

**Immuntherapie des hepatozellulären Karzinoms mittels CD40-Ligand  
exprimierenden dendritischen Zellen in vivo**

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

Anne Timmermann  
aus Hamburg  
2015

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ingo G. H. Schmidt-Wolf
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.11.2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

Meinen Eltern Inge und Hans-Jürgen Timmermann  
und Alain Sermier für Ihren Zuspruch.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom.....	11
1.1.2 Epidemiologie des hepatozellulären Karzinoms.....	11
1.1.3 Ätiologie des HCC.....	11
1.1.4 Die Pathogenese des HCC.....	13
1.1.5 Die Prognose des HCC.....	14
1.1.6 Standardtherapie des HCC.....	15
1.1.6.1 Chirurgische Therapie des HCC.....	15
1.1.6.2 Perkutane Alkoholinjektion.....	16
1.1.6.3 Radio-Frequenz-Thermoablation (RFTA).....	17
1.1.6.4 Laserinduzierte Thermotherapie .....	17
1.1.6.5 Kryotherapie.....	18
1.1.6.6 Transarterielle Chemoembolisation .....	18
1.1.6.7 Strahlentherapie/Radioiod-Lipiodol-Therapie.....	19
1.1.6.8 Selektive Interne Radio-Therapie (SIRT).....	19
1.1.6.9 Systemische Therapie des HCC mit Sorafenib.....	20
1.1.6.10 Chemotherapie des HCC.....	20
1.1.6.11 Hormontherapie.....	21
1.2 Malignome und das Immunsystem.....	21
1.3 Immuntherapie des HCC.....	23
1.3.1 Immuntherapie mittels immunstimulierenden Zytokine.....	23
1.3.2 Aktive Immunisierung.....	24
1.3.3 Antikörper basierte immunologische Therapieansätze.....	24
1.3.4 Immunologische Therapieansätze mit Dendritische Zellen.....	25
1.3.4.1 Dendritische Zellen.....	25
1.3.4.2 Therapieansätze mit TAA-beladenen DC.....	25
1.3.4.3 Optimierung von DC-basierten Immuntherapien:Kostimulation mit CD40 Ligand.....	26
1.4 Adenovirale Vektoren.....	27

1.4.1	Adenoviren: Allgemeines.....	27
1.4.2	Aufbau.....	28
1.4.3	Genexpression.....	28
1.4.4	Gentransfer mit dem humanen Adenovirus Serotyp 5 als Vektor.....	29
1.4.5	Adenovirale Vektoren und DC.....	29
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	30
<b>2.</b>	<b>Material.....</b>	<b>31</b>
2.1	Laborgeräte.....	31
2.2	Eukaryontische Zelllinien.....	32
2.3	Mausstämme.....	32
2.4	Adenovirale Vektoren.....	32
2.5	Medien, Lösungen und Puffer.....	32
2.6	Antikörper.....	35
2.7	Zytokine.....	35
2.8	Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	35
<b>3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>37</b>
3.1	Zellbiologische und proteinbiochemische Methoden.....	37
3.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	37
3.1.2	Einfrieren, Aufbewahren und Auftauen von Zellen.....	37
3.1.3	Passagieren von Zellen.....	37
3.1.4	Zellzahlbestimmung in der Zählkammer nach Neubauer.....	38
3.1.5	Vermehrung adenoviraler Vektoren zur Produktion eines Virusstocks .....	38
3.1.6	Aufreinigung adenoviraler Vektoren mittels Cäsiumchlorid- Dichtegradienten-Zentrifugation.....	39
3.1.6.1	Diskontinuierlicher CsCl-Stufengradient.....	40
3.1.6.2	Kontinuierlicher CsCl-Stufengradient.....	40
3.1.6.3	Dialyse und Aufbewahrung der Adenoviren.....	40
3.1.7	Titerbestimmung durch Plaque Assay in 911–Zellen.....	41

3.1.8	Extraktion von Proteinen aus Tumorzellen und Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford und Lowry.....	41
3.1.9	Gewinnung von murinen DC aus dem Knochenmark von C3H/HeN Mäusen...	42
3.1.10	Pulsen von DC mit Tumorlysat .....	43
3.1.11	Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren.....	43
3.1.12	Durchflusszytometrie.....	44
3.1.13	Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie.....	44
3.1.14	Bestimmung der Konzentration von IL-12 mittels ELISA.....	45
3.2	Tierexperimente.....	45
3.2.1	Induktion eines subkutanen HCC in C3H/HeN Mäusen.....	45
3.2.2	Tumorreexposition.....	46
3.2.3	Applikation von DC zur Immuntherapie von etabliertem HCC.....	46
3.2.4	Durchflusszytometrie von Tumoren.....	46
3.3	Statistik.....	47
<b>4.</b>	<b>Resultate.....</b>	<b>48</b>
4.1	Adenovirale Vermehrung und Aufreinigung.....	48
4.2	Plaque-Assay und Titerbestimmung.....	49
4.3	Nachweis der CD40L-Expression von Ad-CD40L-transduzierten DC .....	50
4.4	Phänotyp der Ad-CD40L-transduzierten DC.....	51
4.5	Morphologische Veränderungen von CD40L transduzierten DC.....	52
4.6	Analyse der IL-12-Expression im Überstand von Ad-CD40L-transduzierte DC.	53
4.7	Einfluss der i.t.-Gabe von Ad-CD40L auf das Tumorwachstum im HCC Mausmodell.....	54
4.8	Einfluss von CD40L-exprimierenden DC auf das Tumorwachstum im HCC Mausmodell. Bedeutung des Applikationsweges von DC .....	56
4.9	Einfluss von CD40L-exprimierenden DC auf das Tumorwachstum von fortgeschrittenem HCC im Mausmodell.....	58
4.10	Tumorzellreexposition.....	60
4.11	Veränderung des IL-12-Spiegel im Serum i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC.....	60

4.12	Analyse der immunologischen Zellpopulationen in Lymphozyten und Tumoren nach i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC.....	61
5.	<b>Diskussion.....</b>	<b>64</b>
6.	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
7.	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
8.	<b>Danksagung.....</b>	<b>88</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Ad	adenoviraler Vektor
Ad5	humanes Adenovirus Typ 5
AFP	Alpha-Fetoprotein
APC	antigenpräsentierende Zellen
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CAR	Coxsackie Adenovirus Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CsCl	Cäsium-Chlorid
DC	dendritische Zellen (dendritic cells)
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF-Rezeptor	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot
FCS	fötales Kälberserum
FSC	forward scatter
GFP	green fluorescence protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GY	Gray
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HER	humanen embryonalen Retinoblasten
HS	Pferdeserum (horse serum)
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.t.	intratumoral

ITR	inverted terminal repeats
i.v.	intravenös
Kbp	Kilobasenpaare
LITT	laserinduzierte Thermotherapie
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
MRT	Magnetresonanztomographie
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors
PEI	percutaneous ethanol injection
pfu	plaque forming units
pRB	Retinoblastoma
RFTA	Radio-Frequenz-Thermoablation
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SSC	sideward scatter
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TCR	T-Zell Antigenrezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TLR-9	Toll-like Rezeptor 9
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular-endothelial-growth-factor
ZTL	zytotoxische T-Zelle

## 1. Einleitung

### 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

#### 1.1.2 Epidemiologie des HCC

Das HCC gehört mit zu den häufigsten Karzinomen bei Männern und Frauen. Jährlich gibt es bis zu 564.000 Neuerkrankungen weltweit, davon sind 398.000 Männer und 166.000 Frauen betroffen. Seine Inzidenz ist steigend und variiert in den verschiedenen Regionen. In Europa, Australien und Nordamerika liegt die Inzidenz bei unter 10 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr, während in manchen Regionen Asiens und Afrikas die Inzidenz bei bis zu 100 pro 100.000 Einwohner pro Jahr liegt (Bosch et al., 2004). In Deutschland sind knapp 1 % aller Karzinome ein HCC (Dürr et al., 2000). Die steigende Inzidenz in den westlichen Industriestaaten liegt noch deutlich unter dem weltweiten Durchschnitt. Ihr stetiger Anstieg wird auf die zunehmende Infektionsrate mit dem Hepatitis C Virus zurückgeführt (El-Serag und Rudolph, 2007; Jepsen et al., 2007).

#### 1.1.3 Ätiologie des HCC

Das HCC entwickelt sich in den meisten Fällen auf dem Boden einer Leberzirrhose, die meistens im Zusammenhang mit chronischen Viruserkrankungen (Hepatitis B und C), verschiedenen Stoffwechselerkrankungen (z.B. Hämochromatose), Alkoholkonsum oder Aflatoxin-Exposition entsteht. Pro Jahr tritt in 5 % der Fälle bei Patienten mit Leberzirrhose ein Leberzellkarzinom auf (Kountouras und Lygidakis, 2000; Okuda, 2000). Wiederum sind 75 % der HCC Erkrankungen mit einer Leberzirrhose assoziiert. Die Leberzirrhose wird daher als Präkanzerose in Bezug auf das HCC gesehen.

#### Hepatitis Virus Infektionen

Ein sehr hohes Risiko für die Entstehung eines HCC stellt eine chronisch, virale Lebererkrankung dar, wobei die HBV-Infektion 50 – 55 % und die HCV-Infektion 25 – 30 % bei der Entstehung des HCC ausmacht (Bosch et al., 2004). Ursächlich für die Entstehung eines HCC ist vor allem der chronische Verlauf der viralen Infektion, wodurch es aufgrund von wiederholtem Zelltod, Regeneration und beschleunigter Zellalterung in der Leber zu der Entwicklung einer Zirrhose kommt, welche wie bereits erwähnt meistens die Präkanzerose des HCC darstellt. HBV und HCV stellen jedoch unabhängig der Entwicklung einer Zirrhose ein Risiko für das HCC dar, da sich das HCC bei Patienten mit

einer chronischen HBV- oder HCV-Infektion auch ohne Zirrhose entwickeln kann (Llovet et al., 2003).

In einer langjährigen Beobachtung (1980-2001) von HCV-Infizierten zeigte sich, dass es im Rahmen der chronischen Erkrankung innerhalb von 13 bis 25 Jahren zu einer Zirrhose kommen kann und nach weiteren 17 bis 31 Jahren sich ein HCC entwickeln kann (El-Serag, 2002). Das HCV integriert nicht in das Wirtsgenom. Jedoch scheint es bei der HCV-Infektion vor allem durch permanente Regeneration und Bildung von HCV-Genprodukten, Mechanismen wie zum Beispiel, Interaktion mit verschiedenen Signalkaskaden der Zelle sowie Induktion von oxidativem Stress zu geben, welche bei der Transformation und Entwicklung eines HCC auch ohne Zirrhose eine ausschlaggebende Rolle spielen (Jüngst et al., 2004; Levrero, 2006; Liang et al., 2004).

Im Falle des HBV kann das HBx-Antigen, welches einen Komplex mit dem Tumorsuppressorgen p53 bilden kann, diesen inaktivieren und somit ebenfalls direkt onkogen wirken. HBV allein, ohne Zirrhose spielt deshalb bei der Entstehung eines HCC ebenfalls eine bedeutende Rolle (Feitelson, 1998; Ma et al., 2008).

### Hämochromatose

Die Hämochromatose ist eine genetisch bedingte Eisenspeichererkrankung, bei der es zu einer Eisenüberladung in der Leber kommt, die im Verlauf andere Organe beteiligt und sogar eine Multiorganstörung induzieren kann. Die Hämochromatose führt im Verlauf in 75 % der Fälle zu einer Leberzirrhose. Das Risiko für die Entstehung eines HCC bei diesen Patienten ist 200-fach höher als bei anderen Patienten mit Leberzirrhose.

### Alkohol

Auch der chronische Alkoholabusus und die daraus resultierende äthyltoxische Leberzirrhose gehen mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung eines HCC einher und spielen vor allem in Europa und Nordamerika in der Ätiologie des HCC eine bedeutende Rolle. Ein Konsum von mehr als 80 g/d über 10 Jahre ergibt ein 5-fach erhöhtes Risiko für ein HCC (Wojciech et al., 2010). Ein anhaltender Alkoholabusus bei gleichzeitig bestehender alkoholinduzierter, dekompensierter Leberzirrhose beinhaltet ein Risiko von 1 % pro Jahr, ein HCC zu entwickeln. Es bleibt jedoch nach wie vor umstritten, ob Alkohol als direktes Karzinogen bei der Hepatokarzinogenese eine Rolle spielt. Sicher ist jedoch, dass bei Patienten mit vorbestehender HCV-Infektion ein chronischer

Alkoholkonsum zu einer Verdopplung des Risikos für die Entwicklung eines HCC im Gegensatz zur Infektion alleine führt (Bosch et al., 2004; De Mitri et al., 1995; Nalpas et al., 1991). Als Mechanismen, wodurch Alkohol eine Beschleunigung der Hepatokarzinogenese bewirkt, werden oxidativer Stress, DNA-Methylierungen und eine verminderte Immunabwehr diskutiert (Morgan et al., 2004).

### Aflatoxin

Aflatoxin ist ein Mykotoxin des Aspergillus-Pilzes. Es ist ein sehr stabiles Toxin, welches vor allem in verdorbenen Lebensmitteln (z.B. Erdnüsse und Getreide) vorkommt. Besonders das Aflatoxin B des Aspergillus flavus spielt als starkes Karzinogen in der Hepatokarzinogenese eine wichtige Rolle. Aflatoxin führt in der Leberzelle zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgen p53. Es kommt zu einer Transversion der Base von Guanin zu Thymin im Kodon 249. Diese Mutation führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der Hepatozyten, fördert die Entstehung einer Leberzirrhose und letztlich auch eines HCC (Bosch et al., 2004; Jackson et al., 1999). Vor allem in Verbindung mit einer HBV-Infektion scheinen Aflatoxine das Risiko, an einem HCC zu erkranken, deutlich zu erhöhen (Turner et al., 2002).

#### 1.1.4 Die Pathogenese des HCC

Die Pathomechanismen, die zur Entwicklung eines HCC führen, sind noch nicht vollständig geklärt (Gonzalez-Carmona et al., 2011). Die Hepatokarzinogenese ist mehrstufig und nimmt unter anderem ihren Ursprung in einer chronischen Leberschädigung die sich beispielsweise durch HBV/HCV-Infektionen oder durch starken Alkoholkonsum entwickeln kann. Diese chronische Entzündung der Leber, bewirkt eine zunehmende Zerstörung der Hepatozyten, wodurch es zu einer Zytokinausschüttung kommt. Es gelangen inflammatorische Zellen in das Leberparenchym und es kommt durch die Stimulation von Interleukinen, Wachstumsfaktoren, Interferonen und Tumornekrosefaktoren zu einer Leberregeneration (Coleman, 2003). Aufgrund der erhöhten Mitoserate der Hepatozyten, kommt es im weiteren Verlauf zu einer Leberzirrhose. Durch die anhaltende Schädigung des Gewebes, kommt es zu einem erhöhten Auftreten von genetischen und epigenetischen Veränderungen der Matrix und Mikroumgebung der Leber (Bosch et al., 1999; Buendia, 2000). Diese genetischen und epigenetischen Veränderungen können durch eine Fehlregulierung zellulärer Proto-

Onkogene oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zu einer malignen Transformation von Hepatozyten beitragen (Worns et al., 2007). Beispiele dieser genetischen und epigenetischen Veränderungen sind die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die für die Regulation der Initiation und Progression des Zellzyklus verantwortlich sind. Dazu zählen die Inaktivierung des multifunktionalen Regulatorproteins p53, des pRB (Retinoblastoma), der Zykline und ihrer zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) oder CDKN2A kodierte Proteine wie p14ARF oder p16INK4a (Del Gaudio et al., 2008; Houben et al., 1999). Die Fehlregulierung zellulärer Proto-Onkogene wie zum Beispiel der Epidermale Growth Factor (EGF)-Rezeptor oder Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Rezeptor verursachen eine häufige Aktivierung der Ras-GTPase vermittelten Erk/MAP Kinase und der Phosphoinositid-3 Kinase Signalwege. Sie spielen eine wichtige Funktion in der Regulation der Zellzyklusprogression und schützen die HCC-Zellen vor der Apoptose (Breuhahn et al., 2006).

#### 1.1.5 Die Prognose des HCC

Ein wichtiger Faktor für die Prognose des HCC ist im Gegensatz zu anderen Tumorarten nicht nur das Tumorstadium sondern auch das Vorliegen einer Leberzirrhose. Die Lebenserwartung ohne Therapie bei Patienten mit einem Leberzellkarzinom liegt ab dem Zeitpunkt der Diagnose bei ca. 6 Monaten. Unbehandelt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem Patienten mit HCC bei < 3 % (Feitelson et al., 2002). Die Resektabilität des HCC als kurativer Ansatz kann bei weniger als 20 % der Patienten angestrebt werden. Diese niedrige Zahl kommt dadurch zustande, dass sich die Erkrankung in den meisten Fällen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium und/oder einer fortgeschrittenen Leberzirrhose (Child B oder C) befindet (Guan und Liu, 2006). Die Gesamt-5-Jahres-Überlebensrate nach chirurgischer Therapie (Leberteilresektion) liegt zwischen 12 – 50 %. Überschreitet die Tumorgröße 5 cm oder liegt ein multifokales Wachstum vor ergibt sich eine weitaus niedrigere Überlebensrate. Für die Stadieneinteilung des HCC hat sich die Barcelona-Klassifikation bewährt:

Barcelona-Stadien (BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer):

- 0 Initialstadium (Very early Stage) (Einzelläsion  $\leq$  2 cm)
- A Frühstadium (Early Stage) (Einzelläsion  $\leq$  5 cm, max. 3 Läsionen  $\leq$  3 cm)
- A1 Einzelherd, ohne portale Hypertension, normales Bilirubin
- A2 Einzelherd, portale Hypertension, normales Bilirubin
- A3 Einzelherd, portale Hypertension, erhöhtes Bilirubin
- A4 3 Herde  $<$  3 cm
- B Intermediäres Stadium (Multifokal, guter AZ, keine Komplikationen)
- C Fortgeschrittenes Stadium (Multifokal, Pfortadereinbruch, Lymphknotenvergrößerung, Fernmetastasen, schlechter AZ)
- D Endstadium (Terminal Stage)

#### 1.1.6 Standardtherapie des HCC

##### 1.1.6.1 Chirurgische Therapie des HCC

Das HCC bleibt lange Zeit asymptomatisch und wird deshalb oft erst diagnostiziert, wenn der Tumor sich bereits in einem fortgeschrittenen Stadium befindet. Nach wie vor stellen die Teilresektion, sowie die totale Hepatektomie mit Lebertransplantation die einzigen, um prognostisch relevante Resultate zu erzielen, potenziell kurativen Therapieverfahren des HCC dar. Daher sind chirurgische Verfahren die Therapie der Wahl. Allerdings können nur 20 % der Patienten mit HCC durch eine chirurgische Intervention behandelt werden. Oft liegen bei der Diagnosestellung Kontraindikationen vor, die eine chirurgische Intervention verhindern (Guan und Liu, 2006). Daher ist es vor der Behandlung von Bedeutung zunächst das genaue Tumorstadium sowie die Leberfunktion und Nebenerkrankungen des Patienten zu evaluieren.

##### Tumorresektion

Patienten ohne Leberzirrhose können selbst Teilresektionen größerer Tumoren gut tolerieren. Diese sollte daher als Therapie der ersten Wahl in Betracht gezogen werden. Die meisten Patienten haben jedoch viele Ausschlusskriterien, die das Durchführen einer Leberteilresektion verhindern. Hierzu gehören zum Beispiel eine Leberzirrhose im Stadium CHILD B oder C, das Vorhandensein von extrahepatischen Metastasen sowie

Komorbiditäten, wie eine schwere Niereninsuffizienz oder eine COPD. Die Grösse des Tumors stellt eine relative Kontraindikation dar (Poon et al., 2004, Song et al., 2004). Wichtig ist vor der Operation die so genannten Leberreserven, sprich die noch vorhandene Leistung der Leber, zu bestimmen. Nicht zu vernachlässigen ist auch die hohe Rezidivgefahr nach Leberteilektomie. Mit 50 - 100 % liegt sie sehr hoch. Es wird zwischen Früh- und Spätrezidive unterschieden. Die Frührezidive gehen zumeist vom Primärtumor aus und treten innerhalb der ersten 3 Jahre nach Resektion auf. Die Spätrezidive hingegen entstehen als neues HCC aus einer fortbestehenden Leberzirrhose (Song et al., 2004).

### Lebertransplantation

Patienten mit schlechter Restfunktion der Leber sollten, solange keine Kontraindikationen vorliegen, (fortgeschrittenes Tumorstadium z.B. extrahepatische Metastasen, Tumoreinbruch in die großen Lebervenen) eine totale Hepatektomie mit einer Lebertransplantation erhalten (Song et al., 2004). Der Vorteil der Lebertransplantation liegt in der primären Therapie des Tumors und zusätzlich in der Therapie der zugrundeliegenden chronischen Lebererkrankung. Zur Eignung der Transplantationsfähigkeit werden die sogenannten Milan-Kriterien hinzugezogen: Einzeltumoren mit einer Grösse von < 5 cm oder maximal 3 Herde von weniger als 3 cm Durchmesser. Werden die Milan-Kriterien eingehalten kann eine Überlebensrate von mehr als 70 % innerhalb von 5 Jahren nach Transplantation erreicht werden. Die Rezidivrate nach einer Lebertransplantation liegt mit 15 % deutlich unter der Rezidivrate nach einer Leberteilektomie. Dies kommt dadurch zustande, dass nach einer Lebertransplantation die Leberzirrhose als Präkanzerose nicht mehr vorhanden ist. Ein weiterer Faktor, der eine große Rolle bei der Rezidivrate nach einer Lebertransplantation spielt, ist z.B. das Vorliegen von Gefässinvasion zum Zeitpunkt der Transplantation (Mazzaferro et al., 1996; Schwartz et al., 2004).

#### 1.1.6.2 Perkutane Alkoholinjektion

(engl. *percutaneous ethanol injection* = PEI)

Bei der PEI werden unter Lokalanästhesie und Ultraschallkontrolle die äußeren Ränder der Tumorherde in der Leber punktiert und dort 95 %iger Alkohol injiziert. Dadurch entsteht eine lokale Koagulationsnekrose mit Proteindenaturierung und zellulärer Dehydratation. Des Weiteren führt eine Thrombosierung der tumorversorgenden Gefäße



zu einer Ischämie und damit zur weiteren Schädigung des Tumorgewebes (Allgaier und Galandi, 2003; Bruix et al., 2001). Der Erfolg einer Behandlung bei Läsionen von weniger als 2 cm Durchmesser kann bei bis zu 100 % liegen. Bei einer Grösse von über 3 cm Durchmesser sind es immerhin noch 70 % (Poon et al., 2002). Die 3-Jahres-Überlebensrate bei PEI mit Läsionen von weniger als 4 cm Durchmesser liegt bei ca. 70 % (Omata et al., 2004). In wenig, sehr gut ausgewählten Patienten kann dieses Verfahren nicht nur in der palliativen Situation sondern auch in kurativer Intention eingesetzt werden. Nach der PEI-Behandlung treten jedoch bei 60-83 % der Patienten, je nach Studienlage, Früh- und Spätrezidive auf (Sung et al., 2006). In den Industrieländern hat dieses Verfahren immer mehr an Bedeutung verloren.

#### 1.1.6.3 Radio-Frequenz-Thermoablation (RFTA)

Hierbei handelt es sich um ein perkutan-lokales Hyperthermieverfahren, welches potentiell in kurativem Ansatz durchgeführt werden kann. Nach Lokalanästhesie wird ultraschall-gesteuert, in einem Tumorherd, über eine spezielle Nadelelektrode eine Hyperthermie (bis zu 95°C) erzeugt, die zu einer Koagulationsnekrose des Tumorgewebes führt (Allgaier et al., 2001). Bei diesem Verfahren können unterschiedliche Zugangswege verwendet werden, unter anderem perkutan, laparoskopisch oder aber auch während einer Laparotomie (Raut et al., 2005). Bei Tumoren, die < 3 cm groß sind, liegt die 3-Jahres-Überlebensrate nach RFTA bei ca. 74 % (Guan und Liu, 2006). In einer weiteren großen Studie wurden beide Verfahren, PEI und RFTA, verglichen. Hierbei zeigte sich, dass vor allem bei HCC mit nur einem Herd und einer Größe von mehr als 2 cm die RFTA der PEI-Therapie überlegen ist (Brunello et al., 2008).

#### 1.1.6.4 Laserinduzierte Thermotherapie

Bei der Laserinduzierten Thermotherapie (LITT) handelt es sich um ein minimalinvasives Verfahren, welches nicht nur zur Therapie von HCC sondern auch von Metastasen der Leber und anderer Tumorentitäten eingesetzt wird. Diese Art der Therapie kann sowohl perkutan als auch laparoskopisch oder während einer Laparotomie eingesetzt werden. Bei der LITT wird durch die kontinuierliche Zufuhr von Laserlicht eine thermische Energie erzeugt, welche eine Zellschädigung auslöst und im Verlauf zu einer Koagulationsnekrose führt. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, werden in der Regel nur Läsionen von

weniger als 5 cm Durchmesser mit LITT behandelt (Nikfarjam et al., 2003; Vogl et al., 2002).

#### 1.1.6.5 Kryotherapie

Die Kryotherapie stellt eine weitere lokal einsetzbare Therapie des HCC dar. Hierbei handelt es sich um das einzige hypotherme Verfahren in der Therapie des HCC. Beim Einsatz von Kryotherapie entsteht durch die Punktion von Kryosonden im Gewebe eine Gewebesnekrose. Die Kryosonden enthalten entweder Flüssigstickstoff oder Argongas (Abkühlung auf  $-30^{\circ}$  bis  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Die Kryotherapie führt zu einer irreversiblen Schädigung der Zelle. Durch Proteindenaturierung, Membranruptur und Hypoxie kommt es zu einer Dehydratation der Zelle und infolge dessen zum Zelltod. Des Weiteren können kälteinduzierte Thrombosen Gefäßschäden verursachen und zu einer Ischämie des Gewebes mit anschließendem Zelluntergang führen. Bei dieser Methode können Läsionen bis maximal 8 cm Durchmesser therapiert werden, da der Durchmesser der Kryosonden auf maximal 8 cm Durchmesser limitiert ist (Giampapa et al., 1981; Rubinsky et al., 1990).

#### 1.1.6.6 Transarterielle Chemoembolisation

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) ist ein radiologisch-interventionell lokales Verfahren. Hierbei wird über mehrere Zyklen hinweg ein Gemisch aus Lipiodol und einem Zytostatikum (Doxorubicin, Mitomycin C oder Platinderivate) in die Arteria hepatica (welche in 80 % der Fälle die Blutversorgung des HCC stellt) injiziert. Lipiodol dient hierbei als Trägersubstanz, welche sich in den Tumorzellen anreichert und somit die Verweildauer und Konzentration des Zytostatikums erhöht. Danach erfolgt die Embolisation der versorgenden Tumorgefäße mit Hilfe kleiner Gelatinepartikel (Bruix et al., 2001). Dieses Verfahren wird insbesondere bei Patienten, bei denen eine Resektion des HCC nicht mehr möglich ist, eingesetzt. Zudem kann es auch bei solchen Patienten, die auf eine Lebertransplantation warten, im Sinne einer sogenannten Überbrückungstherapie (*Bridging*) eingesetzt werden. Die TACE gilt als die Therapie der Wahl in der palliativen Situation. Die 3-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 11 % (Guan und Liu, 2006). In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass die TACE unter den palliativen lokalen Therapieansätzen die einzige ist, die zu einem klaren Überlebensvorteil führt (Lovet et al., 2003). Eine absolute Kontraindikation dieses Verfahrens stellt allerdings eine totale oder segmentale Pfortaderthrombose (ohne hepatofugalen Pfortaderfluss), das Vorhandensein

von extrahepatischen Metastasen sowie eine fortgeschrittene Lebererkrankung (Child-Pugh C) dar.

#### 1.1.6.7 Strahlentherapie/Radioiod-Lipiodol-Therapie

Das HCC ist in der Regel strahlenunempfindlich, so dass bei externer Strahlentherapie eine sehr hohe Strahlendosis von 50 – 70 Gy benötigt würde. Da diese hohe Strahlendosis jedoch neben der Zerstörung des Tumorgewebes auch eine erhebliche Atrophie des gesunden Lebergewebes zur Folge hat, wurde eine interne Radiotherapie durch intraarterielle Injektion von <sup>131</sup>I-Lipiodol entwickelt. Aufgrund der Möglichkeit einer hochselektiven Strahlendosis (bis zu 200 Gy) kann die interne Radiotherapie beim HCC therapeutisch wirken. Der maximale Tumordurchmesser sollte jedoch 6 cm nicht wesentlich überschreiten (Raoul et al., 1994). Die Injektion von <sup>131</sup>I-Lipiodol, kann im Gegensatz zur TACE beim Vorliegen einer Pfortaderthrombose oder eines hepatofugalen Pfortaderflusses als Alternative durchgeführt werden. Die Überlebensraten sowie das Tumoransprechen scheinen unter dieser Therapie mit denen der TACE vergleichbar zu sein (Jang et al., 2006). Die Datenlage ist bei diesem Verfahren jedoch noch nicht ausreichend um die Rolle dieses Verfahrens in der Therapie des HCC zu deuten.

#### 1.1.6.8 Selektive Interne Radio-Therapie (SIRT)

Hierbei werden unter radiologischer Kontrolle kleine, radioaktive Kügelchen sog. "Mikrosphären" über die zuführenden Lebergefäße in das Tumorgewebe der Leber eingeführt. Die Mikrosphären enthalten das radioaktive Element Yttrium-90, welches über mehrere Tage hinweg eine Strahlung mit maximal 11 mm Reichweite erreicht. Dadurch besteht nur eine geringe Gefahr einer Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes. Bei einer Halbwertszeit von ca. 67 Stunden können sehr hohe Strahlungsdosen erreicht werden. Wichtig ist bei dieser Therapie, dass die eingebrachten Mikrosphären in der Leber bleiben und nicht über Shuntverbindungen in das Gefäßsystem und somit in andere Organe gelangen. Daher wird zur präoperativen Diagnostik eine Angiographie durchgeführt. Die Nebenwirkungen der Therapie sind gering, meistens handelt es sich um Oberbauchschmerzen, Übelkeit und Fieber oder über mehrere Tage hinweg starke Müdigkeit und verringerter Appetit. Eine seltene, jedoch relevante Nebenwirkung ist die strahleninduzierte Pneumonitis, welche durch eine Shuntverbindungen aus der Leber in die Lunge entstehen kann. Aus diesem Grund stellt ein, in der Angiographie

diagnostizierter Lungenshunt (> 20 %), eine absolute Kontraindikation dar (Leung et al., 1995, 1994). Weitere Kontraindikationen sind eine vorhandene Metastasierung sowie eine unzureichende Leberfunktion. Bezüglich der Wirksamkeit der Therapie gibt es bis jetzt nur wenige Studien. In einer kleinen Studie mit 24 Patienten wird eine mediane Überlebensrate von 7 Monaten bei allen Patienten beobachtet (Sangro et al., 2006). Daher wird dieses Verfahren zurzeit nur experimentell im Rahmen von klinischen Studien bei Patienten mit HCC eingesetzt.

#### 1.1.6.9 Systemische Therapie des HCC mit Sorafenib

Sorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor der auf Rezeptorebene der Zelle VEGFR (*Vascular-endothelial-growth-factor*)-1-3 und PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptors*) und auf Ebene intrazellulärer Signalwege (RAF/MEK/ERK-Signalweg) angreift. Dadurch entsteht ein dualer antitumoraler Wirkmechanismus, welcher die Tumorzellproliferation und die Tumorangiogenese inhibiert. In einer großen randomisierten Studie (SHARP) konnte bei Patienten mit HCC im fortgeschrittenen Stadium eine Verbesserung der Überlebensrate durch Sorafenib nachgewiesen werden. Die mediane Überlebensrate betrug 10,7 vs. 7,9 Monate zugunsten von Sorafenib (Llovet et al., 2008). Eine neue doppelblinde, placebokontrollierte Phase-III-Studie im asiatisch-pazifischen Raum, Studie ASCO 2008, bestätigte die positiven Ergebnisse der SHARP-Studie (Cheng A et al., 2008). Somit wurde Sorafenib 2007 als Standard der Therapie des nichtoperablen oder metastasierten HCC zugelassen. Die häufigsten Nebenwirkungen von Sorafenib sind gastrointestinale Symptome, wie Diarrhoe, Müdigkeit, Gewichtsverlust und Hautveränderungen (sogenanntes Hand-Fuß-Syndrom). Diese Nebenwirkungen kommen bei 24 % der Patienten und somit relativ häufig vor. Es wird vor allem bei Patienten die an einem fortgeschrittenen HCC leiden, bei denen ein lokales Verfahren nicht in Frage kommt, verabreicht. Allerdings müssen die Patienten in einem guten Allgemeinzustand sein und dürfen nicht an einer Leberdekomensation (i.d.R. Child-Pugh A) leiden.

#### 1.1.6.10 Chemotherapie des HCC

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Chemotherapeutika als systemische Behandlung des HCC untersucht. Unter anderem wurden Anthrazykline (z.B. Doxorubicin erstmals 1970 eingesetzt), Topoisomerase-Inhibitoren (Irinotecan, Etoposid), Cisplatin und Nukleosid-Analoga (Gemcitabin) eingesetzt. Die Chemotherapeutika wurden entweder als

Einzelsubstanz oder in Kombination verwendet. Die verschiedenen Chemotherapien zeigten jedoch nur eine sehr niedrige Wirksamkeit von maximal 20 % Tumoransprechen und führten nicht zu einer Verbesserung der Überlebensrate (Nowak et al., 2004; Rougier et al., 2007; Zhu, 2003). Des Weiteren war die Verträglichkeit der Chemotherapien meist sehr schlecht, da viele Patienten oft gleichzeitig an einer Leberzirrhose litten (Kubicka et al., 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Ansprechen auf eine Chemotherapie schlechter wird, wenn der Patient gleichzeitig unter einer signifikanten Zirrhose, Aszites, Pfortaderthrombose oder eine Erhöhung des Bilirubins leidet (Nagahama et al., 1997). Bislang hat eine systemische Chemotherapie deshalb beim HCC keinen Stellenwert.

#### 1.1.6.11 Hormontherapie

Da die Zellen des HCC Östrogenrezeptoren exprimieren, wurde vermutet, dass Östrogene einen Einfluss auf das Zellwachstum des HCC haben können (Nowak et al., 2004). Als mögliche Monotherapie wurden daher Östrogen-Analoga wie zum Beispiel Tamoxifen zur Behandlung des HCC eingesetzt. Trotz anfänglicher Erfolge konnte für diese Therapie kein Überlebensvorteil in randomisierten Studien festgestellt werden (Ganne-Carrie et al., 2004; Llovet et al., 2003; Rougier et al., 2007; Zhu et al., 2006). In über 40 % der Fälle besitzen die HCC-Zellen außerdem Somatostatinrezeptoren. Somatostatin führt in der Zelle zur Verminderung von EGF-(*Epidermal-Growth-Factor*)-Rezeptoren und senkt die Produktion von IGF (*Insulin-like Growth Factor*). Dabei kommt es zu einer Hemmung der Angiogenese und der Sekretion von Wachstumsfaktoren und über Modulation des Immunsystems zu einer Apoptoseinduktion der Zelle. Jedoch konnte in keiner der folgenden Studien ein Überlebensvorteil bestätigt werden (Becker et al., 2007, Ferjoux et al., 2000).

## 1.2 Malignome und das Immunsystem

Die Hauptaufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor Infektionen durch Fremdorganismen zu schützen. Es setzt sich aus zwei Teilen zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Das Immunsystem ist sehr komplex und besteht aus vielen Zellen und Mediatoren, die in aufeinander abgestimmte Weise gegen fremde Antigene im Körper reagieren. Welche bedeutende Rolle das Immunsystem bei der Tumorentstehung hat, zeigt sich vor allem bei immunsupprimierten Patienten die ein deutlich erhöhtes Risiko haben an einem Tumor zu erkranken. Zum Beispiel zeigen

nierentransplantierte Patienten mit immunsuppressiver Therapie ein bis zu 5-fach erhöhtes Risiko an einem Karzinom zu erkranken (Zeier et al., 2002). Das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Lymphozyten vor allem von CD4(+)- und CD8(+)-T-Lymphozyten in Karzinomen scheint ein Hinweis für eine tumorspezifische Immunreaktion zu sein. Aus verschiedenen Studien wissen wir, dass eine erhöhte Anzahl von tumorinfiltrierenden, CD4(+)- und CD8(+)-T-Lymphozyten mit einer verbesserten Prognose für die Patienten mit einem Karzinom einhergeht (Clark et al., 1989; Clemente et al., 1996; Zhang et al., 2003).

Obwohl Tumore aus körpereigenen Zellen entstehen, können tumorgerichtete Tumorantikörper und tumorspezifische Lymphozyten häufig bei Patienten mit einer Tumorerkrankung nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass das Immunsystem in der Lage zu sein scheint, zwischen Tumorzellen und gesunden Körperzellen zu unterscheiden und hat somit das Potential, die Entwicklung und Ausbreitung von Tumoren zu kontrollieren. Dabei stehen dem Immunsystem 3 Wege der Tumor-Immunüberwachung zur Verfügung:

1. Erkennung, Eliminierung oder Unterdrückung viraler Infektionen und/oder viraler Onkogene (Swann und Smyth, 2007).
2. Rechtzeitige Eliminierung von Pathogenen. Hierdurch wird verhindert, dass es zur Ausbildung eines entzündlichen Geschehens kommt, welches wiederum zur Entstehung eines Tumors beitragen kann (Swann und Smyth, 2007).
3. Gezieltes Eliminieren von Tumorzellen durch Erkennung von tumorspezifischen Antigenen (Swann und Smyth, 2007).

Tumore wiederum haben Mechanismen entwickelt, wodurch sie sich der Immunantwort entziehen können, das sogenannte „Immunoediting“.

Das Immunoediting entwickelt sich während drei Phasen der Tumorentstehung:

Die Elimination (Elimination): Hierbei kommt es zu einer Anerkennung und zu einer vollständigen oder unvollständigen Elimination der Tumorzellen durch das Immunsystem. Wurden die Tumorzellen nur unzureichend eliminiert tritt die zweite Phase des Immunoediting ein.

Das Gleichgewicht (Equilibrium): In dieser Phase des Immunoediting kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen dem Immunsystem und den Tumorzellen. Während die Tumorzellen ruhen oder sich langsam weiter entwickeln, versucht das Immunsystem fortwährend sich gegen die Tumorzellen zu wehren. Dadurch entstehen neue Varianten

der Tumorzellen mit unterschiedlichen Mutationen, welche eine erhöhte Resistenz gegen das Immunsystem aufweisen.

Das Entkommen (*Escape*): In dieser Phase ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage sich gegen die Tumorzellen zu wehren (Immuntoleranz), und es kommt zu einem unkontrollierten Wachstum des Tumors (Dunn et al., 2004). Verschiedene Eigenschaften der Tumorzellen erklären die Immuntoleranz. Beispielsweise werden die vorhandenen TAA vom wirtseigenen Immunsystem nicht mehr erkannt, da sie unzureichend von den Tumorzellen exprimiert werden (Dunn et al., 2002; Swann und Smyth, 2007). Des Weiteren reduzieren Tumorzellen die Expression von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche, wodurch es zu einer verminderten Antigenpräsentation kommt (Garcia-Lora et al., 2003). Zudem können Tumorzellen FAS-Liganden überexprimieren. FAS ist ein Apoptose auslösendes Protein, deren Bindung mit FAS-Liganden zur Apoptose der T-Lymphozyten führt, der sogenannte "Tumorcounterattack". Tumorzellen können außerdem vermehrt immunsuppressive Faktoren, wie IL-10 und TGF- $\beta$ , sezernieren, wodurch die Reifung von DC und damit die Antigenpräsentation unterdrückt wird (Loose und de Wiele, 2009). Im weiteren Verlauf rekrutieren die Tumoren regulatorische T-Zellen und myeloische supprimierende dendritische Zellen (DC) welche stark immunsuppressiv sind.

### 1.3 Immuntherapie des HCC

Das Ziel der Immuntherapie ist, das Immunsystem durch Verbesserung der Sensitivität, Spezifität und Selbstregulation bei der Bekämpfung und Eradikation von Tumorzellen zu unterstützen (Butterfield, 2007). Die Vorteile der Immuntherapie liegen vor allem in der Spezifität der Immunantwort sowie der Bildung der Gedächtniszellen welche theoretisch einen langanhaltenden Schutz vor Tumorrezidiven bewirken könnten.

#### 1.3.1 Immuntherapie mittels immunstimulierenden Zytokinen

Zytokine, regulieren das Immunsystem und können immunstimulatorisch wirken, wodurch die Immunantwort gegen Karzinome verbessert werden kann. Zur Anwendung kommen verschiedene Zytokine, vor allem aber Th1-Zytokine (IL-2, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , oder GM-CSF) in Frage. Es wurden bereits mehrere klinische Studien veröffentlicht, in denen die Wirkung der Immuntherapie durch Verabreichung von Zytokinen allein oder in Kombination (INF- $\gamma$ , IL-2, GM-CSF, IL-12, INF- $\alpha$ ) bei Patienten mit verschiedenen Malignomen untersucht wurde. Zum Teil zeigten die Studien ein gutes Ansprechen auf diese Art der Therapie

(Lotz et al., 1994; Lygidakis et al., 1995; Reinisch et al., 2002, Sangro et al., 2004; Stuart et al., 1996). Ein bereits zugelassenes Zytokin z.B. im Bereich der Urologie ist Interferon-alpha2a welches in Kombination mit Bevacizumab zur First-Line-Therapie beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom verabreicht wird (Motzer und Bukowski, 2006).

### 1.3.2 Aktive Immunisierung

Eine weitere Möglichkeit, Tumorzellen zu bekämpfen, ist die Aktivierung von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen. Hierbei können Vakzine gerichtet gegen TAA hergestellt und verabreicht werden. Dadurch soll eine spezifische antitumorale Immunantwort ausgelöst werden. Beispielsweise wurden in zwei randomisierten, prospektiven Studien, Patienten mit einer Vakzine bestehend aus einem HCC Tumorlysate, gemischt mit GM-CSF, IL-2 und BCG (*Bacillus-Calmette-Guérin*) intradermal verabreicht, nachdem diese Patienten bereits eine kurative Operation erhalten haben. Es zeigte sich eine Verbesserung der Rezidiv- und Überlebensrate (Kuang et al., 2004; Peng et al., 2005).

### 1.3.3 Antikörper basierte immunologische Therapieansätze

Bei dieser Immuntherapie handelt es sich um eine passive Immunisierung, die sich spezifisch gegen TAA richtet, die in vielen Tumoren exprimiert werden. Die Antikörper binden spezifisch an das TAA auf der Oberfläche von Tumorzellen. So können sie vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Andere Antikörper binden an Strukturen des Tumorstroma (z.B. Endothelzellen) oder lösliche Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).

Ein Beispiel für einen solchen monoklonalen Antikörper stellt Bevacizumab, aus der Gruppe der Immunglobuline dar. Durch selektive Bindung an den VEGF wird die Angiogenese gehemmt. In Kombination mit einem Interferon-alpha2a ist Bevacizumab bereits zur Erstlinien-Therapie bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom zugelassen (Motzer und Bukowski, 2006).

Ein weiterführender Ansatz der antigenspezifischen immunologischen Therapie stellen an radioaktive Substanzen oder Zytostatika gekoppelte Antikörper die deren Wirkung verstärken kann. Dieser Ansatz zeigte jedoch keine Besserung der Rezidivfreiheit oder einen Überlebensvorteil im HCC (Shouval, 1997; Zhao et al., 2004;).



### 1.3.4 Immunologische Therapieansätze mit Dendritischen Zellen

#### 1.3.4.1 Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC). Sie stammen aus dem Knochenmark und sind in der Lage Fremdantigene zu präsentieren, um eine antigenspezifische Immunantwort zu initiieren und zu regulieren. Erstmals wurden die DC 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben (Steinman et al., 1973), obwohl bereits 1868 der erste Typ DC, die Langerhans-Zellen, von Paul Langerhans in der Epidermis entdeckt wurden (Schuler et al., 1985). Ihre Bezeichnung haben die DC aufgrund ihres mikroskopischen Bildes, den baumähnlichen, verzweigten Zellfortsätzen (griech. dendros = Baum). Inzwischen ist bekannt, dass DC die wichtigsten APC sind (Steinman, 1991). DC kommen in nahezu allen Geweben, auch dem nicht-lymphatischen Gewebe wie Haut, Lunge, Synovialflüssigkeit, dem Gastrointestinaltrakt, oder im Blut vor, um dort eine Wächterfunktion zu übernehmen. In nichtlymphatischen Geweben befinden sich unreife DC, die in der Lage sind, kleinste Mengen unterschiedlicher Antigene durch Phagozytose und Endozytose aufzunehmen und zu prozessieren. Erst nach der Antigenaufnahme werden die DC aktiviert. Dann setzen sie zunächst Chemokine frei, die immunkompetente Zellen an den Ort der Immunreaktion locken. Erst nach Freisetzung der Chemokine wandern die DC über das lymphatische Abflusssystem zurück in die sekundären lymphatischen Gewebe (Milz, Lymphknoten), um dort die zuvor aufgenommenen Antigene intrazellulär in Peptide zu zerlegen. Anschließend werden die Peptide an MHC-Klasse I und II Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert. Noch während dieses Vorganges reifen die Zellen aus. Nach der Ausreifung sind DC nicht mehr in der Lage weitere Antigene aufzunehmen, jedoch können DC diese Peptide jetzt präsentieren (Branchereau et al., 1998; Fong et al., 2000; Lanzavecchia et al., 2000; Schnurr et al., 2002; Schuler et al., 1997). Im Lymphknoten kommt es durch die Präsentation der Antigene zu einer Stimulation naiver T- Helfer-Zellen (CD4(+)-T-Zellen) und naiver zytotoxischer T-Zellen (CD8(+)-T-Zellen). Durch eine hohe Konzentration von MHC-II-Komplexen, ko-stimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen gehören die DC zu den potentesten Induktoren der T-Zell-Aktivierung.

#### 1.3.4.2 Therapieansätze mit TAA-beladenen DC

Tumorzellen exprimieren spezifische Proteine, die von den T-Zellen als Antigene erkannt werden können, sogenannte TAA. DC sind für eine sehr starke Induktion

antigenspezifischer T-Zellen verantwortlich (Märten et al., 2000). Die Verabreichung von DC alleine zeigte jedoch keinen therapeutischen Effekt (Mazzolini et al., 2005). Mit Hilfe von DC, die zuvor mit verschiedenen Tumorantigenen beladen wurden, ist es jedoch möglich eine potente Immunantwort auf TAA auszulösen (Wan et al., 1997). Für die Präsentation dieser TAA durch DC genügt es, die DC beispielsweise mit den TAA (z.B. Tumorlysat) in vitro zu inkubieren. In der vorliegenden Arbeit werden die DC mit Tumorlysat aus HCC-Zellen inkubiert um DC mit TAA zu beladen. Hierdurch können sowohl bereits bekannte als auch unbekannte Tumorantigene präsentiert werden. AFP wird in 60 - 70 % aller HCC vermehrt exprimiert. In eigenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Beladung von DC mit AFP-exprimierenden adenoviralen Vektoren zu einer spezifischen Immunantwort gegenüber AFP-exprimierenden HCC-Zellen führt (Gonzalez- Carmona et al., 2006; Herr et al., 2000). Es konnte bei Mäusen durch Vakzinierung mit AFP-kodierender Plasmid-DNA eine AFP-spezifische zytotoxische T-Zellantwort ausgelöst werden, die das Wachstum von AFP-positiven subkutanen (s.c.) Tumoren verhinderte (Hanke et al., 2002; Vollmer et al., 1999). Eine derartige Vakzinierungsstrategie führte allerdings nicht zur Tumorregression von bereits etablierten Tumoren. In zwei klinischen Studien wurden AFP-Vakzine zur Therapie des HCC eingesetzt. Bei diesen Patienten konnte nach der Vakzinierung, AFP-spezifische Effektorzellen nachgewiesen werden (Butterfield, 2007). Ein klinischer Effekt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Bei et al., 1999; Butterfield et al., 2003). Es besteht daher der Bedarf eine DC-basierte Immuntherapie zu optimieren.

#### 1.3.4.3 Optimierung von DC-basierten Immuntherapien: Kostimulation mit CD40 Ligand

Die Fähigkeit der DC T-Zellen zu aktivieren ist stark abhängig von den kostimulatorischen Signalen und Zytokinen ihrer Umgebung. Eines dieser kostimulatorischen Moleküle ist CD40L. CD40L ist ein Typ-II-Membranprotein von 33 kDa, welches aus 3 identischen Polypeptidketten besteht und zu der TNF-Genfamilie gehört. Primär wird es auf aktivierten T-Zellen exprimiert, es findet sich aber auch auf B-Lymphozyten, Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten. CD40L wird initial an der Zelloberfläche exprimiert, kann aber später auch als aktive Substanz im biologischen System zirkulieren (Clark, 1990, 2003). CD40L bindet in der Regel an den Rezeptor CD40. CD40 ist 45-50 kDa schwer und ein Typ-I-Membranprotein, das zu der Familie der TNF-

Rezeptoren gehört. Es befindet sich auf der Oberfläche von Makrophagen, Dendritischen Zellen, Endothelzellen und B-Lymphozyten des Immunsystems (Van Kooten et al., 1996). CD40 besteht aus 3 Monomeren, die sich erst nach Bindung mit dem Liganden z.B. CD40L verbinden. Die CD40/CD40L-Interaktion ist im Wesentlichen an der Auslösung einer Immunantwort beteiligt. Erst wenn CD40 mit seinem Liganden interagiert, wird eine intrazelluläre Signalübertragung ausgelöst, welche wiederum zu einer Stimulation der Zytokinproduktion bei Makrophagen und DC beiträgt (Schönbeck et al., 2000). Es hat sich gezeigt, dass die Applikation von CD40L sowohl die zellvermittelte als auch die humoral DC-induzierte Immunantwort verstärken kann. CD40L spielt bei der Aktivierung von DC sowie der Induktion einer antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort eine bedeutende Rolle (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996; Schoeneberger, 1998). Neben der Antigenpräsentation kommt es durch die CD40/CD40L-Interaktion zu einer Überexpression von IL-12 aus den DC. IL-12 ist ein potentes Th1-Zytokin, das für eine starke Aktivierung der CD8-T-Zellen aber auch NK-Zellen zuständig ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass Tumorpatienten sowohl eine verminderte Expression von CD40L als auch von CD40 haben, was sich wiederum negativ auf die Immunantwort auswirkt. In dieser Arbeit soll deshalb die durch TAA-gepulsten DC induzierte tumorspezifische Immunantwort durch die Verwendung von CD40L in einem Mausmodell für HCC optimiert und verstärkt werden.

#### 1.4 Adenovirale Vektoren

Adenoviren als Vektoren sind seit längerer Zeit bekannt und wurden in den 50er Jahren gegen das Zervixkarzinom zum ersten Mal eingesetzt (Huebner et al., 1956). Seitdem werden sie in der Entwicklung zahlreicher Ansätze zur experimentellen Gentherapie verwendet (Zhang, 1999). Adenovirale Vektoren sind nicht mehr replikationskompetent, das heißt sie können sich selbst nicht mehr vermehren. Sie dienen dazu genetisches Material (Transgen) in Zielzellen mittels Transduktion einzubringen und wie z.B. in dieser Arbeit dadurch zu einer Veränderung von DC zu führen.

##### 1.4.1 Adenoviren: Allgemeines

Adenoviren wurden erstmals 1953 beschrieben (Rowe et al., 1953). Die Familie der Adenoviridae lässt sich in 2 Gattungen unterteilen, die Mastadenoviren (humane) und die Aviadenoviren, die Vögel infizieren. Die humanen Adenoviren sind weltweit verbreitet und verursachen vor allem Erkrankungen des respiratorischen Trakts, Gastrointestinaltrakts

und des Auges (Horwitz et al., 1996; Rux et al., 2003; Shenk et al., 1996). Bis zum Alter von 15 Jahren werden die meisten Menschen mit mindestens einem Adenovirus-Typ infiziert. Antikörper werden gegen die Fiberproteine gebildet. Sie neutralisieren die Adenoviren und verleihen eine lebenslange, virustypspezifische Immunität.

#### 1.4.2 Aufbau

Das Adenovirus ist ein unbehülltes DNA-Virus, das einen Durchmesser von 60 bis 90 nm sowie eine Dichte von ca. 1,33 g/ml in Cäsium-Chlorid aufweist. Adenoviren bestehen aus einer doppelsträngigen, linearen DNA mit einer Länge von ca. 32-36 kbp (je nach Virustyp) (Stewart et al., 2002; Vellinga et al., 2005). Neben den terminalen Proteinen findet sich an den Genomenden außerdem sogenannte invertierte, terminale Repetitionen (ITR: inverted terminal repeats) von 100-150 Basenpaaren. Diese Region dient bei der DNA-Replikation als Primer der Doppelstrangsynthese (de Jong et al., 2003; Philipson, 1984; Russell, 2009).

#### 1.4.3 Genexpression

Adenoviren benötigen ca. 32 – 36 Stunden für jeden Lebenszyklus und sind mit einer replikativen Aktivität von mehr als 10.000 Virionen pro Zelle sehr effizient (Green et al., 1961). Die Infektion der Wirtszelle durch ein Adenovirus findet mittels Bindung der Fiberknöpfchen an den Cocksackie Adenovirus Rezeptor (CAR) und/oder des Pentonbasisproteins an Oberflächenproteine der Integrin-Familie statt (Bergelson et al., 1997; Huang et al., 1995; Nemerow et al., 1999). Diese werden mittels rezeptorvermittelter Endozytose in Vesikeln in das Zytosol transportiert. Ein pH-Abfall innerhalb des Vesikels führt zu einer Freisetzung des Virus-Core in das Zytoplasma. Über Mikrotubuli wird das Virus-Core zu den Kernporen transportiert. Die Transkription der Adenoviren wird in mehrere Phasen eingeteilt: Eine frühe Phase, vor Beginn der DNA-Replikation und eine späte Phase, in der die Capsid-Strukturproteine synthetisiert wurde. Im Zellkern erfolgt die Transkription der viralen Gene und die DNA-Replikation (Doerfler et al., 1995). Auf die Synthese der frühen Proteine folgt die DNA-Replikation und die späte Phase des Infektionszyklus, in welcher die späten Proteine (fast ausnahmslos Strukturproteine) synthetisiert werden und die Virionen entstehen. Mit dem Ende des Zyklus wird die Lyse der Wirtszelle eingeleitet.

#### 1.4.4 Gentransfer mit dem humanen Adenovirus Serotyp 5 als Vektor

Das Hauptziel der neuen, molekularen Therapie-Strategien ist die direkte Wirkung auf die Gentranskription bzw. Translation eines Proteins in der Zelle. In diesem Zusammenhang wird das Einbringen einer Fremd-DNA (Transgen) in eukaryotische Zellen als Gentransfer bezeichnet. Physikalische, chemische und virale Strategien werden zurzeit für den Gentransfer erprobt (Colosimo et al., 2000). Am meisten verbreitet in der heutigen Gentherapie sind virale Vektoren wie Retroviren, Herpesviren, adenoassoziierte Viren und Adenoviren. Das humane Adenovirus Serotyp 5 (Ad5) wird zunehmend als Adenovektor zur Genexpression verwendet (Ghosh-Choudhury et al., 1986). Es kann bis zu 105 % der Länge des Wildtyp-Genoms verpacken. Das bedeutet, dass Ad5 mit einer Genomlänge von ca. 36 kbp eine Aufnahmekapazität von 1,8 – 2,0 kb fremder DNA besitzt (Bett et al., 1993). Das Adenovirus Typ 5 weist folgende Vorteile auf: es ist gering pathogen für den Menschen, und die adenovirale DNA integriert nicht in das Genom. Es können bis zu 35 kb der adenoviralen DNA durch fremde DNA ersetzt werden und es ist möglich, mehrere Gene gleichzeitig zu exprimieren, ohne die Replikationsrate und den Titer negativ zu beeinflussen (Bett et al., 1993). Der Nachteil von Adenoviren liegt in der Stimulation einer Immunreaktion des Wirtsorganismus, wodurch eine verlängerte Transgenexpression verhindert wird. Diese Immunreaktion verursacht auch die höchste Toxizität bei der Verwendung dieser Vektoren (Thomas et al., 2003). Die ersten in vivo Behandlungen mit Ad wurden bereits an Patienten durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine akzeptable Toxizität (Reid et al., 2002). Zurzeit werden Optimierungen der Gentherapie erprobt, wie zum Beispiel die Entwicklung von „gutless“-Viren, die eine stark verlängerte Expression in vivo erreichen können und dabei weniger Nebenwirkungen haben. Darüber hinaus kann durch die Verwendung von gewebespezifischen Promotoren die Spezifität der adenoviralen Vektoren deutlich gesteigert werden (Nicklin et al., 2002).

#### 1.4.5 Adenovirale Vektoren und DC

Adenovirale Vektoren können in der Immuntherapie eingesetzt werden. Sie können immunstimulatorische und ko-stimulatorische Moleküle in eine Zielzelle (z.B. DC oder direkt Tumorzellen) einbringen. Antigen-präsentierende Zellen (APC) können aber auch mit TAA-exprimierenden Adenoviren gepulst werden. Werden DC mit TAA-exprimierenden Ad transduziert, produzieren die transduzierten Zellen dann das Antigen selber und

können es über MHC Klasse II-Proteine präsentieren. Somit kann sich die induzierte Immunantwort gegen Tumorzellen verstärken (Wan et al., 1997).

Die Vorteile der Adenoviren als Gentransfer wird in dieser Arbeit ausgenutzt, um die Immunstimulation von DC zu steigern und somit eine verbesserte Immunantwort gegenüber dem HCC zu erreichen, welche einen Tumorregress erzielen kann.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine DC-basierte Immuntherapie ein sehr vielversprechender Ansatz zur Therapie maligner Erkrankungen, wie dem HCC, sein kann. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde zuvor in einer in vitro Studie beispielsweise gezeigt, dass DC, welche mit dem HCC-assoziierten Antigen AFP beladen wurden, tumorspezifische Effektorzellen gegen AFP-positive HCC-Zellen induzieren können (Gonzalez- Carmona et al., 2006). In vivo zeigten Vollmer und Kollegen dass AFP-gepulste DC das Tumorwachstum AFP-positiver Tumoren hemmen kann (Vollmer et al., 1999). Allerdings haben erste klinische Studien mit DC als Vakzine nur einen limitierten antitumoralen Effekt gegen das HCC gezeigt (Butterfield, 2007). In der vorliegenden Arbeit sollte nun eine DC-induzierte tumorspezifische Immunantwort mittels des potenten kostimulatorischen Moleküls CD40L am HCC-Tumormodell in der Maus optimiert und verstärkt werden. Dazu soll zunächst die Wirkung der Transduktion von DC mit CD40L kodierenden Adenoviren auf TAA-gepulsten DC untersucht werden. Es soll vor allem untersucht werden, ob es zu verstärkter Aktivierung der DC durch die Überexpression von CD40L kommt. Ausserdem werden TAA-beladene DC, die mit CD40L-kodierenden Adenoviren transduziert wurden, i.t., s.c. oder i.v. appliziert, um die antitumorale Wirkung gegenüber dem HCC in vivo in einem etabliertem s.c. HCC-Tumormausmodell zu untersuchen. Dabei wird einerseits untersucht ob CD40L die antitumorale Wirksamkeit von TAA-gepulsten DC verbessert, und andererseits wird aufgeklärt welcher Applikationsweg der DC die besten antitumoralen Effekte erzielt. Anschließend soll anhand einer Tumorzell-Reexposition, nach erfolgreichem Tumorregress, das Vorhandensein einer (persistierenden) dauerhaften Immunantwort gegen das HCC evaluiert werden.

## 2. Material

### 2.1 Laborgeräte

Agaroseelektrophoresekammer	Eigenbau MIP-f. Biochemie(Matrinried)
Autoklav (Modell 3870 ELV)	Tuttnauer (Jerusalem, Israel)
Brutschränke	Forma Scientific (Ohio, USA)
	Heraeus, (Zürich, Schweiz)
ELISA- Reader	R&D (Oxon, England)
FACS-Gerät	Coulter Immunotech,
(Coulter Epics XL Zytometer)	(Krefeld, Deutschland)
Festwinkelrotor SW50 TI	Beckman Instruments Inc., (Palo Alto, USA)
Gefrierschränke	Bosch (Stuttgart)
	Liebherr (Linz, Österreich)
Magnetrührer	Labor Brand (Giessen)
Microprocessor-Labor-pH Messgerät	HANNA Instruments (Kehl)
Mikroskop, DMIL	Leica (Bensheim)
MXR – Microplatte Reader	Guerncey, Channel Islands
Pipetten	Gilson S.A (Frankreich)
Pipettierhilfe	Greiner (Solingen)
Sterilbänke:	
-Laminarflow	Nunc (Wiesbaden)
-LaminAir	Heraeus (Zürich, Schweiz)
Vortex	Ika (USA)
Waage SBA52	Scaltec (USA)
Wasserbad	Köttermann (Uetze-Hänigsen)
Zählkammer nach Neubauer	Brandt (Wertheim, Deutschland)
Zentrifugen:	
-Biofuge	Heraeus (Zürich, Schweiz)
-Megafuge	Heraeus (Zürich, Schweiz)
Ultrazentrifuge Rotoren:	
SW-41i;	
SW-51Ti	Beckmann Instruments Inc., Palo Alto

## 2.2 Eukaryontische Zelllinien

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

Es handelt sich um eine Zelllinie aus humanen embryonalen Retinoblasten. Diese Zelllinie ist stabil mit der E1-Region des Adenovirus Serotyp 5 transfiziert, wodurch sich replikationsdefiziente Adenoviren mit Deletion der E1-Region vermehren können. 911-Zellen dienen deshalb der Propagation und Titrierung von adenoviralen Vektoren der 1. Generation.

### Hepa129-Zellen (NCI-Frederick Cancer Research and Development Center, USA)

Hepa129-Zellen finden ihren Ursprung in einem Tumorfsegment eines murinen HCC, welches aus C3H-Mäusen isoliert wurde. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um eine Suspensionszelllinie.

## 2.3 Mausstämme

C3H/HeN (C3H/HeNCrl) Charles River, Sulzfeld, Deutschland

1920 entwickelte Strong diesen Stamm aus der Kreuzung eines „Bagg Albino“-Weibchens und eines DBA/J-Männchens. TVA 84-02.04.2011.A375

## 2.4 Adenovirale Vektoren

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden 2 adenovirale Vektoren mit Deletion des E1-Gens verwendet:

- Ad-CD40L (kodierend für das murine CD40L)
- Ad-LacZ (kodierend für das E.coli  $\beta$ -Galactosidase, als Kontrollvirus)

Beide Vektoren wurden von Dr. Jesus Prieto, Navarra-Universität Spanien zur Verfügung gestellt (Schmitz et al. 2001).

## 2.5 Medien, Lösungen und Puffer

### Medien für die Zellkultivierung

#### 1. DMEM mit Glutamax mit folgenden Zusätzen:

FCS	10 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)

Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.



2. RPMI mit folgenden Zusätzen:

FCS	10 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)

3. Einfriermedium

FCS	90 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

4. Transduktionsmedium

Das Transduktionsmedium wurde zur Transduktion von Zellen mit adenoviralen Vektoren verwendet.

DMEM mit Glutamax mit folgenden Zusätzen:

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
Pferdeserum (HS)	2 % (v/v)

5. Medium für den Plaque-Assay (MEM 2x) angesetzt für 100 ml

MEM 10x (Gibco)	20 ml
ddH <sub>2</sub> O	65 ml
Penicillin/Streptomycin	2 ml
Glutamin	2 ml
Hefe Extrakt (5 %)	2 ml
NaHCO <sub>3</sub> (8,4 %)	7-10 ml (bis pH 7,4)

Das Überschichtungsmedium des Plaque-Assay besteht aus 1:1 2x MEM und Agarose TypVII (Low Gelling Temp, 1,5 %) mit 2 % HS.

6. DC-Medium

RPMI
10 % FCS
1 % P/S
GM-CSF (200 IE/ml)
IL-4 (100 IE/ml)

7. Weitere Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultivierung

PBS (Phosphate buffered saline), Gibco BRL (Gaithersburg, USA)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM

NaCl 50 mM

pH 7,4

als:

1. PBS- (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) 2 Tabletten PBS auf 1 l ddH<sub>2</sub>O
2. PBS++ (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) nach Dulbecco und Vogt (1954)
3. PBS++ für Durchflusszytometrie mit 1 % BSA

BSA Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)	PAA (Cölbe, Deutschland)
DMEM (4,5 g Glucose mit Glutamax)	PAA (Cölbe, Deutschland)
DMSO Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
FCS fötales Kälberserum	GibcoBRL (Berlin, Deutschland)
LPS	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin Lösung (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)	Sigma (München, Deutschland)
Pferdeserum (HS)	PAA, Laboratories (Linz, Österreich)
RPMI 1640 (mit Glutamax)	Gibco BRL, (Berlin, Deutschland)
Trysin-EDTA-Lösung (0,5 g/L Trypsin (1:250) und 0,2 g/L Ethylendiamintetraacetat (EDTA))	Gibco BRL (Gaithersburg, USA)

1,5 % Agarose TypVII

ddH<sub>2</sub>O 100 ml

Agarose TypVII (Low Gelling Temp) 1,5 g

(Die Agarose-Lösung wird autoklaviert und bei 4°C gelagert.)

MACS-Puffer

BSA 0,5 % (m/v)

EDTA 1 mM

in PBS

CsCl-Lösung

1 mM EDTA  
 (EDTA 1 mM/ Tris (pH 8,1) 10 mM)  
 10 mM Tris

TE-Puffer

- |    |                |                               |
|----|----------------|-------------------------------|
| 1. | 1,20 g/ml CsCl | 13,85g CsCl, 50 ml TE-Puffer  |
| 2. | 1,33 g/ml CsCl | 22,50 g CsCl, 50 ml TE-Puffer |
| 3. | 1,45 g/ml CsCl | 30,50 g CsCl, 50 ml TE-Puffer |

## 2.6 Antikörper

Ratte anti-Maus LY-6G (GR-1)	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Ratte anti-Maus CD45R/B220	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Ratte anti-Maus MHC Klasse II	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Ratte anti-Maus CD4/L3T4	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Ratte anti-Maus CD8/Lyt-2	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Ziege anti-Ratte IgG MicroBeads	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Anti-Maus CD80	Caltag (Hamburg, Deutschland)
Anti-Maus CD86	Caltag (Hamburg, Deutschland)
Anti-Maus CD40L	Caltag (Hamburg, Deutschland)

## 2.7 Zytokine

GM-CSF	tebu-bio (Offenbach, Deutschland)
IL-1beta	tebu-bio (Offenbach, Deutschland)
IL-2	tebu-bio (Offenbach, Deutschland)
IL-4	Bender MedSystems (Österreich)
IFN-gamma	tebu-bio (Offenbach, Deutschland)

## 2.8 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

6-Loch-Platten	Greiner (Solingen)
Chirurgische Instrumente	Martin (Tuttlingen)
Deckgläser (18x18 mm)	Engelbrecht (Edermünde)
Dialyse-Kammer (10 000 MWCO)	Perbio (Bonn)

Einmal-Kanüle (20G x 1,5)	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Einwegskalpelle	Sarstedt (Nürnberg)
Ethanol	E. Merck (Darmstadt)
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
FACS-Röhrchen	Labomedic (Bonn)
Insulin-Spritzen (40 U/ml)	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Kyrogefäße (2 ml)	Greiner (Solingen)
Mikrotiterplatten	Greiner (Solingen)
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Offene Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Optiseal Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner (Solingen) und Eppendorf (Hamburg)
Spritzen (10 ml)	B.Braun (Melsungen)
Serologische Pipetten	Sarstedt (Nürnberg)
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner (Solingen)

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellbiologische und proteinbiochemische Methoden

##### 3.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in DMEM, 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. DC und die Tumorzelllinie Hepa129-Zellen, wurden in RPMI kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen der Zellen durch Bakterien und Pilze zu vermeiden. Darüber hinaus wurde durch die Zugabe von Streptomycin und Penicillin (Pen/Strep) weiteren Kontaminationen vorgebeugt.

##### 3.1.2 Einfrieren, Aufbewahrung und Auftauen von Zellen

Um bereits kultivierte Zellen über einen gewissen Zeitraum lagern zu können, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Kryogefäß überführt und langsam bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Das im Einfriermedium verwendete DMSO schützt die Zellen beim Einfrieren durch Verhinderung von Eiskristallbildung, welche die Zellmembranen zerstören und somit zum Zelltod führen würde. Da DMSO im aufgetautem Zustand jedoch toxisch wirkt, müssen die Zellen schnell aufgetaut und sofort in Kulturmedium gewaschen werden, um die noch vorhandenen Reste von DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden dafür bei 500 UpM für 5 min abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten die Zellen in entsprechend komplettem Zellkulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät werden oder für weitere Arbeiten verwendet werden.

##### 3.1.3 Passagieren von Zellen

Erreichen die Zellen während der Kultivierung eine Konfluenz von 90 bis 100 % werden sie passagiert. Das bedeutet, dass die gewachsenen Zellen von einer Kulturflasche auf mehrere weitere Kulturflaschen verteilt werden. Dort können sie sich weiter teilen und vermehren, um für die folgenden Arbeiten eine größere Menge von Zellen zu erhalten. 911-Zellen wachsen adhärent und als Einzelschicht auf dem Boden der Kulturflasche. Um diese vom Boden abzulösen wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung über wenige Minuten zu den Zellen gegeben. Die Zellablösung wurde mikroskopisch kontrolliert, da eine zu lange

Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung die Zellen schädigen könnte. Sobald sich die Zellen vom Boden ablösen, wurde die Trypsin/EDTA-Lösung wieder inaktiviert. Dies erfolgte durch die Zugabe von Kulturmedium. Durch die im Medium enthaltenen zweiwertigen Kationen wird das Trypsin inaktiviert und so eine Zerstörung der Zellen verhindert. Bei den Hepa129-Zellen handelt es sich um Suspension-Zellen. Diese müssen zum Passagieren nur abzentrifugiert werden. Die Zelllinien wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und je nach Dichtegrad und Bedarf in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 in neue Kulturflaschen ausgesät.

#### 3.1.4 Zellzahlbestimmung in der Zählkammer nach Neubauer

Die Zellzahlbestimmung einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe der so genannten Zählkammer nach Neubauer. Diese besteht aus einem dicken Glasobjektträger mit einer Vertiefung und einem geschliffenen Deckglas. In der Vertiefung des Objektträgers ist ein Gitternetz. Eingeteilt ist die Neubauer-Kammer in 4 B-Felder, die nochmals in 16 kleinere C-Felder aufgeteilt sind. Diese C-Felder unterteilen sich dann noch einmal in D-Felder, die eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Tiefe von 0,1 mm besitzen. Das Volumen eines D-Feldes entspricht somit 0,1 µl. Für die Zellzählung werden 10 µl einer Zellsuspension unter das Deckglas in die Zählkammer pipettiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Farbstoff dringt durch die nicht mehr intakte Zellmembran toter Zellen durch Diffusion in die toten Zellen ein und färbt diese deutlich blau an. Sie werden bei der Zellzählung nicht berücksichtigt. Danach werden alle 4 B-Felder ausgezählt.

Die Zellzahl wird hinterher nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{B1+B2+B3+B4}{4} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

(B1-4 = B-Felder)

#### 3.1.5 Vermehrung adenoviraler Vektoren zur Produktion eines Virusstocks

Für die Vermehrung der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektoren (Ad-CD40L, Ad-LacZ) wurden zuerst 911-Zellen in 30 T-175 Kulturflaschen ausgesät und so lange kultiviert bis diese ca. 80 - 90 % konfluent waren (wie in 3.1.3 beschrieben). Anschließend wurden die 911-Zellen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1 einer vorhandenen Virusstocksuspension transduziert. Unter Transduktion wird das

Einbringen adenoviraler Vektoren in eine eukaryontische Zelle verstanden. Zunächst wurden die Zellen mit dem Transduktionsmedium gewaschen. Die Ad Stocklösung wurde ebenfalls im Transduktionsmedium verdünnt und dann auf die Zellen verteilt. Die Transduktion selber wurde in einem möglichst kleinen Volumen durchgeführt, um die Diffusionsstrecke für das Virus gering zu halten. Durch dieses Vorgehen wird die Transduktionseffizienz erhöht. Das im Transduktionsmedium enthaltene Pferdeserum (HS) begünstigt zudem die Virusaufnahme von Ad und wiederum die Transduktionseffizienz. Während einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurden die Kulturflaschen mehrmalig geschwenkt, um die Viren zu verteilen. Zusätzlich wurde hierdurch die Transduktionseffizienz verbessert. Anschließend wurde 25 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zu den Zellen gegeben. Nach 36 - 48 Stunden Inkubation begannen die Zellen sich abzurunden und vom Boden zu lösen. Dieser zytopathische Effekt ist ein Hinweis für eine erfolgreiche Virusvermehrung. Wenn ca. 90 % der Zellen sich abgerundet haben und von diesen weitere 40 % vom Boden abgelöst sind, ist der optimale Zeitpunkt für das Ernten der Ad erreicht. Werden die Vektoren zu früh geerntet, wird die Ausbeute der Virusproduktion sehr niedrig sein, da die Adenoviren mit Hilfe der 911-Zellen nicht genug Zeit gehabt haben sich vollständig zu vermehren. Findet sie jedoch zu spät statt, werden viele Zellen aufgrund des zytopathischen Effektes bereits gestorben sein, womit ebenfalls ein Virusverlust einhergeht. Für die Virus-Ernte wurden die noch restlichen adhärennten Zellen mit einem Schaber vom Boden abgelöst und jeweils in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschliessend wurden diese 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann in insgesamt 8 ml PBS++ mit 10 % Glycerol resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Durch 4 Zyklen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die in 911-Zellen vorhandenen adenoviralen Vektoren aus den Zellen in die Zelllösung freigesetzt. Die Suspensionslösung wurde anschliessend 5 min bei 1400 Upm abzentrifugiert, mittels Cäsiumchlorid (CsCl)-Aufreinigung konzentriert, durch die CsCl- Ultrazentrifugation von Zellresten und defekten Viren aufgereinigt und bei -80°C eingefroren.

### 3.1.6 Aufreinigung adenoviraler Vektoren mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Aufreinigung der Virusstocklösung wurde mittels Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dies ermöglicht die Abtrennung von

zellulären Komponenten wie zum Beispiel Proteinen, Zellmembranen, Zelltrümmern sowie von defekten viralen Partikeln. Diese Methode besteht aus drei Schritten, welche im Folgenden erklärt werden.

#### 3.1.6.1 Diskontinuierlicher CsCl-Stufengradient

Für die Herstellung des Stufengradienten wurden zuerst 3 ml CsCl-Lösung (1,4 g/ml Dichte) in ein durchsichtiges Beckmann-Röhrchen pipettiert, und mit 4,5 ml CsCl-Lösung (1,2 g/ml Dichte) vorsichtig überschichtet. Anschließend wurden 4 ml der Ad-Suspension langsam auf den Gradienten pipettiert. Die Röhrchen wurden austariert, verschlossen und in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Für die Zentrifugation wurde ein Ausschwingrotor (LE 80K, Rotor SW-41i) verwendet. Die Ultrazentrifugation erfolgte über eine Stunde bei 32.000 Upm ungebremst, bei 17°C und maximaler Beschleunigung. Durch die unterschiedlichen Dichten der CsCl-Lösungen bilden sich während der Zentrifugation verschiedene Phasen aus. Die Virusdichte beträgt etwa 1,3 g/ml. Es zeigt sich daher nach der Zentrifugation eine starke Bande, die sich zwischen den beiden CsCl-Lösungen befindet. Direkt über dieser Virusbande befindet sich in der Regel eine zusätzliche dünne diffuse Bande, welche defekte Ad enthält. Mit einer langen Kanüle wurde die starke Virusbande aspiriert und in ein Optiseal-Röhrchen (Beckmann) überführt.

#### 3.1.6.2 Kontinuierlicher CsCl-Stufengradient

Dieser Schritt dient zur weiteren Trennung der intakten von den defekten viralen Partikeln. Die zweite Ultrazentrifugation wurde über 12-17 h, bei 17°C und 40000 Upm, mit maximaler Beschleunigung und langsamen Abbremsen durchgeführt. Das Optiseal-Röhrchen, in dem sich die Ad mit einer Dichte von 1,3 g/ml befinden, wurde mit einer CsCl-Lösung, deren Dichte 1,33 g/ml beträgt, aufgefüllt. Die austarierten Optiseal-Röhrchen wurden in einem Festwinkelrotor (SW50 Ti) zentrifugiert. Aufgrund der Dichteverhältnisse erzeugen die intakten Ad eine Bande in der Mitte des Röhrchens. Diese wurde mit Hilfe einer Kanüle abgenommen.

#### 3.1.6.3 Dialyse und Aufbewahrung der Adenoviren

Nach Schritt 3.1.6.1 und 3.1.6.2 wurde das Ad in eine Dialysekammer überführt, um mittels Dialyse das restliche CsCl aus der Virussuspension zu entfernen, da eine zu starke Konzentration von CsCl für Zellen toxisch ist, und die adenovirale Zelltransduktion stören



würde. Es erfolgten insgesamt 4 Dialyseschritte. Die erste Dialyse erfolgte bei RT für 30 min gegen PBS (100 faches Volumen). Die 2. und 3. Dialyse erfolgten nach Erneuerung des PBS bei 4°C jeweils für 1 Stunde. Bei der 4. und letzten Dialyse wurde als Puffer PBS++ /10 % Glycerol verwendet. Danach wurden die Ad aus der Dialysekammer entnommen, sterilfiltriert und in Aliquots von je 20 µl bei –80°C gelagert.

### 3.1.7 Titerbestimmung durch Plaque Assay in 911 – Zellen

Mit Hilfe des Plaque Assay wird die Konzentration der Ad ermittelt, die in der Lage sind eine Zelle zu infizieren und sich darin zu vermehren. Er stellt eine Standard-Methode zur quantitativen und qualitativen Messung von Ad dar. In einer 6-Loch-Platte wurden  $4 \times 10^5$  911-Zellen pro Loch in 4 ml Medium ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 90-100 % erreichten, wurde eine Verdünnungsreihe der Ad-Suspension von  $1:10^8$  bis  $1:10^{12}$  hergestellt. Die 911-Zellen wurden zunächst mit Transduktionsmedium gewaschen. Danach wurden jeweils 3 Löcher einer 6-Loch-Platte mit je 1 ml der Virussuspension pro Verdünnung versetzt. Zur Kontrolle wurden 3 Löcher mit 911-Zellen mit Transduktionsmedium ohne Virus angesetzt. Nach einer 2 stündigen Inkubationszeit bei 37°C wurde der Überstand abgesaugt, und die Zellen vorsichtig mit 4 ml Überschichtungsmedium (mit Agarose) pro Loch überschichtet. Nach 7-10 Tagen Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde der Plaque-Assay durch Zählen der entstandenen Plaques der verschiedenen Verdünnungen ausgewertet. Der Titer wurde nach der folgenden Formel ermittelt:

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

### 3.1.8 Extraktion von Proteinen aus Tumorzellen und Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford und Lowry

Für die Herstellung eines Proteinlysats aus Hepa129-Zellen wurden zunächst Hepa129-Zellen aus den T175 Kulturflaschen geerntet und in Falcons gegeben (1 Falcon pro T175 Kulturflasche). Dann wurden die Zellen bei Raumtemperatur, 1200 U/min und 5 min zentrifugiert und dreimal in 20 ml PBS pro Falcon gewaschen. Die entstandene Zellsuspension wurde nun dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und jeweils wieder im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Dadurch werden die Zellen lysiert und die Zellproteine freigesetzt. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur mit 3000 U/min über 5 min

zentrifugiert. Die Zellrückstände haben sich hierdurch auf dem Boden abgesetzt. Das Proteinlysate befindet sich im Überstand und wird in Reaktionsgefäße à 200 µl überführt und bei -20 °C eingefroren.

Der Proteingehalt des Hepa129-Proteinlysats wird mit Hilfe des BioRAD-DC-Protein Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dieses Kit besteht aus 3 Lösungen (A, B und S). In einer 96-Loch-Platte wurde eine Standardreihe mit 5 µl einer BSA-Lösung, deren Proteinkonzentration bekannt war, (sie diente als Eichgerade, um die Proteinkonzentrationen der Proben zu ermitteln), hergestellt. Als Leerwert wurden 5 µl PBS vorgelegt. Von den zu untersuchenden Proteinproben wurden nun 5 µl in jedes Loch gegeben und mit 25 µl der Lösung A' (bestehend aus Lösung A und S) gemischt. Danach wurden 200 µl der Lösung B hinzupipettiert. Die Lösungen wurden ca. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Messung mit einem ELISA-Reader.

### 3.1.9 Gewinnung von murinen DC aus dem Knochenmark von C3H/HeN Mäusen

Für die Gewinnung von DC wurden 6 – 10 Wochen alte, männliche C3H/HeN Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden zunächst durch zervikale Dislokation geopfert, bevor ihnen Tibia und Femur entfernt wurden. Danach wurden die Knochen von den umgebenden Muskeln und Gewebe gereinigt, und die intakten Knochen in 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Knochen mit einem Skalpell eröffnet, um das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle und einer 10 ml Spritze, die mit RPMI gefüllt war, aus dem Knochen zu spülen. Das Knochenmark wurde dann über ein Zellsieb mit der Porengröße 100 µm gegeben. Die somit gewonnenen Zellen wurden 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen in 5 ml Erythrozytenlyse-Puffer pro Maus resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurde die Zellsuspension zentrifugiert, wodurch die lysierten Erythrozyten entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Während dieses Schrittes wurden die Zellen, aus denen zuvor eine kleine Probe entnommen wurde, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für die Zellseparation von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten, wurden 6 µl Gesamt-AK bestehend aus 40 % Antikörper gegen LY6G, 30 % gegen CD45R, 10 % gegen MHCII H2-Kb, 10 % gegen CD4 und 10 % gegen CD8 pro 10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt. Das Zellpellet wurde in 50 µl PBS

sowie der entsprechenden Menge an AK-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die nicht gebundenen Antikörper mit 10 ml PBS- gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden pro  $10^7$  Zellen 80  $\mu$ l MACS-Puffer und 20  $\mu$ l Ziege-Anti-Ratte *microbeads* zugegeben, resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in 4 ml MACS-Puffer gewaschen und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das erhaltene Zellpellet in 500  $\mu$ l MACS-Puffer/Maus resuspendiert. Die MACS-Zellseparation erfolgte mit Hilfe von Magnetsäulen, wodurch eine negative Zellselektion erfolgte. Damit wurden unreife DC entfernt. Die Zellen wurden gezählt und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro 2 ml DC-Medium mit 20  $\mu$ l GM-CSF (200IE/ml) und 10  $\mu$ l IL-4 (100IE/ml) pro ml DC-Medium ausgesät und in 6-Loch-Platten im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am Tag 4 nach der Isolierung der DC wurde das Medium in den 6-Loch-Platten erneuert. Dazu wurde 1 ml des alten Medium gegen 2 ml neues Medium mit 20  $\mu$ l GM-CSF (200 IE/ml) und 10  $\mu$ l IL-4 (100 IE/ml) pro ml DC-Medium ersetzt.

#### 3.1.10 Pulsen von DC mit Tumorlysat

Am Tag 5 nach der Herstellung wurden die DC mit Tumorlysat gepulst. Es wurden 100  $\mu$ g Hepa129-Lysat/ml Medium, 500  $\mu$ l neues DC-Medium sowie 20  $\mu$ l GM-CSF und 10  $\mu$ l IL-4 pro ml Medium zu den DC gegeben. Die Zugabe von Hepa129-Lysat zu noch unreifen DC bewirkt, dass DC TAA aufnehmen und diese über MHC-Moleküle präsentieren können.

#### 3.1.11 Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren

Am Tag 6 nach der Herstellung von DC wurden die Zellen mit Ad-CD40L oder Ad-LacZ (Kontrolle) transduziert. Hierzu wurden die DC zunächst mit einem Zellschaber geerntet, und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml Transduktionsmedium resuspendiert. Je nach gewünschter MOI wurde nun die Adenoviren-Menge zu den Zellen gegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium erneuert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am Tag 7 wurden 10  $\mu$ l/ml LPS zur Stimulation der DC dazugegeben. Am Tag 8 wurden die transduzierten DC für weitere Experimente eingesetzt.

### 3.1.12 Durchflusszytometrie

Bei dieser Methode können mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z.B. Größe oder Expression von Oberflächenmolekülen detektiert werden. In dem FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit (*sheath fluid*). In diese Trägerflüssigkeit wird die Probe in Form einer Zellsuspension eingebracht. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Exzitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Pro Zelle können drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und vier weitere Parameter gleichzeitig gemessen werden. Zwei dieser zusätzlichen Parameter (FSC (*forward scatter*) und SSC (*sideward scatter*)) erlauben eine Unterscheidung der Zellen auf Grund von morphologischen Zellparametern (Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit). Mit Hilfe des FACS-Gerätes können in kurzer Zeit 10.000 Zellen untersucht werden. Gleichzeitig können mit diesem Gerät auch Zellen sortiert werden. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, wenn sich die eingesetzten Farbstoffe in ihren Emissionsspektren unterscheiden.

### 3.1.13 Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (s. 3.1.12) diente während dieser Arbeit der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen in Zellen. Konkret wurden mittels Durchflusszytometrie sowohl die typischen DC-Oberflächen-Marker in DC, die mit Ad-CD40L transduziert wurden, als auch die Transgenexpression von CD40L an der Oberfläche von DC untersucht und quantitativ analysiert. Die DC wurden mit Ad-CD40L mit verschiedenen MOIs (100-500) transduziert. 48 Stunden nach der adenoviralen Transduktion wurden DC (s. 3.1.9) für die Antikörperfärbung mit einem Zellschaber aus den 6-Loch-Platten geerntet und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Danach wurden sie in 1 ml PBS++ /1 % BSA gewaschen, erneut zentrifugiert und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen in 80  $\mu$ l PBS++ /1 % BSA eingestellt. Die Zellen wurden anschließend mit FITC- und PE-gekoppelten Antikörpern markiert. In dieser Arbeit wurden FITC- und PE-markierte Isotyp-Antikörper IG/IG, als Kontrolle, sowie FITC- oder PE-markierte Antikörper gegen murine CD80, CD86, CD40 und CD40L verwendet. Die Antikörper wurden mit den DC gemischt

und 20 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Für die Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen zunächst in 1 ml PBS++ /1 % BSA gewaschen und dann 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und erneut in 1 ml PBS++ /1 % BSA resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in FACS-Röhrchen zur Messung in das FACS-Gerät überführt.

### 3.1.14 Bestimmung der Konzentration von IL-12 mittels ELISA

Das Enzyme *Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein sehr sensitives, immunologisches Nachweisverfahren (Assay) zur Quantifizierung von Proteinen, Viren und niedermolekularen Verbindungen. Mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion können die nachzuweisenden Stoffe detektiert werden. Hierfür werden spezifische enzym-markierte Antikörper oder Antigene verwendet, die an das nachzuweisende Protein binden können. Das Enzym erzeugt einen Farbumschlag oder Fluoreszenz. Dieser dient als Nachweis für das Vorhandensein des gesuchten Stoffes. In dieser Arbeit wurde IL-12 im Überstand von DC, Lymphozyten oder im Serum von immunisierten Mäusen gemessen.

## 3.2 Tierexperimente

### 3.2.1 Induktion eines subkutanen HCC in C3H/HeN Mäusen

Für die Induktion eines subkutanen (s.c.) HCC wurde in dieser Arbeit die murine Hepatom-Zelllinie Hepa129 verwendet, welche mit dem Mausstamm C3H/HeN syngen ist. Für die Tumorinduktion wurden die Zellen zunächst geerntet und 10 min bei 500 Upm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 15 ml RPMI ohne Zusätze resuspendiert, um die Zellen zu waschen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3 Mal hintereinander durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die Zellen kein FCS mehr enthalten. Dieses könnte in der Maus als Fremdartigen erkannt werden, und somit eine zusätzliche Immunreaktion induzieren, welche unsere Experimente stören würde. Nach der letzten Zentrifugation wurde die Zellzahl bestimmt, und die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$  RPMI ohne Zusätze resuspendiert. Vor der subkutanen Injektion der Hepa129-Zellen wurden die Mäuse betäubt. Hierfür wurde eine Mischung aus Ketamin (0,1 mg/g Körpergewicht (KG), Rompun (2 % 0,01 mg/g KG) und 0,9 % NaCl-Lösung (100  $\mu\text{l}$  Endvolumen) pro Maus intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Anschließend wurde die rechte Flanke rasiert und die  $1 \times 10^6$  Hepa129-Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Volumen injiziert. 4-5 Tage nach der s.c. Injektion von Hepa129-Zellen entsteht ein messbarer Tumor, bei dem regelmäßig

alle 3 Tage das Tumorwachstum verfolgt wurde. Die Messung der Tumoren erfolgte mit Hilfe einer Schieblehre. Das Tumolvolumen wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,52$$

Ab einem Tumolvolumen von 1500-2000 mm<sup>3</sup> wurden die Mäuse geopfert.

### 3.2.2 Tumorzellreexposition

Bei Mäusen, die im Verlauf der Versuche eine komplette Remission des Tumors erreichten, wurde 3 Monate später eine erneute Tumorinduktion mit Hepa129-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Hepa129-Zellen nun in die linke Flanke gespritzt. Dieses Experiment diente dem Nachweis einer tumorspezifischen, dauerhaften Gedächtnis-Immunantwort.

### 3.2.3 Applikation von DC zur Immuntherapie von etabliertem HCC

Mit der Therapie der s.c. Tumoren wurde ab einer Größe von 150-200 mm<sup>3</sup> begonnen. Dazu wurden die Tiere, wie bereits in 3.2.1 beschrieben, betäubt. Die zu applizierenden DC wurden mit Ad-CD40L transduziert (MOI 250). Als Kontrollgruppe dienten Ad-LacZ-transduzierte und nicht transduzierte DC. Die Injektionen der jeweiligen DC erfolgten mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen in 50 ml PBS-. Die Applikation der DC erfolgte entweder intratumoral (i.t.), subcutan (s.c.) oder intravenös (i.v.). 5-7 Tage nach der ersten Injektion erfolgte eine zweite DC Injektion. Während der gesamten Therapie wurden die Tumoren engmaschig im Abstand von 3 Tagen ausgemessen. Wurde ein Tumolvolumen von 1500-2000 mm<sup>3</sup> erreicht, so wurde das Experiment abgebrochen und die Maus durch zervikale Dislokation getötet.

### 3.2.4 Durchflusszytometrie von Tumoren

In diesem Experiment wurden tumortragende Tiere 5-7 Tage nach der 2. s.c. DC-Behandlung geopfert und die Tumoren entnommen. Als Kontrollgruppe dienten Ad-LacZ-transduzierte DC behandelte Tumoren. Die Tumoren wurden dann mit Kollagenasen behandelt, um eine Zellsuspension zu erzeugen. Die Zellsuspension wurde dann mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei sollte die Menge der CD4(+)- und CD8(+)- bzw. NK-Zellen im Tumor untersucht werden.

### 3.3 Statistik

In dieser Arbeit wurden alle gewonnenen Daten einer beschreibenden statistischen Berechnung unterzogen. Zum Vergleich wurden Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt. Veränderungen wurden als signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  war. Die Überlebensraten wurden als Kaplan-Meier-Kurve präsentiert. Zur Anwendung wurden die Computerprogramme Instat und Origin verwendet.

## 4. Resultate

### 4.1 Adenovirale Vermehrung und Aufreinigung

Um die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektoren (Ad-CD40L, Ad-LacZ) zu vermehren, wurden zuerst 911-Zellen in Kulturflaschen ausgesät und kultiviert bis diese ca. 80-90 % konfluent waren. Anschließend wurden die 911-Zellen mit einer multiplicity of infection (MOI) von 1 einer vorhandenen Virusstocksuspension transduziert. 36-48 Stunden nach der Inkubation kam es zu einem zytopathischen Effekt, die Zellen begannen sich abzurunden und vom Boden zu lösen, als Hinweis für eine erfolgreiche Virusvermehrung. Wenn ca. 90 % der Zellen sich abgerundet haben und von diesen weitere 40 % vom Boden abgelöst sind, ist der optimale Zeitpunkt für das Ernten der Ad erreicht. Um die Ad weiter verwenden zu können, wurden sie mittels Cäsiumchlorid (CsCl)-Aufreinigung konzentriert. Die Virusdichte beträgt etwa 1,3 g/ml und es zeigt sich daher nach der Zentrifugation eine starke Bande, die sich zwischen den beiden CsCl-Lösungen befindet. Direkt über dieser Virusbande befindet sich in der Regel eine zusätzliche dünne, diffuse Bande, welche defekte Ad enthält (Abb. 1).

Mit einer langen Kanüle wurde die starke Virusbande abgenommen.

adenovirale Vektoren

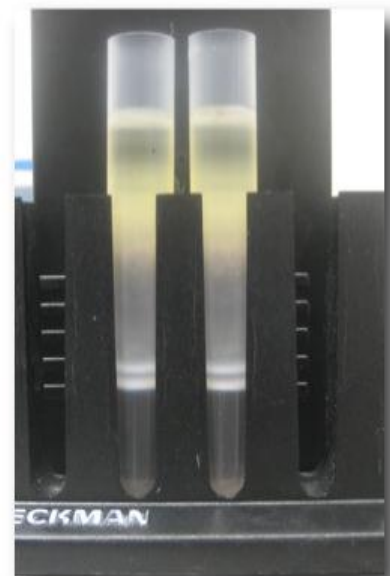


Abb. 1: Cäsiumchlorid (CsCl)-Aufreinigung. Die adenoviralen Vektoren (dargestellt AdCD40L) sind in der starken Bande, die sich zwischen den beiden CsCl-Lösungen befindet. Direkt darüber befindet sich eine zusätzliche dünne, diffuse Bande, welche defekte Ad enthält.



Durch die zweite CsCl-Ultrazentrifugation werden die Ad aufgereinigt, um die Abtrennung von zellulären Komponenten wie zum Beispiel Proteinen, Zellmembranen, Zelltrümmern sowie von defekten viralen Partikeln zu erreichen. Aufgrund der Dichteverhältnisse erzeugen die intakten Ad eine Bande in der Mitte des Röhrchens (Abb. 2). Diese wurde mit Hilfe einer Kanüle abgenommen.

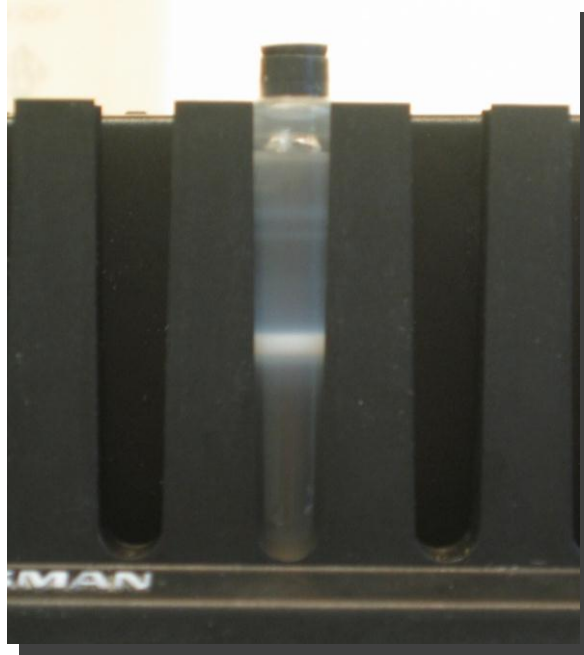


Abb. 2: Aufreinigung mittels CsCl-Ultrazentrifugation. Die Bande in der Mitte des Röhrchens enthält intakte Ad (AdCD40L).

In der anschließenden Dialyse wird das CsCl wieder aus der Virussuspension entfernt, da eine zu starke Konzentration von CsCl für Zellen toxisch ist, und die adenovirale Zelltransduktion stören würde. Danach wurden die Ad aus der Dialysekammer entnommen, steril filtriert und in Aliquots von je 20  $\mu$ l bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.2 Plaque-Assay und Titerbestimmung

Um die aufgereinigten Ad weiter verwenden zu können, wurde mit Hilfe des Plaque Assay die Menge der Ad ermittelt, die in der Lage sind eine Zelle zu infizieren und sich darin zu vermehren (siehe Methoden). Nach 10 Tagen konnten die Plaque Assays für die in dieser Arbeit verwendeten Virusstocklösungen von AdCD40L und AdLacZ ausgewertet werden, da sich zu diesem Zeitpunkt vollständige Plaques ausgebildet haben (Abb. 3).

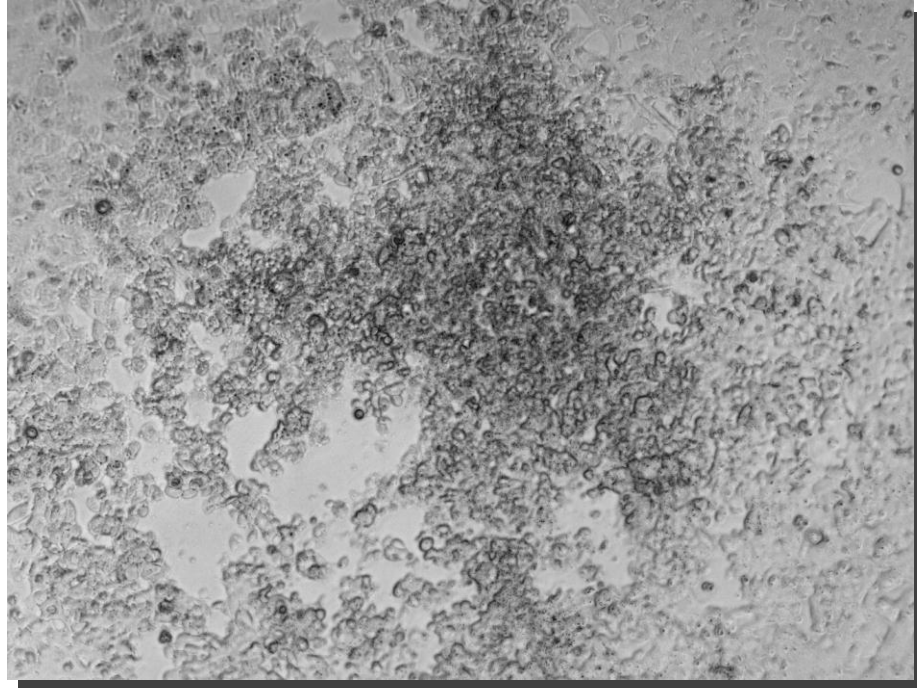


Abb. 3: Lichtmikroskopie (Vergrößerung 10x) eines Plaque aus dem Plaque Assay von AdCD40L. Hier zeigt sich ein Beispiel eines Plaque das nach Vermehrung eines aktiven Viruspartikels in 911-Zellen entsteht.

Der Titer für die Virusstocklösung von AdCD40L betrug  $3,3 \times 10^{10}$  pfu/ml. Für das Kontrollvirus war der Titer  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml.

#### 4.3 Nachweis der CD40L-Expression von Ad-CD40L-transduzierten DC

Die Expression von CD40L auf der Oberfläche von DC wurde 48 Stunden nach Transduktion mit Ad-CD40L bei einer MOI von 250 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie unter 3.1.12 beschrieben, kann mittels Durchflusszytometrie durch spezifische Fluoreszenzmarkierung die Expression von bestimmten Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen von Zellen analysiert werden. Als Kontrolle wurden Ad-LacZ-transduzierte DC auf die Expression von CD40L untersucht und mit Ad-CD40L-transduzierten DC verglichen. Die CD40L-Expression bei den Ad-CD40L-DC (MOI 250) lag im Durchschnitt bei  $47,8 \pm 8,7$  %. Das heißt etwa die Hälfte der DC zeigten eine Expression von CD40L an der Oberfläche. Im Gegensatz dazu zeigten die Ad-LacZ-transduzierten DC (Kontrolle) erwartungsgemäß keine Expression von CD40L. Die Überlebensrate der Zellen nach der adenoviralen Transduktion lag zwischen 60-70 %. (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4 Phänotyp Ad-CD40L-transduzierter DC

CD86 und CD80 sind wichtige Oberflächenproteine, die von dendritischen Zellen (DC) exprimiert werden. Beide sind wichtige kostimulatorische Moleküle, die für die T-Zell Aktivierung verantwortlich sind. Um sicher zu stellen, dass es während der adenoviralen Transduktion der DC nicht zu einer Verminderung der CD86- sowie der CD80-Expression kommt, wurde die Expression von CD86 und CD80 mit Hilfe der Durchflusszytometrie 48 Stunden nach adenoviraler Transduktion mit AdCD40L oder AdLacZ (Kontrolle) in DC untersucht. Wie Abb. 4 zeigt, wurde die Expression von CD80 und CD86 nicht durch die adenovirale Transduktion der DC gemindert. Vielmehr zeigte sich im Vergleich zu nicht-transduzierten oder mit Ad-LacZ-transduzierten DC eine Erhöhung der CD80 und CD86 Expression bei den Ad-CD40L-transduzierten DC. Die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle lag, im Vergleich zu nicht-transduzierten DC, bei CD80 mit  $47,6 \pm 5,5$  % und CD86 mit  $62,8 \pm 4,7$  % signifikant höher ( $p = < 0,02$ ). Verglichen wurde auch die Expression von CD80 und CD86 bei DC, die mit AdCD40L transduziert wurden, mit der Expression in Ad-LacZ-transduzierten DC, um den Effekt von CD40L zu evaluieren. Wie in Abb. 4 dargestellt steigerte die Transduktion von DC mit AdCD40L die Expression von CD80 auf 47 % der Zellen im Vergleich zu 34 % Expressionsrate in AdLacZ-DC. CD86 war mit 62 % Expressionsrate bei CD40L-DC vs. 49 % in LacZ-DC auch signifikant höher.

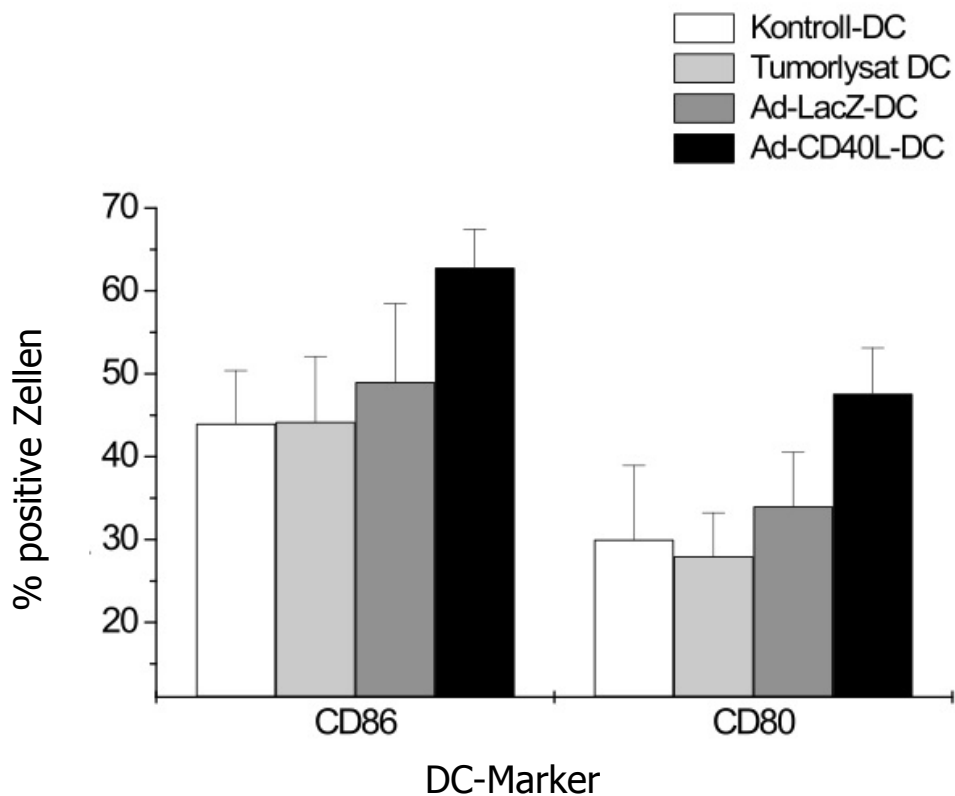


Abb. 4: Expression der DC-typischen kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 an Tag 8 nach der DC-Generierung (48 Stunden nach Adenoviren-Transduktion) mittels Durchflusszytometrie. Die DC wurden am Tag 5 mit Tumorlysat aus Hepa129 beladen und am Tag 6 mit den adenoviralen Vektoren transduziert. n = 4; p < 0,05.

#### 4.5 Morphologische Veränderungen von CD40L-transduzierten DC

Während der in vitro-Experimente konnte lichtmikroskopisch beobachtet werden, dass die DC, die mit Ad-CD40L transduziert wurden, aneinander binden und so mehrere Aggregate bilden. Dies deutet auf eine starke zelluläre Interaktion hin. Durch die Zugabe von anti-CD40L-mAb, der CD40L blockieren kann, zeigte sich dieser Effekt beinahe reversibel, so dass CD40L auf Ad-CD40L-transduzierten DC an den korrespondierenden CD40-Rezeptoren der DC tatsächlich zu binden scheint. Nicht-transduzierte oder Ad-LacZ-transduzierte DC zeigten dagegen dieses Phänomen nicht (siehe Abb. 5)

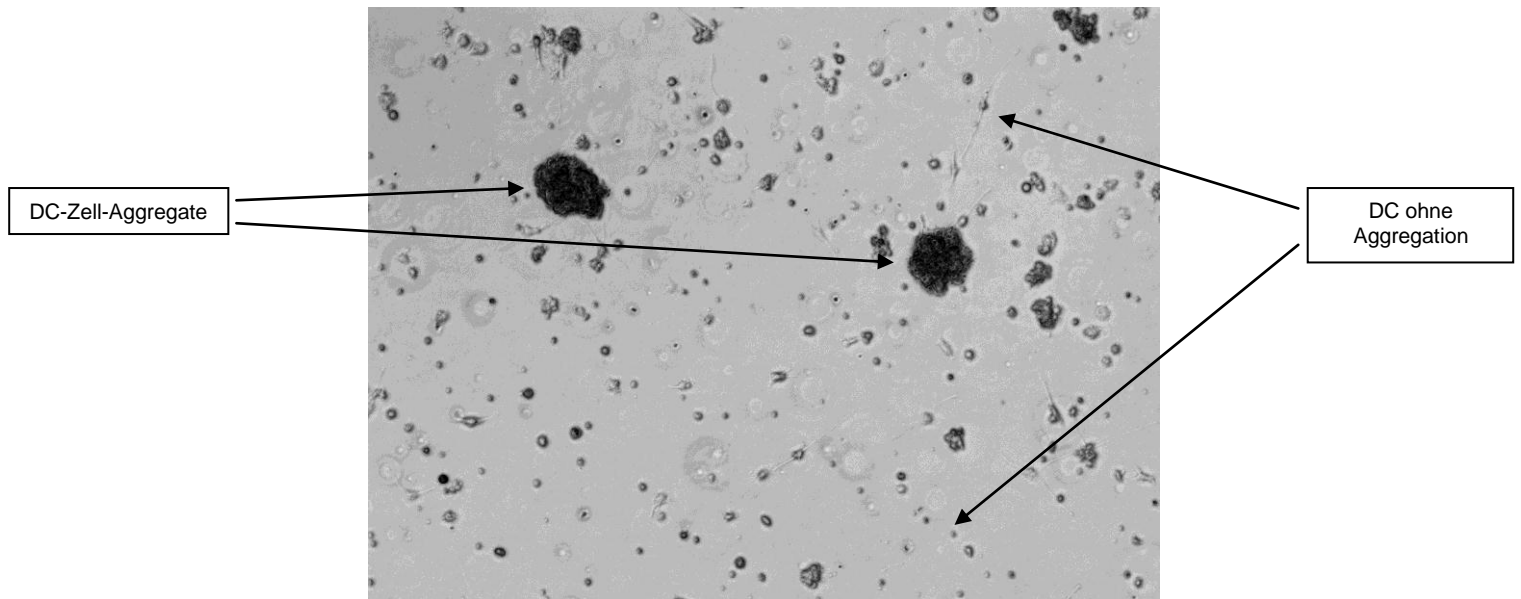


Abb. 5: Lichtmikroskopische Darstellung (Vergrößerung 10x) von DC, 48h nach Transduktion mit AdCD40L. Es zeigt sich die Bildung von Zell-Aggregaten zwischen CD40L-exprimierenden DC.

4.6 Analyse der IL-12-Expression im Überstand von Ad-CD40L-transduzierten DC

Ein weiterer Hinweis einer Immunstimulation von DC ist die Ausschüttung von IL-12 durch die DC. IL-12 ist ein Th1-polarisierendes Zytokin, welches in der Th1-Immunantwort eine essentielle Rolle spielt. Die IL-12-Expression im Überstand von Ad-CD40L-transduzierten DC wurde mittels ELISA bestimmt (siehe 3.1.14). Verglichen wurde das Ergebnis mit Ad-LacZ-transduzierten oder nicht transduzierten DC. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass es bereits 48 Stunden nach der Transduktion von DC mit Ad-CD40L zu einer stark erhöhten IL-12-Sekretion der DC kam. Bei einer MOI von 250 konnten  $730,7 \pm 51,5$  pg/ $10^6$ - Zellen IL-12 im Überstand von DC gemessen werden (Abb. 6). Im Vergleich zu den CD40L-exprimierenden DC konnte bei den Ad-LacZ-transduzierten DC oder nicht-transduzierten DC dagegen keine IL-12 Expression im Überstand nachgewiesen werden. Um die Rolle von CD40L für die IL-12-Expression darstellen zu können, wurde in einem weiteren Experiment die CD40L-Expression mit Hilfe eines anti-CD40L-Antikörpers analog zu 4.3 geblockt. Wie in Abb. 3 dargestellt, war die Produktion von IL-12 bei Verwendung eines anti-CD40L-Antikörpers stark vermindert.

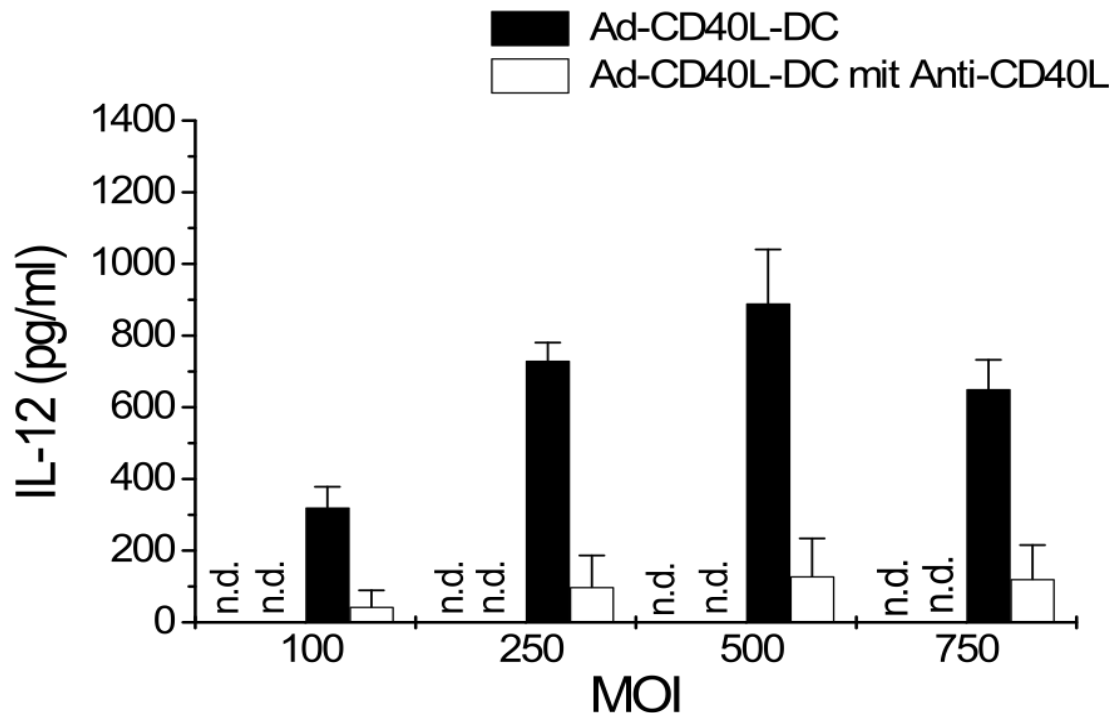


Abb. 6: IL-12-Konzentration im DC-Überstand ( $1 \times 10^6$  Zellen) 48 h nach Transduktion mit Ad-CD40L mit (schwarz) oder ohne anti-CD40L-AK (weiß) mittels ELISA gemessen. n.d.= nicht detektierbare IL-12-Expression von Ad-LacZ- oder nicht-transduzierten DC.

\*  $p = < 0,05$

#### 4.7 Einfluss der i.t.-Gabe von AdCD40L auf das Tumorwachstum im HCC Mausmodell

In einem ersten in vivo Experiment wurde zunächst der antitumorale Effekt der alleinigen Gabe von Ad-CD40L ohne DC bei einem etablierten, s.c. hepatozellulären Tumormodell überprüft. Als Kontrollvektor wurde bei diesem Experiment Ad-LacZ verwendet. Die Tumoren wurden, wie in 3.2.1 beschrieben, s.c. in C3H-Mäuse induziert. Sobald diese ein Volumen von 100-200 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, erfolgte die i.t.-Injektion von Ad-CD40L oder Ad-LacZ (Kontrolle) in 100 µl PBS mit einer Viruskonzentration von  $5 \times 10^9$  pfu/Maus. Die Tiere welche mit Ad-CD40L behandelt wurden, wiesen eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums auf (Abb. 7a). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte eine Hemmung des Tumorwachstums von bis zu 40 % festgestellt werden ( $865,7 \pm 135,8$  mm<sup>3</sup> vs.  $1551,8 \pm 229,3$  mm<sup>3</sup>,  $p = 0,028$ , 19 Tage nach der Tumorinduktion). Entsprechend zeigte sich eine

signifikante Verlängerung des Überlebens in der CD40L-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ), (Abb. 7b). Trotz der signifikanten Hemmung des Tumorstwachstums durch Ad-CD40L kam es nicht zu einer kompletten Tumorremission

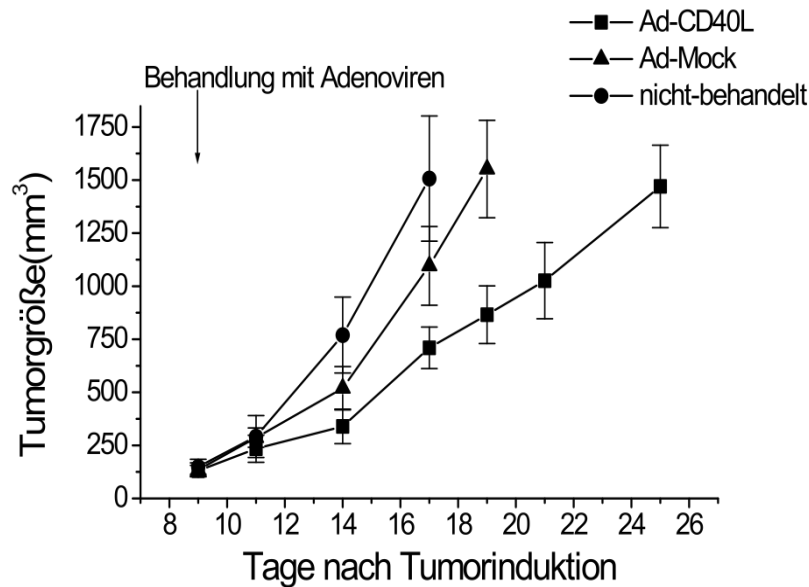


Abb. 7a: Tumorstwachstum in C3H-Mäusen nach i.t.-Gabe von  $1 \times 10^9$  pfu AdCD40L oder AdLacZ. Darstellung des durchschnittlichen Tumorstwachstums in  $\text{mm}^3$  von Mäusen sowie von Kontroll-Mäusen, (jeweils  $n = 12$ ),  $*p < 0,05$ .

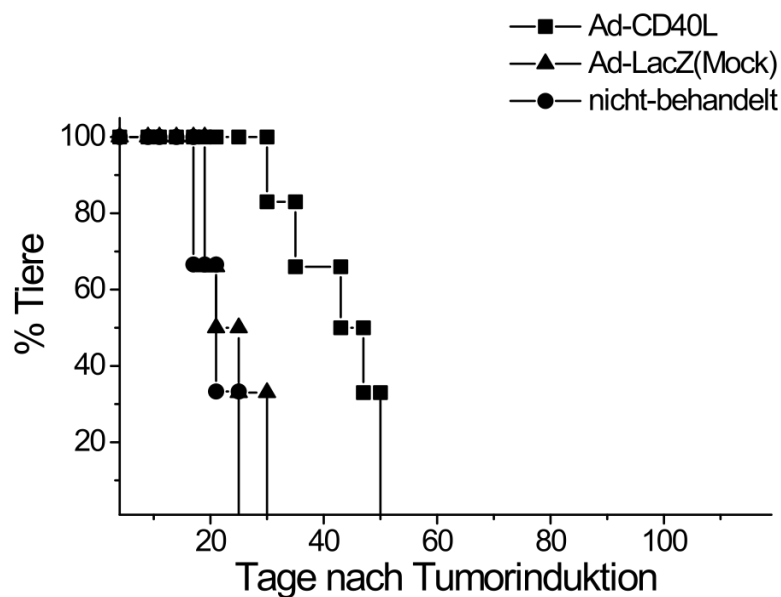


Abb. 7b: Langzeitüberleben nach i.t.-Gabe von Ad-CD40L vs. AdLacZ (Kaplan-Meier-Kurve).  $*p < 0,05$ .

#### 4.8 Einfluss von CD40L-exprimierenden DC auf das Tumorwachstum im HCC Mausmodell. Bedeutung des Applikationsweges von DC

In einem weiteren Experiment wurde die antitumorale Wirkung von AdCD40L-transduzierten DC untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Ad-LacZ-transduzierte DC. Für dieses Experiment wurden zunächst  $1 \times 10^6$  Hepa129-Zellen zur Tumorinduktion wie in 3.2.1 bei C3H-Mäusen s.c. injiziert. 7-10 Tage später zeigte sich ein Tumor mit einer Tumorgöße von 100-200 mm<sup>3</sup>. Erst dann wurden die tumortragenden Mäuse durch i.t.-Injektion mit  $1 \times 10^6$  DC behandelt. Eine Woche nach der ersten i.t.-Injektion erfolgte eine zweite Behandlung mit  $1 \times 10^6$  DC. Wie in Abb. 8 gezeigt, ergab die i.t.-Injektion von Ad-CD40L-transduzierten DC im Vergleich zu Ad-LacZ-transduzierten DC eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums von ca. 60 %. Am Tag 19 nach der Tumorinduktion war die Tumorgöße bei  $562,6 \pm 149,7$  mm<sup>3</sup> in der CD40L-DC-Gruppe vs.  $1363,8 \pm 197,5$  mm<sup>3</sup> in der Kontrollgruppe,  $p = 0,009$ . Darüber hinaus führte die i.t.-Injektion mit CD40L-exprimierenden DC zu einer kompletten Tumorregression bei fast 70 % der tumortragenden Mäuse. Entsprechend zeigte sich in der CD40L-DC-behandelten Gruppe eine signifikante Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit ( $> 90$  Tage vs.  $20,8 \pm 3,1$  Tage in der Kontrollgruppe). In einem weiteren Experiment wurde der antitumorale Effekt einer subcutanen und systemischen Applikation von CD40L-exprimierenden DC im Vergleich zur i.t.-Applikation untersucht. Hierfür wurden s.c. Tumoren analog Kapitel 3.2.1 induziert. Sobald die Tumoren eine Tumorgöße von 100-200 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, erfolgte die DC-Behandlung durch s.c. oder i.v. Injektion. Wie in Abb. 9 dargestellt, zeigte die s.c.-Injektion von Ad-CD40L-transduzierten DC im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums von etwa 40 %. Ihr antitumoraler Effekt war jedoch signifikant kleiner als bei der i.t.-Injektionsbehandlung ( $868,1 \pm 127,4$  mm<sup>3</sup> vs.  $1332,2 \pm 253,1$  mm<sup>3</sup>,  $p=0,041$ ). Die i.v.-Injektion mit CD40L-DC zeigte dagegen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit Ad-LacZ-transduzierten DC keine Inhibition des Tumorwachstums. Verglichen mit der s.c.-Injektion zeigte die i.v.-Gabe von CD40L-DC ebenfalls keinen antitumoralen Effekt ( $531,6 \pm 111,4$  mm<sup>3</sup> in der s.c-Gruppe vs.  $1050,4 \pm 167,2$  mm<sup>3</sup> in der i.v.-Gruppe,  $p = 0,0272$ ). Weder durch die s.c.- noch i.v.-Injektion konnte eine komplette Tumorremission erreicht werden.



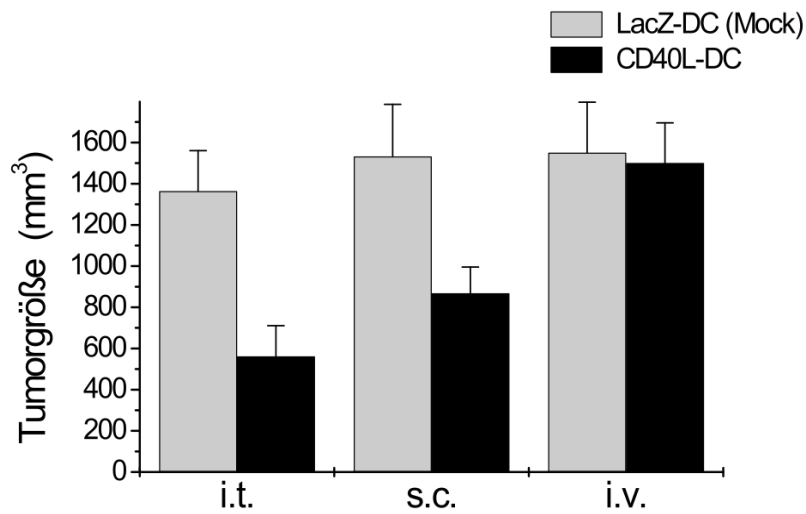


Abb. 8: Tumorgröße 2 Wochen nach i.t., s.c.- oder i.v.-Gabe von  $1 \times 10^6$  CD40L-exprimierenden DC vs. LacZ-DC. Darstellung des durchschnittlichen Tumolvolumens in  $\text{mm}^3$  (jeweils  $n = 12$ ), \*  $p < 0,05$ .

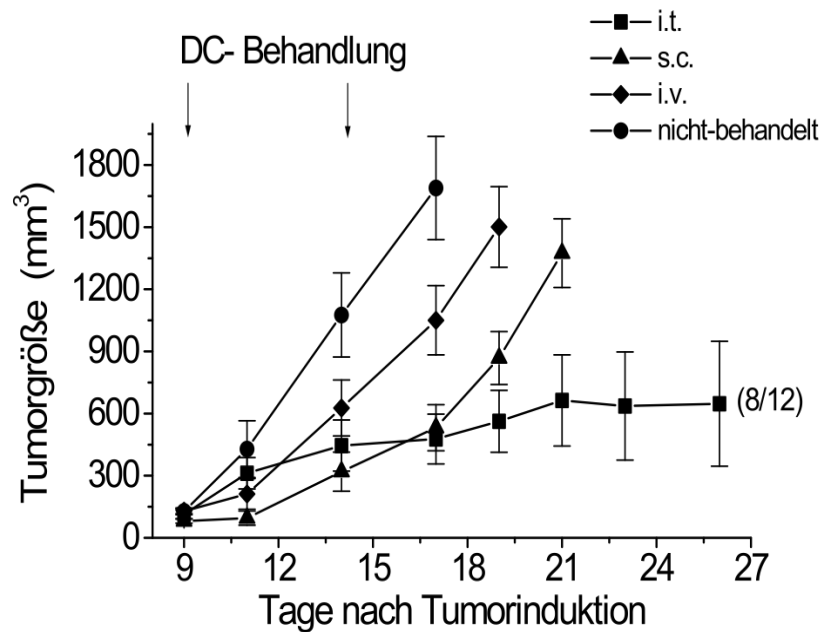


Abb. 9: Tumorstadium in C3H-Mäusen nach i.t., s.c.- oder i.v.-Gabe von  $1 \times 10^6$  CD40L-exprimierenden DC. Darstellung des durchschnittlichen Tumolvolumens in  $\text{mm}^3$  (jeweils  $n = 12$ ), \*  $p < 0,05$ .

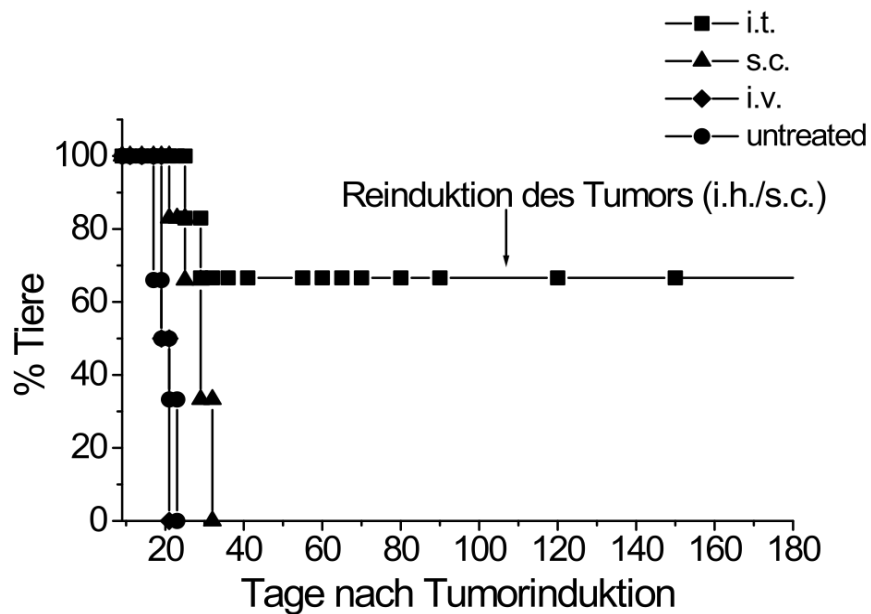


Abb. 10: Langzeitüberleben nach i.t.-, s.c.- oder i.v.-Gabe von Ad-CD40L-transduzierten DC. Drei Monate nach tumorfreiem Überleben erfolgte eine Tumorzell-Reexposition mittels s.c.-Injektion von  $1 \times 10^6$  Hepa129-Zellen oder mittels intrahepatischer Injektion von  $1 \times 10^5$  Hepa129-Zellen (Kaplan-Maier-Kurve). \*  $p < 0,05$ .

#### 4.9 Einfluss von CD40L-exprimierenden DC auf das Tumorstadium von fortgeschrittenem HCC im Mausmodell

Da im klinischen Alltag bei Patienten mit HCC häufig bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorliegt, wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob auch das Tumorstadium in einem fortgeschrittenem Tumorstadium durch die i.t.-Behandlung mit CD40L-exprimierenden DC beeinflussen lässt. Dazu wurden nur Tumore des s.c. Tumormodells, die eine Größe von 200-400 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, verwendet. Wie in Abb. 11 dargestellt zeigte die i.t. Gabe von CD40L-exprimierenden DC einen signifikanten antitumoralen Effekt trotz fortgeschrittenem Tumorstadium. Es kam zu einer Tumordinhibition bei 50 % der Mäuse im Vergleich zu Mäusen, die mit Ad-LacZ-transduzierten DC behandelt wurden oder Mäusen, die keine Therapie erhielten ( $528,9 \pm 76,2$  mm<sup>3</sup> in der CD40L-DC-Gruppe vs.  $1019,2 \pm 186,8$  mm<sup>3</sup> in der Kontrollgruppe,  $p = 0,035$  Abb. 11).

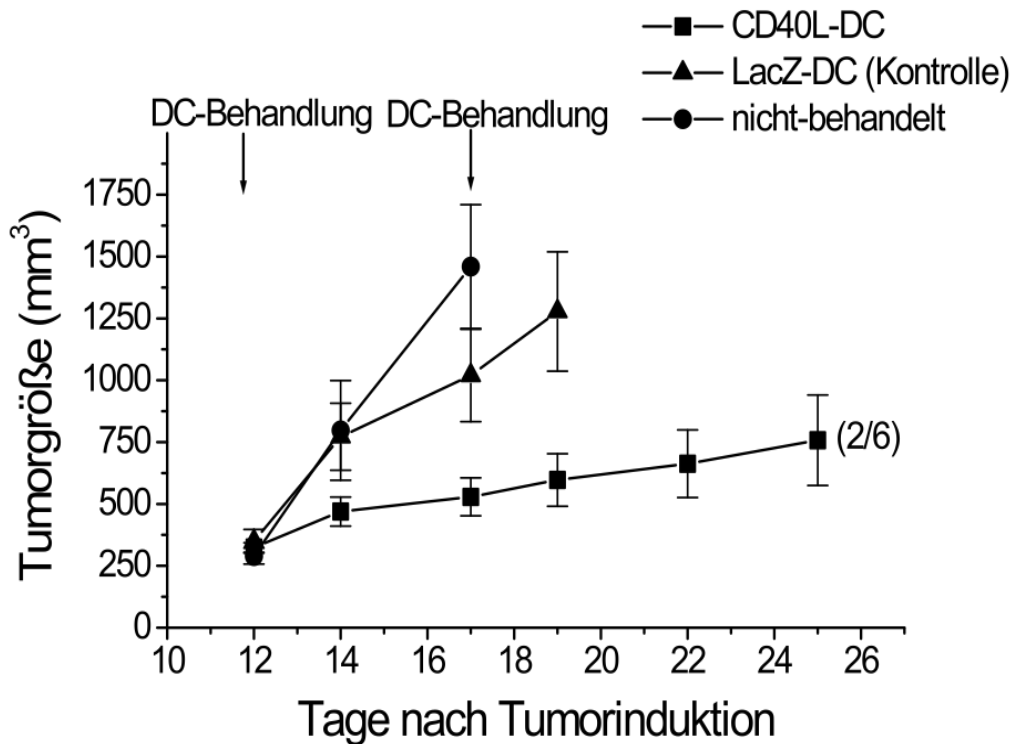


Abb. 11: Tumorwachstum nach i.t.-Gabe von  $1 \times 10^6$  CD40L- oder LacZ-exprimierenden DC. Darstellung des durchschnittlichen Tumolvolumens in mm<sup>3</sup> von Ad-CD40L-, Ad-LacZ-DC-behandelten (jeweils n = 6), sowie von Kontroll-Mäusen (n = 3), \* p < 0,05.

Darüber hinaus kam es bei > 30 % der Mäuse zu einer kompletten Tumorregression und damit zu einer Verlängerung der Überlebensrate (Abb. 12).

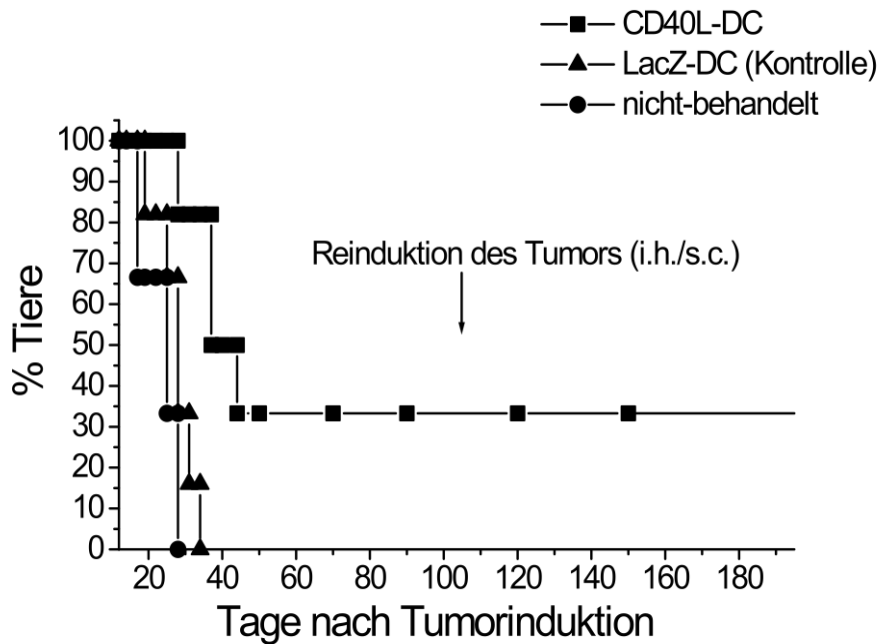


Abb. 12: Langzeitüberleben nach i.t.-Gabe von Ad-CD40L-transduzierten DC. Drei Monate nach tumorfreiem Überleben erfolgte eine Tumorzell-Reexposition mittels s.c.-Injektion von  $1 \times 10^6$  Hepa129-Zellen oder mittels intrahepatischer Injektion von  $1 \times 10^5$  Hepa129-Zellen (Kaplan-Maier-Kurve). \*  $p < 0,05$ .

#### 4.10 Tumorzellreexposition

Um zu überprüfen, ob es zu einer dauerhaften Immunität nach kompletter Tumorregression gegenüber dem HCC kommt, wurden C3H-Mäuse verwendet, bei denen es nach einer Behandlung mit AdCD40L-DC zu einer kompletten Tumorregression gekommen war und die während 3 Monaten kein Tumorrezidiv erlitten hatten. Ihnen wurde eine erneute Injektion von  $1 \times 10^6$  Hepa129-Zellen s.c., analog Kapitel 3.2.3, verabreicht. Die Tiere wurden auf die Entstehung neuer Tumoren untersucht. Es zeigte sich im Verlauf jedoch kein erneutes Tumorwachstum. Die Mäuse der Kontrollgruppe zeigten hingegen innerhalb von 10 Tagen einen Tumor.

#### 4.11 Veränderung des IL-12-Spiegels im Serum nach i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wie sich der IL-12-Spiegel nach i.t. DC-Injektion verändert. Hierzu wurde den Mäusen analog 3.2.3 CD40L exprimierende DC

verabreicht. 5 Tage nach der zweiten i.t. DC-Injektion konnte bereits eine signifikante Erhöhung des IL-12-Spiegel auf 200 – 400 pg/ml im Serum festgestellt werden. Bei der Kontrollgruppe (Ad-LacZ) wurde nur eine leichte Erhöhung < 60 pg/ml des IL-12-Spiegels im Serum festgestellt.

#### 4.12 Analyse der immunologischen Zellpopulationen in Lymphozyten und Tumoren nach i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC

Um die zellulär induzierte Immunantwort näher zu charakterisieren, wurden die mit CD40L behandelten Tumoren, sowie die peripheren Lymphorgane (Lymphknoten und Milz) explantiert und durchflusszytometrisch untersucht. Für dieses Experiment wurden Mäuse mit dem oben beschriebenen etablierten, s.c. hepatozellulären Tumormodell mit Ad-CD40L-transduzierten DC i.t. behandelt. In der Kontrollgruppe wurden Ad-LacZ-transduzierte DC eingesetzt. Am 5. Tag nach der zweiten Behandlung wurde die Verteilung von CD4(+)-, CD8(+)-T-Zellen in den ipsilateralen Lymphknoten untersucht. In der Durchflusszytometrie von diesen Lymphknoten zeigte sich, dass Mäuse, welche i.t. mit Ad-CD40L-transduzierten DC behandelt wurden, eine Zunahme der CD4(+)-T-Zell-Population sowie der CD8(+)-T-Zell-Population aufwiesen, als Mäuse der Kontrollgruppe, welche mit Ad-LacZ-transduzierten DC behandelt wurden ( $p = 0,025$  vs.  $p = 0,032$ ). Interessanterweise zeigten die CD8(+)-T-Zellen im Vergleich zu den CD4(+)-T-Zellen ein geringerer Anstieg (Abb. 13).

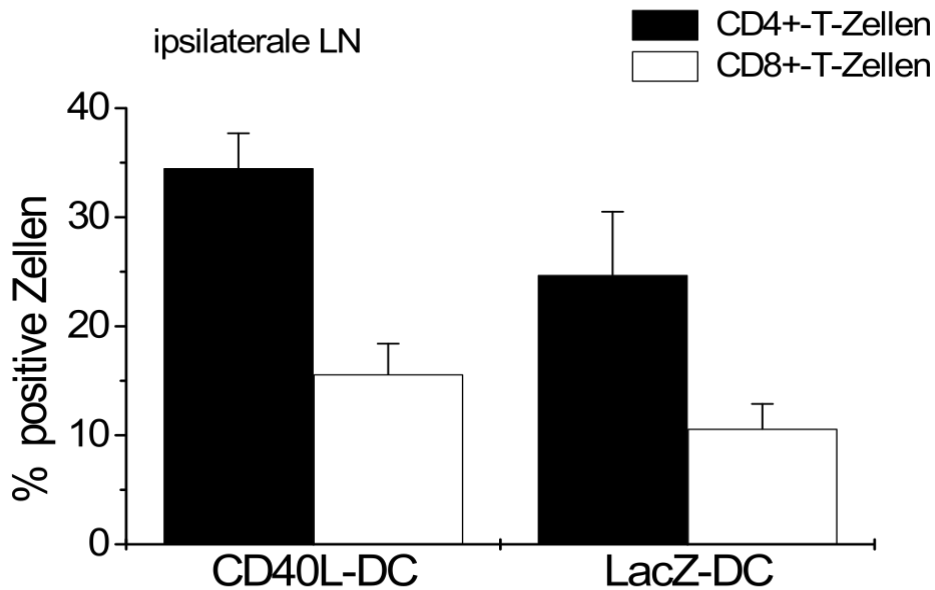


Abb. 13: Prozentuale Verteilung der CD4(+) und CD8(+)-T-Zellen 5 Tage nach i.t.-Behandlung mit Ad-CD40L- und AdLacZ-transduzierten DC in den ipsilateralen Lymphknoten gemessen mittels Durchflusszytometrie. \*  $p < 0,05$ .

Im weiteren wurde bei den Mäusen, die wie oben beschrieben, behandelt wurden und eine signifikante Tumorreduktion aufwiesen, kleine Proben des Tumors entnommen und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Verglichen mit den Resultaten in den ipsilateralen Lymphknoten fand sich auch hier eine signifikant höhere Anzahl von CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen/mm<sup>3</sup> im Gegensatz zur Kontrollgruppe ( $p = 0,041$  und  $p = 0,033$ ) (Abb. 14.). Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der NK-Zellen in den Tumoren, welche mit Ad-CD40L-transduzierten DC behandelt wurden ( $p = 0,021$ ) (Abb. 14).

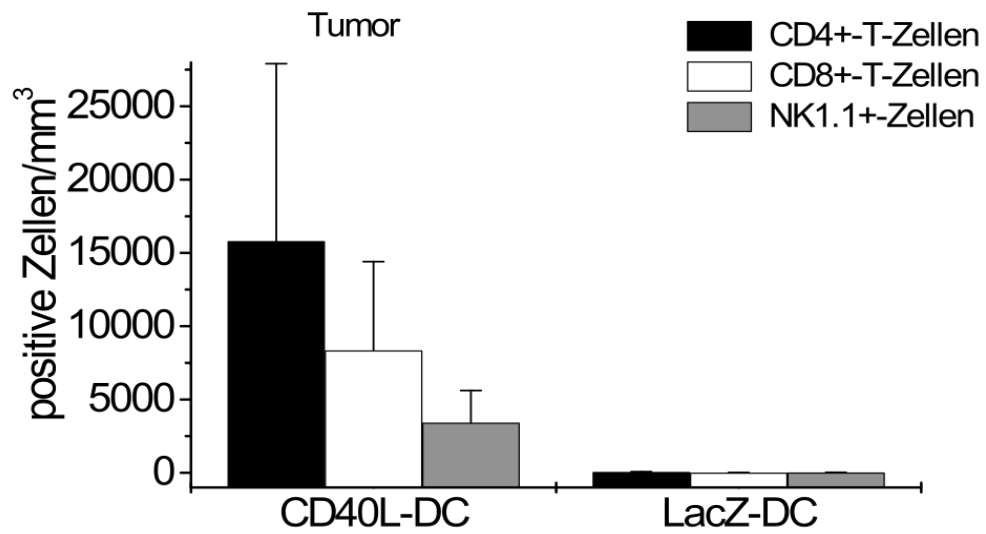


Abb. 14: Anzahl der CD4(+)- und CD8(+)-T- und NK-Zellen 5 Tage nach i.t.-Behandlung mit Ad- CD40L- und AdLacZ-transduzierten DC im Tumor (gemessen in Zellen/mm<sup>3</sup> mittels Durchflusszytometrie). \*  $p < 0,05$ .

## 5. Diskussion

Das HCC gehört mit zu den häufigsten Karzinomen bei Männern und bei Frauen weltweit, mit steigender Inzidenz (Bosch et al., 2004). Die Prognose des HCC ist weiterhin sehr schlecht. Es sterben jährlich ca. 1 Million Menschen an den Folgen dieser Tumorerkrankung (Colombo et al., 1992). Bei Therapiebeginn im Frühstadium ergibt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 70 %, im fortgeschrittenem Stadium eine 3-Jahres-Überlebensrate von bis zu 40 % und im Endstadium nur noch eine 1-Jahres-Überlebensrate von 10 % (Bruix et al., 2005). Die therapeutischen Möglichkeiten des HCC sind allerdings immer noch als stark eingeschränkt einzuschätzen. Zu den kurativen Therapien zählen derzeit die chirurgische Tumoresektion oder die Lebertransplantation. Da das HCC lange Zeit asymptomatisch bleibt und oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, ist die kurative Therapie zurzeit nur bei weniger als 20 % der Patienten mit HCC möglich. Systemische Chemotherapien zeigen keine Wirkung in der Therapie des HCC und haben daher derzeit keinen Stellenwert für die Behandlung der Erkrankung (Trojan et al., 2007). In letzter Zeit konnte eine Verbesserung der Überlebensrate durch den angiostatisch wirksamen Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib erzielt werden (Llovet et al., 2008). Weiterhin bleibt die Forschung für die Verbesserung der Therapie des HCC eine große Herausforderung, da es nach wie vor dringenden Bedarf für neue effektivere Therapien des HCC gibt.

Als vielversprechender Ansatz scheint eine Immuntherapie gegen sogenannte Tumorassoziierte Antigene (TAA) zu sein. Erste Erfolge dieses Ansatzes zeigten Forschungsarbeiten, die sich mit der experimentellen Therapie des Melanoms beschäftigen. DC sind professionelle APC, die für die Induktion und Stimulation der antigenspezifischen T-Zellen verantwortlich sind und somit zu den potentesten Induktoren der T-Zell-Aktivierung gehören (Banchereau et al., 1998). Daher haben DC bislang eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von Tumorstoffen sowie in den meisten immunologischen Therapieansätzen gegen Malignome (und auch beim HCC). In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass DC, die mit dem HCC-assoziiertem Antigen Alpha-Fetoprotein (AFP) kodierenden Adenoviren zur Antigenbeladung transduziert wurden, spezifische Effektorzellen gegenüber AFP-exprimierenden HCC-Zellen *in vitro* stimulieren können (Gonzalez-Carmona et al., 2006). Viele klinische Studien, in denen TAA-gepulste DC als Vakzine gegen das HCC verwendet



wurden, brachten jedoch bisher nur begrenzten Erfolg (Butterfield et al., 2006; Chi et al., 2005; Lee et al., 2001, 2005).

Eine Möglichkeit das immunstimulatorische Potential von DC zu verstärken, ist die Verwendung potenter Zytokine oder kostimulatorischer Moleküle wie CD40Ligand(L). Des Weiteren haben sich Th1-polarisierte Zytokine wie IL-12 als wichtige Immunmodulatoren bei der HCC-Therapie in präklinischen Studien erwiesen. Die Verwendung von IL-12 konnte im Zusammenhang mit Tumorantigen-beladenen DC die Immunantwort gegen HCC zusätzlich verstärken (Harada et al., 2004). CD40L ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül, das für die Initiation der T-Zell vermittelten Immunantwort verantwortlich ist. Die Interaktion von CD40L und dem Rezeptor CD40, welcher u.a. auf DC exprimiert wird, kann die Produktion inflammatorischer Zytokine bei den DC, wie z.B. IL-12, stimulieren. In bereits publizierten Studien zeigte sich sogar eine antitumorale Wirkung von CD40L beim HCC und anderen Malignomen (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996; Schoeneberger, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob CD40L die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort durch TAA-beladene DC am HCC-Tumormodell in der Maus verstärken lässt. Es wurde zunächst die Wirkung der Transduktion mit CD40L kodierenden Adenoviren auf TAA-gepulsten DC in vitro untersucht. Es wurde dann untersucht, ob mit Hilfe von diesen AdCD40L-transduzierten und mit Tumorlysat beladenen DC in einem s.c. HCC-Tumormaus-Modell eine Tumorregression erzeugt werden kann. Weiterhin wurden TAA-beladene DC, die mit CD40L-kodierenden Adenoviren transduziert wurden, i.t., s.c. oder i.v. appliziert um die Relevanz des Applikationsweges der DC näher zu beleuchten. Zum Abschluss wurde die induzierte Immunantwort anhand der Zusammensetzung immunologischer Zellpopulationen im Tumor und den peripheren Lymphknoten analysiert.

Bislang zeigte sich bei Patienten, welche in klinischen Studien mit TAA-gepulsten DC als Vakzine behandelt wurden, nur ein limitierter antitumoraler Effekt. Während der Tumorentwicklung kommt es zu einer Immunresistenz (Immunoediting). Dabei bewirkt der Tumor eine Minderung der DC-Effektivität. In früheren Studien wurde beispielsweise gezeigt, dass DC von Patienten oder Mäusen die an einem HCC erkrankt sind, eine signifikant reduzierte Immunstimulation von einigen DC und aktivierten T-Zellen mit Verminderung der IL-12 Sekretion und der Expression ko-stimulatorischer Moleküle, wie CD40L, aufweisen (Ormandy et al., 2006; Tatsumi et al., 2007). In der hier vorgestellten

Arbeit konnte es nur durch die Transduktion mit CD40L-kodierenden Adenoviren (AdCD40L) eine verstärkte Aktivierung und Ausreifung der DC mit erhöhter Expression von ko-stimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86, sowie eine deutliche Sekretion von IL-12 (Cella et al., 1996) in Tumorzell-gepulsten DC erzielt werden. Dagegen konnte bei den AdLacZ-transduzierten DC oder nicht-transduzierten DC keine IL-12 Expression im Überstand nachgewiesen werden. Interessanterweise kam es nach Transduktion der DC mit Ad-CD40L zu einer Ausbildung von Zellaggregaten durch Interaktion zwischen den benachbarten DC, welche am ehesten einer Interaktion von CD40/CD40L zwischen den DC entspricht. Darüber hinaus zeigte sich, wie erwartet, dass die Produktion von IL-12 nach Gabe von anti-CD40L-Antikörper stark gesenkt werden konnte. Dieses Experiment deutet daraufhin, dass die IL-12 Sekretion abhängig von der CD40L-Interaktion verläuft.

Bisher publizierte in vivo Studien haben eine antitumorale Wirksamkeit von DC-basierten Immuntherapien gegen das HCC erzielt, zeigten jedoch nur unzureichende Ergebnisse im Sinne einer kompletten Tumorremission von bereits etablierten HCC (Homma et al., 2001; Tatsumi et al., 2001; Vollmer et al., 1999). In unseren in vivo Experimenten konnte dagegen ein deutlicher, starker antitumoraler Effekt durch die i.t.-Applikation CD40L-exprimierender DC, im etablierten HCC gezeigt werden. Es konnten Volumenvermindierungen der Tumoren von bis zu 60 % erreicht werden. Im Gegensatz zu den meisten publizierten in vivo Studien mit DC konnte der Ansatz mit CD40L-DC bei ca. 70 % der Mäuse eine komplette Tumorregression erzielen.

DC-basierte Immuntherapien am Menschen zeigten, wie bereits erwähnt im Vergleich zu Tierexperimenten allgemein schlechtere Resultate (Chi et al., 2005; Lee et al., 2005). Zum Teil ist dies darauf zurückzuführen, dass die DC-Vakzine bei Patienten mit HCC in einem fortgeschrittenen Stadium appliziert wurden. Immunologische Ansätze an Tieren sind jedoch oft präventiv oder werden in einem sehr frühen Tumorstadium durchgeführt. In dieser Arbeit zeigte die i.t.-Injektion mit Ad-CD40L-DC auch einen starken antitumoralen Effekt bei fortgeschrittenen subcutanen HCC (von 200 - 400 mm<sup>3</sup>). Nach der i.t.-Injektion kam es bei 50 % der Mäuse zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums und bei immerhin 30 % zu einer kompletten Tumorregression. CD40L allein scheint in verschiedenen Studien eine intrinsische, antitumorale Wirkung zu haben. Beispielsweise zeigte die Injektion von adenoviralen Vektoren, welche für CD40L kodieren, einen hohen antitumoralen Effekt gegenüber verschiedenen Tumorentitäten der Maus, wie z.B. dem HCC (Schmitz et al., 2001). In dieser Arbeit wurde der Effekt von adenoviralen Vektoren

kodierend für CD40L im Vergleich zu CD40L-exprimierenden DC erforscht. In unserer Studie war die alleinige i.t.-Injektion von Ad-CD40L weniger effektiv, als die i.t.-Injektion von AdCD40L-transduzierenden DC. Bei dem Ansatz mit DC zeigte sich, dass durch die adenovirale Transduktion mit immunmodulatorischen Molekülen, wie z.B. CD40L, DC direkt stimuliert werden können. Bei der Applikation von adenoviralen Vektoren allein sind meist keine DC betroffen. Bei der ex vivo Transduktion von DC mit AdCD40L werden gezielt die DC mit den gewünschten Transgenen erreicht. DC dienen einerseits als zellulärer Vektor für CD40L. Gleichzeitig kann sich durch die immunmodulatorischen Wirkung von CD40L stark stimulieren und ihre Effizienz verbessern. Diese beiden Eigenschaften scheinen zum Teil verantwortlich für die starken antitumoralen Effekte von CD40L-transduzierten DC im Vergleich zu Ad-CD40L allein oder untransduzierten bzw. AdLacZ-transduzierten DC zu sein. Des Weiteren konnte in vor kürze publizierten Studien belegt werden, dass adenovirale Vektoren selber aktiv DC stimulieren können und dadurch ihre immunologische Funktion verstärken. Ein Mechanismus hierfür scheint die Aktivierung des Toll-like Rezeptor 9 (TLR-9) zu sein (Basner- Tschakarjan et al., 2006).

Ein weiterer, wichtiger Faktor für den Erfolg einer DC-basierten Immuntherapie scheint der Injektionsweg der DC zu sein. In klinischen Studien ist eine i.t.-Applikation von DC oft sehr schwer zu realisieren. Andere Verabreichungsformen wie z.B. die s.c.- oder i.v.-Applikation sind leichter anzuwenden und sind daher vorrangig von Interesse. Aus diesem Grund wurden s.c.- und i.v.-Applikationen von DC in unseren Experimenten berücksichtigt und auf deren antitumorale Wirksamkeit untersucht. Es zeigte sich, dass es auch nach der s.c.-Injektion von CD40L-exprimierenden DC beim manifesten, s.c. HCC in unserem Mausmodell zu einer signifikanten Verminderung des Tumorwachstums kommt. Interessanterweise ergab diese Art der Applikation im Vergleich zur i.v.-Injektion bessere Ergebnisse. Allerdings kam es im Gegensatz zur i.t.-Applikation sowohl bei der i.v.- als auch bei der s.c.-Injektion bei allen Tieren im Verlauf zu einem Progress. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, beispielsweise Schmidt und Kollegen (2003), die verschiedene Applikationswege von DC gegen das Pankreaskarzinom erforschten, zeigt die i.t.-Injektion von DC den stärksten antitumoralen Effekt. I.t.-applizierte CD40L-DC war die einzige Form der Injektion, bei der es zu einer vollständigen Tumorremission kam.

Tumoren wie das HCC können sich durch zahlreiche immunsuppressive Mechanismen der Immunantwort entziehen. Im Tumor ist eine starke Immunsuppression zu verzeichnen. Dieses immunsuppressive Tumormillieu mit verminderter Expression von MHC-Molekülen

und zunehmender Sekretion von immunsuppressiven Molekülen bewirkt eine Suppression von DC und Effektorzellen. Daher kann die i.t.-Applikation von CD40L-exprimierenden DC zunächst eine direkte Wirkung gegen das Tumormilieu induzieren gegenüber der s.c.- und der i.v.-Applikation.

I.t.-applizierte AdCD40L-transduzierte DC besitzen eine starke Expression von CD40L und erhöhten den Spiegel des IL-12 im Tumor. Zusätzlich exprimieren die i.t. gespritzten DC vermehrt ko-stimulatorische Moleküle an deren Oberfläche sowie MHC-Molekülen, ohne dabei eine systemische Toxizität zu bewirken. Diese Veränderungen können signifikant zu einer Änderung des immunsuppressiven Tumormilieus beitragen. Dadurch kann die Immunresistenz des HCC vermindert und die Immuntoleranz durchbrochen werden.

Weiterhin bewirkten i.t.-applizierte AdCD40L-transduzierte DC die Rekrutierung von CD4(+)-T-, CD8(+)-T- und NK-Zellen in den Tumoren, was mittels Durchflusszytometrie gezeigt wurde, und somit eine Verbesserung des Eindringens von Effektorzellen ins Tumorgewebe.

Ausblick: Da die i.t.-Verabreichung von CD40L-exprimierenden DC am s.c. Tumormodell vielversprechende Resultate zeigte, soll nun in weiteren Studien untersucht werden, ob sich mit diesem Ansatz ein antitumoraler Effekt im orthotopen HCC-Modell der Maus erzielen lässt. Dabei soll die Rolle der Leber bei der induzierten Immunantwort besser untersucht werden, um somit die Therapie des HCC zu optimieren. Des Weiteren soll untersucht werden ob eine Kombination von AdCD40L-transduzierte DC mit Interleukin-transduzierten DC (z.B. IL-2 oder GM-CSF) einer Verbesserung der Wirksamkeit der DC-basierten Therapie, vor allem am HCC im fortgeschrittenen Stadium zeigt.

## 6. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Meist entsteht diese Erkrankung auf dem Boden einer Leberzirrhose, die durch chronische Virusinfektionen, wie Hepatitis B oder C, Alkoholabusus oder verschiedene Stoffwechselerkrankungen verursacht wird. Trotz vermehrter Forschung und Fortschritten in der Diagnostik sowie der Therapie des HCC, ist die Prognose des HCC nach wie vor sehr schlecht. Dieses kommt dadurch zustande, dass kurative Ansätze in der Therapie des HCC nur in einem frühen Stadium möglich sind. Die Therapieformen, die zurzeit zur Verfügung stehen, sind die lokale Ablation, Tumorresektion oder Lebertransplantation. Da die Mehrzahl der Patienten jedoch bereits im fortgeschrittenen Stadium erstdiagnostiziert wird, kommen diese kurativen Behandlungsmethoden oft nicht mehr in Betracht. Für die meisten Patienten bleiben zurzeit nur palliative Behandlungsmethoden wie z.B. die transarterielle Chemotherapie. Des Weiteren wurde vor kurzem der Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib für das HCC zugelassen. Dieser verbessert das Gesamtüberleben der Patienten um einige Monate. Die mediane Überlebensrate betrug 10,7 vs. 7,9 Monate zugunsten von Sorafenib (Llovet et al., 2008). Allerdings kann durch Sorafenib nur eine Hemmung der Tumorprogression erreicht werden. Es führt jedoch in der Regel nicht zu einer Tumorremission, sodass beim HCC weiterhin ein dringender Bedarf von neueren und effektiveren Therapien besteht.

Dendritische Zellen (DC) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die für eine starke Induktion antigenspezifischer T-Zellen verantwortlich sind. Sie können spezifische T-Zellen gegen Tumorantigene stimulieren und zeigten in unterschiedlichen Tumor-entitäten in präklinischen Studien bereits erste Erfolge. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Beladung von DC mit AFP-kodierende adenovirale Vektoren zu einer spezifischen Immunantwort gegenüber AFP-exprimierenden HCC-Zellen führt (Gonzalez-Carmona et al., 2006). Allerdings zeigten erste klinische Versuche mit TAA-gepulsten DC als Tumorstoffe keinen klinisch-relevanten Effekt. In der hier vorgestellten Arbeit sollte daher die antitumorale Wirksamkeit von TAA-gepulsten DC durch eine Ko-stimulation mit CD40L verstärkt und optimiert werden. In unseren Versuchen konnte durch die Transduktion von Tumorzelllysaten gepulsten DC mit CD40L-kodierenden adenovirale Vektoren eine hohe CD40L Expression in DC erreicht werden, welche zu einer CD40/CD40L-Interaktion zwischen den DC führt. Dadurch kommt es zu einer Art Selbst-Immunistimulation der DC mit einer starken

Expression ko-stimulatorischer Moleküle und gesteigerter IL-12-Expression. Die i.t.-Applikation dieser aktivierten CD40L-exprimierenden DC im etablierten HCC-Modell bewirkte stärkere antitumorale Effekte als die Kontroll-DC, aber auch als die subkutane oder die i.v.-Applikation von CD40L-DC. Sie führte bei fast 70 % der tumortragenden Mäuse zu einer kompletten Tumorrogression und zeigte eine signifikante Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit. Bei der i.t.-Applikation von CD40L-DC kommt es zu einer signifikanten Änderung des lokalen immunsuppressiven Tumormilieus mit starker Expression ko-stimulatorischer Moleküle und gesteigerter IL-12-Expression, welche eine erhöhte Rekrutierung von CD4(+)-T-Zellen und CD8(+)-T-Zellen, sowie NK-Zellen begleitet. Diese ausgeprägte Veränderung des Tumormilieus wird als möglicher Mechanismus für den starken beobachteten antitumoralen Effekt diskutiert. Dadurch kann die Immunresistenz des HCC vermindert und die Immuntoleranz durchbrochen werden. In weiteren Studien soll die durch CD40L-exprimierende DC-induzierte Immunantwort am orthotopen HCC Tumormodell untersucht werden. Hierbei werden HCC nach Laparotomie direkt in die Leber implantiert. Bei den Experimenten wird die Rolle der Leber bei der induzierten Immunantwort aufgeklärt, um die Therapie des HCC weiter zu optimieren.

## 7. Literaturverzeichnis

Allgaier HP, Galandi D, Zuber I, Blum HE. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001; 19: 301-310

Allgaier HP, Galandi D, Olschewski M, Blum HE. Randomisierte kontrollierte Studie: Radiofrequenz-Thermoablation von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome. *Deutsches Ärzteblatt* 2003; 100: 2666-2667

Ardavin C, Amigorena S, Reis, Sousa C. Immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity* 2004; 20: 17-23

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 39: 245-252

Basner-Tschakarjan E, Gaffal E, O'Keeffe M, Tormo D, Limmer A, Wagner H, Hochrein H, Tüting T. Adenovirus efficiently transduces plasmacytoid dendritic cells resulting in TLR9 - dependent maturation and IFN-alpha production. *J Gene Med* 2006; 8: 1300-1306

Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 2000; 164: 3902-3912

Becker G, Allgaier HP, Olschewski M, Zähringer A, Blum HE; HECTOR Study Group. Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study. *Hepatology* 2007; 45: 9-15

Bei R, Budillon A, Reale MG, Capuano G, Pomponi D, Budillon G, Frati L, Muraro R. Cryptic epitopes on alpha-fetoprotein induce spontaneous immune responses in hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, and chronic hepatitis patients. *Cancer Res* 1999; 59: 5471-5474

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275: 1320-1323

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

Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 7; 16: 3603-3615

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: 5-16

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

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

Breuhahn, K., Baeuerle PA, Peters M, Prang N, Töx U, Köhne-Volland R, Dries V, Schirmacher P, Leo E., Expression of epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2006; 34: 50-56

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

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

Brunello F, Veltri A, Carucci P, Pagano E, Ciccone G, Moretto P, Sacchetto P, Gandini G, Rizzetto M. Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 727-735

Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2000;10: 185-200

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

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

Butterfield LH. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. *Swiss Med Wkly.* 2007; 10; 137: 83-90

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; 1; 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; 1; 184: 747-752

Cheng A, Kang Y, Chen Z, Tsao S, Qin s, Kim J, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan ZZ.: Randomized phase III trial of sorafenib versus placebo in Asian patients with advanced hepatocellular carcinoma. Abs. 4509 Presented at ASCO Annual Meeting 2008; Chicago, IL

Chi KH, Liu SJ, Li CP, Kuo HP, Wang YS, Chao Y, Hsieh SL. Combination of conformal radiotherapy and intratumoral injection of adoptive dendritic cell immunotherapy in refractory hepatoma. *J Immunother* 2005; 28: 129-135

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

Clark EA. CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens* 1990; 36: 33-36

Clark EA, Craxton A. A CD40 bridge between innate and adaptive immunity. *Immunity* 2003; 18: 724-725

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

Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 2003; 3: 573-588

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 passim

De Jong RN, van der Vliet PC, Brenkman AB. Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; 272: 187-211

Del Gaudio, M., Ercolani G, Ravaioli M, Cescon M, Lauro A, Vivarelli M, Zanello M, Cucchetti A, Vetrone G, Tuci F, Ramacciato G, Grazi GL, Pinna AD. Liver transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma on cirrhosis after liver resection: University of Bologna experience. *Am J Transplant* 2008; 8: 1177-85

De Mitri MS, Poussin K, Baccarini P, Pontisso P, D'Errico A, Simon N, Grigioni W, Alberti A, Beaugrand M, Pisi EI. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995; 18; 345: 413-415

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

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

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-998

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

El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002; 36: 74-83

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

Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, Van Der Eb AJ. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 215-222

Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from gene to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 674-687

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

Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604

Ferjoux, G., Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 2000; 94: 205-210

Flutter B, Gao B. MHC class I antigen presentation--recently trimmed and well presented. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 22-30

Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 245-273

García-Lora A, Algarra I, Collado A, Garrido F. Tumour immunology, vaccination and escape strategies. *Eur J Immunogenet* 2003; 30: 177-183

Ganne-Carrie N, Trinchet JC. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 275-281

Ghosh-Choudhury G, Haj-Ahmad Y, Brinkley P, Rudy J, Graham FL. Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene* 1986; 50: 161-171

Giampapa VC, Oh C, Aufses AH Jr. The vascular effect of cold injury. *Cryobiology* 1981; 18: 49-54

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

Gonzalez-Carmona MA, Blum HE, Kalff JC. Lebertumoren, Innere Medizin, Therapie-Handbuch. München: Urban& Fischer 2011

Grenn M, Daesch Ge. Biochemical studies on adenovirus multiplication. II. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. *Virology* 1961; 13: 169-176

Guan YS, Liu Y. Interventional treatments for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 495-500

Gunzer M, Janich S, Varga G, Grabbe S. Dendritic cells and tumor immunity. *Semin Immunol* 2001; 13: 291-302

Gunzer M, Grabbe S. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Crit Rev Immunol* 2001; 21: 133-145

Harada N, Shimada M, Okano S, Suehiro T, Soejima Y, Tomita Y, Maehara Y. IL-12 gene therapy is an effective therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. *J Immunol* 2004; 1; 173: 6635-6644

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; 1; 96: 1857-1864

Horwitz MS. Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, ed. 4. Philadelphia: Lippincott–Raven, 1996: 2149-2171

Houben KW, McCall JL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in patients without underlying liver disease: a systematic review. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: 91-95

Huang S, Endo RI, Nemerow GR. Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J Virol* 1995; 69: 2257-2263

Homma S, Toda G, Gong J, Kufe D, Ohno T. Preventive antitumor activity against hepatocellular carcinoma (HCC) induced by immunization with fusions of dendritic cells and HCC cells in mice. *J Gastroenterol* 2001; 36: 764-771

Homma S, Komita H, Sagawa Y, Ohno T, Toda G. Antitumour activity mediated by CD4+ cytotoxic T lymphocytes against MHC class II-negative mouse hepatocellular carcinoma induced by dendritic cell vaccine and interleukin-12. *Immunology* 2005; 115: 451-461

Huebner R, Rowe W, Schatten W, Smith R, Thomas L. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 1956; 9: 1211-1218

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

Jackson PE, Groopman JD. Aflatoxin and liver cancer. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1999; 13: 545-555

Jang JW, Choi JY, B SH, Yoon SK, Chang UI, Kim CW, Cho SH, Han JY, Lee YS. A randomized controlled study of preemptive lamivudine in patients receiving transarterial chemo-lipiodolization. *Hepatology* 2006; 43: 233-240

Jepsen P, Vilstrup H, Tarone RE, Friis S, Sørensen HT. Incidence rates of hepatocellular carcinoma in the U.S. and Denmark: recent trends. *Int J Cancer* 2007; 121: 1624-1626

Jüngst C, Cheng B, Gehrke R, Schmitz V, Nischalke HD, Ramakers J, Schramel P, Schirmacher P, Sauerbruch T, Caselmann WH. Oxidative damage is increased in human liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004; 39: 1663-1672

Kikuchi T, Worgall S, Singh R, Moore MA, Crystal RG. Dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with antigen can initiate antigen-specific humoral immunity independent of CD4+ T cells. *Nat Med* 2000; 6: 1154-1159

Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptorligand pair. *Adv Immunol* 1996; 61: 1-77

Kountouras J, Lygidakis NJ. New epidemiological data on liver oncogenesis. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 855-861

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

Kubicka S, Manns MP. Leberzellkarzinom. Richtiges Vorgehen bei Diagnose und Therapie. *Best Practice Onkologie* 2008; 5: 6-19

Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000; 287: 92-97

Lee WC, Wang HC, Jeng LB, Chiang YJ, Lia CR, Huang PF, et al. Effective treatment of small murine hepatocellular carcinoma by dendritic cells. *Hepatology* 2001; 34: 896-905

Lehnert T, Otto G, Herfarth C. Therapeutic modalities and prognostic factors for primary and secondary liver tumors. *World J Surg* 1995; 19: 252-263

Leung TW, Lau WY, Ho SK, Ward SC, Chow JH, Chan MS, Metreweli C, Johnson PJ, Li AK. Radiation pneumonitis after selective internal radiation treatment with intra-arterial <sup>90</sup>yttrium-microspheres for inoperable hepatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33: 919-924

Leung WT, Lau WY, Ho S, Chan M, Leung N, Lin J, Ho KC, Metreweli C, Johnson PJ, Li AK. Selective internal radiation therapy with intra-arterial iodine-131-Lipiodol in inoperable hepatocellular carcinoma. *J Nucl Med* 1994; 35: 1313-1318

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: 62-71

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; 24; 359: 378-90

Loose D, Van de Wiele C. The immune system and cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 369-376

Loskog A, Tötterman TH. CD40L - a multipotent molecule for tumor therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007; 7: 23-28

Lotz JP, Grange JD, Hannoun L, Boudghene F, Amiot X, Lamarque D, Andre T, Estes A, Bellaiche A, Bouleuc C. 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

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 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

Märten A, Schöttker B, Ziske C, Weineck S, Buttgereit P, Huhn D, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with CA 19-9 protein. *J Immunother* 2000; 23: 464-472

Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1981-1991

Mazzolini G, Alfaro C, Sangro B, Feijoó 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

Mazzaferro V, Regalia E, Montalto F, Pulvirenti A, Brunetto MR, Bonino F, Lerut J, Gennari L. Risk of HBV reinfection after liver transplantation in HBsAg - positive cirrhosis. Primary hepatocellular carcinoma is not a predictor for HBV recurrence. The European Cooperative Study Group on Liver Cancer and Transplantation. *Liver* 1996; 16: 117-122

Morgan TR, Mandayam S, Mazen Jamal M. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 87-96

Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 10; 24(35): 5601-5608

Nalpas B, Driss F, Pol S, Hamelin B, Housset C, Brechot C, Berthelot P. Association between HCV and HBV infection in hepatocellular carcinoma and alcoholic liver disease. *J Hepatol* 1991; 12: 70-74

Nagahama H, Okada S, Okusaka T, Ishii H, Ikeda M, Nakasuka H, Yoshimori M. Jpn J Predictive factors for tumor response to systemic chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Oncol* 1997; 27: 321-324

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

Nicklin SA, Baker AH. Tropism-modified adenoviral and adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Curr gene ther* 2002; 2: 273-2293

Nikfarjam M, Christophi C. Interstitial laser thermotherapy for liver tumours. *Br J Surg* 2003; 90: 1033-1047

Nowak AK, Chow PKH, Findlay M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1474–1484

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

Omata M, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S. Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous tumor ablation methods: Ethanol injection therapy and radiofrequency ablation. *Gastroenterology* 2004; 127: 159-166

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; 28; 12: 3275-3282

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

Philipson L. Structure and assembly of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1984; 109: 1-52

Poon RT, Fan ST. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: patient selection and postoperative outcome. *Liver Transpl* 2004; 10: 39-45

Poon RT, Fan ST, Tsang FH, Wong J. Locoregional therapies for hepatocellular carcinoma: a critical review from the surgeon's perspective. *Ann Surg* 2002; 235: 466-486

Raoul JL, Guyader D, Bretagne JF, Duvauferrier R, Bourguet P, Bekhechi D, Deugnier YM, Gosselin M. Randomized controlled trial for hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis: intra-arterial iodine-131-iodized oil versus medical support. *J Nucl Med* 1994; 35: 1782-1787

Raut CP, Izzo F, Marra P, Ellis LM, Vauthey JN, Cremona F, Vallone P, Mastro A, Fornage BD, Curley SA. Significant long-term survival after radiofrequency ablation of unresectable hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 579-580

Reid T, Warren R, Kirn D. Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 979-986

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

Robinson JH, Delvig AA. Diversity in MHC class II antigen presentation. *Immunology* 2002; 105: 252-262

Rougier P, Mitry E, Barbare JC, Taieb J. Hepatocellular Carcinoma (HCC): An Update. *Semin Oncol* 2007; 34: 12-20

Rowe W, Huebner, R, Gilmore L, Parrott R, Ward T. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84: 570-573

Rubinsky B, Lee CY, Bastacky J, Onik G. The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery. *Cryobiology* 1990; 27:85-97

Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *Journal of General Virology* 2009; 1: 1-20

Rux JJ, Kuser PR, Burnett RM. Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. *J Virol* 2003; 77: 9553-9566

Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olagüe C, Sola J, Sádaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1389-1397

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; 15; 63: 8962-8967

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

Schnurr M, Galambos, Scholz C, Dauer M, Krug A, Hartmann G, Eigler A, Endres S. Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Dtsch Arztebl* 2002; 37: 2408

Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 7-14

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Ofringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 4; 393: 480-483

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985 1;161: 526-546

Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1183-1187

Schwartz M. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 268-276

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

Shenk T. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, ed. 4. Philadelphia: Lippincott–Raven, 1996: 2111-2148

Shouval D, Okuda K, Tabor E. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma - Liver cancer. New York: Churchill Livingstone, 1997: 471-480

Song TJ, Ip EW, Fong Y. Hepatocellular carcinoma: current surgical management. *Gastroenterology* 2004; 127: 248-260

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

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

Stewart PL. Adenovirus structure. In Adenoviral vectors for Gene Therapy. Academic Press San Diego 2002; 1-8

Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007; 117: 1137-1146

Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Miyagi T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7563-7567

Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Miyagi T, Jinushi M, Sakamori R, Kohga K, Uemura A, Ohkawa K, Storkus WJ, Hayashi N. Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity. *Gene Ther* 2007; 14: 863-871

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

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

Turner PC, Sylla A, Diallo MS, Castegnaro JJ, Hall AJ, Wild CP. The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: A basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 441-448

Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol* 2005; 86: 1581-1588

Vogl TJ, Eichler K, Zangos S, Mack M, Hammerstingl R. Hepatocellular carcinoma: Role of imaging diagnostics in detection, intervention and follow-up. *Rofo* 2002; 174: 1358-1368

Wan Y, Bramson J, Carter R, Graham F, Gauldie J. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Hum Gene Ther* 1997; 20; 8: 1355-1363

Worns MA, Schuchmann M, Kanzler S, Weinmann A, Galle PR, Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterologie* 2007; 2: 12-19

Zeier M, Hartschuh W, Wiesel M, Lehnert T, Ritz E. Malignancy after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 1-12

Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 113-138

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; 16; 348: 203-213

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

Zhu AX. Hepatocellular carcinoma. *Cancer Invest* 2003; 21: 418-428

Zhu AX. Systemic Therapy of Advanced Hepatocellular Carcinoma: How Hopeful should We Be? *Oncologist* 2006; 11: 790-800

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ingo G. H. Schmidt-Wolf möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit bei ihm durchführen zu können.

Innerhalb dieser Doktorarbeit gab es zwei Menschen, die einen besonderen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten und diese sollen deshalb hier besonders erwähnt werden:

Zum einen danke ich Frau Dr. Gonzalez-Carmona für die Betreuung, permanente Diskussionsbereitschaft, Geduld und konstruktive Kritik an dieser Arbeit.

Zum zweiten möchte ich Frau Vogt für sämtliche Unterstützung im Labor danken, durch ihre Erfahrung konnte eine Vielzahl von Experimenten optimiert werden.