

**Antitumorale Wirkung von AFP-beladenen und CD40L-  
exprimierenden Dendritischen Zellen in etablierten subkutanen  
hepatozellulären Tumoren *in vivo***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Tiyasha Hosne Ayub  
aus Bonn

2014

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Gutachter: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch  
Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Peter Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 30.04.2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Allgemeine Innere Medizin  
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie und Hepatologie, Nephrologie, Infektiologie,  
Endokrinologie und Diabetologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

*Meiner Mutter  
Meinem Vater  
Meinem Nanabhai  
und  
Meinem Rudi*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>14</b>
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom .....	14
1.1.1 Epidemiologie .....	14
1.1.2 Ätiologie.....	14
1.1.3 Hepatokarzinogenese.....	16
1.1.4 Prognose und Therapie des HCC .....	17
1.2 Immunologische Aspekte der Hepatokarzinogenese .....	20
1.3 <i>Immunosurveillance, Immunoediting</i> und Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Tumormilieus .....	21
1.4 Das Alpha-Fetoprotein als Tumor-assoziiertes Antigen des HCC .....	23
1.5 Dendritische Zellen .....	24
1.6 Immuntherapeutische Therapieansätze zur Behandlung des HCC .....	26
1.7 CD40 und CD40L.....	27
1.8 Adenovirale Vektoren .....	29
1.8.1 Adenoviren.....	29
1.8.2 Adenovirale Vektoren.....	31
1.9 Zielsetzung .....	32
<b>2. Material</b> .....	<b>33</b>
2.1 Zellkultur.....	33
2.1.1 Verwendete Zelllinien.....	33
2.1.2 Reagenzien für Zellbiologie .....	34
2.1.3 Zusammenfassung verwendeter Zellkulturmedien.....	34
2.2 Lösungen für die Propagation, Aufreinigung und Titerbestimmung adenoviraler Vektoren.....	35
2.2.1 Chemikalien und Reagenzien .....	35
2.2.2 Zusammenfassung verwendeter Lösungen .....	36
2.3 Verwendete adenovirale Vektoren .....	37
2.3.1 Ad-mAFP .....	37
2.3.2 Ad-CD40L .....	37

2.3.3	Ad-LacZ .....	37
2.4	Weitere häufig verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	38
2.4.1	Chemikalien und Reagenzien .....	38
2.4.2	Zusammenfassung verwendeter Lösungen .....	39
2.5	Antikörper.....	42
2.5.1	Durchflusszytometrie .....	42
2.5.2	MACS-Depletion .....	43
2.5.3	Western Blot .....	43
2.6	Enzyme.....	43
2.7	Zytokine .....	43
2.8	Reagenzsysteme (Kits) .....	44
2.9	Mausmodell.....	44
2.10	Geräte .....	44
2.11	Verbrauchsmaterialien .....	46
2.12	Tierstamm .....	47
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>48</b>
3.1	Zellkultur.....	48
3.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	48
3.1.2	Auftauen von in Stickstoff gelagerten Zellen .....	48
3.1.3	Passagieren von adhärennten Zellen .....	48
3.1.4	Passagieren von Suspensionszellen .....	49
3.1.5	Einfrieren und Aufbewahren von adhärennten Zellen .....	49
3.1.6	Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer nach Neubauer .....	49
3.2	Viruspropagation und Aufreinigung .....	50
3.2.1	Transduktion von 911-Zellen mit adenoviralen Vektoren zur Viruspropagation.....	50
3.2.2	Ernten des Virus .....	51
3.2.3	Aufreinigung und Konzentrierung von adenoviralen Vektoren mittels Cäsiumchlorid-Dichtezentrifugation .....	52
3.2.4	Virustiterbestimmung durch Plaque-Assay .....	53
3.2.5	Messung der optischen Dichte zur Bestimmung der Viruspartikel- konzentration.. .....	54
3.2.6	Plaque-Assay in A549-Zellen.....	55

3.3	Dendritische Zellen.....	55
3.3.1	Isolation von murinen dendritischen Zellen.....	55
3.3.1.1	Gewinnung von murinem Knochenmark.....	55
3.3.1.2	MACS-Zellseparation ( <i>magnetic cell seperation</i> ).....	56
3.3.2	Kultivierung muriner dendritischer Zellen.....	57
3.3.3	Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren .....	58
3.4	Tierexperimente .....	58
3.4.1	Subkutanes HCC-Tumormodell für C3H-Mäuse.....	58
3.4.2	Experimentelle Therapie von tumortragenden Mäusen mit DC .....	59
3.4.3	Explantieren der Tumoren und Milzen .....	60
3.5	Proteinbiochemie .....	60
3.5.1	Herstellung von Gewebehomogenisaten aus den explantierten Tumoren.....	60
3.5.2	Herstellung von Zelllysat aus eukaryontischen Zellen .....	61
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration aus Gewebe oder Zelllysat.....	61
3.5.4	Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen und zum Nachweis von mAFP.....	62
3.5.5	<i>Western Blot</i> im <i>Semy-Dry</i> -Verfahren.....	63
3.5.6	Immunmarkierung.....	63
3.6	Durchflusszytometrie.....	64
3.6.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der Infiltration von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen in subkutanem HCC .....	65
3.7	ELISA.....	66
3.8	Apoptose-Assay.....	66
3.8.1	Bestimmung der SubG <sub>1</sub> -Fraktion mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit Propidiumiodid.....	66
3.8.2	Bestimmung der Apoptoserate durch Messung der Caspase 3-Aktivität.....	68
3.9	Statistik.....	69
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>70</b>
4.1	Viruspropagation von Ad-mAFP, Ad-CD40L und Ad-LacZ.....	70
4.1.1	Transduktion von eukaryontischen Zellen durch adenovirale Vektoren.....	70
4.1.2	Aufreinigung adenoviraler Vektoren.....	71

4.2	Titerbestimmung der verwendeten AdV: Ad-mAFP, Ad-CD40L und Ad-LacZ .....	72
4.2.1	Messung der optischen Dichte (OD) .....	73
4.2.2	Plaque-Assay.....	73
4.3	Transduktion von DC mit Ad-CD40L, Ad-mAFP und Ad-LacZ .....	75
4.4	Mausexperimente.....	78
4.4.1	Subkutanes HCC-Mausmodell mit mAFP-exprimierenden Hepa 129-Zellen....	78
4.4.2	Nachweis von mAFP in Hepa 129-mAFP-induzierten s.c. HCC-Tumoren mittels <i>Western Blot</i> .....	79
4.4.3	Einfluss einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC in Kombination.....	80
4.5	Charakterisierung der Immunantwort in s.c. HCC-Tumoren der C3H-Mäuse nach Therapie mit CD40L-, mAFP- oder LacZ-exprimierenden DC in verschiedenen Kombinationen .....	84
4.5.1	Analyse der tumorinfiltrierenden CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Abschluss der Therapie .....	85
4.5.2	Bestimmung der Konzentrationen der Zytokine IFN-gamma, IL-12 und IL-10 in den therapierten Tumoren mittels ELISA .....	85
4.6	Induktion von Apoptose in Tumorzellen durch Überstände von CD40L-exprimierenden DC .....	88
4.6.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der SubG <sub>1</sub> -Fraktion in Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen nach Kultivierung mit Überstand von CD40L-exprimierenden DC.....	89
4.6.2	Messung der Caspase 3-Aktivität in mit CD40L-DC i.t. therapierten s.c. HCC von C3H-Mäusen zur Bestimmung der Apoptoserate <i>in vivo</i> .....	90
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1	<i>In vitro</i> - Experimente .....	94
5.1.1	Transduktion von DC mit Ad-CD40L, Ad-mAFP und Ad-LacZ.....	94
5.2	<i>In vivo</i> - Experimente.....	95
5.2.1	Subkutanes AFP-positives HCC-Mausmodell.....	95
5.2.2	Antitumorale Wirkung einer Kombinationstherapie mit einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC und einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC im s.c. HCC-Modell von C3H-Mäusen .....	96



5.2.3	Charakterisierung immunologischer Zellpopulationen im HCC nach einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC in Kombination mit der i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC .....	96
5.3	Pro-apoptotische Wirkung von CD40L-exprimierenden DC.....	98
5.4	Methodenkritik .....	100
5.5	Ausblick .....	100
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>121</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AdV	adenoviraler Vektor
afc	<i>Ac-DEVD-amino-4-trifluoromethyl coumarine</i>
AFP	Alpha-Fetoprotein
mAFP	murines Alpha-Fetoprotein
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
Az.	Aktenzeichen
BCLC	<i>Barcelona-Clinic-Liver-Cancer</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BFA	Brefeldin A
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cm	Zentimeter
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CsCl	Cäsiumchlorid
DC	Dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor-receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
FcR-Block	Fc-Rezeptor-Block
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FR	Falcon-Röhrchen

FSB	<i>flow staining buffer</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box p3</i>
g	Gramm
mGM-CSF	<i>murinegranulocyte / macrophage colony stimulating factor</i>
h	<i>hour</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HS	<i>horse serum</i> (Pferdeserum)
HSC	<i>hepatic stellate cells</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
IU	<i>International Units</i>
Kap.	Kapitel
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
LacZ	$\beta$ -Galactosidase aus <i>Escherichia coli</i>
LSEC	sinusoidalen Endothelzellen der Leber
LY6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
M	Mol
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
mAFP	murines Alpha-Fetoprotein
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mg	Milligramm
mGM-CSF	<i>murine granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

ml	Milliliter
mll-4	murines Interleukin 4
mm <sup>3</sup>	cubic Millimeter
mM	Millimol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
m/v	Masse pro Volumen, Dichte
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NC-Membran	Nitrozellulose-Membran
n.d.	<i>non detectable</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
opu	<i>optical particle units</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBS++	PBS mit Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>
PBST	PBS-Tween
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	perkutane Ethanolinjektion
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PI	Propidiumiodid
RFA	Radiofrequenzablation
RG	Reaktionsgefäße
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfonat)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SIRT	selektive interne Radiotherapie
S-Phase	Synthese-Phase
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> (transformierender Wachstumsfaktor)
Th <sub>1</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle Typ 1
Th <sub>2</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle Typ 2
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
U	<i>unit</i>
Upm	Umdrehung pro Minute in der Zentrifuge
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	versus
v/v	Volumen pro Volumen, Konzentration in Prozent

# 1. Einleitung

## 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist das häufigste primäre hepatische Malignom mit einer Neuerkrankungsrate von 600.000 pro Jahr (Schütte et al., 2009). Es gehört somit zu den sechs häufigsten Tumorentitäten und dritthäufigsten tumorassoziierten Todesursachen weltweit, wobei die Inzidenz weiter ansteigt (Ferlay et al., 2010). Männer sind etwa dreimal häufiger betroffen als Frauen (El-Serag und Rudolph, 2007). Die weltweit höchste Erkrankungsrate liegt mit etwa 20/100.000 Einwohnern in Ostasien und der Sub-Sahara (El-Serag, 2012). In den westlichen Ländern liegt die Inzidenz bei etwa 5/100.000 und in den USA bei etwa 1,5-4,9/100.000 Einwohnern (Altekruse et al., 2009; Baffy et al., 2012). Die Erhöhung der Erkrankungsrate auch in den westlichen Regionen wird mit der steigenden Prävalenz von Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektionen erklärt (Charlton, 2008; Baffy et al., 2012).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt in China zwischen 55-59 Jahren, in Europa und Nord Amerika zwischen 63-65 Jahren. In Gebieten mit niedriger HCC-Prävalenz steigt das mittlere Erkrankungsalter auf etwa 75 Jahren und älter. In Gebieten mit der höchsten Prävalenz, wie China, sind auch Erkrankungsfälle unter dem 50. Lebensalter in der männlichen Population häufig (El-Serag, 2012). Aufgrund rechtzeitiger aktiver und passiver Impfungen gegen das Hepatitis-B-Virus (HBV) von Neugeborenen sinkt die Rate an HCC-Neuerkrankungen in Ländern mit hoher Prävalenz, wie eine Studie aus Taiwan zeigte (Chang, 2010).

### 1.1.2 Ätiologie

Bekannt sind mehrere Risikofaktoren, die mit der Entstehung eines HCC assoziiert sind. Die Häufigkeiten der Ursachen sind zudem geographisch unterschiedlich.

Das HCC entsteht in 80 % der Fälle auf dem Boden einer Leberzirrhose. Somit ist die Leberzirrhose der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines HCC. Eine Leberzirrhose entwickelt sich wiederum auf dem Boden verschiedener Lebererkrankungen. In Asien und Afrika zählen Virushepatitiden zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer

Leberzirrhose. Etwa 75 % der weltweiten Hepatitis-Virus-Infektionen liegt in Asien (McMahon et al., 1990; El Serag, 2012). Trotz der Neugeborenenimpfungen spielt v.a. die HBV-Infektion immer noch die wichtigste Rolle für die Entwicklung einer Leberzirrhose in diesen Ländern. Patienten mit einer neonatalen HBV-Infektion haben somit das höchste Risiko, ein HCC im Laufe ihres Lebens zu entwickeln. Darüberhinaus sind auch Fälle bekannt, wo sich bei Patienten mit HBV- oder HCV-Infektion v.a. bei hoher Viruslast ein HCC in einer nicht-zirrhösen Leber entwickelte (De Mitri et al., 1995; Chen et al., 2006). Somit stellen HBV- und HCV-Infektionen auch unabhängige Risikofaktoren für das HCC dar. Möglicherweise spielt auch eine genetische Disposition hierbei eine wichtige Rolle (Hassan et al., 2009).

In westlichen Ländern ist Alkoholkonsum neben den Hepatitiden eine wichtige Ursache für die Entwicklung einer Leberzirrhose und des oft damit assoziierten HCC.

Nicht zu vernachlässigen sind ebenso weitere chronische Lebererkrankungen, wie die primär biliäre Zirrhose, oder Stoffwechselerkrankungen, wie die Hämochromatose, alpha1-Antitrypsinmangel, Morbus Wilson unter anderem. Einen wichtigen Risikofaktor in asiatischen Ländern stellen Aflatoxine, genauer gesagt das Aflatoxin B1 vom *Aspergillus flavus* dar. Dieses starke Hepatokarzinogen befindet sich auf verunreinigten Lebensmitteln und gedeiht in feuchtem Milieu.

Zudem scheint das Geschlecht eine wichtige Rolle zu spielen. In klinischen Studien zeigte sich, dass Männer häufiger ein HCC erleiden als Frauen, was möglicherweise auf einen Einfluss der Sexualhormone zurückzuführen ist, wobei ein ungünstiger Einfluss von Androgenen und ein protektiver Effekt von Östrogenen vermutet wird (Yeh und Chen, 2010; Yuan et al., 1995).

Ein weiteres in Industrieländern zunehmendes Problem stellt die nicht alkoholische Steatohepatitis (NASH) dar, welche oft mit dem metabolischen Syndrom assoziiert ist. Somit zählen Adipositas und Diabetes mellitus zu weiteren Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC (Calle et al., 2003; Davila et al., 2005; Saunders et al., 2010). In verschiedenen klinischen Studien zeigte sich, dass Diabetiker ein doppelt so hohes Risiko für die Entwicklung einer NASH haben und somit auch einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, ein HCC zu entwickeln (El-Serag et al., 2006). Zudem scheinen eine HCV-Infektion und ein gleichzeitig vorhandener Diabetes mellitus das Risiko der HCC-Entstehung synergistisch zu steigern (Hassan et al., 2002).

Einen gewissen protektiven Effekt gegen lebertoxische Noxen scheint bisher nur der Kaffeeconsum zu haben. Studien zeigten, dass ein regelmäßiger Kaffeegenuss mit einem verminderten Serumspiegel von Transaminasen und auch vermindertem Auftreten von chronischen Lebererkrankungen assoziiert ist (Larsson et al., 2007; Bravi et al., 2007; El-Serag et al., 2012). Der genaue Mechanismus hierbei ist jedoch noch nicht bekannt.

### 1.1.3 Hepatokarzinogenese

Die Mechanismen, welche zur HCC-Entstehung führen, sind bis jetzt nicht im Ganzen bekannt und verstanden. Ist die Leber, wie auch jedes andere Organ, Noxen, wie Viren, Alkohol oder Aflatoxinen chronisch ausgesetzt, führt dies zu Ummodellierungsprozessen des gesunden Lebergewebes. Hierbei entsteht zunächst eine Fibrose, die sich bei Persistenz der Noxe letztendlich in eine irreversible Leberzirrhose entwickelt.

Der Umbauprozess der Leber wird v.a. durch *hepatic stellate cells* (HSC) und die Kupferzellen bzw. die sog. Lebermakrophagen getriggert. Eine chronische Reizung dieser Zellen durch Noxen führt dazu, dass sie vermehrt Zytokine, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine sezernieren, die wiederum durch Induktion eines oxidativen Stresses in der Leber den gesteigerten Zellumsatz der Hepatozyten zusätzlich fördern (Farazi et al., 2006; El-Serag et al., 2007). Während dieses Prozesses versucht das gesunde Lebergewebe jedoch zu regenerieren, um diesen Umbauprozess zu verhindern. Die Regenerierungsversuche sind mit einem gesteigerten Zellumsatz verbunden, der zu einem Verbrauch an Telomeren führt (Thorgeirsson et al., 2002; Grisham et al., 2001). Telomere schützen die Zellen bei der Zellteilung vor Mutationen. Bei jeder Zellteilung geht jedoch eine bestimmte Anzahl an ihnen verloren. Je mehr Telomere verbraucht werden, desto höher ist die genetische Instabilität. Chromosomale Mutationen führen zunächst zu einer Dysplasie, die dann in eine Metaplasie, wie dem HCC, ausarten kann. Somit stellt der Hepatozyt, bzw. der sich aus im entwickelnde dysplastische Knoten den Ausgangspunkt des HCC dar (Llovet et al., 2006). In fortgeschrittenen Malignom-Stadien wird die Telomerase-reverse-Transkriptase wieder reexprimiert, damit sich die Tumorzellen weiter teilen können (Shimajima et al., 2004).

Weiterhin spielen epigenetische und genetische Mutationen wie die Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie dem p53, eine wichtige Rolle (Feo et al., 2009). Das Aflatoxin z.B. ist in der Lage an die zelluläre DNA zu binden



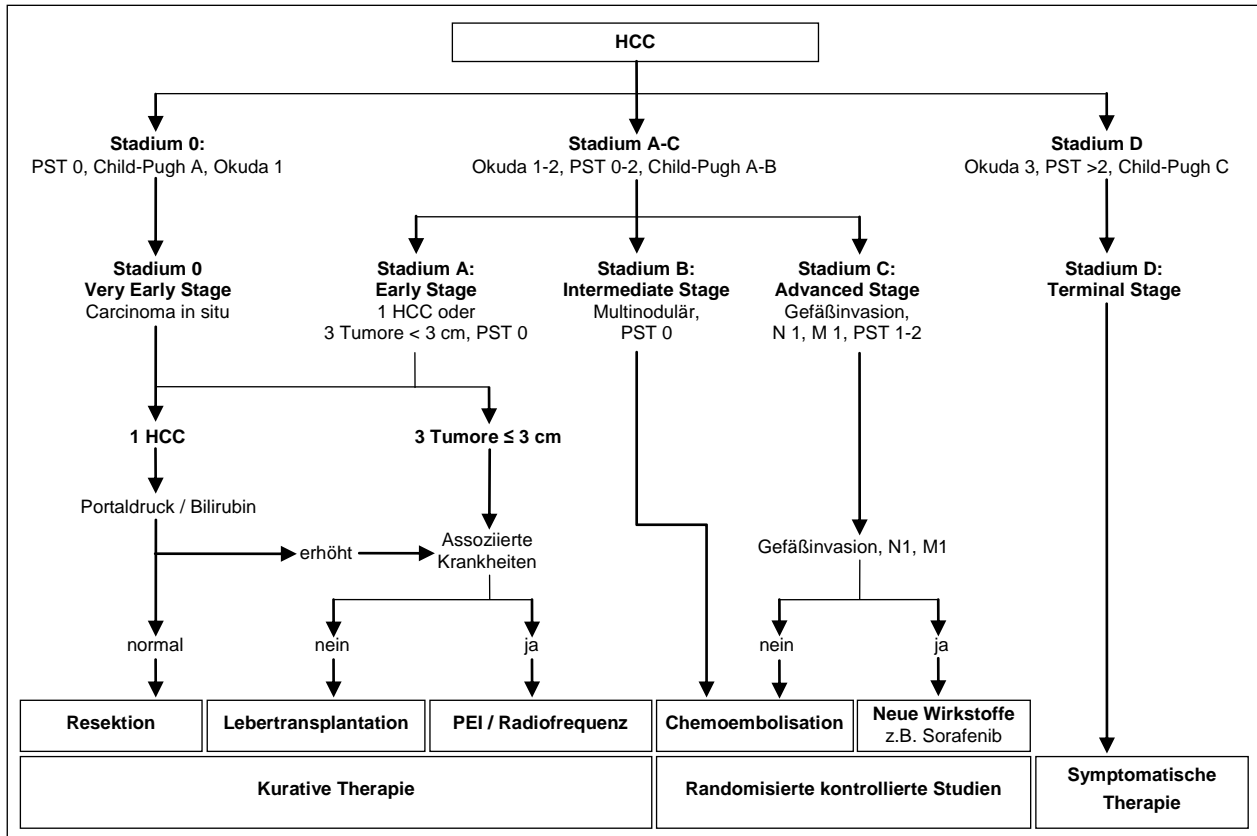
und Mutationen im p53-Suppressorgen zu verursachen. Virale Proteine, wie das HBV-kodierende Protein HB<sub>x</sub> oder das Core-, NS3- oder NS5A-Protein beim HCV können auch selbst als Onkogene fungieren und das p53 direkt inaktivieren (Flecken et al., 2012; Ray et al., 1997; Deng et al., 2006; Lan et al., 2002; Rabe und Caselmann, 2000; Feitelson et al., 2007).

MicroRNAs regulieren die Genexpression posttranskriptionell. Es wurde beschrieben, dass Veränderungen in ihrem Bereich einen prokarzinogenen Effekt durch Modullierung von Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptoseverhalten haben. Diese Veränderungen konnten im HCC und anderen Malignomen nachgewiesen werden (Braconi und Patel, 2008).

Durch die epigenetischen und genetischen Veränderungen können auf zellulärer Ebene verschiedene *pathways*, z.B. über Rezeptoren der EGFR-Familie (*epidermal growth factor receptor*), aktiviert werden, die die Zellproliferation und das Tumorwachstum proangiogenetisch fördern (Ito et al., 2001; Flecken et al., 2012).

#### **1.1.4 Prognose und Therapie des HCC**

Die Prognose des HCC ist aufgrund einer oft sehr späten Erstdiagnose und dann limitierten Therapiemöglichkeiten sehr schlecht. Die 5-Jahresüberlebensrate im Okuda-Stadium I liegt bei 40-50 %, im Okuda-Stadium II bei etwa 20 % und im Okuda-Stadium III bei 3 % bei einer medianen Überlebenszeit von nur einem Monat. Etwa 50 % der in kurativer Absicht therapierten Patienten erleiden innerhalb von 3 Jahren ein Rezidiv. Die Stadieneinteilung nach *Barcelona-Clinic-Liver-Cancer* (s. Abb. 1) gibt seit 1999 detaillierte stadienadaptierte Therapieempfehlungen (Llovet et al., 1999, Bruix und Sherman, 2011). Hierbei werden kurative und palliative Therapieansätze voneinander unterschieden.



**Abb. 1:** Stadieneinteilung nach Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC) mit Therapieempfehlungen für Patienten mit HCC, modifiziert nach Llovet et al., 1999.

Zu kurativen Therapieoptionen zählen u.a. die Leberteilresektion und die Lebertransplantation (Lau, 2000; Okuda, 2000). Die Leberteilresektion ist jedoch nur in frühen Stadien möglich. Zudem limitiert die meist vorhandene Leberzirrhose eine erfolgreiche Operation, da die damit verbundene eingeschränkte Leberfunktion der malignomfreien Leberanteile oft nicht ausreicht. Der Erfolg einer Lebertransplantation wiederum ist limitiert durch den Mangel an Spendern, den damit verbundenen langen Wartezeiten und Progredienz der Erkrankung in dieser Zeit.

Ein weiterer kurativer Therapieansatz stellen die lokal ablativen Verfahren dar, die sich in den letzten Jahren durch gute Ergebnisse zunehmend bewährt haben. Hierzu zählen die perkutane Ethanolinjektion (PEI) und v.a. die Radiofrequenzablation (RFA). Bei der PEI wird Ethanol direkt in den Tumorherd injiziert. Die hierbei induzierte Koagulationsnekrose führt zur Tumorregression. Tumore mit einer Größe von  $\leq 2$  cm zeigen eine Nekroserate von 90-100 % nach Therapie (Bruix et al., 2011). Bei der RFA erfolgt nach perkutaner Punktion des Tumors mittels einer Nadelelektrode eine hypertherme Be-

strahlung des Tumors. Die RFA scheint bei größeren Tumoren bessere Erfolge zu erzielen als die PEI (Orlando et al., 2009; Germani et al., 2010).

Zu den palliativen Therapieoptionen zählt die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Hierbei wird ein Gemisch aus verschiedenen Chemotherapeutika in die Arterie injiziert, die den Tumor versorgt. Die zusätzliche Embolisation dieser Arterie führt zur Unterbindung der Blutzufuhr zum Tumor selbst. Hierdurch kann ein signifikant verlängertes Überleben von über 24 Monaten erzielt werden (Takayasu et al., 2010; Lin et al., 1988; Bruix et al., 1998; Llovet et al., 2003). Patienten mit einem intermediären BCLC-Stadium, die einen inoperablen Tumor haben, oder für eine PEI oder RFA nicht geeignet sind, erhalten die TACE.

Die selektive interne Radiotherapie, SIRT genannt, bietet eine gute und scheinbar sichere Alternative zur TACE-Therapie (Salem et al., 2010; Kulik et al., 2008; de Lope et al., 2012). Hierbei werden 90 Y-Glass-Mikrosphären, die Yttrium-90 enthalten, direkt in den Tumor injiziert. Die hierbei wirkende  $\beta$ -Strahlung ermöglicht eine hohe lokale Strahleneinwirkung und kann zur Tumorregression führen.

Auch auf molekularer Ebene konnten Therapieerfolge beim HCC durch eine systemische Therapie mit Sorafenib, einem Multikinase-Inhibitor, erzielt werden. In der SHARP-Studie 2008, einer multizentrisch, randomisierten Phase-III Studie, erzielte Sorafenib im progressionsfreien Überleben der behandelten Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil (Llovet et al., 2008). Diese Ergebnisse wurden in einer randomisierten asiatischen Studie bestätigt (Cheng et al., 2009). Sorafenib wirkt über einen dualen Mechanismus. Zum Einen inhibiert es die Serin-Threonin-Kinase Raf1 und B-Raf und somit den intrazellulären RAF/MEK/ERK-Signalweg. Zum anderen antagonisiert es auf Zell-Rezeptorebene die Tyrosin-Kinase-Aktivität der *vascular endothelial growth factor*(VEGF)-Rezeptoren 1, 2 und 3 und des *platelet derived growth factor* (PDGFR)- $\beta$ -Rezeptors (Llovet et al., 2008; Villanueva und Llovet, 2011; Pawlik et al., 2011). Hierdurch werden sowohl die Tumorzellproliferation als auch die Tumorangiogenese gehemmt. Sorafenib scheint auch Apoptose der Tumorzellen zu induzieren (Liu et al., 2006; Chang et al., 2007). Kombinationstherapien werden ebenfalls in vielen klinischen Studien erprobt. So zeigte die Kombination von Sorafenib mit einer TACE-Therapie zwar keine erhebliche Zunahme toxischer Nebenwirkungen im Patienten, resultierte jedoch in einem nicht eindeutigen Benefit (Pawlik et al., 2011). Ausreichende

Daten liegen hier allerdings noch nicht vor. Andere Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Sunitinib, oder Inhibitoren der EGFR-Familie werden zur Zeit erprobt. Bisher konnten jedoch keine zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden (Meguro et al., 2011).

## 1.2 Immunologische Aspekte der Hepatokarzinogenese

Das Immunsystem kann ebenfalls selbst an der HCC-Entstehung beteiligt sein, wobei ein Großteil der Mechanismen noch unbekannt ist. So konnte gezeigt werden, dass eine chronische Entzündung in der Leber über einen TLR-vermittelten NF- $\kappa$ B-Signalweg proliferativ und antiapoptisch wirken kann (Tanaka et al., 2009; He et al., 2011; Flecken et al., 2012). Verschiedene Zytokine, wie Interleukin(IL)-17 und IL-22, können durch Rekrutierung von tumorassoziierten Immunzellen eine proliferative und angiogenetische Wirkung auf den Tumor selbst induzieren (Jiang et al., 2011; Kolls et al., 2004; Kuang et al., 2011; Flecken et al., 2012). Bei Patienten mit einem HCC korreliert der Serumspiegel von IL-6 mit der HCC-Entstehung (Wong et al., 2009; Flecken et al., 2012). In Studien wurde hierbei auch ein Geschlechterunterschied festgestellt. Männer weisen höhere IL-6-Spiegel als Frauen auf (Nakagawa et al., 2009; Flecken et al., 2012). Weiterhin ist bekannt, dass sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC) zum Einen über Kreuzpräsentation von Tumorantigenen eine CD8<sup>+</sup>-T-Zell-getriggerte Immuntoleranz und zum Anderen eine Maturierung von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in regulatorische T-Zellen (T<sub>regs</sub>) induzieren können (Limmer et al., 2000; Berg et al., 2006). Zudem ist beschrieben, dass sie dendritische Zellen (DC) hemmen können (Schildberg et al., 2008). Somit spielt die Leber selbst eine wichtige Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung einer gewissen Tumormunitoleranz. Wiederum geht das Vorhandensein von *forkhead-box-p3*(Foxp3)-positiven T<sub>regs</sub> mit einer signifikant schlechteren Prognose einher (Gao et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Fu et al., 2007), was auch bei anderen Malignomen wie dem Ovarialkarzinom sowohl für das progressionsfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben eindrücklich gezeigt werden konnte (Wolf et al., 2007).

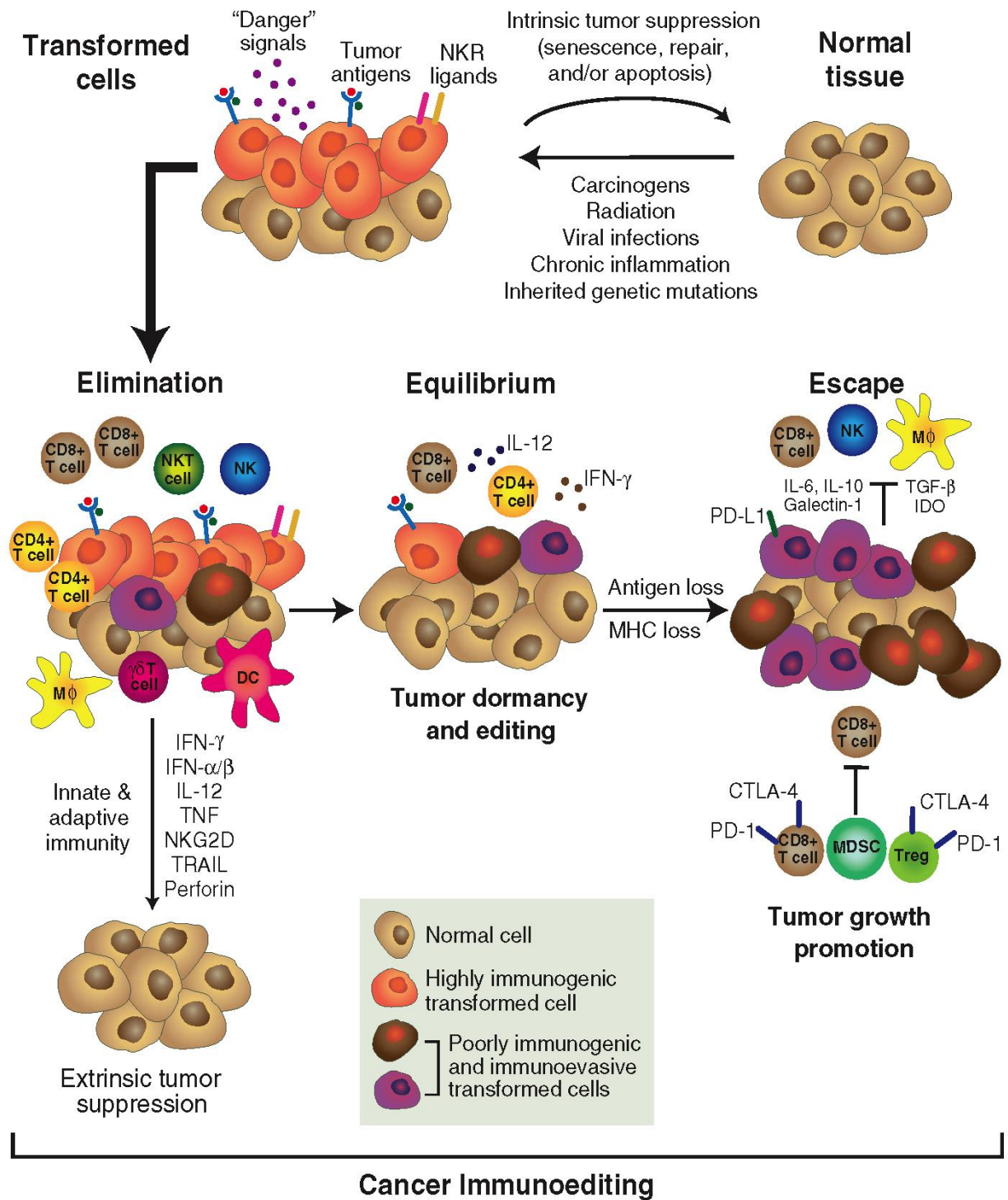
Jedoch kann das Immunsystem auch antitumoral wirken. Tumore, die eine hohe Anzahl an infiltrierten zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aufweisen, sind mit einer besseren Prognose assoziiert (Gao et al., 2007; Wada et al., 1998). Auch wurde nachgewiesen, dass

die HCC-infiltrierten zytotoxischen T-Zellen eine Aufregulation der apoptoseinduzierenden Rezeptoren PD-1 aufweisen (Shi et al., 2010).

### **1.3 *Immunosurveillance, Immunoediting* und Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Tumormilieus**

Tumore entstehen nach maligner Transformation körpereigener Zellen. Tumorzellen haben somit ein geringes immunogenes Potenzial, im Gegensatz zu körperfremden Organismen, wie Bakterien, Viren oder Pilze. Das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) in vielen Malignomen zeigt jedoch, dass das Immunsystem initial in der Lage ist Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Bereits Ende der 50-er Jahre wurde von Burnet und Thomas die sog. *Immunosurveillance*-Hypothese aufgestellt, dass das Immunsystem Tumorstromazellen, d.h. bereits mutierte, jedoch noch nicht entartete Zellen anhand von Tumorstromantigenen erkennen und zerstören kann (Burnet, 1957; Thomas, 1959). Sie griffen damit die Vermutung von Paul Ehrlich Anfang des 19. Jahrhunderts wieder auf, dass das Immunsystem Tumore kontrollieren könne (Ehrlich, 1909). Die Tatsache, dass immunsupprimierte Patienten, wie HIV-infizierte oder transplantierte Patienten eine deutlich höhere Inzidenz an Tumorerkrankungen aufweisen, unterstützt diese These. Zudem sind auch spontane immunbedingte Tumorstromregressionen beschrieben (Sengupta et al., 2007).

Jedoch entwickeln sich Malignome auch in immunkompetenten Menschen. Dies spricht dafür, dass das Immunsystem ab einem bestimmten Zeitpunkt versagt bzw. die proliferierenden Tumorstromzellen nicht mehr erkennen kann. Dieser Prozess wird als *Immunoediting* bezeichnet und läuft in drei Phasen ab (s. Abb. 2): In der ersten Phase, der Elimination, werden die Tumorstromzellen vom Immunsystem erkannt und zerstört. Dieser Selektionsdruck führt jedoch dazu, dass einige Tumorstromzellen mutieren und somit der Elimination entkommen können. Diese zweite Phase wird Equilibrierungsphase genannt. In der dritten Phase, der *Escape*phase, können die mutierten Tumorstromzellen ungehindert proliferieren (Dunn et al., 2002, 2004, 2006; Kim et al., 2007; Quezada et al., 2011; Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011).



**Abb. 2:** Mechanismus des *Immunoeeditings*, bildlich dargestellt von Schreiber et al., 2011.

Obwohl viele Malignome, auch das HCC, ein immunogenes Potenzial besitzen, ermöglichen sog. *Escape*-Mechanismen, dass sich die Tumorzellen dauerhaft vor dem

Immunsystem schützen können. Durch verschiedene *Escape*-Mechanismen sind Malignome beispielsweise in der Lage ein immunsuppressives Tumormilieu zu schaffen. Antigen-präsentierende Zellen (APC) sind entscheidend in der Initiierung einer effektiven Immunantwort. Ihre Inhibierung durch antiinflammatorische Moleküle, wie das IL-10 und *Transforming Growth Factor*(TGF)- $\beta$ , sekretiert von T<sub>regs</sub> oder Tumorzellen selbst, bedingt ein Fehlen von T-Helfer<sub>1</sub>(Th<sub>1</sub>)-Zytokinen. Hochregulierung inhibitorischer (PD-1) und Runterregulierung proinflammatorischer Oberflächenmoleküle (CD80, CD86, CD40 und MHC-II-Moleküle) und eine erhöhte Konzentration von VEGF und T<sub>regs</sub> sind nur einige weitere Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung eines protumoralen Tumormilieus beitragen (Berinstein, 2007; Nagaraj et al., 2007; Gajewski et al., 2006; Marie et al., 2005; Beckebaum et al., 2004; Ohm et al., 2003; Shurin et al., 2002).

#### **1.4 Das Alpha-Fetoprotein als Tumor-assoziiertes Antigen des HCC**

Das Alpha-Fetoprotein (AFP) wird in über 50-70 % der Patienten mit HCC reexprimiert und gehört zu den Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) des HCC. Es sind bisher 6 verschiedene HCC-spezifische TAAs bekannt (Breous und Thimme, 2011), wobei das AFP das bisher am meisten untersuchte TAA ist.

AFP ist ein Glykoprotein bestehend aus einem Gerüst von 590 Aminosäuren (Neville et al., 1975). Es enthält eine Oligosaccharidgruppe und hat ein Molekulargewicht von etwa 64 Kilodalton (Deutsch, 1991). In seiner Struktur ähnelt es dem Serumalbumin (Gitlin und Boesman, 1966). AFP wird in der Embryonalentwicklung von der fetalen Leber, dem Magen-Darm-Trakt und dem Dottersack gebildet (Gitlin and Boesman, 1967; Fartoux und Decaens, 2011). Die maximale Konzentration wird zwischen der 12. und 16. Schwangerschaftswoche erreicht. Danach fällt der AFP-Spiegel bis zum Ende der Schwangerschaft stetig ab (Gitlin und Boesman, 1966). Nach Geburt ist die Bildung durch Repression des zugeordneten Gens stark gedrosselt. Die normale Serumkonzentration bei gesunden Erwachsenen liegt unter 15  $\mu\text{g/l}$ .

Das AFP wurde erstmals 1956 in humanem fetalem Serum mittels Elektrophorese entdeckt. Bereits damals wurde erkannt, dass sich AFP zwar in fetalem Serum nachweisen lässt, jedoch im Serum von gesunden Kindern und Erwachsenen abwesend ist (Bergstrand et al., 1956; 1957; Gitlin und Boesman, 1966). 1963 wurde ein Protein

beschrieben, welches von murinen Lebertumoren exprimiert wird und identisch mit dem fetalen AFP ist (Abelev, 1963; 1968). Einige Jahre später schließlich gelang auch der Nachweis im Menschen und die Assoziation mit Lebererkrankungen (Tatarinov et al., 1964).

AFP ist jedoch nicht HCC-spezifisch. Erhöhte Serumspiegel finden sich in der Schwangerschaft und bei verschiedenen Leberschädigungen, wie der Leberzirrhose, Hepatitiden, Lebermetastasen oder benignen Lebertumoren (Rutoslahti et al., 1974; Johnson et al., 1978). Zudem dient es auch als Tumormarker für Keimzelltumore und Hepatoblastome (Neville et al., 1975). Im klinischen Gebrauch kann die AFP-Bestimmung daher nicht als alleiniger *Screening*marker zur Früherkennung des HCC dienen, sondern muss mit bildgebenden Verfahren, wie dem Ultraschall, kombiniert werden (Bruix et al., 2005). In Risikogruppen, als Differentialdiagnose und Verlaufparameter nach Therapiebeginn ist die Bestimmung ebenfalls sinnvoll. Jedoch sind Serumwerte von über 500 ng/ml hochsuspekt für das Vorliegen eines HCCs (Rutoslahti et al., 1974; Tateishi et al., 2008).

Das AFP hat ein immunogenes Potenzial. In Patienten mit erhöhtem AFP-Spiegel und HCC konnte eine Immunantwort von AFP-spezifischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden (Hanke et al., 2002b; Thimme et al., 2008). Dieses immunogene Potenzial des AFPs kann in immuntherapeutischen Ansätzen, wie Vakzinierungstherapien, genutzt werden.

## 1.5 Dendritische Zellen

DC sind professionelle APC. Sie wurden erstmals 1868 von Paul Langerhans in der Haut visualisiert. Die sog. Langerhans-Zellen interpretierte er jedoch als Hautnervenzellen. Sie gerieten für lange Zeit in Vergessenheit. 1973 wurden diese Zellen von Ralph Steinmann wiederentdeckt und als Immunzellen charakterisiert. Steinmann gelang es DC aus peripherem lymphatischem Gewebe von Mäusen, wie der Milz und Lymphknoten, zu isolieren (Steinmann und Cohn, 1973). Ihren Namen verdanken sie ihren charakteristischen bäumchenartigen Zellfortsätzen.

DC sind potente Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort und werden als Wachposten des Immunsystems bezeichnet. Sie sind potente Stimulatoren von B- und



T-Zellen und können durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine das Immunsystem triggern (Banchereau und Steinmann, 1998). Sie entwickeln sich aus CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen (Romani et al., 1994). Man unterscheidet unreife und reife DC. Unreife DC lauern in der Haut und in Schleimhäuten oder zirkulieren im peripheren Blut. Sie tragen *Toll-like*-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Iwasaki et al., 2004) und sind durch eine rasche Erkennung und hohe Aufnahmekapazität von körperfremden Molekülen, wie Viren, Bakterien oder anderen Antigenen gekennzeichnet. Hierbei können sie drei verschiedene Mechanismen anwenden, die Phagozytose, Makropinozytose und Endozytose durch u.a. Hochregulierung von Mannoserezeptoren. Diese Kombination befähigt sie als einzige APC dazu auch sehr kleine Partikel im Nano- und Picogramm-Bereich aufzunehmen (Inaba et al., 1993; Reis e Sousa et al., 1993; Sallusto und Lanzavecchia, 1995; Banchereau und Steinmann, 1998). Nach Antigenaufnahme erfolgt ihre Maturation, wobei sie gleichzeitig aus der Körperperipherie ins lymphatische Gewebe, wie der Milz und den Lymphknoten, migrieren. Während dieser Phase verlieren sie zwar ihre Phagozytosekapazität, exprimieren jedoch in hoher Konzentration MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche, so dass die Antigenfragmente v.a. naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert werden können. T-Zellen erkennen keine Antigene ohne Antigenpräsentation. Die Antigenpräsentation hat zur Folge, dass sich sog. immunologische Synapsen zwischen der T-Zelle und der APC ausbilden. Hierbei spielt neben den MHC-II-Molekülen die Hochregulation von den kostimulatorischen B7-Molekülen CD80 und CD86 eine wichtige Rolle (Sato und Fujita, 2007), an die CD28-Rezeptoren der T-Zellen binden können. Somit wird die T-Zell-Aktivierung synergistisch gesteigert (Lanzavecchia und Sallusto, 2001). MHC-II-Moleküle ermöglichen die Präsentation von extrazellulären Antigenen und aktivieren T-Helfer-Zellen. DC sind aber auch in der Lage über Kreuzpräsentation und somit MHC-I-Moleküle CD8<sup>+</sup>-T-Zellen intrazelluläre Antigene zu präsentieren, wodurch diese zu zytotoxischen T-Zellen ausreifen können (Banchereau und Steinmann, 1998; Lanzavecchia und Sallusto, 2001).

Aktivierte T-Zellen stimulieren bekanntermaßen wiederum B-Zellen in ihrer Reifung und Immunglobulin-Sekretion. Durch Aufregulation von weiteren kostimulatorischen Molekülen, wie dem CD40, und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie dem IL-12, können DC auch B-Zellen und andere Immunzellen auf direktem Weg proinflammatorisch aktivieren (Sato und Fujita, 2007; Lanzavecchia und Sallusto, 2001;

Banchereau und Steinmann, 1998). Es wurde berichtet, dass aktivierte T-Zellen über CD40Ligand (CD40L) DC ebenfalls proinflammatorisch triggern können (Lanzavecchia und Sallusto, 2001).

Im humanen System können die im Blut zirkulierenden DC anhand ihrer Oberflächenmarker in CD11c-positive und CD11c-negative Zellen unterteilt werden, wobei die CD11c-positiven DC als immunologisch reife DC beschrieben werden (O'Doherty et al., 1994). Reife murine DC tragen ebenfalls den CD11c-Oberflächenmarker. Sie exprimieren auch MHC-I und II-Komplexe (Svensson et al., 1997), sowie CD80, CD86 und CD40. Zudem tragen sie CD4- und CD8 $\alpha$ -Moleküle, wohingegen humane DC kein CD8 $\alpha$  aufweisen (Shortman und Liu, 2002).

Murine DC werden nach der Methode von Inaba gewonnen. Vorläuferzellen, gewonnen aus Knochenmark, werden mit GM-CSF und IL-4 kultiviert (Inaba et al., 1992; Romani et al., 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1995; Arthur et al., 1997). Das GM-CSF ermöglicht die Ausdifferenzierung zu DC. Zudem ist es ein potenter DC-Aktivator (Steinmann, 1991; Berinstein, 2007). Das IL-4 unterstützt die DC in ihrer stimulatorischen Aktivität (Arthur et al., 1997).

Aufgrund ihrer Eigenschaften sind DC in der Lage auch eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen TAA zu induzieren. Die Verwendung von DC in Vakzinierungstherapien scheint daher eine erfolgversprechende Strategie zur Bekämpfung von Tumoren zu sein.

## **1.6 Immuntherapeutische Therapieansätze zur Behandlung des HCC**

Immuntherapeutische Therapiestrategien ermöglichen eine zielgerichtete Therapie und sind fester Bestandteil experimenteller Forschung. Wie bereits zuvor beschrieben, ist z.B. das Vorhandensein von TILs mit einer besseren Prognose für den Patienten assoziiert. Daher erscheinen T-Zell-gerichtete Therapien sehr erfolgversprechend (Breous und Thimme, 2011).

Vakzinierungsstrategien ermöglichen eine spezifische Therapie und sind durch geringe Toxizität gekennzeichnet. Zudem könnte eine erfolgreiche Vakzinierung eine längerfristige bzw. dauerhafte Prävention vor Tumorrezidiven erzielen. Butterfield et al. gelang es 1999 erstmalig Epitope des HCC-assoziierten Antigens, AFP zu identifizieren. In *in*

*vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese Epitope, präsentiert durch MHC-I-Komplexe, durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden (Butterfield et al., 2001). Auch in Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass eine AFP-Vakzinierung eine effektive T-Zell-Antwort bei geringer systemischer Toxizität initiiert (Vollmer et al., 1999). 2003 erfolgte die erste Vakzinierungstherapie gegen AFP im Menschen. Diese Phase I Studie resultierte in einer erhöhten AFP-spezifischen T-Zellantwort im peripheren Blut, jedoch blieb ein signifikantes klinisches Ansprechen aus (Butterfield et al., 2003). Um eine Verstärkung der Immunantwort zu erzielen können DC angewendet werden. In *in vitro* Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass DC mit AFP beladen werden können, um eine starke T-Zell-Antwort spezifisch gegen AFP-exprimierende HCC-Zellen zu induzieren. Darüberhinaus wurde beschrieben, dass die Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren (AdV) zu einer Verstärkung ihrer proinflammatorischen Aktivität führt (Gonzalez-Carmona et al., 2006).

In Phase I/II-Studien erfolgte die Applikation von AFP-beladenen DC, was zwar in einer stärkeren Stimulation von T-Zellen resultierte, jedoch kein klinisches Ansprechen erzielte (Butterfield et al., 2006; Lee et al., 2005). Das fehlende Ansprechen wurde u.a. mit der ausbleibenden Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erklärt (Breous und Thimme, 2011). DC, gepulst mit apoptotischen Tumorzellen, scheinen auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu aktivieren (Lee et al., 2005). Eine Phase-II-Studie zur Vakzinierung dieser Zellen zeigte das bisher beste klinische Ansprechen mit Verminderung der Serum-AFP-Konzentration und Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (Palmer et al., 2009). Diese Daten zeigen, dass DC-basierte Vakzinierungstherapien gegen TAA vielversprechend erscheinen, jedoch noch optimiert werden müssen. Eine Möglichkeit der Kostimulation bietet z.B. der CD40-Ligand (s.u.).

## 1.7 CD40 und CD40L

Das CD40-Antigen ist ein phosphoriliertes Oberflächenmolekül mit einer Größe von etwa 48 kDa und gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor(TNF)-Rezeptoren (Banchereau et al., 1994; Clark und Lane, 1991). Es befindet sich auf der Oberfläche von DC, aber auch B-Lymphozyten, Makrophagen und sogar Tumorzellen u.a. (Banchereau et al., 1994; Gordon, 1995).

Es spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung, Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Apoptoseprävention von B-Zellen (Spriggs et al., 1992; Gordon, 1995). In Anwesenheit von IL-4 stimuliert CD40 B-Zellen zur Immunglobulin E-Sekretion (Armitage et al., 1992; Spriggs et al., 1992; Parker, 1993).

CD40 bindet an den CD40-Liganden, auch CD154L genannt. CD40L ist ein Typ II Membranprotein mit einer molekularen Masse von etwa 39 kDa (Gordon, 1995). CD40L ist ein potentes kostimulatorisches Molekül. Es wird von CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen exprimiert und in aktiviertem Zustand hochreguliert. Somit haben aktivierte T-Zellen einen direkten Einfluss auf die B-Zell-Aktivierung und auf DC (Armitage et al., 1992; Xu et al., 1994; Durie et al., 1994; Caux et al., 1994; van Essen et al., 1995).

Die Interaktion von CD40L mit CD40 führt bei den DC zur proinflammatorischen Veränderung mit Aufregulation von MHC-II-Molekülen, den bereits genannten B7-Molekülen, Steigerung ihrer Antigenpräsentation zur Aktivierung von T-Zellen und Erhöhung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie dem IL-12. Diese proinflammatorische Stimulation bewirkt zudem, dass DC unabhängig vom Einfluss der CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aktivieren können (Schoenberger et al., 1998; Cella et al., 1996; Bianchi et al., 1999; Gonzalez-Carmona et al., 2008). Somit spielt die Interaktion zwischen CD40 und CD40L eine wichtige Rolle sowohl in der zellulären als auch in der humoralen Immunantwort.

In verschiedenen Studien zeigte sich, dass das immunsuppressive Tumormilieu verschiedener Malignome eine verminderte Expression von CD40 und CD40L aufweist, was mit einer ausbleibenden Maturierung von DC einhergeht und einen entscheidenden Faktor im Versagen der antitumoralen Immunantwort im Patienten darstellt. Hierfür scheint das immunsuppressive Zytokin IL-10 verantwortlich zu sein (Shurin et al., 2002). Die CD40-CD40L-Interaktion stellt daher eine Möglichkeit dar, eine DC-basierte Vakzination gegen das HCC zu verstärken.

Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten beispielsweise zeigen, dass CD40L-exprimierende DC eine potente antitumorale Immunantwort u.a. gegen das HCC induzieren können (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Serba et al., 2008; Mackey et al., 1998; Beckebaum et al., 2004; Schmitz et al., 2001). In einigen Publikationen zeigte sich zudem, dass die CD40-CD40L-Interaktion in einigen Zellen, auch Tumorzellen, Apoptose induzieren kann (Xu et al., 2004; Loskog et al., 2007).

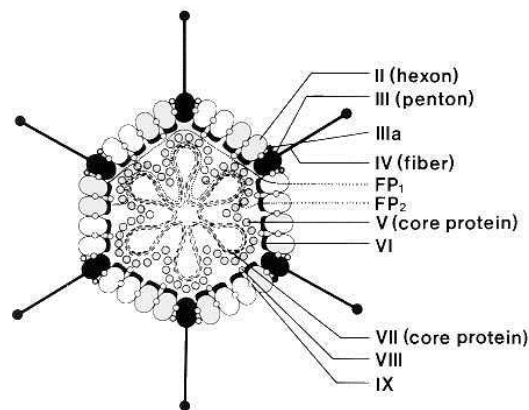
## 1.8 Adenovirale Vektoren

### 1.8.1 Adenoviren

Adenoviren (Ad) sind unbehüllte Viren, die ubiquitär vorkommen. Sie haben einen Durchmesser von 60 – 90 nm. Ihre Dichte beträgt 1,33 g/ml.

Humane Ad verursachen Infektionen der Atemwege, der Keratokonjunktiviten, des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts (Arnberg, 2012). Die Infektionen können asymptomatisch verlaufen, in seltenen Fällen, v.a. bei immunsupprimierten Patienten, auch letal enden (Kojaoghlanian et al., 2003). In den häufigsten Fällen jedoch zeigen sich grippeähnliche Symptome. Die meisten Menschen sind bis zum 15. Lebensjahr mit mindestens einem Ad-Typ infiziert, was eine längerfristige bis dauerhafte virustypspezifische Immunität zur Folge hat.

1953 gelang es erstmals Ad aus Tonsillen und dem namensgebenden adenoidem Gewebe zu isolieren und in Zellkultur zu erhalten (Rowe et al., 1953). Über 50 verschiedene humane und tierpathogene Spezies sind mittlerweile bekannt, die in sieben Untergruppen, A-G, eingeteilt werden (Smith et al., 2010). Taxonomisch lassen sie sich in zwei Gruppen, die Mastadenoviren und die Aviaadenoviren, unterteilen. Mastadenoviren infizieren Säugetiere und Aviaadenoviren Vögel. Sie bestehen aus einem ikosaedrischen Gerüst von insgesamt 252 Kapsomeren mit 12 Pentonen und 240 Hexonen. Die Pentone bestehen aus einer Pentonbasis und antennenartige Fortsätze, sog. Fieberproteinen. Die Fieberproteine sind für die Induktion der gruppenspezifischen Antikörper zuständig, die zu der langanhaltenden Immunität führen. Weitere Proteine, die mit den Pentonen und Hexonen assoziiert sind, tragen zur Stabilität der Struktur bei (s. Abb. 3).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Struktur eines Ad (Volpers und Kochanek, 2004).

Die Viren sind in der Lage zum Einen durch die hoch affine Bindung des an ihrem Fieberprotein befindlichen Cocksackie Adenovirus Rezeptor (CAR), einem Mitglied der IgG-Familie, an *Tight junctions* (Bergelson et al., 1997; Cohen et al., 2001) und zum Anderen durch Bindung ihrer Pentone an Bestandteile der Integrine (Wickham et al., 1993) mittels rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle einzudringen (Meier und Greber, 2004; Nemerow und Stewart, 1999; Chroboczek et al., 1995; Doerfler, 1996). Hierbei spielt die Interaktion zwischen den Integrinmolekülen in der Plasmamembran und die Aminosäuren-Sequenz Arg-Gly-Asp der Pentonbasis eine entscheidende Rolle (Neumann et al., 1988; Biermann et al., 2001). Einige Ad erkennen zudem auch das CD46-Rezeptormolekül, ein *membrane cofactor protein*, oder nutzen Sialinsäure als Rezeptor (Gaggar et al., 2003; Arnberg et al., 2002; Smith et al., 2010).

Der Zellrezeptor wird nach Bindung des Virus mittels Vesikeln in das Zytosol transportiert. Die Pentonproteine ermöglichen durch ihre Toxizität die Lyse der Vesikel und somit Freisetzung des Virus im Zytosol. Von dort leiten Mikrotubuli nach Bindung der Hexonproteine das Virus in den Zellkern (Greber et al., 1993). Dort erfolgt in der frühen Zyklusphase zunächst die Bildung von regulatorischen Proteinen und anschließend in der späten Phase die Synthese struktureller Proteine durch Transkription der viralen Gene und die DNA-Replikation. Ein Zellzyklus dauert etwa 32-36 h (Smith, 1995). Für die frühe Phase werden 6-9 h benötigt. Am Zyklusende wird die Wirtszelle lysiert und die Virionen freigesetzt. Ad besitzen eine hohe replikative Aktivität. Aus einer

Zelle können sich mehr als 10.000 Virionen bilden (Shenk et al., 2001; Kay et al., 2001). Ihre Elimination erfolgt v.a. durch zytotoxische T-Zellen (Horwitz, 2001).

### 1.8.2 Adenovirale Vektoren

AdV werden seit vielen Jahren in der Gentherapie verwendet (Roy-Chowdhury und Horwitz, 2002). Sie sind gekennzeichnet durch eine sehr effiziente Transfektionsrate im Vergleich zu nichtviralen Vektoren, wie den Liposomen, kationischen Polymeren, *gene gun* oder der Elektroporation von DNA. Sie lassen sich sowohl in replizierende als auch nicht replizierende Zellen transduzieren (Fallaux et al., 1996; Schiedner et al., 1998). Weitere Vorteile sind, dass ihre Transduktion auch unabhängig vom Zellzyklus ist und man hohe Titer, zwischen  $1 \times 10^{10}$  und  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml, generieren kann (Imperiale und Kochanek, 2004; Kay et al., 2001). Zudem baut sich ihre DNA aufgrund ihrer episomalen Lage nicht ins Zellgenom ein. Somit werden die Transgene transient exprimiert (Harui et al., 1999). Ad weisen einen natürlichen Hepatropismus auf, d.h. sie infizieren *in vivo* bevorzugt Hepatozyten und akkumulieren zu einem großen Teil spontan in der Leber (Jaffe et al., 1992; Nunes et al., 1999), was für eine leber-assoziierte Therapie vorteilhaft ist.

Zur Verwendung kommen meist replikationsdefiziente Ad, wobei bevorzugt eine E1-Deletion vorliegt. Ihre Transfektion erfolgt in Helferzelllinien, wie den 911-Zellen (Fallaux et al., 1996; He et al., 1998; Morsy und Caskey, 1999). Replikationsdefiziente Ad sind für den Menschen ohne Verlust ihrer hohen Transfektionsrate gering pathogen. Jedoch initiieren sie eine Immunreaktion im Wirtsorganismus, wobei v.a. zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beteiligt sind (Tripathy et al., 1996; Yang et al., 1994). Diese Immunreaktion kann zum Verlust der applizierten transfizierten Zellen mit ihren zu präsentierenden Antigenen führen und somit Therapieerfolge limitieren (Yang et al., 1996; Morsy et al., 1995; Thomas et al., 1993). Zum Anderen aber bietet sie, v.a. aufgrund der Triggerung von zytotoxischen T-Zellen, ein hohes Potenzial in der Anwendung als Vakzinierungstherapie (Xiang et al., 1996). Die hohe Kontaminationsrate der Bevölkerung mit Ad bereits in jungen Jahren kann allerdings den immunstimulatorischen Effekt einer Vakzinierung mit AdV mindern. Jedoch zeigte sich in Mausversuchen, dass Tiere, die bereits mit Ad infiziert waren, nur einen geringen Verlust an Immunantwort nach Vakzinierung aufwiesen (Xiang et al., 1996). Mittlerweile wurden vielen verschiedene Ad

entwickelt. Die Ad-Typen 2 und 5 werden am häufigsten verwendet (Koesdy und Hedleys, 2010; Meier und Greber, 2004; Bett et al., 1993).

## 1.9 Zielsetzung

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass AFP-gepulste DC eine AFP-spezifische und effiziente Immunantwort *in vitro* initiieren. In klinischer Anwendung konnte jedoch kein Effekt erzielt werden. Ursache hierfür ist das stark immunsuppressive Tumormilieu. Die Anwendung des CD40L als potentes kostimulatorisches Molekül kann dieses immunsuppressive Tumormilieu verändern und zur Steigerung einer DC-basierten Immunantwort gegen das HCC in der Maus durch erfolgreiche Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems führen (Gonzalez-Carmona et al., 2006; 2008).

Ziel dieser Arbeit war es nun, eine HCC-spezifische Immunantwort durch eine Vakzinierung mit AFP-gepulsten DC zu induzieren und sie durch Kombination mit einer i.t. Injektion von CD40L-exprimierenden DC zu verbessern. Mit der subkutanen (s.c.) Gabe von AFP-DC kann eine AFP-spezifisch T-Zell-Antwort initiiert werden (Gonzalez-Carmona et al., 2006). Die i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC führt zur proinflammatorischen Veränderung des immunsuppressiven Tumormilieus.

Als Tumormodell wurde das s.c. HCC-Modell in C3H-Mäusen verwendet.

Bei diesem kombinierten Therapieansatz wurden mögliche synergistisch-antitumorale Effekte in Bezug auf das Tumorstadium und das Überleben der Mäuse untersucht. Darüberhinaus wurden die immunologischen Effekte im Tumor über Quantifizierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Analyse des Zytokinmilieus auf IL-10, IFN-gamma und IL-12 im Tumor nach abgeschlossener Therapie untersucht. Zudem erfolgte eine Analyse des apoptotischen Effektes von CD40L als weiteren Mechanismus seiner antitumoralen Wirksamkeit auch im s.c. HCC-Milieu von C3H-Mäusen.



## **2. Material**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Verwendete Zelllinien**

##### 911-Zellen (Fallaux et al., 1996)

911-Zellen entstammen von humanen embryonalen Retinoblasten. Es handelt sich um adhärenz epitheliale, einschichtig wachsende Zellen. Sie sind mit den Basenpaaren 79-5789 der E1-Region des humanen Ad Serotyp 5 (bp 79-5789) stabil transfiziert. Die Zelllinie 911 dient als Verpackungszelllinie, die eine Vermehrung replikationsdefizienter Ad der 1. Generation (mit Deletion der E1-Region) ermöglicht. Sie sind sehr gut mit Ad transduzierbar und werden daher zur Propagation und Titrierung von AdV verwendet.

##### A549-Zellen (ATCC, CCL-185)

Dies sind humane adhärenz wachsende epitheliale Lungenkarzinomzellen (Lieber et al., 1976). Sie exprimieren Wildtyp p53 und in großem Maße den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), der zur Aufnahme von Ad nötig ist. Somit sind sie ebenfalls sehr gut mit AdV transduzierbar (Davison et al., 2001).

##### Hepa 1-6 (ATCC, CRL-1830)

Hierbei handelt es sich um eine murine Hepatomzelllinie aus einem BW 7756 Lebertumor einer C57L Maus. Es ist eine adhärenz Zelllinie, die murines AFP exprimiert (Darlington et al., 1980; Darlington, 1987). Sie sind in der Lage in serumfreiem Medium zu wachsen. Sie sind syngene zu den C57L/J-Mäusen (Grimm et al., 2000).

##### Hepa 129 (NCI-Frederick Cancer Research and Development Center)

Hepa 129-Zellen entstammen aus einem Tumorfragment, welches aus einem murinen HCC einer C3H-Maus isoliert wurde. Es handelt sich hierbei um eine Suspensionszelllinie.

### Hepa 129-mAFP

Diese Hepa 129-Zellen sind stabil mit einem Expressionsvektor transfiziert, der für das mAFP kodiert. Hierfür wurde die gesamte cDNA des mAFP in das eukaryontische pCI Plasmid (Promega, Madison, WI) kloniert und dann mittels dem BMG-neo-mAFP-Plasmid in die Hepa 129-Zellen stabil transfiziert (Hanke et al., 2002a). Sie besitzen ein Neomycin Resistenzgen. Um diese Zellen zu selektieren, erfolgte ihre Kultivierung mit dem Selektionsantibiotikum Neomycin (G418) in einer Konzentration von 1000 µg/ml.

#### **2.1.2 Reagenzien für Zellbiologie**

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , (DMEM) mit Glutamax	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Ethylendiaminteraessigsäure (EDTA)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Fötales hitzeinaktiviertes Kälberserum (FCS)	Pierce/Perbio (Bonn)
Neomycin (G418)	PAA (Cölbe)
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (100 x)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI), 1640 Medium mit Glutamax	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin- EDTA (0,5 g/l Trypsin (1:250) und 0,2 g/l Ethylendiaminotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

#### **2.1.3 Zusammenfassung verwendeter Zellkulturmedien**

Alle Zellkulturmedien wurden stets frisch angesetzt.

Zellkulturmedium für die adhärenente Zelllinien (911, A549 und Hepa 1-6)

- 500 ml DMEM
- 10 % v/v FCS
- 50 U/ml Pen
- 50 µg/ml Strep

Zellkulturmedien für Hepa129 und Hepa129-mAFP
- 500 ml RPMI
- 10 % v/v FCS
- 50 U/ml Pen
- 50 µg/ml Strep
- 1000 µg/ml (700 µl) Selektionsantibiotikum G418 für Hepa129-mAFP
DC-Medium
- 500 ml RPMI
- 10 % v/v FCS
- 50 U/ml Pen
- 50 µg/ml Strep
- 200 U/ml mGM-CSF
- 100 U/ml mL4
Einfriermedium
- 90 % (v/v) FCS
- 10 % (v/v) DMSO

## 2.2 Lösungen für die Propagation, Aufreinigung und Titerbestimmung adeno-viraler Vektoren

### 2.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose Typ VII <i>low gelling temp</i> 1,5 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Cäsiumchlorid (CsCl)	Biomol (Hamburg)
Glyzerol	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Hefe-Extrakt	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipofectamin	Invitrogen (Mannheim)
L-Glutamin (200 mM)	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
<i>Minimum Essential</i> Medium (10 x)	Invitrogen (Mannheim)
Natriumdodecylsulfonat (SDS)	Serva GmbH (Heidelberg)
Natriumchlorid	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
OptiMEM	Invitrogen (Mannheim)

PBS mit Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> (PBS <sup>++</sup> )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	Invitrogen (Mannheim)
Tris ultra pure (Tris)	ICN (Aurora, Ohio, USA)

### 2.2.2 Zusammenfassung verwendeter Lösungen

<p>Cäsiumchlorid (CsCl)-Lösungen in TE-Puffer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dichte von 1,2 g/ml, 13,85 g CsCl in 50 ml TE-Puffer</li> <li>- Dichte von 1,33 g/ml, 22,5 g CsCl in 50 ml TE-Puffer</li> <li>- Dichte von 1,45 g/ml, 30,5 g CsCl in 50 ml TE-Puffer</li> </ul>
<p><i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> (2 x) für Plaque-Assay (MEM 2 x)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 ml MEM 10 x</li> <li>- 65 ml Aqua bidest</li> <li>- 2 ml Penicillin/Streptomycin</li> <li>- 2 ml L-Glutamin</li> <li>- 2 ml Hefe-Extrakt (5 %)</li> <li>- 7-10 ml NaHCO<sub>3</sub> (8,4 %) zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4</li> </ul>
<p>OD-Puffer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,1 % (m/v) SDS</li> <li>- 10 mM Tris/Chlorid</li> <li>- 1 mM EDTA</li> <li>- in Aqua bidest</li> </ul>
<p>Plaque-Assay-Gelschicht</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1:1 (v/v) MEM 2x und Agarose Typ VII</li> <li>- 2 % Pferdeserum</li> </ul>
<p>Transduktionsmedium für 911-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 ml DMEM</li> <li>- 2 % v/v FCS</li> <li>- 50 U/ml Pen</li> <li>- 50 µg/ml Strep</li> </ul>
<p>Transduktionsmedium für murine DC</p>

<ul style="list-style-type: none"> <li>- RPMI</li> <li>- 2 % hitzeinaktiviertes FCS</li> </ul>
Tris/EDTA (TE-Puffer) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mM EDTA</li> <li>- 10 mM Tris (pH 8,1)</li> <li>- in Aqua bidest</li> </ul>
Überschichtungsmedium ( <i>overlay</i> ) <ul style="list-style-type: none"> <li>- aufgekochte und im Wasserbad bei 37 °C abgekühlte sterile Agarose</li> <li>- MEM 2 x im Verhältnis 1:1 zur Agarose</li> <li>- 2 % FCS</li> </ul>

### 2.3 Verwendete adenovirale Vektoren

AdV wurden zum Einbringen von Transgenen in eukaryontische Zellen verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind Vektoren der 1. Generation mit Deletion der E1-Gene und besitzen den CMV-Promotor, 3'-kodierende Sequenz des Cytomegalie-Virus-Promotors. Dieser ermöglicht ihre Expression in eukaryontischen Zellen.

#### 2.3.1 Ad-mAFP

Das replikationsdefiziente AdmAFP kodiert für das mAFP. Die Herstellung des dazugehörigen Ad erfolgte, wie bereits von der eigenen Arbeitsgruppe publiziert, mit dem AdEasy-System (Gonzalez-Carmona et al., 2008; He et al., 2007). Das Plasmid BMG-neo-mAFP enthält die vollständige cDNA des mAFP und wurde ebenfalls in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hergestellt (Hanke et al., 2002a).

#### 2.3.2 Ad-CD40L

Dieser AdV der 1. Generation kodiert für murines CD40L. Er wurde uns freundlicherweise von Prof. Jesus Prieto von der Universität Navarra in Spanien zur Verfügung gestellt (Schmitz et al., 2001).

#### 2.3.3 Ad-LacZ

Dieser AdV enthält die cDNA des bakteriellen  $\beta$ -Galactosidase LacZ-Gens, und ist ebenfalls ein replikationsdefizientes Ad. In dieser Arbeit diente es als Kontrollvektor. Wir

erhielten das Ad-LacZ ebenfalls von Prof. Jesus Prieto der Universität Navarra in Spanien.

## 2.4 Weitere häufig verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer

### 2.4.1 Chemikalien und Reagenzien

Ac-Asp-Glu-Val-asp-afc	Bachem (Heidelberg)
Acrylamid (30 %) / Bisacrylamid (0,8 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
APS	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA (Cölbe)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Calciumchlorid (CaCl)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Complete mini	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dithiotreitol	Serva GmbH (Heidelberg)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Folinreagenz (Lösung B)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glyzin	Merck (Darmstadt)
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumbikarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Kollagenase	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Kupferartrat-Reagenz (Lösung A)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Luminol-Reagenz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumdichlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	KMF (Lohmar)
Natriumdihydrogephosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Delta Select (Pfullingen)
Natriumdodecylsulfonat (SDS)	Serva GmbH (Heidelberg)

Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N-[2-Hydroxyethyl]piperazin- N'-[2-ethansulfonsäure]	Bachem (Heidelberg)
Ponceau S	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Propidiumiodid	BD Biosciences (Heidelberg)
RSB-Puffer	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
trans-1,2-Diamino-cyclohexan	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
N,N,N',N' tetraessigsäure (CDTA)	
Tetramethyldiamin (TEMED)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Triton X-100	Serva GmbH (Heidelberg)
Tween 20	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Zitronensäure	Fluka AG (Buchs, Schweiz)

#### 2.4.2 Zusammenfassung verwendeter Lösungen

Brefeldin A (BFA) Stammlösung <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mM Brefeldin A</li> <li>- in Methanol</li> </ul>
DC-Lysispuffer <ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 mM Tris-Phosphat</li> <li>- 2 mM CDTA</li> <li>- 10 % (v/v) Glycerol</li> <li>- 1 % (v/v) Triton X-100</li> <li>- in Aqua bidest</li> <li>- pH-Wert-Einstellung auf 7,8</li> </ul>
DNA-Extraktionspuffer <ul style="list-style-type: none"> <li>- 192 ml Natriumdihydrogenphosphat (0,2 M)</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"><li>- 8 ml Zitronensäure (0,1 M)</li><li>- pH-Wert-Einstellung auf 7,8</li></ul>
<p>Erythrozyten-Lyse-Puffer (1:10 mit Ampuwa verdünnt)</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 8,29 g <math>\text{NH}_4\text{Cl}</math></li><li>- 1,0 g <math>\text{KHCO}_3</math></li><li>- 0,0371 g EDTA</li><li>- in 1000 ml Aqua bidest</li></ul>
<p>Laufpuffer (5 x), (Lämmli-puffer)</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 25 mM Tris</li><li>- 250 mM Glycin</li><li>- 0,5 % (m/v) SDS</li><li>- in Aqua bidest</li></ul>
<p>MACS-Puffer</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 0,5 % (m/v)</li><li>- 1 mM EDTA</li><li>- in <math>\text{PBS}^{++}</math></li></ul>
<p>NaOH/EDTA-Lösung</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 2 M NaOH</li><li>- 2 mM EDTA</li></ul>
<p>PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 20,0 mM <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></li><li>- 50,0 mM NaCl</li><li>- 0,2 g KCl</li><li>- 800 ml Aqua bidest</li><li>- pH-Wert-Einstellung bei 7,4</li></ul>
<p><math>\text{PBS}^{++}</math> mit BSA</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 1,15 g <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></li><li>- 8 g NaCl</li><li>- 0,2 g <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></li><li>- 0,2 g KCl</li><li>- 0,1 g <math>\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}</math></li></ul>



<ul style="list-style-type: none"><li>- 0,133 g <math>\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}</math></li><li>- 0,1 % BSA</li><li>- in 1000 ml Aqua bidest</li><li>- pH-Wert-Einstellung auf 7,4</li></ul>
<p>Ponceau-S-Lösung (Sambrook et al., 1989)</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 2 g Ponceau S</li><li>- 30 g Trichloressigsäure</li><li>- 30 g Sulfosalicylsäure</li><li>- in 100 ml Aqua bidest</li></ul>
<p>Probenpuffer (5 x)</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 125 M Tris</li><li>- 30 % (m/v) Glycerin</li><li>- 5 % (m/v) SDS</li><li>- 1,25 <math>\mu\text{g/ml}</math> Bromphenolblau</li><li>- in Aqua bidest</li><li>- pH-Wert-Einstellung auf 6,8</li></ul>
<p>Propidiumiodid-Lösung</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 3,8 mM Natriumcitrat</li><li>- 50 <math>\mu\text{g/ml}</math> Propidiumiodid</li><li>- in Phosphat gepufferter Salzlösung</li></ul>
<p>RNase Stammlösung</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 10 mg/ml RNase A</li><li>- in Aqua bidest</li><li>- 5 Minuten bei 95 °C aufkochen</li></ul>
<p>Sammelgelpuffer (4 x)</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 0,5 M Tris</li><li>- 0,4 % (m/v) SDS</li><li>- in Aqua bidest</li><li>- pH-Wert-Einstellung auf 6,8</li></ul>
<p>TBST 10 x (Tris gepufferte Salzlösung (TBS)-Tween)</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 100 mM Tris</li></ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,5 M Natriumchlorid</li> <li>- 0,5 % (m/v) Tween 20</li> <li>- in Aqua bidest</li> <li>- pH-Wert-Einstellung auf 7,4</li> </ul>
<p>TBST-<i>Blocking</i>-Puffer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mM Tris</li> <li>- 150 mM Natriumchlorid</li> <li>- 0,05 % (m/v) Tween 20</li> <li>- 5 % (m/v) Milchpulver</li> <li>- in Aqua bidest</li> </ul>
<p>Transferpuffer (5 x)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 mM Tris</li> <li>- 192 mM Glycin</li> <li>- in 1000 ml Aqua bidest</li> </ul>
<p>Transferpuffer (gebrauchsfertig)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 ml Transferpuffer (5x)</li> <li>- 20 ml Methanol gekühlt</li> <li>- in 60 ml Aqua bidest</li> </ul>
<p>Trenngelbuffer (4 x)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,5 M Tris</li> <li>- 0,4 % (m/v) SDS</li> <li>- in Aqua bidest</li> <li>- pH-Wert-Einstellung auf 8,8</li> </ul>

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Durchflusszytometrie

Die folgenden Antikörper (Ak) wurden von ebiosciences (San Diego, CA) bezogen.

- Ziege-anti-Kaninchen-IgG, FITC-gekoppelt
- CD3-Ak, FITC-/PE-gekoppelt
- CD4-Ak, FITC-/PE-gekoppelt

- CD8-Ak, FITC-/PE-gekoppelt
- FcR-Block (*affinity purified anti-mouse CD16/32*)

### 2.5.2 MACS-Depletion

Die folgenden Ak wurden von Southern Biotech/Biozol (Eching) geliefert.

- Ratte-anti-Maus LY6G
- Ratte-anti-Maus CD45R
- Ratte-anti-Maus MHC II
- Ratte-anti-Maus CD4
- Ratte-anti-Maus CD8

Den folgende Ak erhielten wir von Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)

- Ziege-anti-Ratte IgG *MicroBeads*

### 2.5.3 Western Blot

Kaninchen-anti-mAFP, polyklonal

Dieses Serum wurde  
freundlicherweise von  
Frau Dr. Hanke zur  
Verfügung gestellt  
(Hanke et al., 2002a)

Ziege-anti-Kaninchen IgG,  
Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt

Santa Cruz Biotechnology  
(Heidelberg)

### 2.6 Enzyme

RNase A

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 2.7 Zytokine

Die hier verwendeten Zytokine wurden von Peprotech/Biozol (Eching) bezogen:

- mGM-CSF
- mIL-4

## 2.8 Reagenzsysteme (Kits)

(ELISA) kits

Bioscience (San Diego, CA)

## 2.9 Mausmodell

Folgende Materialien wurden zur Narkose der Mäuse verwendet:

Isofluran	Abbot (Wiesbaden)
Ketamin	Pharmacia (Erlangen)
NaCl (0,9 %)	B. B. Braun AG (Melsungen)
Rompun	Bayer (Leverkusen)

## 2.10 Geräte

Agaroseelektrophoresekammer	Eigenbau MPI-f. Biochemie (Martinsried)
Ausschwingrotor, SW41	Beckmann Coulter (Krefeld)
Autoklav (Modell 3870 ELV)	Tuttnauer (Jerusalem, Israel)
Bio- und Megafuge	Heraus (Zürich, Schweiz)
Brutschrank	Heraeus (Zürich, Schweiz)/ Fisher Scientific (Schwerte)
Coulter Epics XL Zytometer	Coulter Immunotech (Krefeld)
Durchflußzytometer, EPICS XL	Beckman Coulter (Krefeld)
Durchlichtmikroskop, DM IL	Leica (Wetzlar)
Elektrophoresekammer (Protein)	Biorad (München)
ELISA-Reader	Dynatech Laboratories (Frankfurt)
Festwinkelrotor, SW50 TI	Beckman Coulter (Krefeld)
Fluoreszenzmikroskop	Leica (Wetzlar)
Fluorometer	Shimadzu RF-5301PC
Gefriermikrotom	Leica (Wetzlar)
Gefrierschränke	Bosch (Stuttgart)

Gel-Videoprinter	Mitsubishi (Japan)
Kühlzentrifuge	Heraeus Sepatech (Osterode)
Laminar-Flow-Bank	Heraeus (Zürich, Schweiz)
Luminometer	Berthold (Pforzheim)
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	Labor Brand (Giessen)
Microfuge	Lite Beckmann (USA)
Mikropipetten	Gilson (Bad Camberg)
MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Minischüttler	IKA-Works (Wilmington, NC, USA)
Minishaker, Vortex	IKA, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)
Netzgerät (Elektrophorese/ <i>Westernblot</i> )	Biorad (München)
pH-Meter	Hannah Instruments (Kehl am Rhein)
Pipetten	Gilson S.A. (Frankreich)
Pipettierhilfe	Greiner (Solingen)
Photometer, UV Mini 1240	Shimadzu (Japan)
Präzisionskuvetten, Quarzglas	Hellma (Mühlheim)
Schüttelinkubator	Labomedic (Bonn)
Schüttler, ProMax 2000	Heidolph (Kehlheim)
<i>Semi-Dry</i> -Blotkammer	Biorad (München)
Spannungsgeber (Powersupply)	Fisher Scientific (Schwerte)
<i>Swing Out Rotor</i> , SW 41	Beckman Coulter (Krefeld)
Thermomixer, 5436	Eppendorf GmbH (Hamburg)
Thermocycler	Perkin Elmer Cetus (California, USA)
Tischzentrifuge, Biofuge 13	Heraeus Sepatech (Osterode)

Tischzentrifuge, Microfuge Lite	Beckman Coulter (Krefeld)
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Tisch	Berthold (Pforzheim)
Waage, SBA 52	Scaltec (USA)
Wasserbad	Köttermann (Uetze-Hänigsen)

## 2.11 Verbrauchsmaterialien

Ammoniumacetat	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Autoradiographiefilm, CL-XPosure	Pierce/Perbio (Bonn)
Chirurgische Instrumente	Martin, Tuttlingen
Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser (Braunschweig)
Dialyse-Kammer (3-15 ml)	Pierce/Perbio (Bonn)
Einmalkanülen 20 G x 1 ½ " 0,9 x 40 mm	Terumo Cooperation
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Amefa (Limburg)
FACS-Röhrchen, 5 ml (75 mm x 12 mm)	Labomedic (Bonn)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Gel-Blotting-Papier, GB 003	Schleicher & Schuell (Dassel)
Insulin-Spritzen (40 U/ml)	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Kryo-Röhrchen	Nalge Company (Rochester, USA)
Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Multipette plus	Eppendorf (Hamburg)
Multiwell-Platten (6-Well, 24-Well, 96-Well)	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma (Mühlheim)
Polypropylen-Röhrchen	Greiner bio-one GmbH

Objektträger	(Frickenhausen)
Optiseal-Röhrchen	Engelbrecht (Edermünde)
Polyallomer-Zentrifugen-Röhrchen (1,5, 2, 15, 50 ml)	Beckman Coulter (Krefeld)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Beckman Coulter (Krefeld)
Skalpell (Cutfix No. 22)	Eppendorf (Hamburg)
Sterilfilter (0,2 µm)	Aesculap (Tuttlingen)
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen (75 und 175 cm <sup>2</sup> )	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturschalen (Ø 30, 60 und 100 mm)	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Zellschaber	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
	Sarstedt (Nümbrecht)

## 2.12 Tierstamm

In dieser Arbeit wurden 8 bis 12 Wochen alte männliche C3H-Mäuse verwendet. Sie wurden von der Firma Charles River bezogen.

### C3H/N-Mäuse (C3H/HeNCrl)

Dieser Stamm wurde aus einer Kreuzung eines „Bagg Albino“-Weibchens und eines DBA/J-Männchens im Jahre 1920 von Strong entwickelt. Charles River Laboratories erhielten diesen Stamm im Jahre 1974. Dieser Mausstamm ist syngen zur HCC-Zelllinie Hepa 129.

### **3. Methoden**

#### **3.1 Zellkultur**

##### **3.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Die Kultivierung und Inkubation aller Zelllinien erfolgte in einem Zellkulturbrutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % gesättigter Luftfeuchtigkeit. Zur Verhinderung einer Bakterien- und Pilzkontamination wurde stets steril unter einer Laminar-*Flow*-Werkbank gearbeitet. Durch die Hinzugabe einer 2-fach-Antibiose zu allen Kulturmedien, bestehend aus Penicillin und Streptomycin, erfolgte ein zusätzlicher Schutz. Die Kultivierung erfolgte in beschichteten Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturplatten. Alle Zellkulturmedien wurden stets frisch angesetzt. Bei stabil transfizierten Zellen, wie den Hepa 129-mAFP, wurde zusätzlich ein Selektionsantibiotikum hinzugegeben.

##### **3.1.2 Auftauen von in Stickstoff gelagerten Zellen**

Hierbei wurden die in flüssigem Stickstoff befindlichen, in DMSO eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37 °C langsam aufgetaut. Das DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen in gefrorenem Zustand und somit eine Schädigung der Zellmembran. In aufgetautem Zustand ist es jedoch toxisch und muss daher ausgewaschen werden. Hierzu wurde der aufgetaute Inhalt der Kryoröhrchen in 10 ml vorbereitetes vorgewärmtes DMEM bzw. RPMI-Medium pipettiert, in der Megafuge bei 1200 Upm, 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert und der DMSO-haltige Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde zunächst in 1 ml DMEM-Medium resuspendiert. Nach Hinzufügen von weiteren 14 ml Medium wurde die Zellsuspension in einer beschichteten T75-Flasche ausgesät und in den Brutschrank zur Inkubation gestellt. Der erste Medienwechsel erfolgte nach 24 h.

##### **3.1.3 Passagieren von adhärenenten Zellen**

Alle 48-72 h, wenn eine Konfluenz der Zellen von 90-100 % erreicht war, wurden sie passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 5 ml PBS behutsam gewaschen und mit 4 ml Trypsin für 2-3 Minuten im Brutschrank inkubiert (trypsiniert). Das Trypsin löst adhärenente Zellen vom Zellboden ab. Mikroskopisch kann dieser



Vorgang verfolgt werden, wobei sich die Zellen langsam abrunden und ablösen. Das Waschen mit PBS vor Trypsingabe ist notwendig, um die im Medium enthaltenen zweiwertigen Kationen, die das Trypsin inaktivieren würden, zu entfernen. Das Trypsin wiederum ist bei zu langer Inkubationszeit für die Zellen toxisch und muss daher rasch mit Medium inaktiviert werden. Hierfür wurden 6 ml DMEM hinzugefügt und die Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren vereinzelt. Von der nun vorliegenden Zellsuspension wurden die Zellen je nach Dichtegrad und Bedarf in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 in neue Flaschen bzw. Platten ausgesät. Anschließend wurde die entsprechende Menge an frischem Medium hinzugefügt und die Zellen in den Brutschrank bis zur nächsten Passagierung oder Verwendung, z.B. zur Propagation von adenoviralen Vektoren (s.u.), inkubiert.

#### **3.1.4 Passagieren von Suspensionszellen**

Die Zellsuspension wurde aus den Zellkulturplatten direkt in Falcon-Röhrchen (FR) pipettiert, in der Zentrifuge bei 800 Upm und RT für 5 Minuten sedimentiert, die Pellets im jeweiligen Medium resuspendiert und auf die neuen Zellkulturplatten mit frischem Medium gegeben.

#### **3.1.5 Einfrieren und Aufbewahren von adhärenenten Zellen**

Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von etwa 90-100 % wurden die Zellen trypsinisiert (s. 3.1.3). Nach Inaktivierung des Trypsins mit 6 ml DMEM wurden 2 ml der Zellsuspension entnommen, in einer Erhaltungsflasche mit 23 ml DMEM aufgefüllt und in den Brutschrank zur fortführenden Kultivierung gestellt. Die restlichen 8 ml an Zelllösung wurden bei 1200 Upm 5 Minuten lang bei RT abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 8 ml frisch angesetztem Einfriermedium resuspendiert und auf 8 Kryoröhrchen (1 ml/Kryoröhrchen) aliquotiert. Diese wurden gut verschlossen in Styroporbehälter zunächst bei -80 °C schonend mit einer Abkühlungszeit von etwa 1 °C pro Stunde eingefroren und im Intervall zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **3.1.6 Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer nach Neubauer**

Die Neubauer-Zählkammer wird standardmäßig zur Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellsuspension verwendet. Sie besteht aus einem mit einer Vertiefung versehenem dicken Glasobjektträger. Zur Zellzahlbestimmung wurde zudem ein geschliffe-

nes Deckglas benötigt. Durch Auflegen des Deckglases auf den Objektträger entsteht eine Kammer von 0,1 mm Höhe. In dieser Vertiefung des Objektträgers ist ein Gitternetz eingearbeitet. Dieses besteht aus 4 B-Kammern, die in 16 kleinere C-Felder aufgeteilt sind. Diese lassen sich wiederum in D-Felder unterteilen, die eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Tiefe von 0,1 mm aufweisen und somit einem Volumen von 0,1 µl entsprechen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer homogenen Zellsuspension (je nach Zelldichte 1:10 verdünnt) entnommen, mit 0,4 %-igem Trypanblau in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und unter das aufgelegte Deckglas in die Zählkammer pipettiert. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung. Trypanblau ist nicht in der Lage durch die Plasmamembran vitaler Zellen durchzudringen, so dass vitale Zellen nicht angefärbt werden. Sie sind lichtmikroskopisch daher als hell leuchtende Zellen zählbar. Es wurden alle 4 B-Felder ausgezählt. Die Berechnungsformel lautet:

$$\text{Zellzahl} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} : 4 \text{ (Mittlung der B-Quadrate)} \times 10^4 = \\ \text{Zellzahl/ml der Ausgangszellsuspension}$$

Falls aufgrund einer hohen Zellkonzentration eine weitere Verdünnung vorgenommen wurde, erfolgte die entsprechende Anpassung der Formel durch Multiplikation des zusätzlichen Verdünnungsfaktors.

## 3.2 Viruspropagation und Aufreinigung

### 3.2.1 Transduktion von 911-Zellen mit adenoviralen Vektoren zur Viruspropagation

AdV der 1. Generation sind aufgrund des Fehlens der E1-Region nicht in der Lage sich zu replizieren. Zur Viruspropagation diente daher die Verpackungszelllinie 911, welche die E1-Gene enthält. Hierfür wurden die 911-Zellen mit den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren Ad-mAFP, Ad-CD40L und Ad-LacZ transduziert. Als Transduktion bezeichnet man das Einbringen eines Transgens mittels Virus in einen anderen Organismus, in diesem Fall eine eukaryontische Zelle.

911-Zellen wurden mit einer MOI von 1 (*multiplicity of infection* bzw. pfu/Zelle) transduziert. MOI von 1 bedeutet, dass ein infektiöser Viruspartikel pro 911-Zelle zur Transduktion gegeben wird. Hierfür wurde nach Auftauen des Virus zunächst die

entsprechende Virusmenge für MOI 1 ausgerechnet und mit der entsprechenden Menge an Transduktionsmedium (s. Kap. 2.2) verdünnt. Um große Mengen an Viren zu erhalten, wurden die 911-Zellen vor Transduktion auf 30 bis 60 145 mm-Zellkulturplatten expandiert (Fallaux et al., 1996). Die Anzahl an Zellen in einer 145 mm-Platte bei vollständiger Konfluenz betrug etwa  $2 \times 10^7$  Zellen (MOI 1 =  $2 \times 10^7$  pfu/Platte der Virus-suspension). Damit die Diffusionsstrecke des Virus möglichst gering gehalten wird, erfolgte die Transduktion allgemein in möglichst kleinem Volumen. Das alte Medium wurde schrittweise aus den Zellkulturplatten abgesaugt und die Zellen mit jeweils 5 ml der vorbereiteten Virussuspensionsverdünnung vorsichtig beschichtet. Die Platten wurden anschließend zur Inkubation für 2 h in den Brutschrank gestellt, wobei sie zur Verbesserung der Transduktionseffizienz zwischendurch mehrmals geschwenkt wurden. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Platten mit komplettem DMEM-Medium auf insgesamt 25 ml aufgefüllt und im Brutschrank so lange weiter inkubiert, bis sich der gewünschte zytopathische Effekt mikroskopisch zeigte. Dieser Effekt ist charakterisiert durch ein typisches Abrunden und Ablösen der 911-Zellen vom beschichteten Boden der Zellkulturplatte. Man geht davon aus, dass sich zu diesem Zeitpunkt der Großteil der adenoviralen Vektoren im Zellkern befindet (Horwitz, 2001). In der Regel tritt dieser Zeitpunkt nach etwa 2-3 Tagen Inkubationszeit ein.

### **3.2.2 Ernten des Virus**

Bester Erntezeitpunkt für AdV nach Transduktion ist, wenn etwa 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt zeigen. Das Abpassen des optimalen Erntezeitpunktes ist sehr wichtig. Erfolgt die Ernte zu früh, haben die Zellen nicht genügend Ad produziert. Wird er zu spät gewählt sind die meisten Zellen aufgrund des zytopathischen Effektes bereits tot, was einen noch höheren Virusverlust bedeuten würde. Daher ist eine tägliche mikroskopische Kontrolle der Zellen sehr wichtig, um eine möglichst hohe Virusausbeute zu erzielen. Für die Virusernte wurden die adhären Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und zusammen mit den bereits vom Plattenboden gelösten Zellen in 50 ml FR überführt. Die Röhrchen wurden bei 1200 Upm und 4 °C 10 Minuten lang zentrifugiert. AdV sind bei 4 °C stabiler. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden anschließend in 6 ml der zuvor frisch angesetzten PBS<sup>++</sup>/10 % Glycerol-Lösung vereinigt. Aufgrund der Masse der Pellets betrug das Endvolumen der

Zellsuspension 8 ml. Dieses Endvolumen wurde auf zwei 15 ml FR verteilt. Um die Viruspartikel freizusetzen, wurden die Zellen nun lysiert. Hierfür wurden sie in insgesamt 4 Zyklen Einfrieren in Stickstoff und Auftauen in 37 °C-warmem Wasserbad lysiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der lysierten Zellen bei 3000 Upm und 4 °C für 10 Minuten. Die nun im Überstand freigesetzten Viruspartikel wurden vorsichtig abpipettiert, in ein neues 15 ml FR überführt und bei -80 °C bis zur Aufreinigung mittels Cäsiumchlorid(CsCl)-Dichtezentrifugation eingefroren.

### **3.2.3 Aufreinigung und Konzentrierung von adenoviralen Vektoren mittels Cäsiumchlorid-Dichtezentrifugation**

Die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht eine Auftrennung von Partikeln unterschiedlicher Dichte. Sie wurde zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung der jeweiligen Viruslösungen verwendet. Hierfür wurden drei Cäsiumchlorid-Lösungen unterschiedlicher Dichte angesetzt (1,2 g/ml, 1,33 g/ml, 1,4 g/ml Dichte). Die entsprechende Menge an CsCl-Pulver wurde in 50 mg 10 mMTris (pH 8,1) gelöst.

Die aus dem Stickstoff entnommene Virussuspension wurde im Wasserbad langsam aufgetaut und bei 3000 Upm 5 Minuten lang bei RT zentrifugiert. Die im Überstand befindliche Viruslösung wurde in ein separates 15 ml FR überführt. Die Aufreinigung erfolgte in drei Schritten beginnend mit dem diskontinuierlichen CsCl-Stufengradient. Dieser Schritt ermöglicht die Entfernung von zellulären Komponenten wie Proteinen, Zellmembran, Zelltrümmer und defekten viralen Partikeln aus der Virussuspension. Hierfür wurden in zwei Polyallomer-Röhrchen jeweils 3 ml an 1,4 g/ml CsCl-Lösung pipettiert, mit jeweils 4,5 ml an 1,2 g/ml CsCl-Lösung überschichtet und somit ein Gradient aufgebaut. Die Viruslösung wurde auf beide Röhrchen verteilt. Anschließend wurden die Röhrchen mit PBS<sup>++</sup>/10 % Glycerol austariert und diese in einen Winkel Rotor (LE 80K, Rotor SW41 Ti) eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte ungebremst mit maximaler Beschleunigung bei 32.000 Upm und 17 °C für 1 h. Die hierbei wirkende sehr hohe Zentrifugalkraft (>100 kg) führt zur Ausbildung eines Dichtegradienten innerhalb der beiden CsCl-Lösungen. Die Virusdichte beträgt etwa 1,3 g/ml, so dass sich eine hellblaue Virusbande zwischen den beiden CsCl-Lösungen bildet. Oberhalb der starken Virusbande befindet sich eine dünnere und schwächere Bande mit niedrigerer Dichte, die defekte Viruspartikel enthält. Die starke Virusbande (meist 1-2 ml) wurde über

Aspiration mit einer langen Kanüle gewonnen und in ein Optiseal-Röhrchen (Beckman) überführt.

In einem zweiten Schritt wurde mit dem kontinuierlichen CsCl-Gradienten fortgefahren. Dieser Schritt dient der Trennung von intakten infektiösen und defekten viralen Partikeln, wobei sich ein kontinuierlicher Dichtegradient ausbildet. Hierfür wurde die im Optiseal-Röhrchen befindliche Viruslösung mit der 1,33 g/ml CsCl-Lösung luftblasenfrei aufgefüllt, austariert, verschlossen und im Festwinkelrotor (SW50Ti, Nr. 1956) bei 40.000 Upm, 17 °C und maximaler Beschleunigung mit schwacher Bremse zentrifugiert. Durch diese zweite Ultrazentrifugation reichern sich die intakten Viruspartikel erneut in der Mitte des Optiseal-Röhrchens in Form einer milchigen Virusbande an. Oberhalb davon liegt die schwächere Bande mit den defekten Viren. Diese starke Virusbande wurde erneut über Aspiration mit einer Injektionskanüle gewonnen.

Anschließend wurde der dritte Schritt der Aufreinigung durchgeführt. Dieser dient der Entfernung des CsCl aus der Viruslösung, wobei eine Dialyse gegen PBS erfolgt. Das CsCl muss gründlich entfernt werden, da es die Zelltransduktion mit AdV stören kann. Hierfür wurde die Viruslösung in eine Dialysekammer überführt. Die Dialyse erfolgte insgesamt viermal gegen ein 100-faches Volumen an PBS. Zur Vermeidung eines CsCl-Ausfalls erfolgte der erste Dialyseschritt bei RT für 30 Minuten. Die beiden nächsten Dialysen wurden dann für jeweils eine Stunde bei 4 °C durchgeführt, wobei das PBS jedes Mal erneuert wurde. Anschließend wurde für erneute 30 Minuten gegen PBS<sup>++</sup>/10 % Glycerol bei 4°C dialysiert. Die nun gereinigte Virusstockpräparation wurde steril gefiltert, in 1,5 ml Röhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. AdV können so über Jahre gelagert werden.

#### **3.2.4 Virustiterbestimmung durch Plaque-Assay**

Der Plaque-Assay ist die Standardmethode zur Bestimmung der Konzentration infektiöser Viruspartikel einer Viruspräparation (Graham et al., 1995). Hierbei wird die Menge der AdV gemessen, die in der Lage sind, Zellen zu transduzieren.

Hierfür wurden  $3 \times 10^5$  911-Zellen pro Loch in 6-Well Platten in jeweils 4 ml DMEM ausgesät. 48 h später war eine Konfluenz von 90-100 % erreicht. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in jeweils 2 ml Transduktionsmedium pro Well gewaschen. Es wurde eine Verdünnungsreihe der Viruslösung mit Transduktionsmedium

in 10-er Schritten von  $1:10^2$  bis  $1:10^{11}$  in 50 ml FR angesetzt. Nach Absaugen des Transduktionsmediums wurden die Zellen jeweils in Dreifachbestimmung mit 1 ml an Verdünnungssuspension pro *Well*, begonnen mit der Verdünnungsstufe  $1:10^8$  bis  $1:10^{11}$ , transduziert. Als Kontrolle dienten drei *Wells*, die nur reines Transduktionsmedium erhielten. Die Zellen wurden für 2 h im Brutschrank inkubiert und zur Steigerung der Transduktionseffizienz regelmäßig im Medium geschwenkt.

Während der Inkubationszeit erfolgte die Vorbereitung des Überschichtungsmediums (s. Kap. 2.2). Nach Absaugen des Transduktionsmediums wurden die Zellen mit 4 ml des vorbereiteten Mediums pro *Well* vorsichtig beschichtet, bei RT getrocknet und die Platten anschließend für 10 Tage in den Brutschrank gestellt.

Die erfolgreiche Transduktion einer 911-Zelle mit einem aktiven Viruspartikel führt zur Lyse der Zelle und Freisetzung der Viruspartikel, welche weitere Nachbarzellen transduzieren können. Die Agarosebeschichtung verhindert dabei die Diffusion der freigesetzten Viren zu entfernten Zellen. Die transduzierten Zellen lösen sich vom Boden ab und bilden somit Plaques, die lichtmikroskopisch, teilweise auch mit dem bloßen Auge sichtbar sind. Ein Plaque wird von einem Viruspartikel verursacht. Durch das Auszählen entstandener Plaques einer bestimmten Verdünnung kann der Titer der Viruslösung präzise bestimmt werden.

Die Auswertung des Plaque-Assay erfolgte standardmäßig an Tag 10, wobei die Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und gemittelt wurde.

Die Virustiterberechnung erfolgt nun durch folgende Formel:

Anzahl der Plaques x Verdünnungsstufe ( $\text{Volumen}^{-1}$ ) = *plaque forming units*(pfu)/ml.

### **3.2.5 Messung der optischen Dichte zur Bestimmung der Viruspartikelkonzentration**

Diese Methode ermöglicht ebenfalls eine Konzentrationsbestimmung von Viruspartikeln. Vorteil hierbei ist die schnelle Ermittlung der Viruspartikelkonzentration mit relativ konstanten Ergebnissen. Nachteilig ist, dass hierbei nur eine quantitative, jedoch keine qualitative Bestimmung erfolgt, da keine Unterscheidung zwischen intakten und defekten Viruspartikeln mit dieser Methode möglich ist. Es werden die optisch sichtbaren Partikel (*optical particle units, opu*) pro ml AdV-Suspension erfasst. Hierfür wurden 30  $\mu\text{l}$

der Ad-Suspension in einem Verhältnis 1:25 mit frisch angesetztem OD-Puffer verdünnt. Die verdünnte Virussuspension wurde bei 800 Upm und 56 °C für insgesamt 10 Minuten im Thermomixer inkubiert. Hierdurch erfolgt die Inaktivierung der Viruspartikel. Anschließend erfolgte die photometrische Messung des DNA-Gehaltes der inaktivierten Vektorpartikel bei 260 nm gegen reinen OD-Puffer. Als Nullkontrolle wurde die optische Dichte von OD-Puffer (750 µl) gemessen.

Die entsprechende Formel zur Berechnung lautet:

$$\text{Opu/ml} = \text{OD}_{260} \times 25 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 1,1 \times 10^{12} .$$

Mit Hilfe dieser Bestimmung konnten die im Plaque-Assay erstellten Verdünnungsstufen angepasst werden.

### **3.2.6 Plaque-Assay in A549-Zellen**

A549-Zellen lassen sich sehr gut mit AdV transduzieren, da sie das CAR sehr stark exprimieren. Jedoch können AdV in diesen Zellen nicht replizieren, da sie kein E1-Gen enthalten. Somit bilden replikationsdefiziente Ad in A549-Zellen keine Plaques im Plaque-Assay aus. In dieser Arbeit wurde durch Plaque-Assay von A549-Zellen die Replikationsdefizienz der verwendeten AdV überprüft.

## **3.3 Dendritische Zellen**

### **3.3.1 Isolation von murinen dendritischen Zellen**

Murine dendritische Zellen (mDC) wurden aus Knochenmark von C3H Mäusen gewonnen (Inaba et al., 1992). Durch magnetische Depletion und anschließende Kultivierung mit mGM-CSF und mIL-4 erfolgte die Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen in DC.

#### **3.3.1.1 Gewinnung von murinem Knochenmark**

Hierfür wurden etwa 8 Wochen alte C3H-Mäuse, in der Regel 2-4 Mäuse, geopfert. Sie wurden zunächst mit Isofluran betäubt. Anschließend erfolgte ein Genickbruch. Um Knochenmark (KM) zu gewinnen, wurden die Femur- und Tibiaknochen präpariert und in ein 50 ml FR mit frisch angesetztem DC-Medium auf Eis überführt. Unter der Laminar-

Flow-Werkbank wurden die Knochen zunächst kurz in 70 %-igem Ethanol desinfiziert und dann in frisches eisgekühltes DC-Medium überführt. Anschließend wurden die Epiphysen des Femurs abgetrennt und das im Markraum befindliche KM mit DC-Medium ausgespült, durch ein Zellsieb gegeben und in einem 50 ml FR gesammelt. Die KM-Lösung wurde anschließend bei 1200 Upm und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde dann in frisch angesetztem sterilen Erythrozyten-Lyse-Puffer (5 ml/KM aus 2 Mäusen) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 1200 Upm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Aus dieser Suspension erfolgte die Zellzahlbestimmung, während eine weitere Zentrifugation bei 1200 Upm für 5 Minuten durchgeführt wurde. Die Ausbeute an Zellen betrug im Durchschnitt 3 bis  $5 \times 10^7$  Zellen pro 2 Mäuse.

### 3.3.1.2 MACS-Zellseparation (*magnetic cell separation*)

Diese Methode ermöglicht die Sortierung bzw. Auftrennung von Zellen aus einem Zellgemisch anhand gezielter Markierung von bestimmten Oberflächenmolekülen durch Ak. In dieser Arbeit wurden bestimmte Ak zur Markierung verschiedener Lymphozytenpopulationen in der KM-Lösung verwendet. Hierfür wurde das Pellet nach Zentrifugation in 50 µl PBS resuspendiert, mit 6 µl der vorbereiteten Ak-Lösung pro  $10^6$  Zellen resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis unter regelmäßigem Schwenken zur gleichmäßigeren Bindung der Ak inkubiert. Die Ak-Lösung bestand aus folgenden Einzelantikörpern (Schmidt et al., 2003; Lai et al., 1998), (s. Tab. 1).

<b>Antikörper:</b>	<b>Prozentualer Anteil:</b>	<b>Markierte Zellen:</b>
Ly6 G	40 %	Granulozyten
CD45 R	30 %	NK-, B- und T-Zellen
MHC II	10 %	Makrophagen
CD 4	10 %	T-Zellen
CD 8	10 %	T-Zellen

**Tab. 1:** Verwendete Ak-Lösung zur Markierung und Selektion verschiedener Immunzellpopulationen mittels MACS-Zellseparation.



Nach Ende der Inkubationszeit wurden die nicht gebundenen Ak mit 10 ml PBS durch Zentrifugation bei 1200 Upm, 4 °C und 5 Minuten entfernt. Während dessen erfolgte die Vorbereitung von 20 µl *Microbeads* gekoppelte Ziege-anti-Ratte-IgG-Ak pro  $10^7$  Zellen. *Microbeads* sind Magnetpartikel, an die Ak gebunden sind. Sie dienen als sekundärer Ak, da sie an die Fc-Region primärer Ak (s. Tab. 1) binden können.

Nach Zentrifugation des Zellpellets wurde der Überstand abgesaugt, 80 µl MACS-Puffer, sowie die berechnete Menge an *Microbeads*-gekoppelte Ak hinzugegeben, und die gesamte Lösung für 15 Minuten erneut auf Eis inkubiert. Durch Hinzufügen von 4 ml MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation wurden nach Inkubation die nicht gebundenen Ak entfernt. Währenddessen wurden die MACS-Trennsäulen (1 Säule/ Maus) vorbereitet und zunächst mit jeweils 500 µl MACS-Puffer pro Säule equilibriert. Die Säulen werden in einen Magneten eingesetzt, der ein starkes Magnetfeld aufbaut. Die mit *Microbeads* markierten Zellen werden hierdurch in der Säule zurückgehalten. Die nicht markierten Zellen werden in einem 15 ml FR gesammelt. In diesem Fall erfolgte eine Negativ-Selektion. Das Pellet wurde hierfür in 500 µl MACS-Puffer pro Maus resuspendiert und je 500 µl der vorbereiteten Zellsuspension pro Säule pipettiert. Anschließend wurden die Säulen mit jeweils 500 µl MACS-Puffer luftblasenfrei durchgespült. Der gesamte Durchfluss wurde in einem 15 ml FR aufgefangen. Die gewonnene Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 10 ml DC-Medium resuspendiert und die Zellzahl standardmäßig bestimmt. Abschließend erfolgte die Befüllung von 6-Well-Platten mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro 2 ml DC-Medium pro Well. Zusätzlich wurden 200 U/ml mGM-CSF und 100 U/ml mL-4 hinzugegeben. Das mGM-CSF ermöglicht die Differenzierung der Monozyten zu DC. Das mL-4 dient als zusätzliche DC-Stimulation (s. Kap. 1.3). Bevor die Platten in den Brutschrank gestellt wurden, wurden sie mehrmals geschwenkt, damit sich die Zellen gleichmäßig in den Wells verteilen.

### 3.3.2 Kultivierung muriner dendritischer Zellen

An Tag 4 erfolgte ein Medienwechsel, wobei 1,5 ml altes Medium aus jedem Well entnommen und bei 1200 Upm, 5 Minuten und RT zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in neuem Medium mit mGM-CSF und mL-4 (2 ml pro Well) resuspendiert und in die Wells zurückpipettiert. Somit betrug nach Medienwechsel das Endvolumen 2,5 ml/Well.

### 3.3.3 Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren

An Tag 6 nach DC-Isolierung erfolgte die Transduktion mit den in dieser Arbeit verwendeten AdV Ad-CD40L, Ad-LacZ und Ad-mAFP. Hierfür wurden die DC mit einem Zellschaber aus den 6-Well-Platten abgelöst, bei 800 Upm 5 Minuten lang in einer auf 37 °C vorgeheizten Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand in FR zur Aufbewahrung überführt und das Pellet in frisch angesetzttem DC-Transduktionsmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl und einstellen der Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro Transduktionseinheit wurde die entsprechende Virusmenge für MOI 250 für die Transduktion berechnet. Da DC keinen Coxsackie-Rezeptor besitzen, benötigt man entsprechend größere Virusmengen zur Transduktion. Die Zellen wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie zentrifugiert, die Zellpellets in frischem DC-Medium mit mGM-CSF und mIL-4 resuspendiert und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Medium in 6-Well-Platten ausplattiert. Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte eine tägliche mikroskopische Kontrolle der Zellen. DC bilden nach erfolgreicher Transduktion mit Ad-CD40L Zellaggregate durch die CD40-CD40L-Interaktion (Gonzalez-Carmona et al., 2008). Die anderen AdV verursachen keine deutlichen mikroskopischen Zeichen der DC nach erfolgreicher Transduktion (s. Abb. 7).

## 3.4 Tierexperimente

Die hier beschriebenen Tierexperimente wurden gemäß eines von der Bezirksregierung Köln genehmigten Antrages (Az. 50.203.2-BN 22, 12/01) durchgeführt. Die Mäuse wurden stets unter Standardbedingungen gehalten. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu ausreichend Wasser und Futter.

### 3.4.1 Subkutanes HCC-Tumormodell für C3H-Mäuse

Zur Induktion von AFP-positiven Tumoren in C3H-Mäusen wurde die murine Suspensionszelllinie Hepa 129-mAFP-Zellen (s. Kap. 2.1.1) verwendet. Zur Vorbereitung der Tumorzellen für die Tumorinduktion wurden diese zwei Mal in reinem RPMI-Medium ohne Zusatz gewaschen. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Zellen gezählt und eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 100  $\mu$ l RPMI-Medium pro Maus vorbereitet. Das Pellet wurde nach dem zweiten Waschvorgang in der entsprechenden Menge an RPMI

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße (RG) aliquotiert und auf Eis gestellt.

Die Mäuse wurden vor der Tumorinduktion betäubt. Als Betäubungsmittel wurde ein Gemisch bestehend aus 2 % Rompun (0,01 mg/g Körpergewicht), 0,9 % Ketamin (0,1 mg/g Körpergewicht) und 0,9 % NaCl-Lösung pro 100 µl Endvolumen hergestellt. Hiervon wurden 2 Einheiten pro Maus intraperitoneal (i.p.) injiziert. Nach Betäubung wurde die rechte Flanke der Mäuse rasiert. Die Inokulation mit  $1 \times 10^6$  Hepa 129-mAFP-Zellen erfolgte nun s.c. in die rechte Flanke. Anschließend wurden die Mäuse bis zum Erwachen engmaschig beobachtet. Die Tumore waren bereits nach 2 bis 3 Tagen tastbar und nach etwa 5 bis 7 Tagen makroskopisch sichtbar. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 100-150 mm<sup>3</sup> wurde mit verschiedenen Therapieansätzen begonnen. Das Tumolvolumen wurde mit einem Caliper ausgemessen und mit der folgenden Formel berechnet: Länge x Breite<sup>2</sup> x 0,52.

Der Allgemeinzustand der Mäuse und das Tumolvolumen wurden in regelmäßigen 2- bis 3-tägigen Abständen kontrolliert. Bei Erreichen eines Tumordurchmessers von 2000 mm<sup>3</sup> wurden die Mäuse aus ethischen Gründen geopfert. Die Überlebenszeit der Mäuse nach Tumorinduktion wurde stets dokumentiert.

### **3.4.2 Experimentelle Therapie von tumortragenden Mäusen mit DC**

In dieser Arbeit wurde eine s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC mit einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC kombiniert. Für beide Therapieschritte wurden die Zellen auf gleiche Weise vorbereitet. Hierfür wurden die adenoviral transduzierten DC an Tag 8 geerntet und 2 Mal in reinem RPMI gewaschen. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in jeweils 100 µl RPMI für die s.c. Vakzinierung und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in jeweils 50 µl Lösung pro Maus für die i.t. DC-Gabe vorbereitet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Pellets in den entsprechenden Menge an reinem RPMI resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (RG) überführt und bis zur Injektion auf Eis gelagert.

Wie bereits erwähnt, wurde bei einem Tumolvolumen von 100-150 mm<sup>3</sup> mit der Therapie begonnen. Es erfolgte zunächst nach üblicher Betäubung und Rasieren der Tiere die Vakzinierung durch eine s.c. Injektion von mAFP-beladenen DC in die linke Flanke der Mäuse und somit in die kontralaterale Seite zum zuvor s.c. gesetzten HCC. 9

Tage später erfolgte eine zweite Vakzinierung durch erneute s.c. Injektion von mAFP-beladenen DC und eine einmalige i.t Injektion von CD40L-exprimierenden DC. Die i.t. Injektion erfolgte zur gleichmäßigen Verteilung der Lösung im Tumor fächerförmig. Anschließend wurden die Mäuse bis zum Erwachen aus der Narkose überwacht. Die Messung der Tumore erfolgte in 2- bis 3-tägigen Abständen.

### **3.4.3 Explantieren der Tumoren und Milzen**

Die mit verschiedenen Therapieansätzen behandelten tumortragenden C3H-Mäuse wurden, wie zuvor beschrieben, zu einem bestimmten Zeitpunkt nach DC-Behandlung geopfert. Die s.c. Tumore wurden anschließend aus dem Fettgewebe und dem Fell mittels eines sterilen Skalpells herauspräpariert. Das Tumorgewebe wurde in kleine Stücke geschnitten, in FR überführt und zunächst in Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Tumorpräparate bei -80 °C gelagert. Aus dem Tumorgewebe wurden Gewebehomogenisate zur weiteren Proteinanalyse hergestellt (s.u.).

Zur Milzentnahme wurde das Abdomen der Mäuse per medianer Laparotomie eröffnet und die Milz vorsichtig herauspräpariert. Sie wurde nach Homogenisierung (s.u.) in 7 ml Erylysepuffer resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1200 Upm für 5 Minuten wurde das Pellet in RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Milz wurde in dieser Arbeit als Positiv-Kontrolle für CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei durchflusszytometrischen Messungen verwendet (s. Kap.3.6).

## **3.5 Proteinbiochemie**

### **3.5.1 Herstellung von Gewebehomogenisaten aus den explantierten Tumoren**

Die zuvor explantierten und bei -80 °C gelagerten Tumore wurden in mit Keramikugeln gefüllten Röhrchen (jeweils 2 Tumorstücke pro Tube) mit jeweils 300 µl PBS/Complete mini für 3 x 20 Sekunden homogenisiert und direkt auf Eis gestellt. Das entstandene Gewebehomogenisat wurde in 1,5 ml RG überführt, bei 15.000 Upm und 4 °C 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand anschließend in neue RG gefüllt und der Proteingehalt mittels Proteinbestimmung (s.u.) gemessen.

### 3.5.2 Herstellung von Zelllysats aus eukaryontischen Zellen

Hierbei wurde Proteinlysats aus Hepa 129- und Hepa 129-mAFP-Zellen hergestellt. Die Zellen wurden hierfür bei 1200 Upm und RT 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und jedes Pellet in jeweils 1 ml PBS resuspendiert. Zum Waschen der Zellen erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4000 Upm für 5 Minuten. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Pellets zur Lagerung über einen längeren Zeitraum bei -80 °C eingefroren.

Zur Herstellung des Zelllysats wurden die Zellen aufgetaut, in jeweils 175 µl PBS + Complete mini (Lysis-Puffer) resuspendiert, in kleine RG überführt und durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Nach Zentrifugieren bei 1500 Upm, 4 °C über 5 Minuten wurden die nun im Überstand befindlichen freigesetzten Proteine vorsichtig abpipettiert und in vorgekühlte RG umgefüllt.

### 3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration aus Gewebe oder Zelllysats

Hierfür wurde das DC Protein-Assay der Firma Biorad verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Methode basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951). Eine Standardreihe mit BSA in definierten Proteinkonzentrationen von 0,15 g/l bis 6 g/l wurde angesetzt (s. Tab. 2). Die Standardreihe ermöglicht eine Erstellung einer Eichgraden mit der die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt werden können.

	<b>BSA-Konzentration:</b>	<b>BSA-Stammlösung:</b>	<b>Lysispuffer:</b>
Lösung 1	6 g/l	10 µl	90 µl
Lösung 2	3 g/l	50 µl	50 µl
Lösung 3	1,2 g/l	50 µl	75 µl
Lösung 4	0,8 g/l	60 µl	30 µl
Lösung 5	0,6 g/l	45 µl	15 µl
Lösung 6	0,3 g/l	30 µl	30 µl
Lösung 7	0,15 g/l	30 µl	30 µl

**Tab. 2:** Standard-Verdünnungsreihe zur Proteinbestimmung.

### 3.5.4 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen und zum Nachweis von mAFP

Diese Methode ermöglicht die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes durch Sodiumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Das SDS-Polyacrylamid ist ein anionisches Detergens, welches Proteine denaturieren kann. Es bindet an hydrophobe Regionen in Proteinen und kann durch seine stark negative Ladung die Eigenladung der Proteine überlagern. Dadurch ist die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes möglich.

Das Laufverhalten der Proteine hängt von der Größe, ihrer Tertiärstruktur und vom Laufgel ab. Die Tertiärstruktur wird nach Hinzufügen von Dithiotreitol (DTT) im Probenpuffer durch die Zerstörung der Disulfid-Brücken aufgehoben.

Das System der diskontinuierlichen SDS-PAGE besteht aus zwei Gelen (s. Tab. 3).

<b>10 %-iges Trenngel:</b>	<b>4,5 %-iges Sammelgel:</b>
4,15 ml Nanopure	2,85 ml H <sub>2</sub> O
2,5 ml Trenngelpuffer	1,25 ml Sammelgelpuffer
3,35 ml 30 %-iges Acryl/Bisacryl	0,75 ml 30 %-iges Acryl/Bisacryl
40 µl 10 %-iges APS	50 µl 10 %-iges APS
7,5 µl TEMED	3,75 µl TEMED
pH: 8,8	pH: 6,8

**Tab. 3:** Zusammensetzungen des Trenn- und Sammelgels für die Gelelektrophorese.

Von jeder Probe wurden 15 µg Gesamtprotein eingesetzt, mit reduziertem Probenpuffer bei 95 °C für 5 Minuten unter Schütteln im Heizblock aufgekocht und dann auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben in die vorbereiteten Taschen im Gel aufgetragen und die gesamte Kammer in einfachen Lämmli-Lauf-Puffer eingetaucht. Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte zunächst bei 90 V, dann bei 130 V. Der Prozess dauerte etwa 2 h und lief in zwei Schritten ab:

Zunächst wurden die Proben im Sammelgel konzentriert und anschließend im stärker quervernetzten Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und mit einem mitgelaufenen Standardmarker verglichen.

### **3.5.5 Western Blot im Semy-Dry-Verfahren**

Nachdem die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte ihre Überführung aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (NC-Membran, Protran), mit einer Porengröße von 45 µm. Hierfür wird neben der NC-Membran auch *Whatman*-Filterpapier benötigt. Beide wurden zunächst auf Gel-Größe zurechtgeschnitten und für kurze Zeit mit Transferpuffer äquilibriert. Hierfür wurden drei Lagen Filterpapier, die NC-Membran, das Trenngel und weitere drei Lagen Filterpapier luftblasenfrei aufeinander gestapelt und für das *Semi-Dry*-Verfahren in die *Blotkammer* auf die positive *Blot*-elektrode gelegt. Die *Blotkammer* wurde mit der negativen Elektrode verschlossen. Der Transfer erfolgte bei 0,150 A und einer Spannung von 25 V für insgesamt 60 Minuten (Laemmli, 1970; Weber und Osborn, 1969).

### **3.5.6 Immunmarkierung**

Die NC-Membran wurde in TBST-Blockingpuffer über Nacht inkubiert. Dieser Schritt blockt freie Bindungsstellen auf der NC-Membran für die anschließende Ak-Färbung ab. Für die Ak-Färbung wurde die Membran zunächst in 1 x TBST gewaschen und mit dem primären Ak (5000-fach verdünntem mAFP-spezifischen Ak, anti-mAFP-Kaninchenserum) für 1 h bei RT auf einem Schüttler zusammengeführt. Nach der Inkubation wurden die ungebundenen Ak-Reste durch dreimaliges Waschen mit 1 x TBST für jeweils 10 Minuten entfernt. Anschließend erfolgte die zweite Inkubation mit dem sekundären Ak, in diesem Fall dem Ziege-Anti-Kaninchen-Ak (1:5000). Dieser Ak enthält Meerrettichperoxidase (HRP). Die Inkubation erfolgte erneut für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Hiernach wurde die Membran erneut dreimal mit 1 x TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen. Zur Detektion der nun immunmarkierten Proteine wurde die Membran in Luminol-Reagenz für 2 Minuten inkubiert. Dieses Reagenz besteht aus 4 ml Reagenz A, 400 µl Reagenz B und 1,2 µl 35 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die an den sekundären Ak gebundene HRP oxidiert das Luminol-Reagenz. Die so erzeugte Lumineszenz ist auf den Röntgenfilmen dokumentierbar (Gillespie und Hudspeth, 1991).

### 3.6 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können Einzelzellen aus einer Zellsuspension nach Größe, Granularität und weiteren Fluoreszenzeigenschaften charakterisiert werden. Somit können beispielsweise unterschiedliche Oberflächenmoleküle markiert und quantifiziert werden. Die vorbereitete Zelllösung wird hierbei mittels Druckluft aus einem Probenröhrchen in eine dünne Kapillare angesaugt. Hier werden die Zellen durch Zuführen einer isotonischen Trägerflüssigkeit vereinzelt und in einer laminaren Strömung an einer Laserlichtquelle entlang geleitet. Dieser Laserstrahl fokussiert nun die markierten Zellen. Das hierbei entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht wird von einem Photodetektor aufgenommen und in elektrische Impulse umgewandelt. Die Einzelzelle kann dann durch Übertragung auf ein Histogramm nähergehend analysiert werden. Die Messung der Lichtstreuung ermöglicht hierbei die Analyse der Größe und Granularität. Durch Analyse des Fluoreszenzlichtes können Zelloberflächenmarkierungen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen detektiert und quantifiziert werden. Hierbei wird vorwärts gestreutes und seitwärts gestreutes Licht voneinander unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht misst die Zellgröße in einem Winkel von  $0-10^\circ$  (Kleinwinkelbereich). Das Seitwärtsstreulicht ermöglicht die Bestimmung der Zellgranularität und des Fluoreszenzlichtes durch Messung im  $90^\circ$ -Winkel. Die versuchsspezifischen Einstellungen zu Beginn der Messung erfolgen standardmäßig mit Kontrollproben.

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit für zwei Untersuchungen verwendet. Zum Einen erfolgte die Analyse der infiltrierenden immunologischen Zellpopulationen in die s.c. HCC-Tumoren anhand der Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen. Hierbei wurden  $CD4^+$ -T-Zellen anhand ihrer CD3- und CD4-Oberflächenmoleküle und  $CD8^+$ -T-Zellen durch ihre CD3- und CD8-Oberflächenmoleküle detektiert. Die Färbung erfolgte durch Fluorescein-isothiocyanat(FITC)- und Phycoerythrin(PE)-gekoppelte Ak. FITC wird ab einer Wellenlänge von 494 nm bis maximal 521 nm angeregt. Das PE emittiert Licht zwischen einer Wellenlänge von 480 bis 578 nm.

Zum Anderen diente diese Methode zur Bestimmung von apoptotischen Zellen nach Anfärbung mit Propidiumiodid (PI) im Apoptose-Assay. Das PI ist ein kationischer Farbstoff und daher nicht permeabel für lebende Zellen. Jedoch kann es nach Permeabilisierung in apoptotische Zellen eindringen. Es interkaliert mit der Zell-DNA, d.h. es lagert sich zwischen deren Basen ein, und ermöglicht so eine Quantifizierung des DNA-



Gehalts. Somit ermöglicht es eine Unterscheidung von vitalen und toten Zellen. Sein Absorptionmaximum liegt bei 488 nm. Nach Interkalieren mit der DNA verschiebt sich das Maximum auf 535 nm.

### **3.6.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in subkutanem HCC**

Um die Infiltration von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den therapierten s.c. HCC-Tumoren bestimmen zu können, wurden die Tumore drei Tage nach der letzten DC-Therapiegabe, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, explantiert. Die Tumore wurden mit einem Skalpell geviertelt und in RG überführt. In die Tumorstücke wurde in einem Verhältnis von 1:125 mit PBS verdünnte Kollagenase injiziert und die Tumorstücke im Schüttler bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie unter der Laminarflow-Bank durch ein Zellsieb in ein FR mit reinem RPMI gegeben und die Suspension bei 1200 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Pellets in jeweils 10 ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die benötigte Menge an Zellsuspension wurde entnommen und erneut bei 1200 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert, die Pellets in jeweils 100 µl PBS resuspendiert, jeweils 1 µl FcR-Block hinzupipettiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die CD16- und CD32-Rezeptoren werden als sogenannte Fc-Rezeptoren bezeichnet und befinden sich auf der Oberfläche von Monozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen und Blutplättchen. Ak können an diese Rezeptoren unspezifisch binden. Um jedoch eine gezielte Markierung von bestimmten Oberflächemolekülen zu gewährleisten, müssen die Fc-Rezeptoren vor der eigentlichen Ak-Färbung blockiert werden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die entsprechenden Ak hinzupipettiert. Als Ak wurden CD3, CD4 und CD8 verwendet (s.o.). Nach deren Zugabe wurden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit je 500 µl PBS gewaschen, bei 5500 Upm für 5 Minuten erneut abzentrifugiert, der Überstand mit den nicht gebundenen Ak abgesaugt, die Pellets in jeweils 250 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.7 ELISA

Das *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ermöglicht den Nachweis von Antigenen durch Bindung mit Ak. Hierbei kommt es zu einer enzymatischen Farbreaktion. Die Farbintensität kann im ELISA-Reader gemessen werden.

In dieser Arbeit wurden die proinflammatorischen Th<sub>1</sub>-Zytokine IFN-gamma und IL-12 und das antiinflammatorische Th<sub>2</sub>-Zytokin IL-10 quantitativ bestimmt. Der Versuchsablauf erfolgte nach den Angaben des Herstellers BD Biosciences.

Die photospektrometrische Messung der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader. Die Farbintensität ist proportional zur Menge der gebundenen Konjugate und somit der Menge an Zytokin. Anhand einer Standardkurve konnte die genaue Zytokin-Konzentration ermittelt werden.

### 3.8 Apoptose-Assay

Für den Nachweis der Apoptose in Tumorzellen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. *In vitro* wurde durchflusszytometrisch der DNA-Gehalt in Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen gemessen, nachdem sie mit Überstand von CD40L- oder LacZ-expressierenden DC kultiviert wurden. *In vivo* erfolgte die Apoptose-Analyse durch Detektion der Caspase 3-Aktivität in Proteinlysat von Tumoren, die mit LacZ- oder CD40L-expressierenden DC i.t. behandelt worden waren.

#### 3.8.1 Bestimmung der SubG<sub>1</sub>-Fraktion mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit Propidiumiodid

Vor Färbung der Tumorzellen mit dem nicht membrangängigen Propidiumiodid (PI) müssen diese zunächst fixiert und dann einem RNase-Verdau unterzogen werden. Das nach Laseranregung durch PI emittierte Licht ist rot. Die Fluoreszenzstärke ist proportional zum DNA-Gehalt und zur PI-Färbung. Der DNA-Gehalt der Zelle ist vom jeweiligen Zyklusstadium abhängig. Daher ermöglicht das PI neben der Differenzierung von vitalen und toten Zellen auch eine Identifizierung der Zellzyklusverteilung der Zellen einer Zellsuspension.

Der Zellzyklus wird in die Mitose(M)-Phase und die sog. Interphase unterteilt. Die Interphase wird wiederum in 3 Stadien gegliedert, die präsynthetische G1-Phase, die

Synthese(S)- bzw. DNA-Replikationsphase und die postsynthetische bzw. prämitotische G<sub>2</sub>-Phase. Ausdifferenzierte Zellen befinden sich in der G<sub>0</sub>-Phase (Ruhephase). In der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase liegt somit ein vollständiger Chromosomensatz vor, der sich in der S-Phase verdoppelt. In der G<sub>2</sub>-Phase bereiten sich die Zellen auf die M-Phase und somit Teilung in zwei Tochterzellen mit jeweils einem einfachen Chromosomensatz vor. In den nach Durchflusszytometrie erstellten Histogrammen stellen sich die Zellzyklusphasen unterschiedlich dar. Die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und die G<sub>2</sub>/M-Phase sind jeweils als Peak zu erkennen. Dazwischen liegen die Zellen der S-Phase. Manchmal kann zusätzlich zu diesen Phasen ein dritter Peak, die sog. SubG<sub>1</sub>-Fraktion, vorliegen, die apoptotische Zellen charakterisiert. In apoptotischen Zellen ist der DNA-Gehalt aufgrund der DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen niedriger. Dieser Peak liegt somit im Histogramm links neben dem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase-Peak.

In dieser Arbeit wurde die SubG<sub>1</sub>-Fraktion in Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen nach Kultivierung mit Überstand von CD40L-exprimierenden DC als Marker für Zelloptose bestimmt. Als Negativkontrolle wurden die Tumorzellen mit Überstand von LacZ-exprimierenden DC oder untransduzierten DC kultiviert. Als Positivkontrolle diente Medium mit 2 µM Brefeldin A (BFA). Das BFA wird aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum* gewonnen und ist ein makrozyklisches Lacton. Es inhibiert Teile des vesikulären Transports, v.a. den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum und induziert den Zerfall des Golgi-Apparates selbst. Durch die Verhinderung der Bildung von Transportvesikeln wird die Proteinsekretion inhibiert. Das BFA induziert zudem Apoptose und kann den Zellzyklus modulieren (Pommepuy et al., 2003).

Hierfür wurden die Hepa 129 – bzw. Hepa 1-6 – Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % kultiviert. Dann wurden die Zellen jeweils in mindestens Zweifachbestimmung mit den drei verschiedenen konditionierten Überständen aus DC (s.o.) kultiviert. Die Überstände wurden im Verhältnis 2/3 Überstand und 1/3 frisches Medium auf ein Gesamtvolumen von 1 ml zusammengemischt und dann in die Wells pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 48 und 72 h im Brutschrank, wobei täglich eine mikroskopische Kontrolle erfolgte und je nach Zustand der Zellen etwas frisches Medium hinzugegeben wurde. Nach Inkubation wurden die Zellen geerntet, bei 1200 Upm und RT für 5 Minuten abzentrifugiert und die Pellets in jeweils 1 ml HBSS re-

suspendiert. Die Zellen wurden abschließend in jeweils 70 %-igem und -20 °C-kaltem Ethanol unter Vortexen fixiert und die Proben für 24 h bei -20 °C gelagert.

Hiernach wurden die Proben zunächst bei 2200 Upm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Pellets zwei Mal in PBS<sup>++</sup>/1 % BSA gewaschen. Anschließend wurden sie in 150 µl DNA-Extraktionspuffer resuspendiert, in kleine RG überführt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte zur Entfernung des DNA-Extraktionspuffers eine Zentrifugation bei 1500 Upm für 5 Minuten und vorsichtiges Absaugen des Überstandes. Hiernach wurden die Pellets in jeweils 1 ml lichtempfindlichem PI (50 µg/ml) in einer abgedunkelten Werkbank resuspendiert, jeweils 50 µl RNase (10 mg/ml) hinzupipettiert und für 30 Minuten unter Abdeckung mit Alu-Folie bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und durchflusszytometrisch analysiert. Für diese Analyse wurde im Durchflusszytometer mit einer Laser-Anregungswelle bei 488 nm Wellenlänge gearbeitet. Bei jeder Messung wurden 10.000 Zellen auf ihren DNA-Gehalt gemessen. Das PI wurde bei einer Wellenlänge von 555 bis 600 nm (Fluoreszenzkanal 2) detektiert und gemessen. Mit Hilfe des Programms WinMDI erfolgte im Anschluss die Ermittlung des Anteils an SubG<sub>1</sub>-Fraktion in den Zellen.

### **3.8.2 Bestimmung der Apoptoserate durch Messung der Caspase 3-Aktivität**

In diesem Versuch wurde die Apoptoserate in Tumoren durch enzymatischen Nachweis der Caspase 3-Aktivität gemessen. Caspasen sind intrazelluläre Aspartat-spezifische Cysteinproteasen, deren Aktivierung eine zentrale Rolle bei der Zellapoptose spielt. Während der Apoptose werden sie kaskadenartig in großen Mengen aktiviert. Die Caspase 3 gehört neben den Caspasen 6 und 7 zu den Effektorcaspasen, die von den Initiatorcaspasen 2, 8, 9 oder 10 aktiviert werden. Effektorcaspasen aktivieren eine Komplexbildung zwischen Inhibitor und Endonukleasen, was zur Freisetzung der Endonukleasen führt. Diese können dann in den Zellkern translozieren und dort die DNA fragmentieren.

Ihr Nachweis erfolgte durch Messung der von ihnen gespaltenen fluorogenem Substrat *Ac-DEVD-amino-4-trifluoromethyl coumarine (afc)*, im Falle der Caspase 3 das *Ac-Asp-Glu-Val-asp-afc*. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers (Bachem, Heidelberg) durchgeführt.

Hierfür wurden die explantierten s.c. HCC-Tumore, die zuvor mit einer zweimaligen s.c. Vakzinierung mit mAFP- bzw. LacZ-beladenen DC und mit CD40L- bzw. LacZ-exprimierenden DC i.t. behandelt wurden, in 25 mmol/L in N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] Puffer mit 0,1 % Triton X-100, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2,2 mmol/LDTT homogenisiert. Nach Zugabe der entsprechenden Menge an fluorogener Substanz erfolgte die spektrophotometrische Messung im Fluorometer (Shimadzu RF-5301PC) in 5-minütigen Intervallen bei einer Wellenlänge von 400 bis 505 nm. Die Steigung der Kurve wurde als Fluoreszenz-Einheit pro mg Protein pro Minute der Reaktionszeit gewertet und zur Berechnung der Caspase 3-Aktivität in Korrelation mit einer Standardkurve für afc gestellt. Die Angaben erfolgten in Picomol pro mg pro Minute.

### **3.9 Statistik**

Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt. Sämtliche Statistikberechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Origin durchgeführt. Es sind stets die Mittelwerte, in einigen Experimenten die Standardabweichungen und in einigen die *standard error of the mean* (SEM) angegeben. Der Student's t-Test wurde zur Berechnung von Unterschieden zwischen verschiedenen Ansätzen für ungepaarte Stichproben und zur Signifikanz-Berechnung verwendet. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant bewertet. Überlebensraten wurden mit Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

## 4. Ergebnisse

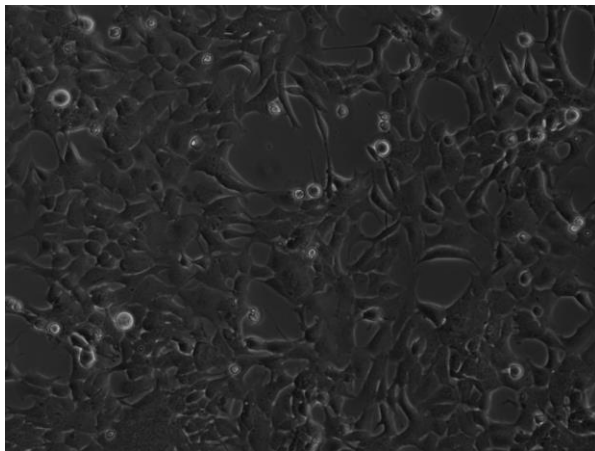
### 4.1 Viruspropagation von Ad-mAFP, Ad-CD40L und Ad-LacZ

#### 4.1.1 Transduktion von eukaryontischen Zellen durch adenovirale Vektoren

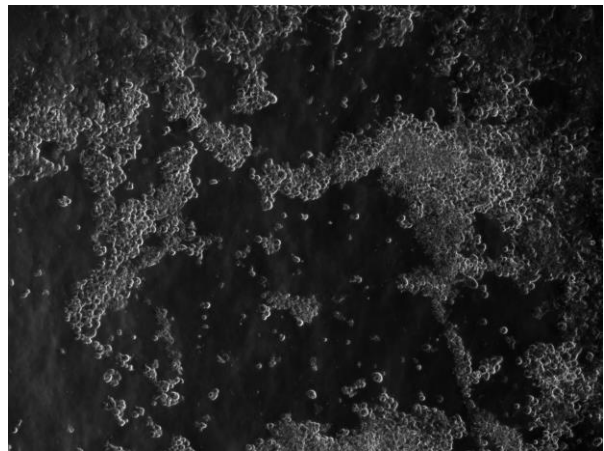
911-Zellen wurden in dieser Arbeit zur Propagation AdV verwendet. Um eine Virusstocklösung mit einer großen Menge an AdV zu produzieren, wurde eine Vielzahl (30-60) an 145 mm-Zellkulturplatten mit 911-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-100 % kultiviert und jeweils mit MOI 1 transduziert (s. Kap. 3.2.2).

Es wurden drei AdV propagiert: Ad-CD40L, Ad-mAFP und Ad-LacZ (als Kontrolle). Die Zellen wurden nach Transduktion bis zur Ausbildung des typischen zytopathischen Effektes kultiviert. Dieser äußert sich in Abrunden und Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturplatte (s. Abb. 4b)

a



b

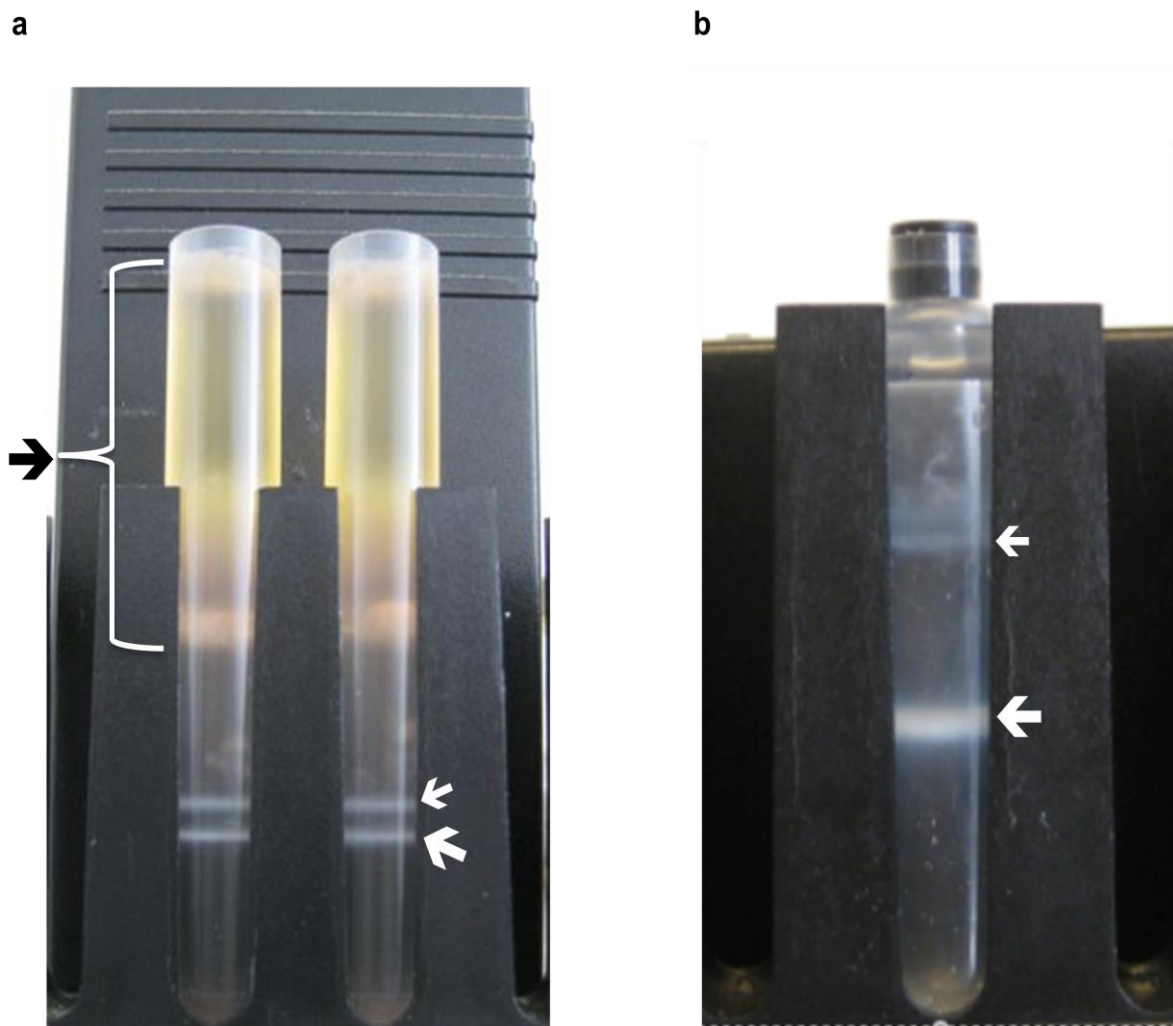


**Abb. 4:** a: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme einer Zellkulturplatte mit etwa 90 %-ig konfluenten 911-Zellen vor adenoviraler Transduktion. b: Repräsentative Aufnahme des typischen zytopathischen Effektes einer 911-Zellkulturplatte 48 h nach adenoviraler Transduktion.

Der optimale Erntezeitpunkt der Zellen zur maximalen Virusausbeute ist, wenn etwa 90 % der Zellen den zytopathischen Effekt zeigen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet. Durch viermaliges Einfrieren und Auftauen wurden die AdV aus den Zellen befreit (s. Kap. 3.2.3) und anschließend aufgereinigt (s.u.).

#### **4.1.2 Aufreinigung adenoviraler Vektoren**

Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung AdV erfolgte in drei Schritten (s. Kap. 3.2.4). Über die diskontinuierliche CsCl-Zentrifugation mit 1,2 g/ml und 1,4 g/ml dichten CsCl-Lösungen wurden intakte AdV von defekten viralen Partikeln und weiteren zellulären Komponenten getrennt (s. Abb. 5a). Die kontinuierliche CsCl-Zentrifugation mit einer 1,3 g/ml dichten CsCl-Lösung diente der Entfernung der Restkontamination von defekten AdV (s. Abb. 5b). In beiden Fällen sammelten sich Banden in der Mitte der Polyallomer-Röhrchen, wobei die untere etwa 1,3 g/ml dichte Bande die intakten AdV, und die obere schwächere Bande mit einer Dichte von unter 1,3 g/ml die defekten AdV darstellte (s. Abb. 5a und b). Der diffuse Schleier oberhalb der Banden enthielt die zellulären Komponenten. Die Virusbanden mit den intakten AdV wurden jeweils mit einer Kanüle in eine Spritze aspiriert. Der dritte Schritt der Virusaufreinigung, eine viermalige Dialyse gegen PBS, diente zur Entfernung des CsCl. Anschließend wurde der Virusstock aliquotiert und bei -80 °C gelagert.



**Abb. 5:** a: Virusbanden nach der diskontinuierlichem CsCl-Dichtezentrifugation. Der dicke weiße Pfeil zeigt auf die Banden mit den intakten AdV, der obere dünne weiße Pfeil auf die defekten Viruspartikeln. Schleier mit Zelltrümmern darüber (schwarzer Pfeil). b: Virusbanden nach kontinuierlicher CsCl-Dichtezentrifugation, konzentrierte Virusbande in der Röhrenmitte (dicker Pfeil), darüber eine schwächere Banden mit den restlichen defekten Viruspartikeln (dünner Pfeil).

#### 4.2 Titerbestimmung der verwendeten AdV: Ad-mAFP, Ad-CD40L und Ad-LacZ

Die Titerbestimmung erfolgte nach jeder Viruspropagation, um die aufgereinigten AdV für weitere Versuche anwenden zu können. Zur präzisen Quantifizierung wurden sowohl optische Dichte-Messungen als auch Plaque-Assays durchgeführt.



#### 4.2.1 Messung der optischen Dichte (OD)

Diese Methode ermöglicht eine schnelle Bestimmung der Gesamtzahl an Viruspartikeln mit konstantem Ergebnis. Jedoch ist hierbei keine Unterscheidung zwischen intakten und defekten Partikeln möglich.

Die Messung der jeweiligen aufgereinigten Viruslösung erfolgte nach Verdünnung in OD-Puffer und Inaktivierung der Viruspartikel im Photometer bei 260 nm (s. Kap. 3.2.6). Als Nullkontrolle diente reiner OD-Puffer. Die Angaben erfolgten in opu und wurden anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{Opu/ml} = \text{OD}_{260} \times 25 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 1,1 \times 10^{12} .$$

Die Umrechnung in pfu/ml erfolgte durch folgende Formel:

$$\text{pfu/ml} = \text{opu}/20.$$

In dieser Arbeit wurden durchschnittliche Titer von über  $1 \times 10^{12}$  erzielt. Tab. 4 fasst beispielhaft die Konzentrationen der hier gemessenen AdV-Titer zusammen.

Adenoviraler Vektor	Titer in opu/ml
Ad-mAFP	$2 \times 10^{12}$
Ad-CD40L	$3,4 \times 10^{12}$
Ad-LacZ	$3,7 \times 10^{12}$

**Tab. 4:** Konzentrationen der Vektorpartikel nach Absorptionsmessung bei 260 nm, angegeben in opu/ml.

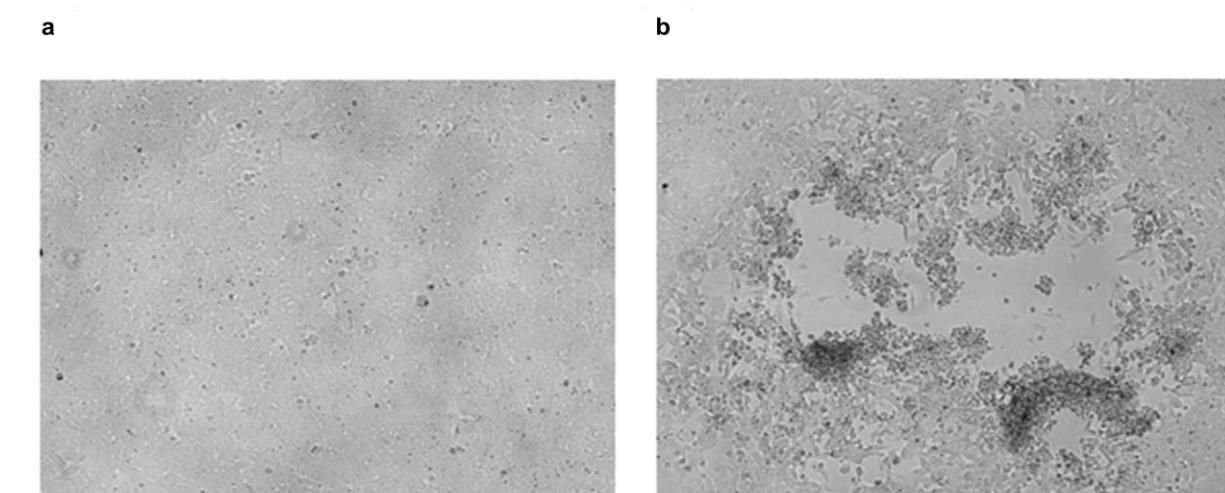
Anhand dieser Werte wurden die im Plaque-Assay hergestellten Verdünnungsreihen angepasst (s.u.).

#### 4.2.2 Plaque-Assay

Die Standardmethode zur Titerbestimmung eines AdV-Stocks ist der Plaque-Assay (Graham et al., 1995). Er ermöglicht eine Aussage über die Menge an infektiösen Viruspartikeln.

Hierbei wurden 911-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und mit einer Virusverdünnung unterschiedlicher Konzentrationen ( $1:10^8$  bis  $1:10^{11}$ ), wie in Kap. 3.2.5 beschrieben, transduziert. Anschließend wurden die transduzierten Zellen mit MEM/Agarose-Medium beschichtet und für 10 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Agarosebeschichtung verhindert, dass ein Viruspartikel nach erfolgreicher Transduktion einer 911-Zelle, welche

zur Lyse der Zelle führt, zu Nachbarzellen diffundiert und auch diese infiziert. Infizierte Zellen lösen sich vom *Well*-Boden, was lichtmikroskopisch, teilweise auch mit dem bloßen Auge, als Plaque sichtbar ist. Somit bildet jeweils eine infizierte Zelle jeweils einen Plaque aus. Dies ermöglicht eine sehr präzise Titerbestimmung der jeweiligen Viruslösung. Abbildung 6b zeigt einen solchen Plaque.



**Abb. 6:** a: 100 %-ig konfluente 911-Zellen vor Ansetzen des Plaque-Assays. b: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme eines Plaques im Plaque-Assay von AdmAFP mit 911-Zellen am 10. Tag nach Ansetzen des Versuches.

An Tag 10 der Inkubationszeit wurde die Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe lichtmikroskopisch ausgezählt und die Anzahl gemittelt. Der Titer wurde in pfu angegeben (s. Kap. 3.2.5). Durch Anwendung der folgenden Formel erfolgte die Titerberechnung:

Anzahl der Plaques x Verdünnungsstufe ( $\text{Volumen}^{-1}$ ) = pfu/ml.

Die durchschnittlich erzielten Konzentrationen für die in dieser Arbeit verwendeten AdV lagen zwischen  $6 \times 10^{10}$  und  $1 \times 10^{11}$ . Tab. 5 zeigt beispielhaft einige der in dieser Arbeit ermittelten Titer.

Adenoviraler Vektor	Titer in pfu/ml
Ad-mAFP	$6 \times 10^{10}$
Ad-CD40L	$7 \times 10^{10}$
Ad-LacZ	$1 \times 10^{11}$

**Tab. 5:** In dieser Arbeit verwendete AdV mit ihren jeweils durchschnittlich erzielten Titern (pfu/ml).

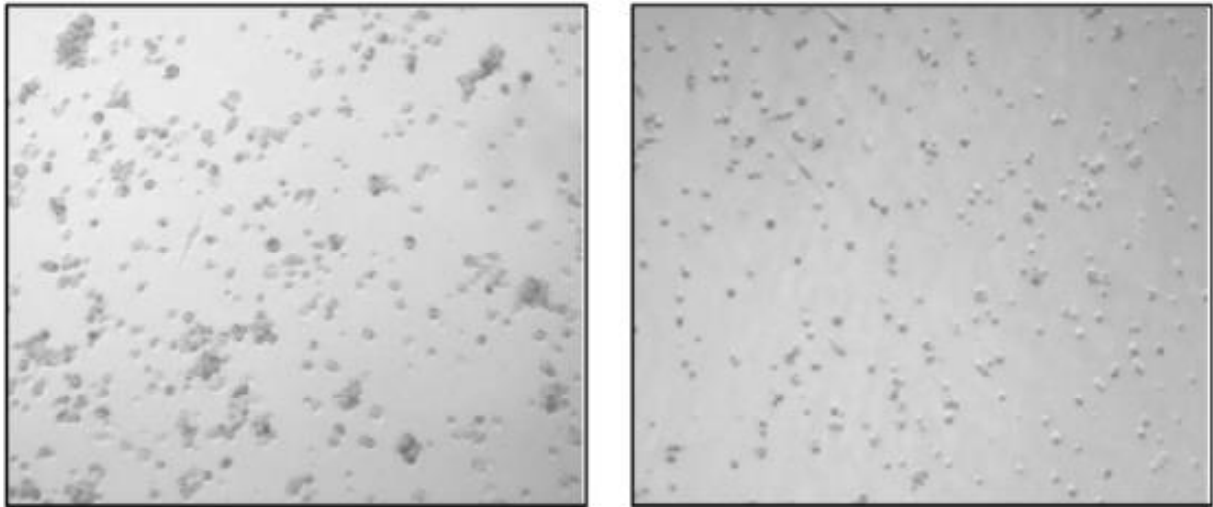
### 4.3 Transduktion von DC mit Ad-CD40L, Ad-mAFP und Ad-LacZ

DC wurden in dieser Arbeit mit verschiedenen AdV transduziert und nach Transduktion zur Therapie von s.c. HCC in C3H-Mäusen verwendet. Hierfür wurden zunächst murine DC aus Knochenmark der Femur- und Tibia-Knochen von C3H-Mäusen nach Inaba et al. (1992) gewonnen und in DC-Medium mit mGM-CSF und mIL-4 kultiviert (s. Kap. 3.3). Um die Informationen zur Expression von mAFP, CD40L und LacZ in die DC einzubringen, erfolgte die adenovirale Transduktion.

Bei der adenoviralen Transduktion spielen die CAR-Rezeptoren eine wichtige Rolle. AdV binden an sie und gelangen so in die Zielzelle. DC exprimieren jedoch diesen Rezeptor nicht und sind dennoch gut mit AdV transduzierbar (Gonzalez et al., 2008). Möglicherweise spielen hierbei  $\alpha_v$ -Integrine auf ihrer Oberfläche eine entscheidende Rolle. Sie sind wichtig für die Internalisierung von Molekülen. AdV können an sie binden und gelangen womöglich so in das DC-Zytoplasma (Tillmann et al., 1999).

Die DC wurden in dieser Arbeit am 6. Tag nach Isolierung transduziert. Hierfür wurden sie zunächst, wie in Kap. 3.3.3 beschrieben, geerntet und ihre Zellzahl bestimmt. Je  $1 \times 10^6$  DC wurden mit MOI 250 der jeweiligen AdV transduziert. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe erzielte die Transduktion mit MOI 250 bei Ad-CD40L die besten Ergebnisse hinsichtlich maximaler Transgenexpression und geringer DC-Toxizität. Daher wurde diese MOI auch für Ad-mAFP und Ad-LacZ verwendet. Zudem wurde die transgene Expression von mAFP mittels *Western Blot* und die von CD40L durchflusszytometrisch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe geprüft und beschrieben (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Schneider et al., 2005).

Die Transduktion mit Ad-CD40L führte typischerweise zur *Cluster*-Bildung von DC untereinander, was man lichtmikroskopisch bereits einen Tag nach Transduktion beobachten konnte (Gonzalez-Carmona et al., 2008). DC tragen den CD40-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die Transduktion mit Ad-CD40L befähigt sie zur CD40L-Expression. Die Agglutination kommt möglicherweise durch die Interaktion zwischen CD40 und CD40L zustande (s. Abb. 7).



**Abb. 7:** Lichtmikroskopische Aufnahme von DC, 48 h nach Transduktion mit Ad-CD40L, links: typische *Cluster*-Bildung der DC durch die CD40-CD40L-Interaktion; rechts: Verhinderung der *Cluster*-Bildung durch Gabe von anti-CD40L (Gonzalez-Carmona et al., 2008).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die *Cluster*-Bildung nach Hinzugabe eines *blocking*-Antikörpers für CD40 ausblieb (Gonzalez-Carmona et al., 2008; 2014, *in preparation*). Bei den anderen AdV konnte lichtmikroskopisch kein vergleichbarer Effekt beobachtet werden.

Nach erfolgreicher Transduktion wurden die Zellen geerntet und den Mäusen nach den entsprechenden Therapieschemata injiziert (s.u.).

## 4.4 Mausexperimente

### 4.4.1 Subkutanes HCC-Mausmodell mit mAFP-exprimierenden Hepa 129-Zellen

Der in dieser Arbeit erprobte Therapieansatz beinhaltete eine zweimalige s.c. Vakzination mit mAFP-beladenen DC in Kombination mit einer i.t. Applikation von CD40L-exprimierenden DC.

Hierfür wurden die Hepa 129-Zellen, die zuvor stabil mit BMG-neo-mAFP transduziert wurden und syngen zum C3H-Mausstamm sind, in Medium mit dem Selektionsantibiotikum G418 kultiviert. Diese Zellen induzieren einen AFP-positiven HCC-Tumor.

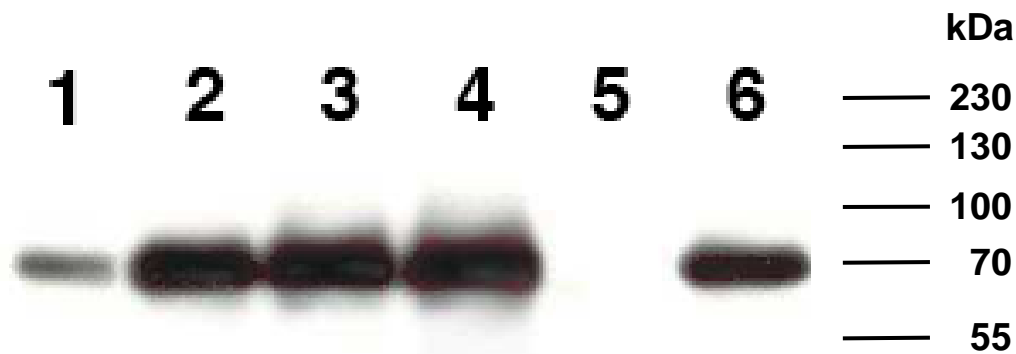
8 bis 12 Wochen alte C3H-Mäuse erhielten nach üblicher i.p. Narkotisierung in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Hepa 129-mAFP-Zellen pro Maus jeweils eine s.c. Injektion in ihre rechte Flanke (s. Kap. 3.4.1). Nach bereits 2 bis 3 Tagen konnte man Tumore in allen Mäusen palpieren, und nach etwa 5 bis 7 Tagen waren sie makroskopisch sichtbar.

Zur Erfassung der Tumorkinetik der durch Hepa 129-mAFP-Zellen induzierten Tumore wurden 5 unbehandelte Mäuse über einen längeren Zeitraum beobachtet und die Tumore gemessen. Die Tumore erreichten zwischen 19 und 23 Tage nach Tumorzellinokulation ein Volumen von ca.  $2000 \text{ mm}^3$ , was aus ethischen Gründen nicht mehr toleriert werden kann. Daher wurden die Mäuse zu diesem Zeitpunkt zunächst durch Begasung mit Isofluran betäubt und anschließend durch einen Genickbruch getötet. Dieses rasche Tumorwachstum spricht für den aggressiven Charakter dieser Zelllinie.

#### **4.4.2 Nachweis von mAFP in Hepa 129-mAFP-induzierten s.c. HCC-Tumoren mittels *Western Blot***

Zum Nachweis der AFP-Positivität der durch Hepa 129-mAFP-induzierten s.c. HCC in C3H-Mäusen erfolgte der mAFP-Nachweis mittels *Western Blot* 3 Wochen nach s.c. Inokulation von  $1 \times 10^6$  Hepa 129-mAFP-Zellen in die rechte Flanke der Mäuse.

Hierfür wurden die s.c. HCC aus den C3H-Mäusen explantiert (s. Kap. 3.4.3) und daraus Gewebehomogenisate hergestellt (s. Kap. 3.4.4). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry mit dem Protein-Assay der Firma Biorad (Lowry et al., 1951), wobei jeweils  $15 \mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Probe verwendet wurde (s. Kap. 3.5.2), wurden die gewonnenen Proteine mittels Gelelektrophorese im SDS-Page entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt (s. Kap. 3.5.3). Im *Semi-Dry*-Verfahren erfolgte die Übertragung auf eine NC-Membran (Laemmli, 1970; Weber und Osborn, 1969). Anschließend wurden das mAFP mit einem primären und einem sekundären Ak angefärbt. Als primärer Ak diente das polyklonale Anti-mAFP-Kaninchenserum und als sekundärer Ak das an HRP gekoppelte Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin. Das HRP ist in der Lage Lumineszenz durch Oxidation von Luminol zu erzeugen (s. Kap. 3.5.4 und 3.5.5). Diese Lumineszenz wurde auf einem Röntgenfilmen dargestellt (s. Abb. 8).



**Abb. 8:** Nachweis transgener Expression von mAFP in s.c. HCC-Tumoren mittels *Western-Blot*, 1: Proteinlysat von AFP-positiven Hepa 1-6-Zellen (Positivkontrolle); 2-4: Proteinlysate von drei verschiedenen s.c. Tumoren aus C3H-Mäusen, 3 Wochen nach s.c. Inokulation von  $1 \times 10^6$  Hepa 129-mAFP-Zellen; 5: Proteinlysat eines Tumors, 3 Wochen nach s.c. Injektion von  $1 \times 10^6$  Hepa 129-Zellen (AFP-negativ); 6: Proteinlysat eines s.c. Tumors induziert durch  $1 \times 10^6$  Hepa 1-6-Zellen (AFP-positiv).

Hierbei zeigte sich, dass die durch Hepa 129-mAFP-Zellen induzierten s.c. HCC tatsächlich mAFP-positiv waren, was eine wichtige Voraussetzung für die in dieser Arbeit erprobten Therapieansätze darstellte (s. Kap. 4.5.1).

#### 4.4.3 Einfluss einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC in Kombination mit einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC auf das Tumorstadium in einem s.c. HCC-Modell in C3H-Mäusen

Nach Inokulation von  $1 \times 10^6$  Hepa 129-mAFP-Zellen in die rechte Flanke der Mäuse wurden die Tumore in 2- bis 3-tägigen Abständen gemessen. Bei Erreichen eines Tumorstadiums von etwa  $150 \text{ mm}^3$  an Tag 9 nach Tumorzellinokulation wurde mit der jeweiligen Therapie begonnen. Ziel des in dieser Arbeit durchgeführten Therapieansatzes war es, eine potente Immunstimulation durch eine s.c. Vakzinierung mit mAFP-gepulsten DC mit Hilfe einer i.t. Applikation von DC, die das potente kostimulatorische Molekül CD40L exprimieren, zu triggern und somit im Idealfall eine Tumorstadiumsregression zu erzielen. Als Negativkontrollen sowohl für die jeweiligen s.c. als auch für die jeweiligen i.t. Injektionen wurden LacZ-exprimierende DC verwendet (s. Tab. 6). Eine i.t. Injektion von DC hatte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe im Vergleich zur i.v. Applikation eine signifikant stärkere antitumorale Wirkung erzielt (Gonzalez-Carmona et al., 2008).

Die Mäuse wurden hierfür in 5 Gruppen mit jeweils 6 Mäusen unterteilt (s. Tab. 6).

	<b>zwei s.c. Injektionen im Abstand von 9 Tagen mit 1 x 10<sup>6</sup></b>	<b>i.t. Injektion mit 1 x 10<sup>6</sup></b>
<b>Gruppe 1</b>	mAFP-DC	CD40L-DC
<b>Gruppe 2</b>	LacZ-DC	CD40L-DC
<b>Gruppe 3</b>	mAFP-DC	LacZ-DC
<b>Gruppe 4</b>	LacZ-DC	LacZ-DC
<b>Gruppe 5</b>	Unbehandelt	unbehandelt

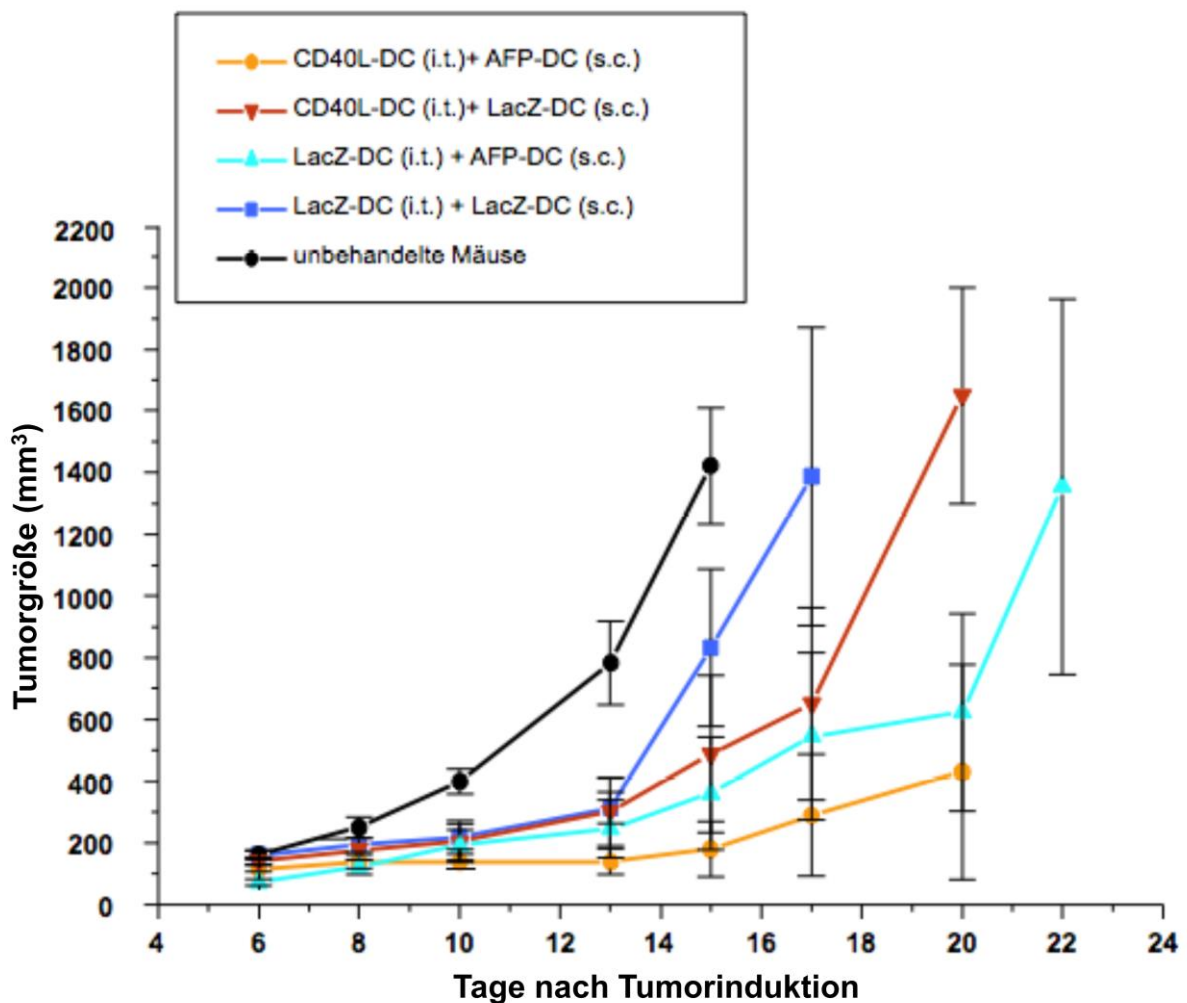
**Tab. 6:** Schema zu den in dieser Arbeit angewendeten Kombinationstherapien zur Behandlung von AFP-positiven s.c. HCC in C3H-Mäusen.

Wie in Tab. 6 dargestellt erhielten die Gruppen 1 und 3 an Tag 9 nach Tumorzellinokulation die erste s.c. Vakzinierung mit  $1 \times 10^6$  mAFP-beladenen DC in die linke Flanke der Mäuse. Den Gruppen 2 und 4 wurden jeweils  $1 \times 10^6$  LacZ-exprimierende DC s.c. injiziert. 9 Tage später folgte die zweite s.c. Vakzinierung mit  $1 \times 10^6$  mAFP-beladenen bzw. LacZ-exprimierenden DC in Kombination mit einer i.t. Injektion von  $1 \times 10^6$  CD40L-exprimierenden (Gruppe 1 und 2) bzw. LacZ-exprimierenden DC (Gruppe 3 und 4). Gruppe 4 beinhaltete die unbehandelten Mäuse mit s.c. HCC. Nach Komplettierung des Therapiezykluses wurden die Tumore erneut in 2- bis 3-tägigen Abständen gemessen.

Abb. 9 und 10 zeigen, dass die Kombinationstherapie einer s.c. Impfung mit mAFP-DC und einer i.t. Behandlung mit CD40L-DC den besten antitumoralen Effekt in dieser Arbeit erzielte. Als *cutoff* wurde Tag 20 nach Tumorinduktion genommen. Zu diesem Zeitpunkt betrug das Tumolvolumen in der s.c. mAFP-DC/i.t. CD40L-DC-Gruppe (Gruppe 1)  $430 \pm 347 \text{ mm}^3$  vs.  $1650 \pm 350 \text{ mm}^3$  in der s.c. LacZ-DC/i.t. CD40L-Gruppe (Gruppe 2). Dieser Unterschied erwies sich als signifikant mit einem p-Wert kleiner 0,05. Die Mäuse, die als Therapie mAFP-DC s.c. und LacZ-DC i.t. (Gruppe 3) erhielten, wiesen an Tag 20 ein durchschnittliches Tumolvolumen von  $544 \pm 270,7 \text{ mm}^3$  auf.

Somit zeigte sich in dieser Gruppe interessanterweise ein etwas langsames Tumorstadium im Vergleich zu den Tieren, die mit CD40L-DC i.t. behandelt wurden.

Die Kontrollgruppe mit einer LacZ-DC-Behandlung sowohl s.c. als auch i.t. zeigte zwar im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ein etwas langsames Tumorstadium, erreichte jedoch ebenfalls vor dem *cutoff*-Tag eine letale Tumorstadium. An Tag 17 betrug das durchschnittliche Tumorstadium der s.c. LacZ-DC/i.t. LacZ-DC-Gruppe  $1387 \pm 483,7 \text{ mm}^3$ . An Tag 15 hatten die Mäuse der unbehandelten Gruppe ein durchschnittliches Tumorstadium von  $1422 \pm 188 \text{ mm}^3$  (s. Abb. 9).



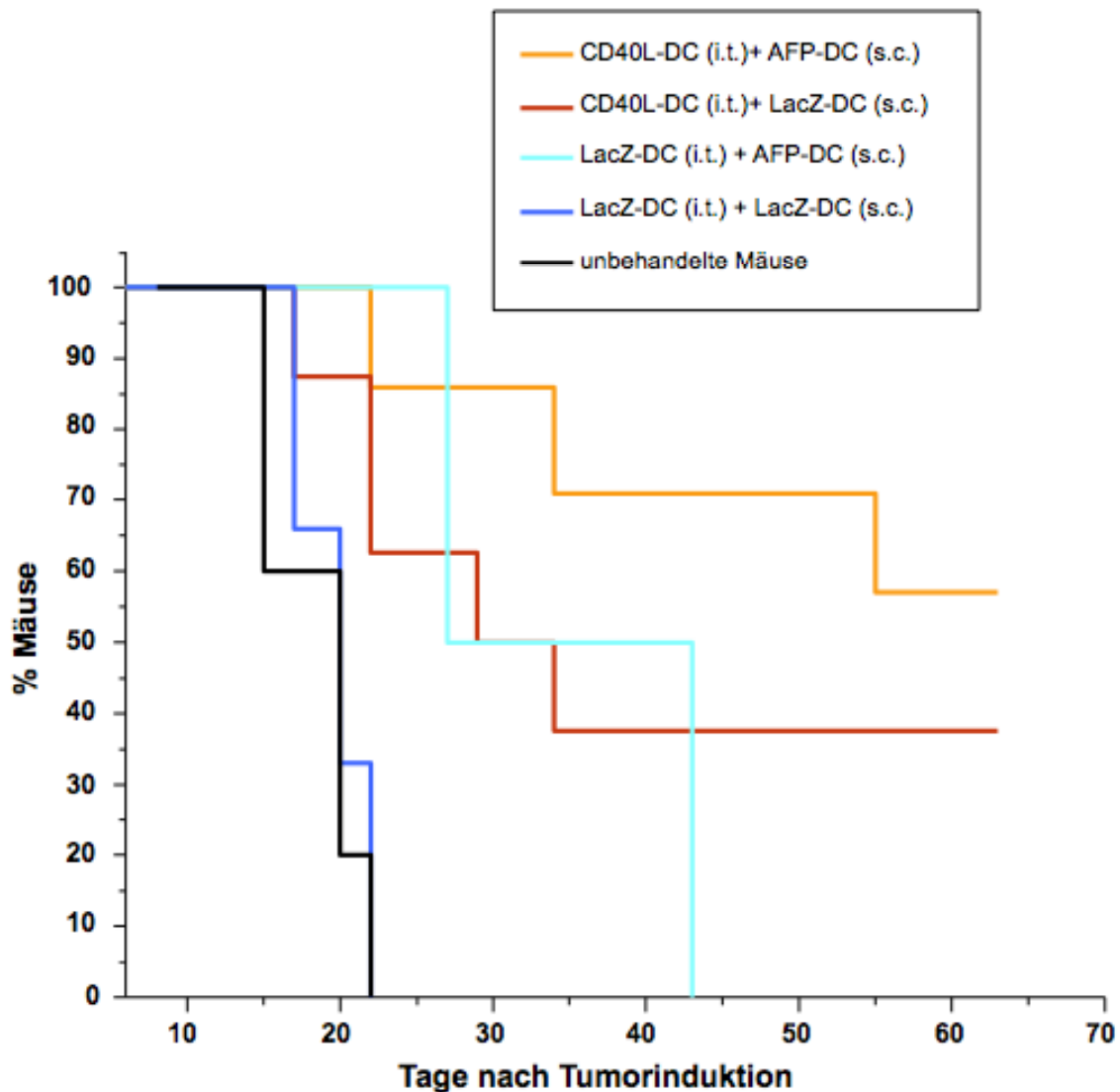
**Abb. 9:** Tumorstadiumen von s.c. AFP-positivem HCC (Hepa 129-mAFP) in C3H-Mäusen, welche mit CD40L-exprimierenden, AFP-beladenen oder LacZ-exprimierenden DC in verschiedenen Kombinationen behandelt wurden. Als Kontrolle dienen unbehandelte Tiere. Die Daten sind als durchschnittliches Tumorstadium ( $\text{mm}^3$ ) angegeben mit SEM.



Noch eindeutiger zeigte sich der antitumorale Effekt der Kombinationstherapie mit s.c. Gabe von mAFP-DC und i.t. Injektion von CD40L-DC in der Kaplan-Meier-Darstellung des Überlebens (s. Abb. 10). Die Kombinationstherapie mAFP-DC s.c./CD40L-DC i.t. erzielte den stärksten antitumoralen Effekt mit einer kompletten Tumorregression in 62,5 % der Tiere in dieser Gruppe. Die Gruppe, die mit einer i.t. Injektion von CD40L-exprimierenden DC und einer s.c. LacZ-DC-Vakzinierung therapiert wurden, zeigten ebenfalls komplette Tumorremissionen, jedoch nur in 37,5 % der Fälle.

Tiere, die eine s.c. Impfung mit AFP-DC und LacZ-DC i.t. erhielten, zeigten mit einem durchschnittlichen Gesamtüberleben von etwa 43 Tagen nach Therapie ein signifikant längeres Überleben im Vergleich zu den unbehandelten Tieren oder den Tieren, die LacZ s.c. und i.t. erhielten. Eine komplette Tumorremission konnte jedoch nicht erreicht werden.

Tiere, die LacZ s.c. und i.t. erhielten, überlebten nicht länger als die unbehandelten Tiere. Bei beiden Gruppen lag das durchschnittliche Gesamtüberleben bei etwa 22 Tagen nach Therapie.



**Abb. 10:** Kaplan-Meier-Kurven zur Überlebensrate von tumortragenden Mäusen nach Behandlung mit CD40L-, mAFP- oder LacZ-exprimierenden DC in verschiedenen Kombinationen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen.

#### 4.5 Charakterisierung der Immunantwort in s.c. HCC-Tumoren der C3H-Mäuse nach Therapie mit CD40L-, mAFP- oder LacZ-exprimierenden DC in verschiedenen Kombinationen

Ziel einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC war es, das vorhandene immunsuppressive Tumormilieu in ein proinflammatorisches Milieu umzumodulieren, um in

Kombination mit einer AFP-Vakzinierung die tumorspezifische Immunantwort zu verstärken und somit eine dauerhafte Tumorregression zu erzielen.

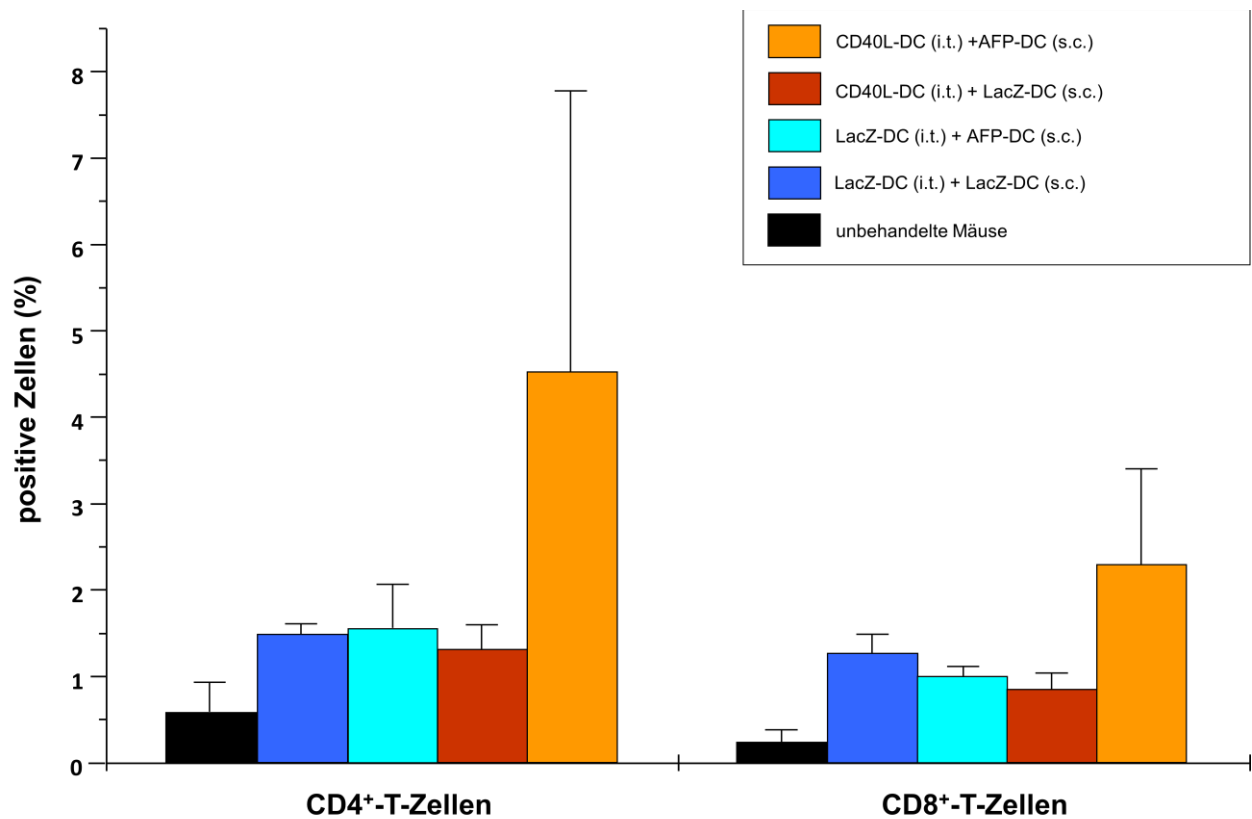
Um nun die antitumorale Wirkung der o.g. Therapienansätze genauer zu charakterisieren und zu quantifizieren, wurde in einem Pilotexperiment (n=5) zum Einen die Infiltration von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in die HCC-Tumore 3 Tage nach Abschluss der verschiedenen Therapien durchflusszytometrisch untersucht, und zum Anderen die Konzentration proinflammatorischer Zytokine wie IFN-gamma und IL-12 im Tumorlysat mittels ELISA gemessen. Zudem wurde das immunsuppressive Zytokin IL-10 quantifiziert.

#### **4.5.1 Analyse der tumorinfiltrierenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Abschluss der Therapie**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (s. Kap. 3.6.1) wurde die Infiltration von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den therapierten Tumoren analysiert. Hierfür wurden die Mäuse 3 Tage nach Abschluss der jeweiligen Therapie geopfert, die s.c. HCC-Tumore aus dem Fettgewebe herauspräpariert, zerkleinert und homogenisiert (s. Kap. 3.4.3). Anschließend erfolgte nach dem FcR-Block die Färbung mit den jeweiligen Ak CD3, CD4 und CD8, die wiederum mit den fluoreszierenden monoklonalen Ak FITC oder PE gekoppelt waren (s. Kap. 3.6.1.1). CD3 ist T-Zell-spezifisch. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen tragen zusätzlich CD4 und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen CD8 auf ihrer Oberfläche.

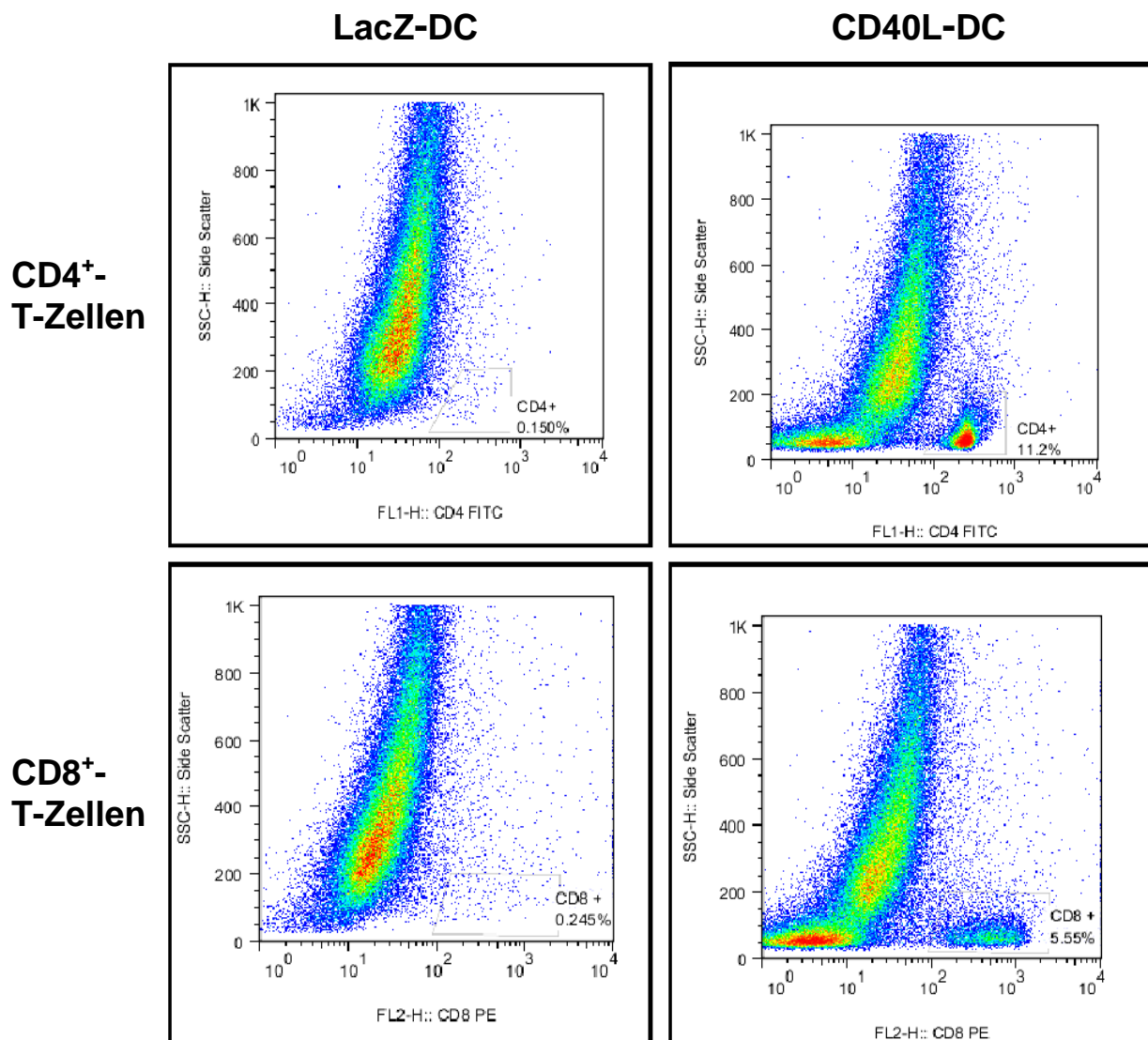
Wie in Abb. 11 und 12 dargestellt, wiesen die Tumore, die mit CD40L-DC i.t. und mAFP-DC s.c. behandelt wurden, eine dreifach so hohe Infiltration an CD4<sup>+</sup>- und eine fast doppelt so hohe Infiltration an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bereits 3 Tage nach Therapie im Vergleich zu den anderen Gruppen auf. Der Prozentanteil an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen lag bei insgesamt 4,5 % gemessen am Gesamtanteil der Tumorzellen, der Prozentanteil an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei insgesamt 2,5 %.

Die CD40L-DC i.t./LacZ-DC s.c.-behandelten Tumore, die Tumore, die eine mAFP-Vakzinierung in Kombination mit LacZ-DC i.t. erhielten und auch die LacZ-DC i.t./LacZ-DC s.c.-behandelten Mäuse wiesen alle durchschnittlich unter 1,5 % an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und unter 1 % an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf. Die unbehandelten Tumore enthielten 0,5 % CD4<sup>+</sup>- und etwa 0,2 % CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.



**Abb. 11:** Nachweis tumorinfiltrierender CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in s.c. HCC 3 Tage nach Behandlung mit verschiedenen Kombinationen von CD40L-, AFP-, und LacZ-DC, analysiert mittels Durchflusszytometrie.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Kombinationstherapie CD40L-DC i.t./mAFP-DC s.c. nicht nur den besten antitumoralen Effekt, sondern auch einen synergistischen Effekt mit doppelt bis dreifach so hoher Rekrutierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen erzielte.



**Abb. 12:** Repräsentative Abbildung der durchflusszytometrischen Analyse tumorinfiltrierender CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in s.c. HCC 3 Tage nach i.t. Behandlung mit CD40L- und LacZ-DC.

#### 4.5.2 Bestimmung der Konzentrationen der Zytokine IFN-gamma, IL-12 und IL-10 in den therapierten Tumoren mittels ELISA

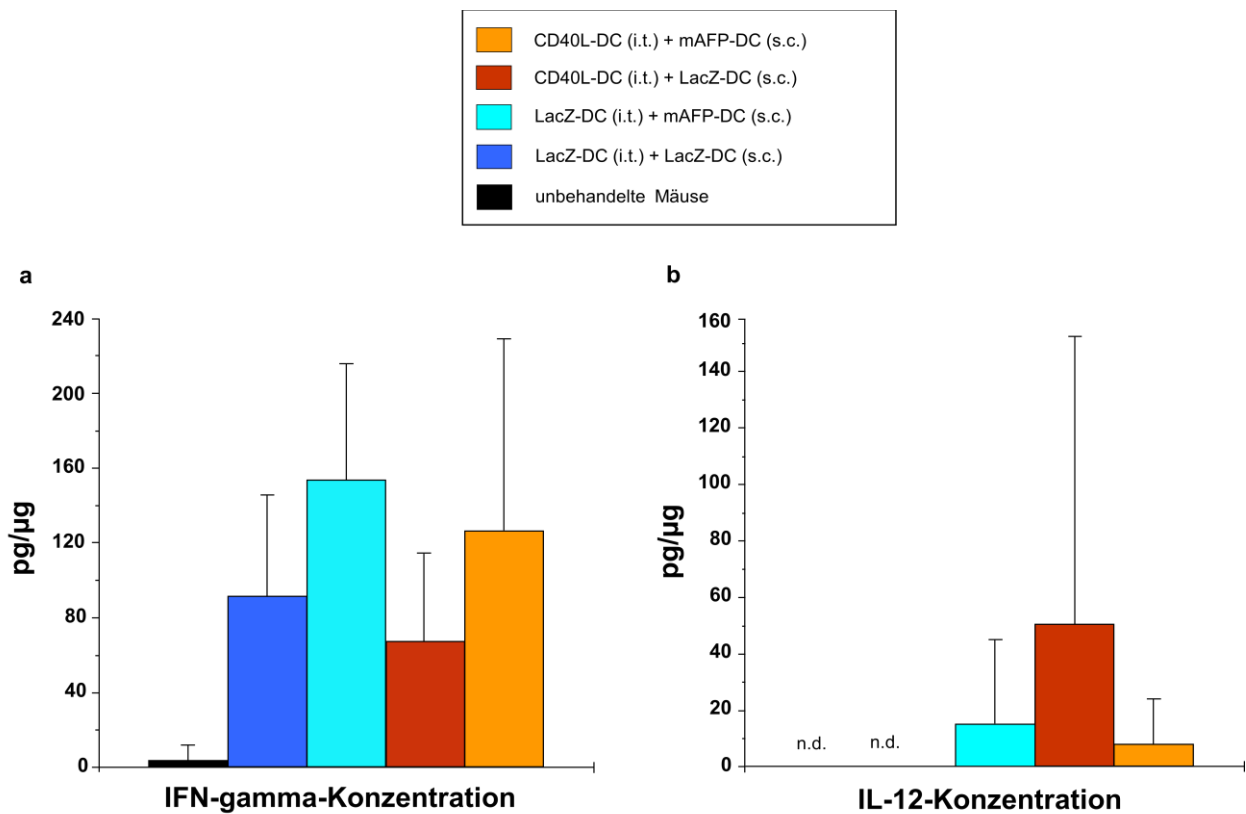
Um die proinflammatorische Aktivität der in den Tumor rekrutierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu messen, wurde die Konzentration von 3 verschiedenen Zytokinen in den Tumoren 3 Tage nach Abschluss der HCC-Therapie mittels ELISA bestimmt. Die dem ELISA zugrunde liegende *Sandwich*-Methode mit Koppelung der jeweiligen Zytokine an zwei Ak (Primär-Ak und biotinylierter Sekundär-Ak) und anschließende photospektro-

metrische Messung der Intensität des dabei entstehenden Farbumschlages im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm, ermöglicht eine genaue Konzentrationsbestimmung anhand einer mitgeführten Standardreihe. Die Farbintensität ist proportional zur Menge der gebundenen Konjugate und somit der Menge an Zytokin. Der Versuchsablauf erfolgte nach Angaben des Herstellers BD (s. Kap. 3.6.2).

IFN-gamma ist ein Th<sub>1</sub>-Zytokin. Das IL-12, v.a. exprimiert von DC und Makrophagen, ist eines der potentesten proinflammatorischen Zytokine und spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Th<sub>1</sub>-Zytokinen (Chehimi et al., 1994). IL-10, ein Th<sub>2</sub>-Zytokin, ist wiederum ein antiinflammatorisches Zytokin und spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Tumormilieus, u.a. durch Inaktivierung von DC (Shurin et al., 2002).

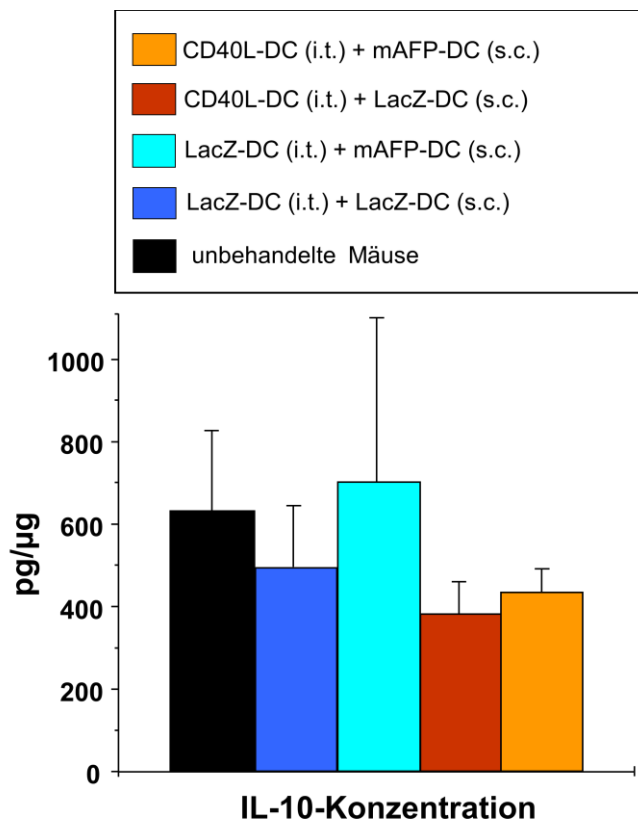
Die IFN-gamma-Konzentration zeigte sich 3 Tage nach Therapie in den Gruppen, die eine mAFP-DC-Vakzinierung erhielten (CD40L-DC i.t./mAFP-DC s.c. und mit LacZ-DC i.t./mAFP-DC s.c.) am höchsten (126,6 bzw. 154 pg/μg Protein), s. Abb. 13a. Die Mäuse, die CD40L-DC i.t./LacZ-DC s.c. erhielten, wiesen einen etwa um die Hälfte geringeren IFN-gamma-Spiegel im Vergleich zu den o.g. Gruppen auf (67,4 pg/μg Protein). Interessanterweise zeigten die mit LacZ-DC i.t. und s.c. behandelten Mäuse zu diesem Zeitpunkt eine relativ starke IFN-gamma-Konzentration im Vergleich zu den nicht behandelten Tumoren auf (91,75 vs. 30 pg/μg Protein).

Die IL-12-Expression zeigte sich zu diesem Zeitpunkt deutlich niedriger in den Tumoren, im Vergleich zur IFN-gamma-Expression. Es konnte lediglich in den Tumoren, die CD40L-DC i.t. erhielten und in den Tumoren, die mit LacZ-DC i.t./mAFP-DC s.c. behandelt wurden detektiert werden (6,5 bzw. 50,62 bzw. 15,53 pg/μg Protein), s. Abb. 13b.



**Abb. 13a und b:** Konzentration der proinflammatorischen Th<sub>1</sub>-Zytokine IFN-gamma (a) und IL-12 (b) in Tumoren, die mit verschiedenen Kombinationen von DC behandelt wurden. Die Bestimmung erfolgte 3 Tage nach Abschluss der Therapie, gemessen im ELISA. Die Konzentrationsangaben erfolgten in pg/µg Protein.

Abb. 14 stellt die IL-10-Expression in therapierten Tumoren ebenfalls 3 Tage nach Therapieabschluss dar. Hier zeigt sich ein Trend zur verminderten Expression des IL-10 in den CD40L-DC i.t.-therapierten Tumoren, interessanterweise unabhängig der s.c. Vakzinierung (463,94 bzw 431,6 pg/µg Protein). Im Vergleich dazu wiesen die LacZ-DC i.t.-therapierten Tumore Konzentrationen bis zu 703,48 pg/µg Protein auf. Die unbehandelten Tumore wiesen ein IL-10-Niveau von über 629,43 pg/µg Protein auf.



**Abb. 14:** Konzentration (pg/µg Protein) des immunsuppressiven Th<sub>2</sub>-Zytokins IL-10 in mit verschiedenen DC-Kombinationen therapierten s.c. HCC-Tumoren 3 Tage nach Abschluss der Therapie.

#### 4.6 Induktion von Apoptose in Tumorzellen durch Überstände von CD40L-exprimierenden DC

In publizierten Arbeiten zeigte sich, dass die CD40-CD40L-Interaktion auch eine apoptotische Wirkung auf Tumorzellen haben kann (Xu et al., 2004; Loskog et al., 2007). Um eine CD40L-induzierte Apoptose als Mechanismus der antitumoralen Wirksamkeit einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet. Zur Bestimmung der Apoptoserate *in vitro* wurden Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen mit Überstand von CD40L-exprimierenden DC kultiviert und anschließend die SubG<sub>1</sub>-Fraktion in diesen Zellen durchflusszytometrisch gemessen. *In vivo* erfolgte der enzymatische Nachweis der Caspase 3-Aktivität in Proteinlysat von mit CD40L-DC i.t.-behandelten HCC im Fluorometer.

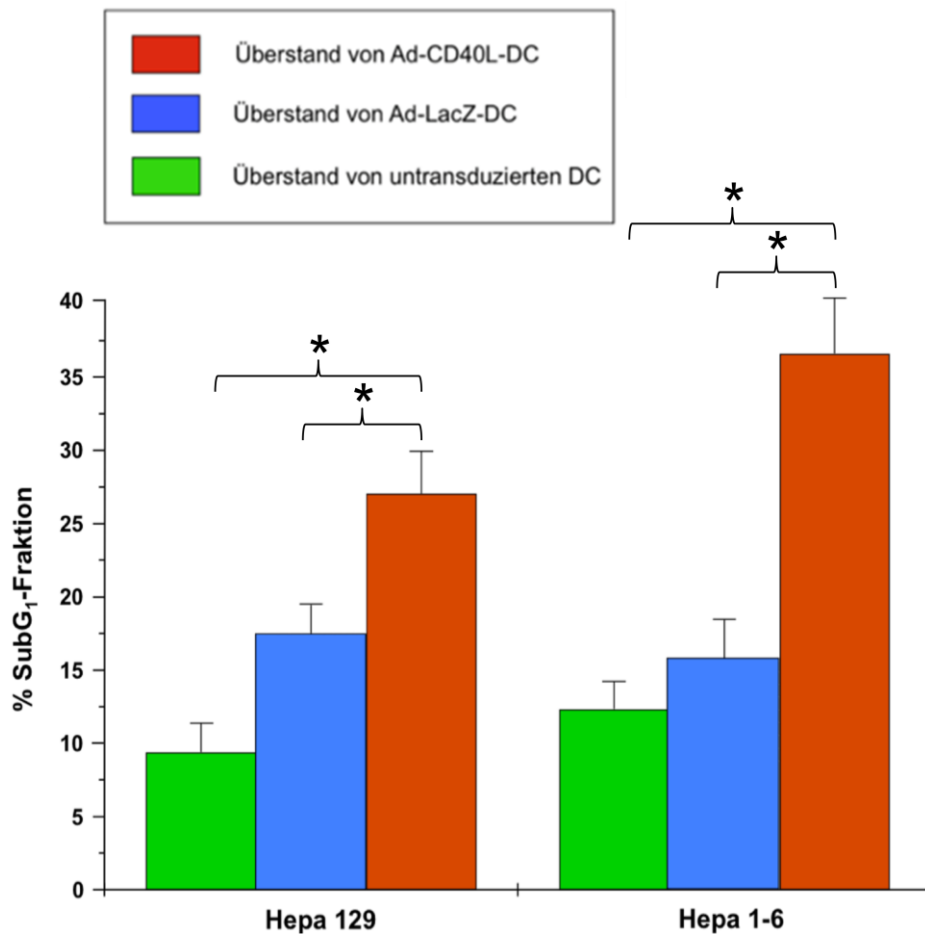


#### **4.6.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der SubG<sub>1</sub>-Fraktion in Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen nach Kultivierung mit Überstand von CD40L-exprimierenden DC**

Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen wurden 48 bzw. 72 h mit dem Überstand von CD40L-exprimierenden DC, wie in Kap. 3.8.1 beschrieben, kultiviert. Als Negativkontrollen wurden Überstände von LacZ-exprimierenden DC und nicht transduzierten DC verwendet. Als Positivkontrolle diente Medium mit 2 µM BFA. Nach Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, in Ethanol fixiert, ihre DNA extrahiert, mit PI gefärbt und einem RNase-Verdau unterzogen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der SubG<sub>1</sub>-Fraktion bei einer Wellenlänge von 555 bis 600 nm im Fluoreszenzkanal 2. Der Anteil an Zellen in der SubG<sub>1</sub>-Fraktion wurde mit Hilfe des Programms WinMDI genau ermittelt (s. Kap. 3.7.1).

Der DNA-Gehalt in apoptotischen Zellen ist aufgrund der DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen niedriger. Daher stellte sich diese Fraktion im Histogramm als dritter Peak links neben dem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase-Peak und G<sub>2</sub>/M-Phase-Peak dar und charakterisierte apoptotische Zellen.

Wie in Abb. 15 dargestellt, zeigte sich bei beiden Zelllinien ein signifikant erhöhter Anteil der Sub-G<sub>1</sub>-Fraktion in den Tumorzellen, die mit dem Überstand von CD40L-DC kultiviert wurden im Vergleich zu den Tumorzellen, die Überstand von LacZ-DC oder Überstand von nicht transduzierten DC erhielten ( $p < 0,01$ ). Im Falle der Hepa 1-6-Zellen konnte sogar eine mehr als doppelt so hohe Menge an Sub-G<sub>1</sub>-Fraktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen gemessen werden.



**Abb. 15:** Apoptosebestimmung in Tumorzellen (Hepa 129 und Hepa 1-6) durch Messung der Sub-G<sub>1</sub>-Fraktion im Durchflusszytometer, *in vitro*, 48 bzw. 72 h nach Kultivierung mit den o.g. Überständen.

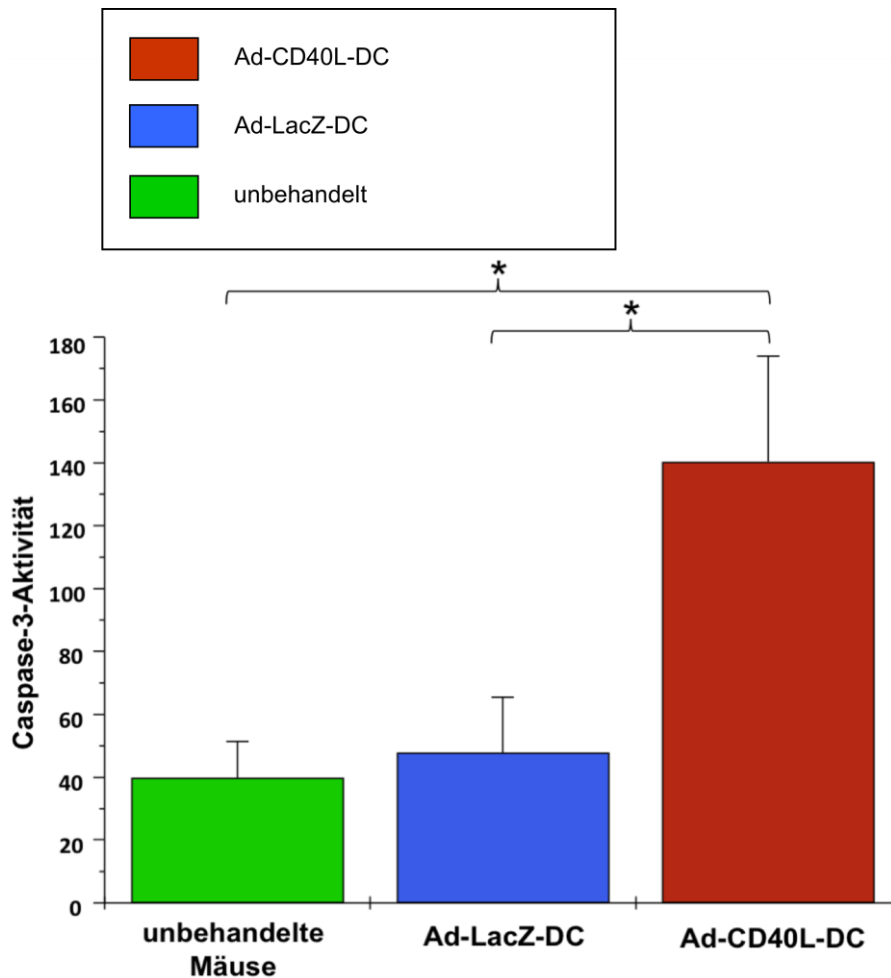
#### 4.6.2 Messung der Caspase 3-Aktivität in mit CD40L-DC i.t. therapierten s.c. HCC von C3H-Mäusen zur Bestimmung der Apoptoserate *in vivo*

Caspasen spielen eine entscheidende Rolle im Ablauf der Zellapoptose. Sie werden hierbei kaskadenartig aktiviert. Die Caspase 3 gehört zu den Effektorcaspasen. Sie kann Endonukleasen aktivieren, die wiederum die Zell-DNA fragmentieren können. Sie ist in der Lage die fluorogene Substanz Ac-Asp-Glu-Val-asp-afc zu spalten. Die Menge dieser Spaltung kann spektrophotometrisch gemessen werden und ist proportional zur Caspase 3-Aktivität.

Um diese Aktivität zu messen, wurden hierfür die mit CD40L-DC bzw. LacZ-DC i.t. therapierten s.c. HCC aus C3H-Mäusen explantiert (s. Kap. 3.4.3). Als weitere Negativ-

kontrolle dienten Tumore von unbehandelten Tieren. Der Versuchsablauf erfolgte nach Angaben des Herstellers (Bachem, Heidelberg), s. Kap. 3.8.2.

Abb. 16 zeigt, dass die Caspase 3-Aktivität in den Tumoren, die mit CD40L-exprimierenden DC i.t. behandelt wurden im Vergleich zu denen mit LacZ-DC behandelten und unbehandelten Tumoren signifikant erhöht war ( $p=0,0013$  und jeweils  $p=0,03$ ).



**Abb. 16:** Detektion der Caspase 3-Aktivität in Proteinlysate von Tumoren, die mit einer i.t. Gabe von LacZ- oder CD40L-exprimierenden DC behandelt wurden. Unbehandelte Tumore dienten als Kontrolle. (Aktivität: AFC = Fluoreszenzeinheit in pmol/mg protein/min).

Mit diesen Ergebnissen konnte eindrücklich gezeigt werden, dass CD40L-exprimierende DC auch im HCC-Modell über den Apoptosemechanismus antitumoral wirken können.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit zeigte sich, dass eine s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC in Kombination mit einer i.t. Applikation von CD40L-exprimierenden DC die induzierte Immunantwort gegen AFP-positives s.c. HCC in C3H-Mäusen verstärken kann und somit eine gesteigerte Tumorregression erzielt wird.

Das HCC ist die sechsthäufigste Tumorentität und belegt Platz drei der häufigsten tumorassoziierten Todesursachen weltweit (Ferlay et al., 2010). Die Inzidenz ist sowohl in Asien und Afrika als auch in westlichen Ländern weiter ansteigend. Trotz der Entwicklung neuer Diagnostikverfahren und Therapieansätze hat das HCC immer noch eine sehr schlechte Prognose. Einerseits limitiert die oft späte Erstdiagnose die möglichen kurativen Therapiemöglichkeiten im klinischen Alltag, andererseits stellt die mit dem HCC oft assoziierte Leberzirrhose und damit verbundene eingeschränkte Leberfunktion eine große Herausforderung operativer Resektionen dar. Ein weiteres Problem ist die häufig bestehende Chemoresistenz des HCC (Ibrahim et al., 2008).

Auf molekularer Ebene schien der Multikinaseinhibitor Sorafenib einen Durchbruch zu erzielen. Die Ergebnisse der SHARP-Studie 2008 ergaben zwar in der palliativen Situation eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens für einige Monate, jedoch keinen anhaltenden antitumoralen Effekt (Llovet et al., 2008). Auch Kombinationstherapien zeigten bisher keinen überzeugenden Benefit (Pawlik et al., 2011). Daher ist es weiterhin dringend notwendig, neue Therapieansätze zur Behandlung des HCC zu erproben.

Das HCC ist ein immunogenes Malignom. Patienten, deren HCC eine hohe Konzentration an tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) aufweisen, haben insgesamt eine bessere Prognose im Vergleich zu Patienten mit geringer Konzentration an TILs im HCC (Breous und Thimme, 2011). Somit ist das Immunsystem initial in der Lage eine Immunantwort gegen das HCC zu initiieren. Jedoch gelingt es dem Malignom, durch sog. *immune escape*-Mechanismen ein starkes immunsuppressives Tumormilieu aufzubauen und sich somit dauerhaft dem Immunsystem zu entziehen.

Viele Malignome exprimieren Tumor-assoziierte Antigene (TAAs), die ebenfalls vom Immunsystem erkannt werden. Das Alpha-Fetoprotein (AFP) ist ein HCC-TAA, welches in 50-70 % der Patienten mit HCC reexprimiert wird. Als mittlerweile eines der am besten charakterisierten TAA des HCC wird es im klinischen Alltag, v.a. in der HCC-Nachsorge als Tumormarker verwendet (Breous und Thimme, 2011). Zudem gibt es Daten dazu, dass die Reexpression von AFP möglicherweise mit der schlechten Prognose AFP-positiver HCC assoziiert ist. Eine Erklärung hierfür scheint ein immunsuppressiver Effekt des AFP selbst zu sein (Lerose et al., 2001). Andererseits bietet das AFP als TAA des HCC ein geeignetes Ziel für die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass in Patienten mit HCC AFP-spezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vorhanden sind (Hanke et al., 2002b). Erste Vakzinierungstherapien gegen AFP erzielten ebenso eine erhöhte nachweisbare spezifische T-Zell-Antwort im peripheren Blut, jedoch blieb bislang ein signifikantes klinisches Ansprechen aus (Butterfield et al., 2003; Lee et al., 2005; Vollmer et al., 1999).

DC sind professionelle APC und werden als Initiatoren der Immunantwort bezeichnet (Banchereau und Steinmann, 1998). Sie sind in der Lage sowohl eine CD4<sup>+</sup>- als auch eine CD8<sup>+</sup>-T-Zell-gesteuerte Immunantwort gegen TAA zu induzieren. Somit besitzen sie ein großes Potenzial für malignomspezifische immuntherapeutische Ansätze. 2010 wurde in den USA eine zelluläre Immuntherapie bestehend aus autologen mit sipuleucel-T (APC8015) gepulsten DC, einem spezifischem TAA des Prostatakarzinoms, als Primärtherapie zur Behandlung von fortgeschrittenen Prostatakarzinomen zugelassen. Die Zulassung basierte auf einer Phase III-Studie von Small et al. 2006. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich ebenfalls, dass DC, die mit Ad beladen wurden, eine AFP-spezifische Immunantwort gegen AFP-positive HCC-Zellen *in vitro* induzieren können (Gonzalez-Carmona et al., 2006). Vakzinierungstherapien mit AFP-beladenen DC in der HCC-Therapie erzielten auch Tumorregressionen *in vivo*, jedoch blieben in klinischen Studien Therapieerfolge aus (Butterfield et al., 2006). Eine Erklärung hierfür scheint das starke immunsuppressive Tumormilieu zu sein, denn die darin vorhandenen antiinflammatorischen Moleküle IL-10 und TGF- $\beta$  inhibieren u.a. DC (Berinstein, 2007; Beckebaum et al., 2004; Shurin et al., 2002; Nagaraj et al., 2007; Ohm et al., 2003). Eine weitere Erklärung für die nicht ausreichende antitumorale

Wirkung von AFP-Vakzinierungstherapien könnte eine verminderte Kostimulation in der Phase der Antigenpräsentation von DC an Effektorzellen des Immunsystems sein (Shurin et al., 2002).

Daher scheint für eine effektive Immuntherapie eines Malignoms, wie des HCCs, nicht nur eine starke antitumorale Immunreaktion, sondern auch die gleichzeitige Elimination immunsuppressiver Mechanismen notwendig zu sein.

CD40L ist ein potentes kostimulatorisches Molekül, das von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen exprimiert wird. Es kann mit dem CD40-Rezeptor auf der Oberfläche von DC interagieren, was eine potente Aktivierung der DC induziert und somit Helfer-abhängige zytotoxische T-Zellen (CTL) und die Produktion von Th<sub>1</sub>-Zytokinen durch DC selbst induziert (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996; Schoenberger et al., 1998; Bianchi et al., 1999). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC zu einer HCC-Regression *in vivo* führt (Gonzalez-Carmona et al., 2008). Somit bietet die Verwendung von CD40L eine Möglichkeit, DC-Vakzinierungen zu verstärken.

Ziel dieser Arbeit war daher nun zu untersuchen, ob die i.t. Applikation von CD40L-exprimierenden DC die Immunantwort einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC effektiv verstärken kann und dies zu einer Tumorregression des s.c. HCC in C3H-Mäusen führt.

## **5.1 *In vitro* - Experimente**

### **5.1.1 Transduktion von DC mit Ad-CD40L, Ad-mAFP und Ad-LacZ**

DC wurden in dieser Arbeit mit AdV der 1. Generation transduziert, die für CD40L, mAFP bzw. LacZ (Kontrolle) kodieren. Hierfür wurden DC-Vorläuferzellen aus Knochenmark von C3H-Mäusen gewonnen. Die Kultivierung erfolgte mit mGM-CSF und mIL-4 (Inaba et al., 1992). Das mGM-CSF spielt eine entscheidende Rolle in der Maturation der Vorläuferzellen zu DC, das mIL-4 übt eine zusätzliche Stimulation auf DC aus (Steinmann, 1992; Berinstein, 2007; Arthur et al., 1997).

Nach DC-Maturation erfolgte die Transduktion mit den jeweiligen AdV. Der Vorteil der AdV ist, dass sie auch reife DC, d.h. nicht mehr teilungsfähige Zellen, transduzieren können. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass DC nach adenoviraler Transduktion die Anzahl ihrer Reifungsmarker, CD80, CD86, CD40 und MHC-II-Komplexe im Vergleich zu untransduzierten DC steigern (Gonzalez-Carmona et al., 2006; Miller et al., 2003). Somit hat zusätzlich zum mGM-CSF und dem mIL-4 auch die adenovirale Transduktion einen Effekt auf die Expression von Zelloberflächenproteine, die Entzündungsvorgänge begünstigen. Die Transduktionen erfolgte mit jeweils einer MOI von 250. Diese Konzentration erwies sich ebenfalls in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe als am geringsten toxisch für DC ohne Verlust der Transgenexpression. Die adenovirale Transduktion mit Ad-mAFP führt zudem dazu, dass das mAFP sowohl intrazellulär als auch extrazellulär in DC verarbeitet wird. Somit ist eine Präsentation über MHC-I- und MHC-II-Moleküle möglich. Dies bringt zusätzlich den Vorteil, dass das gesamte AFP, bekannte und auch unbekannte AFP-Epitope, durch DC generiert und präsentiert werden können.

## **5.2 *In vivo* - Experimente**

### **5.2.1 Subkutanes AFP-positives HCC-Mausmodell**

In dieser Arbeit wurde ein s.c. HCC-Modell in C3H-Mäusen zur Erprobung des Therapieansatzes verwendet. Hierfür wurden den Mäusen  $1 \times 10^6$  Hepa 129-mAFP-positive Zellen in ihre rechte Flanke injiziert. Das Vorhandensein eines AFP-positiven Tumors war Voraussetzung für die hier erprobten Vakzinierungstherapien gegen mAFP. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten s.c. mAFP-Vakzinierungen gegen mAFP-negative Tumore, induziert durch Hepa 129-Zellen, keinen antitumoralen Effekt (Gonzalez-Carmona et al., 2014, *in preparation*).

Das s.c. Tumormodell ermöglichte eine gute Zugänglichkeit für die i.t. Therapieansätze. Zudem konnten die Tumore vor und nach der Therapie exakt gemessen werden. Somit gelang eine gut nachvollziehbare Überprüfung der jeweiligen Therapieeffekte.

### **5.2.2 Antitumorale Wirkung einer Kombinationstherapie mit einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC und einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC im s.c. HCC-Modell von C3H-Mäusen**

Die in dieser Arbeit erprobte Kombinationstherapie mit einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC, sowie einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC erzielte die besten antitumoralen Effekte mit Erreichen einer kompletten Tumorregression in mehr als 60 % der therapierten Mäuse. Die alleinige i.t. CD40L-DC-Therapie erzielte eine signifikant niedrigere Remissionsrate mit nur 37,5 % der Fälle. Eine s.c. mAFP-DC-Vakzinierung zeigte lediglich ein signifikant langsames Tumorwachstum im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, jedoch keine Tumorregression. In Anlehnung an die Untersuchungen im Menschen u.a. von Butterfield et al., zeigte sich auch hier, dass eine alleinige Vakzinierung gegen AFP zu keiner signifikanten Tumorregression führt. Jedoch ist eine Verstärkung des antitumoralen Effektes durch eine potente Kostimulation, wie CD40L es bietet, möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass diese Kombinationstherapie im Vergleich zu den Einzeltherapien nicht nur den besten antitumoralen Effekt erzielte, sondern auch einen synergistischen Effekt mit fast doppelt so hoher Tumorregressionsrate im Vergleich zur CD40L-Einzeltherapie hatte.

### **5.2.3 Charakterisierung immunologischer Zellpopulationen im HCC nach einer s.c. Vakzinierung mit mAFP-beladenen DC in Kombination mit der i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC**

Um den proinflammatorischen Effekt dieser Kombinationstherapie genauer zu charakterisieren, wurden der prozentuale Anteil der T-Zell-Infiltration und die Zytokin-konzentrationen (IFN-gamma, IL-12 und IL-10) im Tumor 3 Tage nach Therapieabschluss bestimmt. Ziel dieser Analysen war es, die möglichen Mechanismen, die zur Tumorregression beitrugen, besser zu verstehen und darzustellen.

Die Ergebnisse zeigten in den Tumoren, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurden, eine 2- bis 3-fach so hohe Konzentration an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse bereits 3 Tage nach Therapieabschluss sprechen für ein sehr rasches Therapieansprechen in der Gruppe mit einer AFP-Vakzinierung und einer gleichzeitigen i.t. CD40L-DC-Behandlung, was den syner-



gistischen Effekt gegen AFP-positive Tumore z.T. erklärt. Durch die s.c. AFP-Vakzination wird eine starke und spezifische T-Zell-Antwort gegen AFP-exprimierende HCC-Zellen initiiert (Gonzalez-Carmona et al., 2006). Die gleichzeitige proinflammatorische Modulation des immunsuppressiven Tumormilieus durch die i.t. Gabe von CD40L-exprimierende DC scheint eine maximale Rekrutierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den Tumor zu ermöglichen.

Tumore, die mit i.t. LacZ-DC behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren ebenfalls leicht erhöhte T-Zell-Infiltrationen. Dies lässt darauf schließen, dass die i.t. Applikation von DC, die lediglich den Leervektor LacZ exprimieren, eine schwache Inflammation induzieren können. Jedoch bleibt eine potente Kostimulation im immunsuppressiven Tumormilieu, die zu einer starken Rekrutierung von Effektorzellen und somit zur Tumorregression führen kann, aus.

Ad-CD40L transduzierte DC sind in der Lage den CD40L auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Dieser kann wiederum mit dem CD40, einem DC-Reifungsmarker, interagieren. Dies führt zu einer starken proinflammatorischen Aktivierung der DC. Die Interaktion der DC untereinander konnte bereits einen Tag nach adenoviraler Transduktion mit Ad-CD40L mikroskopisch beobachtet werden, da sie typischerweise miteinander agglutinieren und sog. *Cluster* bilden (s. Abb. 7). Aktivierte DC sezernieren in hoher Konzentration das potente proinflammatorische Zytokin IL-12, welches eine wichtige Rolle in der Reifung von Th<sub>1</sub>-Zellen und zytotoxischen T-Zellen spielt. IFN-gamma wird von CD4<sup>+</sup>-Th<sub>1</sub>-Zellen, zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und auch NK-Zellen exprimiert. Eine erhöhte Konzentration spricht für eine verstärkte Rekrutierung dieser Effektorzellen in den Tumor.

Beide proinflammatorischen Zytokine wurden im Tumormilieu mittels ELISA ebenfalls 3 Tage nach Therapieende detektiert. Die IFN-gamma-Konzentration zeigte sich in den Tumoren, die eine i.t. CD40L-DC-Gabe erhielten, erhöht. Dies bestätigt die bereits 2008 publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe zur potenten kostimulatorischen Aktivität des CD40L (Gonzalez-Carmona et al., 2008). Möglicherweise scheint auch ein Zusammenhang zwischen der Tumorregression und der Höhe der IFN-gamma-Expression zu bestehen (s. Kap. 5.3). Die Tatsache, dass auch die i.t. LacZ-behandelten Tumore erhöhte IFN-gamma-Konzentrationen im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren

aufwiesen, zeigt erneut, dass DC alleine eine gewisse antitumorale Wirkung erzielen können.

Trotz des frühen Zeitpunktes nach Therapieende konnte auch IL-12 in einigen Tumoren nachgewiesen werden. Jedoch zeigte es sich in den mit der Kombinationstherapie behandelten Tumoren im Vergleich zu Tumoren, die CD40L-DC oder mAFP-DC als Einzeltherapie erhielten, nicht erhöht. In den unbehandelten Tumoren ließ es sich nicht nachweisen. Eine Erklärung für die nicht erzielte Signifikanz dieser Ergebnisse ist möglicherweise die niedrige n-Zahl in diesem Pilotexperiment. In nachfolgenden Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurden Experimente mit einer höheren n-Zahl durchgeführt, die diese Ergebnisse bestätigten und signifikant waren (Gonzalez-Carmona et al., 2014, *in preparation*).

Neben den proinflammatorischen Zytokinen wurde gleichzeitig auch die Konzentration des antiinflammatorischen Th<sub>2</sub>-Zytokins IL-10 gemessen, welches, unabhängig vom Vakzinierungsprotokoll, eine verminderte Konzentration in den CD40L-DC i.t.-behandelten Tumoren aufwies. Auch diese Ergebnisse zeigten einen Trend, erzielten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, was möglicherweise ebenfalls auf die niedrige n-Zahl zurückzuführen ist.

### **5.3 Pro-apoptotische Wirkung von CD40L-exprimierenden DC**

Ein weiteres beschriebenes Charakteristikum von Malignomen, wie des HCCs, ist die Apoptose-Resistenz von Tumorzellen (Roth, 2009). In der Literatur wurde die antitumorale Wirkung von CD40L als vielschichtig beschrieben (Loskog et al., 2007). CD40L ist auch in der Lage Apoptose in Tumorzellen zu induzieren (Xu et al., 2004). Daher erfolgten in dieser Arbeit Untersuchungen zu einer möglichen CD40L-induzierten Apoptose als weiteren Mechanismus der antitumoralen Wirksamkeit einer i.t.-Gabe von CD40L-exprimierenden DCs im s.c. HCC-Modell.

Hierfür wurde zum Einen die SubG<sub>1</sub>-Fraktion in den murinen Hepatom-Zellen Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen nach Kultivierung mit Überstand von CD40L-exprimierenden DC gemessen, und zum Anderen die Caspase 3-Aktivität in Proteinlysat von Tumoren, welche mit CD40L-DC i.t. behandelt wurden, bestimmt (s. Kap. 4.7).

Wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben, konnte in unserem Modell neben den zuvor beobachteten immunologischen Veränderungen im Tumormilieu durch die lokale Applikation von CD40L-exprimierenden DC eine Tumorzellapoptose nachgewiesen werden. Es konnte sowohl ein signifikant erhöhter Prozentanteil an SubG<sub>1</sub>-Fraktion in den Hepa 129- und Hepa 1-6-Zellen nach Inkubation mit Überstand von CD40L-exprimierenden DC ( $p < 0,01$ ), als auch eine signifikant erhöhte Caspase 3-Aktivität in den mit CD40L-DC i.t.-behandelten Tumoren ( $p = 0,0013$  und jeweils  $p = 0,03$ ) im Vergleich zu den Kontrollgruppen gemessen werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass CD40L Apoptose in Tumorzellen als weiteren Mechanismus seiner antitumoralen Eigenschaft induzieren kann.

Die intrinsischen Mechanismen dieser CD40L-vermittelten Apoptose in Malignomen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise scheint ein Zusammenhang zwischen den erhöhten IL-12- und IFN-gamma-Konzentrationen im Tumor, induziert durch eine i.t. Behandlung mit CD40L-exprimierenden DC, zu bestehen (Fulda und Debatin, 2002). Beide Zytokine aktivieren NK-Zellen und Makrophagen, welche dann Apoptose in Tumorzellen durch Freisetzung von apoptoseinduzierenden Liganden der TNF-Familie, sowie mittels Perforin und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Molekülen induzieren können. IFN-gamma selbst scheint in der Apoptoseinduktion auch eine wichtige Rolle zu spielen. Es wurde beschrieben, dass es, sezerniert von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Tumorzell-Apoptose direkt induzieren kann (Komita et al., 2006).

Jedoch scheinen noch weitere Mechanismen in der CD40L-induzierten Apoptose ausschlaggebend zu sein. *In vitro* wurde in dieser Arbeit Apoptose in Tumorzellen durch Inkubation mit Überstand von CD40L-exprimierenden DC ohne die Präsenz von Effektorzellen, IFN-gamma oder direkten Kontakt der DC mit den Tumorzellen induziert. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Hepa 129 und Hepa 1-6-Zellen in geringer Menge CD40 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Hierbei scheint die Apoptoseinduktion durch CD40/CD40L-DC-Interaktion zwischen dem im Überstand von CD40L-DC löslichen CD40L und dem CD40, exprimiert auf der Oberfläche der Hepatom-Zellen, vermittelt zu sein (Liu et al., 2005; Tomihara et al., 2008).

Es ist beschrieben, dass auch Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten CD40 auf ihrer Oberfläche exprimieren und auch hochregulieren können (Pammer et al., 1996; Posner et al., 1999). Diese CD40-Expression dient z.B. durch Herunterregulierung des CD40L

auf T-Helfer-Zellen zur Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Tumormilieus (Batra et al., 2002).

#### **5.4 Methodenkritik**

Das in dieser Arbeit verwendete s.c. Tumormodell ermöglichte sowohl eine gute Zugänglichkeit für die i.t. Therapieansätze, als auch eine exakte Evaluation des Therapieeffektes durch genaues Messen der Tumore. Nachteilig jedoch war, dass es artifiziell induziert wurde und somit eine andere Tumorummunologie aufwies als ein spontan entstandenes HCC. Zudem ist bekannt, dass das Lebergewebe selbst eine wichtige Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung einer gewissen Tumorummuntoleranz spielt (s. Kap. 1.2). Das s.c. HCC-Mausmodell spiegelt somit nur bedingt das tatsächliche Lebergewebe wieder. Zur Untersuchung, inwieweit das Lebergewebe den Effekt einer i.t. Injektion von CD40L-exprimierenden DC beeinflusst, ist ein orthotopes Tumormodell nötig. In Abhängigkeit dieser Untersuchungen wäre, ähnlich einer TACE-Therapie, auch eine gezielte i.t. Applikation von CD40L-exprimierenden DC im Menschen denkbar. Der Vorteil einer i.t.-Therapie ist eine nur bedingt systemische Intoxikation.

Die hier erprobte Kombinationstherapie (s.c. Vakzinierung mit mAFP-gepulsten DC/i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC) ist ein neuer Therapieansatz, der nicht nur eine schnelle Immunantwort erzielen kann, sondern auch unterschiedliche Kombinationen ähnlicher Therapieansätze und somit Evaluation weiterer möglicher synergistischer Effekte ermöglicht.

#### **5.5 Ausblick**

In nachfolgenden Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurden Tumore 10 Tage nach i.t. Behandlung mit CD40L-exprimierenden DC explantiert und sowohl der i.t. Anteil an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, als auch die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IFN-gamma und IL-12 bestimmt. Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit LacZ-DC i.t.-behandelte Tumore.

Die Ergebnisse erzielten eine signifikant erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, sowie signifikant erhöhte IFN-gamma- und IL-12-Konzentrationen in den Tumoren nach

i.t. Behandlung mit CD40L-DC im Vergleich zu den Kontrolltumoren. Somit wurden die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigt (Gonzalez-Carmona et al., 2014, *in preparation*).

## 6. Zusammenfassung

Das HCC hat trotz positiver Entwicklungen in den letzten Jahren mit verbessertem *Screening*, somit früherer Erstdiagnose, und neuen Therapieansätzen immer noch eine sehr schlechte Prognose. Kurative Therapien sind weiterhin in seltenen Fällen möglich und palliative Optionen oft begrenzt. Die häufig vorhandene Chemoresistenz des HCC limitiert zudem systemische Therapien.

Die meisten Malignome, so auch das HCC, haben ein immunogenes Potenzial. Das Immunsystem ist in der Lage initial eine antitumorale Immunantwort gegen das Malignom aufzubauen. Jedoch können Malignome sich durch verschiedene Mechanismen der Immunantwort entziehen und sich auch dauerhaft schützen. Beispielsweise bilden Malignome ein stark antiinflammatorisches Tumormilieu aus, welches ein Eindringen von antitumoralen Effektorzellen bzw. deren proinflammatorische Wirkung verhindert und somit die Tumorprogression ungehindert fördert. Sinnvolle immuntherapeutische Strategien sollten somit nicht nur eine antitumorale Immunantwort initiieren oder eine bestehende verstärken, sondern gleichzeitig die intra- und peritumorale Immunsuppression vermindern und *immune-escape*-Mechanismen umgehen.

DC als APC spielen in der Initiierung und Entwicklung einer Immunantwort eine entscheidende Rolle, werden jedoch in ihrer Maturation und Antigenpräsentation von Malignomen im Rahmen der *immune-escape*-Mechanismen ebenfalls behindert.

Viele Malignome exprimieren TAAs, gegen die eine spezifische zelluläre Immunantwort initiiert werden kann. Das HCC-TAA AFP wird in über 50 % der HCC-Patienten reexprimiert und wurde bereits für gezielte Vakzinierungstherapien genutzt. Jedoch konnte auch hiermit mangels potenter Kostimulation kein klinischer Benefit erzielt werden.

Das CD40L, ein potentes kostimulatorisches Molekül, konnte in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe im HCC-Modell erfolgreich eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden DC mit AdV transduziert, die für CD40L, mAFP und LacZ kodieren. Das Ziel der Therapie war es, den antitumoralen Effekt einer Vakzinierung mit mAFP-gepulsten DC mit Hilfe einer i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC effektiv zu verstärken, um eine Tumorregression von HCC in C3H-Mäusen zu erzielen. Hierfür verwendeten wir ein s.c. Tumormodell.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC ein starkes proinflammatorisches Tumormilieu, sowie Tumorzellapoptose bewirkt und dies in Kombination mit einer mAFP-DC-Vakzinierung einen synergistisch antitumoralen Effekt gegen AFP-positive s.c. HCC-Zellen *in vivo* erzielen kann. Dies führte zu einer kompletten Tumorregression in mehr als 60 % der Mäuse und zu einem signifikant verlängerten Überleben. Als Zeichen der induzierten Proinflammation konnte in diesen Tumoren, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurden, bereits 3 Tage nach Abschluss der Therapie eine starke Rekrutierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durchflusszytometrisch verzeichnet werden. Zudem zeigte sich eine erhöhte i.t. Konzentration an den proinflammatorischen Zytokinen IFN-gamma und IL-12, sowie ein Trend zur verminderten Expression des antiinflammatorischen IL-10 in den ELISA-Messungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit scheinen eine vielversprechende DC-basierte Strategie zur Therapie des HCC zu eröffnen, die weiter am Menschen untersucht und ggf. in klinischen Studien getestet werden sollte.

## 7. Literaturverzeichnis

Abelev G. Study of the Antigenic Structure of Tumors. *Acta Unio Intern Cancer* 1963; 19: 80-82

Abelev GI. Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data. *Cancer Res* 1968; 28: 1344-1350

Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1485-1491

Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; 357: 80-82

Arnberg N, Pring-Akerblom P, Wadell G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. *J Virol* 2002; 76: 8834-8841

Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 442-448

Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, Dubinett S, Glaspy J, McBride WH, Economou JS. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 1997; 4: 17-25

Bachmann MF, Lutz MB, Layton GT, Harris SJ, Fehr T, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2595-2600

Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *J Hepatol* 2012; 56: 1384-1391

Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 881-922

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252

Batrla R, Linnebacher M, Rudy W, Stumm S, Wallwiener D, Gückel B. CD40-expressing carcinoma cells induce down-regulation of CD40 ligand (CD154) and impair T-cell functions. *Cancer Res* 2002; 62: 2052-2057



Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G. Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7260-7269

Berg M, Wingender G, Djandji D, Hegenbarth S, Momburg F, Hämmerling G, Limmer A, Knolle P. Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2960-2970

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1999; 275: 1320-1323

Bergstrand CG, Czar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J clin Lab Invest* 1956; 8: 174

Bergstrand CG, Czar B. Paper electrophoretic study of human fetal serum proteins with demonstration of a new protein fraction. *Scand J clin Lab Invest* 1957; 9: 277

Berinstein NL. Enhancing cancer vaccines with immunomodulators. *Vaccine* 2007; 25: B72-B88

Bett AJ, Prevec L, Graham FL. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 1993; 67: 5911-5921

Bianchi R, Grohmann U, Vacca C, Belladonna ML, Fioretti MC, Puccetti P. Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation. *J Immunol* 1999; 163: 2517-2521

Biermann V, Volpers C, Hussmann S, Stock A, Kewes H, Schiedner G, Herrmann A, Kochanek S. Targeting of high-capacity adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1757-1769

Braconi C, Patel T. MicroRNA expression profiling: a molecular tool for defining the phenotype of hepatocellular tumors. *Hepatology* 2008; 47: 1807-1809

Bravi F, Bosetti C, Tavani A. Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatology* 2007; 46: 430-435

Breous E, Thimme R. Potential of immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011; 54: 830-834

Bruix J, Llovet JM, Castells A, Montana X, Bru C, Ayuso MC. Transarterial embolization versus symptomatic treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized, controlled trial in a single institution. *Hepatology* 1998; 27: 1578-1583

Bruix J, Sherman M. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236

Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-1022

Burnet FM. Cancer - a biological approach. *Br Med J* 1957; 1: 841-847

Butterfield LH, Koh A, Meng W, Vollmer CM, Ribas A, Dissette V. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res* 1999; 59: 3134-3142

Butterfield LH, Meng WS, Koh A, Vollmer CM, Ribas A, Dissette VB. T cell responses to HLA-A\*0201-restricted peptides derived from human alpha-fetoprotein. *J Immunol* 2001; 166: 5300-5308

Butterfield LH, Ribas A, Meng WS, Dissette VB, Amarnani S, Vu HT, Seja E, Todd K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T-cell responses to HLA-A\*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5902-5908

Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Lee Y, Yang JQ, De la Rocha P, Duran SD, Hernandez J, Seja E, Potter DM, McBride WH, Finn R, Glaspy JA, Economou JS. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2817-2825

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625-1638

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994; 180: 1263-1272

Chehimi J, Trinchieri G. Interleukin-12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1994; 14: 149-161

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-752

Chang MH. Hepatitis B vaccination: disease and cancer prevention - a Taiwanese experience. *Clin Liver Dis* 2010; 14: 521-530

Chang YS, Adnane J, Trail PA. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 561-574

Charlton M. Cirrhosis and liver failure in nonalcoholic fatty liver disease: molehill or mountain. *Hepatology* 2008; 47: 1431-1433

Chen CH, GT Huang, PM Yang, PJ Chen, MY Lai, DS Chen, JD Wang. Hepatitis B- and C-related hepatocellular carcinomas yield different clinical features and prognosis. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2524-2529

Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34

Chroboczek J, Ruigrok RW, Cusack S. Adenovirus fiber. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 199: 163-200

Clark EA, Lane PJ. Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 97-127

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15191-15196

Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA, Ruddle FH. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 809-819

Darlington GJ. Liver cell lines. *Methods Enzymol* 1987; 151: 19-38

Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut* 2005; 54: 533-539

Davison E, Kirby I, Whitehouse J, Hart I, Marshall JF, Santis G. Adenovirus type 5 uptake by lung adenocarcinoma cells in culture correlates with Ad5 fibre binding is mediated by alpha(v)beta1 integrin and can be modulated by changes in beta1 integrin function. *J Gene Med* 2001; 3: 550-559

Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol* 2006; 87: 1703-1713

Deutsch HF. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res* 1991; 56: 253-312

- Doerfler W. Adenoviruses. In: Baron S, HRSG. Medical Microbiology, 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch, 1996: Chapter 67
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-998
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-148
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 836-848
- Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today* 1994; 15: 406-411
- Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5: 273-290
- EI-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 369-380
- EI-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
- EI-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012; 142: 1264-1273
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, Van Der Eb AJ. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 215-222
- Farazi PA, De Pinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to Environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 674-687
- Fartoux L, Decaens T. Contribution of biomarkers and imaging in the management of hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35: S21-S30
- Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2007; 252: 157-170
- Feo F, Frau M, Tomasi ML, Brozzetti S, Pascale RM. Genetic and epigenetic control of molecular alterations in hepatocellular carcinoma. *Exp Biol Med* 2009; 234: 726-736
- Ferlay J, HR Shin, F Bray, D Forman, C Mathers, DM Parkin. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917

Flecken T, Schmidt N, Spangenberg HC, Thimme R. Hepatocellular carcinoma - from immunobiology to immunotherapy. *Z Gastroenterol* 2012; 50: 47-56

Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-2339

Fulda S, Debatin KM. IFN $\gamma$  sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2295-2308

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003; 9: 1408-1412

Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, Harlin H. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev* 2006; 213: 131-145

Gao Q, Qiu SJ, Fan J. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2586-2593

Germani G, Pleguezuelo M, Gurusamy K, Meyer T, Isgro G, Burroughs AK. Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Hepatol* 2010; 52: 380-388

Gillespie PG, Hudspeth AJ. Chemiluminescence detection of proteins from single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2563-2567

Gitlin D, Boesman M. Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma-G-globulin in the human conceptus. *J Clin Invest* 1966; 45: 1826-1838

Gitlin D, Boesman M. Sites of serum alpha-fetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J Clin Invest* 1967; 46: 1010-1016

Gonzalez-Carmona MA, Marten A, Hoffmann P, Schneider C, Sievers E, Schmidt-Wolf IG. Patient-derived dendritic cells transduced with an  $\alpha$ -fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells. *Liver Int* 2006; 26: 369-379

Gonzalez-Carmona MA, Lukacs-Kornek V, Timmerman A, Shabani S, Kornek M, Vogt A, Yildiz Y, Sievers E, Schmidt-Wolf IG, Caselmann WH, Sauerbruch T, Schmitz V. CD40ligand-expressing dendritic cells induce regression of hepatocellular carcinoma by activating innate and acquired immunity in vivo. *Hepatology* 2008; 48: 157-168

Gonzalez-Carmona MA, Schneider C, Vogt A, Ayub TH, Decker G, von Lilienfeld-Toal M, Prieto J, Conchon S, Sauerbruch S, Caselmann WH. CD40L co-stimulation improves immunotherapy with  $\alpha$ -Fetoprotein pulsed dendritic cells towards hepatocellular carcinoma in a prophylactic and a therapeutic setting. 2014; *in preparation*

Gordon J. CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation. *Blood Rev* 1995; 9: 53-56

Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. In: Murray EJ, HRSG. *Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols*. Totowa, NJ - USA: Humana Press, 1991: 109-128

Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 1993; 75: 477-486

Grimm CF, Ortmann D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 1104-1112

Grisham JW. Molecular genetic alterations in primary hepatocellular neoplasms: hepatocellular adenoma, hepatocellular carcinoma, and hepatoblastoma. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, HRSG. *The Molecular Basis of Human Cancer*. Totowa, NJ - USA: Humana Press, 2001: 269-346

Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, Sauerbruch T, Caselmann WH. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* 2002a; 9: 346-355

Hanke P, Rabe C, Serwe M, Bohm S, Pagenstecher C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Cirrhotic patients with or without hepatocellular carcinoma harbour AFP-specific T-lymphocytes that can be activated in vitro by human alpha-fetoprotein. *Scand J Gastroenterol* 2002b; 37: 949-955

Harui A, Suzuki S, Kochanek S, Mitani K. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol* 1999; 73: 6141-6146

Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213

Hassan MM, Spitz MR, Thomas MB. The association of family history of liver cancer with hepatocellular carcinoma: a case-control study in the United States. *J Hepatol* 2009; 50: 334-341

Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu G, Jessee J, Felgner PL. Transfection with lipofectamine. *Focus* 1993; 15: 73-79

He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 2011; 21: 159-168

He C, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2509-2514

Horwitz AS. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, HRSG. *Fields Virology*, 4th Edition. Philadelphia - USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 2301-2326

Ibrahim SM, Lewandowski RJ, Sato KT, Gates VL, Kulik L, Mulcahy MF, Ryu RK, Omary RA, Salem R. Radioembolization for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: a clinical review. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1664-1669

Imperiale MJ, Kochanek S. Adenovirus vectors: biology, design, and production. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 273: 335-357

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176: 1693-1702

Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993; 178: 479-488

Ito Y, Takeda T, Sakon M. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 84: 1377-1383

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995

Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y, Rosenfeld MA, Gant TW, Thorgeirsson SS, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* 1992; 1: 372-378

Jiang R, Tan Z, Deng L. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* 2011; 54: 900-909

Johnson PJ, Protmann B, Williams R. Alpha-fetoprotein concentrations measured by radioimmunoassay in diagnosing and excluding hepatocellular carcinoma. *BMJ* 1978; 2: 661-663

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001; 7: 33-40

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121: 1-14

Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, Nakajima A, Hirohashi S. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 902-911

Kojoaghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 2003; 13: 155-171

Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476

Komita H, Homma S, Saotome H, Zeniya M, Ohno T, Toda G. Interferon-gamma produced by interleukin-12-activated tumor infiltrating CD8+T cells directly induces apoptosis of mouse hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 662-672

Kovesdi I, Hedley SJ. Adenoviral producer cells. *Viruses* 2010; 2: 1681-1703

Kuang DM, Peng C, Zhao Q. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells. *Hepatology* 2010; 51: 154-164

Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Atassi B, Ryu RK. Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2008; 47: 71-81

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol* 1998; 160: 3861-3868

Larsson SC, Wolk A. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2007; 132: 1740-1745

Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 4801-4811

Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001; 106: 263-266

Lau WY. Primary liver tumors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 135-144

Lee WC, Wang HC, Hung CF, Huang PF, Lia CR, Chen MF. Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J Immunother* 2005; 28: 496-504

Lerose R, Molinari R, Rocchi E, Manenti F, Villa E. Prognostic features and survival of hepatocellular carcinoma in Italy: impact of stage of disease. *Eur J Cancer* 2001; 37: 239-245



- Lin DY, Liaw YF, Lee TY, Lai CM. Hepatic arterial embolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma - a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 1988; 94: 453-456
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000; 6: 1348-1354
- Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathways, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66: 11851-11858
- Liu Y, Xia D, Li F, Zheng C, Xiang J. Intratumoral administration of immature dendritic cells following the adenovirus vector encoding CD40 ligand elicits significant regression of established myeloma. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 122-132
- Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification: *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-338
- Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003; 37: 429-442
- Llovet JM, Chen Y, Wurbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, Thung SN. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1758-1767
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390
- de Lope CR, Tremosini S, Forner A, Reig M, Bruix J. Management of HCC. *J Hepatol* 2012; 56: S75-S87
- Loskog A, Tötterman TH. CD40L - a multipotent molecule for tumor therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007; 7: 23-28
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
- Mackey MF, Gunn JR, Maliszewsky C, Kikutani H, Noelle RJ, Barth RJ Jr. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 1998; 161: 2094-2098
- Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1061-1067

McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB. Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen positive Alaska native carriers. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1051-1054

Meguro M, Mizuguchi T, Kawamoto M, Hirata K. The molecular pathogenesis and clinical implications of hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol*. 2011; 2011: 818672

Meier O, Greber UF. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 2004; 6: S152-S163

Miller G, Lahrs S, Shah AB, DeMatteo RP. Optimization of dendritic cell maturation and gene transfer by recombinant adenovirus. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 347-358

De Mitri MS, Poussin K, Baccarini P. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995; 345: 413-415

Morsy MA, Gu MC, Motzel S, Zhao J, Su Q, Allen H, Franlin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7866-7871

Morsy MA, Caskey CT. Expanded-capacity adenoviral vectors - the helper dependent vectors. *Mol Med Today* 1999; 5: 18-24

Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007; 13: 828-835

Nakagawa H, Maeda S, Yoshida H. Serum IL-6 levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients: an analysis based on gender differences. *Int J Cancer* 2009; 125: 2264-2269

Nemerow GR, Stewart PL. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 725-734

Neumann R, Chroboczek J, Jacrot B. Determination of the nucleotide sequence for the penton-base gene of human adenovirus type 5. *Gene* 1988; 69: 153-157

Neville AM, Mackay AM, Westwood J, Turberville C, Laurence DJ. Human tumour-associated and tumour-specific antigens: some concepts in relation to clinical oncology. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* 1975; 6: 102-112

Nunes FA, Furth EE, Wilson JM, Raper SE. Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2515-2526

O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinmann RM. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82: 487-493

Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003; 101: 4878-4886

Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; 32: 225-237

Orlando A, Leandro G, Olivo M, Andriulli A, Cottone M. Radiofrequency thermal ablation vs. percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 514-524

Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, Torr EE, Ahmed F, Steele JC. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 124-132

Pammer J, Plettenberg A, Weninger W, Diller B, Mildner M, Uthman A, Issing W, Stürzl M, Tschachler E. CD40 antigen is expressed by endothelial cells and tumor cells in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 1996; 148: 1387-1396

Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 331-360

Pawlik TM, Reyes DK, Cosgrove D, Kamel IR, Bhagat N, Geschwind JF. Phase II trial of sorafenib combined with concurrent transarterial chemoembolization with drug-eluting beads for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3960-3967

Pommepuy I, Terro F, Petit B, Trimoreau F, Bellet V, Robert S, Hugon J, Labrousse F, Yardin C. Brefeldin A induces apoptosis and cell cycle blockade in glioblastoma cell lines. *Oncology* 2003; 64: 459-467

Posner MR, Cavacini LA, Upton MP, Tillman KC, Gornstein ER, Norris CM Jr. Surface membrane-expressed CD40 is present on tumor cells from squamous cell cancer of the head and neck in vitro and in vivo and regulates cell growth in tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2261-2270

Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev* 2011; 241: 104-118

Rabe C, Caselmann WH. Interaction of Hepatitis B virus with cellular processes in liver carcinogenesis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000; 37: 407-429

Ray RB, Steele R, Meyer K. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997; 272: 10983-10986

Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993; 178: 509-519

Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93

Roth W. Apoptosis resistance in malignant tumors: novel apoptosis-based therapeutic approaches. *Pathologie* 2009; 30: 113-116

Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84: 570-573

Roy-Chowdhury J, Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther* 2002; 5: 340-344

Rutolahti E, Salaspuro M, Pihko H, Andersson L, Seppala M. Serum alpha-fetoprotein: Diagnostic Significance in Liver Disease. *BMJ* 1974; 2: 527-529

Salem R, Lewandowski RJ, Mulcahy MF, Riaz A, Ryu RK, Ibrahim S. Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium- 90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology* 2010; 138: 52-64

Sallusto F, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389-400

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989

Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* 2007; 56: 183-191

Saunders D, Seidel D, Allison M, Lyratzopoulos G. Systematic review: the association between obesity and hepatocellular carcinoma - epidemiological evidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 1051-1063

Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beudet AL, Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998; 18: 180-183

Schildberg FA, Hegenbarth SI, Schumak B, Scholz K, Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Immunol* 2008; 38: 957-967

Schmidt T, Ziske C, Märten A, Endres S, Tiemann K, Schmitz V, Gorschlüter M, Schneider C, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Intratumoral Immunization with Tumor RNA-Pulsed Dendritic Cells Confers Antitumor Immunity in a C57BL/6 Pancreatic Murine Tumor Model. *Cancer Res* 2003; 63: 8962-8967

Schmitz V, Barajas M, Wang L, Peng D, Duarte M, Prieto J, Qian C. Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001; 34: 72-81

Schneider C, Gonzales-Carmona MA, von Lilienfeld-Toal M, Sievers E, Schmidt-Wolf IG, Schmitz V, Sauerbruch T, Caselmann WH. Dendritic cells co-transduced with an interleukin (IL)-12-expressing adenovirus and an AFP-expressing adenovirus enhance the cytotoxic activity of immunologic effector cells against AFP-expressing HCC-cells. *J Hepatol* 2005; 42: 141

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393: 480-483

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331: 1565-1570

Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009; 27: 80-92

Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR. Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression. *Pathol Res Pract* 2010; 206: 1-8

Shenk TE. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, HRSG. *Fields Virology*, 4th Edition. Philadelphia - USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 2265-2300

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 151-161

Serba S, Schmidt J, Wentzensen N, Ryschich E, Marten A. Transfection with CD40L induces tumour suppression by dendritic cell activation in an orthotopic mouse model of pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 2008; 57: 344-351

Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi RZ, Liu ZW, Zhang JY. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2010; 128: 887-896

Shimajima M, Komine F, Hisatomi H. Detection of telomerase activity, telomerase RNA component, and telomerase reverse transcriptase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2004; 29: 31-38

Shurin MR, Yurkovetsky ZR, Tourkova IL, Balkir L, Shurin GV. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int J Cancer* 2002; 101: 61-68

Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3089-3094

Smith AE. Viral vectors in gene therapy. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 807-838

Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 343: 195-224

Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, Maliszewski CR, Fanslow WC. Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 1992; 176: 1543-1550

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *J Exp Med* 1973; 137: 1142-1162

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-296

Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-1 and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 1997; 158: 4229-4236

Takayasu K, Arii S, Ikai I, Kudo M, Matsuyama Y, Kojiro M. Overall survival after transarterial lipiodol infusion chemotherapy with or without embolization for unresectable hepatocellular carcinoma: propensity score analysis. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 830-837

Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K. Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2010; 37: 805-814

Tatarinov J. Detection of Embryospecific  $\alpha$ -Globulin in the Blood Sera of Patient with Primary Liver Tumor. *Vopr Med Khim* 1964; 10: 90-91

Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M. Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Hepatol Int* 2008; 2: 17-30

Thimme R, Neagu M, Boettler T. Comprehensive analysis of the alpha-fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1821-1833

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 346-358

Thomas L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive State. In: Lawrence HS, HRSG. New York: Hoeber-Harper, 1959: 529-532

Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346

Tillman BW, de Gruijl TD, Luykx-de Bakker SA, Scheper RJ, Pinedo HM, Curiel TJ, Gerritsen WR, Curiel DT. Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. *J Immunol* 1999; 162: 6378-6383

Tomihara K, Kato K, Masuta Y, Nakamura K, Uchida H. Gene transfer of CD40-ligand to dendritic cells stimulates interferon-gamma production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells. *Gene Ther* 2008; 15: 203-213

Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 1996; 2: 545-550

Wada Y, Nakashima O, Kutami R. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 1998; 27: 407-414

Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Deibl M, Gastl G, Gonsilius E, Marth C. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8326-8331

van Essen D, Kikutani H, Gray D. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* 1995; 378: 620-623

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 235-271

Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 140: 1410-1426

Vollmer CM Jr, Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Koh A. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 3064-3067

Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 2004; 6: S164-S171

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; 73: 309-319

Wong VW, Yu J, Cheng AS. High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *Int J Cancer* 2009; 124: 2766-2770

Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 1996; 219: 220-227

Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. Mice deficient for the CD40 ligand, *Immunity* 1994; 1: 423-431

Xu Y, Song G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci* 2004; 11: 426-438

Yang Y, Ertl HCJ, Wilson JM. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1994; 1: 433-442

Yang Y, Jooss KU, Su Q, Ertl HC, Wilson JM. Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther* 1996; 3: 137-144

Yeh SH, Chen PJ. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology* 2010; 1: 172-179

Yuan JM, Ross RK, Stanczyk FZ. A cohort study of serum testosterone and hepatocellular carcinoma in Shanghai, China. *Int J Cancer* 1995; 63: 491-493



## Danksagung

Als Erstes bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch für die Möglichkeit, dass ich unter seiner Leitung in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Bonn meine Doktorarbeit erstellen konnte. Ich danke ihm auch für sein persönliches Engagement zur Vermittlung an meine Betreuerin Frau Dr. med. Maria-Angeles González-Carmona.

Frau Dr. med. González-Carmona danke ich für die Chance zur Durchführung dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe, die hervorragende Betreuung und das sehr sorgfältige Korrekturlesen meiner Promotionsarbeit. Durch ihre unglaublich inspirierende Liebe und Leidenschaft für die Forschung, ihre harte und stets korrekte Arbeit, ihre Gutmütigkeit und Unterstützung in jeder Hinsicht, auch außerhalb meiner experimentellen Arbeit in ihrem Labor, hat sie sich nicht nur im beruflichen Bereich für mich zu einem wichtigen Vorbild entwickelt.

Annabelle Vogt danke ich für die stets geduldige und sehr fürsorgliche Betreuung im Labor und für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Allen anderen Mitarbeitern des Labor 61 danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Abschließend danke ich meinen Eltern für alles, was sie für mich getan haben. Ohne ihre unendliche Liebe, Fürsorge und Geduld wäre all dies nie möglich gewesen.