

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung

der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Drs. h.c. Konrad Meßmer

jetziger Vorstand: Prof. Dr. A. Baethmann

# **Immunisierung gegen das Tumorantigen CEA: Vergleichende Untersuchung an Wildtyp- und CEA transgenen Mäusen.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Helmut Muders

aus

Duisburg

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg A. Enders

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Th. Brocker

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. M. Mack

Prof. Dr. M. Hallek

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2003

Meinem Sohn Pascal, der am Tag der mündlichen Promotionsprüfung  
geboren wurde,  
meiner Frau Beate  
und meinen Eltern.

**Gliederung und Inhaltsangabe**

1	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Historischer Überblick zur Entwicklung von Tumorvakzinen	1
1.2	CEA als mögliches Zielprotein	8
1.2.1	Beschreibung und Expression von CEA	8
1.2.2	Bisherige Immunisierungsschemata gegen kolorektale Karzinome und gegen das Tumorantigen CEA	9
1.3	Das Modell	13
2	<b>Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Wildtypmäuse	14
2.2	CEA transgene Mäuse	14
2.3	CEA Transfektion der Tumorzellen	15
2.4	In vivo Experimente	16
2.4.1	Tumortransplantation	16
2.4.2	Vakzinierungsprotokolle	16
2.4.3	Detektion von gegen CEA gerichteten Antikörpern	17
2.4.4	Detektion der hämatogenen Tumorzellstreuung in die Milz	18
2.4.5	Chromium Release Assay zur Detektion der Zytotoxizität	18
2.4.6	Zellfragmentationsassay zur Detektion der Zytotoxizität	19
2.4.7	Immunhistochemie	19
2.4.8	Detektion von CEA-DNA	20
2.4.9	CEA Detektion im Stuhl	21
3	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Untersuchungen in den Wildtyptieren	22
3.1.1	Wachstumscharakteristik der L1210-Zelllinie	22
3.1.2	Biologisches Verhalten der transfizierten Tumorzellen	23
3.1.3	Immunologische Reaktion des Mäuseorganismus auf CEA-transfizierte Tumorzellen	24
3.1.4	Immunreaktion nach intraperitonealer Vakzinierung mit Tumorzellen und Adjuvans	28
3.1.5	Immunreaktion nach intravenöser Vakzinierung mit beladenen autologen Lymphozyten	31
3.2	Untersuchungen in den transgenen Tieren	33
3.2.1	Eigenschaften und Generierung der transgenen Tiere	33
3.2.2	Wachstumsverhalten der Wildtyp- und der transfizierten Tumorzellen nach Transplantation	35
3.2.3	Immunreaktion nach Adjuvansimmunisierung	37
3.2.4	Immunantwort nach Vakzinierung mit beladenen Lymphozyten	39
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	41
4	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	Das Tumorantigen CEA als Abstoßungsantigen	43
4.2	Immunologische Reaktion nach Gabe von CEA transfizierten Tumorzellen	44
4.3	Die Effektivität der Antikörper	45
4.4	Die zelluläre Immunantwort gegen CEA	48
4.5	Die Immunisierung mit Adjuvans	50
4.6	Die Spezifität der Immunisierung	51
4.7	Das „cross-priming“	52

			<u>Inhaltsverzeichnis</u>
4.8	Die Effektivität der zytotoxischen Antwort	54	
4.9	Die Vakzinierung mit beladenen Lymphozyten	55	
4.10	Die Reaktion der transgenen Tiere auf transfizierte Tumorzellen	56	
4.11	Induktion einer zytotoxischen Antwort in den transgenen Tieren	57	
4.11.1	Die Überwindung der Toleranz gegen das Antigen CEA	57	
4.11.2	Die Spezifität der Adjuvansimmunisierung im transgenen Tiermodell	60	
4.11.3	Die Immunisierung mit beladenen Lymphozyten im transgenen Tiermodell	61	
4.11.4	Andere CEA transgene Tiermodelle	62	
4.11.5	Schlussfolgerung	63	
5	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>	
6	<b>Literatur</b>	<b>66</b>	
7	<b>Lebenslauf</b>	<b>84</b>	
8	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>	

**Abkürzungsverzeichnis**

cDNA	Zelluläre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CMV	Zytomegalievirus
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
E/T	Effektor- zu Zielzellverhältnis
IL-2	Interleukin 2
kDa	Kilodalton
L5	CEA transfizierte L1210-Zelllinie
MHC	Major Histocompatibility Complex
OVA	Ovalbumin
RNA	Ribonukleinsäure
T <sub>H1</sub> -Lymphozyten	T-Helferzellen-Lymphozyten vom Typ 1
T <sub>H2</sub> -Lymphozyten	T-Helferzellen-Lymphozyten vom Typ 2

# **1 Einleitung**

## **1.1 Historischer Überblick zur Entwicklung von Tumorstoffen**

Die Behandlung maligner Tumorerkrankungen ist seit Jahren Teil dreier miteinander interagierender Subspezialitäten: der Chirurgie, der Strahlentherapie und der internistischen Onkologie.

Die Chirurgie war das erste Fachgebiet, das erfolgreich zur Therapie von Malignomen eingesetzt wurde. So war während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Chirurgie mit den beiden Pionieren Billroth und Halsted die einzige Disziplin, die Krebskranke erfolgreich behandeln konnte. Auch heute noch ist die einzige kurative Therapie vieler solider Tumoren die chirurgische Resektion. Die Chirurgie spielt im ausgehenden 20. Jahrhundert eine sehr wichtige Rolle bei der Diagnose, der Stadieneinteilung und der Prävention maligner Erkrankungen. Neben der Chirurgie entwickelte sich die Radiotherapie zur unverzichtbaren Säule in der onkologischen Behandlung. Die Strahlentherapie nutzt die unterschiedliche Strahlensensitivität des normalen und des Tumorgewebes. Im Idealfall sollte das Tumorgewebe zerstört werden, während das normale umgebende Gewebe geschont wird. Während Chirurgie und Strahlentherapie Behandlungsschemata sind, die ausschließlich bei der Behandlung lokaler maligner Prozesse eingesetzt werden, ist die systemische Chemotherapie ein wichtiger Bestandteil bei der Therapie von disseminierten malignen Prozessen. Dieser Therapieansatz ermöglicht die Heilung vieler lymphoproliferativer Tumoren wie der Lymphome und Leukämien. Aber auch bei soliden Tumoren, wie bei Mammakarzinomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen, Harnblasenkarzinomen und Analkarzinomen, zeigen sich signifikante Erfolge durch chemotherapeutische Behandlungsschemata.

Trotz großer Erfolge in der Tumorthherapie in den letzten Jahrzehnten sind die Heilungschancen immer noch unbefriedigend. Hauptgrund für Therapieversagen ist die lymphogene und hämatogene Metastasierung einzelner Tumorzellen (Jeffers M.D. et al., 1994; Adell G et al., 1996; International Breast Cancer Study Group, 1990), die man trotz immer fortschrittlicherer Chemotherapieschemata noch nicht ausreichend beherrscht.

Eine andere Möglichkeit, disseminierte Tumorzellen aktiv zu bekämpfen, stellt der Aufbau einer Immunantwort dar. Dazu müssen Merkmale der Tumorzellen

gefunden werden, die sie von normalen Zellen unterscheiden und die so dem aktivierten Immunsystem als Zielmoleküle dienen könnten.

Der Gedanke, dass Tumorzellen durch das Immunsystem erkannt und bekämpft werden, ist schon seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Bereits 1943 demonstrierte Gross et al., dass die intradermale Immunisierung von Mäusen gegen chemisch - mit Methylcholanthren - induzierte Sarkome die Tiere vor einem erneuten Anwachsen von Tumoren schützte (Gross L. et al, 1943). Man ging von einer spezifischen Immunantwort, die gegen chemisch induzierte Neoantigene auf den Tumoren gerichtet war, aus. Die Untersuchungen zur Immunogenität von Tumorzellen gipfelte in der Entdeckung Tumor-spezifischer Antigene auf den chemisch induzierten Sarkomen (Foley E.J. et al, 1953; Baldwin R.W. et al, 1955; Prehn R.T. et al, 1957; Klein G. et al, 1960; Globerson A. et al, 1964), die exakt aber erst später definiert wurden. Nachdem man Antigene auf chemisch-induzierten Neoplasien entdeckt hatte, folgten weitere Beschreibungen von Antigenen in durch onkogene Viren induzierte Tumoren (Defendi V. et al, 1963; Khera K.S. et al, 1963; Sjörgen H.O. et al, 1961).

Zur weiteren Charakterisierung der zellulären Immunantwort gegen Tumorantigene wurden Lymphozyten von Patienten mit spontan wachsenden Tumoren isoliert und deren Zytotoxizität gegen Tumorzellen getestet. Diese Assays maßen die Fähigkeit der Lymphozyten, die Bildung von Tumorzellkolonien zu verhindern, sowie die Fähigkeit der Tumorzellen, reaktive Lymphozyten zur Proliferation zu bringen. (Hewitt H.B. et al, 1976; Middle J.G. et al, 1981; Rosenberg S.A. et al, 1986; Topalian et al, 1990). All diese Experimente zeigten, daß eine Zell-medierte Erkennung von Antigenen auf frischen Tumorzellen existiert, die aber gewöhnlich sehr schwach ist und im weiteren durch Verwendung von Interleukinen und anderen Mediatoren des Immunsystems verstärkt werden sollte. So führte die systemische Applikation des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 in Tiermodellen zu einer Reduktion der Tumormasse durch spezifische T-Lymphozyten, die gegen ein Tumorantigen gerichtet waren (Muul L.M. et al, 1987). Erstmals gelang die Identifikation dieser für die Immunantwort so wichtigen Antigene durch die in vitro Expansion von reaktiven Lymphozyten aus Blut (sogenannte Lymphokine activate killer Zellen, abgekürzt LAKs) und aus Tumorgewebe (sogenannte Tumor infiltrierenden Lymphozyten, abgekürzt TILs) durch die Stimulation mit IL-2 und Tumorzellen (Morgan D.A. et al, 1976; Grimm



EA. et al, 1982; Rosenstein M. et al, 1984). Der Transfer dieser anti-Tumor T-Zellen, die im wesentlichen CD3+ und CD8+ waren, brachte Tumoren in Mäusen und Menschen zur Regression (Rosenberg SA. et al, 1986, Toes R. et al, 1996). Ein weiterer entscheidender Schritt bei der Identifizierung von Tumorantigenen gelang Anfang der 90er Jahre (van der Bruggen et al, 1991). Durch Expressionsklonierung konnte ein für maligne Melanome spezifisches Tumorantigen gefunden werden. Dabei wurde eine nicht immunogen wirkende Melanomzelllinie, die offensichtlich ihr Antigen verloren hatte, mit Vektoren einer cDNA-Bibliothek, die aus Melanomzellen gewonnen wurde, transfiziert und gezeigt, dass die transfizierten Zellen von spezifischen zytotoxischen T-Zellen eines Melanompatienten erkannt wurden. Die auf diesem Weg isolierte Gengruppe wurde MAGE (Melanoma antigen) benannt, das isolierte Antigen MAGE-1 (Melanoma antigen-1). Anders als bei früheren Publikationen über Tumor-assoziierte Antigene beschrieben, war MAGE kein durch Mutation entstandenes Antigen oder ein nur in malignen Zellen vermehrt auftretendes Peptid, sondern eine in den meisten normalen, nicht pathologischen Zellen nicht abgelesene aber vorhandene Genfamilie, die bei der malignen Transformation auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert wird. MAGE-Proteine wurden mittlerweile auch auf Karzinomen der Harnblase, Mamma, Lunge und Prostata nachgewiesen. Auf normalen, nicht neoplastisch veränderten Geweben ist die Expression von MAGE auf Testis und Placenta beschränkt. Diese beiden Lokalisationen sind immunologisch besonders privilegiert und werden vom Immunsystem nicht erkannt. Es wurde gezeigt, daß MAGE HLA-A1 restringiert präsentiert wird und zytotoxischen T-Lymphozyten als Zielmolekül dienen kann (Traversari C. et al, 1992). Zusätzlich wurden bis heute noch die Genfamilien BAGE, LAGE und GAGE beschrieben, die MAGE in ihrer Verteilung und ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind. Die Beschreibung von Tumorantigenen bildete die Grundlage zur Entwicklung von Vakzinierungsstrategien gegen Malignome. Neben der Existenz von spezifischen Antigenen für Tumoren ist für die Vakzinierung entscheidend, daß diese auf entsprechenden MHC- Klasse I-Komplexen der entarteten Zellen den T-Lymphozyten präsentiert werden. MHC-Klasse I (MHC I) ist ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Molekül, das intrazellulär prozessierte Protein aufnimmt und den spezifisch-zytotoxischen CD8 positiven T-Lymphozyten präsentiert. Mittlerweile wurde auch eine kleine

Untergruppe von CD4 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten beschrieben, die MHC Klasse II (MHC II) restringierte Antigene erkennen können. MHC II ist im Gegensatz zu MHC I das für die Präsentation von extrazellulär aufgenommenen Proteinen zuständige Oberflächenmolekül. In der letzten Zeit haben Untersuchungen gezeigt, dass die Grenzziehung zwischen den Proteinen, die MHC I und denen, die MHC II restringiert präsentiert werden, durchaus durchgängig sein kann. So wurde im Rahmen des sogenannten Cross-Primings gezeigt, dass extrazelluläre Proteine auch auf MHC I Molekülen den immunkompetenten Zellen, also den CD 8 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten, präsentiert werden können. Gerade dies ermöglicht neue Strategien und Wege bei der Immunisierung gegen Tumorantigene.

Neben der Präsentation der Tumorantigene gibt es weitere entscheidende Voraussetzungen, die bei der Entwicklung wirkungsvoller Vakzinen erfüllt sein müssen. So sind die meisten Tumorantigene sogenannte Autoantigene, gegenüber denen das Immunsystem tolerant ist. Allerdings ist die Toleranz gegen Autoantigene inkomplett. In der Phase der Induktion einer Toleranz im Thymus des jungen Organismus werden die Klone der autoreaktiven T-Lymphozyten eliminiert (zentrale Toleranz). Die Entwicklung einer Toleranz gegen Selbstantigene scheint allerdings inkomplett zu sein. Es werden nur T-Zellen mit einer starken Bindungsfähigkeit gegen Selbstantigene deletiert. Außerdem spielt die Epitopdichte eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Toleranz. Ist diese sehr niedrig, so erfolgt keine Induktion einer Toleranz. Im Blutkreislauf findet man deshalb auch autoreaktive T-Zellen, die zwar Autoantigene erkennen, aber nur eine geringe Affinität zu den Selbstantigenen haben (Poindexter et al., 1992; Cibotti et al., 1994; Oehen et al., 1994; von Herrath et al., 1994; Poplonski et al., 1996). Die Vakzinierung gegen bekannte Tumorantigene muss also die Fähigkeit besitzen, die T-Zellen derart zu aktivieren, dass ihre geringe Avidität zu den Antigenen verstärkt und damit die periphere Toleranz überwunden werden kann. Untersuchungen zeigen nämlich, dass die Bindungsfähigkeit der zytotoxischen T-Lymphozyten zu den Zielantigenen ein entscheidender Parameter der Abstoßung zu sein scheint (Speiser et al., 1992; Alexander-Miller et al., 1996; Gallimore et al., 1998; Zeh Illrd et al., 1999). Nur eine hohe Avidität der CTL gegen ihre Zielantigene sichert die in vivo Wirksamkeit der CTL. Einer der wichtigsten Parameter, der die Wirksamkeit von Vakzinierungen gegen Tumorantigene

determiniert, ist also die Affinität der T-Zellen, die gegen die wachsenden Tumorzellen und ihre Antigene aktiviert werden kann. Und gerade das stellt die Herausforderung bei der Entwicklung von Vakzinierungsprotokollen gegen diese Tumorantigene dar: Mit welcher Immunisierungsmethode gelingt es, die periphere Toleranz zu überwinden, also die Affinität der T-Lymphozyten gegen die Tumorantigene zu erhöhen? Doch um diese Frage experimentell beantworten zu können, müssen zunächst Antigene definiert werden, gegen die vakziniert werden könnte. Es müssen Tumorantigene gefunden werden, die möglichst spezifisch auf Tumorzellen vorkommen. Warum sollte es solche Antigene geben und welche Mechanismen führen zur Entstehung solcher Antigene?

Die Tumorantigene lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 1). Zunächst zu den Proteinprodukten veränderter Gensequenzen: Es gibt in Malignomen zahlreiche Mutationen und Translokationen im Genom der entarteten Zellen. Diese Veränderungen können in Genen vorkommen, die für Proteine kodieren, die an der Oberfläche oder auch im Zytoplasma der Zelle exprimiert werden. Hierzu gehören mutierte Tumorsuppressorgene (p53) (Vierboom M. et al, 1997, Van der Burg S.H. et al, 2002), aber auch durch Mutationen oder Genrearrangements aktivierte Protoonkogenprodukte (p210 Proteinprodukt bei der bcr-abl Translokation) (Sun J.K. et al, 2002). Es entstehen also Genprodukte, gegen die keine immunologische Toleranz besteht und die für jeden einzelnen Tumor spezifisch sind. Sie repräsentieren die genetische Instabilität von maligne transformierten Zellen.

Aber auch Genprodukte von onkogenen Viren (z.B. EBNA-1 Genprodukt) werden von den Tumorzellen exprimiert und können als Tumor-spezifische Abstoßungsantigene fungieren (Paludan C. et al, 2002).

Genauso können Tumorzellen Proteine produzieren, die zwar physiologisch vorkommen, aber nur in geringen Mengen oder an exklusiven, dem Immunsystem nicht zugänglichen Orten exprimiert werden. Oft sind dies Produkte von stummen im Prozess der Karzinogene reaktivierten oder amplifizierten Genen, gegen die keine Toleranz besteht und die als Abstoßungsantigene fungieren könnten. Bekanntestes Beispiel aus diesem Bereich ist das Melanoma-Antigen MAGE (Boon T et al, 1994; Lucas et al, 1998), aber auch die Amplifikation des Her-2/neu Protoonkogens (Mukai K. et al, 2002; Castilleja et al, 2002).

Auch onkofetale Antigene, die nur in den frühen Stadien der Entwicklung exprimiert werden und bei der Karzinogenese reaktiviert werden, können als Abstoßungsantigene fungieren. Ein bekanntes Beispiel ist AFP (Alpha-Fetoprotein). Aber auch CEA (Karzinoembryonales Antigen) gehört zu dieser Gruppe der Tumor-assoziierten Antigenen.

Immunisierungsversuche müssen also den Versuch unternehmen, eines dieser exklusiv oder hauptsächlich auf Tumorzellen exprimierten Proteine als Zielantigen für die zelluläre Immunantwort zu verwenden. Als ein Kandidat für eine Vakzinierung kommt das von Gold und seiner Arbeitsgruppe 1965 beschriebene und sehr häufig auf Adenokarzinomen des Kolon, Pankreas, Mamma und Zervix vorkommende onkofetale Tumorantigen CEA (Gold P et al, 1965) in Frage.

Antigene	Tumor
<b>Physiologisch vorkommende Proteine</b>	
MAGE-1, 3	Melanom, Bronchialkarzinom, Mamma
BAGE	Melanom, Bronchialkarzinom, HNO-Bereich,
GAGE	Sarkome
MART-1	Melanom
Gp100	Melanom
Tyrosinase	Melanom
Gp75	Melanom
P15	Melanom
PSA	Prostata
CEA	Kolon, Mamma, Karzinome im Gastrointestinaltrakt
Her-2-neu	Mamma, Ovarien, etc.
<b>Mutierte Proteine</b>	
Ras	Viele Tumorentitäten, Lunge, Pankreas
P53	Viele Tumorentitäten
<b>Fusionsproteine</b>	
Bcr-abl	CML
Pax3-fkhr	Alveoläres Rhabdosarkom
Ews-fli-1	Ewings Sarkom
<b>Virale Proteine</b>	
HPV-16 E6/E7	Zervix
<b>Abnorm glykosylierte Muzine</b>	
Muc-1	Mamma, Pankreas

**Tabelle 1:** Mögliche T-Zell-Antigene für eine Vakzinierungstherapie gegen maligne Tumoren.

## **1.2 CEA als mögliches Zielprotein**

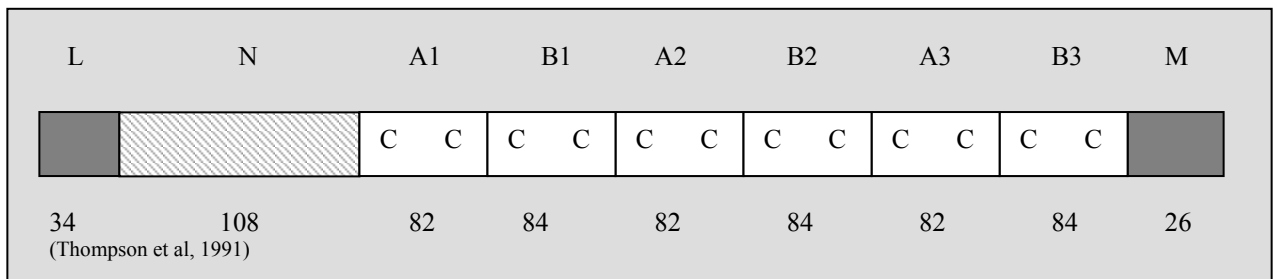
### **1.2.1 Beschreibung und Expression von CEA**

Die CEA Genfamilie gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie und wird auf dem langen Arm des Chromosoms 19 (19q13.2) lokalisiert (Khan W.N. et al, 1992). Die Genfamilie kodiert für zwei unterschiedliche Gruppen von Proteinen, die CEA assoziierten Moleküle und die Gruppe der pregnancy-specific-Glykoproteine (PSG) zugerechneten Moleküle (Thompson J et al, 1988; Thompson J et al, 1991). PSG wird ausschließlich sezerniert und scheint eine immunsupprimierende Funktion während der Schwangerschaft zu haben (Kromer B., 1996), während CEA auf den Zellen exprimiert wird. Zur CEA Untergruppe gehören die dem CEA verwandten Zelladhäsionsproteine, die auf zahlreichen epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen exprimiert werden (sogenannte Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule, abgekürzt CEACAM) (Obrink B. et al, 1997; Barnett T et al, 1989). Alternatives Splicing führt zu zahlreichen weiteren, dem CEA verwandten Proteinen, die nicht nur bei Zelladhäsion, sondern auch bei der Neoangiogenese eine Rolle spielen (Wagener C. et al, 2000).

Das Protein CEA ist ein durch posttranslationale Modifikation hochgradig glykosiliertes 210 kDa schweres integrales Membranprotein, das durch einen GPI Anker (Glykosyl-phosphatidyl-inositol-anker) auf der Zellmembran fixiert ist (Abbildung 1). Physiologischerweise wird CEA in den ersten beiden Trimestern der Schwangerschaft in großen Mengen im Bereich des Darmes, des Pankreas und der Leber exprimiert (Nap M. et al, 1988; Albers G.H. et al, 1988). Beim Erwachsenen findet man eine geringe Expression im Darm und der laktierenden Mamma. Hohe Expression findet man beim Adulten auf Adenokarzinomen.

Dort ist es – ähnlich wie die verwandten Proteine - ein extrazelluläres Adhäsionsmolekül, das eine Rolle bei der Interaktion der Tumorzellen untereinander und der Kommunikation der Karzinomzellen mit dem peritumoralen Gewebe spielt (Oikawa S. et al, 1989).

Neben der ortsständigen Expression wird CEA auch in das Blutserum als freies Protein abgegeben. Deshalb kann der CEA-Titer im Serum vor therapeutischen Eingriffen, sowie dessen Verlauf nach Therapie, zur Früherkennung möglicher Malignomrezidive und zur Abschätzung der Prognose des Patienten verwendet werden.



**Abbildung 1** : Aufbau des CEA-Proteins.

L= Leader Peptide; N= N-terminales Stück; A1-A3 und B1-B3= IgC ähnliche Abschnitte; M=hydrophober Abschnitt, der dann durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) ersetzt wird.

### 1.2.2 *Bisherige Immunisierungsschemata gegen kolorektale Karzinome und gegen das Tumorantigen CEA*

Aufgrund der Häufigkeit von kolorektalen Karzinomen in den Industrieländern wurde schon früh versucht, gegen diese zu immunisieren (Tabelle 2). In den späten 70er und frühen 80er Jahren wurde eine autologe Ganzzelltumorstoffimpfung gegen kolorektale Neoplasien, die mit dem Adjuvans BCG appliziert wurde, entwickelt (Hanna MG et al, 1989). In ersten klinischen Tests induzierte die Vakzine eine „Delayed Type Hypersensitivity-Antwort“ bei einem Hauttest, der autologe Tumorzellen enthielt, aber keine Reaktion gegen normale Kolonepithelien (Hoover HC et al, 1985). Die DTH-Antwort (Delayed Type Hypersensitivity) wird durch die intradermale Applikation eines Antigens, das dem Immunsystem als Immunogen schon bekannt ist, hervorgerufen. Das bekannte Antigen induziert eine Immunreaktion, die zu der typischen, durch Freisetzung von Lymphokinen durch T-Lymphozyten hervorgerufenen Induration - assoziiert mit einem Erythem der Haut 24h bis 48h nach der Injektion - führt. Die DTH zeigt, dass das Antigen durch das Immunsystem erkannt wird und memory-T-Zellen aktivieren kann. Sie ist spezifisch für eine durch T-Lymphozyten getragene zelluläre Immunreaktion, die auch beim Tuberkulin- oder Mantoux-Test verwandt wird. Nach diesem Anfangserfolg wurde eine Studie mit Dukes-C-Patienten, deren Tumor vollständig reseziert worden war, ohne Kontrollarm gestartet. (Hoover HC et al, 1985) Dabei wurde eine Verlängerung des erkrankungsfreien Intervalls und auch der Überlebenszeit gefunden. Allerdings konnten diese Ergebnisse in einer

prospektiven Phase III Studie mit Dukes B und Dukes C Patienten durch die Eastern Cooperative Oncology Group nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich keinerlei Effekt durch die Vakzinierung (Harris J et al, 1994). Während sich diese Arbeiten mit der unselektiven Adjuvansimmunsierung mit Hilfe autologer Tumorzellen beschäftigten, versuchten die neueren Schemata spezifisch gegen CEA als Antigen zu vakzinieren. Grundlage hierfür waren sowohl die Entdeckung, dass CEA-Epitope auf MHC-I Molekülen gebunden werden können (Ras E. et al, 1997; Kawashima I et al, 1998; Nukaya I et al, 1998; Kim C et al, 1998; Keogh E et al, 2001) als auch die Entdeckung, dass beim Menschen spezifische T-Zell-Klone gegen CEA existieren. Diese Schemata verwendeten für ihre Immunisierungen dendritische Zellen als Träger für CEA oder aber das CEA-Protein allein, sowie CEA-anti-Idiotypen (Morse M. et al, 1999; Samanci A. et al, 1998; Foon K. et al, 1997). Ein am Tier etabliertes Modell benutzte als genetischen Träger für das CEA-Gen den Vaccinia-Vektor (Kantor J et al, 1992) und verwendete DNA zur Vakzinierung. Es ließ sich bei der rV-CEA (rekombinante attenuierte Vacciniavirus-DNA als Vakzinierungsvektor) Immunisierung beweisen, dass sich eine spezifische T-Zell-Antwort gegen ein HLA-A2 restringiertes 9 Aminosäuren langes CEA-Peptid aufbauen läßt. Auch Immunomodulatoren wie das als autokriner T-Zell-Wachstumsfaktor so wichtige IL-2 wurden zur Verstärkung einer spezifischen Immunantwort gegen CEA genutzt (McLaughlin et al, 1996). Diese Studien waren auch in vivo effektiv und konnten das Tumorstadium im Tier verringern. Es zeigten sich allerdings große Schwierigkeiten bei der Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse (weitere tierexperimentelle Studien: Bei R., 1994; Conry R.M., 1995) auf den menschlichen Organismus. Zwar konnten bei den zahlreichen klinischen Studien eine humorale oder zelluläre immunologische Reaktion gegen CEA im Menschen nachgewiesen werden (Zhu M. et al, 2000; Marshall J. et al, 1999; Marshall J. et al, 2000; Berinstein N.L. et al, 2002), aber in nur sehr wenigen Studien konnte ein objektivierbarer Erfolg der Vakzinierung gegen CEA gemessen werden. Dieser blieb auf Einzelfälle beschränkt. Eine Schwierigkeit in der Übertragung der Tierexperimente auf den Menschen ist, dass meist humanes CEA verwendet wurde, das den Nagern als Protein nicht bekannt ist. Es gibt zwar Homologien zum humanen CEA im Tierorganismus, die aber alle in entscheidenden Sequenzen nicht mit dem menschlichen CEA übereinstimmen (Rudert et al., 1992; Eades-Perner et al.,



1994). Es könnte also Unterschiede in der immunologischen Reaktion gegen CEA im murinen und im humanen Organismus geben. Es müssen Wege gefunden werden, Immunisierungsversuche gegen CEA in einem Modell zu testen, das die Tatsache, dass CEA beim Menschen in der Fetalzeit exprimiert wird und deshalb ein dem humanen Organismus bekanntes Protein darstellt, berücksichtigt.

Vakzine	Studie/Krankheit	Patienten	Resultat
Autologes Kolon/BCG-Adjuvant	Randomisiert; postoperativ adjuvant	Dukes C, 103 Dukes B, 266	Kein Effekt der Vakzine auf das Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe (Harris et al., 1994)
Autologes Kolon/BCG Adjuvant	Randomisiert, postoperativ, adjuvant, prospektiv	Dukes B2 und B3 Dukes C Insgesamt 254	Signifikante Reduktion der Rückfallrate; kein signifikanter Effekt auf Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vermorken et al; 1999)
Vaccinia-CEA	Phase I; Vakzinenapplikation monatlich 3x	26; Kolon 17	Keine objektivierbare Anti-Tumor-Antwort; T-Zell-Antwort gegen HLA-A2 CEA Peptid (Hamilton JM. et al, 1994)
CEA Antiidiotyp/alum Adjuvant	Phase I, fortgeschrittene Erkrankung	12	75% entwickelten einen Anti-CEA-Antikörper, 33% eine T-Zell proliferative Antwort (Herlyn et al., 1994)

**Tabelle 2:** Resultate einiger ausgewählter klinischer Studien mit Vakzinationsschemata zur Therapie von Kolonkarzinomen.

### **1.3 Das Modell**

Um nun die Diskrepanz zwischen Tiermodellen und Menschen zu untersuchen und ein Modell zu schaffen, das dem menschlichen Organismus näher kommt als die meisten anderen Modellsysteme, verwendeten wir CEA transgene Nager, deren Expressionsmuster von CEA der des Menschen weitgehend gleicht und arbeiteten mit CEA transfizierten Tumorzellen.

An diesem Modellsystem wurden folgende Fragen untersucht: 1. Ist es möglich, eine Immunantwort gegen CEA zu induzieren? 2. Wie läßt sich diese Immunantwort charakterisieren? 3. Auf welchen Mechanismen beruht diese Antwort? 4. Gibt es Unterschiede in der Reaktion des Immunsystems des transgenen und des Wildtyporganismus nach Vakzinierung gegen CEA? Können wir also die schwere Übertragbarkeit konventioneller Wildtypiermodelle auf den Menschen nachvollziehen?

## 2 Methoden

### 2.1 Wildtypmäuse

DBA/2N wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen und unter Standardbedingungen gehalten. Alle Tiere wurden in einem Alter von 8 bis 12 Wochen für die Versuche verwendet.

### 2.2 CEA transgene Mäuse

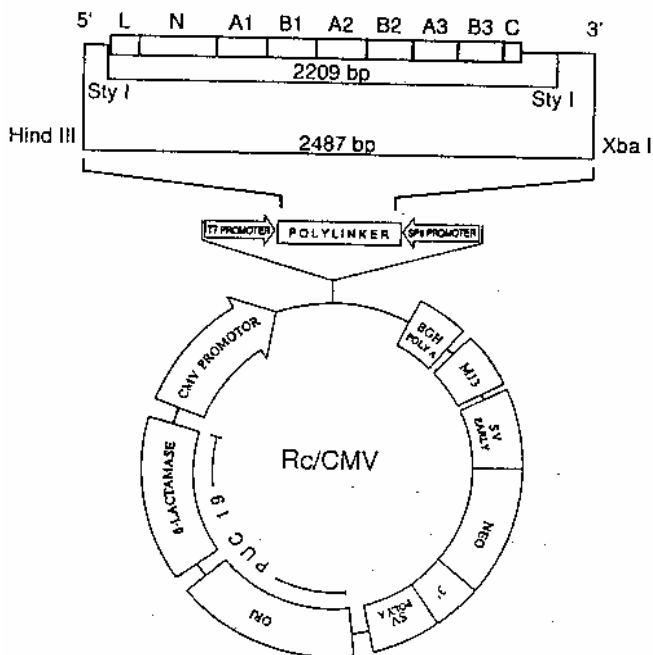
Die CEA transgenen Tieren erhielten wir von W. Zimmermann, damals Universität Freiburg (Eades-Perner et al., 1994). Da die Tumoren H2<sup>d</sup> positiv waren, wurden die transgenen Tiere (C57BL/6 x CB6F1; H-2<sup>b</sup>) mindestens bis zur 10. Generation (C57BL/6 x CB6F1 x DBA/2N F10) auf einen H-2<sup>d</sup> -Hintergrund zurückgekreuzt. Transgene Tiere wurden durch die Analyse der DNA, sowie durch Messung des Proteins CEA im Stuhl durch einen ELISA getestet (Eades-Perner et al., 1994). In den Tieren war das Expressionsmuster humantypisch (Tabelle 3).

Organ	Expression
Zunge	+
Ösophagus	+
Magen	+
Dünndarm	+
Kolon/Rektum	+
Trachea/Lunge	+
Leber	-
Herz	-
Niere	-
Pankreas	-
Milz	-
Gehirn	-

**Tabelle 3:** Expressionsmuster des humanen CEA in den erwachsenen transgenen Mäusen (nach Eades-Perner et al., 1994).

### 2.3 CEA Transfektion der Tumorzellen

Die murine Leukämiezelllinie L1210 (ATCC, Rockville, MD) wurde mit einem Expressionsvektor (pRC/CMV, Invitrogen, San Diego, USA) (Abbildung 2), der die komplette cDNA für humanes CEA enthält, durch Elektroporation (Pelegriin et al., 1992) transfiziert.



**Abbildung 2:** Expressionsvektor. Eine in kompletter Länge vorhandene CEA-kodierende cDNA. NEO:Neomycinphosphotransferasegen/Neomycinresistenzgen; CMV Promoter (816 Basenpaare lang); I-III Immunoglobulinähnliche Domänen des CEA-Glykoproteins; N: N-terminales Ende des CEA; C:hydrophobes C-terminales Ende des CEA.

Die durch das transfizierte Gen der Neomycinphosphotransferase Neomycin resistenten Zellen wurden in einem Medium, das wasserlösliches Neomycin (G418, Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) in einer Konzentration von 500µg-750µg/ml enthielt, selektiert. CEA exprimierende Zellen, die den Namen L5 erhielten, wurden in einem kompletten RPMI 1640, das 10% fetales Kälberserum und G418 in einer Konzentration von 500 bis 750 µg/ml enthält, expandiert. L5 wurden regelmäßig auf ihre CEA-Expression durch eine FACS-Analyse (FACSort, BD, Heidelberg, Deutschland) getestet, bei der ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen CEA (Dakopatts, Hamburg, Deutschland) und ein

FITC markierter Zweitantikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin (Dakopatts, Hamburg, Deutschland) verwendet wurde.

## **2.4 In vivo Experimente**

### **2.4.1 Tumortransplantation**

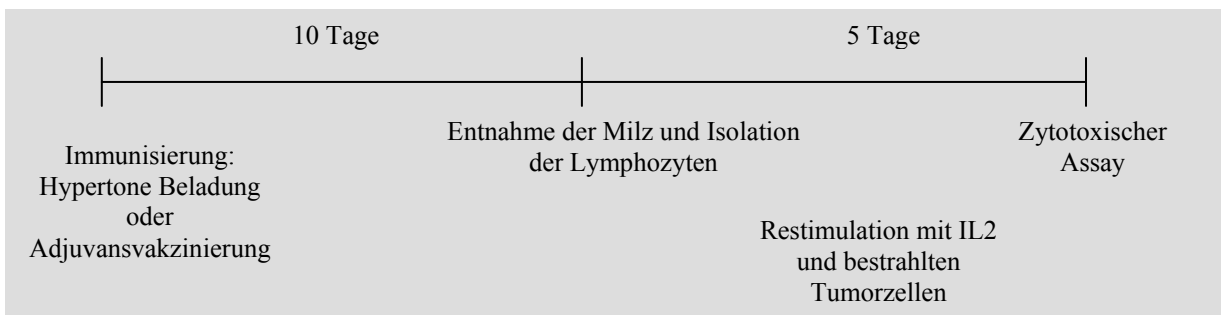
Einen Tag vor der Tumortransplantation wurden die Tumorzellen einheitlich auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. DBA/2N und transgenen Mäusen wurden 24 Stunden später in Narkose subkutan  $5 \times 10^5$  L5 oder L1210 in 100  $\mu$ l Ca/Mg freier HANK Lösung unter die Rückenhaut injiziert. Die Tumorgröße wurde jeden zweiten Tag mit einer Schublehre registriert. Die individuellen Tumorgrößen wurden nach folgender Formel berechnet:  $V = 0.873 \times l \times b \times t$ . Dabei bedeutet V das Volumen in  $\text{mm}^3$ , l die Länge des Tumors in der Longitudinalachse, b die Breite des Tumors in der Transversalachse, und t die Höhe des Tumors in der Sagittalachse jeweils in mm. Nach 21 Tagen bei einem Tumolvolumen von durchschnittlich etwa 5000  $\text{mm}^3$  in den Kontrolltieren wurden die Tiere euthanasiert. Blut wurde durch intrakardiale Punktion entnommen, der eine Teil der Tumoren für immunhistochemische Untersuchungen in Formalin (4 %) eingelegt, der andere in flüssigem Stickstoff schocktiefgefroren.

### **2.4.2 Vakzinierungsprotokolle**

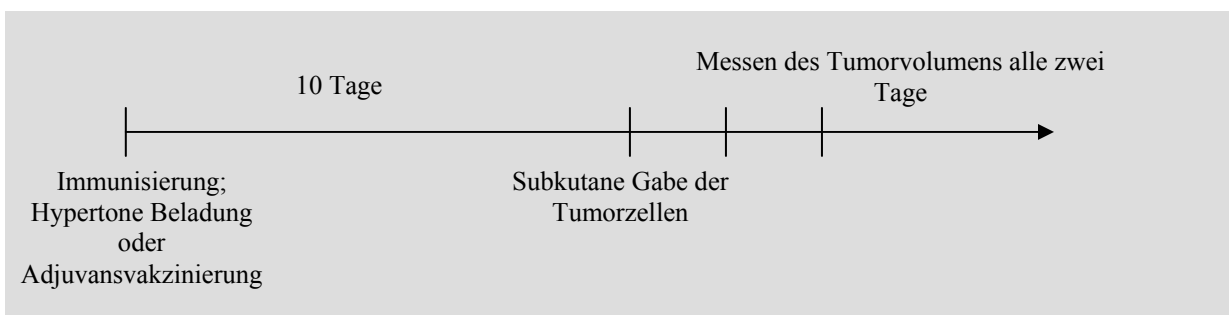
Für die Immunisierung der Mäuse wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet: Beim ersten Protokoll wurden DBA/2N und transgene Tiere mit  $10^6$  lysierten L5 Zellen, die in 500  $\mu$ l kompletten Freundschens Adjuvans aufgelöst wurden, immunisiert. 100  $\mu$ l dieser Lösung, entsprechend  $2 \times 10^5$  Zellen, wurden dann intraperitoneal injiziert. Bei der zweiten Vakzinierungsgruppe wurden den Tieren hypertone beladene Milzlymphozyten intravenös appliziert. Die hypertone Beladung wurde wie in der Literatur beschrieben (Carbone et al., 1990) durchgeführt:  $5 \times 10^6$  Ficoll® separierte autologe Milzlymphozyten wurden mit 2mg/ml CEA in 0.5 ml hypertoner Lösung (0.5M Sucrose, 10% PEG 1000, 10 mM HEPES in RPMI 1640) für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde diese Suspension mit 15 ml hypotoner RPMI (60%) verdünnt und 2 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und den Tieren intravenös injiziert. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  beladenen Zellen suspendiert in einem Volumen von 100  $\mu$ l Ca/Mg freien HANKs langsam in die Schwanzvene appliziert.

Um den Erfolg der durchgeführten Immunisierungen zu überprüfen, wurden zwei Protokolle verwendet. Eines dient der Messung der Zytotoxizität in vitro, das

andere der Überprüfung des Vakzinierungserfolges in vivo. Zur Überprüfung der Zytotoxizität in vitro wurde nach folgendem Schema verfahren: 10 Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere euthanasiert, um die Milz zu entnehmen. Die aus der Milz isolierten Lymphozyten wurden fünf Tage mit bestrahlten L5 (200Gy) und 20U/ml rIL2 (Boehinger, Mannheim, Deutschland) im Verhältnis 1:20 (isolierte Milzzellen : bestrahlten Tumorzellen) restimuliert.



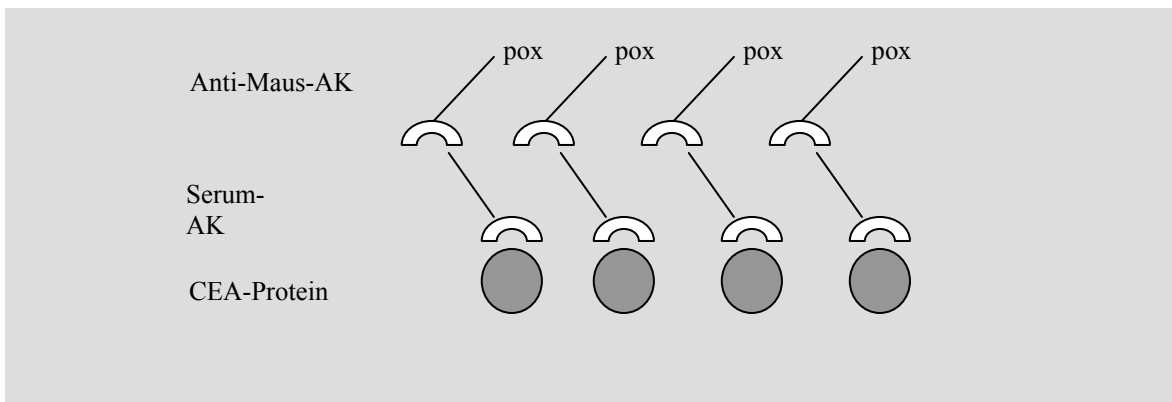
In einem weiteren Versuchsprotokoll wurden zehn Tage nach Immunisierung  $5 \times 10^5$  L5 bzw.  $5 \times 10^5$  der Kontrollzellelinie L1210 subkutan appliziert. Das Tumorstadium wurde jeden zweiten Tag registriert.



#### 2.4.3 Detektion von gegen CEA gerichteten Antikörpern

Antikörper gegen CEA wurden in Blutserumproben durch einen ELISA gemessen. Dazu wurden Mikrotiterplatten über Nacht mit  $2 \mu\text{g/ml}$  gereinigtem und in einem Inkubationspuffer (Karbonatpuffer pH 8,4) gelöstem CEA (BioGenes, Berlin, Deutschland) bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Blocken mit 10% fetalen Kälberserum, wurden die Platten mit den Blutserumproben in Verdünnungen von 1:100 und 1:1000 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein monoklonaler, muriner anti-CEA Antikörper (Dakopatts, Hamburg, Deutschland). Nach dem Waschen wurden die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase markiertem Anti-Maus IgG (Dakopatts, Hamburg, Deutschland)

inkubiert und die gebundene Peroxidase mit Orthophenylenediamin (OPD, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zitratpuffergemisch (pH 5,2) detektiert. Mit Schwefelsäure wurde die chemische Reaktion nach 30 Minuten gestoppt. Die Absorption wurde bei 490 nm auf einem automatischem ELISA-Reader (SLT; Crailsheim, Deutschland) gemessen (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Aufbauprinzip des ELISA zur Detektion der gegen CEA gerichteten Antikörper.

#### 2.4.4 Detektion der hämatogenen Tumorzellstreuung in die Milz

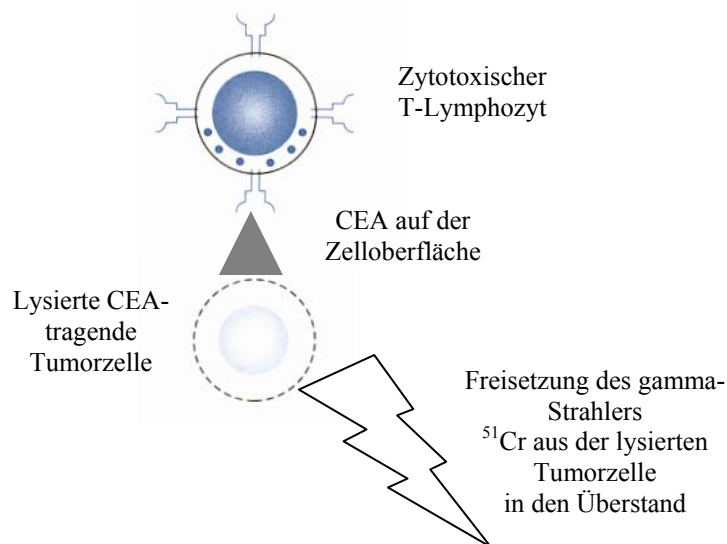
Nach Entnahme der Milz wurde eine Einzellsuspension aus Milzlymphozyten hergestellt und  $5 \times 10^5$  isolierte Milzlymphozyten pro ml in Kulturmedium gegeben. Alle 2-3 Tage wurde das Kulturmedium mikroskopisch auf das Auswachsen von schnell proliferierenden Tumorzellen untersucht. Dies war ein Hinweis für hämatogen gestreute Tumorzellen in der Milz. Wenn innerhalb von 6 Tagen kein Wachstum von Tumorzellen detektiert wurde, wurde davon ausgegangen, dass keine hämatogene Streuung von malignen Zellen in die Milz stattfand. Nach Isolierung vitaler Tumorzellen wurde die CEA-Expression mit Hilfe eines FACS wie beschrieben gemessen.

#### 2.4.5 Chromium Release Assay zur Detektion der Zytotoxizität

$1 \times 10^6$  L5 oder L1210 wurden mit  $100 \mu\text{Ci}$  Natrium  $^{51}\text{Chromat}$  bei  $37^\circ\text{C}$  für 60 Minuten markiert. Nach dem Waschen, wurden  $1 \times 10^4$  markierte Zielzellen und die Effektorzellen in einer Verdünnungsreihe in einem Volumen von  $200 \mu\text{l}$  in einer Mikrotiterplatte bei  $37^\circ\text{C}$  vier Stunden lang inkubiert. Danach wurde der Überstand mit Hilfe eines Filters (Skatron, Norwegen) gesammelt und die radioaktive Strahlung mit einem Gammazähler gemessen. Die Spontanfreisetzung lag bei allen Versuchen unter 25% der maximalen Freisetzung. Die Spontanfreisetzung



wurde ermittelt, indem die Gammastrahlung, die die mit Natrium- $^{51}\text{Cr}$ Chromat markierten intakten Zielzellen ohne Zugabe von Effektorzellen abgaben, gemessen wurde. Zur Bestimmung maximaler  $^{51}\text{Cr}$ Chromat-Freisetzung wurden markierte Zielzellen mit Hilfe eines Detergens (Triton X-100) lysiert und die freigesetzte Gammastrahlung ( $^{51}\text{Cr}$ Chromat als Emittent) ermittelt (Abbildung 4).



**Abbildung 5:** Prinzip des zytotoxischen Assays

#### 2.4.6 Zellfragmentationsassay zur Detektion der Zytotoxizität

$2\text{-}5 \times 10^5$  /ml L5 oder L1210 wurden in 20 ml komplettem RPMI1640-Medium mit  $10\mu\text{M}$  Bromdesoxyuridin bei  $37^\circ$  über Nacht markiert. Dann wurden  $1 \times 10^4$  Zielzellen, die nun Bromdesoxyuridin in ihre DNA eingebaut haben, und Verdünnungsreihen von Effektorzellen ähnlich wie bei dem Chromium Release Assay bei  $37^\circ$  vier Stunden lang inkubiert. Bei Lyse der Zielzellen wird die Bromdesoxyuridin enthaltene DNA in den Überstand freigesetzt.  $100\mu\text{l}$  des Überstandes wurden abpipettiert und die mit BrdU markierte DNA durch einen ELISA, der mit Hilfe von Anti-BrdU-Antikörpern diese DNA detektiert, gemessen. (Cellular DNA Fragmentation Assay, Roche).

#### 2.4.7 Immunhistochemie

Nach Entnahme der Tumoren wurde ein Teil in einem OCT compound (Tissue Tek, Miles Inc., Elkhart, IN) auf Korkplatten fixiert, schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Die daraus angefertigten Cryostatschnitte ( $5\mu\text{m}$ ) wurden luftgetrocknet und 10 Minuten in Aceton oder PAH (4%) fixiert. Ein anderer Teil des Gewebes

wurde in Formalin (4%) fixiert, dehydriert und nach einem Routineprotokoll in Paraffin eingebettet. Es wurden aus den Paraffinblöcken ca. 2-5µm dicke Schnitte gefertigt. Diese wurden auf Objektträger fixiert, dann nach einem Standardprotokoll entparaffiniert und rehydriert. Diese wurden dann - parallel zu den Gefrierschnitten - der Immunhistochemie zugeführt. Nach einem 10 minütigen Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mit Kaninchen anti-CEA Antikörpern (1:100) (Dakopatts, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach 30 Minuten und ausführlichem Waschen der Schnitte wurden Peroxidase markierte anti-Kaninchen Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 (in PBS) hinzugegeben. Die Peroxidase wurde mit Hilfe von Aminoethylcarbazol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entwickelt und mit Meyers Hämalaun gegengefärbt. Bei einem anderen Teil der Schnitte wurde ein Biotin markierter Mausantikörper (Dakopatts, Hamburg, Deutschland) gegen CEA in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Als Zweitantikörper fungierte hier ein Streptavidin-Peroxidase enthaltener Antikörper (Dakopatts, Hamburg, Deutschland).

#### ***2.4.8 Detektion von CEA-DNA***

In einer Ätherkurznarkose wurde ein ca. 0,5 cm langes Schwanzstück mit einem Skalpell abgetrennt. Aus dem so gewonnenen Gewebe wurde DNA nach einem Standardprotokoll isoliert. Zur Proteinverdauung wurden die Gewebstücke fein zerkleinert, um dann mit 35µl einer 10mg/ml enthaltenen Proteinase K Lösung mit 700µl 50mM Tris (pH8), 100mM EDTA, 100mM NaCl und zur Proteindenaturierung 1% SDS vermischt, verdaut zu werden. Nach einer Inkubation bei 55°C über Nacht erfolgte die Zugabe von Phenol/Chloroform. Die entstandene Lösung wurde mit Hilfe eines Mixers gut durchmischt. In einer Zentrifuge wurde dann die wässrige und die phenolische Phase separiert und die DNA-haltige wässrige Phase abpipettiert. Die DNA wurde dann mit 100% Ethanol im Volumenverhältnis 2:1 über Nacht bei 4°C präzipitiert. Die so gewonnene DNA wurde dann in TRIS-EDTA (10/1mM; pH 8) gelöst. 1µg dieser DNA wurde dann in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit speziellen Primern (Abbildung 6) nach einem Standardprotokoll unter Verwendung eines Perkin Elmer Thermocyclers amplifiziert (Thompson et al., 1993).

PCRCEA-5' 5'-CCATGGAGTCTCCCTCG-3'

Fragmentlänge : 641bp ; T<sub>annealing</sub>=56°C

PCRCEA-3' 5'-GTAGCTTGCTGTGTCATTTC-3'

**Abbildung 6** : Primer-Paar für CEA (Thompson et al., 1993; Oikawa et al., 1987).

Die Analyse der amplifizierten DNA erfolgte nach Auftrennung auf einem 1% Agarosegel in TAE-Puffer in einem elektrischen Feld. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt. Die entstandenen Banden wurden im UV-Licht detektiert und quantifiziert.

#### **2.4.9 CEA Detektion im Stuhl**

Von den Zuchttieren wurde jeweils Stuhl gesammelt. Dieses Kotpellet wurde in 200µl PBS/1% Triton aufgelöst und abzentrifugiert. Der Überstand wurde konserviert und der Extraktionsvorgang noch zweimal wiederholt. Danach wurde CEA im Überstand mittels ELISA gemessen. Dazu wurden Mikrotiterplatten über Nacht mit einem monoklonalen Antikörper gegen CEA (6D7) in einer Konzentration von 2µg/ml bei 4°C beschichtet. Nach dem Blockieren verbliebener Bindungsstellen mit 10% fetalen Kälberserum wurden die Überstände in den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und anschließendem mehrmaligem Waschen der Mikrotiterplatte wurden die gebundenen Proteine mit einem polyklonalen anti-CEA-Kaninchenantikörpern (Dakopatts, Hamburg, Deutschland) detektiert. Nach Zugabe von Peroxidase markierten Anti-Kaninchen-IgG (Dakopatts, Hamburg, Deutschland) als Zweitantikörper wurde Orthophenylenediamin (OPD, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) durch die Peroxidase in einem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zitratpuffergemisch (pH 5,2) umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Schwefelsäure nach 30 min gestoppt. Die Absorption wurde bei 490nm auf einem automatischem ELISA-Reader gemessen (SLT, Crailsheim, Deutschland).

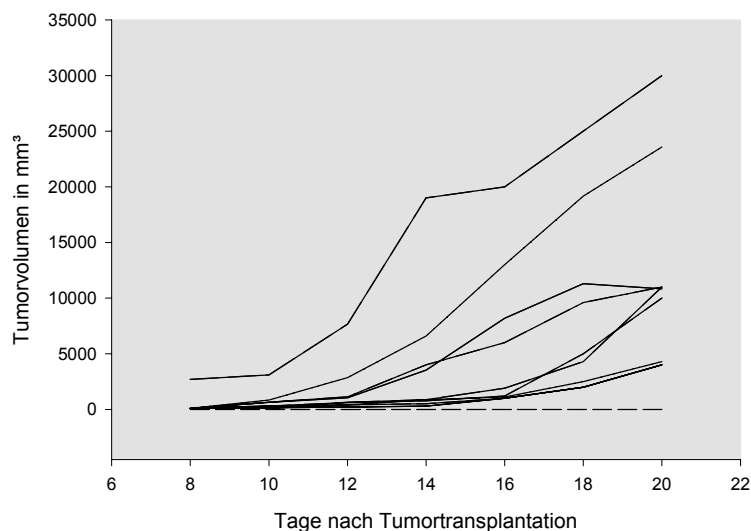
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen in den Wildtyptieren

##### 3.1.1 Wachstumscharakteristik der L1210-Zelllinie

In einem ersten Experiment wurde die murine Leukämiezelllinie L1210 (H2<sup>d</sup>) auf deren Wachstums- und Metastasierungsverhalten im Nagetier getestet. Dazu wurden zunächst  $5 \times 10^5$  Zellen den Tieren subkutan in den Rücken injiziert und das Tumolvolumen zweitäglich gemessen (Abbildung 7).

**Abbildung 7:** Volumenzunahme des Tumors nach subkutaner Gabe von  $5 \times 10^5$  Tumorzellen der murinen Leukämiezelllinie L1210 in  $\text{mm}^3$  bei zehn Tieren. Die Versuche wurden am 21. Tag gestoppt.



91% der Tiere entwickelten einen Tumor. Nach drei Wochen, bei einem durchschnittlichen Tumolvolumen von  $5000 \text{ mm}^3$ , wurden die Tiere euthanasiert. Zur weiteren Beschreibung des biologischen Verhaltens der L1210 wurde zunächst die Milz auf hämatogen streuende Tumorzellen untersucht. Dazu wurde eine Einzelzellsuspension der Milz im Kulturmedium angezchtet, um die Proliferation der immortalen metastasierten Tumorzellen im Unterschied zur absterbenden Zellpopulation der Milzlymphozyten messen zu können. Es zeigte sich eine ausgeprägte hämatogene Streuung in die Milz mit auswachsenden Tumorzellen in jedem tumortragenden Tier, es wuchsen also in 91% der Nager Tumorzellen in der Einzelzellsuspension aus.

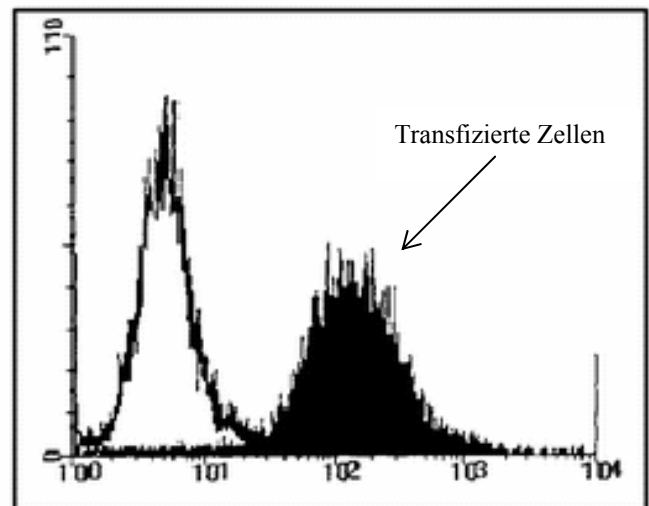
Bei der Testung der zellulären Immunabwehr gegen die transplantierten Tumorzellen durch den  $\text{Cr}^{51}$ -Zytotoxizitätsassay mit Milzlymphozyten als Effektor- und L1210 als Zielzellen zeigte sich bei keinem Tier eine zelluläre Immunantwort. Auch der humorale Teil des Immunsystems zeigte keine Reaktion, es wurden keine Antikörpertiter gegen CEA gemessen.

Zusammenfassend können folgende Feststellungen gemacht werden: Die Leukämiezelllinie L1210 wuchs in den meisten Nagern an. Es zeigte sich eine hämatogene Streuung der Tumorzellen in die Milz. Es wurde keine spezifische zelluläre oder humorale Immunantwort gegen diese Zellen detektiert.

### 3.1.2 *Biologisches Verhalten der transfizierten Tumorzellen*

Die fehlende humorale und zytotoxische Antwort der Immunabwehr auf L1210 ermöglichte es, mit dieser Zelllinie die Immunogenität von CEA, das auf Tumorzellen exprimiert wird, im murinen Organismus zu testen. Es wurde L1210 mit einem CEA-cDNA Vektorsystem transfiziert. Die Expression steuerte ein CMV-Promotor. Ein Neomycinresistenzgen ermöglichte die Selektion der Zellen mittels G418 (membrangängiges Neomycin). Nach Selektion wurde eine Zelllinie etabliert, die CEA exprimierte. Abbildung 8 zeigt eine FACS-Analyse der CEA-Expression (Abbildung 8). Nach Selektion exprimierten alle Zellen CEA an ihrer Oberfläche.

**Abbildung 8:** FACS-Analyse der CEA-Expression der transfizierten Zellen und der Wildtypzellen. Die Zellen wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen CEA angefärbt.



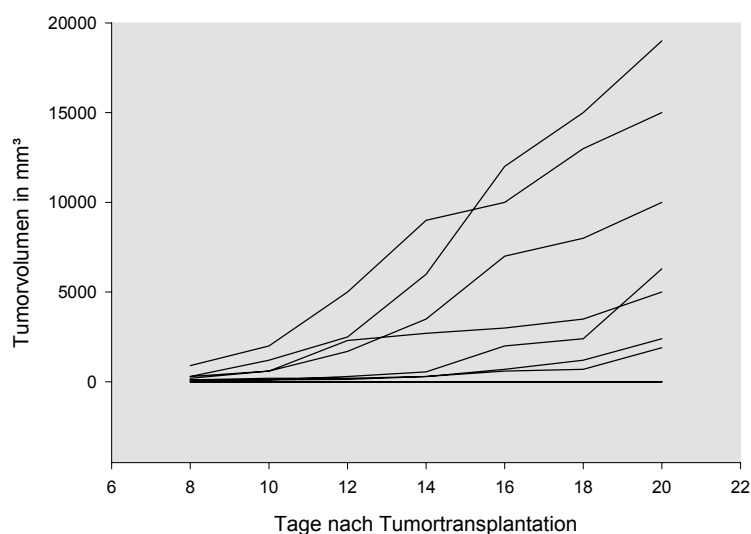
Die Wachstumscharakteristik gemessen in Verdopplungszeiten und die Morphologie der transfizierten und der Wildtypzellen in Zellkultur waren identisch. Bei hoher Zelldichte (mehr als  $5 \times 10^5$  Zellen/ml) zeigten die transfizierten Zellen im Gegensatz zur Mutterzelllinie L1210 eine starke Adhärenz an Plastik.

Um das biologische Verhalten der transfizierten Zelllinie *in vivo* und somit auch die Unterschiede zu der Mutterzelllinie zu testen, wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in die subkutane Rückenhaut der Mäuse injiziert. Das Tumolvolumen wurde jeden zweiten Tag gemessen (Abbildung 9). Dabei entwickelten nur 55% der Nagere einen soliden und messbaren subkutan gelegenen Tumor. Der Beginn des Tumorwachstums

der Tumor-tragenden Tiere war bei beiden Gruppen (Tiere mit transplantierten CEA transfizierten Tumoren/Tiere mit transplantierten CEA negativen Tumoren) annähernd gleich (8 Tage post injectionem). Auch der Vergleich der Volumenzunahme der Geschwulst bei den Tumor-tragenden Tieren in beiden Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied.

Bei der Testung auf hämatogene Streuung der Tumorzellen konnten in allen Geschwulst-tragenden Tiere maligne schnell proliferierende Zellen in der Milz festgestellt werden. Bei den Tieren ohne makroskopischen Tumornachweis konnte keine hämatogene Streuung festgestellt werden.

**Abbildung 9:** Volumenzunahme des Tumors nach subkutaner Gabe von  $5 \times 10^5$  Tumorzellen der CEA transfizierten Tumorzelllinie L5 in  $\text{mm}^3$  bei zehn Nagern. Die Versuche wurden am 21. Tag abgebrochen.



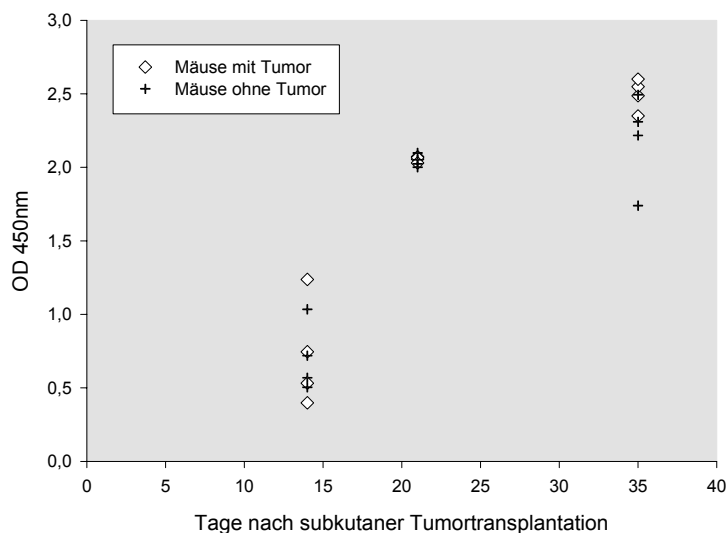
Zusammenfassend kann man konstatieren: Die CEA transfizierte Tumorzelllinie wächst also in knapp mehr als der Hälfte (55%) der Mäuse an. Trotzdem ist der Anteil der Tumor-tragenden Tieren niedriger als in der Gruppe der Nager, denen die CEA negativen Wildtypzelllinie subkutan implantiert wurde (55% versus 91%).

### 3.1.3 Immunologische Reaktion des Mäuseorganismus auf CEA-transfizierte Tumorzellen

Der auffälligste Unterschied zu den Versuchen mit L1210 war also, dass die CEA positiven Tumorzellen in nur 55% der Nagern zu einem soliden Tumorwachstum führt. Das Neoantigen CEA wurde also vom murinen Immunsystem erkannt. Aber warum ist der Tierorganismus in 45% der Fälle fähig, CEA exprimierende Tumorzellen abzustößen, während in 55% der Fälle ein Tumorwachstum, das dem der nicht transfizierten Zellen gleicht, auftritt? Zur Beantwortung dieser Frage

wurde die Reaktion des Immunsystems auf das neue Antigen untersucht. Das humorale Immunsystem reagierte ab dem 14. Tag mit hohen Antikörpertitern gegen CEA. Der Verlauf der Antikörpertiter zeigte einen Anstieg der gegen CEA gerichteten Antikörper ab dem 14. Tag post Transplantation (Abbildung 10). Dieser Titer war bei den Tumor-tragenden und den Tumor-freien Tieren gleich. Es konnte also, wie man annehmen könnte, bei den Tumor-freien Nagern kein höherer Antikörpertiter gefunden werden.

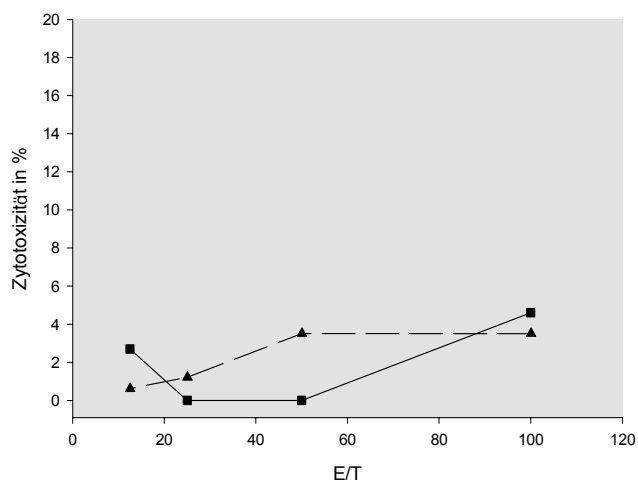
**Abbildung 10:** Verlauf des Anstieges der Antikörpertiter gegen CEA im Serum der Mäuse mit (n=4) und ohne Tumor (n=4) nach Transplantation von CEA transfizierten Tumorzellen.



Da zu einer effektiven Abwehr von Tumorzellen allerdings vor allem die zelluläre Immunantwort entscheidend ist, wurde die spezifische zytotoxische Antwort gegen CEA mit Hilfe zweier etablierter Assays, des Chrom-Release und der Freisetzung von Bromdesoxyuridin gemessen. Als Zielzellen für die Mäuselymphozyten, die aus der homogenisierten Milz der Nager (ca. fünf pro Versuch) gewonnen wurden und die zu einem Teil aus CD8 positiven zytotoxischen Lymphozyten bestehen, dienten die transfizierten Tumorzellen. Zunächst wurden die gepoolten Milzlymphozyten restimuliert, d.h. es wurden selektiv die Zellklone zur Proliferation gebracht, die die Zytotoxizität gegen CEA trugen. Dazu wurde die Milzsuspension mit bestrahlten proliferationsunfähigen Zielzellen inkubiert und die proliferierenden Zellen mit dem T-Lymphozytenwachstumsfaktor IL-2 inkubiert. Es zeigte sich allerdings schon während der Restimulation, dass in der Milz befindliche schnell proliferierende Tumorzellen der Tumor-tragenden Tiere die Zellkultur überwucherten. Unsere Versuche konnten also keine klare Antwort auf die Frage der zytotoxischen Antwort gegen die transfizierten Tumorzellen geben. Die beschriebene in vitro Restimulation dieser Zellen mit bestrahlten Tumorzellen und

IL-2 war nicht möglich, weil die in die Milz hämatogen gestreuten Tumorzellen die isolierten Lymphozyten während der Restimulation in der Einzelzellsuspension innerhalb von 5 Tagen überwucherten. Um doch eine Aussage zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen CEA-positive Tumorzellen nach subkutaner Gabe von intakten CEA transfizierten malignen Zellen zu erhalten, wurden den Wildtyptieren bestrahlte proliferationsunfähige Tumorzellen subkutan injiziert und die beschriebenen Assays wiederholt. Es zeigte sich, daß nach subkutaner Gabe dieser unlysierten Tumorzellen keine spontane oder restimulierte zytotoxische Antwort gegen CEA tragenden Zellen zu induzieren war (Abbildung 11).

**Abbildung 11.** Cr<sup>51</sup>-Zytotoxizitätsassay nach Gabe von  $5 \times 10^5$  intakten bestrahlten Tumorzellen der transfizierten (■; L5) und der Wildtypumorzelllinie (▲; L1210) subkutan in die Rückenhaut nach fünftägiger Stimulation mit L5 und IL-2.

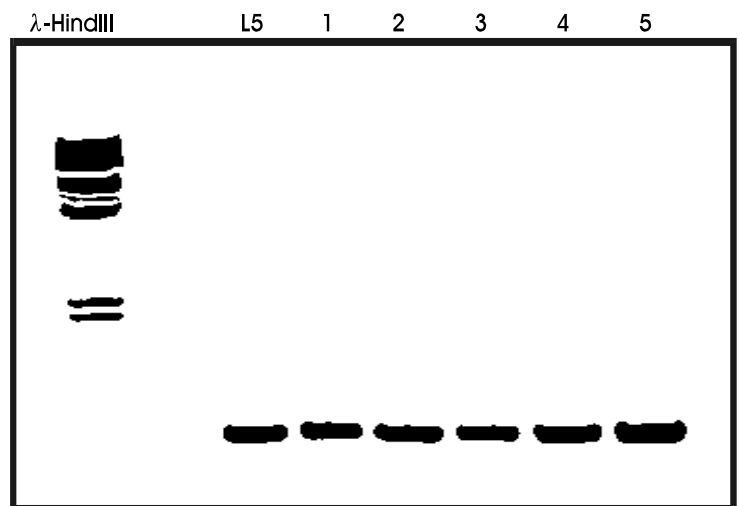


Bisher können folgende Feststellung zur Immunantwort gemacht werden: Es wurden Antikörper gegen CEA gebildet. Die spezifische zytotoxische Antwort wurde nicht induziert. Nachdem nur die Aktivierung des humoralen Schenkels der Immunantwort, also die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen CEA, nachgewiesen werden konnte, scheint diese auf der einen Seite für die Reduktion der anwachsenden CEA exprimierenden Tumoren gegenüber CEA negativen Tumoren von 92% auf 55% verantwortlich zu sein. Auf der anderen Seite ist die Antikörperantwort nicht in der Lage, dass Anwachsen der transfizierten Zellen komplett zu verhindern.

In unserem Modell wurde nun untersucht, ob die begrenzte Effektivität des spezifischen CEA-Antikörpertiters auf den Verlust des Tumorantigens CEA in den soliden transplantierten Tumoren zurückzuführen ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine RT-PCR zur Detektion der CEA-mRNA durchgeführt (Abbildung 14). Dazu wurde aus den Tumormassen RNA isoliert und mittels RT-PCR auf die Existenz von CEA-mRNA untersucht. CEA war auf genetischer Ebene vorhanden und wurde zu mRNA transkribiert.



**Abbildung 12:** RT-PCR der implantierten ausgewachsenen transfizierten Tumorzellen (L5). Lane L5 dient als Kontrolle für die CEA mRNA. Lanes 1-5 sind die unterschiedlichen Tumoren, die in die Rückenhaut der Wildtypiere implantiert wurden.



Die Frage, ob CEA nicht nur transkribiert, sondern auch translatiert wird, sollte mit einer immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von CEA geklärt werden. Dazu wurden die in der Rückenhaut angewachsenen soliden Tumoren zunächst entnommen und in Paraffin eingebettet. Dann wurde das Gewebe immunhistochemisch auf CEA-Expression überprüft. Dabei wurden auf der Oberfläche der Tumoren sitzende CEA-Moleküle mit Hilfe eines Kaninchenantikörpers detektiert. Gegen die konstante Region der Kaninchenantikörper gerichtete Antikörper mit Peroxidaseaktivität dienten als Zweitantikörper zur Umsetzung des Farbstoffes. Zunächst zeigte die Auswertung der Schnitte keine Anfärbung von CEA. Allerdings ist dieses Ergebnis von beschränkter Aussagefähigkeit. Eine Kontrollfärbung mit Biotin markierten, gegen den Fc-Teil gerichteten Anti-Maus-Antikörpern ergab einen sehr hohen Hintergrund. Dieses Ergebnis lässt einen sehr hohen Antikörpertiter im Tumor vermuten, der möglicherweise das CEA auf der Oberfläche der Tumorzellen maskiert. Nachdem dieser Ansatz des eindeutigen Nachweises einer Expression bzw. eines Verlustes der Expression von CEA scheiterte, wurde die Frage überprüft, ob die im Blut zirkulierenden Zellen CEA exprimieren. Die in die Milz nachgewiesenen Tumorzellen wurden in einer Einzelzellsuspension über mehrere Tage angezüchtet und angereichert. Dann wurden sie mittels FACS auf ihre CEA-Expression untersucht. Es zeigte sich eine hohe CEA-Expression. Es lässt sich konstatieren, dass CEA in den Tumorzellen transkribiert wird und auf den im Blut zirkulierenden und metastasierenden Tumorzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit

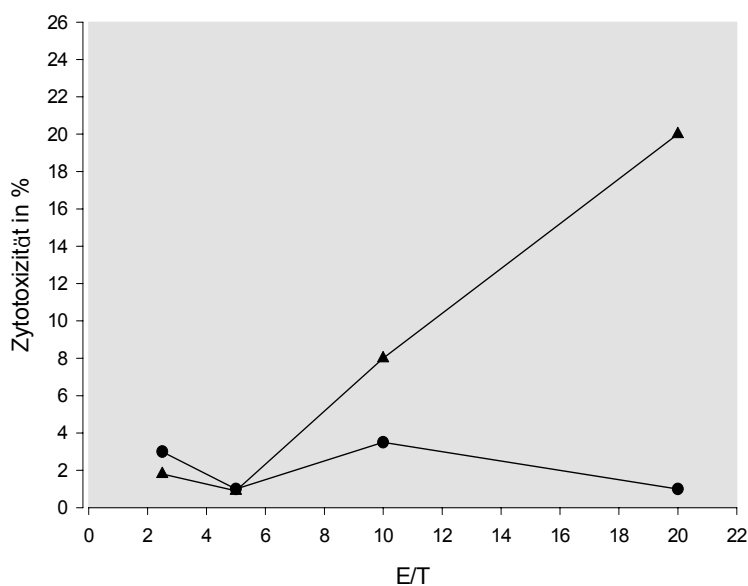
exprimiert wird. Diese beiden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression von CEA auch auf dem soliden Tumor mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht verloren geht. Also kann die beschränkte Effektivität der spezifisch gegen CEA gerichteten Antikörper nicht auf einen Verlust des Tumorantigens zurückzuführen sein.

### 3.1.4 Immunreaktion nach intraperitonealer Vakzinierung mit Tumorzellen und Adjuvans

#### 3.1.4.1 *In Vitro*

Neben der humoralen Immunantwort, die sich in diesem Modell nur als beschränkt effektiv erweist, ist für eine Abwehr von Tumorzellen das zelluläre Immunsystem nötig. Deshalb wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob es möglich ist, die zelluläre zytotoxische Immunantwort gegen CEA tragende Tumorzellen zu induzieren. Zunächst wurde überprüft, ob die Art der Applikation der CEA tragenden intakten Tumorzellen – bisher subkutan in die Rückenhaut – Einfluß auf den Erfolg der Induktion der zellulären Immunantwort hat. Deshalb wurde der Applikationsweg variiert. Mit der Überlegung, dass bei einer intraperitonealen Gabe der Tumorzellen die Peritonealmakrophagen als Antigenpräsentatoren fungieren können und der starke lokale Entzündungsreiz zu einem Einwandern weiterer entscheidender immunkompetenter Zellen führt, wurden die bestrahlten Tumorzellen intraperitoneal appliziert. Hiermit konnte im Gegensatz zur subkutanen Applikation eine Immunantwort nach Restimulation bei den syngeneten Tieren *in vitro* induziert werden (Abbildung 13).

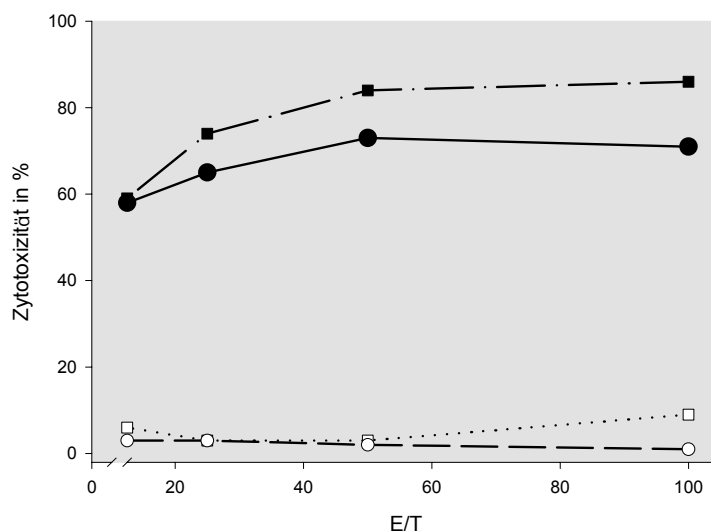
**Abbildung 13:**  $^{51}\text{Chrom}$ -Zytotoxizitätsassay gegen CEA positive Zellen nach intraperitonealer Gabe von intakten bestrahlten und transfizierten Tumorzellen ( $\blacktriangle$ ; L5) und von bestrahlten CEA negativen Wildtypzellen ( $\bullet$ ; L1210). E/T entspricht dem Effektorzell-/Zielzellverhältnis.



Die intraperitoneale Gabe der Tumorzellen scheint also der effektivere Weg zur Induktion von zytotoxischen Lymphozyten zu sein. Allerdings sind noch Verstärkermechanismen nötig, um diese Antwort effektiv zu machen.

Mit dem Ziel, diese Antwort zu verstärken, wurde das Modell der Adjuvansimmunisierung benutzt. Hierbei wird durch ein Adjuvans, in unserem Fall komplettes Freundsches Adjuvans, die Immunantwort gegen Tumorzellen und ihre Antigene verstärkt. Komplettes Freundsches Adjuvans stellt eine Öl in Wasser-Suspension dar, die Anteile von inaktiven Mykoplasmen enthält, die stark immunogen wirken. Als Applikationsroute wurde - aufgrund der induzierten Zytotoxizität bei intraperitonealer Gabe von intakten Tumorzellen - die intraperitoneale Injektion gewählt. Die intraperitoneale Gabe von transfizierten Tumorzellen, die in kompletten Freundsches Adjuvanz aufgelöst wurden, zeigte eine starke zytotoxische Antwort sowohl gegen CEA exprimierende Tumorzellen, als auch gegen die CEA negative Mutterzelllinie in vitro, die durch einen  $^{51}\text{Cr}$  release assay und einen BrdU Assay nach Restimulation der Milzlymphozyten mit IL 2 und bestrahlten Tumorzellen gemessen wurde (Abbildung 14).

**Abbildung 14:**  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätsassay gegen L5 (■/□) bzw. L1210 (●/○) nach intraperitonealer Gabe von L5 (ausgefüllte Symbole) bzw. L1210 (leere Symbole), die in Adjuvans aufgelöst wurden. E/T entspricht dem Effektorzell-/Zielzellverhältnis.

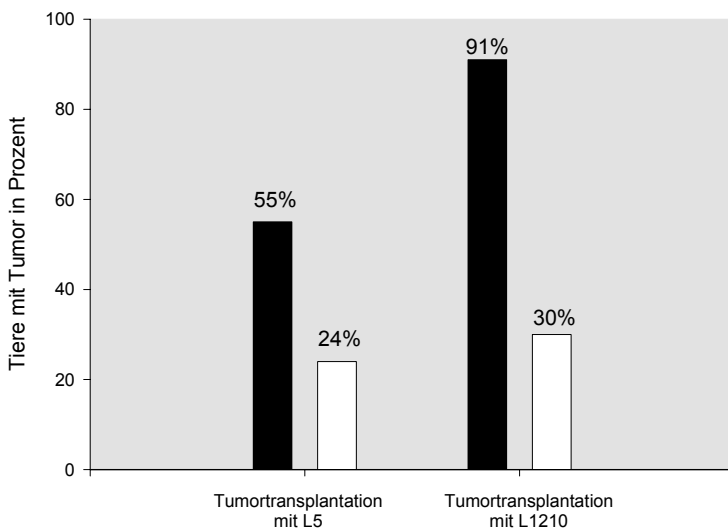


Die entscheidenden Ergebnisse dieser Versuchsreihe waren also, dass nach intraperitonealer Adjuvansimmunisierung mit CEA transfizierten L5 eine Zytotoxizität gegen beide Zelllinien – der CEA positiven und der CEA negativen Linie – in vitro zu messen war. Wie Abbildung 14 ebenfalls zu entnehmen ist, konnte nach intraperitonealer Kontrollimmunisierung mit CEA negativen L1210 keine Zytotoxizität gegen beide Zelllinien in vitro gemessen werden.

### 3.1.4.2 *In Vivo*

Die bisherigen Versuchen demonstrierten, dass eine Induktion zytotoxischer Zellen gegen CEA exprimierende Tumorzellen möglich ist. Diese Versuche wiesen die Zytotoxizität allerdings nur *in vitro* mit Hilfe spezieller Assays nach. Um nun die Effektivität der Immunisierung *in vivo* zu testen, wurden Wildtypmäuse mit Tumorzelllysate intraperitoneal immunisiert. Wir implantierten den Tieren fünf Tage nach Immunisierung  $5 \times 10^5$  CEA transfizierte Tumorzellen subkutan. Dann wurde das biologische Verhalten der Tumorzellen - die Tumoranwachsrate, die Tumorstadiumscharakteristik und das Metastasierungsverhalten - protokolliert. Wie in Abbildung 15 gezeigt, konnte die Immunisierung das Anwachsen der transplantierten CEA exprimierenden Tumorzellen von 55% auf 24% bei den Wildtypmäußen ( $n=17$ ) reduzieren. Aber auch der Prozentsatz der Tumor-tragenden Mäuse mit transplantierten CEA negativen Tumoren konnte von 91% ( $n=11$ ) auf 30% reduziert werden ( $n=10$ ).

**Abbildung 15:** Vergleich des Prozentsatzes der Tumor-tragenden Nager mit und ohne intraperitonealer Adjuvans-immunisierung mit CEA exprimierenden L5. Die schwarzen Balken stellen den Prozentsatz der Mäuse mit Tumor ohne Immunisierung, die weißen den Prozentsatz nach Vakzinierung dar.



Dieser Befund korreliert mit der *in vitro* gezeigte hohen Zytotoxizität gegen CEA-tragende Tumorzellen nach Immunisierung. Es ließ sich bei den Tumor-freien Tieren keine hämatogene Metastasierung in die Milz feststellen, während alle Tumor-tragenden Tiere Metastasierung in die Milz zeigten. Die metastasierenden Zellen zeigten in der FACS-Analyse eine CEA-Expression. Bei den Tieren, die trotz Immunisierung einen Tumor entwickelten, zeigte sich in der

Wachstumscharakteristik keine Retardierung in der Volumenzunahme des Tumors. Es konnte nach Immunisierung der Wildtyptiere gegen CEA tragende Tumorzellen auch die Tumoranwachsrate bei der CEA negativen Mutterzelllinie reduziert werden (Abbildung 15).

### ***3.1.5 Immunreaktion nach intravenöser Vakzinierung mit beladenen autologen Lymphozyten***

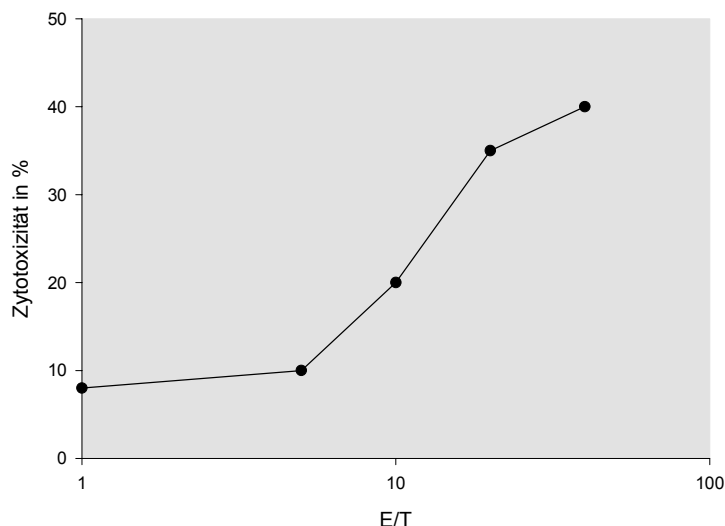
#### ***3.1.5.1 In Vitro***

Die Immunisierung mit CEA positiven Tumorzellen, die intraperitoneal appliziert und in kompletten Freundschens Adjuvans aufgelöst wurden, eignet sich zwar zum Aufbau einer Immunantwort bei Mäusen, allerdings hat sie zwei Nachteile: die Immunantwort ist nicht CEA spezifisch. Es sind andere Antigene bei der Abstoßung der Tumorzellen entscheidend. Unser Ziel war es allerdings, die spezifische Immunantwort gegen CEA zu untersuchen. Desweiteren ist sie als Vakzinationschema beim Menschen ungeeignet. Eine Immunisierung mit aufgelösten Tumorzellen birgt zu hohe Risiken, wie das Anwachsen noch intakter proliferationsfähiger Zellen. Außerdem führt das Adjuvans zu einer starken lokalen inflammatorischen Reaktion. Auch die intraperitoneale Applikation der Vakzine ist beim Menschen so nicht durchführbar.

Es stellt sich also die Frage nach Alternativmethoden: Wie lässt sich eine spezifische zytotoxische Antwort gegen ein lösliches Protein wie CEA induzieren? Carbone et al. konnte zeigen, dass nach intravenöser Injektion von autologen Milzlymphozyten, die mit dem Antigen Ovalbumin beladen wurden, eine spezifische zytotoxische Antwort gegen Ovalbumin aufgebaut werden konnte (Carbone et al., 1990). Die Beladung von autologen Lymphozyten mit CEA und die nachfolgende Injektion stellt also eine Möglichkeit dar, eine spezifisch gegen CEA gerichtete Zytotoxizität zu induzieren und zu untersuchen.

Es wurden nach Beladung der Milzlymphozyten mit CEA  $1 \times 10^6$  der Zellen intravenös den Tieren appliziert. Zehn Tage nach Injektion wurden die Tiere euthanasiert, splenektomiert und die isolierten Milzzellen fünf Tage restimuliert. Der durchgeführte zytotoxische Chrom-Assay zeigte eine spezifische zytotoxische Antwort gegen L5 (Abbildung 16). Im Gegensatz zur intraperitonealen Immunisierung mit Adjuvans, konnte gegen die als Kontrolle verwendete Mutterzelllinie L1210 keine Zytotoxizität gemessen werden. Im Gegensatz zur Adjuvansimmunisierung war die zytotoxische Antwort Antigen-spezifisch.

**Abbildung 16:**  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätassay gegen L5 nach intravenöser Immunisierung mit beladenen Milzlymphozyten. E/T entspricht dem Effektor-/Zielzellverhältnis

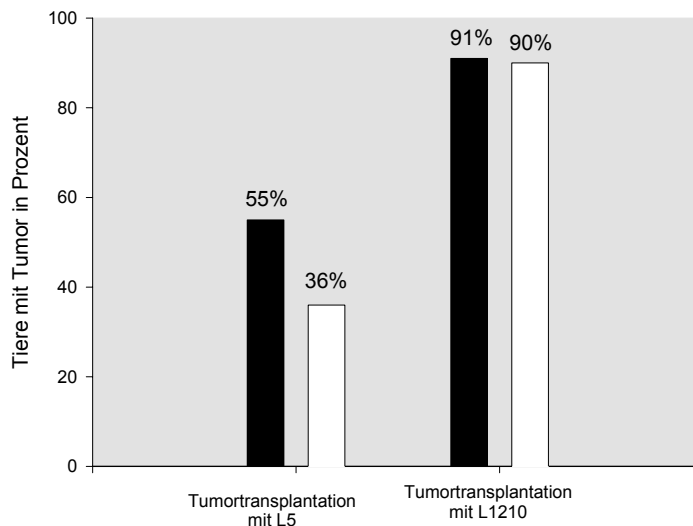


Es konnten keine Antikörpertiter gegen CEA gemessen werden. Als Kontrollimmunisierung wurden nicht-beladene autologe Milzlymphozyten injiziert. Hier konnte keine Zytotoxizität nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte mit der intravenösen Immunisierung mit beladenen Lymphozyten in den Wildtypieren die spezifische zelluläre Zytotoxizität gegen CEA induziert werden. Im Gegensatz zur Adjuvansimmunisierung wurden nur CEA exprimierende Zellen lysiert, während die CEA negativen L1210 nicht erkannt wurde. Die humorale Immunantwort gegen CEA wurde dagegen nicht induziert.

### 3.1.5.2 *In Vivo*

Der Prozentsatz der mit beladenen Lymphozyten vakzinieren Tiere, die nach subkutaner Transplantation der Lymphomzellen einen makroskopisch messbaren Tumor entwickelten, reduzierte sich von 55% auf 36% (n=19) (Abbildung 17). Bei den Tieren, die durch diese Vakzinierung vor dem Anwachsen der neoplastischen Zellen geschützt wurden, konnte keine Fernmetastasierung festgestellt werden. Die Rolle des CEA als Zielantigen bei dieser Vakzinierung wird darin deutlich, dass das Tumorwachstum von CEA negativen L1210-Zellen nicht verringert werden konnte. In dem Mausmodell ist allein durch Induktion der spezifisch gegen das Tumorantigen gerichteten zytotoxischen Antwort ohne eine begleitende Antikörperantwort eine weiterreichende Reduktion der Tumoranwachsrates zu erzielen als mit einer spezifischen humoralen Immunantwort allein. Als Kontrolle wurden nicht-beladene Milzlymphozyten injiziert. Diese bewirkten keine weitere Reduktion des Tumorwachstums (n=10; 6 Mäuse mit Tumor).

**Abbildung 17:** Prozentsatz der Mäuse mit Tumor (L5/L1210) nach intravenöser Immunisierung mit beladenen Milzlymphozyten (n=19). Der schwarze Balken zeigt die Tumoranwachsrate ohne Immunisierung (Kontrollgruppe).



Zusammengefasst induzieren hypertone mit Tumorantigen beladene Milzlymphozyten eine Antigen-spezifische zytotoxische Immunantwort. In vivo sind sie in der Lage, das Tumorstadium zu reduzieren, ohne messbare Antikörpertiter zu induzieren.

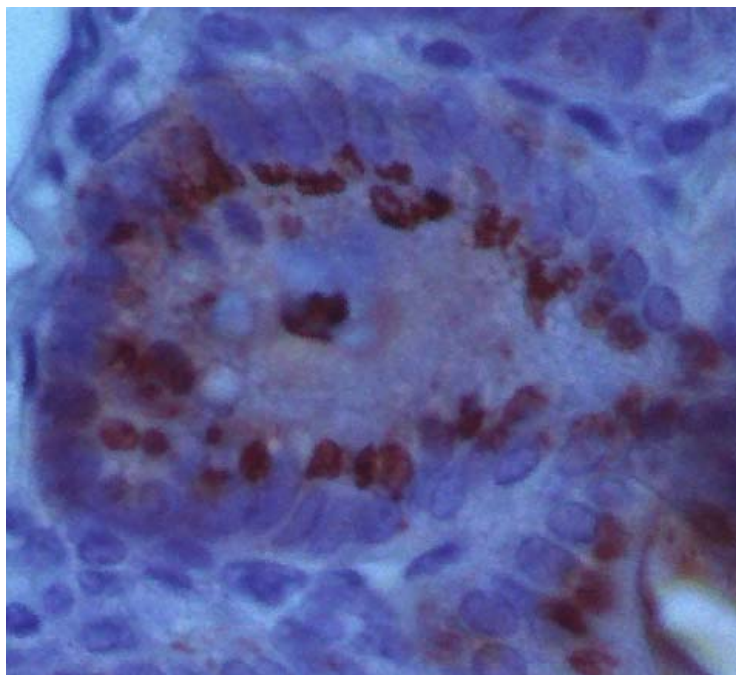
### 3.2 Untersuchungen in den transgenen Tieren

#### 3.2.1 Eigenschaften und Generierung der transgenen Tiere

Die bisherigen Ergebnisse wurden durch Versuche an Wildtyp-Tieren ermittelt. In den Wildtyp-Tieren ist CEA im Gegensatz zum Menschen ein fremdes Protein. Um nun die Immunogenität, sowie die Möglichkeit der Induktion einer Immunantwort gegen CEA in einem Organismus zu überprüfen, der CEA kennt, wurden die gleichen Studien an CEA-transgenen Tieren durchgeführt. Die transgenen Mäuse wurden durch Mikroinjektion des Kosmidclones cosCEA1, der die gesamte humane CEA-Sequenz enthält, in den männlichen Pronucleus befruchteter Mausoozyten generiert (Eades-Perner et al., 1994).

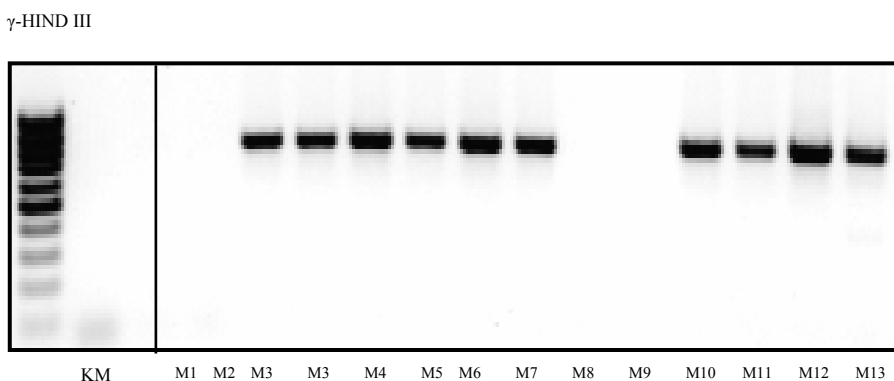
Die Testung der CEA-Transgenität erfolgte mit drei verschiedenen Methoden: Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Expression von CEA auf und in mukosalen Epithelien des Darmes nachgewiesen (Abbildung 18). Das Muster der Expression entsprach dabei der des Menschen, der CEA nach der Embryonalperiode nur auf den Darmepithelien exprimiert. Die humantypische Expression wurde durch die Verwendung der gesamten genomischen CEA DNA inklusive der humanen Promoterregion bei der Generierung der transgenen Tiere erzeugt.

**Abbildung 18:** 40-fache Vergrößerung der immun-histochemischen Färbung des Kolons der transgenen Nager von CEA mit einem CEA-Antikörper. Es wurde die indirekte Peroxidase-methode verwendet. Es ist eine Krypte zu sehen.



Als weitere Methode zum Nachweis der transgenen Tiere wurde die Detektion von CEA-DNA durch die Polymerasekettenreaktion verwendet (Abbildung 19).

**Abbildung 19:** PCR von aus Tier-schwanzgewebe iso-lierter DNA. KM ist eine Wildtypmaus. Neun von 13 Mäusen (M1-M13) sind positiv und somit CEA transgen.



Das dazu notwendige Gewebe wurde aus einem kleinen Stück des Tierschwanzes gewonnen.

Bei der dritten Methode wurde das Glykoprotein CEA im Stuhl der transgenen Tiere mittels ELISA nachgewiesen.

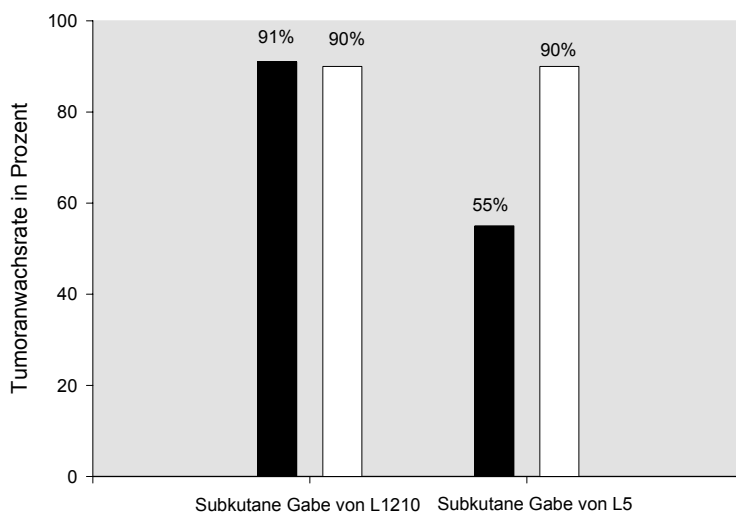
Im Serum der transgenen Tiere konnten keine Antikörpertiter gegen CEA gemessen werden, auch zeigte sich nach Restimulation keine Zytotoxizität gegen CEA-tragende Tumorzellen. CEA stellt also für die transgenen Tiere ein bekanntes Glykoprotein dar, das durch das humorale Immunsystem nicht erkannt wird.



### 3.2.2 Wachstumsverhalten der Wildtyp- und der transfizierten Tumorzellen nach Transplantation

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der Mutterzelllinie L1210 in den transgenen Tieren untersucht. Die Rate der Mäuse, die einen Tumor nach Transplantation entwickelten, lag bei 90% (n=10). Es konnte keine zelluläre Zytotoxizität gegen L1210 gemessen werden. Um eine Aussage über die Immunogenität von CEA im Vergleich zu den Wildtyptieren zu erhalten, wurde das Wachstumsverhalten der transfizierten Zellen in den transgenen Mäusen untersucht. Der Anteil der Mäuse mit Tumor drei Wochen nach Transplantation lag bei 90% (n=20) (Abbildung 20).

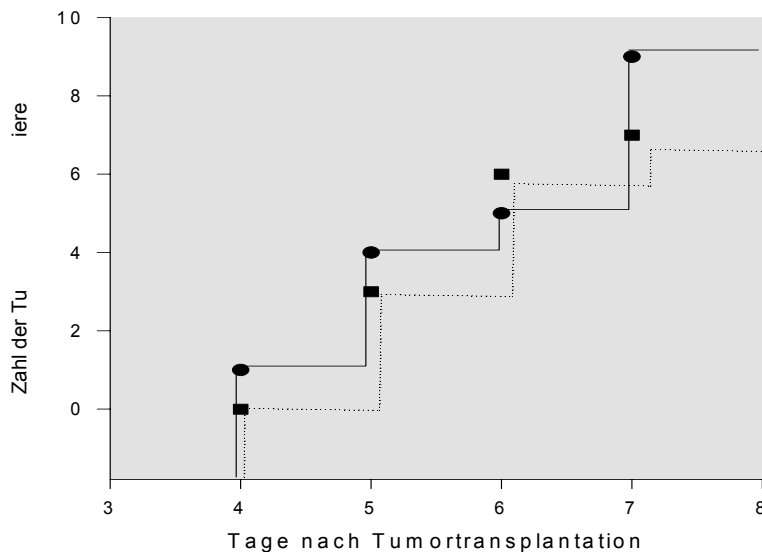
**Abbildung 20:** Prozent der Nager mit Tumor (L1210/L5) nach subkutaner Transplantation unter die Rückenhaut der transgenen Mäuse und der Wildtypiere. Der schwarze Balken stellt den Anteil der Wildtypmäuse mit Tumor dar. Der weiße stellt der Anteil der transgenen Nager mit Tumor dar.



Ähnlich der Versuchsgruppe der syngenen Tiere konnte keine Zytotoxizität gegen CEA gemessen werden.

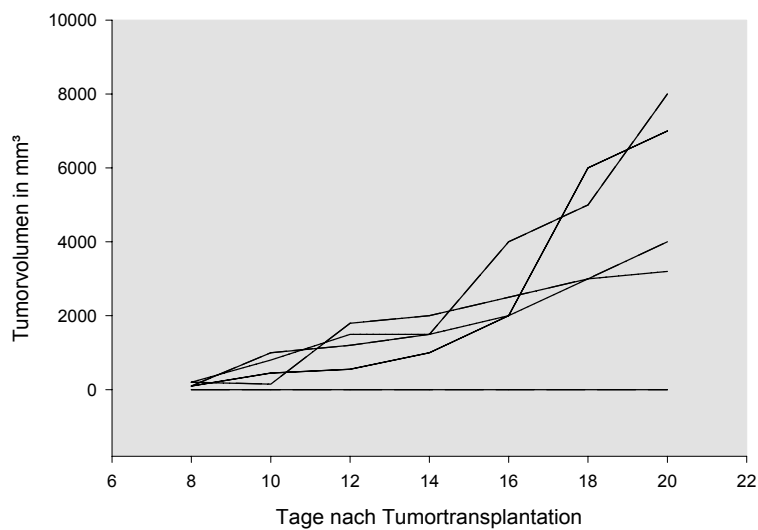
Die Wachstumscharakteristik, gemessen als Volumenzunahme des soliden Tumors und als Wachstumsbeginn des Neoplasmas unterschied sich nicht signifikant zwischen den folgenden beiden Gruppen: den transgenen und den Wildtypieren, denen CEA exprimierende L5 transplantiert wurden (Abbildung 21).

**Abbildung 21:** Beginn des Tumorwachstums nach subkutaner Injektion von L5 unter die Rückenhaut der transgenen Nager (●) und der Wildtypmäuse (■).

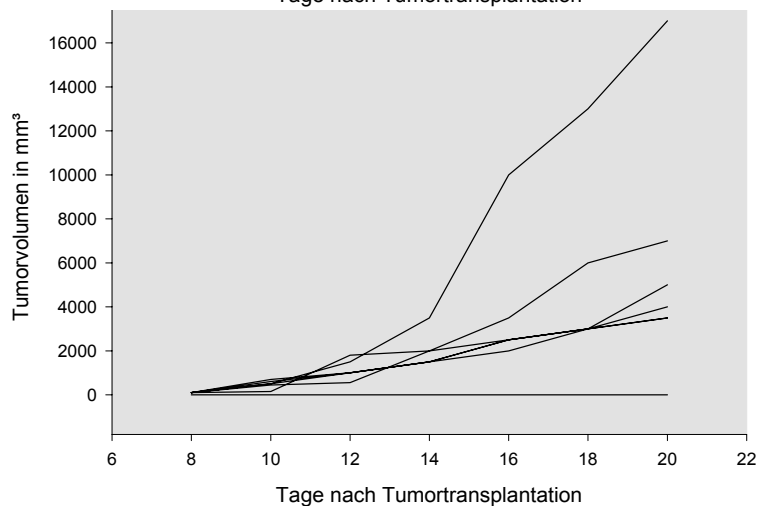


Ebenfalls keinen Unterschied gab es zwischen den folgenden beiden Gruppen: den transgenen Tiere, denen ein nicht-transfizierter und denen ein CEA transfizierter Tumor transplantiert wurde (Abbildung 22,23).

**Abbildung 22:** Volumenzunahme des Neoplasmas nach subkutaner Gabe der L1210 (n=5).

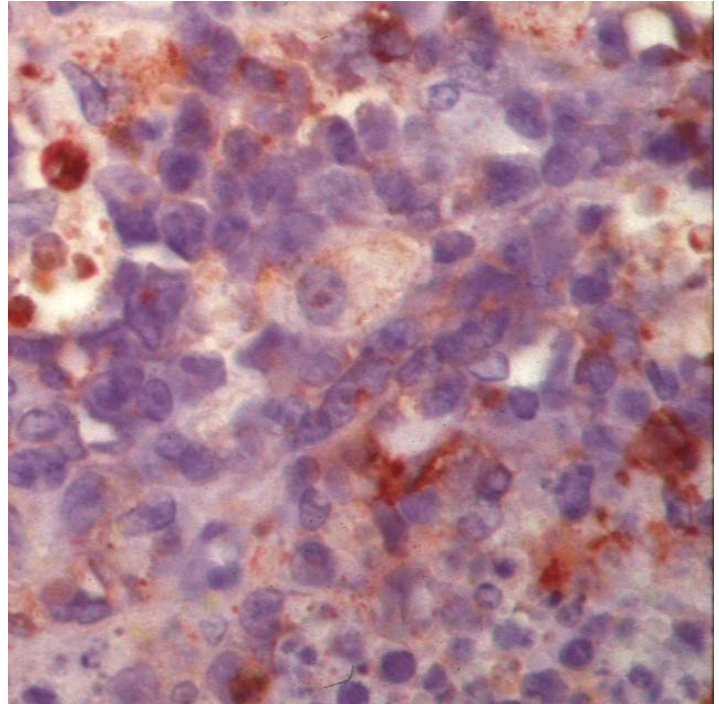


**Abbildung 23:** Volumenzunahme des Neoplasmas nach subkutaner Gabe der CEA exprimierenden L5 (n=6).



Zusammenfassend zeigten die CEA transgenen Tiere ein vergleichbares Wachstum der L5 und der L1210. Bei den L5 wurde – nach Transplantation unter die Rückenhaut - kein Verlust des Tumorantigens CEA nachgewiesen (Abbildung 24).

**Abbildung 24:** 40fache Vergrößerung der immunhistochemischen Anfärbung des implantierten Tumors von CEA in den transgenen Mäusen mit einem CEA-Antikörper. Es ist eine membranöse und zytoplasmatische Anfärbung zu erkennen. Es wurde die indirekte Peroxidasemethode verwendet.



Ebenfalls konnte eine hämatogene Streuung CEA exprimierender Tumorzellen in die Milz nachgewiesen werden. Eine zelluläre oder humorale Immunreaktion gegen CEA wurde im Gegensatz zu den Wildtyptieren (hoher Antikörpertiter, Abbildung 10) nicht gemessen. Diese Ergebnisse zeigen, dass CEA für die transgenen Tiere nicht fremd ist.

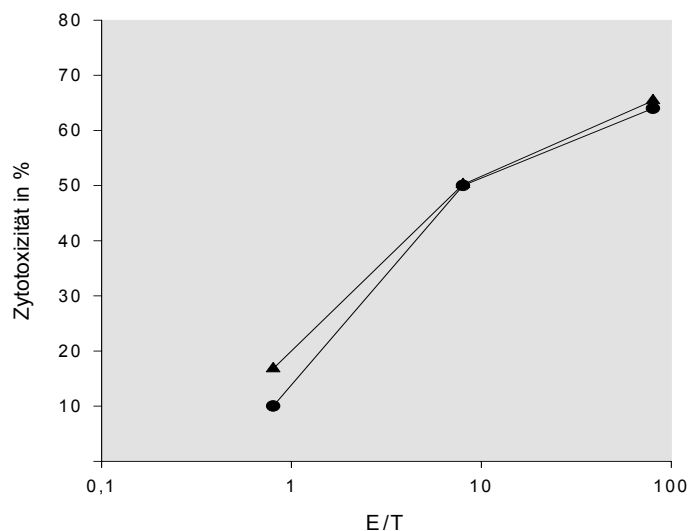
### ***3.2.3 Immunreaktion nach Adjuvansimmunisierung***

#### ***3.2.3.1 In Vitro***

Nachdem nachgewiesen wurde, dass CEA für die transgenen Tiere kein Fremdprotein darstellt, sollte nun folgende Frage beantwortet werden: Ist es möglich, mit den in den Wildtyptieren beschriebenen Immunisierungsstrategien auch in einem transgenen Modell zytotoxische Zellen gegen CEA zu induzieren und damit die Toleranz gegen CEA zu durchbrechen? Zur Beantwortung dieser Frage, testeten wir zunächst das Modell der intraperitonealen Immunisierung mit CEA positiven Tumorzellen, die in kompletten Freundschens Adjuvans aufgelöst wurden. Nach der Immunisierung zeigte sich bei den transgenen Tieren keinerlei Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes. Die Zytotoxizität wurde analog zum Wildtypmodell gemessen: Zehn Tage nach Vakzinierung wurde eine

Milzzellsuspension hergestellt. Diese wurde mit bestrahlten CEA tragenden Tumorzellen stimuliert und schließlich mit IL2 expandiert. So proliferierten selektiv die gegen CEA spezifisch zytotoxischen Klone der T-Lymphozyten. Nach fünf Tagen Restimulation wurden die Lymphozyten aus dieser Kultur isoliert und die Zytotoxizität in einem  $^{51}\text{Cr}$  Assay gemessen. Dabei zeigte sich eine Zytotoxizität gegen CEA tragende Tumorzellen mit einer Lyse von bis zu 70% der CEA tragenden Zielzellen L5 bei einem Effektor-zu Zielzell-Verhältnis von 100, obwohl CEA in den transgenen Tieren ein bekanntes Glykoprotein darstellt. Ähnlich wie bei den Wildtyptieren war die Zytotoxizität gegen die CEA-negative Mutterlinie genauso hoch. Die induzierte Zytotoxizität war also nicht CEA-spezifisch und muß noch gegen andere Antigene gerichtet sein (Abbildung 25).

**Abbildung 25:**  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätsassay nach intraperitonealer Adjuvans-immunisierung gegen CEA exprimierende L5 (▲) und L1210 (●).



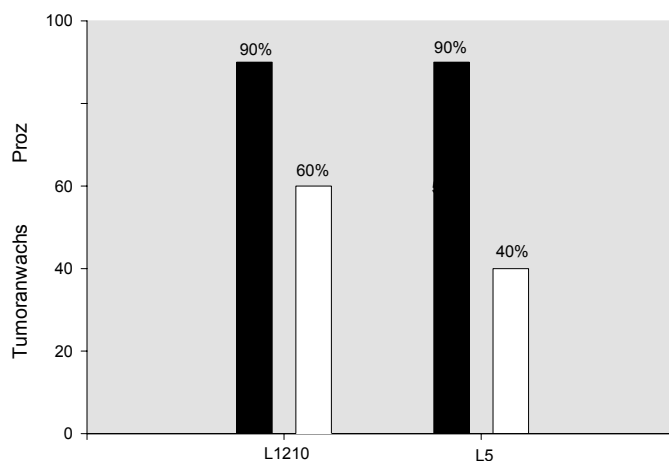
Es war also möglich, in den transgenen Tieren gegen CEA zytotoxische Lymphozyten zu induzieren. Konnten diese das Tumorstadium in vivo reduzieren.

### 3.2.3.2 *In Vivo*

Der Prozentsatz der vakzinierten transgenen Tiere, die nach subkutaner Transplantation der transfizierten Lymphomzellen einen makroskopisch messbaren Tumor entwickelten, reduzierte sich von 90% auf 40% (n=10) (Abbildung 26). Es ließ sich ähnlich wie bei den Wildtyptieren keine Fernmetastasierung von Tumorzellen in die Milz bei den Tumor-freien Tieren feststellen. Bei der Analyse des Blutserums auf Anti-CEA Antikörper fand sich kein

Antikörpertiter. Wie die Ergebnisse der Zytotoxizität gegen CEA negative Zellen bereits erwarten ließen, zeigte sich bei Transplantation der CEA negativen Mutterzelllinie L1210 ebenfalls eine, wenn auch geringere Reduktion der Anwachsrate der Tumoren um 30% auf 60% (n=10).

**Abbildung 26:** Prozent der transgenen Mäuse mit Tumor (L1210/L5) nach subkutaner Transplantation unter die Rückenhaut und L5-Adjuvans-immunisierung (weiße Balken). Als Kontrollgruppe (schwarze Balken) dienen Nager ohne Immunisierung.



Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Reduktion der Tumoranwachsrate die Wirksamkeit der Adjuvansimmunisierung auch bei den transgenen Tieren zeigt. Allerdings ist die gezeigte Reduktion nicht CEA spezifisch. Es werden auch CEA negative Zellen in ihrer Wachstumsaktivität gehemmt. Die Adjuvansimmunisierung erhöht also die Immunogenität der L5-Zellen. Dies aktiviert auch die Zytotoxizität gegen die Wildtypzellen L1210. Eine Kontrollimmunisierung mit L1210, die in Adjuvans aufgelöst wurden, zeigte keine Reduktion der Rate der angewachsenen Tumoren beider Gruppen (L1210 und L5).

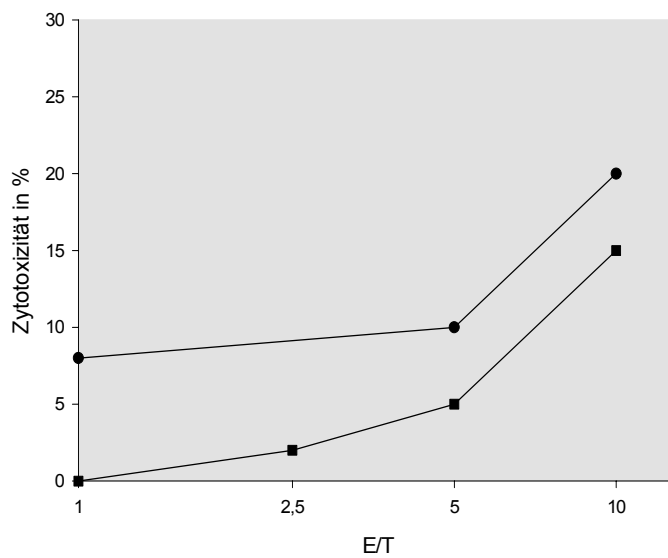
### 3.2.4 Immunantwort nach Vakzinierung mit beladenen Lymphozyten

#### 3.2.4.1 *In Vitro*

Es ist also möglich, eine zytotoxische Antwort in den transgenen Tieren zu induzieren, obwohl für diese CEA ein bekanntes Protein darstellt. Nach Immunisierung mit Antigen exprimierenden Tumorzellen, die in Adjuvans aufgelöst wurden, ist diese Immunantwort allerdings nicht CEA-spezifisch. In den Wildtyptieren konnte mit Hilfe von CEA beladenen Lymphozyten eine CEA spezifische Antwort induziert werden. Ist es möglich auf diese Art eine zytotoxische Antwort in den CEA transgenen Tieren zu induzieren, obwohl hier

CEA als einziges Antigen präsentiert wird? Die intravenöse Immunisierung mit CEA beladenen Lymphozyten konnte nach Restimulation eine *in vitro* wirksame zytotoxische Antwort induzieren, die aber erheblich schwächer war als die in den syngenen Tieren (Abbildung 27). Als Kontrollimmunisierung wurden nicht beladene Milzlymphozyten injiziert. Hier konnte keine Zytotoxizität nachgewiesen werden.

**Abbildung 27:**  $^{51}\text{Cr}$  Zytotoxizitätsassay nach intravenöser Immunisierung mit beladenen autologen Lymphozyten. Dargestellt ist die Zytotoxizität gegen L5 in den transgenen Mäusen (■) und den Wildtypnagern (●).



Im Gegensatz zur Immunisierung mit in Adjuvans aufgelösten Tumorzellen, konnte gegen die Kontrollzelllinie L1210 keine Zytotoxizität gemessen werden. Ist diese spezifisch gegen CEA tragende Zellen gerichtete zytotoxische Antwort in der Lage, *in vivo* das Tumorwachstum zu verhindern?

#### 3.2.4.2 *In Vivo*

Zur Beantwortung dieser Frage wurden 10 Tage nach Vakzinierung CEA positive Tumorzellen subkutan verabreicht. Weitere 10 Tage danach zeigte sich, dass 90% der Tiere Tumore entwickelten (n=10). Dieser Anteil entsprach dem Prozentsatz Tumor-tragender Tiere nach Applikation der Tumorzellen ohne Vakzinierung. Alle Tumor-tragenden Tiere zeigten Fernmetastasierung in die Milz. Die metastasierten Zellen waren CEA positiv. Es konnte also kein Unterschied zwischen der Gruppe der vakzinierten und der Gruppe der nicht-vakzinierten Nager gefunden werden. Bei Transplantation der CEA negativen Kontrollzelllinie wuchsen bei 80% der Tiere 10 Tage nach der intravenösen Vakzinierung mit CEA beladenen Lymphozyten der Tumor an. Es gab also keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wachstumsverhalten der CEA positiven Tumorzellen und der Mutterzelllinie in der

Gruppe der mit CEA beladenen Zellen immunisierten Nagern. Weiterhin zeigt die Wachstumscharakteristik der transplantierten CEA positiven Tumore in dieser Versuchsgruppe keine Verzögerung in der Volumenzunahme im Vergleich zur nicht-immunisierten Kontrollgruppe der CEA transgenen Tiere. Bei der Kontrollimmunisierung mit nicht-beladenen Milzlymphozyten konnte keine Reduktion des Tumorwachstums registriert werden (n=5; 5 Mäuse mit Tumor). Zusammenfassend kann man konstatieren, dass im Gegensatz zur Immunisierung mit Antigen exprimierenden Tumorzellen, die in Adjuvans aufgelöst wurden, sich nach Immunisierung mit CEA beladenen Lymphozyten in unserem Modell keine protektiven Effekte in vivo zeigten. Es ist also möglich, in beiden Mäusestämmen eine in vitro messbare zytotoxische Antwort zu induzieren. Allerdings ist diese Immunisierung nur in den Wildtyptieren in der Lage, auch das Tumorwachstum zu reduzieren.

	Antikörperantwort	CTL-Antwort	Tumorwachstum
Wildtyptiere	-	+	↓
Transgene Tiere	-	+	↔

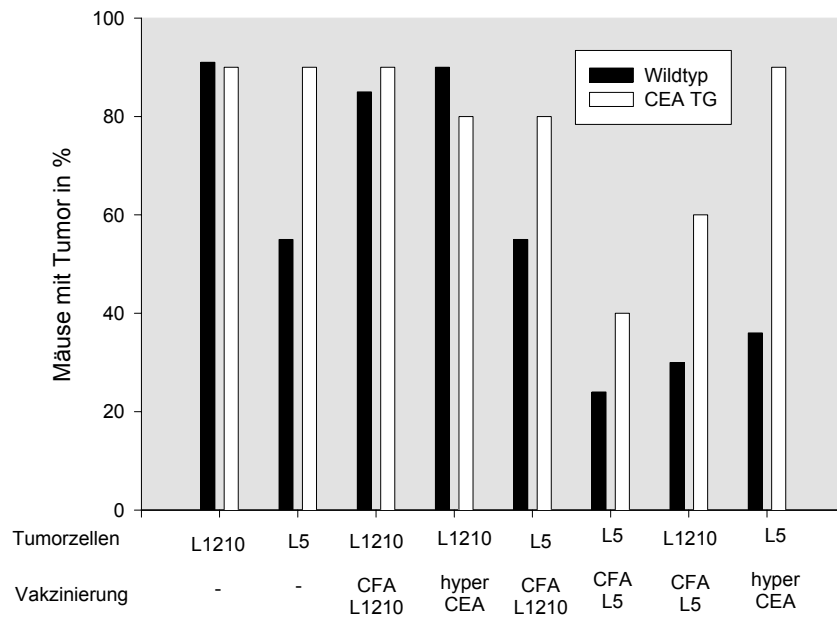
**Tabelle 3:** Vergleich der immunologischen Reaktion nach intravenöser Vakzinierung mit CEA beladenen Lymphozyten.

**3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In Tabelle 4 und Abbildung 28 sind noch einmal die immunologische Reaktion und die Tumoranwachsraten der verschiedenen Vakzinierungsgruppen zusammengefasst:

	Antikörperantwort	CTL	Tumorwachstum
<b>Adjuvansimmunisierung</b>			
CFA mit L5 in WT	+	+ (auch gegen L1210)	↓
CFA mit L5 in TG	-	+ (auch gegen L1210)	↓
<b>Immunisierung mit beladenen Lymphozyten</b>			
WT	-	+	↓
TG	-	+	↔

**Tabelle 4:** Vergleich der immunologischen Reaktion in den verschiedenen Vakzinierungsgruppen. (WT= Wildtypmäuse; TG=transgene Mäuse).



**Abbildung 29:** Prozentsatz der Mäuse mit Tumor in den verschiedenen Vakzinierungsgruppen nach Tumortransplantation.



## **4 Diskussion**

### **4.1 Das Tumorantigen CEA als Abstoßungsantigen**

Die Immunisierung gegen Tumorantigene stellt bisher bei ausgewählten Tumorerkrankungen eine Option dar. So zeigen sich in klinischen Studien Erfolge bei der spezifischen Immuntherapie durch Induktion der zellulären Immunantwort gegen Melanome oder Nierenzellkarzinome (Schuler-Thurner et al, 2000; Kugler A. et al, 2000; Rosenberg S et al, 1998). In Tiermodellen ist man deshalb auf der Suche nach weiteren geeigneten Tumorantigenen, die als Ziel für spezifische zytotoxische Zellen dienen könnten. Eines dieser Antigene stellt das auf Adenokarzinomen exprimierte Glykoprotein CEA dar. CEA ist ein Membranprotein, das in über 50% der epithelialen Tumoren und einigen normalen Zellen exprimiert wird (Thompson et al., 1995). Die Expression auf normalen Zellen ist meist auf die apikale, einem Lumen zugewandte Oberfläche des gastrointestinalen und respiratorischen Epithels beschränkt. Also macht die Expression in zahlreichen epithelialen Tumoren und die exklusive Oberflächenexpression auf nur wenigen normalen Zellen CEA zu einem interessanten Zielprotein für Tumorimmunisierungen. Desweiteren wurde gezeigt, dass im humanen Organismus Epitope von CEA auf MHC-I Molekülen gebunden werden (Ras E. et al, 1997; Kawashima I et al, 1998; Nukaya I et al, 1998; Kim C et al, 1998; Keogh E et al, 2001). Allerdings ergaben sich bei der Testung von Vakzinierungen Diskrepanzen zwischen teils erfolgreichen Tiermodellen und den klinischen Erfahrungen (Zhu M. et al, 2000; Marshall J. et al, 1999; Marshall J. et al, 2000; Berinstein N.L. et al, 2002), die zwar nach Vakzinierung teilweise eine humorale oder zelluläre immunologische Reaktion gegen CEA nachweisen können, die aber nur in Einzelfällen zu objektivierbaren und signifikanten Ergebnissen bei der Tumorreduktion führen. Eine Erklärung könnte sein, dass genetische Differenzen nicht beachtet wurden, die für die Immunreaktion entscheidend sind. Dies ist bei den Modellen naheliegend, die humanes CEA als Zielprotein in Wildtypmäusen, bei denen humanes CEA trotz großer Homologien im Genom nicht vorkommt (Eades-Perner et al., 1994), verwendeten. CEA könnte in den Wildtyptieren als fremd erkannt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, etablierten wir ein Tiermodell mit zwei verschiedenen Mäusestämmen – Wildtyptieren und CEA-transgenen Nagern und testeten in diesen die immunologische Reaktion auf CEA.

#### **4.2 Immunologische Reaktion nach Gabe von CEA transfizierten Tumorzellen**

Der syngene DBA/2N-Organismus zeigte nach Tumortransplantation eine immunologische Reaktion gegen CEA, die ausschließlich vom humoralen Immunsystem ausgeht. Allerdings reicht die humorale Antwort nur dazu aus, das Tumorstadium in 1/3 der Tiere zu verhindern.

Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte 1992 die Arbeitsgruppe um Pelegrin aus Lausanne in einem Tiermodell (Pelegrin A. et al., 1992), in dem sie eine CEA transfizierte Rattenkolonkarzinomlinie immunkompetenten BDIX Ratten subkutan transplantierte, um die Lokalisation von CEA tragenden Tumoren mit Hilfe von radioaktiv markierten Antikörpern zu untersuchen. Dabei entwickelten 45% der Tiere trotz Tumortransplantation keinen Tumor. In diesen Tieren wurde eine starke Antikörperantwort gegen CEA nachgewiesen. In den nicht immunkompetenten Nacktratten hingegen entwickelten fast alle transplantierten CEA transfizierten Karzinomzellen einen Tumor. Die Arbeitsgruppe schloss aus diesen Beobachtungen, dass das humane CEA als Abstoßungsantigen in Ratten fungierte. Diese Publikation zeigte schon 1992, dass humanes CEA trotz einiger homologer Gensequenzen im Nagetiergenom im syngenen Tiermodell besonders bei hoher Expression auf den transfizierten Zellen immunogen wirkt. Weitere Ergebnisse, die zeigen, dass CEA ein Abstoßungsantigen in Wildtyporganismen ist, publizierte die Arbeitsgruppe um Clarke, die das Wachstum von CEA-transfizierten Zellen in einem transgenen und einem nicht-transgenen Mausmodell des Stammes C57 untersuchte (Clarke P. et al., 1998). Er konnte zwar keine Unterschiede in der Anwachsrate der Tumoren erkennen, allerdings zeigten die CEA exprimierenden Tumorzellen eine deutlich verlangsamte Wachstumscharakteristik in den Wildtypmäusen. Beide Arbeitsgruppen arbeiteten – wie in unseren Untersuchungen – mit CEA-transfizierten Tumorzellen. Diesen Ergebnissen widersprechend, konnten andere Publikationen, die mit einer CEA-transfizierten Kolonkarzinomzelllinie für Immunisierungsversuche im Mausmodell arbeiteten (Robbins, P.F. et al, 1991; Bei, R. et al., 1994; Conry, R.M. et al., 1995) folgendes feststellen: Sie untersuchten das Wachstumsverhalten einer CEA negativen und einer CEA exprimierenden Tumorzelllinie in Wildtypmäusen. Diese Modelle zeigten keine Proliferationshemmung der CEA transfizierten Zelllinien. Die Diskrepanz zwischen den Modellen lässt sich durch eine von Hand und seiner Arbeitsgruppe 1993 gemachten Beobachtung erklären (Hand P.H. et al., 1993).

Hand analysierte in seiner Publikation die Wachstumseigenschaften von drei mit verschiedenen Vektoren transfizierten Kolonkarzinomlinien. Er zeigte hierbei, dass die transfizierten Zellen, die CEA mit einem Molekulargewicht von 180kDa exprimieren, das dem in humanen Zellen vorkommenden CEA gleicht, eine Wachstumsverzögerung zeigen. Dagegen konnte bei CEA-Transfektanten mit einem CEA-Gewicht von 70kDa, bei denen zwei bis drei sich wiederholende CEA-Domänen depletiert waren, keine Wachstumsverzögerung im Vergleich zu der Wildtypzelllinie festgestellt werden. Also scheint das Molekulargewicht des transfizierten exprimierten CEA-Glykoproteins entscheidend zu sein, ob die CEA transfizierten Tumorzellen abgestoßen werden. Gründe hierfür liegen sicherlich in mehreren Faktoren: Bei höherem Molekulargewicht sind mehr antigene Determinanten auf dem Molekül vorhanden, die von immunkompetenten Zellen erkannt werden können. Möglich ist auch, dass gerade die sehr immunogen wirkenden Proteinstrukturen bei den Transfektanten mit niedrigem Proteingewicht fehlen. Außerdem könnte die Glykosilierung im längeren und schwereren Molekül ausgeprägter sein als im kürzeren. Nachdem das humorale Immunsystem Zuckerreste erkennen kann und Antikörper bei der Abwehr in diesen Modellen entscheidend sind, kann eine effektivere humorale Immunabwehr der schwereren und längeren Proteine sicherlich ein Grund für den Unterschied in der Wachstumscharakteristik sein. Zur Transfektion in unserer Arbeit wurde eine komplette humane CEA-cDNA verwandt, die zur Expression des gesamten humanen CEA führt. Auch Pelegrin benutzte in seiner Arbeit, in der er eine Abstoßung CEA exprimierender Tumorzellen beschrieb, die komplette humane cDNA. Andere Arbeitsgruppen arbeiteten hingegen mit CEA-Transfektanten, die das Antigen mit einem niedrigeren Molekulargewicht exprimierten. Dies wirkt dann nicht so immunogen.

In Übereinstimmung mit einem Großteil der publizierten Arbeiten konnte also in unserem Modell gezeigt werden, dass CEA ein Abstoßungsantigen in den Wildtyptieren ist.

### **4.3 Die Effektivität der Antikörper**

Wenn CEA also als Antigen fungiert, das zu einer Abstoßung in 45% der Fälle führt, stellt sich die Frage: Warum wachsen überhaupt Tumorzellen in den Wildtyptieren an? Nachdem keine zytotoxischen Zellen gegen CEA nachgewiesen

werden konnten und Antikörper in diesem Modell die entscheidende Immunantwort darstellen, sind mehrere Hypothesen als Erklärung möglich:

Die Antikörpertiter unterscheiden sich signifikant zwischen den Tumor-tragenden und den Tumor-freien Tieren. So wäre es möglich, dass die Tumor-tragenden Tiere einen niedrigeren Antikörpertiter als die Tumor-freien haben. Der Grund für unterschiedliche Antikörperkonzentrationen kann darin liegen, dass die Effektivität der Präsentation des Antigens variiert. Ursache hierfür könnte eine unterschiedlich ausgeprägte Entzündungsreaktion sein. Allerdings zeigte sich auch bei getrennter Untersuchung der Antikörpertiter der Gruppe mit Tumor und der Population ohne Geschwulst keine Differenz in der Höhe des Antikörpertiters. Aus diesem Grund kann eine unterschiedlich starke humorale Antwort nicht als Begründung für das Anwachsen der Tumoren in 55% der Tiere dienen.

Ein weiterer Erklärungsversuch dieses Phänomens: Durch einen Verlust des Tumorantigens als tumor escape-Mechanismus in den Tieren mit anwachsendem Tumor können die Antikörper die Tumorzellen nicht mehr erkennen. Unsere Untersuchungen an den soliden Tumoren zeigten, dass eine Transkription des CEA-Exons stattfindet. Allerdings ist es möglich, dass die Expression des CEA-Proteins posttranslational herunterreguliert wird. Dagegen spricht, dass CEA auf den metastasierten Zellen exprimiert ist. Ein Verlust des Antigens auf dem soliden Tumor ist somit durchaus möglich, aber nicht wahrscheinlich.

Folgende Möglichkeit der Erklärung der Ineffektivität der Antikörper wurde in Betracht gezogen: Der Tumor sitzt an einer exklusiven Stelle, an der die Antikörper nicht angreifen können. Wir konnten allerdings indirekt den Beweis erbringen, dass Antikörper an die Tumorzelle gelangen. Bei dem Versuch das Oberflächenantigen CEA mittels Immunhistochemie zu färben, konnte nämlich keine Expression von CEA nachgewiesen werden, obwohl die RT-PCR CEA-mRNA in der aus dem Tumor isolierten RNA detektierte. Dieses PCR Ergebnis spricht dafür, dass CEA DNA transkribiert wird und somit CEA mit hoher Wahrscheinlichkeit auch exprimiert wird. Wir hingegen können das Protein auf den Tumorzellen mit immunhistochemischen Methoden nicht anfärben. Es besteht also ein Widerspruch zwischen der schweren immunhistochemischen Nachweisbarkeit des Antigens und des positiven Nachweises der Transkription des Gens. Dieser Gegensatz ist dadurch erklärt, dass die im Blutserum nachgewiesenen Antikörper das Antigen maskieren, so dass es durch immunhistochemische Methoden nicht

detektiert werden kann. Die Antikörper scheinen also den Ort des Tumorwachstums zu erreichen.

Doch was könnte dann noch der Grund für das Versagen der humoralen Abwehr sein? Es wäre möglich, dass die Antikörper zwar an den Tumor gelangen, doch die Konzentration der Antikörper dort zu gering ist. Gegen diese These spricht, dass man sehr hohe Antikörpertiter im Blutserum aller Mäusen nachweisen konnte. Aber wir wissen nicht, wie der Antikörpertiter im Serum mit dem lokal am Tumor vorhandenen Antikörpertiter korreliert. Vieles spricht dafür, dass der dort gemessene Antikörpertiter um vieles niedriger sein könnte als der im Serum. CEA wird zwar auf den Tumorzellen exprimiert, kommt aber auch in hohem Maße als sezerniertes Protein im Blutserum vor. So zeigen Tumorpatienten hohe Titer an CEA im Serum (Lamerz R et al, 1975; Wepsic H.T., 1983). Dieses CEA könnte also die vorhandenen Antikörper binden und so verhindern, dass diese an den Tumor gelangen. Die Antikörper-Antigen-Komplexe zirkulieren dann im Blut, ohne dass die Antikörper eine Wirkung hätten.

Ein weiterer Grund, warum so hohe Titer an Antikörpern das Wachstum eines großen Teils der Tumoren nicht verhindert, könnte sein, dass die Aktivierung von Komplement und eine nachfolgende Lyse der Tumorzellen ausbleibt. Auch die Dichte von Makrophagen und anderer immunkompetenter Zellen, die das konstante Fragment der Antikörper ( $F_c$ ) erkennen und an dieses binden, im und um den Tumor könnte zu gering sein, um eine effektive Zerstörung der malignen Zellen zu gewährleisten. Es gibt also zahlreiche Gründe, warum Antikörper nicht die gewünschte Effektivität bei der Tumorabwehr in unserem Modell haben könnten.

Die begrenzte Wirkung von Antikörpern konnten auch schon andere Arbeitsgruppen demonstrieren. Die Arbeitsgruppe um Clarke, die das Wachstum von CEA transfizierten Zellen in einem transgenen und einem nicht-transgenen Mäusestamm untersuchte, publizierte, dass trotz eines hohen Antikörpertiters die CEA transfizierten Zellen in den nicht-transgenen Nagern anwuchsen (Clarke P. et al., 1998). Eine Wachstumsverzögerung bewirkten die gegen CEA gerichteten Antikörper im Tiermodell von Hand et al. nach Transplantation der transfizierten Kolonkarzinomlinie MC-38 ( $H2^b$ ) in syngenen Tieren (Hand P.H. et al, 1993). Die begrenzte Wirksamkeit von Antikörpern in der Tumorthherapie zeigen auch klinische Studien. Die größten Erfahrungen in der Therapie gastrointestinaler

Tumoren liegen mit dem unkonjugierten monoklonalen Antikörper 17-1A vor (Riethmüller et al., 1994). Der murine Antikörper vom IgG-2A-Isotyp erfasst ein 30-40 kD-Glykoprotein auf der Oberfläche einer Reihe von epithelialen Tumoren, unter anderem auf Pankreas-, Magen- und Kolon-/Rektumkarzinomen. Seit 10 Jahren wurde der Antikörper bei über 500 Patienten mit fortgeschrittenen gastrointestinalen Karzinomen, vor allem Kolon-/Rektum- und Pankreaskarzinomen, im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt. Die erzielten Remissionsraten lagen unter 10 %. Diese Studien wurde allerdings bei Patienten mit sehr weit fortgeschrittenen Tumorleiden durchgeführt. Dass Antikörper dagegen in früheren Krankheitsstadien durchaus einen begrenzten Effekt haben, zeigen die Ergebnisse einer adjuvanten prospektiven randomisierten Therapiestudie mit dem beschriebenen Antikörper 17-1A bei Patienten mit Kolon-/Rektumkarzinomen im Stadium Dukes C. Nach einer medianen Beobachtungszeit von 5 Jahren konnte in der Behandlungsgruppe gegenüber einer beobachteten Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Rezidivrate um 27 % und der Mortalität um 30 % beobachtet werden (Riethmüller et al., 1994). In der Zwischenzeit hat sich der Unterschied als nicht signifikant erwiesen.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass CEA in den Wildtyptieren antigen ist. Es werden CEA spezifische Antikörper gebildet. Diese sind in einem knappen Drittel der Mäuse effizient. Der Rest der Mäuse entwickelt allerdings Tumore, obwohl die Expression von CEA auf den Tumorzelle nachweisbar ist.

#### **4.4 Die zelluläre Immunantwort gegen CEA**

Während nun CEA als Antigen erkannt wird und eine Antikörperproduktion gegen dieses Tumorantigen feststellbar ist, stellt sich die Frage nach der T-Zell-Antwort: Lassen sich in diesem Tiermodell nach subkutaner Gabe von intakten CEA exprimierenden Tumorzellen zytotoxische Zellen im Rahmen einer zellulären Abwehr induzieren? Die Ergebnisse zeigen, dass in den nicht- transgenen Mäusen trotz subkutaner Injektion von proliferationsunfähigen bestrahlten CEA positiven Tumorzellen keine zelluläre zytotoxische Antwort gemessen werden kann. Also reicht in diesem Mäusestamm die subkutane Injektion von Tumorzellen nicht aus, um gegen CEA die zelluläre spezifische Immunantwort zu induzieren. Was sind die Gründe? Das Antigen stellt einen Reiz für die B-Zellen dar, während die T-Zellen nicht reagieren. Das Antigen und sein Charakter sind

mitentscheidend, welche Art der Immunantwort induziert wird. CEA ist ein stark glykosiliertes Protein. B-Lymphozyten erkennen nicht nur Proteine, sondern auch Polysaccharide, während T-Lymphozyten nur Proteinstrukturen erkennen. Durch die hochgradige Glykosilierung sind viele antigene Determinanten, die von B-Lymphozyten erkannt werden können, auf CEA vorhanden.

Eine weiterer Grund könnte sein, dass die Präsentation des Antigens zwar für die Induktion von B-Zellen effizient ist, die T-Zell-Antwort allerdings nicht induzieren kann. Dabei ist wichtig zu wissen, dass eine Antikörperproduktion gegen Polysaccharide induziert werden kann, ohne dass akzessorische Zellen des Immunsystems benötigt werden. Normalerweise sind bei der Induktion sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunantwort akzessorische Zellen nötig. Die Antikörper produzierenden B-Lymphozyten sind in der Lage, sogenannte T-Zell-unabhängige (TI) Antigene, vor allem Polysaccharide, auch im gelösten Zustand zu binden, zu erkennen und auch sich selber zu stimulieren (Rijkers et al, 1991). Hingegen sind für die Induktion der T-Helferzellabhängigen zellulären Antwort bei den meisten Proteinen sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (APC) unabdingbar. Zu den Antigen präsentierenden Zellen gehören die Makrophagen, die B-Lymphozyten und die sehr effektiven dendritischen Zellen. Nachdem nach subkutaner Gabe von Tumorzellen keine zelluläre Immunantwort induziert wird, kann man davon ausgehen, dass eine suffiziente, die zelluläre Abwehr stimulierende Präsentation mit Hilfe dieser akzessorischen Zellen nur in einem geringen Maße stattfindet.

Es muß also an der Struktur des Tumorantigens und an einer insuffizienten Antigenpräsentation liegen, dass nach subkutaner Applikation nur die Antikörperantwort, nicht aber die zelluläre Immunabwehr induziert wird. Das Ziel war jetzt, die insuffiziente Antigenpräsentation effektiver zu gestalten.

Die Dermis böte mit ihrer hohen Dichte an dendritischen Zellen eine geradezu ideale Umgebung zur Induktion der zellulären Immunantwort. Aber auch das Peritoneum könnte mit seiner großen Oberfläche und den zahlreich vorkommenden Peritonealmakrophagen eine gute Umgebung bieten. Also entschieden wir uns zur intraperitonealen Gabe der Tumorzellen, um die Antigenpräsentation zu verbessern. So war eine schwache zytotoxische Antwort zu induzieren. Also wirken hier die Peritonealmakrophagen als effiziente Antigenpräsentatoren, die die zytotoxische Antwort induzieren können. Die

Antigenpräsentation konnte verbessert werden, allerdings wurde nur eine schwache Antwort des zellulären Immunsystems stimuliert. Für eine in vivo effektive Abwehr sollte zu einer effektiveren Methode der Antigenpräsentation übergegangen werden.

#### **4.5 Die Immunisierung mit Adjuvans**

Dazu wurden nun weitere Modifikationen bei der Vakzinierung vorgenommen, um die Präsentation von CEA und die zytotoxische Antwort auf CEA weiter zu verbessern. Shi et al. zeigten neben vielen anderen Autoren, dass Adjuvanzien die Wirkung einer Immunisierung deutlich steigern können (Shi et al., 2000). Auch in den hier präsentierten Untersuchungen gelingt es, durch intraperitoneale Gabe von Tumorzellen, die in Adjuvans aufgelöst wurden, in Wildtyptieren neben einer humoralen Immunantwort auch eine zytotoxische Antwort zu stimulieren, die sowohl in vitro, als auch in vivo effektiv ist. Die intraperitoneale Immunisierung mit in Adjuvans aufgelösten Tumorzellen zeigte sich deutlich der Vakzinierung mit intakten Zellen überlegen. Eine Erklärung hierfür ist, dass Adjuvanzien als Verstärker der Immunantwort dienen. Sie lösen durch die antigenen bakteriellen Bestandteile – in diesem Fall inaktivierte Mykobakterien - einen Entzündungsreiz aus. Janeway beschreibt bei dieser Art der Vakzinierung die Rolle sogenannter PAMPs (pathogen associated molecular pattern) (Janeway C.A. et al, 1992) . Dieser Begriff, der einen entscheidenden Teil des unreifen und frühen Immunsystems benennt, beschreibt mikrobielle Antigene wie LPS oder Mannan, die das Immunsystem stimulieren können, ohne dass eine Sensibilisierung gegen diese Antigene vorangegangen sein muss. Normalerweise ist das Immunsystem gegen fremde Antigene durch früheren Kontakt sensibilisiert und kann so schnell Antikörper bilden oder die zelluläre Immunantwort aktivieren. Ohne diese Sensibilisierung ist teilweise keine effektive Immunantwort möglich. Die PAMPs ermöglichen eine effektive Immunantwort, ohne dass die Sensibilisierung erfolgt sein muss. In unserem Modell hat dies den Vorteil, dass somit eine schnelle und effektive Antwort induziert werden kann und gegen andere möglicherweise auf den Tumorzellen liegende Antigene, die dem Organismus nicht - so wie CEA aus der Fetalzeit - bekannt sind, eine effektive Antwort induziert werden könnte. Gerade für diese Antigene stellt die Adjuvansimmunisierung eine hervorragende Möglichkeit dar, eine zelluläre Abwehr aufzubauen. In unseren Untersuchungen



zeigt sich dann auch, dass die Immunisierung mit in Adjuvans aufgelösten Tumorzellen auch andere Antigene als CEA erkannt und sowohl in vitro als auch in vivo effektiv bekämpft. Es werden sowohl in den Zytotoxizitätsassays als auch in den Tumortransplantationsversuchen die CEA negative Mutterzelllinie nach Adjuvansimmunisierung abgestoßen.

Welche weiteren Wirkungen könnten Adjuvantien haben? Neuere Untersuchungen zu untergehenden Zellen – wie sie bei der Adjuvansimmunisierung vorkommen - zeigen, dass sterbende Zellen ein Gefahrensignal exprimieren, das das Immunsystem zusätzlich stimuliert und dendritische Zellen anlockt, aber auch die Differenzierung von Vorläuferzellen zu dendritischen Zellen unterstützt und beschleunigt (Albert et al., 1998; Galucci et al., 1999; Matzinger et al., 1998; Matzinger et al., 1994). In unserem Fall ist davon auszugehen, dass die in Adjuvans aufgelösten und sterbenden Tumorzellen diese Gefahrensignale exprimieren und so dendritische Zellen in das Peritoneum locken, bzw. deren Ausreifung stimulieren. Das Antigen CEA wird dann durch diese Antigen präsentierende Zellen dem Immunsystem präsentiert und zytotoxische Zellen induziert (Armstrong et al., 2001).

#### **4.6 Die Spezifität der Immunisierung**

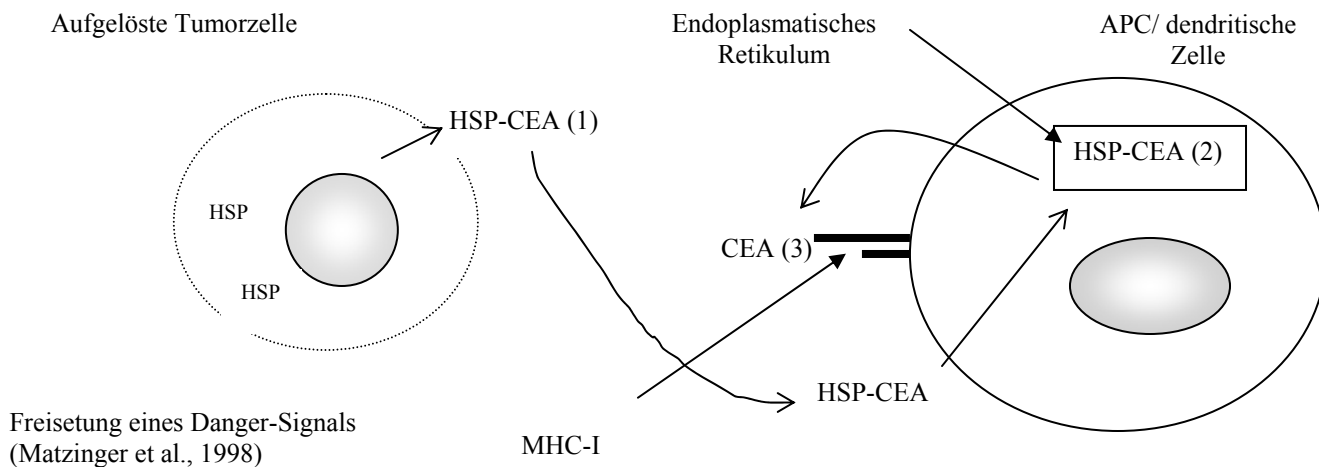
Durch die Adjuvansimmunisierung können zytotoxische T-Lymphozyten erzeugt werden. Diese Antwort ist aber nur zum Teil CEA spezifisch. Wie bereits erwähnt, ist die zytotoxische Antwort nicht CEA spezifisch, sondern auch CEA negative Tumorzellen werden erkannt. Durch die Auflösung der Zellmembran der CEA exprimierenden Tumorzelle werden nicht nur antigene Determinanten von CEA freigesetzt, sondern auch andere Antigene. Somit stehen auch diese als Zielproteine der zytotoxischen Zellen zur Verfügung. Doch welche Antigene könnten dies ein? Es gibt in der Literatur Hinweise, dass „minor histocompatibility antigens“ durch das später beschriebene „cross priming“ zytotoxische T-Zellen, die gerade diese Antigene erkennen, induzieren können (Bevan et al, 1976). Minor histocompatibility antigens sind Antigene, die normalerweise vom Immunsystem nicht erkannt und nicht MHC restringiert präsentiert werden. Ein weiterer Punkt ist interessant: Eine Vakzinierung mit der Wildtypzelllinie L1210, die in Adjuvans aufgelöst wurde, erzeugt keine zytotoxischen Zellen gegen L1210 oder L5, während eine Vakzinierung mit der CEA exprimierenden Zelllinie L5 eine zelluläre

Immunantwort gegen beide Zelllinien (L5 und L1210) induziert. Es ist also anzunehmen, dass auch die Transfektion der Zellen an sich immunstimulatorische Wirkung entfalten könnte.

#### **4.7 Das „cross-priming“**

Die Frage, wie das exogen zugeführte stark glykosilierte Tumorantigen CEA und die anderen Antigene überhaupt eine zelluläre zytotoxische Antwort induzieren können, blieb bisher unbeantwortet. In der Immunologie nahm man lange Zeit an, dass exogen zugeführte Proteine über den Major Histocompatibility Complex II – kurz MHC II – präsentiert werden. MHC-class II restringierte Antigene werden dann von CD 4 positiven T-Helferzellen erkannt und B-Lymphozyten stimuliert, sowie die weitere Differenzierung von T-Zellen angeregt. B-Lymphozyten produzieren dann Antikörper. Eine zytotoxische zelluläre Antwort gegen exogen zugeführte Proteine wird nach diesem Modell nicht induziert. Man ging davon aus, dass nur endogene, sich in der Zelle replizierende Proteine, wie Viruspeptide, die zytotoxische Antwort aktivieren. Diese Proteine werden durch MHC-I – Major Histocompatibility Complex I- präsentiert. Diese Antigene aktivieren dann die zytotoxischen, CD8 positiven T-Lymphozyten und induzieren eine zelluläre Immunantwort. Es wurde also zwischen endogenen, sich in der Zelle replizierende und exogenen, durch präsentierende Makrophagen und andere Präsentatoren aufgenommene Antigenen unterschieden. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, daß diese Trennung nicht so streng sein kann. In diesen Versuchen wird durch die Zuführung exogener Proteine in Form einer durch Adjuvans aufgelösten Zelle, eine zytotoxische T-Zell-Antwort aktiviert. Dieses Phänomen beschreibt der Begriff „Cross priming“. Cross priming beschreibt die Induktion von zytotoxischen Lymphozyten gegen exogene, meist Zell-assoziierte Antigene, die aus dem Knochenmark stammende Zellen aufgenommen und präsentiert werden. Diese Zellen werden unter Mitwirkung von CD 4 positiven Typ-1 Helferzellen so modifiziert, dass sie zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren können (Bennet S.R. et al, 1998). Sie können also CD 8 exprimierende Lymphozyten gegen das Antigen „primen“. Wie schon gesehen, sind bei diesem Vorgang die CD4 positiven Typ1 Helferzellen unerlässlich. Sie müssen aktiviert sein, um überhaupt das sogenannte cross priming zu ermöglichen. Zur Induktion dieser Helferzellen genügt es, wenn die Tumorbestandteile durch Antigen-präsentierende Zellen – bei

uns Peritonealmakrophagen – MHC-II restringiert präsentiert werden (Armstrong et al, 1998). In der Zusammenfassung dieses komplizierten Vorgangs, werden wohl die intraperitoneal applizierten, lysierten Zell-gebundenen Tumorantigenbestandteile durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen. Die Antigene werden MHC-class-II restringiert präsentiert und induzieren T-H1-Helferzellen. Mit Hilfe dieser Helferzellen werden aus dem Knochenmark stammende Lymphozyten so modifiziert, dass die Antigene in den MHC-class-I-Weg eingeschleust werden und zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert werden. Wichtig beim Cross priming – also der Induktion von zytotoxischen T-Zellen durch exogenes Antigen – sind sogenannte Heat Shock Proteine. Heat Shock Proteine wurden erstmals als bei Hitzestress hoch regulierte intrazelluläre Proteine beschrieben. Die für die Expression und Struktur dieser Proteine zuständigen Gensequenzen sind nahe der Gensequenzen für die MHC-Proteine lokalisiert. Zahlreiche Publikationen legen dar, dass diese Proteine dazu dienen, die exogenen Antigenbestandteile auf MHC-class I Moleküle gebunden zu präsentieren, analog zu „cross priming“ auch „cross presentation“ genannt (Srivastava P. et al, 1994; Srivastava P., 1994). In den hier präsentierten Untersuchungen wäre es möglich, dass das CEA schon in den Tumorzellen an Heat Shock Proteine gebunden vorkommt und durch die Lyse frei gesetzt wird. Das an HSP (Heat Shock Proteine) gebundene Tumorantigen CEA wird durch die Antigen präsentierenden Zellen aufgenommen und unter der Mithilfe der Helferzellen MHC-I restringiert präsentiert (Hypothetisches Schema: Abbildung 30).



**Abbildung 30:** In der sich auflösenden Tumorzelle liegt CEA an Heat Shock Proteine gebunden vor (1). So kann CEA in die Antigen-präsentierende Zelle aufgenommen, prozessiert und in das Endoplasmatische Retikulum transportiert werden (2). Dort wird es an MHC-1 Moleküle gekoppelt und auf der Oberfläche präsentiert (3).

#### **4.8 Die Effektivität der zytotoxischen Antwort**

Nachdem es gelungen ist, *in vitro* eine suffiziente zytotoxische Antwort gegen CEA exprimierende Tumorzellen nachzuweisen, stellt sich die Frage, ob die zytotoxische Antwort entscheidend bei der Abwehr der CEA exprimierenden Tumorzellen ist.

Das Anwachsen der Tumorzellen konnte von 55% auf 24% der Mäuse nach Induktion der zellulären Immunantwort reduziert wurde. Also führt allein das Vorhandensein von zytotoxischen Zellen neben einer suffiziente Antikörperantwort zu einer Abnahme von 31 Prozent mehr im Tumorwachstum als Antikörper allein. Zytotoxische T-Lymphozyten sind in unserem Modell mitentscheidend bei der Abwehr von Tumorzellen.

Der Beitrag der T-Lymphozyten bei der Abwehr von Tumorzellen ist schon oft beschrieben worden. So beruht der graft-versus-leukemia-Effekt fast ausschließlich auf Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten, die nach Gabe in einen Leukämie-Kranken den leukämischen Klon fast vollständig eliminieren können (Hsieh MH et al., 2000). Gerade hier wird die Potenz und die Wichtigkeit der zytotoxischen Lymphozyten deutlich, die auch unsere Versuch bestätigen.

Nachdem die intraperitoneale Immunisierung mit Tumorzellen, die in Adjuvans aufgelöst wurden, klinisch als Vakzinierungsmethode nicht in Frage kommt, da Adjuvansimmunisierungen teilweise am Menschen aufgrund der schwerwiegenden lokalen Entzündungsreaktionen nicht durchgeführt werden können, wurde eine andere Immunisierung getestet. Diese Vakzinierung sollte möglichst einfach sein und – im Gegensatz zu der mehrere Antigene präsentierende Adjuvansimmunisierung - CEA allein als Zielprotein einer Immunantwort präsentieren. Dabei wurde eine Methode verwendet, die es ermöglichen sollte, lösliche Antigene zur Induktion von zytotoxischen T-Zellen zu verwenden. 1990 publizierte Carbone und Mitarbeiter eine Arbeit (Carbone et al, 1990), in der beschrieben wurde, dass durch Beladung von Mäusemilzlymphozyten mit Hilfe einer hypertonen Lösung und intravenöser Injektion der beladenen Zellen, gegen das lösliche Antigen Ovalbumin spezifische zytotoxische T-Zellen induzieren konnte. Diese Arbeit zeigt, dass ein lösliches Antigen wie OVA, wenn es mit Splenozyten in einer hypertonen Lösung inkubiert

wird und so in das Zytoplasma der Splenozyten gelangen kann, eine zytotoxische T-Zell-Antwort induzieren kann, während eine Inkubation von Splenozyten mit OVA in einer normotonen Lösung dies nicht vermag.

#### **4.9 Die Vakzinierung mit beladenen Lymphozyten**

Kann nun diese Art, die Lymphozyten mittels einer hypertonen Lösung mit dem löslichen Protein zu beladen und mit diesen Zellen zu immunisieren, auch zytotoxische T-Zellen gegen ein lösliches Tumorantigen wie CEA erzeugen? Unsere Ergebnisse zeigen, dass es mit dieser Vakzinierung möglich ist, spezifische zytotoxische T-Zellen in den syngenen Mäusen zu induzieren, die auch in vivo effektiv sind. Es ist also möglich, gegen ein lösliches Tumorantigen mit dieser einfachen Methode einen effektiven zellulären Schutz gegen CEA exprimierende Tumorzellen in Wildtypmäußen aufzubauen. Wie auch Li und seine Arbeitsgruppe mit OvAlbumin zeigen konnte, ist die Zell-gebundene Form eines Antigens in der Lage durch cross-priming eine zytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren. Li zeigte, dass Zell-assoziiertes OvAlbumin 500mal effizienter präsentiert wurde als freies OvAlbumin und so eine zytotoxische Antwort induzierte (Li M. et al, 2001).

Die Beladung mit CEA induziert also zytotoxische T-Zellen durch „cross presentation“ bzw. „cross priming“. Daß Cross priming ein entscheidender Prozess bei der Aktivierung von zytotoxischen Zellen ist, betont schon Armstrong in seiner 1998 publizierten Arbeit (Armstrong et al, 1998). Er beschreibt, daß die direkte Präsentation von Tumorantigenen auf der Zelloberfläche der malignen Zellen der indirekten Präsentation durch Antigen präsentierenden Zellen mittels cross priming klar unterlegen ist. Diese Beobachtung können wir nur bestätigen. Tumorzellen allein können – wenn intraperitoneal appliziert – eine zytotoxische Antwort induzieren, diese ist nicht in der Lage das Tumorwachstum in vivo zu verhindern.

Noch entscheidender ist aber, dass CEA allein – ohne andere Antigene – in der Wildtypmaus eine zelluläre Immunantwort induzieren kann, die in vitro und in vivo effektiv ist. Die unter anderem von Kantor et al. durchgeführten Experimente bestätigen diese Ergebnisse. Auch sie verwenden CEA allein als Antigen, um erfolgreich gegen CEA exprimierende Tumorzellen zu vakzinieren. Diese gegen CEA gerichtete zelluläre Antwort ist so suffizient, dass das Tumorwachstum in vivo reduziert wird (Kantor J. et al, 1992).

Zusammenfassend ist es uns in einem Wildtypiermodell gelungen, gegen das Tumorantigen CEA in vivo eine effektive Immunantwort zu induzieren. Ein entscheidender Mechanismus bei der Induktion von zytotoxischen Zellen ist das Cross Priming. Zytotoxische T-Zellen lassen sich durch zwei unterschiedliche Methoden induzieren: der Immunisierung mit in Adjuvans aufgelösten Tumorzellen, einer schon etablierten Methode, bei der neben CEA auch gegen andere Antigene immunisiert wird und der Vakzinierung mit beladenen Lymphozyten, die bisher so noch nicht bei löslichen Tumorantigenen verwendet wurde und die spezifisch gegen CEA immunisiert.

Diese Ergebnisse wurden bei Versuchen mit Wildtypieren erzielt. Im Gegensatz zum Menschen ist CEA bei den Wildtypieren aber ein fremdes Protein. Ist es nun möglich mit denselben Immunisierungsmethoden in den CEA-transgenen Mäusen, die dem menschlichen Organismus hinsichtlich der CEA-Expression gleichen, dieselben Ergebnisse zu erzielen, oder bestehen signifikante Unterschiede? Ist es in diesen Nagern überhaupt möglich, eine Immunantwort zu induzieren? Diese Frage ist entscheidend, denn es gibt erhebliche Diskrepanzen zwischen klinischen Studien und Tierversuchsmodellen, die mit Wildtypnagern arbeiteten, bei der Vakzinierung gegen CEA.

#### **4.10 Die Reaktion der transgenen Tiere auf transfizierte Tumorzellen**

Wie zu erwarten ist, gibt es Unterschiede zwischen den syngen und den transgenen Tieren in der Reaktion auf CEA exprimierende Tumorzellen. Im Gegensatz zu den Versuchen in den syngen Tieren, war die Wachstumscharakteristik und der Prozentsatz der anwachsenden Tumoren nach subkutaner Transplantation bei den CEA exprimierenden und den CEA negativen neoplastischen Zellen gleich. Außerdem konnte kein Antikörpertiter gegen CEA in den transgenen Tieren nachgewiesen werden. Ein Verlust des Tumorantigens auf den Tumorzellen lässt sich durch immunhistochemische Untersuchungen ausschließen. Somit wirkt CEA – im Gegensatz zu den syngen Tieren - in den transgenen Tieren nicht immunogen.

Andere Gruppen publizierten ähnliche Ergebnisse: Erik Kass et al. arbeitete in seiner Anfang 1999 in Cancer Research publizierten Untersuchung bei seinen Immunisierungsversuchen mit CEA transgenen Mäusen (Kass E. et al, 1999). Es

wurden keine Antikörpertiter gegen CEA oder Wachstumsverzögerung von transplantierten CEA exprimierenden Tumoren entdeckt. Die Gruppe um Clarke zeigte 1998 ebenfalls keine Antikörperbildung gegen CEA exprimierende Tumoren im transgenen Tiermodell (Clarke et al, 1998).

Der Unterschied der Reaktion des Immunsystems auf die Transplantation von CEA positiven Tumorzellen in den Wildtyp- und den transgenen Mäusen lässt an der Aussagefähigkeit von Untersuchungen, die Immunisierungsmodellen gegen CEA in einer syngenen Maus testeten, zweifeln. CEA ist trotz bestehender Homologien im nicht-transgenen Mäusetiergenom fremd und damit ein Abstoßungsantigen im Nagetiermodell, in dem die Immunisierung ungleich leichter fallen dürfte als im humanen Organismus. Genau deshalb ist die Etablierung eines CEA transgenen Mausmodells, das dem menschlichen Organismus möglichst nahe kommt, so wichtig.

#### **4.11 Induktion einer zytotoxischen Antwort in den transgenen Tieren**

##### ***4.11.1 Die Überwindung der Toleranz gegen das Antigen CEA***

Diese fehlende Antigenität von CEA in diesem und den anderen publizierten Modellen erscheint nicht verwunderlich, kennen die Mäuse CEA doch seit der Fetalzeit. Es sind Mechanismen der peripheren oder zentralen Toleranz für die fehlende Immunogenität von CEA verantwortlich (Nossal G.J. et al, 1993; Anderton S et al, 1999). Die Entwicklung der zentralen Toleranz erfolgt im Thymus in frühen Phasen der Entwicklung. Hier werden die T-Lymphozyten eliminiert, die eigene MHC-Moleküle nicht erkennen (negative Selektion) oder die körpereigene Proteine exprimierende Zellen eliminieren (positive Selektion). So werden T-Lymphozyten, die die eigene MHC-Struktur erkennen, aber nicht autoreaktiv reagieren herausgefiltert. Die dann in die Zirkulation gelangenden T-Lymphozyten erkennen also fremde Proteine, die auf eigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. Um diese Selektion durchführen zu können, werden die Antigene auf Antigen-präsentierenden Zellen des Thymus präsentiert. Damit der Aufbau der zentralen Toleranz gegen ein Protein im Thymus stattfinden kann, muss es also im Thymus nachgewiesen werden. Nachdem im Thymus der Maus – wie auch in dem des Menschen, dessen Thymus im Bereich des epithelialen Netzwerkes kein CEA exprimiert (Savino W. et al, 1985; Nap M. et al, 1988) – keine Expression von CEA nachgewiesen werden konnte (Eades-Perner A.M. et al, 1994), kann eine

zentrale Toleranz gegenüber CEA ausgeschlossen werden. So müssen also Mechanismen der peripheren Toleranz für die fehlende immunologische Reaktion nach Gabe von Tumorzellen verantwortlich sein. Was heißt das? Zunächst liegen autoreaktive T-Lymphozyten gegen CEA im Blut vor, weil diese im Thymus nicht eliminiert werden konnten. Autoreaktive T-Lymphozyten sind immunkompetente Zellen, die eigene Antigene erkennen. Im Falle der peripheren Toleranz zeigen diese aber nur eine geringe Affinität zu den Autoantigenen (Poindexter et al., 1992; Cibotti et al., 1994; Anderton S et al, 1999). Aufgrund dieser geringen Affinität sind sie nicht effektiv und zeigen somit keine immunologische Signifikanz. Desweiteren geht man als wichtigen Mechanismus der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz davon aus, dass nicht nur die Affinität zu dem Autoantigen zu gering ist, sondern dass spezielle Subpopulationen von CD 4 positiven Helferlymphozyten – die sogenannte  $T_{H2}$ -Lymphozyten – dazu führen, dass die T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen das Autoantigen supprimiert wird. Die  $T_{H1}$ -Lymphozyten, deren Chemokinprofil  $TNF-\alpha$  oder  $IFN-\gamma$  beinhaltet, führen dagegen zur Aktivierung von autoreaktiver zytotoxischer T-Zellen (Brennan F.M. et al, 1992). Bei einem Überwiegen der  $T_{H2}$ -Lymphozyten kommt es so zu einer Suppression der Immunantwort und zum Aufbau einer peripheren Toleranz. Aber auch das Fehlen kostimulatorischer Signale („clonal anergy“) wie CD 80 (B7.1) und CD 86 (B7.2), als auch ein exklusiver Sitz des Antigens („clonal ignorance“) können als Begründung für die fehlende Aktivierung zytotoxischer Zellen oder auch B-Lymphozyten herangezogen werden (LaSalle J.M. et al., 1994; Nossal G.J. et al, 1993; Miller JF, 1993).

Es galt nun mit verschiedenen Immunisierungsmethoden die periphere Toleranz, die durch die beschriebenen Mechanismen erhalten wird, zu durchbrechen. Gerade die Immunisierung mit in Adjuvans aufgelösten Tumorzellen scheint die autoreaktiven T-Lymphozyten zu aktivieren und damit auch zu einer Abstoßung CEA exprimierender Tumorzellen in den transgenen Zellen zu führen. Dazu ist eine Aktivierung der  $T_{H1}$ -Lymphozyten-Subpopulation notwendig, so dass die immunsupprimierende Wirkung der  $T_{H2}$ -Lymphozyten aufgehoben wird. Wie kommt es dazu? Zunächst enthält komplettes Freundsches Adjuvans inaktivierte *Mycobacteria bovis*, die in einer Öl-Wasser-Suspension aufgelöst wurden. Die fremden bakteriellen Bestandteile werden vom transgenen Organismus durch die schon beschriebenen Mechanismen erkannt und auf professionellen Antigen



präsentierenden Zellen dargestellt. Diese Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle wie CD 80 oder CD 86 in hoher Dichte auf ihrer Zelloberfläche. Zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wird aber gerade das Fehlen dieser kostimulatorischen Moleküle bei der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierender Zellen postuliert. Im weiteren binden dann die kostimulatorischen Moleküle bei der Interaktion des T-Zell-Rezeptorkomplexes mit dem MHC-Molekül der Antigen präsentierende Zellen an das CD 28 der T-Zelle, um diese zu aktivieren.

Ähnlich den transgenen Mäusen kann auch im Thymus des Menschen eine nur geringe Expression von CEA nachgewiesen werden, die allerdings das epitheliale Netzwerk ausspart (Savino W. et al, 1985; Nap M. et al, 1988). Also liegen hier auch die Mechanismen der peripheren Toleranz der fehlenden Immunogenität von CEA zugrunde. Gerade das betont nochmals die Ähnlichkeit des transgenen Modells mit dem Menschen. Im menschliche Organismus konnten nun ähnliche Ansätze wie beim transgenen Tier die periphere Toleranz durchbrechen: Auch beim Menschen konnten zahlreiche teilweise erfolgreiche Versuche der Adjuvansimmunisierung gegen Kolonkarzinome beschrieben werden. So wurde die aktive spezifische Immunisierung mit Adjuvans bisher viermal in klinischen Studien bei kolorektalen Karzinomen getestet (Hoover et al, 1993; Berd et al, 1990; Harris et al, 1994; Vermorken et al, 1999). In der letzten klinischen prospektiven randomisierten Studie in den Niederlanden (Vermorken et al, 1999) wurde bei 254 Patienten der Effekt einer vierfachen intradermalen Vakzinierung mit autologen Tumorzellen, die durch Bestrahlung proliferationsunfähig gemacht wurden, nach operativer Entfernung getestet. Es handelte sich um Patienten des Tumorstadiums Dukes B1, B2 (Stadium II) und C (Stadium III). Es zeigte sich im gesamten Patientenkollektiv eine signifikante Reduktion des Rückfallrisikos. Allerdings konnte keine signifikante Erhöhung der Überlebenszeit erreicht werden. Interessanterweise war der Effekt der signifikanten Reduktion des Rückfallrisikos auf die starke Reduktion bei den Patienten mit einer geringeren Tumorlast – also Dukes B2 oder B3 (entspricht Stadium II) - zurückzuführen. Die Erfahrung bei Patienten entsprechen also den Ergebnissen, die hier in einem transgenen murinen Modell nach Adjuvansimmunisierung gemacht wurden. Besonders effektiv scheint diese Art der Immunisierung bei geringerer Tumorlast im humanen Organismus zu sein.

#### **4.11.2 Die Spezifität der Adjuvansimmunisierung im transgenen Tiermodell**

Es wurde also gezeigt, dass die periphere Toleranz gegen CEA mit einer Vakzinierung, die Tumorzellen in Adjuvans verwendet, durchbrochen werden kann. Doch ist die Immunisierung mit Adjuvans auch CEA-spezifisch? Ähnlich den syngenen Tieren werden auch bei den transgenen Nagern neben den CEA-exprimierenden Tumorzellen auch die CEA negative Mutterzelllinie von den zytotoxischen Lymphozyten erkannt und lysiert. Entscheidend ist aber, dass CEA negative Tumorzellen in Adjuvans aufgelöst keine Immunantwort induzieren können. Somit handelt es sich nicht um eine Begleitimmunisierung. CEA spielt als entscheidendes Protein bei der Vakzinierung eine wichtige Rolle. Desweiteren scheinen als Antigene in den transgenen Tieren unter anderem die bereits diskutierten Minor Histocompatibility Antigene oder andere unbekannte Tumorantigene entscheidend zu sein. Diese könnten als Zielproteine neben CEA erkannt werden.

Die Bedeutung anderer Antigene als CEA in einem transgenen Tiermodell zeigt die Publikation von Kass et al. (Kass E. et al, 1999) . Er konnte in seiner Publikation durch Immunisierung mit CEA Peptid vermischt mit Adjuvans keine Induktion von zytotoxischen Lymphozyten in transgenen Mäusen nachweisen, was er dann mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus Konstrukt erreichte. Dies demonstriert – gerade bei den transgenen Tieren - die Bedeutung zusätzlicher Antigene oder Stimulantien – wie hier das Vaccinia Virus, das ein potentes zweites Antigen enthält – bei der Überwindung der peripheren Toleranz durch Aktivierung der spezifischen T<sub>H1</sub>-Lymphozyten.

Dass cross-priming sowohl bei den Wildtypnagern – wie schon ausgeführt - als auch bei den transgenen Mäusen entscheidend ist, zeigt die Möglichkeit, bei beiden mit einem exogenen Antigen die Antigen-spezifischen zytotoxischen Zellen zu aktivieren. Gerade in dem transgenen Modell, ist sowohl die MHC-I restringierte Präsentation als auch die MHC-II restringierte Präsentation des exogenen Peptids CEA entscheidend, um CD4 positiven T-Helferzellen und auch zytotoxischen Zellen Antigen-spezifisch zu aktivieren.

#### ***4.11.3 Die Immunisierung mit beladenen Lymphozyten im transgenen Tiermodell***

Im Gegensatz zur erfolgreichen Adjuvansimmunisierung konnte die intravenöse Vakzinierung mit autologen Lymphozyten, die mit CEA beladen wurden, zwar in vitro wirksame zytotoxischen Lymphozyten induzieren, die allerdings in vivo nicht wirksam war. Warum schafft es diese Art der Immunisierung nicht, in den transgenen Mäusen eine wirksame Antwort zu induzieren und somit die existierende Toleranz gegenüber CEA zu durchbrechen? Ein wichtiger Faktor, der den Aufbau einer effektiven zytotoxischen Antwort in den transgenen Mäusen verhindert, liegt in der Zahl der Antigene, die dem murinen Organismus präsentiert wird. Im Gegensatz zu der Adjuvansimmunisierung, bei der die ganze Tumorzelle als Antigenreservoir dient, wird bei der hypertonen Beladung nur mit dem Antigen CEA immunisiert. Gerade dies zeigt wiederum die Bedeutung anderer unbekannter Tumorantigene in diesem Modell. Nur wenn diese bei der Immunisierung eine Rolle spielen können, ist die Vakzinierung im transgenen Modell erfolgreich. Bei der Immunisierung mit beladenen Milzlymphozyten kann also nur ein Antigen als Zielmolekül für die zytotoxischen Zellen dienen und gegen dieses Antigen besteht eine Toleranz, d.h. es wirkt nicht oder nur sehr gering immunogen. Welche weiteren Faktoren - neben der Anzahl der Antigene - könnten noch das Versagen dieser Art der Immunisierung erklären? Es werden zur Beladung autologe Milzlymphozyten verwendet, die keine professionellen Antigenpräsentatoren darstellen. Deshalb ist anzunehmen, dass bei diesen Milzzellen die Zahl der auf der Oberfläche exprimierten kostimulatorischen Moleküle, die zum Aufbau einer jeden Immunantwort neben dem MHC-Komplex wichtig sind und gerade die für die Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten so wichtigen  $T_{H1}$ -Lymphozyten stimulieren, viel geringer ist als die Zahl auf der Oberfläche von professionellen Antigenpräsentatoren. Es fehlen für die Stimulierung von  $T_{H1}$ -Zellen und zytotoxischen T-Zellen also wichtige Signalwege, die zur Proliferation des gegen das Antigen spezifisch gerichteten Klons führen. Die sogenannte, bei der peripheren Toleranz so wichtige „clonal anergy“ kann also nicht überwunden werden.

Außerdem fehlen effektive Immunstimulatoren- wie Adjuvantien oder auch Vacciniaviruskonstrukte. Gerade diese können mittels PAMPs oder auch durch „Death Signal“ Expression auf den zugrundegehenden Tumorzellen eine für den

Aufbau einer effektiven Immunantwort so wichtige Entzündungsreaktion, die weitere Antigen präsentierende Zellen oder andere Immunzellen anlockt, auslösen (Albert et al., 1998; Galucci et al., 1999; Matzinger et al., 1998; Matzinger et al., 1994). In der syngenen Maus scheint das Fehlen all dieser Faktoren bei der Vakzinierung mit beladenen Milzlymphozyten kompensiert werden zu können, weil CEA ein fremdes Protein darstellt, gegen das keine Toleranz aufgebaut wurde. Auch in der transgenen Maus gelingt es überraschenderweise sogar eine in vitro effektive, zytotoxische T-Lymphozyten zu generieren. Doch diese Zellen sind nicht in der Lage, in vivo das Tumorwachstum zu verhindern.

Gerade aber der Unterschied in der Reaktion des Immunsystems der Wildtypiere und der transgenen Mäuse nach Vakzinierung mit beladenen Milzlymphozyten zeigt nochmals die Bedeutung transgener, die humantypische Expression von Tumorantigenen nachahmender Tiermodelle bei der Untersuchung von Immunisierungsprotokollen gegen Tumorantigene. Diese Ergebnisse belegen eindrücklich, wie kritisch man in der Übertragung von Tierversuchsergebnissen bei der Immunisierung gegen Tumorantigene auf den Menschen sein muss.

#### **4.11.4     *Andere CEA transgene Tiermodelle***

Was unterscheidet diese Untersuchung von anderen an CEA transgenen Mäusen durchgeführten Studien? Zunächst wurden Mäuse verwendet, die auf den Haplotyp H2<sup>d</sup> zurückgekreuzt wurden, während in den anderen Studien Nager auf Basis des C57-Stammes (H2<sup>b</sup>) benutzt wurden. Zwischen diesen Stämmen gibt es Unterschiede in der Produktion von Zytokinen (Matthews VB et al, 2000). So zeigt der von uns verwendete Stamm eine höhere Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Es scheint also Unterschiede in der T-Zell-Aktivierung zu geben. Es sollte in dem hier verwendeten Stamm also leichter sein, eine zelluläre Immunantwort zu induzieren. Trotzdem konnte der Versuch der intravenösen Immunisierung mit in hypertoner Lösung beladener Lymphozyten keinen Erfolg in vivo zeigen.

Ein weiterer Unterschied ist die verwendete Tumorzelllinie. In anderen Publikationen wurde die mit Hilfe einer retroviralen cDNA transfizierte murine Kolonkarzinomlinie MC-38 benutzt (Kass E. et al, 1999), während in dieser Untersuchung eine transfizierte Leukämiezelllinie verwendet wurde. Nachdem CEA

auf Karzinomen exprimiert wird, ist eine Karzinomzelllinie sicher die geeignete Zelllinie für Experimente zur Testung von Vakzinierungsmodellen gegen CEA. Diese Zelllinie wächst in den publizierten Modellen allerdings nicht lokaltypisch.

Die hier verwendete Leukämiezelllinie ist eine etablierte, schnell proliferierende Zelllinie, die eine hohe Potenz zur Metastasierung hat. Deshalb sollten diese Zellen keinen Nachteil gegenüber epithelialen Karzinomzelllinien haben.

Die Technik der Beladung von autologen Milzlymphozyten mit Tumorantigenen, um so die Induktion einer spezifischen zytotoxischen Antwort in einem Wildtyp- und einem transgenen Modell zu erreichen, wurde bisher nicht publiziert. Dies wäre ein leicht durchzuführendes Modell auch zur Vakzinierung im humanen Organismus. Alle anderen mit CEA transgenen Tieren arbeitenden Gruppen wählten andere teilweise erfolgreichere aber auch aufwendigere Ansätze.

#### ***4.11.5 Schlussfolgerung***

Mit diesem Modell wird eindrücklich demonstriert, dass die Diskrepanz bei der Vakzinierung gegen Tumorantigene zwischen den teils erfolgreichen Ergebnissen der Tiermodelle (Kantor J et al, 1992) und den objektivierbaren Erfolgen in vivo beim Menschen (Berinstein N.L. et al, 2002), die sich auf Einzelfälle beschränken, teilweise auf die Wahl inadäquater Tiermodellssysteme zurückzuführen ist. Die Testung von Tumorstoffen sollte nur in Modellen durchgeführt werden, bei denen die Tumorantigene keine fremden Proteine darstellen. In diesen ist dann allerdings die Induktion einer zytotoxischen Antwort schwierig und in dieser Untersuchung nur unter Verwendung von Adjuvans und anderen Antigenen ausreichend. Dies sollte in klinischen Studien berücksichtigt werden und zur Suche nach geeigneten Adjuvantien führen.

## **5 Zusammenfassung**

Die Immunisierung gegen ein Tumorantigen stellt eine Option in der Therapie von Tumoren, bzw. deren Metastasen dar. Während in Tiermodellen dabei über gute Erfolge berichtet wird, sind die klinischen Erfolge bis auf Einzelfälle eher entmutigend. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte in der Verwendung ungeeigneter Modelle im Tierversuch liegen. So könnte die experimentelle Verwendung humaner Tumorantigene wie CEA in Nagern, in denen es kein identisches Gen gibt, zu einer immunologischen Reaktion des Tierorganismus führen. Um diese Frage zu überprüfen, wurde eine Tumorzelllinie mit dem häufigen Tumorantigen CEA transfiziert und das Wachstum dieser Zelllinie in Wildtypmäusen und einem CEA transgenen Tiermodell untersucht. An diesem Modell wurden dann unterschiedliche Methoden der Immunisierung getestet.

Nach subkutaner Injektion einer Wildtypleukämiezelllinie und einer CEA transfizierten Leukämiezelllinie bei Wildtypmäusen des Stammes DBA/2N zeigte sich, dass 91% der nicht transfizierten Tumorzellen anwuchsen, während nur 55% der CEA transfizierten Tumorzellen eine Geschwulst bildeten. Eine Ursache für die niedrigere Anwachsrate der transfizierten Zellen liegt in der Erkennung des CEA durch das Immunsystem. So wurden Antikörper gegen CEA gebildet. Zytotoxische T-Lymphozyten konnten spontan nicht induziert werden.

Wurden nun die Tumorzellen den CEA transgenen Mäusen injiziert, zeigte sich kein Unterschied in der Anwachsrate der Tumoren (90% Anwachsrate der transfizierten Zellen versus 90% Anwachsrate der Wildtypzellen). Folgerichtig konnten weder Antikörpertiter, noch zytotoxische T-Zellen gegen CEA nachgewiesen werden.

An diesem Modell wurde dann eine Immunisierung mit Tumorzelllysate bestehend aus CEA transfizierten Zellen in kompletten Freund'schen Adjuvans getestet. Damit konnte sowohl in den Wildtypmäusen, als auch in den transgenen Nagern eine in vitro und in vivo messbare zytotoxische Antwort gegen CEA exprimierende Zellen induziert werden. Allerdings war diese Antwort nicht CEA spezifisch, es wurde auch die Wildtypzelllinie abgestoßen. Damit ist gezeigt, dass die Immunantwort nach Vakzinierung mit Tumorzelllysate nicht nur CEA, sondern auch andere Antigene erkennt.

Eine Möglichkeit, die CEA-Spezifität der Immunantwort weiter zu überprüfen, besteht in der intravenösen Immunisierung mit autologen Milzlymphozyten, die mit CEA beladen wurden. So konnte bei den syngenen Tieren eine Zytotoxizität gegen CEA exprimierende Zellen *in vitro* von bis zu 40% der Zielzellen festgestellt werden (E/T=50). Auch die transgenen Mäuse zeigten eine *in vitro* messbare Zytotoxizität von bis zu 20% der Zielzellen (E/T=10). *In vivo* konnte die Tumoranwachsrate der CEA positiven Tumorzellen in den Wildtypmäußen von 55% auf 36% reduziert werden, während in den transgenen Tieren keine Reduktion nachgewiesen wurde. Gegen die CEA negative Mutterzelllinie zeigte sich keine immunologische Reaktion.

Das Modell demonstrierte Unterschiede im immunologischen Verhalten der Wildtypmäuse und der transgenen Mäuse nach Implantation CEA exprimierender Tumorzellen. Im transgenen Modell, das der Situation im Menschen sehr nahe kommt, war im Gegensatz zum syngenen Modell keine spontane Immunantwort gegen CEA vorhanden. Die Vakzinierung mit einem Tumorzelllysat konnte in beiden Mäusestämmen eine effektive Immunantwort induzieren, die aber nicht nur gegen CEA, sondern auch gegen andere Antigene gerichtet ist. Eine spezifisch gegen CEA gerichtete Immunisierung mit beladenen Lymphozyten zeigte nur in den Wildtypmäusen einen *in vivo* messbaren Erfolg. Diese Beobachtungen zeigen die Bedeutung transgener Modelle bei der Durchführung von Vakzinierungsstudien gegen CEA und begründen teilweise die große Diskrepanz zwischen erfolgreichen Tierversuchen und den erfolglosen klinischen Studien, die bisher nur in einzelnen Patienten von einer in vivo wirksamen Immunisierung berichten. Sie demonstrieren auch, dass es mit entsprechenden Methoden, die mehrere Antigene bei der Vakzinierung benutzen, durchaus gelingen kann, die Toleranz gegen Tumorzellen zu durchbrechen und eine wirksame Immunantwort aufzubauen.

## 6 Literatur

Adell G., Boeryd B., Fronland B., Sjudahl R., Hakansson L. Occurrence and prognostic significance of micrometastasis in regional lymph nodes in Dukes B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg*, **162 (8)**, 637-642 (1996)

Albers, G.H., Fleuren, G., Escribano, M.J., Nap, M. Immunohistochemistry of CEA in the human pancreas during development, in the adult, chronic pancreatitis, and pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.*, **90(1)**, 17-22 (1988)

Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardway, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, **392**, 86-89 (1998)

Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R., Sarin, A., and Berzofsky, J. A. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J.Exp.Med.*, **184**: 485-492 (1996)

Anderton, S., Burkhart, C., Metzler, B., and Wraith, D. Mechanisms of central and peripheral T-cell tolerance: lessons from experimental models of multiple sclerosis. *Immunol.Rev.*, **169**, 123-137 (1999)

Arnold, D., Faath,S., Rammensee, H.H., and Schild, H.J. Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J.exp.Med.*, **182**, 85-889 (1995)

Baldwin, R.W. Immunity to methylcholanthrene-induced tumors in inbred rats ... atrophy and regression of implanted tumors. *Br. J. Cancer*, **9**, 652ff (1955)

Barnett, T. R., Pickle, W., Rae, P. M., Hart, J., Kamarck, M., and Elting, J. Human pregnancy-specific beta 1-glycoproteins are coded within chromosome 19. *Am.J.Hum.Genet.*, **44**, 890-893 (1989)



Bei, R., Kantor, J., Kashmiri, S. V., Abrams, S., and Schlom, J. Enhanced immune responses and anti-tumor activity by baculovirus recombinant carcinoembryonic antigen (CEA) in mice primed with the recombinant vaccinia CEA.

*J.Immunother.Emphasis.Tumor Immunol.*, **16**, 275-282 (1994)

Bellone M, Iezzi G, Imro MA, et al: Cancer immunotherapy: Synthetic and natural peptides in the balance. *Immunol Today*, **20**, 457-462 (1999)

Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Kramalis, F., Miller, J.F.A.P. and Heath, W.R., Induction of a CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4<sup>+</sup> T cell help. *J.exp.Med.*, **186**, 65-70 (1997)

Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Kramalis, F., Miller, J.F.A.P. and Heath, W.R., Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling., *Nature*, **393** (4), 478-480 (1998)

Berinstein, N. L. Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. *J.Clin.Oncol.*, **20**, 2197-2207 (2002)

Bevan, M.J. Cross-Priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*, **143**, 1283-1288 (1976)

Boon, T. and A. Van Pel. Teratocarcinoma cell variants rejected by syngeneic mice: protection of mice immunized with these variants against other variants and against the original malignant cell line. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA.*, **75**, 1519-1523 (1978)

Boon, T., and van der Bruggen, P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J.Exp.Med.*, **183**, 725-729 (1996)

Bremers, A.J., van den Burg, S.H., Kuppen, P.J., Kast, W.M., van de Velde, C.J., and Melief, C.J. The use of Epstein-Barr-virus transformed B lymphocyte cell lines in a peptide-reconstitution assay: identification of CEA-related HLA-A\*0301-

restricted potential cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J.Immunother.*,**18**, 77-85 (1995)

Brennan, F. M. and Feldmann, M. Cytokines in autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.*, **4**, 754-759 (1992)

Carbone F.R., Bevan M.J. Class I restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigens in vivo. *J. Exp. Med.*, **171**, 377-387 (1990)

Castilleja A, Carter D, Efferson CL, Ward NE, Kawano K, Fisk B, Kudelka PA, Gershenson DM, Murray JL, O'Brian CA, Ioannides CG. Induction of Tumor-Reactive CTL by C-Side Chain Variants of the CTL Epitope HER-2/neu Protooncogene (369-377) Selected by Molecular Modeling of the Peptide: HLA-A2 Complex. *J Immunol*, **169 (7)** (2002)

Cibotti, R., Cabaniols, J. P., Pannetier, C., Delarbre, C., Vergnon, I., Kanellopoulos, J. M., and Kourilsky, P. Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice. *J. Exp. Med.*, **180**, 861-872 (1994)

Clarke P., Mann J., Simpson J.F., Rickard-Dickson K., Primus F.J. Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy. *Cancer Res.*, **58 (7)**, 1469-1477 (1998)

Conry, R., Lo Buglio, A., Kantor, J., Schlom, J., Loechel, F., Moore, S., Sumurel, L., Barlow, D., Abrams, S. and Curiel, D. Immune Response to a Carcinoembryonic Antigen Polynucleotide Vaccine, *Cancer Res.*, **54**, 1164-1168 (1994)

Conry, R. M., LoBuglio, A. F., Loechel, F., Moore, S. E., Sumerel, L. A., Barlow, D. L., and Curiel, D. T. A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine has in vivo antitumor activity. *Gene Ther.*, **2**, 59-65 (1995)

Defendi, V. Effects of SV40 virus immunization on growth of transplantable SV. polyoma virus tumors in hamsters, *Proc Soc Exp Biol Med*, **113**, 12ff (1963)

Eades-Perner, A.M., van der Putten, H., Hirth, A., Thompson, J., Neumaier, M., von Kleist, S., and Zimmermann, W. Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res.*, **54**, 4169-4176 (1994)

Foley, E.J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.*, **13**, 835ff (1953)

Foon K, John WJ, Chakraborty M, et al: Clinical and immune responses in resected colon cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. *J. Clin. Oncol.*, **17**, 2889-2895 (1999)

Foon K, John WJ, Chakraborty M, et al: Clinical and immune responses in advanced colorectal cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res*, **3**, 1267-1276 (1997)

Gallimore, A., Hombach, J., Dumrese, T., Rammensee, H. G., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. A protective cytotoxic T cell response to a subdominant epitope is influenced by the stability of the MHC class I/peptide complex and the overall spectrum of viral peptides generated within infected cells. *Eur.J.Immunol.*, **28**, 3301-3311 (1998)

Globerson, A., Feldman, M. Antigenic specificity of benzopyrene-induced sarcomas, *JNCI*, **32**, 1229ff (1964)

Gold, P. and Freedom, S.O., Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*, **121**, 439-462 (1965)

Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., Rosenberg, S.A. The lymphocyte activated killer cell phenomenon: lysis of NK-resistant fresh solid tumor cells by IL-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, **155**, 1823ff (1982)

Gross L. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line, *Cancer Res.*, **3**, 326 (1943)

Hamilton J.M., Chen A.P., Nguyen B., et al. Phase I study of recombinant vaccinia virus that express human carcinoembryonic antigen in adult patients with adenocarcinomas. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **13**, 295 (1994)

Hand, P. H., Robbins, P. F., Salgaller, M. L., Poole, D. J., and Schlom, J. Evaluation of human carcinoembryonic-antigen (CEA)-transduced and non-transduced murine tumors as potential targets for anti-CEA therapies. *Cancer Immunol.Immunother.*, **36**, 65-75 (1993)

Hanna M.G. Jr., Peters L.C., Hoover H. C. Jr. Fundamentals of active immunotherapy of cancer using BCG-tumor cell vaccines, *Prog Clin Biol Res*, **310**, 51-65 (1989)

Harris J., Ryan L., Adams G., Benson A., Haller D. Survival and relapse in adjuvant autologous tumor vaccine therapy for Dukes B and C colon cancer: EST 5283. *Proc Am Soc Clin Oncol*, **13**, 294ff (1994)

Hewitt, H.B., Blake, E.R., Walder, A.S. A critique of the evidence for active host defense against cancer based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin, *Br J Cancer*, **33**, 241ff (1976)

Hodge, J. W., Schlom, J., Donohue, S. J., Tomaszewski, J. E., Wheeler, C. W., Levine, B. S., Gritz, L., Panicali, D., and Kantor, J. A. A recombinant vaccinia virus expressing human prostate-specific antigen (PSA): safety and immunogenicity in a non-human primate. *Int.J.Cancer*, **63**, 231-237 (1995)

Hoover H.C. Jr., Surdyke M.G., Dangel R.B., Peters L.C. et al., Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.5-year median follow up of a phase III prospectively randomized trial. *J Clin Oncol*, **11 (3)**, 390-399 (1993)

Hoover HC., Jr., Surdyke M.G., Dangel R.B., Peters L.C., and Hanna M.G., Jr., Prospectively randomized trial of adjuvant active-specific immunotherapy for human colorectal cancer. *Cancer*, **55**, 1236 (1985)

Horig H, Lee DS, Conkright W, et al: Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. *Cancer Immunol Immunother*, **49**, 504-514 (2000)

Houghton, A.N. Cancer antigens: Immune recognition of self and altered self. *J.Exp.Med.*, **180**, 1-4 (1994)

Huang, A.Y.C., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D. and Levitsky, H., Role of bone marrow derived cells in presenting MHC class I restricted tumor antigens. *Science*, **264**, 961-965 (1994)

International Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastasis from breast cancer: International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *Lancet*, **335 (8705)**, 1565-1568 (1990)

Janeway, C. A., Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol.Today*, **13**, 11-16 (1992)

Jeffers M.D., O'Dowd G.M., Mulcahy H., Stagg M., O'Donoghue D.P., Toner M. The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in colorectal carcinoma. *J Pathol*, **172 (2)**, 183-187 (1994)

Kantor, J., Irvine, K., Abrams, S., Kaufman, H., DiPietro, J., and Schlom, J. Antitumor activity and immune responses induced by a recombinant

carcinoembryonic antigen-vaccinia virus vaccine. *J.Natl.Cancer Inst.*, **84**, 1084-1091 (1992)

Kass, E., Schlom, J., Thompson, J., Guadagni, F., Graziano, P., and Greiner, J. W. Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Res.*, **59**, 676-683 (1999)

Kaufmann, H., Schlom, J. and Kantor, J. A recombinant vaccinia virus expressing human CEA. *Int. J. Cancer*, **48**, 900-907 (1992)

Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, et al: Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumour-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumour regression. *J Immunol.* ,**154**, 3961-3968 (1995)

Kawashima I, Hudson SJ, Tsai V, et al: The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: Identification of several CTL epitopes form various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Hum Immunol*, **59**, 1-14 (1998)

Keogh E, Fikes J, Southwood S, et al: Identification of new epitopes form four different tumor-associated antigens: Recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A\*0201-binding affinity. *J Immunol*, **167**, 787-796 (2001)

Khan W.N., Teglund S., Bremer K., Hammarstrom S. The pregnancy-specific glycoprotein family of the immunoglobulin superfamily: identification of new members and estimation of family size. *Genomics*, **12(4)**, 780-787 (1992)

Khera, K.S., Ashkenazi, A., Rapp, F., Melnick, J.L. Immunity in hamsters to cells transformed in vitro among the papovaviruses. *J Immunol*, **91**, 604ff (1963)

Kim C, Matsumura M, Saijo K, et al: In vitro induction of HLA-A2402-restricted and carcinoembryonic-antigen-specific cyto-toxic T lymphocytes on fixed autologous peripheral blood cells. *Cancer Immunol Immunother*, **47**, 90-96 (1998)

Klein, G., Sjörgen, H.O., Klein, E., Hellström, K.E. Demonstration of resistance against methylcholanthren-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, **20**, 1561ff (1960)

Kromer, B., Finkenzeller, D., Wessels, J., Dveksler, G., Thompson, J., and Zimmermann, W. Coordinate expression of splice variants of the murine pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene family during placental development. *Eur.J.Biochem.*, **242**, 280-287 (1996)

Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Müller, C. A., Becker, V., Gross, A. J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Müller, G. A., and Ringert, R. H. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat.Med.*, **6**, 332-336 (2000)

Lamerz, R. and Fateh-Moghadam, A. Carcinofoetal antigens. II. Carcinoembryonic antigen (CEA). *Klin.Wochenschr.*, **53**, 193-203 (1975)

LaSalle, J. M. and Hafler, D. A. T cell anergy. *FASEB J.*, **8**, 601-608 (1994)

Liefers, G.J., Cleton A.M., van de Velde C.J.H., Hermans J. van Krieken J.H.J.M., Cornelisse C.J., Tollenaar R.A.E.M., Micrometastasis and survival in stage II colorectal cancer, *NEJM*, **339 (4)**, 223-228 (1998)

Li, M., Davey, G.M., Sutherland, R.M., Kurts, C., Lew, A.M., Hirst, C., Carbone F.R., Heath, W.R., Cell-associated Ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble Ovalbumin in vivo, *J. Immunol.*, **166**, 6099-6103 (2001)

Lindblom A. Improved tumor staging in colorectal cancer, *NEJM*, **339 (4)**, 264-265 (1998)

Marshall J, Hawkins MJ, Tsang KY, et al: Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. *J Clin Oncol*, **17**, 332-337 (1999)

Marshall J, Hoyer RJ, Toomey MA, et al: Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *J Clin Oncol*, **18**, 3964-3974 (2000)

Matthews, V. B., Christiansen, F. T., and Price, P. Lymphocytes from H2 mice produce lower levels of several cytokines than congenic H2 or H2 mice. *Immunol. Cell Biol.*, **78**, 247-253 (2000)

McLaughlin, J.P., Schlom, J., Kantor, J.A., and Greiner, J.W. Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccinia vaccine when give in combination with interleukin-2. *Cancer Res.*, **56**, 2361-2367 (1996)

Middle, J.G., Embleton, M.J. Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain. II. Immunogenicity of transplanted tumors, *JNCI*, **67**, 637 (1981)

Mitchell, M.S. T-cell mediated immunity to carcinoembryonic antigen in humans: an example of Aswimming upstream? *J.Natl.Cancer Inst.*, **87**, 949-951 (1995)

Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., Gallo, R.G. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal bone marrow. *Science*, **193**, 1007ff (1976)

Morse M, Deng Y, Coleman D, et al: A phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res*, **5**, 1331-1338 (1999)

Muders M., Ghoreschi K., Suckfuell M., Zimmermann W., Enders G. Studies on the immunogenicity of hCEA in a transgenic mouse model. *Int J Colorectal Dis*, DOI 10.1007/s00384-002-0421-8 (2002)



Mukai, K., Yasutomi, Y., Watanabe, M., Kenjo, A., Aota, T., Wang, L., Nishikawa, H., Ishihara, M., Fujita, T., Kuribayashi, K., and Shiku, H. HER2 peptide-specific CD8(+) T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations. *Gene Ther.*, **9**, 879-888 (2002)

Murphy G, Tjoa B, Ragde H, et al: Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*, **29**, 371-380 (1996)

Muul L.M., Spiess P.J., Director E.P., et al., Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol.*, **138 (3)**, 989-995 (1987)

Nagorsen, D., Keilholz, U., Rivoltini, L., Schmittel, A., Letsch, A., Asemissen, A. M., Berger, G., Buhr, H. J., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.*, **60**, 4850-4854 (2000)

Nap M., Hammarström M-L, Brömer O., Hammarström S., Wagener C., Handt S., Schreyer M., Mach J-P., Buchegger F., von Kleist S., Gunnert F., Sequin P., Fuks A., Holm R., Lamerz R., Specificity and affinity of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.*, **52**, 2329f (1992)

Nap M., Mollgard K., Burtin P., Fleuren G.J. Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour-Biol.*, **9(2-3)**, 145-153 (1988)

Nestle F, Alijagic S, Gilliet M, et al: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, **4**, 328-332 (1998)

Nossal, G. J. Tolerance and ways to break it. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **690**, 34-41, (1993)

Nukaya I, Yasumoto M, Iwasaki T, et al: Identification of HLA-A24 epitope peptides of carcinoembryonic antigen which induce tumour-reactive cytotoxic T lymphocyte. *Int J Cancer*, **80**, 92-97 (1999)

Obrink, B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **9**, 616-626 (1997)

Oehen, S. U., Ohashi, P. S., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Aichele, P. Escape of thymocytes and mature T cells from clonal deletion due to limiting tolerogen expression levels. *Cell Immunol.*, **158**, 342-352 (1994)

Oettgen H.F., Old L.J. The history of cancer immunotherapy. In: DeVita VT, Jr., Hellmann S., Rosenberg SA, eds., *Biologic therapy of cancer*. Philadelphia: Lippincott, 1997; 87

Oikawa, S., Inuzuka, C., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Kosaki, G., and Nakazato, H. Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **164**, 39-45 (1989)

Old, L.J., Boyse, E.A., Clarke, D.A., Carswell E.A. Antigenic properties of chemically induced tumors, *Ann N Y Acad Sci*, **101**, 80ff (1962)

Paludan, C., Bickham, K., Nikiforow, S., Tsang, M. L., Goodman, K., Hanekom, W. A., Fonteneau, J. F., Stevanovic, S., and Munz, C. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J.Immunol.*, **169**: 1593-1603 (2002)

Paoletti E: Applications of poxvirus vectors to vaccination: An update. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11349-11353 (1996)

Pelegri, A., Terskikh, A., Hayoz, D., Chalandon, Y., Olsson, N.O., Folli, S., Buchegger, F., Kromer, B., Schwarz, K., Martin, M., Martin, F., and Mach, J.P. Human carcinoembryonic antigen cDNA expressed in rat carcinoma cells can

function as target antigen for tumor localization of antibodies in nude rats and as rejection antigen in syngeneic rats. *Int.J.Cancer*, **52**, 110-119 (1992)

Poindexter, N. J., Landon, C., Whiteley, P. J., and Kapp, J. A. Comparison of the T cell receptors on insulin-specific hybridomas from insulin transgenic and nontransgenic mice. Loss of a subpopulation of self-reactive clones. *J.Immunol.*, **149**, 38-44 (1992)

Poplonski, L., Vukusic, B., Pawling, J., Clapoff, S., Roder, J., Hozumi, N., and Wither, J. Tolerance is overcome in beef insulin-transgenic mice by activation of low-affinity autoreactive T cells. *Eur.J.Immunol.*, **26**, 601-609 (1996)

Prehn R.T., and Main L.J. Immunity to methylcholanthren-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **18**, 769ff (1957)

Ras E, van der Burg SH, Zegveld ST, et al: Identification of potential HLA-A \*0201 restricted CTL epitopes derived from the epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) and the carcinoembryonic antigen (CEA). *Hum Immunol* **53**, 81-89 (1997)

Restifo, N.P., Szol, M. Cancer Vaccines in: DeVita V.T. Jr., Hellmann, S., Rosenberg, S.A. *Cancer: Principles and Practice in Oncology*, 5th edition, 3023-3043 (1997)

Ridge, A.J.P., Fuchs, E.J. and Matzinger, P., Neonatal tolerance revisited:Turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science*, **271**, 1723-1726 (1996)

Riethmueller, G., Schneider-Gaedicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoeffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R., Buggisch, P., and Witte, J. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes C colorectal carcinoma. *Lancet*, **343**, 1177-1183 (1994)

Robbins, P.F., Kantor, J.A., Salgaller, M., Hand, P.H., Fernsten, P.D., and Schlom,J. Transduction and expression of the human carcinoembryonic antigen gene in a murine colon carcinoma cell line. *Cancer Res.*, **51**, 3657-3662 (1991)

Rosenberg S, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al: Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* **4**, 321-327 (1998)

Rosenberg, S.A. Principles of Cancer Management: Biologic Therapy in: DeVita V.T. Jr., Hellmann, S., Rosenberg, S.A. Cancer: Principles and Practice in Oncology, 5th edition, 349-373 (1997)

Rosenberg, S.A., Spiess, P., Lafreniere, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor infiltrating lymphocytes *Science*, **233 (4770)**, 1318-1321 (1986)

Rosenstein, M., Yron, I., Kaufmann, Y., Rosenberg, S.A. Lymphokine activated killer cells: lysis of fresh syngeneic NK-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin-2 *Cancer Res*, **44 (5)**, 1946-1953 (1984)

Rothbard, J.B. and W.R.Taylor. A sequence pattern common to T-cell epitops. *EMBO J.*, **7**, 93-100 (1988)

Rudert, F., Saunders, A. M., Rebstock, S., Thompson, J. A., and Zimmermann, W. Characterization of murine carcinoembryonic antigen gene family members. *Mamm.Genome*, **3**: 262-273, (1992)

Samanci A, Yi Q, Fagerberg J, et al: Pharmacological administration of granulocyte/macrophage-colony-stimulation factor is of significant importance for the induction of a strong humoral and cellular response in patients immunized with recombinant carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol* **47**, 31-142 (1998)

Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G., Lotz, M., Carson, D.A., and Raz, E., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, **273**, 352-354 (1996)

Savino, W., Durand, D., and Dardenne, M. Immunohistochemical evidence for the expression of the carcinoembryonic antigen by human thymic epithelial cells in vitro and in neoplastic conditions. *Am.J.Pathol.*, **121**, 418-425 (1985)

Schoenberger, S. P., van der Voort, E. I., Krietemeijer, G. M., Offringa, R., Melief, C. J., and Toes, R. E. Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells. *J.Immunol.*, **161**, 3808-3812 (1998)

Schuler-Thurner, B., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Bender, A., Maczek, C., Jonuleit, H., Roder, C., Haendle, I., Leisgang, W., Dunbar, R., Cerundolo, V., von Den, D. P., Knop, J., Brocker, E. B., Enk, A., Kampgen, E., and Schuler, G. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.*, **165**, 3492-3496 (2000)

Shivley, J. and Beatty, J. CEA related antigens: molecular biological and clinical significance. *CRC CRIT. Rev. Oncol. Hematol.*, **2**, 355-399 (1985)

Sibille, C., Chomez, P., Wildmann, C., Van Pel, A., DePlaen, E., Maryanski, J.L., de Bergeyck, V. and T.Boon. Structure of the gene of tum<sup>r</sup> transplantation antigen P198: a point mutation generates a new antigenic peptide. *J.Exp.Med.*, **172**, 35-45 (1990)

Sjörger, H.O., Hellström, I., Klein, G. Resistance to polyoma virus immunized mice to transplantation of established polyoma tumors. *Exp Cell Res*, **91**, 204ff (1961)

Slopak, C.A., Kufe, D.W. Principles of Cancer Therapy in Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L. (eds.) Harrison's Principles of Internal Medicine, 14<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill, 523-537 (1998)

- Speiser, D. E., Kyburz, D., Stubi, U., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. Discrepancy between in vitro measurable and in vivo virus neutralizing cytotoxic T cell reactivities. Low T cell receptor specificity and avidity sufficient for in vitro proliferation or cytotoxicity to peptide-coated target cells but not for in vivo protection. *J.Immunol.*, **149**, 972-980 (1992)
- Srivastava, P. K. Heat shock proteins in immune response to cancer: the Fourth Paradigm. *Experientia*, **50**, 1054-1060 (1994)
- Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E., and Li, Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, **39**, 93-98 (1994)
- Srivastava, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu.Rev.Immunol.*, **20**, 395-425 (2002)
- Sun, J. Y., Krouse, R. S., Forman, S. J., Senitzer, D., Sniecinski, I., Chatterjee, S., and Wong, K. K., Jr. Immunogenicity of a p210(BCR-ABL) fusion domain candidate DNA vaccine targeted to dendritic cells by a recombinant adeno-associated virus vector in vitro. *Cancer Res.*, **62**, 3175-3183 (2002)
- Suto, R., and Srivastava, P.K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*, **269**,1585-1588 (1995)
- Tartaglia, J., Bonnet, M. C., Berinstein, N., Barber, B., Klein, M., and Moingeon, P. Therapeutic vaccines against melanoma and colorectal cancer. *Vaccine*, **19**, 2571-2575 (2001)
- Thompson, J. , Grunert, F. and Zimmermann W. CEA gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.*, **5**, 344-366 (1991)
- Thompson, J., Moessinger, S., Reichardt, V., Engels, U., Beauchemin, N., Kommos, F., von Kleist, S., and Zimmermann, W. A polymerase-chain-reaction

assay for the specific identification of transcripts encoded by individual CEA-gene family members. *Int.J.Cancer*, **55**, 311-319 (1993)

Toes R, Kast WM, Blom RJ, et al: Efficient tumour eradication by adoptively transferred cytotoxic T cell clones in allogenic hosts. *Int J Cancer* **66**, 686-691 (1996)

Todryk, S., Melcher, A. A., Hardwick, N., Linardakis, E., Bateman, A., Colombo, M. P., Stoppacciaro, A., and Vile, R. G. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J.Immunol.*, **163**, 1398-1408 (1999)

Topalian, S.L., Rosenberg, S.A. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL). Evidence for specific immune reactions against growing cancers in mice and humans. In: De Vita VT, Hellman S., Rosenberg S.A. eds. Important advances in oncology. Philadelphia: JB Lippincott 1990: 19

Traversari, C., van-der-Bruggen, P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., Van-Pel, A., DePlaen, E., Amar Costesec, A., Boon, T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T-lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E, *J Exp Med*, **176 (5)**, 1453-1457 (1992)

Tsang K, Zhu M, Nieroda CA, et al: Phenotypic stability of a cytotoxic T-cell line directed against an immunodominant epitope of human carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* **3**, 2439-2449 (1997)

Tsang, K., Zaremba, S., Nieroda, C., Zhu, M., Hamilton, M. and Schlom, J. Generation of Human Cytotoxic T Cells Specific for Human Carcinoembryonic Antigen Epitopes From Patients Immunized With Recombinant Vaccinia-CEA Vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* , **87**, 982-990 (1995)

Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., DePlaen, E., Van den Eynde, B., Knuth A., Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254 (5038)**, 1643-1647 (1991)

Van Der Burg, S. H., Menon, A. G., Redeker, A., Bonnet, M. C., Drijfhout, J. W., Tollenaar, R. A., Van De Velde, C. J., Moingeon, P., Kuppen, P. J., Offringa, R., and Melief, C. J. Induction of p53-specific Immune Responses in Colorectal Cancer Patients Receiving a Recombinant ALVAC-p53 Candidate Vaccine. *Clin.Cancer Res.*, **8**, 1019-1027 (2002)

Vermorken, J. B., Claessen, A. M., van Tinteren, H., Gall, H. E., Ezinga, R., Meijer, S., Scheper, R. J., Meijer, C. J., Bloemena, E., Ransom, J. H., Hanna, M. G., Jr., and Pinedo, H. M. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet*, **353**, 345-350 (1999)

Vierboom M, Nijman HW, Offringa R, et al: Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, **186**, 695-704 (1997)

von Herrath, M. G., Dockter, J., and Oldstone, M. B. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity*, **1**, 231-242 (1994)

von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, et al: Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **6**, 2219-2228 (2000)

von Mehren M, Davey M, McLaughlin S, et al: Phase I Study of Vaccine Therapy with ALVAC-CEA B7.1 and GM-CSF (G) in Patients (PTS) with Advanced CEA-Expressing Cancers. *Proc Am Soc Clin Oncol* **19**:480a (2000) (abstr 1883)

von Mehren M., et al: The Influence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and prior chemotherapy on the immunological response to a vaccine (ALVAC-CEA B7.1) in patients with metastatic carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**, 1181-1191 (2001)

Wagener, C. and Ergun, S. Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp.Cell Res.*, **261**, 19-24 (2000)



Wepsic, H. T. Overview of oncofetal antigens in cancer. *Ann.Clin.Lab Sci.*, **13**, 261-266 (1983)

Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, et al: Identification of an enhancer agonist cytotoxic Y lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **57**, 4570-4577 (1997)

Zeh, H. J., III, Perry-Lalley, D., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A., and Yang, J. C. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J.Immunol.*, **162**, 989-994 (1999)

## 7. Lebenslauf

Name: Michael Helmut Muders  
Geburtsdatum: 03.06.1971  
Geburtsort: Duisburg  
Ehestand: verheiratet mit Beate Muders, geb. Walczyk  
Kinder: Pascal Muders  
Eltern: Helmut Muders  
Renate Muders, geb. Donsbach

### Schulbildung

1977-1981 Grundschule Herbertshofen/Landkreis Augsburg  
1981-1990 Gymnasium Wertingen/Landkreis Dillingen  
06/1990 Abitur am Gymnasium Wertingen

### Zivildienst

08/1990-10/1991 Zivildienst als Pflegehelfer an der Orthopädischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Universitätsausbildung

seit 11/1991 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Harvard Medical School, Boston  
08/1993 Ärztliche Vorprüfung  
08/1994 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/1997 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04-10/1997 PJ als Stipendiat der Ludwig-Maximilians-Universität München an der Harvard Medical School in Boston im Rahmen der "Alliance for Medical Education" in den Fächern Innere Medizin und Chirurgie (Beth Israel Deaconess Medical Center); Ausbildung in „Medical Education“  
11/1997-03/1998 PJ-Tertial am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
05/1998 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08/1998 United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 2  
10/1998 United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 1

### Ärztliche Tätigkeit

11/1998-10/1999 Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch)  
11/1999-04/2000 Arzt im Praktikum am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. U. Löhns)  
05/2000-02/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. U. Löhns)  
09/2002 Praktikum in der Pathologie des Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston (bei Nancy Lee Harris, MD)  
seit 03/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Dresden (Direktor: Prof. Dr. G. B. Baretton)



Michael Muders

## **8. Danksagung**

Meinem Doktorvater Prof. Dr. G. A. Enders danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und der geduldigen und verständnisvollen Betreuung.

Weiterhin danke ich meinem Mitdoktoranden Kamran Ghoreschi für die zuverlässige praktische Unterstützung.

Besonderen Dank meiner Frau und meinen Eltern für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinem Sohn Pascal danke ich für die Ablenkung am Tag der Promotionsprüfung.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Hilfe der Wilhelm Sander Stiftung durchgeführt.

*Teile dieser Arbeit wurden publiziert:*

Muders M., Ghoreschi K., Suckfuell M., Zimmermann W., Enders G. Studies on the immunogenicity of hCEA in a transgenic mouse model. *Int J Colorectal Dis*, DOI 10.1007/s00384-002-0421-8 (2002)