entfernung des Primärtumors eine Erhöhung der Zahl an Lungenmetastasen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Mäusen mit sich ¹¹².

Die Beispiele belegen, dass bedingt durch beachtliche Unterschiede der Auswirkungen einer CpG-ODN-Gabe auf das murine und das humane Immunsystem eine Übertragung von Ergebnissen einer antitumoralen Aktivität vom murinen System auf den Patienten nicht direkt möglich ist.

4.3.3 CpG-ODN, dendritische Zellen und Autoimmunität

Ein schmaler Grat liegt zwischen protektiver Immunität und pathogener Autoimmunität. Tumorzellen können Antigene mit gesundem Gewebe teilen und eine Immunantwort gegen diese Antigene kann zu einer Schädigung von gesundem Gewebe führen. So tritt Vitiligo, eine Autoimmunerkrankung, die zu einer Zerstörung der Melanozyten führt, gehäuft bei Melanompatienten auf und ist gleichzeitig mit einer besseren Prognose für den Patienten verbunden ^{113, 114}.

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Regulierung einer Immunantwort. Eine Injektion mit CpG-ODN führt zur Induktion einer Th1-Antwort mit einer erhöhten Zytokinproduktion von IL-12 und IFN- α durch Zellen des angeborenen Immunsystems. Aktivierte Th-1-Zellen sind die Mediatoren einer zellvermittelten Immunität, tragen jedoch auch zur Pathogenese einer Reihe von Immunkrankheiten wie rheumatische Arthritis, Morbus Crohn und Multipler Sklerose bei ¹¹⁵. Es ist deshalb wichtig zu untersuchen, inwieweit eine Behandlung mit CpG-ODN oder aktivieren DC zu Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen führen kann.

CpG-ODN zeigten bei einer Vielzahl von murinen Tumoren therapeutische Wirksamkeit. Neben C26-Tumoren (Kolonkarzinom) und Renca-Tumoren (Nierenzellkarzinom), wurde von anderen Gruppen die Wirksamkeit von CpG-ODN gegen subkutan induzierte Tumoren wie z. B. die Fibrosarkome IE7 und AG104A, das Melanom B16, das Lungenkarzinom 3LL¹¹⁶, oder das Neuroblastom Neuro2a belegt⁷⁴. In den Studien wurde keine Induktion einer Autoimmunerkrankung beobachtet. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in dieser Arbeit beschriebenen Studien. In allen Versuchen wurden Verhaltensauffälligkeiten und Gewichtsverlust der Tiere kontrolliert. Dabei ließen sich unter CpG-ODN-Behandlung, abgesehen von der bereits bekannten Milzvergrößerung, keine negativen Auswirkungen durch die Therapie feststellen. Insbesondere im Hinblick auf Verhaltensänderungen und potentiellen Immunreaktionen wie Fellverlust zeigten sich keine toxikologischen Effekte.

Bei Versuchen mit Affen erwiesen sich CpG-ODN als effektiv in der Induktion einer Immunantwort gegen das Hepatitis B Virus (HBV)¹¹⁷, Malaria¹¹⁸ und Leishmania¹¹⁹. In diesen Studien kam es zu keinem Auftreten von Autoimmunerkrankungen. In einer ersten klinischen Studie am Menschen erwiesen sich CpG-ODN als geeignete Adjuvantien gegen HBV¹²⁰. Mit CpG-ODN konnte in der Tumorthherapie zwar bisher keine befriedigende therapeutische Wirkung erzielt werden, jedoch zeigte sich auch hier in einer ersten Studie, dass intratumorale Injektionen mit CpG-ODN gut vertragen werden¹¹¹.

Beim Menschen ist der Gebrauch vieler Adjuvantien die in Tierversuchen verwendet werden (wie das in Mäusen gut tolerierte LPS oder das komplette Freund'sche Adjuvans), aufgrund ihrer Toxizität limitiert. CpG-ODN zeigen eine niedrige Toxizität und führen wie beschrieben nach bisherigen Erkenntnissen im Tiermodell und in ersten klinischen Anwendungen nicht zu Autoimmunreaktionen. Im Gegensatz zu anderen angewendeten Adjuvantien wie Alum und inkomplettes Freund'sches Adjuvans, die zu einer Th2-Antwort führen und somit einer Th1-Antwort entgegen wirken, induzieren CpG-ODN eine Th1-Antwort. Ein antitumoraler Effekt lässt sich nur mit einer ausgeprägten

Th1-Antwort erreichen, jedoch wird eine Th1-Antwort auch mit einer großen Anzahl von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht, was durch einen erhöhte IFN- γ Spiegel im Gewebe und der Verbesserung von Autoimmunerkrankungen durch Anti-Zytokin-Behandlungen belegt wird ¹¹⁵. Die Kunst der Immuntherapie wird in Zukunft sicher darin bestehen, eine spezifische Immunantwort zu erzielen, ohne eine Autoimmunantwort auszulösen.

Rückkoppelungsmechanismen verhindern im Allgemeinen die Entstehung von Autoimmunerkrankungen bei natürlichen Infektionen und Behandlungen mit CpG-ODN. CpG-ODN induzieren die Expression von Cyclooxygenase-2 und Prostaglandinen. Prostaglandine sind zentrale Mediatoren der Immunantwort, die unter anderem die durch CpG-ODN induzierte IFN- γ Produktion hemmen. Das durch CpG-ODN induzierte Prostaglandin könnte somit zu einer Hemmung der Immunantwort führen ¹²¹.

Wie bereits diskutiert, sind DC potente, die Th1-Antwort induzierende Adjuvantien. Durch Injektionen von aktivierten tumorspezifischen DC ist es möglich, beim Menschen eine spezifisch gegen den Tumor gerichtete T-Zell-Antwort zu induzieren. Diese Immunantwort führt nach bisheriger Erkenntnis zu keiner offensichtlichen Autoimmunität ¹²²⁻¹²⁴. Bei Melanompatienten wurde mit einer DC-Behandlung eine klinisch signifikante Tumorreduktion mit einer Metastasenregression in Haut, Lunge und Pankreas erzielt, ohne dass diese Behandlung zu Autoimmunreaktionen führte ¹²⁴.

Beim therapeutischen Einsatz von DC als natürliches Adjuvans muss bedacht werden, dass DC nicht nur eine Th1-gerichtete T-Zell-Aktivierung, sondern auch eine Hemmung der Th1-Antwort bewirken können. Diese Hemmung der Th1-Antwort kann für das Erreichen einer genügend starken Immunantwort einerseits ein Problem darstellen, andererseits eine Autoimmunantwort verhindern oder verringern.

Rückkopplungsmechanismen, die die Hemmung einer durch CpG-ODN oder DC induzierte Immunantwort bewirken, werden durch direkten Kontakt

aktivierter Zellen oder durch Zytokine induziert. Ein generell der Th1-Antwort zugerechnetes Zytokin ist IL-12. Die IL-12p70-Expression von pDC wird von zwei Signalen kontrolliert, einem mikrobiellen Stimulus wie CpG-ODN und dem auf aktivierten T-Zellen exprimierten CD40-L. CpG-ODN wirkt auf pDC synergistisch mit dem CD40-Liganden (CD40-L) bei der Produktion großer Mengen von IL-12¹⁵. IL-12, ein die Th1-Antwort generierendes Zytokin, initiiert jedoch auch einen über B-Zellen vermittelten Rückkopplungsmechanismus. Die Interaktion von B-Zellen mit IL-12-produzierenden DC ist notwendig für die B-Zell-abhängige verstärkte IL-4-Produktion. B-Zellen ändern dadurch eine für die Induktion einer Th1-Antwort günstige Umgebung in eine die Th2-Antwort fördernde Umgebung. Diese Immunantwort wird über IL-12 initiiert und repräsentiert somit einen Rückkopplungsmechanismus um den dominanten Einfluss von IL-12 und INF- γ zu limitieren¹²⁵.

Auf T-Zellebene wird die Produktion von IL-4 und IL-13 von naiven T-Zellen durch TGF- β und IL-12 reguliert. Kurz nach deren Aktivierung durch IL-12 exprimieren naive T-Zellen OX40 an der Zelloberfläche. Die Bindung von OX40 auf aktivierten naiven T-Zellen erhöht die Produktion von IL-4 und IL-13, supprimiert die Produktion von IFN- γ und fördert die Entwicklung einer Th2-Antwort¹²⁶. Ob dieser Rückkopplungsmechanismus in der Tumorthherapie mit DC oder CpG-ODN eine Rolle spielt und insbesondere, welche Rückkopplungsmechanismen unter alleiniger oder zusätzlicher Behandlung mit DC oder CpG-ODN auftreten, muss evaluiert werden.

Das Risiko einer Autoimmunerkrankung durch eine induzierte Th1-Antwort scheint durch stringente Kontrollmechanismen auf Zell- und Zytokinebene vermindert zu werden. Es muss sich dennoch in weiteren Studien zeigen, ob es einen therapeutischen Spielraum gibt, der es erlaubt, eine effektive antitumorale Wirkung beim Menschen zu erzielen, ohne Autoimmunreaktionen auszulösen. Bisherige Studien in Tierversuchen und in ersten klinischen Studien lassen vermuten, dass dieser therapeutische Spielraum für CpG-ODN und DC existiert.

5. Ausblick

Es hat sich im murinen Modell gezeigt, dass eine Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich zur vollständigen Tumorregression kleinerer Tumoren und in Verbindung mit einer auf DC basierenden Therapie zur Regression großer subkutaner Tumoren führen kann. Die hohe Konzentration von natürlich vorkommenden bakteriellen CpG-ODN im Darmlumen und das darmspezifische Immunsystem machen es im Fall einer Immuntherapie mit CpG-ODN beim Kolonkarzinom notwendig herauszufinden, ob durch eine lokale CpG-ODN-Behandlung eine intestinale Immunantwort erfolgt.

Die Frage, ob bei einer peritumoralen CpG-ODN-Therapie oder einer kombinierten CpG-ODN/DC-Therapie in einem orthotopen Modell ähnlich gute Resultate erzielt werden können muss vor einer möglichen klinischen Studie im gastrointestinalen Bereich überprüft werden. Erste Versuche, die nach Beendigung dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten bereits die therapeutische Wirkung einer DC/CpG-ODN-Kombination auch im murinen orthotopen Modell.

Es ergeben sich aus dieser Arbeit eine Reihe von weiteren Fragen: Wie beeinflusst CpG-ODN das Migrationsverhalten der DC? Wie tragen DC zur Immunantwort bei? Weshalb bildet sich bei C26-Tumoren mit CpG-ODN eine lang anhaltende Immunität aus, wohingegen in einem Renca-Tumormodell dies nicht der Fall ist? Letztendlich muss festgestellt werden, ob und wie die Erfolge bei der Behandlung eines murinen Kolonkarzinoms auf eine Behandlung des Menschen übertragen werden können.

Ziel einer Forschung im onkologischen Bereich sollte neben dem Erkenntnisgewinn stets auch die Frage nach einer Umsetzbarkeit in die Klinik sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für eine mögliche klinische Studie zum Einsatz von CpG-ODN zur Therapie des Kolonkarzinoms beim Menschen.

6. Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war, an einem murinen Modell des Kolonkarzinoms die therapeutische Wirksamkeit von CpG-ODN zu testen und durch die Kombination mit weiteren Therapien eine Optimierung der CpG-ODN-basierten Therapie zu erreichen.

In dem ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von CpG-ODN als Monotherapie zur Regression von tastbaren etablierten murinen C26-Kolontumoren führt, wenn die Injektion in den Randbereich des Tumors erfolgte. Der Tumorrogression folgte eine lang anhaltende Immunität gegen eine erneute Tumorinduktion mit der gleichen Tumorzelllinie.

Wurden zwei C26-Tumoren in gegenüberliegenden Flanken induziert, bewirkte die Injektion von CpG-ODN in den Tumorrandbereich des einen Tumors bei 68 Prozent der behandelten Mäuse eine Regression und Ausheilung beider Tumoren und eine Protektion gegenüber einer nachfolgenden Tumorinduktion mit C26-Zellen. Dies bewies, dass die lokale Therapie eines Tumors eine systemische Immunantwort auslösen kann. Neben einer spezifischen protektiven Immunantwort führte die CpG-ODN-Therapie auch zu einer Aktivierung der angeborenen Immunantwort.

Die lokale Behandlung von Renca-Nierenzellkarzinomen führte wie die Behandlung von C26-Tumoren zu einer Tumorrogression. Bei diesem Tumor ließ sich allerdings keine Gedächtnisantwort induzieren und eine systemische Immunantwort konnte nicht erreicht werden. Damit bestehen Unterschiede in der Effektivität der CpG-ODN-Monotherapie bei verschiedenen Tumoren.

Der Erfolg der CpG-ODN-Monotherapie war jedoch nur auf Tumoren mit einem Durchmesser von durchschnittlich 3 mm begrenzt.

Große etablierte Tumoren mit einem Tumordurchmesser von 1 cm zu Beginn der Behandlung konnten hingegen nur durch Injektion einer kombinierten

Vakzine von mit Tumorantigen beladenen DC und CpG-ODN erfolgreich therapiert werden. Bei diesen Tumoren induzierten sowohl tumorspezifische DC allein als auch CpG-ODN allein keine, oder nur eine äußerst geringe Reduktion des Tumorwachstums. DC und CpG-ODN wirkten jedoch bei einer Koinjektion synergistisch und führten zu einer Tumorstasis. Die durch DC gesteigerte Immunantwort ist antigenspezifisch da DC, die mit einem Kontrolltumor koinkubiert wurden, nicht zu einer Verbesserung einer peripheren CpG-ODN-Therapie führten.

Bei einem Einsatz einer kombinierten Therapie von mit Tumorantigen beladenen DC, die mit CpG-ODN in die dem Tumor gegenüberliegende Flanke injiziert wurden und in den Tumorrandbereich injiziertem CpG-ODN kam es zu einer vollständigen Tumorregression von etablierten subkutanen Tumoren mit einem Durchmesser von bis zu einem Zentimeter. Durch diese Kombinationstherapie wurde somit die Regression eines Tumors von 5 % des Körpergewichts erreicht.

7. Literatur

1. Rothenfusser S, Jahrsdörfer B, Krug A, Endres S, Hartmann G. CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; Jg 98:981-985.
2. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-9.
3. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop* 1991:3-11.
4. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994; 64:529-64.
5. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, 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.
6. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, et al. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992; 36:983-97.
7. Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164:1617-24.
8. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:2154-63.
9. Blazar BR, Krieg AM, Taylor PA. Synthetic unmethylated cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides are potent stimulators of antileukemia responses in naive and bone marrow transplant recipients. *Blood* 2001; 98:1217-25.
10. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.
11. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2:675-80.
12. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9237-42.

13. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000; 192:595-600.
14. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, et al. Cutting edge: role of toll-like receptor 9 in cpg dna-induced activation of human cells. *J Immunol* 2001; 167:3555-8.
15. Krug A, Towarowski A, Britsch S, et al. 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.
16. Young JW, Steinman RM. The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation. *Stem Cells* 1996; 14:376-87.
17. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96.
18. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
19. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
20. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997; 186:665-72.
21. Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 1993; 362:761-3.
22. Lau R, Wang F, Jeffery G, et al. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2001; 24:66-78.
23. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4:328-32.
24. Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* 2001; 61:842-7.

25. Burch PA, Breen JK, Buckner JC, et al. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2175-82.
26. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 2001; 166:4254-9.
27. Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 2002; 109:409-17.
28. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2:52-8.
29. Holtl L, Rieser C, Papesh C, et al. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen-pulsed dendritic cells. *J Urol* 1999; 161:777-82.
30. Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K, et al. Dendritic cell vaccination with mage peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2277-84.
31. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194:863-70.
32. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:1036-41.
33. Liu YJ, Kadowaki N, Risoan MC, Soumelis V. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251:149-59.
34. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000; 1:199-205.
35. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 194:1171-8.
36. Fuchs EJ, Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 1996; 8:271-80.

37. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-51.
38. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. 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.
39. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-103.
40. Almand B, Resser JR, Lindman B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1755-66.
41. Pitot HC, Goldberg RM. Future directions in adjuvant therapy for stage III colon carcinoma. *Oncology (Huntingt)* 2001; 15:31-6.
42. Cunningham D, James RD. Integrating the oral fluoropyrimidines into the management of advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2001; 37:826-34.
43. Staib L, Link KH, Beger HG. Toxicity and effects of adjuvant therapy in colon cancer: results of the German prospective, controlled randomized multicenter trial FOGT-1. *J Gastrointest Surg* 2001; 5:275-81.
44. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. *J Clin Oncol* 1999; 17:1356-63.
45. Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, et al. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol* 1999; 17:1349-55.
46. Illiger HJ. [Monoclonal antibody 17-1A (Panorex). A new approach to adjuvant therapy of colonic carcinoma]. *Internist (Berl)* 1997; 38:1001-6; discussion 1006.
47. Koda K, Glassy MC, McKnight ME, et al. Immunotherapy for recurrent colorectal cancers with human monoclonal antibody SK-1. *Anticancer Res* 2001; 21:621-7.

48. Hanna MG, Jr., Hoover HC, Jr., Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise. *Vaccine* 2001; 19:2576-82.
49. Harris JE, Ryan L, Hoover HC, Jr., et al. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 2000; 18:148-57.
50. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med* 1995; 181:713-21.
51. Storer JB. Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mouse strains. *J Gerontol* 1966; 21:404-9.
52. Festing MF, Blackmore DK. Life span of specified-pathogen-free (MRC category 4) mice and rats. *Lab Anim* 1971; 5:179-92.
53. Chiodoni C, Paglia P, Stoppacciaro A, Rodolfo M, Parenza M, Colombo MP. Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 1999; 190:125-33.
54. Salup RR, Herberman RB, Chirigos MA, Back T, Wiltrout RH. Therapy of peritoneal murine cancer with biological response modifiers. *J Immunopharmacol* 1985; 7:417-36.
55. Yi AK, Krieg AM. CpG DNA rescue from anti-IgM-induced WEHI-231 B lymphoma apoptosis via modulation of I kappa B alpha and I kappa B beta and sustained activation of nuclear factor-kappa B/c-Rel. *J Immunol* 1998; 160:1240-5.
56. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176:1693-702.
57. Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, et al. 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.

58. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 2000; 30:1813-22.
59. Delius M, Ueberle F, Eisenmenger W. Extracorporeal shock waves act by shock wave-gas bubble interaction. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24:1055-9.
60. Egeter O, Mocikat R, Ghoreschi K, Dieckmann A, Rocken M. Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Res* 2000; 60:1515-20.
61. Esche C, Lokshin A, Shurin GV, et al. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66:336-44.
62. Liu HM, Newbrough SE, Bhatia SK, Dahle CE, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92:3730-6.
63. Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, et al. Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66:345-9.
64. Vaage J. Peri-tumor interleukin-2 causes systemic therapeutic effect via interferon-gamma induction. *Int J Cancer* 1991; 49:598-600.
65. Tschoep K, Hartmann G, Jox R, et al. Shock waves: a novel method for cytoplasmic delivery of antisense oligonucleotides. *J Mol Med* 2001; 79:306-13.
66. van de Winkel JG, Capel PJ. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 1993; 14:215-21.
67. Janeway CA, Travers T. *Immunobiology*. 2001.
68. Ballas ZK, Rasmussen W. Lymphokine-activated killer cells. VII. IL-4 induces an NK1.1+CD8 alpha+beta- TCR-alpha beta B220+ lymphokine-activated killer subset. *J Immunol* 1993; 150:17-30.
69. Renno T, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR. Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 183:431-7.

70. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164:944-53.
71. Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, et al. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur J Immunol* 2001; 31:3525-3534.
72. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 2001; 29:1247-55.
73. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay J, Palucka K. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Lett* 2000; 74:5-10.
74. Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; 59:5429-32.
75. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375:151-5.
76. Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, et al. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160:3627-30.
77. Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 1998; 161:2428-34.
78. Arnold JM, Cummings M, Purdie D, Chenevix-Trench G. Reduced expression of intercellular adhesion molecule-1 in ovarian adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2001; 85:1351-8.
79. Davila E, Celis E. Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 2000; 165:539-47.
80. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 1999; 189:753-6.
81. Diehl L, den Boer AT, Schoenberger SP, et al. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med* 1999; 5:774-9.

82. Melief CJ. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 1992; 58:143-75.
83. Schild HJ, Kyewski B, Von Hoegen P, Schirmacher V. CD4+ helper T cells are required for resistance to a highly metastatic murine tumor. *Eur J Immunol* 1987; 17:1863-6.
84. Ossendorp F, Toes RE, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity. *Immunol Lett* 2000; 74:75-9.
85. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:588-94.
86. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:1178-83.
87. Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, et al. CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 1998; 187:1555-64.
88. Forster I, Lieberam I. Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolescent mice. *Eur J Immunol* 1996; 26:3194-202.
89. Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 1997; 186:239-45.
90. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:2045-54.
91. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9305-10.
92. Sayers TJ, Wiltrot TA, McCormick K, Husted C, Wiltrot RH. Antitumor effects of alpha-interferon and gamma-interferon on a murine renal cancer (Renca) in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1990; 50:5414-20.
93. Sayers TJ, Brooks AD, Lee JK, et al. Molecular mechanisms of immune-mediated lysis of murine renal cancer: differential contributions of perforin-dependent versus Fas-mediated pathways in lysis by NK and T cells. *J Immunol* 1998; 161:3957-65.

94. Banat GA, Christ O, Cochlovius B, Pralle HB, Zoller M. Tumour-induced suppression of immune response and its correction. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 49:573-86.
95. Ballas ZK, Krieg AM, Warren T, et al. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001; 167:4878-4886.
96. Ochsenbein AF, Siervo S, Odermatt B, et al. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 2001; 411:1058-64.
97. Ban E, Dupre L, Hermann E, et al. CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo. *Int Immunol* 2000; 12:737-45.
98. Eggert AA, Schreurs MW, Boerman OC, et al. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res* 1999; 59:3340-5.
99. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996; 184:1413-24.
100. Schwaab T, Weiss JE, Schned AR, Barth Jr RJ. Dendritic cell infiltration in colon cancer. *J Immunother* 2001; 24:130-137.
101. Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* 1995; 60:1539-45.
102. Thurnher M, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Holtl L. The disabled dendritic cell. *Faseb J* 2001; 15:1054-61.
103. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000; 1:311-6.
104. Serody JS, Collins EJ, Tisch RM, Kuhns JJ, Frelinger JA. T cell activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery. *J Immunol* 2000; 164:4961-7.
105. Barratt-Boyes SM, Zimmer MI, Harshyne LA, et al. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol* 2000; 164:2487-95.

106. Klein CA. The biology and analysis of single disseminated tumour cells. *Trends Cell Biol* 2000; 10:489-93.
107. Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 1996; 377:675-84.
108. Schwartz S, Jr., Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59:2995-3002.
109. Ohmiya N, Matsumoto S, Yamamoto H, Baranovskaya S, Malkhosyan SR, Perucho M. Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Gene* 2001; 272:301-13.
110. Hartmann G, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther* 1999; 6:893-903.
111. Trefzer U, C. K, K. P, P. W, W. S, E. OK. Preliminary results of a phase I trial of intralesional injection of CpG DNA in basal cell carcinoma and melanoma. Abstract collection of the 2nd International Symposium "Activating Immunity with CpG Oligos", Amelia Island, Florida, USA 2001.
112. Colmerauer ME, Koziol JA, Pilch YH. Enhancement of metastasis development by BCG immunotherapy. *J Surg Oncol* 1980; 15:235-41.
113. Pittet MJ, Zippelius A, Valmori D, Speiser DE, Cerottini JC, Romero P. Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends Immunol* 2002; 23:325-8.
114. Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen JL, Cerundolo V. High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med* 1998; 188:1203-8.
115. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nature Rev Immunol* 2002; 2:37-45.
116. Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hammerling GJ. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2001; 167:5247-53.

117. Davis HL, Suparto, II, Weeratna RR, et al. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; 18:1920-4.
118. Jones TR, Obaldia N, 3rd, Gramzinski RA, et al. Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine* 1999; 17:3065-71.
119. Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in Pprimates. *J Immunol* 2002; 168:1659-1663.
120. Davis H, Krieg A, Cooper C, Morris M, Cameron D, Heathcote J. CpG ODN is generally well tolerated and highly effective in humans as adjuvant to HBV vaccine: Preliminary results of Phase I trial with CpG ODN 7909. Abstract collection of the 2nd International Symposium "Activating Immunity with CpG Oligos", Amelia Island, Florida, USA 2001.
121. Chen Y, Zhang J, Moore SA, et al. CpG DNA induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *Int Immunol* 2001; 13:1013-20.
122. Bhardwaj N. Processing and presentation of antigens by dendritic cells: implications for vaccines. *Trends Mol Med* 2001; 7:388-94.
123. Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 2002; 109:409-17.
124. Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001; 7:761-5.
125. Skok J, Poudrier J, Gray D. Dendritic cell-derived IL-12 promotes B cell induction of Th2 differentiation: a feedback regulation of Th1 development. *J Immunol* 1999; 163:4284-91.
126. Delespesse G, Ohshima Y, Yang LP, Demeure C, Sarfati M. OX40-Mediated cosignal enhances the maturation of naive human CD4+ T cells into high IL-4-producing effectors. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118:384-6.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APAAP	alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
BALB/c	Bagg albino/c (Albinomaus mit eingeschränkter Th1-Antwort)
BCC	<i>basal cell carcinoma</i> , Basalzellkarzinom
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsantigene
CD40-L	CD40-Ligand
CFSE	5-(and-6-)carboxyfluorescein diacetat succinimidyle ester
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> , modifiziertes Eagle Medium von Dulbecco
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
5-FU	5-Fluoruracil
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> , Granulozyten und Macrophagenkolonien stimulierender Faktor
Gy	Gray (1 Gray = 1 J/kg)
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i> , intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (CD 54)
I.E.	internationale Einheiten
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- γ	Interferon-gamma

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Leucovorin
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
mGM-CSF	<i>murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC-II	<i>major histocompatibility complex II</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex II
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotide
OX40-L	OX40-Ligand
PE	Phycoerythrin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cells</i> , plasmazytoide dendritische Zellen
RPE	Phycoerythrin aus <i>Porphyidium cruentum</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
TE Puffer	Tris-Hydrochlorid-EDTA-Puffer
Th-1	inflammatorische CD4-T-Zellen (Effektorzellen, induzieren IFN- γ und IL-2)
Th-2	Helfer-CD4-T-Zellen (induzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10)
TNF	Tumornekrosefaktor
U	<i>units</i> , Einheiten

Danksagung

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

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Gunther Hartmann für die hervorragende Betreuung, die Möglichkeit zum Besuch von Kongressen, die fruchtbaren Diskussionen und die Verbesserungsvorschläge für die Doktorarbeit bedanken.

Frau Angelika Schlamp danke ich für die Einführung in das murine Kolontumormodell und Herrn Dr. Simon Rothenfusser und Frau Carmen Bock für viele wertvolle Hinweise und Ratschläge.

Auch danke ich meiner Kollegin Frau Katharina Rall und meinem Kollegen Herrn Sebastian Beck für ihren Enthusiasmus, ihren Einsatzwillen, ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Allen anderen Kollegen aus der klinischen Pharmakologie, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für zwei wunderbare Jahre.

Veröffentlichungen

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

1. Heckelsmiller K, Rall K, Schlamp A, Seiderer J, Endres S, Hartmann G.
Peritumoral CpG monotherapy leads to rejection of local and distant established tumors and to long-term memory. 31st Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2000, Düsseldorf; *Immunobiology* 203 (2000)1-3, Seiten 404-405
2. Heckelsmiller K, Rall K, Schlamp A, Hornung V, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G.
Cure of established tumors by repeated peritumoral injection of CpG-ODN is associated with the induction of tumor-specific CD4 and CD8 T cell responses. 11th International Congress of Immunology 2001, Stockholm, *Scandinavian Journal of Immunology* Volume 54, Supplement 1 July/August 2001, Seite 135
3. Heckelsmiller K, Rall K, Schlamp A, Rothenfusser S, Seiderer J, Hornung V, Endres S, Hartmann G.
Immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide zur Therapie etablierter Tumore in einem murinen Modell des Colon-Karzinoms. *Gastroenterologie* 2001, 56. Tagung der Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Münster 2001, *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2001; 39, Seite 688
4. Heckelsmiller K, Rall K, Schlamp A, Endres S, Hartmann G.
CpG-ODN in vivo potentially enhance dendritic cell based tumor therapy in a murine model of colon carcinoma. 32nd Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2001, Dresden, *Immunobiology* 204 (2001)1-2, Seite 133

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in zwei Originalarbeiten beschrieben

1. Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, Sipos S, Schlamp A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large established tumors which resist chemotherapy, *European Journal of Immunology*, 2002, Nov; 32 (11) 3235-45
2. Heckelsmiller K, Rall K., Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdörfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effector cells to cure established tumors in a murine colon carcinoma model, *Journal of Immunology*, 2002, Oct 1/69(7) 3892-9

Lebenslauf

Dipl.-Biol. Klaus Heckelsmiller

Geburtsdaten 23.05.1965 in Legau/Allgäu

Familienstand verheiratet

Schulbildung und Lehre

09/77-07/81 Wirtschaftsschule Memmingen

09/81-07/83 Lehre zum Industriekaufmann

09/83-06/85 Berufsoberschule Memmingen, Fachrichtung Wirtschaft

Bundeswehr

10/85-09/89 Sanitätsunteroffizier, SanTruppführer

Studium

10/90-08/95 Studium der Biologie an der Universität Ulm

Vordiplom: 15.10.92 Note: sehr gut

Diplom: 20.07.95 Note: sehr gut

08/94-07/95 Diplomarbeit an der Oregon State University im
College of Pharmacy in Corvallis, OR, USA

Thema: Fungizide Substanzen in marinen Algen

Berufserfahrung und wissenschaftliche Tätigkeit

01/96-11/98 Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Laser-
technologien in der Medizin, Ulm

11/98-11/99 Projektassistent bei Arzneimittelstudien

11/99-11/01 Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie,
Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der LMU

11/01-12/02 Wissenschaftlicher Angestellter im Genzentrum der LMU

seit 01/03 Wissenschaftlicher Angestellter im MPI für Neurobiologie,
Martinsried

München im Februar 2003