

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

## **TLR7-aktivierende RNA-Oligonukleotide in der Immuntherapie von Tumoren: Aktivierung natürlicher Killerzellen**

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



vorgelegt von  
Anna-Lisa Lanz  
aus Frankfurt am Main

März 2010



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Peter Kufer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dolores J. Schendel

Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2010

---

# Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG .....	1
1.1. Das menschliche Immunsystem im Kontext dieser Arbeit .....	1
1.1.1. Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems .....	1
1.1.2. <i>Toll-like</i> -Rezeptoren .....	9
1.1.3. TLR7-Liganden .....	13
1.2. Immuntherapie von Tumoren .....	15
1.2.1. Grundlagen der Tumorummunologie .....	15
1.2.2. Definition der Immuntherapie und ihre historischer Entwicklung .....	16
1.2.3. Aktueller Stand der Tumorummuntherapie .....	17
1.2.4. Tumorantigene .....	17
1.3. Trägermaterialien für Nukleinsäuren .....	20
2. FRAGESTELLUNG .....	23
3. MATERIAL UND METHODEN .....	24
3.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte .....	24
3.1.1. Geräte .....	24
3.1.2. Chemikalien .....	24
3.1.3. Reagenziensätze .....	25
3.1.4. Materialien für die Zellkultur .....	26
3.1.5. Gelatine-Nanopartikel .....	26
3.1.6. Oligonukleotide .....	27
3.1.7. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen .....	27
3.1.8. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....	28
3.1.9. Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	29
3.1.10. ELISA-Antikörper zur Bestimmung der Immunglobulinsubklasse ....	29
3.1.11. Antikörper zur Zelldepletion .....	30
3.1.12. Zelllinien .....	30
3.1.13. Software .....	31
3.2. Zellkultur .....	31
3.2.1. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	31
3.2.2. Kultivierung der RMA- und RMA-S-Lymphomzellen .....	31

---

3.2.3. Kultivierung der C26-Kolonkarzinomlinie .....	32
3.2.4. Kultivierung der B16- und B16-OVA-Zellen .....	32
3.2.5. Herstellung einer Einzelzellsuspension von Splenozyten.....	32
3.2.6. Splenozytenkultur .....	33
3.3. Immunologische Methoden .....	33
3.3.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	33
3.3.2. Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (FACS).....	34
3.4. Tierversuche .....	38
3.4.1. Versuchstiere und behördliche Genehmigung .....	38
3.4.2. Immunisierung der Mäuse .....	38
3.4.3. Zelldepletion .....	38
3.4.4. Tumorinduktion .....	39
3.4.5. Beobachtung des Tumorwachstums .....	40
3.4.6. Tumorlyse und Percoll-Gradient .....	40
3.5. Statistische Analyse .....	41
4. ERGEBNISSE .....	42
4.1. Immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide und ihr Einfluss auf das Wachstum muriner Tumoren durch die Aktivierung von NK-Zellen .....	42
4.1.1. <i>In-vitro</i> -Aktivierung von NK-Zellen durch immunstimulatorische RNA- Oligonukleotide .....	42
4.1.2. Zeitliches Profil der <i>in vivo</i> NK-Aktivierung nach Applikation von immunstimulatorischer RNA.....	44
4.1.3. Infiltration von aktivierten NK-Zellen im Tumorgewebe nach Behandlung mit immunstimulatorischer RNA .....	45
4.1.4. Antitumorale Wirkung der immunstimulatorischen RNA bei der Behandlung eines murinen NK-empfindlichen Tumors.....	47
4.1.5. Einfluss der immunstimulatorischen RNA auf das Tumorwachstum eines nicht-NK-sensiblen Tumors.....	49
4.1.6. NK-vermittelte antitumorale Aktivität durch immunstimulatorische RNA .....	50
4.2. Gelatine-Nanopartikel als neue Trägersubstanz für immunstimulatorische Oligonukleotide.....	53

---

4.2.1. Antitumorale Wirkung von an Gelatine-Nanopartikel gebundenem CpG .....	54
4.2.2. Systemische Zytokinantwort nach der Applikation von CpG-NP im Vergleich zu freiem CpG .....	55
4.2.3. Entwicklung einer antigenspezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit an Nanopartikel gebundenem CpG .....	56
4.2.4. Immunität gegen einen antigenexprimierenden Tumor durch Immunisierung mit CpG-beladenen Nanopartikeln .....	59
5. DISKUSSION.....	62
5.1. Immunstimulatorische RNA und NK-Zellen.....	62
5.1.1. NK-Infiltration im Tumorgewebe .....	62
5.1.2. NK-Aktivierung unter Immunsuppression .....	63
5.1.3. Antitumorale Wirkung durch aktivierte NK-Zellen .....	65
5.1.4. NK-Zellen versus CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	67
5.2. Immuntherapie mit NK-Zellen.....	68
5.2.1. NK-Zellen als therapeutisches Ziel in der Immuntherapie: Unsere Strategie im Kontext bisheriger Ansätze .....	68
5.2.2. Immuntherapie mit TLR7-Agonisten: Vergleich mit Imiquimod .....	70
5.2.3. Aussagekraft des murinen NK-empfindlichen Tumormodells für humane Tumoren.....	72
5.2.4. RNA versus CpG oder TLR7 versus TLR9.....	72
5.2.5. Resümee I .....	73
5.3. Gelatine-Nanopartikel .....	74
5.3.1. Gelatine-Nanopartikel: ein neues Trägersystem .....	74
5.3.2. Induktion einer antigenspezifische Immunität mit antitumoraler Wirkung.....	75
5.3.3. Reduktion der systemischen Nebenwirkungen von freiem CpG durch Bindung an Gelatine-Nanopartikel .....	75
5.3.4. Resümee II .....	77
6. ZUSAMMENFASSUNG .....	78
7. LITERATURVERZEICHNIS .....	80

Abkürzungen .....	94
Danksagung .....	95
Veröffentlichungen .....	96
Lebenslauf .....	97

# 1. Einleitung

## 1.1. Das menschliche Immunsystem im Kontext dieser Arbeit

### 1.1.1. Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems

Das menschliche Immunsystem besteht aus zwei sich ergänzenden Komponenten, dem angeborenen und dem adaptiven Teil. Das angeborene Immunsystem ist dabei die schnelle, aber unspezifische erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eindringende pathogene Mikroorganismen sobald diese die physikalischen Barrieren durchbrochen haben. Ohne dass es zur antigenspezifischen Erkennung von Krankheitserregern kommt, können die Zellen des angeborenen Immunsystems eine rasche, unspezifische Reaktion des Körpers auf eine Invasion bewirken (Janeway, 2002). Das erworbene Immunsystem vermittelt dagegen die auf das eindringende Pathogen genau zugeschnittene und sich über Tage entwickelnde Antwort des Körpers auf den Angriff.

Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen und antigenpräsentierende dendritische Zellen, die als Brücke zum adaptiven Teil fungieren. Allen diesen Zellen ist gemein, dass sie zwar Pathogene erkennen und angreifen können, jedoch auf eine nicht-antigenspezifische Art. Dies steht im Gegensatz zu den Zellen des erworbenen Immunsystems, den B- und T-Lymphozyten. Diese Zellen besitzen ein durch Rearrangement von Genen für die Rezeptoren praktisch unendliches Repertoire an antigenspezifischen Rezeptoren, wobei jede T- oder B-Zelle individuell nur ein einziges Motiv exprimiert (Janeway, 2005).

Im Folgenden sollen kurz die für meine Arbeit wichtigen Zellen des Immunsystems besprochen werden.

#### 1.1.1.1. Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden erstmals 1975 in Mäusen beschrieben und erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Fähigkeit Tumorzellen ohne weitere Stimulation zu lysieren (Herberman, 1975; Kiessling, 1975). Sie stammen mit den T- und B-Zellen von einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle ab. Da aber ihre Rezeptoren nicht, wie der T-Zell-Rezeptor oder die Antikörper der B-Zellen, der genetischen Rekombination unterliegen und somit nicht antigenspezifisch sind, ordnet man sie dem angeborenen

Immunsystem zu. Sie erkennen infizierte oder entartete Zellen und eliminieren diese. Die folgenden Mechanismen beeinflussen dabei den Aktivierungszustand von NK-Zellen:

1. Der direkte Kontakt mit einer Zielzelle. Hierbei entscheidet ein komplexes Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Rezeptoren, ob die NK-Zelle aktiviert oder inaktiviert wird. Die Sekretion von Zytokinen durch die Zielzelle kann dies weiter verstärken.
2. Die Bindung eines Antikörpers an den Fc-Rezeptor  $Fc\gamma RIII A$  (CD16) auf NK-Zellen führt zu direkter zytolytischer Aktivität gegenüber einer Antikörper-beladenen Zelle (*antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*).
3. Der Kontakt mit Helferzellen (Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen) (Newman, 2007). Dies kann einerseits die Sekretion von Zytokinen, v. a.  $IFN-\alpha$  und  $-\beta$  und IL-12 sein, andererseits aber auch direkter Zell-Zell-Kontakt.
4. Die Bindung des Fas-Liganden (CD95L) an den Fas-Rezeptor (CD95) der Zielzelle. Stromabwärts des Fas-Rezeptors liegt eine Signalkaskade die zur Apoptose der Zielzelle führt.

Die Rezeptoren der NK-Zellen werden in verschiedene Klassen eingeteilt, darunter die *Killer-cell immunoglobuline-like*-Rezeptoren (KIR), die *Immunoglobulin-like-transcript*-Rezeptorenfamilie (ILT), die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren und die *C-type-lectins* (NKG2A-E). Es werden weiterhin inhibitorische (Tabelle 1.1.) und aktivierende (Tabelle 1.2.) Rezeptoren je nach Auswirkung auf den Aktivierungszustand der NK-Zellen unterschieden. Die Signale der Rezeptoren werden dabei in der natürlichen Killerzelle integriert und dadurch das anschließende Verhalten - Angriff oder nicht - determiniert (Tomasello, 2000; Cheent, 2009).

Rezeptor-Familie	Rezeptor	Ligand
KIR (nur human)	2DL1/2/3	HLA-C
	2DL5	nicht bekannt
	3DL1	Bw4+ HLA-B
	3DL2	HLA-A3/A11
C-Typ-Lektine	CD94:NKG2A	HLA-E
	Ly49A (nur murin)	H-2D <sup>d</sup>
	Ly49C (nur murin)	H-2K <sup>b</sup>
	Ly49G (nur murin)	H-2D <sup>d</sup>
	Ly49I (nur murin)	nicht bekannt
ILT	ILT2	HLA-A, -B, -C

**Tabelle 1.1.:** Inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen (Ortaldo, 2005; Cheent and Khakoo, 2009) (KIR: *Killer-cell immunoglobulin-like*-Rezeptor; ILT: *Immunoglobulin-like transcripts*; HLA: Humanes Leukozytenantigen)

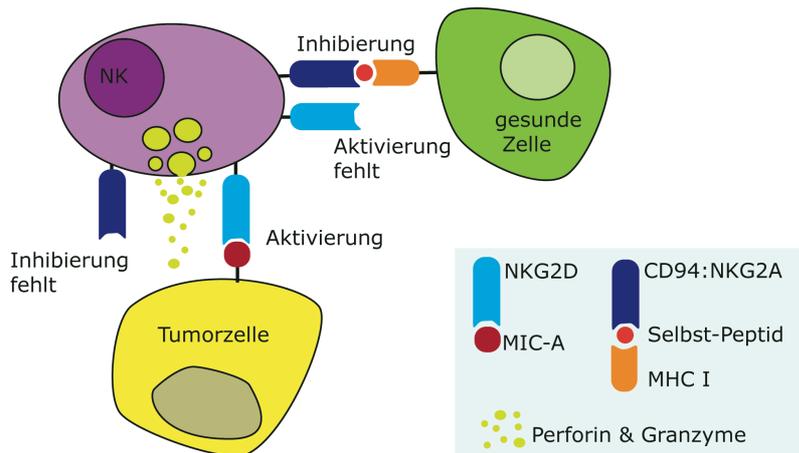
Der Grundzustand der natürlichen Killerzelle ist auf Selbst-Toleranz eingestellt, es überwiegen also inhibitorische Signale. Wie wirken nun die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren zusammen, um eine NK-Zelle zu aktivieren? Es wurde beschrieben, dass inhibierende Rezeptoren an *major-histocompatibility-complex*-Moleküle (MHC-Moleküle) der Klasse I binden. Die MHC-I-Moleküle, beim Menschen auch Humanes Leukozytenantigen (HLA) genannt, fungieren als eine Art Ausweis einer gesunden Zelle. Die inhibierenden Rezeptoren können sowohl der KIR-Rezeptorenfamilie, als auch den C-Typ-Lektinen oder anderen Rezeptorklassen angehören (siehe Tabelle 1.1.). Die Erkennung von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche einer gesunden Zelle resultiert normalerweise in einer Inhibierung der NK-Zelle. Infizierte oder entartete Zellen tragen häufig kein MHC-I. Sie entgehen damit der Erkennung durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die Zellen lysieren, welche fremde Peptide über MHC-I präsentieren. NK-Zellen werden allerdings gerade durch den fehlenden MHC-I-Komplex aktiviert. Sie deaktivieren also Zellen, die sich nicht als Selbst ausweisen können. Diesen Vorgang beschreibt die „*missing-self*“-Hypothese, die Mitte der achtziger Jahre von dem schwedischen Immunologen Klas Kärre formuliert wurde (Ljunggren, 1990). Interessanterweise trägt jede NK-Zellen ein unterschiedliches Repertoire an Rezeptoren für MHC-I-Moleküle. Dies kreiert eine Situation, bei der alle NK-Zellen im Körper gemeinsam fast alle verschiedenen MHC-I-Allele eines Menschen abdecken können (Moretta, 2000).

Rezeptor-Familie	Rezeptor	Ligand
Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren	NKp30	BAT-3
	NKp44, NKp46	Virale Hämagglutinine
C-Typ-Lektine	CD94:NKG2C/E	HLA-E
	NKG2D	MIC-A/B, ULBPs (human) RAE1, H60, MULT1 (murin)
	Ly49D (nur murin)	H2-D <sup>d</sup>
	Ly49H (nur murin)	M157
KIR (nur human)	2DL4	HLA-G
	2DS1	HLA-C
	2DS2	HLA-C
	2DS3	Nicht bekannt
	2DS4	HLA-Cw4
	2DS5	Nicht bekannt
	3DS1	Bw4+ HLA-B?

**Tabelle 1.2.:** Aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen (Ortaldo and Young, 2005; Cheent and Khakoo, 2009) (KIR: *Killer-cell immunoglobulin-like-Rezeptor*; ILT: *Immunoglobulin-like transcripts*; BAT3: *HLA-B-associated transcript 3*, HLA: Humanes Leukozytenantigen; MICA/B: *Major histocompatibility complex antigen-related chain A and B*; ULBPs: *UL16-binding proteins*)

Ein Beispiel eines aktivierenden Rezeptors ist der den C-Typ-Lektinen zugehörige NKG2D. Er wird außer auf NK-Zellen auch von Makrophagen und T-Zellen exprimiert. NKG2D erkennt Liganden unterschiedlicher molekularer Herkunft, die auf gesunden Zellen kaum exprimiert werden, aber durch zellulären Stress, virale Infektionen oder auch Entartung hochreguliert werden (Bauer, 1999; Diefenbach, 2000).

Nach Aktivierung können NK-Zellen direkt zytotoxisch wirken und Zellen lysieren. Dabei wird ein Cocktail aus Perforin, Granzymen und Granulolysin ausgeschüttet. Perforin bildet eine Pore in der Zellmembran der Zielzelle. Durch diese Poren können dann die Granzyme und Granulolysin in die Zelle eindringen, den Zellinhalt verdauen und den Vorgang der Apoptose einleiten. Gleichzeitig schütten NK-Zellen nach ihrer Aktivierung T<sub>H</sub>1-Zytokine, vor allem IFN- $\gamma$ , aus und modulieren damit die weitergehende Immunantwort.



**Abbildung 1.1.:** Aktivierung von NK-Zellen nach Kontakt mit einer Tumorzelle. Fehlende Inhibition über NKG2A sowie Aktivierung durch NKG2D führen zur Ausschüttung des zytotoxischen Cocktails. Im Gegensatz dazu Inhibition der Zytotoxizität nach Kontakt mit einer gesunden Zelle. (MHC: *Major histocompatibility complex*; MIC-A: *Major histocompatibility complex antigen-related chain A*)

Man ging lange Zeit davon aus, dass NK-Zellen eine Art natürliche Aktivität besitzen und anders als T- und B-Zellen kein *priming* benötigen um aktiviert zu werden. Isoliert man jedoch NK-Zellen in Abwesenheit einer Infektion, zeigen diese einen naiven Phenotyp und sind nicht in der Lage zytotoxische Effektorfunktionen gegenüber Zielzellen auszubilden. Lucas und Kollegen konnten zeigen, dass nach *In-vivo*-Stimulation mit TLR-Liganden naive NK-Zellen zur Ausübung ihrer vollen Effektorfunktion auf ein *priming* durch dendritische Zellen im sekundären lymphatischen Gewebe angewiesen sind. Durch die *trans*-Präsentation von IL-15 durch aktivierte CD11c<sup>high</sup> dendritische Zellen entwickeln die NK-Zellen einen gereiften Phenotyp und können daraufhin rasch auf Stimulation durch die oben genannten aktivierenden Signale reagieren (Lucas, 2007).

Humane NK-Zellen werden mittlerweile aufgrund verschiedener Expressionsmuster von CD56 in zwei Untergruppen unterteilt: CD56<sup>dim</sup> (90 %) und CD56<sup>bright</sup> (10 %). Diese beiden Subtypen zeichnen sich auch durch funktionelle Unterschiede aus. CD56<sup>dim</sup>-Zellen exprimieren CD16 und die KIRs in hohem Maße und sind somit potente zytotoxische Effektorzellen. CD56<sup>bright</sup>-Zellen exprimieren im Gegensatz dazu nur wenig CD16 und KIRs, sie sind daher kaum zytotoxisch. Dafür tragen sie viele IL-2-Rezeptor  $\alpha$ -Ketten (IL2R $\alpha$ /CD25), sind also empfindlich für Stimulation durch IL-2, und produzieren außerdem große Mengen an immunmodulatorischen Zytokinen (Jacobs, 2001).

### 1.1.1.2. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) des Körpers. Es handelt sich hierbei um Zellen, die auf verschiedene Weise Pathogene aufgenommen und prozessiert haben und nun diese Antigene zusammen mit kostimulatorischen Molekülen T-Zellen präsentieren. Ihr charakteristisches Merkmal ist der *major histocompatibility complex* der Klasse II, der Peptide von extrazellulären, nicht in der Zelle synthetisierten Proteinen präsentiert. Neben den dendritischen Zellen gehören auch Makrophagen und B-Zellen zu den APCs, bei diesen beiden Zellen ist jedoch die Präsentation von Antigenen nicht die eigentliche Hauptaufgabe. DCs sind außerdem die einzigen antigenpräsentierenden Zellen, die in der Lage sind auch Peptide von außen aufgenommener Proteine über MHC-I zu präsentieren. Normalerweise ist der MHC-I-Komplex intrazellulär produzierten Proteinen vorbehalten. Dieser Vorgang wird Kreuz-Präsentation (*cross-presentation*) genannt und dient der Induktion von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, ohne dass das Pathogen in die dendritische Zelle aufgenommen werden muss (Groothuis, 2005). Dendritische Zellen durchlaufen zwei Entwicklungsstadien mit sehr unterschiedlichen Funktionen (Banchereau, 1998; Janeway, 2005). Naive dendritische Zellen stammen von lymphatischen oder myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks ab. Sie wandern vom Knochenmark in peripheres Gewebe, typischerweise in Organe mit hohem Antigenkontakt wie Haut und Schleimhäute, ein. Auf dieser Entwicklungsstufe zeichnen sich die dendritischen Zellen durch eine niedrige Konzentration von MHC-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) auf ihrer Oberfläche aus. Sie exprimieren jedoch Rezeptoren, die sie zur Erkennung und Aufnahme von Pathogenen durch Phagozytose befähigen. Außerdem nehmen sie extrazelluläre Flüssigkeit über Makropinozytose auf. Detektieren sie dabei ein Pathogen, werden sie aktiviert und wandern aus dem peripheren Gewebe in die regionalen Lymphknoten. Jetzt erst transformieren sie sich in die oben beschriebenen antigenpräsentierenden Zellen. Die Expression von MHC-I- und -II-Komplexen, sowie von einigen kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen wird erhöht. Gleichzeitig verlieren die dendritischen Zellen ihre Fähigkeit zur Antigenprozessierung. Nun können sie mit naiven T-Zellen in Kontakt treten und diese aktivieren. Um eine T-Zelle adäquat zu aktivieren und deren klonale Expansion zu induzieren sind immer zwei Signale der antigenpräsentierenden Zelle notwendig: 1. die Bindung des über MHC präsentierten Antigens an den T-Zell-Rezeptor und 2. die Bindung eines kostimulatorischen Moleküls (CD80 oder 86) an den CD28-Rezeptor auf der T-Zelle. Die aktivierten T-Zellen migrieren dann als Effektorzellen in das periphere Gewebe um ihre Funktion in der Bekämpfung der Infektion auszufüllen (Janeway, 2005).

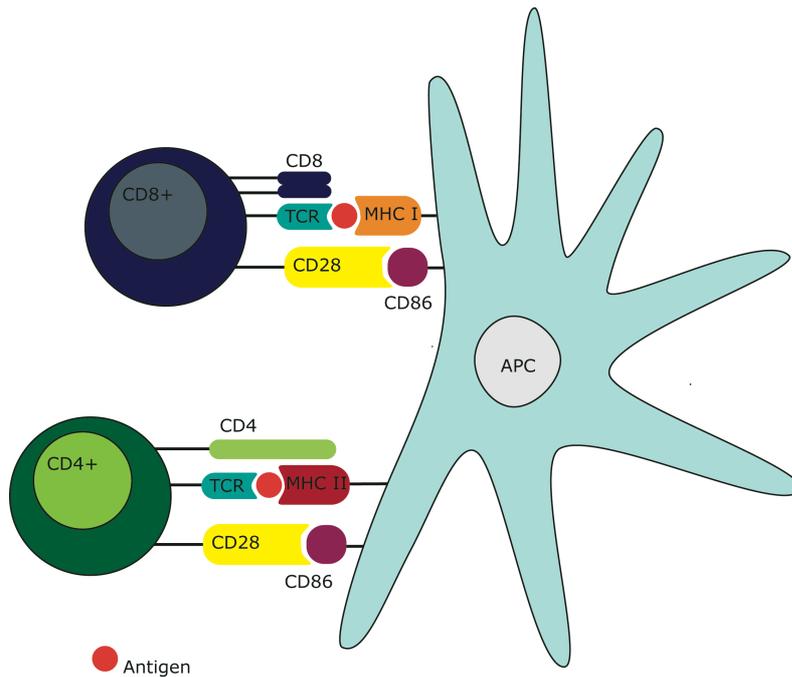
Dendritische Zellen sind keine homogene Gruppe von Zellen, sondern vielmehr eine Vielfalt verschiedener Subtypen, die in ihrer Verteilung in Geweben, der Erkennung von Antigenen sowie in ihrer Funktion variieren. Man unterteilt vor allem in B220<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> CD11c<sup>low</sup> plasmazytoide und CD11c<sup>+</sup> myeloische DCs (pDCs und mDCs). Plasmazytoide DCs sind lymphatischen Ursprungs und haben bevor sie maturieren einen den Plasmazellen ähnlichen äußeren Aspekt, ihnen fehlen die namensgebenden Zellausläufer. Schon vor ihrer Einordnung als dendritische Zellen waren sie als natürliche Interferonproduzierende Zellen bekannt. Dieser Name spiegelt ihre Funktionalität wieder: nach Erkennung eines Virus produzieren pDCs extensiv Typ-I-Interferone (Siegal, 1999). Nach Antigenkontakt reifen sie aber wie die konventionellen DCs und wandern in die Lymphknoten. Myeloische DCs, manchmal auch konventionelle DCs (cDCs) genannt, sind dagegen myeloischen Ursprungs und sezernieren nach Aktivierung hauptsächlich IL-12. Von großer Bedeutung für die Funktion der DCs ist die Erkennung von Pathogenen. Dies geschieht über Mustererkennungsrezeptoren, die definierte molekulare Strukturen von Pathogenen detektieren. Diese Rezeptoren werden im Abschnitt 1.1.2. genauer besprochen.

### 1.1.1.3. Zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Diese Zellen gehören als einzige der hier genauer besprochenen Zellen dem adaptiven Teil des Immunsystems an. T-Zellen unterscheiden sich grundsätzlich in CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Letztere teilen sich im Zuge ihrer Aktivierung weiter auf in T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>) vom Typ T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 oder T<sub>H</sub>17 (Mosmann, 1986; Harrington, 2006; Weaver, 2006), deren Aufgabe es ist andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren und zu unterstützen. Dies geschieht hauptsächlich durch die Sekretion von Zytokinen. T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützen die zelluläre Immunität durch die Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$  (T<sub>H</sub>1-Zytokine). T<sub>H</sub>2-Zellen verstärken die humorale Immunität. Sie sezernieren IL-4, -5, -6, -10 und -13 (T<sub>H</sub>2-Zytokine). Diese regen B-Zellen zur Produktion von neutralisierenden Antikörpern, vor allem IgM, IgA und IgG, an und verstärken Allergien. T<sub>H</sub>17, seit 2006 als neueste Subspezies der T-Helfer-Zellen bekannt, produzieren IL-6, -17, -21, -22 (Korn, 2009). Sie werden für die Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankung, wie der Multiplen Sklerose (Korn, 2008), Rheumatoider Arthritis (Leipe, 2009) und Morbus Crohn (Brand, 2009) mitverantwortlich gemacht.

Im Gegensatz dazu erkennen zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen antigenspezifisch infizierte oder veränderte Zellen und eliminieren diese. Sie teilen dabei die Mechanismen die zur Elimination einer Zielzelle führen, ihre zytotoxische Funktion, mit den NK-Zellen.

Gleichzeitig verläuft ihr Erkennungs- und Aktivierungsprozess komplementär zu den NK-Zellen. Naive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zirkulieren wie alle naiven T-Zellen durch die Blutbahn und das lymphatische System. In den Lymphknoten treffen sie auf die professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen binden sie an die reifen dendritischen Zellen, die über MHC-I Antigene präsentieren. Erkennt eine T-Zelle das Antigen, das zu ihrem T-Zell-Rezeptor passt, geht sie einen engen Kontakt mit der antigenpräsentierenden Zelle ein. Um aktiviert zu werden, benötigt die T-Zelle aber noch ein zweites kostimulatorisches Signal. Die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen sind CD80 und CD86. Der Rezeptor für diese beiden Moleküle auf der T-Zelle ist CD28. Kommen also diese beiden Signale, die Erkennung ihres spezifischen Antigens durch den T-Zell-Rezeptor (1) und die Bindung von CD80 oder CD86 an CD28 (2) zusammen, proliferieren die naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch klonale Expansion und differenzieren sich in zytotoxischen Effektorzellen. Das Fehlen eines kostimulatorischen Signales führt hingegen zu einem Zustand der Unansprechbarkeit der T-Zelle (Schwartz, 2003). Der Vorgang der Aktivierung verläuft für CD4<sup>+</sup>-Zellen analog zu der Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen. Ein wesentlicher Unterschied ist dabei, dass die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor an MHC-Moleküle der Klasse II binden, während CD8<sup>+</sup>-Zellen MHC-Moleküle der Klasse I binden. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen also nur Antigene, die ihnen von professionellen APCs präsentiert werden, während die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen jede Körperzelle erfassen können. Die aktivierten Zellen verlassen nun den Lymphknoten in die Blutbahn, von wo aus sie an den Ort der Infektion gelangen. Kommt es jetzt zum Kontakt mit einem über MHC-I präsentierten Antigen auf einer Zielzelle eliminieren sie diese ohne weitere kostimulatorische Signale zu benötigen. Die Mechanismen sind dabei die gleichen, die auch natürliche Killerzellen benutzen: die Sekretion des zytotoxischen Cocktails aus Perforin, Granzymen und Granulolysin sowie Apoptoseinduktion durch Bindung an den Fas-Rezeptor.



**Abbildung 1.2.:** Aktivierung von  $CD4^+$ - oder  $CD8^+$ -T-Zellen durch eine antigenpräsentierende Zelle: Die  $CD8^+$ -Zelle bindet mit ihrem T-Zell-Rezeptor an den MHC-I-Peptid-Komplex, die  $CD4^+$ -Zelle hingegen an MHC-II. Die Bindung des CD86-Rezeptors an CD28 gibt beiden Zellen das zur Aktivierung nötige kostimulatorische Signal. (APC: antigenpräsentierende Zelle; TCR: T-Zell-Rezeptor)

NK-Zellen und  $CD8^+$ -Zellen ergänzen sich gegenseitig im Bezug auf ihre Erkennung von MHC-I-Molekülen. Exprimiert eine Zelle über MHC-I fremde Peptide so wird sie von  $CD8^+$ -T-Zellen erkannt und eliminiert. Exprimiert sie kein MHC-I, entgeht sie damit zwar den zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Zellen, da aber auch das inhibitorische Signal an die NK-Zellen wegfällt, können diese sie angreifen.

### 1.1.2. Toll-like-Rezeptoren

Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition*-Rezeptoren, PRR) fungieren als Sensoren des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen hoch-konservierte molekulare Strukturen von pathogenen Mikroorganismen. Das sind meist für die Eindringlinge essentielle Strukturen wie Bestandteile der Zellwand (Lipopolysaccharid, LPS und Muramyldipeptid, MDP) oder des Genoms, also Nukleinsäuren. Diese werden als *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP bezeichnet. Mittlerweile wurden verschiedene Klassen dieser Rezeptoren beschrieben, die sich sowohl in ihrer Expression,

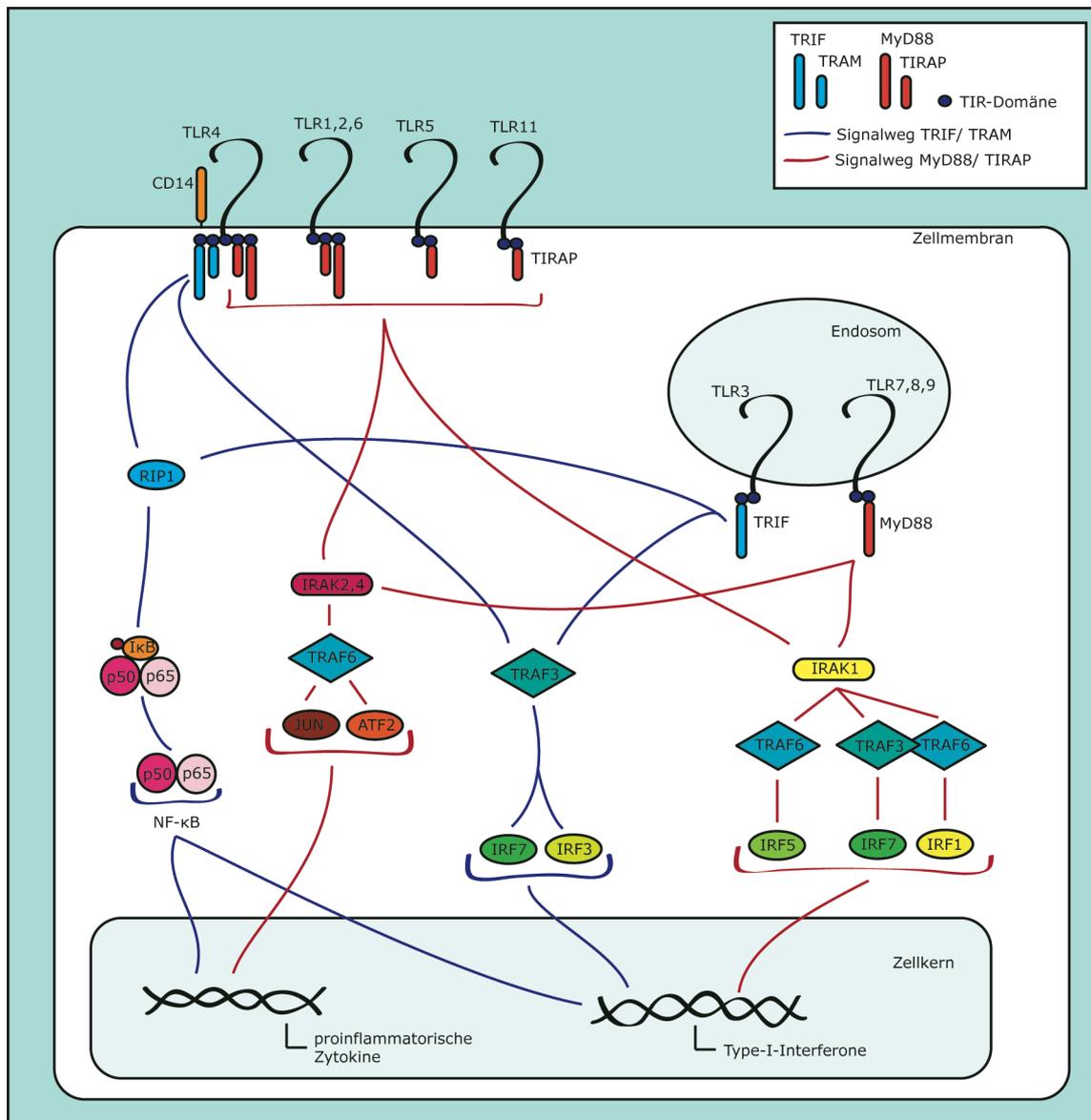
nicht nur auf Zellen des Immunsystems, als auch in ihrer zellulären Lokalisation unterscheiden. Dazu gehören die *NOD-like*-Rezeptoren (NLRs), die zytosolischen *RIG-I-like*-Rezeptoren und die wohl am besten charakterisierten Mustererkennungsrezeptoren, die membranständigen *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs). Diese hochkonservierten Rezeptoren wurden zuerst bei *Drosophila melanogaster* während entwicklungsbiologischer Untersuchungen entdeckt. Das Toll-Protein trägt in den Embryonen der Fruchtfliege zur Entwicklung der ventral-dorsalen Achse bei. Zufällig wurde entdeckt, dass erwachsene Fruchtfliegen mit einer Mutation im Gen des Toll-Proteins einen Immundefekt haben und dadurch besonders anfällig für Infektionen durch Pilze sind (Lemaitre, 1996). Medzhitov et al. charakterisierten kurz darauf den ersten humanen *Toll-like*-Rezeptor (Medzhitov, 1997).

Erkennung eines Liganden durch einen TLR resultiert in einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems. Dies beinhaltet die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und der Reifung und Migration von dendritischen Zellen. In Tabelle 1.3. ist eine Auflistung der heute bekannten TLRs mit ihrer Lokalisation und ihren Liganden zu sehen. Für die experimentelle Arbeit mit Mäusen ist zu beachten, dass sich das Expressionsmuster der Rezeptoren im murinen und humanen System teilweise unterscheidet. So wird TLR7 und -8 zwar im Menschen und in der Maus exprimiert, der murine TLR8 gilt aber als unfunktionell. TLR9 wird in der Maus auf myeloischen und plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert, im Menschen dagegen nur auf plasmazytoiden dendritischen Zellen sowie B-Zellen. Dies gilt auch für TLR7, der im Menschen auch nur auf pDCs beschränkt ist. Da jedoch TLR8 im Menschen auf mDCs exprimiert wird, haben TLR7 und -8 zusammen genommen im Menschen eine größere Ausbreitung und Bedeutung als TLR9.

Rezeptor	Lokalisation	Liganden	Referenz
TLR1	Zelloberfläche	Mit TLR2 assoziiert	
TLR2	Zelloberfläche	LTA, LPS (Gram-pos. Bakterien)	(Takeuchi, 1999)
		Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub> , Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	
		Zymosan (Hefen)	(Ozinsky, 2000)
		MALP-2 (Mykoplasmen)	(Takeuchi, 2000)
TLR3	Endosom	Virale dsRNA	(Alexopoulou, 2001)
TLR4	Zelloberfläche	LPS (Gram-neg. Bakterien)	(Poltorak, 1998)
TLR5	Zelloberfläche	Flagellin (Gram-neg. Bakterien)	(Hayashi, 2001)
TLR6	Zelloberfläche	Mit TLR2 assoziiert	
TLR7 & TLR8	Endosom	Virale ssRNA	(Diebold, 2004; Heil, 2004)
		Imidazoquinoline	(Hemmi, 2002; Jurk, 2002)
		Synthetische RNA	(Hornung, 2005)
		RNA-Immunglobulin-Komplexe	(Vollmer, 2005)
TLR9	Endosom	Virales oder bakterielles CpG	(Hemmi, 2000)
		DNA-Immunglobulin-Komplexe	
TLR10 (nur human)		Nicht bekannt	
TLR11 (murin und human, unfunktionell im Menschen)	Zelloberfläche	Profilin (uropathogene E. coli, Toxoplasma gondii)	(Zhang, 2004; Yarovinsky, 2005)
TLR12 (nur murin)		Nicht bekannt	
TLR13 (nur murin)		Nicht bekannt	

**Tabelle 1.3.:** Toll-like-Rezeptoren mit ihrer Lokalisation und ihren natürlichen und synthetischen Liganden. (LPS: Lipopolysaccharid; LTA: Lipoteichonsäure; MALP-2: *macrophage-activating lipopeptide 2* )

In Abbildung 1.3. sind die verschiedenen TLRs und ihre Signalwege dargestellt (Fitzgerald, 2008). Alle TLRs bis auf TLR3 rekrutieren das Adaptorprotein MyD88. TLR3 signalisiert stattdessen über TRIF, wohingegen TLR4 als einziger TLR sowohl die MyD88- als auch die TRIF-Signalkaskade aktiviert. Das Ergebnis der dann in Gang gesetzten Signalkaskaden unterscheidet sich je nach Adaptormolekül, am Ende steht jedoch in beiden Fällen die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und IRF 1, 3, 5 und 7 (*interferon-regulatory factors*) und eine erhöhte Produktion der Typ-1-Interferone sowie proinflammatorischer Zytokine.



**Abbildung 1.3.:** TLR-Rezeptoren und ihrer Signalwege. (ATF2: *activating transcription factor 2*; IRAK: *IL-1 receptor-associated kinase*; IRF: *Interferon-regulatory factor*; MyD88: *myeloid differentiation primary response protein 88*; NF- $\kappa$ B: *nuclear factor- $\kappa$ B*; TIR: *Toll/IL-1 receptor*;

TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*; auch bekannt als TICAM2; TIRAP: *TIR domain-containing adaptor protein*; TRIF: *TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$* , auch bekannt als TICAM1)

Die Existenz von Rezeptoren, die Nukleinsäuren erkennen, ist ein zweischneidiges Schwert. Fehlerkennung von körpereigenen Nukleinsäuren kann zu gegen sich selbst gerichteten Entzündungen führen. In der Tat werden mittlerweile immer mehr Zusammenhänge zwischen zahlreichen Autoimmunerkrankungen und der Bindung von körpereigenen Nukleinsäuren an *Toll-like*-Rezeptoren gefunden (Marshak-Rothstein, 2006). Die in diesem Zusammenhang am besten studierten Mechanismen sind wohl die zu systemischen Lupus erythematoses führenden pathogenetischen Abläufe. Bei dieser Erkrankung findet man Autoantikörper die an körpereigene DNA binden. Man geht davon aus, dass die DNA enthaltenden Immunkomplexe von TLR9 erkannt werden und plasmazytoide dendritische Zellen zur Produktion von TNF- und IFN- $\gamma$  anregen (Means, 2005). Analog kann es auch zur Erkennung von RNA-enthaltenden Immunkomplexen durch TLR7 kommen (Rahman, 2006).

### 1.1.3. TLR7-Liganden

#### 1.1.3.1. Imidazoquinoline

Die Imidazoquinoline sind Nukleosidanaloga, die schon seit Ende der achtziger Jahre als kleinmolekulare antivirale Komponenten (Chen, 1988) bekannt sind. Aufgrund ihrer immunmodulatorischen Wirkung und der Stimulierung der Zytokinsekretion (Harrison, 1994; Weeks, 1994; Miller, 1999) benannte man sie *immune response modifiers*. Der dahinterstehende Mechanismus war allerdings lange Zeit unbekannt. Erst 2002 beschrieben Hemmi et al. dann die Imidazoquinoline Imiquimod (R-873) und Resiquimod (R-848) als Liganden des murinen TLR7 (Hemmi, Kaisho et al., 2002). Kurz darauf konnten Jurk et al. zeigen, dass es sich bei R-848 um einen Liganden von humanem TLR7 und TLR8 mit stärkerem Potential zur Immunaktivierung als Imiquimod handelt (Jurk, Heil et al., 2002). Seit kurzem gibt es weitere Mitglieder *immune response modifiers*, die entweder selektiv TLR7 (CL097/ 3M-001), TLR8 (CL075/ 3M-002) oder beide (3M-003) stimulieren (Gorden, 2005).

Imiquimod wird seit 1998 unter dem Handelsnamen Aldara<sup>®</sup> in einer 5% Formulierung als Creme zur topischen Therapie von Condyloma acuminata, seit wenigen Jahren auch zur Therapie der aktinischen Keratose und früher Stadien des Basalzellkarzinoms

eingesetzt. Für Resiquimod ist die Zulassung für die Therapie lokaler Herpes-Infektionen zu erwarten.

### 1.1.3.2. Einzelsträngige RNA

Der natürliche Ligand für TLR7 und TLR8 ist einzelsträngige RNA (ssRNA) verschiedener Viren wie z.B. des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), des *vesicular stomatitis*-Virus (VSV) und des Influenzavirus. Entscheidend für die Erkennung scheint dabei unter anderem der Guanosin- und Uridin-Gehalt der RNA-Oligonukleotide zu sein (Diebold, Kaisho et al., 2004; Heil, Hemmi et al., 2004; Lund, 2004).

Die Erkennung von Viren durch das Immunsystem ist ein komplexer Vorgang. Viren sind im Gegensatz zu Bakterien oder Parasiten relativ einfach strukturiert. Sie bestehen zum Großteil aus ihrem genetischen Material (DNA oder RNA), den für den Einbau in das Wirtsgenom nötigen Enzymen sowie einigen Hüllproteinen. Dies unterscheidet sie von anderen Pathogenen, die eine Reihe von Molekülen mit sich bringen, die einzigartig für ein bestimmtes Pathogen sind und die natürlicherweise nicht im Säugetierorganismus vorkommen, wie z.B. LPS oder Flagellin. Viren kapern die Zelle ihres Wirtes und nutzen deren zelluläre Maschinerie und Stoffwechsel für ihre eigenen Zwecke, also die Transkription der Erbinformation und der Produktion viraler Proteine. Die dabei entstehenden Nucleinsäuren und Proteine sind, da sie durch den menschlichen Organismus hergestellt werden, nur schwer von körpereigenen Molekülen zu unterscheiden. Die Erkennung von Viren durch das Immunsystem beruht vor allem auf zwei Mechanismen: Bindung an (1) zytosolische Rezeptoren für Nucleinsäuren mit virentypischen Merkmalen (*RIG-I-like*-Rezeptoren) oder (2) durch Rezeptoren für Nucleinsäuren an für „Selbst-RNA“ untypischen Lokalisationen wie der Zelloberfläche oder dem Endosom (TLR3, -7, -8 und -9) (Hornung, 2006).

### 1.1.3.3. Synthetische immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide

Seit 2005 weiß man, dass siRNA sequenzspezifisch eine Aktivierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) über *Toll-like*-Rezeptor 7 hervorrufen kann (Hornung, Guenther-Biller et al., 2005). RNA-Fragmente, die ein solches immunstimulatorisches Motiv enthalten werden als immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide bezeichnet. Die von Hornung und Kollegen beschriebenen Oligonukleotide sind mindestens 19 Basen lang und tragen in ihrer Mitte das 9 Basen lange immunstimulatorische Motiv 5'-GUCCUCAA-

3'. Auch für die immunstimulatorischen Oligonukleotide gilt, wie schon bei dem natürlichen Liganden ssRNA beschrieben, dass die RNA Guanosin- und Uridin-reich sein sollte.

Wir konnten im letzten Jahr beweisen, dass mit immunstimulatorischer RNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine antigenspezifische Immunantwort des angeborenen Immunsystems generiert werden kann. Diese zeigt sich durch die Proliferation von antigenspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die Sekretion von T<sub>H</sub>1-typischen Zytokinen wie IL-6 und IL-12 sowie INF- $\gamma$  (Bourquin, 2007). Zugleich konnten wir auch eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen beobachten.

## 1.2. Immuntherapie von Tumoren

### 1.2.1. Grundlagen der Tumorummunologie

Vermutlich entstehen in unserem Körper häufig entartete Zellen. Doch nicht aus jeder einzelnen dieser veränderten Zellen entsteht ein Malignom. Die Theorie der Immunüberwachung (engl. *immunosurveillance*) besagt, dass unser Immunsystem nicht nur Pathogene sondern auch entartete Zellen erkennen und zerstören kann. Wenn dies nicht funktioniert, dann kann sich eine entartete Zelle vermehren und Krebs entsteht. Neoplasien entwickeln vielfältige Mechanismen, um sich vor der Erkennung durch das Immunsystem zu tarnen (engl. *immune escape*). Oft verbirgt sich entartetes Gewebe beispielsweise unter einer dichten Schicht von nicht-immunogenem extrazellulärem Material und entgeht damit der Erkennung durch Immunzellen. Irgendwann kann der Tumor diese Kapsel sprengen, aber dann ist die Anzahl der entarteten Zellen meistens schon zu groß um noch erfolgreich eliminiert zu werden. Tumorzellen zeigen weiterhin eine erniedrigte Expression von MHC-I und tumorspezifischen Antigenen, was sie vor dem Angriff durch zytotoxische T-Zellen schützt. Sie sezernieren immunsuppressive Zytokine (IL-10, TGF- $\beta$ ) und einen löslichen FAS-Liganden, der Lymphozyten durch Bindung an deren Fas-Rezeptor zur Apoptose führt (Houston, 2003; Teicher, 2007). Ein weiteres Charakteristikum von Krebszellen ist, dass sie schnell proliferieren und eine hohe Rate an Neumutationen aufweisen, sodass ständig neue Varianten entstehen. Die darwinschen Mechanismen der Selektion gelten auch für Malignome: das „*survival of the fittest*“ führt zwangsläufig zur Bildung von resistenten Tumorzellen. Damit seien nur einige der Strategien genannt, mit denen ein Tumor dem Abwehrsystem entgehen kann.

### 1.2.2. Definition der Immuntherapie und ihre historischer Entwicklung

Das Ziel der Immuntherapie ist die Eradizierung eines Tumors durch das Immunsystems. Um dies zu erreichen versucht man das Immunsystem in seiner Funktion, entartete Zellen aufzuspüren und zu vernichten, zu unterstützen. Das Arsenal der dabei verwendeten Mittel ist groß: Antikörper, immunstimulatorische Moleküle, Zytokine, Zelltransfer und Vakzinierung. Der große Vorteil der Immuntherapie ist, dass sie selektiv gegen maligne Zellen gerichtet ist und gesundes Gewebe, im Gegenteil zur Chemo- oder Radiotherapie, schont.

Schon seit langem gab es Berichte über an Krebs erkrankte Patienten, bei denen nach einer überstandenen Infektionserkrankung auch der Krebs verschwand. Die Ägypter behandelten Geschwulste durch die Inokkulation verschiedener Substanzen in den Tumor mit nachfolgender Entzündungsreaktion. Friedrich Fehleisen, der 1882 in Würzburg *Streptokokkus pyogenes* als Erreger des Erysipels identifizierte, berichtete über Tumorregressionen und Heilungen von Krebspatienten nach einer induzierten Erysipelinfektion (Fehleisen, 1882; Fehleisen, 1883). Der New Yorker Chirurg William B. Coley war ab 1893 der Erste, der diesem systematisch nachging und Patienten mit inoperablen Sarkomen durch die intratumorale Injektion einer Mischung aus hitzeinaktivierten *S. pyogenes* und *Serratia marcescens* zu heilen versuchte (Coley, 1896). Er erzielte erstaunliche Ergebnisse mit bis zu 10% Langzeitheilungsraten. Ein weiteres Dokument der frühen Immuntherapie von Tumoren findet sich in einer Rede von Paul Ehrlich, die er 1908 an der Amsterdamer Universität hielt. Er beschreibt darin seine Versuche, in Mäusen durch wiederholte Injektionen von attenuierten Tumorbestandteilen eine prophylaktische Immunität gegen die spätere Implantation eines Tumors hervorzurufen (Ehrlich, 1909). Die von Coley verwendete Mixtur wurde als Coley's Toxin bekannt und bis 1952 vermarktet, seine Erkenntnisse gerieten aber nach seinem Tod, auch durch die ersten Erfolge der Strahlentherapie und der verbesserten Chemotherapie, rasch in Vergessenheit. Erst in den letzten Jahren gewannen sie wieder an Bedeutung und die dahinter stehenden Mechanismen werden heute besser verstanden. Die Bakterien oder ihre Bestandteile aktivieren das Immunsystem über die Erkennung durch Mustererkennungsrezeptoren, wie den TLRs, und die daraufhin entstehende Immunreaktion führt dazu, dass der Körper den Tumor erkennt und angreifen kann. Tumoren sind in der Lage das Immunsystem zu unterdrücken, Toleranz zu induzieren und so einem Angriff zu entgehen. Coley hatte eine Möglichkeit entdeckt, das Immunsystem aus seiner Anergie zu befreien (Starnes, 1992; Wiemann, 1994).

### 1.2.3. Aktueller Stand der Tumorimmuntherapie

In der modernen Immuntherapie gibt es verschiedene Ansätze, die Erkennung eines Tumors und dessen Eradizierung zu verstärken. Man unterscheidet dabei zwischen aktiven und passiven Methoden. Letztere umfassen den Einsatz von gegen Tumorassoziierte Antigene gerichteten monoklonalen Antikörpern, die Behandlung mit Immunmodulatoren und Adjuvanzen sowie adoptiven T-Zell-Transfer. Aktive Immuntherapie bedeutet, dass man das Immunsystem befähigt sich selbst zu wehren, darunter wird im Allgemeinen eine Vakzinierung verstanden.

### 1.2.4. Tumorantigene

Mit dem Begriff Tumorantigene meint man im Allgemeinen tumorassoziierte Antigene (TAA), also solche Antigene die in entartetem und gesundem Gewebe vorhanden sind, jedoch im Tumor verstärkt exprimiert werden. Zu unterscheiden sind tumorspezifische Antigene (TSA), wenn nur der Tumor das Antigen, z.B. ein mutiertes Protein trägt. Die tumorassoziierten Antigene sind als Zielobjekt für die meisten Ansätze zur Immuntherapie von Bedeutung. Monoklonale Antikörper sind gegen sie gerichtet, beim adoptiven Transfer werden TAA-spezifische T-Zellen transfundiert und Adjuvanzen zielen darauf ab, die Immunreaktion gegen TAAs zu erhöhen.

#### 1.2.4.1. Monoklonale Antikörper

Die erfolgreichste Strategie zur Immuntherapie mit dem bisher breitesten klinischen Einsatz sind monoklonale Antikörper, deren Produktion erst durch die Entwicklung der Hybridoma-Technik ermöglicht wurde (Kohler, 1975). In Tabelle 1.5. findet sich eine Auflistung einiger relevanter monoklonaler Antikörper, die zur Immuntherapie von Tumoren verwendet werden.

Name	Handelsname	Antigen	Erkrankung	Referenz
Rituximab	MabThera <sup>®</sup>	CD20	Non Hodgkin Lymphom	(Maloney, 1997)
Trastuzumab	Herceptin <sup>®</sup>	HER-2/ erbB2	Brustkrebs	(Hudis, 2007)
Cetuximab	Erbix <sup>®</sup>	EGFR	Kolorektales Karzinom, Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Hals-Bereich	(Jonker, 2007)
Bevacizumab	Avastin <sup>®</sup>	VEGF	Metastasiertes kolorektales Karzinom	(Hurwitz, 2004)

**Tabelle 1.4.:** Auflistung von relevanten monoklonalen Antikörpern inkl. Handelsnamen in der Immuntherapie von Tumoren und ihre jeweiligen Anwendungsgebiete

Die Mechanismen, welche zu einer antitumoralen Aktivität der Antikörper führen, sind vielfältig und nur teilweise verstanden. Unter anderem können Antikörper zur Komplement-vermittelten Zellyse führen und über die Bindung an Fc-Rezeptoren auf Immunzellen Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) einleiten (King, 2008; Dougan, 2009). Die Anwendung von monoklonalen Antikörpern ist limitiert durch die Beschränkung ihrer Wirkung auf Moleküle auf der Zelloberfläche und die fehlende Ausbildung einer Langzeitimmunität.

#### 1.2.4.2. Zytokine

Die therapeutische Wirkung von Interferonen und IL-2, einem potenten Proliferationsstimulus für Lymphozyten, wurde in einigen großen Studien untersucht, die Ergebnisse waren nicht besonders erfolgreich. Für IFN- $\alpha$  konnte lediglich für die Therapie von Hochrisikopatienten mit Malignem Melanom ein Überlebensvorteil bewiesen werden (Grob, 1998). Weiterhin wird es auch in der Therapie der Haarzelleukämie, einem seltenen B-Zell-Lymphom, verwendet (Golomb, 2008).

#### 1.2.4.3. Adjuvanzen

In der Immunologie wird unter einem Adjuvans ein Stoff verstanden, der bei Impfungen eingesetzt wird, um die Immunantwort zu potenzieren ohne selbst ein Antigen zu sein. Adjuvanzen haben die Fähigkeit, dem Körper Gefahr zu signalisieren und so durch heute

noch nicht vollständig verstandene Mechanismen die Immunzellen zu unterstützen. Das klassische experimentelle Adjuvans ist das komplette Freund-Adjuvans (KFA), eine Wasser-in-Öl-Emulsion die hitzeinaktivierte Mykobakterien enthält. Aufgrund ihrer starken Aktivierung des Immunsystems können theoretisch alle TLR-Liganden als Adjuvanzen verwendet werden. Adjuvanzen können nicht nur zur Verstärkung von Vakzinen sondern auch als Einzelsubstanzen in der Tumorthherapie verwendet werden. Wie schon unter 1.1.3.1. erwähnt wird der TLR7-Ligand Imiquimod (Aldara®) erfolgreich zur topischen Therapie von Baszellkarzinom eingesetzt. Ein weiteres Adjuvans, das in der Krebstherapie eingesetzt wird ist Bacillus Calmette-Guérin (BCG), ein heute nicht mehr zur Impfung verwendeter Tuberkulose-Lebendimpfstoff aus attenuierten Tuberkelbakterien. BCG wird zur intravesikalen Rezidivprophylaxe des Blasenkarzinoms im Stadium pTa bis pT1 nach lokaler Tumorabtragung in die Blase instilliert (Lamm, 1991).

#### 1.2.4.4. Adoptiver T-Zelltransfer

Der adoptive Transfer von *in vitro* expandierten CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Lymphdepletion der Patienten zeigt gute Erfolge in der Therapie des metastasierten Malignen Melanoms. Diese Zellen entstammen entweder reseziertem Tumorgewebe (*tumor infiltrating lymphocytes*) oder dem peripheren Blut des Patienten (Dudley, 2002). Ein neuer Ansatz ist die Generierung tumorspezifischer T-Zellen durch Gentransfer für den T-Zell-Rezeptor (Johnson, 2009).

#### 1.2.4.5. Aktive Immuntherapie: Therapeutische Tumorstoffe

Das Ziel einer therapeutischen Tumorstoffung ist es, eine lang anhaltende Immunreaktion des Körpers gegen den Tumor zu etablieren. Es gibt verschiedene Ansätze dies zu erreichen:

1. Antigen-spezifische Vakzine, die ein einzelnes Tumorstoff zusammen mit Adjuvanzen enthalten.
2. Impfungen mit abgetöteten ganzen Tumorstoffen zusammen mit Zytokinen oder Adjuvanzen.
3. Reinfusionen von *ex vivo* mit Tumorstoffen kokultivierten dendritischen Zellen.

Trotz vielversprechender Vorergebnisse konnten in den bisherigen Phase-III-Studien keine durchschlagenden Erfolge durch die verschiedenen Vakzine erzielt werden. Die Ergebnisse einiger aktueller Studien sind in einem Übersichtsartikel von Finke et al. exzellent zusammengefasst (Finke, 2007). Man muss aber bedenken, dass neue Therapieformen meist in metastasierten Stadien experimentell angewandt werden und die Vakzine somit die schon bestehende Immuntoleranz durchbrechen müssen (Finn, 2008; Dougan and Dranoff, 2009).

### 1.3. Trägermaterialien für Nukleinsäuren

Verschiedenste Typen von Nukleinsäuren werden zur therapeutischen Anwendung im Menschen erforscht. Dazu gehören Oligonukleotide wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotide oder CpG-DNA, aber auch siRNA, miRNA, Aptamere, sowie - in der experimentellen Gentherapie - längere Nukleotidsequenzen. Deren Anwendung stehen vor allem zwei Hindernisse entgegen.

1. In der extrazellulären Flüssigkeit befinden sich Nukleasen, welche freie DNA und RNA abbauen. Dabei wird die Phosphodiesterbindung zwischen der Zuckerkette und dem Nukleotid gespalten. Der enzymatische Abbau betrifft vor allem RNA, aber auch DNA. In einigen Studien zur Gentherapie wurden freie Sequenzen ungeschützt direkt in das Zielgewebe injiziert (Wolff, 1990; Shi, 2002), dies ist jedoch nur bei einfach erreichbaren Geweben wie der Haut und Muskeln möglich. Bei der systemischen Verwendung kommt es immer zu einer mehr oder minder starken Degradation. Neben der Verwendung eines schützenden Transportsystems wird zusätzlich versucht, das Rückgrat der Nukleinsäuren durch verschiedene chemische Modifikationen zu stabilisieren. So verfügen die hier verwendeten RNA-Oligonukleotide über eine Phosphothioesterbindung (PTO) zwischen Zuckerrückgrat und Nukleotiden (Campbell, 1990). Wir konnten in vorherigen Arbeiten bereits zeigen, dass sich dadurch die Effizienz der Immunstimulation erhöhen lässt (Bourquin et al., 2007). Ein weiteres Beispiel einer Rückgratmodifikation sind mit der *locked-nucleic-acid*-Technik (LNA-Technik) geschützte Nukleinsäuren. Hierbei handelt es sich um ein bizyklisches Furanosemolekül, welches die Ribose ersetzt (Vester, 2004). Solche Modifikationen reichen jedoch nicht aus, um Nukleinsäuren vollständig vor dem enzymatischen Abbau zu bewahren.

2. Ein weiteres Problem bei der Anwendung von Nukleinsäuren ist die Überwindung der hydrophoben Plasmamembran durch die polyanionischen hydrophilen Makromoleküle.

Um diese natürliche Barriere zu überwinden besteht die Möglichkeit die Nukleinsäuren durch physikalische Methoden wie die Elektroporation oder das Beschießen einer Zelle mit DNA-beladenen Partikeln (*gene gun*) in die Zellen zu transportieren. Dies ist jedoch nur für *In-vitro*-Applikationen denkbar.

Um Nukleinsäuren therapeutisch im Menschen verwenden zu können, wurden deshalb Trägersysteme entwickelt. Ein ideales Trägermaterial vereint dabei folgende Eigenschaften:

1. Schutz der Nukleinsäure vor Degradation durch Nukleasen im extrazellulären Raum.
2. Transport der Nukleinsäure in die Zelle.
3. Erreichen eines anvisierten Zielorganells, z.B. des Zellkerns in der Gentherapie, des Endosoms für Stimulation von TLR7/8 (*intracellular targeting*).
4. Geringe Toxizität

Für die *In-vivo*-Applikation von therapeutischen Nukleinsäuren werden virale oder nicht virale Vektoren verwendet. Virale Vektoren werden hauptsächlich in der Gentherapie eingesetzt. Dabei werden Viren (z.B. Retroviren, Adenoviren) so verändert, dass sie zwar in eine Zelle eindringen können, sich aber nicht mehr replizieren können. Diese Methode wird Transduktion genannt, analog der Übertragung von genetischem Material zwischen Bakterien durch Bakteriophagen. Hierbei kann eine DNA-Sequenz fest in das Genom des Wirts integriert werden. Virale Vektoren können durch die Induktion einer Immunantwort, sowie durch ihr onkogenes Potential (*insertional mutagenesis*) erhebliche, bisweilen tödliche Nebenwirkungen mit sich bringen (Hartman, 2008; Sarkis, 2008; Romano, 2009). Ihre Verwendung ist dadurch auf Bereiche limitiert, in denen die stabile, langjährige Insertion in das Genom von Bedeutung ist.

Die Verwendung von nicht-viralen Vektoren zur zellulären Lieferung von Nukleinsäuren wird Transfektion genannt. Hierbei kommt es nicht zu einer Insertion der DNA-/RNA-Sequenz ins Genom. Die wichtigsten Vertreter der nicht-viralen Vektoren sind die kationischen Lipide oder kationischen Polymere. Beide vermögen durch elektrostatische Wechselwirkungen die anionischen Nukleinsäuren zu binden. Es entstehen so entweder Lipoplexe oder Polyplexe, beides Komplexe welche die Nukleinsäuren einschließen. Sowohl Lipoplexe als auch Polyplexe zeigen jedoch toxische Nebenwirkungen, was ihre Verwendung *in vivo* limitiert. Die Toxizität entsteht dabei hauptsächlich durch die positive Ladung. Schon *in vitro* wird das Schrumpfen von Zellen, eine reduzierte Mitoserate und

Vakuolisierung des Zellinneren beobachtet (Lv, 2006). Ein Hauptmechanismus ist dabei die Inhibierung der Proteinkinase C, die eine tragende Rolle in der Signaltransduktion und Zellproliferation spielt. *In vivo* kommt es weiterhin zur Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems sowie Mikroembolisationen (Filion, 1997; Morille, 2008).

## 2. Fragestellung

Synthetische immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide sind neue TLR7-/8-Agonisten. Es wurde gezeigt, dass sie sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* eine starke Wirkung auf das adaptive wie angeborene Immunsystem, im Speziellen von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen entfalten. Sie erscheinen daher als vielversprechende neue Adjuvantien in der Immuntherapie von Tumoren, die Anwendung in der Tumorthherapie wurde allerdings noch nicht untersucht. Ihre immunstimulatorische Aktivität *in vivo* wurde außerdem bisher nur in gesunden Tieren untersucht. Da eine Tumorerkrankung jedoch das Immunsystem moduliert und supprimiert, ist der Einfluss der immunstimulatorischen RNA spezifisch in einem erkrankten Organismus noch zu determinieren.

Grundsätzlich ist für die therapeutische Anwendung von RNA eine Trägersubstanz nötig, da die RNA sonst sehr schnell durch im Plasma vorhandene Ribonukleasen enzymatisch degradiert werden kann. Auch wenn es schon einige kommerziell erhältliche Träger für diese Zwecke gibt, sind diese noch nicht optimal geeignet und bringen Nebenwirkungen mit sich. Die Entwicklung verbesserter Trägersubstanzen ist somit ein weiterer wichtiger Schritt für die zukünftige Anwendung von immunstimulatorischer RNA in der Immuntherapie von Tumoren. Nanopartikel aus dem Naturstoff Gelatine sind aufgrund der Tatsache, dass Gelatine schon länger in der Medizin verwendet wird und kaum Nebenwirkungen mit sich bringt ein vielversprechendes Trägermaterial. Es wurde gezeigt, dass ihre Anwendung die immunstimulatorische Wirkung von Oligonukleotiden verstärkt. Es gibt jedoch noch keine Untersuchungen zur Verwendung von Gelatine-Nanopartikeln in der Therapie muriner Tumoren.

In diesem Kontext wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen adressiert:

1. Führt die Applikation von immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotiden in tumortragenden Mäusen zu einer Aktivierung natürlicher Killerzellen?
2. Kann immunstimulatorische RNA das Wachstum muriner Tumore verhindern? Und wenn ja, was sind die dahinter stehenden zellulären Mechanismen?
3. Haben Gelatine-Nanopartikel das Potential zu einer neuen Trägersubstanz für die therapeutische Verwendung von immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotiden?

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte

#### 3.1.1. Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Gefriertruhe (-80°C)	Fa. Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühlschränke(4°C, -20°C)	Fa. Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Luminometer (Mithras LB 940)	Fa. BertholdTechnologies (Bad Wildbad, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
Multifuge 3L-R	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Multifuge 4KR	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Neubauer Zählkammer	Fa. Optik Labor Frischknecht (Balgach, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Schüttler	Fa. NeoLab (Heidelberg, D)
Thermomixer	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Vortex VF2	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5424)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

#### 3.1.2. Chemikalien

Aqua ad injectabilia	Fa. B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Anexate® (Flumazenil)	Fa. Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
Antisedan® (Methyl-4-Hydroxybenzoat)	Fa. Orion Pharma GmbH (Hamburg, D)
Buprenorphin	Fa. DeltaSelect GmbH (München, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DNase	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dormitor® (Medtomidinhydrochlorid)	Fa. Pfizer Pharma (Berlin, D)

---

DOTAP <sup>®</sup> (N-(1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat)	Fa. Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Forene <sup>®</sup> (Isofluran)	Fa. Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke des Klinikum Innenstadt der LMU (München, D)
Kollagenase	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Midazolam	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Naloxon Inresa <sup>®</sup> (Naloxonhydrochlorid)	Fa. Inresa Arzneimittel GmbH (Freiburg, D)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumchlorid (NaCl 0.9%)	Fa. Baxter S. A. (Lessines, B)
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Percoll	Fa. Biochrome (Berlin, D)
PharmLyse (10x) Lysereagenz	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Saponin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Schwefelsäure (2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Sigma fast OPD Tabletten	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
TMB Substrate Reagent Set	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin (10x)	Fa. PAA (Pasching, A)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

### 3.1.3. Reagenziensätze

ELISA-Sets zur Bestimmung von Zytokinen:

IL-6 (murin)	Fa. Biosource (Camarillo, CA, USA)
IL-12p70 (murin)	Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

### 3.1.4. Materialien für die Zellkultur

$\beta$ -Mercaptoethanol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM) high glucose	Fa. PAA (Pasching, A)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS)	Fa. PAA (Pasching, A)
<i>HEPES buffer</i> (Hydroxyethylpiperazinethanschwefelsäure)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Pasching, A)
MEM-NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Natrium-Pyruvat (Na Pyr)	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Pasching, A)
Penicillin	Fa. PAA (Pasching, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Pasching, A)

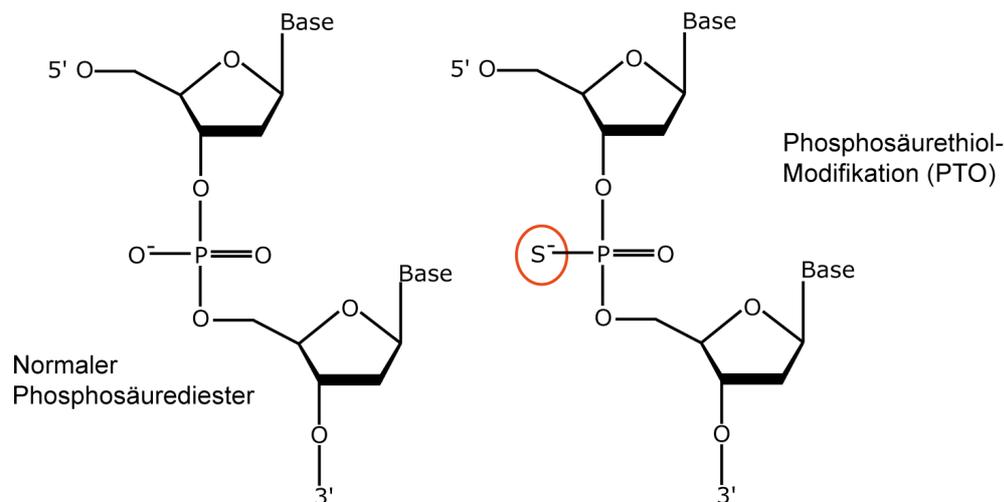
Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, D), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), Gilson (Den Haag, NL) Greiner (Frickhausen, D) bezogen.

### 3.1.5. Gelatine-Nanopartikel

Die Gelatine-Nanopartikel wurden von der Abteilung für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität München hergestellt (Coester, 2000). Die Kationisierung wurde durch die Einführung einer quartären Aminogruppe durch kovalente Bindung von Choleminchlorid Hydrochlorid an die Partikeloberfläche erreicht (Zwiorek, 2005). Die auf diese Art hergestellten kationisierten Partikel wurden mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test endotoxinfrei getestet. Der durchschnittliche Durchmesser der Partikel betrug 272 nm (SD 33,3), der Polydispersitätsindex lag unter 0,1 und das  $\zeta$  Potential lag über 4 mV.

### 3.1.6. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (sowohl RNA als auch DNA) tragen am Zuckerrückgrat eine PTO-Modifikation. Bei der normalen Phosphorsäurediesterbindung die zwei Ribosemoleküle verbindet ist hierbei die Hydroxygruppe durch eine Thiolgruppe ersetzt. Oligonukleotide erhalten dadurch eine größere Resistenz gegen die Degradation durch die meisten Endo- und Exonukleasen.



**Abbildung 3.1.:** Molekulare Darstellung der PTO-Modifikation im Vergleich zum natürlich vorkommenden Phosphorsäurediester

9.2dr-PTO

(5'-UGUCCUUC A AUGUCCUUC A A-3')

PolyA-PTO

CpG-PTO (1826)

(5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3')

Fa. CureVac (Tübingen, D)

Fa. CureVac (Tübingen, D)

Fa. Coley (Langenfeld, D)

### 3.1.7. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen

GM-CSF

Interleukin-4 (IL-4)

Ovalbumin (OVA)

Fa. PeproTech Inc. (NJ, USA)

Fa. PeproTech Inc. (NJ, USA)

Fa. Merck/Calbiochem (Nottingham, GB)

### 3.1.8. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

#### 3.1.8.1. Zellkulturmedien

Splenozytenmedium: RPMI mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin, 1% Natrium-Pyruvat und 1% nicht-essentielle Aminosäuren.

RMA/RMA-S: RPMI mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin, 1% Natrium-Pyruvat und 1% nicht-essentielle Aminosäuren

C26: DMEM mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin

B16-F10: DMEM mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin

B16-F10-OVA: RPMI mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin

#### 3.1.8.2. ELISA-Puffer

*Coating-Puffer A:*  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,083 mol/l +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,13mol/l in  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

*Coating-Puffer B:*  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,05 mol/l +  $\text{NaHCO}_3$  0,05 mol/l in  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

*Standard-Assay-Diluent:* 10% FCS in PBS

*Wasch-Puffer:* 0,05% Tween-20 in PBS

#### 3.1.8.3. FACS-Puffer:

2% FCS in PBS

### 3.1.9. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten FACS-Antikörper:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft
Anti-CD3e	Armenischer Hamster	145-2C11	Fa. BD Biosciences
Anti-CD4	Ratte (DA) IgG2a	κRMA4-5	Fa. BD Biosciences
Anti-CD8a	Ratte (LOU/Ws1/M) IgG2a	κ53-6.7	Fa. BD Biosciences
Anti-CD11c	Armenischer Hamster IgG1a	λ2HL3	Fa. BD Biosciences
Anti-CD45R/B220	Ratte IgG2a	κRA3-6B2	Fa. BD Biosciences
Anti-CD69	Armenischer Hamster IgG1	λ3H1.2F3	Fa. BD Biosciences
Anti-NK1.1	Maus IgG2a	PK136	Fa. BD Biosciences
Isotypen-Kontrollen			Fa. BD Biosciences
Pro5-OVA <sub>257-264</sub> -H2Kb Pentamere	OVA <sub>257-264</sub> -H2Kb		Fa. Proimmune

**Tabelle 3.1.:** Auflistung der verwendeten FACS-Antikörper und des Klons zusammen mit dem verwendeten Isotypen

### 3.1.10. ELISA-Antikörper zur Bestimmung der Immunglobulinsubklasse

Anti-IgG (Polyklonal, *goat anti mouse*) Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA)  
 Anti-IgG1 (Polyklonal, *goat anti mouse*) Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA)  
 Anti-IgG2a (KLH/G2a-1-1) Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA)

### 3.1.11. Antikörper zur Zelldepletion

<b>Antikörper</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Referenz</b>
TM $\beta$ 1	Anti-IL2-Rezeptor- $\beta$ -Kette	(Tanaka, 1991)
RmCD8.2	Anti-CD8	(Mocikat, 1997)

**Tabelle 3.2:** Spezifität der zur Zelldepletion verwendeten monoklonalen Antikörper

Beide Antikörper wurden von Prof. Dr. med. Ralph Mocikat, Institut für molekulare Immunologie des Helmholtz Centers, München zur Verfügung gestellt.

### 3.1.12. Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Referenz</b>
RMA	C57Bl/6	Dr. J. Charo, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin	(Karre, 1986)
RMA-S	C57Bl/6	Dr. J. Charo, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin	(Karre, Ljunggren et al., 1986)
C26	Balb/c	National Cancer Institute (NCI)	(Corbett, 1975)
B16-F10	C57Bl/6	Prof. T. Brocker, Institut für Immunologie, LMU, München	(Fidler, 1975)
B16-F10-OVA	C57Bl/6	Prof. T. Brocker, Institut für Immunologie, LMU, München	(Moore, 1988)

**Tabelle 3.3.:** Verwendete Tumorzelllinien mit Angabe des murinen Hintergrundes und der Bezugsquelle

### 3.1.13. Software

Adobe Creative Suite	Fa. Adobe Systems (San Jose, USA)
CellQuest	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
FlowJo	Fa. Tree Star (Ashland, USA)
Microsoft Office	Fa. Microsoft (Redmond, USA)
SPSS	Fa. SPSS (Chicago, USA)

## 3.2. Zellkultur

### Allgemeine Kulturbedingungen

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

### 3.2.1. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

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

### 3.2.2. Kultivierung der RMA- und RMA-S-Lymphomzellen

Die RMA- und RMA-S-Lymphomzelllinie wurde in T75-T175-Kulturflaschen in RMA-Zellmedium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Alle zwei Tage wurden die Zellen bei 400 g über 7 min abzentrifugiert, mit neuem Medium aufgenommen und 1:5 verdünnt weiterkultiviert.

### 3.2.3. Kultivierung der C26-Kolonkarzinomlinie

Die C26-Kolonkarzinomzelllinie wurde in T75-T175-Kulturflaschen in C26-Zellmedium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Dreimal wöchentlich wurden die adhärennten Zellen nach Abkippen des alten Mediums durch einen Zellscraper vom Flaschenboden gelöst und in PBS aufgenommen. Nach Abzentrifugieren bei 380 g für fünf Minuten wurden die Zellen mit Hilfe einer 20G-Kanüle resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:10 neu ausgesät.

### 3.2.4. Kultivierung der B16- und B16-OVA-Zellen

Die B16-Melanomzelllinie wurde in T75-T175-Kulturflaschen in B16-Zellmedium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Dreimal wöchentlich wurden die adhärennten Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin und mehrmaliges Abspülen vom Flaschenboden gelöst, nach Abzentrifugieren bei 380 g für fünf Minuten mit Hilfe einer 20G Kanüle resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:2 neu ausgesät.

### 3.2.5. Herstellung einer Einzelzellsuspension von Splenozyten

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

### 3.2.6. Splenozytenkultur

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Splenozyten wurde diese auf die gewünschte Konzentration eingestellt ( $2 \times 10^6$ /ml) und nach Zugabe des gewünschten Stimulans in einem Volumen von 200  $\mu$ l in 96-Rundbodenwells bei 37 °C inkubiert. Als Stimulanzen wurden entweder 9.2dr-RNA, Poly A, CpG-ODN verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten abzentrifugiert (400 g, 4 °C, 7 min). Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen in PBS resuspendiert und zur FACS-Analyse gefärbt.

## 3.3. Immunologische Methoden

### 3.3.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

#### 3.3.1.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die Technik des *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) erlaubt es ein bestimmtes Molekül (Zytokin, Antigen, Antikörper) in einer Probe mittels eines für dieses Molekül spezifischen Antikörpers, der an ein Enzym gekoppelt ist zu detektieren. Das Enzym katalysiert eine Farbreaktion, sodass es nach Zugabe eines farblosen Substrates zu einem Farbumschlag (meist farblos nach gelb) kommt. Die Farbintensität ist dabei proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Moleküls.

#### 3.3.1.2. Zytokinbestimmung mittels kommerzieller Kits

Den immunisierten Tieren wurde 6 Stunden nach der Immunisierung 400  $\mu$ l Blut aus dem retrobulbären Venenplexus mit heparinisierten Kapillaren entnommen. Das Blut wurde 15 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Serum abpipettiert und eingefroren. Eine 96-well-ELISA-Platte wurde mit dem in *Coating*-Puffer verdünnten Antikörper (*capture antibody*) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte nach viermaligem Waschen mit 150  $\mu$ l pro well Waschpuffer für zwei Stunden mit 100  $\mu$ l 0,5% BSA in PBS zur Blockade von noch freien Bindungsstellen behandelt. Nach viermaligem Waschen wurden jeweils Standard, Proben und Kontrollen als Duplikate aufgetragen und weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde vorher mit einem rekombinaten murinen Zytokin hergestellt. Danach wurde ein biotinylierter anti-Maus *detection*-Antikörper gegen das entsprechende Zytokin für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Nach weiteren

vier Waschschritten wurde die Platte für 45 Minuten mit Streptavidin-*Horseradish*-Peroxidase inkubiert, wobei das Streptavidin aufgrund seiner hohen Affinität zu Biotin an den biotinylierten Antikörper bindet. Die Platte wurde dann viermal gewaschen und die Substrat-Lösung bestehend aus dem Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1 aufgetragen. Bei der Reaktion der Peroxidase mit ihrem Substrat  $H_2O_2$  werden Protonen freigesetzt, die das Chromogen zu einem Farbstoff oxidieren. Die Reaktion wurde mit 25  $\mu$ l 2N  $H_2SO_4$  gestoppt, sobald die Standardreihen sichtbare Intensitätsunterschiede entwickelten. Der Zytokingehalt der Proben ist proportional zur entstehende Farbreaktion und kann durch die Standardkurve quantitativ bestimmt werden. Die Werte der optischen Dichte wurden mit dem ELISA-Reader eingelesen.

### 3.3.1.3. Bestimmung von OVA-spezifischen Antikörpern

Den immunisierten Tieren wurde 400  $\mu$ l Blut aus dem retrobulbären Venenplexus mit heparinisierten Kapillaren entnommen. Das Blut wurde 15 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Serum abpipettiert und eingefroren. Zur Bestimmung der Titer verschiedener Subklassen an OVA-spezifischen Antikörpern wurden 96-well-ELISA-Platten über Nacht mit Ovalbumin ( $c = 10 \mu$ g/ml in PBS) beschichtet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde die Platte am folgenden Tag für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit *assay diluent* beladen. Nach dreimaligem Waschen mit 150  $\mu$ l Waschpuffer wurden die Proben (50  $\mu$ l) als Duplikate in einer Verdünnung von 1:100 in PBS aufgetragen und die Platten für eine Stunde inkubiert. 50  $\mu$ l mit *Horseradish*-Peroxidase gekoppelte Anti-Maus-Antikörper wurden nach wiederholtem Waschen zugegeben und die Platten eine weitere Stunde inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden in Wasser gelöste OPD-Substrat-Tabletten (o-Phenylenediamine Dihydrochlorid und Carbamid-Peroxid) zugegeben und die Farbreaktion für 5-20 min entwickelt, bevor die Reaktion mit 25  $\mu$ l 2N  $H_2SO_4$  gestoppt wurde. Die optische Dichte wurde im ELISA-Reader bei 490 nm mit einer Wellenlängenkorrektur von 690 nm ausgelesen.

## 3.3.2. Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (FACS)

### 3.3.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Größe, Granularität und fluorochrom-markierte Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und

zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit an Fluorochromen gebundenen Antikörpern gegen das zu messende Oberflächenantigen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch eine Messkammer geführt. Hier wird der Zellstrom in der Trägerflüssigkeit auf das Küvettenzentrum verengt und beschleunigt, so dass die Zellen einzeln in ausreichendem Abstand voneinander am Messpunkt vorbeifließen (hydrodynamische Fokussierung). Das Durchflusszytometer ist mit zwei verschiedenen Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren und somit die benutzten Fluorochrome zur Fluoreszenz anregen. Ein luftgekühlter Argonlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm und ein Diodenlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 635 nm. Am Messpunkt wird das Licht beider Laser auf die Zellen gebündelt. Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre Granula führen zu einer Lichtstreuung des einfallenden Laserstrahls, die durch je einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einen im rechten Winkel dazu liegenden (Seitwärtsstreulicht) registriert und in elektrische Signale umgewandelt wird. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, die des Seitwärtsstreulichts durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Der Laserstrahl regt weiterhin das Fluorochrom der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die ebenfalls in Linsen gesammelt werden. Dabei trennen Filter das gesammelte Licht und lenken es, nach den Wellenlängenbereichen aufgetrennt, zu verschiedenen Photodetektoren. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das untersuchte Oberflächenantigen.

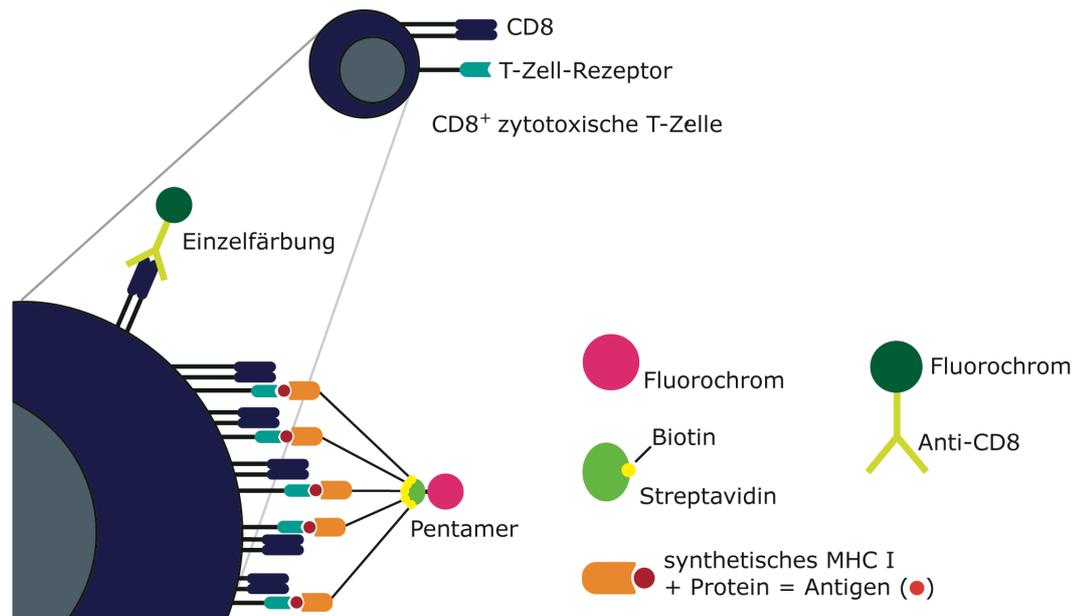
### 3.3.2.2. Oberflächenfärbung

Für die FACS-Analysen wurden  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  in FACS-Puffer Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (400 g, 5 min), der Überstand abgegossen und im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (0,5 µl je Antikörper) für 15-30 min im Dunkeln inkubiert. Als Fluorochrome wurden dabei Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), (Bandpassfilter 530 nm), Phycoerythin (PE) (Bandpassfilter 585 nm), Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) (Bandpassfilter 670 nm) oder Allophycocyanin (APC) (Bandpassfilter 660 nm) verwendet. Diese fluoreszierenden Farbstoffe strahlen in der angegebenen Reihenfolge in die Kanäle 1-4, die mit dem verwendeten FACSCalibur analysiert werden konnten. Für jeden Antikörper wurde ein passender IgG-Isotyp im Kontrollansatz

verwendet. Die am FACSCalibur erhobenen Daten wurden mit CellQuest oder FlowJo Software ausgewertet. Dabei werden zuerst aufgrund von Größe und Granularität der Zellen die lebenden Lymphozyten definiert (*lifegate*). Danach werden je nach Kombination von Oberflächenmarkern weitere Zellpopulationen genauer betrachtet. So werden NK-Zellen als  $CD3^-NK1.1^+$ -Subpopulation definiert und gated und in diesem Gate dann die CD69-Expression als Aktivierungsmarker analysiert.

### 3.3.2.3. Pentamer-Färbung

Die Pentamer-Färbung ist eine Methode zur Identifizierung von antigenspezifischen T-Zellen. Hierfür werden mit unterschiedlichen Expressionssystemen lösliche MHC-I-Moleküle generiert. Anschließend werden die Moleküle gereinigt, konzentriert und biotinyliert. Entsprechend ihrer jeweiligen HLA-Subtypenzugehörigkeit werden die synthetisierten MHC-I-Moleküle mit korrespondierenden Peptiden beladen und nachfolgend mit Streptavidin pentamerisiert. Die so generierten Peptid-beladenen pentameren MHC-I-Moleküle können mit Fluorochromen markiert und anschließend für Analysen am FACS eingesetzt werden. Zum Nachweis antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen wird die Tatsache genutzt, dass diese ihr Zielpeptid erkennen, wenn es durch MHC-I-Komplexe präsentiert wird. Die Anfärbung Peptid-spezifischer T-Zellen mit MHC-Peptid-Komplexen beruht also auf der Pentamer-Bindung an die entsprechenden T-Zell-Rezeptoren. Da allerdings die Affinität des MHC-I-Komplexes zum T-Zell-Rezeptor relativ schwach ist, verwendet man Pentamere um eine stabilere Bindung des Fluorochroms an die Zelle zu erreichen. Dieses Verfahren stellt eine äußerst genaue Methode für die direkte Quantifizierung von antigenspezifischen T-Zellen aus peripherem Blut oder gemischten Zellkulturen dar.



**Abbildung 3.2.:** Schematische Darstellung eines an eine CD8<sup>+</sup>-T-Zelle gebundenen MHC-I-Pentamers sowie der CD8-Einzelfärbung für den Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen in der Durchflusszytometrie.

Für die Färbung der OVA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen wurde den Tieren 7 Tage nach der Immunisierung 400  $\mu$ l Blut aus dem retrobulbären Venenplexus mit heparinisierten Kapillaren entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit vorgelegtem 20  $\mu$ l Heparin gesammelt. Das Blut wurde mit 1 ml Erythrozytenlyse verdünnt und nach 8-10 min mit 2 ml PBS verdünnt um die Lyse zum Schutz der Lymphozyten zu stoppen. Nach einmaligem Waschen mit PBS, Abzentrifugieren der Zellen (400 g, 4 °C, 6 min) und Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und je  $2 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Jede Probe wurde mit 10  $\mu$ l fluoreszenzmarkiertem Pentamer für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem Waschschrift wurde die Oberflächenfärbung mit PerCP-markiertem Anti-CD8-Antikörper für 20 min bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben im FACSCalibur gemessen und die erhobenen Daten wie unter 3.3.2.2 beschrieben analysiert.

## 3.4. Tierversuche

### 3.4.1. Versuchstiere und behördliche Genehmigung

Als Versuchstiere wurden sechs bis acht Wochen alte, weibliche Balb/c- oder C57Bl/6-Mäuse (Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln, D) verwendet. Alle Tierversuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie mit behördlicher Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

### 3.4.2. Immunisierung der Mäuse

#### 3.4.2.1. Immunisierung mit RNA

Zur Immunisierung von C57BL/6-Mäusen wurden 20 µg 9.2dr-RNA oder PolyA bzw. 5 µg CPG-ODN mit 100 µg DOTAP für 20 Minuten unter Schütteln koinkubiert und direkt im Anschluss den Tieren in insgesamt 200 µl Volumen in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Als Negativkontrolle wurde 200 µl PBS verwendet.

#### 3.4.2.2. Immunisierung mit CpG-beladenen Gelatine-Nanopartikeln

Zur Beladung der kationisierten Gelatine-Nanopartikel wurden diese mit CpG im Verhältnis 20:1 (2 mg NP:100 µg CpG) gemischt. Dafür wurden die Nanopartikel in physiologischer Kochsalzlösung in der richtigen Konzentration vorgelegt, das CpG schnell zugegeben und die Mischung für 90 min bei 25 °C im Schüttler inkubiert. Für Immunisierungen gemeinsam mit Ovalbumin wurde nach der Beladung der Nanopartikel 50 µg Ovalbumin zu der Lösung zugegeben.

Zur Immunisierung wurde den Tieren entweder 2 mg Nanopartikel, 2 mg Nanopartikel beladen mit 100 µg CpG, 100 µg CpG (alles in 200 µl Volumen) oder 200 µl physiologischer Kochsalzlösung als Negativkontrolle subkutan injiziert.

### 3.4.3. Zelldepletion

NK- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie von Adam et al. beschrieben depletiert (Adam, 2005).

### 3.4.3.1. NK-Zellen

Zur Depletion der NK-Zellen wurden 0,5 µg des IL-2-Rezeptorketten-spezifischen monoklonalen Antikörpers TMβ1 4 Tage vor sowie 2 und 14 Tage nach Tumorinduktion intraperitoneal injiziert. Der Erfolg der Depletion wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert.

### 3.4.3.2. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Zur Depletion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde 0,1 µg des monoklonalen Antikörpers RmCD8 4 und einen Tag vor sowie 7 Tage nach Tumorinduktion intraperitoneal injiziert. Der Erfolg der Depletion wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert.

## 3.4.4. Tumorinduktion

### 3.4.4.1. Induktion eines RMA-/RMA-S-Tumors

Die RMA-S-Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und eine Konzentration von 5 Mio Zellen/ml eingestellt. Es wurden unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran  $1 \times 10^5$  Zellen in 200 µl PBS pro Maus subkutan in die rechte Flanke von C57Bl/6-Mäusen injiziert. In dieser Konzentration war ab Tag 7 bis 10 ein Tumor tastbar.

### 3.4.4.2. Induktion eines C26-Tumors

Die C26-Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und eine Konzentration von 5 Mio Zellen/ml eingestellt. Es wurden unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 200 µl PBS pro Maus subkutan in die rechte Flanke von Balb/c-Mäusen injiziert. In dieser Konzentration war ab Tag 7 bis 10 ein Tumor tastbar.

### 3.4.4.3. Induktion eines B16-/B16-OVA-Tumors

Die B16-/B16-OVA-Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und eine Konzentration von 5 Mio Zellen/ml eingestellt. Es wurden unter Kurzzeitbetäubung

mit Isofluran  $1 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu\text{l}$  PBS pro Maus subkutan in die rechte Flanke von C57Bl/6-Mäusen injiziert. In dieser Konzentration war ab Tag 10 bis 14 ein Tumor tastbar.

### 3.4.5. Beobachtung des Tumorwachstums

Das Wachstum der Tumoren wurde jeden 2. Tag anhand der Querschnittsfläche ( $\text{mm}^2$ ) bestimmt. Als Maß für die Querschnittsfläche des Tumors wurde das Produkt aus größtem Querdurchmesser (mm) mal darauf senkrechtem Durchmesser (mm) dreimal wöchentlich bestimmt. Überschreitet die Größe der Tumoren  $250 \text{ mm}^2$  bzw. die Größe der Ulzerationen der Haut über dem Tumor  $50 \text{ mm}^2$ , oder zeigten die Mäuse Störungen des Allgemeinbefindes aufgrund des Malignoms (Inaktivität, Piloerektion, Tumorkachexie) wurden die Tiere durch  $\text{CO}_2$ -Narkose oder zervikale Dislokation unter Isofluran-Kurzzeitbetäubung getötet.

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

**Tabelle 3.4.:** Bewertungsschema für die Belastung der Versuchstiere

### 3.4.6. Tumorlyse und Percoll-Gradient

Zur Isolation der Lymphozyten wurden die Tumoren mechanisch zerkleinert und mit 1 mg/ml Kollagenase und 0,05 mg/ml DNase inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines 40  $\mu\text{m}$  Zellsiebs vereinzelt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden diese in einer 44%igen Lösung von Percoll in PBS resuspendiert. Percoll ist ein kolloidales Silikat mit einer Polyvinylpyrrolidon-Beschichtung mit einer Dichte von 1,130 g/ml (Pertoft, 1978). Je nach Konzentration einer Mischung von Percoll mit PBS lassen sich

Dichte-Gradienten zwischen 1,0-1,3 g/ml herstellen. Zur Anreicherung der im Tumor enthaltenen Lymphozyten wurden die in 44%igem Percoll suspendierten Zellen mit einer 67%igen Percoll-Lösung überschichtet und die Zellen bei 800 g für 30 Minuten zentrifugiert. Die Lymphozyten, die sich in der Interphase angereicherten hatten, wurden vorsichtig abgenommen und für die Durchflusszytometrie gefärbt.

### 3.5. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm SPSS durchgeführt. Vergleiche der Tumorgrößen in verschiedenen Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. Vergleiche zwischen verschiedenen Gruppen von Zytokinen, Antikörpern oder Zellen wurden mittels Students T-Test ermittelt. Fehlerindikatoren wurden für den SEM (*standard error of the mean*) angegeben.

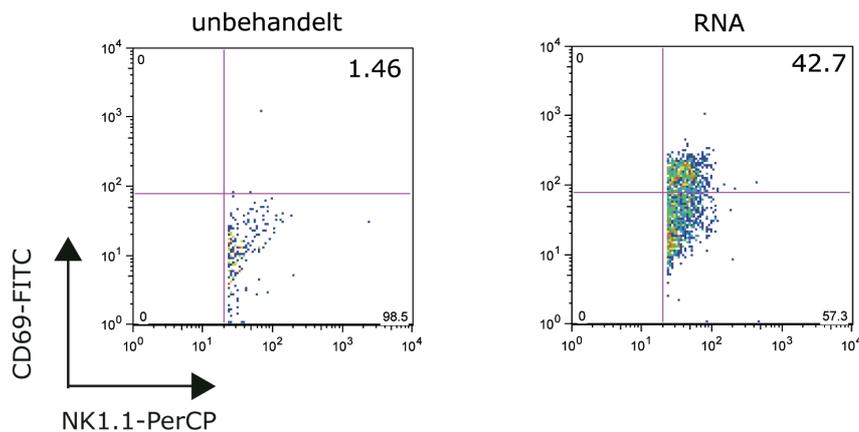
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide und ihr Einfluss auf das Wachstum muriner Tumoren durch die Aktivierung von NK-Zellen

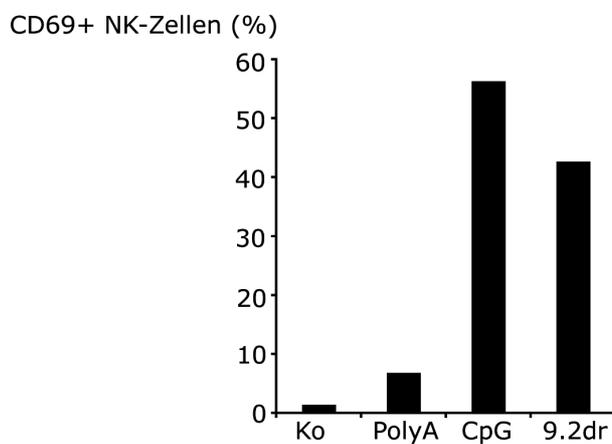
#### 4.1.1. *In-vitro*-Aktivierung von NK-Zellen durch immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide

Dendritische Zellen wirken als Katalysatoren des angeborenen wie auch des adaptiven Immunsystems indem sie T- und B-Zellen, aber auch NK-Zellen stimulieren. (Walzer, 2005; Moretta, 2006). Sie nehmen diese Rolle wahr, indem sie typische molekulare Muster verschiedener Pathogene detektieren und das Signal einer Gefahr weitergeben und potenzieren. In der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass immunstimulatorische RNA via TLR7 sequenz-spezifisch zur Aktivierung von dendritischen Zellen führt und es daraufhin zur Generierung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen und der Produktion von Antikörpern kommt (Bourquin, 2007). Weiterhin wurde in Versuchen der Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Applikation von immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotiden zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt (Bourquin, 2009). Eine Möglichkeit um die Aktivierung von Zellen des Immunsystems zu untersuchen, ist die Bestimmung des Anteils an CD69<sup>+</sup> Zellen in der Durchflusszytometrie. CD69, ein transmembranöses Glykoprotein, ist ein besonders früher Marker der Aktivierung von Lymphozyten. Es hat vielfältige Funktionen in der Zellkommunikation und Signaltransduktion und eignet sich gut zur zeitlichen Analyse von Aktivierungszuständen (Ziegler, 1994). Wie in Abbildung 4.1. zu sehen ist, führt die Stimulation von naiven murinen Splenozyten (Gesamtheit aller Milzzellen, diese enthalten aufgrund der immunologischen Funktion der Milz fast alle Typen von Immunzellen) mit dem immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotid 9.2dr zu einer Aktivierung von NK-Zellen. Durch die Stimulation von Milzzellen kommt es auf NK-Zellen zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression von CD69 von 1,5% bei unbehandelten Splenozyten auf 45% CD69<sup>+</sup> NK-Zellen. Im Vergleich dazu lag der Anteil an CD69<sup>+</sup> NK-Zellen nach Stimulation mit CpG-DNA bei 55%. Zum Beweis, dass diese Aktivierung sequenzspezifisch ist, verwendete ich ein Poly-Adenosin-Oligoribonukleotid (PolyA) als Kontrolle. Diese führt zu einer nur marginalen Stimulierung der Zellen (Abbildung 4.1. Bild B).

A



B

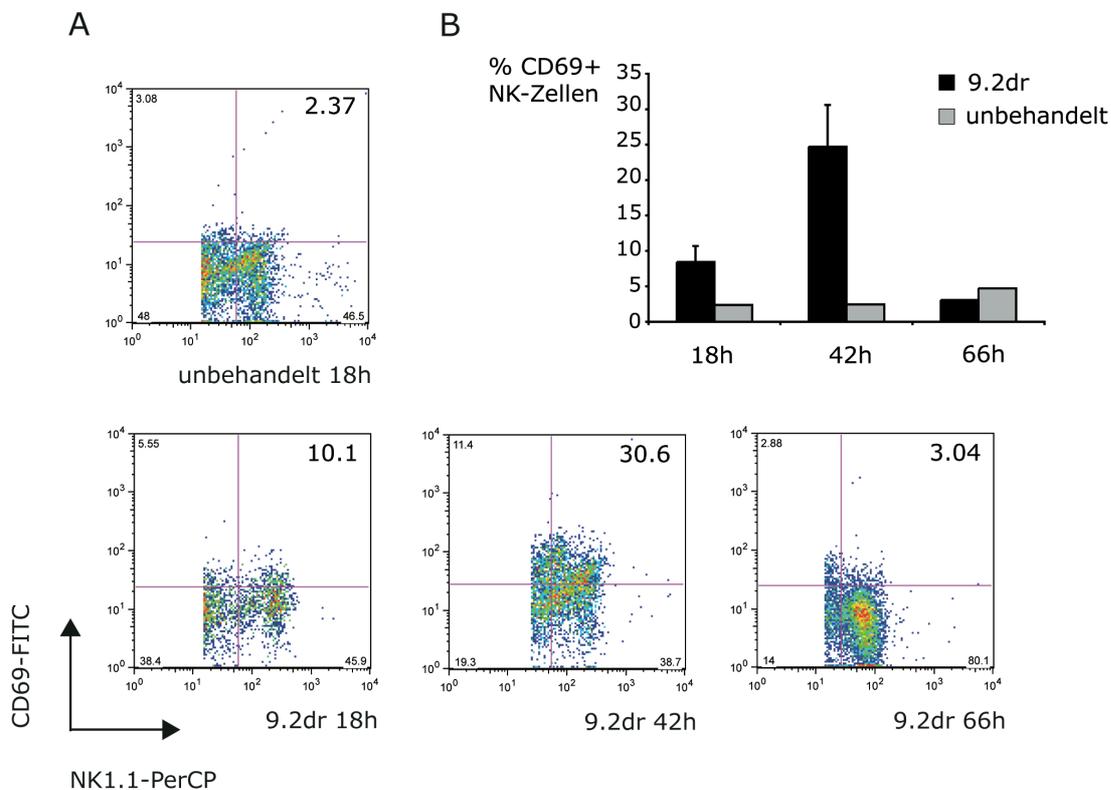


**Abbildung 4.1.:** Frisch isolierte Splenozyten wurden in Kultur genommen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) und mit  $10 \mu\text{g/ml}$  PolyA oder  $10 \mu\text{g/ml}$  9.2dr komplexiert mit DOTAP ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) oder  $20 \text{mg/ml}$  CpG stimuliert oder unbehandelt (Ko) gelassen. Nach 12 h wurden die Überstände abgenommen und die Zellen gewaschen. Die Oberflächenexpression von CD69 auf NK-Zellen ( $\text{NK1.1}^+$ ) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. A) FACS-Bilder der unstimulierten oder mit RNA behandelten NK-Zellen, B) Gepoolte Werte von biologischen Triplikaten ( $n=3$ ).

In unserer Arbeitsgruppe wurde untersucht, ob die aktivierende Wirkung der immunstimulatorischen RNA auf die NK-Zellen durch dendritische Zellen vermittelt wird. Dabei wurde beobachtet, dass die CD69-Expression auf NK-Zellen nach Stimulation von Splenozyten mit 9.2dr komplett aufgehoben wird, wenn man vorher die dendritischen Zellen - mittels magnetischem Zellsorting (MACS) - aus den gesamten Milzzellen entfernt. Dies zeigte, dass die NK-Aktivierung über dendritische Zellen vermittelt wird.

#### 4.1.2. Zeitliches Profil der *in vivo* NK-Aktivierung nach Applikation von immunstimulatorischer RNA

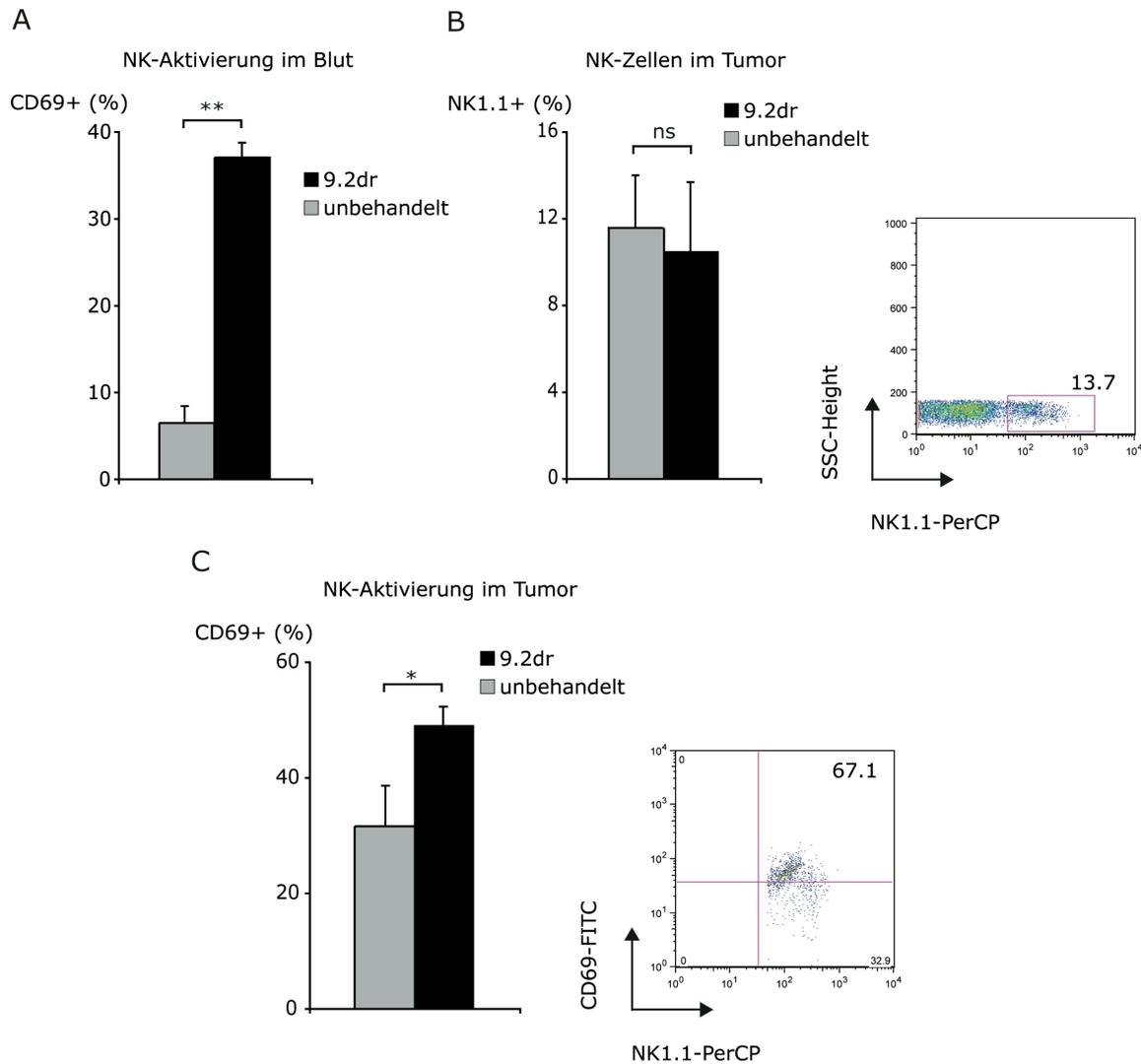
Um die bisherigen Ergebnisse zur NK-Zell-Aktivierung auf die Tumorthherapie zu übertragen, studierte ich zuerst den zeitlichen Verlauf der Aktivierung von NK-Zellen nach Applikation der immunstimulatorischen RNA. Dafür wurden 20  $\mu$ g mit DOTAP komplexierte RNA-Oligonukleotide intravenös injiziert und nach 18 h, 2 d und 3 d die Aktivierung von NK-Zellen der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Abbildung 4.2. ist zu sehen, dass auch *in vivo* die NK-Zellen nach Kontakt mit immunstimulatorischer RNA CD69 hochregulieren. Deutlich ist dabei ein zeitliches Profil der Aktivierung zu erkennen. Nach 18 h sind 10% der NK-Zellen aktiviert im Vergleich zu 2,4 % der NK-Zellen von unbehandelten Tieren. Nach 42 h ist mit einem Anteil von 30 % der NK-Zellen mit CD69-Oberflächenexpression ein Maximum erreicht. Nach 66 h hat der Anteil der CD69-positiven NK-Zellen mit 3 % fast wieder den Ausgangswert erreicht. Dieser zeitliche Verlauf hat deutliche Implikationen für die therapeutische Anwendung der immunstimulatorischen RNA. Um eine konstante Aktivierung der NK-Zellen zu erreichen und diese maximal für die Tumorthherapie nutzen zu können sollte die Applikation der immunstimulatorischen RNA mehrmalig in regelmäßigen Abständen wiederholt werden.



**Abbildung 4.2.:** C57Bl/6-Mäuse wurden mit 20 µg 9.2dr komplexiert mit DOTAP i.v. behandelt. Als Kontrolle diente PBS. 18, 42 oder 66 Stunden nach Injektion wurden die Tiere getötet, die Milzen entnommen und die NK-Zellen der Milzen (NK1.1<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades (CD69<sup>+</sup>) mittels Durchflusszytometrie untersucht (n=2).

#### 4.1.3. Infiltration von aktivierten NK-Zellen im Tumorgewebe nach Behandlung mit immunstimulatorischer RNA

Wie oben beschrieben konnte ich bestätigen, dass die NK-Zellen im Blut und in der Milz der behandelten Tiere die CD69-Expression erhöht hatten. Dies gilt jedoch nur für gesunde Tiere, die NK-Aktivierung in tumortragenden Mäusen war bisher noch nicht untersucht worden. Gerade die Situation in erkrankten Tieren ist aber von Bedeutung, da Tumoren vielfältige lokale wie auch systemische immunsuppressive Mechanismen ausbilden, um so dem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen. Im Hinblick auf die spätere therapeutische Anwendung ist es besonders wichtig zu sehen, ob die immunstimulatorische RNA diese Immunsuppression grundsätzlich durchbrechen kann. Ich untersuchte dafür die NK-Aktivierung im Blut tumortragender Mäuse. Wie in Abbildung 4.3. A) zu sehen, kommt es nach Injektion von 9.2dr im Blut tumortragender Mäuse zu einer stark erhöhten Aktivierung der NK-Zellen. Dies entspricht den Werten die bei nicht-tumortragenden Tieren gemessen wurden. Der Aktivierungsgrad der NK-Zellen bei behandelten Tieren lag bei 37 %, bei unbehandelten Tieren jedoch nur bei 6,5 %. Durch die Applikation von immunstimulatorischer RNA lässt sich also die im Zuge einer Tumorerkrankung entstehende Immunsuppression durchbrechen und eine Aktivierung von NK-Zellen im Blut erkrankter Tiere erreichen.



**Abbildung 4.3.:** Nach Induktion eines subkutanen RMA-S-Tumors wurden die Mäuse an Tag 0, 2, 4, 6 und 8 und 12 nach Tumorinduktion mit 20  $\mu\text{g}$  9.2dr komplexiert mit DOTAP i.v. behandelt oder unbehandelt gelassen. An Tag 14 nach Tumorinduktion wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entnommen. Nach Durchführung einer Tumorlyse und Anreicherung der Lymphozytenfraktion mittels Percoll-Gradienten wurden NK-Zellen ( $\text{NK1.1}^+/\text{CD3}^-$ ) in der Durchflusszytometrie auf ihre Oberflächenexpression von CD69 untersucht. A) Mittelwerte  $\pm$  SEM der CD69-Expression auf NK1.1 positiven Zellen des Blutes. \*\*:  $p < 0,01$  B) Mittelwerte  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils der NK-Zellen an den kleinen Lymphozyten im Tumor und exemplarische Darstellung der NK-Infiltration einer einzelnen Maus (9.2dr:  $n = 6$ ; unbehandelt:  $n = 7$ ). ns: nicht signifikant C) Mittelwerte  $\pm$  SEM der Expression von CD69 auf NK-positiven Zellen des Tumors und exemplarische Darstellung der Aktivierung von NK-Zellen im Tumor einer einzelnen Maus (9.2dr:  $n = 6$ ; unbehandelt:  $n = 7$ ). \*:  $p < 0,05$

Die antitumorale Wirkung von NK-Zellen kommt hauptsächlich durch direkten zellulären Kontakt mit den Zielzellen zustande, deshalb ist die Infiltration des Tumors mit NK-Zellen Grundlage einer jeden erfolgreichen NK-vermittelten Immuntherapie. Daraufhin stellte sich die Frage, ob es auch zu einer Infiltration der NK-Zellen in den Tumor kommt und ob diese durch die immunstimulatorische RNA erhöht wird. Dafür untersuchte ich den Anteil von NK-Zellen in einem subkutanen RMA-S-Tumor nach Behandlung mit immunstimulatorischer RNA. In Abbildung 4.3. B) zeigt sich, dass die Infiltration des Tumorgewebes bei mit 9.2dr behandelten und unbehandelten Tieren etwa gleich ist: 11,5 % bei unbehandelten Tieren und 10,5 % nach Applikation von 9.2dr. Die NK-Zellen sind also grundsätzlich in der Lage in erkrankten Tieren den Tumor zu infiltrieren, die immunstimulatorische RNA ist aber nicht in der Lage die Migration von NK-Zellen in das Tumorgewebe zu erhöhen.

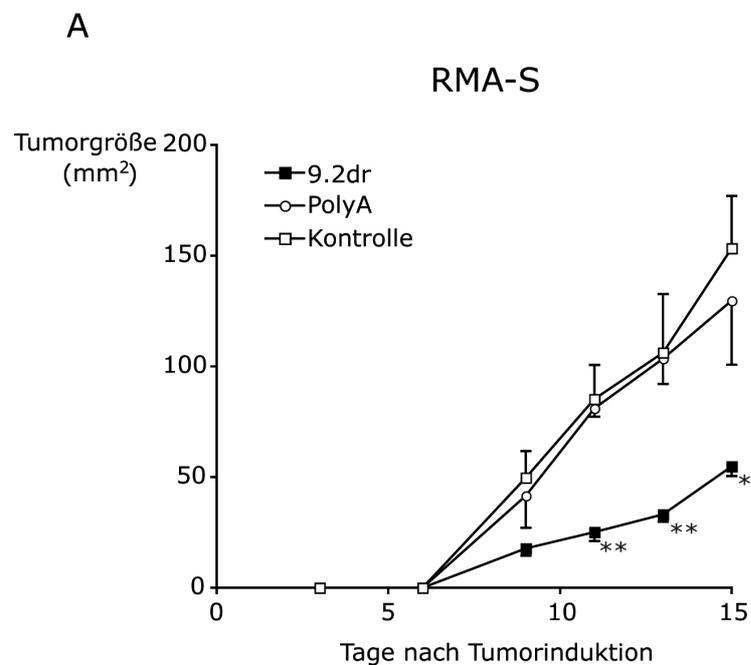
Da bekannt ist, dass es durch die immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide hauptsächlich zu einer erhöhten Aktivierung der NK-Zellen im Blut, nicht jedoch zu einem Proliferationsreiz kommt, untersuchte ich im nächsten Schritt den Anteil an aktivierten NK-Zellen im Tumorgewebe. Nur aktivierte Zellen können auch ihre zytotoxische Funktion erfüllen. Dabei konnte ich bei der Analyse des Aktivierungsgrades der NK-Zellen im Tumorgewebe einen deutlichen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren feststellen. In Abbildung 4.3. C) ist zu sehen, dass der Anteil CD69-positiver NK-Zellen bei den Tieren die 9.2dr erhalten hatten bei 50 % lag, während bei den unbehandelten Tieren nur 31,5 % der NK-Zellen aktiviert waren. Auch wenn es durch die Applikation von 9.2dr nicht zu einer verstärkten Migration der NK-Zellen in das Tumorgewebe kommt, so zeigen doch diejenigen NK-Zellen die den Tumor infiltrieren eine verstärkte Aktivierung. Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass es durch die Anwendung von immunstimulatorischer RNA gelingt die tumorinduzierte Immunsuppression zu durchbrechen und es dadurch sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe zu einer erhöhten Aktivierung der NK-Zellen kommt.

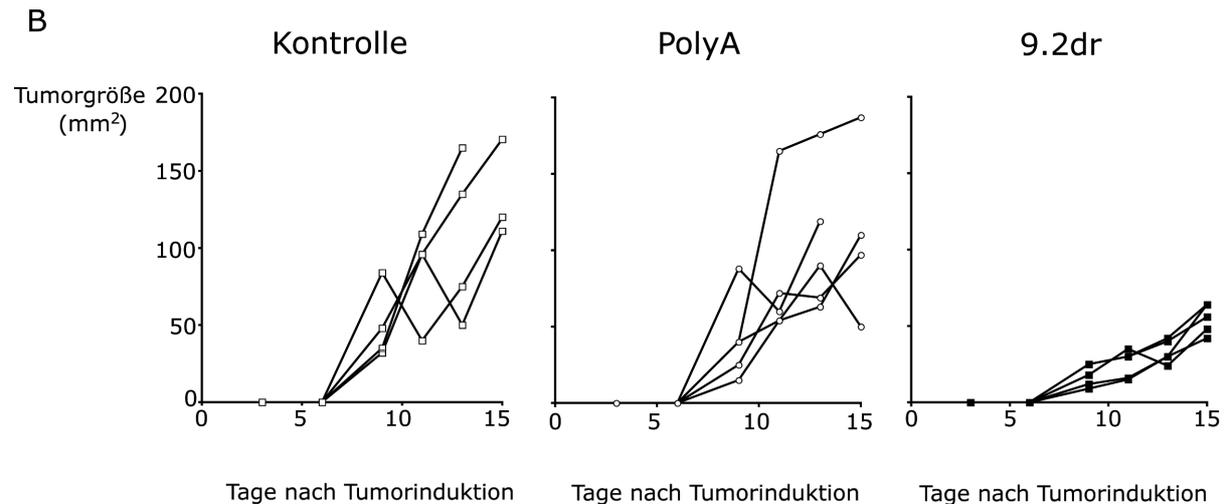
#### 4.1.4. Antitumorale Wirkung der immunstimulatorischen RNA bei der Behandlung eines murinen NK-empfindlichen Tumors

Um die antitumoralen Effekte der NK-Aktivierung zu studieren, wählten wir ein murines Tumormodell das besonders sensitiv für einen Angriff durch NK-Zellen ist. Die RMA-S-Lymphom-Zelllinie hat einen durch eine Mutation nicht funktionsfähigen TAP-Transporter und ist dadurch MHC-I-inkompetent (Karre, Ljunggren et al., 1986). Durch die fehlende Selbst-Ausweisung durch MHC-I wird das RMA-S-Lymphom nach der „*missing-self*

Hypothese“ zu einer Zielzelle für NK-Zellen und somit der ideale Tumor um NK-Zell-abhängige antitumorale Mechanismen zu studieren.

Nach der Induktion des RMA-S-Tumors wurde 9.2dr-RNA mehrmalig intravenös appliziert. Als Negativkontrollen diente PolyA und PBS. Wie in Abbildung 4.4. zu sehen ist, konnte durch die Behandlung mit immunstimulatorischer RNA das Tumorstadium signifikant verlangsamt werden. An den Tagen 11, 13 und 15 entsprach die Tumorstadium bei behandelten Mäusen nur 31, 35 oder 47 % der Größe von unbehandelten Tumoren. Das Wachstum der Tumoren, die mit PolyA behandelt wurden, war dabei vergleichbar dem der unbehandelten Tiere. Die immunstimulatorische RNA reduziert somit sequenz-abhängig das Wachstum eines NK-sensitiven Tumors.



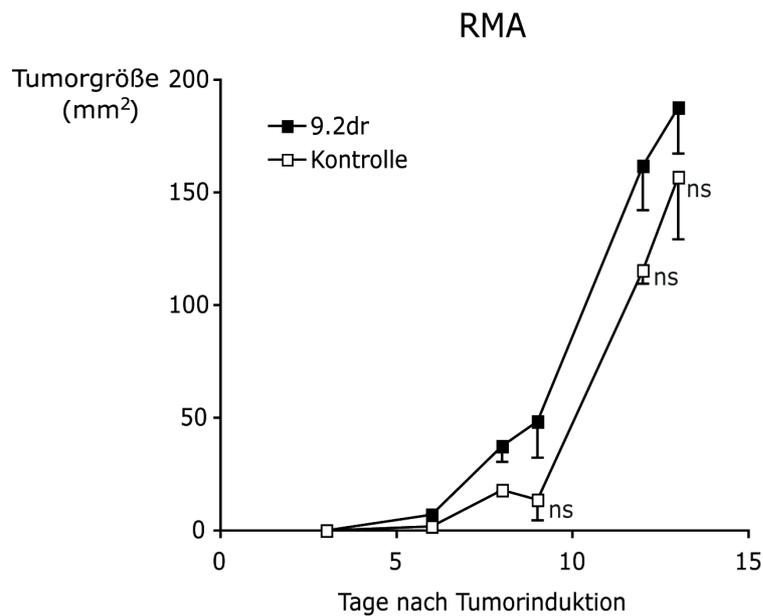


**Abbildung 4.4.:** C57BL/6-Mäuse wurden am Tag null  $1 \times 10^6$  RMA-S Tumorzellen s.c. in die rechte Flanke injiziert. An den Tagen 0, 3, 6, 9 und z.T. am Tag 12 nach Tumorinduktion wurden  $20 \mu\text{g}$  9.2dr oder PolyA komplexiert mit DOTAP oder PBS i.v. injiziert und das Tumorwachstum beobachtet. A) Gezeigt wird der Mittelwert der Tumorgröße  $\pm$  SEM ( $n = 5$ , Kontrolle  $n = 4$ ). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . B) Dargestellt ist das Tumorwachstum der einzelnen Tiere in den 3 Gruppen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

#### 4.1.5. Einfluss der immunstimulatorischen RNA auf das Tumorwachstum eines nicht-NK-sensiblen Tumors

Zum Nachweis der NK-Abhängigkeit der immunstimulatorischen Wirkung der RNA verglichen wir das Tumorwachstum des NK-sensitiven Lymphoms RMA-S mit der elterlichen Zelllinie RMA. Die Zellen des RMA-Lymphoms sind MHC-I-kompetent und sollten deshalb nicht wie die RMA-S-Tumoren durch eine NK-Aktivierung beeinflusst werden. Ist der davor beobachtete Effekt auf das Tumorwachstum jedoch nicht durch die aktivierten NK-Zellen zustande gekommen, müsste man hier eine ähnlich starke Verlangsamung des Tumorwachstums sehen.

Die Tiere wurden nach Induktion eines subkutanen RMA-Tumors mit 9.2dr-RNA therapiert oder unbehandelt gelassen. In Abbildung 4.5. ist die Tumorkurve des RMA-Tumors zu sehen. Es fand sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum mit oder ohne RNA Behandlung. Dass der hier verwendete nicht-NK-empfindliche Tumor, im Gegensatz zu einem NK-sensitiven Tumor, nicht auf die Behandlung anspricht, verdeutlicht die wichtige Rolle der NK-Zellen in der anti-tumoralen Aktivität der immunstimulatorischen RNA.

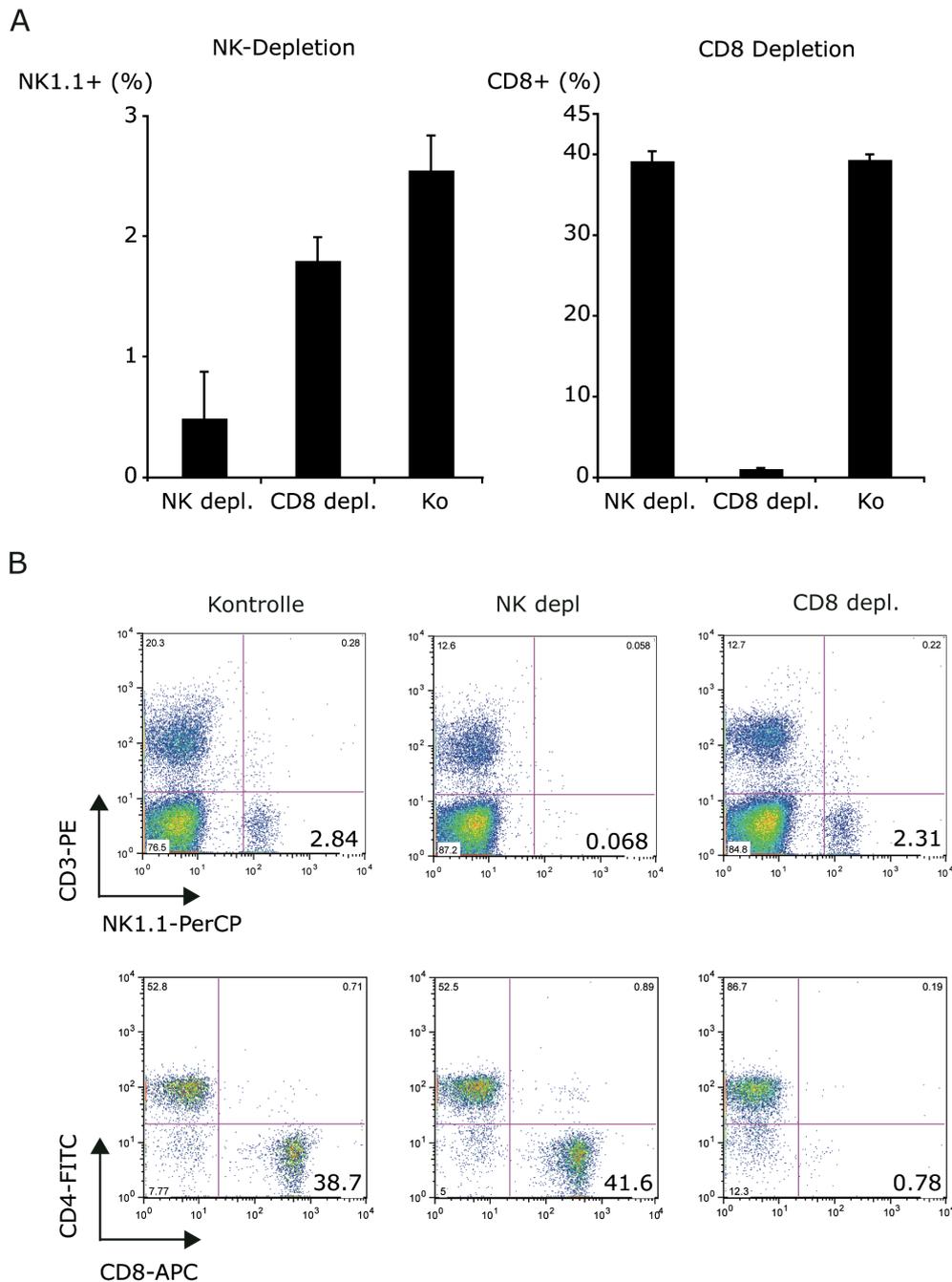


**Abbildung 4.5.:** C57BL/6 Mäusen wurden am Tag null  $3,75 \times 10^5$  RMA Tumorzellen s.c. in die rechte Flanke injiziert. An den Tagen 0, 3, 6, 9 und z.T. am Tag 12 nach Tumorinduktion wurden  $20 \mu\text{g}$  9.2dr komplexiert mit DOTAP oder PBS i.v. injiziert und das Tumorstadium beobachtet. Gezeigt wird der Mittelwert der Tumorstadium  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). ns: nicht signifikant.

#### 4.1.6. NK-vermittelte antitumorale Aktivität durch immunstimulatorische RNA

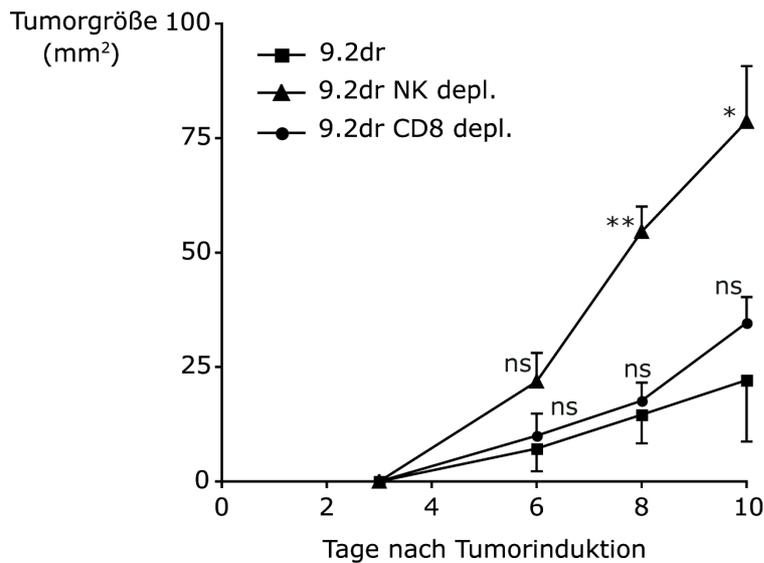
Um die Rolle von NK-Zellen und zytotoxischen  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen für die antitumorale Wirkung zu untersuchen, entwarfen wir einen Versuchsaufbau, bei dem die NK-Zellen *in vivo* depletiert wurden und somit ihr Effekt aufgehoben werden sollte.

Wie in Abbildung 4.7. sichtbar, war die Depletion beider Zelltypen erfolgreich. Der Anteil der NK-Zellen an allen Zellen lag bei 0,38 % nach Depletion im Vergleich zu 2,24 % bei den nicht-depletierten Tieren. Interessanterweise ist auch bei den Tieren welche den Anti- $\text{CD8}$ -mAB erhalten haben der Anteil der NK-Zellen auf 1,52 % reduziert. Nach  $\text{CD8}$ -Depletion fiel der Anteil der  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen an allen  $\text{CD3}^+$  Zellen auf 0,93 % im Vergleich zu 36,8 % bei den unbehandelten Tieren.



**Abbildung 4.6.:** Zur Depletion der NK-Zellen wurde Mäusen 0,5  $\mu\text{g}$  TM $\beta$ 1 i.p. an den Tagen -4, 2 und 14 nach Tumorinduktion injiziert. Zur Depletion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde 0,1  $\mu\text{g}$  RmCD8 i.p. an den Tagen -4, -1 und 7 nach Tumorinduktion injiziert. Am Tag 1 nach Tumorinduktion wurde Blut abgenommen und in der Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression von CD3, CD8 und NK1.1 auf Blutzellen gemessen. A) Gezeigt wird der prozentualen Mittelwert  $\pm$  SEM der NK- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im peripheren Blut (n = 5). B) Exemplarische Darstellung der FACS-Bilder je einer Maus.

Nach der Induktion des RMA-S-Tumors wurden alle Tiere mit immunstimulatorischer RNA behandelt und das Tumorstadium beobachtet. Im Vergleich zu den nicht-depletierten Tieren war das Wachstum des Tumors in der NK-depletierten Gruppe beschleunigt. Bei den Tieren, die CD8-depletiert wurden verhielt sich das Tumorstadium dagegen ähnlich wie bei den nicht-depletierten Tieren. Abbildung 4.7. zeigt das Tumorstadium des RMA-S-Tumors nach der Depletion und mit 9.2dr Behandlung.



**Abbildung 4.7.:** Nach erfolgreicher Depletion der NK- respektive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden  $1 \times 10^6$  RMA-S Tumorzellen s.c. in die rechte Flanke injiziert. Die Mäuse wurden an den Tagen 0, 2, 4, 8 und 10 nach Tumorinduktion mit 20  $\mu$ g 9.2dr komplexiert mit DOTAP i.v. behandelt. Gezeigt wird der Mittelwert der Tumorstadium +/- SEM (n = 5). \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; ns: nicht signifikant.

An den Tagen 8 und 10 ist der Unterschied in der Tumorstadium zwischen den NK-depletierten Tieren und den nicht depletierten Tieren signifikant, während der Unterschied in der Tumorstadium zwischen CD8-depletierten Tieren und nicht-depletierten Tieren zu keinem Zeitpunkt signifikant ist. Damit wird deutlich, dass die antitumorale Wirkung der immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotide durch NK-Zellen vermittelt wird. Zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen haben hingegen keinen Einfluss auf das Tumorstadium.

## 4.2. Gelatine-Nanopartikel als neue Trägersubstanz für immunstimulatorische Oligonukleotide

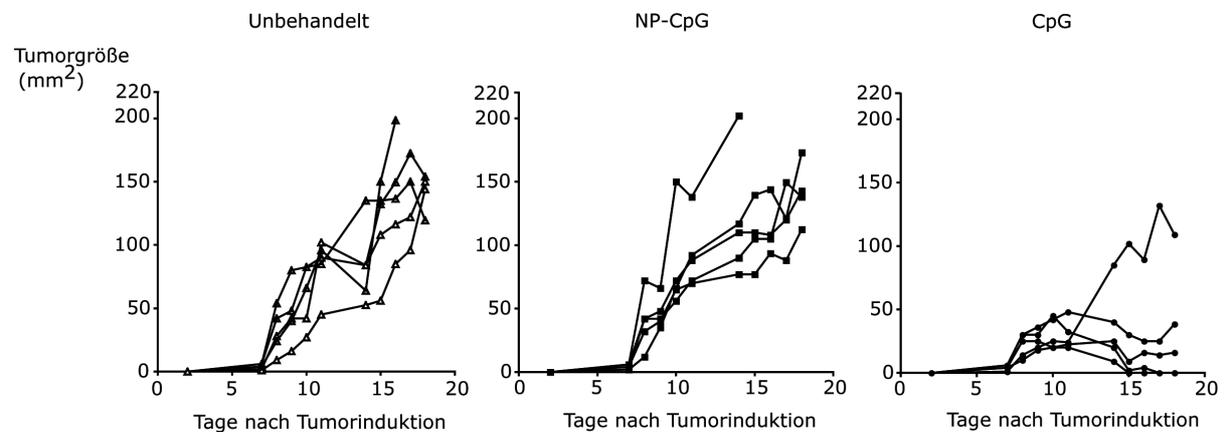
Ribonukleinsäuren sind instabil und anfällig für eine Degradation durch die extrazellulär vorkommenden RNAsen. Um den Ort ihrer Wirksamkeit zu erreichen brauchen sie somit eine geeignete Trägersubstanz. Verschiedene Möglichkeiten stehen dafür mittlerweile zur Verfügung. Das hier von uns verwendete DOTAP gehört zur Gruppe der kationischen liposomalen Komplexe. Diese Substanzen bilden mit negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe, welche dann die Zellwand durchdringen können. Dieses System ist einfach zu verwenden und *in vitro* sehr effizient, jedoch gibt es einige Hindernisse, die der systemischen Anwendung im Menschen noch entgegenstehen. So sind bei der *In-vivo*-Anwendung hohe Konzentrationen nötig, die wiederum zu toxischen Nebenwirkungen führen können (Wasungu, 2006; Morille, Passirani et al., 2008). Ein zusätzliches Problem bei der Verwendung liposomaler Komplexe wie DOTAP ist ihre Instabilität. Die Partikel müssen jedes Mal kurz vor Therapie frisch hergestellt werden. Da sie dann nur für einen kurzen Zeitraum (DOTAP: 20 Minuten) stabil sind und würde dies die Anwendung im Menschen verkomplizieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine neuartige Trägersubstanz für RNA-Oligonukleotide zu untersuchen: kationische Gelatine-Nanopartikel. Gelatine wird als Naturstoff aus hydrolysiertem Kollagen gewonnen und findet vielfältige Anwendung in Lebensmitteln, in der Industrie sowie in der Medizin als Plasmaexpander und zur Verkapselung von Medikamenten. Gelatine ist biologisch abbaubar, nicht-toxisch und nicht immunogen. Im Vergleich zu liposomalen Formulierungen zeigen Gelatine-Nanopartikel eine höhere Stabilität in der Aufbewahrung und nach *In-vivo*-Applikation (Kreuter, 1995; Coester, 2006). Gelatine-Nanopartikel scheinen somit sehr gut geeignet als ein neues Trägersystem für RNA eingesetzt zu werden. In der *In-vitro*-Anwendung von Gelatine-Nanopartikeln zeigte sich, dass sie die gezielte Lieferung der Nukleinsäure in dendritische Zellen bewirken (Zwiorek, Kloeckner et al., 2005).

Um die Effektivität dieser neue Trägersubstanz für Nukleinsäuren in der Immuntherapie von Tumoren zu untersuchen, verwendete ich das DNA-Oligonukleotid CpG. Dieser TLR9-Agonist ist eines der stärksten bekannten Adjuvanzen für die Generierung von T<sub>H</sub>1-Immunantworten. Basierend auf Vorarbeiten zur *In-vitro*-Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen nach Aufnahme von mit CpG-beladenen Gelatine-Nanopartikeln untersuchte ich die *In-vivo*-Anwendung der Nanopartikel in der Tumorthherapie (Zwiorek, 2008).

#### 4.2.1. Antitumorale Wirkung von an Gelatine-Nanopartikel gebundenem CpG

Zuerst verglich ich in einem etablierten Tumor-Mausmodell die Wirkung von an Gelatine-Nanopartikel gebundenem CpG (NP-CpG) mit freiem CpG. Dafür wurden Balb/c-Mäuse nach Induktion eines subkutanen C26-Kolonkarzinoms peritumoral mit einer der beiden CpG-Formulierungen behandelt. In Anbetracht der für nanopartikelgebundenes CpG nachgewiesenen starken immunstimulatorischen Aktivität, im Speziellen durch Induktion der  $T_H1$ -Zytokine IL-12 und Typ-I-Interferon, sollte sich analog zu freiem CpG auch ein Effekt auf das Tumorstadium zeigen. Entgegen der Erwartungen blieb das Tumorstadium jedoch durch die lokale Applikation von NP-CpG unbeeinflusst.

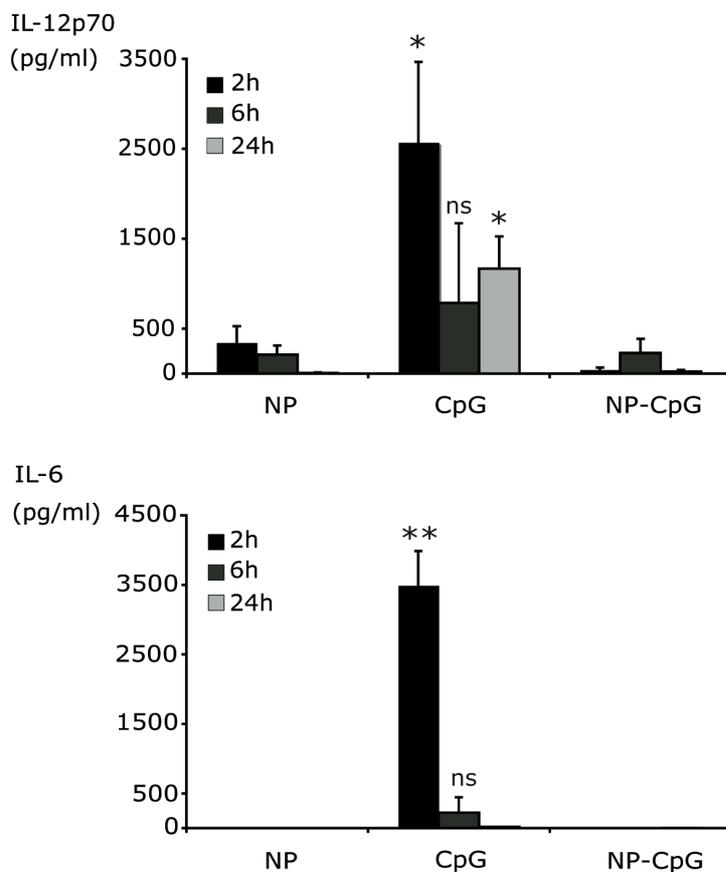


**Abbildung 4.8.:** Induktion eines subkutanen C26-Kolonkarzinoms ( $2,5 \times 10^5$  Zellen) an der rechten Flanke von Balb/c-Mäusen. An den Tagen 7, 12 und 16 nach Tumorinduktion wurde  $100 \mu\text{g}$  CpG oder  $100 \mu\text{g}$  CpG gebunden an  $1 \text{ mg}$  Gelatine-Nanopartikel oder PBS peritumoral injiziert. Dargestellt sind die Tumorstadium der einzelnen Tiere in den drei Gruppen ( $n = 5$ ).

In Abbildung 4.8. ist das Tumorstadium der einzelnen Gruppen dargestellt. Es wurde entweder PBS als Kontrolle peritumoral injiziert, NP-CpG oder freies CpG. Es ist zu sehen, dass die Tumoren in der mit NP-CpG behandelten Gruppe mit der gleichen Geschwindigkeit wachsen, wie die Tumoren der Kontrollgruppe. Die Tumoren der Mäuse die mit freiem CpG behandelt wurden, zeigen hingegen bis auf einen Ausreißer keine Progredienz, die Tumorstadium ist für die Dauer der Behandlung zum Teil sogar gleichbleibend oder rückläufig. Die starke antitumorale Wirkung von freiem CpG wird somit durch die Bindung an Nanopartikel vollständig aufgehoben.

#### 4.2.2. Systemische Zytokinantwort nach der Applikation von CpG-NP im Vergleich zu freiem CpG

Um dieses Ergebnis besser zu verstehen, analysierte ich die systemische Zytokinantwort nach subkutaner Applikation von an Gelatine-Nanopartikel gebundenem CpG im Vergleich zu freiem CpG sowie der alleinigen Applikation von Nanopartikeln. In *In-vitro*-Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass durch die Aufnahme der mit CpG beladenen Nanopartikel in pDCs und in Mäusen auch in mDCs die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen gefördert wird.



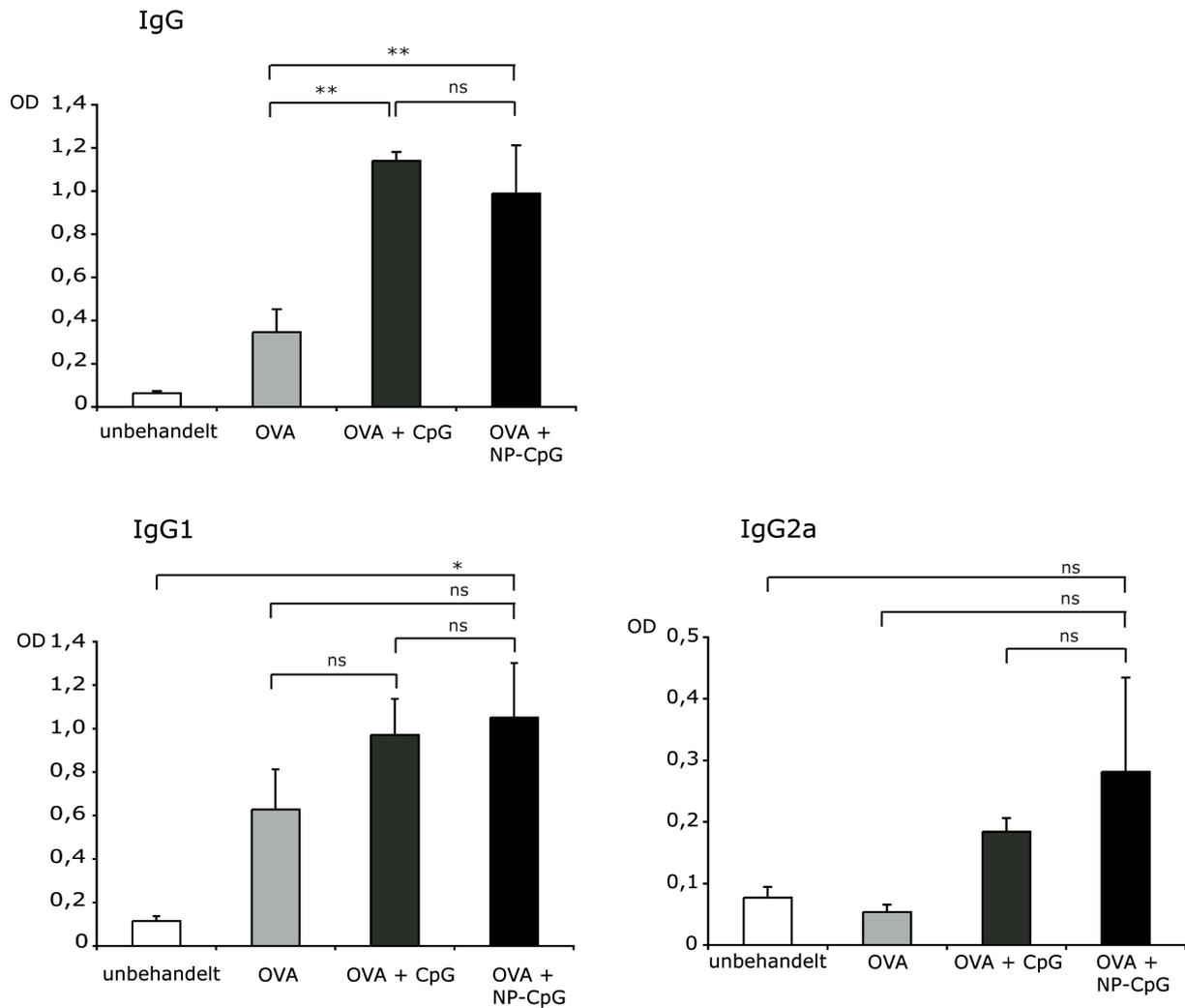
**Abbildung 4.9.:** 100  $\mu$ g freies CpG oder 100  $\mu$ g an Nanopartikel gebundenes CpG wurde C57BL/6-Mäusen subkutan injiziert. 2, 6 und 24 h nach Injektion wurde den Mäusen Blut abgenommen und im Serum die Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-12p70 bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte der Zytokinkonzentration  $\pm$  SEM (n = 5). \*\*: p < 0,01; \*: p < 0,05; ns: nicht signifikant im Vergleich zu NP-CpG zum entsprechenden Zeitpunkt.

Wie in Abbildung 4.9. zu sehen, führt die Injektion von freiem CpG wie erwartet zu einem deutlichen Anstieg des Serumspiegels sowohl von IL-12p70 als auch von IL-6. Diese beiden proinflammatorischen Zytokine sind typisch für eine  $T_H1$ -Antwort des

Immunsystems auf eine Stimulation. Im Gegensatz dazu fehlt bei der Administration von an Gelatine-Nanopartikel gebundenem CpG diese systemische Zytokinantwort völlig. Zu keinem der Messzeitpunkte lag der Serumspiegel von IL-6 oder IL-12p70 über dem Wert der nur mit Nanopartikeln behandelten Mäuse. In der *In-vivo*-Applikation von NP-CpG zeigt sich also keine systemische Aktivierung des Immunsystems in Sinne eines Anstiegs der Zytokine im Serum. Dies könnte die ausbleibende Reduktion des Tumorwachstums nach therapeutischer Anwendung des gebundenen CpGs erklären.

#### 4.2.3. Entwicklung einer antigenspezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit an Nanopartikel gebundenem CpG

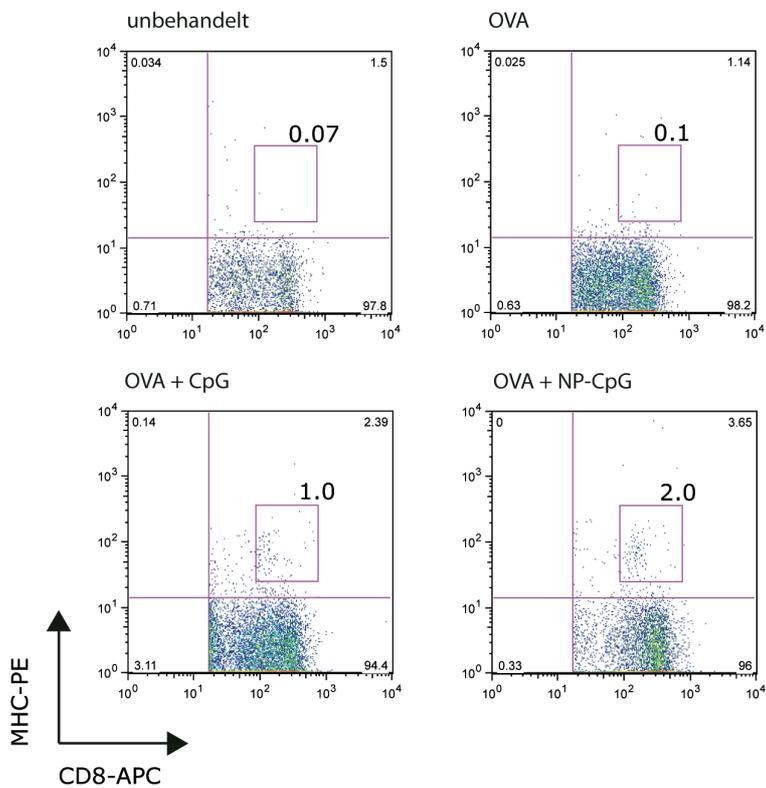
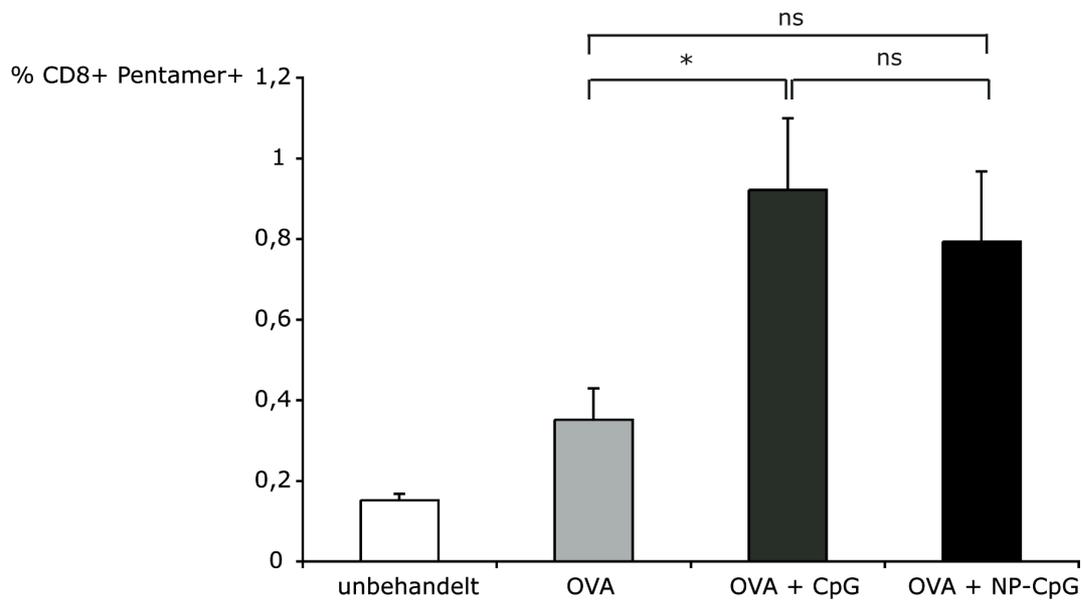
Wie gut ist das Potential der mit CpG beladenen Nanopartikel für die Induktion einer Langzeitimmunität in Mäusen? Um diese Fragestellung zu untersuchen verwendeten wir einen Versuchsaufbau mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA). Das Ovalbumin-Antigenmodell ist ein weitverbreitetes Modellsystem zur Untersuchung von Immunreaktionen. Ovalbumin ist ein sehr immunogenes Alloprotein, Hühnereiweiß ist einer der häufigsten Auslöser einer Nahrungsmittelallergie im Kindesalter (Kemp, 2007). Bei einer Vakzinierung mit Ovalbumin kann man schon ohne die Zugabe eines Adjuvans eine schwache antigenspezifische Immunreaktion beobachten. Es gibt weiterhin mehrere Tumormodelle, die durch genetische Modifikation Ovalbumin als synthetisches Tumorantigen exprimieren. C57BL/6-Mäuse wurden im Abstand von 2 Wochen zweimalig mit dem Modellantigen OVA entweder zusammen mit freiem CpG oder an Nanopartikel gebundenem CpG immunisiert. Danach wurde die humorale Immunantwort durch Bestimmung der OVA-spezifischen Antikörper untersucht. In Abbildung 4.12. sind die Ergebnisse der ELISA-Messung für die OVA-spezifische IgG-Antwort abgebildet. Dabei ist zu sehen, dass die IgG Antikörper sowohl bei der Applikation von freiem CpG als auch von Nanopartikel-gebundenem CpG und OVA im Vergleich zu alleiniger OVA-Gabe signifikant erhöht sind. In beiden Fällen kommt es also zur Ausbildung einer starken B-Zell-Immunantwort mit Antikörperbildung. Schlüsselt man die Antikörper noch in verschiedene IgG-Subklassen auf, ist vor allem die Bildung von IgG2a Antikörpern deutlich verstärkt nach Immunisierung mit CpG-beladenen Nanopartikeln. Antikörper der IgG1 Subklasse waren dagegen auch schon durch die Administration von OVA alleine erhöht. Die IgG2a Subklasse ist vor allem ein Anzeiger der  $T_H1$ -Immunantwort, während IgG1 Antikörper eher im Zusammenhang mit Opsonierung und Phagozytose gesehen werden (Janeway, 2005).



**Abbildung 4.10.:** Nach zweimaliger Immunisierung mit Ovalbumin, Ovalbumin + 100  $\mu\text{g}$  CpG oder OVA + 100  $\mu\text{g}$  CpG gebunden an Gelatine-Nanopartikel im Abstand von 14 Tagen wurde den Mäusen Blut abgenommen und im Serum die Immunglobuline IgG, IgG1 und IgG2a mittels Elisa bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der optischen Dichte (OD)  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant.

Zusätzlich studierte ich die Effekte auf die Generierung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen. Nach Immunisierung mit OVA und mit CpG-beladenen Nanopartikeln kommt es zu einem 4 bis 5-fachen Anstieg der für das MHC-I-beschränkte Peptid OVA<sub>257-264</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut. Wie in Abbildung 4.11. dargestellt, finden sich 0,8 % antigenspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach der Immunisierung im Vergleich zu 0,15 % bei nicht-immunisierten Tieren und 0,35 % bei Tieren die nur mit OVA, ohne Adjuvans immunisiert worden sind. Der Anteil an antigenspezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Immunisierung mit CpG und OVA war mit 0,92 % vergleichbar mit dem Anteil nach alleiniger Immunisierung mit CpG-Nanopartikeln. Mit CpG-beladene Nanopartikel können

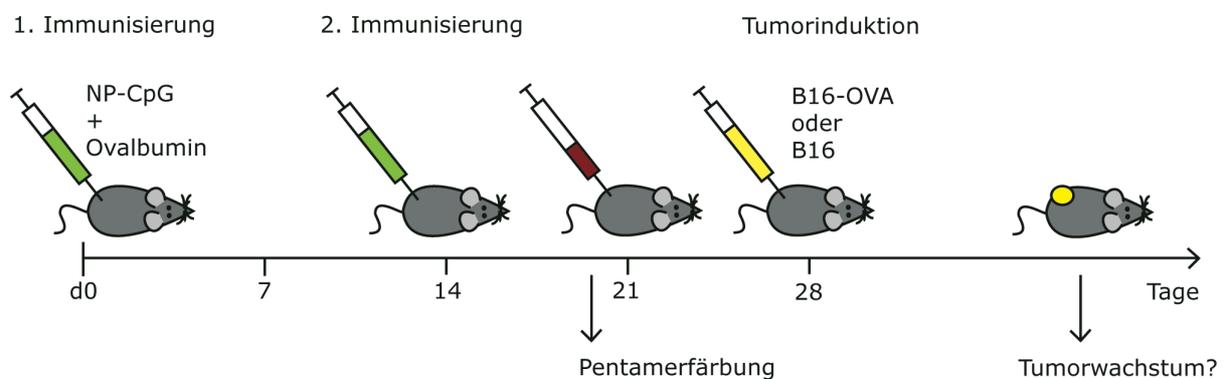
als Adjuvanzien eine antigenspezifische humorale und zelluläre Immunantwort hervorrufen. Gleichzeitig zeigen sie im Vergleich zu freiem CpG keine systemischen inflammatorischen Nebenwirkungen.



**Abbildung 4.11.:** Zweimalige Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen mit 50 µg OVA, 50 µg OVA + 100 µg freies CpG oder an Gelatine-Nanopartikel gebundenes CpG im Abstand von 14 Tagen. Als Kontrolle dienten unbeladene Gelatine-Nanopartikel. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der Ovalbumin-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>-CTLs) anhand der Bindung von H-2k<sup>b</sup>-OVA<sub>257-264</sub> Peptid-Pentameren bestimmt. A) Gezeigt werden die Mittelwerte +/- SEM des prozentualen Anteils an Pentamer-positiven CTLs (n = 5). \*: p < 0,05; ns: nicht signifikant. B) Exemplarische Darstellung der FACS-Bilder einzelner Mäuse.

#### 4.2.4. Immunität gegen einen antigenexprimierenden Tumor durch Immunisierung mit CpG-beladenen Nanopartikeln

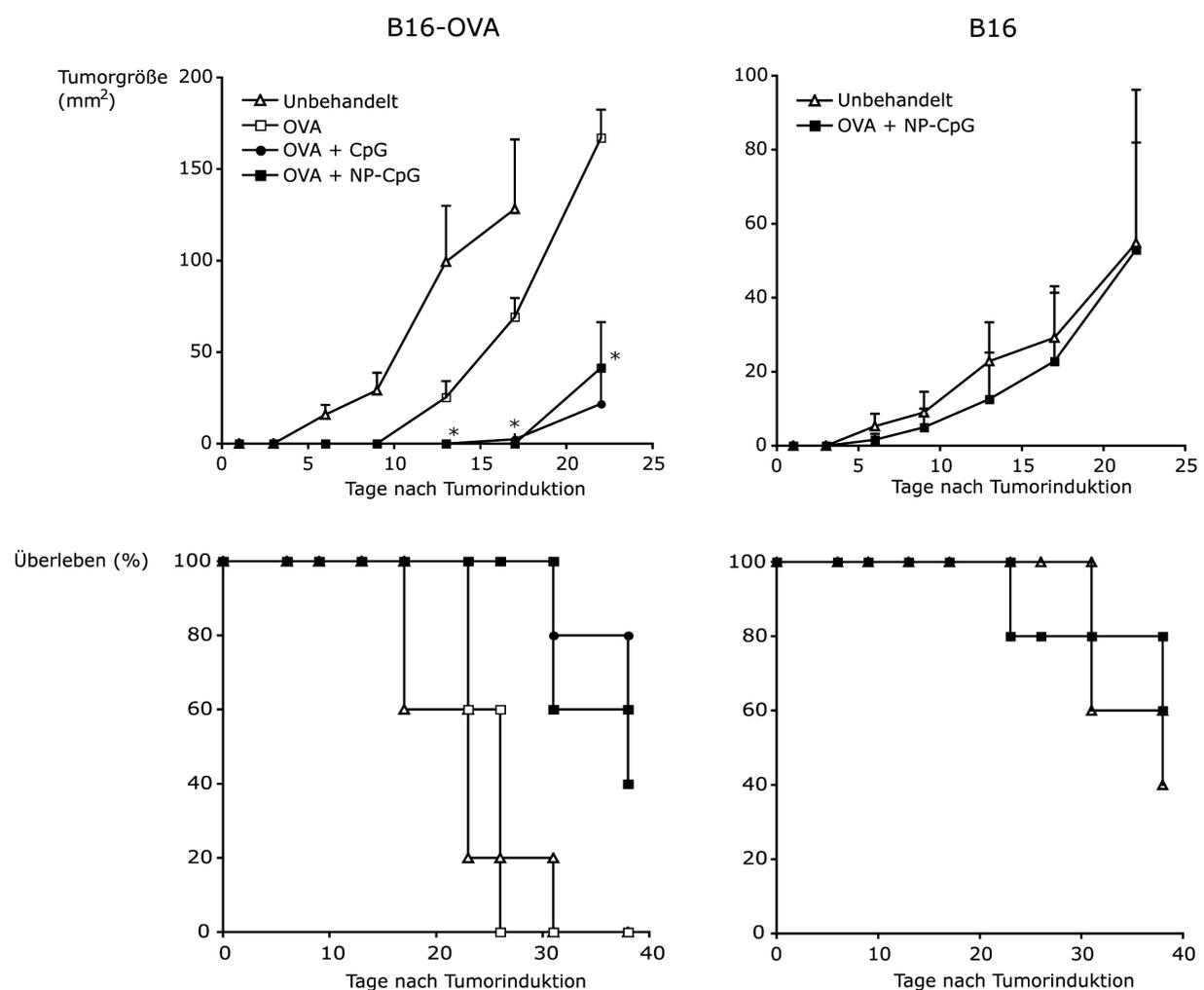
Um zu untersuchen, ob die beobachteten Erfolge bei der antigenspezifische Immunisierung auch gegen das Wachstum eines Tumors schützen, wurde bei den mit OVA und NP-CpG immunisierten Tieren ein antigentragender Tumor induziert. Hierfür wurde die OVA-exprimierende Melanomzelllinie B16-OVA benutzt. Als Kontrolle diene das elterliche Melanom B16.



**Abbildung 4.12.:** Zeitlicher Ablauf der Immunisierung mit Ovalbumin und CpG-beladenen Gelatine-Nanopartikel und nachfolgender Tumorinduktion.

In Abbildung 4.12. ist der zeitliche Ablauf der Immunisierungen, der Pentamerfärbung und der nachfolgenden Tumorinduktion verdeutlicht. Wie in Abbildung 4.13. zu sehen, ist das Wachstum des B16-OVA Tumors in Mäusen, die mit CpG-beladenen Nanopartikeln immunisiert wurden im Vergleich zu unbehandelten oder nur mit OVA immunisierten Mäusen deutlich verlangsamt. Das Wachstum der Tumoren der mit freiem CpG und OVA immunisierten Tiere entwickelt sich vergleichbar zur mit NP-CPG und OVA behandelten

Gruppe. In der Überlebenskurve zeigt sich eine signifikante Verlängerung des Überlebens der mit an Nanopartikeln gebundenem CpG behandelten Mäuse im Vergleich zu den nicht-immunisierten ( $p = 0,009$ ) oder den nur mit OVA immunisierten ( $p = 0,003$ ) Tieren. Bei Tieren, die den elterlichen Tumor B16 trugen, fand sich weder im Wachstum des Tumors noch in der Überlebenskurve ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-immunisierten Tieren und denen, die mit CpG beladenen Nanopartikeln und OVA immunisiert worden sind. Dies zeigt, dass die Immunisierung mit CpG-beladenen Nanopartikeln eine prophylaktische Immunität gegen das Wachstum eines antigenexprimierenden Tumors hervorrufen kann.



**Abbildung 4.13.:** Dreimalige Immunisierung mit 50 µg OVA, 50 µg OVA + 100 µg freies CpG oder an Gelatine-Nanopartikel gebundenes CpG im Abstand von 7 Tagen, einmalige Aufrisch-Immunisierung nach 2 Monaten. Als Kontrolle dienten unbeladene Gelatine-Nanopartikel. Nach Kontrolle der Immunisierung mittels Pentamer-Färbung wurden  $1 \times 10^6$  B16-OVA- oder B16 wt-Tumorzellen s.c. in die rechte Flanke injiziert und das Tumorwachstum beobachtet. A) Mittelwert der Tumorgröße +/- SEM ( $n = 5$ ). \*:  $p < 0,05$ . B) Überleben in % nach Tumorinduktion ( $n = 5$ ).



## 5. Diskussion

### 5.1. Immunstimulatorische RNA und NK-Zellen

#### 5.1.1. NK-Infiltration im Tumorgewebe

In den letzten Jahren wurde vermehrt der Zusammenhang zwischen der Infiltration von Immunzellen im Tumorgewebe und der Prognose der Erkrankung untersucht. So konnte gezeigt werden, dass eine Infiltration mit dendritischen Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ein guter prognostischer Marker ist und mit einem verlängerten Überleben korreliert (Naito, 1998; Kawai, 2008). Bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erwiesen sich regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>; CD25<sup>+</sup>; FoxP3<sup>+</sup>) als ungünstig in Bezug auf das Überleben (Curiel, 2004; Yu, 2006). Der Einfluss von NK-Zellen wurden in diesem Kontext bisher wenig untersucht. Es gibt allerdings einige Studien, die mittels Immunhistochemie nach chirurgischer Resektion die Infiltration humaner solider Tumoren mit NK-Zellen untersuchen und eine erhöhte NK-Infiltration mit positivem Überlebensvorteil verknüpfen. Dies wurde unter anderem für Prostata-Karzinome (Gannon, 2009), das Magenkarzinom (Ishigami, 2000), Bronchialkarzinome (Villegas, 2002) und kolorektale Karzinome (Coca, 1997) belegt. In diesem Zusammenhang wurde allerdings nie der Aktivierungszustand der infiltrierenden NK-Zellen analysiert. Weiterhin wurde in einer aktuellen Publikation gezeigt, dass bei fehlender NK-Migration in das Tumorgewebe das Tumorwachstum verschiedener muriner Tumoren verstärkt ist. Hierfür wurde ein Mausmodell mit defekter Expression von Selektinen, welche für die Migration von Lymphozyten von großer Bedeutung sind, verwendet (Sobolev, 2009). Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Infiltration von Tumorgewebe mit NK-Zellen für die Immuntherapie.

In der hier vorliegenden Arbeit untersuchte ich den Anteil von NK-Zellen im Tumorgewebe nach mehrfacher Applikation von immunstimulatorischer RNA. Dabei konnte ich feststellen, dass sich der Anteil der NK-Zellen im Tumorgewebe durch die Anwendung der RNA nicht veränderte. Die im Tumor vorhandenen NK-Zellen waren jedoch im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren zu einem höheren Prozentsatz aktiviert. Dies lässt darauf schließen, dass durch die RNA-Applikation zwar nicht das Einwandern der NK-Zellen ins Tumorgewebe verstärkt wird, sich aber der Aktivierungszustand der infiltrierenden NK-Zellen erhöht. Welcher Unterschied in der prognostischen Bedeutung zwischen dem reinen Vorhandensein und dem Grad der Aktivierung der infiltrierenden NK-Zellen besteht, wurde bisher noch nicht untersucht. Da

ich jedoch zeigen konnte, dass sich durch die immunstimulatorische RNA nur der Aktivierungszustand der infiltrierenden NK-Zellen erhöht, nicht jedoch die Infiltration, und es gleichzeitig zu einer Reduktion des Tumorwachstums kam, kann man vermuten, dass die Präsenz der NK-Zellen alleine nicht ausreicht, sondern es zusätzlich zu einer Aktivierung der Zellen kommen muss, um die antitumorale Wirkung zu entfalten.

### 5.1.2. NK-Aktivierung unter Immunsuppression

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Behandlung von gesunden Mäusen mit immunstimulatorischer RNA zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt. Daraufaufbauend konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es auch in tumortragenden Mäusen zu einer Aktivierung von NK-Zellen kommt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da es im Laufe einer Tumorerkrankung häufig zur Entstehung einer lokalen und systemischen Immunsuppression kommt, welche das weitere Voranschreiten der Erkrankung fördert. Die Entwicklung der Interaktionen des Immunsystems mit den entarteten Zellen hin zu einer Immunsuppression wurde 2002 von Dunn et al. durch das dreistufige Konzept des *cancer immunoediting* beschrieben (Dunn, 2002; Dunn, 2004). Es besagt, dass das Immunsystem sowohl den Tumor bekämpft als auch gleichzeitig durch Selektion von resistenten Tumorzellen das Tumorwachstum fördert. Dieser dreistufige Prozess gestaltet sich wie folgt:

1. Das Immunsystem eliminiert entartete Zellen, die Entstehung einer Tumorerkrankung wird verhindert.
2. Es besteht ein Equilibrium zwischen beiden Gegenspielern, dabei entwickeln sich durch Selektion vermehrt Tumorzellen, die gegen die Angriffe des Immunsystems resistent sind.
3. Resistente Tumorzellen entkommen dem Immunsystem, die Tumorerkrankung schreitet fort.

Auf der dritten Stufe dieses Prozesses wirken verschiedene Mechanismen zusammen, sodass der Tumor dem Immunsystem entkommt (*tumor immune escape*). Die Tumorzellen haben dann

- a) mögliche Angriffspunkte für Immunzellen verloren (MHC-I-Komplexe, TAAs, kostimulatorische Moleküle),

- b) exprimieren verstärkt inhibitorische Rezeptoren oder solche die Apoptose bei Kontaktzellen auslösen können (Rouas-Freiss, 2007),
- c) sezernieren lösliche immunsuppressive Faktoren (sMICA (Bauer, Groh et al., 1999; Groh, 2002), sULBP 1-4 (Pende, 2002; Song, 2006)) und Zytokine (TGF- $\beta$  (Gorelik, 2001; Li, 2006), IL-10 (Moore, 2001)) und
- d) rekrutieren und induzieren regulatorische CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>reg</sub>), tumorassoziierte Makrophagen, immature DCs und myeloide Suppressorzellen in die Umgebung des Tumors (Poggi, 2006; Bronte, 2009).

Vor allem die Effekte dieser Immunsuppression auf das adaptive Immunsystem und die dadurch unterdrückte Entwicklung einer antigenspezifischen Immunantwort wurden verstärkt untersucht. Aber auch NK-Zellen sind von supprimierenden Strategien der Tumorzellen betroffen. In den letzten Jahren wurde beispielsweise entdeckt, dass HLA-G, ein nicht-klassisches MHC-I-Molekül, das hauptsächlich vom Trophoblasten der fetalen Plazenta exprimiert wird und Toleranz beim mütterlichen Immunsystem induziert, verstärkt von Tumorzellen exprimiert wird. HLA-G beeinflusst dabei die Funktion von NK-Zellen, aber auch T- und B-Zellen sowie APCs (Rouas-Freiss, Moreau et al., 2007). Die Bindung von HLA-G an inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen führt zu verminderter zytolytischer Aktivität von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (Pazmany, 1996; Soderstrom, 1997). Dieser neue Mechanismus der tumoralen Immunsuppression wurde zuerst für das Maligne Melanom beschrieben (Paul, 1998), gilt aber auch für verschiedenen andere Malignome wie z.B. Glioblastome (Wiendl, 2002), Nierenzellkarzinome (Bukur, 2003), Ovarialkarzinome (Menier, 2009), kolorektale Karzinome (Ye, 2007), nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (Yie, 2007) und andere.

Ich konnte beweisen, dass die Applikation von immunstimulatorischer RNA in tumortragenden Mäusen zu einer Aktivierung der NK-Zellen im Blut und im Tumorgewebe führt. Die supprimierenden Einflüsse des Malignoms auf die Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem die hier beteiligten dendritischen Zellen und NK-Zellen, scheinen sich durch die Behandlung mit immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotiden reduzieren zu lassen. Schließlich konnte ich zeigen, dass es nicht nur zu einer Aktivierung der NK-Zellen kommt, sondern auch zu einer NK-vermittelten Reduktion des Tumorwachstums. Die NK-Zellen werden also durch die immunstimulatorische RNA wieder in die Lage versetzt, die ihnen eigene Funktion zu erfüllen und Zielzellen zu eliminieren.

### 5.1.3. Antitumorale Wirkung durch aktivierte NK-Zellen

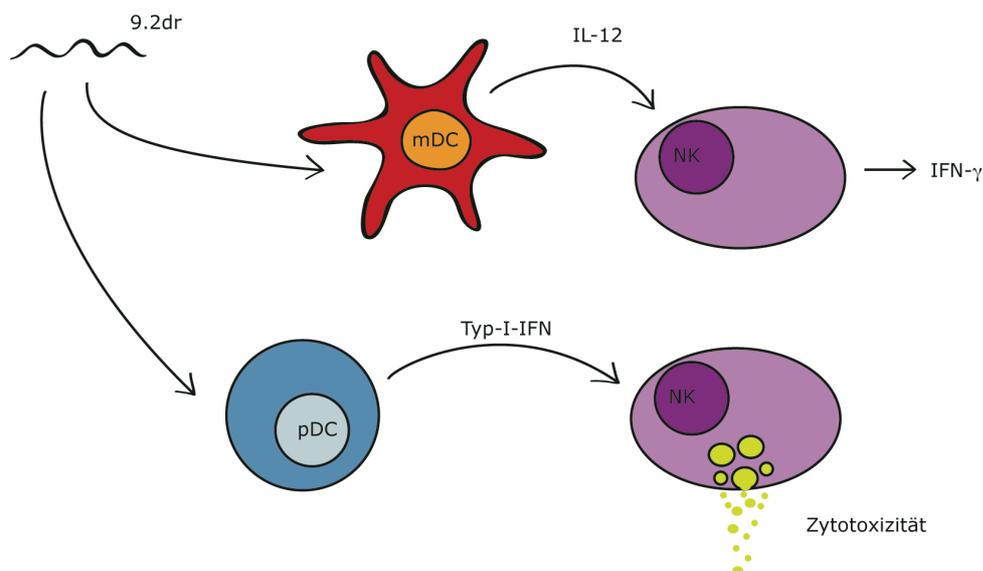
In der hier vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die intravenöse Applikation von immunstimulatorischer RNA das Wachstum eines murinen NK-sensitiven Tumors reduziert. Zwei Hauptwirkungsweisen sind für die antitumorale Aktivität der NK-Zellen beschrieben, zum einen die Zytotoxizität und zum anderen die Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen, vor allem IFN- $\gamma$  (Caligiuri, 2008; Vivier, 2008). Beide Mechanismen sind essentiell für die antitumorale Aktivität und wirken komplementär zueinander. Durch die Zytotoxizität können Tumorzellen direkt eliminiert werden. Die Sekretion von immunmodulatorischen IFN- $\gamma$  verstärkt dagegen die antitumorale Wirkung von anderen Immunzellen. Es kommt zur Aktivierung von APCs und Makrophagen sowie zur Induktion einer T<sub>H</sub>1-Anwort durch T-Zellen. Gleichzeitig wirkt IFN- $\gamma$  antiproliferativ auf viral infizierte oder entartete Zellen. Auch die Entwicklung einer adaptiven T-Zell-Antwort kann durch NK-Zellen induziert werden (Kelly, 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel mit einer besseren Prognose einer Tumorerkrankung korrelieren (Dunn, Bruce et al., 2002; Terme, 2008). Eine aktuelle Studie von Dumitru et al. belegt die Wichtigkeit der Produktion von IFN- $\gamma$  für die Aktivität von NK-Zellen gegen einen Tumor. In einem murinen Lungenmetastasenmodell war IFN- $\gamma$  der entscheidende Faktor für die Inhibierung des Metastasenwachstums durch einen TLR7/-8-Agonisten (Dumitru, 2009).

Die beiden beschriebenen Effektorfunktionen werden jeweils von verschiedenen Subtypen der humanen NK-Zellen ausgeübt. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen wirken zytotoxisch: Neben direkter Zellyse durch Perforin und Granzyme, können sie Fas- oder TRAIL-abhängig Apoptose induzieren oder mit opsonierenden Antikörpern beladene Zellen über antikörpervermittelte Zytotoxizität (ADCC) eliminieren. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sezernieren dagegen IFN- $\gamma$  (Cooper, 2001; Jacobs, Hintzen et al., 2001; Caligiuri, 2008). Im murinen System exprimieren die NK-Zellen kein CD56, sie werden deshalb anhand von CD11b und CD27 klassifiziert. CD11b<sup>+</sup> CD27<sup>+ /dull</sup> NK-Zellen weisen Analogien zu den humanen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen auf, während murine CD11b<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> NK-Zellen eher den humanen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen entsprechen (Vivier, Tomasello et al., 2008). Trotz der Unterschiede in der Oberflächenexpression, findet sich auch bei murinen NK-Zellen eine Unterscheidung in zytotoxische und IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen.

In *In-vivo*-Zytotoxizitätsuntersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass NK-Zellen nach der Applikation von immunstimulatorischer RNA  $\beta$ 2m-defiziente Zielzellen lysieren (Bourquin et al., 2009). Dies spricht für eine direkte zytotoxische Wirkung auf

die Tumorzellen. Die Tatsache, dass ich aktivierte NK-Zellen im Tumor nachweisen konnte, also an dem Ort an dem die Zytotoxizität gefragt ist, unterstützt diese Annahme zusätzlich. Um den genauen Mechanismus zu erhellen, wäre es nötig funktionsspezifische Merkmale zu untersuchen. So könnte man im Gewebe behandelter Tumoren immunhistochemisch Perforin und Granzyme nachweisen und so den Anteil zytotoxischer Effektorzellen nach Injektion immunstimulatorischer RNA bestimmen. Da wir weiterhin beobachten konnten, dass *in vivo* mit immunstimulatorischer RNA behandelte NK-Zellen IFN- $\gamma$  produzieren (Bourquin et al., 2009), ist ein synergistischer Effekt der IFN- $\gamma$ -Sekretion und der direkten Zytotoxizität auf das Tumorwachstum wahrscheinlich.

Die beiden Wirkungsweisen - Zytotoxizität und IFN- $\gamma$ -Produktion - können nicht nur verschiedenen NK-Subtypen zugeordnet werden, auch ihre Aktivierung verläuft unterschiedlich. So wird die Zytotoxizität hauptsächlich durch Typ-I-Interferone stimuliert, während IL-12 zur Produktion von IFN- $\gamma$  führt. Diese mechanistische Trennung konnte durch unsere Arbeitsgruppe auch für die Aktivierung durch immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide bewiesen werden (Bourquin et al., 2009). Wie in der Einleitung unter 1.1.1.2 erläutert unterscheiden sich auch die dendritischen Zellen als Quelle der NK-aktivierenden Zytokine in zwei Subtypen (myeloide und plasmazytoide DCs). Zusammengenommen ergibt sich für die Aktivierung und Funktionen der NK-Zellen das in Abbildung 4.1. gezeichnete Bild.



**Abbildung 5.1.:** Schematische Darstellung der Aktivierung von NK-Zellen durch mDCs und pDCs nach Kontakt mit immunstimulatorischer RNA und die darauffolgenden unterschiedlichen Reaktionsmuster der NK-Zellen. mDC: myeloide dendritische Zelle; pDC: plasmazytoide dendritische Zelle.

#### 5.1.4. NK-Zellen versus CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Die beiden Effektorzelltypen des Immunsystems, zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen, sind die hauptsächlichen Vermittler von antitumorale Aktivität. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Aktivierungsmechanismus und dem zeitlichen Profil ihrer Wirkung. Zytotoxische T-Zellen werden durch antigenpräsentierende Zellen in den Lymphknoten aktiviert und wandern dann in den Tumor ein. Dies erfordert die Detektion eines Antigens durch antigenpräsentierende Zellen, die Reifung und Migration der APCs in die Lymphknoten. Dort müssen sich die Wege der T-Zelle und einer mit dem passenden Antigen beladenen dendritischen Zelle kreuzen und die beiden zur Interaktion kommen. Dies, wie auch die darauffolgende klonale Proliferation und Migration der T-Zellen braucht Zeit (Williams, 2007). NK-Zellen hingegen wurden immer als die schnelle Eingreiftruppe des Immunsystems verstanden, welche auch ohne *priming* Zielzellen attackieren können. Erst in letzter Zeit wurde gezeigt, dass auch NK-Zellen eine Art Voraktivierung benötigen. Diese wird durch dendritische Zellen vermittelt und braucht je nach Subtyp der beteiligten DCs und NK-Zellen Typ-I-Interferone oder IL-12, immer jedoch IL-15 (Lucas, Schachterle et al., 2007; Ferlazzo, 2009) (siehe auch Abbildung 5.1.). Danach ergibt sich ein 2-stufiger-Prozess zum Erreichen der vollen Wirksamkeit der NK-Zellen: (1) Voraktivierung durch DCs, (2) Ausführung der Effektorfunktion nach Triggerung über aktivierende Rezeptoren. Dieser Vorgang nimmt jedoch insgesamt weniger Zeit in Anspruch als die Generierung und Expansion von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen. In einem Versuch zum zeitlichen Verlauf der *in vivo* NK-Aktivierung konnte ich zeigen, dass die NK-Zellen schon nach weniger als 2 d maximal aktiviert sind. In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe konnte außerdem gezeigt werden, dass es schon 4 h nach der Injektion von immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotiden zu einer Verdoppelung der IFN  $\gamma^+$  NK-Zellen kam (Bourquin et al., 2009). Schaut man sich weiterhin die Wachstumskurven des NK-sensitiven RMA-S-Lymphoms an sieht man, dass die Kurven unter Behandlung mit 9.2dr schon von Anfang an im Vergleich zu unbehandelten Tieren deutlich verlangsamt laufen. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die frühe antitumorale Aktivität hier durch NK-Zellen vermittelt wird und nicht durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.

Um zu differenzieren, welche dieser beiden Zellentypen für den in meinen Versuchen beobachteten Rückgang des Tumorwachstums verantwortlich ist, depletierte ich sowohl NK-Zellen als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vor Therapiebeginn. Dabei konnte ich in den ersten 14 Tagen einen klaren Einfluss der NK-Zellen beweisen. Verfolgt man das Tumorwachstum allerdings über einen längeren Zeitraum, kann man beobachten, dass die T-Zell-Antwort an Bedeutung gewinnt, während der Einfluss der NK-Zellen sich verliert: die CD8-depletierten Tiere zeigten dann ein schnelleres Tumorwachstum, während sich die Tumorwachstumskurve der NK-depletierten Tiere wieder verlangsamt (Bourquin et al., unveröffentlichte Daten). Dies ist kohärent mit früheren Ergebnissen, bei denen immunstimulatorische RNA eine antigenspezifische Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen hervorruft (Bourquin et al., 2007). Durch immunstimulatorische RNA lässt sich somit sowohl der angeborene als auch adaptive Arm des Immunsystems aktivieren und für die Immuntherapie synergistisch nutzen.

## 5.2. Immuntherapie mit NK-Zellen

### 5.2.1. NK-Zellen als therapeutisches Ziel in der Immuntherapie: Unsere Strategie im Kontext bisheriger Ansätze

Während sich die Forschung zur Immuntherapie anfänglich hauptsächlich auf T-Zellen konzentrierte, haben NK-Zellen in dem Maße wie auch ihre zellulären Eigenschaften besser verstanden werden als therapeutisches Ziel in der Immuntherapie mehr und mehr Aufmerksamkeit gewonnen. Schon jetzt spielen sie eine wichtige Rolle in der Krebstherapie, wird doch die Wirkung von monoklonalen Antikörpern zu einem großen Teil über Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) durch NK-Zellen vermittelt (Clynes, 2000). Mittlerweile gibt es jedoch eine Reihe von Ansätzen, deren therapeutisches Ziel die NK-Zellen sind und die sich daher auf die Aktivierung von NK-Zellen konzentrieren.

1. Zytokintherapie: Zytokine wurden schon früh in der Immuntherapie maligner Erkrankungen untersucht, vor allem Interferone und Interleukin-2 (IL-2) waren dabei im Fokus experimenteller Studien. IL-2, ursprünglich als T-Zell-Wachstumsfaktor beschrieben (Morgan, 1976), wurde zur Stimulierung von T-Zellen *ex* und *in vivo* eingesetzt (Rosenberg, 1985). Es zeigte sich aber, dass es durch die *In-vivo*-Anwendung von IL-2 auch zu einer Vermehrung der NK-Zellen kommt (Caligiuri, 1991). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-2 zur Aktivierung von NK-Zellen führt, die daraufhin eine

antitumorale Wirkung entfalten (Robinson, 1987; Egilmez, 1998; Whiteside, 1998). Klinische Studien zum Potential von NK-Zellen in der Immuntherapie untersuchten daraufhin auch die Verwendung von IL-2 (Phillips, 1987). Unter der Applikation von niedrig dosiertem IL-2 – IL-2 wirkt in hohen Dosen toxisch – zeigte sich jedoch hauptsächlich eine Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, also des Subtyps der eher immunmodulatorisch als zytotoxisch wirkt (Caligiuri, 1993). Dies könnte die im Gesamten gesehen eher mangelhaften Ergebnisse der systemischen IL-2-Therapie zum Teil erklären. In letzter Zeit wurde deshalb in Studien zur antitumoralen Wirkung der auf NK-Zellen zielenden niedrig dosierten IL-2-Therapie auch Kombinationen mit anderen Zytokinen wie IL-12 (Rossi, 1994), IL-15 (Fujisaki, 2009), IFN- $\alpha$  (Atzpodien, 1993; Pavone, 2001) oder auch Histamin (Donskov, 2006) untersucht (Sutlu, 2009).

2. Adoptiver Transfer: Der adoptive Transfer von autologen oder allogenen NK-Zellen, die *ex vivo* expandiert und aktiviert werden, ist der zweite große klinische Focus in der NK-gerichteten Immuntherapie. Hierbei sind große Unterschiede in der Dauer der Expansion und der Art der Aktivierung in den verschiedenen Studien zu finden. Gerade bei der Verwendung von autologen Zellen muss erst die durch den Tumor induzierte Suppression der körpereigenen NK-Zellen durchbrochen werden. Zu Beginn standen Studien mit adoptivem Transfer von autologen LAK-Zellen (*lymphokine-activated killer cells*), die zu einem Großteil aus NK-Zellen bestehen. Diese waren allerdings nur eingeschränkt erfolgreich (Rosenberg, Lotze et al., 1985). Auch der Transfer von autologen *ex vivo* expandierten NK-Zellen erwies sich zwar als sicher, zeigte aber keine starken antitumoralen Effekte (Burns, 2003; Ishikawa, 2004). Dies könnte an der Suppression autologer NK-Zellen durch Signale inhibitorischer Rezeptoren (z.B. KIR) nach Erkennung von „Selbst-Molekülen“ (MHC-I) liegen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei der Therapie einer Leukämie durch Knochenmarkstransplantation, ein größerer antileukämischer Effekt erreicht wurde, wenn die NK-Zellen des Spenders ein KIR (*killer cell immunoglobuline-like receptor*)-Profil trugen, das eine höhere Zytotoxizität gegenüber den Leukämiezellen des Empfängers zeigte (*KIR mismatch*) (Ruggeri, 2002; Giebel, 2003; Velardi, 2009). Aktuell wird deshalb verstärkt der adoptive Transfer von allogenen NK-Zellen untersucht. Diese erzielten vor allem nach einer vorbereitenden Chemo- oder Radiotherapie gute Ergebnisse (Miller, 2005; Ljunggren, 2007).

NK-Zellen sind neben ihrer Funktion als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems auch in der Lage eine antigenspezifische adaptive T-Zell-basierte Immunantwort auszulösen (Kelly, Darcy et al., 2002). Mehrere aktuelle Studien in Mäusen weisen

zusätzlich darauf hin, dass auch NK-Zellen eines der typischen Kriterien des adaptiven Immunsystems erfüllen: die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses nach Kontakt mit einem Antigen (O'Leary, 2006; Cooper, 2009; Sun, 2009; Ugolini, 2009). Lassen sich diese Ergebnisse auf Menschen übertragen, wird dies die Bedeutung der NK-Zell-basierten Immuntherapie noch weiter verstärken.

Grundsätzlich ist es für jede Art der NK-Zell-vermittelten Immuntherapie wichtig zu determinieren, welche Tumoren überhaupt sensitiv für einen NK-Angriff sind. So erscheint es unerlässlich, die Expression von MHC-I und potentieller Liganden für die aktivierenden Rezeptoren zu bestimmen. Das humane Nierenzellkarzinom (RCC) zeigt zum Beispiel schlechte Voraussetzungen für eine NK-basierte Immuntherapie, da es keine Reduktion in der MHC-I Expression zeigt und im Einklang damit auch eine nur geringe Infiltration mit NK-Zellen bewiesen werden konnte (Sconocchia, 2009).

### 5.2.2. Immuntherapie mit TLR7-Agonisten: Vergleich mit Imiquimod

Mit den Imidazoquinolinen werden bereits heute TLR7/-8-Agonisten zur topischen Therapie von Tumoren der Haut verwendet. Es ergeben sich für die *In-vivo*-Anwendung jedoch mindestens zwei grundlegende Unterschiede zu den hier verwendeten immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotiden. Es handelt sich hierbei zum einen um den Wirkmechanismus und zum anderen um die Pharmakokinetik.

Für die Imidazoquinoline ist bekannt, dass der Wirkmechanismus neben TLR7 und -8 auch über andere Rezeptoren und Signalwege vermittelt wird. So aktivieren Imidazoquinoline das NALP3-Inflammasom und führen so zur Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-18 (Kanneganti, 2006). Gorski et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von NK-Zellen nach Imidazoquinolinguabe zu einem Großteil durch IL-1 $\beta$  und IL-18 vermittelt wird (Gorski, 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es durch die antagonistische Wirkung von Imiquimod am A<sub>2A</sub>-Adenosinrezeptor und gleichzeitige rezeptorunabhängige Inhibierung der Adenylatzyklase zu einer intrazellulär reduzierten cAMP-Konzentration kommt. cAMP unterdrückt proinflammatorische Prozesse durch Inhibierung von intrazellulären Signalkaskaden (Sitkovsky, 2004). Imiquimod verstärkt über diesen Mechanismus inflammatorische Reaktionen (Schon, 2006). Weiterhin kann Imiquimod über Bcl-2 und die Aktivierung von Caspase-9 proapoptotisch wirken und dadurch das Tumorstadium negativ beeinflussen (Schön, 2004; Meyer, 2003). In mehreren *In-vivo*-Studien konnte außerdem auch ein antiangiogenetischer Effekt durch Imiquimod beobachtet werden. Dieser wird durch verschiedenen Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , und IL-

18 vermittelt (Majewski, 2005; Li, 2008). Die topische Administration von Imiquimod wird mittlerweile auch in der Therapie des infantilen Hämangioms untersucht (Sidbury, 2003; McCuaig, 2009).

Wir konnten hingegen durch Versuche mit TLR7-knockout-Mäusen zeigen, dass die Wirkung von immunstimulatorischer 9.2dr-RNA ausschließlich TLR7-abhängig ist. In TLR7<sup>-/-</sup> Mäusen findet keine NK-Aktivierung durch die immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotide statt, durch adoptiven Transfer von Wildtyp dendritischen Zellen (TLR7<sup>+/+</sup>) lässt sich jedoch die Aktivierung wieder herstellen (Bourquin et al., 2009).

Imidazoquinoline sind nur zur topischen Tumortherapie zugelassen. Es ist aktuell nicht klar, ob sie auch zur systemischen Immuntherapie solider Tumoren eingesetzt werden können. Die bisherigen Daten dazu sind inkonsistent. So konnten Dumitru et al. zwar einen systemischen Effekt in einem Lungenmetastasenmodell nach Behandlung mit dem TLR7/-8 Liganden 3M-011 nachweisen (Dumitru, Antonysamy et al., 2009), in einem aktuellen Artikel konnten Broomfield et al. jedoch demonstrieren, dass die Anwendung von Imiquimod alleine nicht ausreicht um eine systemische Immunantwort zu generieren. Systemische Behandlung mit Imiquimod hatte keinen Effekt auf das Tumorwachstum eines soliden Tumors. Topische (intratumorale) Therapie konnte zwar das Wachstum des behandelten Tumors reduzieren, hatte aber auch keinen Einfluss auf einen zweiten Tumor an anderer Lokalisation (Broomfield, 2009). Außerdem war der Effekt auf das Wachstum eines B16 Melanoms in der Studie von Dumitru et al. hauptsächlich IFN- $\gamma$  abhängig, während die Wirksamkeit der immunstimulatorischen RNA sowohl über IFN- $\gamma$  als auch durch direkte Zytotoxizität vermittelt wird (Bourquin et al., 2009).

Ein zusätzliches Problem der *immune response modifiers* wie z.B. Imiquimod ist ihre nur kurze Halbwertszeit, die eine häufige Anwendung erfordert. Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass eine einmalige intravenöse Injektion des Oligonukleotides zu einer schnellen und 2 Tage anhaltenden Aktivierung der NK-Zellen führt. Auch konnten wir in weiteren Versuchen zeigen, dass sich selbst nach mehrmaliger Anwendung keine Tachyphylaxie einstellt (Bourquin et al., 2009).

Ein Vorteil der immunstimulatorischen Oligonukleotide ist, dass die RNA Moleküle so modifiziert werden können, dass sie mehrere immunstimulatorische oder antitumorale Mechanismen in sich vereinen. So konnten Poeck et al. synergistische Effekte durch die Kombination von verschiedenen Eigenschaften in einem Molekül erreichen: sie

entwickelten eine siRNA zum *knock-down* des anti-Apoptose Gens *bcl2*, die gleichzeitig durch ihre 5'-Triphosphat-Endung am zytosolischen Mustererkennungsrezeptor RIG-I immunstimulatorisch wirkt (Poeck, 2008). Die Entwicklung eines multifunktionalen Moleküls wäre auch für die hier untersuchte 9.2dr-RNA denkbar.

### 5.2.3. Aussagekraft des murinen NK-empfindlichen Tumormodells für humane Tumoren

Das hier verwendete Tumormodell zeichnet sich durch seine Sensibilität für den Angriff von NK-Zellen aus. Die NK-Sensitivität des RMA-S-Lymphoms kommt durch eine Mutation im TAP-Transporter zustande, dies mündet letztendlich in einer fehlenden MHC-I-Expression. Malignome verfügen grundsätzlich über verschiedenste Mechanismen der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Sehr effizient ist der schon in den neunziger Jahren beschriebene Verlust der MHC-Oberflächenexpression. Es können hierbei alle Bestandteile der antigenprozessierenden Maschinerie betroffen sein: das Proteasom, der TAP-Transporter, der MHC-I Komplex,  $\beta$ 2-Mikroglobulin etc. Mutationen oder Verlust der Expression von TAP 1 oder 2 wurden unter anderem bei kleinzelligem Bronchialkarzinom (Chen, 1996; Restifo, 1993), bei Brustkrebs (Kaklamanis, 1995) und beim malignen Melanom (Maeurer, 1996) beschrieben. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tumormodell repräsentiert somit einen typischen Mechanismus der *immune escape* humaner Tumoren, dem Verlust von Oberflächenerkennungsmerkmalen für den Angriff durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.

### 5.2.4. RNA versus CpG oder TLR7 versus TLR9

CpG-DNA wurde als erster TLR-Agonist aufgrund seiner starken immunstimulatorischen Effekte als Adjuvans in der Immuntherapie erforscht. In verschiedenen Untersuchungen fanden sich vielversprechende Ergebnisse mit CpG als Einzelsubstanz in der Therapie muriner Tumoren (Heckelsmiller, 2002; Kawarada, 2001). Auch im Menschen zeigte sich CpG als potenter Induktor der IFN- $\gamma$ -Produktion und einer antigenspezifischen Immunantwort (Speiser, 2005). Die Verwendung als singuläres Agens in der Tumorthherapie im Rahmen von Phase I und II Studien war jedoch bisher eher enttäuschend. Es zeigten sich zwar antitumorale Effekte und partielles Ansprechen, doch nur selten komplette Remissionen (Kim, 2004; Carpentier, 2006; Pashenkov, 2006). Um dies besser zu verstehen ist es interessant die Unterschiede in der zellulären Verteilung von TLR9 in Mensch und Maus zu betrachten. In der Maus wird TLR9 sowohl auf

myeloiden DCs (mDCs) als auch auf plasmazytoiden DCs (pDCs) exprimiert, im Menschen findet er sich jedoch nur auf pDCs und B-Zellen, nicht hingegen auf mDCs (Hartmann, 1999; Bauer, 2001; Hornung, 2002). mDCs sind eine wichtige Quelle für IL-12, welches eines der potentesten Zytokine zur Induktion einer antitumoralen Immunität ist. Die fehlende Stimulation von mDCs durch TLR9-Agonisten könnte zu den hinter den Erwartungen zurückbleibenden Ergebnissen mit CpG in der Immuntherapie von humanen Tumoren beitragen. Anders ist die Situation für TLR7 und -8. In Mäusen ist nur der auf mDCs exprimierte TLR7 funktional. Im humanen Immunsystem findet sich TLR7 auf pDCs und B-Zellen, TLR8 hingegen auf mDCs und Monozyten sowie den aus Monozyten entstehenden DCs, Makrophagen und Langerhanszellen. (Hornung, Rothenfusser et al., 2002; Gorden, Gorski et al., 2005). Dadurch könnten TLR7/-8-Agonisten im Gegensatz zu TLR9-Agonisten im humanen System einen größeren Einfluss auf das Entstehen einer potenten und spezifischen Immunantwort haben.

#### 5.2.5. Resümee I

Die hier untersuchte 9.2dr-RNA ist durch die Stimulation von TLR7 ein potenter Aktivator von NK-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit immunstimulatorischer RNA eine NK-Zell-vermittelte antitumorale Wirkung entsteht, welche das Wachstum eines Tumors zurückdrängen kann. Eine Krebserkrankung kann außer in den frühesten Stadien, wenn der Tumor noch chirurgisch greifbar ist, selten mit nur einer Therapieform alleine geheilt werden. Mit der hier aufgezeigten neuen Strategie zur Aktivierung von NK-Zellen können sowohl die bisherigen Ansätze in der Immuntherapie mit NK-Zellen unterstützt werden als auch die anderen immunologischen nicht NK-basierten Tumortherapien. Die zytolytische Wirksamkeit monoklonaler Antikörper könnte durch immunstimulatorische RNA verstärkt werden. Für Tumorstoffe bietet sich die Möglichkeit zur Stimulierung der dendritischen Zellen ein neues, potenteres Adjuvans an der Hand zu haben. Und auch beim adoptiven Transfer können sowohl NK- als auch T-Zellen durch Behandlung mit RNA-Oligonukleotiden maximal aktiviert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TLR7-aktivierende RNA-Oligonukleotide großes Potential als zukunftsweisende Immunstimulanzien in der Therapie humaner Tumoren besitzen.

## 5.3. Gelatine-Nanopartikel

### 5.3.1. Gelatine-Nanopartikel: ein neues Trägersystem

Um therapeutische Oligonukleotide wie immunstimulatorische RNA in die Zelle, dem Ort ihrer Wirkung zu transportieren, benötigt man Transfektionsreagenzien, wie die in den Versuchen mit 9.2dr-RNA benutzen Lipoplexe (DOTAP). Die bisher verwendeten Transfektionsreagenzien, kationische Lipo- und Polyplexe, bringen jedoch eine noch immer erhebliche Toxizität mit sich. Eine neuere Transfektionsmethode ist die Verwendung von biologisch abbaubaren Polymeren, deren Oberfläche mit Nukleinsäuren beladen wird. Die in dieser Arbeit untersuchten Gelatine-Nanopartikel sind Prototypen solcher biologisch abbaubarer Polymere. Gelatine als Grundstoff für Nanopartikel vereint viele Vorzüge: es ist kostengünstig, leicht herstellbar, biologisch abbaubar, nicht immunogen und wird seit Jahren in der Medizin verwendet, ist also erwiesenermaßen sehr sicher (Zwiorek, Kloeckner et al., 2005). Weiterhin zeigten sich in den bisherigen Studien keine toxischen Nebenwirkungen (Zwiorek, Bourquin et al., 2008).

Im Folgenden sollen Gelatine-Nanopartikel im Hinblick auf ihre Funktion mit den schon etablierten Trägersystemen verglichen werden:

Lipo- und Polyplexe schließen die Nukleinsäuren in ihrem Inneren ein, sodass sie vor der Degradation durch extrazelluläre Nukleasen geschützt sind. Allerdings müssen diese Komplexe später auch wieder abgebaut werden, bevor die freien Nukleinsäuren wirksam werden können. Kationisierte Gelatine-Nanopartikel binden die Nukleinsäuren dagegen an ihrer Oberfläche. Die Vermutung, dass die Nukleinsäuren hier, im Vergleich zu den Komplexen, bei denen sie im Kern des Partikels gebunden sind, weniger gut vor Nukleasen geschützt sind, wurde widerlegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an die Gelatine-Nanopartikel RNA-Oligonukleotide vor der Degradation schützt (Fuchs et al., unveröffentlichte Daten).

Ein weiteres Problem in der Anwendung von Nukleinsäuren ist die Überwindung der hydrophoben Plasmamembran durch die polyanionischen hydrophilen Makromoleküle. Virale Vektoren docken über Rezeptoren an die Zellmembran an und werden dann durch Fusion oder Endozytose internalisiert. Lipo- und Polyplexe können aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften direkt durch die Zellmembran diffundieren bzw. über Pinozytose aufgenommen werden (Morille, Passirani et al., 2008). Gelatine-Nanopartikel werden hingegen über Phagozytose, vor allem durch Makrophagen aufgenommen

(Bourquin, 2008). Sie bringen die immunstimulatorischen Oligonukleotide dadurch auch direkt an den Ort ihrer Wirksamkeit, das Endosom, in dem TLR7, -8 und -9 lokalisiert sind (Coester, Nayyar et al., 2006). Gelatine-Nanopartikel besitzen somit alle Merkmale eines guten Transportsystems: Schutz vor Degradation, Transport über die hydrophobe Plasmamembran und im Falle der immunstimulatorischen Oligonukleotide zusätzlich auch die effektive Lieferung in das angestrebte Zellkompartiment. Gleichzeitig zeichnen sie sich durch eine im Vergleich zu den schon etablierten Transfektionsmethoden niedrigere Toxizität aus.

### 5.3.2. Induktion einer antigenspezifische Immunität mit antitumorale Wirkung

CpG-Oligonukleotide sind bekannt für ihre Fähigkeit, eine schnelle und starke CD8-T-Zell-Antwort hervorzurufen. Dies macht sie besonders interessant als Adjuvanzen für Vakzine (Klinman, 2009). Ich konnte hier zeigen, dass an Gelatine-Nanopartikel gebundenes CpG im gleichen Maße wie freies CpG eine antigenspezifische CD8-T-Zell-Antwort hervorruft. Weiterhin lässt sich durch die Applikation von Nanopartikel-gebundenem CpG auch die Entwicklung einer humoralen Immunität, die effiziente Bildung von Antikörpern bewirken. Hierbei kam es insbesondere zu einer Produktion des Subtyps IgG2a, der typisch für eine T<sub>H</sub>1-Antwort ist (Janeway, 2005). Die Entwicklung einer starken zellulären und humoralen T<sub>H</sub>1-Antwort ist eine wichtige Vorbedingung um eine effiziente antitumorale Immunität zu generieren. In weiteren Versuchen konnte ich dann zeigen, dass diese antigenspezifische Immunantwort vor dem Wachstum eines aggressiven Melanoms schützt. Wieso das Wachstum eines etablierten Tumors sich durch die peritumorale Applikation von Nanopartikel-gebundenem CpG nicht verhindern bzw. reduzieren ließ, bleibt bisher unklar und soll durch weitere Versuche untersucht werden.

### 5.3.3. Reduktion der systemischen Nebenwirkungen von freiem CpG durch Bindung an Gelatine-Nanopartikel

Bei der Immunisierung mit CpG-beladenen Nanopartikeln und dem Modellantigen Ovalbumin zeigte sich eine Immunstimulation mit Ausbildung einer Langzeitimmunität. Gleichzeitig war die systemische Produktion proinflammatorischer Zytokine reduziert. Um dies besser zu verstehen, ist es essentiell sich den Mechanismus der durch die CpG-beladenen Gelatine-Nanopartikel vermittelten Immunaktivierung im Vergleich zu freiem CpG zu verdeutlichen. Freies CpG, welches subkutan appliziert wird, wird von

dendritischen Zellen aufgenommen und initiiert eine antigenspezifische  $T_H1$ -gerichtete Immunantwort (Krieg, 2004). Gleichzeitig wird es von den Lymphknoten aus weiter über die Blutbahn in alle Bereiche des Körpers verteilt. CpG trifft dann in verschiedensten Geweben, wie Leber und Milz auf mit TLR9 ausgestattete Immunzellen (Noll, 2005). Diese werden aktiviert und schütten  $T_H1$ -polarisierende Zyto- und Chemokine aus, die ihrerseits eine weitergehende zelluläre Immunaktivierung triggern. Durch diese systemische Entzündungsreaktion kann es im schlimmsten Fall zu einem Zytokinsturm und dem was wir beim Menschen SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) nennen kommen. In Mäusen wurde nach wiederholter Anwendung von CpG über mehr als 20 Tage eine Splenomegalie und Lymphadenopathie aufgrund massiver Expansion der lymphatischen und erythrozytären Kompartimente, sowie die Entstehung von Peritonitis, Aszites, Thrombozytopenie und schwerer Hepatotoxizität beobachtet. Zusätzlich kam es zu einer vorübergehenden Immunsuppression, vor allem der Antikörperproduktion (Heikenwalder, 2004). In diesem Zusammenhang scheint auch erwähnenswert, dass Bedenken bestehen, ob durch die längerfristige Anwendung von solch einem potenten Immunstimulans wie CpG autoinflammatorische Reaktionen ausgelöst und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses unterstützt werden können (Hasegawa, 2003). Auch wenn TLR9 im Menschen im Gegensatz zu Mäusen nur auf pDCs und B-Zellen exprimiert wird, kommt es nach subkutaner Applikation von CpG bei Testpersonen zur systemischen Zytokinausschüttung und Produktion von Akute-Phase-Proteinen (Krieg, Efler et al., 2004). Durch die Verwendung von Nanopartikel-gebundenem CpG wird dies verhindert. Gleichzeitig wird auch die Gewebeverteilung des Oligonukleotides verändert. Im Gegensatz zur Verteilung von freiem CpG sind die Gelatine-Nanopartikel selektiv nur in den regionalen Lymphknoten nahe der Einstichstelle zu finden. In Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten nach Injektion von freiem oder gebundenem CpG dieses aufnehmen und aktiviert werden. Das an Nanopartikel gebundene CpG erfährt allerdings anders als freies CpG keine systemische Verteilung, messbar anhand der Detektion von CpG-positiven Splenozyten (Bourquin, Anz et al., 2008). Durch die Beladung auf Nanopartikel bleibt also die immunstimulatorische Wirkung des CpG lokalisiert. Die systemische Immunaktivierung mit ihren unspezifischen Nebenwirkungen wird reduziert bei gleichzeitigem Erhalt der erwünschten antitumoralen Aktivität.

#### 5.3.4. Resümee II

Gelatine-Nanopartikel sind ein neues Transportsystem für Oligonukleotide, da sie zum einen zu einer effizienten Lieferung der aktiven Substanz an den Ort ihrer Wirkung führen und gleichzeitig eine unerwünschte systemische Verteilung und die damit zusammenhängenden Nebenwirkungen verhindern können. Zusätzlich hat Gelatine ein durch ihre langjährige Verwendung in der Medizin bestätigtes gutes Sicherheitsprofil, ist kostengünstig und einfach herstellbar. Die Anwendung als Träger für andere immunstimulatorische Oligonukleotide, insbesondere der leicht degradierbaren 9.2dr-RNA, erscheint vielversprechend.

## 6. Zusammenfassung

*Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) gehören zur Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren, die auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden. Diese erkennen typische molekulare Muster verschiedener Pathogene, wie zum Beispiel virale Nukleinsäuren. Der natürliche Ligand von TLR7 ist kurze einzelsträngige RNA, welche während viraler Infektionen in Endosomen sequenz-abhängig detektiert wird. Mit Imiquimod (Aldara®), einem Guanosin-Analogen, ist bereits ein TLR7-Agonist als Medikament zugelassen, der erfolgreich in der Therapie von Hauttumoren eingesetzt wird. Synthetische RNA-Oligonukleotide imitieren die Wirkung des natürlichen Liganden an TLR7. Immunstimulatorische RNA aktiviert sowohl den angeborenen als auch den adaptiven Arm des Immunsystems und erscheint als ein vielversprechendes Molekül für die Immuntherapie von Tumoren. Die Effekte der Immunaktivierung, insbesondere der Aktivierung von NK-Zellen durch RNA-Oligonukleotide auf Tumoren wurden bisher jedoch noch nicht untersucht. Mein Ziel war es deshalb, die antitumorale Wirkung einer Stimulation des Immunsystems mit RNA-Oligonukleotiden zu untersuchen.

Ich zeigte, dass es im murinen RMA-S-Lymphommodell nach intravenöser Applikation von immunstimulatorischer RNA zu einer *In-vivo*-Aktivierung von NK-Zellen im Blut tumortragender Mäuse kommt. Weiterhin erhöht sich auch der Anteil aktivierter NK-Zellen im Tumorgewebe. Durch die Applikation der immunstimulatorischen RNA kommt es zu einer Reduktion des Tumorwachstums um 50 bis 70% im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Durch Depletion von NK-Zellen wird dieser Effekt vollständig aufgehoben. Dies zeigt einen direkten Effekt der durch die immunstimulatorische RNA aktivierten NK-Zellen auf das Tumorwachstum.

Um therapeutisch eingesetzt zu werden braucht RNA eine Trägersubstanz, welche die Nukleinsäure vor der Degradation schützt und sie sicher in die Zellen transportiert. Ich untersuchte eine neue Trägersubstanz für RNA: kationische Gelatine-Nanopartikel. Ich testete dies mit dem DNA-Oligonukleotid CpG, ein TLR9-Agonist mit starker immunstimulatorischer Wirkung. Zuerst konnte ich zeigen, dass sich durch die Immunisierung mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) zusammen mit an Gelatine-Nanopartikel gebundenem CpG (NP-CpG) eine spezifische Immunität gegenüber OVA herstellen lässt. Es finden sich OVA-spezifische zytotoxische T-Zellen und gleichzeitig kommt es auch zur Bildung von OVA-spezifischen IgG. In murinen Tumormodell mit dem antigenexprimierenden Melanom B16-OVA verlieh die Immunisierung Schutz gegenüber Tumorwachstum. Überraschenderweise zeigte sich, dass sich nach subkutaner

Anwendung von NP-CpG bei Mäusen im Gegensatz zu freiem CpG keine erhöhten Serumspiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 oder IL-12p70 finden. Es kommt somit zu einer Reduktion der systemischen Nebenwirkungen durch CpG bei Erhalt der spezifischen Wirkung.

Zusammenfassend konnte ich zum ersten Mal zeigen, dass immunstimulatorische RNA als TLR-7-Agonist über die Aktivierung von NK-Zellen starke antitumorale Effekte vermittelt. Weiterhin konnte ich demonstrieren, dass Gelatine-Nanopartikel ein vielversprechendes neues Trägersystem für die therapeutische Anwendung von immunstimulatorischen Oligonukleotiden im Menschen sind. Immunstimulatorische RNA-Oligonukleotide präsentieren sich damit als eine neue und aussichtsreiche Strategie für die Immuntherapie von Tumoren.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adam, C., King, S., Allgeier, T., et al. DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* (2005);106:338-44.
2. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* (2001);413:732-8.
3. Atzpodien, J., Kirchner, H., Korfer, A., et al. Expansion of peripheral blood natural killer cells correlates with clinical outcome in cancer patients receiving recombinant subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha-2. *Tumour Biol* (1993);14:354-9.
4. Banchereau, J. and Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* (1998);392:245-52.
5. Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., et al. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* (2001);166:5000-7.
6. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* (1999);285:727-9.
7. Bourquin, C., Anz, D., Zwioerek, K., et al. Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J Immunol* (2008);181:2990-8.
8. Bourquin, C., Schmidt, L., Hornung, V., et al. Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response. *Blood* (2007);109:2953-60.
9. Bourquin, C., Schmidt, L., Lanz, A. L., et al. Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK cell response through the TLR7. *J Immunol* (2009);183:6078-86.
10. Brand, S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* (2009);58:1152-67.
11. Bronte, V. and Mocellin, S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother* (2009);32:1-11.
12. Broomfield, S. A., van der Most, R. G., Prosser, A. C., et al. Locally administered TLR7 agonists drive systemic antitumor immune responses that are enhanced by anti-CD40 immunotherapy. *J Immunol* (2009);182:5217-24.
13. Bukur, J., Rebmann, V., Grosse-Wilde, H., et al. Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res* (2003);63:4107-11.

14. Burns, L. J., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant* (2003);32:177-86.
15. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* (2008);112:461-9.
16. Caligiuri, M. A., Murray, C., Robertson, M. J., et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* (1993);91:123-32.
17. Caligiuri, M. A., Murray, C., Soiffer, R. J., et al. Extended continuous infusion low-dose recombinant interleukin-2 in advanced cancer: prolonged immunomodulation without significant toxicity. *J Clin Oncol* (1991);9:2110-9.
18. Campbell, J. M., Bacon, T. A. and Wickstrom, E. Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J Biochem Biophys Methods* (1990);20:259-67.
19. Carpentier, A., Laigle-Donadey, F., Zohar, S., et al. Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* (2006);8:60-6.
20. Cheent, K. and Khakoo, S. I. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* (2009);126:449-57.
21. Chen, H. L., Gabilovich, D., Tampe, R., et al. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* (1996);13:210-3.
22. Chen, M., Griffith, B. P., Lucia, H. L., et al. Efficacy of S26308 against guinea pig cytomegalovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* (1988);32:678-83.
23. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* (2000);6:443-6.
24. Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* (1997);79:2320-8.
25. Coester, C., Nayyar, P. and Samuel, J. In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *Eur J Pharm Biopharm* (2006);62:306-14.
26. Coester, C. J., Langer, K., van Briesen, H., et al. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul* (2000);17:187-93.
27. Coley, W. B. Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and bacillus prodigious with a report of 160 cases. *Johns Hopkins Hospital Bulletin* (1896);7:157-162.
28. Cooper, M. A., Elliott, J. M., Keyel, P. A., et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009);106:1915-9.

29. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* (2001);22:633-40.
30. Corbett, T. H., Griswold, D. P., Jr., Roberts, B. J., et al. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* (1975);35:2434-9.
31. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* (2004);10:942-9.
32. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* (2004);303:1529-31.
33. Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., et al. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* (2000);1:119-26.
34. Donskov, F., Hokland, M., Marcussen, N., et al. Monocytes and neutrophils as 'bad guys' for the outcome of interleukin-2 with and without histamine in metastatic renal cell carcinoma--results from a randomised phase II trial. *Br J Cancer* (2006);94:218-26.
35. Dougan, M. and Dranoff, G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* (2009);27:83-117.
36. Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* (2002);298:850-4.
37. Dumitru, C. D., Antonyshamy, M. A., Gorski, K. S., et al. NK1.1+ cells mediate the antitumor effects of a dual Toll-like receptor 7/8 agonist in the disseminated B16-F10 melanoma model. *Cancer Immunol Immunother* (2009);58:575-87.
38. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* (2002);3:991-8.
39. Dunn, G. P., Old, L. J. and Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* (2004);22:329-60.
40. Egilmez, N. K., Jong, Y. S., Iwanuma, Y., et al. Cytokine immunotherapy of cancer with controlled release biodegradable microspheres in a human tumor xenograft/SCID mouse model. *Cancer Immunol Immunother* (1998);46:21-4.
41. Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* (1909);5:273-290.
42. Fehleisen, F. Über die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (1882);8:553-554.
43. Fehleisen, F. Die Etiologie des Erysipels. *Theodor Fischer, Berlin* (1883);48.

44. Ferlazzo, G. and Munz, C. Dendritic cell interactions with NK cells from different tissues. *J Clin Immunol* (2009);29:265-73.
45. Fidler, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* (1975);35:218-24.
46. Filion, M. C. and Phillips, N. C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim Biophys Acta* (1997);1329:345-56.
47. Finke, L. H., Wentworth, K., Blumenstein, B., et al. Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies--outcomes from the 2006 meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC). *Vaccine* (2007);25 Suppl 2:B97-B109.
48. Finn, O. J. Cancer immunology. *N Engl J Med* (2008);358:2704-15.
49. Fitzgerald, E. L. a. K. A. Innate immunity: sensing and signalling. *Nature reviews immunology* (2008);9:
50. Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* (2009);69:4010-7.
51. Gannon, P. O., Poisson, A. O., Delvoye, N., et al. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J Immunol Methods* (2009);
52. Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* (2003);102:814-9.
53. Golomb, H. M. Hairy cell leukemia: treatment successes in the past 25 years. *J Clin Oncol* (2008);26:2607-9.
54. Gorden, K. B., Gorski, K. S., Gibson, S. J., et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* (2005);174:1259-68.
55. Gorelik, L. and Flavell, R. A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* (2001);7:1118-22.
56. Gorski, K. S., Waller, E. L., Bjornton-Severson, J., et al. Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. *Int Immunol* (2006);18:1115-26.
57. Grob, J. J., Dreno, B., de la Salmoniere, P., et al. Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. *Lancet* (1998);351:1905-10.
58. Groh, V., Wu, J., Yee, C., et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* (2002);419:734-8.
59. Groothuis, T. A. and Neefjes, J. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* (2005);202:1313-8.

60. Harrington, L. E., Mangan, P. R. and Weaver, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* (2006);18:349-56.
61. Harrison, C. J., Miller, R. L. and Bernstein, D. I. Posttherapy suppression of genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and enhancement of HSV-specific T-cell memory by imiquimod in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* (1994);38:2059-64.
62. Hartman, Z. C., Appledorn, D. M. and Amalfitano, A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res* (2008);132:1-14.
63. Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999);96:9305-10.
64. Hasegawa, K. and Hayashi, T. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. *Lupus* (2003);12:838-45.
65. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* (2001);410:1099-103.
66. Heckelsmiller, K., Rall, K., Beck, S., et al. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* (2002);169:3892-9.
67. Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., et al. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* (2004);10:187-92.
68. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* (2004);303:1526-9.
69. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* (2002);3:196-200.
70. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* (2000);408:740-5.
71. Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., et al. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* (1975);16:230-9.
72. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* (2006);314:994-7.
73. Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* (2005);11:263-70.

74. Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* (2002);168:4531-7.
75. Houston, A., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., et al. Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer, irrespective of TGF-beta expression. *Br J Cancer* (2003);89:1345-51.
76. Hudis, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* (2007);357:39-51.
77. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* (2004);350:2335-42.
78. Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* (2000);88:577-83.
79. Ishikawa, E., Tsuboi, K., Saijo, K., et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* (2004);24:1861-71.
80. Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* (2001);31:3121-7.
81. Janeway, C. A., Jr. (2005). Immunobiology: the immune system in health and disease. New York, Garland Science Publishing.
82. Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* (2002);20:197-216.
83. Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* (2009);114:535-46.
84. Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Karapetis, C. S., et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* (2007);357:2040-8.
85. Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* (2002);3:499.
86. Kaklamanis, L., Leek, R., Koukourakis, M., et al. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res* (1995);55:5191-4.
87. Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* (2006);440:233-6.
88. Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* (1986);319:675-8.

89. Kawai, O., Ishii, G., Kubota, K., et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* (2008);113:1387-95.
90. Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., et al. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* (2001);167:5247-53.
91. Kelly, J. M., Darcy, P. K., Markby, J. L., et al. Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol* (2002);3:83-90.
92. Kemp, A. S. Egg allergy. *Pediatr Allergy Immunol* (2007);18:696-702.
93. Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., et al. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* (1975);5:117-21.
94. Kim, Y., Girardi, M., McAuley, S., et al. Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) responses to a TLR9 agonist CPG immunomodulator (CPG 7909), a phase I study. *Journal of Clinical Oncology* (2004);22:
95. King, J., Waxman, J. and Stauss, H. Advances in tumour immunotherapy. *QJM* (2008);101:675-83.
96. Klinman, D. M., Klaschik, S., Sato, T., et al. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev* (2009);61:248-55.
97. Kohler, G. and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (1975);256:495-7.
98. Korn, T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* (2008);255 Suppl 6:2-6.
99. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* (2009);27:485-517.
100. Kreuter, J. Nanoparticulate systems in drug delivery and targeting. *J Drug Target* (1995);3:171-3.
101. Krieg, A. M., Efler, S. M., Wittpoth, M., et al. Induction of systemic TH1-like innate immunity in normal volunteers following subcutaneous but not intravenous administration of CPG 7909, a synthetic B-class CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist. *J Immunother* (2004);27:460-71.
102. Lamm, D. L., Blumenstein, B. A., Crawford, E. D., et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* (1991);325:1205-9.
103. Leipe, J., Skapenko, A. and Schulze-Koops, H. [Th17 cells - a new proinflammatory T cell population and its role in rheumatologic autoimmune diseases]. *Z Rheumatol* (2009);68:405-8.
104. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* (1996);86:973-83.

105. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* (2006);24:99-146.
106. Li, V. W. and Li, W. W. Antiangiogenesis in the treatment of skin cancer. *J Drugs Dermatol* (2008);7:s17-24.
107. Ljunggren, H. G. and Karre, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* (1990);11:237-44.
108. Ljunggren, H. G. and Malmberg, K. J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* (2007);7:329-39.
109. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., et al. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* (2007);26:503-17.
110. Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004);101:5598-603.
111. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release* (2006);114:100-9.
112. Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Storkus, W. J., et al. Tumor escape from immune recognition: loss of HLA-A2 melanoma cell surface expression is associated with a complex rearrangement of the short arm of chromosome 6. *Clin Cancer Res* (1996);2:641-52.
113. Majewski, S., Marczak, M., Mlynarczyk, B., et al. Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Dermatol* (2005);44:14-9.
114. Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* (1997);90:2188-95.
115. Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* (2006);6:823-35.
116. McCuaig, C. C., Dubois, J., Powell, J., et al. A phase II, open-label study of the efficacy and safety of imiquimod in the treatment of superficial and mixed infantile hemangioma. *Pediatr Dermatol* (2009);26:203-12.
117. Means, T. K. and Luster, A. D. Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* (2005);1062:242-51.
118. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* (1997);388:394-7.
119. Menier, C., Prevot, S., Carosella, E. D., et al. Human leukocyte antigen-G is expressed in advanced-stage ovarian carcinoma of high-grade histology. *Hum Immunol* (2009);
120. Meyer, T., Nindl, I., Schmook, T., et al. Induction of apoptosis by Toll-like receptor-7 agonist in tissue cultures. *Br J Dermatol* (2003);149 Suppl 66:9-14.

121. Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* (2005);105:3051-7.
122. Miller, R. L., Gerster, J. F., Owens, M. L., et al. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* (1999);21:1-14.
123. Mocikat, R., Selmayr, M., Thierfelder, S., et al. Trioma-based vaccination against B-cell lymphoma confers long-lasting tumor immunity. *Cancer Res* (1997);57:2346-9.
124. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* (2001);19:683-765.
125. Moore, M. W., Carbone, F. R. and Bevan, M. J. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* (1988);54:777-85.
126. Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., et al. Human NK-cell receptors. *Immunol Today* (2000);21:420-2.
127. Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* (2006);214:219-28.
128. Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* (1976);193:1007-8.
129. Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., et al. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* (2008);29:3477-96.
130. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* (1986);136:2348-57.
131. Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* (1998);58:3491-4.
132. Newman, K. C. and Riley, E. M. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* (2007);7:279-91.
133. Noll, B. O., McCluskie, M. J., Sniatala, T., et al. Biodistribution and metabolism of immunostimulatory oligodeoxynucleotide CPG 7909 in mouse and rat tissues following subcutaneous administration. *Biochem Pharmacol* (2005);69:981-91.
134. O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., et al. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* (2006);7:507-16.
135. Ortaldo, J. R. and Young, H. A. Mouse Ly49 NK receptors: balancing activation and inhibition. *Mol Immunol* (2005);42:445-50.

136. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000);97:13766-71.
137. Pashenkov, M., Goess, G., Wagner, C., et al. Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* (2006);24:5716-24.
138. Paul, P., Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998);95:4510-5.
139. Pavone, L., Andrulli, S., Santi, R., et al. Long-term treatment with low doses of interleukin-2 and interferon-alpha: immunological effects in advanced renal cell cancer. *Cancer Immunol Immunother* (2001);50:82-6.
140. Pazmany, L., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., et al. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* (1996);274:792-5.
141. Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* (2002);62:6178-86.
142. Pertoft, H., Laurent, T. C., Laas, T., et al. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal Biochem* (1978);88:271-82.
143. Phillips, J. H., Gemlo, B. T., Myers, W. W., et al. In vivo and in vitro activation of natural killer cells in advanced cancer patients undergoing combined recombinant interleukin-2 and LAK cell therapy. *J Clin Oncol* (1987);5:1933-41.
144. Poeck, H., Besch, R., Maihoefer, C., et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* (2008);14:1256-63.
145. Poggi, A. and Zocchi, M. R. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (2006);54:323-33.
146. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* (1998);282:2085-8.
147. Rahman, A. H. and Eisenberg, R. A. The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol* (2006);28:131-43.
148. Restifo, N. P., Esquivel, F., Kawakami, Y., et al. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* (1993);177:265-72.
149. Robinson, B. W. and Morstyn, G. Natural killer (NK)-resistant human lung cancer cells are lysed by recombinant interleukin-2-activated NK cells. *Cell Immunol* (1987);106:215-22.

150. Romano, G., Marino, I. R., Pentimalli, F., et al. Insertional mutagenesis and development of malignancies induced by integrating gene delivery systems: implications for the design of safer gene-based interventions in patients. *Drug News Perspect* (2009);22:185-96.
151. Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* (1985);313:1485-92.
152. Rossi, A. R., Pericle, F., Rashleigh, S., et al. Lysis of neuroblastoma cell lines by human natural killer cells activated by interleukin-2 and interleukin-12. *Blood* (1994);83:1323-8.
153. Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., et al. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin Cancer Biol* (2007);17:413-21.
154. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* (2002);295:2097-100.
155. Sarkis, C., Philippe, S., Mallet, J., et al. Non-integrating lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* (2008);8:430-7.
156. Schön, M. P. and Schön, M. Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis* (2004);9:291-8.
157. Schon, M. P., Schon, M. and Klotz, K. N. The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion. *J Invest Dermatol* (2006);126:1338-47.
158. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* (2003);21:305-34.
159. Sconocchia, G., Spagnoli, G. C., Del Principe, D., et al. Defective infiltration of natural killer cells in MICA/B-positive renal cell carcinoma involves beta(2)-integrin-mediated interaction. *Neoplasia* (2009);11:662-71.
160. Shi, F., Rakhmilevich, A. L., Heise, C. P., et al. Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model. *Mol Cancer Ther* (2002);1:949-57.
161. Sidbury, R., Neuschler, N., Neuschler, E., et al. Topically applied imiquimod inhibits vascular tumor growth in vivo. *J Invest Dermatol* (2003);121:1205-9.
162. Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* (1999);284:1835-7.
163. Sitkovsky, M. V., Lukashev, D., Apasov, S., et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* (2004);22:657-82.
164. Sobolev, O., Stern, P., Lacy-Hulbert, A., et al. Natural killer cells require selectins for suppression of subcutaneous tumors. *Cancer Res* (2009);69:2531-9.

165. Soderstrom, K., Corliss, B., Lanier, L. L., et al. CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* (1997);159:1072-5.
166. Song, H., Kim, J., Cosman, D., et al. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* (2006);239:22-30.
167. Speiser, D. E., Lienard, D., Rufer, N., et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* (2005);115:739-46.
168. Starnes, C. O. Coley's toxins in perspective. *Nature* (1992);357:11-2.
169. Sun, J. C., Beilke, J. N. and Lanier, L. L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* (2009);457:557-61.
170. Sutlu, T. and Alici, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med* (2009);266:154-81.
171. Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* (1999);11:443-51.
172. Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., et al. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* (2000);164:554-7.
173. Tanaka, T., Tsudo, M., Karasuyama, H., et al. A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor beta-chain. Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL-4 cells. *J Immunol* (1991);147:2222-8.
174. Teicher, B. A. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* (2007);13:6247-51.
175. Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., et al. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* (2008);9:486-94.
176. Tomasello, E., Blery, M., Vely, F., et al. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* (2000);12:139-47.
177. Ugolini, S. and Vivier, E. Immunology: Natural killer cells remember. *Nature* (2009);457:544-5.
178. Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., et al. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol* (2009);21:525-30.
179. Vester, B. and Wengel, J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* (2004);43:13233-41.

180. Villegas, F. R., Coca, S., Villarrubia, V. G., et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* (2002);35:23-8.
181. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* (2008);9:503-10.
182. Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* (2005);202:1575-85.
183. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* (2005);106:2252-8.
184. Wasungu, L. and Hoekstra, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* (2006);116:255-64.
185. Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* (2006);24:677-88.
186. Weeks, C. E. and Gibson, S. J. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. *J Interferon Res* (1994);14:81-5.
187. Whiteside, T. L., Sung, M. W., Nagashima, S., et al. Human tumor antigen-specific T lymphocytes and interleukin-2-activated natural killer cells: comparisons of antitumor effects in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* (1998);4:1135-45.
188. Wiemann, B. and Starnes, C. O. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* (1994);64:529-64.
189. Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* (2002);168:4772-80.
190. Williams, M. A. and Bevan, M. J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* (2007);25:171-92.
191. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* (1990);247:1465-8.
192. Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* (2005);308:1626-9.
193. Ye, S. R., Yang, H., Li, K., et al. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol* (2007);20:375-83.
194. Yie, S. M., Yang, H., Ye, S. R., et al. Expression of human leucocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* (2007);58:267-74.
195. Yu, P. and Fu, Y. X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* (2006);86:231-45.

- 
196. Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* (2004);303:1522-6.
  197. Ziegler, S. F., Ramsdell, F. and Alderson, M. R. The activation antigen CD69. *Stem Cells* (1994);12:456-65.
  198. Zwioerek, K., Bourquin, C., Battiany, J., et al. Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm Res* (2008);25:551-62.
  199. Zwioerek, K., Kloeckner, J., Wagner, E., et al. Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *J Pharm Pharm Sci* (2005);7:22-8.

## Abkürzungen

APC	Antigenpräsentierende Zelle
$\beta$ 2m	Beta-2-Mikroglobulin
CD	<i>Complex of differentiation</i>
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DC	Dendritische Zelle
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MICA/ B	<i>Major-histocompatibility-antigen-related chain A</i> oder B
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NALP3	<i>Nacht domain-, Leucine-rich repeat-, and PYD-containing protein 3</i>
NK	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligodesoxynukleotid
ORN	Oligoribonukleotid
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PRR	<i>Pattern-recognition-receptor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
sMICA	<i>Soluble major histocompatibility antigen related chain A</i> (Lösliches MICA)
sULBP 1-3	<i>Soluble UL16-binding proteins 1-3</i> (Lösliches ULBP 1-3)
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSA	Tumorspezifisches Antigen

## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres bedanke ich mich für die persönliche Unterstützung sowie die Möglichkeit in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Abteilung zu forschen, die Ergebnisse auf Kongressen und in wissenschaftlichen Zeitungen zu präsentieren.

Für die kontinuierliche Betreuung, Motivation und die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich mich bei meiner Betreuerin PD Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei allen Post-Docs, Mitdoktoranden und technischen Assistentinnen, insbesondere Cornelia Wurzenberger, Tobias Schwerd und Nadja Sandholzer für konstruktive Gespräche und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Weiterhin gilt meine tiefe Dankbarkeit meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung und immerwährenden Rückhalt in all den Jahren meiner Ausbildung.

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Bourquin C., Anz D., Zwioerek K., **Lanz A. L.**, Fuchs S., Weigel S., Wurzenberger C., Borch P., Golic M., Moder S., Winter S., Coester C. and Endres S. Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J Immunol* (2008);181:2990-2998

Bourquin C., Schmidt L., **Lanz A. L.**, Storch B., Wurzenberger C., Anz D., Sandholzer N., Mocikat R., Berger M., Poeck H., Hartmann G., Hornung V. and Endres S. Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK-cell response through Toll-like receptor 7. *J Immunol* (2009); 183:6078-6086

### Abstracts und Poster

**Lanz A. L.**, Anz D., Zwioerek K., Sandholzer N., Borch P., Wurzenberger C., Golic M., Coester C., Endres S. and Bourquin C. Immunostimulatory oligonucleotides bound to gelatin nanoparticles induce potent cellular and humoral immunity leading to a protective anti-tumor response. *3rd annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society, Berlin, 2007*

**Lanz A. L.**, Weigel S., Anz D., Wurzenberger C., Sandholzer N., Endres S. and Bourquin C. Induction of combined T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 responses for the immunotherapy of tumors. *World Immune Regulation meeting II, Davos, 2008*

**Lanz A. L.**, Schmidt L., Wurzenberger C., Sandholzer N., Anz D., Storch B., Endres S. and Bourquin C. Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an efficient anti tumor response through activated NK cells. *3rd Tegernsee Conference Immunotherapy of Cancer, 2009*

## Lebenslauf

Anna-Lisa Lanz, geboren am 03.06.1980 in Frankfurt am Main.

### SCHULBILDUNG

1986 bis 1990	Grundschule Bruchköbel-Roßdorf
1990 bis 1996	Heinrich-Böll-Gesamtschule, Bruchköbel
1996 bis 1999	Lichtenberg-Oberstufen-Gymnasium, Bruchköbel
06/1999	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4) Buchpreis des Fonds der Chemischen Industrie als beste Abiturientin im Fach Chemie

### HOCHSCHULSTUDIUM

09/1999 bis 03/2003	Studium der Chemie, TU Darmstadt
09/2001	Vordiplom Chemie (Note 2,0)
04/2003-05/2009	Studium der Medizin, LMU München
03/2005	Ärztliche Vorprüfung (Note 2,6)
02/ 2008 – 02/ 2009	Praktisches Jahr I. Tertial: Pädiatrie, Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU, München II. Tertial: Innere Medizin, Harvard Medical School, Boston, USA III. Tertial: Allgemein Chirurgie, Kilimanjaro Christian Medical Center, Moshi, Tansania und Kinderchirurgie, Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU, München
05/2009	Staatsexamen Medizin (Note 1,5)
2006 bis 2009	Experimentelle Promotionsarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie (Leitung Prof. Dr. med. Stefan Endres), Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München

STIPENDIEN

09/2006-09/2007

Graduiertenkolleg 1202

„Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“

03/2008-08/2008

Munich-Harvard Alliance for Medical Education, PJ Tertial an  
der Harvard Medical School, Boston, USABERUF

Seit 10/2009

Assistenzärztin am Dr. von Haunerschen Kinderspital  
(Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Reinhardt), Klinikum der  
Universität München