

**Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort zur Therapie des HCC durch
CD40L- und IL2-exprimierende Dendritische Zellen, *in vivo***

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

Wolfram Demmer
aus Waldbröl

2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tilmann Sauerbruch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Nicolas Wernert

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.05.2012

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	13
1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom	13
1.1.1 Epidemiologie	13
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	14
1.1.3 Diagnose, Therapie und Prognose des HCC.....	18
1.2 Tumorummunologie	22
1.2.1 Malignome und das Immunsystem	22
1.2.2 Toleranzmechanismen von Malignomen	23
1.2.3 Immunologische Sonderstellung der Leber	25
1.3 Immunologische Therapieansätze gegen Malignome.....	25
1.3.1 Antikörper basierte Therapieansätze	25
1.3.2 Antitumorale Therapien durch Modulation des Immunsystems mittels Zytokinen	26
1.3.3 T-Zell-basierte Immuntherapien (adoptive Immuntherapie)	27
1.3.4 Aktive Immunisierung	27
1.4 Immunologische Therapieansätze basierend auf dendritischen Zellen	27
1.4.1 Dendritische Zellen.....	27
1.4.2 Therapieansätze mit TAA-beladenen DC gegen Malignome.....	30
1.4.3 Optimierung DC-basierter immunologischer Therapieansätze	32
1.4.3.1 CD40 Ligand.....	33
1.4.3.2 Interleukin-2.....	34
1.4.3.3 CD40L und IL-2	35
1.5 Adenovirale Vektoren	36
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	37
2. Material und Methoden	38
2.1 Material.....	38

2.1.1	Tierstamm (C3H/HeNcr1)	38
2.1.2	Eukaryontische Zelllinien	38
2.1.2.1	911-Zellen.....	38
2.1.2.2	Hepa129-Zellen	39
2.1.3	Adenovirale Vektoren	39
2.1.3.1	AdIL-2.....	39
2.1.3.2	AdCD40L.....	40
2.1.3.3	AdLacZ	40
2.1.4	Proteine	40
2.1.4.1	Zytokine	40
2.1.4.2	Antikörper	40
2.1.4.2.1	Antikörper für die MACS-Separation.....	40
2.1.4.2.2	Antikörper für die Lymphozytenkultur	41
2.1.4.2.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	41
2.1.5	Medien, Lösungen und Puffer.....	41
2.1.5.1	Zellbiologie	41
2.1.5.2	Molekularbiologie und Zellkultur	42
2.1.6	Tiermodell.....	46
2.1.7	Geräte.....	46
2.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	48
2.2	Methoden.....	49
2.2.1	Zellbiologische Methoden	49
2.2.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	49
2.2.1.2	Kultivierung und Passagieren von 911-Zellen	49
2.2.1.3	Kultivierung und Passagieren von Hepa129-Zellen.....	49
2.2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
2.2.1.5	Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer .	50
2.2.2	Propagation, Aufreinigung und Titerbestimmung adenoviraler Vektoren.	50
2.2.2.1	Amplifikation von AdV mittels 911-Zellen.....	51

2.2.2.2	Aufreinigung adenoviraler Vektoren mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	52
2.2.2.2.1	Zentrifugation über einen diskontinuierlichem CsCl-Gradient.....	52
2.2.2.2.2	Zentrifugation über kontinuierlichem CsCl-Gradient	52
2.2.2.2.3	Dialyse.....	53
2.2.2.3	Bestimmung der opu einer Virussuspension	53
2.2.2.4	Bestimmung des Virustiters mittels <i>Plaque-Assay</i>	54
2.2.3	Murine dendritische Zellen.....	55
2.2.3.1	Isolieren muriner dendritischer Zellen.....	55
2.2.3.1.1	Gewinnung von Knochenmark nach Inaba <i>et al.</i>	55
2.2.3.1.2	Zellseparation mittels MACS (<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>)	55
2.2.3.1.3	Kultivierung von DC	56
2.2.3.2	Pulsen von DC mit TAA.....	57
2.2.3.3	Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren	57
2.2.3.4	Kokultur von DC mit Milzlymphozyten	57
2.2.3.4.1	Gewinnung von Milzlymphozyten	57
2.2.3.4.2	Kokultur von Lymphozyten mit transduzierten DC.....	58
2.2.3.5	⁵¹ Chrom-Freisetzung Zytotoxassay	58
2.2.3.6	Durchflusszytometrie	59
2.2.3.6.1	Antikörperfärbung der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	59
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	60
2.2.4.1	Herstellung und Proteinbestimmung des Tumorlysats.....	60
2.2.4.2	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	61
2.2.5	Tierexperimente.....	62
2.2.5.1	Intratumorale Behandlung mit DC	62
2.2.6	Statistik	63
3.	Ergebnisse.....	64
3.1	Vektoramplifikation von AdIL-2	64
3.1.1	Titerbestimmung einer Viruslösung	66
3.1.1.1	OD-Bestimmung	66

3.1.1.2	<i>Plaque-Assay</i>	66
3.2	Herstellung und Antigenbeladung muriner DC	68
3.2.1	DC Generierung.....	68
3.2.2	Beladen der DC mit Tumorantigenen	69
3.3	Transduktion von DC und Charakterisierung transduzierter DC.....	70
3.3.1	Vitalitätskontrolle der transduzierten DC.....	70
3.3.2	Ausreifungskontrolle mittels Durchflusszytometrie.....	72
3.3.3	Expression kostimulatorischer Moleküle nach Transduktion der DC mit AdIL-2 bzw. AdCD40L	75
3.3.3.1	Kostimulatorische Moleküle auf IL-2-DC.....	75
3.3.3.2	Kostimulatorische Moleküle auf CD40L-DC.....	78
3.3.4	Transgenexpression von CD40L auf DC nach adenoviraler Transduktion mit AdCD40L	78
3.3.5	Transgenexpression von IL-2 im Überstand von DC nach Transduktion mit AdIL-2	80
3.4	Induktion tumorspezifischer zytotoxischer Effektorzellen gegen Hepa129-Zellen <i>in vitro</i>	81
3.4.1	Generierung von Milzlymphozyten und Kokultur mit DC.....	82
3.4.2	⁵¹ Chromium-Freisetzungs Zytotoxassay	82
3.5	<i>In vivo</i> Experimente	84
3.5.1	Subkutanes Tumormodell.....	84
3.5.2	Einfluss von IL-2- und CD40L-exprimierender DC auf das Wachstum von s. c. Tumoren.....	86
3.5.3	Einfluss der kombinierten Gabe von IL-2-DC und CD40L-DC auf das Wachstum von s. c. HCC.....	89
3.5.4	Einfluss einer sequenziellen Gabe von CD40L-DC und IL-2-DC auf das Tumorwachstum von s. c. HCC <i>in vivo</i>	91
3.5.5	Charakterisierung der Immunantwort.....	92
4.	Diskussion	95
4.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen.....	97

4.1.1	Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren kodierend für CD40L und IL-2 (AdCD40L und AdIL-2)	97
4.1.2	Zytotoxizitätsassay zur Funktionalitätsüberprüfung der DC <i>in vitro</i>	98
4.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen der antitumoralen Wirksamkeit von IL-2- und CD40L-DC	99
4.2.1	Monotherapie mit IL-2- bzw. CD40L-DC	100
4.2.2	Kombinierte Verabreichung von IL-2- und CD40L-DC	100
4.3	Resümee und Ausblick	104
5.	Zusammenfassung	105
6.	Literaturverzeichnis	107
	Danksagung.....	136
	Lebenslauf	137

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
⁵¹ Cr	Chrom-51-Isotop
A. bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AdV	Adenoviraler Vektor
AFB1	Aflatoxin B1
AFP	Alpha-Fetoprotein
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BCLC	<i>Barcelona-Clinic-Liver-Cancer</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Coxsackie-Adenoviraler-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
CD40L	<i>Cluster of differentiation 40 Ligand (=CD154)</i>
cDNS	Komplimentäre Desoxyribonukleinsäure
CEUS	<i>Contrast-enhanced ultrasound</i>

CIK	Zytokin-induzierte Killerzellen
CsCl	Cäsiumchlorid
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DC	Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsDNS	Doppelstrang-DNS
E:T	<i>Effector-Target-Verhältnis</i>
EASL	<i>European Association for the Study of Liver Diseases</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOXP3	Forkhead box P3
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis B Virus X Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	Humane embryonale Retinoblasten

HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HIV	<i>Humane Immundefizienz-Virus</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HS	Pferdeserum
HTLV-Tax	Tax Gen des humanen T-Zell-lymphotropen Virus Typ I
i. t.	Intratumoral
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
ICER	Inducible cAMP Early Repressor
IE/ml	International Einheiten pro ml
IL-2	Interleukin-2
INF	Interferon
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LacZ	β -Galactosidase aus <i>Escherichia coli</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Sinusoidale Endothelzellen der Leber
LY6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
m/v	Dichte (Masse pro Volumen)
MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mIL	Murines Interleukin
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Proben Umfang

NAFL	Nichtalkoholbedingten Fettleber
NASH	Nichtalkoholischen Steatohepatitis
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
OD	Optische Dichte
opu	<i>Optical particle units</i>
p	Signifikanz
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGFR- β	<i>Platelet-derived growth factor receptor β</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pfu	<i>Plaque forming unit</i>
PGE2	Prostaglandin-E ₂
PIAF-Protokoll	Systemische Chemotherapie mit Cisplatin, Interferon, Doxorubicin, 5-Fluorouracil
RFA	Radiofrequenzablation
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s. c.	Subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
T _H 1	T-Helferzellreaktion Typ 1

T _H 2	T-Helferzellreaktion Typ 2
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris/Cl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Chlorid
U/min	Umdrehung pro Minute
U/ml	Unit pro Milliliter
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
v/v	(Volumen pro Volumen) Konzentration in Prozent
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> -Rezeptor
VF	Verdünnungsfaktor

1. Einleitung

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom

Primäre Leberzelltumoren werden unterteilt in epitheliale, mesenchymale und gemischte Tumoren. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den epithelialen Tumoren der Leber.

Es kann solitär, diffus infiltrierend oder multizentrisch auftreten und sowohl hämatogen als auch lymphogen metastasieren. Die meisten HCC entstehen auf dem Boden einer Leberzirrhose. Deshalb bestehen klinisch, neben unspezifischen Symptomen wie Gewichtsabnahme, Müdigkeit diffusen Oberbauchschmerzen und Ikterus, oft Zeichen portaler Hypertension wie Aszitesbildung, Caput Medusae und Splenomegalie (Dürr und Caselmann, 2000; Schönfelder und Matern, 1999).

1.1.1 Epidemiologie

Das HCC ist der mit Abstand häufigste primäre Lebertumor. Es ist mit etwa 560.000 Erstdiagnosen pro Jahr der fünft häufigste Tumor weltweit und belegt mit beinahe ebenso vielen jährlichen Todesfällen Platz drei der Tumormortalität (Bosch *et al.*, 2004; Dürr und Caselmann, 2000; Kew *et al.*, 2002; Llovet *et al.*, 2003).

Generell erkranken Männer zwischen 1,5- und 3-mal häufiger an einem HCC als Frauen (Bosch *et al.*, 1999).

Bei großen geographischen Unterschieden in der Inzidenz treten mehr als 80 % der Neuerkrankungen in Südostasien und den Subsaharastaaten auf. China alleine trägt über 50 % zur weltweiten Inzidenz bei (Bosch *et al.*, 1999; El-Serag und Rudolph, 2007), (siehe Abb. 1).

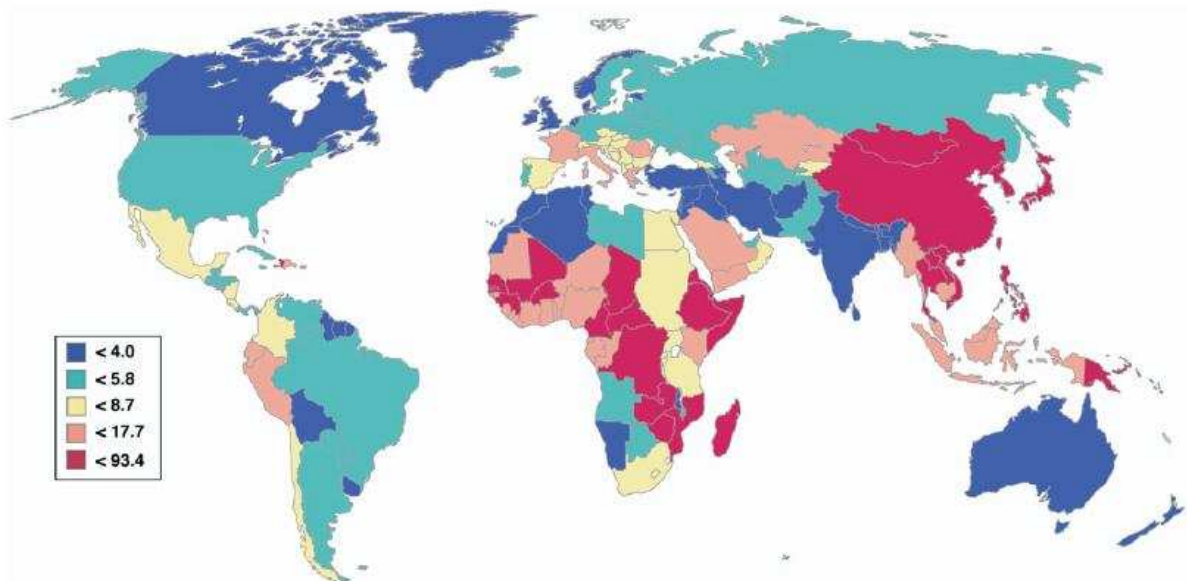


Abb. 1: Regionale Unterschiede der Sterblichkeitsraten bei HCC. Altersbereinigte Anteile pro 100.000 Personen (El-Serag und Rudolph, 2007).

In westlichen Industrieländern ist das HCC eher selten; seine Inzidenz steigt aber seit zwanzig Jahren kontinuierlich an. In den USA hat das HCC heute die am schnellsten wachsende Tumormortalitätsrate (El-Serag und Rudolph, 2007).

Für diesen Anstieg wird vor allem die Zunahme der Prävalenz von Patienten mit chronischen Hepatitis-C-Infektionen angeführt, die zur Zirrhose und später zum Leberzellkarzinom führen können (Schurr, 2006).

In Europa erkranken jährlich ca. 20.000 Männer und ca. 10.000 Frauen am HCC. Das sind 1,9 % der gesamten Tumorneuerkrankungen (Bray, 2003; Kew, 2002). In Deutschland bestätigt sich die weltweit steigende HCC-Prävalenz. Hier liegt die Inzidenz für Männer bei 5,7 und für Frauen bei 2,0 pro 100.000 Einwohner (Schurr, 2006).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Männliches Geschlecht und fortgeschrittenes Alter gelten als generelle Risikofaktoren für das HCC (Fattovich *et al.*, 2004). Es gibt aber auch Risikofaktoren, die mit der geographischen Lage korrelieren. In den Hochrisikogebieten Südostasien und Äquatorialafrika sind chronische HBV-Infektionen und mit Aflatoxinen verunreinigte Lebensmittel die Hauptrisikofaktoren. In Gebieten mit niedrigerer Prävalenz, v.a.

westliche Industriestaaten, sind die zunehmenden chronischen Infektionen mit HCV und/oder HBV sowie Alkoholmissbrauch, orale Kontrazeptiva und Tabakkonsum die Hauptrisikofaktoren für HCC. Weiterhin gehen Krankheitsbilder wie Diabetes mellitus, angeborene oder erworbene Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen mit einem erhöhten Risiko für das HCC einher (Bosch *et al.*, 1999; El-Serag *et al.*, 2004; El-Serag und Rudolph, 2007; Fiel *et al.*, 1996; Okuda, 2000).

Die Pathomechanismen der Entstehung des HCC sind für alle Risikofaktoren nicht ausreichend geklärt. In den westlichen Ländern stellt die Leberzirrhose, insbesondere vom makronodulären Typ, in mehr als 80 % der Fälle die Grundlage dar, auf der sich ein HCC entwickelt. Im Gegensatz dazu gehen in Südostasien und Teilen Afrikas zum Teil weniger als 50 % der HCC eine Zirrhose voraus (Dürr und Caselmann, 2000; Schönfelder und Matern, 1999).

Zurzeit werden verschiedene Wege der Karzinogenese von der Zirrhose zum HCC diskutiert. Durch eine chronische Lebererkrankung wird der Zellumsatz gesteigert. Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere. Kommt es zu einer kritischen Länge, können chromosomale Mutationen in den Hepatozyten die Folge sein (El-Serag und Rudolph, 2007). Darüber hinaus können, von Kupferzellen sezernierte, extrazelluläre Matrixproteine, Zytokine und Wachstumsfaktoren oxydativen Stress verursachen. Dadurch kann das Mikromilieu in der zirrhotischen Leber verändert und die Zellproliferation zusätzlich begünstigt werden. Die Zellmasse der Leber wird ebenfalls durch Wachstumsfaktoren kontrolliert. Ein Untergang von Hepatozyten, z.B. in einer zirrhotischen Leber, kann so zu einem allgemein zellwachstumsfördernden Makromilieu führen (El-Serag und Rudolph, 2007).

Des Weiteren verliert die Leber mit zunehmendem Alter an Regenerationskraft, was das höhere Risiko für HCC bei älteren Menschen mit z.B. chronischer Hepatitis erklären könnte (El-Serag und Rudolph, 2007).

Chronische Hepatitis-B Virusinfektionen sind mit geschätzten 300.000 Erkrankten weltweit die häufigste Ursache für die Entwicklung eines HCC. Das Risiko HBV-Erkrankter ist gegenüber der gesunden Bevölkerung 5- bis 15- fach erhöht. In 70-90 % der HBV-assoziierten HCC-Erkrankungen lag eine Leberzirrhose vor (El-Serag und Rudolph, 2007). Das HBV kann die Entstehung eines HCC über direkte und indirekte Mechanismen induzieren. Einerseits steigert der erhöhte Zellumsatz der Hepatozyten,

aufgrund der chronischen Infektion, indirekt das Risiko maligner Entartung (Block *et al.*, 2003). Andererseits kann beispielsweise das HBx-Antigen direkt onkogen wirken (Ma *et al.*, 2008), möglicherweise indem es einen Komplex mit dem Tumorsuppressorgen p53 bildet und dieses so inaktiviert (Feitelson, 1998).

Die chronische HCV-Infektion fördert die Fibrogenese der Leber bis hin zur Zirrhose (El-Serag und Rudolph, 2007). Zudem werden die Hepatozyten durch die chronische Infektion und die inflammatorische Wirtreaktion geschädigt. Die Lebensdauer der Hepatozyten wird von etwa 100 auf wenige Tage herabgesetzt. Gehäufte genetische Instabilität und Mutationen sind die Folge (Liang und Heller, 2004). Des Weiteren bestehen ebenfalls Hinweise auf eine direkte Wirkung von HCV auf die Tumorentstehung. Neben verschiedenen anderen Antigenen wird diese Wirkung v. a. dem Core-Protein zugeschrieben (Dürr und Caselmann, 2000; Moriya *et al.*, 1998; Levrero, 2006).

Für HBV/HCV-Koinfektionen besteht ein mehr als additiv erhöhtes Risiko für die Entstehung eines HCC (Donato *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2005). Dies beruht wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Mechanismen, durch welche die beiden Erreger das HCC induzieren (Lee *et al.*, 2008).

Alkohol ist in Europa und Nordamerika die häufigste Ursache für die Leberzirrhose, die wiederum die Grundlage für die Entstehung eines HCC darstellt (Dürr und Caselmann, 2000). Die Wahrscheinlichkeit an einem HCC zu erkranken steigt dabei mit der täglich konsumierten Menge an Alkohol. Das Risiko ist ab einer Tagesdosis von >60g für Männer und Frauen gleichermaßen erhöht. Bei moderatem oder geringem Alkoholkonsum ist das HCC-Risiko bislang unbekannt. Des Weiteren besteht ein synergistischer Effekt zwischen starkem Alkoholkonsum und Hepatitis Virusinfektionen. So ist die HCC-Rate bei bestehender HCV-Infektion und Alkoholkonsum von mehr als 60 g/Tag um das Doppelte erhöht (Fattovich *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2002).

Das Aflatoxin AFB₁ ist ein bekanntes Leberkarzinogen, das von Aspergilluspilzen gebildet wird. Diese wachsen auf feucht und warm gelagertem Getreide und anderen Nahrungsmitteln. AFB₁ kann an die DNA binden und Mutationen im p53-Gen induzieren. Diese Mutationen wurden in 30–60 % der HCC in Aflatoxin-endemischen Gebieten gefunden. Die Verbreitung des HCC in einigen Teilen Chinas und Afrikas spiegelt die Lebensmittelkontamination mit Aspergillus wieder. Die Aufnahme von Aflatoxinen erhöht

das HCC Risiko um das 4-fache. Darüber hinaus sind Gebiete mit einer hohen Aspergillusdurchseuchung oftmals auch endemische HBV-Gebiete. Patienten, die positiv auf das HBV-Oberflächenantigen und Aflatoxinmetabolite getestet wurden tragen, ein 60-fach erhöhtes HCC Risiko (Dürr und Caselmann, 2000; El-Serag und Rudolph, 2007; Qian *et al.*, 1994).

Diabetes mellitus und Adipositas werden mit der Entstehung der nichtalkoholbedingten Fettleber (NAFL) und ihrer stärksten Ausprägung der nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) in Verbindung gebracht. NASH kann zu Leberfibrose, -zirrhose und schließlich zur Tumorbildung führen. Für Diabetiker konnte eine Verdoppelung des Risikos für chronische nichtalkoholbedingte Lebererkrankungen sowie für das HCC festgestellt werden (El-Serag *et al.*, 2004, El-Serag und Rudolph, 2007; Hassan *et al.*, 2002). Es ist daher mit einer weiteren Steigerung der Inzidenz des HCC zu rechnen, v.a. wegen des starken Anstiegs von Übergewicht und Diabetes mellitus in Schwellenländern (Trojan *et al.*, 2007).

Im Zellkern von Hepatozyten finden sich Östrogenrezeptoren, deren Zahl im HCC sogar erhöht ist. Dies suggeriert eine hormonelle Ansprechbarkeit des neoplastischen Lebergewebes. Die Ergebnisse verschiedener Studien lassen allerdings keine definitive Aussage zum Risiko einer HCC-Erkrankung durch orale Kontrazeptiva zu (El-Serag und Rudolph, 2007).

Tabakkonsum wird in einigen Studien ebenfalls als Risikofaktor für die Entstehung von Leberzelltumoren angeführt (Marrero *et al.*, 2005). Sein Einfluss ist allerdings nicht eindeutig bewiesen und scheint allenfalls schwach zu sein (Llovet *et al.*, 2003). Außerdem können oft gleichzeitig bestehender Alkoholkonsum und andere Lebererkrankungen etwaige Effekte überlagern (El-Serag und Rudolph, 2007).

Erworbene Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen können ebenfalls Ursachen für das Entstehen eines HCC sein. Hierzu gehören unter anderem die hereditäre Hämochromatose, α 1-Antitrypsin-Mangel, Willson-Krankheit, primäre biliäre Zirrhose, primäre sklerosierende Cholangitis, Autoimmunhepatitis und die sogenannte kryptogene Leberzirrhose. Das HCC-Risiko bei diesen Erkrankungen ist sehr unterschiedlich und zum Teil gering. Seinem Entstehen geht jedoch auch eine Leberzirrhose voraus (Fattovich *et al.*, 2004, DiBisceglie *et al.*, 1998).

1.1.3 Diagnose, Therapie und Prognose des HCC

Die Diagnose eines HCC wird in der Regel zufällig oder im Rahmen von Routinekontrollen bei Patienten mit einer vorbekannten Leberzirrhose oder chronischen Hepatitiden gestellt. Zur Diagnosestellung werden bildgebende Methoden, wie die Kontrastmittel verstärkte Sonographie (CEUS), Computertomographie (CT) oder die Kernspintomographie (MRT) sowie die Biopsie und die Bestimmung des Tumormarkers α -Fetoprotein (AFP) im Serum verwendet. AFP ist ein embryonales Tumorantigen, dessen Bildung nach der Geburt stark herabreguliert wird. Beim HCC ist AFP in 60-80 % der Fälle im Serum erhöht (Butterfield *et al.*, 2003; Hanke *et al.*, 2002). Seine Spezifität für das HCC liegt zwischen 76 % und 96 % (Debruyne und Delanghe, 2008).

Die Diagnose des HCC wird histologisch gestellt, kann jedoch, im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, bei Rundherden von >2 cm auch ohne Histologie zuverlässig gestellt werden. Nach den EASL-Kriterien wird eine Raumforderung von mehr als 2 cm mit einem arteriell hyperperfundierter Muster in zwei unterschiedlichen bildgebenden Verfahren als HCC diagnostiziert. Kann die arterielle Hyperperfusion der Raumforderung nur in einem bildgebenden Verfahren detektiert werden, gilt eine AFP-Konzentration von mehr als 400 ng/l bei zirrhotisch vorgeschädigter Leber als beweisend für ein HCC (Bruix *et al.*, 2001, Caselmann *et al.*, 1999).

Durch eine verbesserte Diagnostik werden heute 30-40 % der HCC im Initialstadium entdeckt, wodurch die Prognose deutlich verbessert wurde. Lag Anfang der 1990er Jahre die 3-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit HCC und einer Leberzirrhose im Stadium A nach Child-Pugh noch bei 65 %, so liegt heute die 5-Jahresüberlebensrate bei 50-70 % (Llovet *et al.*, 2003).

Insgesamt ist die Prognose des HCC trotz der Fortschritte in Diagnose und Therapie in den letzten Jahren immer noch sehr schlecht. Viele HCC entziehen sich aufgrund ihres fortgeschrittenen Stadiums oder ihrer Lage einer kurativen operativen Therapie. Häufig schließt eine schwere Leberzirrhose mit stark eingeschränkter Leberfunktion auch lokoregionale Therapien aus. Eine weitere Verbesserung der Überlebenszeit konnte durch die Einführung der *Targeted*-Therapie mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib erreicht werden. Sein Einsatz ist allerdings palliativ und führt in der Regel nicht zu einer Tumorremission (Llovet *et al.*, 2008).

Mit Hilfe der Barcelona-Clinic-Liver-Cancer- (BCLC-) Klassifikation kann die Prognose eines Patienten mit HCC sehr genau gestellt werden (siehe Abb. 2). Dabei werden das Tumorstadium, die Leberfunktion, der Allgemeinzustand des Patienten sowie der Einfluss der Behandlung auf die verbleibende Lebenszeit berücksichtigt (Bruix *et al.*, 2001; Bruix und Sherman, 2005). Die Verwendung der BCLC-Stadieneinteilung wird von der *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) und der *European Association for the Study of Liver Diseases* (EASL) empfohlen (Trojan *et al.*, 2007).

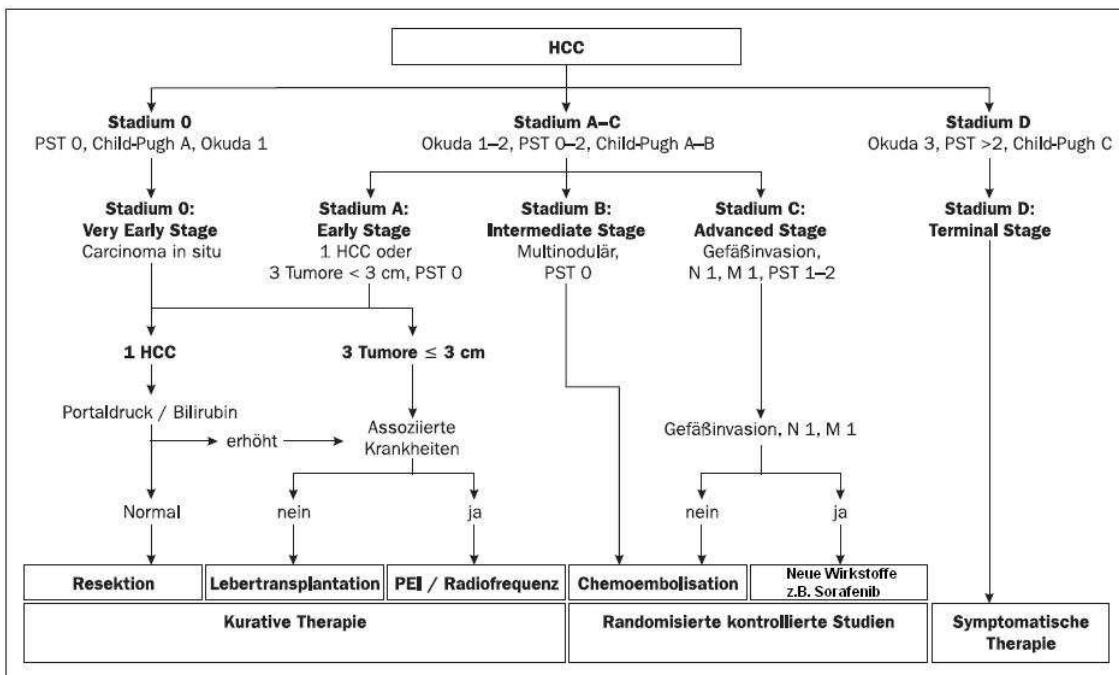


Abb. 2: Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Stadieneinteilung und Therapieempfehlung bei Patienten mit HCC. Modifiziert nach Llovet *et al.*, 1999.

Das therapeutische Vorgehen beim HCC hängt von der Zahl, Größe und Lokalisation der Leberläsionen sowie vom Stadium der zugrunde liegenden Lebererkrankungen und dem Allgemeinzustand des Patienten ab. Mit Hilfe der Milan-Kriterien kann festgestellt werden, ob für den Patient eine kurative Therapie, im Sinne einer Lebertransplantation in Frage kommt.

Liegt keine Leberzirrhose vor, ist die Tumorsektion die Behandlung der Wahl. Indiziert ist sie für Patienten mit Child-Pugh A und solitärem Karzinomherd. Der portale Druck sollte < 10 mmHg betragen und es sollten keine oesophagealen Varizen vorliegen. Bei Patienten mit Leberzirrhose ist besonders darauf zu achten, dass durch die Resektion

kein Leberversagen herbeigeführt wird. Bei guter Auswahl der Patienten erreicht man mit einer Resektion die besten Ergebnisse mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 50-60 % (Bruix und Sherman, 2005).

Die Lebertransplantation war ein großer Durchbruch in der Therapie des HCC. Sie kann theoretisch die Krebserkrankung sowie die zugrunde liegende Zirrhose heilen und gilt als Methode der Wahl für Patienten mit dekompensierter Zirrhose oder multizentrischen Tumoren. Die anfänglich enttäuschenden Überlebensraten von weniger als 40 % konnten nach der Einführung der Milan Kriterien deutlich verbessert werden. Danach werden nur Patienten mit einzelnen Tumoren bis maximal 5 cm Durchmesser bzw. mit maximal 3 Knoten mit je maximal 3 cm Durchmesser sowie fehlender Pfortaderinfiltration und extrahepatischen Manifestationen transplantiert. Heute liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei 70 % mit einer Rezidivrate von 15 %. Ein einschränkender Faktor ist die Knappheit an Spenderorganen, die zu einer langen Wartezeit mit einer Ausscheiderate von 20-50 % führt.

Als perkutane, ablativ Methoden kommen vor allem die perkutane Alkoholinjektion (PEI) und die Radiofrequenzablation (RFA) in Frage. Sie werden vor allem bei frühen nichtresektablen Tumoren eingesetzt.

Bei der PEI wird in mehreren Sitzungen 95 %iges Ethanol in den Tumor injiziert. Tumoren unter 2 cm Durchmesser sprechen in 90-100 % auf diese Therapie an. Mit wachsendem Durchmesser sinkt allerdings die Wirkung.

Die RFA kann in weniger Sitzungen als die PEI durchgeführt werden, hat jedoch eine höhere Komplikationsrate. Der therapeutische Erfolg ist bei kleineren Tumoren mindestens gleichwertig. Bei Tumoren mit einem Durchmesser von >3,5 cm zeigten sich in einigen Studien eher bessere Resultate durch RFA (Seror *et al.*, 2006).

Beide Methoden haben eine 5-Jahresüberlebensrate von etwa 50 %, sind relativ einfach durchzuführen und kostengünstig.

Ist das HCC weit fortgeschritten, stehen oft nur noch palliative Maßnahmen zur Verfügung. Durchgesetzt hat sich hier die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Nach angiographischer Darstellung der tumorversorgenden Gefäße erfolgt die Embolisation mit Lipiodol, einem Chemotherapeutikum (Anthracyclin, Mitomycin C oder Cisplatin) und Mikrosphären. Auch hier muss das Risiko einer hepatischen

Dekompensation berücksichtigt werden. Die 5-Jahresüberlebensrate der so behandelten Patienten liegt bei bis zu 26 % (Llovet *et al.*, 2003; Trojan *et al.*, 2007; Takayasu *et al.*, 2006). Die TACE kann ebenfalls zur präoperativen Tumorverkleinerung (*Downstaging*) oder als Überbrückungstherapie während der Wartezeit auf eine Lebertransplantation angewendet werden (Marin *et al.*, 2009).

Systemische Therapieansätze mit zytotoxischen, hormonellen oder immunmodulatorischen Substanzen haben bislang keine Verbesserung der Gesamtüberlebensrate gezeigt (Llovet *et al.*, 2003). Chemotherapien wie zum Beispiel das PIAF-Protokoll (Cisplatin, Interferon- α 2b, Doxorubicin und 5-Fluorouracil) zeigten lediglich geringe Ansprechraten bei einer deutlich höheren Toxizität (Trojan *et al.*, 2007). Auch der Östrogenblocker Tamoxifen, der wegen der Östrogenrezeptoren in fortgeschrittenen HCC als Therapie versucht wurde, zeigte keine antitumorale Wirkung (Llovet *et al.*, 2003, Rabe *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie, die darauf abzielt die Zellteilung der Tumorzellen und damit das Tumorstadium zu verhindern, wendet sich die sogen. *Targeted*-Therapie gegen spezifische Moleküle innerhalb von Signalkaskaden in der Tumorzelle. Durch Störung der Signalwege sollen die Tumorzellproliferation, das Tumorstadium oder die Tumorstadiumgenese spezifisch verhindert werden. Sorafenib ist das erste zugelassene Medikament einer neuen Generation sogen. „*small-molecules*“ zur *Targeted*-Therapie des HCC, die sich für das fortgeschrittene HCC als Therapie der Wahl etabliert (siehe Abb. 2).

Sorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor, der sowohl die Tumorzellproliferation als auch die Tumorstadiumgenese hemmt. Hierzu werden verschiedene Kinasen wie die Raf1, Raf2 und den RAF/MEK/ERK-Signalweg, aber auch den „*vascular-endothelial-growth-factor*“-Rezeptor (VEGFR)-1,-2,-3 und den „*plattlet-derived-growth-factor*“-Rezeptor- β (PDGFR- β) gleichzeitig angegriffen. Obwohl sich nur bei wenigen Patienten eine objektive Tumorstadiumregression nachweisen ließ, hatten die mit Sorafenib behandelten Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil von über 3 Monaten (10,7 gegenüber 7,9 Monate) gegenüber der Kontrollgruppe (Llovet *et al.*, 2008).

Weitere Wirkstoffe, die das HCC auf molekularer Ebene therapieren sollen, werden derzeit in Phase-II- und Phase-III-Studien getestet. Hierzu zählen weitere Tyrosinkinase-

Inhibitoren, wie Erlotinib, Gefitinib oder Sunitinib sowie Angiogenesehemmer, wie der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Llovet *et al.*, 2008).

Zudem sollen zukünftige Studien den positiven Effekt dieser neuen Medikamente in Kombination mit interventionellen Verfahren zeigen.

Der effektivste Ansatz zu Verringerung der HCC Prävalenz weltweit kann allerdings nicht mit therapeutischen Mitteln, sondern durch präventive Maßnahmen erreicht werden. Da etwa 53 % der HCC-Fälle weltweit auf eine HBV Infektion zurückgeführt werden können (Lupberger und Hildt, 2007), könnte eine frühzeitige Impfung gegen HBV die Inzidenz des HCC deutlich senken. So wurde in Taiwan 1984 ein HBV-Impfprogramm eingeführt, das einen deutlichen Rückgang der landesweiten HCC Neuerkrankungen zur Folge hatte (Chang *et al.*, 1997; Lok, 2004).

1.2 Tumorimmunologie

1.2.1 Malignome und das Immunsystem

Bereits 1909 vermutete Paul Ehrlich, dass das Immunsystem das Wachstum von Tumoren unterdrücken könnte, welche sonst häufiger auftreten müssten. Burnet stellte 1957 die These auf, dass Tumorzellen aufgrund von Mutationen neue Antigeneigenschaften erlangen, wodurch eine immunologische Reaktion hervorgerufen werden kann, die die entstehenden Tumorzellen eliminieren sollte. Neuere Thesen gehen allerdings von einer evolutionären Anpassung der Tumorzellen an das Immunsystem aus, dem sogen. „*Immunoediting*“. Diese läuft in drei Schritten ab. Zuerst kommt es zu einer Elimination der Tumorzellen, die für das Immunsystem erkennbar sind. In einem zweiten Schritt, der Latenzphase, bilden sich nach inkompletter Tumorerstörung Tumorzellen heraus, die durch Mutationen resistent gegenüber dem Immunsystem geworden sind. Zuletzt können die Tumorzellen, in der sogen. *Escape-Phase*, vom Immunsystem ungehindert proliferieren (Dunn *et al.*, 2004).

Die Bedeutung des Immunsystems bei der Tumorabwehr wird bei Betrachtung der Tumorraten in immundefizienten Menschen deutlich. Bis vor wenigen Jahren überlebten Menschen mit angeborener oder erworbener Immundefizienz nicht lange genug um Tumoren zu entwickeln. Heutzutage ist aber vor allem bei immunsupprimierten Transplantations- und HIV-Patienten ein stärkerer Anstieg von Tumorerkrankungen nach Ausschaltung des Immunsystems festzustellen. Viele der Tumoren stehen dabei in

Beziehung zu viralen Infektionen, aber auch die Zahl nicht-viraler Neoplasien ist erhöht. In der westlichen Welt sind etwa 90 % der Erwachsenen mit dem Epstein-Barr Virus infiziert, die durch ihn induzierten Malignome sind jedoch relativ selten. Dagegen haben HIV-Patienten ein 28- bis 49-mal höheres Risiko an Lymphomen zu erkranken, deren Entstehung mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) in Verbindung gebracht wird (Weinberg, 2007). Ein weiteres Beispiel sind Nierentransplantierte, bei denen durch anschließende Immunsuppression das Risiko für Colon-, Larynx-, Lungen- und Blasenkarzinome um das 2-5 fache erhöht ist. Das Risiko für die Entwicklung von Lippen- und nicht-melanomartigem Hautkrebs, Nierenzellkarzinomen und Non-Hodgkin Lymphomen sowie Vaginal- und Zervixkarzinomen ist bei dieser Patienten sogar um das 10-30 fache erhöht (Birkeland *et al.*, 1995; Buell *et al.*, 2005).

Ein Zeichen für eine tumorspezifische Immunreaktion sind die zahlreichen tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), die sich in vielen resezierten Karzinomen finden. Es sind vor allem CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, deren Vorhandensein in der Regel mit einer besseren Prognose für den Patienten verbunden ist (Clark *et al.*, 1989; Clemente *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003). Hingegen wirkt sich eine erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) im Tumorgewebe prognostisch negativ aus (Gao *et al.*, 2007). Beispielsweise konnte für das HCC gezeigt werden, dass eine hohe intratumorale (*i. t.*) Zahl aktivierter zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen zusammen mit einer geringen Anzahl von T_{reg} sowohl mit einem verlängerten krankheitsfreien Intervall als auch mit einer gesteigerten Gesamtüberlebensrate einhergehen. So liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei hoher T_{reg}- und niedriger CD8⁺-Zahl bei 24.1 %, bei niedriger T_{reg}- und hoher CD8⁺-Zahl hingegen bei 64.0 % (Gao *et al.*, 2007). Verschiedene Studien belegen, dass eine spezifische CD8⁺-T-Zellantwort HCC Rezidive unterdrücken kann und die rezidivfreie Zeit verlängert (Curiel *et al.*, 2004; Hiroishi *et al.*, 2010; Unitt *et al.*, 2006; Yu und Fu, 2006).

1.2.2 Toleranzmechanismen von Malignomen

Im Gegensatz zu Bakterien, Viren oder Pilzen sind Tumoren kaum immunogen, da Tumorzellen trotz Entartung weiterhin vor allem physiologische, körpereigene Proteine synthetisieren. Das Immunsystem kann deshalb entartete Zellen nur schwer erkennen. Durch tumorale Toleranzmechanismen wird die Identifikation von Tumorzellen weiter

erschwert. Tumorzellen können beispielsweise dem Angriff zytotoxischer T-Zellen entgehen, indem sie die Expression von Tumorantigenen und MHC-I-Molekülen herunterregulieren. Darüber hinaus können Tumorzellen NKG2D-Liganden unterdrücken, um inneren Stress vor natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu verbergen oder die Caspasen-Kaskade, die der Apoptoseinduktion dient, zu blockieren (Weinberg, 2007). Tumoren können sich dem Angriff des Immunsystems aber auch aktiv entziehen, indem sie Interleukin-10 (IL-10) und *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) exprimieren, die immunsuppressiv wirken. Tumorzellen, die bereits Toleranz gegenüber dem Apoptoseinduktor Fas Ligand (FasL), einem Transmembranprotein aus der Familie der Tumornekrose Faktoren (TNF), erworben haben, können diesen als lösliches Produkt ausscheiden und so Lymphozyten in der näheren Umgebung abtöten (Dunn *et al.*, 2004; Weinberg, 2007). Auch dendritische Zellen (DC) können durch den Tumor zur Apoptose gebracht werden. Dadurch sinkt die Konzentration des Zytokins Interleukin-12 (IL-12), das von stimulierten, ausgereiften DC sezerniert wird. Die Folge ist eine Verschiebung der T_H1/T_H2 Balance im Tumormilieu weg von der $CD8^+$ T-Zell stimulierenden T_H1 , hin zu einer T_H2 -Dominanz. Die Herunterregulation antitumoraler zytotoxischer T-Zellen ist die Folge (Antony *et al.*, 2005; Esche *et al.*, 1999 a; Gottfried *et al.*, 2008).

Der vielleicht wichtigste Abwehrmechanismus mancher Tumorzellen könnte darin bestehen, dass sie das Chemokin CCL22 exprimieren, welches mit dem CCR4 Rezeptor auf T_{reg} (regulatorische T-Zellen) interagiert und diese in die Nähe des Tumors lockt. T_{reg} sind $CD4^+$ -T-Zellen, exprimieren aber zusätzlich das Oberflächenantigen CD25 und den Transkriptionsfaktor FOXP3 (Curiel *et al.*, 2004). Durch die Sezernierung von IL-10 und TGF- β können T_{reg} Lymphozyten unterdrücken, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. In den Lymphknoten können sie außerdem die DC-abhängige Aktivierung von T-Helferzellen blockieren. Somit verhindern T_{reg} Autoimmunreaktionen. In resezierten Tumoren werden oft unter den tumorinfiltrierenden Lymphozyten auch T_{reg} gefunden. Von den Tumorzellen durch Zytokine angelockt, werden sie von diesen als Verteidigung gegen die Immunabwehr zweckentfremdet. Durch Sezernierung immunsuppressiver Zytokine regulieren sie die antitumorale Immunantwort herunter. In gesunden Menschen machen T_{reg} etwa 5-10 % der $CD4^+$ T-Zellen aus, ihr Anteil kann in Tumorpatienten allerdings auf 25-30 % der $CD4^+$ Population ansteigen (Weinberg, 2007). Für Ovarial- und Lungenkarzinome konnte gezeigt werden, dass das

Vorhandensein von T_{reg} mit einer schlechteren Prognose und verkürzter Überlebenszeit der Patienten einhergeht (Curiel *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2001; Weinberg, 2007). Auch beim HCC konnte eine Infiltration durch T_{reg} nachgewiesen werden (Ormandy *et al.*, 2005).

1.2.3 Immunologische Sonderstellung der Leber

Zusätzlich zu den oben genannten Mechanismen genießt die Leber eine immunologische Sonderstellung, die dem Immunsystem die Tumorbekämpfung zusätzlich erschwert. Den sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) wird eine besondere Bedeutung bei der Induktion peripherer Immuntoleranz zugeschrieben. Ausgestattet mit allen bekannten Molekülen zur T-Zell Stimulation können sie unter anderem naive $CD4^+$ T-Zellen anregen, sich zu T_{reg} zu entwickeln oder bei $CD8^+$ T-Zellen durch Kreuzpräsentation exogener Antigene Toleranz, auch gegen Tumorantigene, induzieren (Berg *et al.*, 2006, Knolle und Limmer, 2003).

Trotz der vielen Hindernisse scheint eine Durchbrechung der Immuntoleranz gegen Malignome möglich. Für das HCC sind, wie für andere Tumorentitäten auch, partielle und komplette Spontanremissionen beschrieben worden. Die Gründe für diese sehr seltenen Phänomene sind nicht vollständig geklärt. Neben verschiedenen anderen Faktoren werden aber vor allem immunologische Prozesse für die Rückbildung der Tumoren verantwortlich gemacht (Chang, 2000; Lin *et al.*, 2004; Stoelben *et al.*, 1998). Die Induktion einer tumorspezifischen antitumoralen Immunantwort ist daher Gegenstand intensiver Forschung.

1.3 Immunologische Therapieansätze gegen Malignome

Angesichts der weltweit wachsenden Inzidenz des HCC ist die Suche nach neuen Therapieformen für das HCC dringend geboten. Hier bieten sich immuntherapeutisch eine Vielzahl neuer Ansätze an.

1.3.1 Antikörper basierte Therapieansätze

Eine bereits therapeutisch eingesetzte Möglichkeit Tumoren immunologisch zu bekämpfen, ist die passive Immunisierung mit tumorspezifischen Antikörpern.

Viele Tumoren überexprimieren Proteine, die als Marker verwendet werden können, sogen. tumorassoziierte Antigene (TAA). Bei der passiven Immunisierung werden in Wirtstieren monoklonale Antikörper hergestellt, die spezifisch gegen ein Tumorantigen

gerichtet sind. Durch Veränderung der cDNS wird der konstante Teil der Antikörper humanisiert, damit das Immunsystem sie nicht als fremd erkennt und eliminiert. Werden sie einem Patienten appliziert, binden sie an das TAA an der Oberfläche der Tumorzelle und umhüllen diese. Wie bei bakteriellen Infektionen erkennt dann das Immunsystem die antikörpermarkierten Zellen und kann sie zerstören. Ein Beispiel für die Verwendung solcher monoklonaler Antikörper ist Trastuzumab (Herceptin). Es ist spezifisch gegen den Rezeptor HER2, der zu den *Epidermal-Growth-Factor*-Rezeptoren (EGFR) gehört, welcher in etwa 30 % der Mamma-Ca und etwa 20 % der Magen-Ca überexprimiert wird. Trastuzumab wird vor allem nach Tumorresektion in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie bei Mamma-Ca und in der palliativen Situation bei Magen-Ca eingesetzt. Neben der rezidivfreien Zeit verlängert es auch signifikant das Gesamtüberleben (Rayson *et al.*, 2008; Hicks und Kulkarni, 2008; Song *et al.*, 2003; Weinberg, 2007).

1.3.2 Antitumorale Therapien durch Modulation des Immunsystems mittels Zytokinen

Durch das Eingreifen in molekulare Signalkaskaden kann eine Immunantwort gegen maligne Neoplasien gefördert werden. Zytokine regulieren und koordinieren die verschiedenen Abwehrmechanismen des Immunsystems. Viele Studien beschäftigen sich mit der Verabreichung von Zytokinen oder anderen immunologischen Signalmolekülen, häufig zur Verstärkung anderer therapeutischer Verfahren wie systemische und lokoregionale Chemotherapien oder zelluläre, immunologische Ansätze.

Speziell für das HCC sind die Zytokine Interferon- α (IFN- α), Interferon- γ (IFN- γ), *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor* (GM-CSF) und Interleukin-2 (IL-2), die das Immunsystem stimulieren sollen, Gegenstand der Forschung. In zahlreichen Studien werden diese zum Teil mit Chemotherapeutika, wie 5-Fluoruracil oder Doxorubicin verabreicht. Dabei wurde in einigen Fällen ein Ansprechen der Patienten beschrieben. Die Ergebnisse sind jedoch inkonsistent (Lotz *et al.*, 1994; Lygidakis *et al.*, 1995; Stuart *et al.*, 1996; Reinisch *et al.*, 2002).

1.3.3 T-Zell-basierte Immuntherapien (adoptive Immuntherapie)

Um die Effektivität der zellulären Immunantwort zu steigern können naive Lymphozyten *ex vivo* stimuliert und expandiert werden. Anschließend werden die dem Patienten reinfundiert. Diese Methode wird als adoptive Immuntherapie bezeichnet. Verschieden Studien zeigten eine Verlängerung der rezidivfreien Zeit nach Behandlung mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten und NK-Zellen, im als adjuvante Therapie nach Tumorresektion oder in Kombination mit anderen Maßnahmen (Shi *et al.*, 2005; Kawata *et al.*, 1995 Wang *et al.*, 1997; Takayama *et al.*, 1991).

1.3.4 Aktive Immunisierung

Eine weitere immunologische Strategie ist die aktive z.T. zytokinunterstützte Immunisierung mit autologen Tumorzellen. Sie soll eine spezifische antitumorale Immunantwort bei Tumorpatienten hervorrufen. Beispielsweise wurden Vakzine bestehend aus formalinfixierten HCC-Zellen, die mit GM-CSF und IL-2 freisetzenden Mikropartikeln sowie Tuberkulin als Adjuvanz versetzt wurden, verwendet. Dieses TAA-Vakzin wurde Patienten mit HCC nach einer Tumorresektion intradermal injiziert. Daraufhin konnte eine Induktion tumorspezifischer CD8⁺-T-Zellen festgestellt werden, durch welche die rezidivfreie Zeit verlängert und das Gesamtüberleben der Patienten verbessert werden konnte (Butterfield, 2004; Kuang *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005). Die tumorspezifischen CD8⁺-T-Zellen wurden durch antigenpräsentierende DC induziert. Somit spielen DC eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems gegen Tumorzellen.

1.4 Immunologische Therapieansätze basierend auf dendritischen Zellen

1.4.1 Dendritische Zellen

DC sind die potentesten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und deshalb in der Lage, naiven T-Zellen neuartige Antigene zu präsentieren (Esche *et al.*, 1999 b). Sie stimulieren durch ein komplexes System von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowohl das adaptive Immunsystem in Form von CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen als auch Bestandteile der angeborenen Immunabwehr wie NK-Zellen. Die DC werden ebenfalls durch komplexe positive und negative *Feedback*-Regelkreise beeinflusst.

Langerhanszellen, als epidermale DC, wurden erstmals 1868 von Paul Langerhans lichtmikroskopisch entdeckt (Wolff, 1963). Steinman und Cohn wiesen sie 1973 in lymphatischem Gewebe elektronenmikroskopisch erneut nach und brachten sie in einen immunologischen Kontext (Steinman und Cohn, 1973).

DC stammen von myeloiden CD34⁺ Vorläuferzellen ab. Nach der Bildung im Knochenmark werden die noch unreifen DC mit dem Blut in die Peripherie transportiert und migrieren dort in nichtlymphatisches Gewebe. Als unreife Zellen exprimieren sie noch wenige MHC-II-Moleküle sowie wenige kostimulatorische B7-Moleküle (CD80 und CD86) an ihrer Oberfläche. Unreife DC sind jedoch sehr effektiv darin, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Die Antigenaufnahme kann rezeptorvermittelt über den DEC-205 Rezeptor, Homolog mit dem Makrophagen-Mannose-Rezeptor, der Kohlenhydrate bindet und deren Endozytose veranlaßt, oder über den Fc γ - und Fc ϵ -Rezeptor erfolgen sowie durch Makropinozytose (Jiang *et al.*, 1995; Janeway *et al.*, 2002; Sato und Fujita, 2007). Bei den aufgenommenen Antigenen handelt es sich zumeist um Zellreste oder Proteine, die in den DC prozessiert und als Peptide an der Zelloberfläche präsentiert werden. Die so aufgenommenen extrinsischen Antigene werden über MHC-II-Moleküle präsentiert. Dagegen werden intrazelluläre Antigene wie etwa virale Proteine, die über den Syntheseapparat der DC hergestellt wurden wie alle intrazellulär hergestellten Proteine, über MHC-I-Moleküle präsentiert. Im Rahmen des sogen. *Cross-priming* können antigenpräsentierende Zellen aber auch extrinsische Antigene, welche sie zuvor aufgenommen haben, über MHC-I-Moleküle an CD8⁺-T-Zellen präsentieren. Dieser Mechanismus ist wichtig zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen gegen virusinfizierte aber auch neoplastische Zellen (Bachmann *et al.*, 1996; Paglia *et al.*, 1996; Rock, 1996).

DC können unter dem Einfluss inflammatorischer Faktoren, wie z.B. IL-1, GM-CSF und TNF- α , oder direkt durch aufgenommene Antigene die über *toll-like*-Rezeptoren (TLR), wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), ausreifen. Sie wandern dann zu lymphatischen Geweben, wie benachbarte Lymphknoten oder der Milz. Während des Migrationsprozesses verlieren sie die Fähigkeit zur Makropinozytose. Gleichzeitig werden MHC-II-Moleküle sowie B7-Moleküle an ihrer Oberfläche vermehrt exprimiert. Nach ihrer Wanderung in benachbarte Lymphknoten locken die DC durch Freisetzung von Chemokinen Lymphozyten zu sich.

Die wichtigste Aufgabe von DC ist die Aktivierung naiver T-Zellen zu antigenspezifischen Effektorzellen, welche Teil des erworbenen Immunsystems sind. Die Antigene, die mit MHC-Molekülen zusammen präsentiert werden, können von T-Zellen über den T-Zellrezeptor (TCR) erkannt werden. Die Enden dieser membranständigen Rezeptoren sind variabel. Ein T-Lymphozyt wird aktiviert, wenn sein TCR spezifisch für ein Antigen ist, welches von der DC präsentiert wird.

Naive CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die über MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Sind die TCR eines CD8⁺-Lymphozyts spezifisch für das präsentierte Antigen, wird er zu einer zytotoxischen T-Zelle (CTL) aktiviert und beginnt sich klonal zu expandieren. Dieser Lymphozytenklon ist spezifisch für Zellen, die ebenfalls das zuvor präsentierte Antigen an ihrer Oberfläche zeigen, und bringt diese zur Apoptose.

Zeigt eine DC ein Antigen über MHC-II-Molekülen, kann es von einer naiven CD4⁺ T-Zelle mit passendem TCR erkannt werden. Die T-Zelle wird dann zur T-Helferzelle aktiviert. Das Zytokinmilieu entscheidet hierbei, ob die Zelle sich in eine Typ1- (T_H1) oder Typ2-T-Helferzelle (T_H2) differenziert. In Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ entwickeln sich die CD4⁺ T-Zellen zu Zellen des T_H1-Typs. Diese vermitteln vor allem eine zelluläre Immunreaktion, indem sie u.a. die Zytokine IL-2, TNF- β und GM-CSF sezernieren, welche proinflammatorisch wirken und Makrophagen aktivieren. Hierdurch wird das Abtöten intrazellulärer Erreger ermöglicht (Stevens *et al.*, 1988; Janeway *et al.*, 2002). Zusätzlich unterstützen sie das *Cross-priming* zwischen DC und zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen und erhöhen die Zytotoxizität von NK-Zellen (Kaplan *et al.*, 1996; Ouyang *et al.*, 1999; Thierfelder *et al.*, 1996).

Überwiegen die Zytokine IL-4 und IL-6, die von einer Subpopulation der T-Helferzellen produziert werden, entwickeln sich CD4⁺ T-Zellen zum T_H2-T-Zell-Typ. Die von ihnen produzierten Zytokine, u.a. IL-4, IL-5 und IL-10, wirken vor allem auf die humorale Abwehr und veranlassen B-Zellen zur Antikörperproduktion und -sekretion (Scott *et al.*, 1988; Janeway *et al.*, 2002).

Neben der Aktivierung der adaptiven Abwehr, in Form von B- und T-Zellen, interagieren die DC auch mit NK-Zellen, die Teil des angeborenen zellulären Immunsystems sind. Zudem sind NK-Zellen in der Lage Tumorzellen direkt abzutöten.

DC können IL-12 sezernieren und damit die Zytokinproduktion und die Zytotoxizität der NK-Zellen stimulieren (Ormandy *et al.*, 2006). Im Gegenzug sezernieren NK-Zellen IFN-

γ , was wiederum zu einer T-Zellaktivierung vom proinflammatorischen T_H1 -Typ führt (Munder *et al.*, 1998). Darüber hinaus beschleunigt die tumorlytische Wirkung der NK-Zellen und die dadurch freigesetzten Tumorantigene die Entstehung einer spezifischen Tumormunität (Kalinski *et al.*, 2005; Moretta *et al.*, 2006).

1.4.2 Therapieansätze mit TAA-beladenen DC gegen Malignome

Die Fähigkeit von DC, eine spezifische zelluläre Immunantwort gegen Antigene hervorzurufen, macht sie für die Entwicklung immunologischer Strategien gegen Tumorerkrankungen sehr interessant.

Für experimentelle Zwecke können große Mengen an dendritischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Versuchstieren gewonnen werden (Inaba *et al.*, 1992). Beim Menschen können DC-Vorläufer durch Dichtezentrifugation aus peripherem Blut gewonnen werden. Die gewonnenen Zellen können anschließend angereichert werden, um möglichst reine DC-Kulturen zu gewinnen (Herr *et al.*, 2000). In Gegenwart von GM-CSF und IL-4 kultiviert, entwickeln die Zellen den typischen Phänotyp und die Eigenschaften ausgereifter DC, die u.a. durch eine hohe Expressionsrate von MHC-II- und B7-Molekülen gekennzeichnet sind (Sallusto und Lanzavecchia, 1994).

Das Verabreichen unspezifischer DC alleine zeigte in der Vergangenheit allerdings keine durchschlagenden therapeutischen Erfolge bei Tumorerkrankungen (Mazzolini *et al.*, 2005, Nakamoto *et al.*, 2007).

Viele Tumoren überexprimieren TAA. Da diese zum größten Teil physiologische eigene Proteine sind, werden sie von der Immunabwehr nicht als Fremdartigene erkannt. Tumoren setzen zudem keine Gefahrensignale frei, so dass DC, auch wenn sie ein Tumorantigen aufnehmen und prozessieren, dadurch nicht reifen können. Durch andauernde unterschwellige Antigenpräsentation ohne Aktivierung der T-Zellen können DC außerdem anerg gegenüber den Tumorantigenen werden und so eine Immuntoleranz induzieren (Lipscomb und Masten, 2002).

DC-basierte immunologische Therapieansätze versuchen dies zu verhindern, indem DC *in vitro* mit Tumorantigenen beladen und stimuliert werden. Anschließend können dem Patienten zahlreiche reife DC reinjiziert werden, die in der Lage sind eine selektive zelluläre Immunantwort zu induzieren.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten DC *ex vivo* mit TAA zu beladen. Neben der Lipofektion und der Elektroporation der DC, die nur einen geringen Wirkungsgrad haben (Arthur *et al.*, 1997), können DC auch mit adenoviralen Vektoren (AdV), die für das Antigen kodieren, transduziert werden. Die transduzierten Zellen produzieren das Antigen dann selbst und präsentieren es sowohl im MHC-I als auch im MHC-II Kontext (Butterfield *et al.*, 2001). Eine weitere Art DC mit TAA zu beladen ist das sogenannte Pulsen. Hierbei nutzt man die Fähigkeit der DC aus, Antigene aus ihrer Umwelt aufzunehmen. Die DC werden dazu mit Tumorlysat oder apoptotischen Tumorzellen inkubiert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die DC alle Proteine der Tumorzelle aufnehmen und prozessieren. So werden nicht nur bekannte TAA, wie z.B. AFP, MAGE-1, SSX-1, CTP11 oder HCA587 (Zhao *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2002) durch die DC prozessiert und präsentiert, sondern auch bislang unbekannte Tumorantigene an der Oberfläche der DC dargeboten. Nach dem Pulsen sind die DC in der Lage, via MHC-II-Moleküle CD4⁺ T-Zellen spezifisch zu aktivieren, vornehmlich zu T_H1-Zellen (Esche *et al.*, 1999 a; Herr *et al.*, 2000, Shurin *et al.*, 1996). Darüber hinaus sind DC in der Gegenwart von GM-CSF und ausreichend hoher Antigenkonzentration in der Lage, exogene Antigene ebenfalls über MHC-I-Moleküle zu präsentieren (Bachmann *et al.*, 1996; Paglia *et al.*, 1996; Rock, 1996).

Für verschiedene Tumorentitäten konnte die immunstimulatorische Wirkung TAA gepulster bzw. beladener DC *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Beispielsweise führte die Kokultivierung TAA beladener DC mit Lymphozyten zum Entstehen tumorspezifischer zytotoxischer Effektorzellen. So konnten Telomerase gepulste DC spezifische zytokininduzierte Killerzellen (CIK) gegen Nierenzellkarzinomzellen induzieren (Sievers *et al.*, 2004), oder CA 19-9-Protein gepulste DC spezifische zytotoxische Aktivität gegen Pankreas- bzw. Kolonkarzinomzellen hervorrufen (Marten *et al.*, 2000).

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (AG Gonzalez-Carmona) konnte die antitumorale Wirkung TAA beladener DC gegen HCC-Zellen *in vitro* nachweisen werden (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2006). Mit Hilfe eines AdV wurde die DNS von α -Fetoprotein (AFP) in die DC eingeschleust, die daraufhin AFP exprimierten. Sie präsentierten das Transgen an ihrer Oberfläche sowohl über MHC-I als auch MHC-II-Moleküle (Butterfield

et al., 2001) und waren *in vitro* in der Lage spezifische CIK gegen AFP⁺-HCC-Zellen zu induzieren (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2006).

In ersten klinischen Studien bei Patienten mit HCC konnte durch Vakzinierung mit Tumorlysat gepulsten autologen DC eine spezifische T-Zellantwort induziert und eine Senkung der Tumormarker beobachtet werden. Die Reinjektion der DC wurde dabei in der Regel gut vertragen (Palmer *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2005, Iwashita *et al.*, 2003). Allerdings war, trotz der nachgewiesenen immunologischen Antwort, der therapeutische Effekt der Behandlung mit TAA gepulsten DC, in Patienten mit HCC, bislang nur begrenzt.

Die Tatsache, dass sich das HCC in immunkompetenten Patienten entwickelt, deutet auf ein Versagen der natürlichen antitumoralen Immunantwort des Organismus hin. Die oben bereits beschriebenen *Escape*-Mechanismen, wie z.B. die Herabregulierung von MHC-I-Molekülen auf den Tumorzellen oder die Sekretion immuninhibitorischer Zytokine durch T_{reg} könnten dafür verantwortlich sein (O'Neill *et al.*, 2004). Um das volle therapeutischen Potenzial der Immuntherapie mit TAA gepulsten DC ausschöpfen zu können scheint es daher nötig zu sein, die Anwendungsprotokolle von DC-Vakzinen zu optimieren sowie das immunsuppressive Milieu, welches von den Tumoren aufgebaut wird, zu neutralisieren.

1.4.3 Optimierung DC-basierter immunologischer Therapieansätze

Mit Hilfe von AdV können Gene immunstimulatorischer Zytokine oder kostimulatorische Oberflächenmoleküle in Zielzellen eingebracht werden. Eine Möglichkeit, DC-Vakzine zu optimieren, ist die direkte Beeinflussung des tumoralen Mikromilieus durch die *i. t.* Applikation von DC, die potente T_H1-Zytokine oder kostimulatorische Moleküle überexprimieren.

TAA gepulste DC werden dazu mit AdV transduziert, die für T_H1-Zytokine oder kostimulatorische Moleküle kodieren. Die Transgenexpression durch die DC könnte die Lymphozytenrekrutierung und Antigenpräsentation verbessern und so eine stärkere Immunantwort gegen Tumorzellen auslösen.

In verschiedenen Arbeiten mit AdIL-12, AdIL-7 und AdCD40 Ligand (AdCD40L) transduzierten DC konnte ein Anstieg der tumorspezifischen zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen sowie ein Ansteigen von IFN- γ und IL-12 und damit einhergehend die Induktion

einer spezifischen Immunreaktion vom T_H1 -Typ festgestellt werden. Außerdem konnte eine Verringerung immunsuppressiver Faktoren wie IL-10, TGF- β , PGE2 und VEGF belegt werden. Insgesamt führte dies zu einer signifikanten Reduktion der Tumorlast (Kikuchi *et al.*, 2000; Mazzolini *et al.*, 2005; Melero *et al.*, 1999; Nishioka *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2003; Tirapu *et al.*, 2002). Speziell für AdCD40L-transduzierte DC, konnten diese Ergebnisse in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008).

1.4.3.1 CD40 Ligand

Der Ligand des CD40 Rezeptors (CD40L oder CD154) ist im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor CD40 eines der potentesten kostimulatorischen Moleküle. Die CD40/CD40L-Interaktion induziert eine starke Aktivierung von DC (Bianchi *et al.*, 1999). CD40L wurde erstmals 1992 von Armitage beschrieben (Armitage *et al.*, 1992). Es ist ein etwa 35 kDa großes Glykoprotein, das zur Familie der Tumornekrosefaktoren gehört. Das membranständige Protein wird vor allem von aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen und zu geringeren Teilen von aktivierten $CD8^+$ -T-Zellen sowie Thrombozyten exprimiert. Das integrale Membranprotein CD40 wird unter anderem von DC gebildet. Nach der Aktivierung der DC durch Antigenaufnahme wird die Expression von CD40 an ihrer Oberfläche hochreguliert. Die Interaktion von DC und naiven T-Zellen induziert die vermehrte Expression von CD40L auf der Oberfläche von T-Lymphozyten (Caux *et al.*, 1994). Die folgende Interaktion von CD40L auf aktivierten T-Zellen und dem CD40 Rezeptor auf DC löst die Produktion sehr großer Mengen IL-12 und die vermehrte Expression von ICAM-1-, CD80-, und CD86-Molekülen auf der Oberfläche der DC aus. DC können so T-Zellen besser aktivieren und deren Proliferation und Differenzierung anregen. Zusätzlich wird die IFN- γ -Produktion durch die T-Zellen gesteigert (Banchereau *et al.*, 1994; Cella *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1996). IL-12 und IFN- γ sind die Hauptzytokine der T_H1 -Immunantwort und haben somit entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von $CD4^+$ -T-Zellen zu T_H1 -Helferzellen (Janeway *et al.*, 2002; Thierfelder *et al.*, 1996). Das T_H1 -Milieu fördert eine inflammatorische zelluläre Immunreaktion durch Aktivierung von Makrophagen, verbessertes *Cross-priming* der DC und zytotoxischen T-Zellen sowie eine erhöhte Zytotoxizität von NK-Zellen (Kaplan *et al.*, 1996; Ouyang *et al.*, 1999; Thierfelder *et al.*, 1996).

Schoenberger konnten zeigen, dass DC, die per CD40 Rezeptor aktiviert wurden, in der Lage sind zytotoxische T-Zellen zu induzieren (Schoenberger *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus kann die sonst notwendige Hilfe der CD4⁺-T-Helferzellen umgehen (Bennett *et al.*, 1997; Husmann und Bevan, 1988; Keene und Forman, 1982). Das ist besonders interessant, da gerade nach Therapie mit TAA-gepulsten DC bei HCC-Patienten eine mangelnde CD4⁺-Zellantwort auf das Tumorantigen beobachtet werden konnte (Butterfield, 2007).

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die Transduktion von *in vitro* expandierten und mit Tumorslysat gepulsten DC mit CD40L-kodierenden Adenoviren (AdCD40L) zu einer wechselseitigen autogenen Aktivierung der DC durch CD40-CD40L Interaktion führt. Als Zeichen der DC-Aktivierung war die IL-12 Sekretion der Zellen deutlich erhöht, ebenso die Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle. *In vivo* zeigten die gepulsten, mit AdCD40L transduzierten DC einen verbesserten antitumoralen Effekt im Vergleich mit gepulsten, mit Kontrollvirus transduzierten DC, gegen subkutane (s. c.) HCC in der Maus. Die induzierte Immunantwort war von der Aktivierung CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen abhängig (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008; Cella *et al.*, 1996). Interessanterweise war die antitumorale Wirkung von CD40L umso größer je mehr CD40L gebildet wird (Murugaiyan *et al.*, 2007).

1.4.3.2 Interleukin-2

IL-2 ist ein Lymphozytenwachstumsfaktor der von aktivierten T-Zellen, v.a. vom T_H1-Typ, gebildet wird. Nach dem Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen und in Anwesenheit kostimulatorischer Signale, wie B7-Molekülen, wird die Synthese von IL-2 initiiert. Gleichzeitig wird der IL-2 Rezeptor, der bei ruhenden T-Zellen aus einer β - und einer γ - Kette bestehen, um eine α -Kette (CD25) erweitert, was eine deutliche Affinitätssteigerung gegenüber IL-2 bewirkt (Janeway *et al.*, 2002). IL-2 trägt auch selbst zu einer vermehrten IL-2-Rezeptorexpression bei. Durch Autostimulation können sich die T-Zellen 2-3 mal täglich teilen. Diese klonale Expansion führt in kurzer Zeit zum Entstehen einer großen Menge Zellen mit identischen Antigenrezeptoren. IL-2 fördert außerdem die Differenzierung der T-Lymphozyten zu T-Effektorzellen (Cantrell und Smith, 1983; Janeway *et al.*, 2002).

IL-2 zeigt auch eine direkte antitumorale Wirkung, weshalb rekombinantes IL-2 in hohen Dosen beispielsweise zur Therapie metastasierter Nierenzellkarzinome eingesetzt wird (Donskov, 2007; Fyfe *et al.*, 1995). Auch für die kombinierte Gabe mit IFN- α wurde ein antitumoraler Effekt von IL-2 nachgewiesen (Bukowski, 2001; Negrier *et al.*, 2000). Ebenso wurde die antitumorale Wirksamkeit der Kombination von IL-2 mit Thalidomid, welches die antitumorale Aktivität von T-Zellen fördert und antiangiogenetisch wirkt, beschrieben (Amato *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2004; Teo, 2005).

Die tumorhemmende Wirkung von IL-2 scheint auf der Induktion spezifischer antitumoraler CD8⁺-T-Zellen und der Steigerung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen zu beruhen (Jackaman *et al.*, 2003).

Etwa 50 % der HCC bilden IL-2. Es zeigte sich, dass die Prognose von Patienten mit IL-2-exprimierenden Tumoren verbessert ist. Diese Tumoren zeigten eine höhere Zahl von CD8⁺-T-Zellen, was auf eine Stimulation zytotoxischer T-Zellen durch IL-2 schließen lässt (Ikeguchi und Hirooka, 2005).

Nach bakteriellem Kontakt konnte auch bei DC eine IL-2 Produktion beobachtet werden. Es wird angenommen, dass IL-2 eine Schlüsselfunktion bei der außergewöhnlichen Stimulationsfähigkeit von DC auf CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten zukommt (Grannucci *et al.*, 2001; Grannucci *et al.*, 2002).

Durch Transduktion von DC mit IL-2-kodierenden adenoviralen Vektoren (AdIL-2) ist eine starke Sekretion von IL-2 in der Umgebung der DC zu erwarten. In früheren Studien zeigten die transduzierten DC neben einer stark erhöhten IL-2-Produktion zusätzlich eine erhöhte Ausschüttung von IL-12 sowie verbesserte Fähigkeiten Tumorantigene aufzunehmen und zu präsentieren. Hierdurch konnte eine effektivere spezifische antitumorale Immunreaktion hervorgerufen werden (Sun *et al.*, 2002).

1.4.3.3 CD40L und IL-2

Die Relevanz der CD40-CD40L Interaktion für das *Cross-priming* zwischen DC und CD8⁺-T-Zellen wurde bereits beschrieben (siehe 1.4.3.1). Da IL-2 besonders CD8⁺-T-Zellen propagiert (Ikeguchi und Hirooka, 2005; Jackaman *et al.*, 2003), ist es naheliegend einen synergistischen Effekt durch die Therapie mit CD40L- und IL-2-transduzierten DC zu vermuten.

Nach der Transduktion von Tumorzellen mit AdCD40L und AdIL-2 konnten Takahashi einen synergistischen Effekt feststellen. Hierbei wurde die Notwendigkeit des CD40L vermittelten *Cross-primings* der durch IL-2 expandierten CD8⁺-Population besonders betont (Takahashi *et al.*, 2001 a; Takahashi *et al.*, 2001 b).

Andere Arbeiten konnten ebenfalls, sowohl in Vakzinierungsversuchen als auch in Versuchen mit stimulierenden Antikörpern, durch die Kombination von IL-2 und CD40L eine verbesserte Immunaktivierung gegen Malignome erzielen. Sie zeigten, dass eine effektive CD8⁺-T-Zellantwort gegen Tumorantigene abhängig von CD40-CD40L induzierten CD4⁺-T-Helferzellen ist (Lode *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2006). Sowohl die CD4⁺-T-Helferzell-vermittelte Aktivierung der CD8⁺-T-Lymphozyten als auch das *Cross-priming* von DC und CD8⁺-T-Zellen scheint wichtig zu sein, um im Rahmen einer Immuntherapie des HCC, spezifische antitumorale zytotoxische Zellen zu generieren.

1.5 Adenovirale Vektoren

Humanpathologische Adenoviren (Ad) sind weltweit verbreitet. Sie verursachen vor allem Atemwegserkrankungen aber auch Bindehautentzündungen, Pharyngitiden, Gastroenteritiden und Urogenitalinfektionen (Wold und Horwitz, 2007; Falke, 2001).

Ad sind nicht-behüllte Doppelstrang-DNS (dsDNS) Viren, die einen Durchmesser von ungefähr 90 nm und eine Masse von 150×10^6 Da haben, wovon die DNS 13 % ausmacht (Berk, 2007). Ad binden an Membranproteine der Zelloberfläche und gelangen durch rezeptorvermittelte Endozytose ins Innere der Zielzelle. Nach Freilegen der Virus DNS gelangt diese in den Zellkern, wo sie transkribiert und repliziert wird (Berk, 2007; Doerfler und Boehm, 1995).

Verschieden Viren können als Vektoren fungieren, um fremde DNS in das Zytosol von Zellen einzuschleusen. Der Vorteil von adenoviralen Vektoren (AdV) liegt in ihre Fähigkeit sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen transduzieren zu können. Darüber hinaus können hohe AdV-Titer erzeugt werden und die Transduktionseffizienz bei ihrer Verwendung ist außerordentlich groß (Gerard und Chan, 1996). Das am häufigsten als Vektor verwendete Ad ist das humane Ad Serotyp 5. Sein Genom hat eine Länge von 36 kb (Bett *et al.*, 1993). Durch Deletion nicht essentieller Virus DNS kann Platz geschaffen werden für die einzuschleusende Fremd-DNS. E1-E3 deletierte

AdV der 1. Generation können so 8,3 kb Fremd-DNS aufnehmen (*Gutless Adenovirus vector and the construction method thereof, Patent Application 20070077226, United States Patent and Trademark Office*).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Immunologische Therapieansätze mit DC haben sich für verschiedene Malignome als vielversprechend erwiesen. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass AFP-beladene DC in der Lage sind, tumorspezifische Effektorzellen gegen AFP-positive HCC-Zellen *in vitro* zu induzieren (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 1999). Allerdings haben DC-Vakzine in ersten klinischen Studien keinen klinischen antitumoralen Effekt gezeigt (Butterfield *et al.*, 2007). Durch die Expression von rekombinantem CD40L auf DC, die zuvor mit AdCD40L transduziert worden waren, konnte eine stärkere Aktivierung der DC und eine verbesserte Induktion der tumorspezifischen T-Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Dies steigerte die antitumorale Wirksamkeit gegenüber HCC *in vivo* (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008).

Aufbauend auf den Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe werden in dieser Arbeit IL-2-transduzierte DC in Kombination mit CD40L-DC *i. t. bei s. c.* HCC in einem Mausmodell appliziert, um die Wirksamkeit einer DC-basierten Therapie des HCC weiter zu steigern. Zunächst soll der Effekt der Transduktion mit AdIL-2 auf TAA gepulste DC *in vitro* untersucht werden. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen sollen die DC anhand der Expression von Reifungsmarkern nach Transduktion mit AdIL-2 charakterisiert werden. In einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitäts-Assay soll die Fähigkeit von TAA gepulsten und AdIL-2- bzw. AdCD40L-transduzierten DC verglichen werden, tumorspezifische Effektorzellen zu induzieren.

In einem *s. c.* Tumormodell an C3H-Mäusen soll der Effekt von AdIL-2-transduzierten DC *in vivo* untersucht und mit AdCD40L-transduzierten DC verglichen werden.

Anschließend soll die Kombination von AdIL-2- und AdCD40L-transduzierten DC *in vivo* auf ihre synergistischen Effekte bezüglich einer antitumoralen Wirkung untersucht werden.

Abschließend werden die tumorinfiltrierenden Effektorzellen nach den verschiedenen immunologischen Therapien durchflusszytometrisch charakterisiert und quantifiziert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tierstamm (C3H/HeNcrI)

Der C3H-Mausstamm wurde 1920 von Strong durch die Kreuzung eines „Bagg Albino“ Weibchens mit einem DBA-Männchen gezüchtet. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen und eigneten sich zur Induktion von s. c. Tumoren durch die syngene HCC-Zelllinie Hepa129.

2.1.2 Eukaryontische Zelllinien

2.1.2.1 911-Zellen

Bei der Zelllinie 911 handelte es sich um eine epitheliale, adhärenzte Zelllinie, die humanen embryonalen Retinoblasten (HER) entstammte. 911 Zellen wurden mit der E1-Region des humanen Adenovirus Serotyp 5 stabil transfiziert (bp 79-5789). Die einschichtig wachsenden Zellen eigneten sich deshalb gut zur Vermehrung replikationsdefizienter AdV der ersten Generation mit Deletion der E1-Region (Fallaux *et al.*, 1996).

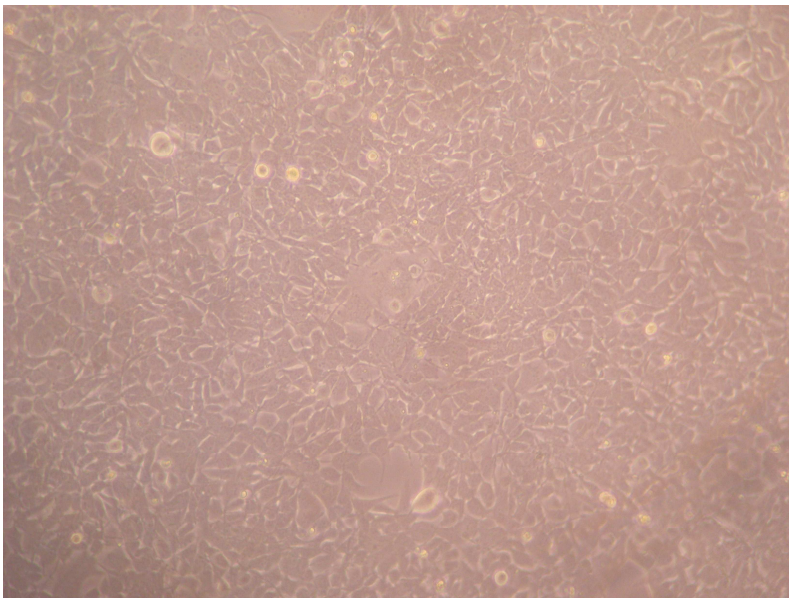


Abb. 3: 911-Zellen unter dem Lichtmikroskop (40-fache Vergrößerung)

2.1.2.2 Hepa129-Zellen

Die murine Zelllinie Hepa129 wurde aus einem HCC einer C3H-Maus gewonnen. Sie wurde vom *NCI-Frederick Cancer Research and Development Center, USA*, bezogen. Bei Hepa129-Zellen handelte es sich um Suspensionszellen. Sie wurden zur Induktion von *s. c.* Tumoren bei syngenen C3H-Mäusen verwendet (Schmitz *et al.*, 2004) und dienten als Quelle für Tumorlysat zum Pulsen muriner DC.

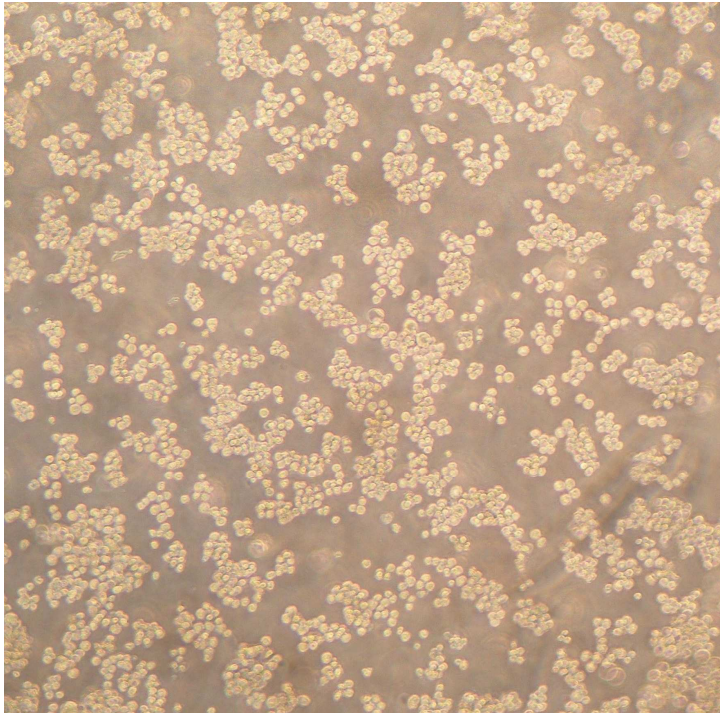


Abb. 4: Hepa129 Suspensionszellen unter dem Lichtmikroskop (40-fache Vergrößerung)

2.1.3 Adenovirale Vektoren

Um eine Überexpression von IL-2 bzw. CD40L in murinen DC zu erreichen, wurden murine DC mit den bereits im Labor vorhandenen AdV, AdIL-2, AdCD40L sowie AdLacZ als Kontrolle, transduziert.

2.1.3.1 AdIL-2

Bei dem, für IL-2 kodierende Vektor, handelte es sich um einen AdV der 1. Generation mit Deletionen der E1- und E3-Gene. Zur Herstellung wurde das AdenoEasy-System verwendet (He *et al.*, 1998). Das pCI-IL-2 Plasmid mit der cDNS des humanen IL-2, welches in der Maus wirksam ist, war bereits im Labor vorhanden. Aus dem pCI-IL-2 wurde die gesamte Sequenz des IL-2 Gens mittels Restriktionsverdau isoliert und in den

Transfervektor pAd-Shuttle des AdenoEasy-Systems kloniert. Nach Sequenzierung des Transfervektors wurde dieser durch homologe Sequenzen mit pAdEasy1 (Plasmid mit der Sequenz des humanen Adenovirus Typ 5) rekombiniert und in 911-Zellen transfiziert, um den ersten Stock AdIL-2 zu produzieren.

2.1.3.2 AdCD40L

Der für murines CD40L kodierende Vektor wurde uns freundlicherweise von Prof. Jesus Prieto von der Universität Navarra in Spanien zur Verfügung gestellt (Schmitz *et al.*, 2001). Es handelte sich ebenso um einen AdV der 1. Generation.

2.1.3.3 AdLacZ

AdLacZ ist ebenfalls ein AdV der 1. Generation. Er trägt das Gen der β -Galactosidase von *E. coli* und wurde als Kontrollvektor eingesetzt. AdLacZ wurde uns auch von Prof. Jesus Prieto von der Universität Navarra in Spanien zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Proteine

2.1.4.1 Zytokine

Alle Zytokine wurden von der Firma Tebu-Bio GmbH (Offenbach) bezogen

Murines GM-CSF	200 U/ml
Murines Interleukin 1 β (IL-1 β)	100 U/ml
Murines Interleukin 2 (IL-2)	300 U/ml
Murines Interleukin 4 (IL-4)	100 U/ml

2.1.4.2 Antikörper

2.1.4.2.1 Antikörper für die MACS-Separation

Die MACS-Antikörper wurden von der Firma Southern Biotech (Eching) bezogen.

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

Magnetic Beads:

Die *Magnetic Beads* wurden von der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) bezogen.

Ziege-anti-Ratte IgG <i>Micro Beads</i>

2.1.4.2.2 Antikörper für die Lymphozytenkultur

Der Antikörper der Lymphozytenkultur wurde von der Firma Southern Biotech (Eching) bezogen

Anti-CD3	50 ng/ml
----------	----------

2.1.4.2.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Phycoerythrin (PE)-gekoppelte Antikörper:

Isotypenkontrolle PE (Maus Ig62b)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Hamster-anti-Maus CD11c	BD Pharmingen (Heidelberg)
Hamster-anti-Maus CD86	BD Pharmingen (Heidelberg)
Hamster-anti-Maus CD40-L (CD154)	BD Pharmingen (Heidelberg)

Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelte Antikörper:

Isotypenkontrolle FITC (Maus Ig62a)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Hamster-anti-Maus CD40	BD Pharmingen (Heidelberg)
Hamster-anti-Maus CD80	BD Pharmingen (Heidelberg)
Hamster-anti-Maus MHC-II	BD Pharmingen (Heidelberg)

2.1.5 Medien, Lösungen und Puffer**2.1.5.1 Zellbiologie**

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
--	------------------------------------

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
PBS mit Mg ⁺⁺ und Ca ⁺⁺ (PBS ⁺⁺)	Cambrex (Belgien)
LPS	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert/ nicht hitzeinaktiviert)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Pferdeserum (HS) (hitzeinaktiviert)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Minimum Essential Medium (MEM) (10 x)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 100 x (Penicillin (100 IE/ml), Streptomycin (100 µg/ml))	Lonza (Schweiz)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin-EDTA-Lösung (EDTA) (0,5 g/l Trypsin (1:250) und 0,2 g/l Ethylendiaminotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hefeextrakt	Becton, Dickinson & Co. (USA)

2.1.5.2 Molekularbiologie und Zellkultur

Medium für 911-Zellkulturen:

DMEM mit Glutamax	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)
Pen/Strep	1 % (v/v)
Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.	

Medium für Hepa129-Zellkulturen:

RPMI 1640 mit Glutamax	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)
Pen/Strep	1 % (v/v)
Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.	

Transduktionsmedium für 911-Zellen:

DMEM mit Glutamax	500 ml
Pen/Strep	1 % (v/v)
Pferdeserum (HS)	2 % (v/v)

Kulturmedium für DC:

RPMI 1640 mit Glutamax	500 ml
FCS (nicht hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)
Pen/Strep	1 % (v/v)
Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Zur Kultivierung der DC wurden dem Medium nach Anleitung Zytokine zugesetzt.	

Transduktionsmedium für DC:

RPMI 1640 mit Glutamax	500 ml
FCS (nicht hitzeinaktiviert)	2 % (v/v)
Pen/Strep	1 % (v/v)
Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.	

Medium für Lymphozytenkultur:

RPMI 1640 mit Glutamax	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)
Pen/Strep	1 % (v/v)
HEPES	25 mM
Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.	

Medium für den *Plaque-Assay*: *Eagle's Minimum Essential Medium 2x* (MEM 2x)

MEM 10 x	20 ml
A. bidest.	65 ml
Pen/Strep	2 ml
L-Glutamin	2 ml
Hefeextrakt (5 %)	2 ml
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) (8,4 %)	ca. 7-10 ml (bis ein pH von 7,4 erreicht ist)
Das Medium wurde bei 4 °C gelagert.	

Agarose (1,5 %)	
Agarose Typ VII (<i>low gelling temperature</i>)	1,5 g
A. bidest.	100 ml
Das Gemisch wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.	

Die Gelschicht des *Plaque-Assays* bestand zu gleichen Teilen aus MEM 2x und Agarose (1,5 %) Typ VII mit 2 % HS.

Cäsiumchlorid- (CsCl-) Lösungen für die Gradientenzentrifugation der Virusreinigung:

Puffer:	
EDTA	1 mM
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	10 mM (pH 8,1)

1,2 g/ml CsCl:	
CsCl	13,85 g
Puffer	50 ml

1,33 g/ml CsCl:	
CsCl	22,5 g
Puffer	50 ml

1,45 g/ml CsCl:	
CsCl	30,5 g
Puffer	50 ml

Erythrozyten-Lyse-Puffer:

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	8,29 g
Kaliumbikarbonat (KHCO ₃)	1 g
EDTA	0,0371 g
Die Ingredienzien wurden in 1000 ml A. bidest. gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.	

MACS-Puffer:

Bovines Serumalbumin (BSA)	0,5 % (m/v)
EDTA	1 mM
in PBS ⁺⁺	

Phosphate buffered saline (PBS):

Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	20 mM
Natriumchlorid (NaCl)	50 mM
Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.	

PBS/BSA für die Durchflusszytometrie:

BSA	1 % (m/v)
Natriumazid (NaN ₃)	0,02 % (m/v)
in PBS ⁺⁺	

Optische-Dichte (OD) - Puffer:

Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1 % (m/v)
Tris/Cl	10 mM
EDTA	1 mM

2.1.6 Tiermodell

Ketavet	zur Narkose der Tiere verwendet	Pharmacia (Erlangen)
Xylacin		Bayer (Leverkusen)
NaCl (0,9 %)		B.B. Braun AG (Melsungen)
Isofluran		Abbot (Wiesbaden)

2.1.7 Geräte

Ausschwingrotor, SW41Ti	Beckman Coulter (Krefeld)
Autoklav, Varioklav	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
CO ₂ -Inkubator	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Durchflusszytometer, EPICS XL	Beckman Coulter (Krefeld)
ELISA-Reader	Dynatech Laboratories (Frankfurt)
Festwinkelrotor SW50Ti	Beckman Coulter (Krefeld)

Gefrierschrank	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	Labor Brand (Giessen)
Mikrowellengerät	Panasonic (Hamburg)
Mikroskop, DM IL	Leica (Wetzlar)
MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Minischüttler	Works, Wilmington (USA)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)
pH-Elektrode	Hannah Instruments (Kehl a. Rhein)
Photometer, GenQuant	Pharmacia (Freiburg)
Pipetten	Gilson (Bad Camberg)
Pipettierhilfe, PipetBoy Accu	Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Pipettierhilfe, Accu-Jet	Baacklab (Schwerin)
Präzisions-Quarzküvette	Hellma (Mühlheim)
Sterilwerkbänke:	
LaminAir	Heraeus Sepatech (Osterode)
Microflow	Nunc GmbH & Co KG (Wiesbaden)
Tiefkühlschrank, Colora E80	Colora Messtechnik GmbH (Lorch)
Waage, SBA52	Scaltec (Heiligenstadt)
Wasserbad	Köttermann (Uetze-Hänningen)
Zentrifugen:	
Biofuge 13R	Heraeus Sepatech (Osterode)
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech (Osterode)
Tischzentrifuge, Microfuge Lite	Beckman Coulter (Krefeld)
Ultrazentrifuge, Optima LE 80K	Beckman Coulter (Krefeld)
Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech (Osterode)

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Chirurgische Instrumente	Aesculap AG (Tuttlingen)
Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser (Braunschweig)
Einmalkanülen	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Glasswaren (Kolben, Pipetten, Standzylinder, Reagenzgläser usw.)	Schott (Mitterteich)
Insulin-Spritzen (40 U/ml)	B. Braun AG (Melsungen)
Latex-Handschuhe	Ansell (Belgien)
Multi-Platten (6-Loch, 12-Loch, 96-Loch)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde)
Optiseal Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman Coulter (Krefeld)
Polyallomer Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman Coulter (Krefeld)
Polysyrol-Röhrchen, GLKL 5 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipetten, Costar Stripette	Corning (USA)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Skalpelle Cutfix Nr. 22	Aesculap (Tuttlingen)
Spritzen Amefa 2 ml, 5 ml, 20 ml	Braun (Melsungen)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturschalen (Ø 100 mm, 145 mm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellschaber	BD Biosciences (Heidelberg)
Zellsieb 100 µm	BD Biosciences (Heidelberg)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagieren von 911-Zellen

911-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät. Bei einer Konfluenz von >90 % (ca. alle 2-3-Tagen) wurden die Zellen passagiert, d.h. vom Boden der Kulturschale abgelöst und neu ausgesät. Dazu wurde der Überstand der Zellkultur abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um sie von FCS-Resten zu reinigen. Die Zellen wurden anschließend 2-3 min mit Trypsin-EDTA inkubiert und so vom Boden der Schale gelöst. Durch die Zugabe von frischem Medium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellsuspension in einer neuen Zellkulturschale wieder ausgesät. Dabei wurden die Zellen einer Ursprungsschale im Verhältnis 1:10 auf, je nach Bedarf, 2 bis 10 neue Schalen verteilt.

2.2.1.3 Kultivierung und Passagieren von Hepa129-Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurde das Medium mit den darin enthaltenen Suspensionszellen aus den Zellkulturschalen bzw. Flaschen abpipettiert und bei 800 U/min 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in frischem Medium vorsichtig resuspendiert. Die Zellen einer Ursprungsschale wurden, je nach Bedarf, auf 2 bis 10 neue Schalen verteilt.

2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen langfristig aufzubewahren, wurden sie in flüssigem Stickstoff (N₂) gelagert. Dazu wurden sie in eine Lösung aus FCS und 10 % DMSO überführt, zu 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen gefüllt und zunächst in Styropor verpackt auf -80 °C tiefgekühlt. DMSO verhinderte hierbei die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellmembran zerstören können. Die Verpackung in Styropor erlaubte das langsame Herunterkühlen der Zellen von ca. 1 °C pro Stunde. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (N₂-Tank) überführt und gelagert.

Um Zellen wieder aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C langsam erwärmt. Danach wurden die Zellen in 10 ml Medium gewaschen und abzentrifugiert, um das DMSO schnell zu entfernen, da es die Zellen im aufgetauten Zustand schädigt. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium erneuert.

2.2.1.5 Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Um die Zellzahl und Zellvitalität einer Zellsuspension zu ermitteln, wurden die Zellen zunächst mit Trypanblau angefärbt und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurde eine 10 µl Probe der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (0,2 %) gemischt.

Trypanblau kann durch defekte Zellmembranen eindringen, im Zytosol an Zellproteine binden und so tote Zellen blau anfärben. Die Neubauer-Zählkammer bestand aus einem dicken Glasobjektträger mit einer Vertiefung und einem Deckglas. Am Boden der Vertiefung befand sich ein Zählgitter aus 4 Quadranten mit je 16 Feldern á 0,1 mm. Wurde das Deckglas auf den Objektträger geschoben, entstand ein definierter Hohlraum von 0,1 mm Höhe. Die Zellsuspension wurde seitlich aufpipettiert und saugte sich durch den Kapillareffekt in den Hohlraum. Unter dem Mikroskop wurden bei 40-facher Vergrößerung alle vitalen (nicht blau gefärbten) Zellen ausgezählt.

Die Zellzahl pro ml Ausgangssuspension ergab sich aus dem arithmetischen Mittel der vier Quadranten welches verdoppelt und mit 10^4 multipliziert wurde:

$$(Z \text{ ges}) / 4 \times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

2.2.2 Propagation, Aufreinigung und Titerbestimmung adenoviraler Vektoren

Die verwendeten AdV, AdIL-2, AdCD40L und AdLacZ, waren bereits im Labor vorhanden (siehe 2.1.3). Um eine ausreichende Menge für die *in vitro* und *in vivo* Experimente zu erhalten, wurden die AdV mit Hilfe der Verpackungszelllinie 911 amplifiziert. Im Schnitt wurden zu diesem Zweck $2,5 \times 10^8$ 911-Zellen mit dem entsprechenden AdV transduziert. Um die viralen Partikel freizusetzen mussten die Zellen lysiert werden. Danach konnten die AdV mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt werden. Anschließend wurde das CsCl durch Dialyse gegen PBS aus der Viruslösung entfernt. Zum Schluss wurde der Virus-Titer sowohl durch Messung der optischen Dichte als auch über einen *Plaque-Assay* bestimmt.

2.2.2.1 Amplifikation von AdV mittels 911-Zellen

Vor der Transduktion wurden die 80-90 % konfluenten 911-Zellen mit Transduktionsmedium gewaschen und dann mit AdV-Stock transduziert. Um die Virusausbeute zu erhöhen wurde in der Regel eine 80-90 % konfluente Kulturplatte 911-Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1 (d.h. 1 *plaque forming unit* pro Zelle) vortransduziert. Anhand des Titers des verwendeten Virusstocks errechnet sich das zu verwendende Virusvolumen. Um die Diffusionsstrecke für das Virus gering zu halten, wurde für die Transduktion möglichst wenig Medium verwendet. Die errechnete Virusstockmenge wurde in 4 ml Transduktionsmedium resuspendiert und auf den Zellrasen gegeben. Das HS im Transduktionsmedium begünstigt die Aufnahme der AdV in die Zellen zusätzlich. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 20 ml komplettes 911-Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale abgelöst sobald sich die Ad-induzierten zytopathischen Effekte zeigten. Der zytopathische Effekt wurde durch ein sukzessives Abkugeln und Lösen der Zellen von der Kulturschale gekennzeichnet. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der überwiegende Teil der AdV noch in den Zellen (Wold und Horwitz, 2007). Optimaler Weise sollten 80 % der Zellen zum Zeitpunkt der Ernte bereits abgekugelt, die Mehrzahl jedoch noch adhären sein. Nach dem Ernten wurden die Zellen zentrifugiert und in 1 ml PBS⁺⁺ mit 10 % Glycerol resuspendiert. Anschließend wurden die 911-Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem N₂ und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C lysiert und so die Viruspartikel freigesetzt. Zelltrümmer wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 3000 U/min (4 °C) pelletiert und der Überstand, der die freigesetzten Viruspartikel enthielt, abgenommen. Die Virussuspension wurde bis zur Hauptinfektion bei -80 °C gelagert.

Für die Hauptinfektion wurden 911-Zellen auf 30 Kulturplatten bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Die in der Vorinfektion gewonnenen AdV wurden in 120 ml Transduktionsmedium resuspendiert und in 4 ml Portionen auf die Kulturplatten verteilt. Ernte und Freisetzung der AdV erfolgten wie oben beschrieben. Das dreimalige Einfrieren und Auftauen fand in 8 ml PBS⁺⁺ mit 10 % Glycerol statt. Der vektorhaltige Überstand (ca. 8 ml) wurde bis zur CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Aufreinigung adenoviraler Vektoren mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Aufreinigung der AdV wurde eine zweistufige CsCl-Dichtegradientenultrazentrifugation mit anschließender Dialyse durchgeführt.

Diese Methode beinhaltet drei Schritte:

1. Zentrifugation mit diskontinuierlichem CsCl-Gradient, um Zelltrümmer und Zellmembranen sowie Proteine und Teile der defekten viralen Partikel zu entfernen.
2. Zentrifugation mit kontinuierlichem CsCl-Gradient, um die Restkontamination mit defekten Viruspartikeln zu entfernen.
3. Dialyse gegen PBS, um das CsCl aus der Virusstocklösung zu entfernen.

2.2.2.2.1 Zentrifugation über einen diskontinuierlichem CsCl-Gradient

In zwei Optiseal Ultrazentrifugenröhrchen wurden je 3 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,45 g/ml pipettiert. Diese wurde mit 4,5 ml CsCl-Lösung mit 1,20 g/ml Dichte überschichtet, wobei darauf zu achten war, die beiden CsCl-Lösungen nicht zu vermischen. In jedes der beiden Röhrchen wurden etwa 4 ml der ungereinigten vektorhaltigen Lösung gegeben und mit PBS⁺⁺/10 % Glycerol aufgefüllt und gegeneinander austariert. Dann wurden beiden Röhrchen in den Ausschwingrotor (SW41Ti) überführt und bei 17 °C und maximaler Beschleunigung von 32000 U/min über eine Stunde ungebremst ultrazentrifugiert. Die Virusdichte betrug 1,3 g/ml. Gemäß ihrer Dichte reicherten sich die Viren an der Phasengrenze der CsCl-Lösungen an. Unterhalb der Virusbande befanden sich Zellreste höherer Dichte. In einer diffusen, dünnen Bande oberhalb der Virusbande, sammelten sich defekte virale Partikel niedrigerer Dichte. Die Virusbanden beider Röhrchen wurden mit einer langen Kanüle entnommen (ca. 1-2 ml) und in ein frisches OptiSeal Röhrchen überführt.

2.2.2.2.2 Zentrifugation über kontinuierlichem CsCl-Gradient

Das Optiseal Röhrchen mit dem Ertrag der 1. Ultrazentrifugation wurde mit CsCl-Lösung der Dichte 1,33 g/ml aufgefüllt und luftdicht mit einem Gummistopfen sowie einem kleinen Metallkappchen verschlossen. Es wurde auf einer Feinwaage gegen ein Tara-Röhrchen genau austariert und beide Röhrchen in einen Festwinkelrotor (SW50Ti Nr. 8686) gesteckt. Die zweite Ultrazentrifugation erfolgt über 12 Stunden bei 17 °C und 40000 U/min mit maximaler Beschleunigung und schwacher Bremskraft. Anschließend

wurde das vektorhaltige Röhrchen zuerst entlüftet, dann eine Kanüle unterhalb der Virus-Bande durch das weiche Plastik eingeführt, um die Virusbande vorsichtig entnehmen zu können (ca. 1 ml).

2.2.2.2.3 Dialyse

Die hohe Konzentration von CsCl in der Virus-Suspension kann die adenovirale Zelltransduktion stören und zytotoxisch wirken. Deshalb wurde das CsCl in vier Dialyseschritten gegen PBS entfernt. Hierfür wurde die Virussuspension in eine Dialysekammer überführt und für 30 min gegen PBS dialysiert. Um das Ausfällen von CsCl zu vermeiden, fand die erste Dialyse bei RT statt. Die zweite und dritte Dialyse wurde bei 4 °C für je eine Stunde durchgeführt. Das PBS wurde nach jeder Dialyse erneuert. Für die letzte Dialyse wurde PBS⁺⁺ mit 10 % Glycerol als Puffer verwendet. Der Virusstock wurde anschließend steril filtriert (0,2 µm Porengröße), zu je 20 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Bestimmung der opu einer Virussuspension

Mit der Messung der optischen Dichte wurde die Gesamtzahl der Viruspartikel (opu) in der Virussuspension ermittelt. Da die Methode schnell und ihre Ergebnisse sehr konstant sind, ermöglicht sie eine gute erste Aussage über die Ausbeute der aufgereinigten Viruspräparation. Da sie jedoch als physikalische Methode alle Viruspartikel unabhängig von der Funktionalität der AdV misst, lässt diese Methode keine Aussage über die Transduktionsqualität der Vektoren zu. Anhand der opu kann jedoch der Virustiter geschätzt und somit die Verdünnungsstufen im *Plaque-Assay* angepasst werden. Für die Bestimmung der OD wurden 30 µl der Virussuspension zu 720 µl frisch angesetztem OD-Puffer gegeben. Um die Viren zu inaktivieren, wurde die Lösung 10 min bei 56 °C und 800 U/min zentrifugiert. Danach wurde je eine Quarzküvette mit der Lösung und eine weitere Küvette mit OD-Puffer als Referenzwert gefüllt. Die Messung der Viruspartikel erfolgte im Photometer bei 260 nm.

Die opu/ml berechneten sich wie folgt:

$$\text{opu} = \text{OD}_{260} \times 25 \text{ (VF (Verdünnungsfaktor))} \times 1,1 \times 10^{12}$$

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

2.2.2.4 Bestimmung des Virustiters mittels *Plaque-Assay*

Mit dem *Plaque-Assay* wurden, anders als bei der optischen Dichtemessung, die infektiöse Viruspartikel als pfu/ml bestimmt. Der *Plaque-Assay* stellt somit die Standard Methode zur Titerbestimmung viraler Lösungen dar (Graham *et al.*, 1991). Drei Tage vor Testbeginn wurden 911-Zellen auf drei 6-Lochplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von nahezu 100 % inkubiert. Eine aufsteigende Verdünnungsreihe wurde entsprechend den Ergebnissen der opu-Bestimmung angesetzt. Sollte keine OD-Bestimmung vorgelegen haben, wurde standardmäßig mit einer Verdünnungsreihe von $1:10^8$ bis $1:10^{12}$ gearbeitet. Es wurden 40 μ l des Virusstocks mit 4 ml Transduktionsmedium verdünnt (1:100). Davon wurden 400 μ l in ein Reaktionsgefäß mit 3,6 ml Transduktionsmedium gegeben (1:1000) usw. bis zu einer Verdünnungsstufe von $1:10^{12}$. Die 911-Zellkulturen wurden zuerst mit Transduktionsmedium gewaschen. Anschließend wurde in jedes Loch der 6-Lochplatten 1 ml der Virusverdünnung à drei Löcher pro Verdünnungsstufe pipettiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich drei Löcher mit virusfreiem Transduktionsmedium gefüllt. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und zwischenzeitlich vorsichtig geschwenkt. Nach 2 Stunden wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in jedes Loch 4 ml Agarosemedium gegeben. Für das Überschichtungsmedium wurde Agarose Typ VII in einem Mikrowellengerät verflüssigt und anschließend mit 2 x MEM im Verhältnis 1:1 und 2 % HS gemischt. Bei RT erstarrte die Überschichtung in etwa 10-15 min. Der *Plaque-Assay* wurde weitere 7-10 Tage im Brutschrank inkubiert.

Die Auswertung des *Plaque-Assays* folgte unter dem Lichtmikroskop durch Zählen der entstandenen *Plaques* in den verschiedenen Verdünnungsstufen. Die *Plaques* stellten lokale zytopathische Effekte der 911-Zellen dar, die durch die aktive Propagation der Viruspartikel entstanden sind. In der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch *Plaques* erkennbar waren, wurden diese arithmetisch gemittelt und die pfu nach folgender Formel berechnet:

$$\text{pfu/ml} = \text{Plaques} \times \text{Verdünnung} / \text{Volumen}$$

2.2.3 Murine dendritische Zellen

2.2.3.1 Isolieren muriner dendritischer Zellen

Für die Experimente wurden DC aus C3H-Mäusen verwendet. Hierzu wurden DC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C3H-Mäusen isoliert (Inaba *et al.*, 1992).

2.2.3.1.1 Gewinnung von Knochenmark nach Inaba *et al.*

Vier Wochen alten Mäuse wurden zunächst mit Isofluran betäubt und dann mittels zervikaler Dislokation getötet. Den Tieren wurden Tibia und Femur beidseitig entnommen und in gekühltes DC-Medium überführt. Unter der Sterilwerkbank wurden die Knochen sauber präpariert, kurz in 70 % Ethanol gewaschen und in sterilem DC-Medium zwischengelagert. Der Markraum der Knochen wurde durch das Abschneiden beider Epiphysen eröffnet. Mit einer dünnen Kanüle und einer 10 ml Spritze wurde der Markraum mit DC-Medium gespült bis der Knochen hellweiß wurde. Das Mark wurde in einem Zellsieb mit 100 µm Porengröße aufgefangen. Die Zellsuspension wurde dann 5 min bei 1200 U/min abzentrifugiert. Um die Erythrozyten zu entfernen wurde das Zellpellet in 10 ml Erythrozyten-Lyse Puffer pro Maus resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelllösung wurde erneut abzentrifugiert, und anschließend in 10 ml PBS gewaschen und ausgezählt.

2.2.3.1.2 Zellseparation mittels MACS (*Magnetic-Activated Cell Sorting*)

Für die MACS Zellseparation wurden die Zellen aus dem Knochenmark zunächst mit einem Ratte-Anti-Maus-Antikörpergemisch inkubiert. Die Menge Antikörper richtet sich nach der ermittelten Zellzahl. Pro 10^6 Zellen wurden 6 µl der Antikörpermischung benötigt. Durch die Inkubation mit den Antikörpern wurden verschiedene Lymphozytenpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenantigene markiert (siehe Tabelle 1) (Schmidt *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 1998)).

Antikörper	Prozentualer Anteil an der Mischung	Zielzelle des Antikörpers
LY6G-Antikörper	40 %	Granulozyten
CD45R-Antikörper	30 %	T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen
MHC-II- Antikörper	10 %	Makrophagen
CD4-Antikörper	10 %	T-Zellen
CD8-Antikörper	10 %	T-Zellen

Tabelle 1: Zusammensetzung der Antikörpermischung zur Markierung verschiedener Lymphozytenpopulationen für die magnetische Zellseparation.

Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 50 µl PBS unter Zugabe des Antikörpermischs resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde dann in 80 µl MACS-Puffer mit 20 µl Ziege-Anti-Ratte *MicroBeads* pro 10^7 Zellen resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. *MicroBeads* sind an Antikörper gebundene Magnetpartikel. Sie können spezifisch an die Fc-Region der oben genannten primären Antikörper binden. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 500 µl MACS-Puffer/Maus resuspendiert. Beim Durchlaufen einer Trennsäule in einem starken Magnetfeld wurden die markierten Zellen zurückgehalten (sogen. negative Selektion).

2.2.3.1.3 Kultivierung von DC

Die nach der MACS-Depletion gewonnenen Zellen wurden durch erneute Zentrifugation pelletiert, in 5 ml DC-Medium resuspendiert und ausgezählt. Die Zelllösung wurde auf 2 ml DC-Medium pro 10^6 Zellen eingestellt. Dem Medium wurden 200 IE/ml GM-CSF und 100 IE/ml IL-4 (Romani *et al.*, 1994) hinzugegeben. Zuletzt wurden die Zellen zu je 1×10^6 Zellen pro Loch auf 6-Lochplatten ausgesät. Sie wurden im Brutschrank inkubiert. Am Tag +4 nach der Herstellung wurden 1,5 ml Medium pro Loch abgenommen und durch 2 ml frisches DC-Medium mit GM-CSF und IL-4 ersetzt.

2.2.3.2 Pulsen von DC mit TAA

DC können Antigene aufnehmen, prozessieren und sie an ihrer Oberfläche präsentieren. Dadurch sind sie in der Lage, TAA-spezifische Effektorzellen zu aktivieren. Um DC mit TAA *in vitro* zu beladen, wurde den DC-Kulturen am Tag +5 Tumorlysat aus Hepa129-Zellen zugesetzt. Pro 1 ml Kulturmedium wurden 100 µg Tumorlysat benötigt. Das Lysat wurde in 2 ml DC-Medium und 200 IE/ml GM-CSF und 100 IE/ml IL-4 gelöst und gleichmäßig in die Löcher der 6-Lochplatten verteilt. Die Platten wurden leicht geschwenkt und weiter inkubiert.

Um die Fähigkeit der TAA gepulsten DC indirekt zu überprüfen, spezifische Effektorzellen zu induzieren, wurde am Tag +8 eine Kokultur mit Milzlymphozyten angelegt und deren spezifische Zytotoxizität gegen Hepa129-Zellen gemessen (siehe 2.2.4.5).

2.2.3.3 Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren

Am Tag +6 wurden die DC mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und geerntet. Sie wurden 5 min bei 1200 U/min und RT zentrifugiert. Anschließend wurden die DC ausgezählt und in Reaktionsgefäße überführt. Für jeden verwendeten AdV wurde das gewünschte MOI berechnet und eine Masterlösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angelegt. Die DC wurden dann mit den verschiedenen Vektoren und entsprechenden MOI beschickt. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Pellets in je 0,5 ml DC-Medium resuspendiert und auf 6-Lochplatten überführt. In jedes Loch wurden 1,5 ml DC-Medium mit 200 IE/ml GM-CSF und 100 IE/ml IL-4 pro ml Gesamtvolumen gegeben und die Zellkultur im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.4 Kokultur von DC mit Milzlymphozyten

2.2.3.4.1 Gewinnung von Milzlymphozyten

C3H-Mäuse wurden zunächst mit Isofluran betäubt und dann mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Milz wurde herauspräpariert und in 4 °C kaltes DC-Medium überführt. Unter der Sterilwerkbank wurde die Milz mit dem Stempel einer sterilen Spritze durch ein Zellsieb von 100 µm Porengröße gedrückt und mit Medium nachgespült. Die aufgefangenen Zellen wurden 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Das Pellet wurde in 5 ml Erylysepuffer pro Maus

resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelllösung wurde erneut zentrifugiert und die so gewonnenen Milzlymphozyten in 10 ml PBS⁺⁺ mit 1 % BSA gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in je 7,5 ml Lymphozyten-Medium mit 10 µl/ml IFN-γ pro Maus resuspendiert und die Zellen von je zwei Tieren in einer T-75 Kulturflasche über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Tag +1 wurde der Zustand der Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und dem Medium IL-2 (300 IE/ml), IL-1β (10 IE/ml) sowie Anti-CD3 (50 IE/ml) zugesetzt. Am Tag +4 wurde den Milzlymphozyten weitere 300 IE/ml IL-2 zugegeben. IL-2 dient als Wachstumsfaktor für die Lymphozyten. Dieser Schritt wurde am Tag +6 wiederholt.

2.2.3.4.2 Kokultur von Lymphozyten mit transduzierten DC

48 Stunden nach adenoviraler Transduktion (siehe 2.2.3.3) werden die DC mit einem Zellschaber von den 6-Lochplatten gelöst und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und der Überstand zur späteren Bestimmung der Zytokine mittels ELISA bei -20 °C aufbewahrt (siehe 2.2.3.7). Die Milzlymphozyten wurden am Tag +8 ebenfalls geerntet und ausgezählt. Sie wurden im Verhältnis 5:1 mit den DC kokultiviert (5 Lymphozyten pro 1 DC). Anschließend wurden sie in 6-Lochplatten mit 2 ml Lymphozytenmedium pro Loch ausgesät. Am Tag +11 wurde humanes IL-2 zum Medium hinzugegeben (300 IE/ml).

2.2.3.5 ⁵¹Chrom-Freisetzungszytotoxassay

Mit dem Standard-4h-⁵¹Cr-Freisetzungszytotoxassay wurde gezeigt, dass naive Milzlymphozyten durch die Kokultur mit Hepa129-Lysat gepulsten DC eine spezifische Zytotoxizität gegenüber Hepa129-Zellen induzieren können. Die Zielzellen (Hepa129-Zellen) wurden 1,5 Stunden mit ⁵¹Cr radioaktiv markiert und anschließend über 4 Stunden mit den Effektorzellen (DC-kokultivierte Lymphozyten) inkubiert. Die maximale ⁵¹Cr-Asschüttung wurde durch die Inkubation der Zielzellen mit 0,1 % IGEPAL erreicht. Zur Bestimmung der Spontanabgabe von ⁵¹Cr dienten Hepa129 ohne Lymphozyten.

Die stimulierten T-Zellen lysierten die Hepa129-Zellen und das vorher aufgenommene ⁵¹Cr wurde freigesetzt. Die Menge an radioaktivem ⁵¹Cr konnte mittels eines Szintillationszählers im Überstand gemessen werden und gab so Aufschluss über das Ausmaß der T-Zell-induzierten Zellyse.

Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

Zytotoxizität in % = $(\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung}) / (\text{maximale } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung})$.

2.2.3.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden vereinzelte Zellen in einer laminaren Strömung an einem Laserstrahl (Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm) vorbeigeführt. Aufgrund der Vorwärtsstreuung des Laserstrahls (*forward scatter*) kann die Größe der Zellen bestimmt werden. Durch die Seitwärtsstreuung des Lichtes (*sideward scatter*) wird die Granularität bestimmt. Darüber hinaus kann die Expression bestimmter Oberflächenproteine quantifiziert werden. Dazu wurden die Zellen im Vorfeld mit Fluoreszenzantikörpern (FITC oder PE) markiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzstärke der Farbstoffe im Durchflusszytometer mit Photodetektoren gemessen. Die Daten der untersuchten Zellen wurden gesammelt und als Histogramm dargestellt.

2.2.3.6.1 Antikörperfärbung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Zur Fluoreszenzmarkierung wurden Fluorescein-isothiocyanat (FITC)- und Phycoerythrin (PE)-gekoppelte Antikörper verwendet. FITC (grün) wurde bei einer Wellenlänge 468-509 nm angeregt, sein emittiertes Licht lag bei 504-541 nm. PE (orange-rot) wurde bei 486-580 nm angeregt, sein emittiertes Licht lag bei 568-590 nm (Produktbeschreibung der monoklonale Antikörper 4B4-FITC und 4B4-RD1 für CytoStat® / Coulter Clone®, Beckman Coulter Inc., 2004) (Shapiro, 2003).

Als Standardmarker für murine DC wurde CD11c (Metlay *et al.*, 1990) auf den Zellen markiert. Weiterhin wurden CD40, CD80 und CD86 als Ausreifungsmarker angefärbt (Inaba *et al.*, 1994) sowie CD40L um die Transgenexpression von AdCD40L transduzierten DC zu messen.

Hierzu wurden DC mit einem Zellschaber von den 6-Lochplatten gelöst und 5 min bei 1200 U/min pelletiert. Der Überstand der einzelnen Proben wurde abpipettiert und für eine später ELISA-Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

Danach wurden die Zellen in 1 ml PBS⁺⁺ mit 1 % BSA resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 4000 U/min abzentrifugiert, in 80 µl PBS⁺⁺ mit 1 % BSA resuspendiert und auf Eis gelagert.

Für jeden Antikörper wurde eine Masterlösung der benötigten Menge vorbereitet und daraus die entsprechende Menge in beschriftete Reagenzröhrchen pipetiert. Die DC wurden mit je einem FITC- (5 µl) und einem PE- Antikörper (2,5 µl) inkubiert. Das Gemisch aus Zellen und Antikörpern wurde 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in je 1 ml PBS⁺⁺ mit 1 % BSA resuspendiert. Die Proben wurden kurz vor der Messung gevortext. Die Messung erfolgte in einem EPICS XL Durchflusszytometer. Anhand der Isotypenfärbung bzw. Positivkontrollen wurde die Fluoreszenzverstärkung kompensiert. Pro Messung wurden mindestens 10.000 Zellen berücksichtigt. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms FCS Express Version 3 der Firma De Novo Software analysiert und dargestellt.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung und Proteinbestimmung des Tumorlysats

Um die DC mit TAA des HCC beladen zu können, wurden zuvor Hepa129-Zellen lysiert. Hierzu wurden Hepa129-Zellen geerntet, bei 1200 U/min 5 min zentrifugiert und dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Hepa129 in einem Pellet vereinigt. Das Zellpellet wurde dreimal wechselseitig in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und gevortext (Feuere r *et al.*, 2001). Die Zellsuspension wurde bei 3000 U/min 5 min zentrifugiert, der homogene Überstand mit den Zellproteinen in Aliquots à 200 µl in Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C eingefroren.

Der Proteingehalt des hergestellten Hepa129-Tumorlysats wurde mittels des *DC Protein Assays* von Bio-Rad nach Herstellerangaben gemessen. Hierbei wurde die Proteinkonzentration einer Probe photometrisch bestimmt und mit einer Verdünnungsreihe aus BSA-Lösungen definierter Konzentrationen verglichen. Grundlage dieses Tests bildet die primäre Reaktion des Kupfers im basischen Milieu mit den Peptidbindungen der Proteine sowie in einem zweiten Schritt die Reduktion des Folin durch die dabei freigesetzten Cu⁺, was zur Blaufärbung führt (Lowry *et. al.*, 1951).

Verschiedene, mit PBS verdünnte, BSA-Konzentrationen von 1,4 µg/µl, 1,2 µg/µl, 1,0 µg/µl, 0,8 µg/µl, 0,6 µg/µl, 0,4 µg/µl und 0,2 µg/µl wurden in einer 96-Lochplatte angelegt. Als Leerwert diente PBS ohne BSA.

Anhand dieser Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt, an der die Proteinkonzentration der Proben bestimmt wurde. In jedem Loch der Standardreihe wurden 5 µl der Probe vorgelegt. Dann wurden in alle beschickten Löcher der Platte (Eichreihe und Proben) 25 µl einer Mischung aus den Lösungen A und S (Kupfertartrat-Lösung) sowie 200 µl der Lösung B (Folinreagenz) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 700 nm im ELISA-Reader bestimmt.

2.2.4.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* für IL-2 erfolgte die quantitative Messung von IL-2 im Überstand von AdIL-2-transduzierten DC oder Kokulturen von DC mit Milzlymphozyten. Als Prinzip lag diesem Immunoassay eine sogenannte Sandwich-Methode mit zwei Antikörpern zu Grunde. In eine mit Primärantikörpern für IL-2 beschichtete 96-Loch Mikrotiterplatte wurden je 100 µl des Zellüberstandes pipettiert und zwei Stunden inkubiert. Das zu bestimmende Zytokin wurde von den monoklonalen Antikörpern, die den Boden der Platte beschichten, fixiert. In einem zweiten Schritt wurden 100 µl biotinylierte Sekundärantikörper hinzugegeben, die an den immobilisierten Antikörper-Zytokin-Komplex banden. Nach einstündiger Inkubation wurde überschüssiges Konjugat durch dreimaliges Waschen mit Pufferlösung entfernt. Nachfolgend wurden 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung hinzugefügt und die Platte für 30 min inkubiert. Streptavidin band an den Biotinrest des Sekundärantikörpers und fixierte so das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) am Antikörper-Zytokin-Antikörper-Komplex. Zuletzt wurden 100 µl TMB (Tetramethylbenzidin)-Substrat-Lösung als Chromogen hinzugefügt, welches durch die Meerrettichperoxidase oxidiert wurde und eine blaue Farbe annahm. Durch die Zugabe eines Stoppreagenzes (H_2SO_4) bildete sich ein stabiler gelber Komplex, der gleichzeitig das Reaktionsende anzeigte. Die entstandene Menge an Farbkomplexen war direkt proportional der Menge an gebundenem Konjugat und damit der Menge von IL-2. Im letzten Schritt wurde die Absorption photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen; die IL-2-Konzentration konnte dann durch den Abgleich mit vorhandenen Standardkurven ermittelt werden. Es wurden für alle Proben jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.5 Tierexperimente

Wegen seiner einfachen Handhabung wurde für die Experimente des hier beschriebenen Forschungsvorhabens ein *s. c.* Tumormodell für das HCC eingesetzt. Die *s. c.* HCC waren gut reproduzierbar, das Tumorstadium nach wenigen Tagen sichtbar und einfach zu verfolgen. Da nur eine kurze Narkose und keine Operation zur Tumorinduktion benötigt wurde, war dieses Modell darüber hinaus für die Tiere schonender als orthotope Modelle. Zur Induktion der *s. c.* HCC wird die Zelllinie Hepa129 in syngen C3H-Mäusen verwendet. Das Tumormodell war in unserem Labor bereits etabliert. Es wurden männliche Tiere im Alter zwischen 8 und 12 Wochen verwendet. Zuerst wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit 100 µl einer Mischung aus Xylacin 2 % (0,01 mg/g Körpergewicht) und Ketamin (0,1 mg/g Körpergewicht) in NaCl -Lösung 0,9 % (Verhältnis 1:2:2) betäubt und dorso-lateral rasiert. Anschließend wurden 1×10^6 Hepa129-Zellen in 100 µl RPMI 1640 *s. c.* in die rechte Flanke injiziert. Die Tiere wurden bis zum Erwachen engmaschig beobachtet. Einige Tage nach der Tumorinduktion waren die Tumoren tastbar. Sobald der Tumor ein Volumen von etwa 100 mm³ erreicht hatte wurde mit der Therapie begonnen.

Die *in vivo* Versuche an C3H Mäusen wurden in Übereinstimmung mit den geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt und vom Bezirksregierungspräsidenten in Köln genehmigt (Az. 50.203.2-BN22).

2.2.5.1 Intratumorale Behandlung mit DC

Zur Therapie der Tumoren wurden AdCD40L- bzw. AdIL-2-transduzierte murine DC verwendet. Als Kontrolle dienen AdLacZ-transduzierte DC.

Vor jeder Behandlung wurden die Tiere, wie oben beschrieben, zunächst betäubt und dann 1×10^6 DC in 100µl RPMI 1640 *i. t.* in den *s. c.* Tumor injiziert. Jeder tumortragenden Maus wurde zweimal mit jeweils 1×10^6 DC behandelt, beginnend an Tag +11, mit 5 Tagen Pause zwischen den Applikationen. Über den Behandlungszeitraum hinweg wurde der Allgemeinzustand der Tiere alle 2-3 Tage kontrolliert und der Tumor in 2 Ebenen mit einem Messschieber gemessen. Mit der Formel für ellipsoide Körper (Länge x Breite x 0,52) konnte das Tumorstadium errechnet werden. Bei Erreichen eines Tumorstadiums von mehr als 2000 mm³ wurden die Tiere aus ethischen Gründen durch Genickbruch getötet.

2.2.6 Statistik

Bei den *in vivo* Experimenten wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung des gemessenen Tumolvolumens dargestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen mit verschiedenen Behandlungen wurden mit dem *Student's t-Test* für ungepaarte Stichproben berechnet. Hierzu wurden die Computerprogramme Origin und InStat verwendet. Ein Unterschied von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Vektoramplifikation von AdIL-2

Bei allen drei verwendeten AdV (AdIL-2, AdCD40L und AdLacZ) handelte es sich um Vektoren der 1. Generation, bei denen E1- und E3- Gene deletiert wurden, um die Replikationsfähigkeit des Virus auszuschalten. Adenoviren, die keine E1-Proteine mehr exprimieren, sind zwar in der Lage effizient Zielzellen zu infizieren, können sich in diesen jedoch nicht selbstständig replizieren. Sie müssen deswegen mit Hilfe von Verpackungszellen, wie z.B. 911-Zellen, welche die E1-Gene in *trans* zur Verfügung stellen, produziert werden (Kochanek, 2001).

Für die Versuche wurden mehrmals AdV in 911-Zellen amplifiziert. Zur Amplifikation wurden 80-90 % konfluente 911-Zellen mit den AdV bei MOI 1 vortransduziert. Die hier geernteten Vektoren wurden zur Transduktion 30 weiterer 911-Zellkulturplatten verwendet. Für eine maximale Ausbeute wurden die Verpackungszellen lichtmikroskopisch beobachtet, um zytopathische Effekte zu kontrollieren. Optimaler Weise zeigten 80 % der Zellen zum Zeitpunkt der Ernte zytopathische Effekte, die Mehrzahl sollte jedoch noch adhären gewesen sein (siehe Abb.5).

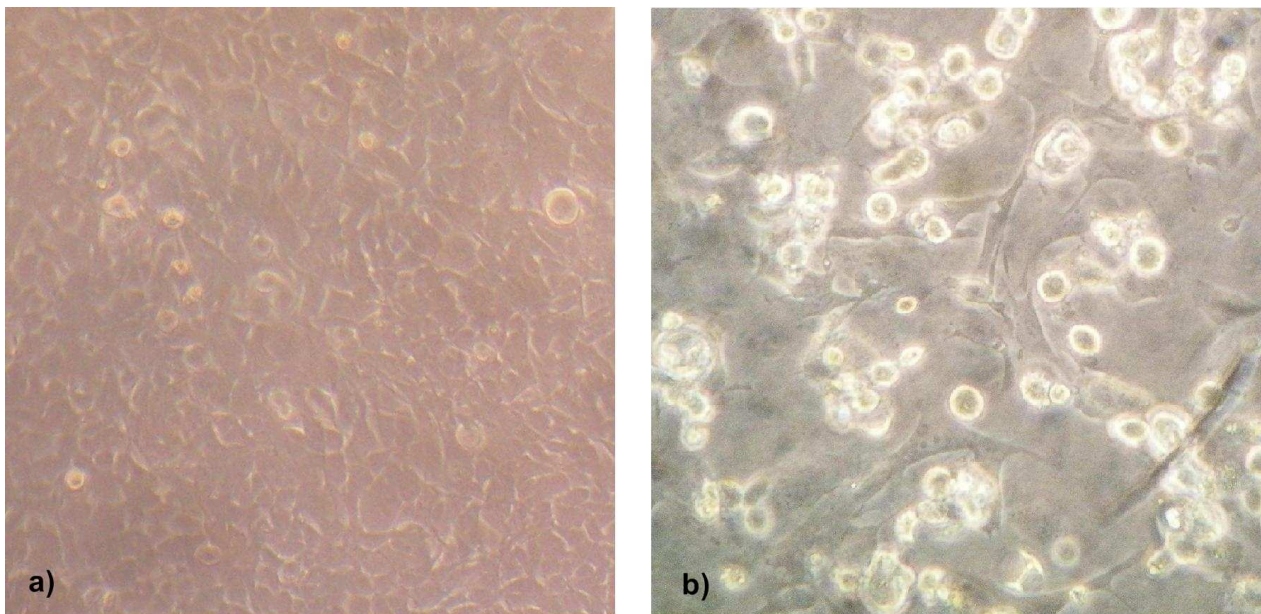


Abb. 5: a) Nicht-transduzierte 911 Zellen, Konfluenz etwa 90 %. b) Erkennbarer zytopathischer Effekt bei 911-Zellen an Tag +2 nach Transduktion mit AdIL-2 bei MOI 1.

Die adenoviralen Vektoren aus den 30 Zellkulturplatten wurden geerntet und anschließend, wie in 2.2.2.2 beschrieben, mittels zweistufiger CsCl-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Dialyse aufgereinigt. Durch die erste Ultrazentrifugation über einen diskontinuierlichen CsCl-Gradient wurden Zelltrümmer, Zellmembranen, Proteine und defekte virale Partikel entfernt. Nach der Zentrifugation entstanden zwei dünne Banden in der Mitte des Röhrchens. Die untere entsprach den AdV, die eine Dichte von 1,3 g/ml besitzen. Oberhalb der AdV-Bande konnte eine zweite, dünnere Bande mit defektiven Vektoren einer Dichte $< 1,3$ g/ml identifiziert werden. Weiterhin fand sich über den beiden Banden ein diffuser Schleier aus Zellresten (siehe Abb. 6a). Die Restkontamination mit defekten Vektoren wurde durch eine zweite Zentrifugation über einen kontinuierlichen CsCl-Gradient entfernt.

Mit dieser zweiten Ultrazentrifugation konnte eine distinkte Virusbande von ca. 1,3 g/ml Dichte in der Mitte des Röhrchens erreicht werden (siehe Abb. 6b). Diese beinhaltete die konzentrierten AdV und konnte mit einer Kanüle entnommen werden. Da CsCl die Zelltransduktion stören kann, wurde es durch viermalige Dialyse gegen PBS aus der Viruslösung entfernt. Anschließend wurden die AdV aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

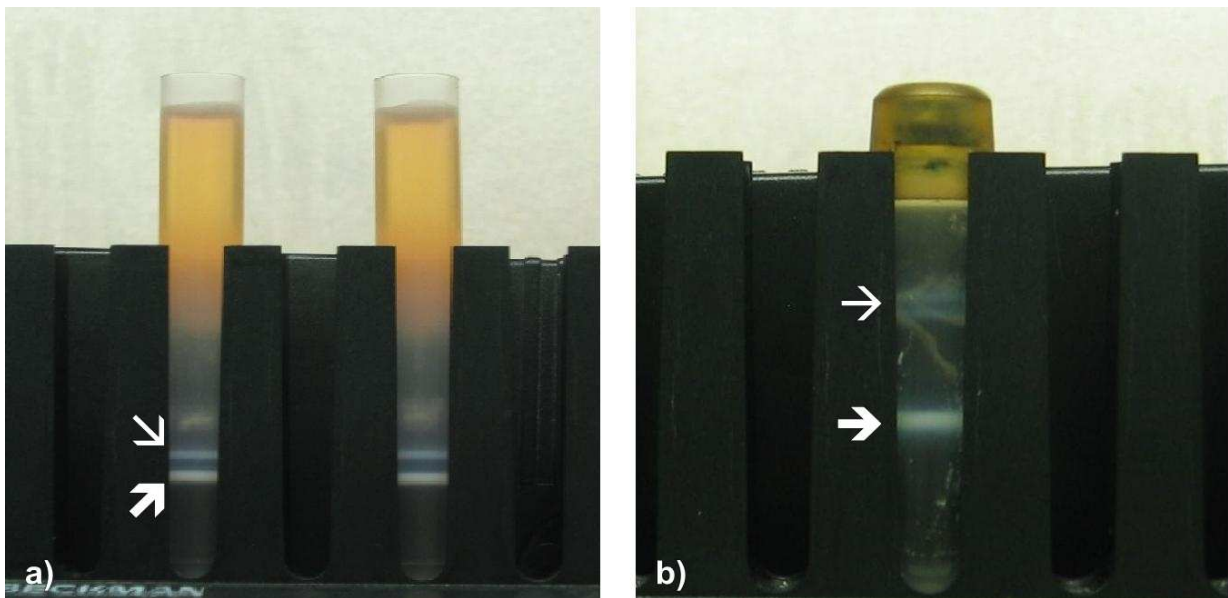


Abb. 6: Aufreinigung der adenoviralen Vektoren a): Die untere Bande in der Mitte des Röhrchens entspricht dem Virus nach der ersten Ultrazentrifugation (dicker Pfeil). Die obere Bande entspricht defektiven Viruspartikeln (dünner Pfeil). Oberhalb befinden sich andere, leichtere zelluläre Komponenten. b): Die dicke Bande in der Mitte des Röhrchens entspricht den konzentrierten adenoviralen Vektoren nach der zweiten Ultrazentrifugation (dicker Pfeil). Die diffuse Bande darüber enthält defekte Viren (dünner Pfeil).

3.1.1 Titerbestimmung einer Viruslösung

Um die aufgereinigten AdV verwenden zu können, musste der Titer der Virusstocklösung bestimmt werden. Um die Gesamtzahl der enthaltenen Viruspartikel zu quantifizieren (opu/ml), wurde sowohl die optische Dichte (OD) bestimmt als auch ein *Plaque-Assay* durchgeführt (siehe 2.2.2.3 und 2.2.2.4).

3.1.1.1 OD-Bestimmung

Durch die photometrische Messung der Absorption bei 260 nm wurden die opu/ml ermittelt. Die Methode kann allerdings nicht zwischen infektiösen und defekten Partikeln unterscheiden. Annäherungsweise konnte die pfu/ml mit Hilfe der nachstehenden Formel aus den Ergebnissen der opu-Bestimmung abgeleitet werden.

Formel zur Berechnung des opu/ml bzw. der pfu/ml durch Messung der OD:	
opu/ml	gemessene OD x 1,1 opu/ml x 25 x 10 ¹²
pfu/ml	opu/20

Bei der ersten Amplifikation des AdIL-2 die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, lag die der Virustiter bei $3,85 \times 10^{11}$ opu/ml und die so ermittelte pfu/ml bei $1,9 \times 10^{10}$.

Bei der zweiten Amplifikation von AdIL-2 lagen der Virustiter bei $4,4 \times 10^{11}$ opu/ml und entsprechend bei $2,2 \times 10^{10}$ pfu/ml, nach oben genannter Formel.

3.1.1.2 *Plaque-Assay*

Der *Plaque-Assay* stellt die Goldstandardmethode zur Titerbestimmung einer Viruslösung dar. Mit dieser Methode kann die Menge tatsächlich infektiöser Partikel bestimmt werden (Graham *et al.*, 1995). Die in 6-Lochplatten konfluent kultivierten 911-Zellen wurden für 2 Stunden mit einer Verdünnungsreihe der Viruslösung inkubiert und anschließend mit Agarose überschichtet. Lichtmikroskopisch waren bereits ab 3-4 Tagen, mit bloßem Auge nach ca. 5 Tagen, erste *Plaques* erkennbar. Nach 10 Tagen wurde der Assay ausgewertet. Abbildung 7 zeigt einen typischen *Plaque* an Tag +7 nach ansetzen des *Plaque-Assays*.

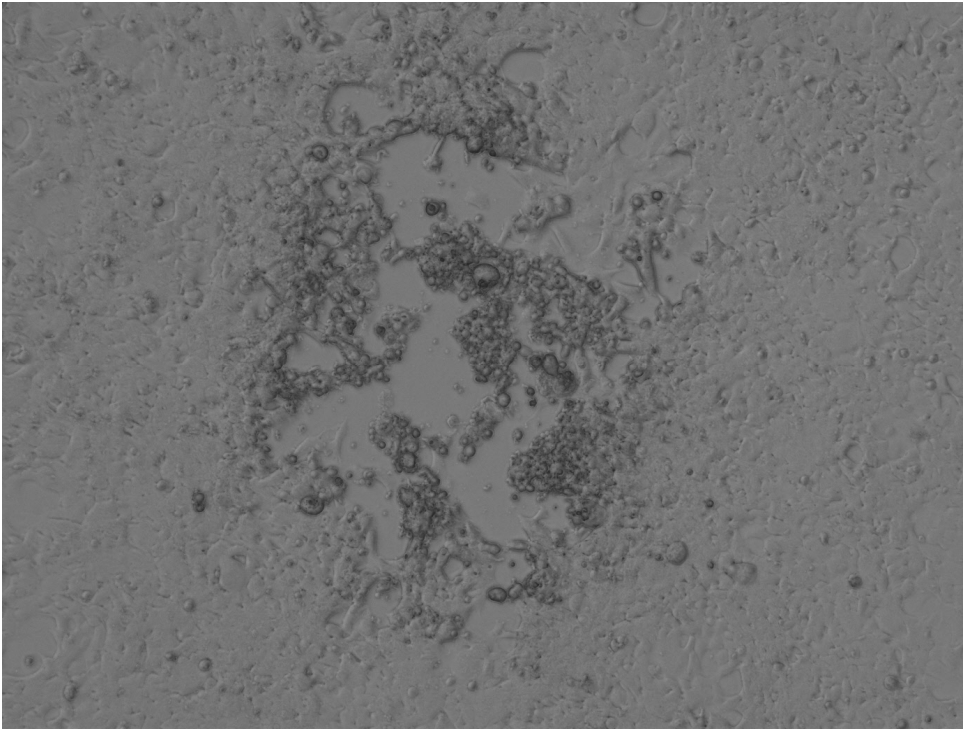


Abb. 7: Beispiel eines Plaques in 911-Zellkultur an Tag +7. Das erkennbare Loch (*Plaque*) im Zellrasen der 911-Zellen entspricht einem typischen zytopathischen Effekt, der durch die AdV hervorgerufen wurde.

Für die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch *Plaques* gefunden werden konnten, wurden diese gezählt und arithmetisch gemittelt. So konnte die pfu/ml berechnet werden (siehe 2.2.2.4). Bei den Virusproduktionen für diese Arbeit konnten Mittels *Plaque-Assay* Titer von $1,0 - 3,0 \times 10^{10}$ pfu/ml ermittelt werden.

Tabelle 2 gibt nachfolgend eine Übersicht über die ermittelten Titer (pfu/ml) für die verschiedenen AdV, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

AdV	Titer in pfu/ml
AdIL-2	
1. Viruspräparation	$1,0 \times 10^{10}$
2. Viruspräparation	$3,0 \times 10^{10}$
AdCD40L	$6,0 \times 10^{10}$
AdLacZ	$1,0 \times 10^{11}$

Tabelle 2: Verwendete AdV und ihr Titer in pfu/ml.

3.2 Herstellung und Antigenbeladung muriner DC

Die für die Experimente dieser Arbeit verwendeten DC wurden aus syngenen C3H-Mäusen gewonnen, *in vitro* mit Tumorlysat beladen und anschließend mit AdIL-2 und AdCD40L transduziert (siehe 2.2.3.1, 2.2.3.2 und 2.2.3.3).

3.2.1 DC Generierung

Wie durch Inaba beschrieben, wurden DC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C3H-Mäusen gewonnen (Inaba *et al.*, 1994). Sie wurden mit Hilfe magnetischer Zellseparation (MACS) angereichert und durch Stimulation mit GM-CSF und IL-4 über 6 Tage zur Ausreifung gebracht (Romani *et al.*, 1994). Es wurden für jeden Versuch Zellen aus dem Knochenmark der Femora und Tibiae von je 4 Mäusen verwendet. Aus dem Knochenmark einer Maus konnten im Durchschnitt $20,8 \times 10^6$ Knochenmarkzellen gewonnen werden. Die gewonnenen Zellen wurden mit einer Mischung verschiedener Antikörper inkubiert, die für Oberflächenmarker bestimmter Lymphozytenpopulationen spezifisch waren. So wurden T-Zellen (CD4, CD8, CD45R), B-Zellen (CD45R), NK-Zellen (CD45R), Granulozyten (LY6G) und Makrophagen (MHC-II) markiert. In einem zweiten Schritt wurden magnetpartikelgekoppelte Sekundärantikörper hinzugegeben, die spezifisch für die Primärantikörper waren, um die markierten Zellen beim Durchlaufen eines starken Magnetfeldes von den DC-Vorläuferzellen zu separieren (negative Selektion) (siehe 2.2.3.1.2). Nach der magnetischen Zellseparation betrug die Ausbeute an DC-Vorläuferzellen im Durchschnitt $13,7 \times 10^6$.

Durch Stimulation mit 200 IE/ml GM-CSF und 100 IE/ml IL-4 im Medium wurden die Zellen zur Reifung angeregt. In wenigen Tagen entwickelten sie sich zu adhärenenten, flächigen Zellen mit zahlreichen Zellausläufern und zeigten so das typische morphologische Erscheinungsbild von DC.

Zum Zeitpunkt der Transduktion (Tag +6) waren im Durchschnitt $12,4 \times 10^6$ DC pro Maus verfügbar (siehe Tabelle 3).

	Zellzahlentwicklung pro Maus	Zur Verfügung stehende Zellen pro Experiment (4 Mäuse)
Medulläre Zellen (nach Erythrozyten- entfernung)	20,8 x 10 ⁶	83,1 x 10 ⁶
DC-Vorläuferzellen nach MACS-Depletion	13,7 x 10 ⁶	54,6 x 10 ⁶
DC vor adenoviraler Transduktion (Tag +6)	12,4 x 10 ⁶	49,5 x 10 ⁶
DC nach adenoviraler Transduktion (Tag +8)	4,2 x 10 ⁶	16,8 x 10 ⁶

Tabelle 3: Ausbeute an Zellen pro Maus nach den einzelnen Arbeitsschritten zur Anreicherung ausgereifter DC.

3.2.2 Beladen der DC mit Tumorantigenen

Unreife DC nehmen sehr effektiv Antigene auf, prozessieren diese und präsentieren sie an ihrer Oberfläche im Kontext von MHC-I- und MHC-II-Molekülen (Schmidt *et al.*, 2003). Die Antigene können dabei von den DC auf zwei unterschiedliche Arten aus der Umgebung aufgenommen werden. Die Aufnahme erfolgt rezeptorvermittelt durch Phagozytose und durch kontinuierliche Aufnahme größerer Mengen Umgebungsflüssigkeit durch Makropinozytose (Jiang *et al.*, 1995; Sallusto *et al.*, 1995). Damit intrazelluläre Tumorzellproteine besser durch Makropinozytose aufgenommen werden können, müssen diese zuvor freigesetzt werden. Dazu werden Hepa129-Zellen, die zur Tumorinduktion *in vivo* verwendet wurden, lysiert (siehe 2.2.4.1). Der Proteingehalt der gewonnenen Tumorlysatsuspensionen schwankte zwischen 3,77 µg/µl und 4,0 µg/µl. Er wurde mit dem *DC Protein Assay* von Bio-Rad, einem modifizierten Lowry-Assay (Lowry *et al.*, 1951), ermittelt. Die DC wurden am Tag +5 mit den gewonnenen Tumorlysats beladen. Dazu wurden den in den 6-Lochplatten kultivierten Zellen jeweils 100 µg Tumorlysats pro ml Kulturmedium zugesetzt. Die DC können diese Proteine internalisieren, prozessieren und anschließend an der Zelloberfläche im Kontext mit MHC-

Molekülen präsentiert. Die Kulturen wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit den AdV transduziert.

3.3 Transduktion von DC und Charakterisierung transduzierter DC

Um Gene in die Zielzelle einzuschleusen zu können, müssen die AdV an die Zelloberfläche binden. Ein für die primäre Anbindung von Ad bzw. AdV notwendige Rezeptor ist der Coxsackieadenovirusrezeptor (CAR). Er wird von DC nicht oder nicht ausreichend exprimiert. Trotzdem können DC effektiv mit AdV transduziert werden (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008). DC exprimieren die zur Internalisation notwendigen α_v Integrine (Tillman *et al.*, 1999). Höchstwahrscheinlich binden die AdV direkt an diese Integrine und werden so in die DC eingeschleust.

Sowohl für die *in vitro* als auch für die *in vivo* Experimente wurden die gepulsten DC am Tag +6 mit AdIL-2 und AdCD40L sowie dem Kontrollvektor AdLacZ transduziert. Dazu wurden die DC am Tag +6 geerntet, unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und zu je 1×10^6 Zellen aliquotiert. Anschließend wurden sie mit AdIL-2, AdCD40L bzw. AdLacZ bei verschiedenen MOI (100-750) transduziert. Am Tag +7 wurden die DC mit $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ LPS stimuliert, um eine bessere transgene Expression zu erreichen (Miller *et al.*, 2003).

3.3.1 Vitalitätskontrolle der transduzierten DC

Der Verlust vitaler Zellen durch die adenovirale Transduktion war vor allem abhängig von den verwendeten MOI. Je höher die MOI war, desto höher war die Zelltoxizität und umso geringer die Ausbeute an vitalen transgenexprimierenden DC.

Mit Hilfe der *in vitro* Experimente sollte die Menge an AdV festgestellt werden, die zu einer optimalen Expression von IL-2 und CD40L führt und dabei eine erhöhte Zahl vitaler DC erhält.

48 Stunden nach der Transduktion (Tag +8 nach DC-Generation) wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Dazu wurden diese in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die abgestorbenen Zellen werden nach Trypanblaufärbung blau, wohingegen die vitalen Zellen heller imponierten. Das Ergebnis wurde mit der Zellzahl von Tag +6 verglichen.

Tabelle 4 gibt die Zahl der vitalen DC vor und nach der Transduktion wieder. In Abb. 8 sind die vitalen Zellen nach AdV gegliedert abgebildet. Beide beziehen sich auf die in 3.3.4 und 3.3.5 für die jeweiligen AdV ermittelten MOI, welche die beste Zellvitalität bei

maximaler Transgenexpression zeigten (AdIL-2: MOI 500, AdCD40L: MOI 250, AdLacZ: MOI 250).

Gesamte Zellzahl vor Transduktion	Gesamte Zellzahl nach Transduktion (alle AdV)	Vitale Zellen nach Transduktion in % (alle AdV)	Rückgang der vitalen Zellen in %
44,5 x 10 ⁶	16,8 x 10 ⁶	33,86 %	66,14 %

Tabelle 4: Entwicklung der Zellzahl vitaler DC nach adenoviraler Transduktion (n=8 aus verschiedenen Transduktionsdurchläufen). Bei der Transduktion verwendete MOI: AdIL-2: MOI 500, AdCD40L: MOI 250, AdLacZ: MOI 250.

Die DC wurden durch die Ad, die als Vektoren fungierten, geschädigt, so dass die Gesamtviitalität der Zellen sank. Dieser Effekt war bei allen AdV etwa gleich. Nach der Transduktion mit AdIL-2, AdCD40L bzw. AdLacZ waren noch 36,2 % respektive 33,5 % und 39,2 % der Zellen vital (siehe Abb. 8).

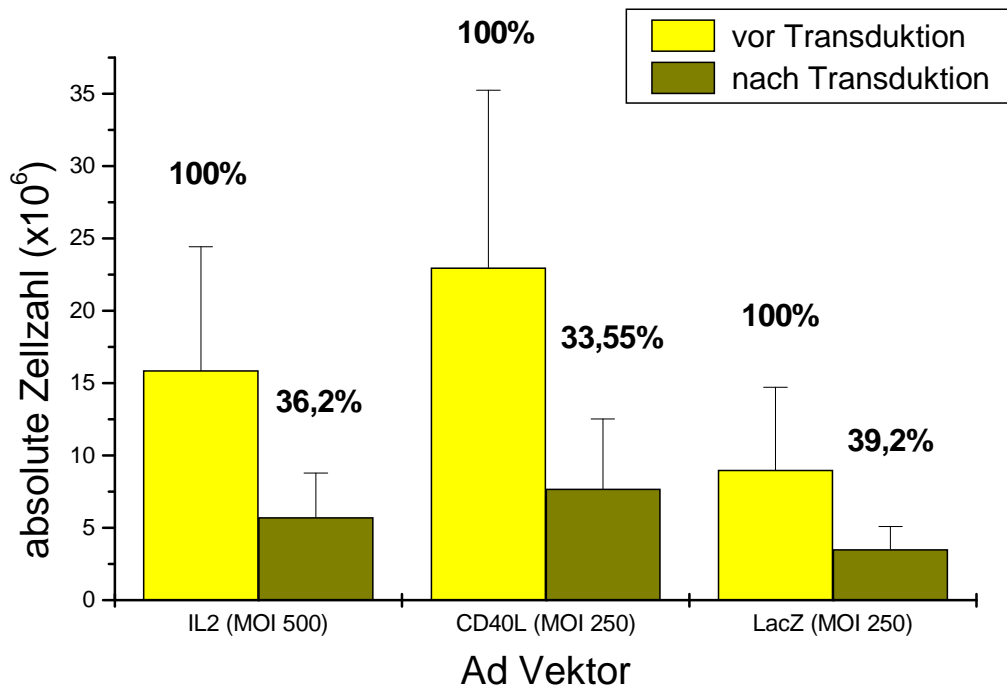


Abb. 8: Entwicklung der Zellzahl nach Transduktion mit den verschiedenen AdV. Dargestellt sind Durchschnitt und Standardabweichung der absoluten Zellzahlen vor und nach Transduktion aus 8 verschiedenen Transduktionsdurchläufen (Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer).

3.3.2 Ausreifungskontrolle mittels Durchflusszytometrie

Die Ausreifung der medullären dendritischen Vorläuferzellen zu DC durch die Stimulation mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse festgestellt (siehe 2.2.3.6). Mit Hilfe fluoreszierender monoklonaler Antikörper (FITC bzw. PE) konnte die Expression markierter Oberflächenproteine auf den DC quantifiziert werden. Zusätzlich wurden die Größe und die Granularität der Zellen gemessen, wodurch DC als große, granuläre Zellen erkannt wurden. Sie wurden nach diesen Kriterien *gaget* und so andere Zellen von den Messungen ausgeschlossen. Die Zahl DC *gageten* Zellen schwankte bei den verschiedenen Messungen zwischen 39 % und 69,5 %. Im Mittel wurden 58,7 % der Zellen, nach den Kriterien Größe und Granularität, als DC eingestuft.

Zur weiteren Charakterisierung der DC wurden folgende Oberflächenproteine angefärbt: CD11c, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 und MHC-II-Moleküle.

Das Oberflächenprotein CD11c gilt als Markerprotein für DC (Metlay *et al.*, 1990), während CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) und CD40 Reifungsmarker darstellen, da sie als Kostimulatoren bei der T-Zellaktivierung durch reife DC fungieren (Inaba *et al.*, 1995). Zusätzlich wurden MHC-II-Moleküle, als wichtige Oberflächenmoleküle für die Antigenpräsentation reifer DC, markiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu erfassen, wurden Isotypenkontrollen für FITC- respektive PE-Antikörper durchgeführt und von den Messergebnissen subtrahiert. Die Ergebnisse einer repräsentativen durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenantigene auf TAA gepulsten nichttransduzierten DC an Tag +8 sind in Abb. 9 dargestellt.

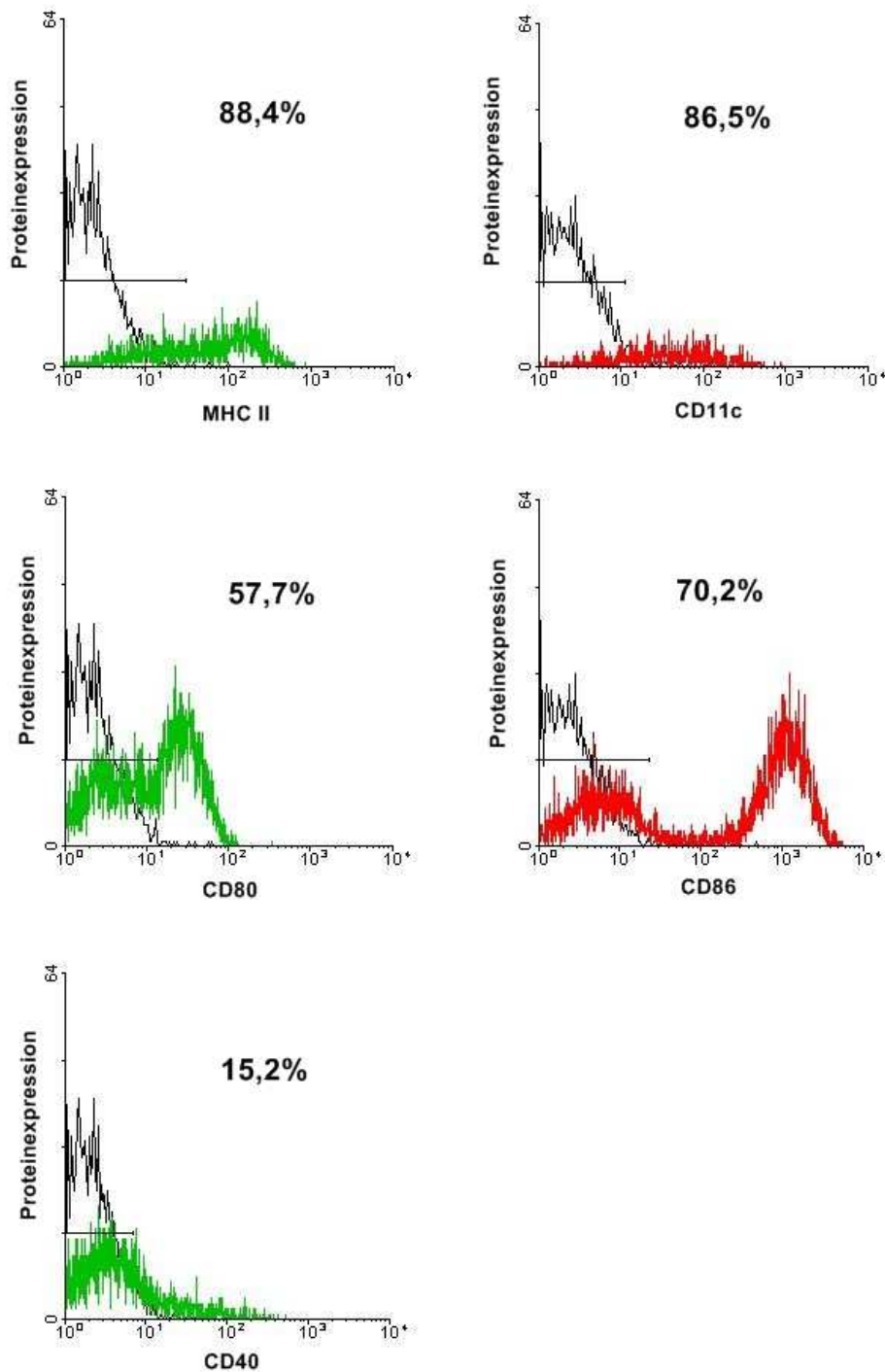


Abb. 9: Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen auf Tumorlysat-gepulsten, nichttransduzierten DC. FITC-markierte Antikörper (grün): MHC-II, CD80 und CD40 sowie PE-markierte Antikörper (rot): CD11c und CD86, wurden jeweils gegen entsprechende Isotypenkontrolle aufgetragen (schwarz). Populationen wurden als „large granular cells“ im *forward* und *sideward scatter* gegatet (jeweils >85 % der Gesamtpopulation)

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Messung an Tag +8.

In der *gegateten* Population zeigten sich Expressionen von MHC-II-Molekülen in 88,4 % der Zellen. Das Protein CD80 wurde von 57,7 %, CD11c von 86,5 % und CD86 von 70,2 % der Zellen exprimiert. CD40 war nur in 15,2 % der Zellen positiv. Durch die Messung konnte gezeigt werden, dass die DC-Vorläuferzellen durch die Kultivierung mit IL-4 und GM-CSF sowie das Pulsen mit TAA bis Tag +8 zu maturierten DC ausgereift sind. Damit konnten sie für die weiterführenden Experimente genutzt werden.

3.3.3 Expression kostimulatorischer Moleküle nach Transduktion der DC mit AdIL-2 bzw. AdCD40L

Bei den adenoviral transduzierten DC schwankte die Expression der Ausreifungsmarker CD80, CD86 und CD40 in Abhängigkeit von dem verwendeten AdV und dessen MOI.

3.3.3.1 Kostimulatorische Moleküle auf IL-2-DC

Nach der Transduktion mit AdIL-2 konnte eine gesteigerte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf den DC im Vergleich zu AdLacZ transduzierten DC festgestellt werden.

So zeigten die DC z.B. bei MOI 250 eine um 24,4 % höhere Expression von CD80 sowie eine um 23,8 % höhere Expression von CD86 und eine um 51,1 % höhere Expression von CD40 im Vergleich zu den LacZ-Kontrollen. Die Expression aller drei Marker stieg nur minimal bei der Transduktion mit AdIL-2 oder Ad-LacZ mit höheren MOI (siehe Abb. 10, 11 und 12).

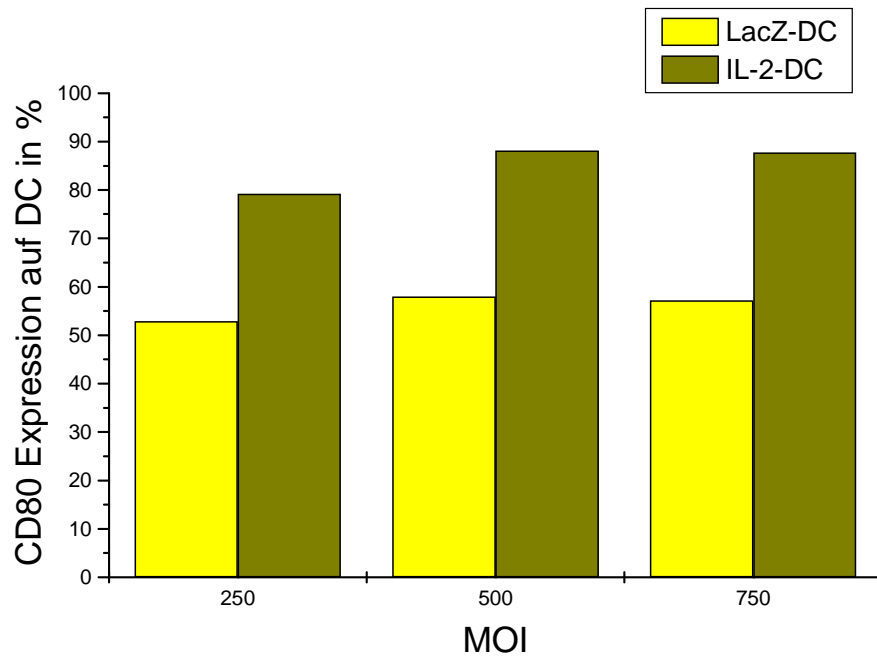


Abb. 10: Entwicklung der CD80-Oberflächenexpression mit zunehmender MOI auf AdIL-2 und AdLacZ transduzierten DC.

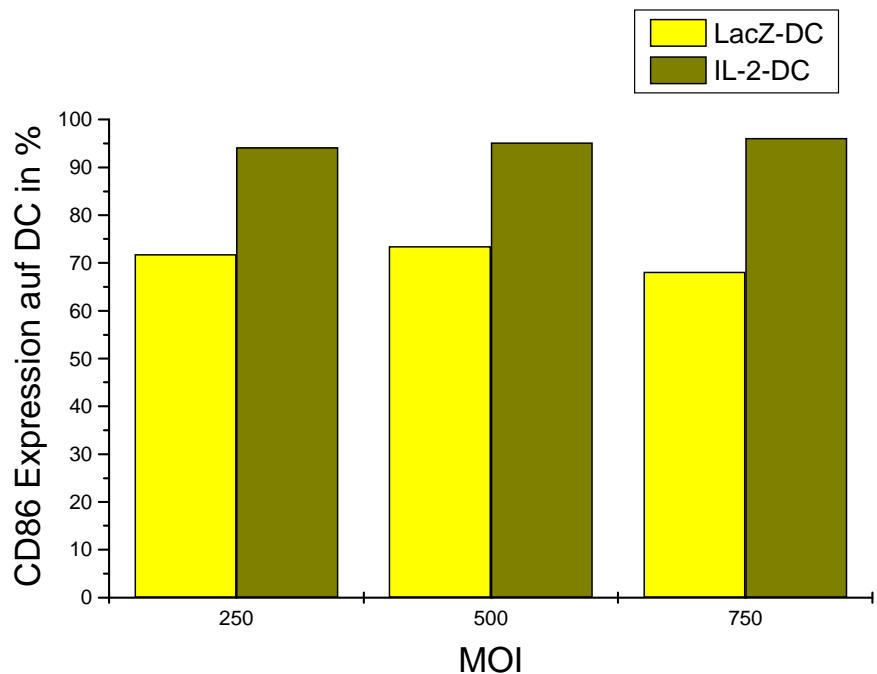


Abb. 11: Entwicklung der CD86-Oberflächenexpression mit zunehmender MOI auf AdIL-2 und AdLacZ transduzierten DC.

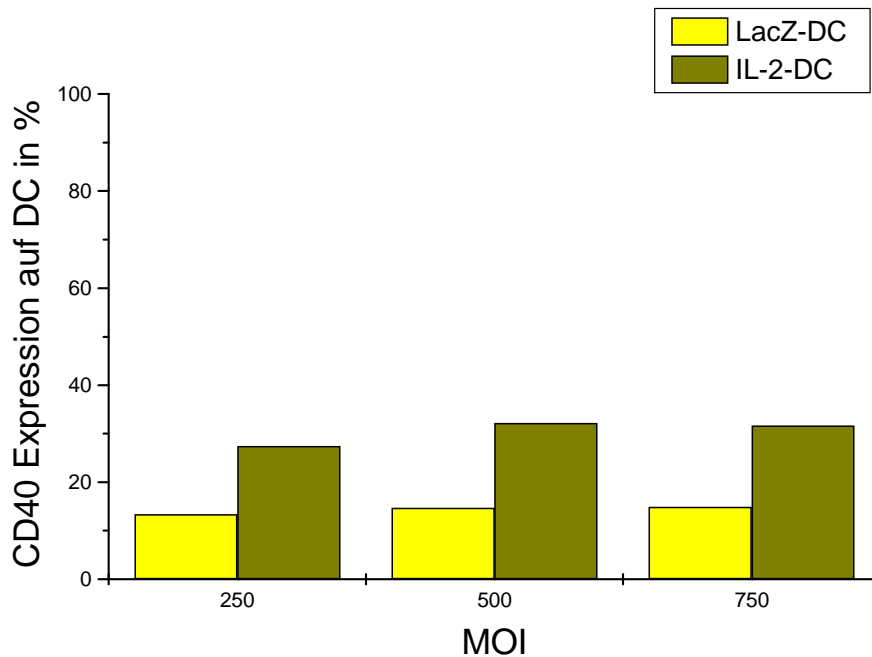


Abb. 12: Entwicklung des CD40-Oberflächenexpression mit zunehmender MOI auf AdIL-2 und AdLacZ transduzierten DC.

Die Expression der kostimulatorischen Moleküle war auch bei LacZ-DC, im Vergleich zu nichttransduzierten DC, erhöht (Daten nicht gezeigt). Diese Aktivierung der transduzierten DC war auf Ausreifungsstimuli der AdV zurückzuführen.

Wie bereits in 3.3.1 gezeigt, war die Zahl vitaler Zellen vor allem von der MOI des AdV abhängig. Abb. 13 zeigt die Menge, durchflusszytometrisch als vital *gegateter*, DC nach Transduktion mit AdIL-2 bei verschiedenen MOI. Der Anteil vitaler DC verringerte sich zwischen MOI 250 und MOI 500 stark. Gleichzeitig nahm die Expression von Ausreifungsmarkern nur noch leicht zu (siehe Abb. 10, 11 und 12). Deshalb wurde für die *in vivo* Experimente für AdIL-2 zunächst die MOI 250 festgelegt, später aber auf MOI 500 erhöht (siehe 3.3.5).

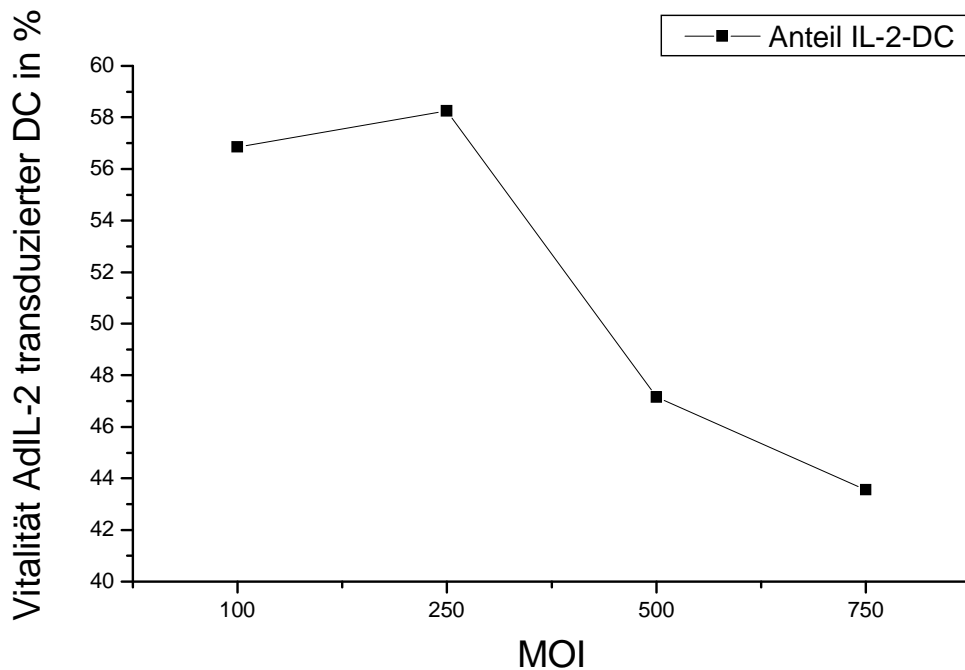


Abb. 13: Entwicklung des Anteils vitaler, AdIL-2 transduzierter DC mit zunehmender MOI.

3.3.3.2 Kostimulatorische Moleküle auf CD40L-DC

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass durch die Transduktion von DC mit MOI 250 des AdCD40L die Expression kostimulatorischer Moleküle auf den DC ebenfalls gesteigert wird. Im Vergleich zu nichttransduzierten DC war die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 um 47,6 % ($\pm 5,5$ %) und CD86 um 62,8 % ($\pm 4,7$ %) erhöht (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.4 Transgenexpression von CD40L auf DC nach adenoviraler Transduktion mit AdCD40L

CD40 ist ein Membranprotein, das u.a. auf DC gefunden wird. Sein Ligand, CD40L, ist ein kostimulatorisches Molekül, das v. a. von aktivierten CD4⁺ T-Helferzellen gebildet wird (Banchereau *et al.*, 1994). Die Interaktion von CD40 mit CD40L ist essentiell für die Bildung von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und steigert die Produktion proinflammatorischer T_H1 Zytokine durch die DC, wodurch antitumorale Effekte gegen das HCC und andere Tumoren induziert werden können (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008).

Nichttransduzierte DC sind adhären, polymorph und bilden in Kultur einen Zellrasen. Die mit AdCD40L transduzierten DC neigten bereits einen Tag nach der Transduktion zur Agglutination und bildeten Zellaggregate, sogen. *Cluster*. Verantwortlich hierfür scheint die Interaktion der CD40 Rezeptoren der DC mit CD40L, das als Transgen von den DC gleichzeitig exprimiert wird (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008). Die Agglutination der DC war ausschließlich bei CD40L-DC zu beobachten (siehe Abb. 14).

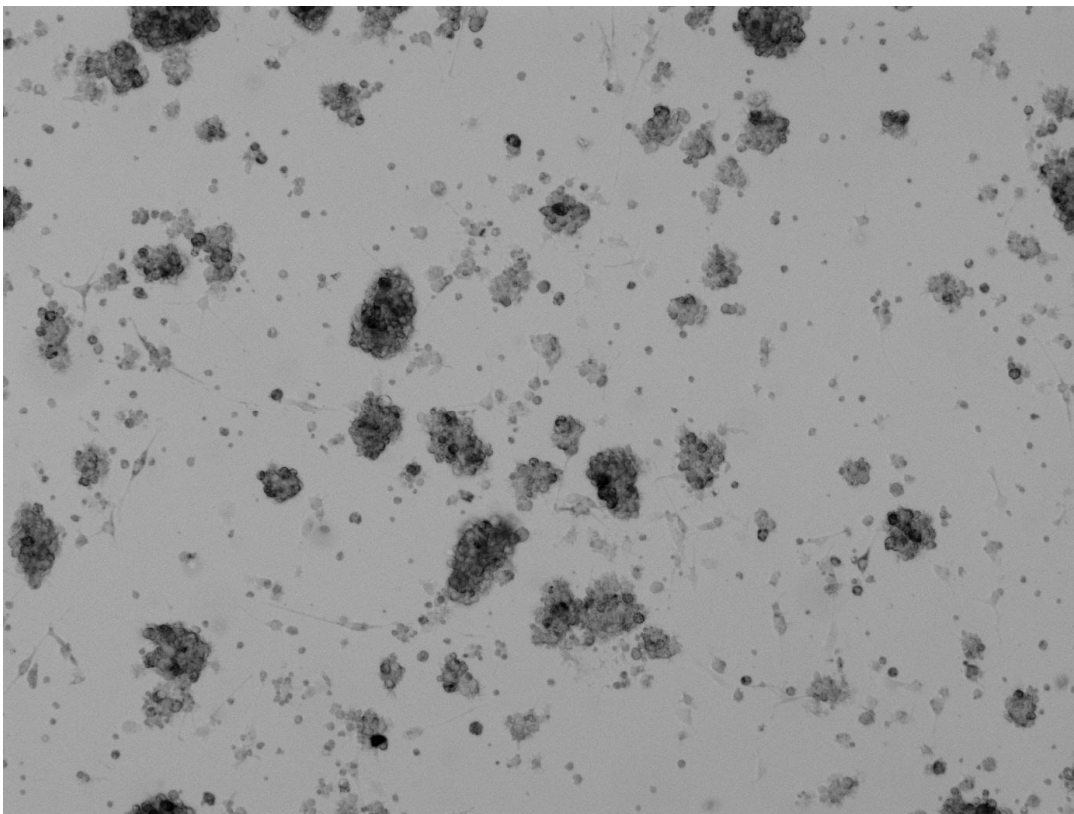


Abb. 14: Agglutinierte DC, 48 Stunden nach Transduktion mit AdCD40L mit MOI 250.

Um die Expression von CD40L in DC nach Transduktion mit AdCD40L mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren, wurden die transduzierten Zellen mit PE-markierten Anti-CD40L Fluoreszenzantikörper gefärbt.

Die Expression von CD40L auf den transduzierten DC war von der verwendeten MOI des AdCD40L abhängig. Bei MOI 250 lag die Expression von transgenem CD40L bei 50,2 %, bei MOI 500 lag sie bei 65,2 %. Dies entspricht einem Anstieg um 15 % und zeigt die Dosisabhängigkeit der Transgenexpression von der MOI der adenoviralen Transduktion. Gleichzeitig war die Zahl der, durch das Durchflusszytometer als DC

erkannten, Zellen bei der Transduktion mit MOI 500 im Vergleich zur Transduktion mit MOI 250 deutlich geringer. So lag die durchflusszytometrisch gemessene Vitalität der, mit MOI 250 transduzierten Zellen bei 69,5 % und sank bei MOI 500 auf 57,8 %. Das entspricht einem Rückgang von 11,7 %. Die Zahl vitaler, transduzierter DC ist somit ebenfalls abhängig von der verwendeten Dosis des AdV. Aufgrund dieser Ergebnisse, die mit bereits publizierten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe übereinstimmen, wurde zunächst MOI 250 für die Transduktion mit AdCD40L für die folgenden Experimenten gewählt (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008).

3.3.5 Transgenexpression von IL-2 im Überstand von DC nach Transduktion mit AdIL-2

Die IL-2 Expression der mit AdIL-2 transduzierten DC wurde an Tag +8 mittels ELISA im Überstand der DC-Kulturen gemessen (2 Tage nach der adenoviralen Transduktion). Der ELISA wurde wie unter 2.2.4.7 beschrieben durchgeführt. Die entstehenden Farbkomplexe, die proportional zur Menge IL-2 im Überstand waren, wurden photo-spektrometrisch im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

Wie in Tabelle 5 dargestellt, war die Transgenexpression von IL-2 im Überstand von DC nach Transduktion mit AdIL-2 abhängig von der verwendeten MOI des AdV (siehe Tabelle 5 und Abb. 15).

MOI	IL-2-Expression im Überstand pg/ μ l	im <i>gegatete</i> Zellen (vitale DC) in %
100	151,0	56,85
250	434,6	58,25
500	736,3	47,15

Tabelle 5: Dargestellt ist die IL-2 Produktion in Abhängigkeit von der verwendeten MOI und im Verhältnis zu den *gegateten* Zellen (vitale DC). Je höher die verwendeten MOI desto stärker war die IL-2 Expression. Allerdings war der schädliche Effekt der Transduktion mit AdIL-2 auf die DC-Vitalität ebenfalls ausgeprägter.

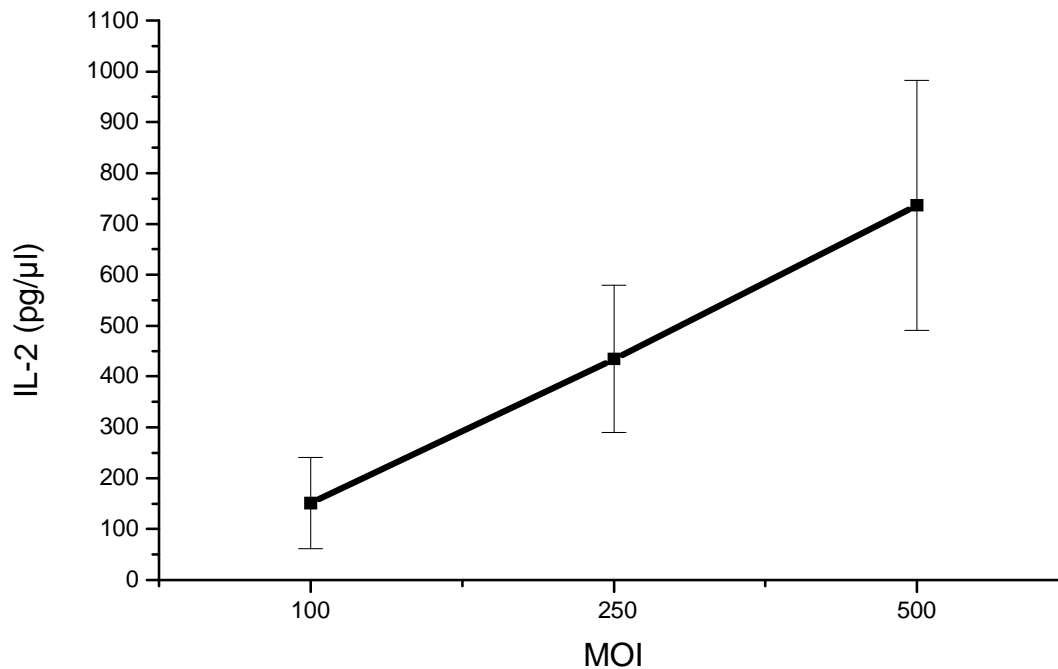


Abb. 15: Dosisabhängige Expression von IL-2 im Überstand von IL-2-exprimierenden DC nach Transduktion mit MOI 100, 250 und 500.

Bei MOI 250 lag die transgene IL-2 Produktion bei 434,6 pg/μl, bei MOI 500 lag sie bei 736,3 pg/μl. Zwischen MOI 250 und 500 stieg die Menge an exprimiertem IL-2 somit um 41 % an. Im gleichen Intervall sank die durchflusszytometrisch gemessene Zahl vitaler DC von 58,25 auf 47,15 %. Das entspricht einer Abnahme um 11,1 %.

Wegen der starken Expressionszunahme wurde zunächst MOI 500 für die Transduktion mit AdIL-2 in den folgenden *in vivo* Experimenten gewählt, trotz der geringeren Vitalitätsquote.

Eine IL-2 Expression war nicht detektierbar in nicht-transduzierten DC oder LacZ- sowie CD40L-transduzierten DC (Daten nicht gezeigt).

3.4 Induktion tumorspezifischer zytotoxischer Effektorzellen gegen Hepa129-Zellen *in vitro*

Mit dem ^{51}Cr -Freisetzungstest wurde die Induktion spezifischer zytotoxischer Effektorzellen nach Kokultur mit TAA-gepulsten DC gegen murine HCC-Zellen (Hepa129) *in vitro* überprüft. Murine Milzlymphozyten wurden als Effektorzellen mit TAA-

gepulsten und adenoviral transduzierten DC kokultiviert. Die mit ^{51}Cr markierten Hepa129-Zellen wurden durch die Effektorzellen lysiert und das freigesetzte radioaktive ^{51}Cr im Überstand gemessen (siehe 2.2.3.5). Hieraus ließen sich Rückschlüsse auf das Ausmaß der spezifischen Zelllyse und damit der Aktivierung der Effektorzellen durch die DC ziehen.

3.4.1 Generierung von Milzlymphozyten und Kokultur mit DC

Als Effektorzellen wurden Lymphozyten aus den Milzen von zwei C3H-Mäusen verwendet. Die Zellen wurden gewonnen und kultiviert wie in 2.2.4.4.1 beschrieben. Durch die Zugabe von IL-2 wurden das Wachstum der Lymphozyten und gleichzeitig deren Differenzierung zu zytotoxischen CIK-Effektorzellen stimuliert. Der monoklonale Antikörper Anti-CD3 aktiviert die Lymphozytenkulturen und lässt sie expandieren. Durch das Zusetzen von IL-1 β wird die lytische Aktivität der, mit IL-2 und Anti-CD3 expandierten und aktivierten Lymphozyten, gesteigert (Ochoa *et al.*, 1987; Schmidt-Wolf *et al.*, 1997).

Am Tag +8 wurden die Lymphozyten geerntet und ausgezählt. Es wurden ca. 60×10^6 Milzlymphozyten pro zwei Mäusen gewonnen.

Anschließend wurden TAA-gepulste und AdIL-2, AdCD40L bzw. AdLacZ (jeweils MOI 250) transduzierte DC mit den Lymphozyten im Verhältnis 5:1 (5 Lymphozyten pro 1 DC) kokultiviert. Die Zellen wurden für vier Tage in Kultur gehalten und täglich beobachtet. Bei Bedarf wurde das Medium erneuert, ohne jedoch erneut Zytokine oder Antikörper hinzuzugeben. Die DC starben in der Kultur allmählich ab, da ihr kein IL-4 oder GM-CSF mehr zugesetzt wurde. Am Tag +11 bestand die Zellkultur daher fast ausschließlich aus Lymphozyten.

3.4.2 ^{51}Cr Chromium-Freisetzung Zytotoxassay

Es ist anzunehmen, dass die DC in den vier Tagen der Kokultur den Milzlymphozyten die aufgenommenen Tumorantigene in einem MHC-Kontext präsentiert haben. Erkennt ein naiver Lymphozyt ein präsentiertes Tumorantigen wird die Bindung von LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) mit dem ICAM (*Inter-Cellular Adhesion Molecule*) der DC erhöht und der Lymphozyt vermehrt sich. Er und seine Tochterzellen werden zu aktivierten T-Effektorzellen (Janeway *et al.*, 2002).

Am Tag +11 wurde der Zytotoxizitätstest durchgeführt. Nachdem die Zielzellen (Hepa129) mit radioaktivem ^{51}Cr markiert worden waren, wurden sie mit den Effektorzellen (aktivierte Lymphozyten) in verschiedenen Effektor-Ziel-Verhältnissen für vier Stunden inkubiert. Als Maximallyse (100 %) wurden Hepa129-Zellen mit IGEPAL (Detergens) verwendet. Bei der Lyse der Zielzellen wurde ^{51}Cr frei und konnte mittels eines Szintillationszählers im Überstand gemessen werden. Die spezifische Zytotoxizität wurde, wie in 2.2.3.5 beschrieben, berechnet.

Der ^{51}Cr -Freisetzungstest zeigte, dass alle adenoviral transduzierten und gepulsten DC in der Lage waren, tumorspezifische zytotoxische Effektorzellen zu induzieren. Das Ausmaß der Lyse von Hepa129-Zellen durch die Effektorzellen war abhängig vom Effektor-Ziel-Verhältnis. Außerdem unterschied sich die lytischen Aktivität je nachdem mit welcher DC-Population die Effektorzellen kokultiviert wurden (IL-2-DC, CD40L-DC oder LacZ-DC) (siehe Abb. 16).

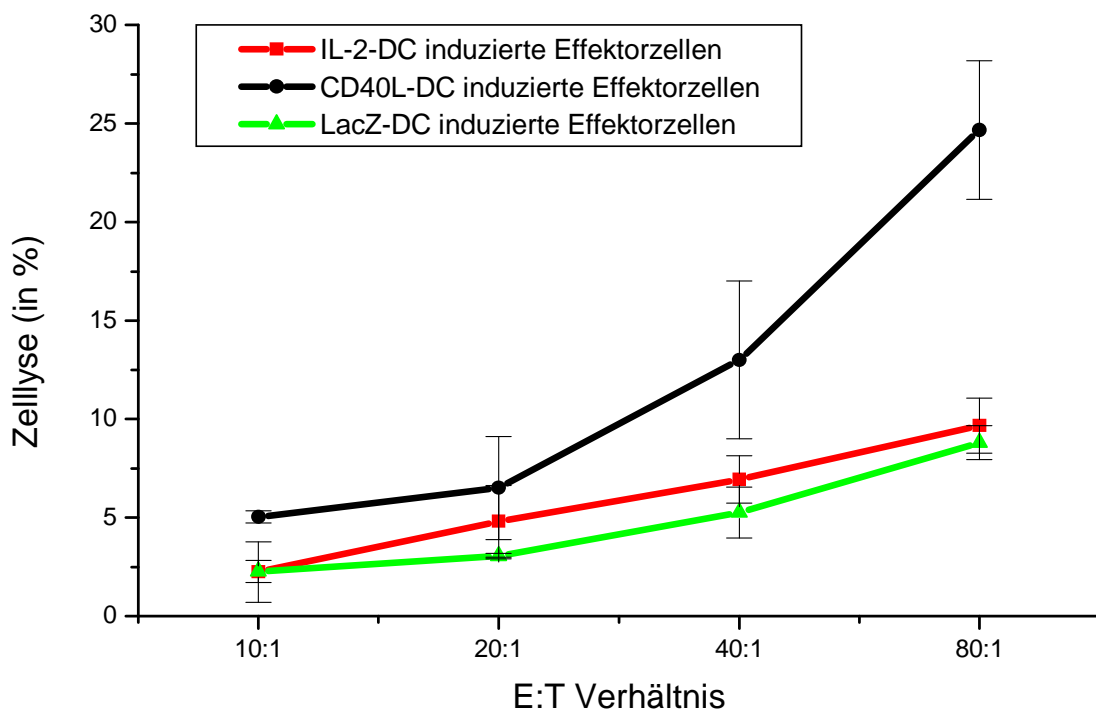


Abb. 16: Spezifische Zielzellyse verschiedener *Effector-Target*-Verhältnisse (E:T-Verhältnis). Die spezifische Tumortoxizität wurde von den DC-Populationen IL-2-DC, C40L-DC und LacZ-DC an die Lymphozyten-Effektorzellen vermittelt.

Die Kokulturen mit CD40L-exprimierenden, antigengepulsten DC vermittelten die stärkste Zytotoxizität. Bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 lysierten sie bereits 5,03 % der Hepa129-Zellen. Die Steigerung der induzierten spezifischen Zytotoxizität durch CD40L-DC war im Vergleich mit LacZ-DC signifikant ($p=0,0330$). Im Gegensatz dazu wurden von IL-2-DC vermittelten zytotoxischen Effektorzellen bzw. der LacZ-Probe bei gleichem E:T-Verhältnis nur 2,23 % respektive 2,27 % der Targetzellen lysiert. Mit steigendem E:T-Verhältnis konnte die Lyserate der Kokulturen mit CD40L-DC auf bis zu 24,67 % bei 80:1 gesteigert werden, wohingegen die Kokulturen mit IL-2- und LacZ-DC lediglich bei 9,66 % bzw. 8,80 % lagen (siehe Abb. 16).

Die Zytotoxizität der Lymphozyten, die mit IL-2-exprimierenden DC kokultiviert worden waren, war insgesamt nur leicht höher als jene die mit AdLacZ transduzierten DC kokultiviert worden waren. Es konnte keine signifikante Steigerung der Induktion von Zytotoxizität bei Effektorzellen durch die Expression von IL-2 durch DC festgestellt werden ($p=0,1751$).

3.5 *In vivo* Experimente

Ziel der *in vivo* Experimente war die Untersuchung des Einflusses von IL-2-exprimierenden DC alleine oder in Kombination mit CD40L-exprimierenden DC auf das Tumorwachstum etablierter *s. c.* Tumoren in einem murinen HCC-Modell.

3.5.1 Subkutanes Tumormodell

Hierfür wurde die murine Hepatomzelllinie Hepa129, die syngen mit dem C3H Mausstamm ist, verwendet. Durch *s. c.* Injektion von 1×10^6 Hepa129-Zellen in die rechte Flanke der Mäuse bildeten sich nach 5-7 Tagen, in 100 % aller Tiere palpable *s. c.* Tumoren. Am Tag +11 nach der Tumorinduktion wurde mit der Therapie begonnen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tumoren in der Regel ein Volumen von 100-200 mm³ erreicht. Die Mäuse wurden dann mit den, zuvor *in vitro* mit TAA gepulsten und adenoviral transduzierten, DC behandelt. Die DC wurden *i. t.* injiziert, da diese Applikationsform, in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, den stärksten antitumoralen Effekt zeigte (Gonzalez-Carmona, *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2003). Jedem Tier wurden zweimal transduzierte DC verabreicht, am Tag +11 und am Tag +16. Die Zahl der pro Anwendung applizierten DC schwankte zwischen $0,75-1,3 \times 10^6$ DC pro Maus, je nach Verfügbarkeit. Im Durchschnitt lag die Zahl bei ca. 1×10^6 Zellen pro Maus. Den

behandelten sowie den Kontrollmäusen wurden jeweils die gleiche Menge DC verabreicht.

Die Tumorgröße wurde über den Behandlungszeitraum hinweg alle 2-3 Tage gemessen und das Volumen nach der Formel Länge x Breite x 0,52 bestimmt. Sobald ein Tumor größer als 2000 mm^3 war, wurde das Tier getötet (siehe 2.2.5.1).

Um Referenzwerte für das normale Wachstum der s. c. Tumoren und die Kinetik des Tumorstwachstums zu erhalten, wurden bei einigen Mäusen Tumoren induziert, ohne an Tag +11 eine Therapie zu beginnen. Die Tumoren erreichten bis spätestens Tag +19 eine letale Größe bzw. ein Volumen über 2000 mm^3 , so dass die Maus getötet werden musste (siehe Abb. 17).

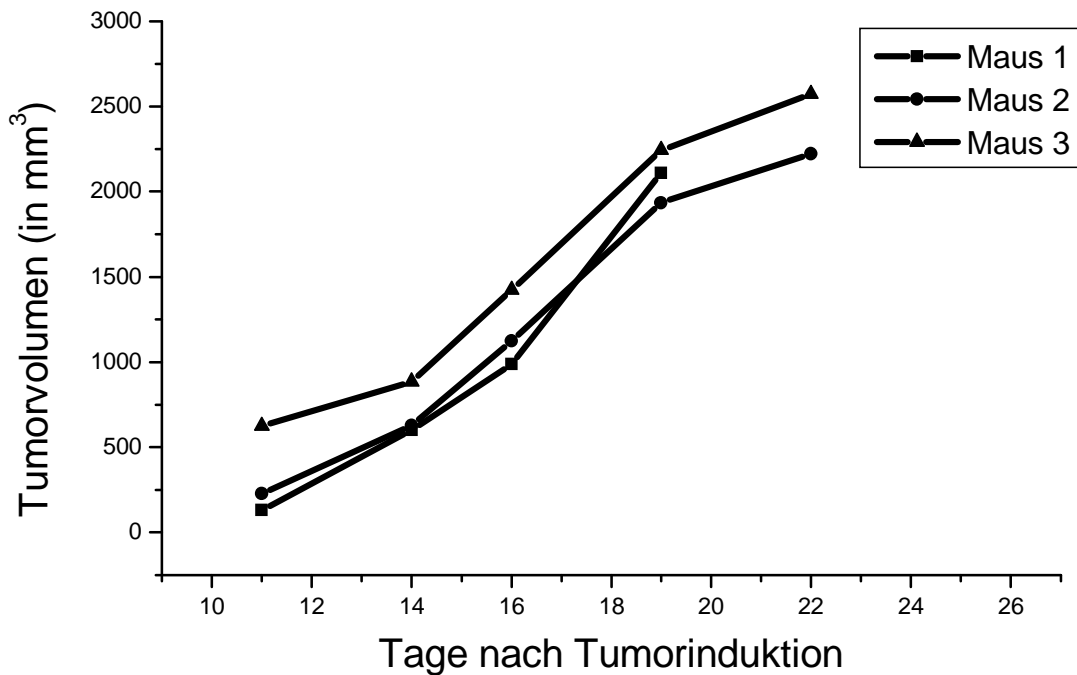


Abb. 17: Tumorentwicklung von s. c. HCC in C3H-Mäusen ohne Behandlung. Um Referenzwerte für Wachstum der s. c. HCC-Tumoren zu erhalten, wurden bei 3 Mäusen Tumoren induziert, die nicht behandelt wurden. Nach spätestens 22 Tagen hatten die Tumoren eine letale Größe erreicht ($>2000 \text{ mm}^3$); Dargestellt ist das Tumorstwachstum von drei C3H-Mäusen.

3.5.2 Einfluss von IL-2- und CD40L-exprimierender DC auf das Wachstum von s. c. Tumoren

In einem ersten Experiment wurde die Wirkung von IL-2-exprimierenden DC auf das Tumorstadium von s. c. HCC im Vergleich zu der Wirkung von CD40L-exprimierenden DC *in vivo* untersucht. Als Kontrolle dienten Tumoren, die mit LacZ-DC behandelt wurden.

Im Rahmen der Behandlung wurden am Tag +11 und am Tag +16 nach Tumorstadium je 1×10^6 IL-2-DC, CD40L-DC bzw. LacZ-DC *i. t.* injiziert.

Unbehandelte Tumoren dienten als Referenz für das Tumorstadium ohne DC-Behandlung.

Passend zu den bereits veröffentlichten Ergebnissen aus der eigenen Arbeitsgruppe, konnte ein signifikanter Effekt der CD40L-exprimierenden DC auf das Tumorstadium festgestellt werden (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008). Es zeigte sich eine signifikante Inhibition des Tumorstadiums bei Mäusen, die mit CD40L-DC behandelt worden waren, im Vergleich zu denjenigen, die mit LacZ-DC behandelt worden waren, sowie zu den unbehandelten Tieren (siehe Abb. 18).

Interessanterweise zeigte die Behandlung mit IL-2 transduzierten DC ebenfalls einen signifikant erhöhten antitumoralen Effekt im Vergleich zur LacZ-DC-Kontrollgruppe und den unbehandelten Mäusen. Der antitumorale Effekt von IL-2-DC war an Tag +19 nur geringfügig kleiner als der Effekt der CD40L-DC-Gruppe (siehe Abb. 18).

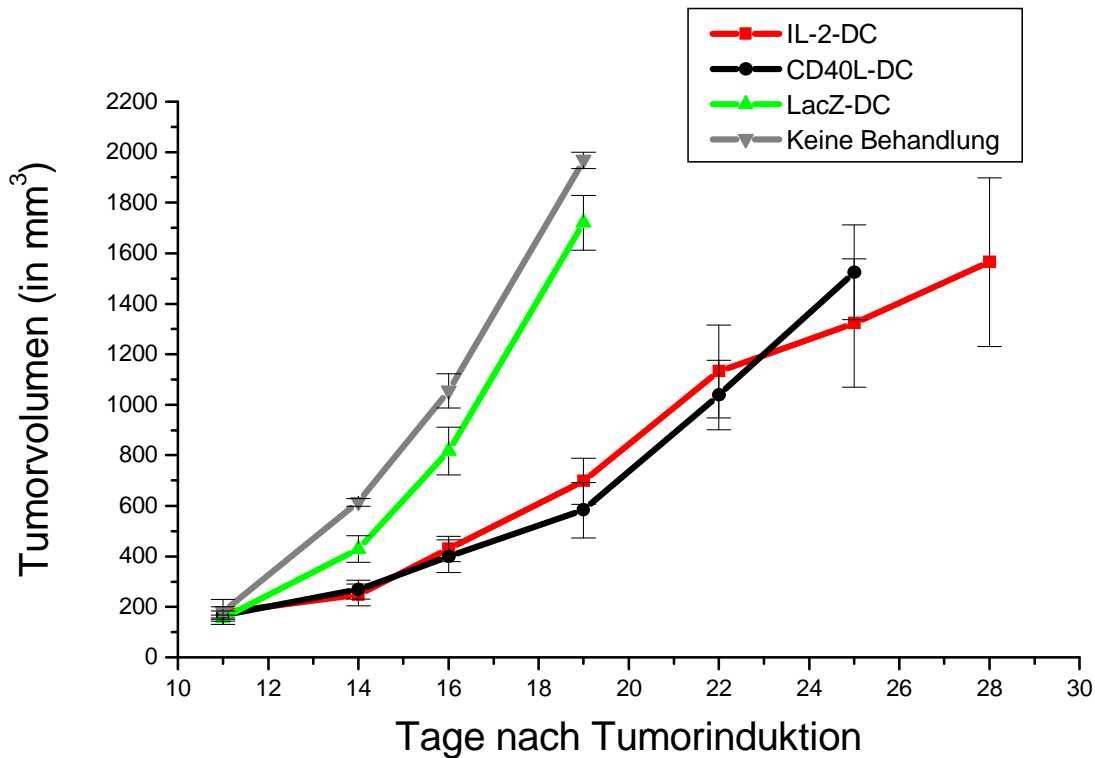


Abb. 18: Wachstum der *s. c.* Tumoren nach Behandlung mit den verschiedenen DC-Ansätzen bzw. ohne Behandlung. Die *i. t.* Injektion der DC erfolgte an Tag +11 und +16. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung des Tumorzvolumens der Tiere, die mit IL-2- ($n=4$) bzw. CD40L- ($n=7$) exprimierenden DC oder mit LacZ-exprimierenden DC ($n=3$) therapiert wurden sowie der unbehandelten Tiere ($n=2$).

Bei einem Vergleich der Tumorgößen an Tag +19 konnte sowohl für die IL-2-DC- ($p=0,0019$) als auch für CD40L-DC-Therapie ($p=0,0003$) eine signifikante Reduktion des Tumorzvolumens gegenüber den unbehandelten Kontrolltumoren gezeigt werden. Die Tumorgöße betrug bei den mit IL-2-DC behandelten Tumoren durchschnittlich $697,8 \text{ mm}^3$ im Vergleich zu $1720,3 \text{ mm}^3$ in der LacZ-Gruppe und $1936,0 \text{ mm}^3$ bei unbehandelten Tumoren. Somit zeigte sich eine Tumoringibition von $63,9 \%$ im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die mit CD40L-DC behandelten Tumoren waren zum selben Zeitpunkt mit $583,3 \text{ mm}^3$ sogar um $69,9 \%$ kleiner als die unbehandelten Tumoren (siehe Tabelle 6). Somit ist die Therapie mit CD40L-exprimierenden DC der mit IL-2-produzierenden DC in ihrer antitumoralen Wirkung geringfügig überlegen, der Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p=0,4453$). Auch die

Behandlung mit LacZ-DC verminderte das Tumorstadium. Im Vergleich mit nicht behandelten Tieren jedoch lediglich um 11,2 %.

Therapie	Tumorstadium in mm ³	Größe im Vergleich zu unbehandelten Tumoren
CD40L-DC	583,3 (± 109,2)	30,1 %
IL-2-DC	697,8 (± 91,6)	36,1 %
LacZ-DC	1720,3 (± 108,0)	88,8 %
Keine Behandlung	1936,0 (± 32,0)	100 %

Tabelle 6: Durchschnittliches Tumorstadium im Vergleich zu unbehandelten Tumoren in mm³ an Tag +19.

Mäuse, die mit LacZ-DC bzw. nicht behandelt wurden, starben im Durchschnitt 22 Tage nach der Induktion des s. c. HCC-Tumors.

Die IL-2-DC- und CD40L-DC-Behandlung zeigte auch auf die Überlebenszeiten der Mäuse einen positiven Einfluss. Beide Therapien verlängerten das Überleben der Mäuse signifikant, wobei die Therapie mit IL-2-exprimierenden DC der mit CD40L-exprimierenden DC überlegen war. IL-2-DC-behandelte Mäuse überlebten bis zu 45 Tage nach Tumorstadium (durchschnittlich 33,25 Tage (± 8,057)), im Vergleich zu maximal 35 Tagen Überlebenszeit in der mit CD40L-DC behandelten Gruppe (durchschnittlich 28,29 Tage (±3,904)). Die mit LacZ-DC behandelten Tiere überlebten maximal 25 Tage (durchschnittlich 22 Tage (±3,0)) (siehe Abb. 19). Nach statistischer Auswertung war die Überlebenszeit der Mäuse, die mit IL-2-DC behandelt wurden, trotz der längsten durchschnittlichen Überlebenszeit, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nicht signifikant ($p=0,0735$). Die Überlebenszeit der mit CD40L-DC behandelten DC war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verlängert ($p=0.0391$).

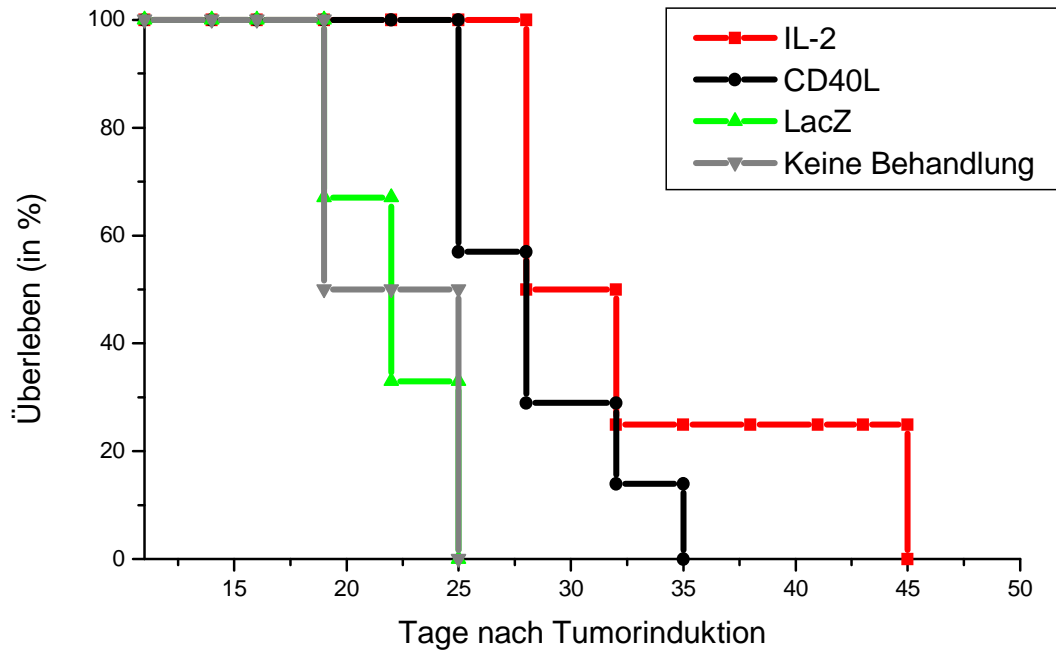


Abb. 19: Überleben der Mäuse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der angewandten DC-Therapie: IL-2-DC (n=4), CD40L-DC (n=7), LacZ-DC (n=3), unbehandelte Tumoren (n=2). Die Therapie mit IL-2-DC zeigte sich nicht nur den Kontrollgruppen, sondern auch der CD40L-Gruppe hinsichtlich der Überlebenszeit leicht überlegen.

3.5.3 Einfluss der kombinierten Gabe von IL-2-DC und CD40L-DC auf das Wachstum von s. c. HCC

Die Interaktion von CD40 Rezeptor und CD40L führt zur Freisetzung von T_H1 -Zytokinen, die u.a. zu einem verbesserten *Cross-priming* beitragen.

IL-2 hat eine stark proliferationsfördernde Wirkung auf bereits aktivierte Lymphozyten (Cantrell and Smith, 1983). Darauf aufbauend wurde ein synergistischer Effekt bei der Aktivierung der zellulären Immunantwort gegen Tumorzellen bei kombinierter Gabe von CD40L- und IL-2-exprimierenden DC vermutet (siehe 1.4.3.3).

Im folgenden Experiment sollte daher geprüft werden, ob die kombinierte Gabe von CD40L- und IL-2-DC eine verbesserte antitumorale Wirkung im Vergleich zur CD40L-DC-Monotherapie in unserem Tumormodell zeigt.

Analog zu den vorherigen Experimenten wurden s. c. HCC in C3H-Mäusen induziert. Die Tumoren wurden mit einer Kombinationstherapie bestehend aus IL-2- und CD40L-

exprimierenden DC behandelt. Unter Kombinationstherapie wurde sowohl die gleichzeitige Gabe von 1×10^6 IL-2- und CD40L-DC (Verhältnis 1:1), an Tag +11 und +16 als auch die sequenzielle Gabe von 1×10^6 CD40L-DC an Tag +11 und 1×10^6 IL-2-DC an Tag +16, zusammengefasst.

Die Tumorumfänge wurden mit Volumina von Tumoren, die ausschließlich mit 1×10^6 CD40L-exprimierenden DC behandelt wurden, verglichen (siehe Abb. 20). Hierbei zeigte sich die kombinierte Gabe von CD40L- und IL-2-transduzierenden DC nicht signifikant stärker als die Monotherapie mit CD40L-exprimierenden DC. An Tag +19 waren die Tumoren, die kombiniert behandelt wurden, im Durchschnitt $915,1 \text{ mm}^3$ groß. Tumoren, die lediglich mit CD40L-DC behandelt wurden, waren durchschnittlich nur $583,3 \text{ mm}^3$ groß. Die alleinige Gabe von CD40L-DC lieferte etwas bessere Ergebnisse in Bezug auf das Tumorwachstum. Der Unterschied zwischen den beiden Therapieformen war jedoch nicht signifikant ($p=0,0834$).

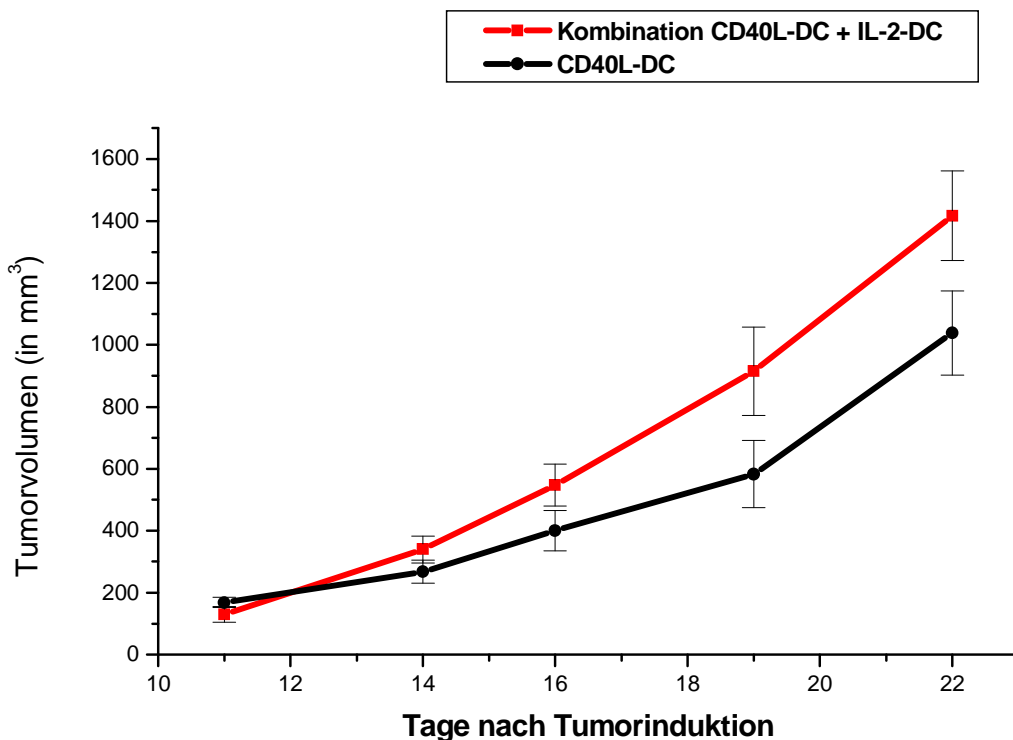


Abb. 20: Wachstum von s. c. HCC nach Behandlung mit der Kombination aus $0,5 \times 10^6$ CD40L- und $0,5 \times 10^6$ IL-2-DC im Vergleich zur Behandlung mit 1×10^6 CD40L-DC. Die *i. t.* Injektion von DC erfolgte an Tag +11 und +16. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Tumorumfänge beider Gruppen. Kombinationstherapie ($n=11$), CD40L-DC ($n=7$).

3.5.4 Einfluss einer sequenziellen Gabe von CD40L-DC und IL-2-DC auf das Tumorwachstum von *s. c.* HCC *in vivo*

Die durch CD40/CD40L-Interaktion ausgelöste T_H1 -Immunreaktion schafft ein Milieu, das das *Cross-priming* zwischen DC und zytotoxische $CD8^+$ -Zellen verbessert. Ausgehend von der These eines synergistischen Effekts von IL-2 und CD40L in 3.5.3 sollte weiterhin überprüft werden, ob eine sequenzielle Gabe von CD40L und IL-2 den antitumoralen Effekt steigern kann. An Tag +11 wurden zunächst 1×10^6 CD40L-exprimierende DC *i. t.* injiziert, um die Bildung von spezifischen antitumoralen zytotoxischen $CD8^+$ -Zellen zu induzieren. An Tag +16 wurden 1×10^6 IL-2-exprimierende DC *i. t.* injiziert, um die bereits im Tumor induzierten zytotoxischen Lymphozyten durch Steigerung von IL-2 im Tumormilieu zur Proliferation anzuregen. Einer zweiten Gruppe von Mäusen wurde sowohl an Tag +11 als auch an Tag +16 jeweils 1×10^6 CD40L-DC verabreicht.

An Tag +19 wurden die Ergebnisse der sequenziellen Gabe von CD40L- und IL-2- DC mit der gleichzeitigen Gabe von CD40L- und IL-2-DC sowie der alleinigen Gabe von CD40L-DC verglichen. Wie in Abb. 21 dargestellt zeigten sowohl die sequenzielle Gabe als auch die gleichzeitige Gabe von CD40L-DC und IL-2-DC etwas schlechtere Ergebnisse als die Monotherapie mit CD40L-DC (siehe Abb. 21). Die antitumorale Wirkung der sequenziellen Gabe von CD40L- und IL-2-exprimierenden DC an Tag +19 war mit einem Tumolvolumen von 996 mm^3 , im Vergleich zu $1012,9 \text{ mm}^3$ bei gleichzeitiger Gabe, nur geringfügig besser. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,1$).

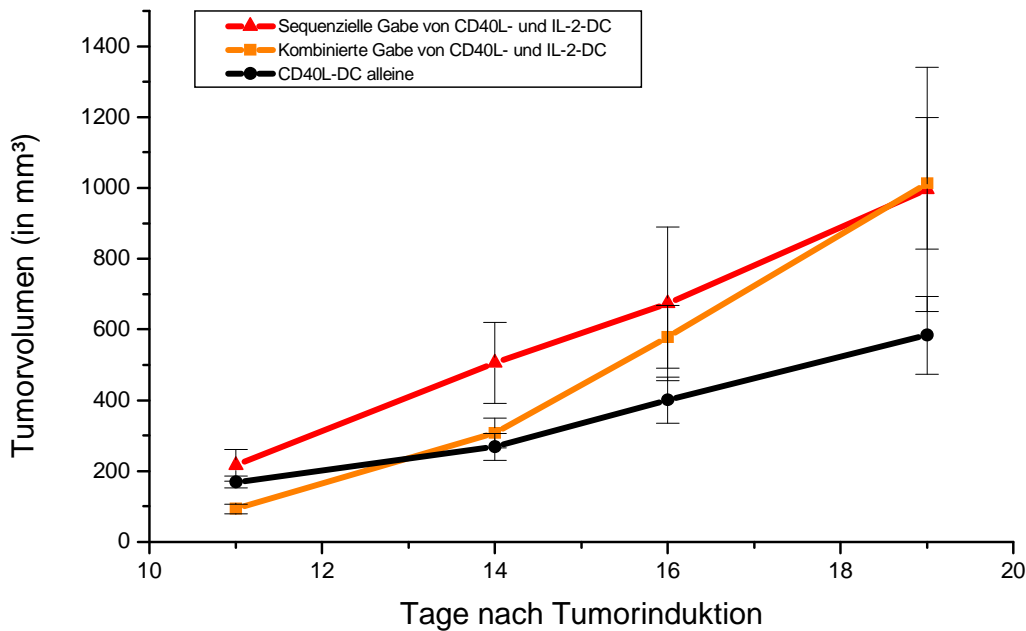


Abb. 21: Tumorwachstum nach Behandlung mit der sequenziellen Gabe von CD40L- und IL-2-DC, im Vergleich zur gleichzeitigen Gabe von CD40L- und IL-2-DC sowie zur Monotherapie mit CD40L-DC. Die Injektion der DC erfolgte an den Tagen +11 und +16. Dargestellt sind der Durchschnitt sowie die Standardabweichung. Sequenzielle Gabe von zuerst CD40L-DC und dann IL-2-DC (n=4), Gleichzeitige Gabe von CD40L-DC und IL-2-DC (n=8), CD40L-DC-Monotherapie (n=7).

3.5.5 Charakterisierung der Immunantwort

Um die immunologischen Mechanismen des antitumoralen Effekts der *i. t.* Injektion mit DC näher und zu charakterisieren, wurde die Infiltration von T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺) sowie NK-Zellen in den Tumoren durchflusszytometrisch quantifiziert. Die *s. c.* induzierten HCC Tumoren wurden an den Tagen +11 und +16, nach Tumorinduktion, mit einer Kombination aus $0,5 \times 10^6$ CD40L- und $0,5 \times 10^6$ IL-2-DC, sowie mit 1×10^6 CD40L-DC oder 1×10^6 LacZ-DC als Monotherapie behandelt.

Am Tag +24 nach Tumorinduktion wurden alle Tiere getötet und die Tumoren entnommen. Anschließend wurde der Anteil von CD4⁺-, CD8⁺- und NK-Zellen im Tumor durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abb. 22).

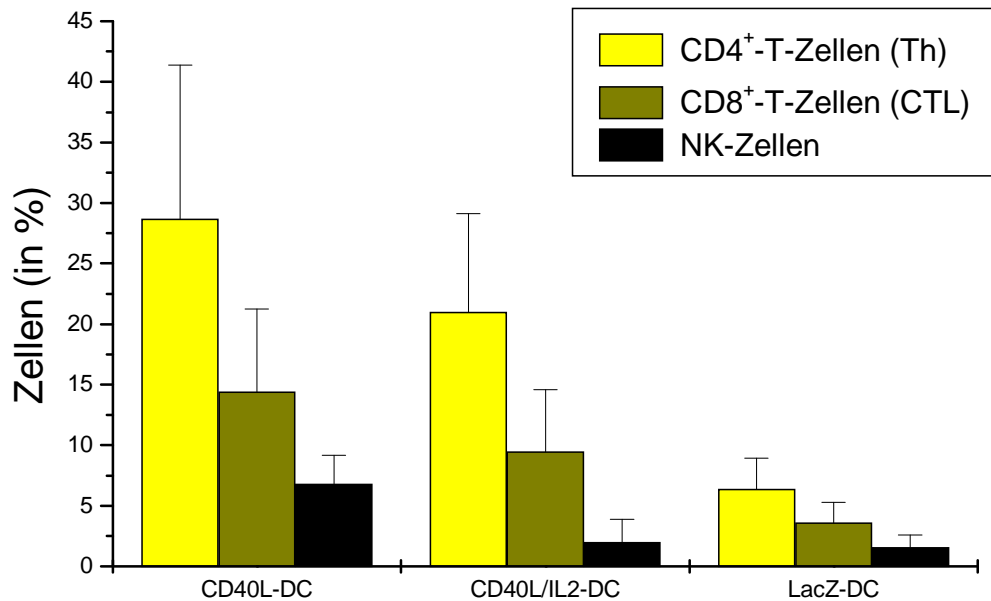


Abb.22: Durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in s. c. Hepa129-Tumoren an Tag +5 nach Behandlung mit CD40L-DC, einer mit einer Kombination von CD40L-DC und IL-2-DC im Vergleich zur Behandlung mit LacZ-DC als Kontrolltherapie (n=3). Untersucht wurde der prozentuale Anteil von CD4⁺-, CD8⁺- und NK-Zellen im explantierten HCC mittels Durchflußzytometrie.

Die Menge an TIL in den Tumoren variierte je nach angewandter DC-Therapie stark. Während in der LacZ Kontrolle eine relativ geringe Anzahl von TIL gefunden wurden (CD4⁺-Zellen: 6,4 % (± 2,5), CD8⁺-Zellen: 3,6 % (± 1,7) und NK-Zellen: 1,56 % (± 1,03)), konnten in den Tumoren, die mit CD40L-DC behandelt wurden ein zum Teil signifikanter Anstieg der TIL beobachtet werden. Es überwogen die CD4⁺-T-Lymphozyten mit einem Anteil von 28,7 % (± 12,67) (p=0,0104), gefolgt von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen mit einem Anteil von 14,42 % (± 6,83) (p=0,0562) und NK-Zellen mit einem Anteil von 6,82 % (± 2,35) (p=0,0238). In Tumoren, die mit einer Kombination aus CD40L- und IL-2-exprimierenden DC behandelt wurden, fand sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg an TIL. Im Vergleich zur der Kontrollgruppe wurde eine Steigerung der CD4⁺-Zellen um 21 % (± 8,1) (p=0,1218), der CD8⁺-Zellen um 9,48 % (± 5,11) (p=0,1315) und der NK-Zellen um 1,97 % (± 1,9) (p=0,7590) gemessen. Diese Ergebnisse entsprechen einer Steigerung der CD4⁺-Zellen in den Tumoren um 88 % nach Therapie mit CD40L-DC

bzw. 70 % nach Applikation der CD40L/IL-2 Kombination, einer Steigerung der CD8⁺-Zellen um 75 % bzw. 62 % und einer Steigerung der NK-Zellen um 87 % bzw. 20 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bemerkenswert ist, dass es keine Steigerung der CD8⁺-T-Zellpopulation in der Gruppe gab, die u. a. mit IL-2-DC behandelt wurde im Vergleich zu der mit CD40L-DC-behandelten Gruppe.

Da eine erhöhte Zahl an TIL, v.a. CD8⁺-Zellen, mit einer besseren Prognose einer Karzinomkrankung einhergeht (Clark *et al.*, 1989; Clemente *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2007; Hiroishi *et al.*, 2010; Unitt *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003), passen diese Daten zu den in 3.5.2. beschriebenen Ergebnissen, nach denen sowohl die Therapie mit CD40L-DC als auch die Kombination von CD40L/IL-2-DC zu einer verlängerten Überlebenszeit der Mäuse im Vergleich zur LacZ-Kontrolle geführt haben.

Die signifikante Erhöhung der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen sowie der NK-Zellen weist darauf hin, dass sowohl die erworbene als auch die angeborene Immunität eine Rolle bei der durch die DC-Therapie induzierten Immunantwort spielen.

4. Diskussion

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist mit Tumorlysat gepulste DC mit AdV, kodierend für IL-2 und/oder CD40L, zu transduzieren um eine Überexpression der proinflammatorischen Moleküle CD40L und IL-2 in der Umgebung von DC zu induzieren. In einem *s. c.* Tumormodell der Maus für das HCC konnte durch *i. t.* Injektion der CD40L- und IL-2-exprimierenden DC eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums sowie eine deutliche Steigerung der Überlebenszeit *in vivo* erzielt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten somit einen relevanten Beitrag bei der Suche nach einer wirksamen Immuntherapie des HCC.

Das HCC ist weltweit die fünfthäufigste maligne Erkrankung und der mit Abstand häufigste primäre Lebertumor. Seine Inzidenz ist sowohl in Asien und Afrika als auch in den westlichen Industrieländern ansteigend (Bosch *et al.*, 2004, Dürr und Caselmann, 2000, Kew *et al.*, 2002, Llovet *et al.*, 2003).

Die Prognose des HCC ist in der Regel sehr schlecht und potentiell kurative Resektionen oder eine Lebertransplantation können oft wegen einer zugrundeliegenden Leberzirrhose oder multinodulärem Tumorbefall nicht angewandt werden. Systemische Chemotherapien sind bei HCC weitgehend wirkungslos und zudem bei den meisten Patienten, bedingt durch eine vorhandene Leberzirrhose und schlechter Leberfunktion, sehr toxisch (Trojan *et al.*, 2007). Durch die Einführung des Multikinase-Inhibitors Sorafenib in die Therapie des fortgeschrittenen HCC konnte zwar eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls und der Überlebenszeit erreicht werden, allerdings wurde bisher nur bei wenigen Patienten eine objektive Tumorregression nachgewiesen (Llovet *et al.*, 2008).

Es besteht also nach wie vor ein dringender Bedarf an neuen, effektiven Behandlungsstrategien des HCC.

Das Immunsystem hat das Potential, die Entwicklung und Ausbreitung von Tumoren zu kontrollieren. Viele Tumore überexprimieren tumorspezifische Proteine, die potentiell immunogen sein und vom eigenen Immunsystem spezifisch erkannt werden können (sogen. tumorassoziierte Antigene, TAA).

Allerdings reicht die Antwort des Immunsystems gegen TAA in der Regel nicht aus, um alle Karzinomzellen zu zerstören. Hierfür sind sogen. *Escape*-Mechanismen verantwortlich. Dabei können Tumoren eine Immuntoleranz induzieren und sich so der Immunantwort entziehen. Ziel vieler neuerer immunologischer Therapieansätze ist es deshalb, die Immuntoleranz dem Tumor gegenüber zu durchbrechen und eine tumorspezifische Immunantwort herbeizuführen.

Eine Schlüsselfunktion für die effektive Aktivierung des Immunsystems gegen TAA scheint den DC, mit ihrer Fähigkeit tumorspezifische T-Zellen zu induzieren, zuzukommen. Allerdings zeigten erste Therapieansätze mit unspezifischen, nicht-antigengepulsten DC alleine bislang keine durchschlagenden therapeutischen Erfolge gegen Malignome (Mazzolini *et al.*, 2005; Nakamoto *et al.*, 2007). Um die spezifische antitumorale Wirkung von DC zu verbessern, können die DC mit TAA beladen werden. Dies ermöglicht es den DC die TAA an CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zu präsentieren und eine spezifische Immunantwort induzieren.

In dieser Arbeit wurden die DC mit Tumorlysat gepulst, um sie mit dem gesamten Spektrum aller potentiellen TAA der Tumorzelle zu beladen.

Weiterhin beschäftigen sich viele Studien damit, den immunstimulatorischen Effekt der TAA gepulsten DC im immungeschwächten Tumorpatienten zu steigern und die *Escape*-Mechanismen des Tumors zu überwinden.

Im Rahmen dieser Therapieziele soll in der vorliegenden Arbeit die antitumorale, DC-induzierte Immunantwort gegen das HCC *in vivo* durch die kombinierte Verabreichung des kostimulatorischen Moleküls CD40L und des Zytokins IL-2 gesteigert werden. CD40L ist eines der potentesten kostimulatorischen Moleküle und wird von aktivierten CD4⁺-T-Zellen exprimiert. Seine Interaktion mit dem CD40-Rezeptor auf der Oberfläche der DC induziert eine starke Aktivierung der DC und fördert die Produktion von proinflammatorischen T_H1-Zytokinen (Cella *et al.*, 1996; Bianchi *et al.*, 1999). Zudem ist sie essentiell für die Generierung zytotoxischer T-Zellen (Schoenberger *et al.*, 1998).

IL-2 ist ein Lymphozytenwachstumsfaktor, der von aktivierten T-Zellen, v.a. vom T_H1-Typ, gebildet wird. Zudem hat sich gezeigt, dass IL-2 auch eine direkte antitumorale Wirkung besitzt (Donskov 2007; Fyfe *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden die DC, nach dem Pulsen mit TAA, mit adenoviralen Vektoren, die für die Gene von CD40L bzw. IL-2 kodieren, transduziert. Nach *i. t.* Gabe der trans-

duzierten DC soll die Transgenexpression von CD40L bzw. IL-2 das Tumormilieu, in etablierten HCC, zugunsten einer antitumoralen Immunantwort verändern und so die DC-Immuntherapie des HCC verbessern.

4.1 *In vitro* Untersuchungen

Für die Experimente dieser Arbeit wurden DC aus dem Knochenmark von C3H-Mäusen gewonnen, aufgereinigt und kultiviert. Den DC-Kulturen wurde HCC-Tumorlysat zugesetzt, um die DC so mit TAA zu beladen. Es ist zu erwarten, dass die DC die Tumorproteine durch Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen, die Proteine prozessieren und über MHC-Molekülen an der Oberfläche der DC präsentieren. Der Vorteil des Pulsens mit Tumorlysat ist, dass das gesamte Spektrum der TAA von den DC aufgenommen und prozessiert wird. So können sowohl bekannte als auch unbekannte TAA zur Induktion einer spezifischen Immunantwort genutzt werden. Idealerweise werden dabei sowohl spezifische CD4⁺-T-Helferzellen als auch spezifische zytotoxische CD8⁺-T-Zellen induziert (Bachmann *et al.*, 1996; Paglia *et al.*, 1996; Rock, 1996). Wegen dieser Vorteile wurde das Pulsen der DC mit TAA in dieser Arbeit als Methode zur Beladung der DC mit TAA gewählt.

4.1.1 Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren kodierend für CD40L und IL-2 (AdCD40L und AdIL-2)

Mit Hilfe von AdV der 1. Generation wurden die Gene von IL-2 bzw. CD40L und LacZ in die DC eingebracht.

Nach der Transduktion wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD40 und MHC-II auf den DC durchflusszytometrisch bestimmt. Die genannten Oberflächenantigene dienen als Reifungsparameter für DC. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Zellen zum größten Teil um maturierte DC handelte (siehe 3.3.2).

Interessanterweise zeigte sich bei allen adenoviral transduzierten DC eine Steigerung in der Expression dieser Reifungsmarker im Vergleich zu den nicht transduzierten DC. Neben der Stimulation der DC-Kulturen durch GM-CSF und IL-4 scheinen auch virale Proteine der AdV zur Ausreifung der DC beigetragen und ihre Fähigkeit, spezifische T-Zellen induzieren zu können, erhöht zu haben (Korst *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2003; Schumacher *et al.*, 2004). Die zusätzliche Aktivierung der DC durch die AdV stellt somit einen positiven Nebeneffekt der Transduktion dar.

Darüber hinaus erwies sich die adenoviral vermittelte Transgenexpression als sehr stark und daher geeignet für das hier beschriebene Forschungsvorhaben.

Die Produktion von transgenem IL-2 durch die DC wurde an Tag +8 mit Hilfe eines ELISA im Überstand der Kulturen quantifiziert (siehe 3.3.5). Sie war abhängig von der verwendeten MOI des AdIL-2. Die transgene Expression von CD40L wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.3.4). Auch sie war abhängig von der verwendeten MOI des AdCD40L.

Diese starke Transduktionseffizienz der AdV ist ihr Hauptvorteil im Vergleich zu nichtviralen Vektoren wie Liposomen, kationischen Polymeren oder der Elektroporation (Colosimo *et al.*, 2000). Weiterhin können AdV auch Zellen, die sich nicht mehr oder nur sehr selten teilen, transduzieren. Diese Fähigkeit erlaubte es DC zu transduzieren und zur starken Expression der eingeschleusten DNS zu bringen.

Wie andere, nicht-adenovirale Vektoren, z.B. Lipofektion oder Elektroporation, zeigten auch AdV eine gewisse Toxizität den DC gegenüber. Zellzählungen ergaben, dass die Toxizität aller AdV mit zunehmender MOI anstieg. Bei der durchflusszytometrischen Vitalitätsbestimmung fiel auf, dass der AdIL-2 eine toxischere Wirkung auf die DC hatte als AdCD40L. So waren nach Transduktion mit AdIL-2 bei MOI 250 und bei MOI 500 jeweils etwa 10 % mehr DC untergegangen als nach Transduktion mit AdCD40L (siehe 3.3.4 und 3.3.5). Die Ursache hierfür ist allerdings wahrscheinlich eher in der AdV-Komposition als im kodierten Transgen zu suchen. Durch die Anpassung der adenoviralen MOI, die zur Transduktion verwendet wurden, konnte dieser negative Effekt der AdV jedoch minimiert werden. Ziel dieses Teils der Arbeit war eine maximale Transgenexpression bei einer größtmöglichen Zahl vitaler und ausgereifter DC, zu erreichen. Nach der Analyse der Durchflusszytometrie, der Transgenexpression durch den ELISA sowie der Vitalitätsbestimmung zeigte sich, dass MOI 250 bei AdCD40L und MOI 500 bei AdIL-2 die besten Ergebnisse lieferte.

4.1.2 Zytotoxizitätsassay zur Funktionalitätsüberprüfung der DC *in vitro*

Mit einem Zytotoxizitätsassay wurde die Fähigkeit der TAA gepulsten adenoviral transduzierten DC getestet, tumorspezifische Effektorzellen zu induzieren. In Übereinstimmung mit den publizierten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008) zeigten CD40L-exprimierende DC eine überlegene Fähigkeit,

spezifische Effektorzellen gegen Hepatomzellen, *in vitro*, zu induzieren. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von CD40L bei der Aktivierung von DC bei der Induktion tumorspezifischer Effektorzellen.

Kokulturen von Lymphozyten mit IL-2-produzierenden DC konnten zwar eine tendenziell höhere spezifische Zytotoxizität bei den Lymphozyten hervorrufen als die LacZ-DC-Kontroll-Kokulturen, diese war allerdings nicht signifikant höher. Im Vorfeld des zytotoxischen Assays wurde allen drei Arten von DC-Lymphozyten-Kokulturen IL-2 zugefügt, um das Lymphozytenwachstum zu fördern. Es ist wahrscheinlich, dass diese exogene IL-2-Zugabe für den beobachteten, geringen Unterschied der Effektorzellen aus IL-2-DC- und LacZ-DC-Kokulturen verantwortlich ist. Als Lymphozytenwachstumsfaktor fördert IL-2 die klonale Vermehrung von aktivierten Lymphozyten und hierdurch die quantitative Steigerung der zellulären Immunantwort (Cantrell und Smith, 1983). Für die spezifische Aktivierung der Lymphozyten und die Vermittlung von antitumoraler Spezifität an die Effektorzellen sind jedoch vor allem CD40L-aktivierte DC verantwortlich. Da in diesem zytotoxischen Assay mit festgelegten *Effector-Target*-Verhältnissen gearbeitet wurde, konnte nur die Spezifität der induzierten Effektorzellen beurteilt werden nicht aber deren quantitative Steigerung. Zur Beurteilung der antitumoralen Wirkung von IL-2-sezernierenden DC scheint der zytotoxische Assay daher nicht geeignet. Zur Beurteilung des antitumoralen Effektes von IL-2-induzierten, klonal expandierten, aktivierten Lymphozyten sind *in vivo* Untersuchungen besser geeignet.

4.2 *In vivo* Untersuchungen der antitumoralen Wirksamkeit von IL-2- und CD40L-DC

Die antitumorale Wirkung der mit TAA gepulsten und mit AdIL-2 bzw. AdCD40L transduzierten DC wurde in einem *s. c.* Tumormodell für das HCC *in vivo* untersucht. Hierzu wurden Hepa129-Zellen verwendet, die syngen zu C3H-Mäusen sind. Durch *s. c.* Injektion von Hepa129-Zellen konnten in 100 % der Mäuse *s. c.* HCC-Tumoren induziert werden (Schmitz *et al.*, 2004).

Untersucht wurden die Behandlung mit IL-2-DC sowie die Behandlung mit Kombinationen aus IL-2- und CD40L-DC im Vergleich zur alleinigen Gabe von CD40L-DC. Als Kontrolle dienten LacZ-DC. Die DC wurden *i. t.* injiziert. In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass mit dieser Applikationsform im Vergleich zur *s. c.* und

i. v. Gabe von DC die besten Behandlungsergebnisse erzielen werden (Gonzalez-Carmona *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2003).

4.2.1 Monotherapie mit IL-2- bzw. CD40L-DC

Zunächst wurden IL-2- bzw. CD40L-DC als Monotherapie getestet. Für beide Gruppen konnte eine starke antitumorale Wirksamkeit im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit LacZ-DC sowie zu unbehandelten Tumoren nachgewiesen werden. Bei beiden Ansätzen zeigte sich ein signifikant verringertes Tumorstadium gegenüber unbehandelten Tumoren sowie eine signifikant verlängerte Überlebenszeit der Versuchstiere.

Tumoren, die mit IL-2- bzw. CD40L-DC behandelt wurden, unterschieden sich in ihrem Wachstum nicht signifikant ($p=0,4453$ für Tag +19). Die Daten lassen vermuten, dass sowohl die Aktivierung einer starken T_H1 Immunantwort durch die Transgenexpression von CD40L als auch die wachstumsstimulierende Wirkung von IL-2 auf die T-Zellen einen, in etwa gleichwertigen, antitumoralen Effekt haben könnten. Überraschenderweise war die erzielte antitumorale Wirksamkeit durch IL-2-DC in Bezug auf die Überlebenszeit sogar besser, als die von CD40L-DC. Die Tumoren, welche mit LacZ-DC behandelt wurden, zeigten lediglich ein etwas langsames Wachstum als unbehandelte Tumoren. Hierin spiegelt sich die bekannte, geringere antitumorale Wirkung TAA-gepulster DC ohne Adjuvantien wieder. Dies verdeutlicht wiederum die Notwendigkeit von potenten T_H1 -Zytokinen, wie IL-2, oder kostimulatorischen Molekülen, wie CD40L, im Tumormilieu, um im Tumor eine effektivere DC-induzierte Immunantwort zu erzielen.

4.2.2 Kombinierte Verabreichung von IL-2- und CD40L-DC

In der Literatur wird ein synergistischer Effekt für die Kombination von IL-2 und CD40L bezüglich Proliferation und Aktivierung spezifischer T-Zellen für Melanome, Nierenzellkarzinome und Lymphome beschrieben (Lode *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2006).

Die autokrine Stimulation der DC durch CD40/CD40L-Interaktion induziert über gesteigerte IL-12 Sekretion vor allem $CD4^+$ - T_H1 -Zellen (Kikuchi *et al.*, 2000; Melero *et al.*, 1999; Mazzolini *et al.*, 2005; Nishioka *et al.*, 1999; Tirapu *et al.*, 2002). Die so entstandenen tumorspezifischen T-Helferzellen sollten die DC beim *Cross-priming* der $CD8^+$ -T-Zellen unterstützen und so die Zahl spezifischer zytotoxischer $CD8^+$ -T-Zellen

erhöhen. Als Lymphozytenproliferationsfaktor (Cantrell und Smith, 1983) kann eine Überexpression von IL-2 die klonale Vermehrung der tumorspezifischen T-Zellen unterstützen und so die von CD40L induzierte antitumorale zelluläre Immunreaktion verstärken (Donskov, 2007) und zeitlich verlängern.

Zur Überprüfung des angenommenen Synergismus wurden die *s. c.* Tumoren je zweimal mit einer Injektion einer Kombination von CD40L-exprimierenden und IL-2-sezernierenden DC behandelt. Im Vergleich mit Tumoren die ausschließlich mit CD40L-DC behandelt wurden zeigte sich, entgegen unseren Erwartungen, keine verbesserte antitumorale Wirkung der *i. t.* Kombination von CD40L- und IL-2-exprimierenden DC. Die Inhibition des Tumorwachstums war durch die Kombinationstherapie sogar etwas, wenn auch nicht signifikant, geringer als die, der CD40L-DC-Monotherapie.

In einem weiteren Versuch wurden CD40L- und IL-2-DC sequenziell verabreicht. Die erste Applikation an Tag +11 bestand aus CD40L-DC. Sie sollte zunächst tumorspezifische T-Zellen induzieren. An Tag +16 wurden IL-2-sezernierende DC verabreicht um eine Proliferation der zuvor induzierten tumorspezifischen Lymphozyten zu erreichen. Die sequenzielle Verabreichung von CD40L- und IL-2-DC zeigte ebenfalls keinen Unterschied zur gleichzeitigen Applikation. Beide Kombinationsformen von CD40L- und IL-2-DC führten sogar zu einem geringfügig größeren Tumorwachstum als die CD40L-DC-Monotherapie.

Die tierexperimentell ermittelten Ergebnisse der Kombinationstherapie von CD40L- und IL-2-DC wurde durch die durchflusszytometrischen Untersuchung der *s. c.* Tumoren bestätigt. Die Tumoren enthielten nach Kombinationstherapie deutlich weniger TIL als nach CD40L-DC-Monotherapie. Das zeigte sich sowohl für CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen als auch für NK-Zellen (siehe 3.5.5).

Die kombinierte Gabe von CD40L- und IL-2-DC führte demnach nicht zu dem erwarteten synergistischen antitumoralen Effekten. Verschiedene Ursachen könnten hierfür verantwortlich sein.

In dieser Arbeit wurden die DC mit AdV transduziert, die für humanes IL-2 kodierten. Humanes IL-2 wird regelmäßig in experimentellen Mausmodellen eingesetzt und ihm wird die gleiche Lymphozytenstimulationsfähigkeit in Mäusen zugesprochen wie murinem IL-2 (Mosmann *et al.*, 1987). Trotzdem ist es vorstellbar, dass humanes IL-2 einen nicht ausreichenden Effekt auf die tumorspezifischen zytotoxischen Lymphozyten

im Tumor hat. Derzeit werden daher in unserer Arbeitsgruppe auch Experimente mit murinem IL-2 durchgeführt.

Weiterhin könnten die unerwarteten Ergebnisse der Kombinationstherapie mit der Menge der verabreichten DC zusammenhängen. Bei der Kombination von CD40L- und IL-2 DC wurde von jeder Art nur $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Injektion verwendet. Im Gegensatz zu den 1×10^6 Zellen der Monotherapie mit CD40L-DC könnte die $0,5 \times 10^6$ CD40L-DC nicht ausgereicht haben, um genügend CD40L, und hierdurch induziertes IL-12, zu produzieren um die zytotoxische T-Zellen adäquat zu induzieren. Gleichzeitig könnte die geringere Zahl von $0,5 \times 10^6$ IL-2-DC, im Vergleich zu der Monotherapie mit 1×10^6 IL-2-DC, nicht ausgereicht haben um genügend IL-2 für eine ausreichende Proliferation der Lymphozyten zu produzieren.

Eine weitere, und wahrscheinlich ausschlaggebende, Ursache für die unerwartete, nicht-synergistische antitumorale Wirkung der Kombinationstherapie könnten die z.T. noch nicht ausreichend bekannten Wechselbeziehungen von IL-2 mit anderen Zellen des Immunsystems, wie z. B. den regulatorische T-Zellen (T_{reg}), sein.

IL-2 wird seit den 1980er Jahren als *in vitro* Wachstumsfaktor für Lymphozyten verwendet. Neueren Erkenntnissen nach scheint allerdings eine Hauptaufgabe von IL-2 *in vivo* die Vermittlung von Toleranz gegenüber Selbstantigenen, durch die IL-2-vermittelte Stimulation von T_{reg} , zu sein (Antony *et al.*, 2006). T_{reg} sind eine $CD4^+$, $CD25^+$ und $FOXP3^+$ Unterpopulation von T-Zellen die normalerweise das immunologische Gleichgewicht durch die Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie aufrecht erhält und so den gesunden Menschen gegen Autoimmunreaktionen schützt. Tumoren können sich vor dem Zugriff des Immunsystems schützen, indem sie T_{reg} rekrutieren. Auf diese Weise zweckentfremdet könnten sie Toleranz gegenüber Tumorantigenen verursachen (Curiel *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2001). T_{reg} modulieren die Immunantwort durch direkte Tötung zytotoxischer T-Zellen durch die Hemmung der Produktion zytotoxischer Zytokine und durch aktive Sezernierung immunsuppressiver Zytokine, insbesondere TGF- β und IL-10 (Askenasy *et al.*, 2008). Der FOXP3 Rezeptor wurde als Hauptregulator für Entwicklung und Funktion der T_{reg} sowohl im Thymus als auch in der Peripherie identifiziert (Zhang und Zhao 2007). Die gleichzeitige Expression von FOXP3 und CD25 sind entscheidend für das Überleben der T_{reg} in der Peripherie. FOXP3 induziert die Bildung von CD25 und damit die Schaffung des hochaffinen IL-2-Rezeptors.

Im Gegenzug ist IL-2 essentiell für den Erhalt der FOXP3 Expression in der Peripherie (Nishimura *et al.*, 2004; D'Cruz and Klein, 2005; Kretschmer *et al.*, 2005; Fontenot *et al.*, 2005). Die permanente Expression von CD25, des hochaffinen IL-2-Rezeptors, auf den T_{reg} lässt sie extrem sensibel auf IL-2 reagieren und verdeutlicht die wichtige Rolle von IL-2 für der Regulation der T_{reg} -Aktivität (Guiducci *et al.*, 2005; Antony *et al.*, 2006). IL-2 muss aber nicht per se eine immunsuppressive Wirkung haben. Vielmehr hängt die Rolle von IL-2 *in vivo* davon ab, welche Zellpopulationen im Umfeld vorhanden sind und auf IL-2 reagieren. In der Anwesenheit von T_{reg} vermittelt IL-2 Toleranz gegenüber Selbstantigenen und kann daher, unter Umständen, eine tumorspezifische Immunantwort eher verhindern. In der Abwesenheit von T_{reg} fördert IL-2 allerdings die Induktion einer tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellreaktion (Antony *et al.*, 2006). Diese Erkenntnisse stimmen vermutlich mit unseren Beobachtungen überein.

Verschiedene Studien haben nach Depletion der T_{reg} eine verbesserte Immunreaktion auf Tumor- bzw. Autoantigene bestätigt (Jones *et al.*, 2002; Golgher *et al.*, 2002; Suttmüller *et al.*, 2003). Zur Depletion von T_{reg} können beispielsweise anti-CD25 Antikörper verwendet werden. Die kombinierte Behandlung mit anti-CD25 Antikörpern und TAA-gepulsten DC wurde bereits *in vivo* in einem murinen Pankreastumormodell getestet. Das Tumorstadium war nach Depletion der $CD25^+$ - T_{reg} verlangsamt sowie die Überlebenszeit der Versuchstiere verlängert (Linke *et al.*, 2009).

Ihre Anwendung *in vivo* hätte allerdings den Nachteil, dass auch kürzlich aktivierte $CD8^+$ $CD25^+$ -T-Zellen eliminiert werden könnten (Antony und Restifo, 2002).

Eine Inhibition von FOXP3 scheint sinnvoller. Der Rezeptor ist entscheidend für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des T-regulatorischen Phänotyps der $CD4^+$ -Zellen (Zhang und Zhao, 2007). Über die Herunterregulation von FOXP3 ist noch wenig bekannt. Es wurden aber IL-6, ICER (Inducible cAMP Early Repressor) und HTLV-Tax (Tax Gen des humanen T-Zell-lymphotropen Virus Typ I) als negative Regulatoren der FOXP3-Expression postuliert (Yamano *et al.*, 2005; Bettelli *et al.*, 2006; Bodor *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2006). Nachgewiesen werden konnte die transkriptionsinhibitorische Wirkung von CyclosporinA auf das FOXP3-Gen (Mantel *et al.*, 2006). In der Unterdrückung der T_{reg} könnte allerdings die Gefahr liegen, Autoimmunerkrankungen zu induzieren.

4.3 Resümee und Ausblick

Die Induktion regulatorischer T-Zellen durch IL-2 scheint eine plausible Erklärung für die nicht-synergistische Wirkung der Kombination von CD40L- und IL-2-DC in dieser Arbeit zu sein. In der Tat zeigen weitere gezielte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zu T_{reg} in Hepa129-Tumoren eine Rekrutierung von FOXP3⁺ CD25⁺ CD4⁺-T-Zellen (T_{reg}) in s. c. HCC-Tumoren.

Da T_{reg} vor allem in Entzündungsherden auftreten und CD40L vornehmlich inflammatorische T_H1 induziert, könnte die gemeinsame Expression von IL-2 und CD40L sogar einen negativ verstärkenden Effekt auf die Tumorregression haben. Der Effekt von IL-2 auf die T_{reg}-Population wurde in dieser Arbeit nicht vertieft. Das Ausmaß der Induktion von T_{reg} durch IL-2 sowie die negative Wirkung auf das Tumorstadium bleiben deshalb bisher nur spekulativ. Jedoch bergen der Ansatz der Immuntherapie mit gepulsten DC und auch die Steigerung ihrer immunstimulatorischen Wirkung mittels IL-2 und CD40L noch hohes Potential. In Folgeexperimenten der eigenen Arbeitsgruppe werden derzeit die Menge und der Einfluss der T_{reg} in den Tumoren ermittelt. Außerdem wird derzeit erforscht, ob die Unterdrückung von T_{reg} zu einer Steigerung der anti-tumorale Wirkung von IL-2- und CD40L-exprimierenden DC führt.

5. Zusammenfassung

Das HCC ist der mit Abstand häufigste primäre Lebertumor. Es zählt zu den fünf häufigsten Tumorentitäten weltweit mit etwa 560.000 Neuerkrankungen pro Jahr bei steigender Inzidenz. Als größter Risikofaktor und Präkanzerose für das HCC gilt die Leberzirrhose. Aufgrund zunehmender chronischer Hepatitiden und alkoholbedingter Leberzirrhosen ist die Inzidenz auch in westlichen Industriestaaten in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen.

Trotz verbesserter und früher Diagnose in den letzten Jahren ist die Prognose für Patienten mit HCC immer noch sehr schlecht. Oft ist eine kurative, chirurgische Therapie der Patienten nicht möglich. Zudem spricht das HCC schlecht auf systemische Therapieformen an. Mit neueren Medikamenten wie dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib gelang es die Überlebenszeit der Patienten zu verlängern. Eine definitive Heilung ist aber weiterhin nicht möglich.

Unter diesen Voraussetzungen ist dringend geboten nach weiteren Therapieformen für das HCC zu suchen.

Das Immunsystem hat das Potential, die Entwicklung und Ausbreitung von Tumoren zu kontrollieren. Zudem ist das Immunsystem in der Lage eine spezifische zelluläre Antwort gegen, von HCC gebildete, TAA auszulösen. Zur Initiierung und Aktivierung von spezifischen antitumoralen T-Zellen haben sich DC als potenteste antigenpräsentierende Zellen etabliert. Die Manipulation von DC bietet daher einen vielversprechenden Ansatz um das antitumorale Potenzial des Immunsystems gezielt zu aktivieren und zu steigern.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DC *ex vivo* mit HCC-TAA gepulst werden können und mit Hilfe von IL-2- oder CD40L-kodierenden AdV eine Überexpression von IL-2 bzw. CD40L in den DC induziert wird. IL-2 und CD40L sind als wichtige kostimulatorische bzw. T_H1-Moleküle essentiell für eine effektive Immunantwort. IL-2 ist ein Lymphozytenwachstumsfaktor der antigenspezifische T-Zellen zu klonaler Expansion anregen kann. CD40L ist, im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor CD40, der unter anderem von DC gebildet wird, eines der potentesten kostimulatorischen Moleküle zur Aktivierung von DC und damit von CD4⁺-T-Zellen. *In vitro* konnten die transduzierten DC durchflusszytometrisch anhand von Reifungsmarkern als maturierte

DC charakterisiert werden. Ebenso konnte eine starke, dosisabhängige Transgenexpression von CD40L auf der Zelloberfläche der DC nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Stärke der Transgenexpression von IL-2 war ebenso dosisabhängig und wurde mit einem ELISA im Überstand der DC-Kulturen quantifiziert.

In vivo wurde untersucht, ob eine *i. t.* DC Therapie durch die Expression der kostimulatorischen Moleküle IL-2 bzw. CD40L verbessert werden könnte. Die DC wurden *i. t.* in *s. c.* HCC bei C3H Mäusen appliziert. Neben der Einzeltherapie mit entweder IL-2-DC oder CD40L-DC wurde auch ein möglicher synergistischer Effekt einer kombinierten Gabe von IL-2- und CD40L-DC untersucht. Sowohl für IL-2- als auch für CD40L-exprimierende DC konnte nach Applikation beider Therapien eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums sowie eine signifikante Steigerung der Überlebenszeit erzielt werden. Bei der kombinierten Gabe von IL-2- und CD40L-exprimierenden DC konnten zwar auch signifikante, antitumorale Effekte im Vergleich zu Kontroll-DC (LacZ-DC) erreicht werden, allerdings konnte der erwartete synergistische antitumorale Effekt der Kombinationstherapie nicht nachgewiesen werden.

Eine mögliche Ursache hierfür könnten T_{reg} darstellen. Normalerweise ist diese Unterpopulation von $CD4^+$ -T-Zellen für die Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts und die Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen zuständig. Da sie sehr sensibel auf IL-2 reagieren, könnten sie suppressiv auf die TAA-spezifischen $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen gewirkt haben.

Diese Arbeit verdeutlicht das große Potenzial von DC in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen und weist Wege zur Verstärkung der antitumoralen Immunreaktion durch die transgene Überexpression potenter kostimulatorischer Moleküle wie CD40L oder T_H1 -Zytokine wie IL-2. In Zukunft sollte die Wechselwirkung der Zytokine, v.a. im Bezug auf T_{reg} genauer untersucht werden, und so die hier beschriebenen immunologischen Ansätze weiter optimiert werden.

6. Literaturverzeichnis

Amato RJ, Morgan M, Rawat A. Phase I/II study of thalidomide in combination with interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 2006; 106: 1498-1506

Antony PA, Paulos CM, Ahmadzadeh M, Akpınarli A, Palmer DC, Sato N, Kaiser A, Hinrichs CS, Klebanoff CA, Tagaya Y, Restifo NP. Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol* 2006; 176: 5255-5266

Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW, Rosenberg SA, Restifo NP. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174: 2591-2601

Antony PA, Restifo NP. Do CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells hinder tumor immunotherapy? *J Immunother* 2002; 25: 202-206

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

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

Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 370-375

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

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, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001; 61: 6451-6458

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 1997; 186: 65-70

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, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, Crowell RL, Finberg RW. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 1998; 72: 415-419

Berk AJ *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, HRSG. *Fields Virology*, 5th Edition, Volume Two. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2355-2394

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

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238

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

Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohmé I, Forsberg B, Eklund B, Fjeldborg O, Friedberg M, Frödin L. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 1995; 60: 183-189

Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 5093-5107

Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 161-167

Bosch FX, Ribes J, Borràs J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 271-285

Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16

Bray F, Guerra Yi M, Parkin DM. Comprehensive Cancer Monitoring Programme in Europe. *Eur J Public Health* 2003;13: 61-66

Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236

Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J; EASL Panel of Experts on HCC. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-430

Buell JF, Gross TG, Woodle ES. Malignancy after transplantation. *Transplantation* 2005; 80: S254-S264

Bukowski RM. Cytokine therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 2001; 19: 148-154

Butterfield LH. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S232-S241

Butterfield LH, Meng WS, Koh A, Vollmer CM, Ribas A, Dissette VB, Faull K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. 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, Potter DM, Economou JS. Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2007 56: 1931-1943

Cantrell DA, KA Smith. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J Exp Med* 1983; 158: 1895-1911

Caselmann WH, Blum HE, Fleig WE, Huppert PE, Ramadori G, Schirmacher P, Sauerbruch T. [Guidelines of the German Society of Digestive and Metabolic Diseases for diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. German Society of Digestive and Metabolic Diseases]. *Z Gastroenterol* 1999; 37: 353-365

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

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, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 1855-1859

Chang WY. Complete spontaneous regression of cancer: four case reports, review of literature, and discussion of possible mechanisms involved. *Hawaii Med J* 2000; 59: 379-387

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893-1904

Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77: 1303-1310

Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ, Gruenert DC. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques*. 2000; 29: 314-318, 320-322, 324

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-949

D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 2005; 6: 1152-1159

Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta* 2008; 395: 19-26

Di Bisceglie AM, Carithers RL Jr, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 28: 1161-1165

Doerfler W, Boehm P. *The Molecular Repertoire of Adenoviruses*. Berlin: Springer, 1995

Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75: 347-354

Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 323-331

Donskov F. Interleukin-2 based immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Dan Med Bull* 2007; 54: 249-265

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-148

Durr R, Caselmann WH. Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 154-161

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576

El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-468

Esche C, Lokshin A, Shurin GV, Gastman BR, Rabinowich H, Watkins SC, Lotze MT, Shurin MR. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999a; 66: 336-344

Esche C, Shurin MR, Lotze MT. The use of dendritic cells for cancer vaccination. *Curr Opin Mol Ther* 1999b; 1: 72-81

Falke D. Adeno-Viren. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 4. Auflage. Berlin: Springer, 2001: 625-628

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-S50

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

Feitelson MA. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5: 367-374

Feuerer M, Beckhove P, Bai L, Solomayer EF, Bastert G, Diel IJ, Pedain C, Oberniedermayr M, Schirmacher V, Umansky V. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 2001; 7: 452-458

Fiel MI, Min A, Gerber MA, Faire B, Schwartz M, Thung SN. Hepatocellular carcinoma in long-term oral contraceptive use. *Liver* 1996; 16: 372-376

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 1142-1151

Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 688-696

Ganji P, Nadji M, Albores-Saavedra J, Morales AR. Histologic markers in primary and metastatic tumors of the liver. *Cancer* 1988; 62: 1994-1998

Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, Xu Y, Li YW, Tang ZY. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2586-2593

Gerard RD, Chan L. Adenovirus-mediated gene transfer: strategies and applications in lipoprotein research. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 105-111

Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3267-3275

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, Märten A, Hoffmann P, Schneider C, Sievers E, Schmidt-Wolf IG, Sauerbruch T, Caselmann WH. Patient-derived dendritic cells transduced with an a-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

Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 65-77

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

Granucci F, Andrews DM, Degli-Esposti MA, Ricciardi-Castagnoli P. IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells. *Trends Immunol* 2002; 23: 169-171

Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001; 2: 882-888

Guiducci C, Valzasina B, Dislich H, Colombo MP. CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Eur J Immunol* 2005; 35: 557-567

Hanke P, Rabe C, Serwe M, Böhm 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* 2002; 37: 949-955

Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213

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

Herr W, Ranieri E, Olson W, Zarour H, Gesualdo L, Storkus WJ. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses. *Blood* 2000; 96: 1857-1864

Hicks DG, Kulkarni S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1008-1015

Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2010; 45: 451-458

Husmann LA, Bevan MJ. Cooperation between helper T cells and cytotoxic T lymphocyte precursors. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 532: 158-169

Ikeguchi M, Hirooka Y. Interleukin-2 gene expression is a new biological prognostic marker in hepatocellular carcinomas. *Onkologie* 2005; 28: 255-259

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, Witmer-Pack M, Hatchcock K, Hodes R, Steinman RM. Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 1995; 378: 65-70

Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994; 180: 1849-1860

Iwashita Y, Tahara K, Goto S, Sasaki A, Kai S, Seike M, Chen CL, Kawano K, Kitano S. A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 155-161

Jackaman C, Bundell CS, Kinnear BF, Smith AM, Filion P, van Hagen D, Robinson BW, Nelson DJ. IL-2 intratumoral immunotherapy enhances CD8+ T cells that mediate destruction of tumor cells and tumor-associated vasculature: a novel mechanism for IL-2. *J Immunol* 2003; 171: 5051-5063

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002

Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 151-155

Jones E, Dahm-Vicker M, Simon AK, Green A, Powrie F, Cerundolo V, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun* 2002; 2: 1

Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, Zeh HJ, Basse P, Bartlett DL, Kirkwood JM, Lotze MT, Herberman RB. Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1303-1315

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 174-177

Kato T, Hakamada R, Yamane H, Nariuchi H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol* 1996; 156: 3932-3938

Kawata A, Une Y, Hosokawa M, Wakizaka Y, Namieno T, Uchino J, Kobayashi H. Adjuvant chemoimmunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Adriamycin, interleukin-2, and lymphokine-activated killer cells versus adriamycin alone. *Am J Clin Oncol* 1995; 18: 257-262

Keene JA, Forman J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1982; 155: 768-782

Kew MC. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 35-38

Kikuchi T, Moore MA, Crystal RG. Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. *Blood* 2000; 96: 91-99

Knolle PA, Limmer A. Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly* 2003; 133: 501-506

Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kämpgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med*. 1996; 184: 741-746

Kochanek S. Gentransfer mit adenoviralen Vektoren. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2001; 44: 1031-1037

Korst RJ, Mahtabifard A, Yamada R, Crystal RG. Effect of adenovirus gene transfer vectors on the immunologic functions of mouse dendritic cells. *Mol Ther* 2002; 5: 307-315

Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; 6: 1219-1227

Kuang M, Peng BG, Lu MD, Liang LJ, Huang JF, He Q, Hua YP, Totsuka S, Liu SQ, Leong KW, Ohno T. Phase II randomized trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1574-1579

Kumar S, Witzig TE, Rajkumar SV. Thalidomid: current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2477-2488

Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC 3rd. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol* 1998; 160: 3861-3868

Lee CF, Ling ZQ, Zhao T, Lee KR. Distinct expression patterns in hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6072-6077

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

Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006; 25: 3834-3847

Liang TJ, Heller T. Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S62-S71

Lin TJ, Liao LY, Lin CL, Shih LS, Chang TA, Tu HY, Chen RC, Wang CS. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case report and literature review. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 579-582

Linke A, Brossart P, Schmidt-Wolf IG, Gonzalez-Carmona MA, Ziske C, Messmer D, Schmitz V, Sauerbruch T. Enhanced inhibition of tumor growth with depletion of CD25 regulatory cells and intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells in a C57BL/6 pancreatic tumor model. *Pancreas*. 2009; 38: 602-604.

Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002; 82: 97-130

Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 225-235

Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-338

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390

Lode HN, Xiang R, Pertl U, Förster E, Schoenberger SP, Gillies SD, Reisfeld RA. Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4(+) T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction. *J Clin Invest* 2000; 105: 1623-1630

Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004; 127: S303-309

Lotz JP, Grange JD, Hannoun L, Boudghene F, Amiot X, Lamarque D, Andre T, Estes A, Bellaiche A, Bouleuc C, *et al*. Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with a combination of human recombinant alpha-2b interferon and doxorubicin: results of a pilot study. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1319-1325

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275

Luo G, Huang S, Xie X, Stockert E, Chen YT, Kubuschok B, Pfreundschuh M. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun* 2002; 2: 11

Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 74-81

Lygidakis NJ, Kosmidis P, Ziras N, Parissis J, Kyparidou E. Combined transarterial targeting locoregional immunotherapy-chemotherapy for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a new alternative for an old problem. *J Interferon Cytokine Res.* 1995; 15: 467-472

Ma CK, Zarbo RJ, Frierson HF Jr, Lee MW. Comparative immunohistochemical study of primary and metastatic carcinomas of the liver. *Am J Clin Pathol.* 1993; 99: 551-557

Ma NF, Lau SH, Hu L, Xie D, Wu J, Yang J, Wang Y, Wu MC, Fung J, Bai X, Tzang CH, Fu L, Yang M, Su YA, Guan XY. COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5061-5068

Mantel PY, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 2006; 176: 3593-3602

Marin HL, Furth EE, Olthoff K, Shaked A, Soulen MC. Histopathologic outcome of neoadjuvant image-guided therapy of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* 2009; 18: 169-176

Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42: 218-224

Märten A, Ziske C, Schöttker B, Renoth S, Weineck S, Buttgereit P, Schakowski F, Klingmüller D, Scheffold C, von Rücker A, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Increase in the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with serum derived from pancreatic and colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15: 197-205

Mazzolini G, Alfaro C, Sangro B, Feijó E, Ruiz J, Benito A, Tirapu I, Arina A, Sola J, Herraiz M, Lucena F, Olagüe C, Subtil J, Quiroga J, Herrero I, Sádaba B, Bendandi M, Qian C, Prieto J, Melero I. Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Clin Oncol* 2005; 23: 999-1010

Melero I, Duarte M, Ruiz J, Sangro B, Galofré J, Mazzolini G, Bustos M, Qian C, Prieto J. Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of established murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Ther* 1999; 6: 1779-1784

Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1990; 171: 1753-1771

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

Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 2006; 214: 219-228

Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-1067

Mosmann TR, Yokota T, Kastelein R, Zurawski SM, Arai N, Takebe Y. Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). *J Immunol.* 1987; 138: 1813-1816

Mukherjee S, Upham JW, Ramshaw I, Bundell C, van Bruggen I, Robinson BW, Nelson DJ. Dendritic cells infected with a vaccinia virus interleukin-2 vector secrete high levels of IL-2 and can become efficient antigen presenting cells that secrete high levels of the immunostimulatory cytokine IL-12. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 591-602

Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 1998; 187: 2103-2108

Murphy WJ, Welniak L, Back T, Hixon J, Subleski J, Seki N, Wigginton JM, Wilson SE, Blazar BR, Malyguine AM, Sayers TJ, Wiltout RH. Synergistic anti-tumor responses after administration of agonistic antibodies to CD40 and IL-2: coordination of dendritic and CD8+ cell responses. *J Immunol* 2003; 170: 2727-2733

Murugaiyan G, Martin S, Saha B. Levels of CD40 expression on dendritic cells dictate tumour growth or regression. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 194-202

Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S. Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: clinical safety. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 296-305

Negrier S, Maral J, Drevon M, Vinke J, Escudier B, Philip T. Long-term follow-up of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with intravenous recombinant interleukin-2 in Europe. *Cancer J Sci Am* 2000; 6 Suppl 1: S93-98

Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1189-1201

Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, Ogawa H, Yamamoto S, Tani K, Sone S. Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 2001; 253: 113-124

Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res* 1999; 59: 4035-4041

Noureddini SC, Curiel DT. Genetic targeting strategies for adenovirus. *Mol Pharm* 2005; 2: 341-347

O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 2004; 104: 2235-2246

Ochoa AC, Gromo G, Alter BJ, Sondel PM, Bach FH. Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, beta-IL 1, interferon-gamma and -beta. *J Immunol* 1987; 138: 2728-2733

Oh U, Grant C, Griffith C, Fugo K, Takenouchi N, Jacobson S. Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during human t lymphotropic virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2006; 193: 1557-1566

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

Ormandy LA, Farber A, Cantz T, Petrykowska S, Wedemeyer H, Horning M, Lehner F, Manns MP, Korangy F, Greten TF. Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3275-3282

Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 2457-2464

Ouyang W, Jacobson NG, Bhattacharya D, Gorham JD, Fenoglio D, Sha WC, Murphy TL, Murphy KM. The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3888-3893

Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 317-322

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

Peng BG, Liang LJ, He Q, Kuang M, Lia JM, Lu MD, Huang JF. Tumor vaccine against recurrence of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 700-704

Peter I, Nawrath M, Kamarashev J, Odermatt B, Mezzacasa A, Hemmi S. Immunotherapy for murine K1735 melanoma: combinatorial use of recombinant adenovirus expressing CD40L and other immunomodulators. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 597-605

Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, Wogan GN, Groopman JD. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 3-10

Rabe C, Lenz M, Schmitz V, Pilz T, Fimmers R, Sauerbruch T, Caselmann WH. An independent evaluation of modern prognostic scores in a central European cohort of 120 patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1305-1315

Rayson D, Richel D, Chia S, Jackisch C, van der Vegt S, Suter T. Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies. *Ann Oncol* 2008; 19: 1530-1539

Reinisch W, Holub M, Katz A, Herneth A, Lichtenberger C, Schoniger-Hekele M, Waldhoer T, Oberhuber G, Ferenci P, Gangl A, Mueller C. Prospective pilot study of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *J Immunother* 2002; 25: 489-499

Rinaldi M, Iurescia S, Fioretti D, Ponzetto A, Carloni G. Strategies for successful vaccination against hepatocellular carcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009; 22: 269-277

Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 1996; 17: 131-137

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

Rousseau RF, Biagi E, Dutour A, Yvon ES, Brown MP, Lin T, Mei Z, Grilley B, Popek E, Heslop HE, Gee AP, Krance RA, Popat U, Carrum G, Margolin JF, Brenner MK. Immunotherapy of high-risk acute leukemia with a recipient (autologous) vaccine expressing transgenic human CD40L and IL-2 after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107: 1332-1341

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995;182: 389-400

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118

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

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

Schmidt-Wolf GD, Negrin RS, Schmidt-Wolf IG. Activated T cells and cytokine-induced CD3+CD56+ killer cells. *Ann Hematol*. 1997; 74: 51-56

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

Schmitz V, Tirado-Ledo L, Tiemann K, Raskopf E, Heinicke T, Ziske C, González-Carmona MA, Rabe C, Wernert N, Prieto J, Qian C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Establishment of an orthotopic tumour model for hepatocellular carcinoma and non-invasive in vivo tumour imaging by high resolution ultrasound in mice. *J Hepatol* 2004; 40: 787-791

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

Schönfelder T, Matern S. Maligne Lebertumoren. In: Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M, HRSG. *Thiemes Innere Medizin*. Stuttgart - New York: Thieme, 1999: 778-781

Schumacher L, Ribas A, Dissette VB, McBride WH, Mukherji B, Economou JS, Butterfield LH. Human dendritic cell maturation by adenovirus transduction enhances tumor antigen-specific T-cell responses. *J Immunother* 2004; 27: 191-200

Schurr R, Stölzel U, Schuppan D, Schwertner C, Steinberg J, Scherübl H. Zunahme des hepatozellulären und des intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms im Nordosten Deutschlands. *Dtsch Med Wochenschr*. 2006; 131: 1649-1655

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 1988; 168: 1675-1684

Seror O, N'Kontchou G, Tin Tin Htar M, Durand-Zaleski I, Trinchet JC, Sellier N, Beaugrand M. Ethanol versus radiofrequency ablation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a retrospective study of efficacy and cost. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 1265-1273

Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*, 4th Edition. New York: Wiley & Sons, 2003

Sharma S, Batra RK, Yang SC, Hillinger S, Zhu L, Atianzar K, Strieter RM, Riedl K, Huang M, Dubinett SM. Interleukin-7 gene-modified dendritic cells reduce pulmonary tumor burden in spontaneous murine bronchoalveolar cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1511-1524

Shi J, Zhu L, Liu S, Xie WF. A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br J Cancer* 2005; 92: 607-612

Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, Fan ZP, Xu DP, Wang FS. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1146-1151

Shurin MR. Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43: 158-164

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

Sievers E, Albers P, Schmidt-Wolf IG, Märten A. Telomerase pulsed dendritic cells for immunotherapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171: 114-119

Song HS, Kim IH, Sohn SS, Kwon KY, Lee WS. Prognostic significance of p53, Rb, EGFR, and c-erbB2 genes in curatively resected gastric cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 2003

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

Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988; 334: 255-258

Stift A, Friedl J, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Schueller G, Zontsich T, Benkoe T, Radelbauer K, Brostjan C, Jakesz R, Gnant M. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 135-142

Stoelben E, Koch M, Hanke S, Lossnitzer A, Gaertner HJ, Schentke KU, Bunk A, Saeger HD. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma confirmed by surgical specimen: report of two cases and review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383: 447-452

Stuart K, Tessitore J, Huberman M. 5-Fluorouracil and alpha-interferon in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1996; 19: 136-139

Sun L, Liu J, Cao X, Zhang M, Zhou Y, Liu B, Shi H. [Enhancement of antigen presenting function of dendritic cells by IL-2 gene modification and its mechanism]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2002; 23: 247-250

Sutmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; 194: 823-832

Takahashi S, Rousseau RF, Yotnda P, Mei Z, Dotti G, Rill D, Hurwitz R, Marini F, Andreeff M, Brenner MK. Autologous antileukemic immune response induced by chronic lymphocytic leukemia B cells expressing the CD40 ligand and interleukin 2 transgenes. *Hum Gene Ther* 2001a; 12: 659-670

Takahashi S, Yotnda P, Rousseau RF, Mei Z, Smith S, Rill D, Younes A, Brenner MK. Transgenic expression of CD40L and interleukin-2 induces an autologous antitumor immune response in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Gene Ther* 2001b; 8: 378-387

Takayama T, Makuuchi M, Sekine T, Terui S, Shiraiwa H, Kosuge T, Yamazaki S, Hasegawa H, Suzuki K, Yamagata M, *et al.* Distribution and therapeutic effect of intraarterially transferred tumor-infiltrating lymphocytes in hepatic malignancies. A preliminary report. *Cancer* 1991; 68: 2391-2396

Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y; Liver Cancer Study Group of Japan. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* 2006; 131: 461-469

Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *Aaps J* 2005; 7: E14-19

Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996; 382: 171-174

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

Tirapu I, Arina A, Mazzolini G, Duarte M, Alfaro C, Feijoo E, Qian C, Chen L, Prieto J, Melero I. Improving efficacy of interleukin-12-transfected dendritic cells injected into murine colon cancer with anti-CD137 monoclonal antibodies and alloantigens. *Int J Cancer*. 2004; 110: 51-60

Tirapu I, Rodriguez-Calvillo M, Qian C, Duarte M, Smerdou C, Palencia B, Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Cytokine gene transfer into dendritic cells for cancer treatment. *Curr Gene Ther* 2002; 2: 79-89

Trojan J, Hammerstingl R, Strey CW, Vogl TJ, Bechstein WO, Zeuzem S. Fortschritte in der bildgebenden Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Dtsch Arztebl* 2007; 104: A 3326-3333

Unitt E, Marshall A, Gelson W, Rushbrook SM, Davies S, Vowler SL, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ. Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J Hepatol* 2006; 45: 246-253

van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 2-17

Vollmer CM Jr, Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Koh A, Montejo LD, Lee MC, Andrews KJ, McBride WH, Glaspy JA, Economou JS. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 3064-3067

Wang Y, Chen H, Wu M, Bao J, Cong W, Wang H. Postoperative immunotherapy for patients with hepatocarcinoma using tumor-infiltrating lymphocytes. *Chin Med J (Engl)* 1997; 110: 114-117

Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007

Wells JW, Darling D, Farzaneh F, Galea-Lauri J. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. *Scand J Immunol* 2005; 61: 251-259

Wickham TJ, Filardo EJ, 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

Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, HRSG. *Fields Virology*, 5th Edition, Volume Two. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2395-2436

Wolff K. Zur Enzymaktivität in den Langerhansschen Zellen. *Archiv für klinische u. experimentelle Dermatologie* 1964; 218: 446-460

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 4766-4772

Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1849-1853

Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, Maric DA, Jacobson S. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1361-1368

Yau T, Chan P, Epstein R, Poon RT. Evolution of systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6437-6441

Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 2006; 86: 231-245

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 203-213

Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol* 2007; 211: 590-597

Zhao L, Mou DC, Leng XS, Peng JR, Wang WX, Huang L, Li S, Zhu JY. Expression of cancer-testis antigens in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2034-2038

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Tilmann Sauerbruch dafür danken, dass ich diese Arbeit unter seiner Leitung in der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Bonn erstellen konnte.

Ganz besonders danke ich Dr. Maria-Angeles González-Carmona für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und für die hervorragende Betreuung meiner Promotionsarbeit, insbesondere für die geduldige Einarbeitung in die Labortechniken und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Auch Annabell Vogt möchte ich für ihre Hilfe im Laboralltag und bei Fragen aller Art herzlich danken.

Ferner danke ich allen anderen Mitarbeitern des Labors 61 für ihre Unterstützung.

Abschließend danke ich meinen Eltern und meiner Freundin Katharina für das Korrekturlesen und die moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Wolfram Demmer

Schul- und Hochschulausbildung

August 1991 bis Juni 2000	Schulzeit und Abitur am Hollenberg Gymnasium, Waldbröl
September 2000 bis Juni 2001	Grundwehrdienst, 1./231 Geb.Jg.Btl. Bad Reichenhall
Oktober 2001 bis Juli 2002	Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
September 2002 bis Januar 2003	Geoökologiestudium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
März 2003 bis Juli 2003	Medizinstudium an der Universität zu Köln
September 2003 bis September 2009	Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
September 2004	Physikum
September 2005 bis April 2006	Medizinstudium im Rahmen des Erasmusprogramms der EU an der Université (VI) Pierre et Marie Curie in Paris
April 2008 bis August 2008	Auslandsaufenthalt im Rahmen des Praktischen Jahres an der Universidad de Santiago de Chile und an der McGill University in Montreal, Kanada
Mai 2009	Zweites Staatsexamen in Medizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Berufliche Tätigkeiten

November 2009 bis November 2010	Assistenzarzt in der allgemeinchirurgischen Abteilung des Bundeswehrzentralkrankenhauses in Koblenz
November 2010 bis April 2011	Stipendiat des Carlo-Schmid-Programms im StopTB Department der Weltgesundheitsorganisation (WHO), Genf
Juli 2011 bis September 2011	Wehrübung in der Plastischen- und Handchirurgie des Bundeswehrkrankenhauses in Berlin
Seit Oktober 2011	Assistenzarzt in der Orthopädie/Unfallchirurgie im Katholischen Klinikum Essen

Veröffentlichungen

World Health Organization. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015. Geneva, World Health Organisation, 2011

Demmer W. Chirurgie in Entwicklungsländern: Grundversorgung verbessern. Dtsch Arztebl 2011; 108: 1424-1425

Posterbeiträge

Gonzalez-Carmona MA, Vogt A, Demmer W, Sauerbruch T, Caselmann WH. Intratumoral Treatment with Dendritic Cells Engineered to Express CD40L or CD40L and IL-2 Induces Inhibition of Subcutaneous Hepatocellular Tumor Growth in Mice. 59th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). San Francisco 31. Oktober - 4. November 2008. AASLD Abstracts and e-Poster Archive (<http://aasld.scientificabstracts.org>)

Vogt A, Demmer W, Caselmann WH, Sauerbruch T, Gonzalez-Carmona MA. Intratumoral Treatment with Dendritic Cells Engineered to Express CD40L or CD40L and IL-2 Induces Inhibition of Subcutaneous Hepatocellular Tumor Growth in Mice. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Kopenhagen, 22.-26. April 2009. J Hepatol 2009; 50(1): 122-123

Vogt A, Demmer W, Decker G, Sauerbruch T, Gonzalez-Carmona MA. Inhibition des Tumorwachstums von etablierten HCC-Tumoren durch intratumorale Behandlung mit CD40L- oder CD40L/IL-2-exprimierenden dendritischen Zellen in vivo. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Hamburg, 30. September - 3. Oktober 2009. Z Gastroenterol 2009; 47: 401

Vogt A, Demmer W, Sauerbruch T, Gonzalez-Carmona MA. Inhibition des Tumorwachstums von etablierten HCC-Tumoren durch intratumorale Behandlung mit CD40L- oder CD40L/IL-2-exprimierenden dendritischen Zellen in vivo. 25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Heidelberg, 30.-31. Januar 2009. Z Gastroenterol 2009; 47: 352