

Immunogener Tumorzelltod von Ovarialkarzinomzellen durch die gezielte Aktivierung der Virus-Sensoren RIG-I und MDA-5 – Etablierung eines Immuntherapiekonzepts im Mausmodell

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

Carola tho Pesch
aus Köln
2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Garbi

Tag der Mündlichen Prüfung: 4.11.2015

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Das Ovarialkarzinom	7
1.2	Das Immunsystem – angeborene und erworbene Abwehr.....	10
1.3	Die Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems	11
1.4	Detektion von Viren im Zytosol durch PRRs – RIG-I und MDA-5.....	12
1.5	Effektormechanismen der antiviralen Immunantwort.....	13
1.6	Tumorimmunologie des Ovarialkarzinoms	16
1.7	Ganzzellvakzine und Tumorassoziierte Antigene (TAAs).....	17
1.8	Verstärkung der Anti-Tumor-Immunantwort durch Adjuvanzien	19
1.9	Verstärkung der Anti-Tumor-Immunantwort durch Oxidation	20
1.10	Kombinierte Immuntherapie	21
1.11	Immuntherapie des Ovarialkarzinoms	22
1.12	Vorarbeiten im humanen System	23
1.13	Mausmodell - MOSEC ID8	25
1.14	Zielsetzung der Arbeit	26
2.	Material und Methoden.....	27
2.1	Material	27
2.2	Zellbiologische Methoden:.....	38
2.3	Immunfluorometrische Methoden	42
2.4	Quantifizierung der Zytokinproduktion.....	46
2.5	Molekularbiologische Methoden	49
2.6	Virologische Methoden.....	51
2.7	Maus in vivo Versuche	55
2.8	Statistische Analysen	58

3.	Ergebnisse	59
3.1	Ziel 1: Übertragung der mit humanen EOC Zellen ermittelten Parameter auf das Mausmodell	59
3.2	Ziel 2: Generierung von transgenen Tumorzelllinien	73
3.3	Ziel 3: Etablierung und funktionelle Evaluation einer Ganzzell-Tumorvakzinierung im EOC Mausmodell in vivo	77
4.	Diskussion	82
4.1	RIG-I und MDA-5 induzierte Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie Induktion von Apoptose	82
4.2	Aktivierung von Dendritischen Zellen durch apoptotische ID8-Zellen.....	82
4.3	Intraperitoneale Injektion von poly(I:C)-behandelten ID8-Zellen führt zur NK- und DC-Aktivierung	82
4.4	Oxidative Abtötung von mID8 EOC-Zellen durch Hypochlorsäurebehandlung	83
4.5	Luciferase-transgene Tumorzelllinien.....	84
4.6	Diphtherietoxinrezeptor-transgene Tumorzelllinien	84
4.7	DTRLuc-transgene Zelllinien	85
4.8	Ovalbumin-transgene Tumorzelllinien	86
4.9	Immuntherapie des Ovarialkarzinoms – Ausblick.....	88
5.	Zusammenfassung.....	89
6.	Abbildungsverzeichnis.....	90
7.	Literaturverzeichnis	91
8.	Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

3-P-RNA	5'-Triphosphat RNA
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CARD	caspase recruitment domain
CD	Cluster of Differentiation
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
ds	Doppelstrang-, doppelsträngig
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FSC	forward scatter
G(M)-CSF	Granulozyten-(Makrophagen-)Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horse radish peroxidase
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IPS-1	IFN- β promotor stimulator
IRF	Interferon regulatory factor
kB	Kilobasenpaar

MACS	magnetic cell sorting
MDA-5	melanoma differentiation associated gene 5
mDC	myeloide dendritische Zelle
MHC	major histocompatibility complex
mID8	MOSEC ID8
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle
PCR	polymerase chain reaction
pmol	Picomol
poly A	polyadenylic acid potassium salt
poly dAdT	polydeoxyadenylic-polydeoxythymidilic acid sodium salt
poly(I:C)	polyinosinic-polycytidilic acid
PRR	pattern recognition receptor
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RLR	Rig-like Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SSC	sideward scatter
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetracetat
TBK 1	TANK binding kinase 1
TE	Tris-Ethylendiamintetracetat
T _H 1	T-Helfer-Zelle Typ 1
TLR	Toll-like Rezeptor
U	Units

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Das epitheliale Ovarialkarzinom (EOC) ist die häufigste Todesursache aller weiblichen Genitalmalignome in der westlichen Welt. In Deutschland betreffen 3,5 % aller bösartigen Neubildungen der Frauen und 5,6 % aller Krebstodesfälle das Ovar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. Das Risiko, im Laufe des Lebens am Ovarialkarzinom zu erkranken beträgt 1,5 % (Kaatsch et al., 2013).

1.1.2 Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren für die Entstehung eines sporadischen Ovarialkarzinoms gehören neben dem zunehmenden Lebensalter eine frühe Menarche, eine späte Menopause, primäre Sterilität, späte Erstgravidität und fehlende Stillzeit (Landen et al., 2008). Diese Risikofaktoren stützen die Theorie, dass die mit einer ständigen Ovulation einhergehenden Reparaturprozesse mit jedem Zyklus Transformationen auslösen, die letztendlich kumulativ zu neoplastischen Veränderungen führen können (Fathalla, 1972). Passend dazu wirken Ovulationshemmer, Parität, Hysterektomie und Tubenligatur protektiv (Post et al., 2005; Riman et al., 2002).

Etwa 10% der Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt. Am häufigsten liegt dabei eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation vor (Burgess und Schmalfeldt, 2011). Aber auch im Rahmen des HNPCC oder des Li-Fraumeni-Syndroms können Ovarialkarzinome vorkommen.

1.1.3 Symptomatik und Diagnostik des Ovarialkarzinoms

Da die Erkrankung zunächst symptomfrei verläuft, wird bei den meisten Patientinnen der Tumor erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt: 59 % der erkrankten Frauen werden im Stadium T3 entdeckt, 29 % im Stadium T1 (Kaatsch et al., 2013). Bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom sind diffuse abdominelle Beschwerden, unklarer Gewichtsverlust sowie eine Zunahme des Bauchumfanges typisch.

Die Transvaginalsonographie hat in der Untersuchung einer ovariellen Raumforderung

den höchsten Stellenwert (Burges und Schmalfeldt, 2011). Bei speziellen Fragestellungen, z.B. zur differentialdiagnostischen Abklärung, können auch die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie oder die Positronen-Emissions-Tomographie hilfreich sein.

1.1.4 Stadieneinteilung

Man kann das Ovarialkarzinom sowohl nach der TNM-Klassifikation der UICC als auch nach dem der FIGO einteilen. Beide Klassifikationen orientieren sich an klinisch-präoperativen, intraoperativ makroskopischen sowie histopathologischen und zytologischen Befunden.

Die TNM Klassifikation des Ovarialkarzinoms:

TNM	FIGO	Befundbeschreibung
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	Ia	Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	Ib	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
T1c	Ic	Tumor begrenzt auf ein Ovar oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen in der Peritonealspülung oder im Aszites
T2	II	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
T2a	IIa	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tuben
T2b	IIb	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIc	Ausbreitung im Becken (IIa oder IIb) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIa	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIb	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens,

		größte Ausdehnung \geq 2cm
T3c Und/oder N1	IIIc	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung \geq 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
Nx		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		Regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

1.1.5 Tumorlokalisation und –ausbreitung

Das epitheliale Ovarialkarzinom wächst lange Zeit lokal begrenzt. Doch nach Durchbruch an die Ovaroberfläche kommt es meist zum Befall des Bauchfells (Peritoneum). Das Bauchfell kleidet die Bauchhöhle aus und sorgt für eine reibungslose Verschiebbarkeit der Organe. Beim Ovarialkarzinom liegt häufig eine diffuse, intraperitoneale Tumorausbreitung vom kleinen Becken bis zum Zwerchfell vor, sodass man von einer diffusen Peritonealkarzinose spricht (Burges und Schmalfeldt, 2011). Lymphogen erfolgt die Metastasierung entlang der Gefäße in die paraaortalen Lymphknoten und über die Parametrien in die pelvinen Lymphknoten.

1.1.6 Therapie und Rezidiv

Die Standardtherapie bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom besteht in einer radikalen Tumorresektion mit dem Ziel, alle sichtbaren Tumormassen zu entfernen (Kuhn et al., 2001). Die Prognose der Patientinnen korreliert stark mit dem Volumen des verbliebenen Tumorrests (Tingulstad et al., 2003). Nach der radikalen Tumorresektion folgt eine Platin und Taxanhaltige Chemotherapie. Der Großteil der Patientinnen spricht primär sehr gut auf diese Therapie an (Eltabbakh, 2004).

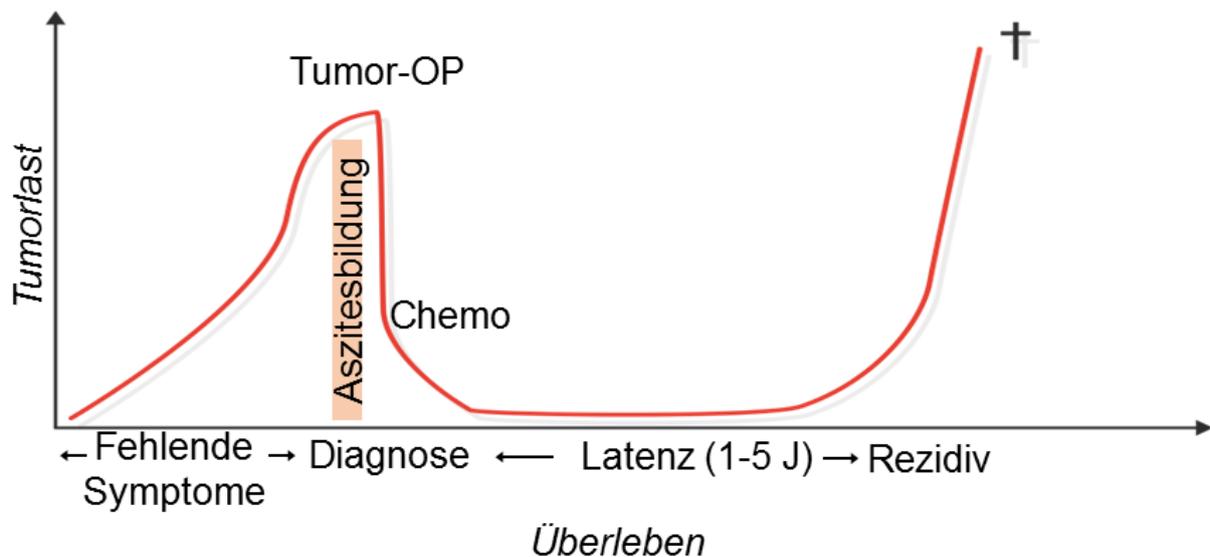


Abb. 1: Das Ovarialkarzinom – Krankheitsverlauf und Behandlung.

Dargestellt ist die Entwicklung der Tumormasse in Bezug auf den typischen Krankheitsverlauf von Ovarialkarzinompatientinnen. Die fehlende Symptomatik im Anfangsstadium der Krankheit bewirkt, dass der Tumor oft erst durch seine Aszitesbildung entdeckt wird. Die Standardtherapie, bestehend aus einer radikalen Tumoresektion und Chemotherapie, kann die Tumormasse zwar erheblich verringern, meist kommt es jedoch nach einer Latenzphase von 1-5 Jahren zum Rezidiv und dann zum Tod. (Abbildung von Winfried Barchet)

Die eigentliche Problematik der Therapie des Ovarialkarzinoms liegt in der hohen Rezidivrate von über 90 %, die für die geringe 5-Jahres-Überlebensrate von unter 30% verantwortlich ist (Bookman, 2005). Oft liegt dabei ein chemoresistentes Rezidiv mit ausgedehnter Peritonealkarzinose vor, sodass nur noch palliativ therapiert werden kann. Diese ernüchternde Bilanz zeigt, wie wichtig die Entwicklung neuer Therapiestrategien für das EOC ist. Dabei gewinnt im multimodalen Behandlungsansatz des Ovarialkarzinoms die Immuntherapie, deren Ziel es ist, die körpereigene, anti-tumorale Immunantwort zu verstärken, zunehmend an Bedeutung.

1.2 Das Immunsystem – angeborene und erworbene Abwehr

Das humane Immunsystem ist ein komplizierter Schutzmechanismus für die Abwehr von Pathogenen wie z.B. Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze. Um diese Aufgabe bewältigen zu können, besteht das Immunsystem aus vielen verschiedenen, spezialisierten Zelltypen und den von diesen Zellen produzierten Produkten. Dabei unterscheidet man

die angeborene, unspezifische Abwehr („innate immunity“) und die erworbene, spezifische Abwehr („adaptive immunity“). Die beiden Teile sind eng miteinander verknüpft und nur durch ihr Zusammenspiel kann eine effiziente Beseitigung von Pathogenen gewährleistet werden.

Die angeborene Immunantwort ist dabei vor allem für die direkte Bekämpfung einer Infektion in den ersten Stunden und Tagen verantwortlich. Sie ist antigen-unspezifisch, kann aber durch die Mustererkennungsrezeptoren („Pattern recognition receptors“ - PRRs) körpereigene von körperfremden Substanzen unterscheiden und dementsprechend reagieren. Zellulär repräsentiert wird sie vor allem durch Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten und Natürliche Killerzellen.

Die adaptive Immunantwort ist im Gegensatz zur angeborenen fähig, antigen-spezifisch Pathogene zu beseitigen und Gedächtniszellen zu bilden. Durch die Rekombination von Genen ist das adaptive Immunsystem in der Lage ein sehr großes Repertoire antigen-spezifischer Rezeptoren zu bilden (Brack et al., 1978). Nach Erkennung und Bindung eines Antigens können diese expandieren und eine effiziente Abwehr des Krankheitserregers auslösen. Aus diesem Grund kann die adaptive Immunabwehr erst einige Tage nach der Infektion wirksam werden. Zellulär besteht das adaptive Immunsystem vor allem aus B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten können sich zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen entwickeln und sind somit für die humorale Abwehr von Antigenen zuständig. Ein kleiner Teil der B-Zellen entwickelt sich zu B-Gedächtniszellen. Diese sorgen dafür, dass bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger eine schnelle Reaktion erfolgt (Wherry et al., 2003). Bei den T-Lymphozyten unterscheidet man zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-Zellen) und T-Helferzellen (CD4⁺-Zellen). Die zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, die Antigen-präsentierende Zelle direkt zu zerstören. Sie setzen zytotoxische Proteine wie Perforin, Granzyme und Granulysin frei und können somit körpereigene Zellen lysieren und Apoptose induzieren. T-Helferzellen sind vor allem für die Aktivierung der B-Zellen von Bedeutung.

1.3 Die Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems – Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“

Die Fähigkeit des Immunsystems, zwischen körpereigenen und körperfremden Molekülen unterscheiden zu können, beruht auf dem Vorhandensein von Mustererkennungsre-

zeptoren („Pattern Recognition Receptors“ – PRRs). Diese PRRs können pathogen-assoziierte Muster („pathogen associated patterns“ – PAMPs) erkennen. Als PAMPs fungieren meist hoch konservierte Molekülstrukturen, die in Pathogenen vorhanden sind, aber in körpereigenen Zellen nicht vorkommen (Janeway, 1989). Zu den PRRs zählen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Kawai und Akira, 2007), die C-Typ Lektin-like Rezeptoren (LLRs) (Robinson et al., 2006), die Rig-like Rezeptoren (RLRs), die Nod-like Rezeptoren (NLRs) (Franchi et al., 2009) und die DNA-Sensoren (Takaoka und Taniguchi, 2008).

Auf die für die Viruserkennung wichtigen PRRs werde ich im folgenden Kapitel näher eingehen.

1.4 Detektion von Viren im Zytosol durch PRRs – RIG-I und MDA-5

Viren werden von infizierten Körperzellen hergestellt und enthalten deshalb keine körperfremden Strukturen. Die Viruserkennung hängt von zytosolischen Rezeptoren der angeborenen Immunität ab. Im Gegensatz zu den anderen oben genannten PRRs erkennen sie DNA- und RNA-Strukturen, also Strukturen, die auch in körpereigenen Zellen vorkommen. Sie detektieren Nukleinsäuren, die im Zuge des viralen Replikationszyklus in infizierten Zellen entstehen, und lösen eine Immunantwort aus. Virale RNA wird im Zytosol durch die Helikasen retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) und melanoma differentiation antigen-5 (MDA-5) detektiert (Yoneyama et al., 2004; Gitlin et al., 2006). RIG-I und MDA-5 werden zu den RIG-like Rezeptoren („RIG-like receptors“, RLRs) zusammengefasst und gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren. Die RLRs werden beinahe ubiquitär exprimiert und sind somit wichtig für die Beseitigung von Viren.

RIG-I erkennt doppelsträngige (ds) RNA mit einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende (3pRNA) (Schlee et al., 2009), sowie die synthetische dsDNA polydeoxyadenosine-deoxythymidine [poly(dAdT)], welche durch die RNA Polymerase III in dsRNA mit einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende umgeschrieben wird (Ablasser et al., 2009). Die MDA-5 aktivierende virale RNA Struktur ist bisher nicht bekannt. Jedoch kann MDA-5 durch die synthetische dsRNA polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] aktiviert werden (Gitlin et al., 2006). N-terminal besitzen sowohl RIG-I als auch MDA-5 zwei Caspase-Rekrutierungsdomänen („caspase recruitment domains“, CARDs). Mit diesen CARDs können RIG-I und MDA-5 eine Interaktion mit der N-terminalen CARD-Domäne ihres

Signaladaptermoleküls „IFN- β promoter stimulator 1“ (IPS-1) ausbilden. IPS-1 ist ein Molekül, das C-terminal an der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist. Durch die Bildung des RIG-I bzw. MDA-5/IPS-1-Komplexes kommt es zu einer Rekrutierung von weiteren Signalmolekülen und damit zur Auslösung einer Signalkaskade, die letztendlich zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I-IFN führt (s. Abb. 2). Unser Ziel ist die Verbesserung der anti-tumoralen Immunantwort durch Imitation einer viralen Infektion in Ovarialkarzinomzellen. Dazu wollen wir die Virusinfektion in den Tumorzellen mit nichtinfektiösen Nukleinsäureagonisten (wie z.B. poly(I:C) oder 3pRNA) imitieren, um so die hochwirksamen antiviralen Immunmechanismen gegen Tumorzellen zu lenken und therapeutisch nutzbar zu machen (Barchet et al., 2008).

1.5 Effektormechanismen der antiviralen Immunantwort

Wie in den vorigen Kapiteln beschrieben, führt die Detektion von Viren durch die zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 zur Auslösung einer antiviralen Immunantwort. Dabei spielen vor allem Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), zytotoxische T-Zellen, Dendritische Zellen (DCs) und die Typ-I-Interferone (IFN) eine bedeutende Rolle.

Typ-I-Interferone stellen die wichtigsten antiviralen Zytokine dar. Im Immunsystem treten dabei vor allem die IFN- α Subtypen und IFN- β (IFN- α/β) in Erscheinung. IFN- α/β bewirken die Abwehr der Virusinfektion über verschiedene Mechanismen: Sie hemmen einerseits direkt die Virusreplikation in den Wirtszellen und erhöhen andererseits auf infizierten Zellen die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, sodass diese einfacher durch zytotoxische T-Zellen abgetötet werden können. Außerdem steigern sie die Präsentation von Antigenen und aktivieren Dendritische Zellen, Makrophagen und NK-Zellen (Janeway und Murphy, 2009).

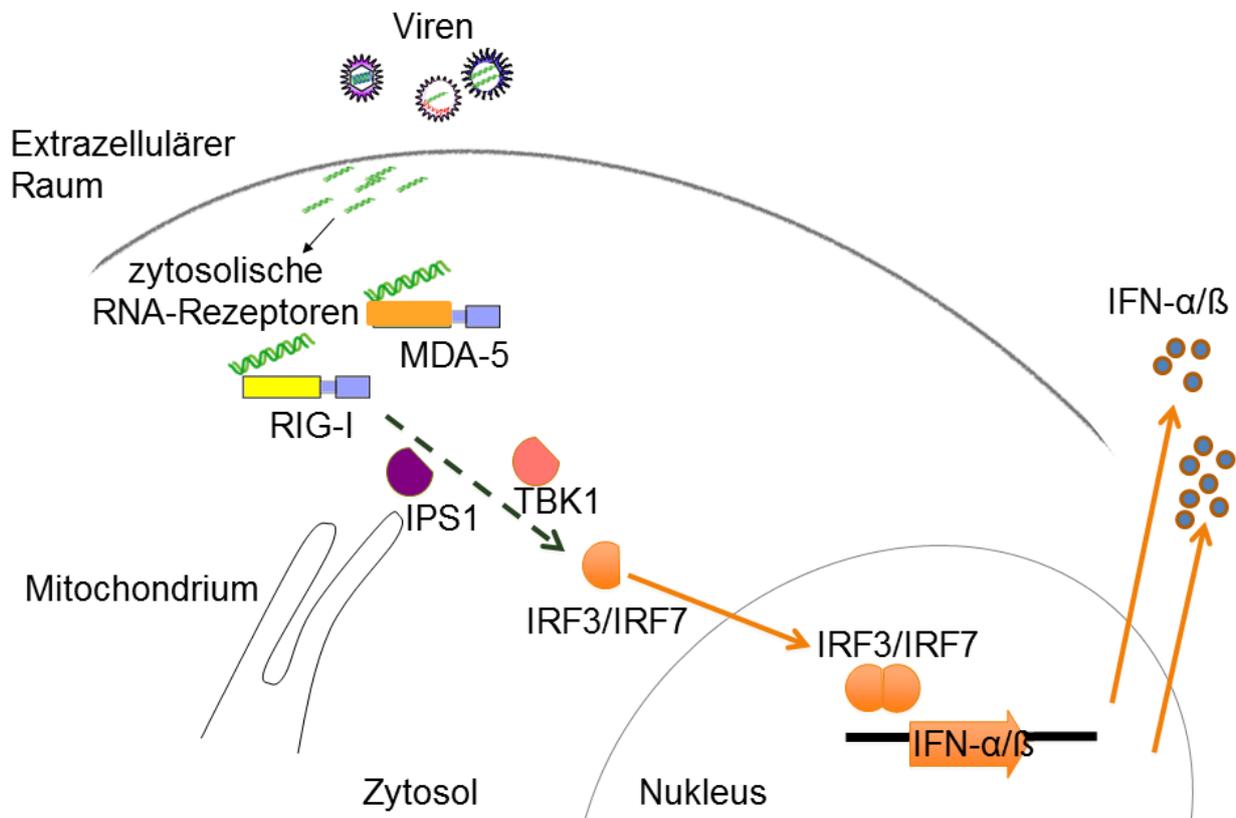


Abb. 2: Die Detektion von Viren im Zytosol

Im Zytosol somatischer Zellen können Viren über ihr RNA-Erbgut von den Helikasen RIG-I (retinoic acid inducible gene I) und MDA-5 (melanoma differentiation associated gene 5) erkannt werden. Die Aktivierung von RIG-I und MDA-5 führt zu Konformationsänderungen, die eine Interaktion zwischen RIG-I/MDA-5 und dem mitochondrialen Adaptermolekül IPS-1 (IFN- β promotor stimulator) ermöglichen. Durch die Rekrutierung verschiedener Signalmoleküle, darunter TBK1 (TANK binding kinase 1) und IRF3/7 (Interferon regulatory factor), kommt es zur Auslösung einer Signalkaskade, die letztendlich zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I-IFN (Interferon) führt (Abbildung verändert nach Winfried Barchet).

Dendritische Zellen (DCs) besitzen die Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren und so eine zelluläre Immunantwort auszulösen. Sie kommen in fast allen peripheren Geweben vor. Dort nehmen sie durch Phagozytose oder Pinozytose Pathogene bzw. Antigene auf und prozessieren sie. Diese können auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentiert und so von T-Zellen erkannt werden. Dazu wandern die DCs in sekundäre lymphatische Organe, z.B. einen Lymphknoten. Dort liegen sie dann als reife DCs vor und exprimieren neben den mit Peptiden beladenen MHC-Komplexen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Nur wenn beide Signale vorhanden sind, können die DCs spezifische T-Zellen aktivieren.

NK-Zellen sind lymphoide Zellen mit zytotoxischer Aktivität und gehören zum angeborenen Immunsystem. Im Zytoplasma der NK-Zellen befinden sich Granula mit zytotoxischen Proteinen wie z.B. Perforinen und Proteasen. Diese werden in der Umgebung der infizierten Zelle freigesetzt und führen dort zur Perforation der Zellmembran und schließlich zum Abtöten der Zelle. Außerdem sezernieren aktivierte NK-Zellen IFN- γ , welches wiederum antivirale Immunmechanismen auslöst, u. a. die Aktivierung von Makrophagen. Die NK-Zellen gehören zum frühen Teil der antiviralen Immunantwort. Nach einer Aktivierung über IL-12 und IFN- α / β sind sie rasch in der Lage virusinfizierte Zellen abzutöten; NK-Zellen können eine Infektion jedoch meist nicht vollständig eliminieren. Dies geschieht durch die zytotoxischen T-Zellen, die erst einige Tage nach der Infektion auftreten (Janeway und Murphy, 2009). Diese CD8⁺-T-Zellen verfügen über einen ähnlichen Tötungsmechanismus wie die NK-Zellen: Sie können ebenfalls durch die Freisetzung ihrer Granula körpereigene Zellen lysieren und die Apoptose induzieren.

Alle diese antiviralen Mechanismen zusammen sorgen für eine effektive Immunantwort, die fähig ist, infizierte Zellen selektiv zu beseitigen

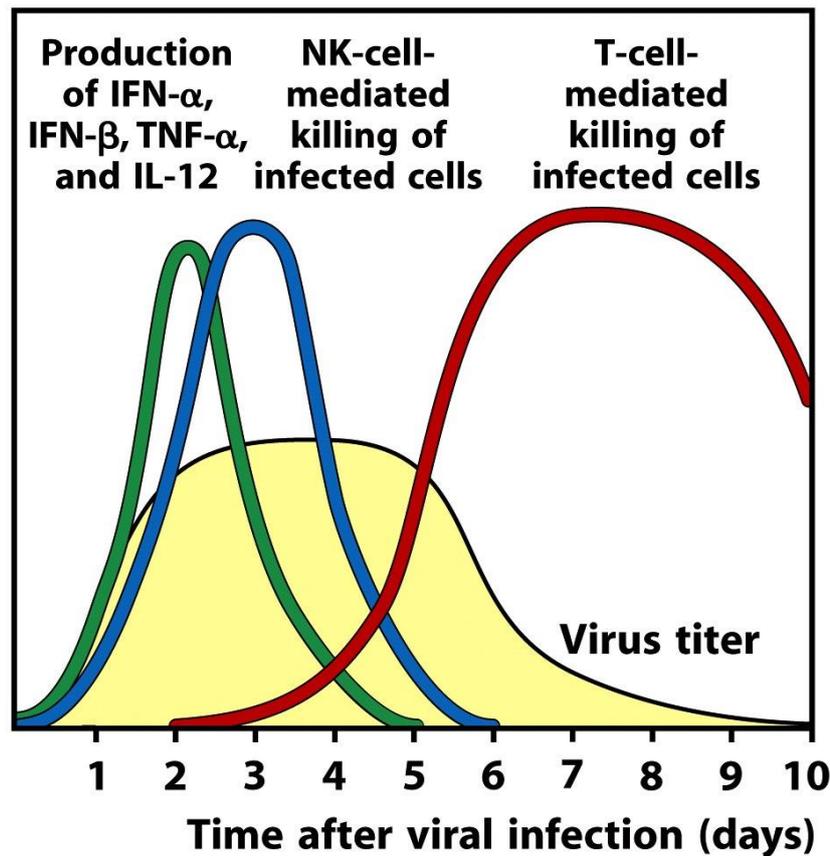


Figure 2-55 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abb. 3: NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) sind bereits früh an der Immunreaktion auf eine Virusinfektion beteiligt.

Nach einer Virusinfektion treten zunächst IFN- α und IFN- β sowie die Zytokine TNF- α und IL-12 auf. Gemeinsam mit den dann auftretenden NK-Zellen halten sie die virale Vermehrung auf, sind jedoch nicht fähig die Viren vollständig zu eliminieren. Dies geschieht durch die zytotoxischen T-Zellen, die erst einige Tage nach der Infektion auftreten (Janeway, 2009).

1.6 Tumorimmunologie des Ovarialkarzinoms

Beim Ovarialkarzinom handelt es sich um einen potentiell immunogenen Tumor, da er vom körpereigenen Immunsystem erkannt wird und eine Immunantwort auslösen kann. So wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) die Überlebensdauer der Patientinnen deutlich verbessert (Sato et al., 2005; Zhang et al., 2003). Zhang et al. führten 2003 erstmals immunhistologische Untersuchungen an Ovarialkarzinomen durch, die eine T- bzw. B-Zell-Infiltration beim Ovarialkarzinom zeigen. Dabei konnten sie eine Korrelation zwischen dem rezidiv-

freien bzw. dem Fünf-Jahres-Überleben und der Infiltration des Tumorgewebes mit T-Zellen (TIL) feststellen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug bei Patientinnen mit T-Zell-infiltrierten Tumoren 38 %, während sie bei Patientinnen ohne T-Zell-Infiltrate im Tumorgewebe bei 4,5 % lag (Zhang et al., 2003).

Die spontane anti-tumorale Immunabwehr ist jedoch meist nicht in der Lage den Tumor vollständig zu beseitigen. Unter Zuhilfenahme verschiedener Immun-Escape-Mechanismen entzieht er sich dem Immunsystem, sodass es zu einem klinisch manifesten Tumorwachstum kommen kann.

Einer dieser Immun-Escape-Mechanismen besteht in der Infiltration des Tumorgewebes mit regulatorischen T-Zellen. Diese Zellen sind normalerweise für die Verhinderung von autoimmunen Prozessen wichtig. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das Vorhandensein dieser regulatorischen T-Zellen im Ovarialkarzinom mit einer schlechten Prognose der Patientinnen korreliert ist (Curiel et al., 2004; Pölcher et al., 2010).

Krockenberger et al. zeigten, dass der Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Ovarialkarzinomen überexprimiert ist (Krockenberger et al., 2012). MIF kann über die Herunterregulation des NK-Zell-Rezeptors NKG2D die antitumorale Aktivität von NK-Zellen unterdrücken. Folglich ist die Expression von MIF in Ovarialkarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Ein weiterer Zelltyp, der in der Immunität vieler Tumoren eine Rolle spielt, sind Tumorassoziierte Makrophagen (TAM). Sie wirken immunsuppressiv und können somit das Tumorwachstum fördern. Ein Wirkmechanismus wird dabei über das auf TAMs exprimierte Molekül B7-H4 vermittelt. B7-H4 gehört zur Familie der B7-Proteine, behindert das Entstehen einer spezifischen T-Zell-Antwort (Sica et al., 2003) und wird auch im Ovarialkarzinom überexprimiert (Tringler et al., 2006). Kryczek et al. zeigten, dass die im Tumormilieu in großen Mengen vorhandenen Zytokine IL-6 und IL-10 die Aufregulation von B7-H4 auf TAMs bewirken können. Außerdem stellte sich heraus, dass die Expression von B7-H4 negativ mit dem Überleben der Patientinnen korreliert (Kryczek et al., 2007).

1.7 Ganzzellvakzine und Tumorassoziierte Antigene (TAAs)

Unter Ganzzellvakzinierung versteht man die Impfung mittels ganzer Tumorzellen. Dabei unterscheidet man zwischen autologen und heterologen Ganzzellvakzinen:

Bei der autologen Ganzzellvakzinierung werden patienteneigene, teilungsunfähig gemachte Tumorzellen verwendet. Dies hat den Vorteil, dass alle relevanten Tumorantigene, die für die Auslösung einer effizienten Immunantwort benötigt werden, vorhanden sind, auch wenn sie noch nicht genau identifiziert bzw. charakterisiert wurden (Sabbatini und Odunsi, 2007). Auch Genmutationen, die für jeden Patienten einzigartig sind und z.T. immundominante Epitope darstellen können, sind enthalten und können somit eine effektive und langanhaltende Anti-Tumor-Antwort induzieren (Chiang et al., 2011). Eine Metaanalyse von 173 Patienten mit soliden Tumoren hat gezeigt, dass die Patienten, die mit Ganzzellvakzinierung behandelt wurden, ein höheres Ansprechen auf die Therapie zeigten als Patienten, die nur mit bestimmten Tumor-Antigenen immunisiert worden waren (Neller et al., 2008). Ein Nachteil der autologen Ganzzellvakzine liegt allerdings in der schwierigen Herstellung der Vakzine aus patienteneigenen Tumorzellen, also im Problem der Zellgewinnung, der Prozessierung, der Reproduzierbarkeit und der großen Variabilität zwischen den verschiedenen Patienten (Chiang et al., 2011). Ganzzellvakzine aus Tumormaterial bergen zudem immer das Risiko von autoimmunen Reaktionen und auch ein Monitoring der Immunantwort gestaltet sich schwierig, da man die Antigene, die die antitumorale Immunantwort hervorrufen, nicht kennt (Sabbatini und Odunsi, 2007).

Heterologe Ganzzellvakzinen haben den Vorteil der einfacheren Herstellung und besseren Reproduzierbarkeit. Allerdings enthalten sie nicht alle patientenspezifischen tumorassoziierten Antigene, was eine qualitative und quantitative Einschränkung der ausgelösten Immunantwort bedeuten könnte. Außerdem könnte es auch zu einer Selektion und Wachstumsförderung der Tumorzellen führen, die die in der heterologen Ganzzellvakzine enthaltenen Antigene nicht exprimieren (Schreiber et al., 2010).

Insgesamt sind Ganzzellvakzine ein relativ einfacher Weg einen immunaktivierenden Impfstoff mit einem großen Repertoire an Tumorantigenen herzustellen (Liu et al., 2010b).

Beim Ovarialkarzinom sind die immundominanten Tumorantigene bisher nicht gut charakterisiert. Darüber hinaus muss bei Verwendung von definierten Tumorantigenen die Vakzine auf das MHC-Molekülspektrum des Patienten angepasst werden. Daher ist es für unser Projekt attraktiv, die aus dem Patienten gewonnenen Tumorzellen selbst als Ganzzellvakzine einzusetzen.

Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom liegt oft bereits eine Peritonealkarzinose vor, die zur Bildung von malignem Aszites führen kann. Durch eine Aszitespunktion können vereinzelte und in vitro kultivierbare Tumorzellen gewonnen werden. Aufgrund dieser relativ einfachen Möglichkeit der Tumorzellgewinnung eignet sich das Ovarialkarzinom besonders für den Therapieansatz der Ganzzellvakzine.

Obwohl Tumorzellen eine offensichtlich gute Quelle für TAAs darstellen, wirken die meisten natürlichen und therapeutisch induzierten Formen von Tumorzelltod nicht immunogen, sondern können im Gegenteil zur Unterdrückung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort beitragen. Die Immunogenität der Tumorantigene muss also so verstärkt werden, dass eine effiziente Anti-Tumor-Antwort ausgelöst wird.

1.8 Verstärkung der Anti-Tumor-Immunantwort durch Adjuvanzen

Adjuvanzen sind eine Art immunologische Wirkungsverstärker. Sie verstärken B- und T-Zell-Antworten, indem sie das angeborene Immunsystem aktivieren.

Der bisher vielversprechendste experimentelle Ansatz basiert auf der Verwendung von onkolytischen Viren, die selektiv Tumorzellen infizieren und sie entweder direkt oder über die antivirale Immunantwort abtöten sollen (Tedcastle et al., 2012). Schirmacher et al. benutzten inaktivierten Newcastle Disease Virus zusammen mit einer Ganzzellvakzine (Schirmacher, 2005). Diese Vakzinierung rief eine gegen den Tumor gerichtete zytotoxische T-Zell-Antwort hervor, wobei die Ganzzellvakzine in Kombination mit Newcastle Disease Virus ein besseres Ergebnis zeigte als die Ganzzellvakzine allein. Die Verwendung von infektiösen Vektoren birgt jedoch die Gefahr der genomischen Integration sowie der Infektion und Zerstörung unbeteiligter Gewebe. Ein weiterer Nachteil ist, dass die zytotoxische T-Zellantwort vorrangig auf virale Neo-Antigene und nicht auf TAAs fokussiert ist (Leveille et al., 2011). Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz besteht dagegen darin, eine Virusinfektion der Tumorzellen zu imitieren, indem Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA-5, mit nichtinfektiösen Nukleinsäuren aktiviert werden. Generell stellen fast alle Mitglieder der PRR-Familie potentielle Angriffspunkte für Adjuvanzen dar (Coffman et al., 2010). Das in dieser Arbeit als Adjuvanz verwendete poly(I:C) aktiviert sowohl TLR3 als auch MDA-5, was die Größe und Dauer der T-Zell-Antwort erhöht (Longhi et al., 2009). Außerdem wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben, dass das Codelivering von Anti-

gen und Adjuvanz zur selben DC die Effektivität der T-Zell-Antwort entscheidend verbessert (Blander und Medzhitov, 2006; Joffre et al., 2009; Spörri und Reis e Sousa, 2005). Für eine bestmögliche Immunaktivierung benötigt die das Antigen präsentierende DC sowohl die direkte Aktivierung durch das Adjuvanz als auch die indirekte Aktivierung über die entstehenden inflammatorischen Zytokine. In meinem Projekt wurden aufbereitete Tumorzellen mit dem Adjuvanz (poly(I:C), 3pRNA, poly dAdT) stimuliert und dann als Ganzzellvakzine verwendet. Dadurch wurden sie in einer Form verabreicht, die zur Aktivierung und Maturation von DCs führt und eine effiziente Kreuzpräsentation von phagozytierten TAAs ermöglicht (Kurts et al., 2010).

1.9 Verstärkung der Anti-Tumor-Immunantwort durch Oxidation

Um die Tumorzellen als Ganzzell-Vakzine einsetzen zu können muss das Überleben bzw. die Vermehrung der Zellen ausgeschlossen werden. Ein Ansatz hierfür ist die oxidative Schädigung der Tumorzellen mit Hypochlorsäure. Hypochlorsäure (HOCl) ist ein reaktiver Sauerstoffmetabolit, der zu den nichtradikalischen Oxidantien zählt und physiologisch von aktivierten Neutrophilen in akuten Entzündungssituationen produziert wird. HOCl ist fähig, die Immunogenität von Antigenen zu steigern, die Antigen-Aufnahme und Prozessierung zu verstärken (Marcinkiewicz et al., 1991; Allison und Fearon, 2000) und eine Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten hervorzurufen (Prokopowicz et al., 2010). Die Steigerung der Immunogenität kann durch fünf möglicherweise synergistisch wirkende Mechanismen erklärt werden (Chiang et al., 2011). Erstens kann HOCl die Seitenketten von Proteinen in Aldehyde deaminieren. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Einbau von Aldehyden die Immunantwort gegen Antigene deutlich verstärkt (Hazen et al., 1996). Zweitens führt die Oxidation eines Antigens zu seiner Entfaltung, wodurch es zu einer Exponierung der immunogenen Epitope des Antigens zu den T-Zellen kommt (Carrasco-Marín et al., 1998). Drittens scheinen Scavenger Rezeptoren wie z.B. LOX-1 bei der Aufnahme von oxidierten Tumorantigenen in DCs involviert zu sein, wodurch die Kreuzpräsentation von TAAs zu zytotoxischen T-Zellen erleichtert wird (Delneste et al., 2002). Viertens wäre es möglich, dass HOCl den Tumorzelltod induziert. Dadurch werden zahlreiche Gefahr-Signale (wie z.B. DNA, RNA, ATP, Harnsäure, HMGB1, HSPs) sezerniert, die zu einer Reifung und Aktivierung von DCs führen

können (Chiang et al., 2013). Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass oxidierte DNA stimulatorisch wirkt, da sie nicht über TREX1 abgebaut wird (Gehrke et al., 2013). Chiang et al. konnten an humanen Ovarialkarzinomzellen (SKOV-3) zeigen, dass durch die Behandlung der Zellen mit HOCl die Aufnahme der Zellen durch DCs verstärkt wird und dass eine starke Tumor-spezifische T-Zell-Antwort induziert wird (Chiang et al., 2008; Chiang et al., 2006). Sie testeten auch drei verschiedene Herstellungsweisen von Ganzzell-Tumor-Lysaten gegeneinander: HOCl Oxidation, UVB Bestrahlung und 6 Zyklen der „freeze-thaw“-Methode. Dabei zeigte die mit HOCl behandelte Ganzzellvakzine sowohl in vitro als auch in vivo das beste Ergebnis: Sie erwies sich als fähig, TAAs kreuzpräsentieren, sie rief die höchste Rate an IFN- γ -produzierenden, tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen hervor und induzierte die beste Anti-Tumor-Antwort in vivo (Chiang et al., 2013). In einer klinischen Pilot-Studie vakzinierten sie 5 Frauen, die an Ovarialkarzinom erkrankt waren, mit einer mit HOCl-behandelten DC-Ganzzelltumorstoffvakzine und konnten eine hohe Korrelation zwischen klinischem Outcome und durch die Vakzine hervorgerufener Immunantwort beobachten (Chiang et al., 2013).

1.10 Kombinierte Immuntherapie

Es gibt viele immunologische Hürden, die überwunden werden müssen, um eine effektive und langanhaltende Immunantwort gegen Tumoren auszulösen. Einzelne immuntherapeutische Ansätze haben vielversprechende Teilerfolge zeigen können, eine wirklich effiziente, neue Therapiemöglichkeit für das Ovarialkarzinom blieb aber bisher aus. Daher erscheint es sinnvoll, verschiedene immunologische Therapien zu verknüpfen, um so die Tumorzellen auf mehreren Ebenen anzugreifen (Liu et al., 2010a). Kandalaf et al. führten eine kombinierte Immuntherapie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom durch (Kandalaf et al., 2013). Aus dem Blut von 31 Patientinnen mit rezidivierendem Ovarialkarzinom wurden DCs isoliert und mit patienteneigenen Tumorzellen stimuliert. Dieser Impfstoff führte bei 19 Patientinnen zu einer mit einem klinischen Ansprechen einhergehenden spezifischen Immunreaktion. Jene Patienten, bei denen trotz Impfung weiterhin eine Resterkkrankung nachweisbar war, erhielten die zweite Stufe der Immuntherapie, einen adoptiven T-Zell-Transfer, bei dem patienteneigene T-Zellen ex vivo stimuliert und dann wieder injiziert wurden. Insgesamt zeigten von den Patientinnen, die ausschließlich

die Impfung erhalten hatten, 61% ein klinisches Ansprechen. Von den Patientinnen, die den kombinierten Therapieansatz erhielten (Impfung + adoptiver T-Zell-Transfer), profitierten sogar 75%. Diese klinische Studie zeigt, dass die Kombination von verschiedenen Immuntherapien durchaus erfolgsversprechend ist und dass die weitere Erforschung sinnvoll erscheint. So wäre z.B. ein sinnvoller Angriffspunkt, der mit der in dieser Arbeit dargestellten Ganzzellvakzinierung kombiniert werden könnte, das immunsuppressive Tumormilieu. Denn auch wenn man es mithilfe einer erfolgreichen Vakzinierung schafft, eine T-Zell-Aktivierung hervorzurufen, limitiert doch möglicherweise die Fähigkeit des Tumors, der Immunaktivierung mit immunsuppressiven Mechanismen entgegenzuwirken, langfristig den Erfolg der Vakzinierung (Mellman et al., 2011). Experimentelle Ansätze umfassen dabei momentan z.B. die Depletion von regulatorischen T-Zellen (Chen et al., 2012) oder auch den Einsatz von Cyclophosphamid, dessen Verwendung in Studien die Eliminierung von tumorinduzierten T-Suppressor-Zellen zeigen konnte (Awwad und North, 1989; Ghiringhelli et al., 2004).

1.11 Immuntherapie des Ovarialkarzinoms

Wie oben beschrieben handelt es sich beim Ovarialkarzinom um einen potentiell immunogenen Tumor: Er wird vom Immunsystem erkannt und kann eine Immunantwort auslösen. Meist überwiegen jedoch die immunsuppressiven Signale, die das Ovarialkarzinom im Tumormilieu auslöst, sodass eine effiziente Immunantwort des Körpers verhindert wird und der Tumor weiter wachsen kann. Mit dem Ziel, das Gleichgewicht zwischen effizienter, körpereigener Immunantwort und immunsuppressiven Signalen zugunsten der Tumorbekämpfung zu verschieben, rücken immunstimulatorische Ansätze in den Fokus der Forschung. Als Therapiezeitpunkt bietet sich insbesondere die Latenzphase nach der chirurgischen und chemotherapeutischen Initialtherapie an, in welcher die Tumoralast gering ist und sich das durch den Tumor ausgelöste immunsuppressive Milieu zurückbildet (Yigit et al., 2010). Ziel ist es mit Hilfe einer Immuntherapie in dieser Zeit, das Wiederauftreten des Tumors deutlich hinauszuzögern und insgesamt das Rezidivrisiko zu verringern. Da das Ovarialkarzinom typischerweise auf den Peritonealraum begrenzt bleibt und der Peritonealraum sehr reich an Immunzellen ist, bietet er die idealen Voraussetzungen für die lokale, intraperitoneale Gabe der Immuntherapie.

Unser Ansatz sieht daher vor, eine Virusinfektion der Tumorzellen mit nichtinfektiösen Nukleinsäureagonisten zu imitieren, um die hochwirksamen antiviralen Immunmechanismen gegen Tumorzellen zu lenken und so für die onkologische Therapie nutzbar zu machen (Barchet et al., 2008).

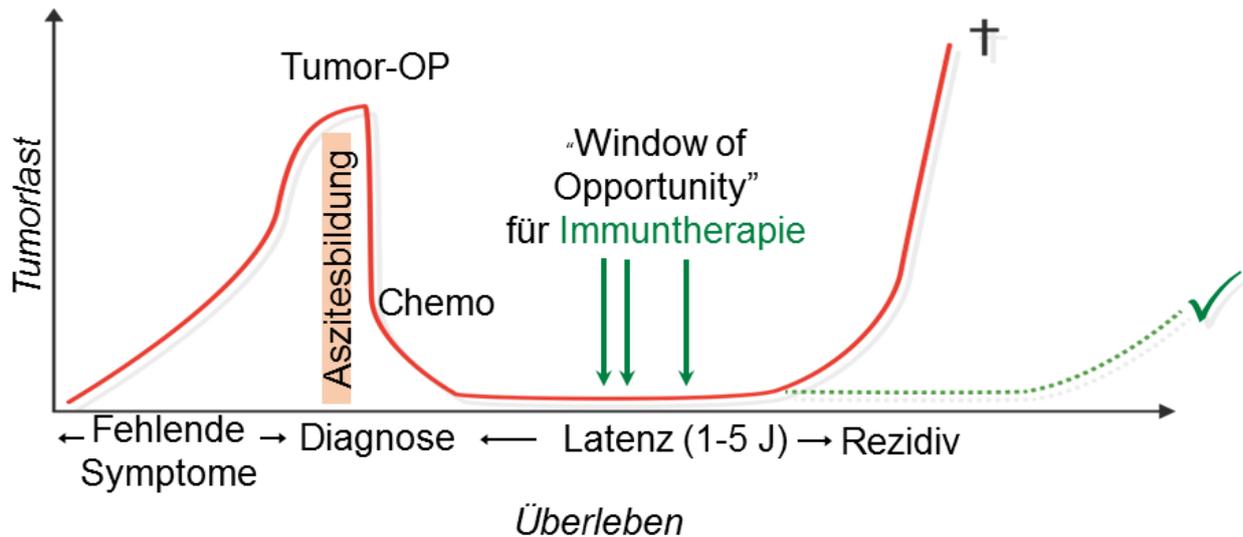


Abb. 4: Das Ovarialkarzinom – Krankheitsverlauf und Immuntherapie

Dargestellt ist die Entwicklung der Tumormasse in Bezug auf den typischen Krankheitsverlauf von Ovarialkarzinompatientinnen. Die fehlende Symptomatik im Anfangsstadium der Krankheit bewirkt, dass der Tumor oft erst durch seine Aszitesbildung entdeckt wird. Die Standardtherapie, bestehend aus einer radikalen Tumorresektion und Chemotherapie, kann die Tumormasse zwar erheblich verringern, meist kommt es jedoch nach einer Latenzphase von 1-5 Jahren zum Rezidiv und dann zum Tod. Durch eine Immuntherapie in der Latenzphase soll das Wiederauftreten des Tumors hinausgezögert und insgesamt das Rezidivrisiko verringert werden. (Abbildung von Winfried Barchet)

1.12 Vorarbeiten im humanen System

Kirsten Kübler untersuchte die Interaktion von lebenden und durch die Stimulation der zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA-5 apoptotischen Tumorzellen mit myeloiden und lymphoiden Immunzellen im humanen System. Da sich Tumorzelllinien oftmals schon weit von der initialen Tumorpathologie in der Patientin entfernt haben, etablierte sie primäre Zellkulturen (OVCACE-1 bis -5) aus dem Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Die Tumorzellen wurden dabei über deren Expression der Tumorantigene

Folatrezeptor- α und CA125 identifiziert.

Um die proapoptotische Aktivität von Liganden der zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 zu untersuchen, wurden sowohl Tumorzelllinien (SKOV-3, OVCAR-3, IGROV1) als auch primäre Tumorzellen für 24h mit RIG-I und MDA-5 Liganden stimuliert. Diese induzierten dosisabhängig Apoptose sowohl in den Zelllinien als auch in den Primärkulturen. Darüber hinaus zeigte sich nach Stimulation eine erhöhte Tumorummunogenität, welche über die Aufregulation von HLA-Klasse I Molekülen sowie die Sekretion von IFN- β , CXCL10, CCL5, IL-6 und TNF- α nachgewiesen wurde. Außerdem analysierte sie den Effekt der infolge der Aktivierung zytosolischer Rezeptoren in Apoptose getriebenen Tumorzellen auf Immunzellen. Die Kokultur mit apoptotischen Tumorzellen aktivierte Monozyten und maturierte dendritische Zellen. Im Kontakt mit infolge der RIG-I oder MDA-5 Stimulation apoptotischen Tumorzellen sekretierten Monozyten und DCs IFN- α und CXCL10 und exprimierten HLA-Klasse II und kostimulatorische Moleküle (Kübler et al., 2010). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der Überstand von kokultivierten apoptotischen Tumorzellen und Monozyten NK-Zellen aktiviert. Hierbei wies sie die Induktion von CD69 und IFN- γ sowie die Steigerung der NK-Zell-vermittelten Tumorzellyse nach (Kübler et al., 2011a).

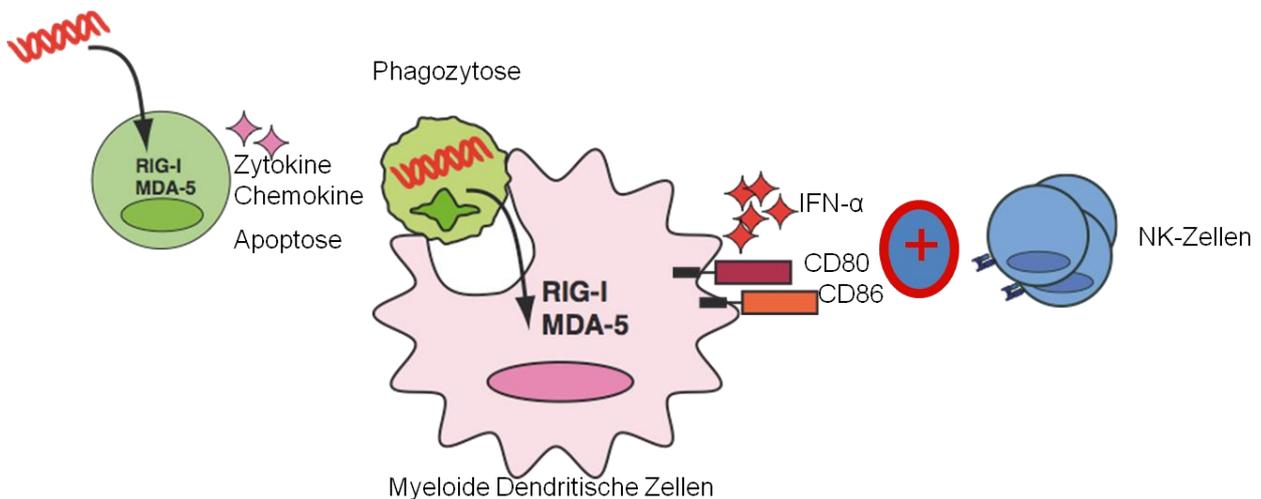


Abb. 5: Simulation der Virusinfektion in Tumorzellen

Durch Stimulation der Tumorzellen mit synthetischen Nukleinsäuren (z.B. poly(I:C), 3pRNA oder poly dAdT) sezernieren die Zellen Zytokine und Chemokine und gehen in Apoptose. Die Phagozytose der apoptotischen Zellen bewirkt eine Aktivierung von DCs, eine weitere Produktion von Zytokinen und letztendlich auch die Aktivierung von NK-Zellen. (Abbildung von Winfried Barchet)

1.13 Mausmodell - MOSEC ID8

Die Evaluation der adaptiven Immunantwort auf RIG-I und MDA-5 vermittelten, immunogenen Zelltod – einschließlich der Generierung und Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen - kann nur im intakten Organismus erfolgen. Aus diesem Grund sollte für die Entwicklung einer immuntherapeutischen Strategie ein Mausmodell etabliert werden. Durch Dr. Katherine F. Roby wurden uns sechs, zum C57Bl/6 Mausstamm syngene Ovarialkarzinom-Zelllinien durch zur Verfügung gestellt (Roby et al., 2000). Diese sogenannten MOSEC-Zellen („Mouse ovarian surface epithelial cells“) sind in der Lage als transplantierbare Tumoren in immunkompetenten Mäusen zu wachsen. Dabei ähneln diese Tumoren denen von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen im 3.-4. Stadium. Die MOSEC-Zellen wurden durch multiples Passagieren von murinen, ovariellen Epithelzellen gewonnen, basierend auf der Idee, dass so in vitro Transformationen ausgelöst werden. Diese Hypothese konnte u.a. schon mit Ovarialepithelzellen von Ratten bestätigt werden (Godwin et al., 1992; Testa et al., 1994). Diese Beobachtungen stützen auch die Theorie, dass eine ständige Ovulation einen Risikofaktor für einen Ovarialtumor darstellt: Dabei löst die ständige Regenerierung des Ovarialepithels mit jedem Zyklus Transformationen aus, die letztendlich zu neoplastischen Veränderungen und damit zu einer Tumorerkrankung führen (Fathalla, 1972).

Die Zelllinien wurden ursprünglich folgendermaßen gewonnen: Die Epithelschicht der Ovarien wurde mittels Trypsinierung abgelöst. Die so erhaltenen Ovarialepithelzellen wurden in Kultur gebracht und wiederholt passagiert. Dabei zeigten die frühen Passagen eine typische Kopfsteinpflaster-Morphologie und eine Kontaktinhibition beim Wachstum. Nach ca. 20 Passagen verloren die Zellen diese Eigenschaften und zeigten nun ein tumorähnliches Verhalten. Im Gegensatz zu den frühen Passagen waren die späten Passagen auch fähig in vivo Tumoren zu bilden. Dies wurde sowohl durch s.c. als auch durch i.p.-Injektion in C57Bl/6-Mäuse nachgewiesen. Die i.p.-Injektion führte dabei sowohl zur Bildung von multiplen Tumoren im Peritonealraum als auch zur Bildung von Aszites. Histopathologische Untersuchungen der Tumoren zeigten hochmaligne Neoplasien mit sowohl karzinomatösen als auch sarkomatösen Anteilen (Roby et al., 2000).

Die Vorteile dieses transplantierbaren Tumormodells liegen vor allem in der einfachen Handhabung und der guten Reproduzierbarkeit: Die Tumorzellen werden in Kultur ge-

halten und durch Injektion in syngene Mäuse formen sich Tumore. Durch das schnelle Wachstum ist eine rasche Evaluierung von therapeutischen Strategien möglich (Dranoff, 2012). Ein weiterer Vorteil der transplantierbaren Tumore besteht darin, dass durch die Herstellung transgener Tumorzelllinien die Untersuchung des Tumorwachstums *in vivo* und der gegen den Tumor gerichteten T-Zell-Antwort erleichtert werden kann. So kann z.B. durch die Einführung des Luciferase-Gens per Biolumineszenz Tumorwachstum nicht-destruktiv *in vivo* evaluiert werden (Craft et al., 2005). Der Nachteil von transplantierbaren Tumormodellen ist, dass eine Injektion einer großen Menge an monoklonalen, schon vollständig transformierten Tumorzellen in eine gesunde Maus erfolgt. Dies ähnelt eher einer Infektion und der mit der Injektion einhergehende Gewebeschaden kann lokal eine entzündliche Reaktion auslösen, die den Erfolg der therapeutischen Strategie beeinflusst. Die natürliche Entwicklung eines Tumors besteht dahingegen aus einer Zelle, die sich langsam vermehrt und immer mehr Mutationen ansammelt.

Die Vorteile dieses Modells für mein Projekt lagen vor allem im schnellen Wachstum der Zellen, was eine rasche Durchführung der Experimente und Evaluierung verschiedener Therapiestrategien ermöglichte. Außerdem waren natürlich auch die gute Reproduzierbarkeit, die einfache Handhabung und die Möglichkeit mit transgenen Tumorzelllinien zu arbeiten positive Aspekte dieses Modells.

1.14 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel meiner Arbeit bestand zunächst in der Übertragung der in Zellkulturen mit humanen Zellen gewonnenen Ergebnisse in das murine C57BL/6 syngene MOSEC Tumorzellmodell. Anschließend sollte ein Immuntherapiekonzept erarbeitet werden, das erlauben soll, Tumorrezidive im Ovarialkarzinommodell *in vivo* hinauszuzögern bzw. zu verhindern.

Insgesamt lassen sich die Ziele meiner Arbeit gut in drei Punkten zusammenfassen:

Ziel 1: Übertragung der mit humanen Ovarialkarzinom-Zellen ermittelten Parameter auf das Mausmodell

Ziel 2: Generierung von transgenen Tumorzelllinien, die die Untersuchung des Tumorwachstums und der gegen den Tumor gerichteten T-Zell Antwort *in vivo* erleichtern.

Ziel 3: Etablierung und funktionelle Evaluation einer Ganzzell-Tumorvakzinierung im Ovarialkarzinom-Mausmodell *in vivo*.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Midisart 2000	Sartorius (Göttingen)
Analysewaagen U4100-OD2.2, MC BA 100	Sartorius (Göttingen)
Autoklav Typ VX-150	Systec (Wettenberg)
Bechergläser (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l)	Schott (Mainz)
Begasungsbrutschrank MCO-20AIC	Sanyo (San Diego (USA))
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences (Heidelberg)
Einfrierbehälter	VWR (Darmstadt)
Eismaschine AF20	Scotsman (Pogliano (I))
ELISA-Lesegerät Apollo LB912	Berthold (Bergisch Gladbach)
ELISA-Waschgerät Vacupette	VWR (Darmstadt)
En Vision 2104 Multilabel Reader	PerkinElmer (Rodgau)
Erlenmeyer-Kolben (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml)	Schott (Mainz)
Fluoreszenzmikroskop IX71	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop Observer D1	Carl-Zeiss (Göttingen)
Gefrierschrank (- 20 °C)	AEG-Electrolux (Nürnberg), Siemens (München)
Gefrierschrank (- 80 °C) HFU 586 basic	Thermo Electron (Oberhausen)
Gefriertruhe (- 150 °C) ultra low freezer	Sanyo (San Diego (USA))
Gelkammer Modell 40-1214 und 40-0911 mit Elektrophoreseschlitten und Kamm	Peqlab (Erlangen)
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Kühlschrank	AEG-Electrolux (Nürnberg)
MACS-Separator und Multistand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Mehrkanalpipetten Ergonomic High-Performance (1-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl)	VWR (Darmstadt)
Messkolben (10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l)	Schott (Mainz)
Mikroskop Willovert 30	Hund (Wetzlar)
Mikrowelle NN-E205W	Panasonic (Hamburg)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
pH-Meter HI8424	HANNA Instruments (Kehl am Rhein)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Präparierbesteck	Labotec Labor-Technik (Göttingen)
Reagenzglas-Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York (USA))
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Peqlab (Erlangen)
Sterilwerkbank Microbiological Safety Cabinet Typ 1.8	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Stickstofftank	Taylor Wharton (Mildstedt)
Vortexer lab dancer	VWR (Darmstadt)
Wasserbad Isotemp	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Zentrifugen 5415 D, 5415 R, 5430 R, 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Galaxy mini	VWR (Darmstadt)

2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Einmal-Feindosierungsspritze Omnifix® F (1 ml)	Braun (Melsungen)
Einmal-Handschuhe Dermaclean (S, M, L)	Ansell Healthcare (Brüssel (B))
Einmal-Kanülen Sterican (0,4 x 20 mm, 0,45 x 20 mm)	Braun (Melsungen)
Einmal-Spritzen Discardit II (2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)

ELISA-Platte groß	Greiner Bio-One (Solingen)
ELISA-Platte klein	Corning Costar (Bodenheim)
FACS-Röhrchen groß	Sarstedt (Nürnbrecht)
FACS-Röhrchen klein	Corning Costar (Bodenheim)
Glaspasteurpipette (230 mm)	Brand (Wertheim)
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One (Solingen)
MACS-Nylonfilter (30 µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS-Separationssäule (MS, LS, LD)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mini Quick DNA Spin Columns	Roche (Mannheim)
Pipettenspitzen (0,1-10 µl (kristall), 2-200 µl (gelb), 100-1000 µl (blau))	Greiner Bio-One (Solingen)
Pipettenspitzen mit Aerosolfilter (0,1-2,5 µl, 1-20 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl)	Biozym (Hess. Oldendorf), nerbe plus (Winsen/Luhe)
Petrischalen (Ø 10 cm)	Greiner Bio-One (Solingen)
Plastikpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Costar (Bodenheim)
Spritzenfilter (0,45 µm)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Sterilfilter 500 ml Filtersystem	Corning Costar (Bodenheim)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel) Whatman (Dassel)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Kulturplatten (6-, 12-, 24-, 48- und 96- Lochflachbodenplatte, 96-Lochrundbodenplatte)	TPP (Trasadingen (CH))
Zellkulturschalen (100 x 20 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Agarose	Applichem (Darmstadt)
Aqua Spüllösung	Braun (Melsungen), Delta Select (Pfullingen)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)

BD Pharmlyse	BD Biosciences (Heidelberg)
Biocoll	Biochrom AG (Berlin)
Brefeldin A (1 µg/ml)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth (Karlsruhe)
Cytofix/Cytoperm kit	BD Biosciences (Heidelberg)
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Diphtherietoxin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DreamTaq™ Green Buffer 10 x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 41965	Gibco (Karlsruhe)
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories (Pasching)
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung 0,5 M	PAA Laboratories (Pasching)
FastDigest® Puffer 10 x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco (Karlsruhe)
Gelatine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GM-CSF (murin)	Generierter J55811- Zellüberstand nach G418- Selektion
Größenstandards GeneRuler DNA Ladder (100 bp, 1 kb)	Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Ipswich (GB))
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ionomycin (250 ng/ml)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Carl Roth (Karlsruhe)
LB-Medium (Lennox)	Carl-Roth (Karlsruhe)
Kollagenase D	Roche (Mannheim)
L-Glutamin 100 x	Cambrex BioWhittaker (New Jersey (USA))
Ladepuffer DNA Loading Dye 6 x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Lyse-Puffer (5x Passive Lysis Buffer)	Promega ((Madison (USA))

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl) 10 %	Braun (Melsungen)
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung 0,9 %	Braun (Melsungen)
Natriumhypochlorid (NaOCl)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Optimem	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin 100 x	Cambrex BioWhittaker (New Jersey (USA))
PMA (50 ng/ml)	Enzo Life Sciences (Lörrach)
Polybrene	Sigma-Aldrich (Steinheim)
poly L-Ornithin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI 1640	Gibco (Karlsruhe)
SYBR® Safe DNA gel stain 40000 x	Invitrogen (Karlsruhe)
TAE (50x)	Carl Roth (Karlsruhe)
TE (100x)	Carl Roth (Karlsruhe)
Terrific-Broth-Medium	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypanblau (C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin EDTA	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)

2.1.4 Puffer und Kulturmedien

Alle Puffer und Kulturmedien wurden bis zu ihrer Verwendung, falls vom Hersteller nicht anders angegeben, bei 4 °C aufbewahrt. Bei allem verwendeten FCS wurden vor dem Einsatz die Komplementfaktoren Hitze inaktiviert (30 min bei 56 °C).

Medium	Zusammensetzung
DMEM-Medium für HEK293T-Zellen	DMEM 41965; 10 % (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM MEM Natrium-Pyruvat; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	90 % (v/v) FCS; 10 % (v/v) DMSO
ELISA-Assaypuffer (IFN- α (murin))	1 x PBS; 10 % (v/v) FCS; (0,05 % (v/v) Natriumazid)
ELISA-Assaypuffer (IL-6 (murin))	1 x PBS; 10 % (v/v) FCS

ELISA-Assaypuffer (IP-10 (murin))	1 x PBS; 1 % (v/v) BSA
ELISA-Beschichtungspuffer (IFN- α , (murin))	0,2 M Natriumphosphat pH 6,5 (12,49 g Na_2HPO_4 und 15,47 g NaH_2PO_4 in H_2O gelöst, pH 6,5 eingestellt und mit H_2O auf 1 l aufgefüllt)
ELISA-Beschichtungspuffer (IL-6 (murin))	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5 (7,13 g NaHCO_3 und 1,59 g Na_2CO_3 in H_2O gelöst, pH 9,5 eingestellt und mit H_2O auf 1 l aufgefüllt)
ELISA-Waschpuffer	1 x PBS; 0,05 % (v/v) Tween 20
Erylyse	BD Pharmlyse 1:10 in Aqua Spüllösung
FACS-Puffer	1 x PBS; 2 % (v/v) FCS
Gelatine-Lösung	0,1 % Gelatine in H_2O
LB Medium (Lennox)	Bacto-Trypton 10 g/l; Hefeextrakt 5 g/l; Natriumchlorid 5 g/l
MACS-Puffer	1 x PBS; 2 % (v/v) FCS; 2 mM EDTA; pH 7,2-7,4
ITS-Medium für ID8-Zellen	DMEM 41965; 1 % ITS; 4% FCS; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
Medium für humane IGROV-Zellen	RPMI-1640; 10% FCS; 4mM L-Glutamin; 200 U/ml Penicillin/Streptomycin; 1mM Natriumbicarbonat
poly L-Ornithin-Lösung (100 x)	100 mg poly L-Ornithin in 67 ml ddH ₂ O gelöst (1,5 mg/ml), sterilfiltriert und in 10 ml Aliquots eingefroren
RPMI-Medium für RMA Zellen	RPMI 1640; 10 % (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM MEM Natrium-Pyruvat; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
TAE	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
T-Zell Medium für B3Z-Zellen und OTI-Zellen	RPMI 1640; 6 % FCS; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin; 2 mM L-Glutamin; 500 μl β -Mercaptoethanol (500 mM)

2.1.5 ELISA (Kits, Antikörper und Enzyme)

Bezeichnung	Hersteller
Donkey Anti-Rabbit F(ab) ² -Peroxidase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Human IFN-alpha Module Set	Bender MedSystems (Wien (A))
Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet	R&D Systems (Minneapolis (USA))
Mouse ELISA Set IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12 (p40), IL-12 (p70)	BD Biosciences (Heidelberg)
MAB to Mouse Interferon-Alpha, neutralizing, Clone RMMA-1	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey (USA))
Mouse Interferon-Alpha A	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey (USA))
PAb to Mouse Interferon-Alpha, Rabbit Serum, neutralizing	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey (USA))

2.1.6 Antikörper Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD3e	145-2C11	Armenian Hamster IgG1	BD Biosciences
CD69	H1.2F3	Armenian Hamster IgG1	BD Biosciences
NK-1.1	PK136	Mouse IgG2a	BD Biosciences
CD11c	HL3	Armenian Hamster IgG1	BD Biosciences
CD86	GL1	Rat IgG2a	BD Biosciences
IFN- γ	XMG1.2	Rat IgG1	BD Biosciences
CD8a	53-6.7	Rat IgG2a	BD Biosciences

2.1.7 Fluoreszenzfarbstoffe und Lumineszenz-Substrate

Bezeichnung	Hersteller
Annexin-V-Fluos	Roche (Mannheim)

Cell Titer Blue®	Promega (Madison (USA))
Hoechst H 33258	Hoechst (Frankfurt)
D-Luciferin firefly	Caliper (Hopkinton (USA))
CFSE	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.8 Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
TransIT LT-I	Mirus (Madison (USA))

2.1.9 Enzyme zur Manipulation von DNA

Enzym	Hersteller
DNase I	Roche (Mannheim)
DreamTaq™ DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq DNA Polymerase	Promega (Madison (USA)), Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.10 Restriktionsenzyme

Name	Erkennungs- Sequenz (Schnitt- stelle mit gekenn- zeichnet)	Terminus-Typ	Firma
BamHI	G GATCC	5'-Überhang	NEB (Frankfurt)
NotI	GC GGCCGC	5'-Überhang	NEB (Frankfurt)
SalI	G TCGAC	5'-Überhang	NEB (Frankfurt)
XhoI	C TCGAG	5'-Überhang	NEB (Frankfurt)

2.1.11 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel	Firma
--------------	---------------	---------------	-------

Ampicillin	100 mg/ml	H ₂ O	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Blasticidin	10mg/ml	PBS	Carl Roth (Karlsruhe)

2.1.12 Nukleinsäuren

2.1.12.1 Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')
DTR: forward primer	ATATATGTCGACGCCAC- CATGCTCCCGGCCATGGCCATGGCC
DTR: reverse primer	ATATATGCGGCCGCCTT- GTACAGCTCGTCCATGCCGAG
Firefly-Luciferase: forward primer	ATATATGTCGACGCCAC- CATGGCCGATGCTAAGAACATTAAGAAG
Firefly-Luciferase: reverse primer	ATATATGCGGCCGCTTAGACGTT- GATCCTGGCGCT
SIINFEKL (Ova): forward primer	ATATATGTCGACGCCAC- CATGGGCTCCATCGGTGCAGCA
SIINFEKL (Ova): reverse primer	ATATATGCGGCCGCTTAAGGG- GAAACACATCTGCCAAAGAA

Alle Oligonukleotid-Synthesen wurden durch Metabion international, Planegg-Martinsried durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden in entsalzter und lyophilisierter Form geliefert. Sie wurden in reinem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert. Für die Verwendung in der PCR wurde die Aufbewahrungslösung 1:10 in reinem Wasser verdünnt.

2.1.13 Plasmide

2.1.13.1 pLenti6-EF1a

Der von Invitrogen bezogene pLenti6 wurde von Jonas Dörr und Lars Nolden (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) durch Einführung des EF1a-Promotors und des posttranskriptionalen regulatorischen Elements des Marmeltier Hepatitis Virus

(WPRE) verändert. Das WPRE-Element erhöht die RNA-Stabilität und vermittelt so eine höhere Expressionsrate des Transgens (Zufferey et al., 1999).

2.1.13.2 Programme

Zur Erstellung von Plasmidkarten, Finden von Restriktionsschnittstellen und Vorhersage von Restriktionsfragmenten sowie zum Sequenzvergleich von Sequenzierungsergebnissen wurde das Programm ApE (A plasmid Editor) von M. Wayne Davis verwendet.

Zur inversen Komplementierung von DNA-Sequenzen wurde das Java-basierte Sequenzmanipulationstool der Colorado State University verwendet (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/manip/>).

Schmelztemperaturen der Primer wurden mit einem Programm der Northwestern university medical school (Chicago) berechnet. (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

2.1.14 Weitere Kits

Kit	Hersteller
innuPREP Micro RNA Kit	Analytic Jena (Jena)
innuPREP PCR pure Kit	Analytic Jena (Jena)
PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
BrdU Flow Kit – FITC	BD Biosciences
CD8a (Ly-2) MicroBeads mouse	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

2.1.15 Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung
HEK293T Zellen	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, bezogen von Invitrogen (Darmstadt)
humane Primärzellen	isoliert aus Buffy Coats von gesunden Spendern, bezogen vom Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (Bonn)
RMA Zellen:	NK-Zellhybridoma (H2Kb) (Gays et al., 2000)
RMAmOva Zellen:	NK-Zellhybridoma, das das Neo-Antigen Ova exprimiert.
B3Z-Zellen:	CD8 ⁺ -T-Zellhybridoma, dessen T-Zellrezeptor spezifisch das SIINFEKL-Peptid von Ovalbumin erkennt. Bei Aktivierung produzieren die Zellen IL-2.
ID8-Zellen:	„Mouse ovarian surface epithelial cells“, murine Ovarialepithelzellen, die nach multiplen Passagen tumorähnliches Verhalten zeigen und fähig sind in immunkompetenten Mäusen Tumoren zu induzieren (Roby et al., 2000). Die Zellen wurden uns im Rahmen eines MTA von Dr. Katherine F. Roby zur Verfügung gestellt.
OTI-Zellen:	CD8 ⁺ -Zellen, deren T-Zell-Rezeptoren spezifisch das SIINFEKL-Peptid von Ovalbumin erkennen; isoliert aus Milzen und Lymphknoten von OTI-RAG-Mäusen.
IGROV-Zellen:	Humane Ovarialkarzinomzellen (Bénard et al., 1985) freundlicherweise bereitgestellt von Juan José Hernando

2.1.16 Verwendete Mauslinien:

Wildtyp Linien	Beschreibung
C57BL/6N und J	Inzuchtstamm mit dem MHC I-Haplotyp H2K ^b , aus eigener Zucht oder bezogen von Jackson Laboratory
Transgene Linien	Beschreibung

MDA-5-/-	MDA-5-Gen defiziente Mauslinie, aus eigener Zucht
TLR-3-/-	TLR-3-Gen defiziente Mauslinie (Alexopoulou et al., 2001)
OTI-RAG-Maus	OTI-transgene Maus, deren CD8 ⁺ -Zellen T-Zell-Rezeptoren exprimieren, die spezifisch das SIINFEKL-Peptid von Ovalbumin erkennen (Kelly et al., 1993)

Alle Versuchstiere wurden im „Haus für Experimentelle Therapie“ (HET) oder IMMEI am Universitätsklinikum Bonn unter „specific pathogen free“-Konditionen gezüchtet und gehalten. Die Mäuse waren zu Beginn der Versuche 6-8 Wochen alt.

2.2 Zellbiologische Methoden:

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Arbeit mit den Zelllinien wurde unter Sterilbanken durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Medien gebraucht. Bei allen Arbeiten wurden Einmalhandschuhe getragen.

2.2.2 Kultivierung von Zellen und ihre Passagierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in CO₂-begasteten Brutschränken (5 % CO₂ v/v) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit unter Verwendung der entsprechenden Kulturmedien. Durch den in den verwendeten Medien enthaltenen pH-Indikator Phenolrot, der bei pH 7,4 eine hellrote Färbung hervorruft, konnte die Mediumqualität durch Inspektion begutachtet werden. Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden regelmäßig verdünnt und mit neuem Medium versehen.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurden 95 µl Trypanblau(1:10 (v/v) Verdünnung der 0,4 % Stocklösung in PBS) mit 5 µl Zellsuspension gemischt. Anschließend wurden 10 µl dieser Mischung in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Die Trypanblau-Färbung diente dabei zur Bestimmung der Vitalität der Zellen. Die vitalen Zellen wurden in vier Großquadraten unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung gezählt und anschließend der Mittelwert der gezählten Zellen gebildet. Die Gesamtzell-

zahl der Zellsuspension wurde dann mit folgender Formel berechnet: $Z \text{ [Zellen/ml]} = N \times f \times 10^4$ mit Z = Zellzahl, N = vitale Zellen in einem Großquadrat und f = Verdünnungsfaktor.

2.2.4 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die je $0,5-2 \times 10^7$ Zellen in 1ml Einfriermedium aufgenommen und in je ein Kryoröhrchen pipettiert. Diese Röhrchen wurden anschließend in einem Einfrierbehälter für mindestens 24h auf -80°C gekühlt und dann zur Endlagerung in eine -150°C Gefriertruhe überführt. Die so kryokonservierten Zellen konnten nun bei 37°C wieder aufgetaut werden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen sofort mit dem entsprechenden Kulturmedium gewaschen und dann 10 min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.2.5 Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Zur Isolation humaner peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs) wurde das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Dieses Prinzip beruht darauf, dass sich die verschiedenen Bestandteile des Blutes aufgrund der Dichteunterschiede während des Zentrifugierens in unterschiedliche Phasen auftrennen. Dazu wurde das Lymphozytenseparationsmedium Biocoll verwendet. Biocoll hat eine spezifische Dichte von $1,077 \text{ g/ml}$, weshalb sich bei einer Dichtegradientenzentrifugation die PBMCs an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Biocoll anreichern. Während Thrombozyten sich in der Serumschicht oberhalb davon befinden, sedimentieren Eosinophile, Neutrophile und Erythrozyten unter die Biocoll-Schicht. Durch Entnehmen der Phase zwischen Blutserum und Biocoll können somit die PBMCs von den übrigen Zellen getrennt werden. Zur Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation wurde zunächst Blut aus Buffy Coats im Verhältnis 1:2 mit 0,9 % NaCl verdünnt. In 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 14 ml Biocoll vorgelegt. Dann wurden 25 ml des verdünnten Blutes langsam und äußerst vorsichtig auf das vorgelegte Biocoll geschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen bei RT bei 800 g 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennten sich nun, wie oben beschrieben, die verschiedenen Bestandteile des Blutes auf. Die PBMCs wurden mit einer Pipette gesammelt und in ein neues 50 ml-

Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde dann mit 0,9 % NaCl aufgefüllt und bei RT 10 min bei 450 g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Erylyse aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Dadurch wurden die im Zellpellet enthaltenen Erythrozyten lysiert. Nach einem Waschschrift mit 30 ml 0,9 % NaCl wurden die PBMCs in 50 ml 0,9 % NaCl aufgenommen und gezählt.

2.2.6 Isolation von humanen Monozyten

Aus den so gewonnenen humanen PBMCs konnten nun mittels dem MACS-Prinzip („magnetic cell sorting“) humane Monozyten isoliert werden. Dazu wurde das Monocyte Isolation Kit II human der Firma Miltenyi biotec verwendet. Dabei handelt es sich um ein indirektes magnetisches Markierungssystem. Es werden alle Zelltypen außer Monozyten (das heißt T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen und basophile Granulozyten) mit Biotin-konjugierten Antikörpern (monoklonale Antikörper gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glykophorin A) markiert. Im folgenden Schritt binden Anti-Biotin MicroBeads an diese Antikörper. Dann werden sie über eine in einem Magnetfeld stehende Selektionssäule gegeben, sodass alle markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden, während die unmarkierten Monozyten die Säule passieren und aufgefangen werden können (Prinzip der Negativselektion).

2.2.7 Isolierung von Knochenmarkszellen aus der Maus und Differenzierung zu myeloiden dendritischen Zellen (mDCs)

Nach Tötung der Mäuse durch Genickbruch wurden die Hinterlaufknochen entnommen. Anschließend wurde an beiden Enden der Knochen jeweils ein kleines Stück abgeschnitten. Der so eröffnete Knochenmarkskanal wurde dann mit Hilfe einer mit Medium gefüllten Spritze durchgespült und die nun mit Knochenmarkszellen angereicherte Spüllösung in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1500 U/min und RT zentrifugiert. Zur Lysierung der im Zellsediment enthaltenen Erythrozyten wurden die Zellen in 10 ml Erylyse aufgenommen und 5-10 min bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen über ein 40 µm-Zellsieb gegeben. Für die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu mDCs wurden die Zellen in Petrischalen ausgesät und in Vollmedium mit 3 % GM-CSF kultiviert. 4 Tagen später wurden pro Schale 6 ml frisches Medium vorsichtig zugefügt. Nach einer

Inkubationszeit von insgesamt 7 Tagen konnten die Zellen geerntet werden. Dazu wurden die Überstände in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Adhärente Zellen wurden durch Inkubation mit PBS+5 mM EDTA gelöst. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C wurde das erhaltene Zellpellet in Medium aufgenommen und die Zellen gezählt.

2.2.8 Isolation von murinen OTI-Zellen

Zur Isolation von murinen OTI-Zellen wurden die Milz und die Lymphknoten von OTI-RAG-Mäusen durch ein Gaze-Sieb gedrückt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 10 ml Erylyse resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Falcon mit PBS aufgefüllt, die Suspension wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die CD8a⁺-Zellen mit einem indirekten magnetischen Markierungssystem („magnetic cell sorting“, MACS) isoliert. Dazu wurden die CD8a⁺-Zellen zunächst mit CD8a MicroBeads markiert. Dann wurde die Zellsuspension auf eine MACS-Säule gegeben, die in das magnetische Feld eines MACS-Separators platziert wurde. Dabei wurden die markierten CD8a⁺-Zellen in der Säule festgehalten, die unmarkierten Zellen flossen durch die Säule. Nachdem die Säule aus dem magnetischen Feld genommen wurde, konnten die CD8a⁺-Zellen eluiert werden. Diese Arbeitsschritte wurden gemäß der Herstellerangaben (Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)) durchgeführt.

2.2.9 Stimulation von Zellen mit Nukleinsäuren

2.2.9.1 Transfektion von Nukleinsäuren mit TransIT-LT1 Transfection Reagent

Mit dem Transfektionsreagenz TransIT-LT1 von Mirus ist es möglich, Nukleinsäuren in das Zytoplasma von Zellen zu transferieren. Für die Stimulation der ID8-Zellen in 96-Well-Platten wurden zunächst in ein Well mit 50 µl Optimem die gewünschte Menge der zu transfizierenden DNA/RNA (3pRNA, poly (I:C), poly(dAdT), poly A) pipettiert. In ein anderes Well wurden 50 µl Optimem mit dem Transfektionsreagenz TransIT-LT1 gemischt. Die Menge des Transfektionsreagenzes betrug dabei stets die dreifache Menge der verwendeten DNA/RNA. Anschließend wurde das in Optimem verdünnte Transfektionsreagenz auf die vorgelegte Nukleinsäure-Lösung gegeben. Dieser Stimulationsan-

satz wurde dann 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann 18-48 h im Brutschrank gelagert. Dann konnten die Überstände zur weiteren Analyse entnommen bzw. die Zellen untersucht werden.

2.2.10 Hypochlorsäurebehandlung von Zellen

Für die Hypochlorsäurebehandlung wurden die Zellen (ID8 oder IGROV) in einer 96-Well-Platte ausgesät und für ca. 18 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und Reste des Mediums durch einen Waschschrift mit PBS gewaschen. Durch Verdünnung der NaOCl-Stock-Lösung (Sigma-Aldrich) mit PBS, wurden HOCl-Lösungen der gewünschten Konzentration (5-1000 μM) hergestellt. Von dieser HOCl-Lösung wurden 200 μl pro Well pipettiert. Diese Tumorzellsuspension wurde dann für 1 h im Brutschrank inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS wurde die HOCl-Lösung von den Zellen entfernt. Anschließend wurden die Zellen weiter behandelt oder analysiert.

2.3 Immunfluorometrische Methoden

2.3.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer – allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse („Fluorescence Activated Cell Sorting“) ist ein Verfahren, durch das Zellen nach Größe, Granularität und Oberflächenantigenen dargestellt und quantifiziert werden können. Das Prinzip beruht dabei auf der Markierung von Molekülen mittels Antikörper-gebundener Fluorochrome. Die zu untersuchenden Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch eine Messkammer geführt. Durch einen Laserstrahl werden, je bei einer bestimmten Wellenlänge (Extinktion), die Fluorochrome angeregt. Dann wird die aufgenommene Energie als Licht abgegeben (Emission). Dieser Vorgang kann durch sogenannte Photomultiplier detektiert werden. Verwendet wurde das Durchflusszytometer LSR II der Firma BD Biosciences mit der Software FACS Diva. Die Auswertung wurde mit der Software Flowjo durchgeführt.

2.3.2 Markierung von Oberflächenantigenen

Für die FACS-Analyse wurden 2×10^5 Zellen in eine 96-Lochrundbodenplatte gegeben, bei 1500 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit dem erforderlichen Antikörper gefärbt. Dazu wurde der Antikörper in ca. 20 μ l FACS-Puffer aufgenommen und auf die jeweilige Probe gegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4 °C wurden die nicht gebundenen Antikörper durch einen Waschriff mit 200 μ l FACS-Puffer entfernt. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen in 50 μ l FACS-Puffer aufgenommen.

2.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion mit Propidium-Iodid

Der Fluoreszenz-Farbstoff Propidiumiodid besitzt die Eigenschaft, nach Permeabilisierung der Zelle in den Zellkern gelangen und an die DNA binden zu können. Dies ermöglicht es, den DNA-Gehalt von Zellen mittels FACS-Analyse zu bestimmen. Durch den DNA-Verlust von apoptotischen Zellen erscheinen diese im Histogramm links des G0/G1-DNA-Peaks und bilden somit den subG0/G1-Peak.

Die ID8-Zellen wurden hierfür mithilfe von Trypsin von der 96-Well-Platte abgelöst und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und anschließend 1 ml 100%iges eiskaltes Ethanol hinzugefügt. Nach 1 h auf dem Schüttler und zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 1 ml kaltem FACS-Puffer resuspendiert. Im Folgenden wurden pro Probe 100 μ l der DNA-Färbelösung hinzugefügt. Diese setzt sich aus 200 μ g/ml RNase A und 10 μ g/ml Propidiumiodid zusammen. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT konnten die Zellen per Durchflusszytometrie analysiert und so der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt werden.

2.3.4 BrdU-Inkorporationsassay

Der BrdU-Inkorporationsassay wurde zur Bestimmung der in vivo Proliferationsrate von NK-Zellen benutzt. Bei diesem Assay beruht die Quantifizierung der Zellproliferation auf der Messung des Basenanalogs 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), das während der Zellteilung anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird.

Zur Durchführung wurde den Mäusen 1 mg BrdU intraperitoneal injiziert. Nach 3 h wur-

de der Peritonealraum ausgespült, Milz und Lymphknoten rausgenommen und Einzellsuspensionen hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit dem für NK-Zellen typischen fluoreszierenden Antikörpern NK1.1 markiert. Die Zellen wurden dann mit dem BD Cytofix/Cytoperm Puffer nach Angaben des Herstellers fixiert und permeabilisiert und mit DNase behandelt, um die BrdU-Epitope zu exponieren. Im Folgenden wurden die Zellen mit anti-BrdU Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.3.5 CFSE-Proliferationsassay

CFSE (Carboxyfluorescein Diacetat N-Succinimidyl Ester) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der bei Zellteilungen gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt wird und sich somit in der Fluoreszenzintensität halbiert. Diese Eigenschaft erlaubt es, jede neue Generation von Tochterzellen mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren. Chemisch gesehen handelt es sich bei CFSE um ein kleines lipophiles Molekül, das in seiner ursprünglichen Form nicht-fluoreszierend ist und leicht durch die Zellmembran ins Zytoplasma diffundiert. Dort werden durch eine Esterase die Acetylgruppen entfernt. Dadurch wird das Molekül so verändert, dass es stark fluoreszierend ist und die Zellmembran nicht länger passieren kann. Proliferiert die Zelle, wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt.

In dieser Arbeit sollte CFSE zum Nachweis der Proliferation von OTI-Zellen dienen. Dies sind CD8⁺-T-Lymphozyten, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor besitzen, der spezifisch das SIINFEKL-Peptid von Ovalbumin erkennt. In diesem Versuch sollten die OTI-Zellen durch LucOva-transgene ID8-Zellen, die durch murine Dendritische Zellen präsentiert wurden, zur Proliferation angeregt werden. Dadurch sollte die Funktionalität der LucOva-transgenen ID8-Zellen geprüft werden. Nach Isolation der OTI-Zellen aus Milz und Lymphknoten von OTI-RAG-Mäusen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, gezählt und dann in 10 ml PBS aufgenommen. Aus im Brutschrank vorgewärmten PBS und CFSE wurden 10 ml einer 2 µM CFSE-Lösung hergestellt, sodass nach Zugabe der 10 ml Zellsuspension eine CFSE-Endkonzentration von 1 µM entstand. Diese Mischung wurde dann für exakt 10 min im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Färbung wurden dann 5 ml kaltes FCS zugegeben und das Falcon mit kaltem PBS aufgefüllt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in T-Zell-Medium aufgenommen. Die Kokultur aus ID8-Zellen und murinen Dendritischen Zellen wurde ebenfalls in

T-Zell-Medium aufgenommen und pro Well 100.000 OTI-Zellen hinzugefügt. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen per Durchflusszytometrie analysiert werden. Dazu wurden die Zellen zusätzlich noch mit einem CD8a-Antikörper angefärbt. Kurz vor der Messung am Durchflusszytometer wurden noch 2 µl Hoechst pro 100 µl FACS-Puffer eingesetzt, um lebende Zellen von toten unterscheiden zu können.

2.3.6 Restimulation und intrazelluläre Interferon- γ -Messung

Um die Interferon- γ -Produktion von NK-Zellen nachzuweisen, müssen diese nach der Isolierung *in vitro* restimuliert werden. Dadurch werden allerdings nur schon voraktivierte Zellen zur Zytokinproduktion angeregt. Brefeldin A inhibiert die Zytokinsekretion und führt somit zu einer Anhäufung des Zytokins in der Zelle.

Aus murinen Milzen isolierte Zellen wurden für 4 h mit 50 ng/ml PMA, 250 ng/ml Ionomycin und 1 µg/ml Brefeldin A bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und nach Permeabilisierung der Zellen mit dem intrazellulären Interferon- γ -Antikörper angefärbt.

2.3.7 Messung der Zellviabilität mit CellTiter-Blue

Der CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay wurde verwendet, um die Viabilität von Zellen nach der Stimulation mit Nukleinsäuren oder nach Hypochlorsäurebehandlung zu bestimmen. Das Prinzip beruht auf dem im CellTiter-Blue[®]-Reagenz enthaltenen blauen Farbstoff Resazurin. Dieser wurde im Verhältnis 1:10 direkt auf die Zellkultur gegeben. Dadurch wurde das Kulturmedium blau gefärbt. Lebende, metabolisch aktive Zellen setzen Resazurin in den pink-farbenen, fluoreszenten Farbstoff Resorufin um. Sterbende Zellen können hingegen den Farbstoff nicht umsetzen und erzeugen somit kein fluoreszentes Signal. Die Messung der Signals wurde am EnVision 2104 Multilabel Reader durchgeführt und erfolgte nach ca. 1-4h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank, wenn die Zellkulturüberstände der unbehandelten Zellen eine pinke Färbung aufwiesen. Das Fluoreszenzsignal entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

2.4 Quantifizierung der Zytokinproduktion

Gebildete Zytokine wurden mittels „Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay“ (ELISA) und durch intrazelluläre Färbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern und Analyse im Durchflusszytometer quantifiziert.

2.4.1 Elisa zur Bestimmung der murinen Zytokine IL-6 und IP-10

Zur Bestimmung der IL-6- und IP-10-Konzentration im Überstand stimulierter ID8-Zellen wurde der ELISA verwendet. Dem Verfahren liegt das Prinzip des Sandwich-ELISA zugrunde: Die Wells einer 96-Loch-ELISA-Platte werden über Nacht mit einem Erstantikörper gegen das zu bestimmende Zytokin beschichtet. Ein Zweitantikörper, der an ein Farbstoffsubstrat umsetzendes Enzym (Peroxidase) gekoppelt ist, kann an ein weiteres Epitop des vom Erstantikörper gebundenen Zytokins binden. Somit ist die Menge gebundener Peroxidase proportional zum enthaltenen Zytokin. Nach Zugabe eines Substrats findet in den Wells, in denen Peroxidase vorhanden ist, eine Farbreaktion statt. Es entsteht eine blaue Lösung. Die Reaktion kann durch Zugabe von 2 N H₂SO₄ gestoppt werden, wodurch eine gelbe Lösung entsteht. Der Substratumsatz ist durch die Änderung der optischen Dichte mittels eines speziellen ELISA-Readers messbar. Durch Vergleich mit einer Standardkurve lassen sich nun Rückschlüsse auf die Konzentration des im Überstand enthaltenen Zytokins ziehen.

Zur Messung der murinen Zytokine IL-6 und IP-10 wurde die 96-Loch-ELISA-Platte mit je 50 µl Erstantikörper-Lösung pro Well beschichtet und über Nacht bei 4 °C (IL-6) bzw. RT (IP-10) inkubiert. Als Beschichtungspuffer für den IL-6-ELISA wurde eine 0,1 M Natriumcarbonat-Lösung mit pH 9,5 und für den IP-10-ELISA 1 x PBS verwendet. Nach Entfernung der Antikörper-Lösung und Ausklopfen der Platte wurde sie einmal (IL-6) bzw. dreimal (IP-10) mit 150 µl Waschpuffer (1 x PBS mit 0,05 % Tween 20) pro Well gewaschen. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung wurden die Wells anschließend mit jeweils 50 µl Assay-Puffer (1 x PBS mit 10 % FCS (IL-6) bzw. mit 1 % BSA (IP-10)) geblockt und für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 50 µl der Proben wurden in der gewünschten Verdünnung in die Wells der 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert. Um am Ende die Zytokinproduktion quantifizieren zu können, wurde eine 8-punktige 1:2 Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Standardzytokins inklusive Leerkontrolle hinzugefügt. Die Proben sowie das Stan-

dardzytokin wurden dazu mit dem jeweiligen Assay-Puffer verdünnt. Nach 2 h Inkubation bei RT wurden die Überstände wieder aus der ELISA-Platte entfernt und es wurde fünfmal (IL-6) bzw. dreimal (IP-10) gewaschen. Für den IL-6-ELISA wurden danach 50 µl einer Zweitantikörper/HRP-Konjugatlösung („horse radish peroxidase“) pro Well zugegeben und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Falle des IP-10-ELISA wurde dagegen zunächst nur der Detektionsantikörper in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung für 2 h aufgetragen und erst dann nach dreimaligem Waschen für weitere 30 min 50 µl der HRP-Konjugatlösung. Nach Entfernung der Zweitantikörper/HRP-Konjugatlösung und siebenmal Waschen konnte der ELISA entwickelt werden. Nach Zugabe von 50 µl Substratlösung pro Well wurde die ELISA-Platte im Dunkeln bei RT etwa 15 min inkubiert. Durch enzymatische Umsetzung des Substrats entstand eine Blaufärbung. Bei ausreichender Blaufärbung wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ pro Vertiefung abgestoppt. Mit Hilfe eines ELISA-Readers konnte nun die Farbintensität bei 450 und 570 nm gemessen und daraus die Zytokinkonzentration berechnet werden.

2.4.2 ELISA zur Bestimmung des murinen IL-2

Pro Well wurden 100 µl des Erst-Antikörpers Anti-IL-2 in Coating-Puffer (0,1 M NaHCO₃, pH 8,2) in einer Konzentration von 1 µg/ml in eine ELISA-Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde mit 200 µl pro Well PBS/1% FCS für mindestens 1 h bei RT geblockt. Anschließend wurde dreimal gewaschen und die Proben und der Standard in je 100 µl Medium aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschriffe, dann wurden je 100 µl Detektor Antikörper Biotin-Anti Maus IL-2 verdünnt in PBS/1% FCS aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschriffen wurde die Peroxidase 1:1000 in PBS verdünnt und 100 µl pro Well aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe der Substratlösung. Nach ca. 10-15 min Entwicklungszeit bei RT und im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion am Elisa-Reader bei 450 und 570 nm gemessen.

2.4.3 ELISA zur Bestimmung des murinen IFN-α

Zur quantitativen Bestimmung von murinem IFN-α wurde eine 96-Loch-ELISA-Platte mit je 50 µl Erstantikörper-Lösung pro Well beschichtet. Der Erstantikörper RMMA-1 (1

mg/ml) wurde dazu 1:1000 in 0,2 M Natriumphosphat-Beschichtungspuffer mit pH 6,5 verdünnt. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C und Ausklopfen der Platte zur Entfernung der Antikörper-Lösung wurde die ELISA-Platte dreimal mit 150 µl Waschpuffer (1 x PBS mit 0,05 % Tween 20) pro Well gewaschen. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung wurde die Platte anschließend mit jeweils 150 µl Assay-Puffer (PBS mit 10 % FCS und 0,05 % Sodiumazid) pro Well geblockt und 3 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit 150 µl Waschpuffer pro Well wurden jeweils 50 µl der Proben und der Standard aufgetragen. Die 8-punktige 1:2 Verdünnungsreihe des rekombinanten IFN- α -Standards wurde mit dem Medium angesetzt, das auch zur Kultivierung der Zellen verwendet worden war. Anschließend wurden die Proben und der Standard für mindestens 16 h bis maximal 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung der Überstände und drei Waschschritten wurde in die ELISA-Platte ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-IFN- α -Detektionsantikörper in einem Volumen von 50 µl pro Well pipettiert. Dazu wurde der Detektionsantikörper (80 NU/µl) 1:1000 in Assay-Puffer (1 x PBS mit 10 % FCS und 0,05 % Sodiumazid) verdünnt. Nach 3 h Inkubation bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C und Entfernen der Detektionsantikörper-Lösung wurde die ELISA-Platte fünfzehnmal mit 150 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und ein HRP-konjugierter Zweitantikörper aufgetragen. Bei diesem Zweitantikörper handelt es sich um eine Esel-anti-Kaninchen-F(ab)²-Peroxidase, die 1:10000 in Assay-Puffer (1 x PBS mit 10 % FCS ohne Sodiumazid) verdünnt wurde und in einem Volumen von 50 µl pro Well auf die ELISA-Platte pipettiert wurde. Während einer Inkubationszeit von 3 h im Dunkeln bei RT auf dem Schüttler konnte der Zweitantikörper an den Detektionsantikörper binden. Nach zwölfmaligem Waschen konnte der ELISA entwickelt werden. Zur Entwicklung wurden 50 µl Substratlösung pro Well pipettiert und die ELISA-Platte im Dunkeln bei RT 5-30 min inkubiert, bis die ersten fünf Standardverdünnungen anhand der Blaufärbung zu unterscheiden waren. Durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ pro Well wurde die Farbreaktion gestoppt und die Platte umgehend im ELISA-Reader bei 450 und 570 nm gemessen. Über den Vergleich mit der Standardkurve konnte nun die Zytokin-konzentration der untersuchten Überstände bestimmt werden.

2.4.4 ELISA zur Bestimmung von humanem IFN- α

Zur Quantifizierung der Konzentration von humanem IFN- α in Überständen wurde ein ELISA verwendet, dessen Durchführung etwas von dem beim „Elisa zur Bestimmung der murinen Zytokine“ beschriebenen Protokoll abwich.

Nach Inkubation der ELISA-Platte über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper, Ausklopfen der Platte und Blockung mit Assay-Puffer für 1h bei RT, wurde die Platte dreimal gewaschen. Dann wurde gleichzeitig mit den verdünnten Proben (je 50 μ l) und der Standardreihe (50 μ l) 25 μ l der HRP-Konjugat-Lösung pro Well auf die ELISA-Platte aufgetragen und es wurde 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die ELISA-Platte dreimal gewaschen, das Substrat zugegeben und mit 2 N H₂SO₄ die Farbreaktion abgestoppt, um die Farbintensität zu detektieren.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) dient zur Amplifizierung linearer DNA. Dazu werden benötigt: die DNA, die den zu vervielfältigenden Bereich (Template) enthält, zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden Bereich begrenzen, eine hitzestabile DNA-Polymerase zur Replikation des zu vervielfältigenden Abschnitts, Oligonukleotide als Bausteine für den neuen DNA-Strang, Mg²⁺-Ionen für die Funktionsfähigkeit der DNA-Polymerase sowie eine Pufferlösung, die für eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sorgt.

Die PCR läuft in drei verschiedenen Schritten ab: Denaturierung, Annealing und Elongation. Durch Erhitzen des Reaktionsansatzes wird bei der Denaturierung der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge aufgeschmolzen. Beim Annealing hybridisieren die Primer spezifisch an das Template. Während der Elongation findet die von den Primern ausgehende Synthese des neuen DNA-Stranges statt. Dieser Zyklus läuft nun mehrmals ab. Dabei wird das Template exponentiell vermehrt.

2.5.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Mit Hilfe des innuPREP PCRpure Kit der Firma Analytik Jena wurden die PCR-Produkte nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Um die PCR-Fragmente an einen Säulenfil-

ter binden zu können, wurde dafür zunächst ein Bindungspuffer zum PCR-Reaktionsansatz gegeben. Danach wurden sie mit einem dafür vorgesehenen Puffer eluiert.

Anschließend erfolgte eine Ethanolpräzipitation, bei der den PCR-Produkten 3 Volumen 100 % Ethanol sowie 1/10 Volumen Natriumazetat zugesetzt wurden. Nach Inkubation des Ansatzes für 5 min bei - 80 °C und anschließender Zentrifugation für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und 500 µl 70 % Ethanol zum Waschen der sedimentierten PCR-Produkte zugegeben. Es wurde nochmals 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sediment getrocknet. Dann konnten die PCR-Produkte in H₂O aufgenommen werden. Nach Bestimmung ihrer Konzentration konnten die Produkte bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C aufbewahrt werden.

2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dem Nachweis von Nukleinsäuren, insbesondere der Analyse von PCR-Produkten. Die Methode beruht darauf, dass DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativ geladenen Polarität bei neutralem pH-Wert in einem elektrischen Feld von der Anode zur Kathode wandern. Dazu werden die Fragmente mit einem Puffer gemischt und in die Taschen einer festen Agaroseplatte pipettiert. In dem an der Agaroseplatte angelegten elektrischen Feld werden die DNA-Fragmente nun ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Laufgeschwindigkeit hängt dabei von der Agarosekonzentration des Gels, von der elektrischen Spannung, von der Größe und der Konformation der DNA ab. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente können diese mittels SYBR[®] Safe DNA gel stain nachgewiesen werden. SYBR[®] Safe DNA gel stain ist eine weniger mutagene, grün-fluoreszierende Alternative zur herkömmlichen Ethidiumbromid-Färbung.

Die Herstellung eines 1 %igen Agarosegels erfolgte durch Aufkochen von 1 g Agarose und 100 ml 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle. Nach ca. 90 s wurde die in einem Erlenmeyerkolben enthaltene Lösung kurz geschwenkt und dann noch ein weiteres Mal kurz aufgekocht, bis eine homogene Lösung entstand. Diese Agaroselösung wurde dann in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Zur Aussparung der Geltaschen für die Proben wurde ein Kamm eingesetzt. 2,5 µl SYBR[®] Safe DNA gel stain (40000 x) wurden gleichmäßig in der Lösung verteilt. Nach Aushärtung des Gels wurde der Kamm vorsich-

tig entfernt und das Gel samt Gelschlitten in eine mit 1 x TAE gefüllte Kammer gelegt. Dann konnten die Taschen mit den DNA-Proben zusammen mit 1/6 Volumen Ladepuffer (6 x) befüllt werden. Außerdem wurden zusätzlich 5µl des Größenstandards in einer Extratasche auf das Gel aufgetragen, um eine spätere Größenabschätzung der erhaltenen Banden zu ermöglichen. Die Gelelektrophorese wurde für ca. 45 min bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der erhaltenen Banden wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt.

2.6 Virologische Methoden

2.6.1 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Hitzeschock-Transformation wurden 50 µl chemokompetenter *E. coli* in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,2 bis maximal 5 µl Plasmid-Lösung 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde ein 45 Sekunden dauernder Hitzeschock in einem 42°C heißen Wasserbad durchgeführt. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis, wurden 950 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz wurde bei 37 °C und 1050 rpm im Heizschüttler für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 30 s bei 10.000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und 100 µl der Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und per 4-Zonen-Verdünnungsausstrich verteilt.

2.6.2 Anzucht von *Escherichia coli* Stämmen

Die Agarplatten mit den transformierten Bakterien wurden über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überimpft, welches vorher mit je 1 ml TB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum befüllt worden war. Die Anzucht erfolgte unter Schütteln (1050 rpm) bei 37°C. Am folgenden Tag konnten die Bakterien geerntet und die Plasmid-DNA isoliert werden.

2.6.3 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Miniprep)

Mit einer Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Miniprep) konnten die nach der Transformation gewachsenen Bakterienkolonien überprüft werden. Hierzu wurden die

Zellen der Übernachtskultur abzentrifugiert und eine Plasmid-Präparation gemäß Herstellerangabe (PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit von Invitrogen) durchgeführt. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend einer Restriktionsanalyse unterzogen, um die Bakterien-Klone, die das korrekte Plasmid enthielten, zu identifizieren.

2.6.4 Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (Midiprep)

Um Plasmid-DNA mit einer größeren Ausbeute und Reinheit zu isolieren, wurde eine Übernachtskultur 1:100 in 400 ml LB-Medium verdünnt und mit dem geeigneten Antibiotikum für mindestens 8 Stunden kultiviert. Für die Plasmid-Isolation wurde das PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) nach den Vorschriften des Herstellers eingesetzt. Mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung wurden die präparierten Plasmide überprüft.

2.6.5 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Zum Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen (BamHI, Not, Xho, Sall) wurde in einem Reaktionsansatz die gewünschte Menge der DNA mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an Enzym und entsprechendem Puffer vermischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert und zur Charakterisierung der entstandenen Banden auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.6.6 Isolation von Plasmid-Restriktionsfragmenten und PCR-Produkten aus Agarosegelen

Die gewünschten Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, abgewogen und mit dem innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena) nach Herstellervorgaben isoliert.

2.6.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die eingesetzte T4 DNA-Ligase (Fermentas) ist ein Enzym, das unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe katalysiert. Somit können linearisierte DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden verknüpft werden. Durch den Einbau von DNA-Fragmenten in aufgeschnittene

Vektoren entstehen so modifizierte zyklische Plasmide. Für die Durchführung der Ligasereaktion wurden die beiden zuvor mit Restriktionsenzymen aufgeschnittenen DNA-Fragmente mit der T4-Ligase und dem entsprechenden Ligase-Puffer zusammenpipettiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C.

2.6.8 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 600 ng Plasmid mit 20 pmol Sequenzierungsprimer mit 10 mM Tris pH 8,5 in einem Gesamtvolumen von 7 µl H₂O in einem 0,2 ml-PCR-Gefäß verschickt.

2.6.9 Herstellung der Lentiviren

Für die Produktion der Lentiviren wurden der Vektor pLenti6-EF1a, das Verpackungsplasmid psPAX2 der zweiten Generation (Addgene Plasmid 12260, Didier Trono) sowie das Hüllplasmid pMD2.G (Addgene Plasmid 12259, Didier Trono) mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode in HEK293T-Zellen transfiziert. Zunächst wurden dazu Petrischalen mit poly L-Ornithin beschichtet. Dies erhöht die Adhärenz der für die Virusproduktion dienenden HEK-Zellen an die Polystyroloberfläche. Die 100 x Stammlösung des poly L-Ornithins wurde dazu 1:100 in H₂O verdünnt und jeweils 5 ml pro Petrischale eingefüllt. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde das poly L-Ornithin wieder abgesaugt und die Petrischalen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Gelatine-Lösung in die Petrischalen gegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurde die Gelatine abgesaugt und die Schalen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Nun wurden je 4×10^6 HEK-Zellen mit 10 ml Medium in die Schalen gegeben. Nach 24 h waren die HEK-Zellen bereit zur lentiviralen Transfektion, wobei 1 h vorher das Medium gewechselt wurde. Um eine hohe Transfektionsrate zu gewährleisten, sollten die Zellen zu diesem Zeitpunkt idealerweise zu 50-70% konfluent sein.

Der Transfektionsansatz pro 10 cm-Petrischale setzte sich aus 15 µg lentiviralem Plasmid (pLenti6-EF1a), 10 µg Verpackungsplasmid (psPAX2) und 5 µg Hüllplasmid (pMD2.G) zusammen und wurde mit H₂O auf ein Volumen von 250 µl aufgefüllt. Dann wurden 250 µl 2 x HBS zugegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 37,5 µl 2 M CaCl₂ wurde der Ansatz gevortext. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei RT, dann wurde der Ansatz tropfenweise auf den HEK Zellen verteilt. Anschließend wurden die

HEK Zellen bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. 8 h später erfolgte ein Mediumwechsel. 24 h nach dem Mediumwechsel fand die Virusernte durch Abnahme des Zellüberstandes statt. Da sich die HEK Zellen in den mit poly L-Ornithin beschichteten Petrischalen nicht ablösten, konnte mit Medium nachgefüttert werden und nach 24 h erneut Viren geerntet werden. Der Überstand wurde 5 min bei 400 g und RT zentrifugiert, um Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand mit einer 10 ml-Spritze durch einen 0,45 µm-Sterilfilter gepresst und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei - 80 °C gelagert.

2.6.10 Herstellung von transduzierten Tumorzelllinien

Um ID8 mit den Lentiviren zu infizieren, wurden in einer 24-Well-Zellkulturschale $1,6 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, neues Medium mit 1:1000 Polybrene eingefüllt und pro Well 100-400 µl Virusüberstand zugefügt. Nach 24 und 48 h erfolgte ein Mediumwechsel. Bei letzterem wurde das Selektionsantibiotikum Blastocidin zugegeben. Seine Konzentration wurde so gewählt, dass untransduzierte Zellen nach 3-5 Tagen starben. Bei ID8 waren dies 2,5 µg/ml Blastocidin. Die Zellen wurden so lange kultiviert, bis genügend Zellen für die Generierung von Einzelzellklonen vorhanden waren.

2.6.11 Herstellung von Einzelzellklonen

Für die Herstellung von Einzelzellklonen der transduzierten ID8-Zellen wurden diese in einer Konzentration von 0,3 Zellen pro Well in eine 96-Well-Zellkulturschale ausgesät. Sie wurden unter Blastocidin-Selektion gehalten, wobei das Medium regelmäßig gewechselt wurde. Bei Anwachsen von Einzelzellklonen wurden diese hochgezüchtet, bis genügend Zellen für eine Testung der stabilen Transgen-Expression zur Verfügung standen.

2.6.12 Luciferase-Assay

Zur Testung der stabilen Transgen-Expression von Luciferase-transgenen Einzelzellklonen wurden 2×10^5 dieser Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 50 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl Luciferin-Substrat gemischt und die Lumineszenz sofort im

EnVision 2104 Multilabel Reader gemessen. Somit konnten funktionsfähige von unfunktionalen Klonen unterschieden werden.

2.6.13 Testung der DTR-transgenen Einzelzellklone

Dazu wurden in einer 96-Well-Platte je 2×10^4 Zellen der DTR-transgenen Einzelzellklone ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und dem neuen Medium 0-500 ng/ml Diphtherietoxin zugegeben (Ausgangskonzentration 200 ng/ μ l). Nach weiteren 24 h wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Blue-Tests bestimmt.

2.6.14 B3Z-T-Zell-Aktivierungs-Assay

Zur Testung der Ovalbumin-transgenen ID8-Zellen wurde ein B3Z-T-Zell-Aktivierungs-Assay durchgeführt. Dazu wurden in einer 96-Well-Platte 3×10^4 Zellen pro Well ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Dabei wurden RMAmOva-Zellen als Positivkontrolle und untransfizierte ID8-Zellen als Negativkontrolle mitgeführt. Am nächsten Tag wurden pro Well $1,2 \times 10^5$ B3Z-Zellen zugefügt. Nach 16 h wurden die Überstände abgenommen und ein IL-2-Elisa durchgeführt.

2.7 Maus in vivo Versuche

2.7.1 Isolation von Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und Peritonealraum

Nach Tötung der Mäuse durch Genickbruch wurde der Peritonealraum mittels einer mit PBS gefüllten 10 ml Spritze und einer 20G Kanüle ausgespült. Anschließend wurden Milz und Lymphknoten entnommen und von Fettgewebe gesäubert. Die frisch entnommenen Milzen und Lymphknoten wurden in Petrischalen mit einer Schere zerkleinert und für 30 min in eine Kollagenaseverdaulösung eingebracht. Die Inkubation im Brutschrank wurde mit 2 ml 0,1 M EDTA-Lösung und weiteren 10 Minuten bei 37° C abgestoppt. Diese Zellsuspensionen wurden mit dem Kolben einer 1 ml Spritze durch ein steriles 100 μ m Nylonsieb gerieben. Anschließend wurden die 50 ml Falcons mit PBS aufgefüllt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstands wurde das verbleibende Zellpellet in 10 ml Erylyse resuspendiert und für 5-10 min bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Falcon mit PBS aufgefüllt, die

Suspension wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension des Pellets in PBS wurde die Zellsuspension nochmals durch ein 100 µm Nygonsieb gefiltert und die Anzahl lebender Zellen in der Neubauer-Zählkammer durch Exklusion mit Trypan-Blau bestimmt. Anschließend konnten die Zellen mit den gewünschten Antikörpern markiert und per Durchflusszytometrie analysiert werden.

2.7.2 In vivo Zytotoxizitätstest

Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8⁺-T-Zellen in vivo. Dazu wurden RMA- und RMAmOva-Zellen mit CFSE differenziell gefärbt: Die RMAmOva-Zellen wurden mit einer hohen Konzentration CFSE gefärbt (2 µM), die RMA-Zellen mit einer niedrigen (0,2 µM). Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt. Es wurden je 2×10^7 Zellen dieses Gemischs in die zu untersuchenden Empfängermäuse injiziert. 4h später wurden die Mäuse geopfert, eine Peritoneallavage durchgeführt und die so erhaltenen Zellen per Durchflusszytometrie analysiert.

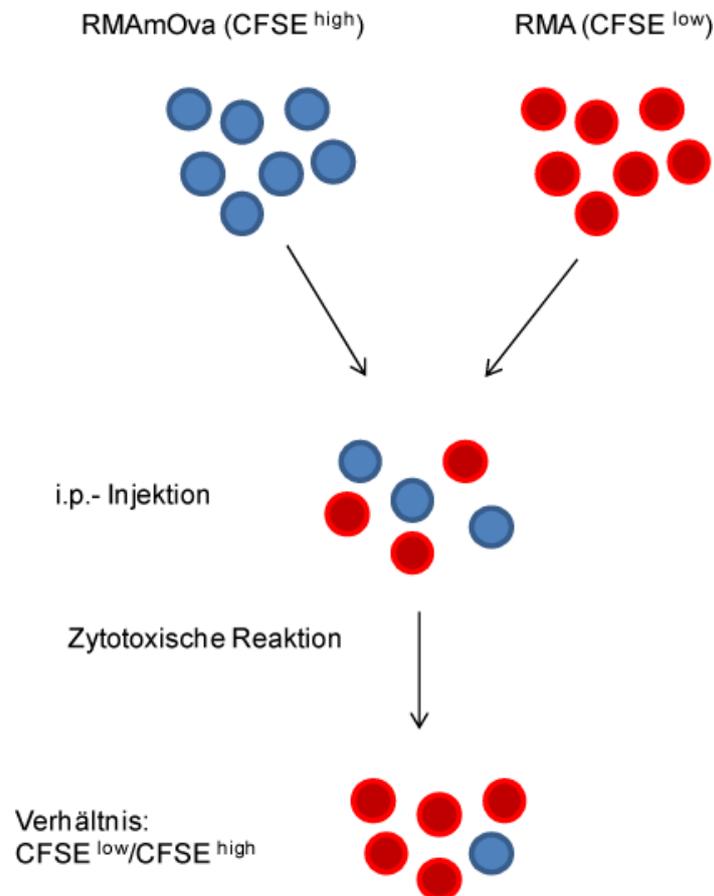


Abb. 6: Illustration des in vivo Zytotoxizitätstests

Die stark CFSE gefärbten RMAmOva-Zellen und die schwach CFSE gefärbten RMA-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Anschließend wurden 2×10^7 Zellen des Gemischs in die zu untersuchenden Empfängermäuse i.p. injiziert. Die spezifische Lyse der Zellpopulationen wurde nach 4h mittels durchflusszytometrischer Analyse des Verhältnisses von CFSE^{low}/CFSE^{high} ermittelt.

Anhand des Verhältnisses CFSE^{low}/CFSE^{high}-Zellen wurde die spezifische Lyse nach folgenden Formeln berechnet:

Verhältnis beider Populationen zueinander:

Ratio (R) = (Prozentsatz CFSE^{low}/Prozentsatz CFSE^{high})

Prozentsatz der spezifischen Lyse = „[1 – (R von nicht immunisierter Maus/R von immunisierter Maus) x 100]“

2.7.3 IVIS-Messung

Das IVIS Imaging-System ermöglicht es uns, in vivo Biolumineszenz zu detektieren, wie sie beispielsweise bei der Expression des Luciferasegens freigesetzt wird. In diesen Versuchen wurden Mäusen je 5×10^6 Luc-transgene oder LucOva-transgene ID8-Zellen intraperitoneal injiziert. Das IVIS Imaging-System erlaubte anschließend die nicht-invasive Quantifizierung des Tumorwachstums im Peritoneum nach der Injektion von Luciferin. Dazu wurden die Bäuche der Mäuse rasiert, um ein störendes Signal durch die Behaarung auszuschließen. Dann wurde den Mäusen 200 μ l einer 15 mg/ml-Luciferin-Lösung intraperitoneal gespritzt. Nach 5-10 min konnte nun das Biolumineszenz-Signal im IVIS Imaging-System gemessen werden.

2.8 Statistische Analysen

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung des Mittelwerts („standard error of mean“, SEM) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet (*= $p \leq 0,05$). Im Ausnahmefall wurde der einseitige Student's t-Test verwendet, dies ist in der zugehörigen Bildunterschrift erwähnt. Stimulationen und Zytokinbestimmungen wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ziel 1: Übertragung der mit humanen EOC Zellen ermittelten Parameter auf das Mausmodell

Kirsten Kübler konnte mit primären humanen EOC-Zellen zeigen, dass über RIG-I und MDA-5 stimulierte Tumorzellen Zytokine und Chemokine sezernierten und in Apoptose gingen. Durch eine Phagozytose dieser apoptotischen Zellen kam es zu einer Aktivierung von Dendritischen Zellen, einer Sekretion von Interferonen und letztendlich zu einer Aktivierung von NK-Zellen (Kübler et al., 2010).

Als Grundlage für eine spätere klinische Studie ist aber die Untersuchung dieser immuntherapeutischen Strategie im intakten Organismus unabdingbar. Außerdem ist die Untersuchung der zytotoxischen T-Zell-Antwort nur in vivo möglich, was die Etablierung eines Mausmodells nahe legt. Daher bestand das erste Ziel meiner Arbeit in der Übertragung der mit humanen EOC-Zellen ermittelten Parameter auf ein Mausmodell. Dazu verwendete ich die murine Ovarialkarzinomzelllinie ID8. Dabei handelt es sich um zum C57Bl/6 Mausstamm syngene EOC-Zelllinien (Roby et al., 2000).

3.1.1 Über RIG-I und MDA-5 stimulierte ID8-Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine

Zunächst wurde dazu die Zytokinausschüttung von über RIG-I und MDA-5 stimulierten ID8-Zellen untersucht. Wir stimulierten die Zellen für 18 h mit 6 µg poly(I:C) (Aktivierung von MDA-5) und mit 3pRNA (Aktivierung von RIG-I), sowie als Kontrolle mit der nicht-stimulatorischen RNA poly A. Die durch die Stimulation bewirkte Ausschüttung von IFN- α , mL-6 und mIP10 wurden mittels ELISA im Überstand analysiert. Dabei zeigte sich analog zum humanen System eine erhöhte Zytokin- und Chemokinsekretion der Tumorzellen: Sowohl die Sekretion von IFN- α als auch die von mL-6 und mIP10 wies bei Stimulation durch poly(I:C) oder 3pRNA eine signifikante Erhöhung auf im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit der nicht-stimulatorischen RNA poly A (s. Abb. 7).

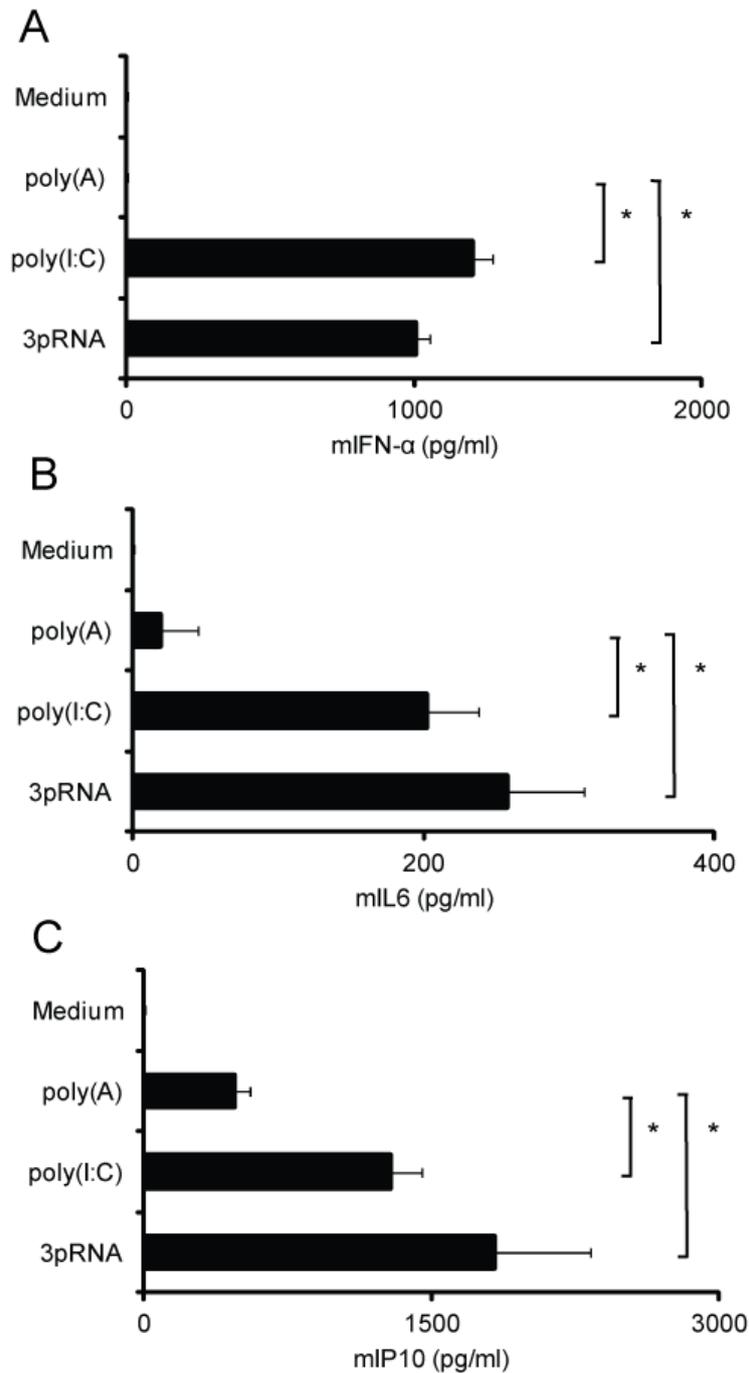


Abb. 7: Über RIG-I und MDA-5 stimulierte ID8-Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine

A Liganden zytosolischer Rezeptoren der Viruserkennung erhöhen die Immunogenität in ID8. Die Zellen wurden 18h mit 6µg der angegebenen Liganden stimuliert; IFN-α wurde mittels ELISA im Überstand analysiert. **B** mL-6 wurde mittels ELISA im Überstand analysiert. **C** mIP10 wurde mittels ELISA im Überstand analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Versuchen. Mit Hilfe des einseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*=p≤0,05).

3.1.2 Liganden zytosolischer Rezeptoren der Viruserkennung induzieren dosisabhängig Apoptose in ID8

Parallel untersuchten wir ob in ID8 Zellen Apoptose durch Liganden zytosolischer Rezeptoren der Viruserkennung ausgelöst wird. Dafür wurden die Zellen für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von poly A, poly(I:C), 3pRNA und poly dAdT stimuliert. Dann wurde unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie der Anteil von Zellen mit apoptotisch fragmentierter DNA bestimmt (s. Abb. 8 A) bzw. die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test untersucht (s. Abb. 8 B). Sowohl in der Durchflusszytometrie als auch im CellTiter-Blue-Test konnten wir dosisabhängige Tumorzellapoptose beobachten. Dabei war die Apoptoseinduktion bei Zellen, die mit den stimulatorischen Liganden poly(I:C), 3pRNA und poly dAdT behandelt worden waren höher als bei den mit der nicht-stimulatorischen RNA poly A behandelten Zellen. Im Vergleich zu den vorher untersuchten primären menschlichen EOC Zellen fiel die Apoptoseneigung nach der Stimulation in ID8 Zellen jedoch deutlich geringer aus.

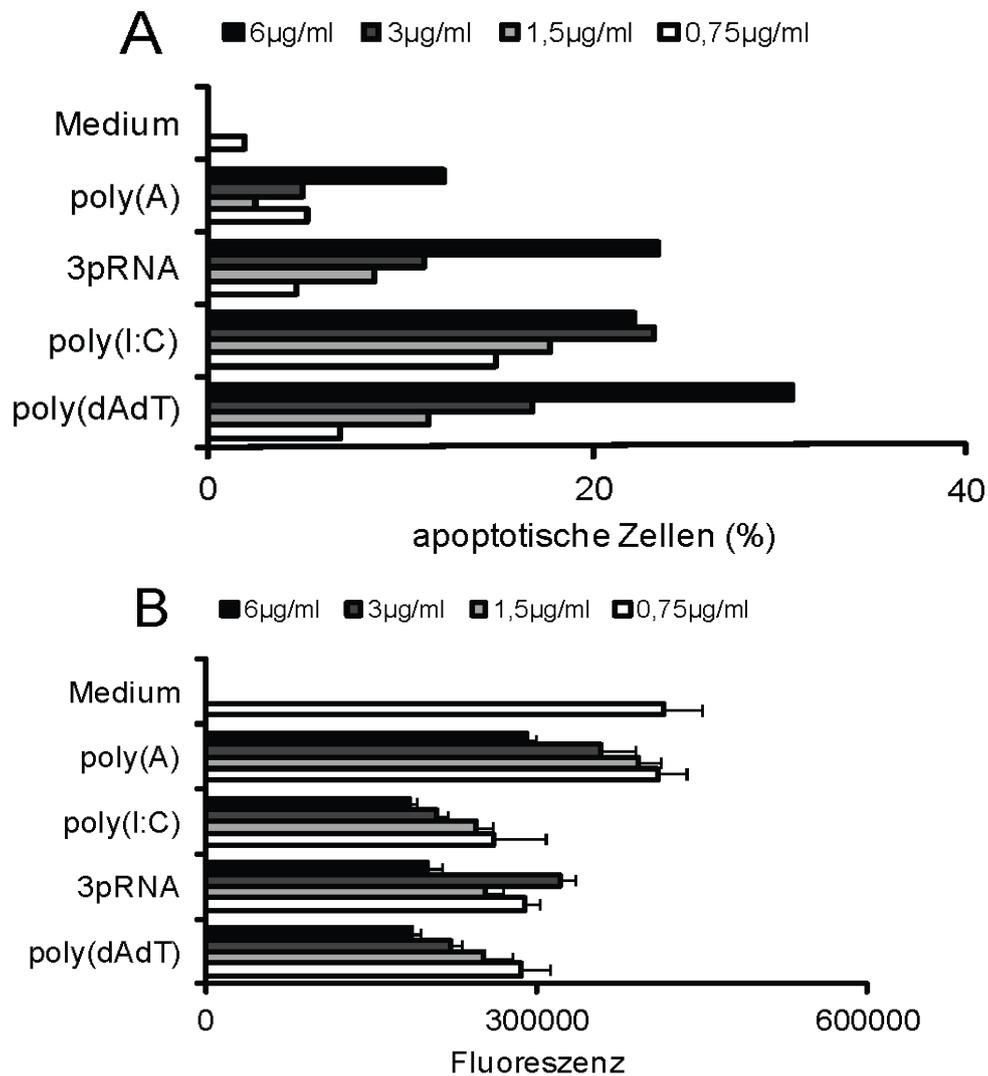


Abb. 8: Liganden zytosolischer Rezeptoren der Viruserkennung induzieren Apoptose in ID8

A Die Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen Liganden stimuliert und der Anteil fragmentierter DNA in der Durchflusszytometrie bestimmt. **B.** Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Liganden stimuliert und die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Versuchen. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt ($*=p \leq 0,05$).

3.1.3 Oxidative Abtötung von ID8 durch Hypochlorsäurebehandlung

Unser Ansatz sieht vor, eine Virusinfektion der Tumorzellen mit nichtinfektiösen Nukleinsäureagonisten zu imitieren, um so hochwirksame antivirale Immunmechanismen gegen

Tumorzellen zu lenken und therapeutisch nutzbar zu machen (Barchet et al., 2008). Dazu sollen über RIG-I oder MDA-5 aktivierte, apoptotische EOC-Zellen als Ganzzell-Tumorkvakzine eingesetzt werden, um eine gegen EOC Zellen wirksame zytotoxische T-Zell Antwort zu induzieren. Für den Einsatz der EOC Zellen als Ganzzell-Vakzine muss jedoch ein mögliches Überleben bzw. eine mögliche Proliferation der Zellen ausgeschlossen werden. Um dies zu erreichen beschlossen wir, die Tumorzellen durch die Behandlung mit Hypochlorsäure (HOCl) oxidativ abzutöten. Dieses Vorgehen hat den zusätzlichen Vorteil, dass chlorinierte Tumorantigene effizienter von Dendritischen Zellen präsentiert werden (Prokopowicz et al., 2010)(s. S.20 und S.83).

Die ID8-Zellen wurden zunächst für 3 h mit 0,375 µg pro Well poly A bzw. poly(I:C) stimuliert. Anschließend wurden sie für 1 h mit 500 µM, 125 µM oder 0 µM Hypochlorsäure behandelt. Zur Quantifizierung der Apoptose wurde in der Durchflusszytometrie der Anteil an Zellen mit fragmentierter DNA analysiert (s. Abb. 9 A). Aus den Überständen wurde mittels ELISA die Interferon- α -Ausschüttung bestimmt (s. Abb. 9 B). Abbildung 9 A zeigt eine dosisabhängige Apoptoseinduktion durch Hypochlorsäure. So konnte nach 1 h Behandlung mit 500 µM Hypochlorsäure bei ca. 40% aller Zellen (unstimuliert, poly A) bzw. bei ca. 50% aller Zellen (poly(I:C)) Apoptose festgestellt werden. Beobachtungen unter dem Mikroskop zeigten, dass auch die noch nicht apoptotischen Zellen bereits starke Schädigungen aufwiesen. Die so behandelten Zellen erwiesen sich in der Zellkultur auch als nicht mehr proliferationsfähig (Daten nicht gezeigt). Abbildung 9 B zeigt, dass reziprok zur Apoptoseinduktion die durch poly(I:C) induzierte Interferonproduktion bei Behandlung mit 125 µM Hypochlorsäure stark nachlässt bzw. bei 500 µM Hypochlorsäure überhaupt keine Interferonproduktion mehr nachweisbar ist.

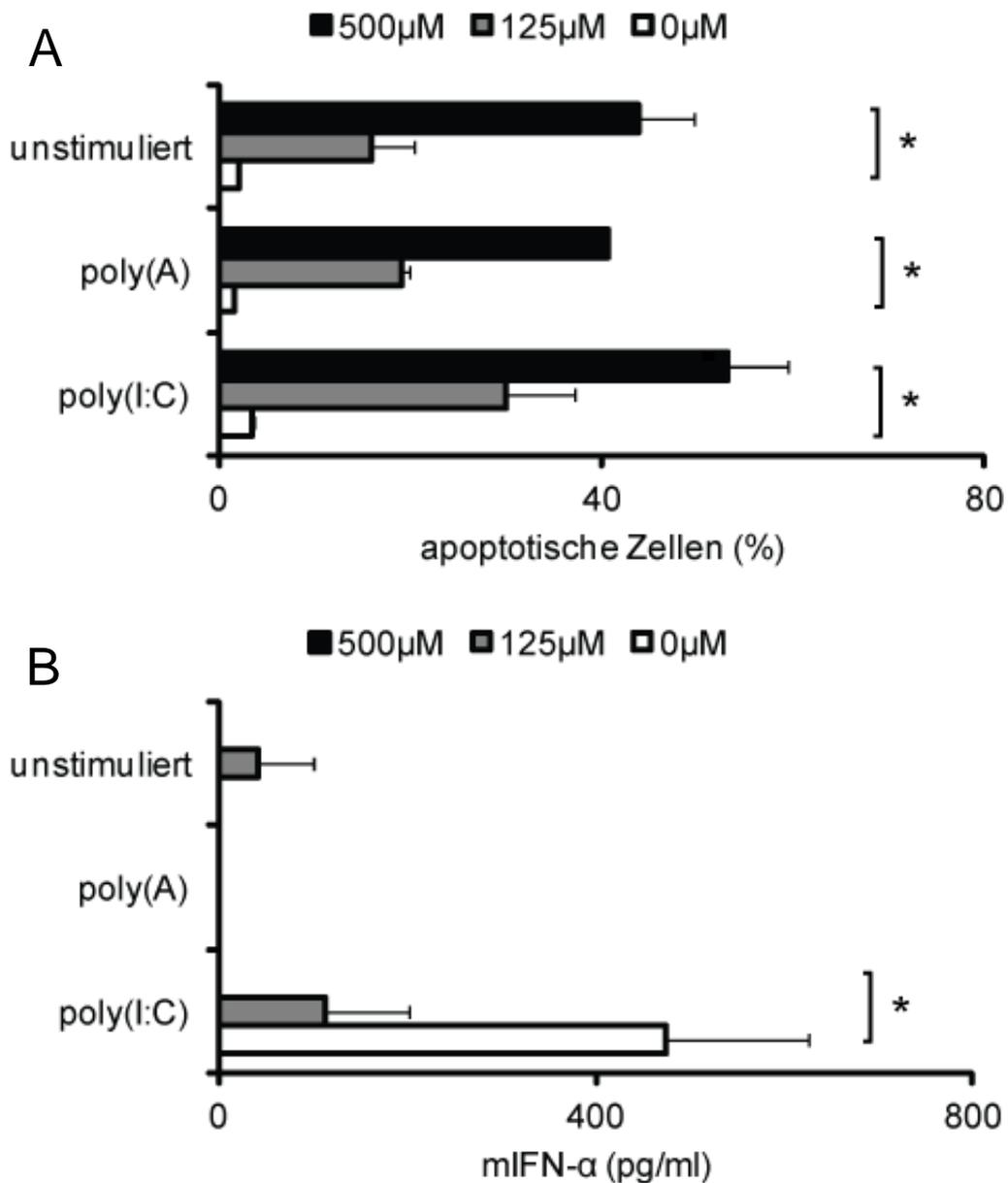


Abb. 9: Oxidative Abtötung von ID8-Zellen durch Hypochlorsäurebehandlung

Die Zellen wurden zunächst für 3h mit den angegebenen Liganden stimuliert und anschließend für 1h mit Hypochlorsäure behandelt. **A** Der Anteil fragmentierter DNA wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. **B** Aus den Überständen wurden mittels ELISA die Interferon- α -Werte analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Versuchen. Mit Hilfe des einseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt ($*=p \leq 0,05$).

3.1.4 Oxidative Abtötung von humanen IGROV-Zellen durch Hypochlorsäure

Im Hinblick auf eine künftige klinische Studie sollten, soweit möglich, alle Untersuchungen sowohl im humanen als auch im murinen System durchgeführt werden. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich diese im murinen System gemachten Beobachtungen auch auf humane Zellen übertragen ließen. Da sich in Vorversuchen zeigte, dass humane Zellen sehr viel sensibler auf eine Hypochlorsäurebehandlung reagierten als die murinen Zellen, wurden für die folgenden Experimente deutlich geringere Hypochlorsäurekonzentrationen verwendet als für die Versuche mit den murinen Zellen.

Humane IGROV-Zellen wurden für 1 h mit Hypochlorsäurekonzentrationen zwischen 10 μM und 250 μM behandelt. Nach 24 h wurde die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test bestimmt (s. Abb. 10 A). In einem weiteren Versuch wurden die Zellen nach der Hypochlorsäurebehandlung noch mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly A oder 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly(I:C) behandelt. Anschließend wurden aus den Überständen mittels ELISA die hIP10-Werte ermittelt (s. Abb. 10 B). Abbildung 10 A zeigt eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität, wobei bereits bei Behandlung der Zellen mit 60 μM HOCl kaum noch lebende Zellen nachweisbar sind. Abbildung 10 B zeigt eine signifikante Abnahme der durch poly(I:C) induzierten hIP10-Produktion. Bei einer Hypochlorsäurekonzentration von 60 μM ist kaum noch hIP10 nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine effektive Abtötung sowohl der humanen als auch der murinen Tumorzellen durch Hypochlorsäure möglich ist und durch die Behandlung eine weitere Proliferation der Zellen ausgeschlossen werden kann.

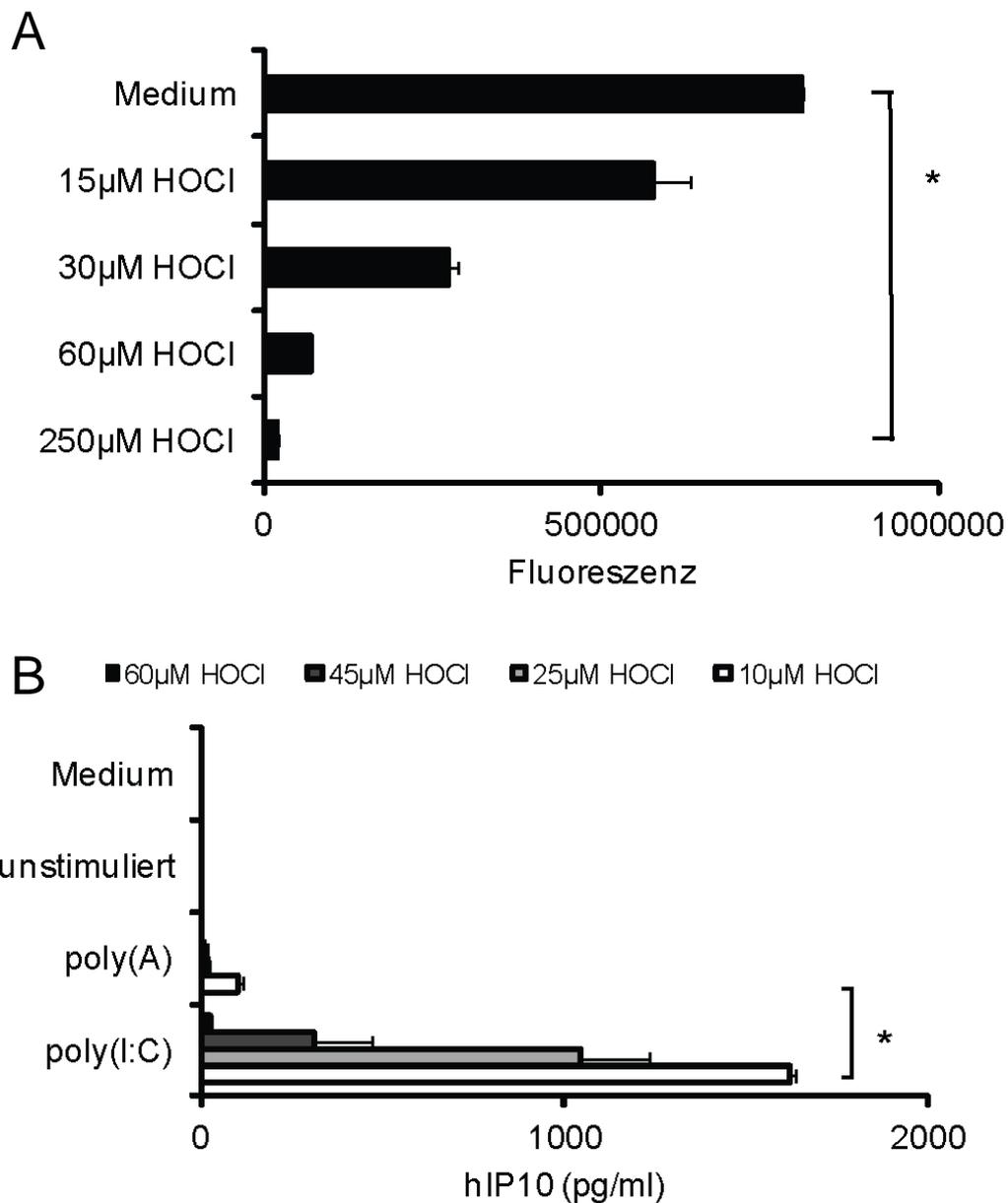


Abb. 10: Oxidative Abtötung von IGROV durch Hypochlorsäure

IGROV-Zellen wurden für 1h mit den angegebenen Konzentrationen an Hypochlorsäure und in B auch mit 3 µg/ml poly A bzw. poly(I:C) behandelt. Nach 24h wurde **A.** die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test bestimmt und **B.** mittels ELISA aus den Überständen die hIP10-Werte ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Versuchen. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*= $p \leq 0,05$).

3.1.5 Aktivierung von Monozyten durch apoptotische IGROV-Zellen

Für die geplante Nutzung der Tumorzellen als Ganzzell-Tumorvakzine sollen die Zellen zunächst durch Hypochlorsäurebehandlung proliferationsunfähig gemacht und anschließend durch Nukleinsäureagonisten stimuliert werden. Die so erhaltene Vakzine sollte möglichst immunogen wirken. Zur Quantifizierung der Immunogenität der Vakzine wurden mit dem entwickelten Vakzinierungsprotokoll behandelte Tumorzellen mit Monozyten kokultiviert. Den Grad der Aktivierung der Monozyten durch die Tumorzellen bestimmten wir anschließend mit Hilfe der Messung der IFN- α -Konzentration.

ID8-Zellen sezernieren Interferon- α nach Stimulation mit Nukleinsäureagonisten (s.Abb. 7). IGROV-Zellen sezernieren bei einer solchen Stimulation kein Interferon (s.Abb. 11). Erst bei Kokultur mit Monozyten wird infolge der Phagozytose apoptotischen Materials von den Monozyten Interferon- α sezerniert. Die Interpretation erhaltener Daten wird dadurch bei menschlichen Zellen im Vergleich zum murinen System vereinfacht, da gemessenes Interferon als von Monozyten sezerniertes Interferon interpretiert werden kann. Daher eignen sich in diesem Fall die humanen Zellen besser zur Etablierung einer Vakzinierungsstrategie als die murinen.

Für das folgende Experiment wurden humane PBMCs aus Buffy Coats aufgereinigt und aus diesen mittels magnetischer Separation Monozyten isoliert.

Anschließend behandelten wir die IGROV-Zellen für 1 h mit 0 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M und 250 μ M Hypochlorsäure. Nach zwei Waschschritten stimulierten wir sie dann für 1h mit 3 μ g/ml poly A oder poly(I:C). Die so behandelten Tumorzellen brachten wir mit den Monozyten in Kokultur. Nach 18 h bestimmten wir aus den Überständen die Interferon- α -Werte.

Abb. 11 zeigt, dass die durch poly(I:C) stimulierten humanen Tumorzellen alleine kein Interferon produzieren. Werden diese jedoch mit Monozyten in Kokultur gebracht, lassen sich Interferon-Werte von bis zu 500 pg/ml nachweisen. Dabei kann mit steigender Hypochlorsäurekonzentration ein Trend zu höheren Interferon-Werten beobachtet werden. Dies könnte durch die Steigerung der Immunogenität durch Hypochlorsäure (Prokopowicz et al., 2010) bedingt sein.

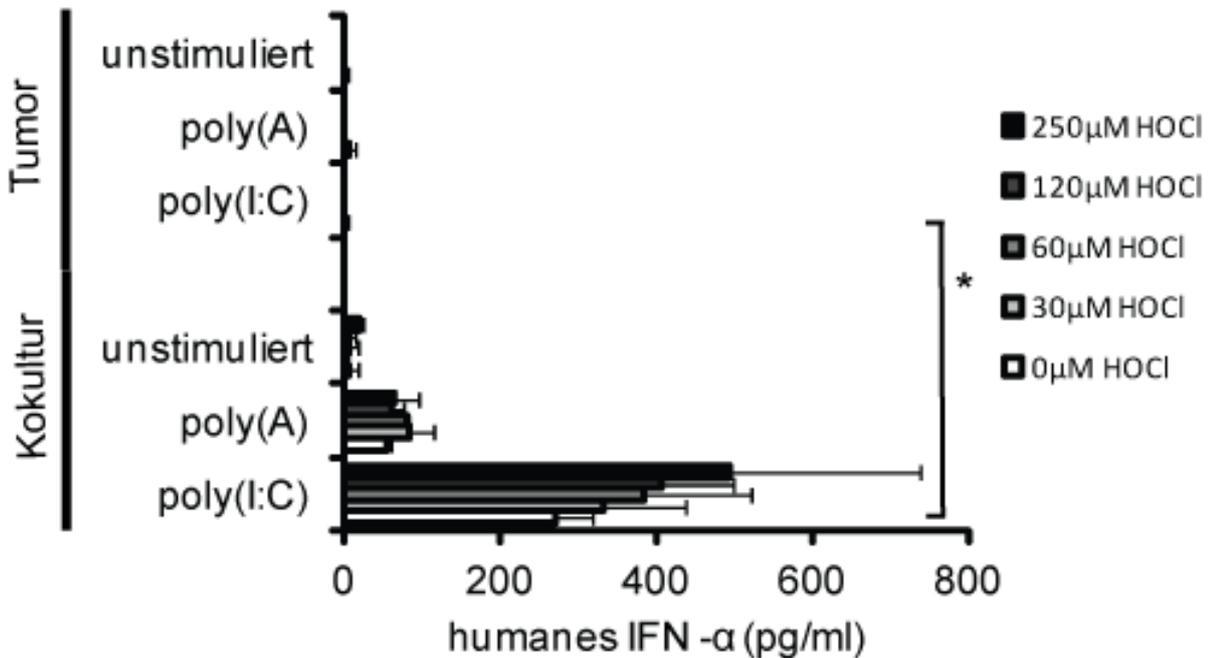


Abb. 11: Aktivierung von Monozyten durch apoptotische IGROV-Zellen

A. IGROV-Zellen wurden für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen an Hypochlorsäure behandelt und dann für 1 h mit 3 μg/ml der angegebenen Liganden stimuliert. Anschließend wurden sie mit Monozyten kokultiviert. Aus den Überständen wurden mittels ELISA die Interferon-α-Werte bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Versuchen. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*=p≤0,05).

3.1.6 Aktivierung von Dendritischen Zellen durch apoptotische ID8-Zellen

Nachdem wir zeigen konnten, dass eine Aktivierung von Monozyten durch humane Tumorzellen möglich ist, sollte dies im murinen System bestätigt werden. Dazu behandelten wir ID8-Zellen für 1 h mit 0 μM , 250 μM , 500 μM und mit 1000 μM Hypochlorsäure. Nach zwei Waschschrritten wurden sie dann für 1 h mit 0,6 μg pro Well poly A oder poly(I:C) stimuliert. Auf zwei weitere Waschschrritte folgte dann die Kokultur mit murinen Dendritischen Zellen. Diese waren zuvor aus Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert worden. Nach 16 h Kokultur bestimmten wir aus den Überständen die Interferon- α -Werte.

Wie erwartet, konnte bereits bei durch poly(I:C) stimulierten Tumorzellen ohne Kokultivierung eine Interferon- α -Produktion nachgewiesen werden (s.Abb. 12). Bei Kokultivierung der Tumorzellen mit den Dendritischen Zellen wurde die Interferon-Produktion allerdings signifikant gesteigert. Das zusätzlich produzierte Interferon muss folglich von den Dendritischen Zellen kommen, die durch die apoptotischen Tumorzellen aktiviert wurden.

Aus vorherigen Versuchen wissen wir, dass die Tumorzellen durch eine Hypochlorsäurekonzentration von 1000 μM so stark geschädigt sind, dass sie nicht mehr proliferationsfähig sind, in Apoptose gehen und somit auch keine Zytokine mehr produzieren (s.Abb. 9). Abbildung 12 bestätigt dies, da die Tumorzellen ohne Kokultur bei einer Behandlung mit 1000 μM Hypochlorsäure kaum noch Interferon sezernieren. Aufschlussreich ist, dass bei gleichen Konditionen (Stimulation mit poly(I:C), Behandlung mit 1000 μM Hypochlorsäure) unter Kokultur mit Wildtyp Dendritischen Zellen, die Interferon-Produktion hoch bleibt. Daraus lässt sich schließen, dass dieses Interferon von den aktivierten Monozyten sezerniert wurde.

Für die von uns geplante Vakzinierung ist es äußerst wichtig, dass wir die Tumorzellen mit Hypochlorsäure proliferationsunfähig machen. Daher ist das Ergebnis dieser Experimente für uns von großer Bedeutung, da sie zeigen, dass auch durch mit hohen Konzentrationen an Hypochlorsäure behandelte Tumorzellen tatsächlich immunogen wirken können.

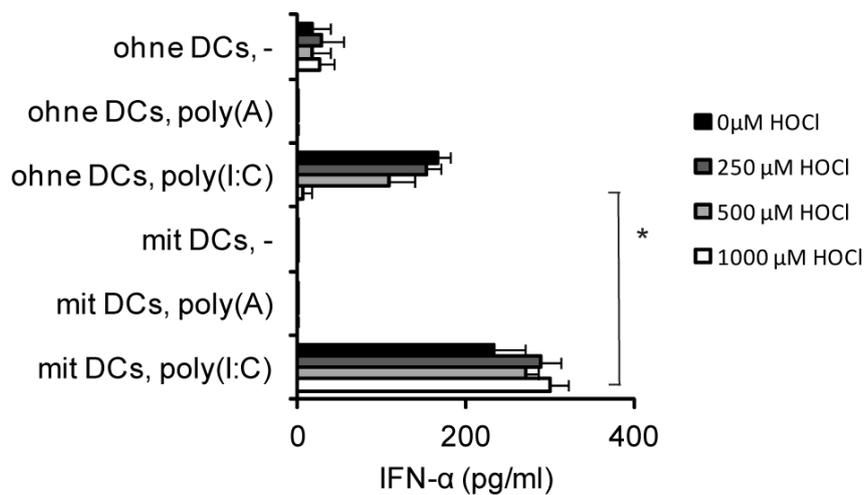


Abb. 12: Aktivierung Dendritischer Zellen durch apoptotische ID8-Zellen

Die Zellen wurden für 1h mit den angegebenen Liganden stimuliert. Anschließend wurden sie für 24h mit WT-bmDCs kokultiviert. Dann wurden aus den Überständen mittels ELISA die IFN- α -Werte bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Versuchen. Mit Hilfe des einseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*= $p \leq 0,05$).

3.1.7 Intraperitoneale Injektion von poly(I:C)-behandelten ID8-Zellen führt zur NK- und DC-Aktivierung

Im humanen System konnte der Effekt stimulierter Tumorzellen auf Effektorzellen gezeigt werden: Der Überstand von kokultivierten, apoptotischen Tumorzellen und Monozyten aktivierte NK-Zellen. Dabei konnte die Induktion von CD69 und IFN- γ sowie die Steigerung der NK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse nachgewiesen werden (Kübler et al., 2011b). Es stellte sich nun die Frage, ob stimulierte Tumorzellen auch im Mausmodell in vivo fähig sind, NK-Zellen und Dendritische Zellen zu aktivieren. Dazu wurde folgendes Experiment durchgeführt: C57BL/6 Mäuse wurden mit entweder durch poly A oder durch poly(I:C) stimulierten ID8-Zellen immunisiert. 6 h nach Injektion entnahmen wir den Mäusen Blutproben und bestimmten die Interferon- α -Werte im Blutserum. Für die Durchführung des BrdU-Inkorporations-Assay spritzten wir den Mäusen 21 h nach Injektion der Zellen je 1 mg BrdU intraperitoneal. 24 h nach Injektion der Tumorzellen spülten wir den Peritonealraum der Mäuse aus und entnahmen Milzen und Lymphknoten. Nach Färbung der Zellen untersuchten wir diese mittels Durchflusszytometrie.

Anhand verschiedener Parameter konnten wir zeigen, dass nur die mit poly(I:C) beladenen Zellen in vivo zu einer Immunaktivierung führten:

6 h nach Immunisierung konnte im Serum der Mäuse, die die mit poly(I:C) behandelten Zellen injiziert bekommen hatten, Interferon- α nachgewiesen werden (s. Abb. 13 A). Bei der Aktivierung von Dendritischen Zellen kommt es zu einer Aufregulation des Aktivierungsmarkers CD69 und des kostimulatorischen Moleküls CD86. Sowohl CD69 als auch CD86 waren in den Milzzellen der Mäuse, die die mit poly(I:C) stimulierten Zellen erhalten hatten, signifikant aufreguliert (s. Abb. 13 B). Darüber hinaus untersuchten wir auch die NK-Zell-Aktivierung: Im Peritonealraum, in der Milz und in den Lymphknoten wurde der Aktivierungsmarker CD69 auf NK-Zellen aufreguliert – wieder ausschließlich in den Mäusen, denen die poly(I:C) behandelten Zellen injiziert worden waren (s. Abb. 13 C). In denselben Mäusen waren auch die NK-Zell-Proliferation (gemessen durch den BrdU-Inkorporations-Assay) und die Interferon- γ -Produktion der NK-Zellen signifikant erhöht (s. Abb. 13 D und E).

Aus diesen Beobachtungen ließ sich schlussfolgern, dass – ähnlich den Ergebnissen mit primären humanen Zellen in vitro – eine Immunaktivierung und besonders eine Aktivierung von Effektorzellen durch Injektion von mit poly(I:C) stimulierten Tumorzellen in vivo möglich ist.

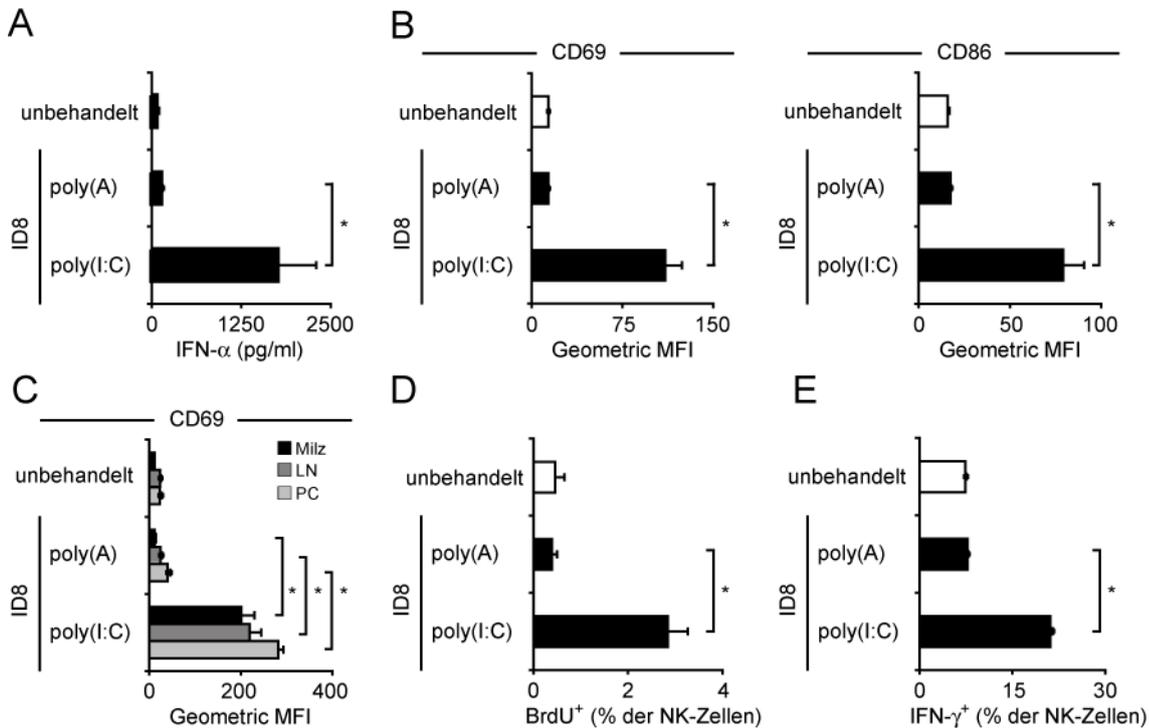


Abb. 13: Intraperitoneale Injektion von poly(I:C)-behandelten ID8-Zellen führt zur NK- und DC-Aktivierung

Mäuse wurden mit durch poly(A) oder poly(I:C) stimulierten Tumorzellen immunisiert oder unbehandelt belassen. **A.** 6 h nach Injektion wurden mittels ELISA die Interferon- α -Werte im Serum der Mäuse bestimmt (Mittelwert \pm SEM; $*=p \leq 0,05$, Student's t-Test). **B.** 24 h nach Injektion wurden die Milzzellen der Mäuse untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Zelloberflächenexpression von CD69 und CD86 auf CD11c⁺ Dendritischen Zellen quantifiziert (Mittelwert \pm SEM; $*=p \leq 0,05$, Student's t-Test). **C.** 24 h nach Injektion wurde die Zelloberflächenexpression von CD69 auf CD3⁻ NK1.1⁺ NK-Zellen in Milz, Lymphknoten (LN) und Peritonealraum (PC) mittels Durchflusszytometrie untersucht (Mittelwert \pm SEM; $*=p \leq 0,05$, Student's t-Test). **D.** 24 h nach Injektion wurde die in vivo NK-Zell Proliferation durch den BrdU-Inkorporations-Assay bestimmt. Dargestellt ist der Anteil der BrdU⁺ Zellen an allen identifizierten NK-Zellen (Mittelwert \pm SEM; $*=p \leq 0,05$, Student's t-Test). **E.** 24 h nach Injektion wurden die Milzzellen isoliert und für 4 h mit PMA/Ionomycin in der Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert. Dargestellt ist der Anteil IFN- γ ⁺ Zellen an allen identifizierten NK-Zellen (Mittelwert \pm SEM; $*=p \leq 0,05$, Student's t-Test). Es handelt sich um repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen.

3.2 Ziel 2: Generierung von transgenen Tumorzelllinien

Um die Untersuchung des Tumorwachstums *in vivo* zu erleichtern und um eine Untersuchung der gegen den Tumor gerichteten T-Zell-Antwort *in vivo* zu ermöglichen generierte ich über lentivirale Transfektion mehrere transgene Tumorzelllinien. Die Expressionskonstrukte enthalten I) Firefly-Luciferase (Luc), welche erlaubt nach der Gabe von D-Luciferin Tumorwachstum im Peritoneum nicht-destruktiv *in vivo* zu evaluieren; II) den humanen Diphtherietoxin Rezeptor (DTR), der erlaubt die Tumorzellen *in vivo* durch die Applikation von Diphtherietoxin (DTx) gezielt abzutöten (Saito et al., 2001); III) Ovalbumin bzw. Ova Peptide als Neo-Antigen. Dabei entschieden wir uns für das SIINFEKL-Peptid von Ovalbumin, welches erlaubt etablierte immunologische Werkzeuge (SIINFEKL-reaktive OTI-T-Zellen) in diesem Tumormodell zu nutzen. Kombinationen aus den genannten Transgenen (DTRLuc, LucOva, DTRLucOva) wurden entweder als Fusionsproteine, oder bi-cistronisch verbunden über das virale 2A Peptid koexprimiert (Ryan et al., 1991). Dabei wurden die verschiedenen Transgene jeweils über die Sall- und NotI-Schnittstellen in das pLenti6-EF1a-Plasmid kloniert.

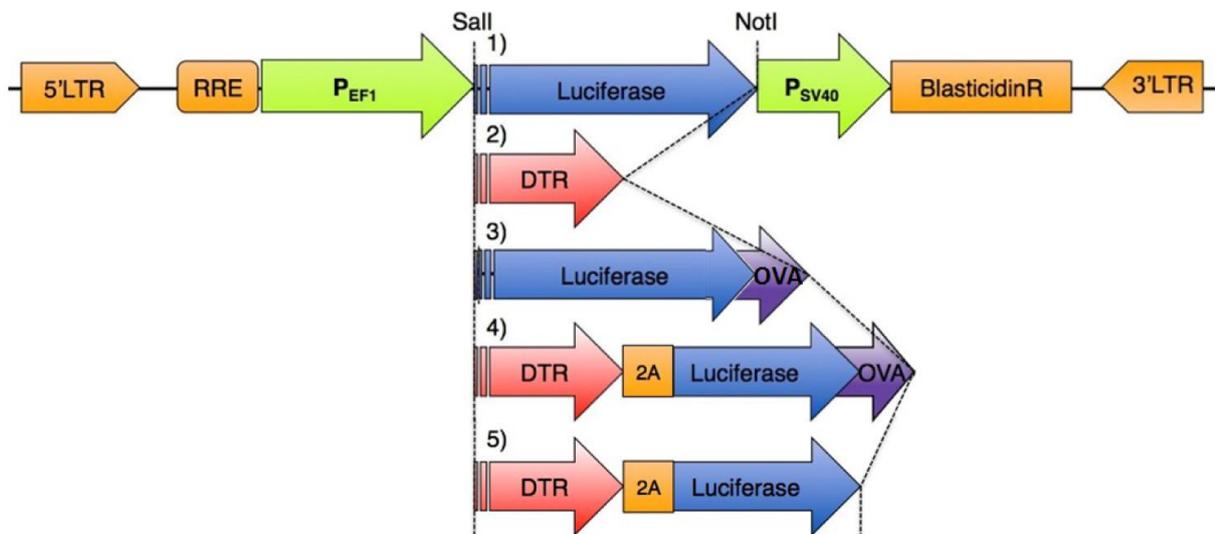


Abb. 14: Übersicht der lentiviralen Konstrukte zur Generierung transgener Tumorzellen

Über lentivirale Transfektion wurden Tumorzelllinien generiert, die ein Transgen stabil exprimieren. Hierfür wurden in einem lentiviralen Expressionsvektor fünf unterschiedliche Konstrukte kloniert, die unter der Kontrolle des Pef1 Promoters erlauben entweder Luciferase, DTR, Ovalbumin oder eine Kombination aus diesen drei Elementen zu exprimieren.

3.2.1 Testung der stabilen Transgen-Expression der Tumorzellklone

Nach der Anzucht von Einzelzellklonen testete ich diese zunächst in vitro.

Dazu lysierten wir die Luciferase-transgenen Tumorzellen. Anschließend wurde nach Zugabe von Luciferin die Lumineszenz gemessen. Durch Vergleich mit Wildtyp-Tumorzellen konnte die Funktionsfähigkeit der Einzelzellklone beurteilt werden (s. Abb. 15 A).

Einzelzellklone der DTR-transgenen Tumorzelllinien inkubierte ich für 24 h mit 0 bzw. 100 ng/ml Diphtherietoxin. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Blue-Tests bestimmt. Bei funktionsfähigen Einzelzellklonen konnte bei Zugabe von Diphtherietoxin eine starke Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden (s. Abb. 15 B).

Einzelzellklone Ovalbumin-transgener Tumorzelllinien wurden mit B3Z-Zellen kokultiviert. B3Z-Zellen sind CD8⁺-T-Zell-Hybridom-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor spezifisch das SIINFEKL-Peptid von Ovalbumin erkennt. Durch die Aktivierung wird mIL-2 sezerniert. In den Überständen der Kokultur wurde durch einen ELISA die sezernierte mIL2-Menge quantifiziert. Als Positivkontrolle setzten wir dabei RMA mOva-Zellen, als Negativkontrolle Wildtyp-ID8-Zellen ein (s. Abb. 15 C).

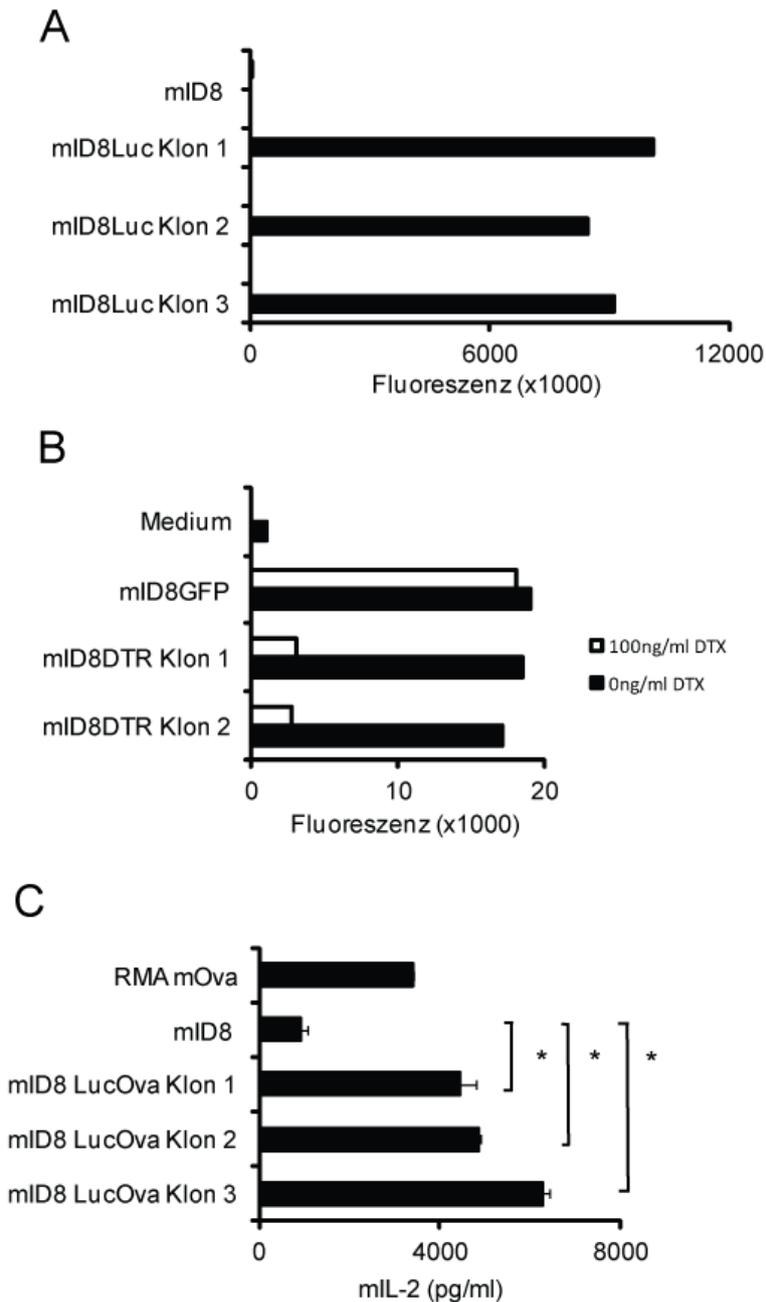


Abb. 15: Testung der stabilen Transgen-Expression von Einzelzellklonen der Luciferase-, Diphtherietoxinrezeptor- und Ovalbumin-transgenen Tumorzelllinien

A. Nach Zugabe von Luciferin zu Zelllysaten von Einzelzellklonen der Luciferase-transgenen ID8-Zellen wurde die Lumineszenz gemessen. B. Einzelzellklone der Diphtherietoxinrezeptor-transgenen ID8-Linien wurden für 24h mit 0 bzw. 100 ng/ml Diphtherietoxin inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Blue-Tests bestimmt. C. Einzelzellklone Ovalbumin-transgener ID8-Linien wurden mit B3Z-Zellen kokultiviert. Dann wurden aus den Überständen mittels ELISA die mIL-2-Werte bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM eines repräsentativen Ergebnisses. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*= $p \leq 0,05$).

3.2.2 CFSE-Proliferationsassay: Mit apoptotischen, Ova-transgenen ID8-Zellen beladene Dendritische Zellen regen Ovalbumin spezifische zytotoxische T-Zellen (OTI-Zellen) zur Proliferation an.

Zur weiteren Testung der Funktionsfähigkeit der Ovalbumin-transgenen Tumorzelllinien führten wir einen CFSE-Proliferationsassay durch. Dabei sollte gezeigt werden, dass LucOva-transgene ID8-Zellen, die durch murine DCs präsentiert werden, fähig sind, OTI-Zellen zur Proliferation anzuregen. Zur Durchführung des Versuchs wurden ID8-Zellen und ID8 LucOva-Zellen zunächst mit HOCl und/oder poly(I:C) bearbeitet oder unbehandelt gelassen. Dann brachten wir die Tumorzellen mit murinen DCs in Kokultur. Nach 24 h wurden OTI-Zellen aus den Milzen und Lymphknoten von OTI-RAG-Mäusen isoliert, mit CFSE gefärbt und mit den Tumorzellen und DCs kokultiviert. 3 Tage später färbten wir die Zellen zusätzlich mit einem CD8a-Antikörper an und untersuchten sie anschließend per Durchflusszytometrie.

Abb. 16 A zeigt die Proliferation der CFSE-gefärbten OTI-Zellen: ID8-Zellen ohne Ova-Transgen waren erwartungsgemäß nicht fähig, OTI-Zellen zur Proliferation anzuregen. Die Kokultur von OTI-Zellen mit murinen DCs und ID8 LucOva hingegen bewirkte eine starke Proliferation der Ova-spezifischen T-Zellen. Dabei löste die Vorbehandlung der Tumorzellen mit HOCl und/oder poly(I:C) keine gravierende Verschlechterung der Proliferationsrate aus. Abb. 16 B und C zeigen den Division und Proliferation Index der OTI-Zellen. Diese bestätigen ebenfalls die starke Proliferation der OTI-Zellen in Anwesenheit des Ova-Epitops.

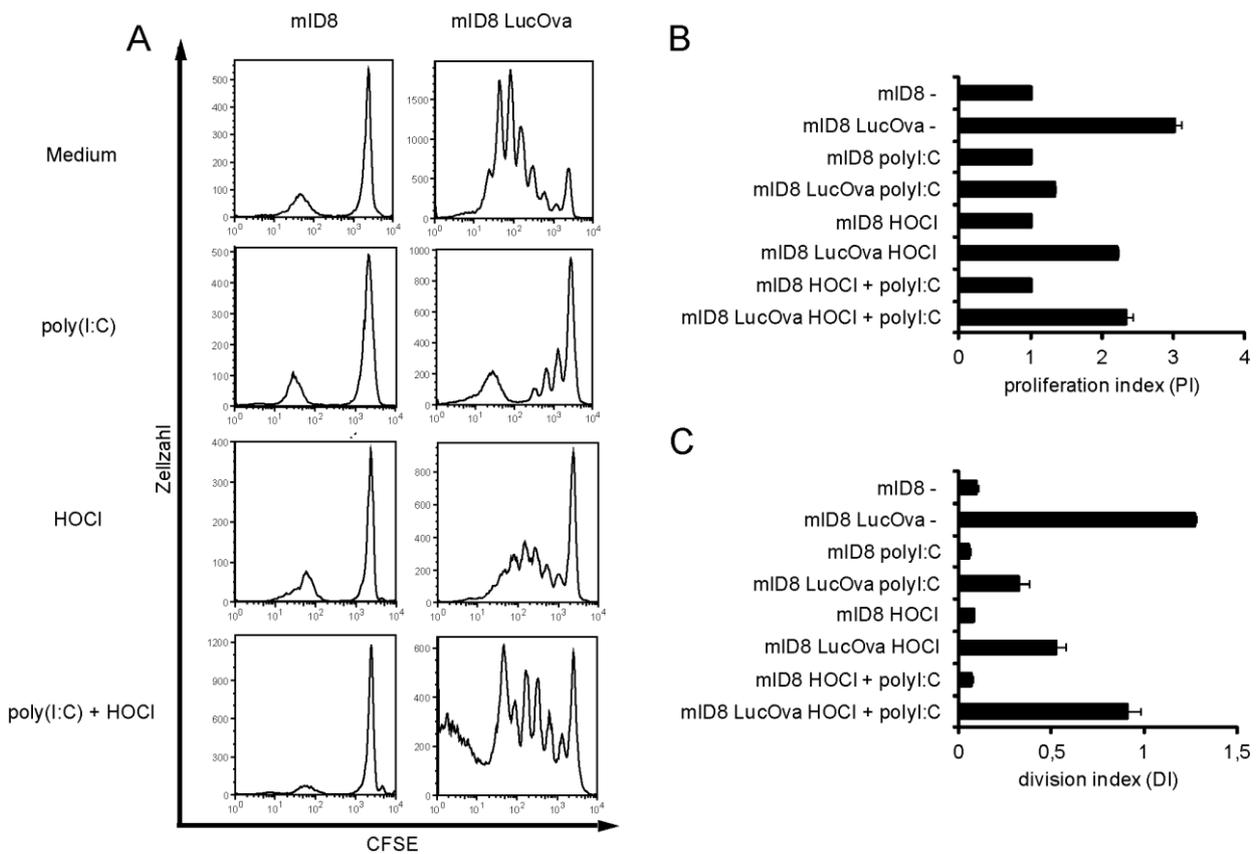


Abb. 16: CFSE-Proliferationsassay

A. ID8- und ID8 LucOva-Zellen wurden mit HOCl und/oder poly(I:C) bearbeitet oder unbehandelt gelassen. Nach 24 h Kokultur der Tumorzellen mit murinen DCs wurden mit CFSE gefärbte Ova reaktive T-Zellen (OTI-Zellen) hinzugefügt. 3 Tage später wurden die Zellen per Durchflusszytometrie analysiert **B.** Proliferations-Index der CFSE-gefärbten OTI-Zellen **C.** Division Index der CFSE-gefärbten OTI-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

3.3 Ziel 3: Etablierung und funktionelle Evaluation einer Ganzzell-Tumorvakzinierung im EOC Mausmodell in vivo

Nachdem die Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen durch eine Behandlung mit MDA-5 oder RIG-I stimulierenden Nukleinsäuren analog zum humanen System in vitro nachgewiesen werden konnte, sollte nun die Auswirkung einer solchen Behandlung auf einen intakten Organismus untersucht werden. Als Grundlage für eine spätere klinische Studie sollten so präklinische Daten im Mausmodell erhoben werden.

3.3.1 Wachstum von ID8-Zellen in vivo

Katherine F. Roby et al. konnten zeigen, dass die von ihnen generierten MOSEC-Zellen Tumoren in immunkompetenten Mäusen induzieren können. Dabei ähneln diese Tumoren denen von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen im 3.-4. Stadium. Die i.p.-Injektion der Zellen führte dabei sowohl zur Bildung von multiplen Tumoren im Peritonealraum als auch zur Bildung von Aszites (Roby et al., 2000).

Um zu überprüfen, dass die von uns in Kultur gehaltenen ID8-Zellen fähig waren in vivo ähnliche Tumoren zu induzieren, führten wir folgendes Experiment durch: 10 C57BL/6N-Mäusen wurden 2×10^6 oder 5×10^6 ID8-Zellen i.p. injiziert. Dann wurde die Aszitesbildung, das Überleben und nach Tod oder Opferung das Ausmaß der Peritonealkarzinose beobachtet. Dabei wurde die Aszitesbildung durch regelmäßiges Wiegen der Mäuse verfolgt. Als Endpunkt sollte der Tag gewählt werden, an dem die geschätzte Aszitesmenge 10 ml überstieg. Nach dem plötzlichen Tod zweier Mäuse, die dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden die anderen Mäuse geopfert, unabhängig davon, ob sie bereits 10ml Aszites gebildet hatten oder nicht. Abb. 17 A zeigt in Tabellenform die Ergebnisse dieses Experimentes: Bei allen obduzierbaren Mäusen war eine mehr oder weniger starke Peritonealkarzinose nachweisbar. Dabei bildete ein Großteil der Mäuse auch Aszites. Die Photos in Abb. 17 B und C zeigen beispielhaft an einer Maus die Aszites- und Tumorbildung.

A	Überleben	Aszites	Peritoneal- karzinose
Maus 1 (2×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 66	-	+
Maus 2 (2×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 66	+	++
Maus 3 (2×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 64	+++	+++
Maus 4 (2×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 66	+	+
Maus 5 (2×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 66	-	+
Maus 1 (5×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 66	++	++
Maus 2 (5×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 66	+	++
Maus 3 (5×10^6 Zellen)	Verstorben an Tag 65		
Maus 4 (5×10^6 Zellen)	Verstorben an Tag 65		
Maus 5 (5×10^6 Zellen)	Geopfert an Tag 66	+	++

B



C



Abb. 17: Wachstum von ID8-Zellen in vivo

A. 10 C57BL/6N-Mäusen wurden 2×10^6 oder 5×10^6 ID8-Zellen i.p. injiziert. Dann wurde die Aszitesbildung, das Überleben und nach Tod oder Opferrung das Ausmaß des Tumorwachstums beobachtet. **B.** Photo einer Maus mit Aszites **C.** Peritonealkarzinose der Maus

3.3.2 Wachstum von ID8 Luc und ID8 LucOva in vivo

Zur Evaluation des Tumorwachstums wurden je 7 C57Bl/6 Mäusen 5×10^6 ID8 Luc- bzw. ID8 LucOva-Zellen intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Tumorwachstum durch Messung der Lumineszenz im IVIS-Gerät verfolgt. Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der IVIS-Messung an Tag 64: Bei allen Mäusen, die Luc-transgene Zellen erhalten haben, sieht man ein starkes, ausgedehntes Lumineszenz-Signal. Die Mäuse, die neben

der Luciferase auch das Ova Epitop als Transgen erhalten haben, zeigen dagegen kaum bzw. kein Signal. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die LucOva-Klone nicht anwachsen konnten. Eine andere mögliche Erklärung besteht darin, dass die Expression der Ova Epitope eine Ova-spezifische Zytotoxizität induzierte, was letztlich das Tumorwachstum verhinderte.

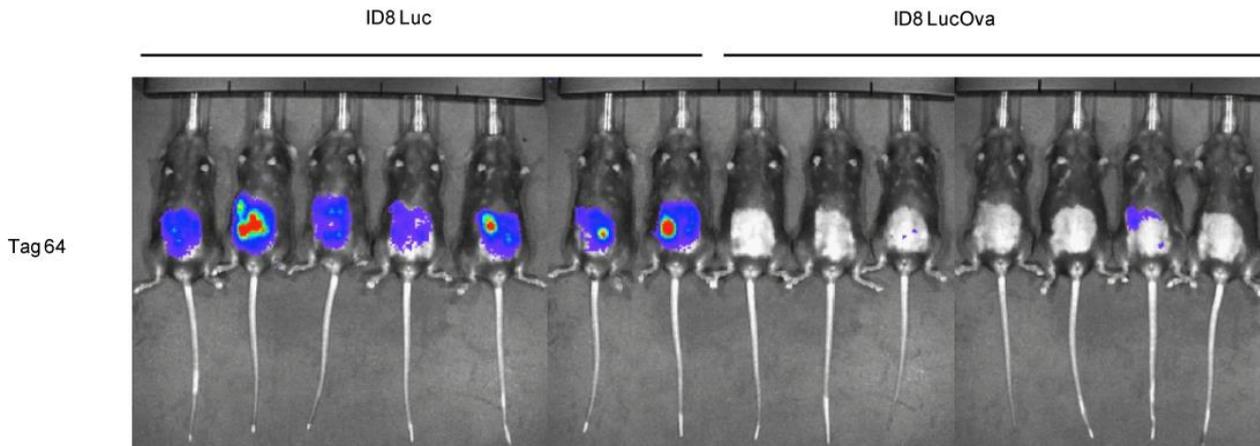


Abb. 18: Wachstum von ID8 Luc und ID8 LucOva in vivo

Zur Evaluation des Tumorwachstums mittels Lumineszenz im IVIS Gerät wurden je 7 C57Bl/6 Mäusen $5 \cdot 10^6$ ID8 Luc bzw. ID8 LucOva intraperitoneal injiziert. Gezeigt ist der Status an Tag 64.

3.3.3 In vivo Zytotoxizitätstest

Um zu untersuchen, ob die Expression des Ova Epitops zur Induktion einer Ova-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort führt, machten wir einen in vivo Zytotoxizitätstest. Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von $CD8^+$ -T-Zellen in vivo. Dazu wurden C57Bl/6 Mäuse mit 5×10^4 ID8 LucOva Zellen, entweder untransfiziert oder transfiziert mit poly(I:C), immunisiert. Nach 8 Tagen wurde die $CD8^+$ -T-Zell Antwort im in vivo Zytotoxizitätstest und nach Ova spezifischer Restimulation in vitro mittels intrazellulärer IFN- γ Färbung quantifiziert.

Mit dem in vivo Zytotoxizitätstest konnten wir in allen Mäusen, die ID8 LucOva Zellen erhalten hatten eine Ova-spezifische Zytotoxizität nachweisen. Die Zytotoxizität konnte durch Vorbehandlung der LucOva-Zellen mit poly(I:C) noch deutlich gesteigert werden (s. Abb. 19 A).

IFN- γ wird unter anderem von aktivierten zytotoxischen T-Zellen produziert und zeichnet sich durch antivirale, immunmodulatorische sowie antitumorale Eigenschaften aus. Nach Ova spezifischer Restimulation der murinen Milzzellen *in vitro* färbten wir intrazellulär IFN- γ an. So konnten wir zeigen, dass durch Immunisierung der Mäuse mit den LucOva-Zellen eine Produktion von IFN- γ ausgelöst werden konnte. Durch Behandlung der Tumorzellen mit poly(I:C) konnte diese IFN- γ -Produktion noch um ein Vielfaches gesteigert werden.

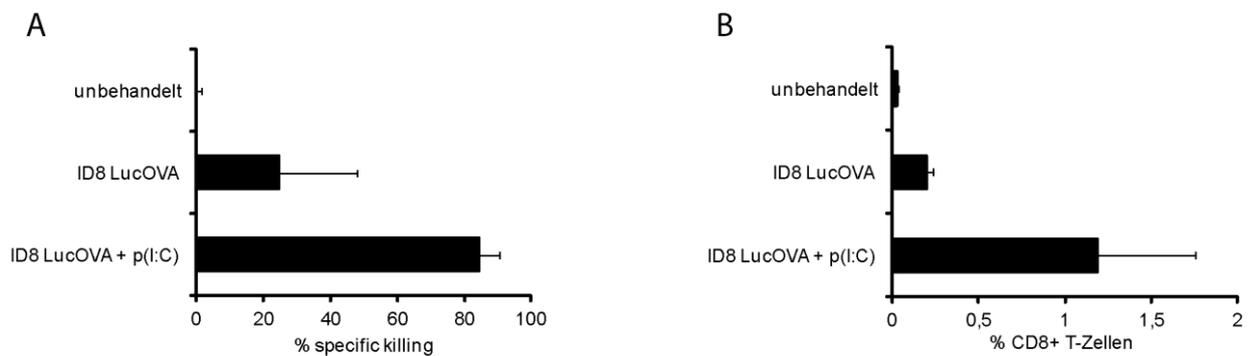


Abb. 19: In vivo Zytotoxizitätstest

Zur Untersuchung der Ova-spezifischen Zytotoxizität wurden C57Bl/6 Mäuse mit $5 \cdot 10^4$ ID8 LucOva Zellen, entweder untransfiziert oder transfiziert mit dem MDA-5 Agonisten poly(I:C), immunisiert. Nach 8 Tagen wurde die CD8⁺-T-Zell Antwort im *in vivo* Zytotoxizitätstest (**A**) und nach Ova spezifischer Restimulation *in vitro* mittels intrazellulärer IFN- γ Färbung quantifiziert (**B**). Als Spezifitätskontrolle dienten unbehandelte Mäuse. Die gezeigten Daten wurden von Volker Böhnert erhoben.

4. Diskussion

4.1 RIG-I und MDA-5 induzierte Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie Induktion von Apoptose

Wir konnten zeigen, dass über RIG-I und MDA-5 stimulierte murine Ovarialkarzinomzellen proinflammatorische Zytokine und Chemokine sezernierten und apoptotisch wurden. Die Reaktion der humanen und der murinen Tumorzellen auf die Behandlung mit RIG-I und MDA-5-Liganden ist somit sehr ähnlich (Kübler et al., 2010). Der Signalweg, der über die Aktivierung von RIG-I und MDA-5 zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen führt und die Zelle apoptotisch werden lässt, ist folglich sowohl in humanen als auch in murinen Zellen nach der malignen Transformation intakt und kann somit im Prinzip für therapeutische Zwecke genutzt werden.

4.2 Aktivierung von Dendritischen Zellen durch apoptotische ID8-Zellen

Wir beobachteten, dass über RIG-I/MDA-5 stimulierte Ovarialkarzinomzellen die Aktivierung von DCs induzierten. Dabei konnten wir die Ausschüttung von IFN- α nachweisen. IFN- α spielt eine entscheidende Rolle bei der Abstoßung von Tumoren durch das Immunsystem (Dunn et al., 2006) und hat auch schon klinische Erfolge in der Behandlung von EOC-Patienten gezeigt (Berek et al., 1985).

4.3 Intraperitoneale Injektion von poly(I:C)-behandelten ID8-Zellen führt zur NK- und DC-Aktivierung

Ich konnte zeigen, dass die intraperitoneale Injektion von MDA-5 stimulierten EOC-Zellen zu NK- und DC-Aktivierung in Mäusen führt. Bei der Aktivierung von DCs kommt es zu einer Aufregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Aktivierungsmarkers CD69. Ich beobachtete, dass es durch poly(I:C) zu einer signifikanten Aufregulation von CD86 und CD69 auf DCs kommt. Für die Untersuchung der NK-Zell-Aktivierung bestimmten wir den Aktivierungsmarker CD69, welcher der ausschlaggebende Triggerfaktor für die Tumorzellyse durch NK-Zellen ist (North et al., 2007). CD69 wurde sowohl im Peritonealraum als auch in Milz und Lymphknoten auf den NK-Zellen hochreguliert. Auch die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen war signifikant erhöht. IFN- γ ist ein unabhängiger Prognosefaktor für die Gesamtüberlebensrate von Ovarialkarzinompa-

tientinnen (Marth et al., 2004) und spielt eine große Rolle in der antitumoralen Abwehr. Unser Ziel ist die Verbesserung der anti-tumoralen Immunantwort durch Imitation einer viralen Infektion in Ovarialkarzinomzellen, um damit die Rezidivrate und die Tumorprogression zu verringern. Diese Experimente zeigen, dass die stimulierten EOC-Zellen in vivo fähig sind, Effektorzellen wie NK-Zellen und DCs zu aktivieren und eine signifikante Immunaktivierung auszulösen. Dies legt nahe, dass die Imitation einer viralen Infektion in Ovarialkarzinomzellen in Form einer Ganzzellvakzine ein vielversprechender Ansatz für eine Immuntherapie des Ovarialkarzinoms darstellt.

4.4 Oxidative Abtötung von mID8 EOC-Zellen durch Hypochlorsäurebehandlung

Wir möchten für die geplante Immuntherapie über RIG-I oder MDA-5 aktivierte, apoptotische EOC-Zellen als Ganzzell-Tumorvakzine einsetzen, um eine gegen EOC Zellen wirksame zytotoxische T-Zell Antwort zu induzieren. Für den Einsatz der EOC Zellen als Ganzzell-Vakzine muss jedoch ein mögliches Überleben bzw. eine mögliche Proliferation der Tumorzellen ausgeschlossen werden.

Nadine Gehrke entdeckte, dass oxidierte DNA auf das angeborene Immunsystem besonders stimulatorisch wirkt, da DNA mit oxidativen Schäden im Zytosol nicht durch die Exonuklease TREX1 abgebaut werden kann (Gehrke et al., 2013). Um uns diesen Immunmechanismus zusätzlich zu Nutze zu machen, töteten wir die Tumorzellen durch die Behandlung mit Hypochlorsäure (HOCl) oxidativ ab. Dieses Vorgehen hat den zusätzlichen Vorteil, dass chlorinierte Tumorantigene immunogener wirken, da sie effizienter von Dendritischen Zellen präsentiert werden (Prokopowicz et al., 2010).

In meinem Projekt behandelte ich sowohl humane Tumorzellen (IGROV) als auch murine (mID8) mit HOCl. HOCl erwies sich als äußerst wirksam, sowohl die murinen als auch die humanen Tumorzellen proliferationsunfähig zu machen. Um die Immunogenität der mit HOCl behandelten und über RIG-I/MDA-5 stimulierten Ganzzellvakzine zu prüfen, kokultivierte ich die humanen Tumorzellen mit Monozyten. Den Aktivierungsgrad der Monozyten bestimmte ich anschließend mithilfe der Interferon- α -Messung. Dabei konnte ich mit steigender Hypochlorsäurekonzentration eine Tendenz zu höheren Interferon-Werten beobachten. Dies stände im Einklang mit den Ergebnissen von Chiang et al. (s. S.20). Allerdings ist eine genauere Untersuchung der Immunogenitätssteigerung

der Vakzine durch HOCl in Zukunft notwendig, z.B. könnte man die Aktivierungsmarker auf den DCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an HOCl messen.

4.5 Luciferase-transgene Tumorzelllinien

Um die Untersuchung des Tumorwachstums zu erleichtern, generierte ich über lentivirale Transfektion Luciferase-transgene Tumorzelllinien. Diese erlauben es nach der Gabe von D-Luciferin Tumorwachstum im Peritoneum nicht-invasiv mit Hilfe des IVIS Lumimometers in vivo zu evaluieren (Craft et al., 2005). Nach Testung der stabilen Transgen-Expression in vitro konnte ich in ersten Versuchen auch die Funktion der Tumorzellklone in vivo nachweisen. In meiner Arbeitsgruppe werden die von mir hergestellten Klone derzeit intensiv genutzt, um die Ganzzell-Tumorvakzinierung in vivo weiterzuentwickeln. Sowohl die Tumorprogression als auch die durch eine entsprechende Behandlung eingeleitete Tumorregression können mit Hilfe der Luciferase-transgenen Tumorzelllinien optimal und nicht-invasiv verfolgt werden und stellen somit die Basis der Evaluierung einer Therapiestrategie im Mausmodell dar. Die Arbeitsgruppe konnte mithilfe der Luciferase-Zellen inzwischen zeigen, dass Mäuse, die mit ID8DTRLuc-Zellen und dem Immunstimulanz 3P-RNA vakziniert wurden, im Anschluss fähig waren, eine Tumorchallenge mit ID8DTRLuc-Zellen effektiv abzustößten. Dabei konnte mithilfe der IVIS-Messung, die Abnahme des Tumors durch die Vakzinierung genau verfolgt werden.

4.6 Diphtherietoxinrezeptor-transgene Tumorzelllinien

Des Weiteren generierte ich transgene Tumorzelllinien, die den humanen Diphtherietoxinrezeptor enthalten. Dies ermöglicht nach Applikation des für murine Zellen ansonsten nicht toxischen Diphtherietoxins die transgenen Tumorzellen in vivo gezielt abzutöten (Saito et al., 2001). Ich konnte in vitro die stabile Transgen-Expression der DTR-Klone nachweisen. Meine Arbeitsgruppe zeigte dann, dass die DTR-Zelllinien auch in vivo funktionieren: Die angewachsenen Tumoren konnten nach der Diphtherietoxininjektion schon nach wenigen Tagen nicht mehr nachgewiesen werden und auch in der Langzeitüberwachung über ein Jahr konnte kein Wiederauftreten des Tumors beobachtet werden. Dies spricht für eine effiziente und komplette Depletion des Tumors durch das Diphtherietoxin.

4.7 DTRLuc-transgene Zelllinien

Ich klonierte auch Kombinationen aus den drei Transgenen, die entweder als Fusionsproteine oder bi-cistronisch über das virale 2A-Peptid koexprimiert wurden (Ryan et al., 1991). In der Arbeitsgruppe werden inzwischen vor allem die DTRLuc-transgenen Zelllinien weiter verwendet.

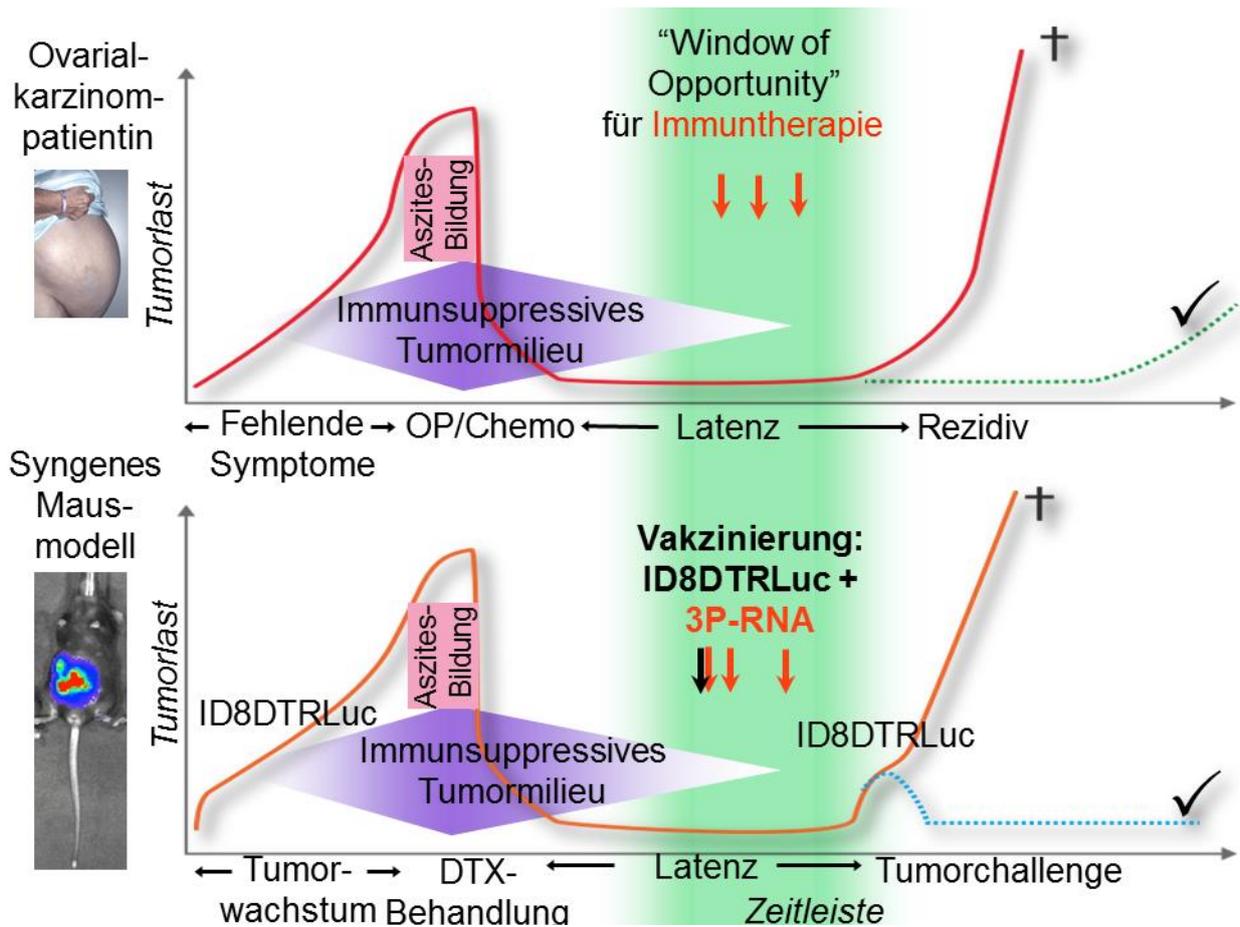


Abb. 20: Ganzzellvakzinierung in vivo – Evaluierung der Therapiestrategie

Mithilfe der ID8DTRLuc-transgenen Tumorzelllinien kann der Krankheitsverlauf mit OP/Chemo und der Vakzinierung in vivo sehr gut nachgestellt werden. Den Mäusen werden ID8DTRLuc-Zellen injiziert, der Tumor wächst an. Durch Diphtherietoxin-Behandlung kann dann der Tumor depletiert werden. In der Latenzphase wird dann die Vakzinierung, bestehend aus ID8DTRLuc-Zellen und einem Immunstimulanz (3P-RNA) appliziert. Durch eine Tumorchallenge mit ID8DTRLuc-Zellen wird dann der Vakzinierungserfolg überprüft. (Abbildung verändert nach Winfried Barchet)

Damit kann nun die Situation im Menschen vor und nach OP/Chemo nachgestellt werden, indem den Mäusen zunächst die EOC-Zellen i.p. injiziert werden, sodass der Tu-

mor anwächst. Dann wird zum gewünschten Zeitpunkt Diphtherietoxin gespritzt wodurch es zu einer vollständigen Depletion des Tumors in den Mäusen kommt. So können „tumorerfahrene“ Mäuse generiert werden, d.h. Mäuse, deren Immunsystem bereits mit den Tumorzellen und deren Antigenen konfrontiert wurde. Anschließend kann durch eine Tumorchallenge, d.h. die Nachstellung eines Rezidivs durch Injektion von ID8DTRLuc-Zellen der Erfolg einer vorher durchgeführten Vakzinierung überprüft werden (s. Abb. 20). Meine Arbeitsgruppe konnte in ersten Experimenten zeigen, dass die von uns etablierte Vakzinierung fähig ist, das Immunsystem so zu aktivieren, dass die komplette Tumorchallenge abgestoßen wird. Interessant ist nun die Frage, auf welchen Immunmechanismen dieser Vakzinierungserfolg beruht. Dazu werden derzeit Versuche durchgeführt, in denen einzelne Gruppen von Immunzellen, wie NK-Zellen, CD4-Zellen und CD8-Zellen depletiert werden und anschließend der Vakzinierungserfolg untersucht wird. Mit diesen Versuchen wollen wir die Immunmechanismen, die hinter dem Vakzinierungserfolg stecken, besser verstehen, um sie optimal für die Therapie einsetzen zu können. Denn das Ziel ist es, eine möglichst effektive und sichere Vakzine zu entwickeln, um diese auch im Rahmen einer klinischen Studie testen zu können.

4.8 Ovalbumin-transgene Tumorzelllinien

Ovalbumin, der mengenmäßig größte Bestandteil von Hühnereiweiß, ist ein in der immunologischen Grundlagenforschung häufig als Modellantigen verwendetes Protein, für das es viele etablierte immunologische Werkzeuge gibt. In meiner Arbeit stellte ich auch Tumorzelllinien die immundominante T-Zell Epitope transgen exprimieren her, um die zytotoxische T-Zell-Antwort mithilfe dieses gut charakterisierten Neo-Antigens untersuchen zu können. Bei einem Tumorwachstumsexperiment mit Luc-transgenen bzw. LucOva-transgenen Zellen beobachtete ich, dass die Mäuse, die neben der Luciferase auch die Ova-Epitope als Transgen erhalten hatten, kein Tumorwachstum mehr zeigten (s. S.79). Die Expression der Ova-Epitope scheint also eine starke Steigerung der Tumor-Immunogenität bewirkt zu haben, was letztendlich ein Tumorwachstum verhinderte. Für die Klärung der Frage, ob die Expression der Ova-Epitope tatsächlich die Induktion einer Ova-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort bewirkt, führten wir in vivo Zytotoxizitätstests durch (s. S.80). Diese zeigten das Vorhandensein einer ausgeprägten Ova-spezifischen Zytotoxizität, welche durch eine Vor-Behandlung der Tumorzellen mit po-

ly(I:C) noch weiter gesteigert werden konnte. Offen bleibt jedoch bisher, ob durch die Fokussierung der T-Zellantwort auf das Neo-Antigen Ova die bei der Ganzzell- Vakzinierung eigentlich angestrebte zytotoxische Antwort gegen autologe Tumorantigene ebenfalls verstärkt, oder im Gegenteil verhindert wird.

Die Steigerung der Immunogenität durch Epitope des Neoantigens Ova wurde schon in mehreren Vorausgegangenen Studien beobachtet. Coffman et al. beschrieben, dass Ovalbumin einfacher kreuzpräsentiert wird als andere Proteine, sodass die hohe spezifische Zytotoxizität, die man mit Epitopen von Ovalbumin erzeugt hat, nicht unbedingt auf „normale“ Proteine übertragbar seien (Coffman et al., 2010). Chiang et al. stellten bei ihren Immunisierungsversuchen mit DC-gepulsten und mit HOCl behandelten mID8-Ova-Zellen fest, dass die meisten zytotoxischen T-Zellen gegen Ova gerichtet waren und nicht gegen tumoreigene Antigene (Chiang et al., 2013). Sie interpretierten dieses Ergebnis als positiv, da es zeige, dass DCs das immundominante Epitop Ova, das als Ganzzellvakzine präsentiert wurde, genauso effizient kreuzpräsentieren konnte wie DCs, die nur mit einem einzelnen Peptid konfrontiert wurden. Die Tatsache, dass die DCs keine effiziente Immunantwort gegen andere Tumorantigene zeigten, wurde damit erklärt, dass das hochimmune, xenogene Ova die weniger immunogenen tumoreigenen Antigene überlagert und damit verdrängt habe (Chiang et al., 2013).

Eine mögliche Erklärung für die Immunogenitätssteigerung des Neo-Antigens Ova könnte sein, dass Ova sowohl CD8⁺-T-Zellen als auch CD4⁺-T-Zellen aktivieren kann. Lange Zeit galt vor allem den CD8⁺-T-Zellen große Aufmerksamkeit, da diese als Effektorzellen fähig sind, Tumorzellen direkt zu zerstören. Aber auch die CD4⁺-T-Zellen sind für die Induktion einer effizienten und lang anhaltenden CD8⁺-T-Zell-Antwort unabdingbar (Bennett et al., 1997). Burgdorf et al. beobachteten, dass der Weg, über den ein Antigen von der DC aufgenommen wird, über die Art seiner Präsentation bestimmt (Burgdorf et al., 2007). Sie beschrieben, dass Ova, wenn es über den Mannose-Rezeptor aufgenommen wurde, ausschließlich auf MHC-I an CD8⁺-T-Zellen präsentiert wird, wohingegen Ova, das von Scavenger-Rezeptoren bzw. über Pinozytose aufgenommen wurde, auf MHC-II an CD4⁺-T-Zellen präsentiert wird (Achmed Imam Chasan, Christian Kurts, Sven Burgdorf). Die Tatsache, dass die von uns verwendeten Ova Epitope sowohl über MHC-I als auch über MHC-II präsentiert werden, könnte also für die Steigerung der Immunogenität verantwortlich sein. In Zukunft sollte der Weg, wie Ova von den DCs prä-

sentiert wird, genauer untersucht werden. Da theoretische die Möglichkeit besteht, über den Weg der Antigenaufnahme die Art der Immunantwort zu bestimmen, könnte durch die Veränderung einer Ganzzellvakzine eine effizientere zytotoxische Immunantwort ausgelöst werden (Achmed Imam Chasan, Christian Kurts, Sven Burgdorf).

4.9 Immuntherapie des Ovarialkarzinoms – Ausblick

Wie oben bereits erwähnt, hat meine Arbeitsgruppe erste Experimente zu den Immunmechanismen, die dem beobachteten Vakzinierungserfolg zugrunde liegen, durchgeführt. Dazu depletierten sie jeweils NK-Zellen, CD4-Zellen und CD8-Zellen und untersuchten dann den Vakzinierungserfolg. Die ersten Ergebnisse zeigen, dass CD4-Zellen eine herausragende Rolle im Prozess der Anti-Tumor-Immunisierung zu spielen scheinen. Daher sollen nun weitere Versuche durchgeführt werden, in denen die genaue Rolle der CD4-Zellen in diesem Prozess untersucht wird.

Eine Studie von Vermeij et al. zeigt, dass sich p53, Sperm Protein 17, das Wilms Tumor Gene 1 und Survivin zusammengenommen in 98,2 % der untersuchten 270 humanen EOC Gewebeproben nachweisen lassen (Vermeij et al., 2010). Diese TAAs sind potentiell immunogen und in Mensch und Maus konserviert. HLA bzw. MHC I präsentierte Peptide dieser Antigene werden derzeit auch für andere Tumorarten als potentielle Vakzine untersucht. In meiner Arbeitsgruppe wird derzeit die CD8⁺- T-Zellantwort gegen die im Ovarialkarzinom prävalenten Tumorantigene evaluiert, um so ein Protokoll für eine auf diese Antigene optimierte Ganzzell-Vakzinierung zu etablieren.

Des Weiteren wäre es sehr spannend aufzuklären, ob sich der Vakzinierungserfolg der in der Arbeitsgruppe entwickelten Immuntherapie auch auf andere Tumormodelle übertragen lässt und ob man mit anderen Stimuli des angeborenen Immunsystems vergleichbare Ergebnisse erzielen kann.

5. Zusammenfassung

Tumorzellen lösen häufig keine wirksame, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort aus. Im Gegensatz hierzu wird die Anwesenheit von Viren umgehend durch das angeborene Immunsystem erkannt, was letztendlich zur gezielten Zerstörung der virusinfizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen (CTL) führt. Es erscheint sinnvoll, diese hochwirksamen antiviralen Immunmechanismen gegen Tumorzellen zu lenken und so therapeutisch nutzbar zu machen. RNA Viren werden im Zytosol somatischer Zellen von den darauf spezialisierten Helikasen RIG-I und MDA-5 detektiert. Wir konnten zeigen, dass es durch die gezielte Applikation von RIG-I und MDA-5 aktivierenden RNAs möglich ist, in humanen Ovarialkarzinomzellen (EOC-Zellen) eine Virusinfektion zu imitieren, und so eine immunogene Form des Tumorzelltods auszulösen. Für die weitere präklinische Entwicklung dieser immuntherapeutischen Strategie übertrug ich die mit humanen Tumorzellen ermittelten Parameter auf ein syngenes Mausmodell des Ovarialkarzinoms. Dabei zeigte sich, dass auch murine EOC-Zellen nach Stimulation über RIG-I und MDA-5 proinflammatorische Zytokine und Chemokine sezernierten, apoptotisch wurden und Dendritische Zellen aktivierten. Um die Untersuchung des Tumorwachstums und von gegen den Tumor gerichteten CTL in vivo zu erleichtern, generierte ich Luciferase-, Diphtherietoxinrezeptor- sowie Ovalbumin-transgene EOC Tumorzelllinien. Nach Testung der stabilen Transgen-Expression und der Funktion der Tumorzellklone in vitro und in vivo begannen wir mit der Evaluierung von Ganzzell-Tumorvakzinierungen im Mausmodell in vivo. So konnte ich unter anderem zeigen, dass die intraperitoneale Injektion von MDA-5 stimulierten EOC-Zellen zu NK- und DC-Aktivierung in Mäusen führt, und dass durch Ganzzell-Vakzinierung induzierte CTL eine vollständige Abstoßung von OVA-transgenen Tumorzelllinien bewirkten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von zytosolischen Virus-Sensoren in Tumorzellen ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung eines Immuntherapiekonzepts beim Ovarialkarzinom darstellen könnte.

Derzeit wird das Immuntherapiekonzept weiterentwickelt und die hinter dem Vakzinierungserfolg stehenden Immunmechanismen genau untersucht, um eine möglichst wirksame und sichere Vakzine für eine klinische Studie zu entwickeln.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Ovarialkarzinom – Krankheitsverlauf und Behandlung.....	10
Abb. 2: Die Detektion von Viren im Zytosol.....	14
Abb. 3: NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) sind bereits früh an der Immunreaktion auf eine Virusinfektion beteiligt.	16
Abb. 4: Das Ovarialkarzinom – Krankheitsverlauf und Immuntherapie	23
Abb. 5: Simulation der Virusinfektion in Tumorzellen	24
Abb. 6: Illustration des in vivo Zytotoxizitätstests	57
Abb. 7: Über RIG-I und MDA-5 stimulierte ID8-Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine	60
Abb. 8: Liganden zytosolischer Rezeptoren der Viruserkennung induzieren Apoptose in ID8	62
Abb. 9: Oxidative Abtötung von ID8-Zellen durch Hypochlorsäurebehandlung.....	64
Abb. 10: Oxidative Abtötung von IGROV durch Hypochlorsäure	66
Abb. 11: Aktivierung von Monozyten durch apoptotische IGROV-Zellen	68
Abb. 12: Aktivierung Dendritischer Zellen durch apoptotische ID8-Zellen.....	70
Abb. 13: Intraperitoneale Injektion von poly(I:C)-behandelten ID8-Zellen führt zur NK- und DC-Aktivierung.....	72
Abb. 14: Übersicht der lentiviralen Konstrukte zur Generierung transgener Tumorzellen	73
Abb. 15: Testung der stabilen Transgen-Expression von Einzelzellklonen der Luciferase-, Diphtherietoxinrezeptor- und Ovalbumin-transgenen Tumorzelllinien.....	75
Abb. 16: CFSE-Proliferationsassay	77
Abb. 17: Wachstum von ID8-Zellen in vivo	79
Abb. 18: Wachstum von ID8 Luc und ID8 LucOva in vivo	80
Abb. 19: In vivo Zytotoxizitätstest.....	81
Abb. 20: Ganzzellvakzinierung in vivo – Evaluierung der Therapiestrategie	85

7. Literaturverzeichnis

Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 2009; 10: 1065–1072

Imam-Chasan A, Kurts C, Burgdorf S. Molekulare und zellbiologische Mechanismen der Kreuzpräsentation. *Biospektrum* 2009, 6: 606–608

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 6857: 732–738

Allison ME, Fearon DT. Enhanced immunogenicity of aldehyde-bearing antigens: a possible link between innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2000; 10: 2881–2887

Awwad M, North RJ. Cyclophosphamide-induced immunologically mediated regression of a cyclophosphamide-resistant murine tumor: a consequence of eliminating precursor L3T4+ suppressor T-cells. *Cancer Res* 1989; 7: 1649–1654

Barchet W, Wimmenauer V, Schlee M, Hartmann G. Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Curr Opin Immunol* 2008; 4: 389–395

Bénard J, Da Silva J, Blois MC de, Boyer P, Duvillard P, Chiric E, Riou G. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 1985; 10: 4970–4979

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 1997; 1: 65–70

Berek JS, Hacker NF, Lichtenstein A, Jung T, Spina C, Knox RM, Brady J, Greene T, Ettinger LM, Lagasse LD. Intraperitoneal recombinant alpha-interferon for "salvage" immunotherapy in stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer Res* 1985; 9: 4447–4453

Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006; 7085: 808–812

Bookman MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *Int J Gynecol Cancer* 2005: 212–220

Brack C, Hiramata M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978; 1: 1–14

Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 2007; 5824: 612–616

Burges A, Schmalfeldt B. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 38: 635–641

Carrasco-Marín E, Paz-Miguel JE, López-Mato P, Alvarez-Domínguez C, Leyva-Cobián F. Oxidation of defined antigens allows protein unfolding and increases both proteolytic processing and exposes peptide epitopes which are recognized by specific T cells. *Immunology* 1998; 3: 314–321

Chen Y, Chang M, Chen C, Lin H, Cheng W, Chien C. Depletion of regulatory T lymphocytes reverses the imbalance between pro- and anti-tumor immunities via enhancing antigen-specific T cell immune responses. *PLoS ONE* 2012; 10: e47190

Chiang CL, Kandalaf LE, Coukos G. Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines. *Int Rev Immunol* 2011; 2-3: 150–182

Chiang CL, Kandalaft LE, Tanyi J, Hagemann AR, Motz GT, Svoronos N, Montone K, Mantia-Smaldone GM, Smith L, Nisenbaum HL, Levine BL, Kalos M, Czerniecki BJ, Torigian DA, Powell DJ, Mick R, Coukos G. A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous Acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside. *Clin Cancer Res* 2013; 17: 4801–4815

Chiang CL, Ledermann JA, Aitkens E, Benjamin E, Katz DR, Chain BM. Oxidation of ovarian epithelial cancer cells by hypochlorous acid enhances immunogenicity and stimulates T cells that recognize autologous primary tumor. *Clin Cancer Res* 2008; 15: 4898–4907

Chiang CL, Ledermann JA, Rad AN, Katz DR, Chain BM. Hypochlorous acid enhances immunogenicity and uptake of allogeneic ovarian tumor cells by dendritic cells to cross-prime tumor-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 11: 1384–1395

Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010; 4: 492–503

Craft N, Bruhn KW, Nguyen BD, Prins R, Liao LM, Collisson EA, De A, Kolodney MS, Gambhir SS, Miller JF. Bioluminescent imaging of melanoma in live mice. *J Invest Dermatol* 2005; 1: 159–165

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 9: 942–949

Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K, Kawakami-Honda N, Goetsch L, Sawamura T, Bonnefoy J, Jeannin P. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 2002; 3: 353–362

Dranoff G. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? *Nat Rev Immunol* 2012; 1: 61–66

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 11: 836–848

Eltabbakh GH. Recent advances in the management of women with ovarian cancer. *Minerva Ginecol* 2004; 1: 81–89

Fathalla MF. Factors in the causation and incidence of ovarian cancer. *Obstet Gynecol Surv* 1972; 11: 751–768

Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009; 1: 106–128

Gays F, Unnikrishnan M, Shrestha S, Fraser KP, Brown AR, Tristram CM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Brooks CG. The mouse tumor cell lines EL4 and RMA display mosaic expression of NK-related and certain other surface molecules and appear to have a common origin. *J Immunol* 2000; 10: 5094–5102

Gehrke N, Mertens C, Zillinger T, Wenzel J, Bald T, Zahn S, Tüting T, Hartmann G, Barchet W. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity* 2013; 3: 482–495

Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004; 2: 336–344

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 22: 8459–8464

Godwin AK, Testa JR, Handel LM, Liu Z, Vanderveer LA, Tracey PA, Hamilton TC. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implications of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 8: 592–601

Hazen SL, Hsu FF, Mueller DM, Crowley JR, Heinecke JW. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J Clin Invest* 1996; 6: 1283–1289

Janeway C, Murphy KP. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl 2009

Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989: 1–13

Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 1: 234–247

Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernai J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Krieghoff-Henning E, Kunz B, Penzkofer A, Tremel K, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe. Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.. Berlin, 2013

Kandalaft LE, Powell DJ, Chiang CL, Tanyi J, Kim S, Bosch M, Montone K, Mick R, Levine BL, Torigian DA, June CH, Coukos G. Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer. *Oncoimmunology* 2013; 1: e22664

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; 1: 24–32

Kelly JM, Sterry SJ, Cose S, Turner SJ, Fecondo J, Rodda S, Fink PJ, Carbone FR. Identification of conserved T cell receptor CDR3 residues contacting known exposed peptide side chains from a major histocompatibility complex class I-bound determinant. *Eur J Immunol* 1993; 12: 3318–3326

Krockenberger M, Kranke P, Häusler S, Engel JB, Horn E, Nürnberger K, Wischhusen J, Dietl J, Hönig A. Macrophage migration-inhibitory factor levels in serum of patients with ovarian cancer correlates with poor prognosis. *Anticancer Res* 2012; 12: 5233–5238

Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, Cheng P, Chen L, Coukos G, Zou W. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007; 18: 8900–8905

Kübler K, Gehrke N, Riemann S, Böhnert V, Zillinger T, Hartmann E, Pölcher M, Rudlowski C, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010; 13: 5293–5304

Kübler K, Pesch C, Gehrke N, Riemann S, Dassler J, Coch C, Landsberg J, Wimmenauer V, Pölcher M, Rudlowski C, Tüting T, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. *Eur J Immunol* 2011a; 10: 3028–3039

Kuhn W, Rutke S, Späthe K, Schmalfeldt B, Florack G, Hundelshausen B von, Pachyn D, Ulm K, Graeff H. Neoadjuvant chemotherapy followed by tumor debulking prolongs survival for patients with poor prognosis in International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIIC ovarian carcinoma. *Cancer* 2001; 10: 2585–2591

Kurts C, Robinson, Bruce W S, Knolle PA. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2010; 6: 403–414

Landen CN, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2008; 6: 995–1005

Leveille S, Goulet M, Lichty BD, Hiscott J. Vesicular stomatitis virus oncolytic treatment interferes with tumor-associated dendritic cell functions and abrogates tumor antigen presentation. *J Virol* 2011; 23: 12160–12169

Liu B, Nash J, Runowicz C, Swede H, Stevens R, Li Z. Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *J Hematol Oncol* 2010a: 7

Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, Salazar AM, Colonna M, Steinman RM. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* 2009; 7: 1589–1602

Marcinkiewicz J, Chain BM, Olszowska E, Olszowski S, Zgliczyński JM. Enhancement of immunogenic properties of ovalbumin as a result of its chlorination. *Int J Biochem* 1991; 12: 1393–1395

Marth C, Fiegl H, Zeimet AG, Müller-Holzner E, Deibl M, Doppler W, Daxenbichler G. Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am. J Obstet Gynecol* 2004; 5: 1598–1605

Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 7378: 480–489

Neller MA, López JA, Schmidt CW. Antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* 2008; 5: 286–295

North J, Bakhsh I, Marden C, Pittman H, Addison E, Navarrete C, Anderson R, Lowdell MW. Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. *J Immunol* 2007; 1: 85–94

Pölcher M, Braun M, Friedrichs N, Rudlowski C, Bercht E, Fimmers R, Sauerwald A, Keyver-Paik M, Kübler K, Büttner R, Kuhn WC, Hernando J. Foxp3(+) cell infiltration and granzyme B(+)/Foxp3(+) cell ratio are associated with outcome in neoadjuvant chemotherapy-treated ovarian carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 6: 909–919

Post PN, Casparie MK, Blaauwgeers, J L G, Blok S de. Reduced risk of ovarian cancer after hysterectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 10: 1024; author reply 1024-1025

Prokopowicz ZM, Arce F, Biedroń R, Chiang CL, Ciszek M, Katz DR, Nowakowska M, Zapotoczny S, Marcinkiewicz J, Chain BM. Hypochlorous acid: a natural adjuvant that facilitates antigen processing, cross-priming, and the induction of adaptive immunity. *J Immunol* 2010; 2: 824–835

Riman T, Dickman PW, Nilsson S, Correia N, Nordlinder H, Magnusson CM, Persson IR. Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer: results from a Swedish case-control study. *Am J Epidemiol* 2002; 4: 363–373

Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 2006; 12: 1258–1265

Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, Persons DL, Smith PG, Terranova PF. Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2000; 4: 585–591

Ryan MD, King AM, Thomas GP. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* 1991: 2727–2732

Sabbatini P, Odunsi K. Immunologic approaches to ovarian cancer treatment. *J Clin Oncol* 2007; 20: 2884–2893

Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 2001; 8: 746–750

Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen Y, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 51: 18538–18543

Schirrmacher V. Clinical trials of antitumor vaccination with an autologous tumor cell vaccine modified by virus infection: improvement of patient survival based on improved antitumor immune memory. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 6: 587–598

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juraneck S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009; 1: 25–34

Schreiber TH, Raez L, Rosenblatt JD, Podack ER. Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art. *Semin Immunol* 2010; 3: 105–112

Sica GL, Choi H in, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen L. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 2003; 6: 849–861

Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 2005; 2: 163–170

Takaoka A, Taniguchi T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 7: 847–857

Tedcastle A, Cawood R, Di Y, Fisher KD, Seymour LW. Virotherapy--cancer targeted pharmacology. *Drug Discov Today* 2012; 5-6: 215–220

Testa JR, Getts LA, Salazar H, Liu Z, Handel LM, Godwin AK, Hamilton TC. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells results in well to poorly differentiated tumors with a parallel range of cytogenetic complexity. *Cancer Res* 1994; 10: 2778–2784

Tingulstad S, Skjeldestad FE, Halvorsen TB, Hagen B. Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2003; 5 Pt 1: 885–891

Tringler B, Liu W, Corral L, Torkko KC, Enomoto T, Davidson S, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR. B7-H4 overexpression in ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2006; 1: 44–52

Vermeij R, Daemen T, de Bock, Geertruida H, Graeff P de, Leffers N, Lambeck A, ten Hoor, Klaske A, Hollema H, van der Zee, Ate G J, Nijman HW. Potential target antigens for a universal vaccine in epithelial ovarian cancer. *Clin Dev Immunol* 2010

Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, Andrian UH von, Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003; 3: 225–234

Yigit R, Massuger LFAG, Figdor CG, Torensma R. Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecol Oncol* 2010; 2: 366–372

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 7: 730–737

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; 3: 203–213

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 1999; 4: 2886–2892

8. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. G. Hartmann, der es mir ermöglichte meine Dissertation am Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie durchzuführen.

Mein besonderer Dank geht an meinen Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Winfried Barchet und Frau Dr. Kirsten Kübler. Durch ihre intensive Betreuung haben sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Winfried Barchet für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei der ganzen AG Barchet für die unglaublich geduldige und exzellente Einarbeitung in die verschiedenen Methoden, die großartige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Soheila Riemann, Nadine Gehrke, Volker Böhnert, Malte Stasch und Thomas Zillinger. Vielen Dank!

Für die Unterstützung bei den in-vivo-Versuchen und der Durchflusszytometrie möchte ich auch Christopher Jacobs (AG Hornung), Frank Schildberg, Dr. Andreas Limmer, Dr. Dirk Wohlleber (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie) und Dr. Jennifer Landsberg und Prof. Dr. Thomas Tüting (Labor für Experimentelle Dermatologie) danken.

Ich möchte meiner ganzen Familie, meinem Freund und allen Freunden, die auf vielfältige Weise zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben, Danke sagen. Dabei geht ein besonderes Dankeschön an meine Mutter, Christiane tho Pesch, für das Korrekturlesen dieser Arbeit und an meinen Freund, Sergio D'Araio, für die geduldige Hilfe bei der Formatierung.