

Vakzinierungsstrategien für die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

vorgelegte
DISSERTATION

von

Dipl. Biol. Nicolás Nathaniel Herbert

aus

Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Margot Zöller

Korreferent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2010

Humor und Geduld sind zwei Kamele,
mit denen du durch jede Wüste kommst.

(Phil Bosmans)

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Tumormunologie	2
2.1.1. Tumorantigene	3
2.1.2. Stimulation einer optimalen Immunantwort	6
2.1.3. Überwindung immunsuppressiver Mechanismen	8
2.2. Immuntherapeutische Strategien.....	10
2.2.1. Passive Immuntherapie	10
2.2.2. Aktive Immuntherapie.....	12
2.2.3. Adjuvantien.....	13
2.3. Ziel der Arbeit	15
3. Material.....	18
3.1. Chemikalien	18
3.2. Antikörper	19
3.3. Primer	22
3.4. siRNA.....	22
3.5. Peptide.....	22
3.6. Rekombinante Zytokine.....	24
3.7. Radionuklide	24
3.8. Enzyme.....	24
3.9. Vektoren	24
3.10. Transfektionsreagenzien	25
3.11. Zellkulturmedien	25

3.12. Puffer und Lösungen	26
3.13. Verwendete Kits	27
3.14. Instrumente und Geräte.....	27
3.15. Verbrauchsmaterialien	28
4. Methoden	29
4.1. Tierexperimentelle Methoden	29
4.1.1. Haltung	29
4.1.2. Präparation von lymphatischen Organen und Tumor.....	29
4.1.3. Isolation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) durch Ficoll-Hypaque-Zentrifugation	30
4.1.4. Blutentnahme und Gewinnung von Serum.....	30
4.1.5. Tumorwachstumsexperimente und Immunisierung von Mäusen.....	30
4.2. Zellbiologische Methoden	31
4.2.1. Zelllinien und Kultur	31
4.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl.....	31
4.2.3. Kryokonservierung.....	31
4.3. Immunologische Methoden	32
4.3.1. Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark.....	32
4.3.2. Beladung von dendritischen Zellen mit Peptid und Tumorlysat.....	32
4.3.3. Durchflusszytometrie	33
4.3.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	35
4.3.5. ELISA-Spot-Assay	35
4.3.6. T-Zell-Proliferationsassay	36
4.3.7. Zytotoxizitätsassay	37
4.3.8. TRAP-Assay (T cell recognition of antigen-presenting cells by protein capture)	38
4.3.9. Immunhistologie.....	40

4.4. Molekular- und mikrobiologische Methoden.....	41
4.4.1. Klonierung humaner TAA und stabile Transfektion von Renca-Zellen	41
4.4.2. Gene silencing durch RNS-Interferenz	41
4.4.3. siRNA-Transfektion	42
4.4.4. Isolation der Gesamt-RNS aus Zellen	43
4.4.5. Reverse Transkription.....	43
4.4.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	44
4.4.7. Agarose-Gelelektrophorese.....	45
4.4.8. Transformation von Salmonella typhimurium aroA SL7207	45
4.5. Statistik	46
5. Ergebnisse	47
5.1. Vakzinierung mit tumorpeptid- oder tumorlysatbeladenen dendritischen Zellen induziert eine Anti-Tumor-Immunantwort.....	47
5.2. Tumorantigenbeladene DC und Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 induzieren die Expansion antigenspezifischer T-Zellen	49
5.3. Antigenspezifische CD8 ⁺ -T-Zellen interagieren vorrangig mit peptid- und lysatbeladenen DC nach Kovakzinierung mit SL-GOLGA4.....	53
5.4. T-Zellaktivierung nach Tumorantigen- und Autoantigen-Kovakzinierung	58
5.5. Einfluss der Vakzinierung auf die Expression von immunregulatorischen Zytokinen.....	59
5.6. Einfluss der Vakzinierung auf die Induktion und Rekrutierung von T _{reg} -Zellen und MDSC	61
5.7. Verstärkte Aktivität zytotoxischer T-Effektorzellen nach Tumorantigen- und Autoantigen-Kovakzinierung	64
5.8. Tumorantigen- und autoantigenspezifische T-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe.....	68
5.9. Eine kombinierte Vakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC und autoantigen transformierten Salmonellen inhibiert das Tumorwachstum	71
6. Diskussion	76
6.1. Wahl der Antigene und Art der Vakzinierung	77

6.1.1.	Die Tumorantigene G250 und MAGE9	77
6.1.2.	Das Autoantigen GOLGA4.....	77
6.1.3.	Kovakzinierung mit attenuierten <i>Salmonella typhimurium</i>	78
6.1.4.	Immunsuppression durch Salmonellen.....	78
6.2.	Der Modus, über den die Kovakzinierung mit einem Autoantigen tumorantigen spezifische T-Zellen unterstützt.....	79
6.2.1.	Die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen	79
6.2.2.	Die Rolle dendritischer Zellen.....	80
6.2.3.	Die Rolle der Salmonellen	80
6.2.4.	Die Antigenpezifität	81
6.2.5.	Vergleich von Peptid- und Lysatvakzinierung	82
6.3.	Die Kovakzinierung mit Salmonellen unterstützt die Rekrutierung von Effektor-T-Zellen in den Tumor.....	82
6.4.	Der Wert und Nutzen dieser Arbeit.....	84
Literatur		85
Abkürzungsverzeichnis		101
Danksagung		104
Lebenslauf.....		105
Publikationen.....		106
Eidesstattliche Erklärung		107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adaptive Immunantwort auf Tumorantigene.....	7
Abbildung 2: Immun-Escape und Immun-Evasion von Tumorzellen	9
Abbildung 3: Transfer von heterologen Antigenen durch <i>Salmonella typhimurium</i>	15
Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie.....	33
Abbildung 5: Prinzip des TRAP-Assays.....	39
Abbildung 6: RNS-Interferenz.....	42
Abbildung 7: Expression der Antigene MAGE9, G250 und GOLGA4 in Renca-Zellen	47
Abbildung 8: Inhibition des Tumorwachstums nach Vakzinierung mit TAA-beladenen DC	48
Abbildung 9: Expansion von T-Zellen nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigentransformierten Salmonellen	50
Abbildung 10: Proliferation von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen nach Kovakzinierung mit TAA- beladenen DC und autoantigentransformierten Salmonellen	51
Abbildung 11: Antigen-spezifische Proliferation von LNC vakzinierter Mäuse nach Restimulation mit beladenen DC.....	52
Abbildung 12: Antigen-spezifische Interaktion von beladenen DC mit T-Zellen aus vakzinieren tumorfreen Mäusen	54
Abbildung 13: <i>Ex-vivo</i> -TRAP-Analyse tumorantigen-spezifischer T-Zellen aus vakzinieren tumortragenden Mäusen.....	56
Abbildung 14: TRAP-Analyse von autoantigen-spezifischen T-Zellen aus vakzinieren tumortragenden Mäusen.....	57
Abbildung 15: Aktivierung von T-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen	58
Abbildung 16: Expression von Zytokinen nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen	60
Abbildung 17: Einfluss einer Vakzinierung mit Tumor- und Autoantigenen auf die Expression immunregulatorischer Zytokine und Zellen.....	62
Abbildung 18: Rekrutierung immunregulatorischer Zellen in den Tumor	63
Abbildung 19: Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und IFN- γ -Sekretion nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen	65
Abbildung 20: Aktivierung autoantigen-spezifischer CTL durch Vakzinierung mit SL-GOLGA4	67

Abbildung 21: Rekrutierung von antigenspezifischen T-Zellen in den Tumor von vakzinierten Mäusen.....	69
Abbildung 22: Expression von Chemokin-Rezeptoren nach Kovakzinerung mit TAA-beladenen DC und autoantigentransformierten Salmonellen.....	70
Abbildung 23: Inhibition des Tumorwachstums durch prophylaktische Vakzinerung mit tumorantigenbeladenen DC und SL-GOLGA4-Kovakzinerung	72
Abbildung 24: Einfluss der Vakzinerung auf das Wachstum von nicht-tumorantigenexprimierenden Tumorzellen	73
Abbildung 25: Inhibition des Tumorwachstums durch therapeutische Vakzinerung mit tumorantigenbeladenen DC und SL-GOLGA4-Kovakzinerung	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorantigene	4
Tabelle 2: Adjuvantien	13
Tabelle 3: Chemikalien	18
Tabelle 4: Anti-Maus-Antikörper	19
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper und Streptavidin-Konjugate	21
Tabelle 6: Primer.....	22
Tabelle 7: siRNA	22
Tabelle 8: Peptide	22
Tabelle 9: Rekombinante Zytokine	24
Tabelle 10: Radionuklide	24
Tabelle 11: Enzyme.....	24
Tabelle 12: Vektoren	24
Tabelle 13: Transfektionsreagenzien.....	25
Tabelle 14: Standard-Zellkulturmedien.....	25
Tabelle 15: Spezielle Zellkulturmedien.....	25
Tabelle 16: Puffer und Lösungen.....	26
Tabelle 17: Verwendete Kits.....	27
Tabelle 18: Instrumente und Geräte	27
Tabelle 19: Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 20: Einfluss der Vakzinierung mit TAA beladenen DC auf das Tumorwachstum und das Überleben	49
Tabelle 21: Einfluss der prophylaktischen Vakzinierung auf das Tumorwachstum und das Überleben	72
Tabelle 22: Einfluss der therapeutischen Vakzinierung auf das Tumorwachstum und das Überleben	74

1. Zusammenfassung

Für eine effiziente Vakzinierung werden in aller Regel Adjuvantien benötigt, die häufig toxische Nebenwirkungen zeigen. Die simultane Induktion einer Autoimmunreaktion wird als eine alternative, nicht-toxische Möglichkeit diskutiert, die schwache Immunantwort gegen Tumorantigene zu verstärken. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die Wirksamkeit der Vakzinierung mit dendritischen Zellen (DC) gegen die Nierenzellkarzinom-Antigene G250 und MAGE9 durch eine gleichzeitige Vakzinierung mit dem von Nierenzellkarzinomen exprimierten Autoantigen GOLGA4 verbessern lässt.

BALB/c-Mäuse wurden mit DC vakziniert, die mit MHC-Klasse-I-restringierten Peptiden der Tumorantigene G250 und MAGE9 oder mit Tumorlysat beladen wurden. Prophylaktisch immunisierte Mäuse waren in der Lage, eine geringe Dosis an G250- und MAGE9-exprimierenden Renca-Tumorzellen abzustößeln. Bei einer höheren Tumordosis (200x TD₁₀₀) wurde das Tumorwachstum aber nur verlangsamt. Stattdessen konnten 75%-100% der prophylaktisch vakzinierten Mäuse durch Kovakzinierung mit *Salmonella typhimurium*, die mit einem eukaryotischen Expressionsvektor transformiert wurden, der für das Autoantigen GOLGA4 kodiert, den Tumor abstoßen. Selbst bei einer therapeutischen Vakzinierung konnte die Überlebensrate durch die Kovakzinierung mit GOLGA4-transformierten *S. typhimurium* von 20% auf 40% erhöht werden.

Die Kovakzinierung mit einem Autoantigen verstärkte speziell in peptidvakzinierten Mäusen signifikant die Expansion und Aktivierung von tumorspezifischen CD4⁺- und CD8⁺-Effektor-T-Zellen. Die kombinatorische Vakzinierung mit *S. typhimurium* führte zu einer erhöhten Expression und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ , die die gegen den Tumor gerichtete antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort nachhaltig unterstützten. Außerdem wurde die Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR6, CXCR3 und CXCR4 erhöht, was zu einer verstärkten Rekrutierung von Effektor-T-Zellen in den Tumor führte. Die Kovakzinierung hatte keinen Effekt auf die Induktion von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}-Zellen) und bewirkte nur einen geringfügigen Anstieg von myeloiden Suppressorzellen (MDSC).

Diese Befunde zeigen, dass durch die Vakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC und autoantigen-transformierten *S. typhimurium* eine effektive, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort aufgebaut wurde. Die Kovakzinierung trägt hierbei insbesondere zur Aktivierung von autoantigen- und tumorspezifischen T-Helfer-Zellen und der Sekretion immunstimulierender Zytokine und Chemokine bei, die zu einer verstärkten Aktivierung von tumorantigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL) und deren Einwanderung in den Tumor führen.

2. Einleitung

2.1. Tumورimmunologie

Immunüberwachung von Tumorzellen (*immune surveillance of cancer*), ein Begriff, den Burnet schon in den 1950er Jahren prägte, wurde stets kontrovers diskutiert (1). Der Begriff der Immunüberwachung beschrieb zunächst das einfache Konzept, dass Tumorzellen vom Immunsystem eines gesunden Organismus erkannt und zerstört werden können. Wobei die Hypothese auf der Beobachtung basierte, dass im geschwächten Organismus, zum Beispiel nach Bestrahlung, eine höhere Tumorzinzidenz beobachtet wurde (2-6).

Aus heutiger Sicht hat sich das Konzept zwar bewahrheitet, beruht aber auf einem komplexen Wechselspiel zwischen Immunsystem und dem Prozess der Entstehung von Krebs. Dieser Prozess, Immun-Editing (7) genannt, hat im Prinzip drei mögliche Ausgänge. (a) Das Immunsystem erkennt frühzeitig veränderte Zellen mit dem Potential zur Tumorentwicklung und eliminiert diese. (b) Ein Gleichgewicht zwischen einer Anti-Tumor-Immunreaktion und der durch Selektionsdruck hervorgerufenen Entstehung von neuen weniger immunogenen Tumorzellen (8). (c) Die Entstehung von Krebs durch die Eigenschaft von Tumorzellen, sich der Zerstörung durch das Immunsystem zu entziehen (*tumor escape*) (7). Das Immunsystem kann dabei auf zwei Arten auf Tumorzellen reagieren. Es erkennt und reagiert auf Moleküle, die speziell und nur von Tumorzellen exprimiert werden, sogenannte tumorspezifische Antigene, oder es erkennt Moleküle, die in Tumorzellen gegenüber normalen, gesunden Zellen verändert exprimiert werden, sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA) (9). Tumorzellen sind also aufgrund ihres veränderten oder entarteten Charakters antigen, das bedeutet, sie werden vom Immunsystem als fremd erkannt. Sie sind jedoch nicht unbedingt immunogen, was bedeutet, dass die Tumorantigene keine Immunantwort auslösen, oder die Tumorantigene sind immunsuppressiv, so dass sie den Aufbau einer Immunantwort effektiv unterdrücken. Letztlich kann der Tumor dem Druck des Immunsystems ausweichen und sogenannte *immune-escape*-Mechanismen entwickeln.

Die Anforderungen an zelluläre immuntherapeutische Verfahren zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen orientieren sich an diesen vorgegebenen Prinzipien und dem heutigen Verständnis der molekularen Prozesse beim Aufbau einer zellulären adaptiven Immunantwort. Die Herausforderungen sind demnach die Identifikation von immunogenen Tumorantigenen,

die optimale Aufnahme, Prozessierung und Präsentation der Antigene sowie die optimale Aktivierung des Immunsystems und schließlich die Überwindung von immunsuppressiven Mechanismen und die effektive Eliminierung des Tumors (10,11).

2.1.1. Tumorantigene

Seit der Entdeckung des ersten Tumorantigens in einem humanen Melanom (12) und mit der Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von Tumorantigenen sind in den letzten 20 Jahren eine Vielzahl von Tumorantigenen beschrieben und charakterisiert worden. Im Prinzip lassen sich die Antigene in zwei Gruppen aufteilen (9,13).

Tumorspezifische Antigene sind aufgrund der genetischen Instabilität von Krebszellen (14) entstandene veränderte Genprodukte, die meist mit der malignen Transformation der Zellen in Zusammenhang stehen und daher oft Tumorsuppressorgene oder Proto-Onkogene betreffen (15). Sie können auf vielfältige Weise wie durch Punktmutation, Deletion oder chromosomale Translokation entstehen. Diese Mutationen entstehen zufällig und sind daher in der Regel individuelle patientenspezifische Antigene. Diese Antigene haben ein großes Potential für die individuelle immuntherapeutische Anwendung, sind aber wenig praktikabel, da sie zunächst individuell beim Patienten identifiziert und isoliert werden müssen (16). Weitere tumorspezifische Antigene sind Proteine, die von tumorinduzierenden Viren stammen. Wie zum Beispiel die E6- und E7-Proteine der humanen Papilloma-Viren (HPV), die im Gebärmutterhalskarzinom exprimiert werden, oder das EBNA-1-Protein in Lymphomen, das vom Epstein Barr Virus (EBV) induziert wird. Onkovirale Proteine eignen sich sehr gut für den immuntherapeutischen Einsatz, da sie körperfremde Proteine sind, und somit in der Regel stark immunogen und die Induktion von Toleranz oder die Gefahr der Induktion einer Autoimmunreaktion nach Vakzinierung gegen diese Proteine praktisch nicht gegeben ist.

Tumorassoziierte Antigene sind Moleküle, die in Krebszellen und gesunden Zellen gleichermaßen vorkommen, in Tumorzellen aber verstärkt exprimiert werden. Dabei handelt es sich um normale nicht-mutierte Genprodukte, die häufig nur während der Embryogenese oder in sogenannten *immune privileged* Geweben exprimiert werden. „*Immune privileged*“ sind Gewebe, zu denen Elemente des Immunsystems keinen Zugang haben. Dazu gehören unter anderem die *cancer/testis*-Antigene (17-20), deren Expression auf Testikel beschränkt ist, die aber in normalen somatischen Zellen nicht exprimiert werden. In Krebszellen kommt es oft zu

einer Reaktivierung dieser Gene (21). Zu den *cancer/testis*-Antigenen gehören zum Beispiel die Proteine der MAGE-Familie (*melanoma antigen*), deren Mitglied MAGE1 das erste Tumorentigen war, das im humanen Melanom identifiziert werden konnte (12). Die Expression der MAGE-Antigene beschränkt sich dabei nicht nur auf die Expression im Melanom. So ist MAGE9 ein Antigen, das häufig bei Nierenzellkarzinom-Patienten gefunden wurde (22).

In der zweiten Gruppe werden die Differenzierungs-Antigene zusammengefasst, die entweder in der Embryogenese oder bestimmten Differenzierungsstadien gewebespezifisch in normalen Zellen und Tumoren gleichen Ursprungs exprimiert werden. Beispiele sind Melan-A, gp100 und Tyrosinase, die gleichermaßen von Melanomzellen und gesunden Melanozyten exprimiert werden. Ein weiteres bekanntes Beispiel ist die Expression von PSA (*prostate-specific antigen*) im Prostatakarzinom (13).

Andere Tumorentigene zeichnen sich dadurch aus, dass sie in Tumorzellen überexprimiert werden. Die Überexpression kann durch Genamplifikationen, begünstigt durch die genetische Instabilität von Tumorzellen, eine erhöhte Induktion der Gene oder erhöhte Stabilität der mRNA verursacht sein. Vertreter dieser Antigene sind zum Beispiel HER2/neu und Telomerase, die in vielen Krebsarten überexprimiert werden (13). Besonders soll an dieser Stelle das mit dem Nierenzellkarzinom assoziierte Tumorentigen G250 (Glykoprotein 250, Produkt des Carbonanhydrase IX (CAIX)-Gens) erwähnt werden, da es in den folgenden Untersuchungen verwendet wurde. Das G250-Antigen wird in über 90% von Nierenzellkarzinom-Patienten, aber nicht im gesunden Nierengewebe, exprimiert. G250 dient auch als diagnostischer Marker beim Nierenzellkarzinom (23-25).

Tabelle 1: Tumorentigene

Exemplarische Übersicht ausgewählter Tumorentigene, deren Klassifizierung und Vorkommen nach Emens et al. (26).

Tumorentigen	Tumor
<i>Cancer/testis-Antigene</i>	
MAGE	Melanom, Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom
BAGE	Melanom, Mammakarzinom
GAGE	Melanom, Prostatakarzinom
RAGE	Nierenzellkarzinom, Sarkome
NY-ESO-1	Melanom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom

Gewebespezifische Differenzierungsantigene

Tyrosinase	Melanom
MART-1/Melan-A	Melanom
gp100	Melanom
TRP-1, TRP-2	Melanom, Nierenzellkarzinom
PSA	Prostatakarzinom

Mutierte Genprodukte

CDK-4-R24C	Melanom
β -Catenin	Kolonkarzinom
p53	Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom
k-ras	Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom
MUM-1	Multiples Myelom, Lymphom
bcr-abl	CML, AML

Überexprimierte Selbst-Antigene

G250/CAIX	Nierenzellkarzinom
HER-2/neu	Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom
Proteinase-3	CML, AML
Mucin-1	Multiples Myelom, Nierenzellkarzinom
WT-1	CML, AML
MART-1/Melan-A	Melanom

Virale Antigene

HPV	Zervixkarzinom
HBV, HCV	HCC
EBV	Burkitts Lymphom

PSA: Prostataspezifisches Antigen, HPV: humanes Papilloma Virus, HBV: Hepatitis B Virus, EBV: Epstein Barr Virus, HCC: *hepatocellular carcinoma*, CML: chronische myeloische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie

Autoantigene nehmen unter den Tumorantigenen eine umstrittene Stellung ein, da sie im gesunden wie im neoplastischen Gewebe gleichermaßen exprimiert werden. Jedoch sind die überwiegende Anzahl der Antikörper, die man in Serumproben von Tumorpatienten identifiziert, gegen Autoantigene gerichtet und werden auch nur von Krebspatienten gebildet (27-29). Der zugrundeliegende Mechanismus, der zur Bildung von Autoantikörpern in Krebspatienten führt, ist noch weitestgehend unklar. Möglich sind Veränderungen in der Präsentation und/oder Prozessierung von Antigenen in Tumorzellen, oder sie werden aufgrund der Freisetzung von zytoplasmatischen Proteinen nach nekrotischem Zelltod gebildet, der oft mit dem Tumorwachstum assoziiert ist (28,30-32). Ein Autoantigen, von dem hohe Titer an Antikörpern in allen getesteten Serumproben von Nierenzellkarzinom-Patienten gefunden

wurden, ist GOLGA4 (Golgin-A4) (30). Golgine sind eine Familie von *coiled-coiled*-Proteinen, die mit dem Golgiapparat assoziiert sind, und eine wichtige Funktion zur Erhaltung der Golgi-Struktur, dem vesikulären Proteintransport und der Zellmotilität ausüben (33,34). Antikörper gegen Golgine sind wiederholt im Serum von Krebspatienten detektiert worden (35-37). Die Rolle der körpereigenen humoralen Immunabwehr bei Tumorpatienten ist noch unklar. Obwohl Antikörper oft in Krebspatienten detektiert werden, scheinen sie nicht zu einer effektiv schützenden Anti-Tumor-Immunantwort beizutragen. Andererseits wurde gezeigt, dass eine Vakzinierung gegen ein Tumorantigen durch kombinierte Vakzinierung mit Serum-Autoantigenen eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort erheblich verbessern kann (38,39).

2.1.2. Stimulation einer optimalen Immunantwort

Der Erfolg einer gegen den Tumor gerichteten Immuntherapie hängt im Wesentlichen von Ausmaß und Fortdauer der durch das Vakzin induzierten Immunantwort ab. Wie bereits erwähnt sind Tumorzellen antigen aber nicht unbedingt immunogen. Die Immunogenität ist essentiell vom Antigen abhängig. Viele der Tumorantigene sind Selbst-Antigene, stammen also von körpereigenen Molekülen ab, und werden daher leicht vom Immunsystem toleriert (40). Ziel ist es deshalb, eine möglichst vollständige Aktivierung des Immunsystems gegen ein Tumorantigen zu erreichen, die spezifisch zur Eliminierung des Tumors, nicht aber von gesunden Zellen, führt.

Die zentrale Rolle in der Tumorimmuntherapie nehmen die $CD8^+$ -zytotoxischen T-Zellen (CTL) ein. Als Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind $CD8^+$ -CTL in der Lage, Tumorzellen, die Tumorantigene über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren, zu erkennen und zu eliminieren. Zur Aktivierung von T-Zellen kommt es, wenn antigenpräsentierende Zellen (APC), wie dendritische Zellen (DC), Tumorantigene von Tumoren aufnehmen und prozessieren (41,42). Dabei werden die Antigene durch das Proteasom zu kurzen Peptiden gespalten. Diese Peptide werden über MHC-Moleküle T-Zellen präsentiert, die diese mit ihrem T-Zell-Rezeptor erkennen und daraufhin aktiviert werden. Über MHC-Klasse-II-Moleküle werden $CD4^+$ - T_H1 -Zellen (Typ-1-Helfer-T-Zellen) aktiviert und MHC-Klasse-I präsentierte Peptide führen zur Aktivierung von $CD8^+$ -CTL (43). Die Qualität der Aktivierung wird maßgeblich durch das Vorhandensein von kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen beeinflusst (44-46). Zum einen tragen die reifen antigenpräsentierenden DC über die Expression von kostimulatorischen Molekülen (z.B. B7-

Moleküle, CD40) und Zytokinen wie Interleukin-12 (IL-12) zur Aktivierung von CTL bei (47,48). Aber auch aktivierte $CD4^+$ -T-Zellen unterstützen zum anderen durch Sekretion von Interferon-Gamma ($IFN-\gamma$) und Interleukin-2 (IL-2) die vollständige Aktivierung und Erhaltung von $CD8^+$ -T-Zellen. Kostimulatorische Moleküle, Zytokine und $CD4^+$ -T-Zellen sind darüber hinaus wichtig für die Genierung von T-Gedächtniszellen (*memory T cells*) und damit zur Gewährleistung langanhaltender Immunität (49-53). (Abbildung 1)

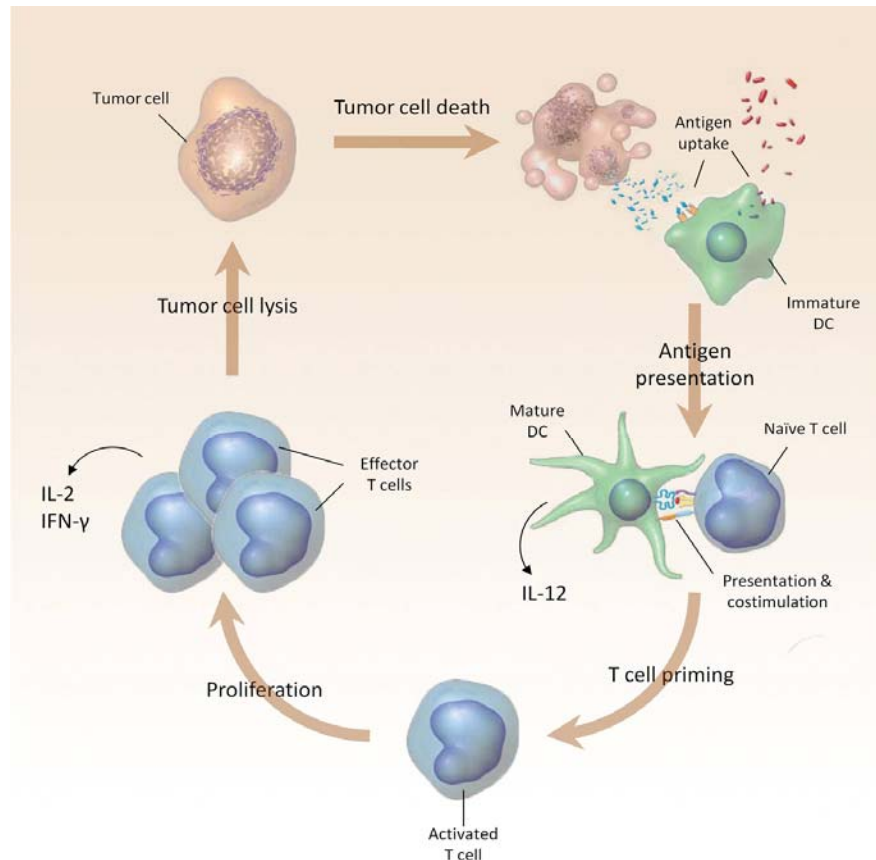


Abbildung 1: Adaptive Immunantwort auf Tumorantigene

Unreife (immature) DC nehmen von toten Tumorzellen freigesetzte Antigene auf und prozessieren diese im Proteasom zu kurzen Peptiden. Maturierte DC wandern in die peripheren Lymphknoten und präsentieren die Peptide über MHC-Moleküle naiven T-Zellen. Durch Sekretion von Zytokinen (z.B. IL-12) und kostimulatorische Moleküle (B7/CD28) werden T-Zellen aktiviert, die über den T-Zell-Rezeptor die MHC-präsentierten Antigene erkennen. Aktivierte antigenspezifische T-Zellen expandieren durch Proliferation und sezernieren ihrerseits Effektorzytokine wie $IFN-\gamma$ und IL-2, die zur Expansion und Erhaltung der T-Zell-Antwort beitragen. Aktivierte Effektor-T-Zellen wandern zum Tumor und erkennen die vom Tumor exprimierten, über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentierten Tumorantigene und eliminieren diese.

Durch die zentrale Rolle, die den dendritischen Zellen bei der Aktivierung einer effektiven Immunantwort zukommt, werden sie in der Immuntherapie oft eingesetzt, um Tumorantigene dem Immunsystem zugänglich zu machen. Dendritische Zellen gelten als die professionellsten antigenpräsentierenden Zellen, und die Entwicklung von Methoden, DC *in vitro* zu generieren und ihnen Tumorantigene für die Präsentation darzureichen, machen sie zu einem wichtigen Werkzeug für die Entwicklung von effektiven Vakzinierungsprotokollen (54). Dabei können DC mit vom Tumor abstammenden Proteinen, Peptiden, ganzen Tumorzellen oder durch Transfektion mit cDNA oder mRNA der Tumorantigene beladen werden (55-57).

Ein weiterer Kernpunkt für die effektive Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort ist die Rolle von CD4⁺-T-Zellen (49,58-60). Aufmerksamkeit erhalten CD4⁺-T-Zellen zum einen durch ihre zentrale Rolle für die Generierung von Gedächtnis-Effektorzellen (50-52), zum anderen dadurch, dass sie wesentlich zur Aktivierung von CTL beitragen (53). Immuntherapeutische Ansätze, die eine gleichzeitige Aktivierung von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen verfolgten, zeigten, dass die gegen den Tumor gerichtete Aktivität der zytotoxischen T-Zellen durch CD4⁺-T-Zellen verstärkt wird (61). Die Antigenpezifität der CD4⁺-T-Zellen muss dabei nicht der von CD8⁺-T-Zellen entsprechen. Studien zeigten, dass heterospezifische CD4⁺-T-Zellen oder die gleichzeitige Vakzinierung mit Autoantigenen und Tumorantigenen zu einer von CD4⁺-T-Zellen abhängigen Verstärkung von tumorantigen-spezifischen CD8⁺-T-Zellen führen (38,39,62). Dies verdeutlicht, dass CD4⁺-T-Zellen zu einer umfangreichen Aktivierung des Immunsystems und damit zur effektiven Anti-Tumor-Immunantwort beitragen.

2.1.3. Überwindung immunsuppressiver Mechanismen

Tumore wehren sich gegen die Attacke durch das Immunsystem (63-65). Tumore exprimieren und sezernieren oft TGF- β (*transforming growth factor beta*) und Interleukin-10 (IL-10), die direkten Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen ausüben und die Entstehung von regulatorischen T-Zellen (CD4⁺DC25⁺FoxP3⁺T_{reg}-Zellen) fördern. T_{reg}-Zellen blocken die Aktivität von Effektor-T-Zellen und sezernieren ihrerseits TGF- β und IL-10 (66). Andere immunsuppressive Zellen sind myeloide Suppressorzellen (MDSC, *myeloid-derived suppressor cell*), die häufig in Tumoren akkumulieren. MDSC sind unreife myeloide Zellen, die durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden können (67-72). MDSC können sehr effektiv tumorspezifische T-Zellen inhibieren, indem sie Stickstoffoxid (NO) und

andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) freisetzen und/oder durch sehr hohe Arginaseaktivität dem Tumormilieu L-Arginin entziehen (73-76). Zudem sezernieren auch MDSC IL-10 und inhibieren somit die Aktivierung von T-Zellen und fördern die Entstehung von T_{reg} -Zellen. Die Induktion und Freisetzung von immunsuppressiven Zellen und Zytokinen durch den Tumor bezeichnet man als Immun-Evasion (77). Dem gegenüber steht der Begriff des Immun-Escape. Begünstigt durch die genetische Instabilität von Tumoren können Antigene mutieren, oder ihre Expression wird abgeschaltet, so dass die Tumorzelle vom Immunsystem nicht mehr erkannt wird (63-65). Mutationen in den Komponenten der Antigen-Prozessierung und -Präsentation können dazu führen, dass Tumore Antigene nicht mehr präsentieren (78). Der Verlust der MHC-Klasse-I-Expression auf Tumoren wird sehr oft beobachtet und führt dazu, dass der Tumor von CTL nicht mehr erkannt werden kann (Abbildung 2).

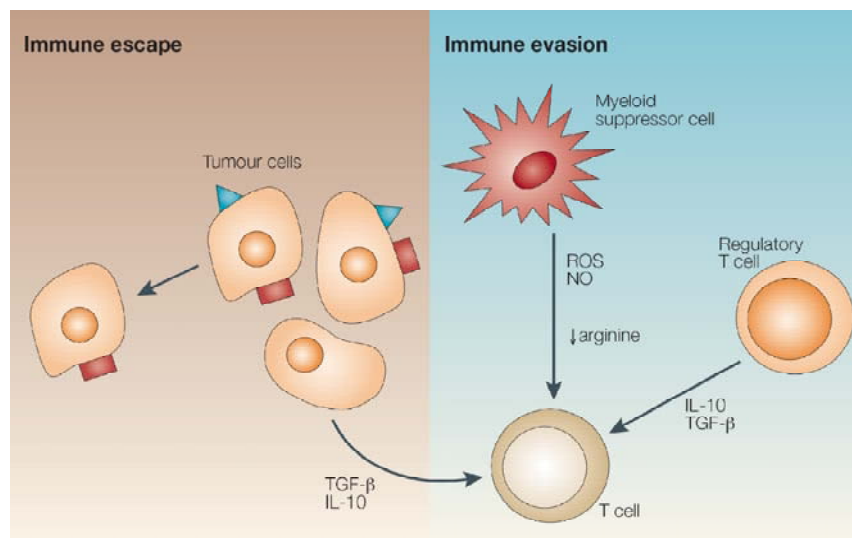


Abbildung 2: Immun-Escape und Immun-Evasion von Tumorzellen

Aufgrund der genetischen Instabilität von Tumoren kommt es oft zu Mutationen, die zu veränderten Antigenen oder zum Verlust der MHC-Klasse-I-Expression führen, wodurch Tumorantigene nicht mehr durch das Immunsystem erkannt werden (Immun-Escape). Tumore setzen außerdem immunsuppressive Zytokine wie TGF- β und IL-10 frei, wodurch antigenspezifische T-Zellen inhibiert werden und die Entstehung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) gefördert wird. Im inflammatorischen Milieu des Tumors finden sich außerdem unreife myeloide Suppressorzellen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Stickstoffoxid (NO) freisetzen und dem Milieu L-Arginin entziehen, wodurch tumorspezifische T-Zellen inhibiert werden (Immun-Evasion). (Abbildung nach Gilboa, (10))

Daher ist für die Immuntherapie eine optimale Aktivierung des Immunsystems essentiell. Zum einen, weil eine unvollständige Aktivierung von T-Zellen zu Toleranz oder sogar zur Induktion

von T_{reg}-Zellen führt. Zum anderen, weil durch eine umfangreiche Aktivierung des Immunsystems, die z.B. natürliche Killerzellen (NK) und/oder die Aktivierung von tumorspezifischen CD4⁺-T-Zellen umfasst, ein Verlust der MHC-Klasse-I-Expression auf Tumoren kompensiert werden kann (77). Der Verlust der Antigenpräsentation ist tückisch und lässt sich, sofern er nur durch Mutation einzelner Antigene hervorgerufen wird, durch Verwendung mehrerer Antigene für die Vakzinierung ausgleichen (79). Andere Möglichkeiten, immunsuppressiven Mechanismen zu entgehen, sind die gezielte Eliminierung von inhibitorischen Zellen durch Chemotherapeutika, deren Depletion mit Antikörpern, oder die gezielte Intervention mit TGF- β - und IL-10-Signalwegen (80,81). All-trans-Retinsäure (ATRA) zum Beispiel führt sehr effektiv zur Differenzierung von unreifen myeloiden Suppressorzellen, und die Depletion von CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen mit Antikörpern kann zu einer effektiveren Anti-Tumor-Immunantwort führen (82-86).

2.2. Immuntherapeutische Strategien

Die Tatsache, dass viele Tumore sich gegenüber herkömmlichen Therapien wie Chemotherapie oder Bestrahlung als resistent erweisen, erfordert die Suche nach alternativen Therapien in der Krebsmedizin (87-90). Die Beobachtung, dass Tumore wie das Melanom oder das Nierenzellkarzinom immunsuszeptibel sind (91-93), und nicht zuletzt die Entdeckung und Identifizierung von Tumorantigenen führten zur Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen (40). Man unterscheidet prinzipiell zwischen passiven Strategien wie dem adoptiven Transfer von T-Zellen und einer Therapie mit tumorspezifischen Antikörpern und den aktiven Strategien, deren Ziel es ist, eine gegen den Tumor gerichtete Stimulation des Immunsystems im Patienten zu induzieren.

2.2.1. Passive Immuntherapie

Adoptiver T-Zell-Transfer

Die Option, antigenspezifische T-Zellen *in vitro* zu generieren und zu expandieren, ermöglicht den Einsatz von tumorspezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer (94). Die ersten Versuche wurden mit angereicherten tumorinfiltrierenden T-Zellen (TIL) des Melanoms gemacht, die *in vitro* expandiert und Patienten wieder zugeführt wurden (95). Neue Methoden

erlauben die Anreicherung und Expansion hoch spezifischer CD8⁺-T-Zellen, welche das Risiko einer Autoimmunreaktion minimieren. Unterstützt wird die Therapie meist durch die Gabe von Zytokinen wie IL-2, das die Proliferation und die Aktivität von Effektor-T-Zellen stimuliert und somit den Fortbestand der transferierten T-Zellen gewährleistet (95-97). Die Kurzlebigkeit der transferierten T-Zellen ist zugleich einer der Nachteile des adoptiven T-Zell-Transfers. Trotz ausgewiesener Erfolge, vor allem beim Melanom, ist der Aufwand zur Durchführung dieser Art von Therapie enorm und für den Patienten mühselig (98-100). Beim Nierenzellkarzinom wurden bisher nur mäßige Erfolge mit *in vitro* expandierten TIL und begleitender Gabe von IL-2 erzielt. Erfolgreicher waren klinische Studien mit aus TIL angereicherten CD8⁺-CTL (101). Die Bemühungen gehen daher hin zur Anwendung von tumorantigenspezifischen T-Zellen. Nichtsdestotrotz bleibt der adoptive Transfer von T-Zellen aufgrund des hohen Aufwands nur beschränkt praktikabel.

Monoklonale Antikörper

Mit der Entwicklung der Hybridoma-Technologie ist es möglich, tumorantigenspezifische Antikörper in nahezu unbegrenzten Mengen herzustellen (102). Dabei werden in der Krebstherapie nicht nur Antikörper gegen Tumorantigene eingesetzt (103). Erfolgreiche Anwendung finden außerdem monoklonale Antikörper, die gegen für den Tumor wichtige Wachstumsfaktoren gerichtet sind oder sich gegen Moleküle richten, die in immunsuppressiven Mechanismen eine Rolle spielen (104,105).

Klinische Anwendung beim Nierenzellkarzinom finden Antikörper, die gegen das Tumorantigen G250 (CAIX) gerichtet sind, das in über 90% der Patienten exprimiert wird. Die Wirkung beruht auf der antikörpervermittelten Zytotoxizität (ADCC, *antibody dependent cellular cytotoxicity*), bei der die Tumorzellen mit dem Antikörper opsoniert und dadurch von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erkannt und eliminiert werden (106). Eine weitere Strategie beim Nierenzellkarzinom ist die Blockade der Tumorangio-genese mit Antikörpern, die gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet sind (107,108). Durch den Antikörper wird verhindert, dass VEGF mit seinen Rezeptoren interagieren kann, und somit wird die vom Tumor induzierte Bildung von neuen Blutgefäßen für die Nährstoffversorgung geblockt (109).

Vorteil der Therapie mit Antikörpern ist, dass sie von den Patienten gut toleriert wird und nur milde Nebenwirkungen im Vergleich zur Chemotherapie verursachen kann. Allerdings stellen

sich mit einer rein antikörperbasierten Therapie nur mäßige Erfolge ein. Der Trend geht daher zu kombinatorischen Therapien wie beispielsweise die beim Nierenzellkarzinom erfolgreich angewendete Therapie mit Zytokinen und tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern (110,111).

2.2.2. Aktive Immuntherapie

Die Verfahren zur aktiven Immuntherapie von Tumoren sind vielfältig und umfassen die Vakzinierung mit aufgereinigten Tumorantigenen und Peptiden ebenso wie die Vakzinierung mit bestrahlten Tumorzellen oder dem Lysat von Tumorzellen. Diese Art der Vakzinierung benötigt die Unterstützung durch Adjuvantien, um die Tumorantigene dem Antigenpräsentationsweg zuzuführen und somit eine effektive Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen zu erreichen (112-116). Andere Methoden zur Vakzinierung nutzen daher die Eigenschaften von antigenpräsentierenden Zellen, um eine effektive Stimulation von tumorspezifischen T-Zellen zu erreichen.

Dendritische Zellen

Als die professionellsten antigenpräsentierenden Zellen gelten dendritische Zellen (DC), da sie nicht nur effektiv Antigene aufnehmen, prozessieren und präsentieren, sondern auch die für die Stimulation von Effektorzellen benötigten kostimulatorischen Moleküle und Zytokine exprimieren und sezernieren. DC lassen sich einfach mit Tumorantigenen beladen (55,57). Die Beladung mit ganzen Tumorzellen, Tumorlysat und Peptiden ist ebenso möglich wie der Transfer von tumorantigenkodierender cDNA oder mRNA (117-126). Mit der Möglichkeit, DC *in vitro* zu generieren, ist somit ein effektives Werkzeug für die Vakzinierung gegen Tumorantigene gegeben, die aber auch Nachteile mit sich bringt (54). Die effektive Stimulation von T-Zellen hängt besonders vom Differenzierungsstatus der DC ab (127-129). Humane DC werden aus den aus peripherem Blut isolierten myeloiden Vorläuferzellen gewonnen und müssen *in vitro* durch Zugabe von Zytokinen und anderen Faktoren, deren Kombination umstritten ist, in den richtigen DC-Typ differenziert werden (56,130-133). Maturierte DC lassen sich zudem *in vitro* nicht weiter expandieren, wodurch regelmäßige Blutentnahmen von Patienten für die Therapie nötig sind. Als alternative antigenpräsentierende Zellen können CD40-aktivierte B-Zellen dienen (134-137). Sie sind *in vitro* nahezu unbegrenzt expandierbar und weisen nach

einfacher CD40-Stimulation einen zu DC vergleichbaren antigenpräsentierenden Phänotyp auf (138,139).

In klinischen Studien zeigte die Vakzinierung mit tumorlysatbeladenen DC beim Nierenzellkarzinom nur mäßigen Erfolg (140-142). Vielversprechend war hingegen die Vakzinierung mit definierten Tumorantigenen. Studien, die MHC-Klasse-I-restringierte Peptide oder mRNA des Tumorantigens G250 zur Beladung von DC verwenden, waren weitaus erfolgreicher (111,143,144).

2.2.3. Adjuvantien

Vakzinierungsstrategien in der Tumorthherapie kommen oft nicht ohne die Verwendung von Adjuvantien aus, die für einen bestmöglichen Effekt der Vakzinierung sorgen sollen. So unterschiedlich die Arten der Adjuvantien, so unterschiedlich sind auch ihre Wirkungen (Tabelle 2) (145). Die Anwendung von Adjuvantien führt zur Stimulation des humoralen und/oder zellulären Immunsystems. Dabei können beispielsweise pro-inflammatorische Faktoren freigesetzt werden, die zur Reifung und Aktivierung von DC führen und damit die Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation unterstützen.

Tabelle 2: Adjuvantien

Adjuvant	Beispiel
Chemische	IFA (<i>incomplete Freund's adjuvant</i>) <i>Keyhole limpet haemocyanin</i> Haptene, z.B. Dinitrophenol ISCOM™
Mikrobielle	Lipopolysaccharide (LPS) Glykolipide Lipoproteine
Zytokine	GM-CSF IL-2 IL-12 FLT-3L IFN-α
Zelluläre	Dendritische Zellen <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Mycobacterium bovis</i> BCG <i>Shigella</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

Chemische und mikrobielle Adjuvantien finden Anwendung und werden vor allem eingesetzt, um Antikörperreaktionen auf Protein-Peptid-Vakzine zu verstärken. Eine besondere Rolle in der Tumorthherapie spielen Zytokine und Zelluläre Adjuvantien.

Zytokine

Für die Modulation von Immunreaktionen spielen Zytokine eine wichtige Rolle und werden daher oft unterstützend in der Immuntherapie eingesetzt (115,146). Vor allem die Gabe von IL-2 findet häufig Anwendung, um die T-Zellantwort zu verstärken, so zum Beispiel beim adoptiven Transfer von tumorspezifischen T-Zellen oder der Therapie mit tumorantigen-spezifischen Antikörpern (147-150). Insbesondere beim Nierenzellkarzinom ist die Therapie mit Zytokinen bis dato die etablierteste und effektivste Form der Immuntherapie (151). Durch Gabe von IL-2 zeigen 15% der Patienten eine teilweise oder komplette Remission des Tumors (152,153). Die systemische Behandlung mit Interferon-alpha (IFN- α) ist etwas weniger effektiv. In Kombination mit IL-2 profitieren jedoch bis zu 30% der Patienten von der Therapie (154). Trotz des Risikos, toxische Nebenwirkungen zu verursachen, wenn sie in zu hoher Dosierung eingesetzt werden (155,156), sind Zytokine aufgrund ihres Nutzens, vor allem in Kombination mit anderen Therapien, in der Immuntherapie unverzichtbar geworden.

Zelluläre Adjuvantien

Zu den zellulären Adjuvantien, die man in der Immuntherapie einsetzt, um die bestmögliche Induktion des Immunsystems zu erreichen, gehören insbesondere dendritischen Zellen. Da ihre Funktion und Relevanz in der Tumorthherapie bereits vorgestellt wurden, soll die Aufmerksamkeit den Bakterien geschenkt werden. Bakterielle Lebend-Vakzine werden schon lange als Vakzine benutzt (157). Beispiele sind attenuierte Stämme von *Mycobacterium bovis* BCG, *Shigella*, *Listeria monocytogenes* oder, besonders in der Tumorthherapie eingesetzt, *Salmonella typhimurium* (158,159). Als Adjuvant zeichnen sich die Bakterien dadurch aus, dass sie immunstimulatorische Moleküle wie Lipopolysaccharide (LPS) oder unmethylierte CpG-Motive tragen. Sie induzieren die Produktion von zahlreichen pro-inflammatorischen Faktoren wie die Sekretion von Zytokinen und aktivieren somit eine umfangreiche Immunantwort (160). Bakterielle Lebend-Vakzine finden vor allem Anwendung in der Gentherapie, da sie sich hervorragend als Vehikel für DNS-Vakzine eignen (161). Attenuierte Enterobakterien, wie *S.*

typhimurium haben die Eigenschaft, dass sie nach Phagozytose in antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen überleben und heterologe DNS transferieren können, die daraufhin von der Wirtszelle exprimiert wird (Abbildung 3). Salmonellen-Stämme sind wiederholt für die Krebstherapie eingesetzt worden, indem sie mit eukaryotischen Expressionsvektoren, die für Tumorantigene kodieren, transformiert wurden (162-164). Der genau zugrundeliegende Mechanismus des DNS-Transfers bei *S. typhimurium* ist noch nicht vollständig verstanden (165). Die orale Vakzinierung mit tumorantigentransformierten Salmonellen zeigte aber, dass eine effektive zelluläre Immunantwort gegen den Tumor induziert werden kann, welche die Antigenpräsentation über DC und Aktivierung von CD4⁺-Helfer-T-Zellen und tumorantigenspezifischen CD8⁺-CTL beinhaltet (162,166,167).

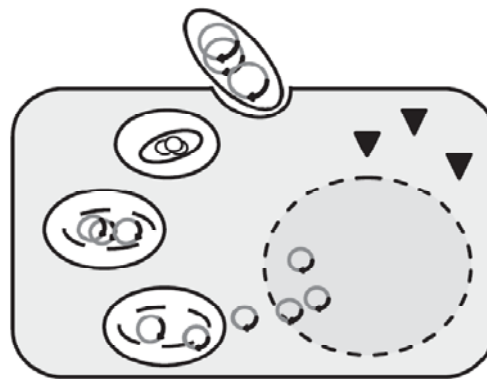


Abbildung 3: Transfer von herterologen Antigenen durch Salmonella typhimurium

Salmonellen, transformiert mit einem eukaryotischen Expressionvektor, der für ein heterologes Antigen kodiert, werden von Phagozyten wie Makrophagen aufgenommen und können in den Phagosomen begrenzte Zeit überleben und sich vermehren. Werden Salmonellen lysiert, kommt es zur Freisetzung des Vektors in das Zytosol, dessen genauer Mechanismus noch nicht geklärt ist. Der Vektor gelangt in den Nukleus und wird dort transkribiert und translatiert. Die exprimierten Antigene werden dann von den Makrophagen prozessiert und präsentiert, wodurch eine zelluläre Immunantwort induziert wird. (Abbildung nach Loessner et al., (168))

2.3. Ziel der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom erweist sich oft als resistent gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung (87-90). Die Beobachtung, dass der Tumor, wengleich sehr selten, eine effiziente Immunantwort auslöst, die zu drastischen Spontanen Remissionen des Tumors führen kann, unterstützte die Hoffnung auf eine immuntherapeutische Intervention (91-93). Die Identifikation von Tumorantigenen und die Etablierung von Methoden, *ex vivo* zelluläre

Komponenten des Immunsystems (DC, T-Zellen) zu aktivieren und zu expandieren, waren bahnbrechend für den Einsatz immuntherapeutischer Verfahren in der Onkologie (40). In der Tat waren die Ergebnisse erster klinischer Studien mit tumorantigenbeladenen DC beim Nierenzellkarzinom vielversprechend, erfüllten aber bei weitem nicht die Erwartungen, die man in diese Therapie gesetzt hatte (169,170).

Ziel dieser Arbeit war es daher, Vakzinierungsstrategien mit tumorantigenbeladenen DC beim Nierenzellkarzinom zu optimieren. Um eine effiziente Vakzinierung zu erzielen, bedarf es in aller Regel des Einsatzes von Adjuvantien. Dies gilt in besonderem Maße für die Vakzinierung mit schwach immunogenen Tumorantigenen. Um dies zu erreichen, wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit evaluiert, die Vakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC durch eine Kovakzinierung mit transformierten attenuierten *Salmonella typhimurium* zu unterstützen. Als Adjuvant wählten wir das Autoantigen GOLGA4, dessen cDNS über einen Expressionsvektor in die Salmonellen eingeführt wurde. Das Autoantigen wählte ich, da es Hinweise gibt, dass die Kovakzinierung mit einem vom Tumor exprimierten Autoantigen die Anti-Tumor-Immunantwort verstärken kann (38,39). Um gleichzeitig das mögliche Repertoire nierenzellkarzinom-assoziiertes Tumorantigene für die Therapie zu erweitern, wurden DC mit MHC-Klasse-I-bindenden Peptiden des etablierten G250- und des noch nicht erprobten MAGE9-Antigens beladen. Zur Kontrolle wurden die DC mit Tumorlysate beladen. Diese Kontrolle erschien wichtig, da in der Klinik häufig Tumorlysate für die Vakzinierung eingesetzt werden, aber noch nicht geklärt wurde, in wieweit hierdurch immunsuppressive Mechanismen aktiviert werden. Als Modell wurde das Nierenzellkarzinom Renca der BALB/c-Maus eingesetzt, das mit den humanen Tumorantigenen G250 bzw. MAGE9 stabil transfiziert wurde. Die Renca-Zelllinie hat vergleichbare Wachstums- und Metastasierungseigenschaften wie die humanen Tumorzellen und exprimiert zudem das Autoantigen GOLGA4 (171). Dieses Modell erlaubte, folgende Aspekte der induzierten Immunantwort nach Vakzinierung mit DC und Kovakzinierung mit Salmonellen zu vergleichen:

1. Effizienz zweier nierenzellkarzinomspezifischer Antigene
2. Tumorlysate versus MHC-Klasse-I-bindende Peptide
3. Supportive Funktion eines Autoantigens und Modus der Applikation des Autoantigens (Gentransfer über Salmonellen oder peptidbeladene DC)

Die Effizienz der Vakzinierung wurde jeweils zuerst *in vivo* überprüft. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden *in vitro* erarbeitet, wobei neben der Überprüfung der Aktivierung antigenspezifischer Effektorzellen auch die Frage nach immunsuppressiver Gegensteuerung evaluiert wurde.

3. Material

3.1. Chemikalien

Für die Herstellung von Lösungen und Puffer wurden ausschließlich Chemikalien von analytischer Reinheit verwendet.

Tabelle 3: Chemikalien

Name	Hersteller
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
AEC (3-amino-9-ethyl-cerbazol)	Sigma-Aldrich, München
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Ampicilin	Calbiochem, Darmstadt
CFSE (<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>)	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Concavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, München
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, München
Diethanolamin	AppliChem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Lymphocytenseparationsmedium (Ficoll)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glukose	Calbiochem, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	GERBU Biochemicals, Gaiberg
Insulin-Tranferin Selenium	GIBCO, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München

L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt
LPS	Calbiochem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mayers Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, München
MOPS	GERBU Biochemicals, Gaiberg
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	AppliChem, Darmstadt
Penicillin-G	Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenylphosphat-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RNAase Zap	Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
Sulfobiotin-X-NHS	Calbiochem, Darmstadt
TMB	Calbiochem, Darmstadt
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt

3.2. Antikörper

Anti-Maus-Antikörper

Tabelle 4: Anti-Maus-Antikörper

Antigen	Spezies, Ig-Klasse	Hybridom (Klon), Hersteller
CCL1	Ratte, IgG2b	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
CCL19	Ratte, IgG2a	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
CCL21	Ratte, IgG2b	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

CCR6	Ratte, IgG2a	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
CCR7	Ratte, IgG2a	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
CD4	Ratte, IgG2b	Hybridom (YTA), EAACC, Salesbury, UK
CD8	Ratte, IgG2b	Hybridom (YTS 169), EAACC, Salesbury, UK
CD11b	Ratte, IgG2a	Hybridom (YBM6.6.10), EAACC, Salesbury, UK
CD25	Ratte, IgG2b	BD/Pharmingen, Heidelberg
CD40	Ratte, IgG2a	BD/Pharmingen, Heidelberg
CD69	Hamster, IgG1	Dianova, Hamburg
CD80	Ratte, IgG2a	BD/Pharmingen, Heidelberg
CD86	Ratte, IgG2a	BD/Pharmingen, Heidelberg
CD152	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
CD154	Hamster, IgG3	BD/Pharmingen, Heidelberg
CXCR3	Ratte, IgG2a	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
CXCR4	Ratte, IgG2b	Biozol Diagnostica, Eching
FoxP3	Ratte, IgG2a	Biozol Diagnostica, Eching
Gr1	Ratte, IgG2b	Immunotools, Friesoythe
H2-Kd	Ratte, IgG3	Hybridom (K9-18), EAACC, Salesbury, UK
<i>IFN-γ capture</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IFN-γ detection</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL1-β capture</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL1-β detection</i>	Ziege, IgG	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL2 capture</i>	Ratte, IgG2a	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL2 detection</i>	Ratte, IgG2a	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL4 capture</i>	Ratte, IgG2b	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL4 detection</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL6 capture</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL6 detection</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL10 capture</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg

<i>IL10 detection</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL12 capture</i>	Ratte, IgG1	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>IL12 detection</i>	Ratte, IgG2a	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>TNF-α capture</i>	Hamster, IgG	BD/Pharmingen, Heidelberg
<i>TNF-α detection</i>	Kaninchen, IgG	BD/Pharmingen, Heidelberg

Sekundäre Antikörper und Streptavidin-Konjugate

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper und Streptavidin-Konjugate

Konjugate	Spezies	Hersteller
anti-Hamster IgG FITC	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG APC	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG FITC	Maus	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG PE	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG APC	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG FITC	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG PE	Ziege	Dianova, Hamburg
Streptavidin AP	-	Dianova, Hamburg
Streptavidin APC	-	Dianova, Hamburg
Streptavidin FITC	-	Dianova, Hamburg
Streptavidin HRP	-	Dianova, Hamburg
Streptavidin PE	-	Dianova, Hamburg

3.3. Primer

Tabelle 6: Primer

Primer		Sequenz
G250	<i>forward</i>	5'-ACTGCTGCTTCTGATGCCTGT-3'
	<i>reverse</i>	5'-AGTTCTGGGAGCGGCGGGA-3'
MAGE9	<i>forward</i>	5'-ATGTCTCTCGAGCAGAGGAGTCCG-3'
	<i>reverse</i>	5'-CTCAGACTCCCTCTTGCTCCTCT-3'
GOLGA4	<i>forward</i>	5'-AGGGTGGTTTCTTTTTCTTC-3'
	<i>reverse</i>	5'-CCAAAAGCTAGGTAAACATGAGG-3'

3.4. siRNA

Tabelle 7: siRNA

Name	Zielsequenz
siRNA GOLGA4	5'-CAGCTTCGTAGTCATATCAA-3'

3.5. Peptide

Tabelle 8: Peptide

MAGE9 MHC-Klasse-I Peptide	
Protein ID/NCBI Referenzsequenz:	NP_005356.1
Name/Position	Peptidsequenz (N-terminal->C-terminal)
MAGE9 pos141-149	NYKRYFPVI
MAGE9 pos160-168	IFGTDVKEV
MAGE9 pos281-289	SYEKVINYL
MAGE9 pos237-245	FYGEPRKLL
MAGE9 pos299-307	CYPSLYEEV

G250 MHC-Klasse-I Peptide

Protein ID/NCBI Referenzsequenz: CAB82444

<i>Name/Position</i>	<i>Peptidsequenz (N-terminal->C-terminal)</i>
G250 pos258-266	AFARVDEAL
G250 pos219-227	EYRALQLHL
G250 pos288-296	AYEQLLSRL
G250 pos323-331	RYFQYEGSL
G250 pos172-180	AFCPALRPL

GOLGA4 MHC-Klasse-I Peptide

Protein ID/NCBI Referenzsequenz: NP_002069.2

<i>Name/Position</i>	<i>Peptidsequenz (N-terminal->C-terminal)</i>
GOLGA4 pos1	MFKKLLKQKI
GOLGA4 pos67	LRYPVESL
GOLGA4 pos152	SYRGKysel
GOLGA4 pos564	TYRTRILEL
GOLGA4 pos2110	TQLAQKKTTL

GOLGA4 MHC-Klasse-II Peptide

Protein ID/NCBI Referenzsequenz: NP_002069.2

<i>Name/Position</i>	<i>Peptidsequenz (N-terminal->C-terminal)</i>
GOLGA4 pos1171	ELAELKLLADKSQLR
GOLGA4 pos17	QQALAPAQASSSST
GOLGA4 pos1016	AQILEMAQANSAGIS
GOLGA4 pos1402	ISPSDKAEAISLSK
GOLGA4 pos1478	LQAQLDVKATDAREK

3.6. Rekombinante Zytokine

Tabelle 9: Rekombinante Zytokine

Spezies	Zytokin	Hersteller
Maus	IL-4	Immunotools, Friesoythe
	GM-CSF	Immunotools, Friesoythe

3.7. Radionuklide

Tabelle 10: Radionuklide

Name	Hersteller
[6- ³ H]-Thymidine	Amersham/GE Healthcare, Freiburg

3.8. Enzyme

Tabelle 11: Enzyme

Enzym	Hersteller	
Restriktionsenzyme	BamHI	Fermentas, St. Leon-Rot
	EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot
	HindIII	Fermentas, St. Leon-Rot
	XhoI	Fermentas, St. Leon-Rot
REDTaq DNS-Polymerase	Sigma-Aldrich, München	
M-MLV Reverse-Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt	
T4 DNS-Ligase	Invitrogen, Darmstadt	

3.9. Vektoren

Tabelle 12: Vektoren

Vektor	Hersteller
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen, Darmstadt
pcDNA3.1 (-)	Invitrogen, Darmstadt

3.10. Transfektionsreagenzien

Tabelle 13: Transfektionsreagenzien

Name	Hersteller
GeneJuice Transfection Reagent	Novagen, Darmstadt
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

3.11. Zellkulturmedien

Standardmedien

Tabelle 14: Standard-Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung/Supplementierung
RPMI-1640	10% FCS 100µg/ml Streptomycinsulfat 50µg/ml Penicillin-G 245,7µg/ml L-Glutamin

Spezielle Kulturmedien

Tabelle 15: Spezielle Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung/Supplementierung
DC-Medium	RPMI-1640 2ng/ml rekombinantes Maus IL-4 10ng/ml rekombinantes Maus GM-CSF
TCGF-Medium	RPMI-1640 10% EL4-Kulturüberstand (TCGF, T cell growth factor)

3.12. Puffer und Lösungen

Tabelle 16: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
AEC-Komplex	<p>Lösung 1: 2,1ml Essigsäure (0,1M) mit 7,9ml Natriumacetat (0,1M) mischen und 500µl verwerfen.</p> <p>Lösung 2: 3,5mg AEC in 500µl Dimethylformamid</p> <p>Lösung 1 und Lösung 2 mischen, durch 0,45µm Spritzenfilter filtrieren und 5µl H₂O₂ (30%) zugeben</p>
Bicarbonatpuffer	<p>15mM Na₂CO₃ und 35mM NaHCO₃ in 900ml Wasser pH-Wert auf pH9,6 einstellen Auf 1l mit Wasser auffüllen</p>
DEPC Wasser	<p>500µl DEPC in 1l Wasser Inkubation über Nacht auf Magnetrührer, autoklavieren</p>
Diethanolaminpuffer	<p>97ml Diethanolamin und 100mg MgCl₂ in 900ml Wasser pH-Wert auf pH9,8 einstellen Auf 1l mit Wasser auffüllen</p>
LB-Medium	<p>10g Trypton, 5g Hefeextrakt und 10g NaCl in 900ml Wasser pH-Wert mit NaOH auf pH7,0 einstellen Auf 1l mit Wasser auffüllen, autoklavieren</p>
LB-Agar	<p>LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar</p>
MOPS	<p>0,4M MOPS, pH7,0 0,1M Natriumacetat 0,01M EDTA in DEPC Wasser</p>
10x PBS	<p>Löse 80g NaCl, 2 g KCl, 26,8g Na₂PO₄-7H₂O und 2,4g KH₂PO₄ in 800ml Wasser pH-Wert mit HCl auf pH7,4 einstellen Auf 1l mit Wasser auffüllen, autoklavieren</p>

10x AEC-PBS	400g NaCl, 5g KCl, 57,5g Na ₂ HPO ₄ und 10g KH ₂ PO ₄ in 5l Wasser
50x TAE	242g Tris in 500ml Wasser 100ml 0,5M Na ₂ EDTA (pH8,0) 57,1ml Eisessigsäure Auf 1l mit Wasser auffüllen

3.13. Verwendete Kits

Tabelle 17: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
VECTASTAIN ABC Kit	Vektor Labs, Burlingame, CA, USA

3.14. Instrumente und Geräte

Tabelle 18: Instrumente und Geräte

Instrument/Gerät	Typ	Hersteller
Bakterieninkubator	Brutschrank Typ A	MELAG, Berlin
Bakterienschüttler	TH-30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Beta-Radioaktivitätszähler	Betaplate 120S	LKB Wallace, Piscataway, NJ, USA
Bestrahlungsanlage	Gammacell 1000 Elite	Atomic Energy of Canada, Ontario, Kanada
CO ₂ -Brutschrank	Water-Jacket-Incubator	Labotect, Göttingen
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg
Elektroporator	EasyJect Optima	Peqlab, Erlangen
ELISA-Reader	Multiscan FC	Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMRBE	Leica, Wetzlar
Gelelektrophoresekammer	-	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Kryotom	2800 Frigocut E	Reichert-Jung/Leica, Wetzlar
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph, Schwabach

Mikroskop	Leica DMIL	Leica, Wetzlar
PCR Thermocycler	Mastercycler pro	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Genesys 10uv	Spectronic, Garforth, UK
Pipetten	pipetman	Gilson, Midleton, WI, USA
Pipettierhilfen	Accu-Jet® pro	Brand, Wertheim
Sterile Arbeitsbank	HERAsafe	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
UV- Geldokumentationssystem	MidiDoc	Herolab, Wiesloch
Vortexer	Vortexer Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage	PT 3100	Sartorius, Göttingen
Waage	Feinwaage RC210D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Eco Temp TW8	Julabo, Seelbach
Zellerntegrät	Harvester 96	Tomtec Inc., Hamden, CT, USA
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 3.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge	Biofuge 15	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

3.15. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 19: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well Mikrotiterplatten, Flachboden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-well Mikrotiterplatten, Rundboden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Beta-Radioaktivitätszähler Filtermatten	LKB Wallace, Piscataway, New Jersey, USA
MultiScreen HTS ELISPOT Filter-Platten	Millipore, Schwalbach
Gewebekulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 175cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kanülen 20G, 23G, 27G	BD, Heidelberg
Multiwell Zellkulturplatten (6-well, 24-well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (20, 100, 1000)	Eppendorf, Hamburg
PP-PCR-Gefäße (0,2ml)	Applied Biosystems, Austin, TX, USA
PP-Tentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß mit Deckel (1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (1ml, 5ml, 10ml, 20ml)	BD, Heidelberg
PP-Kryo-Gefäße	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzenfilter (0,2µm, 0,45µm)	Carl Roth, Karlsruhe

4. Methoden

4.1. Tierexperimentelle Methoden

4.1.1. Haltung

BALB/c-Mäuse wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bestellt und unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) in der zentralen Tierhaltungseinrichtung des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) sowie in der interfakultären biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg gehalten. Mäuse wurden mit sterilem Futter und Wasser *ad libitum* gefüttert. Für Experimente wurden BALB/c-Mäuse in einem Alter von 8 bis 10 Wochen eingesetzt.

4.1.2. Präparation von lymphatischen Organen und Tumor

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und unter sterilen Bedingungen präpariert. Für die Gewinnung von Lymphozyten wurden den Mäusen Lymphknoten und Milz entnommen und die Organe auf einer sterilen Gaze zerrieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde in PBS aufgenommen, durch Zentrifugation gewaschen und in Zellkulturmedium (RPMI-1640) aufgenommen.

Für die Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden den Mäusen Femur und Tibia entnommen. Das Knochenmark wurde anschließend mit PBS und einer 27G Kanüle aus dem Knochen gespült, ebenfalls auf einer Gaze zerrieben, gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen.

Die Isolation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) erfolgte aus Tumoren, die bis zu einem Durchmesser von ca. 1,5cm gewachsen waren. Dazu wurde der Tumor unter sterilen Bedingungen frei präpariert und die Tumormasse auf einer Gaze zerrieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde in PBS aufgenommen und durch Zentrifugation gewaschen.

4.1.3. Isolation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) durch Ficoll-Hypaque-Zentrifugation

Die Isolation von TIL erfolgte durch Ficoll-Hypaque-Zentrifugation. Dazu wurde die präparierte Tumormasse in 5ml PBS resuspendiert und auf 2ml Ficoll-Hypaque geschichtet und bei 2000rpm für 15min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Lymphozytenschicht entnommen. Die TIL wurden zweimal mit einem Überschuss an PBS gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen.

4.1.4. Blutentnahme und Gewinnung von Serum

Durch Punktion der *vena facialis* wurden BALB/c-Mäusen ca. 500µl Blut entnommen. Das Blut wurde über Nacht bei 4°C zur Koagulation gelagert. Zur Gewinnung des Serums wurde das koagulierte Blut zentrifugiert (2000rpm, 20min) und das im Überstand befindliche Serum abgenommen. Serumproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.5. Tumorwachstumsexperimente und Immunisierung von Mäusen

Die Injektion von Tumorzellen erfolgte durch subkutane (s.c.) Injektion in die rechte Flanke von BALB/c-Mäusen. Die Mäuse erhielten je nach Experiment 1×10^4 , 2×10^5 bzw. 1×10^6 Tumorzellen. Das Tumorwachstum wurde regelmäßig kontrolliert und protokolliert. Hatte der Tumor einen Durchmesser von 2,5cm erreicht, so wurden die Mäuse getötet. Für die Erstellung von Tumorwachstumskurven und Überlebensraten wurde der durchschnittliche Tumordurchmesser errechnet bzw. der Todeszeitpunkt der Mäuse nach Tumorgabe festgehalten.

Für die Vakzinierung wurden BALB/c-Mäusen 2×10^6 antigenbeladene dendritische Zellen subkutan in den unteren Rückenbereich injiziert. Für die prophylaktische Vakzinierung erfolgte die Injektion der dendritischen Zellen 20 Tage vor der Tumorgabe. Eine weitere Injektion wurde 10 Tage vor Tumorgabe verabreicht. Für die therapeutische Vakzinierung erhielten die BALB/c-Mäuse eine Injektion mit dendritischen Zellen drei Tage nach der Tumorapplikation. Die Vakzinierung mit antigenbeladenen dendritischen Zellen erfolgte regelmäßig in Intervallen von 10 Tagen. Für die Kovakzinierung mit autoantigentransformierten *S. typhimurium* wurden BALB/c-Mäusen $1-2 \times 10^8$ CFU/ml oral mit einer Schlundsonde verabreicht. Die erste Gabe der

Salmonellen erfolgte gleichzeitig mit der Injektion von dendritischen Zellen. Die Vakzinierung mit Salmonellen wurde regelmäßig alle 14 Tage wiederholt.

4.2. Zellbiologische Methoden

4.2.1. Zelllinien und Kultur

Renca

Renca sind eine zur BALB/c-Maus syngene Zelllinie des Nierenzellkarzinoms. Die Tumorzelllinie ist gut charakterisiert und weist *in vivo* konstante Wachstums- und Metastasierungseigenschaften auf, die denen des menschlichen Nierenzellkarzinoms sehr ähnlich sind (171). Diese Eigenschaften machen die Renca-Zelllinie zu einem geeigneten Model des Nierenzellkarzinoms in der Maus. Für die Etablierung eines humanen Nierenzellkarzinom-Modells in der BALB/c-Maus wurden die Renca-Zellen mit den humanen tumorassoziierten Antigenen G250 (Renca-G250) und MAGE9 (Renca-MAGE9) stabil transfiziert.

Kultur

Die adhärenenten Zelllinien Renca wurden in RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 10% FCS, Glutamin und Antibiotika kultiviert. Standardmäßig wurden die Zellen in Zellkulturflaschen bei 37°C in einem Brutschrank unter 5% CO₂-Begasung in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre (95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Bei konfluentem Wachstum wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1600rpm, 4min) gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und verdünnt (1:5) in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

4.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Verdünnungen einer Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung zur Anfärbung von toten Zellen gemischt und die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt.

4.2.3. Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation gewaschen und in FCS/10% DMSO zu ca. 10×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C für mindestens 24 Stunden gelagert, bevor sie zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-170°C) überführt wurden.

4.3. Immunologische Methoden

4.3.1. Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Die Generierung von dendritischen Zellen (DC) erfolgte aus isolierten Knochenmarkszellen (BMC, *bone marrow cells*). Dazu wurden ca. 2×10^6 BMC in 10ml DC-Medium in einer 10cm Bakterienkultur-Petrischale ausgesät und unter Standardkulturbedingungen (37°C , 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Nach 3 Tagen wurden 10ml DC-Medium dazugegeben und am Tag 6 der Kultur wurden 50% des Mediums ausgetauscht. Für die Maturation der DC wurden die leicht adhärennten und Suspensionszellen am Tag 8 geerntet, durch Zentrifugation gewaschen und in frischem DC-Medium mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ LPS auf neuen Kulturschalen über Nacht kultiviert. Am Tag 9 wurden die maturierten dendritischen Zellen geerntet, gewaschen und für den weiteren Gebrauch in RPMI resuspendiert.

4.3.2. Beladung von dendritischen Zellen mit Peptid und Tumorlysat

Zur Herstellung von Tumorlysat wurden Renca-Zellen (Renca-Wildtyp, Renca-G250, Renca-MAGE9) geerntet, gewaschen und zu 2×10^7 Zellen/ml in PBS resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch mehrmaliges (3x) Schockgefrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff. Die Beladung der dendritischen Zellen erfolgte am Tag 8 der DC-Kultur. Dazu wurde mit dem LPS-Stimulus Tumorlysat in einem Äquivalent von 3:1 (3 Tumorzellen auf 1 dendritische Zelle) zu den DC gegeben und über Nacht kultiviert. Am Tag 9 wurden die maturierten und mit Tumorlysat beladenen DC geerntet, gewaschen und in RPMI-Medium resuspendiert.

Für die Beladung mit Peptiden wurden 5×10^6 maturierte DC in 10ml serumfreien RPMI-Medium mit $10 \mu\text{g/ml}$ Peptid resuspendiert und für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die peptidbeladenen DC geerntet, gewaschen und in RPMI-Medium für den weiteren Gebrauch resuspendiert.

4.3.3. Durchflusszytometrie

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der sich Zellpopulationen untersuchen und charakterisieren lassen. Im FACS-Gerät (*fluorescence-activated cell sorter*) werden dabei Informationen über die Granularität und Größe einzelner Zellen gewonnen, wodurch sich bestimmte Zellpopulationen identifizieren lassen. Werden die Zellen zudem mit monoklonalen Antikörpern markiert, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man mit der Durchflusszytometrie Subpopulationen identifizieren und die Expressionsstärke bestimmter Moleküle auf Zellen untersuchen. Das FACS-Gerät erzeugt einen laminaren Probenstrom, mit dem Zellen aus einer Probe durch eine dünne Kapillare angesaugt werden. Dabei werden einzelne Zellen an einem Lasersystem vorbeigeführt. Trifft das Licht des Lasers auf eine Zelle, so wird anhand der Absorption und der Streuung des Lichts die Größe (FSC, *forward scatter*) und Granularität (SSC, *side scatter*) der Zelle bestimmt. Ist die Zelle mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, wird dieser durch den Laser einer bestimmten Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht von Photodetektoren gemessen (Abbildung 4). Auf diese Weise kann man die Anzahl von Zellen mit bestimmten Eigenschaften ermitteln und Auskunft über die Expressionsrate verschiedener Moleküle erhalten. Dabei ist die Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen ebenso möglich wie die von intrazellulären Molekülen.

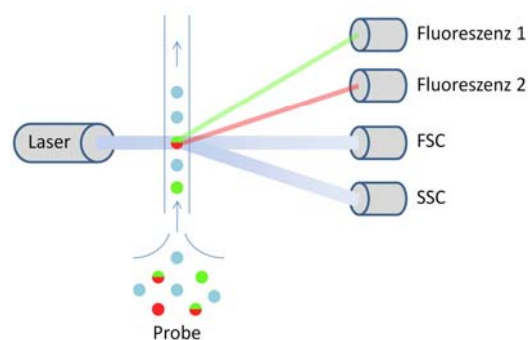


Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie

Im FACS-Gerät werden einzelne Zellen in einem laminaren Probenstrom durch eine Messkapillare geführt. Die Zellen passieren dabei das Licht eines Lasers. Photodetektoren messen das von den Zellen absorbierte (FSC) und gestreute (SSC) Licht, wodurch Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden. Wird durch den Laser ein Fluoreszenzfarbstoff angeregt, mit dem eine Zelle markiert ist, so wird auch das emittierte Licht gemessen. Somit

können einzelne Zellpopulationen untersucht werden und die Anzahl von Zellen mit bestimmten Eigenschaften sowie die Expressionsrate von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen ermittelt werden.

Markieren von Oberflächenmolekülen mit Antikörpern für die FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse wurden 5×10^5 Zellen pro Well in eine 96-Loch-Rundbodenplatte überführt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen in PBS/1% BSA für 30min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden anschließend zentrifugiert (1600rpm, 4min) und der Überstand durch vorsichtiges Ausschlagen der Platten verworfen. Die Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper für 30min bei 4°C inkubiert. Es folgte abermals das zweimalige Waschen mit eiskaltem PBS und die Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper bzw. Streptavidin bei 4°C für 30min. Schließlich wurden die Zellen nochmals mit kaltem PBS 2x gewaschen und für die FACS-Analyse in Probenröhrchen überführt. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern validieren zu können, dienten für die FACS-Analyse als Kontrollen (a) ungefärbte Zellen, (b) Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurden, bzw. (c) die Inkubation der Zellen mit einer Isotypenkontrolle. Die Auswertung und Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der *Cell Quest Software* (BD, Heidelberg).

Markieren von intrazellulären Molekülen für die FACS-Analyse

Für die Markierung von intrazellulären Molekülen (Zytokine, Chemokine) wurden die Zellen vor der Inkubation mit den Antikörpern fixiert und permeabilisiert. Dazu wurden 5×10^5 Zellen zunächst 2x mit PBS gewaschen und in 50µl PBS/1% Formalin resuspendiert. Für die Fixierung wurden die Zellen für 20min bei 4°C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für die Permeabilisierung in 50µl PBS/0,5% Tween-20 resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für maximal 15min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen 3x mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach folgte, wie oben beschrieben, das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen und die Inkubation mit den Antikörpern zur Markierung der intrazellulären Proteine.

4.3.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für den Nachweis von Zytokinen aus Kulturüberständen und dem Serum von Mäusen wurden 96-Loch-ELISA-Platten mit 2-4µg/ml Antikörper in Bicarbonatpuffer (pH9,6) über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen und die ELISA-Platten mit RPMI/10% FCS für mindestens 2h bei 37°C geblockt. Nach dem Blocken wurde 3x mit PBS/0,1% Tween-20 gewaschen, die Waschlösung verworfen und die Platten getrocknet. Schließlich wurden 50µl/Well an Kulturüberstand bzw. Serum pipettiert, die Platten mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Platten 3x mit PBS/0,1% Tween-20 gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 50µl/Well des biotin-konjugierten Detektionsantikörpers (0,5-1µg/ml in PBS/1% BSA) pipettiert und die Platten bei 37°C im Brutschrank für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde gründlich (6x) mit PBS/0,1% Tween-20 gewaschen. Dann wurden 50µl/Well Streptavidin-AP (alkalische Phosphatase) in einer Konzentration von 0,2µg/ml pipettiert und bei RT für maximal 1 Stunde inkubiert. Es folgten abermals 6 Waschschritte mit PBS/0,1% Tween-20. Als Substrat für die alkalische Phosphatase dienten p-Nitrophenylphosphat-Tabletten, die in 5ml Diethanolamin-Puffer gelöst wurden. 50µl der Substratlösung wurden pro Well pipettiert und die ELISA-Platten, vor Licht geschützt, bei RT solange inkubiert, bis ein Farbumschlag der Substratlösung zu beobachten war. Schließlich wurde die Quantität des umgesetzten Substrats photometrisch bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen.

4.3.5. ELISA-Spot-Assay

Der ELISPOT-Assay dient zur Bestimmung der Zahl an Zellen, die Antikörper, Zytokine oder Chemokine sezernieren. In dieser Arbeit wurde er zum Nachweis von interferon-γ-sezernierenden (IFN-γ) Zellen eingesetzt. Dazu wurden die ELISPOT-Platten zur Äquilibration der PVDF-Membran zunächst mit 35% Ethanol (15µl) befeuchtet und 3x mit PBS unter sterilen Bedingungen gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit 10µg/ml anti-IFN-γ-Antikörper in sterilem PBS beschichtet und die Platten wurden mit Parafilm versiegelt bei 4°C über Nacht inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt. Das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte mit RPMI/10% FCS für mindestens 2 Stunden bei 37°C. Das Medium wurde durch Ausschlagen der Platten verworfen. Anschließend wurden 1×10^5 Effektorzellen (LNC) in 100µl RPMI in

Triplikaten pipettiert. Zu den Effektorzellen wurden 1×10^4 antigenbeladene Stimulations-Zellen (DC) gegeben, sodass ein Effektor/Stimulator-Verhältnis von 10:1 erreicht wurde. Die ELISPOT-Platten wurden dann bei 37°C im Inkubator für 48 Stunden inkubiert. Vor der Zugabe des Sekundärantikörpers wurden zunächst die Zellen dekantiert und die Platten gründlich (6x) mit PBS/0,01% Tween-20 gewaschen. 50µl pro Well des biotin-konjugierten anti-IFN- γ -Detektionsantikörpers (2µg/ml in PBS/0,5% BSA) wurden zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten 6x mit PBS/0,01% Tween-20 gewaschen und 100µl des Enzymkonjugats Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*) 1:1000 verdünnt dazu gegeben. Nach der Inkubation von 1 Stunde bei RT wurden die ELISPOT-Platten 3x mit PBS/0,01% Tween-20 und 3x mit PBS gewaschen. Schließlich wurden 100µl TMB-Substratlösung auf die ELISPOT-Platte gegeben und solange bei RT inkubiert, bis die *Spots* auf der Membran gut sichtbar wurden. Die Substratumsetzung wurde durch Waschen der Platten mit Wasser gestoppt. Die Membran wurde anschließend getrocknet und die Anzahl der *Spots* bestimmt.

4.3.6. T-Zell-Proliferationsassay

^3H -Thymidin-Inkorporation

Die Messung der Proliferation von T-Zellen erfolgte durch den Nachweis der Inkorporation von tritium(^3H)-markiertem Thymidin in die DNS sich teilender Zellen. Je häufiger sich Zellen teilen, desto größer ist die Menge an in die DNS der Zellen eingebautem ^3H -Thymidin, die somit die Proliferationsrate reflektiert.

Für die Durchführung des Assays wurden Lymphknotenzellen bzw. Milzzellen in Triplikaten in eine 96-Loch-Rundbodenplatte titriert (2×10^5 - $2,5 \times 10^4$ Zellen/Well) und mit jeweils 1×10^4 antigenbeladenen dendritischen Zellen stimuliert. Nach drei Tagen wurde ^3H -Thymidin (10µCi/ml) in das Kulturmedium gegeben und für weitere 16 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit dem Zellerntegerät gewaschen und lysiert, wobei die DNS der lysierten Zellen auf Filtermatten aufgefangen wurde. Die Filtermatten wurden anschließend getrocknet und mit Szintillationsflüssigkeit in Plastikbeutel eingeschweißt. Die Menge an radioaktiv markierter DNS wurde mit einem β -Counter gemessen, wobei als Maßeinheit für die Radioaktivität cpm (*counts per minute*) angegeben wurde.

CFSE-Verdünnungs-Assay

Ein weiterer Nachweis für die Proliferation von Zellen ist die CFSE-Verdünnungs-Methode. Die Methode beruht darauf, dass Zellen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert wurden, diesen bei ihrer Teilung an die Tochterzellen weitergeben. Mit jeder Zellteilung halbiert sich demnach die Fluoreszenzintensität der Zellen. Diese Abnahme der Fluoreszenz kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen werden.

Für die Markierung der Zellen mit CFSE wurden diese zunächst gewaschen und in PBS/0,1% BSA zu 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Um eine gleichmäßige Färbung der Zellen zu gewährleisten, wurde $4 \mu\text{M}$ CFSE in PBS verdünnt und dann 1:1 mit den Zellen vermischt ($2 \mu\text{M}$ CFSE-Endkonzentration). Die Zellen wurden für 10min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend zum Blocken mit 1 Volumen FCS verdünnt und für 5min auf Eis inkubiert. Ungebundenes CFSE wurde durch mehrmaliges Waschen der Zellen in RPMI1640/10% FCS entfernt. Die Zellen wurden unter normalen Kulturbedingungen gehalten und die Abnahme der CFSE-Fluoreszenz zu gegebenen Zeitpunkten (1-4 Tage) mit dem FACS-Gerät gemessen.

4.3.7. Zytotoxizitätsassay

Um das Potential von zytotoxischen T-Zellen (CTL) zur Abtötung ihrer Zielzellen zu messen, wurden die Zielzellen (Renca-Tumorzellen) radioaktiv mit ^3H -Thymidin markiert, das sich bei deren Proliferation in die DNS der Tumorzellen einbaut. Zytotoxische T-Zellen induzieren die Apoptose in ihren Zielzellen, die letztendlich zur DNS-Fragmentierung führt. Ähnlich wie beim Proliferationsassay (siehe oben) wird beim Zytotoxizitätsassay die DNS der Tumorzellen auf Filtermatten überführt. Da die Filtermatten nur hochmolekulare DNS auffangen, wird die fragmentierte DNS apoptotischer Tumorzellen nicht gebunden. Je mehr Zellen getötet wurden, desto weniger ^3H -Thymidin-markierte DNS wird aufgefangen und desto weniger Radioaktivität kann nachgewiesen werden.

Im Einzelnen wurden für die Durchführung Lymphknotenzellen (Effektorzellen) immunisierter BALB/c-Mäuse präpariert und *in vitro* mit antigenbeladenen dendritischen Zellen restimuliert. Die Restimulation der Effektorzellen erfolgte in TCGF-Medium für 5 Tage unter Standardkulturbedingungen (37°C , 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit). Die Zellen wurden anschließend geerntet, gewaschen und gezählt. Triplikate der Effektorzellen wurden in 96-Loch-Rundbodenplatten

titriert ($1 \times 10^6 - 6 \times 10^4$ Zellen/Well) und je 1×10^4 ^3H -Thymidin-markierte (16h, 10 μCi) Zielzellen dazugegeben. Die Platten wurden für 6 Stunden bei 37°C, 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert, anschließend mit dem Zellerntegerät gewaschen, lysiert und die DNS auf die Filtermatten übertragen. Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte mit dem β -Counter und wurde in cpm (*counts per minute*) angegeben. Zur Berechnung der spezifischen Zytotoxizität wurde folgende Formel verwendet:

$$\% \text{ spezifische Zytotoxizität} = 100 \times \frac{\text{cpm (Zielzellen)} - \text{cpm (Ziel + Effektozellen)}}{\text{cpm (Zielzellen)}}$$

4.3.8. TRAP-Assay (T cell recognition of antigen-presenting cells by protein capture)

Mit dem TRAP-Assay können antigenspezifische Lymphozyten detektiert, quantifiziert und charakterisiert werden (172,173). Dabei beruht der Assay auf dem Prinzip der Trogozytose, einem Phänomen, bei dem es im Falle einer antigenspezifischen Interaktion von T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle (APC) zum Austausch von Membranfragmenten und assoziierten Proteinen kommt.

Der Nachweis der Trogozytose erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie, wobei biotinylierte Membranfragmente von APCs, die von T-Zellen aufgenommen wurden, mit fluoreszenz-konjugiertem Streptavidin detektiert wurden. Die Identifikation von T-Zellen erfolgte durch Gegenfärbung mit CD4- bzw CD8-spezifischen Antikörpern (Abbildung 5).

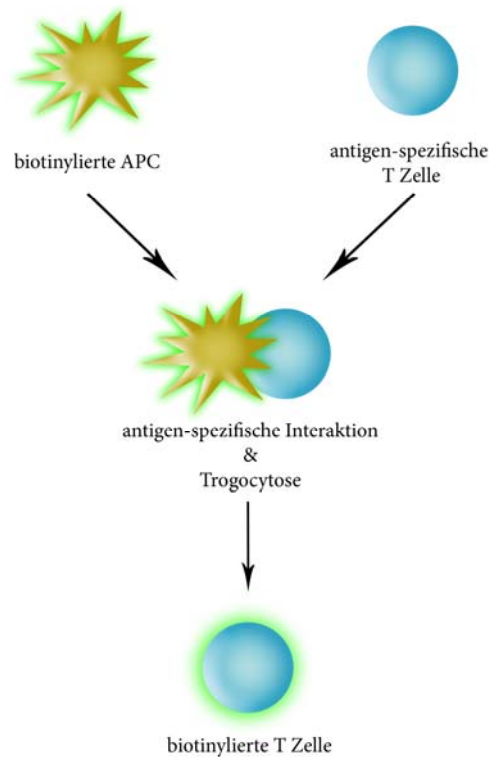


Abbildung 5: Prinzip des TRAP-Assays

Der TRAP-Assay beruht auf dem Phänomen der Trogozytose, einem Prozess, bei dem es im Falle einer antigen-spezifischen Interaktion von APC und T-Zelle zum Austausch von Membranfragmenten und assoziierten Proteinen kommt. Sind Oberflächenmoleküle auf den APC mit Biotin markiert, so nehmen antigenspezifische T-Zellen diese durch Trogozytose auf. Werden antigenspezifische Lymphozyten zudem mit Antikörpern markiert, ist die Identifizierung, Quantifizierung und Charakterisierung von antigenspezifischen Lymphozyten mit dem TRAP-Assay möglich.

In-vitro-TRAP-Assay

Die Durchführung des TRAP-Assays *in vitro* diente zum Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen, die aus Lymphknoten vakzinierter Mäuse isoliert wurden. Die Lymphknotenzellen (LNC) wurden mit 5×10^6 Zellen/ml in RPMI-1640/10% FCS suspendiert. Dann wurden $100 \mu\text{l}$ (5×10^5 LNC) pro Well in eine 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert. Für die Biotinylierung der DC wurden 10×10^6 DC/ml in PBS resuspendiert und mit 1 mg/ml Biotin für 10min bei RT inkubiert. Danach wurde 1 Volumen FCS dazugegeben und die Zellen für 10min auf Eis inkubiert. Der nächste Schritt umfasste das gründliche Waschen der Zellen mit RPMI-1640/10% FCS, um ungebundenes Biotin zu entfernen. Nach dem Beladen wurden die DC 2x gewaschen und zu

5×10^6 DC/ml in RPMI-1640/10% FCS resuspendiert und $100 \mu\text{l}$ (5×10^5 DC) zu den LNC zugegeben. Die Platten wurden schließlich für 1min bei 1600rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die sie für 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in PBS/2mM EDTA resuspendiert, um Zellaggregate aufzulösen. Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen und in PBS für die Antikörperfärbung resuspendiert (siehe Durchflusszytometrie).

Ex-vivo-TRAP-Assay

Der Nachweis, dass antigenspezifische Lymphozyten *in vivo* mit dendritischen Zellen interagieren, erfolgte durch Nachweis der Trogozytose *ex vivo*. Dazu wurden vakzinierten BALB/c-Mäusen 2×10^6 antigenbeladene und biotinylierte DC (siehe oben) subkutan appliziert. 24 Stunden später wurden die drainierenden Lymphknoten (inguinal und paraaortal) präpariert und für den durchflusszytometrischen Nachweis der Trogozytose mit Antikörpern gefärbt.

4.3.9. Immunhistologie

Für die immunhistologische Untersuchung wurden Tumore präpariert, mit Einbettmedium überzogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit dem Mikrotom wurden $5 \mu\text{m}$ dicke Schnitte des Tumorgewebes erstellt und auf Objektträger überführt. Die Fixierung des Gewebes erfolgte durch Inkubation in Chloroform/Aceton (1:1) für 4min. Fixierte Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet. Zum Blocken wurden $100 \mu\text{l}$ AEC-PBS/2% BSA auf die Schnitte gegeben und für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um die endogene alkalische Phosphatase-Aktivität zu blocken, wurden die Schnitte mit Levamisol-Lösung behandelt. Für das Anfärben von intrazellulären Proteinen wurde das Gewebe mit 4% Paraformaldehyd/0,1% Triton X-100 fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper in AEC-PBS/2% BSA für 1 Stunde bei 37°C . Die Schnitte wurden 3x mit AEC-PBS/2% BSA gewaschen und nach dem Trocknen der Schnitte mit dem Zweitantikörper für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 3x gewaschen und die Schnitte wurden getrocknet. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde *Avidin/Biotin Blocking Kit* (VECTASTAIN ABC KIT) verwendet. Geblockt wurde 30min bei 37°C . Anschließend wurden die Schnitte 3x gewaschen und getrocknet. Schließlich erfolgte die Zugabe des AEC-Substrat-Komplexes für 5-20min. Die Substratumsetzung wurde durch Waschen der Schnitte mit AEC-

PBS/2% BSA gestoppt. Nach dem Trocknen der Schnitte (über Nacht, RT) wurden die Schnitte mit Mayers Hämatoxylin (1min, RT) gegengefärbt und mit Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden schließlich nach dem Trocknen mit Deckgläsern und Kaisers Glyceringelatine abgedeckt.

4.4. Molekular- und mikrobiologische Methoden

4.4.1. Klonierung humaner TAA und stabile Transfektion von Renca-Zellen

Um eine zielgerichtete Therapie für die menschlichen RCC-assoziierten Antigene MAGE9 und G250 zu etablieren, wurden Renca-Zellen mit der cDNS der humanen Antigene stabil transfiziert. Die cDNS wurde aus der menschlichen Nierenzellkarzinom-Zelllinie KTCTL28 isoliert. Zur Transfektion wurde die cDNS der Antigene in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Für die Transfektion wurden 3×10^5 Renca-Zellen/Well einen Tag vor der Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät und bei 37°C im Brutschrank gehalten. Am Tag der Transfektion wurden pro Well 4µl GeneJuice-Transfektionsreagenz mit 100µl serumfreiem RPMI-1640 vermischt und für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1µg DNS/Well zugegeben und für weitere 10min bei RT inkubiert. Pro Well wurden 100µl des Transfektionsgemischs tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden im Transfektionsmedium 24 Stunden inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde anschließend verworfen, die Zellen gewaschen und zur Selektion transfizierter Zellen in RPMI-1640/250µg/ml G418 kultiviert (1-2 Wochen). Von den im Selektionsmedium überlebenden Zellen wurden schließlich zur Gewinnung von Einzelzellklonen Verdünnungsreihen in 96-Loch-Flachbodenplatten hergestellt. Einzelne Zellkolonien wurden in Selektionsmedium kultiviert und regelmäßig durch RT-PCR auf die Stabilität der Transfektion der Tumorantigene überprüft.

4.4.2. Gene silencing durch RNS-Interferenz

Die RNS-Interferenz ist ein Mechanismus, der zur post-transkriptionellen Genausschaltung (*gene silencing*) führt. Dabei bewirken sogenannte *small-interfering-RNA* (siRNA) in der Zelle die Bildung eines RNS-Protein-Komplexes, der in der Lage ist, die mRNA eines Gens spezifisch zu spalten. Bei der siRNA handelt es sich um kurze (21-23bp) doppelsträngige RNS-Moleküle

(dsRNS) mit 2-3 Nukleotide langen, ungepaarten 3'-Überhängen und 5'-phosphorylierten Enden (Abbildung 6 A). Die siRNA entsteht gewöhnlich durch Spaltung von langen dsRNS-Molekülen. Für die Spaltung der langen dsRNS ist ein zytoplasmatisches RNase-III-typ-ähnliches Protein, genannt *Dicer*, verantwortlich. Die durch das *Dicer*-Protein hergestellten siRNA bilden den sogenannten *multi-protein RNA-Induced Silencing Complex* (RISC), der nach einem ATP-abhängigen Aktivierungsschritt nur noch den *antisense*-Strang der siRNA enthält. Dieser *antisense*-Strang führt den RISC zu der homologen Zielsequenz endogener mRNS, die daraufhin endonukleolytisch gespalten wird (Abbildung 6 B).

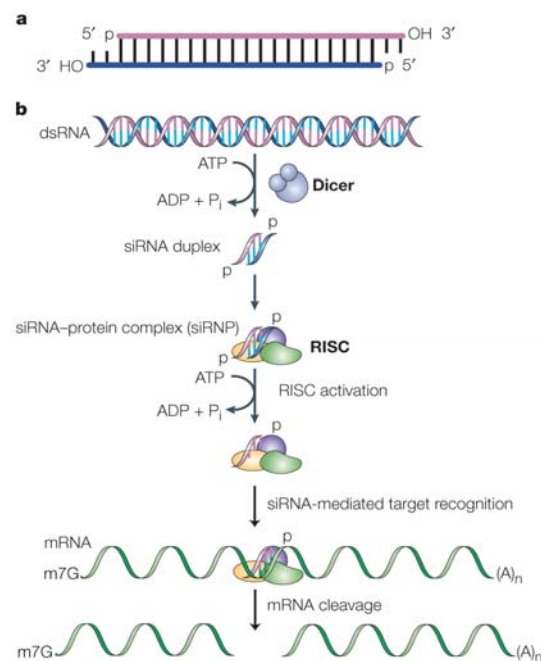


Abbildung 6: RNS-Interferenz

(A) Struktur der *short interfering* (si)RNA. Die molekulare Struktur zeichnet sich durch 2-3 Nukleotide lange, ungepaarte 3'-Überhänge und phosphorylierte 5'-Enden aus. siRNA sind doppelsträngig 21-23 Nukleotide lange Moleküle. (B) Der RNS-Interferenz-Signalweg. Lange dsRNS-Moleküle wie die von Viren werden durch das *Dicer*-Protein (RNase-III-Proteinfamilie) gespalten. Die entstandenen siRNA-Moleküle werden von dem *RNA-induced silencing Complex* (RISC) gebunden. In einem ATP-abhängigen Schritt wird die doppelsträngige siRNA entwunden und der *antisense* siRNA-Proteinkomplex bindet homolog an endogene mRNS-Moleküle, die daraufhin endonukleolytisch gespalten werden. (Abbildung nach Dykxhoorn et al., (174))

4.4.3. siRNA-Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden $2-3 \times 10^6$ Renca-Zellen in 7ml RPMI-1640 in Kulturschalen ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Am Tag darauf wurden 1,2µg der

siRNA in 1ml serumfreiem RPMI-1640 vermischt (entspricht einer siRNA-Endkonzentration von 10nM). Zu der verdünnten siRNA wurden dann 80µl des HiPerFect-Transfektionsreagenzes (Qiagen, Hilden) gegeben und durch Vortexen vermischt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur zur Komplexbildung für 10min inkubiert. Der Transfektionskomplex wurde daraufhin tropfenweise auf die Zellen gegeben und gleichmäßig durch Schwenken im Kulturmedium verteilt. Die Zellen wurden schließlich weitere 48 Stunden unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Kontrolliert wurde das Ausmaß des *gene silencing* auf mRNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR.

4.4.4. Isolation der Gesamt-RNS aus Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNS aus Zellen erfolgte mit dem *RNeasy-Kit* (Qiagen, Hilden) und wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden dazu geerntet, gewaschen und gezählt. Anschließend wurden sie in Lysispuffer resuspendiert. Für den vollständigen Aufschluss der Zellen wurde die Suspension durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 26G-Kanüle homogenisiert. Das Lysat wurde schließlich mit 1 Volumen Ethanol verdünnt und durch die Membran der *RNeasy spin columns* zentrifugiert. Die an die Membran gebundene Gesamt-RNS wurde anschließend gewaschen und mit DEPC-Wasser von der Membran eluiert.

Die Konzentration und Qualität der isolierten RNS wurde schließlich photometrisch bestimmt (Konzentration = $OD_{260nm} \times 40 \mu\text{g/ml}$, reine RNS = $OD_{260nm} : OD_{280nm} \geq 2,0$).

4.4.5. Reverse Transkription

Die Umschreibung der isolierten RNS in cDNS erfolgte mit der M-MLV-reversen Transkriptase (Invitrogen, Darmstadt). Dazu wurden 1µg der isolierten RNS mit 1µl Oligo-dT-Primer (50µM) in einem Gesamtvolumen von 5µl mit Wasser gemischt. Der Ansatz wurde im Thermocycler für 5min bei 70°C und anschließend für 5min bei 4°C inkubiert. Dem Reaktionsansatz wurden daraufhin 1x *1st Strand Buffer*, 0,5 mM dNTPs, 5 mM DTT, 1U reverse Transkriptase zugegeben (mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20µl). Die anschließende reverse Transkription erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

<i>Annealing</i> :	25°C, 5min
cDNS-Synthese:	42°C, 60min
Inaktivierung:	70°C, 15min

Das Reaktionsvolumen wurde schließlich 1:5 mit Wasser verdünnt und die Konzentration und Qualität der cDNS photometrisch bestimmt (Konzentration = $OD_{260nm} \times 50 \mu\text{g/ml}$, reine DNS = $OD_{260nm} : OD_{280nm} \geq 1,8$).

4.4.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die in der PCR zur spezifischen Vervielfältigung der DNS eingesetzten Primer wurden kommerziell synthetisiert (Invitrogen, Darmstadt). Die in der PCR-Reaktion verwendete spezifische *Annealing*-Temperatur der Primer wurde zuvor mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt. Als Enzym wurde die REDTaq-DNS-Polymerase eingesetzt (Sigma-Aldrich, Darmstadt).

Für die Durchführung der PCR wurden die Reaktionsansätze wie folgt angesetzt:

10ng DNS
1x REDTaq-Puffer
0,5mM dNTPs
0,5 μ M Primer 1
0,5 μ M Primer 2
1 Unit REDTaq-DNS-Polymerase
Wasser für ein Gesamtvolumen von 20 μ l

Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	94°C, 5min	25-30 Zyklen
Denaturierung:	94°C, 45sec	
<i>Annealing</i> :	55-68°C, 30sec	
Elongation:	72°C, 1min	
Finale Elongation:	72°C, 10min	

4.4.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur qualitativen und quantitativen Bewertung sowie zur Auftrennung und Isolierung von Nukleinsäuren. DNS-Proben wurden je nach Größe in 0,8-1,5%igen Agarose-Gelen (TAE-Puffer/0,5µg/ml Ethidiumbromid) in einer horizontalen Elektrophorese-Kammer in TAE-Puffer bei einer Spannung von 5-10 Volt/cm aufgetrennt. Für die Klonierung relevante DNS-Fragmente wurden mit dem *QIAquick-Gel-Extraction-Kit* (Qiagen, Hilden) aus dem Agarose-Gel extrahiert und aufgereinigt. Die Auswertung und Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte unter UV-Licht mit dem Geldokumentationssystem. Für die Auftrennung von RNS-Proben wurden denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gele in MOPS-Puffer verwendet.

4.4.8. Transformation von *Salmonella typhimurium aroA* SL7207

Der attenuierte Bakterienstamm *S. typhimurium aroA* SL7207 kann als Lebend-Vakzin eingesetzt werden und eignet sich als Träger für die DNS-Vakzinierung (157,160). Zu diesem Zweck wurde das humane Autoantigen GOLGA4 in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Darmstadt) kloniert. Für Kontrollexperimente wurde zudem der Vektor ohne GOLGA4-Insert in *S. typhimurium aroA* SL7207 transformiert. Bei dem GOLGA4-Insert handelt es sich um ein 1694bp langes cDNS-Fragment des Proteins, das aus einer Phagenbibliothek der humanen Nierenzellkarzinomzelllinie KTCTL28 isoliert wurde. Der cDNS wurden am 3'-Ende die Kozak-Sequenz und am 5'-Ende ein Stop-Codon angefügt. Dieses GOLGA-Insert wurde schließlich mit einer 5'-BamHI- und einer 3'-XhoI-Schnittstelle in den pcDNA3.1-Vektor kloniert. Kompetente *S. typhimurium aroA* SL7207 wurden schließlich durch Elektroporation (2500V, 25µF) mit dem pcDNA3.1-Vektor und dem pcDNA-Golga4-Vektor transformiert. Transformierte *S. typhimurium* wurden über ihre Ampicillin-Resistenz selektioniert. Vermehrt wurden die Salmonellen in LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator. Für die orale Applikation der Salmonellen mittels Schlundsondierung wurden Kulturen bis zu einer optischen Dichte von 1 ($OD_{600\text{ nm}} = 1$ entspricht ca. 1×10^8 CFU/ml) herangezogen. Die Salmonellen wurden zentrifugiert (6000rpm, 15min) und 2x mit PBS gewaschen. Für die Neutralisation des sauren pH-Werts im Magen wurden die Salmonellen in PBS/10% Bicarbonatpuffer pH8,5 resuspendiert.

4.5. Statistik

Signifikante Unterschiede wurden mit den Wilcoxon-Rangsummen-Test (*In-vivo*-Assays) oder mit dem *Student's t-Test* (*In-vitro*-Assays) ermittelt. Die Durchschnittswerte und Standardabweichungen der *In-vivo*-Experimente wurden aus 2 Experimenten mit je 8-10 Mäusen pro Gruppe errechnet. *Ex-vivo*-Experimente wurden aus Gruppen von 2-3 Mäusen 3-5x wiederholt. Durchschnittswerte und Standardabweichungen von *In-vitro*-Experimenten wurden 3-4x wiederholt und in Triplikaten durchgeführt.

5. Ergebnisse

Tumorantigene sind schwach immunogen und sind bei der Vakzinierung oft auf die Unterstützung von Stimulanzen angewiesen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Kovakzinierung mit transformierten *Salmonella typhimurium* diese Funktion erfüllen kann (162,175,176). Die Kovakzinierung mit einem Autoantigen wird ebenfalls als Möglichkeit diskutiert, eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu verstärken (38,39). Deshalb wurde untersucht, ob durch die Kovakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC und autoantigen-transformierten *S. typhimurium* die mangelnde Aktivierung von T-Helfer-Zellen überwunden werden kann.

5.1. Vakzinierung mit tumorpeptid- oder tumorlysatbeladenen dendritischen Zellen induziert eine Anti-Tumor-Immunantwort

Zunächst wurde die Immunogenität der tumorassoziierten Antigene (TAA) MAGE9 und G250 und der Effekt der kombinatorischen Vakzinierung mit dem Autoantigen GOLGA4 auf das Tumorstadium untersucht. Dazu wurden BALB/c-Mäuse mit DC vakzinieren, die entweder mit Peptiden des MAGE9-Antigens bzw. mit dem Tumorlysate von G250-exprimierenden Renca-Zellen beladen wurden. Die Mäuse erhielten mit der zweiten Injektion des Vakzins eine subkutane (s.c.) Injektion von 1×10^4 Renca-Zellen, die jeweils die TAA MAGE9 (Renca-MAGE9) und G250 (Renca-G250) exprimierten. Renca-Zellen exprimieren ebenso wie das humane Nierenzellkarzinom das Autoantigen GOLGA4 (Abbildung 7).

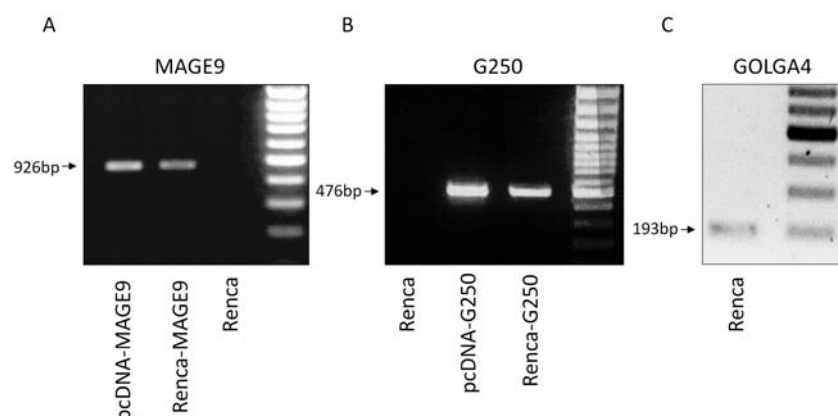


Abbildung 7: Expression der Antigene MAGE9, G250 und GOLGA4 in Renca-Zellen

Nachweis der Expression der Tumorantigene MAGE9 (A) und G250 (B) durch RT-PCR nach stabiler Transfektion von Renca-Zellen. (C) RT-PCR-Nachweis der Expression des Autoantigens GOLGA4 in Renca-Zellen.

Alle nicht-vakzinieren BALB/c-Mäuse entwickelten einen Tumor. Das Tumorstadium war deutlich verzögert oder wurde unterdrückt, wenn Mäuse mit tumorantigenbeladenen DC vakzinieren wurden. So entwickelte lediglich 1 von 8 Mäusen, die mit MAGE9-peptidbeladenen DC vakzinieren wurden, einen Tumor. Bei den Mäusen, die mit G250-lysatebeladenen DC vakzinieren wurden, entwickelten 2 von 8 Tieren einen Tumor. Die ausschließliche Vakzinieren mit Salmonellen (SL) zeigte keinen Einfluss auf das Renca-G250-Wachstum. Wurde jedoch mit Salmonellen kovakzinieren, die mit dem Autoantigen GOLGA4 transformieren waren (SL-GOLGA4), so blieben alle Tiere tumorfrei. Die Kovakzinieren mit Salmonellen, die nur den eukaryotischen Expressionvektor ohne das Autoantigen-Insert tragen (SL-empty), zeigte keinen signifikanten Unterschied zu dem Tumorstadium von Mäusen, die ausschließlich mit lysatebeladenen DC vakzinieren wurden (Abbildung 8, Tabelle 20).

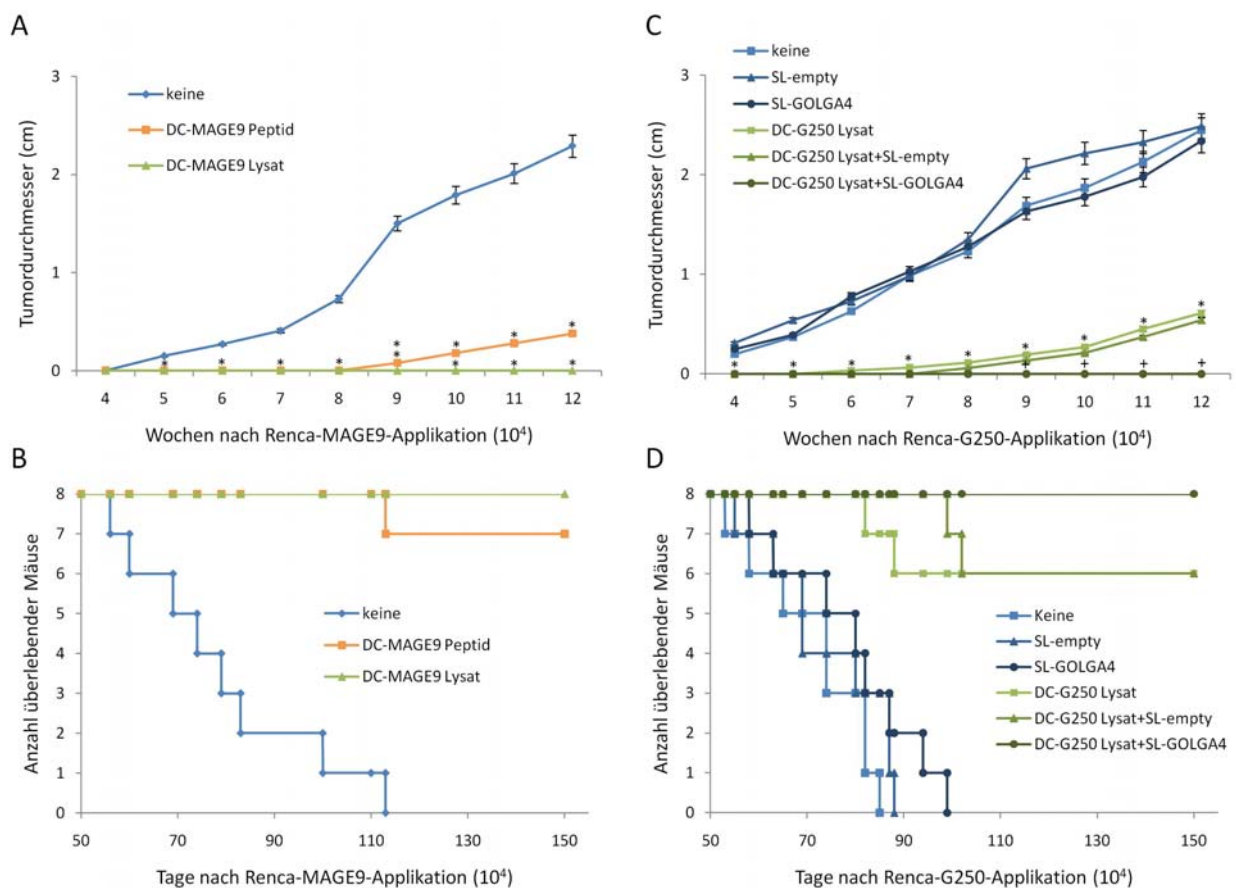


Abbildung 8: Inhibition des Tumorstadiums nach Vakzinieren mit TAA-beladenen DC

(A und B) BALB/c-Mäuse erhielten alle 10 Tage eine s.c. Injektion von MAGE9-peptid- oder Renca-MAGE9-lysatebeladenen DC. Nach der zweiten Injektion wurden 1×10^4 Renca-MAGE9-Zellen appliziert. (A) Durchschnittlicher Tumordurchmesser. (B) Überlebenszeit und Überlebensrate von 8 Mäusen pro Gruppe. (C und D) BALB/c-Mäuse erhielten alle 10 Tage s.c. Renca-G250-lysatebeladene DC und/oder eine orale Applikation (alle 14 Tage) von GOLGA4-transformierten Salmonellen (SL-GOLGA4) oder vektortransformierten Salmonellen (ohne *Insert*, SL-empty). Nach der

zweiten Vakzinierung wurden 1×10^4 Renca-G250-Zellen s.c. appliziert. (C) Durchschnittlicher Tumordurchmesser. (D) Überlebenszeit und Überlebensrate von 8 Mäusen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede in der Tumorstadiumsrate zwischen vakzinieren und nicht-vakzinieren Mäusen sind durch * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen DC- und DC+SL-vakzinieren Mäusen sind durch + gekennzeichnet. (p-Werte für Wachstums- und Überlebensrate siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Einfluss der Vakzinierung mit TAA beladenen DC auf das Tumorstadium und das Überleben

Tumor (1×10^6)	Vakzinierung	p-Wert (Tumorstadium)			p-Wert (Überleben)		
		nicht-vakzinieren	kovakzinieren	Peptid : Lysat	nicht-vakzinieren	kovakzinieren	Peptid : Lysat
Renca-MAGE9	keine						
	DC-MAGE9 Peptid	< 0,001			< 0,001		
	DC-MAGE9 Lysat	< 0,001		n.s.	< 0,001		n.s.
Renca-G250	keine						
	SL-empty	n.s.			n.s.		
	SL-GOLGA4	n.s.			n.s.		
	DC-G250 Lysat	< 0,001			< 0,001		
	DC-G250 Lysat + SL-empty	< 0,001	n.s.		< 0,001	n.s.	
	DC-G250 Lysat + SL-GOLGA4	< 0,001	0,008		< 0,001	n.s.	

Zusammenfassend bestätigten die Experimente die Immunogenität der Nierenzellkarzinom-assoziierten Antigene MAGE9 und G250. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass bei einer geringen Tumorzellapplikation von $2 \times TD_{100}$ (TD_{100} = kleinste Tumorzellzahl, die ein subkutanes Tumorstadium induziert) eine Inhibition des Tumorstadiums nach DC-Vakzinierung beobachtet werden konnte. Das Tumorstadium ließ sich durch Kovakzinierung mit dem Autoantigen GOLGA4 komplett unterdrücken.

In den folgenden Experimenten untersuchte ich die Immunantwort, die durch die Immunisierung gegen die Tumorstadiume G250 und MAGE9 mit peptid- und lysatbeladenen DC und die Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 induziert wurde.

5.2. Tumorstadiumantigenbeladene DC und Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 induzieren die Expansion antigenspezifischer T-Zellen

Eines der charakteristischen Merkmale einer Immunantwort ist die klonale Expansion von T-Zellen, die mit dem für sie spezifischen Antigen konfrontiert wurden. Zunächst wurde mit dem ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay die Proliferation von Lymphknotenzellen (LNC) aus naiven Mäusen

mit der von immunisierten Mäusen verglichen. Es zeigte sich eine gesteigerte Proliferation von Lymphknotenzellen, die aus immunisierten Mäusen isoliert wurden, im Vergleich zu naiven LNC, die *in vitro* mit beladenen DC stimuliert wurden. Durch *In-vitro*-Restimulation der LNC immunisierter Mäuse ließ sich die Proliferationsrate weiter steigern (Abbildung 9 A). Auch die Proliferation von Lymphknotenzellen und Milzzellen (SC) tumortragender Mäuse konnte durch Restimulation mit peptid- und lysatbeladenen DC *in vitro* gesteigert werden (Abbildung 9 B und C). Die stärkste proliferative Reaktion konnte in LNC und SC von Mäusen nach Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 detektiert werden.

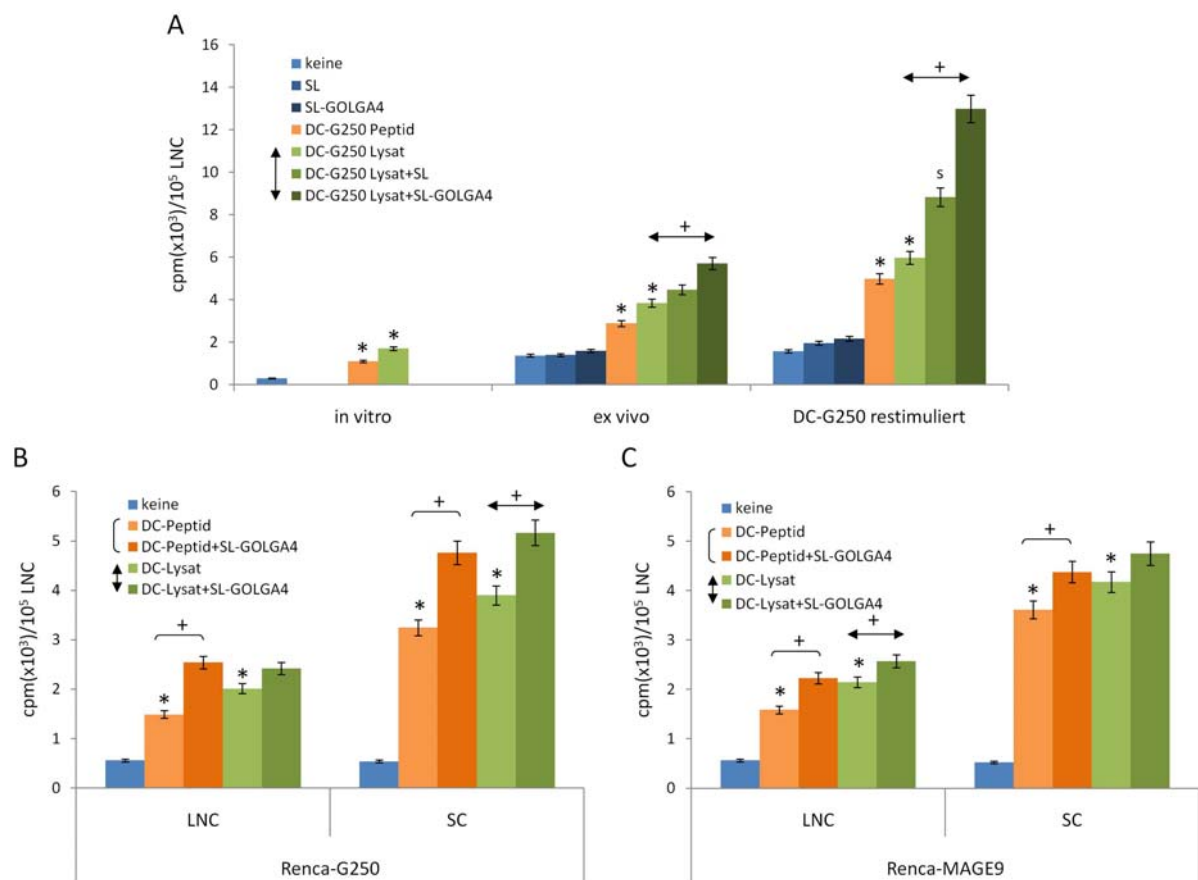


Abbildung 9: Expansion von T-Zellen nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen

BALB/c-Mäuse erhielten für die Vakzinierung alle 10 Tage s.c. TAA-beladene DC und/oder alle 14 Tage eine orale Applikation von Salmonellen. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-MAGE9- bzw. Renca-G250-Zellen. Die drainierenden LNC und SC wurden aus vakzinierter und nicht-vakzinierter Mäusen präpariert und die Proliferation durch ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen. (A) Proliferation von LNC aus naiven Mäusen nach *In-vitro*-Stimulation mit beladenen DC bzw. *Ex-vivo*-Proliferation von LNC vakzinierter Mäuse ohne/mit Restimulation. (B und C) Proliferation von LNC und SC nach *In-vitro*-Restimulation mit beladenen DC von vakzinierter Renca-G250-tragender Mäuse (B) und Renca-MAGE9-tragender Mäuse (C). Signifikante Unterschiede zwischen nicht-

vakzinieren und DC-vakzinieren Mäusen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Vakzinierung mit SL-GOLGA4 sind durch s gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 sind mit + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im CFSE-Verdünnungs-Assay zeigte, dass CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen gleichermaßen zur Proliferation angestoßen werden. Insbesondere wurde die Proliferation nach Vakzinierung mit peptidbeladenen dendritischen Zellen durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 gesteigert, wodurch sich die Zahl der proliferierenden T-Zellen nahezu verdoppeln ließ. Kein signifikanter Unterschied durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 wurde hingegen bei der Vakzinierung mit Tumorlysat festgestellt. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen von mit Lysat immunisierten Mäusen zeigten unabhängig von der Art der Vakzinierung eine erhöhte Proliferation (Abbildung 10).

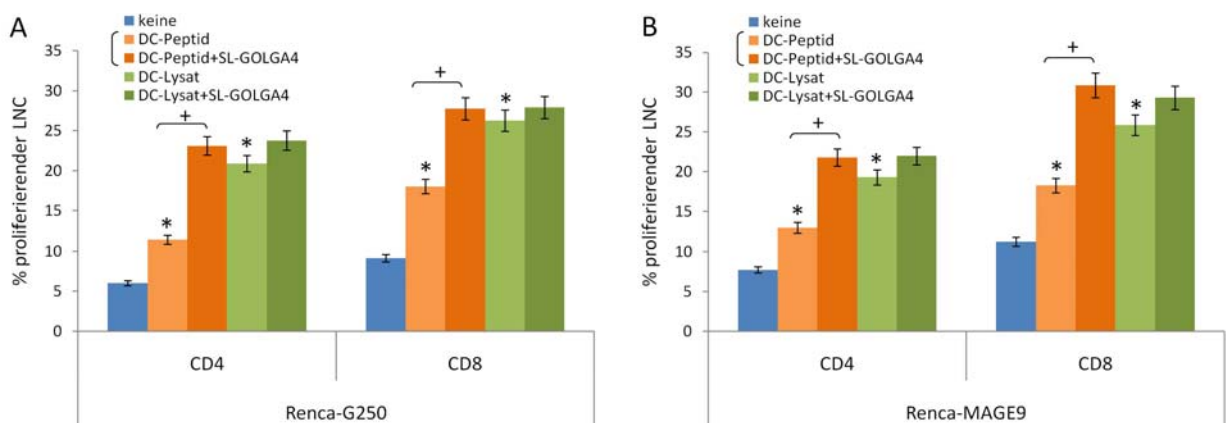


Abbildung 10: Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigentransformierten Salmonellen

LNC von vakzinieren tumortragenden BALB/c-Mäusen wurden mit CFSE markiert und *in vitro* mit beladenen DC restimuliert. 24 Stunden nach der Restimulation wurden die Zellen mit anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern markiert und die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinieren und DC-vakzinieren Mäusen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 sind mit + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Um die Antigen-spezifität der induzierten Expansion der T-Zellen genauer zu bestimmen, wurden die Lymphknotenzellen von DC-G250-peptidvakzinieren und kovakzinieren Mäusen isoliert, die zum einen den Renca-Tumor und zum anderen den Renca-G250-Tumor trugen. Die LNC wurden *in*

in vitro mit verschiedenen Antigen-Kombinationen konfrontiert, indem sie entweder mit unbeladenen DC, G250-peptidbeladenen DC, Renca-lysatbeladenen (GOLGA4⁺) DC oder Renca-G250-lysatbeladenen (G250⁺ und GOLGA4⁺) DC restimuliert wurden. Die Experimente zeigten, dass LNC aus Renca-tumortragenden Mäusen eine signifikante Steigerung der Proliferation lediglich nach Restimulation mit lysatbeladenen (RENCA und RENCA-G250-Lysat) DC aufwiesen. Lymphknotenzellen aus Renca-G250-tumortragenden Mäusen hingegen zeigten zusätzlich eine signifikante Steigerung der Proliferation nach Konfrontation mit dem G250-Antigen. Dabei war die Proliferation nach Restimulation mit Renca-G250-lysatbeladenen DC stärker als die nach Restimulation mit G250-peptidbeladenen DC (Abbildung 11 A).

Die antigenspezifische Reaktion auf das Autoantigen GOLGA4 wurde in einem entsprechenden Experiment untersucht. Dafür wurden Renca- und Renca-G250-tumortragende BALB/c-Mäuse, die mit GOLGA4-peptidbeladenen DC bzw. mit GOLGA4-transformierten Salmonellen immunisiert wurden, *in vitro* mit unbeladenen bzw. GOLGA4-peptidbeladenen DC restimuliert. Hier zeigte sich, dass LNC von Renca- und Renca-G250-tumortragenden Mäusen, die mit SL-GOLGA4 immunisiert wurden, viel stärker proliferierten als LNC, die mit G250-peptidbeladenen DC restimuliert wurden (Abbildung 11 B).

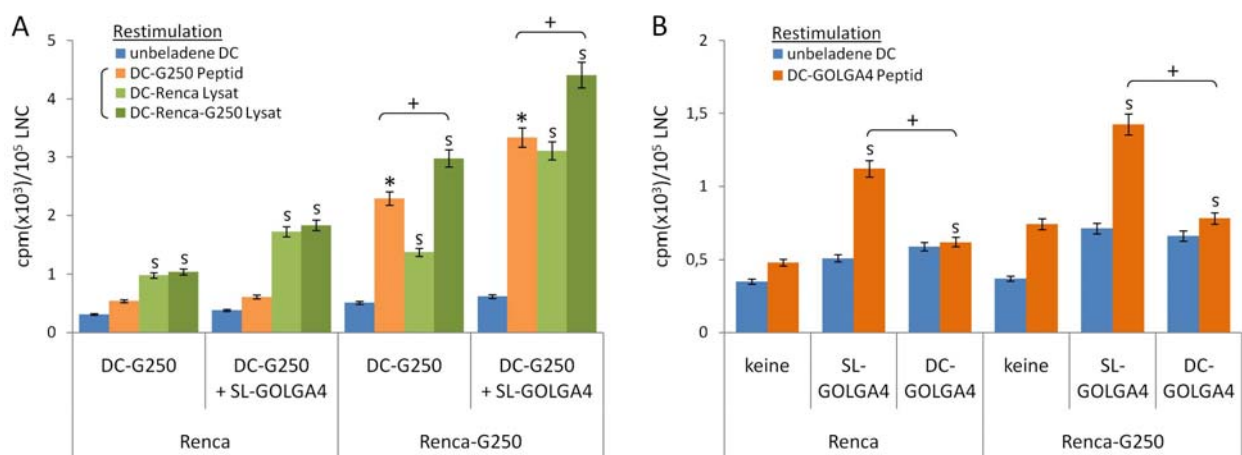


Abbildung 11: Antigen-spezifische Proliferation von LNC vakzinierter Mäuse nach Restimulation mit beladenen DC

(A) Drainierende LNC von Renca- und Renca-G250-tragenden BALB/c-Mäusen, vakzinierter mit G250-peptidbeladenen DC mit bzw. ohne Kovakzinierung mit SL-GOLGA4, wurden *in vitro* mit unbeladenen, G250-peptidbeladenen, Renca-lysatbeladenen oder Renca-G250-lysatbeladenen DC stimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Proliferation durch Bestimmung der ³H-Thymidin-Inkorporation gemessen. (B) ³H-Thymidin-Inkorporation von LNC aus Renca- und Renca-G250-tragenden Mäusen, die mit SL-GOLGA4-, GOLGA4-peptidbeladenen DC oder nicht vakzinierter wurden, sind *in vitro* mit unbeladenen DC bzw. GOLGA4-peptidbeladenen DC restimuliert worden. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinierter und DC-vakzinierter Mäusen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch

Vakzinierung mit SL-GOLGA4- oder GOLGA4-peptidbeladenen DC sind durch s gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung (A) bzw. zwischen SL-GOLGA4- und DC-GOLGA4-Peptid (B) sind mit + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Somit zeigten die Experimente zur Untersuchung der Expansion der T-Zellen eine antigenspezifische Induktion der T-Zell-Proliferation nach Vakzinierung mit tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen, die durch Kovakzinierung mit autoantigen-transformierten Zellen noch gesteigert werden konnte. Dabei war der synergistische Effekt der kombinatorischen Vakzinierung mit dem Autoantigen und peptidbeladenen DC deutlicher als im Falle der Kovakzinierung mit lysatbeladenen DC. Des Weiteren zeigte sich, dass die Kovakzinierung mit Salmonellen eine signifikant höhere Induktion der T-Zell-Proliferation induziert als die Kovakzinierung mit autoantigen-peptidbeladenen dendritischen Zellen.

5.3. Antigenspezifische CD8⁺-T-Zellen interagieren vorrangig mit peptid- und lysatbeladenen DC nach Kovakzinierung mit SL-GOLGA4

Der TRAP-Assay (*T cell recognition of antigen presenting cells by protein capture*) ist eine Methode, die auf dem Phänomen der Trogozytose basiert. Trogozytose beschreibt einen Vorgang, bei dem es im Falle einer Interaktion antigenspezifischer T-Zellen mit APC zum Austausch von Membranfragmenten und assoziierten Proteinen zwischen den T-Zellen und APC kommt. Durch den Nachweis der Trogozytose im TRAP-Assay können somit selektiv antigenspezifische Interaktionen von Lymphozyten detektiert, quantifiziert und charakterisiert werden (172,177).

Um in den ersten Versuchen die Immunantwort nach Vakzinierung hinsichtlich der antigenspezifischen Interaktion von T-Zellen mit peptid- bzw. tumorlysatbeladenen DC zu untersuchen, wurden LNC immunisierter Mäuse *in vitro* mit biotinylierten DC restimuliert. Es zeigte sich im Vergleich zur Restimulation mit unbeladenen DC, dass signifikant mehr biotinylierte CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit antigenbeladenen DC detektiert werden konnten. Ebenso wurden mehr biotinylierte T-Zellen nach Vakzinierung mit tumorlysatbeladenen DC detektiert als nach Vakzinierung mit peptidbeladenen DC. Die Anzahl der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die nach Trogozytose biotin-positiv waren, ließ sich durch wiederholte Vakzinierung mit G250-lysatbeladenen DC noch weiter erhöhen, wobei sich die Anzahl von CD8⁺-Biotin⁺-T-Zellen deutlicher als

die der $CD4^+$ -Biotin $^+$ -T-Zellen erhöhen ließ. In immunisierten tumorfreien Mäusen ließ sich durch die Kovakzinierung mit GOLGA4-transformierten Salmonellen keine signifikante Steigerung der Anzahl von $CD4^+$ -Biotin $^+$ -T-Zellen beobachten. Die Anzahl von $CD8^+$ -Biotin $^+$ -T-Zellen war hingegen in SL-GOLGA4-vakzinieren Mäusen leicht erhöht. Jedoch wurde auch nach Kovakzinierung mit nicht-transformierten Salmonellen (SL-empty) eine erhöhte Anzahl biotinylierter $CD8^+$ -T-Zellen detektiert (Abbildung 12).

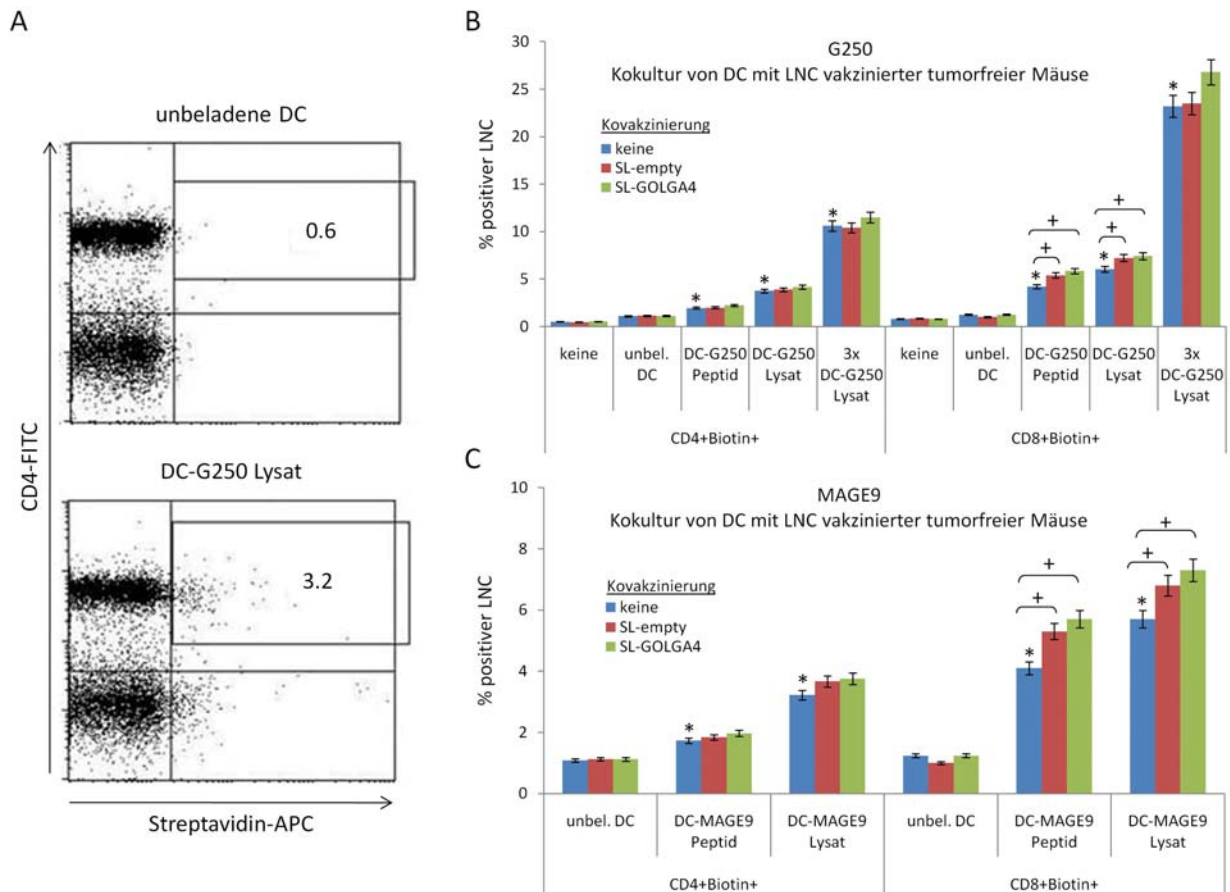


Abbildung 12: Antigen-spezifische Interaktion von beladenen DC mit T-Zellen aus vakzinieren tumorfreien Mäusen

TRAP-Analyse von LNC vakzinieren, tumorfreier BALB/c-Mäuse. LNC wurden *in vitro* mit biotinylierten DC für 2 Stunden kokultiviert und anschließend mit Streptavidin-APC, anti- $CD4$ -FITC- und anti- $CD8$ -FITC-Antikörpern gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil biotinylierter $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -Zellen bestimmt. (A) Beispielhafte Darstellung der Doppelfluoreszenzbestimmung von $CD4^+$ -Biotin $^+$ -T-Zellen. (B) TRAP-Analyse von G250-vakzinieren Mäusen. (C) TRAP-Analyse von MAGE9-vakzinieren Mäusen. Signifikante Steigerung des prozentualen Anteils biotinylierter T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (unbeladene DC) ist mit * gekennzeichnet. Signifikante Steigerung durch Kovakzinierung ist mit + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Ein anderes Bild der antigenspezifischen Interaktion der T-Zellen mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen zeigte sich nach *Ex-vivo*-Analyse von tumortragenden BALB/c-Mäusen. Dazu wurden vakzinieren, tumortragenden Mäusen biotinylierte antigenbeladene DC subkutan injiziert. 24 Stunden später wurde in drainierenden Lymphknoten mit dem TRAP-Assay die Anzahl der biotinylierten T-Zellen bestimmt. Die *Ex-vivo*-Analyse zeigte, dass signifikant mehr CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Vakzinierung mit peptid- bzw. tumorlysatbeladenen DC biotin-positiv waren. Darüber hinaus war im Vergleich zu nicht-tumortragenden Mäusen die Anzahl der biotinylierten T-Zellen nach Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 deutlich erhöht. Auch hier war der prozentuale Anteil der T-Zellen nach Vakzinierung mit lysatbeladenen DC (16,1% CD4⁺ und 24,1% CD8⁺) höher als der nach Vakzinierung mit peptidbeladenen DC (10,2% CD4⁺ und 17,3% CD8⁺). Jedoch ist dieser Unterschied zwischen peptid- und lysatvakzinieren Mäusen nach Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 nicht mehr nachweisbar (15,6%/16,3% CD4⁺ und 21,8%/28% CD8⁺) (Abbildung 13 A). Auch in der *Ex-vivo*-Analyse der Trogozytose von MAGE9- und G250-tumortragenden Mäusen zeigte sich, dass nach Vakzinierung mit tumorlysatbeladenen DC und Kovakzinierung mit Salmonellen, die Anzahl von CD8⁺-Biotin⁺-T-Zellen in den drainierenden LNC erhöht wurde. Eine zusätzliche Erhöhung der Anzahl von CD4⁺-Biotin⁺-T-Zellen zeigte sich hingegen nur durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 nicht aber nach Kovakzinierung mit nicht-transformierten Salmonellen (SL-*empty*) (Abbildung 13 B und C).

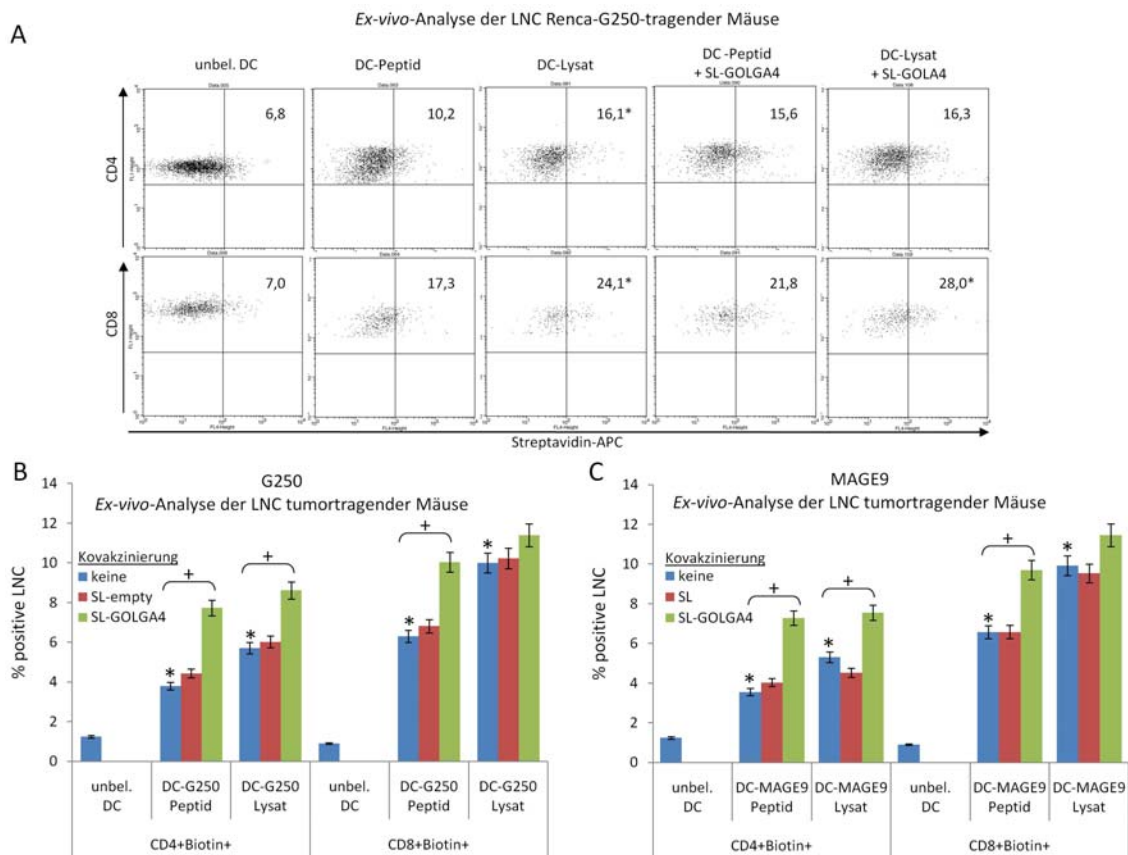


Abbildung 13: *Ex-vivo*-TRAP-Analyse tumorantigenspezifischer T-Zellen aus vakzinierter tumortragender Mäusen

BALB/c-Mäuse erhielten für die Vakzinierung alle 10 Tage s.c. TAA-beladene DC und/oder alle 14 Tage eine orale Applikation von Salmonellen. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-MAGE9- bzw. Renca-G250-Zellen. Zwei Wochen nach Tumorzellapplikation wurden biotinylierte DC s.c injiziert und 24 Stunden später die drainierenden LNC isoliert. LNC wurden mit Streptavidin-APC, anti-CD4-FITC- und anti-CD8-FITC-Antikörpern gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil biotinylierter CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen bestimmt. (A) Repräsentatives Beispiel der Doppelfluoreszenzbestimmung von CD4⁺Biotin⁺- bzw. CD8⁺Biotin⁺-T-Zellen aus drainierenden LNC vakzinierter Renca-G250-tragender BALB/c-Mäuse. (B) *Ex-vivo*-TRAP-Analyse aus drainierenden LNC vakzinierter Renca-G250-tragender BALB/c-Mäuse. (C) *Ex-vivo*-TRAP-Analyse aus drainierenden LNC vakzinierter Renca-MAGE9-tragender BALB/c-Mäuse. Signifikante Steigerung des prozentualen Anteils biotinylierter T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (unbeladene DC) ist mit * gekennzeichnet. Signifikante Steigerung durch Kovakzination ist mit + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Die Ergebnisse der TRAP-Analyse dokumentierten eine MAGE9- bzw. G250-spezifische Interaktion von T-Zellen mit antigenbeladenen dendritischen Zellen. Um die Immunantwort hinsichtlich der Spezifität der T-Zellen gegenüber dem Autoantigen GOLGA4 zu untersuchen, wurden LNC von Renca- (GOLGA4⁺) und Renca-G250- (GOLGA4⁺, G250⁺) tumortragenden Mäusen *in vitro* mit biotinylierten G250-peptid- bzw. GOLGA4-peptidbeladenen DC für die TRAP-Analyse kokultiviert.

Hierbei zeigte sich, dass T-Zellen aus Renca-tumortragenden Mäusen, die mit SL-GOLGA4 immunisiert wurden, erwartungsgemäß nur mit GOLGA4-peptidbeladenen DC interagieren, nicht aber mit G250-peptidbeladenen DC. T-Zellen aus G250-tumortragenden Mäusen interagieren mit G250-peptidbeladenen DC, wenn die Mäuse auch mit G250-peptidbeladenen DC vakziniert wurden und interagieren mit GOLGA4-peptidbeladenen DC, wenn die Mäuse mit SL-GOLGA4 vakziniert wurden. Insbesondere zeigt sich, dass die Anzahl von biotinylierten T-Zellen nach kombinatorischer Vakzinierung mit DC-G250 und SL-GOLGA4 gegenüber der ausschließlichen Vakzinierung mit DC-G250 signifikant erhöht war (Abbildung 14).

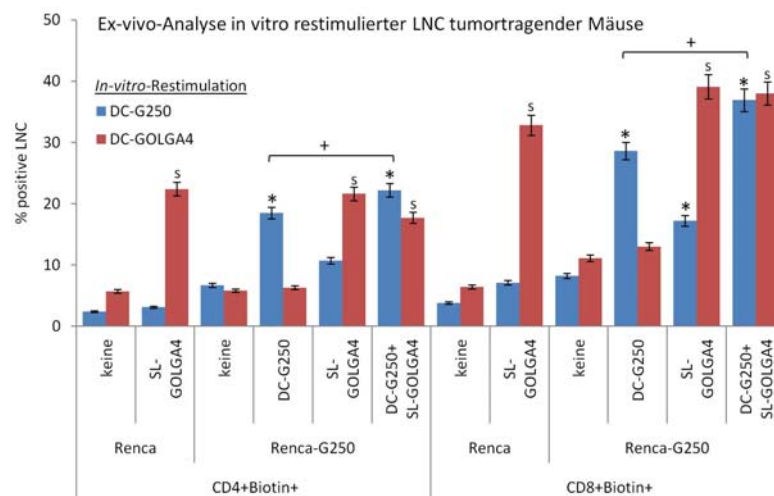


Abbildung 14: TRAP-Analyse von autoantigenspezifischen T-Zellen aus vakzinieren tumortragenden Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden mit G250-peptidbeladenen DC und/oder SL-GOLGA4 vakziniert. Zwei Wochen nach Renca- bzw. Renca-G250-Tumorapplikation wurden drainierende LNC *in vitro* mit biotinylierten DC (DC-G250-Peptid bzw. DC-GOLGA4-Peptid) für 2 Stunden kokultiviert. LNC wurden mit Streptavidin-APC, anti-CD4-FITC- und anti-CD8-FITC-Antikörpern gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil biotinylierter CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen bestimmt. Signifikante Steigerung des prozentualen Anteils biotinylierter T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (LNC nicht-vakzinierter Mäuse) ist mit * (G250-spezifisch) bzw. mit s (GOLGA4-spezifisch) gekennzeichnet. Signifikante Steigerung durch Kovakzinierung ist mit + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Mit dem TRAP-Assay konnte die antigenspezifische Interaktion von T-Zellen nach Vakzinierung mit peptid- und tumorlysatbeladenen DC nachgewiesen werden. Die Kovakzinierung mit autoantigen-transformierten Salmonellen erhöhte insbesondere im tumortragenden Tier die Anzahl von CD8⁺-T-Zellen, die spezifisch auf das Tumorantigen sowie das Autoantigen reagieren.

5.4. T-Zellaktivierung nach Tumorantigen- und Autoantigen-Kovakzinierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Vakzinierung die Expansion von antigenspezifischen T-Zellen induziert, wurde in folgenden Experimenten der Aktivierungstatus von T-Zellen sowie die Expression von Zytokinen in immunisierten Mäusen untersucht. Dazu wurden aus tumortragenden Tieren die drainierenden Lymphknoten isoliert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression relevanter Oberflächenmoleküle und Zytokine bestimmt. Die Abbildung 15 zeigt, dass der prozentuale Anteil von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in vakzinierten Mäusen leicht erhöht war. Zudem zeigte sich eine erhöhte Expression der mit der Lymphozytenaktivierung assoziierten Moleküle CD69 und CD154 in vakzinierten Mäusen. Die Expression von CD154 wurde durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 gesteigert. Gleichermäßen war der Anteil von CD40-exprimierenden Zellen (CD154-Rezeptor) in vakzinierten Mäusen erhöht. Dessen Expression war in peptidvakzinierten Mäusen stärker erhöht als in DC-lysatvakzinierten Tieren und konnte durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 noch weiter gesteigert werden. Die Analyse der Expression von Molekülen, die einen inhibierenden Einfluss auf die Immunantwort haben, zeigte, dass CD152 und dessen bevorzugter Ligand CD80 nach Vakzinierung mit lysatbeladenen DC, nicht aber durch Vakzinierung mit peptidbeladenen DC signifikant erhöht wurde (Abbildung 15).

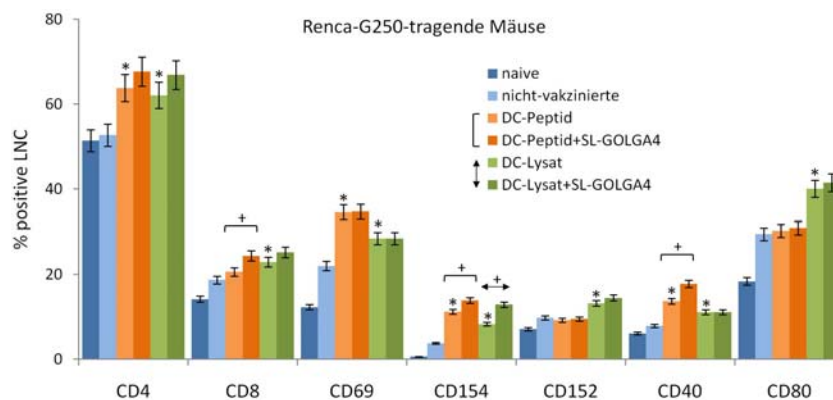


Abbildung 15: Aktivierung von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen

BALB/c-Mäuse wurden mit G250-peptidbeladenen DC bzw. mit SL-GOLGA4 kovakziniert. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-G250-Zellen. Drei Wochen nach Tumorzellapplikation wurden die drainierenden LNC isoliert und mit Antikörpern für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Aktivierungsmarkern markiert. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinierten und DC-vakzinierten LNC sind durch * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung sind durch + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

5.5. Einfluss der Vakzinierung auf die Expression von immunregulatorischen Zytokinen

Die Qualität der Immunantwort zeichnet sich nicht nur durch die antigenspezifische Interaktion, die Proliferation und die Aktivierung von T-Zellen aus, sondern wird auch maßgeblich von der Expression und Sekretion von Zytokinen bestimmt. Insbesondere Interferon-Gamma (IFN- γ) ist ein immunstimulatorisches Zytokin, das im adaptiven Immunsystem vor allem von CD4⁺- und CD8⁺-Effektor-T-Zellen produziert wird. Untersucht wurde deshalb der Einfluss von DC und Salmonellen auf die Expression von IFN- γ in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aus drainierenden LNC vakzinierter G250- bzw. MAGE9-tumortragenden Mäusen. Es stellte sich heraus, dass IFN- γ vornehmlich in peptidvakzinieren Tieren von CD4⁺-T-Zellen exprimiert und durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 signifikant gesteigert wurde. In CD8⁺-T-Zellen jedoch wurde sowohl durch SL als auch durch SL-GOLGA4 die Expression von IFN- γ gesteigert (Abbildung 16 A und B). Neben der Expression von IFN- γ wird vor allem auch IL-12, das von antigenpräsentierenden Zellen nach Antigenstimulation gebildet wird, in peptid- und lysatvakzinieren Mäusen exprimiert. Peptid- und Lysatvakzinierung hatten auf die Expression der immunregulatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 keinen nennenswerten Einfluss, deren Expression jedoch durch Kovakzinierung mit Salmonellen (SL und SL-GOLGA4) gesteigert wurde (Abbildung 16 C).

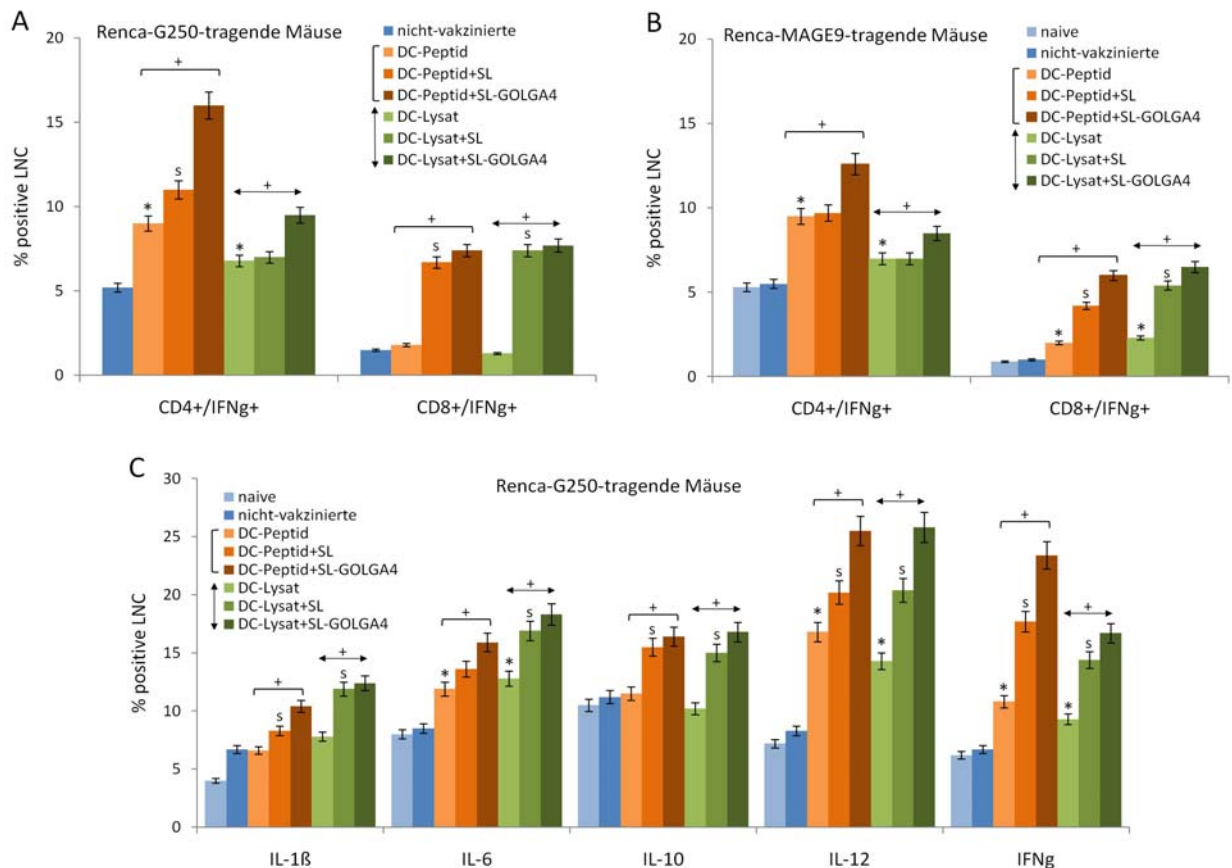


Abbildung 16: Expression von Zytokinen nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen

BALB/c-Mäuse wurden mit TAA-beladenen DC bzw. mit Salmonellen kovakzinieren. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-G250- bzw. Renca-MAGE9-Zellen. Drei Wochen nach Tumorzellapplikation wurden die drainierenden LNC isoliert und mit Antikörpern für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Zytokinen markiert. (A und B) Prozentualer Anteil IFN- γ -exprimierender CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen in Renca-G250- (A) und Renca-MAGE9- (B) tragenden Mäusen. (C) Expression von Zytokinen in LNC aus Renca-G250-tragenden Mäusen. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinierter und DC-vakzinierter LNC sind durch * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL sind mit s gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 sind durch + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass peptid- und lysatbeladene dendritische Zellen die Aktivierung von T-Zellen induzieren. Die Expression der mit der Aktivierung von T-Zellen assoziierten Oberflächenmarker und die Expression von Zytokinen wurden vor allem in DC-peptidvakzinierter Mäusen durch Kovakzinierung mit autoantigen-transformierten Salmonellen gesteigert. Dabei wurde die Aktivierung von T_H-Zellen (CD4⁺) durch SL-GOLGA4, nicht aber durch

Vakzinierung mit Salmonellen (*SL-empty*), erhöht. Hingegen wurden CD8⁺-T-Zellen sowohl durch SL- als auch SL-GOLGA4-Vakzinierung verstärkt aktiviert.

5.6. Einfluss der Vakzinierung auf die Induktion und Rekrutierung von T_{reg}-Zellen und MDSC

Die Zytokine IL-1 β und IL-10 üben einen regulatorischen Einfluss aus, indem sie inhibierend auf die Immunantwort wirken. So werden durch diese Zytokine regulatorische Zellen wie MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*) stimuliert und die Entstehung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}-Zellen) gefördert, die einer Immunreaktion entgegenwirken. Deshalb wurde auch das Blutserum vakzinierter tumortragender Mäuse auf den Gehalt von IL-1 β und IL-10 untersucht. Kein Anstieg des Serumgehalts von IL-1 β und IL-10 konnte in mit G250-peptidbeladenen DC vakzinieren Mäusen beobachtet werden. Ein leichter Anstieg des Serumlevels beider Zytokine konnte jedoch in Mäusen beobachtet werden, die mit Salmonellen (SL und SL-GOLGA4) vakziniert wurden (Abbildung 17 A).

Trotz der offensichtlich erhöhten Expression von IL-1 β und IL-10 in LNC und des Anstiegs im Blutserum sowie der leicht erhöhten Expression von CD152 in LNC konnte kein signifikanter Unterschied in der Zahl von T_{reg}-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) in LNC vakzinierter tumortragender Mäuse festgestellt werden. Jedoch wurde in MAGE9- sowie G250-tumortragenden Mäusen, die mit autoantigen-transformierten Salmonellen kovakziniert wurden, ein leichter Anstieg von MDSCs (CD11b⁺Gr-1⁺) in der Milz (SC) beobachtet (Abbildung 17 B-E).

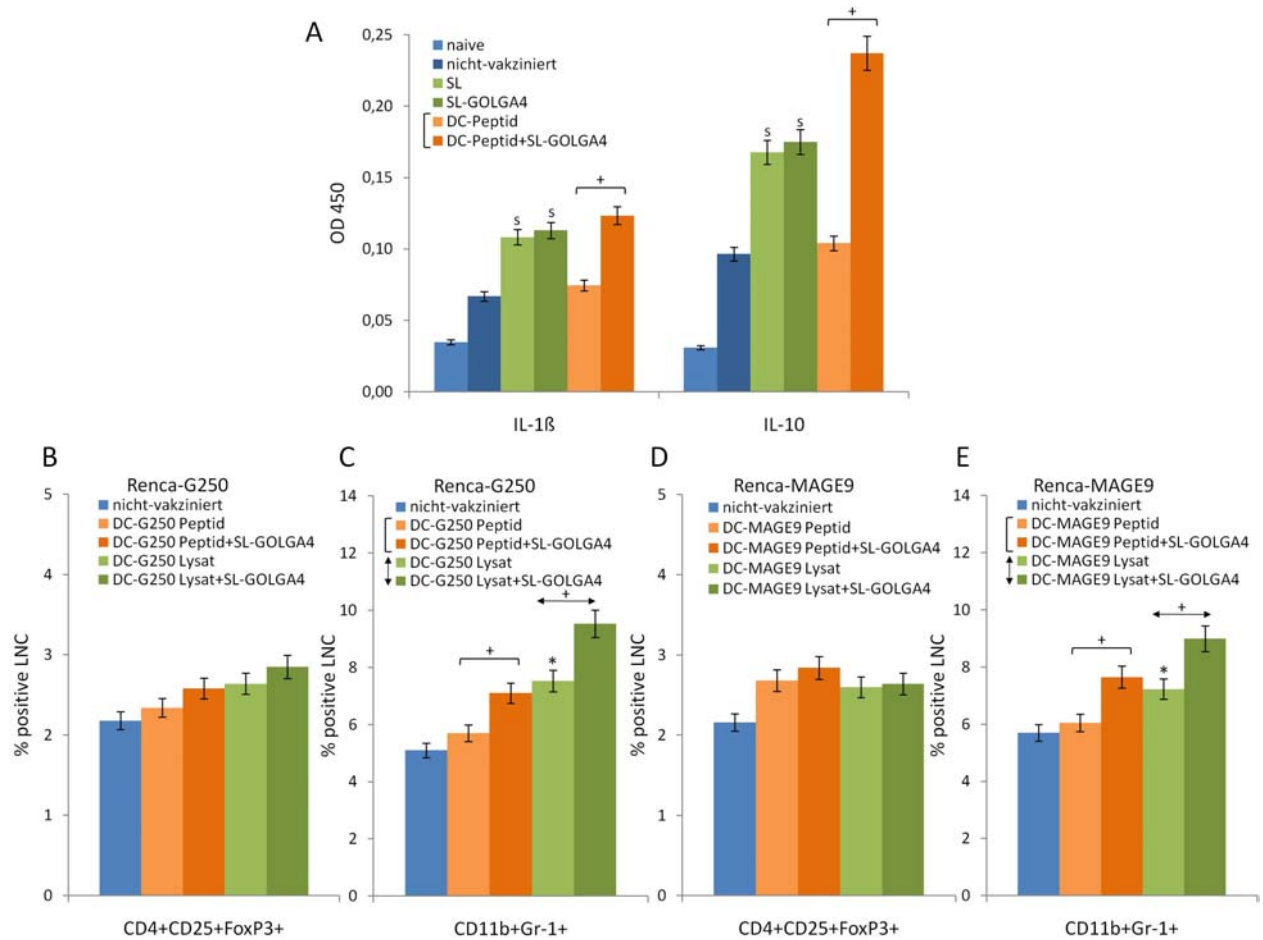


Abbildung 17: Einfluss einer Vakzinierung mit Tumor- und Autoantigen auf die Expression immunregulatorischer Zytokine und Zellen

BALB/c-Mäuse wurden mit G250-peptidbeladenen DC bzw. mit SL-GOLGA4 kovakzinieren. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-G250-Zellen. Drei Wochen nach Tumorapplikation wurde den Mäusen Blut abgenommen und drainierende LNC isoliert. (A) ELISA-Bestimmung des Serumgehalts von IL-10 und IL-1 β . (B) Prozentualer Anteil von CD4⁺CD25⁺T_{reg}-Zellen in drainierenden LNC Renca-G250-tragender Mäuse. (C) Prozentualer Anteil von MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) in der Milz von Renca-G250-tragenden Mäusen. (D+E) Prozentualer Anteil von T_{reg}-Zellen (D) und MDSC (E) in Renca-MAGE9-tragenden Mäusen. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinieren und DC-vakzinieren LNC bzw. SL sind durch * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Vakzinierung mit SL und SL-GOLGA4 sind mit s gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 sind durch + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Auch die immunhistologische Untersuchung der Renca-G250-Tumore zeigte, dass T_{reg}-Zellen (CD25⁺) nur sehr vereinzelt im Tumorgewebe zu detektieren waren. Die meisten davon wurden in Tumoren kovakzinierter Mäuse nachgewiesen. CD11b- und Gr-1-positive Zellen waren kaum im Tumorgewebe von nicht-vakzinieren und peptidvakzinieren Mäusen zu finden. Ein leichter

Anstieg von CD11b⁺- und Gr-1⁺-Zellen wurde jedoch in lysatvakzinieren Mäusen (DC-G250-Lysat und DC-G250-Lysat+SL-GOLGA4) nachgewiesen (Abbildung 18).

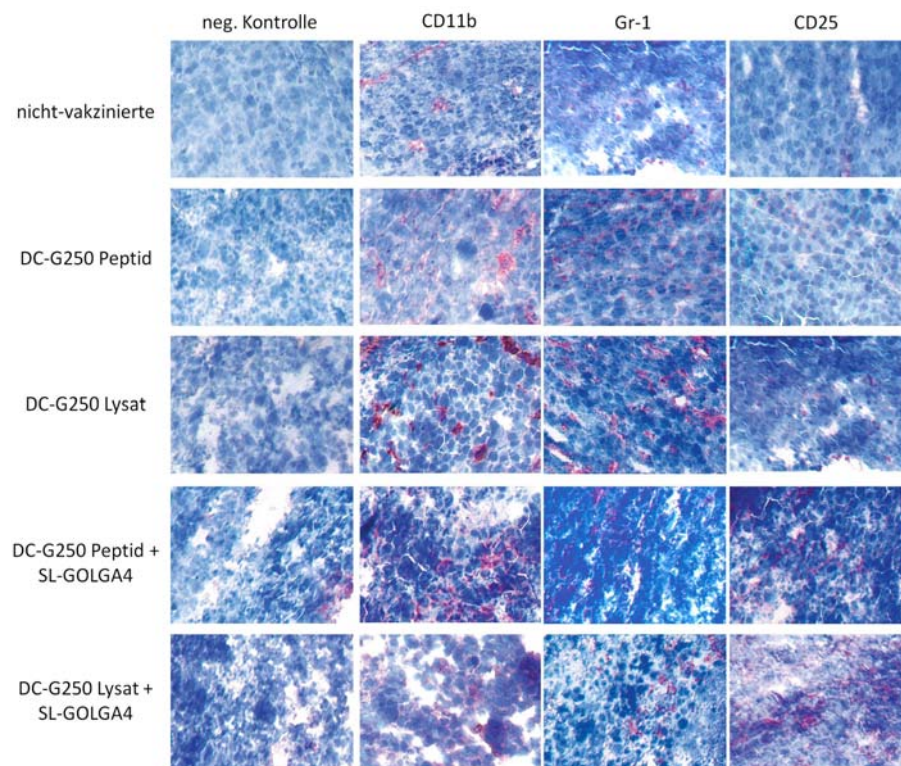


Abbildung 18: Rekrutierung immunregulatorischer Zellen in den Tumor

Immunhistologische Färbung von Renca-G250-Tumoren aus vakzinieren BALB/c-Mäusen. 5µm dicke Schnitte von schockgefrorenen Tumoren wurden mit anti-CD11b-, anti-Gr-1-, anti-CD25- oder Kontroll-IgG-Antikörpern gefärbt (rot). Zellkernstrukturen wurden mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt (blau) (Vergrößerung 200x).

So wurden durch die Vakzinierung, obwohl eine erhöhte Expression und Sekretion der immunregulatorischen Zytokine IL-1 β und IL-10 sowie eine erhöhte Expression von CD152 in SL- und SL-GOLGA4-vakzinieren Mäusen dies vermuten ließ, keine immunregulatorischen T_{reg}-Zellen induziert. Die Anzahl von immunsupprimierenden MDSC war in der Milz von lysatvakzinieren Mäusen etwas erhöht, im Tumorgewebe jedoch nur vereinzelt auszumachen.

5.7. Verstärkte Aktivität zytotoxischer T-Effektorzellen nach Tumorantigen- und Autoantigen-Kovakzinierung

Die bisherigen Experimente belegen die Induktion einer tumorantigenspezifischen T-Zell-Immunität, die durch Kovakzinierung mit dem Autoantigen GOLGA4 verstärkt wurde. In den folgenden Experimenten wurde das Effektorpotential der T-Zellen näher untersucht. Im IFN- γ -ELISPOT-Assay wurde dazu die IFN- γ -Sekretion von LNC nach *In-vitro*-Stimulation nachgewiesen. Die *Ex-vivo*-Analyse der LNC von tumortragenden und tumorfreien Mäusen zeigte eine leicht erhöhte Sekretion von IFN- γ nach Restimulation mit lysatbeladenen DC im Vergleich zur Restimulation mit peptidbeladenen DC. In beiden Fällen war die Sekretion von IFN- γ von LNC aus kovakzinieren Mäusen signifikant gesteigert (Abbildung 19 A und D).

Die gesteigerte Sekretion von IFN- γ geht einher mit dem gesteigerten zytolytischen Potential der LNC vakzinierter Mäuse. LNC aus gegen MAGE9- und G250-vakzinieren Mäusen zeigten eine verstärkte zytotoxische Aktivität gegen antigenexprimierende Tumorzellen (Renca-G250 und Renca-MAGE9), die durch Kovakzinierung mit dem Autoantigen gesteigert war. Dabei war kein merklicher Unterschied zwischen Peptid- und Lysat-Vakzinierung zu beobachten (Abbildung 19 B und E). Da in G250-vakzinieren Mäusen auch eine leicht gesteigerte zytotoxische Aktivität gegen die nicht-tumorantigenexprimierenden Renca-Zellen und gegen syngene BALB/c-Blasten beobachtet wurde, wurde die Antigenpezifität sowie die Abhängigkeit von der Aktivität natürlicher Killerzellen (NK) untersucht. Außer bei nicht-vakzinieren Mäusen konnte die zytotoxische Aktivität sehr deutlich durch Antikörper gegen zytotoxische T-Zellen (anti-CD8) und MHC-Klasse-I (anti-H-2K^d) reduziert werden, wodurch die Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen demonstriert wurde (Abbildung 19 C und F).

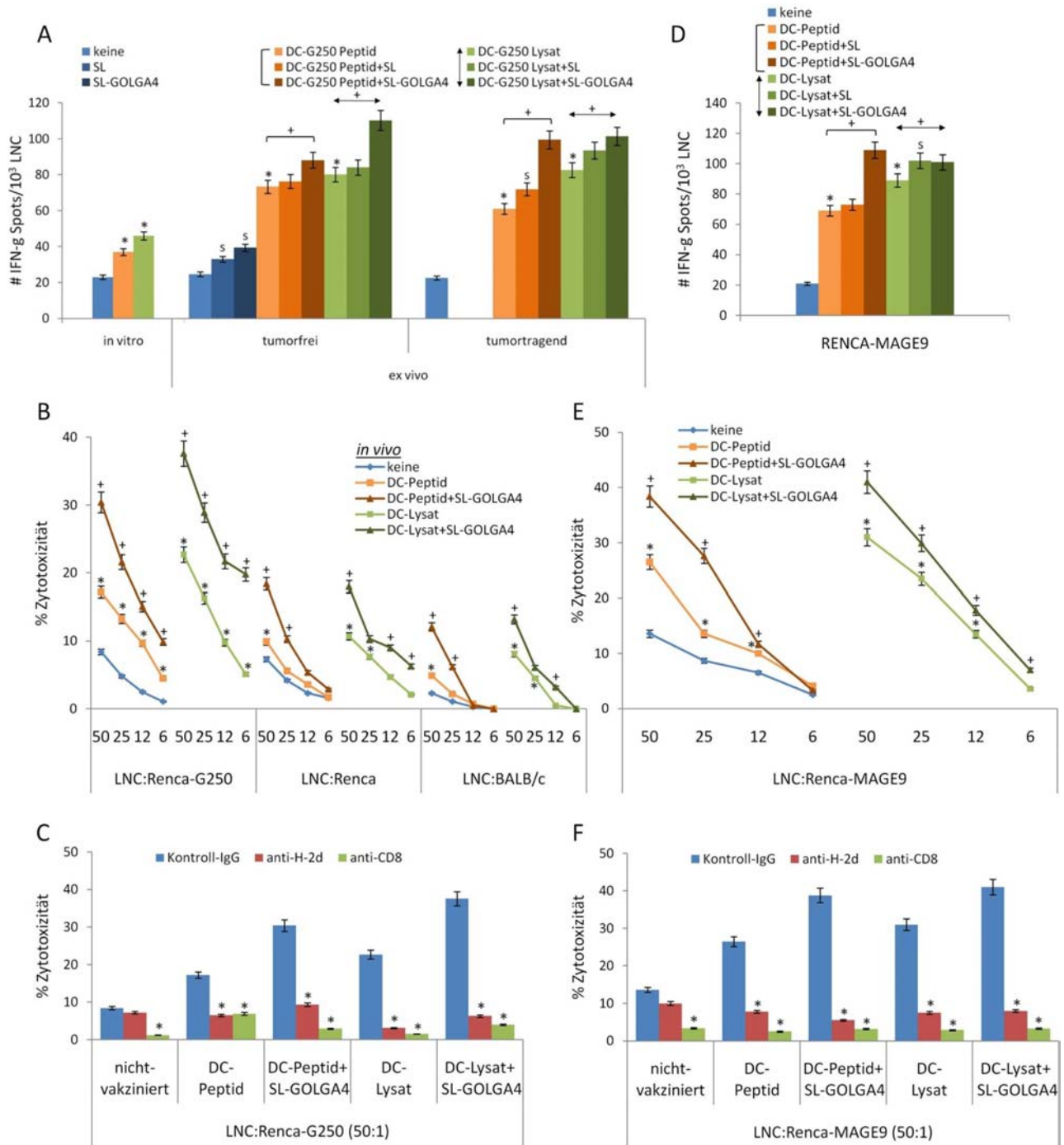


Abbildung 19: Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und IFN- γ -Sekretion nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen

(A) ELISPOT-Assay für die Bestimmung der Anzahl von IFN- γ -sezernierenden Zellen in LNC aus naiven Mäusen, die *in vitro* mit G250-peptid- oder Renca-G250-lysatbeladenen DC stimuliert wurden, bzw. in LNC aus tumorfreien und tumortragenden vakzinieren Mäusen, die *ex vivo* mit beladenen DC restimuliert wurden. (B) Zytotoxizität von LNC aus naiven, nicht-vakzinieren und vakzinieren tumortragenden Mäusen, die *in vitro* mit entsprechenden DC restimuliert und 5 Tage in Kultur mit IL-2 supplementiertem Medium gehalten wurden. Die Zellen wurden gezählt und im genannten Verhältnis auf ^3H -Thymidin-markierte Zielzellen ausgesät. (C und F) LNC wurden wie oben beschrieben restimuliert und im Verhältnis 1:50 auf ^3H -Thymidin-markierte Renca-G250-Zellen (C) bzw. Renca-MAGE9-Zellen (F)

ausgesät. Der Kokultur wurden 10µg/ml anti-H-2K^d, anti-CD8- und Kontroll-IgG-Antikörper zugegeben. (D) Anzahl von IFN-γ-sezernierenden Zellen in LNC aus Renca-MAGE9-tragenden Mäusen, die *in vitro* mit peptid- oder lysatbeladenen DC stimuliert wurden. (E) Zytotoxizität von LNC aus MAGE9-vakzinierten Mäusen gegen ³H-Thymidin-markierte Renca-MAGE9-Zellen. (A,B,D,E) Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinierten und DC-vakzinierten T-Zellen sind durch * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Vakzinierung mit SL sind mit s gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 sind durch + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt. (C, F) Signifikante Inhibition der Zytotoxizität durch die Antikörper ist mit * gekennzeichnet.

Das wenngleich gering gesteigerte Potential von Effektor-T-Zellen, nach Kovakzinierung mit GOLGA4-transformierten Salmonellen auch nicht-tumorantigenexprimierende Renca-Zellen zu lysieren, ließ auf eine antigenspezifische Reaktion auf das Autoantigen schließen. Um dies im Zytotoxizitäts-Assay zu kontrollieren, wurden durch RNS-Interferenz Renca-GOLGA4-*knock-down*-Zellen erzeugt (Abbildung 20 A). LNC von SL-GOLGA4-vakzinierten Mäusen wurden dazu *in vitro* mit GOLGA4-peptidbeladenen DC restimuliert. Gleichmaßen wurden LNC von SL-GOLGA4- und DC-G250-peptidvakzinierten Mäusen mit GOLGA4+G250-peptidbeladenen DC restimuliert. Der Zytotoxizitäts-Assay zeigte, dass unabhängig von der Art der Vakzinierung Renca-GOLGA4^{kd}-Zellen kaum lysiert wurden (Abbildung 20 B). Dieselben Effektorzellen waren jedoch in der Lage, Renca-G250-Zellen zu lysieren, und die zytotoxische Aktivität der LNC aus SL-GOLGA4-vakzinierten Mäusen gegenüber Renca-G250-GOLGA4^{kd}-Zellen war signifikant reduziert (Abbildung 20 C).

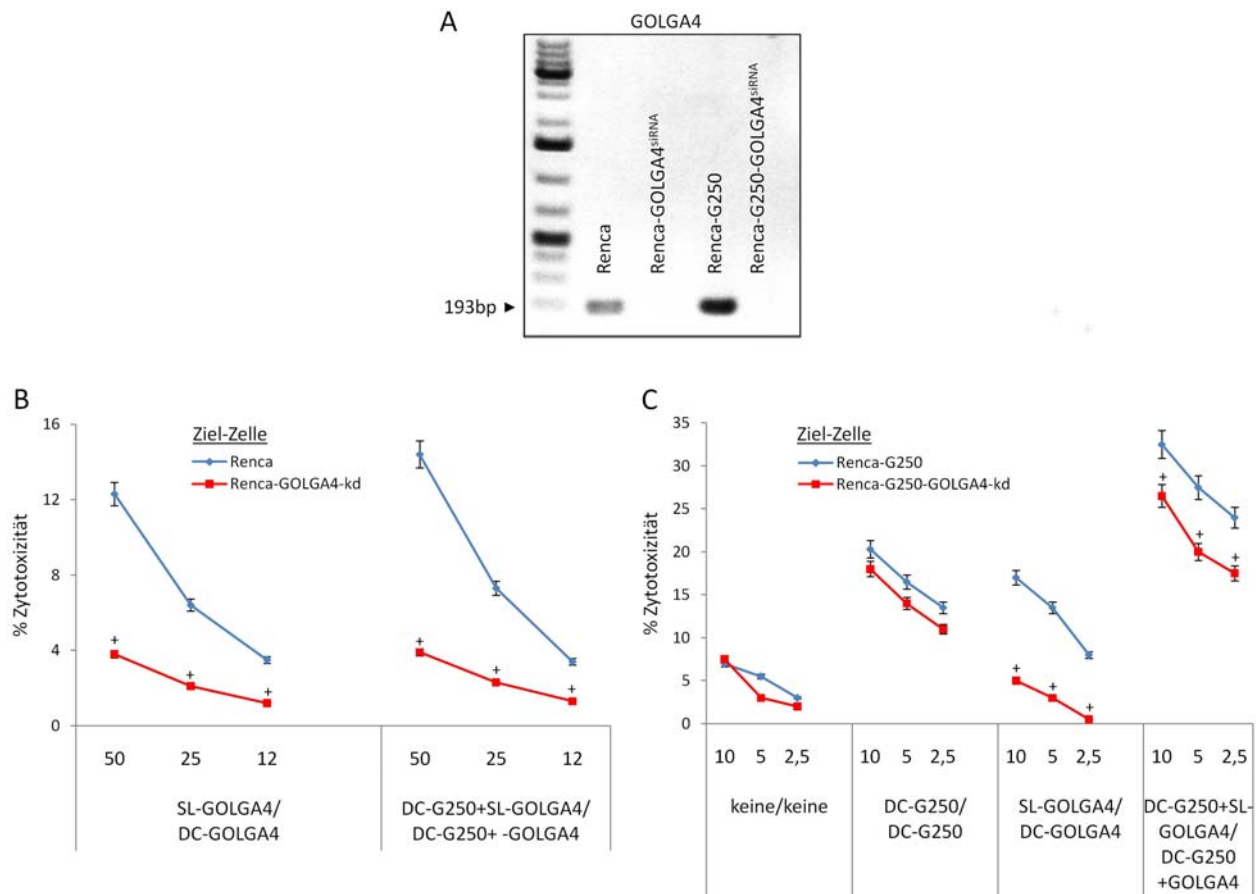


Abbildung 20: Aktivierung autoantigenspezifischer CTL durch Vakzinierung mit SL-GOLGA4

(A) Drainierende LNC aus Renca-G250-tragenden Mäusen, die mit SL-GOLGA4- bzw. DC-G250-Peptid plus SL-GOLGA4 vakziniert wurden, wurden *in vitro* mit G250-peptid- bzw. G250+GOLGA4-peptidbeladenen DC restimuliert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen gezählt und im genannten Verhältnis auf ³H-Thymidin-markierte Renca- bzw. Renca-GOLGA4^{kd}-Zielzellen ausgesät. (B) Drainierende LNC aus vakzinierten Renca-G250-tragenden Mäusen sind *in vitro* mit G250-peptid-, GOLGA4-peptid- bzw. G250+GOLGA4-peptidbeladenen DC restimuliert worden. Nach 5 Tagen wurden die Zellen gezählt und im genannten Verhältnis auf ³H-Thymidin-markierte Renca-G250- bzw. Renca-G250-GOLGA4^{kd}-Zielzellen ausgesät. (C) Nachweis des siRNA-induzierten GOLGA4-*knock-down* in Renca- und Renca-G250-Zellen durch RT-PCR. Signifikante Reduktion der zytotoxischen Aktivität gegen Renca-GOLGA4^{kd}- bzw. Renca-G250-GOLGA4^{kd}-Zielzellen sind mit + gekennzeichnet.

Die Experimente zur Untersuchung des zytotoxischen Potentials von Effektor-T-Zellen zeigten somit eine gegen die Tumorantigene G250 und MAGE9 gerichtete Anti-Tumor-Immunantwort, die durch kombinatorische Vakzinierung mit dem Autoantigen gestärkt wurde. Zudem führte die Kovakzinierung mit GOLGA4-transformierten Salmonellen zur Induktion und Aktivierung autoantigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen.

5.8. Tumorantigen- und autoantigenspezifische T-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe

Eine Voraussetzung für eine effektive Tumorabstoßung ist, dass Effektorzellen den Tumor erreichen. Die immunhistologische Untersuchung von vakzinierten Renca-G250-tragenden Mäusen zeigte eine starke Infiltration des Tumorgewebes mit CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Vakzinierung mit dendritischen Zellen. Die Rekrutierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) war in Tumoren kovakzinierter Mäuse noch verstärkt, wobei die Akkumulation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen um vereinzelte Tumorzellen in der aufgelösten Gewebsstruktur auffällig war (Abbildung 21 A). Darüber hinaus zeigte die TRAP-Analyse aus dem Tumor isolierter TIL die Präsenz von G250-spezifischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten im Tumorgewebe von DC-G250-peptid-vakzinierten Tieren. Der prozentuale Anteil G250- und GOLGA4-spezifischer TIL war in kovakzinierten Mäusen signifikant erhöht. Die Immunogenität des Autoantigens GOLGA4 verdeutlichte sich nicht nur dadurch, dass in SL-GOLGA4-vakzinierten Mäusen ein erheblicher Anteil von autoantigenspezifischen TIL detektiert wurde, sondern auch dadurch, dass in nicht-vakzinierten Mäusen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen Biotin durch Trogozytose von GOLGA4-peptid-beladenen DC aufnahmen (Abbildung 21 B).

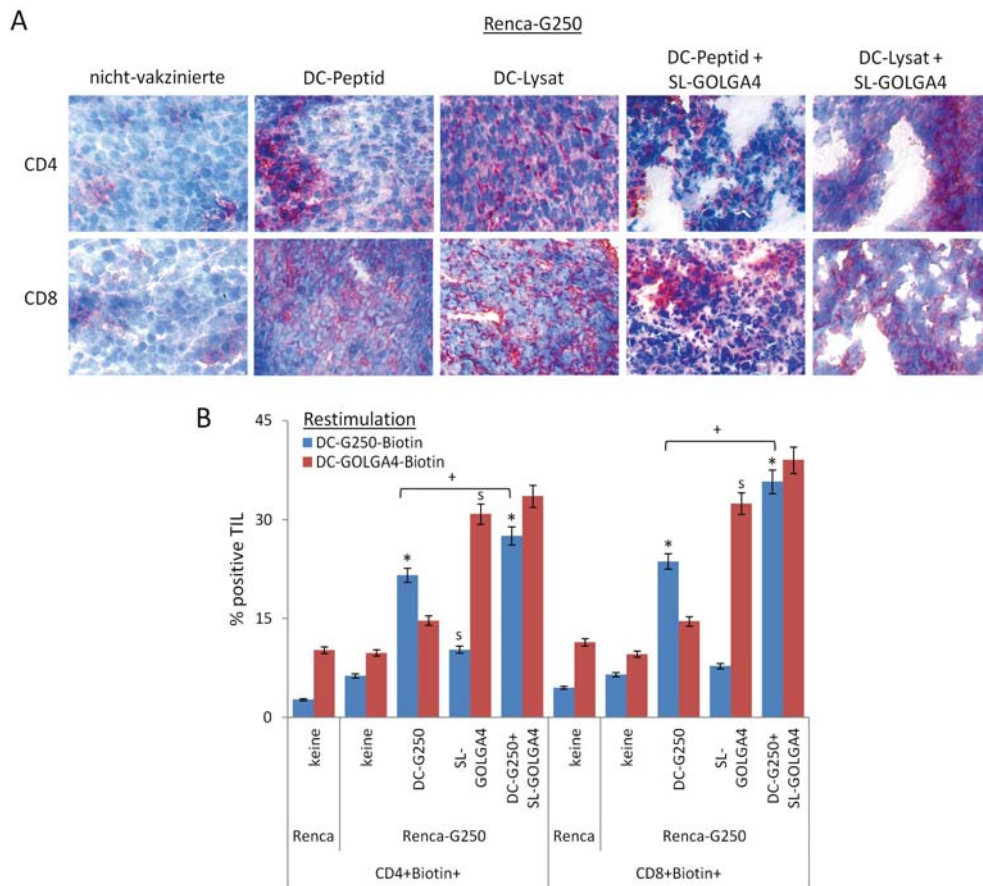


Abbildung 21: Rekrutierung von antigenspezifischen T-Zellen in den Tumor von vakzinierter Mäusen

(A) Immunhistologische Färbung von Renca-G250-Tumoren aus vakzinierter BALB/c-Mäusen. 5µm dicke Schnitte von schockgefrorenen Tumoren wurden mit anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern gefärbt (rot). Zellkernstrukturen wurden mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt (blau) (Vergrößerung 200x). (B) Isolierte TIL von nicht-vakzinierter Renca- und von vakzinierter Renca-G250-tragender Mäusen wurden *in vitro* mit biotinylierten G250- oder GOLGA4-peptidbeladenen DC für 2 Stunden kokultiviert. Für die TRAP-Analyse wurden die Zellen mit Streptavidin-APC und anti-CD4-FITC- bzw. anti-CD8-FITC-Antikörpern markiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil doppelt-positiver CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinierter und DC-vakzinierter TIL sind durch * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Vakzinierung mit SL-GOLGA4 sind mit s gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 sind durch + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Der hohe Anteil von antigenspezifischen TIL in Tumoren vakzinierter Tiere ließ vermuten, dass durch die Vakzinierung auch die Expression von Chemokin-Rezeptoren, die bei der Rekrutierung von Lymphozyten eine Rolle spielen, beeinflusst wird. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Chemokin-Rezeptoren in den drainierenden LNC zeigte eine erhöhte Expression der Rezeptoren CCR6, CXCR3 und CXCR4 nach Vakzinierung mit peptidbeladenen DC in

Renca-G250- und Renca-MAGE9-tragenden Tieren. Durch Kovakzinierung mit autoantigen-transformierten Salmonellen war die Expression der Chemokin-Rezeptoren in drainierenden LNC weiter gesteigert (Abbildung 22).

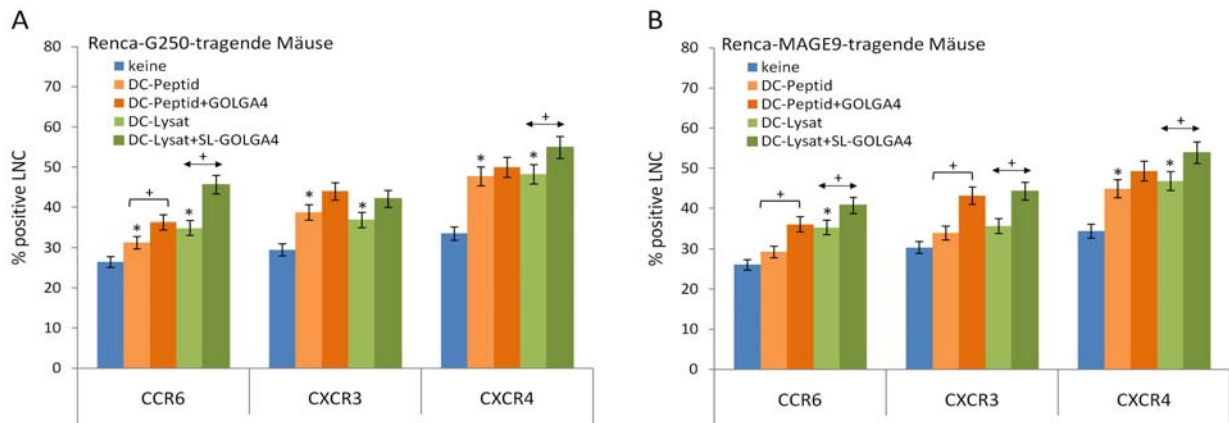


Abbildung 22: Expression von Chemokin-Rezeptoren nach Kovakzinierung mit TAA-beladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen

BALB/c-Mäuse wurden mit TAA-beladenen DC bzw. mit Salmonellen kovakzinert. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-G250- bzw. Renca-MAGE9-Zellen. Drei Wochen nach Tumorzellapplikation wurden die drainierenden LNC isoliert und mit Antikörpern für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Chemokin-Rezeptoren markiert. (A) Prozentualer Anteil chemokin-rezeptorexprimierender LN-Zellen in Renca-G250- (A) und Renca-MAGE9- (B) tragenden Mäusen. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-vakzinierter und DC-vakzinierter LNC sind durch * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 sind durch + gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Die Vakzinierung mit tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen führte zu einer verstärkten Rekrutierung antigenspezifischer T-Zellen in den Tumor. Die Kovakzinierung mit autoantigen-transformierten Salmonellen führte nicht nur zur vermehrten Rekrutierung von tumorantigen- und autoantigenspezifischen $CD4^+$ und $CD8^+$ in das Tumorgewebe, sondern auch zu einer erhöhten Expression von Chemokin-Rezeptoren, die vor allem die Rekrutierung von T-Zellen und dendritischen Zellen fördern.

5.9. Eine kombinierte Vakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC und autoantigentransformierten Salmonellen inhibiert das Tumorwachstum

Um die Effizienz der Vakzinierung mit Tumorantigen und Autoantigen auf das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen, erhielten BALB/c-Mäuse eine Tumorzellapplikation von 1×10^6 Renca-MAGE9- bzw. Renca-G250-Zellen ($200 \times TD_{100}$). Nicht-vakzinierter Tiere entwickelten nach zwei Wochen erste tastbare Tumore und wurden mit dem Erreichen des kritischen Tumordurchmessers getötet. Dies war nach 5-7 Wochen (Renca-MAGE9) bzw. nach 4-5 Wochen (Renca-G250) der Fall. Das Tumorwachstum in vakzinierter Mäusen war signifikant reduziert, wobei Tiere, die mit DC-MAGE9-Peptid und SL-GOLGA4 vakzinierter wurden, keinen Tumor entwickelten. Die Überlebensrate von lysatvakzinierter Tieren erhöhte sich, obwohl nicht signifikant, durch Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 von 5 auf 7 von 8 Tieren in Renca-MAGE9- und Renca-G250-tragender Mäusen. Die Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 war effizienter nach Vakzinierung mit peptidbeladenen DC und statistisch signifikant (Tabelle 21). So entwickelten 5 von 8 Tieren Renca-MAGE9-Tumore und 4 von 8 Tieren Renca-G250-Tumore nach DC-Peptidvakzinierung. In DC-Peptid/SL-GOLGA4-kovakzinierter Tieren entwickelten nur 2 von 8 Tieren Renca-G250-Tumore und keine der Mäuse entwickelte Renca-MAGE9-Tumore (Abbildung 23, Tabelle 21).

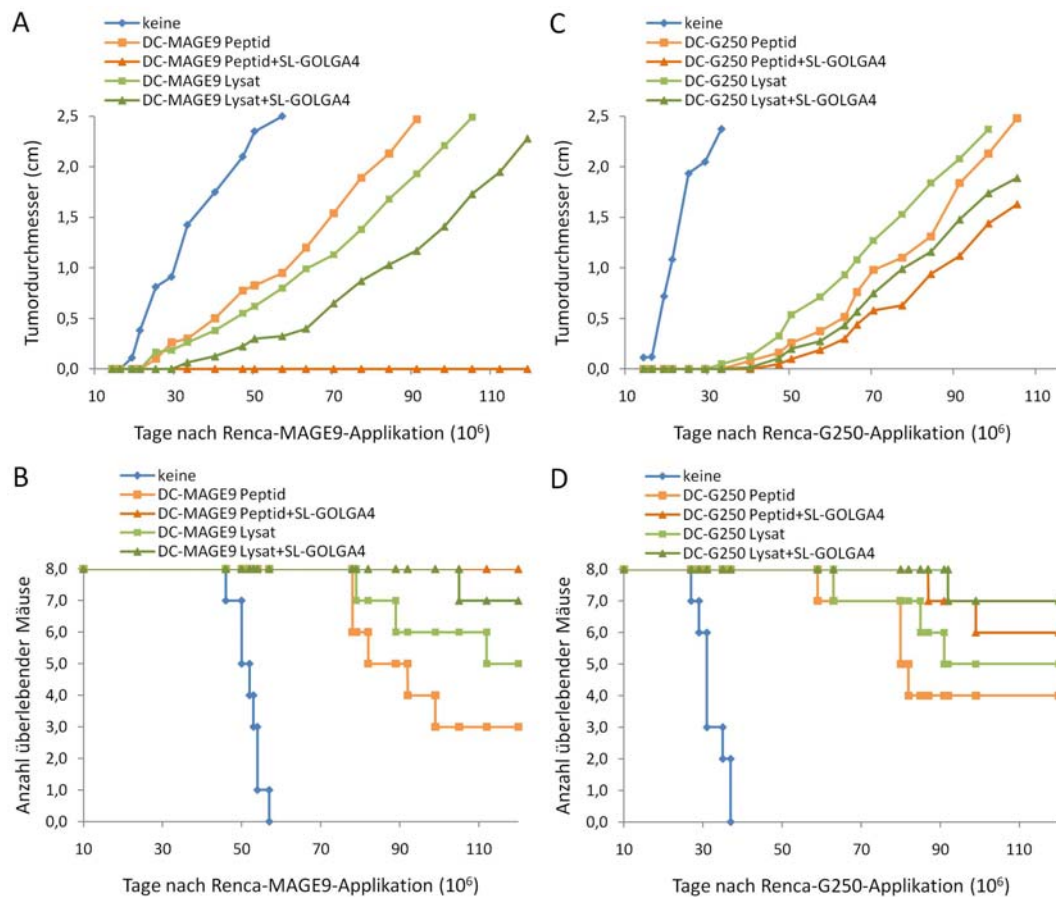


Abbildung 23: Inhibition des Tumorwachstums durch prophylaktische Vakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC und SL-GOLGA4-Kovakzinierung

BALB/c-Mäuse wurden wie in der Abbildung beschrieben vakzinieren. Die Vakzinierung mit DC erfolgte in Intervallen von 10 Tagen und die Vakzinierung mit Salmonellen in Intervallen von 14 Tagen. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-MAGE9- (A und B) bzw. Renca-G250- (C und D) Zellen. (A und C) Durchschnittlicher Tumordurchmesser. (B und D) Überlebenszeit und Überlebensrate von 8 Mäusen pro Gruppe. (Statistik siehe Tabelle 21)

Tabelle 21: Einfluss der prophylaktischen Vakzinierung auf das Tumorwachstum und das Überleben

(ns: nicht signifikant; k.A.: keine Angabe)

Tumor (1×10^6)	Vakzinierung	Wachstumsrate (mm/d)	p-Wert		Mittlere Überlebenszeit	p-Wert		Überlebensrate	p-Wert	
			nicht-vakzinieren	kovakzinieren		nicht-vakzinieren	kovakzinieren		nicht-vakzinieren	kovakzinieren
Renca-MAGE9	keine	0,42 ± 0,36			52 ± 3,3			0/8		
	DC-MAGE9 Peptid	0,27 ± 0,19	< 0,0001		129 ± 59,5	0,0014		3/8	0,0298	
	DC-MAGE9 Peptid + SL-GOLGA4	--	k.A.	k.A.	> 200	< 0,0001	0,0022	8/8	< 0,0001	< 0,0001
	DC-MAGE9 Lysat	0,24 ± 0,15	< 0,0001		160 ± 55,9	< 0,0001		5/8	0,0021	ns
	DC-MAGE9 Lysat + SL-GOLGA4	0,18 ± 0,15	< 0,0001	0,001	188 ± 33,6	< 0,0001	ns	7/8	< 0,0001	ns
Renca-G250	keine	0,72 ± 0,84			32 ± 3,7			0/8		
	DC-G250 Peptid	0,23 ± 0,24	< 0,0001		138 ± 67,1	0,0003		4/8	0,0096	
	DC-G250 Peptid + SL-GOLGA4	0,17 ± 0,18	< 0,0001	0,008	173 ± 49,6	< 0,0001	0,0483	6/8	0,0002	ns
	DC-G250 Peptid + GOLGA4	0,20 ± 0,18	< 0,0001	0,023	160 ± 55,9	< 0,0001	ns	5/8	0,0021	ns
	DC-G250 Lysat	0,24 ± 0,19	< 0,0001		155 ± 62,8	< 0,0001	ns	5/8	0,0021	ns
Renca	keine	0,50 ± 0,49			40 ± 5,3			0/8		
	SL-GOLGA4	0,42 ± 0,36	0,011		46 ± 4,4	0,0284		0/8		
	DC-G250 Peptid	0,50 ± 0,46	ns		43 ± 4,7	ns		0/8		
	DC-G250 Peptid + SL-GOLGA4	0,40 ± 0,32	0,0009	ns	46 ± 4,2	0,0141	ns	0/8		

Da die Vakzinierung mit Salmonellen, wenn auch nur geringfügig, die Expression des immun-suppressiven Zytokins IL-1 β und die Entstehung von MDSC förderte, wurde in weiteren Experimenten erprobt, ob die Salmonellen durch Vakzinierung mit autoantigenbeladenen DC ersetzt werden können. Wie in Tabelle 21 dargestellt, zeigte die Kovakzinierung mit GOLGA4-peptidbeladenen DC im Vergleich zur Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum von DC-G250-peptidvakziniierten Mäusen.

Letztlich war es erforderlich, die Antigenspezifität der Vakzinierung zu kontrollieren. Hierzu wurde das Tumorwachstum von nicht-tumorantigenexprimierenden Renca-Zellen überprüft. Wie erwartet zeigte sich im Vergleich zu nicht-vakziniierten Mäusen nach Vakzinierung mit G250-peptidbeladenen DC kein Einfluss auf das Tumorwachstum von Renca-Zellen. Die Vakzinierung mit SL-GOLGA4 führte zu einem geringfügig langsameren Tumorwachstum und einer nicht signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit (Abbildung 24).

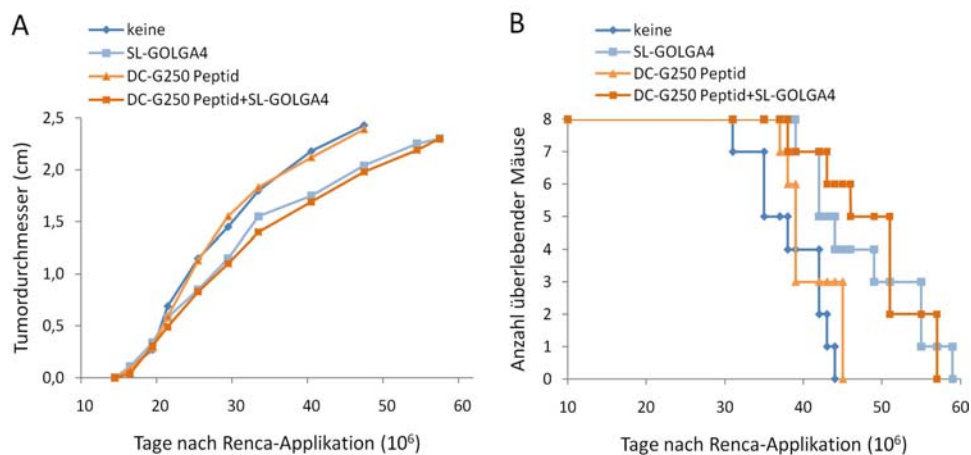


Abbildung 24: Einfluss der Vakzinierung auf das Wachstum von nicht-tumorantigenexprimierenden Tumorzellen

BALB/c-Mäuse wurden wie in der Abbildung beschrieben vakziniiert. Die Vakzinierung mit DC erfolgte in Intervallen von 10 Tagen und die Vakzinierung mit Salmonellen in Intervallen von 14 Tagen. Nach der zweiten Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 1×10^6 Renca-Zellen. (A) Durchschnittlicher Tumordurchmesser. (B) Überlebenszeit und Überlebensrate von 8 Mäusen pro Gruppe. (Statistik siehe Tabelle 21)

Da ein immuntherapeutischer Ansatz zur Therapie von Krebs meist nach Entfernung des Primärtumors stattfindet, wurde die Effizienz der kombinatorischen Vakzinierung mit dem Autoantigen im therapeutischen Kontext untersucht. Dazu wurden BALB/c-Mäusen 3 Tage vor Beginn der Vakzinierung 2×10^5 Renca-G250-Zellen injiziert. Die alleinige Vakzinierung mit SL-GOLGA4 zeigte

hierbei keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum. Durch wiederholte Vakzinierung mit G250-peptidbeladenen DC zeigte sich hingegen ein signifikant verzögertes Tumorwachstum und 2 von 10 Mäusen entwickelten keinen Tumor. Nach Kovakzinierung mit SL-GOLGA4 blieben 4 von 10 Mäusen tumorfrei und das Tumorwachstum verzögerte sich auch im Vergleich zur DC-G250-Vakzinierung signifikant (Abbildung 25, Tabelle 22).

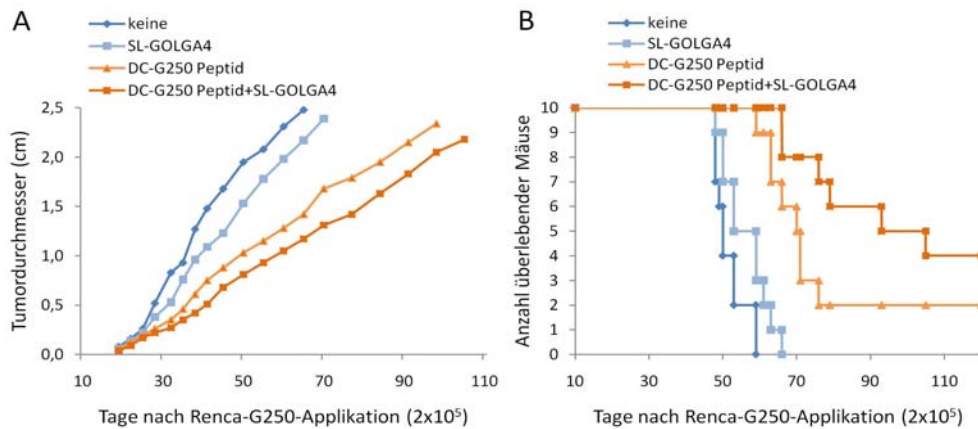


Abbildung 25: Inhibition des Tumorwachstums durch therapeutische Vakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC und SL-GOLGA4-Kovakzinierung

BALB/c-Mäuse wurden wie in der Abbildung beschrieben vakzinieren. Die Vakzinierung mit DC erfolgte in Intervallen von 10 Tagen und die Vakzinierung mit Salmonellen in Intervallen von 14 Tagen. 3 Tage vor Beginn der Vakzinierung erhielten die Mäuse s.c. 2×10^5 Renca-G250-Zellen. (A) Durchschnittlicher Tumordurchmesser. (B) Überlebenszeit und Überlebensrate von 10 Mäusen pro Gruppe. (Statistik siehe Tabelle 22)

Tabelle 22: Einfluss der therapeutischen Vakzinierung auf das Tumorwachstum und das Überleben

(ns: nicht signifikant)

Tumor (2×10^5)	Vakzinierung	Wachstumsrate (mm/d)	p-Wert		Mittlere Überlebenszeit	p-Wert		Überlebensrate	p-Wert	
			nicht-vakzinieren	kovakzinieren		nicht-vakzinieren	kovakzinieren		nicht-vakzinieren	kovakzinieren
RENCA-G250	keine	$0,39 \pm 0,31$			$52 \pm 4,7$			0/10		
	SL-GOLGA4	$0,34 \pm 0,22$	0,0101		$56 \pm 6,2$	ns		0/10	ns	
	DC-G250 Peptid+ SL-GOLGA4	$0,26 \pm 0,14$	< 0,0001	< 0,0001	$94 \pm 56,1$	0,0291	0,0245	2/10	ns	ns
	DC-G250 Peptid+ SL-GOLGA4	$0,22 \pm 0,12$	< 0,0001	0,002	$129 \pm 62,6$	0,0011	ns	4/10	0,0124	ns

Die Befunde belegen, dass nicht nur die prophylaktische, sondern auch die therapeutische kombinatorische Immuntherapie mit tumorantigenbeladenen dendritischen Zellen und autoantigen-transformierten Salmonellen zur Inhibition des Tumorwachstums von MAGE9- und G250-exprimierenden Tumoren geeignet erscheint. Eine Vakzinierung nur durch peptidbeladene DC erwies sich einer Vakzinierung mit Tumorlysat überlegen. Die Effizienz der gegen den Tumor

gerichteten Immunantwort konnte durch Kovakzinierung gesteigert werden, wobei sich der DNS-Transfer über Salmonellen gegenüber autoantigenbeladenen DC als wirksamer erwies.

6. Diskussion

Für immunogene Tumore wie das Nierenzellkarzinom ist die Immuntherapie eine attraktive Alternative zu herkömmlichen Therapien. Eine Immuntherapie mit dendritischen Zellen wird generell als vielversprechend erachtet. Dennoch erfüllen die Ergebnisse der klinischen Studien nicht die Erwartung (178-181). Als Ursachen hierfür wird eine ineffiziente Aktivierung von T-Helfer-Zellen durch die in der Regel schwach immunogenen Tumorantigene diskutiert (182,183). Da das Nierenzellkarzinom aber auch immunsuppressive Eigenschaften aufweist, könnte auch die Unterdrückung einer effizienten Immunantwort durch den Tumor dafür verantwortlich sein (184). Dies gilt insbesondere auch für die bei Nierenzellkarzinom-Patienten durchgeführte Vakzinierung mit tumorlysatbeladenen DC. Mit dem Lysat werden eine Vielzahl zum Teil nicht-definierter Antigene angeboten, so dass zum einen immunogene Epitope nicht in entsprechender Quantität vorliegen. Zum anderen enthalten Lysate hauptsächlich Selbst-Antigene, die, wie bereits wiederholt beobachtet, Immunsuppression induzieren können (185,186). Die Therapie mit definierten Antigenen wie bei der Beladung von DC mit MHC-Klasse-I-bindenden Peptiden bestimmter Tumorantigene vermeidet das Risiko der Induktion immunsuppressiver Mechanismen. Durch MHC-Klasse-I-restringierte Peptide werden aber ausschließlich CD8⁺-Effektor-T-Zellen aktiviert, wohingegen eine Aktivierung von T-Helfer-Zellen nicht im erforderlichen Maße erzielt wird.

Aus diesem Grund war das besondere Anliegen dieser Arbeit, eine effektive Aktivierung von T-Helfer-Zellen bei einer Vakzinierung mit peptidbeladenen DC zu erzielen. Ich konnte zeigen, dass eine kombinierte Vakzinierung mit peptidbeladenen DC und autoantigen-transformierten Salmonellen das Tumorstadium signifikant unterdrückt. Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass im tumortragenden Wirt T-Helfer-Zellen das Autoantigen erkennen, das vom Tumor exprimiert wird und so die Aktivierung von tumorantigen- und autoantigen-spezifischen CTL unterstützen. Außerdem wird durch die Verwendung von transformierten Salmonellen als Adjuvant das Immunsystem stimuliert und ein inflammatorisches Milieu geschaffen, das die Expression von Chemokin-Rezeptoren fördert, wodurch die Aktivierung von tumorspezifischen CTL und deren Rekrutierung in den Tumor zusätzlich unterstützt werden.

6.1. Wahl der Antigene und Art der Vakzinierung

6.1.1. Die Tumorantigene G250 und MAGE9

Für die Etablierung eines Mausmodells für das Nierenzellkarzinom wurden Renca-Zellen mit dem für das humane Nierenzellkarzinom am besten charakterisierten Tumorantigen G250 transfiziert (23). Um das Antigen-Repertoire für die Immuntherapie zu erweitern, wurden Renca-Zellen darüber hinaus mit dem humanen Antigen MAGE9 transfiziert (22). In vielen Studien werden DC als die professionellsten antigenpräsentierenden Zellen bevorzugt für die Vakzinierung mit Tumorantigenen verwendet. Deshalb wurde diese etablierte Vakzinierungsstrategie eingesetzt, um die Effizienz und mögliche Nachteile der Vakzinierung mit MHC-Klasse-I-restringierten Peptiden gegenüber der Vakzinierung mit Tumorlysatz zu vergleichen.

6.1.2. Das Autoantigen GOLGA4

Viele Tumorantigene sind nur schwach immunogen. Die Vakzinierung gegen Tumorantigene benötigt deshalb oft die Unterstützung durch Adjuvantien. Neuere Untersuchungen zeigten, dass eine Kovakzinierung mit vom Tumor exprimierten Autoantigenen die spezifische Immunantwort gegen den Tumor verstärken kann, wobei die Immunreaktion maßgeblich von T-Helferzellen abhängig ist (38,62). Wie man aus Untersuchungen mit den Serex- und SADA-Screening-Verfahren weiß, sind die meisten Antikörper, die man im Serum von Krebspatienten findet, gegen Autoantigene gerichtet (27-29). Diese Verfahren detektieren nur IgG-Antikörper mit sehr hoher Avidität, weshalb man bei den entsprechenden Autoantigenen davon ausgehen kann, dass sie stark immunogen sind. Eines der Autoantigene, das in allen untersuchten Nierenzellkarzinom-Patienten detektiert wurde, ist das Golgiprotein GOLGA4 (30). Dieses Autoantigen wird auch von Renca-Zellen exprimiert, die für diese Arbeit als murines Modell für das humane Nierenzellkarzinom eingesetzt wurden. Das Modell erwies sich daher als besonders geeignet, die unterstützende Wirkung von autoantigen-spezifischen T-Helferzellen auf die Aktivierung von tumorantigen-spezifischen CTL zu untersuchen.

6.1.3. Kovakzinierung mit attenuierten *Salmonella typhimurium*

Als Strategie für die Kovakzinierung mit dem Autoantigen GOLGA4 wurde der Gentransfer über oral verabreichte attenuierte *Salmonella typhimurium* gewählt. Die Gentherapie mit *S. typhimurium*, die mit einem eukaryotischen Expressionsvektor transformiert wurden, fand bereits erfolgreiche Anwendung. Außerdem sind *S. typhimurium* aufgrund der adjuvanten Eigenschaften ein sehr potentes Vakzin (162,164,166,167). In der Tat konnten, wie erwartet, in den drainierenden Lymphknotenzellen und unter den tumorinfiltrierenden Lymphozyten nach Vakzinierung mit GOLGA4-transformierten Salmonellen GOLGA4-spezifische T-Helfer-Zellen und CTL nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte durch Kovakzinierung mit GOLGA4-Salmonellen die gegen den Tumor gerichtete tumorantigenspezifische Immunreaktion effektiv gesteigert werden.

6.1.4. Immunsuppression durch Salmonellen

Salmonellen sind stark immunogen (187). Dies ist die Grundlage für Vakzinierungen gegen Salmonelleninfektionen. Salmonellen haben daher Eigenschaften entwickelt, um ihr eigenes Überleben zu sichern, insbesondere aktivieren sie immunsuppressive Mechanismen (188). Durch die Verwendung des eukaryotischen Expressionssystems für die Darreichung von heterologen Antigenen gelingt es, die immunsuppressiven Mechanismen, die von Salmonellen induziert werden, zu umgehen (175). Dem entspricht, dass ich keine nennenswerte Immunreaktion auf den eukaryotischen Expressionsvektor feststellen konnte (162,166,167). Dennoch wurde eine leicht erhöhte Expression der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und IL-1 β sowie von MDSC in der Milz von Mäusen beobachtet, die mit Salmonellen vakziniert wurden. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass immunsuppressive Mechanismen bei dieser Form der Salmonellen-Vakzinierung keine dominante Rolle spielen, da durch die Kovakzinierung mit GOLGA4-Salmonellen die Hemmung des Tumorwachstums bzw. die Abstoßung des Tumors nicht beeinträchtigt, sondern deutlich verstärkt wurden. Trotzdem wurde versucht, die durch die Salmonellen induzierte Hochregulierung von immunsuppressiven Zytokinen und Zellen zu umgehen, indem dendritische Zellen verwendet wurden, die mit GOLGA4-Peptid (MHC-Klasse-II-restringiert) beladen wurden. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass GOLGA4-peptidbeladene DC einen schwächeren Stimulus als GOLGA4-Salmonellen bieten. Die Ursache für die Induktion einer besseren Immunantwort durch GOLGA4-Salmonellen liegt wahrscheinlich in der durch die

Salmonellen induzierten Expression von proinflammatorischen Zytokinen und IFN- γ . Somit sind GOLGA4-Salmonellen das weitaus bessere Adjuvant. Um die leichte Tendenz der Salmonellen-Vakzinierung, die Immunantwort zu supprimieren, gegenzusteuern, könnte ATRA (All-trans-Retinsäure) verwendet werden. ATRA führt sehr effizient zur Differenzierung von MDSC, wodurch sich der suppressive Einfluss dieser Zellen unterbinden ließe (189).

6.2. Der Modus, über den die Kovakzinierung mit einem Autoantigen tumorantigenspezifische T-Zellen unterstützt

Die Tumorstudien zeigten, dass Mäuse, die mit Tumor- und Autoantigen kovakzinieren wurden, in der Lage waren, eine geringe Tumordosis abzuwehren. Dies war für G250-Tumore ebenso der Fall wie für MAGE9-Tumore. Bei der Applikation einer höheren Tumordosis erhöhte sich die Überlebensrate im Falle der G250-Tumore von 50% auf 75% und im Falle der MAGE9-Tumore sogar von 37,5% auf 100%. Bei der therapeutischen Vakzinierung konnte die Überlebensrate durch Kovakzinierung mit GOLGA4-Salmonellen und Tumorantigen von 20% auf 40% erhöht werden. Um den hierfür zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären, wurde insbesondere die Vakzinierung mit Tumorlysate gegenüber der Vakzinierung mit tumorpeptidbeladenen DC und dem adjuvanten Effekt der GOLGA4-Salmonellen verglichen.

6.2.1. Die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen

Die Untersuchung der antigenspezifischen Interaktion von Effektor-T-Zellen mit den antigen-präsentierenden DC im TRAP-Assay (172,190) zeigte, dass durch wiederholte Vakzinierung mit lysatbeladenen DC in der tumorfreien Maus die Zahl der antigenspezifischen Effektor-T-Zellen erhöht wurde. So ließ sich in den drainierenden LNC der prozentuale Anteil von T-Helfer-Zellen von < 2% auf > 10% und der Anteil CD8-positiver CTL von < 2% auf > 20% steigern. Wurden die tumorfreien Mäuse mit Salmonellen oder GOLGA4-Salmonellen kovakzinieren, konnte ein weiterer Anstieg auf über 25% an CD8-positiven Effektorzellen erzielt werden. Die Vakzinierung von tumorfreien Mäusen mit peptidbeladenen DC war wenig effizient und die Kovakzinierung mit Salmonellen war ineffektiv. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch sehr deutlich, dass in der tumortragenden Maus durch Kovakzinierung mit peptidbeladenen DC und GOLGA4-

Salmonellen die Anzahl von tumorantigenspezifischen T-Helfer-Zellen und CD8-positiver Effektorzellen erhöht wurde.

6.2.2. Die Rolle dendritischer Zellen

Dass infolge der Vakzinierung, wenngleich nur in geringem Ausmaß, auch T-Helfer-Zellen mit DC interagieren, kann dahingehend interpretiert werden, dass das Tumorslysate von den DC über MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert wird. Darüber hinaus enthält das Tumorslysate das Autoantigen GOLGA4. Wie die Experimente zur Proliferation von LNC demonstrierten, war die proliferative Aktivität der LNC aus tumortragenden Mäusen, die mit lysatbeladenen DC vakziniert wurden, gesteigert. Demzufolge waren die DC in der Lage, sowohl Tumorantigene als auch Autoantigene zu prozessieren und T-Zellen zu präsentieren, was zur gesteigerten Aktivierung von T-Helfer-Zellen und als Folge auch zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen führte (191).

6.2.3. Die Rolle der Salmonellen

Wie bereits erwähnt sind Salmonellen selbst sehr immunogen (187) und werden zunächst von peritonealen Makrophagen phagozytiert, weshalb immunogene Epitope der Salmonellen von den Makrophagen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden können (166,167). Deshalb ist es möglich, dass die vermehrte Trogozytose von CD8-positiven Effektor-T-Zellen in tumorfreien Mäusen, wenigstens zum Teil auch vom Tumorantigen und Autoantigen unabhängig sein kann und vielmehr auf die inflammatorische Reaktion zurückzuführen ist, die durch die Salmonellen in Gang gesetzt wurde. Der stark erhöhte Anstieg der Trogozytose von T-Helfer-Zellen nach Kovakzinierung mit peptidbeladenen DC und GOLGA4-Salmonellen kann hingegen nicht damit begründet werden, dass DC auch T-Helfer-Zellen aktivieren, da die Tumorpeptide MHC-Klasse-I-restringiert sind und ausschließlich zur Aktivierung von CD8⁺-Effektorzellen führen. Stattdessen deutet die gesteigerte Anzahl an tumorspezifischen CD8⁺-Effektorzellen auf die Unterstützung durch autoantigenspezifische T-Helfer-Zellen hin und steht im Einklang mit den Arbeiten von de Goër de Herve et al., die zeigten, dass antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Antworten nicht ausschließlich von T-Helfer-Zellen profitieren, die für das gleiche Antigen spezifisch sind, also homospezifisch sind, sondern auch durch heterospezifische T-Helfer-Zellen unterstützt und aktiviert werden können (62). Des Weiteren ist die Unterstützung von Effektor-

T-Zellen durch autoantigenspezifische T-Helfer-Zellen in meinem Vakzinierungsprotokoll vergleichbar mit den Arbeiten von Kikuchi et al., die eine verstärkte zytotoxische Aktivität von CD8⁺-T-Zellen nach Immunisierung mit einem T-Helfer-Zell-Typ-1-Peptid nachwiesen (61).

Zusammenfassend kann die Kovakzinierung mit einem Autoantigen in Form des Gentransfers mit Hilfe von Salmonellen als sehr effektives Adjuvant eingesetzt werden, das die Aktivierung von antigenspezifischen T-Helfer-Zellen fördert. Diese Auslegung wird durch die vermehrte Anzahl an CD154⁺-T-Zellen, CD40⁺-Zellen und IFN- γ -sezernierenden Zellen unterstützt, aber besonders auch durch die stark erhöhte proliferative Aktivität von CD4⁺-T-Zellen und die hohe zytotoxische Aktivität gegen Renca-G250- und Renca-MAGE9-Tumorzellen, die nach Kovakzinierung mit GOLGA4-Salmonellen erreicht wurde.

6.2.4. Die Antigenpezifität

Die Untersuchung der Proliferation von T-Zellen nach Konfrontation mit GOLGA4-beladenen DC bestätigte ebenso wie die zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen nicht-autoantigen-exprimierende Tumorzellen (Renca-G250⁺GOLGA^{kd}), dass durch die Kovakzinierung mit GOLGA4-Salmonellen eine autoantigenspezifische proliferative und zytotoxische Immunantwort induziert wird. Es sei darauf hingewiesen, dass die zytotoxische Aktivität der CTL gegen Renca-G250⁺GOLGA^{kd}-Zellen nach Kovakzinierung mit G250-beladenen DC und GOLGA4-Salmonellen deutlich die Aktivität von CTL aus DC G250-vakzinierter Mäuse übertrifft. Damit belegen die Ergebnisse direkt die Beteiligung von autoantigenspezifischen T-Helfer-Zellen bei der Aktivierung von tumorantigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen. Eine mögliche Erklärung für die Verstärkung und Unterstützung der gegen den Tumor gerichteten antigenspezifischen Aktivität durch autoreaktive T-Helfer-Zellen in der tumortragenden Maus ist die, dass die DC Antigene direkt vom Tumor aufnehmen. Durch Aufnahme von toten Tumorzellen- und -zellrückständen oder über die Aufnahmen von Exosomen, die von den Tumoren freigesetzt werden, könnten DC das Autoantigen GOLGA4 und Tumorantigene prozessieren und präsentieren. In den drainierenden Lymphknoten wären die DC dann in der Lage, sowohl T-Helfer-Zellen als auch zytotoxische T-Zellen zu aktivieren (192-195). Diese Hypothese wird durch die hohe Überlebensrate von tumortragenden Mäusen nach Kovakzinierung mit peptidbeladenen DC und GOLGA4-Salmonellen unterstützt. Aber auch die signifikant

verlängerte Überlebenszeit von Mäusen, die therapeutisch mit peptidbeladenen DC und GOLGA4-Salmonellen vakziniert wurden, steht in Einklang mit dieser Annahme.

6.2.5. Vergleich von Peptid- und Lysatvakzinierung

Letztlich möchte ich darauf hinweisen, dass im Gegensatz zur Peptidvakzinierung nach Vakzinierung mit lysatbeladenen DC eine leicht erhöhte Expression von CD152 und dessen Rezeptor CD80 festgestellt wurde. Die Interaktion von CD152 mit seinem Rezeptor induziert in den T-Zellen ein inhibitorisches Signal und verhindert die Aktivierung von T-Zellen. Außerdem war ein leichter Anstieg von MDSC in der Milz und im Tumor von lysatvakzinierten Mäusen zu beobachten. Durch das Tumorklysate werden demnach, wenn auch ohne dominanten Einfluss auf die Effizienz der Vakzinierung, immunsuppressorische Mechanismen angestoßen. Andererseits haben Renca-Zellen suppressive Eigenschaften und können direkt zur Inhibition des Immunsystems beitragen (196). Dennoch wurden vor allem nach Vakzinierung mit Tumorklysate Anzeichen für Immunsuppression gefunden. Es ist wahrscheinlich, dass mit dem Tumorklysate sowohl immunogene Epitope als auch tolerogene Epitope präsentiert werden (197-199). Da in der Masse des Tumorklysats überwiegend Selbst-Antigene vorhanden sind, kann ein Ungleichgewicht zugunsten der Präsentation von tolerogenen Epitopen entstehen. Zum anderen ist es möglich, dass tumorklysatebeladene DC direkt zur Stimulation von MDSC beitragen und die Konkurrenz von immunogenen und tolerogenen Epitopen sowohl die antigenspezifische Stimulation des Immunsystems als auch die Induktion von Immunsuppression bewirkt (197,200-202). Trotz dieser gegenläufigen Effekte sei nochmals darauf hingewiesen, dass Immunsuppression keine dominante Rolle einnimmt und offensichtlich keinen negativen Einfluss auf die Effizienz der gewählten Vakzinierungsstrategie ausübt.

6.3. Die Kovakzinierung mit Salmonellen unterstützt die Rekrutierung von Effektor-T-Zellen in den Tumor

Die dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass es nach Kovakzinierung mit GOLGA4-Salmonellen in den Tumoren der Mäuse zu einer Akkumulation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten kommt. Die erhöhte Expression von Chemokin-Rezeptoren weist darauf hin, dass die Salmonellen Einfluss auf die Migration von Lymphozyten nehmen. Die Kovakzinierung mit

GOLGA4-Salmonellen verstärkt die Expression von CCR6, CXCR3 und CXCR4. CXCR3 wird hauptsächlich von T-Helfer-Zellen des Typs 1 (T_H1-Zellen) exprimiert. Es wurde gezeigt, dass die CXCR3-Expression zur Rekrutierung von T_H1-Zellen bei Autoimmunerkrankungen und Gewebeschäden beiträgt (203). CCR6 wird von unreifen DC und von Effektor- sowie Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. CCR6-exprimierende Zellen werden durch deren Liganden CCL20 angezogen, der auch von Nierenzellkarzinom-Zellen exprimiert wird (204,205). CXCR4 übt eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von T-Zellen und deren Migration aus (206). Die Chemokin-Rezeptoren CCR6 und CXCR4 werden zudem von DC, wenn auch zum Teil nur transient, exprimiert und unterstützen DC auf ihrem Weg von Blut- und Lymphgefäßen zu den lymphatischen Organen (207). Diese Funktion der Chemokin-Rezeptoren steht im Einklang mit ihrer wichtigen Funktion, die sie in Autoimmunerkrankungen ausüben, und dementsprechend bei einer Vakzinierung mit einem Autoantigen. Die gesteigerte Expression von Chemokin-Rezeptoren nach Kovakzinierung mit GOLGA4-Salmonellen fördert die Migration von T-Zellen und somit deren Rekrutierung in den Tumor und erleichtert es DC, Antigene aufzunehmen und in lymphatischen Organen den T-Zellen zu präsentieren. Die Steigerung der Chemokin-Expression durch die Vakzinierung mit Salmonellen liefert somit einen weiteren wesentlichen Faktor beim Aufbau einer therapeutisch effizienten Immunantwort gegen Tumore.

Zusammenfassend erwies sich die Vakzinierung mit definierten Antigenen durch Peptidbeladung von DC im Zusammenhang mit der unterstützenden Wirkung der Kovakzinierung mit dem Autoantigen, das vom Tumor exprimiert wird, als hocheffizientes Vakzin. Auch wenn die Vakzinierung mit lysatbeladenen DC oft effizienter erschien, werden bei Kovakzinierung noch T-Helfer-Zellen aktiviert, die zur Verstärkung der gegen den Tumor gerichteten zytotoxischen T-Zell-Antwort führen. Außerdem kann mit der Vakzinierung mit peptidbeladenen DC die Induktion immunsuppressorer Mechanismen umgangen werden, die vor allem nach Vakzinierung mit tumorlysatbeladenen DC beobachtet wurden. Die Ergebnisse demonstrieren außerdem, dass durch Kovakzinierung mit autoantigen-transformierten Salmonellen eine Autoimmunreaktion induziert wird, die sich gegen das vom Tumor exprimierte Autoantigen GOLGA4 richtet. Des Weiteren induzieren die Salmonellen ein inflammatorisches Milieu, das von einer erhöhten Expression und Sekretion von Zytokinen und der Expression von Chemokin-Rezeptoren begleitet wird, wodurch wiederum die Aktivierung und Expansion von tumorspezifischen T-Zellen gefördert wird und die Rekrutierung von Effektor-T-Zellen in den Tumor unterstützt wird.

6.4. Der Wert und Nutzen dieser Arbeit

In den hier präsentierten Ergebnissen werden zum einen der Einsatz selektiver definierter und umfassender, aber zum Teil undefinierter, Tumorantigene für die Vakzinierung mit DC verglichen. Die Ergebnisse unterstreichen den Trend der klinischen Studien, dass durch Vakzinierung mit definierten Tumorantigenen bessere Resultate erzielt werden und gezielter therapiert werden kann (208). Deshalb ist die Identifizierung und Charakterisierung immunogener Tumorantigene von großem Wert und sollte weiterhin umfassend vorangetrieben werden. Mit dem hier verwendeten tumorassoziierten Antigen MAGE9 steht ein weiteres Antigen zur Verfügung, das im Hinblick auf seine Immunogenität mit dem etablierten Nierenzellkarzinomassoziierten Antigen G250 vergleichbar ist. Trotzdem erfüllt die Therapie ausschließlich mit DC gerade bei soliden Tumoren nicht die Erwartungen. Vielversprechend ist die Therapie erst nach Entfernen des Primärtumors und bei metastasierenden Tumoren, bei denen eine effektiv induzierte zelluläre Immunantwort, das Wiederaufkommen des Tumors bzw. dessen Metastasierung unterbinden kann (209). Dies wird in dem hier vorgestellten Mausmodell beim Vergleich der prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierung ebenfalls verdeutlicht. In jedem Fall ist es erforderlich, eine Vakzinierung mit DC durch Adjuvantien zu unterstützen, um eine effiziente Aktivierung des Immunsystems zu erreichen. Beim Nierenzellkarzinom wird daher die Vakzinierung mit DC häufig mit einer etablierten Zytokintherapie kombiniert. Die erfolgreiche Anwendung von Zytokinen benötigt aber meist die Verabreichung hoher Dosen, die wiederum, speziell auch bei Verabreichung von IL-2, von toxischen Nebenwirkungen begleitet wird (155).

Ich habe hier eine alternative adjuvante Therapiestrategie aufgezeigt. Attenuierte Salmonellen sind als Vakzin im Allgemeinen sehr gut verträglich und schwere Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Darüber hinaus bieten Salmonellen die Möglichkeit einer gentherapeutischen Anwendung, die hier, in Form des Autoantigens GOLGA4, erfolgreich angewendet wurde und zu einer signifikanten Steigerung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort geführt hat. Die Verwendung von Salmonellen als Vakzin wäre darüber hinaus sehr kostengünstig und sie könnten den Patienten in medikamentöser Form verabreicht werden, wodurch sich Krankenhausaufenthalte vermeiden ließen und dem Wohl der Patienten gedient wäre.

Literatur

1. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
2. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-998.
3. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KCF, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, u. a. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* 2005 Juli;6(7):722-729.
4. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 2006;90:1-50.
5. Simson L, Ellyard JI, Dent LA, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS, u. a. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J. Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4222-4229.
6. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, u. a. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1107-1111.
7. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 2004 4;22(1):329-360.
8. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, u. a. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007 Dez 6;450(7171):903-907.
9. Graziano DF, Finn OJ. Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer Treat. Res.* 2005;123:89-111.
10. Gilboa E. The promise of cancer vaccines. *Nature Reviews Cancer.* 2004;4(5):401-411.
11. Finn OJ. Cancer immunology. *The New England journal of medicine.* 2008;358(25):2704.
12. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde BJ, u. a. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Immunol.* 2007 März 1;178(5):2617-2621.
13. van der Bruggen P, Stroobant V, Van Pel A, Van den Eynde B. Peptide Database of T-cell defined tumor antigens [Internet]. *Cancer Immunity.* 2009 Juli 27 [zitiert 2010 Mai 12]; Available from: <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>
14. Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 28;103(48):18238-18242.
15. Carbone DP, Ciernik IF, Kelley MJ, Smith MC, Nadaf S, Kavanaugh D, u. a. Immunization With Mutant p53- and K-ras-Derived Peptides in Cancer Patients: Immune Response and

- Clinical Outcome. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5099-5107.
16. Sensi M, Anichini A. Unique Tumor Antigens: Evidence for Immune Control of Genome Integrity and Immunogenic Targets for T Cell-Mediated Patient-Specific Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(17):5023-5032.
 17. Gure AO, Türeci Ö, Sahin U, Tsang S, Scanlan MJ, Jäger E, u. a. SSX: A multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *International Journal of Cancer*. 1997;72(6):965-971.
 18. Caballero OL, Chen Y. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. 2009 Nov;100(11):2014-2021.
 19. Mathieu MG, Miles AK, Li G, McArdle SEB, Rees RC. Cancer/testis antigens for therapeutic use. *J BUON*. 2009 Sep;14 Suppl 1:S97-102.
 20. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Zeuthen J. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest*. 2002;20(2):222-236.
 21. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2005 Aug;5(8):615-625.
 22. Oehlrich N, Devitt G, Linnebacher M, Schwitalle Y, Grobetakinski S, Stevanovic S, u. a. Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-Lymphocyte lines for transfer in patients with renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2005;117(2):256-264.
 23. Vissers JL, De Vries IJ, Schreurs MW, Engelen LP, Oosterwijk E, Figdor CG, u. a. The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*. 1999 Nov 1;59(21):5554-5559.
 24. Oosterwijk E, Ruiter DJ, Hoedemaeker PJ, Pauwels EK, Jonas U, Zwartendijk J, u. a. Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int. J. Cancer*. 1986 Okt 15;38(4):489-494.
 25. Bui MHT, Seligson D, Han K, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, u. a. Carbonic Anhydrase IX Is an Independent Predictor of Survival in Advanced Renal Clear Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2003 Feb;9(2):802-811.
 26. Emens LA, Jaffee EM. Cancer vaccines: an old idea comes of age. *Cancer Biol. Ther*. 2003 Aug;2(4 Suppl 1):S161-168.
 27. Krebs P, Kurrer M, Sahin U, Türeci O, Ludewig B. Autoimmunity seen through the SEREX-scope. *Autoimmun Rev*. 2003 Okt;2(6):339-345.
 28. Fernández Madrid F, Tang N, Alansari H, Karvonen RL, Tomkiel JE. Improved approach to identify cancer-associated autoantigens. *Autoimmun Rev*. 2005 Apr;4(4):230-235.

29. Desmetz C, Cortijo C, Mangé A, Solassol J. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery. *J Proteomics*. 2009 Aug 20;72(6):982-988.
30. Devitt G, Meyer C, Wiedemann N, Eichmüller S, Kopp-Schneider A, Haferkamp A, u. a. Serological analysis of human renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2006 Mai 1;118(9):2210-2219.
31. Koroleva EP, Lagarkova MA, Mesheryakov AA, Scanlan MJ, Old LJ, Nedospasov SA, u. a. Serological identification of antigens associated with renal cell carcinoma. *Russ. J. Immunol*. 2002 Okt;7(3):229-238.
32. Türeci O, Usener D, Schneider S, Sahin U. Identification of tumor-associated autoantigens with SEREX. *Methods Mol. Med*. 2005;109:137-154.
33. Mellor H. Cell motility: Golgi signalling shapes up to ship out. *Curr. Biol*. 2004 Juni 8;14(11):R434-435.
34. Short B, Barr FA. Membrane traffic: a glitch in the Golgi matrix. *Curr. Biol*. 2003 Apr 15;13(8):R311-313.
35. Kooy J, Toh BH, Pettitt JM, Erlich R, Gleeson PA. Human autoantibodies as reagents to conserved Golgi components. Characterization of a peripheral, 230-kDa compartment-specific Golgi protein. *J. Biol. Chem*. 1992 Okt 5;267(28):20255-20263.
36. Tsukada Y, Ichikawa H, Chai Z, Lai FP, Dunster K, Sentry JW, u. a. Novel variant of p230 trans-Golgi network protein identified by serum from Sjögren's syndrome patient. *Eur. J. Cell Biol*. 2000 Nov;79(11):790-794.
37. Barr FA. A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr. Biol*. 1999 Apr 8;9(7):381-384.
38. Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, Sakakura M, Miyahara Y, Aota T, u. a. Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Dez 4;98(25):14571-6.
39. Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, u. a. CD4⁺ CD25⁺ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Sep 16;100(19):10902-6.
40. Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. 1999 Sep;11(3):263-270.
41. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol*. 2010 Feb;22(1):109-117.
42. Segura E, Villadangos JA. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr. Opin. Immunol*. 2009 Feb;21(1):105-110.
43. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.

- Immunol. Today. 1996 März;17(3):138-146.
44. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;14:233-258.
 45. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:111-135.
 46. Holter W, Schwarz M, Cerwenka A, Knapp W. The role of CD2 as a regulator of human T-cell cytokine production. *Immunol. Rev.* 1996 Okt;153:107-122.
 47. van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr. Opin. Immunol.* 1997 Juni;9(3):330-337.
 48. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, u. a. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:495-521.
 49. Gerloni M, Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 2005 Juni;27(1):37-48.
 50. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* 2003 Feb 20;421(6925):852-856.
 51. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science.* 2003 Apr 11;300(5617):339-342.
 52. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003 Apr 11;300(5617):337-339.
 53. Zhang S, Zhang H, Zhao J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 Juli 10;384(4):405-408.
 54. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, Brinster C. Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol.* 2009 Aug;Chapter 3:Unit 3.7.
 55. Melief CJM. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity.* 2008 Sep 19;29(3):372-383.
 56. Osada T, Clay TM, Woo CY, Morse MA, Lyerly HK. Dendritic cell-based immunotherapy. *Int. Rev. Immunol.* 2006 Dez;25(5-6):377-413.
 57. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007;449(7161):419-426.
 58. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998 Okt;10(5):588-594.

59. Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 2001 Mai;22(5):269-276.
60. Ostrand-Rosenberg S. CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest.* 2005;23(5):413-419.
61. Kikuchi T, Uehara S, Ariga H, Tokunaga T, Kariyone A, Tamura T, u. a. Augmented induction of CD8+ cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide. *Immunology.* 2006 Jan;117(1):47-58.
62. de Goer de Herve M, Cariou A, Simonetta F, Taoufik Y. Heterospecific CD4 Help to Rescue CD8 T Cell Killers. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):5974-5980.
63. Pawelec G, Zeuthen J, Kiessling R. Escape from host-antitumor immunity. *Crit. Rev. Oncog.* 1997;8:111-141.
64. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* 2000;74:181-273.
65. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):999-1005.
66. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2006 Apr;6(4):295-307.
67. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2009 März;9(3):162-174.
68. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol. Immunother.* 2002 Aug;51(6):293-298.
69. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006 März;55(3):237-245.
70. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):4499-4506.
71. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2561-2563.
72. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;601:213-223.
73. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* 2008 Apr;222:180-191.

74. Bronte V, Serafini P, Mazzone A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* 2003 Juni;24(6):302-306.
75. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2005 Aug;5(8):641-654.
76. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J. Immunol.* 2005 Okt 1;175(7):4583-4592.
77. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:267-296.
78. Maeurer MJ. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J. Clin. Invest.* 1996;98:1633-1641.
79. Ilett EJ, Prestwich RJD, Melcher AA. The evolving role of dendritic cells in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 März;10(3):369-379.
80. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat. Med.* 2001 Okt;7(10):1118-1122.
81. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, u. a. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Aug;9(4):470-481.
82. Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, u. a. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res.* 2003 Aug 1;63(15):4441-4449.
83. Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, u. a. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 2006 Sep 15;66(18):9299-9307.
84. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999 Juli 1;59(13):3128-3133.
85. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5211-5218.
86. Suttmüller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, u. a. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 2001 Sep 17;194(6):823-832.

87. Yagoda A, Bander NH. Failure of cytotoxic chemotherapy, 1983-1988, and the emerging role of monoclonal antibodies for renal cancer. *Urol. Int.* 1989;44(6):338-345.
88. Yagoda A. Chemotherapy of renal cell carcinoma: 1983-1989. *Semin Urol.* 1989 Nov;7(4):199-206.
89. Harris DT. Hormonal therapy and chemotherapy of renal-cell carcinoma. *Semin. Oncol.* 1983 Dez;10(4):422-430.
90. Yang JC, Childs R. Immunotherapy for renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006 Dez 10;24(35):5576-5583.
91. Gleave ME, Elhilali M, Fradet Y, Davis I, Venner P, Saad F, u. a. Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal-cell carcinoma. Canadian Urologic Oncology Group. *N. Engl. J. Med.* 1998 Apr 30;338(18):1265-1271.
92. Oliver RT, Nethersell AB, Bottomley JM. Unexplained spontaneous regression and alpha-interferon as treatment for metastatic renal carcinoma. *Br J Urol.* 1989 Feb;63(2):128-131.
93. Vogelzang NJ, Priest ER, Borden L. Spontaneous regression of histologically proved pulmonary metastases from renal cell carcinoma: a case with 5-year followup. *J. Urol.* 1992 Okt;148(4):1247-1248.
94. June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.* 2007 Juni;117(6):1466-1476.
95. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, u. a. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994 Aug 3;86(15):1159-1166.
96. Jotereau F, Pandolfino MC, Boudart D, Diez E, Dreno B, Douillard JY, u. a. High-fold expansion of human cytotoxic T-lymphocytes specific for autologous melanoma cells for use in immunotherapy. *J. Immunother.* 1991 Dez;10(6):405-411.
97. Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P, u. a. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 1999 Aug;17(8):2521-2529.
98. Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2006 Nov 1;24(31):5060-5069.
99. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, u. a. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 Dez 10;99(25):16168-16173.

100. King J, Waxman J, Stauss H. Advances in tumour immunotherapy. *QJM*. 2008 Sep;101(9):675-683.
101. Shablak A, Hawkins RE, Rothwell DG, Elkord E. T cell-based immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma: modest success and future perspective. *Clin. Cancer Res*. 2009 Nov 1;15(21):6503-6510.
102. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J. Immunol*. 2005 März 1;174(5):2453-2455.
103. Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2007 Feb;7(2):95-106.
104. Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res*. 2007 Nov 1;13(21):6247-6251.
105. Lien S, Lowman HB. Therapeutic anti-VEGF antibodies. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(181):131-150.
106. Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today*. 2003;39 Suppl C:1-16.
107. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, u. a. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med*. 2003 Juli 31;349(5):427-434.
108. Elaraj DM, White DE, Steinberg SM, Haworth L, Rosenberg SA, Yang JC. A pilot study of antiangiogenic therapy with bevacizumab and thalidomide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Immunother*. 2004 Aug;27(4):259-264.
109. Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol*. 2005 Feb 10;23(5):1028-1043.
110. Rini BI, Halabi S, Taylor J, Small EJ, Schilsky RL. Cancer and Leukemia Group B 90206: A randomized phase III trial of interferon-alpha or interferon-alpha plus anti-vascular endothelial growth factor antibody (bevacizumab) in metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2004 Apr 15;10(8):2584-2586.
111. Bleumer I, Oosterwijk E, Oosterwijk-Wakka JC, Völler MCW, Melchior S, Warnaar SO, u. a. A clinical trial with chimeric monoclonal antibody WX-G250 and low dose interleukin-2 pulsing scheme for advanced renal cell carcinoma. *J. Urol*. 2006 Jan;175(1):57-62.
112. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, u. a. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1993 Apr 15;90(8):3539-3543.
113. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, u. a. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor

- response. *Cell*. 1990 Feb 9;60(3):397-403.
114. Pardoll DM. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr. Opin. Immunol.* 1993 Okt;5(5):719-725.
 115. Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:399-415.
 116. Paoletti LC, Rench MA, Kasper DL, Molrine D, Ambrosino D, Baker CJ. Effects of alum adjuvant or a booster dose on immunogenicity during clinical trials of group B streptococcal type III conjugate vaccines. *Infect. Immun.* 2001 Nov;69(11):6696-6701.
 117. Li Y, Bendandi M, Deng Y, Dunbar C, Munshi N, Jagannath S, u. a. Tumor-specific recognition of human myeloma cells by idiotype-induced CD8(+) T cells. *Blood*. 2000 Okt 15;96(8):2828-2833.
 118. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, u. a. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*. 2002 März 1;99(5):1517-1526.
 119. Mitchell DA, Nair SK. RNA transfected dendritic cells as cancer vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000 Apr;2(2):176-181.
 120. Mitchell DA, Nair SK. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 2000 Nov;106(9):1065-1069.
 121. Strobel I, Berchtold S, Götze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther.* 2000 Dez;7(23):2028-2035.
 122. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, u. a. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*. 2001 Juli 1;98(1):49-56.
 123. Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int. J. Cancer*. 2001 Aug 15;93(4):539-548.
 124. Ferlazzo G, Semino C, Spaggiari GM, Meta M, Mingari MC, Melioli G. Dendritic cells efficiently cross-prime HLA class I-restricted cytolytic T lymphocytes when pulsed with both apoptotic and necrotic cells but not with soluble cell-derived lysates. *Int. Immunol.* 2000 Dez;12(12):1741-1747.
 125. Gong J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, u. a. Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J. Immunol.* 2000 Aug 1;165(3):1705-1711.

126. Koido S, Ohana M, Liu C, Nikrui N, Durfee J, Lerner A, u. a. Dendritic cells fused with human cancer cells: morphology, antigen expression, and T cell stimulation. *Clin. Immunol.* 2004 Dez;113(3):261-269.
127. Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* 2005 Sep;78(3):656-664.
128. Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, Steinman RM. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunol. Rev.* 2006 Aug;212:314-329.
129. Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, u. a. TNF-alpha drives human CD14⁺ monocytes to differentiate into CD70⁺ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J. Immunol.* 2007 Aug 1;179(3):1449-1457.
130. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 1994 Apr 1;179(4):1109-1118.
131. Cao H, Vergé V, Baron C, Martinache C, Leon A, Scholl S, u. a. In vitro generation of dendritic cells from human blood monocytes in experimental conditions compatible for in vivo cell therapy. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2000 Apr;9(2):183-194.
132. Morse MA, Lyerly HK, Li Y. The role of IL-13 in the generation of dendritic cells in vitro. *J. Immunother.* 1999 Nov;22(6):506-513.
133. Tarte K, Fiol G, Rossi JF, Klein B. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro. *Leukemia.* 2000 Dez;14(12):2182-2192.
134. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 2003 Juni 1;63(11):2836-43.
135. Ritchie DS, Yang J, Hermans IF, Ronchese F. B-Lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8(+) T-cells. *Scand. J. Immunol.* 2004 Dez;60(6):543-51.
136. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, u. a. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 1997 Dez 1;100(11):2757-65.
137. Schultze JL, Grabbe S, von Bergwelt-Baildon MS. DCs and CD40-activated B cells: current and future avenues to cellular cancer immunotherapy. *Trends in Immunology.* 2004

- Dez;25(12):659-664.
138. Ahmadi T, Flies A, Efebera Y, Sherr DH. CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology*. 2008;124(1):129-140.
 139. von Bergwelt-Baildon M, Shimabukuro-Vornhagen A, Popov A, Klein-Gonzalez N, Fiore F, Debey S, u. a. CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2786-9.
 140. Hörtl L, Rieser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H, u. a. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J. Urol*. 1999 März;161(3):777-782.
 141. Hörtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, u. a. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin. Cancer Res*. 2002 Nov;8(11):3369-3376.
 142. Oosterwijk-Wakka JC, Tiemessen DM, Bleumer I, de Vries IJM, Jongmans W, Adema GJ, u. a. Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study. *J. Immunother*. 2002 Dez;25(6):500-508.
 143. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, u. a. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res*. 2003 Mai 1;63(9):2127-2133.
 144. Wierecky J, Müller MR, Wirths S, Halder-Oehler E, Dörfel D, Schmidt SM, u. a. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res*. 2006 Juni 1;66(11):5910-5918.
 145. Davis ID. An overview of cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2000 Juni;78(3):179-195.
 146. Tovey MG, Lallemand C. Adjuvant activity of cytokines. *Methods Mol. Biol*. 2010;626:287-309.
 147. Gershanovich ML. [Use of interleukin-2 (proleukin, aldesleukin) in oncological practice]. *Vopr Onkol*. 2003;49(6):776-782.
 148. Hurley KE, Chapman PB. Helping melanoma patients decide whether to choose adjuvant high-dose interferon-alpha2b. *Oncologist*. 2005 Okt;10(9):739-742.
 149. Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, u. a. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J. Clin. Oncol*. 2003 Aug 15;21(16):3127-3132.

150. McDermott DF. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 2009 Mai 15;115(10 Suppl):2298-2305.
151. Vuky, Motzer. Cytokine therapy in renal cell cancer. *Urol. Oncol*. 2000 Nov 1;5(6):249-257.
152. Bukowski RM. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2. *Cancer*. 1997 Okt 1;80(7):1198-1220.
153. Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am*. 2000 Feb;6 Suppl 1:S55-57.
154. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C, u. a. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Français d'Immunothérapie. N. Engl. J. Med*. 1998 Apr 30;338(18):1272-1278.
155. Kammula US, White DE, Rosenberg SA. Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer*. 1998 Aug 15;83(4):797-805.
156. Panelli MC, White R, Foster M, Martin B, Wang E, Smith K, u. a. Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration. *J Transl Med*. 2004 Juni 2;2(1):17.
157. Hoiseth SK, Stocker BA. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*. 1981 Mai 21;291(5812):238-239.
158. Kotton CN, Hohmann EL. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect. Immun*. 2004 Okt;72(10):5535-5547.
159. Curtiss R. Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J. Clin. Invest*. 2002 Okt;110(8):1061-1066.
160. Dietrich G, Spreng S, Favre D, Viret J, Guzman CA. Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther*. 2003 Feb;5(1):10-19.
161. Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, Lemoine NR. Bacterial gene therapy strategies. *J. Pathol*. 2006 Jan;208(2):290-298.
162. Zöller M, Christ O. Prophylactic tumor vaccination: comparison of effector mechanisms initiated by protein versus DNA vaccination. *J. Immunol*. 2001 März 1;166(5):3440-3450.
163. Cochlovius B, Stassar MJG, Schreurs MW, Benner A, Adema GJ. Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity. *Immunol. Lett*. 2002 Feb 1;80(2):89-96.
164. Weth R, Christ O, Stevanovic S, Zöller M. Gene delivery by attenuated *Salmonella typhimurium*: comparing the efficacy of helper versus cytotoxic T cell priming in tumor

- vaccination. *Cancer Gene Ther.* 2001 Aug;8(8):599-611.
165. Loessner H, Weiss S. Bacteria-mediated DNA transfer in gene therapy and vaccination. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Feb;4(2):157-168.
166. Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA, Colombo MP. Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3172-3176.
167. Panthel K, Meinel KM, Sevil Domènech VE, Trülsch K, Rüssmann H. *Salmonella* type III-mediated heterologous antigen delivery: a versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int. J. Med. Microbiol.* 2008 Jan;298(1-2):99-103.
168. Loessner H, Endmann A, Leschner S, Bauer H, Zelmer A, zur Lage S, u. a. Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* 2008 Jan;298(1-2):21-26.
169. Asemissen AM, Brossart P. Vaccination strategies in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 4;58(7):1169-1174.
170. Gouttefangeas C, Stenzl A, Stevanović S, Rammensee H. Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Jan;56(1):117-28.
171. Wiltrout RH, Gregorio TA, Fenton RG, Longo DL, Ghosh P, Murphy WJ, u. a. Cellular and molecular studies in the treatment of murine renal cancer. *Semin. Oncol.* 1995 Feb;22(1):9-16.
172. Puaux A, Campanaud J, Salles A, Prévaille X, Timmerman B, Joly E, u. a. A very rapid and simple assay based on trogocytosis to detect and measure specific T and B cell reactivity by flow cytometry. *European Journal of Immunology.* 2006;36(3):779-788.
173. Rechavi O, Goldstein I, Kloog Y. Intercellular exchange of proteins: the immune cell habit of sharing. *FEBS Lett.* 2009 Juni 5;583(11):1792-1799.
174. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003 Juni;4(6):457-467.
175. Hummel S, Apte RN, Qimron U, Vitacolonna M, Porgador A, Zöller M. Tumor vaccination by *Salmonella typhimurium* after transformation with a eukaryotic expression vector in mice: impact of a *Salmonella typhimurium* gene interfering with MHC class I presentation. *J. Immunother.* 2005 Okt;28(5):467-479.
176. Weth R, Christ O, Stevanovic S, Zöller M. Gene delivery by attenuated *Salmonella typhimurium*: comparing the efficacy of helper versus cytotoxic T cell priming in tumor vaccination. *Cancer Gene Ther.* 2001 Aug;8(8):599-611.
177. Daubeuf S, Puaux A, Joly E, Hudrisier D. A simple trogocytosis-based method to detect,

- quantify, characterize and purify antigen-specific live lymphocytes by flow cytometry, via their capture of membrane fragments from antigen-presenting cells. *Nat Protoc.* 2007 1;1(6):2536-2542.
178. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *The Lancet.* 2009;373(9669):1119–1132.
179. Uemura H, De Velasco MA. Tumor vaccines in renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2008 Apr;26(2):147-154.
180. Tacke PJ, de Vries IJM, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 Okt;7(10):790-802.
181. Kim JH, Lee Y, Bae Y, Kim WS, Kim K, Im HY, u. a. Phase I/II study of immunotherapy using autologous tumor lysate-pulsed dendritic cells in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Immunol.* 2007 Dez;125(3):257-267.
182. Ji Q, Gondek D, Hurwitz AA. Provision of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor converts an autoimmune response to a self-antigen into an antitumor response. *J. Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1456-1463.
183. Berntsen A, Trepikak R, Wenandy L, Geertsen PF, thor Straten P, Andersen MH, u. a. Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial. *J. Immunother.* 2008 Okt;31(8):771-780.
184. Frankenberger B, Noessner E, Schendel DJ. Immune suppression in renal cell carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 2007 Aug;17(4):330-343.
185. Amato RJ. Vaccine therapy for renal cancer. *Expert Rev Vaccines.* 2008 Sep;7(7):925-935.
186. Jasani B, Navabi H, Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine.* 2009 Mai 26;27(25-26):3401-3404.
187. Gahan ME, Webster DE, Wesselingh SL, Strugnell RA, Yang J. Bacterial antigen expression is an important component in inducing an immune response to orally administered Salmonella-delivered DNA vaccines. *PLoS ONE.* 2009;4(6):e6062.
188. Bueno SM, González PA, Kalergis AM. Use of genetically modified bacteria to modulate adaptive immunity. *Curr Gene Ther.* 2009 Juni;9(3):171-184.
189. Weiss T, Vitacolonna M, Zöller M. The efficacy of an IL-1alpha vaccine depends on IL-1RI availability and concomitant myeloid-derived suppressor cell reduction. *J. Immunother.* 2009 Aug;32(6):552-564.
190. Riond J, Elhmouzi J, Hudrisier D, Gairin JE. Capture of membrane components via trogocytosis occurs "in vivo" during both dendritic cells and target cells encounter by CD8⁺ T cells. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2007;66(4):441-450.

191. Decker WK, Xing D, Li S, Robinson SN, Yang H, Yao X, u. a. Double loading of dendritic cell MHC class I and MHC class II with an AML antigen repertoire enhances correlates of T-cell immunity in vitro via amplification of T-cell help. *Vaccine*. 2006 Apr 12;24(16):3203-3216.
192. van der Bruggen P, Van den Eynde BJ. Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. *Curr. Opin. Immunol*. 2006 Feb;18(1):98-104.
193. Li X, Zhang Z, Schluesener HJ, Xu S. Role of exosomes in immune regulation. *J. Cell. Mol. Med*. 2006 Juni;10(2):364-375.
194. Wieckowski E, Whiteside TL. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles. *Immunol. Res*. 2006;36(1-3):247-254.
195. D' Hooghe E, Buttiglieri S, Bisignano G, Brusa D, Camussi G, Matera L. Apoptotic renal carcinoma cells are better inducers of cross-presenting activity than their primary necrotic counterpart. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007 Dez;20(4):707-717.
196. Banat GA, Christ O, Cochlovius B, Pralle HB, Zöller M. Tumour-induced suppression of immune response and its correction. *Cancer Immunol. Immunother*. 2001 Jan;49(11):573-586.
197. Graf MR, Sauer JT, Merchant RE. Tumor infiltration by myeloid suppressor cells in response to T cell activation in rat gliomas. *J. Neurooncol*. 2005 Mai;73(1):29-36.
198. Díaz-Montero CM, El Naggar S, Al Khami A, El Naggar R, Montero AJ, Cole DJ, u. a. Priming of naive CD8+ T cells in the presence of IL-12 selectively enhances the survival of CD8+CD62Lhi cells and results in superior anti-tumor activity in a tolerogenic murine model. *Cancer Immunol. Immunother*. 2008 Apr;57(4):563-572.
199. Bijker MS, van den Eeden SJF, Franken KL, Melief CJM, van der Burg SH, Offringa R. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur. J. Immunol*. 2008 Apr;38(4):1033-1042.
200. Ruter J, Barnett BG, Kryczek I, Brumlik MJ, Daniel BJ, Coukos G, u. a. Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines. *Front. Biosci*. 2009;14:1761-1770.
201. Andrews DM, Maraskovsky E, Smyth MJ. Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? *Immunol. Rev*. 2008 Apr;222:242-255.
202. Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood*. 2006 Okt 15;108(8):2655-2661.
203. Homey B, Meller S, Savinko T, Alenius H, Lauerma A. Modulation of chemokines by staphylococcal superantigen in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy*. 2007;93:181-194.

204. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Okt;14(5):409-426.
205. Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, u. a. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 2000 Sep 4;192(5):705-718.
206. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol. Rev.* 2000 Okt;177:175-184.
207. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J. Leukoc. Biol.* 1999 Juli;66(1):1-9.
208. Ranieri E, Gigante M, Storkus WJ, Gesualdo L. Translational Mini-Review Series on Vaccines: Dendritic cell-based vaccines in renal cancer. *Clin Exp Immunol.* 2007 März;147(3):395-400.
209. Vulink A, Radford KJ, Melief C, Hart DNJ. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Adv. Cancer Res.* 2008;99:363-407.

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Cerbazol
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	All-trans-Retinsäure
BMC	<i>Bone marrow cells</i>
bp	<i>Base pairs</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	Beziehungsweise
CAIX	Carbonanhydrase IX, G250
CCL	C-C-Chemokin-Ligand
CCR	C-C-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNS	<i>Complementary DNS</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CFU	<i>Colony-forming units</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocytes</i>
CXCR	C-X-C-Chemokin-Rezeptor
d	Tage
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DC	<i>Dendritic cell</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	Doppelsträngig
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbant assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme linked immunosorbant spot assay</i>
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>Foetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
g	Gramm
G250	Carbonanhydrase IX (CAIX)
G418	Geneticin
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GOLGA4	Golgi-Autoantigen, Golgin Subfamilie A, 4
Gy	<i>Gray</i>
h	Stunden
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IBF	Interfakultäre biomedizinische Forschungseinrichtung

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LNC	<i>Lymphnode cells</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
m	Milli
MAGE1	Melanom-Antigen-Familie A, 1
MAGE9	Melanom-Antigen-Familie A, 9
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mol	Mol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNS	<i>Messenger RNS</i>
μ	Mikro
n	Nano
NK	Natürliche Killerzellen
NO	<i>Nitric oxide</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered Salin</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Renca	<i>Renal cell carcinoma cell line</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Revolution per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
SADA	<i>Serum antibody detection assay</i>
sec	Sekunde
s.c.	Subkutan
SEREX	<i>Serological identification of antigens by recombinant expression cloning</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SL	<i>Salmonella typhimurium</i>
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SSC	<i>Side Scatter</i>
Streptavidin-APC	Streptavidin-Allophycocyanin
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCGF	<i>T cell growth factor</i>
TGF-beta	<i>Transforming growth factor-beta</i>

Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	<i>Trogocytosis Assay Protocol</i>
Treg-Zellen	Regulatorische T-Zellen
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	Zum Beispiel

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Margot Zöller dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gab, auf einem so wunderbaren Gebiet meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich möchte mich für das entgegengebrachte große Vertrauen, das stets offene Ohr und die Unterstützung an allen Fronten bedanken, die es mir ermöglichten, mich und meine Ideen zu entwickeln und zu verwirklichen. Das hat Spaß gemacht. Das war fantastisch.

Es ist unmöglich jedem gerecht zu werden. Das ist utopisch. An dieser Stelle soll deshalb allen mein Dank gelten, die mich während meiner Zeit als Doktorand unterstützt haben. Dies sind jene, die mit Rat dienten und mit Taten beistanden. Es sind all jene, die mir einen Augenblick schenkten und sich Zeit nahmen. Es sind auch die, welche das Talent haben, Zeit zu verkürzen und Raum zu schaffen. Das war Zauberei.

Und ich danke Anne, der größten Zauberin von allen. Mit ihrem Zauber nur für mich. Das ist Liebe.

Lebenslauf

Nicolás Nathaniel Herbert
Diplom Biologe

Bergheimer Straße 25
69115 Heidelberg

Persönliche Angaben

Geburtstag/-ort: 24. August 1979 in Frankfurt am Main
Familienstand: ledig

Dissertation

Seit Juni 2006 Promotionsstudium, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

Thema:
„Vakzinierungsstrategien für die Immuntherapie des Nierenzell-
karzinoms“

Betreut von Prof. Dr. Margot Zöller

Durchführung

Seit März 2008 Universitätsklinikum Heidelberg
Experimentelle Chirurgie – Tumorzellbiologie
Im Neuenheimer Feld 365, 69115 Heidelberg

Juni 2006 - März 2008 Deutsches Krebsforschungszentrum DKFZ, Heidelberg
Tumorprogression und Tumorabwehr
Im Neuenheimer Feld 280, 69115 Heidelberg

Studium

Oktober 2001 - Januar 2006 Studium der Biologie, Technische Universität Kaiserslautern
Abschluss als Diplom Biologe

Titel der Diplomarbeit:
„Modulation der Expression inflammatorischer Mediatoren
durch Stickstoffmonoxid und Hypoxie“

Wehrdienst

September 2000 - Juni 2001 Panzergrenadierbataillon 52 in Rothenburg an der Fulda
Grundwehrdienst

Schule

August 1990 - Juni 2000 Augustinerschule, Gymnasium des Wetteraukreises Friedberg
Abschluss: Abitur

Publikationen

Artikel:

Herbert N, Haferkamp A, Schmitz-Winnenthal FH, Zöller M, Concomitant tumor and autoantigen vaccination supports antigen-specific renal cell carcinoma rejection, Journal of Immunology, in press

Schubert M, Herbert N, Taubert I, Ran D, Singh R, Eckstein V, Vitacolonna M, Ho A, Zöller M, Differential survival of AML subpopulations in NOD/SCID mice, submitted

Vitacolonna M, Schubert M, Herbert N, Taubert I, Singh R, Ho A, Zöller M, Improved T and B cell recovery by the transfer of slowly dividing human hematopoietic stem cells, Leukemia Research (2009)

Poster:

Herbert N, Zöller M, Vaccination strategies for the immunotherapy of Renal Cell Carcinoma, 2nd European Congress of Immunology (ECI), Berlin, September 2009

Herbert N, Xie C, Zöller M, Vaccination strategies for the immunotherapy of Renal Cell Carcinoma, Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI), Vienna, Austria, September 2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe sowie die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung beachtet habe

Heidelberg, den 01. Juni 2010

Nicolás Nathaniel Herbert