

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und  
Tumorimmunologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

**Chemokine als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung: CCL19 (ELC)  
verbessert den tumorprotektiven Effekt einer Her-2/neu-DNA-Vakzine**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gerd Baldenhofer

aus Stuttgart

Datum der Promotion: 05.12.2014

# Inhaltsverzeichnis

1.0 Abstrakt .....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Methodik.....	1
1.3 Ergebnisse.....	1
1.4 Schlussfolgerung .....	2
1.5 Introduction .....	2
1.6 Methods .....	2
1.7 Results .....	3
1.8 Conclusion.....	3
2.0 Einleitung.....	4
2.1 Immuntherapie .....	4
2.2 Tumorkvakzinierung .....	5
2.2.1 Tumorantigene .....	6
2.3 DNA Vakzinierung .....	9
2.3.1 Antigenpräsentation nach DNA Vakzinierung .....	9
2.3.2 Dendritische Zellen .....	12
2.4 Koexpression von immunstimulatorischen Molekülen bei der DNA-Vakzinierung .....	13
2.4.1 Das Chemokin CCL19 .....	17
2.4.2 CCL19 und spezifische Immunität.....	18
2.5 Her-2/neu.....	18
3.0 Fragestellung.....	21
4.0 Material und Methoden.....	22
4.1 Maus-Tumormodell.....	22

4.1.1 Vakzinierung und Tumor-Challenge.....	22
4.1.2 Aufbereitung der Splenozyten.....	23
4.2 ELISPOT .....	24
4.2.1 Prinzip .....	24
4.2.2 Protokoll.....	24
4.3 Durchflusszytometrie .....	25
4.3.1 Prinzip .....	25
4.3.2 Protokoll.....	26
4.4 Indirekte Durchflusszytometrie der Her-2/neu-spezifischen Antikörper.....	27
4.4.1 Prinzip .....	27
4.4.2 Protokoll.....	27
4.5 Plasmid-Präparation .....	28
4.5.1 Klone .....	28
4.5.2 Präparation .....	28
4.6 Her-2/neu-Expression auf D2F2IE2.....	29
4.7 CFSE-Zellproliferation.....	29
4.7.1 Prinzip .....	29
4.7.2 Protokoll.....	30
4.8 Zellkultur.....	31
4.8.1 D2F2/E2-Zellen.....	31
4.8.2 SK-BR-3-Zellen .....	31
4.8.3 Standardmedium.....	32
4.8.4 Escherichia Coli .....	32
4.8.5 Kryokonservierung von Zellen.....	33
4.9 Puffer.....	33
4.9.1 PBS (Phosphate buffered saline).....	33
4.9.2 Erythrozytenlysepuffer.....	33
4.9.3 FACS-Puffer.....	34
4.9.4 TNT-Puffer.....	34
4.10 Statistische Methoden .....	34
5.0 Ergebnisse.....	35
5.1 D2F2/E2-Tumorzellen zeigen eine starke Expression von Her-2/neu.....	35

5.2 Koexpression von CCL19 verbessert den protektiven Effekt einer Her-2/neu DNA Vakzine.....	36
5.3 T-Zellen von vakzinierten Mäusen proliferieren nach in vitro Stimulation mit D2F2/E2.	38
5.4 Koexpression von pDNA(Her-2/neu) und pDNA(CCL19) bewirkt eine Th1-Polarisierung der Immunantwort .....	39
5.5 Immunphänotyp der Splenozyten von überlebenden Mäusen der verschiedenen Vakzinierungsgruppen .....	40
5.6 CCL19 als Adjuvans induziert eine verstärkte humorale anti-Her-2/neu Immunantwort .	43
5.7 Übersicht der Ergebnisse.....	45
6.0 Diskussion .....	46
7.0 Abkürzungsverzeichnis.....	55
8.0 Literaturverzeichnis .....	58
9.0 Eidesstattliche Versicherung .....	73
10.0 Lebenslauf .....	75
11.0 Publikationsliste.....	76
11.1 Publikationen.....	76
11.2 Posterpräsentationen.....	76
12. Danksagung .....	77

## **1.0 Abstrakt**

### **1.1 Einleitung**

Die genetische Immunisierung mit Plasmid-DNA gegen Tumorantigene ist ein vielversprechender Ansatz in der Tumorstimmung. Um die in bisherigen klinischen Studien unbefriedigende Immunogenität von DNA-Vakzinen zu verbessern, werden unterschiedliche Adjuvantien eingesetzt. In diesem Zusammenhang sind Chemokine wie CCL19 interessante immunregulatorische Moleküle, da sie wichtige Determinanten einer adaptiven Immunantwort sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit des Chemokins CCL19 als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung untersucht. CCL19 spielt eine zentrale Rolle bei der Interaktion von T-Zellen und dendritischen Zellen in der immunologischen Synapse, ein zentraler Schritt bei der Induktion Antigen-spezifischer Immunität. Als Zielantigen diente Her-2/neu, ein Tumor-assoziiertes Antigen, das bei einem Teil der Mamma-Karzinome überexprimiert wird.

### **1.2 Methodik**

In einem BALB/c-Maus-Tumormodell wurden Tumor-Challenge-Experimente mit Her-2/neu-positiven syngenen Tumorzellen durchgeführt. Die Mäuse wurden zunächst mit einer Her-2/neu-DNA-Vakzine (pDNA(Her2/neu) intramuskulär immunisiert, wobei CCL19-kodierende Plasmid-DNA (pDNA(CCL19) als Adjuvans verwendet wurde. Als Kontrolle dienten pDNA(Her-2/neu), pDNA(CCL19) und Mock-Vektor alleine. In den verschiedenen Vakzinierungsgruppen wurden dann die durch die Vakzine erzielte Tumorstimmung sowie die induzierte Her2/neu-spezifische T-zelluläre und humorale Immunantwort analysiert.

### **1.3 Ergebnisse**

Im Vergleich zu pDNA(Her-2/neu) alleine führte die Vakzinierung mit pDNA(Her-2/neu) und pDNA(CCL19) zu einer signifikanten Verbesserung der Tumorstimmung und einer

Th1-polarisierten Her2/neu-spezifischen T-Zell-Antwort. Weiterhin konnte durch die Koapplikation von CCL19 als Adjuvans eine Amplifikation der humoralen Anti-Her-2/neu-Immunantwort erreicht werden. Der genaue immunologische Mechanismus bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

### **1.4 Schlussfolgerung**

In einem Her2/neu-Maus-Tumormodell ist CCL19 in der Lage ist, die Wirksamkeit einer Her-2/neu-DNA-Vakzine zu steigern und ist somit ein potentes Adjuvans für die DNA-Vakzinierung. Die klinische Perspektive von Her2/neu-DNA-Vakzinen liegt u.a. in einer Anwendung bei Patientinnen mit Her2/neu-positivem Mamma-Karzinom in einer klinischen Situation mit minimaler Resterkrankung (MRD).

### **1.5 Introduction**

Genetic immunization using plasmid DNA (pDNA) against tumor antigens is a promising strategy for tumor vaccination. In order to overcome insufficient immunogenicity of DNA vaccines which has so far been observed in clinical trials, different adjuvants are being used. In this context, chemokines such as CCL19 can be considered as attractive immunoregulatory candidate molecules, since they are key regulators of adaptive immune responses.

In this study, CCL19 was investigated as an adjuvant for DNA vaccination. CCL19 plays a central role for the interactions between T cells and dendritic cells within the immunological synapse, which is a pivotal step during the induction of antigen-specific immunity. Her-2/neu is a tumor-associated antigen being expressed in a subgroup of breast cancer and was used as a target antigen.

### **1.6 Methods**

Tumor challenge experiments were performed in a BALB/c mouse tumor model using Her-2/neu-positive syngeneic tumor cells. Mice were immunised intramuscularly with a Her2/neu DNA vaccine (pDNA(Her-2/neu) together with CCL19-encoding plasmid DNA

(pDNA(CCL19) as an adjuvant. pDNA(Her-2/neu), pDNA(CCL19) and mock vector alone were used as controls. Vaccine-induced protection from tumor growth, the induction of Her2/neu-specific T cell responses as well as Her2/neu-specific humoral immune responses were analysed.

### **1.7 Results**

In comparison with pDNA(Her-2/neu) alone, vaccination with pDNA(Her-2/neu) and pDNA(CCL19) resulted in significant improvement of both tumor protection and Th1-polarized Her2/neu-specific T cell responses. Furthermore, the humoral anti-Her-2/neu immune response was significantly amplified. The exact immunological mechanism remains to be studied.

### **1.8 Conclusion**

In a Her2/neu mouse tumor model, CCL19 is able to augment the efficacy of a Her2/neu DNA vaccine and can therefore be considered as a potent adjuvant for DNA vaccination. The clinical perspective of Her2/neu DNA vaccines might be their use in Her-2/neu-positive breast cancer patients in a clinical situation of minimal residual disease (MRD).

## 2.0 Einleitung

### 2.1 Immuntherapie

Immuntherapeutische Ansätze gelten heute als erfolgreiche Erweiterung der drei Säulen der Krebstherapie, bestehend aus Operation, Chemo- und Radiotherapie. Nach jahrelanger Forschung und unzähligen Rückschlägen gibt es erste Anwendungen, die in der Klinik eingesetzt werden. Vorteil der immuntherapeutischen Strategien sind die zielgerichtete Behandlung, besonders im Vergleich zu Radio- und Chemotherapie, die aufgrund der fehlenden Spezifität mit einer ausgeprägten allgemeinen Toxizität verbunden sind. Zuerst sind die inzwischen zahlreich verfügbaren monoklonalen Antikörper zu nennen, wie zum Beispiel Rituximab (MabThera©) beim B-Zell-Lymphom oder Trastuzumab (Herceptin©) beim Mamma-Karzinom. Diese haben bei ihrem Einsatz einen zusätzlichen Vorteil für behandelte Patienten erbracht [1, 2].

Ziel der Immuntherapie von Tumorerkrankungen ist es, die große Spezifität des Immunsystems auszunutzen, um Zielzellen effektiv zu eradizieren und gesunde Körperzellen zu verschonen. Heutzutage gibt es verschiedenste Methoden um eine Immuntherapie durchzuführen. Sie lässt sich unterteilen in aktive und passive Immuntherapie. Bei der passiven Immuntherapie werden zuvor hergestellte Antikörper, die spezifisch für bestimmte Antigene sind, dem Patienten verabreicht. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang auch der adoptive T-Zelltransfer, der bisher nur in klinischen Studien zur Anwendung kommt. Hierbei werden isolierte T-Zellen, welche vom Patienten selbst oder einem Spender stammen, in vitro expandiert, gegebenenfalls genetisch modifiziert, gegen das Zielantigen aktiviert und anschließend dem Empfänger transferiert.

Das Ziel der aktiven Immuntherapie ist es, eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren. Unterschieden werden Immunisierungsformen wie z.B. die direkte Immunisierung mit rekombinanten Tumorproteinen bzw. -peptiden, die Verabreichung von antigenpräsentierenden Zellen, die zuvor mit Tumorpeptiden beladen worden sind und genmodifizierte Tumorzellen sowie DNA oder auch RNA, die für Tumorantigene kodiert.



## **2.2 Tumorstabilisierung**

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts gelang es William B. Coley durch die lokale Injektion hitzebehandelter Bakterien mit darauf folgender lokaler Inflammation, Tumore in Regression zu bringen. Dies stellt die erste unspezifische Immuntherapie dar. Es wird angenommen, dass er durch die unspezifische Stimulierung multipler Immunzellen auch solche aktivierte, die gegen eben jene Krebszellen reaktiv waren [3].

1960 formulierte Burnet seine Immunosurveillance-Theorie (engl. Immunüberwachung), in der er postuliert, dass das Immunsystem Tumorzellen durch veränderte Oberflächenproteine erkennen und eradizieren kann. Dieser Theorie zufolge ist die Entstehung von Tumoren somit auch auf Fehler in der Kontrolle durch das Immunsystem zurückzuführen [4].

Ob diese generelle Überwachung der Tumorentstehung durch das Immunsystem tatsächlich existiert oder, wie manche Autoren schlussfolgern, dies nur speziell auf viral verursachte Tumore zutrifft, die durch die Expression viraler Antigene als Ziele erkannt werden, ist nicht abschließend geklärt [5, 6]. Sicher ist jedoch, dass immunologische Botenstoffe und Immunzellen des Körpers Einfluss auf die Entstehung von Tumoren nehmen können und man durch verschiedene therapeutische Ansätze Immunreaktionen gegen diese erzeugen kann [7].

Eine große Rolle bei Untersuchungen am Tiermodell spielen sogenannte Knockout-Tiere, bei denen ein Gen gezielt ausgeschaltet wurde, so dass man Informationen darüber gewinnen kann, wozu dieses Gen dient. So konnten Kaplan et al. zeigen, dass Tumore bei IFN- $\gamma$ -Rezeptor defizienten Knockout-Mäusen schneller wachsen bzw. vermehrt spontane Tumore auftreten [8]. Weiterhin stellte sich heraus, dass Mäuse, die infolge eines Gen-Knockouts keine Gammadelta T-Zellen bilden können, anfälliger sind für die Bildung von kutanen Tumoren nach Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen [9]. Auch beim Menschen konnte man einen Zusammenhang zeigen zwischen der Anzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten und der klinischen Prognose. Beim Malignen Melanom ist eine starke Infiltration des Tumors mit Lymphozyten verbunden mit einer bis zu dreifach längeren Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten, die eine solche Infiltration nicht aufweisen [10]. Somit ist der Versuch

naheliegender, die Kapazität des Immunsystems nutzen zu wollen und durch Immunisierungsstrategien verbesserte Effekte gegen Tumore zu erzielen.

### 2.2.1 Tumorantigene

Um eine spezifische Reaktion des Immunsystems gegen Tumorzellen hervorzurufen, benötigt man als Ziel entsprechende Antigene, die nur auf diesen Zellen exprimiert werden und sie so von anderen Zellen unterscheidbar machen und die zugleich von CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden können. Hierbei kann man fünf verschiedene Arten von Antigenen unterscheiden [11, 12]:

1. Differenzierungsantigene, welche nur auf Zellen einer bestimmten Gewebedifferenzierung und entsprechend den daraus entstehenden Tumorzellen exprimiert werden, wie z.B. das prostataspezifische Antigen (PSA).
2. Tumor-/Testisantigene werden normalerweise nur bei gesunden männlichen Erwachsenen auf Gonaden exprimiert, können aber auch bei bestimmten Tumoren vorgefunden werden. Beispiele sind hier das Melanoma Antigen Encoding Gene-1 (MAGE-1) oder das Cancer/Testis-Antigen 1B (CTAG1B) [13, 14].
3. Tumorassoziierte Antigene werden in unterschiedlichem Maß von verschiedenen Zellen exprimiert, von bestimmten Tumoren aber überexprimiert. Beispiele dafür sind das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) oder das karzinoembryonale Antigen (CEA).
4. Tumorspezifische Antigene zeigen sich nur auf Tumorgewebe und resultieren z.B. aus einer Punktmutation im Genom der Krebszelle, wie z.B. das Tumorsuppressorgen P53 beim Glioblastoma multiforme [15]. Ein weiteres Beispiel ist die Entstehung des Fusionsproteins BCR-ABL durch eine Chromosomentranslokation (sogenanntes Philadelphia-Chromosom) z.B. bei der Chronischen Myeloischen Leukämie oder in seltenen Fällen bei der Akuten Lymphatischen Leukämie [16].

5. Virale Antigene, die durch einen Befall von Viren und die daraus resultierende Mutation des Gewebes entstehen und von Tumoren exprimiert werden, wie z.B. durch das Humane Papillomavirus (HPV) beim Cervixkarzinom.

Betrachtet man die oben aufgeführte Auswahl, so erkennt man, dass bestimmte Antigene, wie tumorspezifische, virale und Tumor-/Testisantigene eine gezielte Immuntherapie ermöglichen, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen. Die unter Punkt drei genannten tumorassoziierten Antigene sind bereits vor der Entstehung der Krebszellen im Körper vorhanden, so dass für den Großteil dieser Antigene Selbsttoleranz entstanden ist. Selbsttoleranz zur Vermeidung einer Immunreaktion gegen körpereigenes Gewebe entsteht auf zwei Wegen. Einerseits durch zentrale Toleranz während der Entwicklung von T-Zellen im Thymus, wobei T-Zellen mit zu hoher Affinität gegen körpereigene Peptide negativ selektiert werden [17, 18]. Diese Peptide werden von medullären Epithelzellen des Thymus präsentiert. T-Zellen, die eine zu starke Bindung an diese Peptide zeigen, werden eliminiert. Um T-Zellen, die dieser negativen Selektion aufgrund einer nur schwachen Bindung an diese Peptide entgangen sind, daran zu hindern, autoimmune Reaktionen hervorzurufen, gibt es mehrere Mechanismen, die unter dem Begriff „periphere Toleranz“ zusammengefasst werden. So zirkulieren naive T-Zellen im Blutkreislauf, in sekundären Lymphorganen und im Lymphsystem, wobei sie erst nach Kontakt mit dendritischen Zellen aktiviert werden. Da sie peripheres Gewebe außerhalb des Lymphsystems nicht erreichen, kommen sie nicht in direkten Kontakt mit gewebespezifischen Antigenen. T-Zellen, die bereits Antigenkontakt hatten, zirkulieren durch die meisten Gewebetypen des Körpers, aber reagieren auch dann nicht gegen körpereigene Zellen, wenn ihr T-Zell-Rezeptor deren Oberflächenproteine bindet. Erst wenn das Gewebe Teil einer Inflammation oder Infektion ist, wird die T-Zelle aktiviert. Hierzu benötigt sie kostimulatorische Signale, z.B. von aktivierten Dendritischen Zellen, die der T-Zelle eine Inflammation anzeigen. Bleiben diese Signale aus, so wird Toleranz gegenüber diesen Antigenen erzeugt [19]. Autoreaktive T-Zellen, die mehrfach körpereigene Proteine ohne kostimulatorische Signale binden, gehen sogar durch Apoptose zugrunde. Antigene, gegen die auf diese Weise Toleranz erzeugt wurde, sind dann nur gering immunogen.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang die „Danger-Theorie“ von P. Matzinger. Sie war die Erste, die davon ausging, dass das Immunsystem nicht zwischen fremd und eigen, sondern zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“ unterscheidet [20]. T-Zellen reagieren demnach auf die Präsentation von Antigenen nur dann mit einer Aktivierung, wenn es gleichzeitig zur Ausbildung von Gefahrensignalen oder zur Bindung von kostimulatorischen Molekülen kommt. Solche Gefahrensignale sind z.B. Lipopolysaccharide, bakterielle Lipopeptide oder DNA, die unmethylierte CpG Motive enthält, wie sie ebenfalls bei Bakterien vorkommt. Hierfür besitzt die T-Zelle spezielle Rezeptoren – unter anderem die „Toll-like-Rezeptor“-Gruppe. Kostimulatorische Moleküle sind z.B. CD40, CD80 und CD86, die auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden und an T-Zellen binden. Findet zusätzlich zur Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem entsprechenden MHC-Molekül keine Aktivierung durch kostimulatorische Moleküle oder Gefahrensignale statt, verfällt die T-Zelle in Anergie [21, 22].

Des Weiteren gibt es so genannte „Immune Escape“-Varianten, d.h. Tumorzellen, die auf unterschiedliche Art und Weise die Interaktion zwischen T-Zellen und Tumorzellen behindern und infolgedessen ihrer Zerstörung entgehen. Mechanismen hierfür sind z.B. die verminderte Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche oder die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen [23]. Außerdem scheinen regulatorische T-Zellen sowie myeloische Suppressorzellen eine große Rolle in der Unterdrückung einer natürlichen oder induzierten Immunantwort zu spielen [24-26].

Im Rahmen der Immunoediting-Theorie wird diskutiert, dass es eine komplexe Interaktion zwischen Immunzellen und Tumorzellen gibt und dass durch diese Interaktion ein Prozess stattfindet, der als Immunoediting bezeichnet wird. Man nimmt an, dass im Rahmen der Tumorentwicklung zwar Tumorzellen durch das Immunsystem zerstört werden, jedoch solche selektiert werden, die in der Lage sind, der Erkennung durch das Immunsystem und somit ihrer Eradikation zu entgehen. Die so entstandenen Tumorvarianten können dann ungehindert wachsen [27]. Richtungsweisend war in diesem Zusammenhang die Arbeit von Shankaran et al., der Tumore von Wildtyp-Mäusen und solchen, die einen genetischen Immundefekt hatten, in Mäuse transplantierte, die ebenfalls ein defektes Immunsystem besaßen. Die transplantierten Tumore wuchsen daraufhin weiter. Transplantierte er allerdings Tumore von Mäusen

mit Immundefekt in gesunde Mäuse, so wurde beinahe die Hälfte dieser Tumore abgestoßen. Tumore, die sich in immunkompetenten Mäusen entwickeln, sind insofern aggressiver. Das Immunsystem nimmt demnach Einfluss auf die Entwicklung bzw. die Ausprägung von Tumoren, indem solche Varianten selektiert werden, die das Immunsystem überleben [28].

## **2.3 DNA Vakzinierung**

Die Entwicklung von Vakzinen auf der Basis von DNA beruht auf der Entdeckung von Wolff et al. vor ca. 20 Jahren, dass die Injektion von bakterieller Plasmid-DNA zur Transfektion von Muskelzellen und anschließend zur Produktion des Proteins führte, das auf dem Plasmid kodiert war [29]. Plasmide werden aus Bakterien präpariert und bestehen aus einem zirkulären doppelsträngigen DNA Molekül. Diese Form der aktiven Immuntherapie versucht das Immunsystem der Patienten zur Erkennung von Antigenen auf der Oberfläche von Tumoren zu stimulieren und in der Folge direkt zur Elimination der Krebszellen zu aktivieren [30]. Tang et al. gelang der Nachweis, dass Immunisierung mit bakteriellen Plasmiden zur Produktion von spezifischen Antikörpern gegen das auf dem Plasmid kodierte Protein führt [31].

Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass ein Plasmid, welches das Gen für ein Oberflächenprotein von Influenza-A trägt, Mäuse vor nachfolgender Infektion mit Influenza durch Induktion zellulärer und humoraler Immunität schützen konnte [32]. Diese Untersuchungen waren der Anfang für die Entwicklung einer ebenso simplen wie effektiven neuen Impfstrategie, die in der Folge dazu führte, dass für eine Vielzahl von tumorösen wie auch infektiösen Erkrankungen DNA-Vakzine entwickelt wurden, die sowohl im Tiermodell als auch bereits in klinischen Studien erprobt werden [33-35].

### **2.3.1 Antigenpräsentation nach DNA Vakzinierung**

Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, wie die applizierte DNA eine starke Immunantwort erzeugt. Es wurden unterschiedliche Mechanismen der Antigenprozessierung, die relevant sind, nachgewiesen. Womöglich führt auch nur deren Zusammenspiel zu einer ausreichenden Immunantwort [30]: Das Cross-Priming,

eine Präsentation durch Myozyten und die direkte Transfektion von antigenpräsentierenden Zellen (APC) [36].

Als ein wichtiger Mechanismus in der Induktion einer Immunantwort gilt heute die „Cross Presentation“ (engl. Kreuz-Präsentation):

Normalerweise werden im Zytoplasma produzierte (endogene) Proteine und Peptide nach Spaltung in kleine acht bis neun Aminosäuren umfassende Peptide durch beinahe alle zellkernhaltigen Zellen des Körpers über „Major Histocompatibility Complex“ (MHC)-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert [37-39]. Dieser Komplex wird von zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Zellen erkannt und, wenn die  $CD8^+$ -Zelle einen antigenspezifischen T-Zellrezeptor trägt, der den Peptid-MHC-Komplex erkennt, die entsprechende Zelle zerstört. Dies geschieht durch die Sekretion lytischer Enzyme oder durch Induktion von Apoptose, also der Einleitung eines programmierten Zelltodes. So werden z. B. auch nach Infektion mit einem Virus die in der infizierten Gastzelle produzierten Virusproteine den  $CD8^+$ -Lymphozyten präsentiert, die infizierte Zelle zerstört und auf diese Weise das Virus an der Replikation gehindert. Darüber hinaus existieren Zellen, die in der Lage sind exogene Proteine wie bakterielle Bestandteile oder Toxine nach Phagozytose über MHC Klasse-II-Moleküle für  $CD4^+$ -T Zellen anzubieten. Zu diesen professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) gehören unter anderem dendritische Zellen (DC) und Makrophagen. Diese können nun nach Interaktion entsprechende  $CD4^+$ -T-Helferzellen aktivieren. Nach Aktivierung proliferieren diese  $CD4^+$ -Lymphozyten und differenzieren sich entweder unter Einfluss von IL-12 oder IFN- $\gamma$  zu Th1- oder unter Einfluss von IL-4 zu Th2-Helferzellen. Die Th1-Zellen verstärken eine immunologische Antwort von zytotoxischen Zellen, während Th2-Zellen unter anderem die Aktivierung von B-Zellen mit anschließender Produktion von Antikörpern unterstützen. Diese Differenzierung ist also vom immunologischen Milieu der Zellen abhängig, dem „Microenvironment“. Damit nach der Aufnahme von Antigenen durch die antigenpräsentierenden Zellen eine Immunkaskade eingeleitet wird, müssen außer den entsprechenden Zytokinen auch sogenannte Gefahrensignale vorhanden sein, die den Zellen die Anwesenheit eines für den Körper gefährlichen Agens vermitteln. Dies können z. B. Lipopolysaccharide aus der Zellwand von Bakterien sein oder auch bakterielle DNA, die an bestimmte Oberflächenrezeptoren antigenpräsentierender Zellen bindet.

Beim sogenannten „Cross Priming“ (engl. Kreuz-Bahnung) dienen aufgenommene, nicht endogene Proteine professionellen antigenpräsentierenden Zellen nicht wie eben beschrieben zur Induktion einer Th2-gewichteten Immunantwort, sondern nach intrazellulärer Verarbeitung und Bindung an MHC-I zur Stimulation einer Th1-gewichteten, zellulären Antwort von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen [40-43]. Von der Mehrheit der Autoren wird dieser Weg als essentiell für eine erfolgreiche Vakzinierung gegen Tumore erachtet, da eine effektive Immunreaktion eine Th1-Antwort benötigt [44-46].

Der zweite mögliche Mechanismus beruht auf der Tatsache, dass die Plasmid DNA nach intramuskulärer Injektion im Zytosol von Muskelzellen gefunden und nach Prozessierung das entsprechende Antigen auf MHC-Klasse-I-Molekülen der Myozyten exprimiert werden kann. Weiterhin können sie als Antigen depot fungieren, so dass über einen längeren Zeitraum dem Immunsystem das entsprechende Antigen präsentiert wird und eine langanhaltende Immunität damit unterstützt würde. Fraglich ist, ob Myozyten fähig sind, eine entsprechende Immunantwort zu triggern und T-Zellen direkt zu aktivieren, da sie nur eine geringe Expression von MHC-Molekülen aufweisen und unter Normalbedingungen keine Expression von kostimulatorischen Signalen wie CD80 oder CD86 zeigen [47]. Dennoch können auch Myozyten unter bestimmten Umständen in der Lage sein, Zytokine zu sezernieren und kostimulatorische Signale zu exprimieren [48]. Möglich wäre auch ein Transfer von Antigenen nach Prozessierung aus den Muskelzellen in antigenpräsentierende Zellen, die anschließend T-Zellen aktivieren [49].

Als Drittes gibt es nach Immunisierung mit DNA einen kleinen Teil von APC, zum größten Teil dendritische Zellen (DC), die direkt mit den Plasmiden transfiziert werden und nach Expression des entsprechenden Proteins direkt T-Zellen aktivieren können [35].

In jedem der genannten Mechanismen spielen DC eine wichtige Rolle für die Induktion einer starken Immunantwort nach DNA Vakzinierung [50-54].

### 2.3.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen des Körpers [51, 55]. Sie entstammen dem Knochenmark und lassen sich unterteilen in unreife und reife Zellen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen und dementsprechend auch unterschiedliche Gene aktivieren und Proteine exprimieren. Unreife DC finden sich in nahezu allen Geweben des Körpers und dienen der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Einerseits sind DC zur Phagozytose von Mikroorganismen befähigt und können andererseits durch Makropinozytose auch extrazelluläre Flüssigkeit mit darin gelösten Molekülen aufnehmen [56]. Außerdem besitzen sie auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren, die eine Endozytose möglich machen, wie den Fc-Rezeptor, der es gestattet, opsonierte Epitope aufzunehmen, oder den Mannose-Rezeptor, der bestimmte Kohlenhydratmuster auf der Oberfläche von Bakterien erkennt [57, 58]. Ansonsten findet sich eine geringe Expression von kostimulatorischen und MHC-Molekülen im unreifen Zustand.

Zur Reifung werden DC durch bestimmte Stimuli gebracht. Signale sind z.B. bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), unmethylierte CpG oder Oligonukleotide, die über bestimmte Rezeptoren, die „Pattern-Recognition Receptors“, erkannt werden. Diese dienen der Erkennung von Molekülen, die für Krankheitserreger spezifisch sind [59]. Am besten erforscht sind aus dieser Gruppe die „Toll Like Receptors“ (TLR). Die Rezeptoren dieser Familie erkennen unterschiedliche mikrobielle Moleküle und zeigen eine sehr distinkte Verteilung auf bestimmten Immunzellen, die nach Aktivierung wiederum unterschiedliche Zytokine sezernieren [60]. Damit machen sie zu einem gewissen Grad eine angepasste Immunreaktion je nach Krankheitserreger möglich. Diese Rezeptoren stellen das Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar [61]. Weiterhin führen bestimmte Zytokine, also inflammatorische Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\alpha$  und - $\gamma$ , zur Reifung der DC. Auf diese Weise aktivierte und gereifte DC verändern stark ihre Oberflächenexpression. Zum einen werden Rezeptoren für die Antigenaufnahme durch Endozytose von der Zelloberfläche entfernt, zum anderen Moleküle exprimiert, wie z.B. CCR7, die eine wichtige Rolle spielen bei der Migration in die lymphatischen Organe [62]. Außerdem exprimieren reife dendritische Zellen vermehrt MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle, die zur Präsentation der zuvor aufgenommenen Antigene dienen. Zusätzlich kommt es zu einer



Vermehrung der auf der Zelloberfläche befindlichen kostimulatorischen Signale wie CD40, CD80 und CD86 und dendritische Zellen produzieren IL-12, um eine Aktivierung der spezifischen T-Zelle zu erreichen [63, 64]. Reife DC sind also darauf ausgelegt, eine entsprechende Immunantwort gegen das aufgenommene und prozessierte Antigen zu induzieren und spielen somit eine zentrale Rolle in der Initiation einer spezifischen Immunabwehr [55, 65-67]. Sie sind verantwortlich für das sogenannte „Priming“ der T-Zellen. Die DC aktivieren spezifische T-Zellen durch Präsentation der entsprechenden Zielantigene. Im Anschluss daran verändern auch T-Zellen ihr Rezeptor-Expressionsmuster in der Art, dass CCR7 herunterreguliert und die Expression anderer Chemokinrezeptoren wie z.B. CCR5 gesteigert wird, die vor allem in peripherem oder entzündetem Gewebe zu finden sind. Hierüber wird dann die Migration an den Ort der ursprünglichen Antigenaufnahme durch die DC ermöglicht [68, 69].

#### ***2.4 Koexpression von immunstimulatorischen Molekülen bei der DNA-Vakzinierung***

Im Mausmodell ließ sich mittels Injektion von Plasmid DNA, die für entsprechende Tumorantigene kodierte, in vielerlei verschiedenen Tumormodellen mit unterschiedlichen Tumorantigenen Tumorabstoßung und Regression nachweisen [70]. Leider konnten diese vielversprechenden Ergebnisse in klinischen Studien bisher nicht auf den Menschen übertragen werden [71]. Tatsächlich ist das Ergebnis bisher untersuchter Immuntherapien im Allgemeinen in klinischen Studien am Menschen meist ohne wesentliche klinische Verbesserung. Auch wenn die meisten Tumor-Vakzine einen messbaren immunologischen Effekt hatten, wie z. B. eine erhöhte Anzahl tumorspezifischer T-Zellen oder verstärkte Leukozyteninfiltration des Tumorgewebes, verbesserten sie das klinische Outcome, an objektiven klinischen Kriterien wie Remission oder Langzeitüberleben gemessen, in den meisten Fällen jedoch gar nicht [2].

Eine Methode, das immunologische Milieu zu beeinflussen, ist die Koexpression von Molekülen, die für Antigene und Zytokine kodieren [72]. Diese Zytokine, die von nahezu jeder Körperzelle synthetisiert werden und eine wichtige Funktion in der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung ausüben, sollen einen Einfluss auf die Th1-/Th2-

Ausrichtung, wie auch eine allgemein verstärkende Wirkung auf die Immunantwort nach Vakzinierung haben [73].

Ein gut untersuchtes Zytokin in diesem Zusammenhang ist GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Dieses Zytokin spielt eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktor im Rahmen der Hämatopoese, moduliert aber auch durch seine Wirkung auf Leukozyten lokale und systemische Immunreaktionen, z.B. durch verbesserte Antigenpräsentation und gesteigerte T-Zellproliferation. Sowohl beim Tier als auch beim Menschen konnte ein Einfluss auf die Anti-Tumor-Immunantwort gezeigt werden. Unter anderem ließ sich durch Koinjektion von Plasmiden, die für GM-CSF kodierten, eine Verstärkung der Immunantwort gegenüber der alleinigen Injektion des Tumorantigen-tragenden Plasmids nachweisen [74, 75]. Am Menschen gibt es bereits erste Ergebnisse von Phase-II-Studien bei Melanompatienten, die eine verbesserte T-Zellantwort zeigen [76].

Interessant sind hier u. a. auch Chemokine, also chemotaktische Zytokine, die dazu dienen, die Migration von Leukozyten zu regulieren und antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen an den Ort der Entzündung oder in lymphatische Organe zu rekrutieren [77]. Unterteilen lassen sich Chemokine in 4 Subgruppen, je nach Lage der 4 enthaltenen Cysteinreste am N-terminalen Ende der Moleküle. Befindet sich zwischen den ersten beiden Cysteingruppen eine Aminosäure oder sind diese direkt angrenzend, unterscheidet man zwischen CXC oder CC-Chemokinen. Diese beiden Untergruppen machen den Großteil der Chemokine aus. Ferner gibt es noch einen Vertreter mit 3 Aminosäuren zwischen den Cysteinen (CX3C) und zwei, denen der erste und dritte Cysteinrest fehlt (XC). Entsprechend dieser Nomenklatur erfolgt eine durchgehende Nummerierung der Chemokine. Chemokine interagieren mit transmembranösen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Es sind inzwischen über 50 Chemokine bekannt, die Zahl der entsprechenden Rezeptoren liegt bei mindestens 20 [78, 79]. Dabei gibt es Chemokine, die an verschiedene Rezeptoren binden. Solche Rezeptoren, die unterschiedliche Chemokine binden und Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren, die nur einen spezifischen Bindungspartner besitzen.

Das Profil der Chemokinrezeptoren auf einer Zelle wird bestimmt durch Zelltyp, Differenzierungsgrad und Umgebungsfaktoren wie Chemokinkonzentration oder Anwesenheit von inflammatorischen Zytokinen. Chemokine spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der lokalen Immunabwehr als auch der kontinuierlichen Zirkulation der

Immunzellen sowie auch beim angeborenen und beim adaptiven Immunsystem [80]. Die Migration der Zellen, die einen entsprechenden Rezeptor exprimieren, geschieht entlang des chemischen Gradienten von Chemokinen (Chemokingradient) hin zur höchsten lokalen Konzentration von Chemokinen [79]. Sezerniert werden diese entsprechend von nahezu jeder Zelle des Körpers, allen voran gewebständige Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Sie führen ebenfalls zur Transkription von Genen, die involviert sind in Motilität, Gewebeinvasion, Zell-Zell-Interaktion und Zellüberleben.

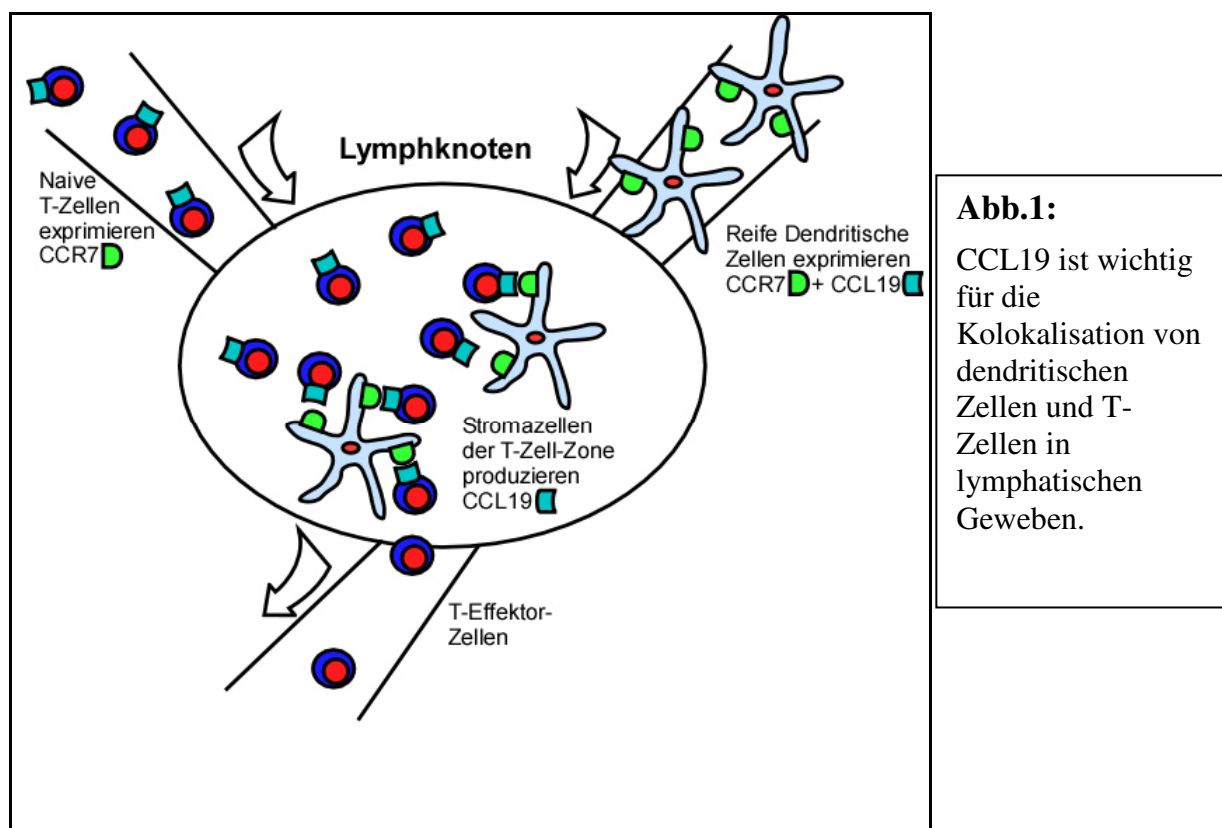
### Übersichtstabelle der Chemokine [81]

Chemokin	Rezeptor	Exprimiert durch	Funktion
CCL1	CCR8	Monozyten, T-Zellen	Th2 Inflammation
CCL2	CCR2	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Basophile, Progenitorzellen	Angeborene und adaptive Immunität, Th1 Inflammation, ischämische und allergische Lungenverletzung, tumorfördernd
CCL3	CCR1, CCR5	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Basophile, Eosinophile, Dendritische Zellen, Progenitorzellen	Angeborene und adaptive Immunität, Th1 Inflammation, tumorfördernd
CCL4	CCR5, CCR8	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, Progenitorzellen	Angeborene und adaptive Immunität
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, Eosinophile, Basophile	Angeborene und adaptive Immunität, tumorfördernd
CCL6		Makrophagen	
CCL7	CCR1, CCR2, CCR3	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, Eosinophile, Basophile	Angeborene und adaptive Immunität
CCL8	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Eosinophile, Basophile	Angeborene und adaptive Immunität, Lungenverletzung
CCL9		T-Zellen	tumorfördernd
CCL10		T-Zellen	
CCL11	CCR3	T-Zellen, Eosinophile	Angeborene und adaptive Immunität, Th2 Inflammation, Allergische Lungen- und Hauterkrankung
CCL12	CCR2	Monozyten, T-Zellen, Eosinophile	Th1 und Th2 Inflammation, Allergische Lungenerkrankung
CCL13	CCR1, CCR2, CCR3	Monozyten, T-Zellen, Eosinophile	Angeborene und adaptive Immunität
CCL14	CCR1	Monozyten, Progenitorzellen	Angeborene und adaptive Immunität
CCL15	CCR1, CCR3	Monozyten, T-Zellen, Eosinophile	Angeborene und adaptive Immunität
CCL16	CCR1, CCR2,	T-Zellen, Neutrophile	

	CCR5, CCR8		
CCL17	CCR4	T-Zellen	T-Lymphopoese
CCL18		Naive T-Zellen	Interaktion von T-Zellen und /Dendritischen Zellen
CCL19	CCR7	T- und B-Zellen, Dendritische Zellen, aktivierte NK-Zellen	T-Lymphopoese, T-Zell Homing
CCL20	CCR6	T- und B-Zellen	Entwicklung von dendritischen Zellen, adaptive Immunität, Immunität von Haut und Darm
CCL21	CCR7, CXCR3	T- und B-Zellen, Dendritische Zellen, aktivierte NK-Zellen, Makrophagenprogenitor	T-Lymphopoese, T-Zell Homing
CCL22	CCR4	T-Zellen, Eosinophile	Adaptive Immunität von kutanen T-Zellen, Thymus und allergischer Lunge
CCL23	CCR1	Dendritische Zellen, Osteoklasten	
CCL24	CCR3	Effektor Th2-Zellen	Angeborene und adaptive Immunität
CCL25	CCR9	Gedächtnis T- und B-Zellen, unreife Thymozyten	T-Lymphopoese, adaptive Immunität, T- und B-Zell Trafficking in Dünndarm und Thymus
CCL26	CCR3	Eosinophile, T-Zellen	Angeborene und adaptive Immunität
CCL27	CCR10	CLA-T-Zellen	Haut
CCL28	CCR3, CCR10	T-Zellen	
CXCL1	CXCR1, CXCR2	Neutrophile, Endothelzellen	Angeborene Immunität
CXCL2	CXCR2	Neutrophile, Endothelzellen	Angeborene Immunität
CXCL3	CXCR2	Neutrophile	Angeborene Immunität
CXCL4	CXCR3	Fibroblasten, Endothelzellen	
CXCL5	CXCR2	Neutrophile	Angeborene Immunität
CXCL6	CXCR1, CXCR2	Neutrophile	
CXCL7	CXCR2	Fibroblasten	
CXCL8	CXCR1, CXCR2	Neutrophile, Endothelzellen, T-Zellen, Basophile	Angeborene Immunität und akute Lungenverletzung
CXCL9	CXCR3	T-Zellen, Progenitorzellen	T-Lymphopoese
CXCL10	CXCR3	T-Zellen	Adaptive Immunität
CXCL11	CXCR3, CXCR7	T-Zellen	Th1 Antwort
CXCL12	CXCR4, CXCR7	Monozyten, B-Zellen, Progenitorzellen	Hämatopoese, Homöostase von Leukozyten
CXCL13	CXCR5	B-Zellen	Follikuläre Aktivität
CXCL14		Neutrophile, NK-Zellen, B-Zellen	Entwicklung von antigenpräsentierenden Zellen
CXCL15		Neutrophile der Lunge	
CXCL16	CXCR6	Dendritische Zellen, Makrophagen, Karzinomzellen	T-Lymphopoese, Extravasation
CXCL17			
XCL1	XCR1	B-, T- und NK-Zellen, Neutrophile	
XCL2	XCR1	B-, T- und NK-Zellen, Neutrophile	
CX3CL1	CX3CR1	Effektor T-Zellen	Extravasation

## 2.4.1 Das Chemokin CCL19

Ein für die Interaktion zwischen DC und T-Zellen wichtiges Chemokin ist das Epstein-Barr-Virus-induziertes-Molekül-1-Ligand-Chemokin (ELC), auch als Chemokin-Ligand 19 (CCL19) bezeichnet, das in T-Zell-reichen Arealen von Lymphknoten und anderen lymphatischen Geweben wie Milz und Peyer-Plaques durch Stromazellen exprimiert wird. Der entsprechende Rezeptor, Chemokin Rezeptor 7 (CCR7), findet sich auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, B-Zellen und reifen dendritischen Zellen [82]. Bei den T-Zellen sind es naive und „Central Memory“ Zellen, die CCR7 exprimieren. Alle diese Zellen binden über CCR7 an CCL19 und werden somit im gleichen Lymphknotenareal rekrutiert, so dass eine Aktivierung und Expansion von T-Zell-Klonen für spezifische Antigene ermöglicht wird.



CCL19 spielt somit eine wichtige Rolle für das „lymph node homing“, also das Rezirkulieren der Immunzellen aus der Peripherie in den Lymphknoten und die Kolokalisation von DC und T-Zellen und damit der Aktivierung des spezifischen Immunsystems durch antigenpräsentierende Zellen [69, 83, 84]. Hierbei kommt es zur

Ausbildung der sogenannten „immunologischen Synapse“, ein Begriff der beschreibt, dass Immunzellen miteinander in Kontakt treten.

### **2.4.2 CCL19 und spezifische Immunität**

Unter physiologischen Umständen führt CCL19 dazu, dass reife DC, die mit Antigen beladen sind, und T-Lymphozyten, die einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor tragen, im Lymphknoten zusammengeführt werden. Hierbei handelt es sich sowohl um naive T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, als auch um „Central Memory“-T-Zellen, die das immunologische Gedächtnis bilden. Dieser Schritt ist sowohl wichtig für das Priming der T-Zellen als auch die Reaktivierung einer Immunantwort [85]: Bindet die dendritische Zelle eine antigenspezifische T-Zelle und werden kostimulatorische Rezeptoren exprimiert, so wird die T-Zelle aktiviert. Dabei ist eine einzige DC in der Lage zwischen 100 und 3000 naive T-Zellen zu primen.

Im Mausmodell hat die alleinige Gabe von CCL19 die Entwicklung von spontanen Tumoren verlangsamen können und resultierte in massiver Infiltration des Tumorgewebes mit Leukozyten [86].

Ektoper Expression von CCL19 in Inselzellen des Pankreas von transgenen Mäusen führte zur Infiltration von Lymphozyten und Dendritischen Zellen und zur vermehrten Bildung von „High Endothelial Venules“ (HEV) [87].

## **2.5 Her-2/neu**

Eine gezielte Immuntherapie gegen Krebs erfordert ein geeignetes Antigen, das im Idealfall tumorspezifisch ist. Deren Anzahl ist jedoch begrenzt und nur bei einigen wenigen Tumoren vorhanden. Weitaus häufiger sind überexprimierte tumorassoziierte Antigene, die jedoch die Gefahr in sich tragen, dass erfolgreich induzierte Immunität eine Schädigung gesunder Körperzellen im Sinne einer autoimmunen Reaktion verursacht. Dennoch hat die spezifische Immuntherapie schon erfolgreich Einzug in den klinischen Alltag gehalten. Vor allem die passive Immuntherapie, also der Transfer von Antikörpern oder aktivierten Zellen, konnte in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse erzielen. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung des monoklonalen

Antikörpers Trastuzumab (Herceptin ©) beim Mamma-Karzinom. Dieser Antikörper ist gegen einen Oberflächenrezeptor, Her-2/neu, gerichtet, der unter anderem bei einem Teil von Brustkrebspatientinnen überexprimiert ist. In klinischen Studien konnte die Wirksamkeit einer Chemotherapie durch die Kombination mit Trastuzumab deutlich verbessert und die 1-Jahres-Überlebensrate gesteigert werden. Zurzeit finden sich weitere monoklonale Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen Her-Rezeptoren in klinischen Studien [88]. Nachteil der passiven Therapie ist die fehlende Erzeugung eines immunologischen Gedächtnisses.

Her-2/neu ist für die Entwicklung neuer Immuntherapien äußerst interessant, da es bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Karzinomen überexprimiert wird. Her-2/neu oder auch ErbB2, ein 185kDA großes transmembranöses Protein, gehört zur „Human Epidermal Growth Factor Receptor“ (Her) Familie, eine Gruppe von Rezeptortyrosinkinasen, bestehend aus Her-1, auch bekannt als „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR), bis Her-4, die eine große Rolle in der Entwicklung der Brustdrüse, des kardiovaskulären und des neuronalen Systems spielen [89]. Ihr Einfluss auf die Embryologie anderer Gewebe ist bisher noch nicht genauer untersucht. Ihre intrazelluläre Wirkung entfalten sie nach Bindung eines entsprechenden Liganden durch Dimerisation mit einem anderen Rezeptor der Her-Familie (Homo- oder Heterodimere). Diese Wirkung besteht im erwachsenen Organismus in verstärkter Zellproliferation, -motilität und -differenzierung sowie Angiogenese [90, 91].

Des Weiteren wirken sie antiapoptotisch. Entsprechende Liganden sind Anphiregulin, Betacellulin, Heparin bindender EGF, Epiregulin, EGF, NRG1 und TGF $\alpha$ , wobei interessant ist, dass Her-2 keinen eigenen Liganden zu haben scheint, sondern durch Heterodimerisation mit anderen Her-Familienmitgliedern oder durch Homodimerisation bei hoher Expression aktiviert wird. Her-2 enthaltende Heterodimere entwickeln die stärkste biologische Aktivität [92].

Als erstes - und deswegen am besten - wurde Her-2/neu-Überexpression bei Brustkrebspatientinnen untersucht. Am häufigsten zeigt inflammatorischer Brustkrebs eine Überexpression (60%), gefolgt von Wilmstumor (50%), Blasentumor (44%) und nicht inflammatorischem Brustkrebs (25-30%). Die Zahlenangaben anderer Karzinome wie Ovar-, Prostata-, Pankreas-, Lungen- und Kolontumoren unterscheiden sich in der Literatur deutlich [92, 93].

Zielantigene, die direkt die Entwicklung von Neoplasien begünstigen, sind besonders interessant für die spezifische Immuntherapie, da deren Überexpression für das Tumorstadium benötigt wird und deren Herunterregulation darum unwahrscheinlich ist. Auch die transmembranöse Lage von Her-2/neu bietet ein optimales Ziel sowohl für Antikörper als auch T-Zellen [94].

Ob die Überexpression von Her-2/neu der Auslöser der Zellentartung und damit der Tumorentstehung oder nur Ausdruck anderer kausaler Vorgänge ist, bleibt bisher noch unklar. Vieles spricht für eine ursächliche Rolle von Her-2/neu, insbesondere die Tatsache, dass Her-2/neu-transgene Mäuse multiple Mammakarzinome in frühem Alter entwickeln [95, 96]. Weiterhin kann Her-2 den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren [97], der wichtig ist für Tumorentwicklung und -progression durch antiapoptotische Signalwege [98]. Außerdem führt die Her-2/neu-Bindung zur Aktivierung der Angiogenese [99]. Möglich ist auch, dass Her-2/neu-Überexpression nur Ausdruck und Teil einer größeren Kaskade ist. Eindeutig ist jedoch die Korrelation mit einem aggressiveren Tumorverhalten und einer insgesamt schlechteren Prognose. So zeigen Mammakarzinome mit amplifizierter Her-2/neu-Expression eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit nach Operation, erhöhte Resistenz gegenüber Chemo- und Hormontherapie, erhöhte Gefahr der Metastasenbildung und Betroffene eine kürzere Überlebenszeit [100-102]. Ferner ist bei Tumorzellen mit Her-2/neu-Überexpression ebenfalls die Expression von CXCR4 gesteigert, welches wiederum eine bedeutende Rolle bei der lokalen Infiltration und Metastasierung in anderes Gewebe spielt [103].

Zusammenfassend kann man sagen, dass Her-2/neu ein geeignetes Antigen für eine gezielte Immuntherapie darstellt. Den bisherigen Immunisierungsversuchen beim Menschen gegen Her-2/neu-Antigen ist aber das gleiche Problem wie den meisten Vakzinierungsmodellen gegen Tumorantigene zu eigen, dass die Behandlung zwar in vitro messbar eine verstärkte T-Zell-Aktivierung gegen das Antigen bewirkt, sich diese Aktivierung aber nicht in klinisch messbare Ergebnisse im Sinne von verbesserter Remission oder Überlebenszeit übersetzt. Eine Optimierung der Vakzinierungsstrategien ist somit notwendig [94, 104, 105]



### 3.0 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die adjuvante Gabe von für CCL19 kodierender DNA die Immunogenität einer Her-2/neu-DNA-Vakzine amplifizieren kann. Es wurde experimentell geprüft, ob eine Vakzinierung mit einer CCL19-koexprimierenden Her-2/neu-DNA-Vakzine in der Lage ist, BALB/c-Mäuse nach subkutaner Injektion von syngenem Her-2/neu-positiven Tumorzellen vor der Entwicklung von Tumoren zu schützen. Darüber hinaus sollte die durch die Vakzinierung induzierte Her-2/neu-spezifische Immunantwort untersucht werden.

Konkret sollten folgende Fragen durch die vorliegende Arbeit beantwortet werden:

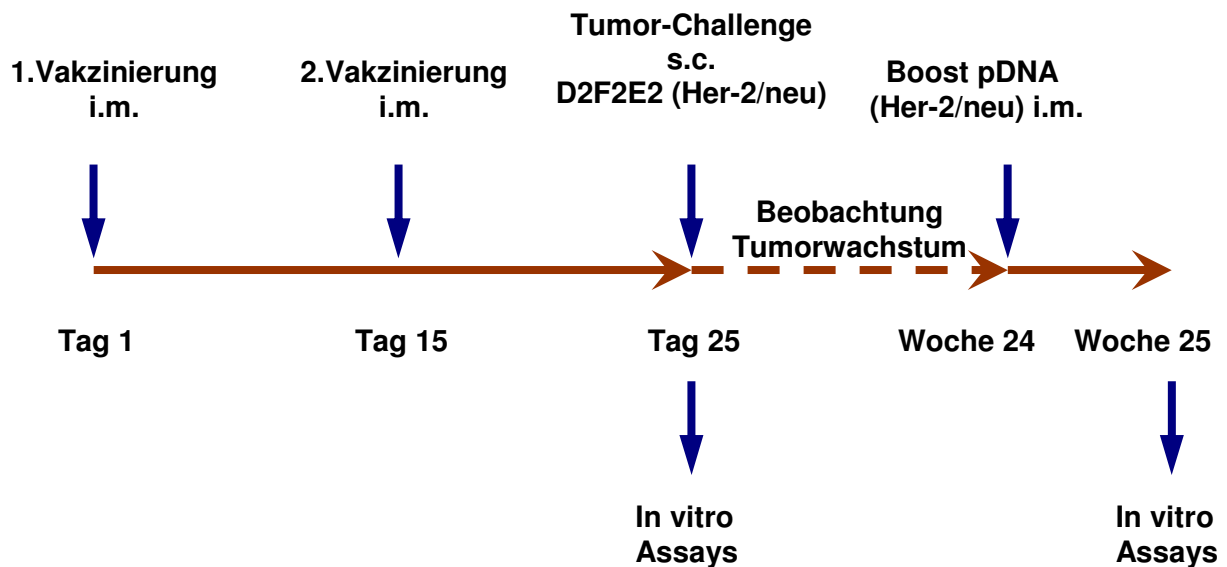
- 1) Führt die Koexpression von Her-2/neu und CCL19 im Rahmen der DNA-Vakzinierung zu einer Verbesserung der Tumorprotektion in einem Her-2/neu+ BALB/c-Maus-Tumormodell?
- 2) Welchen Einfluss hat das Adjuvans CCL19 auf die Her-2/neu-spezifische humorale und T-zelluläre Immunantwort?

## 4.0 Material und Methoden

### 4.1 Maus-Tumormodell

Die Experimente im Maus-Tumormodell erfolgten nach Genehmigung durch die zuständigen Behörden (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Tierversuchsvorhaben G 0176/03). Für die Versuche wurden weibliche BALB/c-Mäuse von der Firma Charles River in Sulzfeld, Deutschland bezogen. Bei Eintreffen der Tiere waren diese 6-8 Wochen alt. Die Tierhaltung erfolgte gemäß keimfreien Standardbedingungen im Tierstall des Max-Delbrück-Centrums, Berlin.

#### 4.1.1 Vakzinierung und Tumor-Challenge



**Abb. 2**  
Zeitlicher Ablauf des Experiments

Die einzelnen Gruppen bestanden aus jeweils 7 Mäusen. Das Experiment wurde einmal wiederholt. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte zweimal im Abstand von 14 Tagen. Immunisiert wurde mit Plasmid DNA für Her-2/neu, für CCL19, für Her-2/neu plus

Plasmid DNA für CCL19 oder mit einem leeren Mock Vektor. Für jedes Gen wurden 100µg Plasmid DNA gelöst in insgesamt 100µl phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate buffered Saline, PBS) intramuskulär in den Oberschenkel der Mäuse injiziert. Weitere zehn Tage später wurde den Mäusen Serum für die Durchführung von immunologischen Assays entnommen. Es erfolgte ferner kontralateral zur Seite der pDNA-Injektion die Tumor-Challenge mit  $2 \times 10^5$  D2F2/E2-Zellen in 100µl PBS subkutan. D2F2/E2 sind BALB/c syngene Zellen einer murinen Mammakarzinomzelllinie, die Her-2/neu exprimieren. Die Expression von Her-2/neu auf D2F2/E2-Zellen wurde vor Tumor-Challenge untersucht. Anschließend wurde das Wachstum der Tumore zweimal wöchentlich kontrolliert und das Volumen vorhandener Tumore gemessen bis die erste Maus getötet werden musste, da der Tumor entsprechend der ethischen Richtlinien der zuständigen Behörden eine kritische Größe erreicht hatte. Die kombinierte Immunisierung von pDNA(Her-2/neu) mit pDNA(CCL19) wurde verglichen mit alleiniger Applikation von pDNA(Her-2/neu), pDNA(CCL19) oder Mock Vektor.

Nach einer Beobachtungszeit von 24 Wochen führten wir an allen überlebenden Mäusen, die kein Tumorstadium gezeigt hatten, erneut eine einmalige Immunisierung mit Plasmid DNA durch, die unabhängig der Vakzinierungsgruppe für Her-2/neu kodierte. Eine Woche danach wurden die Mäuse getötet und Serum und Milz für die Durchführung von ELISA und T-Zell-Assays gewonnen. Die Entnahme von Blut geschah mit einer gläsernen Pasteurpipette im Auge der betäubten Mäuse. Serum wurde von anderen Blutbestandteilen durch Zentrifugation getrennt und im Anschluss für weitere Versuche bei -20°C eingefroren.

### **4.1.2 Aufbereitung der Splenozyten**

Nach Ende des Beobachtungszeitraums wurde den Mäusen steril die Milz entnommen. Diese diente zur Präparation von Mauslymphozyten. Dazu wurde die Milz in Standardmedium (siehe 4.8.3) mechanisch zerkleinert und eine Einzelzellsuspension hergestellt, danach die Zellen durch Zentrifugation (1min, 600rpm, ohne Bremse) von Bindegewebe getrennt. Anschließend, nach erneuter Zentrifugation (5min, 1000rpm), erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 3ml Erythrozyten-Lysepuffer (siehe 4.9.2) für 4 Minuten. Nach zweimaligem Waschen (erst 10ml, dann 5ml

Standardmedium, jeweils mit anschließender Zentrifugation 6min, 1000rpm) wurden die Zellpellets in Standardmedium resuspendiert und ausgezählt. Die weiteren Schritte für ELISPOT und FACS siehe unter 4.2 und 4.3.

## **4.2 ELISPOT**

### **4.2.1 Prinzip**

Der ELISPOT ist ein sensibles Verfahren zur Messung der Zytokinsekretion von individuellen Immunzellen nach Stimulation mit Antigen. Dazu wird in einem ersten Schritt die Mikrotiterplatte mit Antikörpern für das entsprechende Zytokin beschichtet. Dann erfolgen die Zugabe von Lymphozyten und die Inkubation mit Antigen für 18 Stunden. Die aus der Milz von behandelten Mäusen gewonnenen Lymphozyten werden durch die Inkubation mit Antigen reaktiviert und setzen entsprechende Zytokine frei. Das zu untersuchende Zytokin wird nach Sekretion an die Antikörper am Boden der Platte gebunden. Nach dem Waschen der Platte, wodurch die Zellen und ungebundene Zytokine entfernt werden, wird ein weiterer zytokinspezifischer biotinylierter Antikörper hinzugegeben. Dieser wird in einem weiteren Schritt durch Zugabe von Streptavidin gebunden, das mit einem Enzym konjugiert ist. Dieses Enzym führt bei Inkubation mit dem entsprechenden Substrat zur Ausbildung sichtbarer gefärbter Stellen (englisch = Spots), die jeweils einer zytokinsezernierenden Zelle entsprechen. Diese Spots können dann mit entsprechender Software (AID EliSpot Reader, AID, Strassberg, Deutschland) auf dem Computer ausgezählt werden.

### **4.2.2 Protokoll**

Im Wesentlichen entsprachen die Schritte den Angaben des Herstellers. Die 96 Vertiefungen („wells“) der Mikrotiterplatte (ELISPOT Kit, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) wurden entweder mit „Capture Antibody“ gegen IFN- $\gamma$  oder IL-4 über Nacht bei -4°C beschichtet. Dieser wurde vor Inkubation in PBS verdünnt (1:200) und anschließend 100 $\mu$ l dieser Verdünnung je Vertiefung zugegeben. Am nächsten Tag

wurde die Antikörper-Suspension entfernt, die Platte mit Standardmedium gewaschen und 2 Stunden blockiert. Danach erfolgte die Inkubation von 100µl Splenozytensuspension (siehe 3.1.2) in Standardmedium ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) mit der Stimulationslösung für 18 Stunden. Als Stimulator dienten 100µl einer Lösung aus sieben verschiedenen Epitopen des Her-2/neu-Proteins (WITA GmbH, Teltow, Deutschland) mit einer Konzentration von 1µg/ml für jedes Epitop. Die Epitope wurden aus dem extrazellulären, transmembranösen und intrazellulären Bereich des Her-2/neu-Proteins ausgewählt und mit einer Reinheit von über 95% synthetisiert.

Gleichzeitig wurden Negativ- (100µl Zellsuspension + 100µl Standardmedium ohne Peptide) und Positivkontrollen (100µl Zellsuspension + 100µl einer Lösung mit 1µg/ml Concanavalin A) angefertigt.

Zur Beendigung der Reaktion nach 18 Stunden folgten Waschschrte mit deionisiertem Wasser und PBS mit 0,05% Tween-20 (Roth AG®, Karlsruhe, Deutschland). Nach 2-stündiger Inkubation mit Detektionsantikörper (biotinylierter anti-Maus IFN-γ/IL-4 in Verdünnung 1:250 in PBS mit 10% FCS (Fetal cow serum)) wurde Streptavidin Horseradish Peroxidase (Streptavidin-HRP, Verdünnung 1:100 in PBS mit 10% FCS) zugegeben. 60 Minuten später und nach gründlichem Spülen wurde das Substrat (Diaminobenzidin, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt. Die Reaktion wurde anhand der sichtbaren Entwicklung von einzelnen gefärbten Punkten nach 5-10 Minuten durch ausgiebiges Waschen mit Wasser gestoppt. Die Platte wurde anschließend über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Die Auswertung erfolgte dann computergestützt mit einem AID EliSpot Reader (AID, Strassberg, Deutschland).

## **4.3 Durchflusszytometrie**

### **4.3.1 Prinzip**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die es ermöglicht die Expression von extra- oder intrazellulären Rezeptoren und Zytokinen auf Zellen durch spezifische Markierung mit einem fluoreszierenden Antikörper sichtbar zu machen. Dabei fließen die Zellen in einer Suspension einzeln an einem Laserstrahl vorbei, der einerseits entsprechend der

Streuung des Lichtes die Größe und Granularität der Zelle bestimmen kann. Andererseits kann man mittels fluoreszierender Antikörper, die durch den Laser angeregt werden, bestimmte Oberflächenmoleküle markieren. Unterschiedliche Fluoreszenzstoffe emittieren Licht verschiedener Wellenlänge, so dass eine quantitative und qualitative Unterscheidung der Expression mehrerer Moleküle auf der Oberfläche von Zellen gleichzeitig möglich ist.

### **4.3.2 Protokoll**

Benutzt wurden Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD11c, CD19, CD44, CD62L, B220, CCR7, DX5, I-A<sup>d</sup>, NK1.1 (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und F-4/80 (Serotec, Kidlington, Oxford, UK). Markiert waren diese Antikörper mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll- $\alpha$  Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC), was eine vierfache Färbung der Zellen ermöglichte. Diese Färbungen gestatteten die Quantifizierung und Unterscheidung von B-Zellen, Dendritischen Zellen, Monozyten, NK-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen konnten durch die Verwendung der Antikörper gegen CD44 und CD62L weiterhin unterschieden werden in naive, Memory- oder Effektor-T-Zellen.

Die Splenozyten für die FACS-Untersuchung wurden wie unter 4.1.2. beschrieben gewonnen. Danach wurden die Zellen in FACS-Puffer suspendiert, in Fraktionen à 50 $\mu$ l geteilt und für 15min mit den entsprechenden Antikörpern bei 4°C inkubiert. Zu jeder Fraktion wurde 0,25 $\mu$ l pro Antikörper zugegeben. Nach zweimaligem Waschen (5min, 1500rpm) mit FACS-Puffer zur Entfernung nicht gebundener Antikörper erfolgte die Messung (10.000Zellen/Ansatz) am FACS-Calibur (Becton Dickinson Biosciences, Mountain View, CA, USA). Zur Auswertung diente das Programm „Cell-Quest“ (Becton Dickinson).

## **4.4 Indirekte Durchflusszytometrie der Her-2/neu-spezifischen Antikörper**

### **4.4.1 Prinzip**

Der „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern in Serumproben. Für die Anwendung auf unser System wurde dieser Assay ähnlich einer bereits beschriebenen Modifikation verändert, so dass eine quantitative Auswertung der humoralen Antwort am Durchflusszytometer möglich ist [106]. Als Matrix dienen SK-BR-3-Zellen, eine humane Mamma-Adenocarcinom-Zelllinie, die Her-2/neu überexprimiert. Diese werden für eine Stunde mit dem Serum der Mäuse inkubiert, so dass Her-2/neu spezifische Antikörper, die sich im Serum befinden, an diese Zellen binden. Hinterher werden diese Komplexe mit biotinylierten Antikörpern in Lösung gegeben, die gegen murine Immunglobulinsubtypen gerichtet sind. Im nächsten Schritt wird Streptavidin hinzugefügt, das Biotin mit hoher Affinität bindet und das an den Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) gekoppelt ist. Diese Fluoreszenz lässt sich mittels Durchflusszytometrie messen und ist proportional der Menge an gebundenem Immunglobulin. Die mittlere Fluoreszenz erlaubt somit einen quantitativen Vergleich der Bindung von Her-2/neu-Antikörper an SK-BR-3-Zellen.

### **4.4.2 Protokoll**

40µl SK-BR-3-Zellen ( $3-5 \times 10^5$  Zellen) in FACS-Puffer wurden für eine Stunde bei 4°C mit 10µl einer Verdünnungsreihe von Mausseren in PBS inkubiert (Endkonzentration der Sera 1:50, 1:100 und 1:200). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 500µl FACS-Puffer (5min, 1200rpm) wurden 50µl Antikörper (nach Verdünnung 1:50) zu den Pellets hinzugefügt, die gegen murines IgG1, IgG2a, IgG2b oder IgG3 gerichtet und mit Biotin konjugiert sind (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Es folgte eine Inkubation bei 4°C über 30min. Nach erneutem Spülen wurde das Pellet mit 50µl Streptavidin-APC (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), nach vorheriger Verdünnung 1:200, für 15min bei 4°C inkubiert. An ein letztes Waschen der Probe schloss sich die

Resuspension in 300µl FACS-Puffer an. Gemessen wurde die Fluoreszenz der einzelnen Proben am FACS-Calibur.

## **4.5 Plasmid-Präparation**

### **4.5.1 Klone**

Die Transformation der Plasmidvektoren erfolgte in *Escherichia coli* X1-blue (Agilent Technologies, Amsterdam, Niederlande). Zur Vakzinierung wurden ein leerer Mock Vektor (pVax, Invitrogen), ein Vektor für das humane ErbB2-Gen unter Kontrolle eines humanen CMV-Promoters (pVAX/E2a, bereitgestellt von Dr. S. Preise und Dr. T. Kammertöns, MDC, Berlin, Germany) und dem Resistenzgen für Kanamycin sowie Plasmid DNA für humanes CCL19, kloniert in den Vektor pcDNA3 mit einem Resistenzgen für Ampicillin und ein CMV Promoter, verwendet. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte dementsprechend mit Luria Bertani Medium (LB-Medium), das Ampicillin oder Kanamycin enthielt. Für die Vakzinierung der Mäuse wurden die Plasmide mit dem „Endofree Plasmid Giga Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) dem Protokoll entsprechend präpariert.

### **4.5.2 Präparation**

Die Selektion transformierter *E.coli* Bakterien erfolgte mittels Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltigem LB-Agar (100µg Antibiotikum/ml). Eine Vorkultur von 30ml LB-Medium (100µg Antibiotikum/ml) wurde mit einem Einzelklon der zuvor angelegten Agarplatte angeimpft und für 12h bei 37°C im Schüttler mit 180 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann auf 2,6l LB-Medium verteilt und weitere 12h zu oben genannten Umständen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Plasmide mit dem „Endofree Plasmid Giga Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Protokoll präpariert. Dabei wurde die Bakterienkultur zuerst pelletiert (11min, 6500rpm) und anschließend in einem speziellen Puffer (P1) resuspendiert. Durch Zugabe von Puffer P2 erfolgte die Lyse der Bakterienzellen, die zerstörten Zellproteine wurden durch



Puffer P3 ausgefällt und in der anschließenden Zentrifugation (11min, 8000rpm) pelletiert. Die Trennung der Plasmid-DNA von den Überresten der lysierten Bakterien wurde durch den Einsatz eines Vakuumfilters erreicht, die erhaltene Lösung wurde für 30min auf Eis gelagert. Anschließend diente eine Reinigungssäule, die die Plasmid-DNA gebunden hat, zum Auswaschen der verschiedenen Puffer-Lösungen. Die DNA wurde durch Zugabe von 100ml Puffer QF in vier Zentrifugenröhrchen (50ml) à 25ml eluiert. Zur Ausfällung der DNA wurde in jedes Falcon 17,5ml Isopropanol gegeben. Nach Zentrifugation (31min, 3800rpm) wurde das Pellet durch 70%iges Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (11min, 3800rpm). Im letzten Schritt wurden die vier Pellets nach kurzem Lufttrocknen in 0,5 – 1,5ml sterilem PBS gelöst und bei -20°C eingefroren.

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA-Lösung geschah mit dem Photometer (Beckman DU-600, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)

#### ***4.6 Her-2/neu-Expression auf D2F2/E2***

Zur Kontrolle der Expression von Her-2/neu wurde eine Suspension von D2F2/E2-Zellen in FACS-Puffer hergestellt. Zu 50µl Suspension wurden 5µl anti-Her-2-PE (Becton Dickonson, San Jose, Ca, USA) hinzugegeben und für 15min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 500µl FACS-Puffer inklusive Zentrifugation (5min, 1500rpm) und anschließender Resuspension in 200µl FACS-Puffer erfolgte die Messung im FACS-Gerät. Als Negativkontrolle dienten D2F2/E2-Zellen ohne Zugabe von Antikörper und D2F2-Zellen, die keine Expression von Her-2/neu vorweisen, mit Zugabe von anti-Her-2-PE.

#### ***4.7 CFSE-Zellproliferation***

##### **4.7.1 Prinzip**

Carboxyfluorescein Diazetat Succinimidyl Ester (CFSE) kann passiv in Zellen diffundieren, bindet dort an zytoplasmatische Proteine und wird durch Esterasen

gespalten, so dass fluoreszierende Moleküle entstehen. Diese können anschließend nicht mehr aus der Zelle diffundieren. Die Fluoreszenzintensität je Zelle ändert sich somit nicht mehr. Gleichzeitig wird bei Zellteilung der Farbstoff jeweils zur Hälfte an jede Zelle weitergegeben, so dass sich die Fluoreszenzintensität je Tochterzelle halbiert. Werden zwei Zellpopulationen miteinander verglichen und jeweils mit CFSE angefärbt, zeigt sich die Zellpopulation mit stärkerer Proliferation durch im Verlauf geringere Fluoreszenzintensität je Zelle an.

#### **4.7.2 Protokoll**

Am ersten Tag wurden die Stimulatorzellen präpariert. Hierfür wurden  $2,5 \times 10^5$  Tumorzellen – entweder D2F2-Tumorzellen oder D2F2/E2-Tumorzellen – je Vertiefung in eine Titerplatte gegeben und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  belassen. Am nächsten Tag wurden diese mit 250 Grey bestrahlt und anschließend der Zellkulturüberstand verworfen. Zum Vergleich der Proliferation von Splenozyten wurden diese wie unter 3.1.2 beschrieben gewonnen, nachdem die Mäuse zweimal im Abstand von 14 Tagen mit pDNA(Her-2/neu) vakziniert wurden. Anschließend wurden  $1 \times 10^7$  Zellen/ml mit  $5 \mu\text{M}$  CFSE für 30min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem Zwischenschritt zum Waschen (1000 rpm, 10min) wurden die Zellen in RPMI Medium mit einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert, Danach gaben wir 2 ml dieser Zellsuspension in jede Vertiefung der Titerplatte ( $1 \times 10^7$  Zellen/well) – entweder zu Her-2/neu-negativen D2F2-Tumorzellen oder zu Her-2/neu-positiven D2F2/E2-Tumorzellen. Es folgte eine Inkubation für 3 Tage bei  $37^\circ$ . Die Zellsuspension wurde dann einmalig mit PBS gewaschen und nach Resuspension in FACS-Puffer mit entsprechenden Antikörpern markiert (siehe 3.3). Am Durchflusszytometer wurden CD4+- und CD8+-T-Zellen auf ihre Fluoreszenzintensität für CFSE untersucht.

## **4.8 Zellkultur**

### **4.8.1 D2F2/E2-Zellen**

D2F2 ist eine murine Mammakarzinomzelllinie abgeleitet von einem spontanen Brustkrebs bei einer BALB/c-Linie [107]. D2F2/E2 ist dieselbe Zelllinie transfiziert mit dem Selektionsvektor pRSV/neo und humanem Her-2/neu durch den Expressionsvektor pCMV/E2, so dass dieses Molekül auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wird. Die Expression wird kontrolliert durch Selektion mittels einer Resistenz gegen das Antibiotikum G418 (BD Pharmingen GmbH, Heidelberg, Deutschland) [108]. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Kammertöns (MDC, Berlin Deutschland) zur Verfügung gestellt und in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert. Die Prozentzahl an Her-2/neu-Expression von D2F2/E2-Zellen in unseren Experimenten war stets über 95%. Das Medium enthielt in 500ml:

- 10 % hitzeinaktiviertes und sterilfiltriertes fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 5 ml 100 mM Natriumpyruvat (Lonza, Verviers, Belgien)
- 100 IU/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 400 µg/ml G418 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- 50µM 2-Mercaptoethanol (Roth AG®, Karlsruhe, Deutschland)

### **4.8.2 SK-BR-3-Zellen**

SK-BR-3 ist eine humane Brust-Adenokarzinom-Zelllinie (ATCC, Manassas, USA) mit Überexpression von Her-2/neu. Die Zellen wurden in Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640) (Lonza, Verviers, Belgien) kultiviert. Als Zusatz enthielt das Medium in 500ml:

- 10 % hitzeinaktiviertes und sterilfiltriertes fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 2mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 5 ml 100 mM Natriumpyruvat (Cambrex BioScience, Verviers, Belgien)
- 100 IU/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- 50µM 2-Mercaptoethanol (Roth AG®, Karlsruhe, Deutschland)

#### **4.8.3 Standardmedium**

Als Standardmedium für „in vitro“ Versuche diente Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640) (Lonza, Verviers, Belgien) mit folgenden Zusätzen in 500ml:

- 10 % hitzeinaktiviertes und sterilfiltriertes fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 2mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 5 ml 100 mM Natriumpyruvat (Cambrex BioScience, Verviers, Belgien)
- 100 IU/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- 50 µM 2-Mercaptoethanol (Roth AG®, Karlsruhe, Deutschland)

#### **4.8.4 Escherichia Coli**

Die Kultivierung von E.coli erfolgte in Luria Bertani Medium. Auf einen Liter destilliertes Wasser wurde aufgefüllt mit:

- 10g Natriumchlorid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 10g Trypton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 5g Hefe Extrakt (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

- Einstellung auf pH 7,0 mit Natronlauge (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- LB-Agar enthält zusätzlich 15g Bactoagar / Liter

#### **4.8.5 Kryokonservierung von Zellen**

Pro Aliquot wurden  $1 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^7$  Zellen in 1 bis 1,5ml Einfriermedium (FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)) in 2ml Kryoröhrchen (Simport, Beloeil, Quebec, Kanada) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad belassen und unter tropfenweiser Zugabe von Standardmedium zweimalig mit anschließender Zentrifugation (5min, 1200rpm) gewaschen.

### **4.9 Puffer**

#### **4.9.1 PBS (Phosphate buffered saline)**

Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt:

- 8,0 g Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,2 g Kaliumchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

pH-Einstellung auf 7,2 und Autoklavierung

#### **4.9.2 Erythrozytenlysepuffer**

Mit destilliertem Wasser auf 0,5 Liter aufgefüllt:

- 4,15 g Ammoniumchlorid ((Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,5 g Natriumcarbonat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,2 g EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

pH-Einstellung auf 7,3 und Sterilfiltration

#### **4.9.3 FACS-Puffer**

Mit PBS auf 1 Liter aufgefüllt:

- 0,744g EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 5g Bovines Serum-Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 10ml 5%ige Natrium-N3 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

#### **4.9.4 TNT-Puffer**

Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt:

- 0,1M Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,15M Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

pH Einstellung auf 7,5

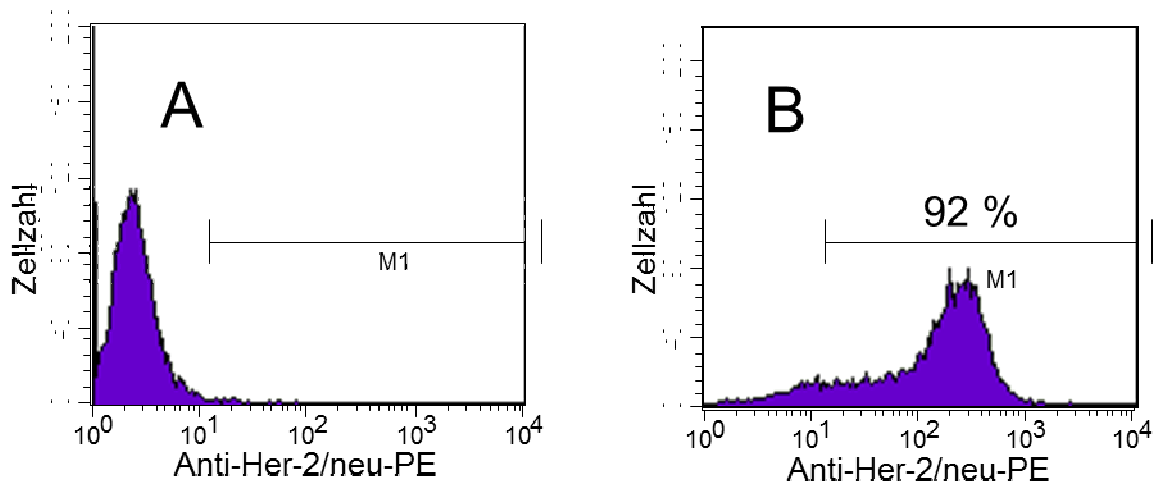
### **4.10 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung der Überlebenskurven und der Experimente erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Statistiksoftware (Version 5). Die Überlebenskurven der Mäuse wurden mit dem Log Rank Test ausgewertet, für die numerischen Werte der anderen Versuche wurde beim Vergleich von zwei Gruppen der students t-test, beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen die analysis of variance (ANOVA) angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p < 0,05$  angenommen.

## 5.0 Ergebnisse

### 5.1 D2F2/E2-Tumorzellen zeigen eine starke Expression von Her-2/neu

Zur Kontrolle der Expression des Her-2/neu-Proteins auf den Tumorzellen erfolgten regelmäßige Messungen am FACS-Gerät. Die Expression wurde kontrolliert durch Selektion mittels einer Resistenz gegen das Antibiotikum G418 und betrug stets über 90%. Abbildung 3 zeigt eine repräsentative Untersuchung aus einer Zellkultur mit Her-2/neu-positiven D2F2/E2-Tumorzellen.

**Abb. 3**

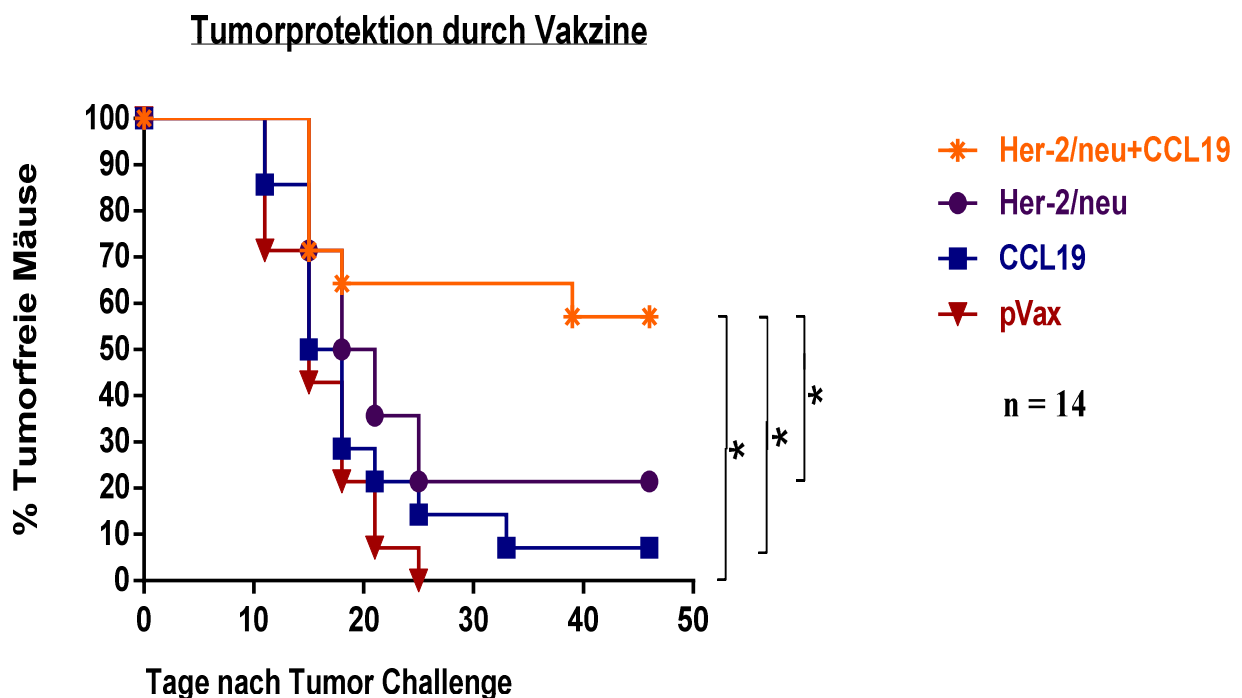
FACS-Analyse von Tumorzellen auf Expression von Her-2/neu durch Zugabe von Anti-Her-2/neu-PE-Antikörper.

**A** Her-2/neu-negative D2F2-Tumorzellen als Negativkontrolle **B** Her-2/neu-Expression auf D2F2/E2-Zellen

## 5.2 Koexpression von CCL19 verbessert den protektiven Effekt einer Her-2/neu DNA Vakzine

Verschiedene Gruppen von Mäusen wurden an Tag 1 und Tag 15 mit Plasmid DNA (pDNA) intramuskulär immunisiert. Eine Vakzinierung mit pDNA(CCL19) plus pDNA(Her-2/neu) wurde mit einer alleinigen Vakzinierung mit pDNA(Her-2/neu) verglichen. Als Kontrolle diente eine Immunisierung mit pDNA(CCL19) sowie eine Gruppe, die nur einen leeren Mock Vektor (pVax) erhielt, also pDNA, die für kein Protein kodierte. Syngene D2F2/E2 Tumorzellen, die Her-2/neu exprimieren, wurden allen Mäusen an Tag 25 subkutan gespritzt, sodann das Tumorwachstum in regelmäßigen Abständen zwei- bis dreimal pro Woche kontrolliert.

Die Mäuse, die eine Kombination aus CCL19 und Her-2/neu kodierenden Plasmiden erhalten hatten, zeigten zu 60% Tumorfreiheit nach 50 Tagen. In den anderen Gruppen war die Rate an tumorfreien Mäusen deutlich niedriger (Her-2/neu 20%, CCL19 7%, pVax 0%) (s. Abb. 4). Der Unterschied war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 4**

Die Koexpression von CCL19 verbessert den tumorprotektiven Effekt einer Her-2/neu DNA Vakzine nach Injektion von syngenen D2F2/E2 Zellen. Die Ergebnisse stellen gepoolte Daten aus 2 Experimenten dar, n = 14 Mäuse.

\* =  $p < 0,05$

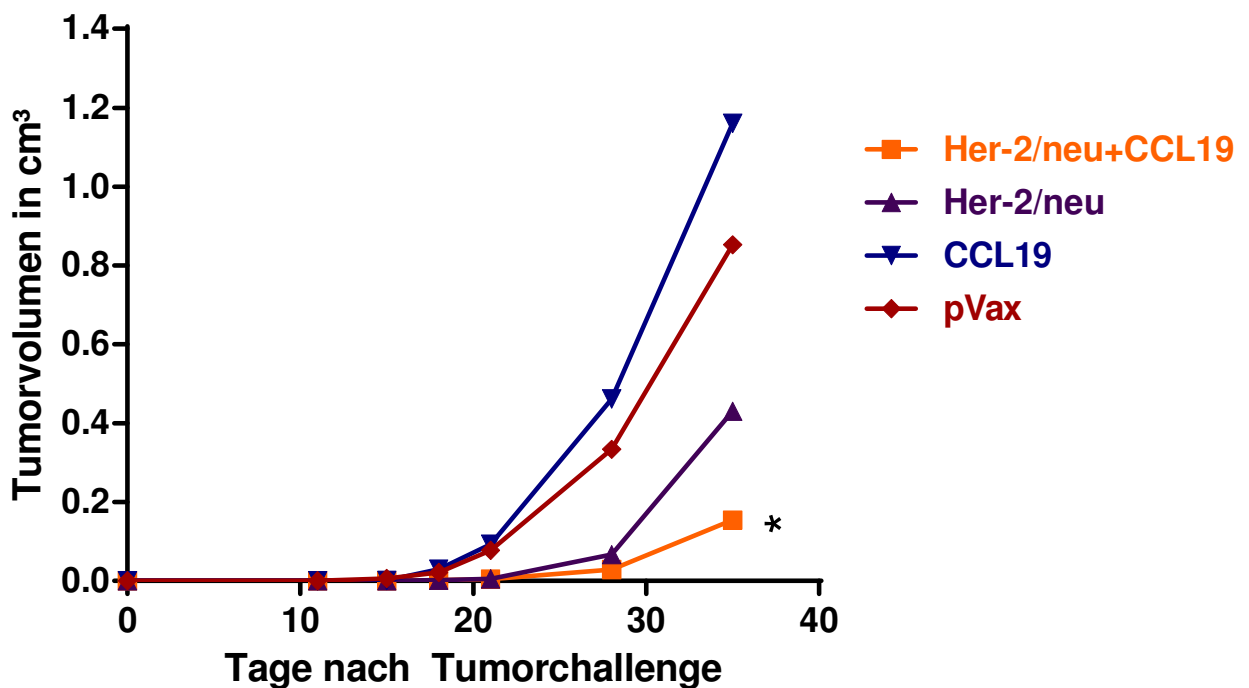


Anteil tumorfreier Mäuse

Tag	Her-2/neu+CCL19	Her-2/neu	CCL19	pVax
11	100 %	100 %	85 %	71 %
15	71 %	71 %	50 %	42 %
18	64 %	50 %	28 %	21 %
21	64 %	35 %	21 %	7 %
25	64 %	21 %	14 %	0 %
33	64 %	21 %	7 %	0 %
39	57 %	21 %	7 %	0 %

Auch zeigte sich nach Koinjektion von pDNA(Her-2/neu) plus pDNA(CCL19) eine deutliche Verlangsamung des Tumorwachstums im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Kontrollgruppen, die Mock Vektor oder CCL19 erhalten hatten, wiesen nach zwei Wochen eine rapide Zunahme des Tumorwachstums auf (s. Abb. 5). Auch die Immunisierung mit pDNA(Her-2/neu) allein konnte das Wachstum verzögern.

**Tumorwachstum**

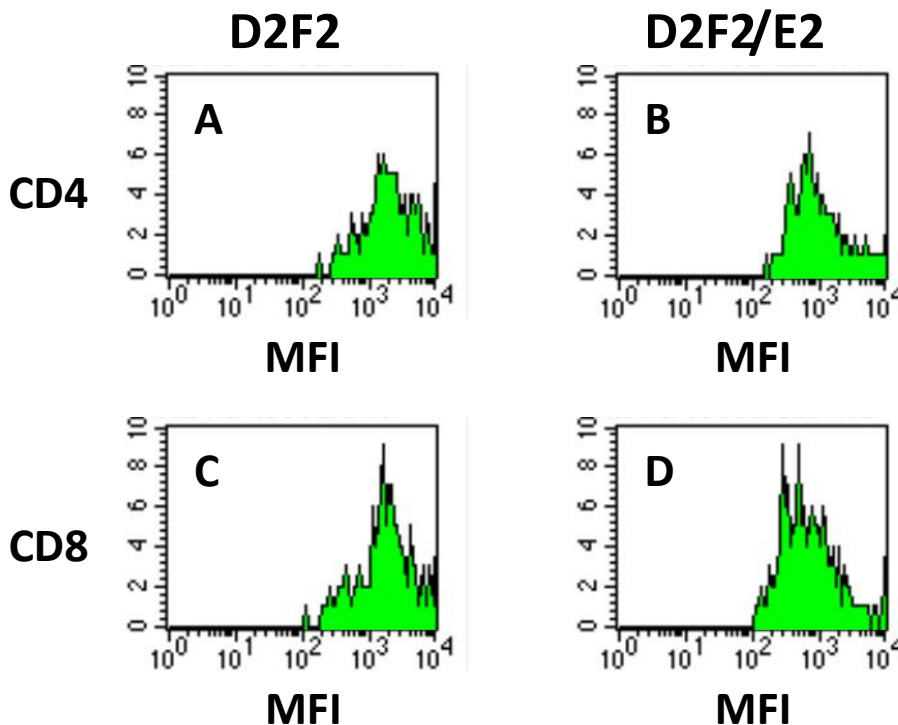


**Abb. 5**  
Die Koinjektion von pDNA(Her-2/neu) und pDNA(CCL19) bewirkt eine deutliche Verlangsamung des Tumorwachstums. Die Ergebnisse stellen gepoolte Daten aus 2 Experimenten dar, n = 14. \* = p < 0,05 im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

### 5.3 T-Zellen von vakzinieren Mäusen proliferieren nach *in vitro* Stimulation mit D2F2/E2

Milzzellen von Mäusen nach einer einzigen Vakzinierung mit pDNA(Her-2/neu) wurden mit Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE, Molecular Probes, Eugene, USA) angefärbt. Anschließend wurden diese entweder zu Medium, Her-2/neu-negativen D2F2- oder Her-2/neu-positiven D2F2/E2-Zellen hinzugegeben. Die Analyse der proliferativen Tätigkeit von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Inkubation mit den Tumorzellen erfolgte am Durchflusszytometer.

Die Zugabe von Her-2/neu exprimierenden D2F2/E2-Zellen übte einen stärkeren proliferativen Stimulus sowohl auf CD4<sup>+</sup>- als auch auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus als die Inkubation mit Her-2/neu-negativen D2E2-Zellen, die kein Her-2/neu exprimieren, erkennbar an den nach links verschobenen Histogrammen, welche auf eine vermehrte Zellteilung hinweisen. Die Fluoreszenzintensität einer Zelle nimmt mit jeder Zellteilung ab. (s. Abb. 6).

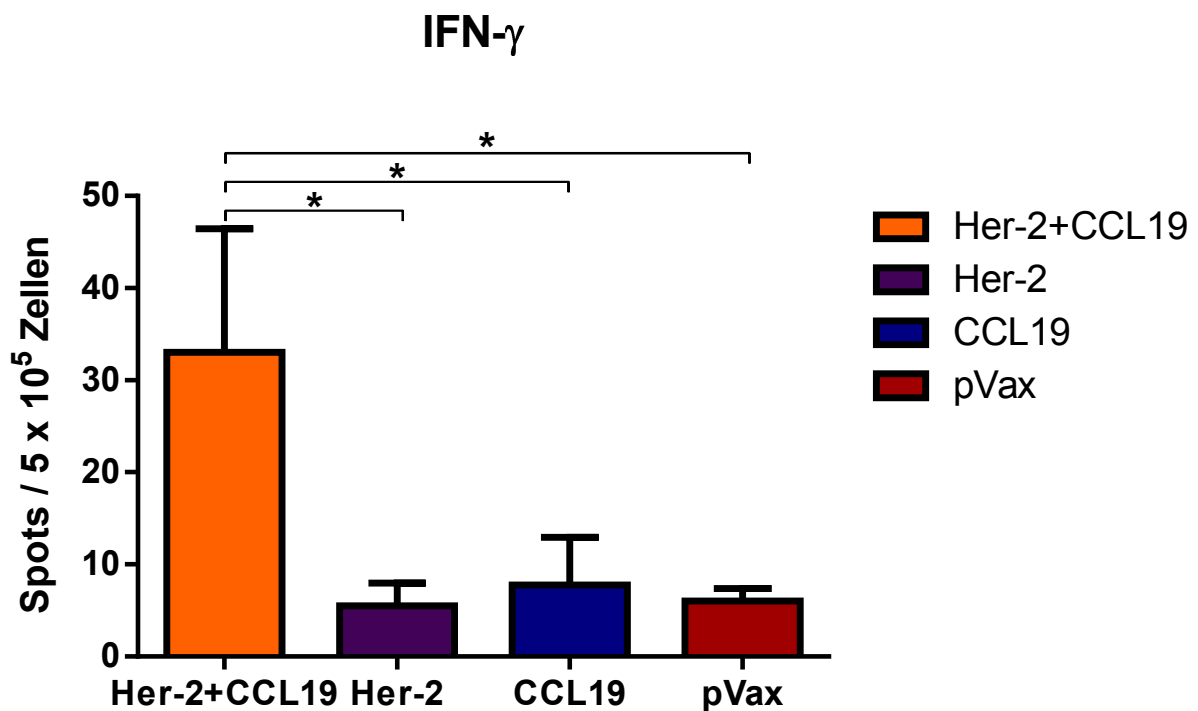


**Abb. 6**  
 (A) und (B) Proliferation von CD4-Zellen nach Stimulation mit (A) D2F2 oder (B) D2F2/E2  
 (C) und (D) Proliferation von CD8-Zellen nach Stimulation mit (C) D2F2 oder (D) D2F2/E2. Die Analyse erfolgte an gepoolten Splenozyten (n = 6)

Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)	D2F2	D2F2/E2
CD4	A 2566	B 1397
CD8	C 2393	D 1089

#### 5.4 Koexpression von pDNA(Her-2/neu) und pDNA(CCL19) bewirkt eine Th1-Polarisierung der Immunantwort

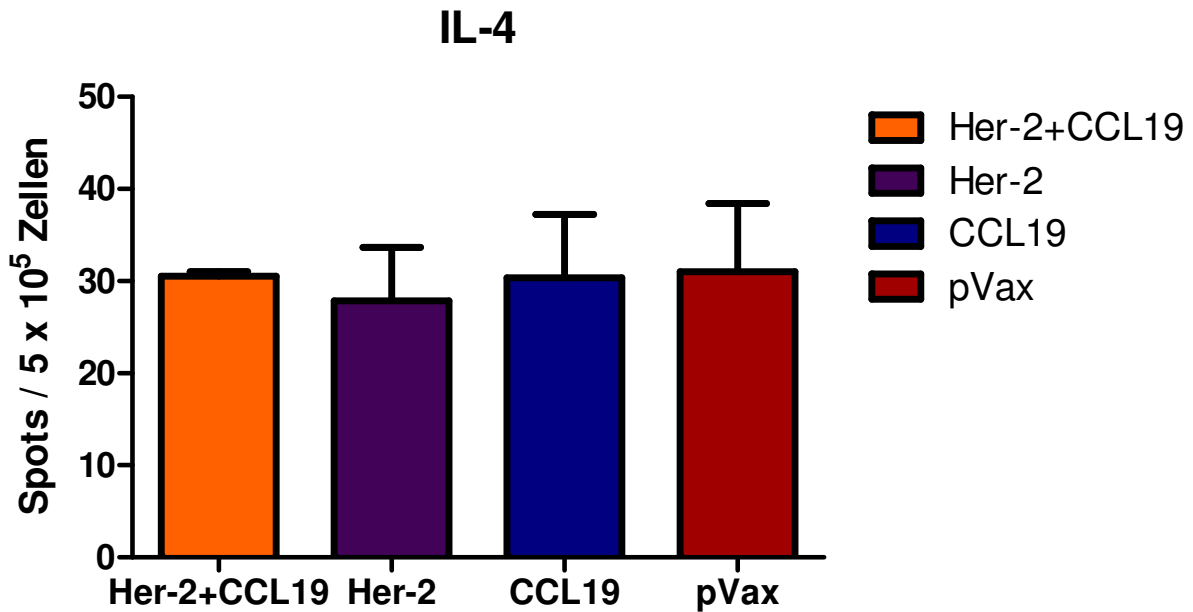
Um die Her-2/neu-spezifische Immunantwort in den verschiedenen Gruppen zu untersuchen, wurden die Splenozyten der Mäuse untersucht. Diese wurden mit einem Gemisch von verschiedenen MHC-I-restringierten Peptiden des Her-2/neu Proteins über Nacht inkubiert und stimuliert. Tags darauf wurde mittels ELISPOT die daraus resultierende Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-4 durch die Splenozyten bestimmt. Die mit CCL19 plus Her-2/neu immunisierten Mäuse zeigten die stärkste CD8+T-Zell-Antwort gegen Her-2/neu. Der Unterschied erreichte gegenüber allen anderen Gruppen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ; s. Abb. 7). Immunisierung mit Her-2/neu alleine erzeugte keine signifikante T-Zell-Antwort. Im IL-4 ELISPOT konnte keine Immunantwort dargestellt werden (s. Abb. 8). Dies deutet auf die Induktion einer Th1-Antwort durch Koexpression von CCL19 und Her-2/neu hin.



**Abb. 7**

Der IFN- $\gamma$  ELISPOT zeigt eine verstärkte CD8+T-Zell-Antwort gegen Her-2/neu bei Mäusen, die pDNA(Her-2/neu) plus pDNA(CCL19) erhalten haben. Die Ergebnisse beziehen sich auf gepoolte Daten aus 2 Experimenten (siehe 4.2).

\* =  $p < 0,05$

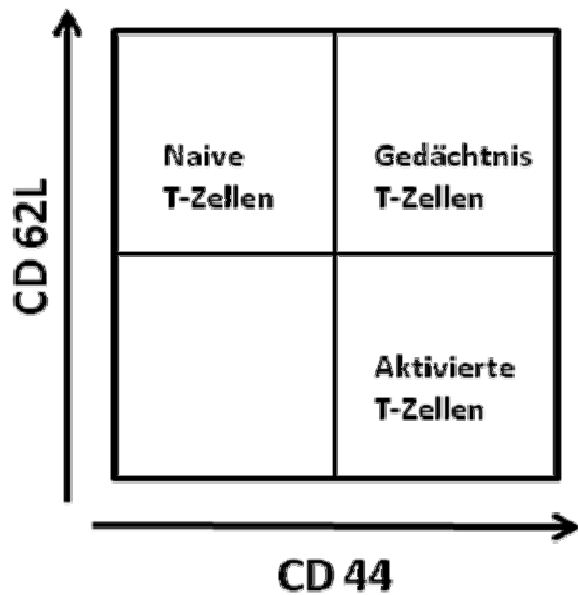
**Abb. 8**

In dem IL-4 ELISPOT sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Die Ergebnisse beziehen sich auf gepoolte Daten aus 2 Experimenten (siehe 3.3).

### ***5.5 Immunphänotyp der Splenozyten von überlebenden Mäusen der verschiedenen Vakzinierungsgruppen***

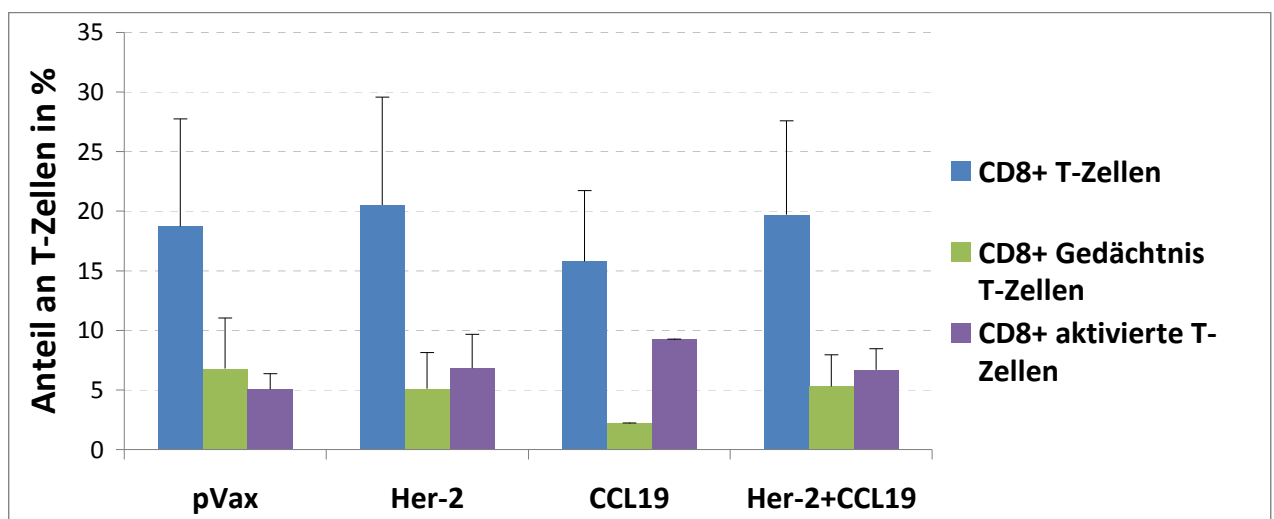
Ziel dieser Untersuchung war es, mögliche Unterschiede in den Subpopulationen der Splenozyten zwischen den Vakzinierungsgruppen herauszuarbeiten. Hierfür wurden die überlebenden Mäuse aller Gruppen 24 Wochen nach Injektion der D2F2/E2 Tumorzellen einmalig mit pDNA(Her-2/neu) immunisiert (boost). Nach einer weiteren Woche wurden die Milzen der Mäuse präpariert und die Splenozyten gewonnen.

Der Phänotyp der gewonnenen Milzzellen wurde mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Untersucht wurde auf Monozyten, CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T Zellen, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen (NK). Eine weitere Differenzierung von CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Naive, Gedächtnis- oder Effektorzellen fand mithilfe der Untersuchung auf die Expression entsprechender Oberflächenmarker statt (Naive Zellen exprimieren CD62Ligand, Gedächtniszellen CD62Ligand und CD44, aktivierte Zellen CD44, s. Abb. 9).

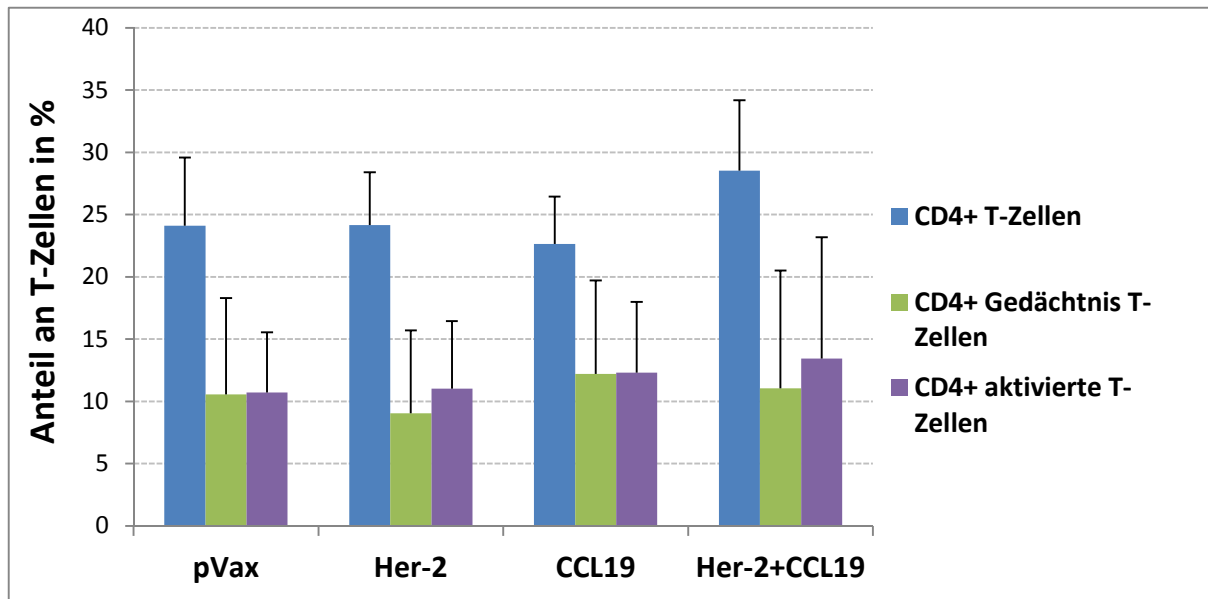


**Abb. 9**  
Einordnung der T-Zellen in Naive, Gedächtnis- und aktivierte Zellen entsprechend der Expression von CD62Ligand und CD44.

Signifikante Unterschiede zwischen der Koinjektion von pDNA(Her-2/neu) und pDNA(CCL19), der Injektion dieser Vektoren allein oder auch der alleinigen Expression von Mock Vektor konnten nicht festgestellt werden. Der Anteil von CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen an den Splenozyten betrug in jeder Gruppe jeweils ca. 20 - 30 Prozent. Ebenso waren bei der genaueren Subtypisierung der T-Zellen keine signifikanten Differenzen im Anteil der Aktivierte oder der Gedächtniszellen zu erkennen.



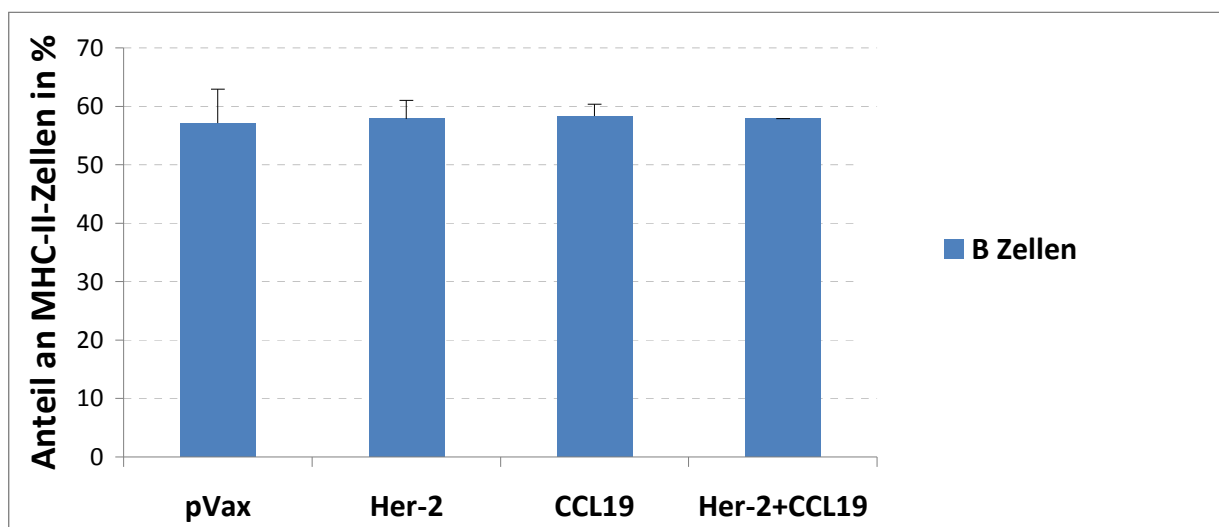
**Abb. 10 CD8+T-Zellen**  
Dargestellt sind der Anteil aller CD8+ T-Zellen sowie von CD8+Gedächtnis- und aktivierte CD8+T-Zellen an den Leukozyten in der Milz. Die Ergebnisse beziehen sich auf gepoolte Daten aus 2 Experimenten (siehe 4.3). Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen sind nicht signifikant.



**Abb. 11 CD4+T-Zellen**

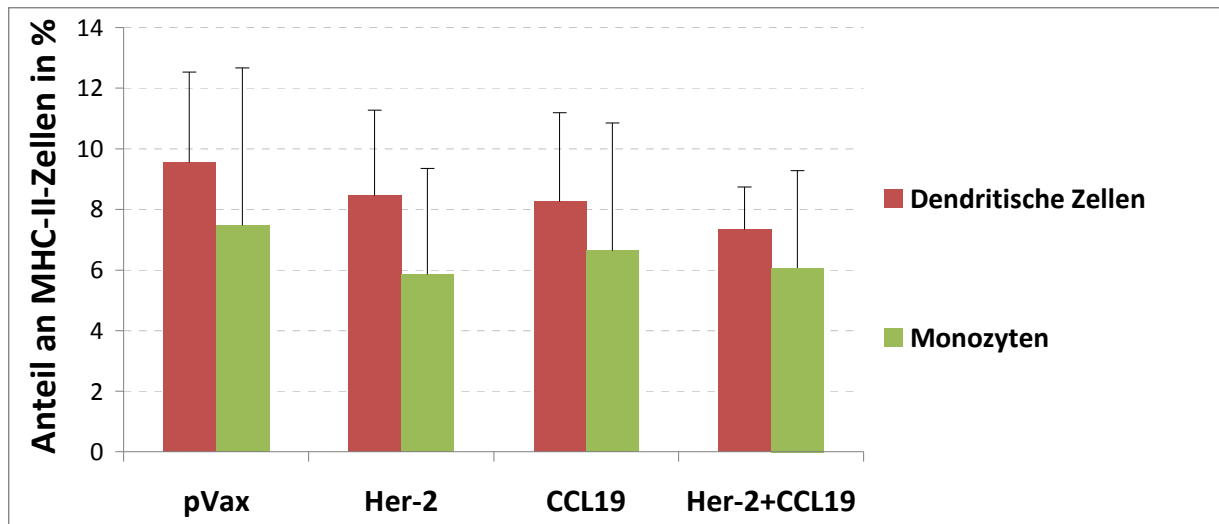
Anteil von Gesamt-CD4+T-Zellen, von aktivierten CD4+T-Zellen und CD4+ Gedächtnis-T-Zellen an den Leukozyten in der Milz. Die Ergebnisse beziehen sich auf gepoolte Daten aus 2 Experimenten (siehe 4.3). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Vakzinierungsgruppen besteht nicht.

Ein ähnliches Bild ergab sich bezogen auf den Anteil von B-Zellen an antigenpräsentierenden Zellen bei den untersuchten Milzen der Mäuse. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den vier Gruppen erhoben werden.



**Abb. 12 B-Zellen**

B-Zellen stellen in allen untersuchten Gruppen den gleichen Anteil gemessen an den in der Milz vorhandenen Zellen mit MHC-II-Expression. Die Ergebnisse beziehen sich auf gepoolte Daten aus 2 Experimenten (siehe 4.3).

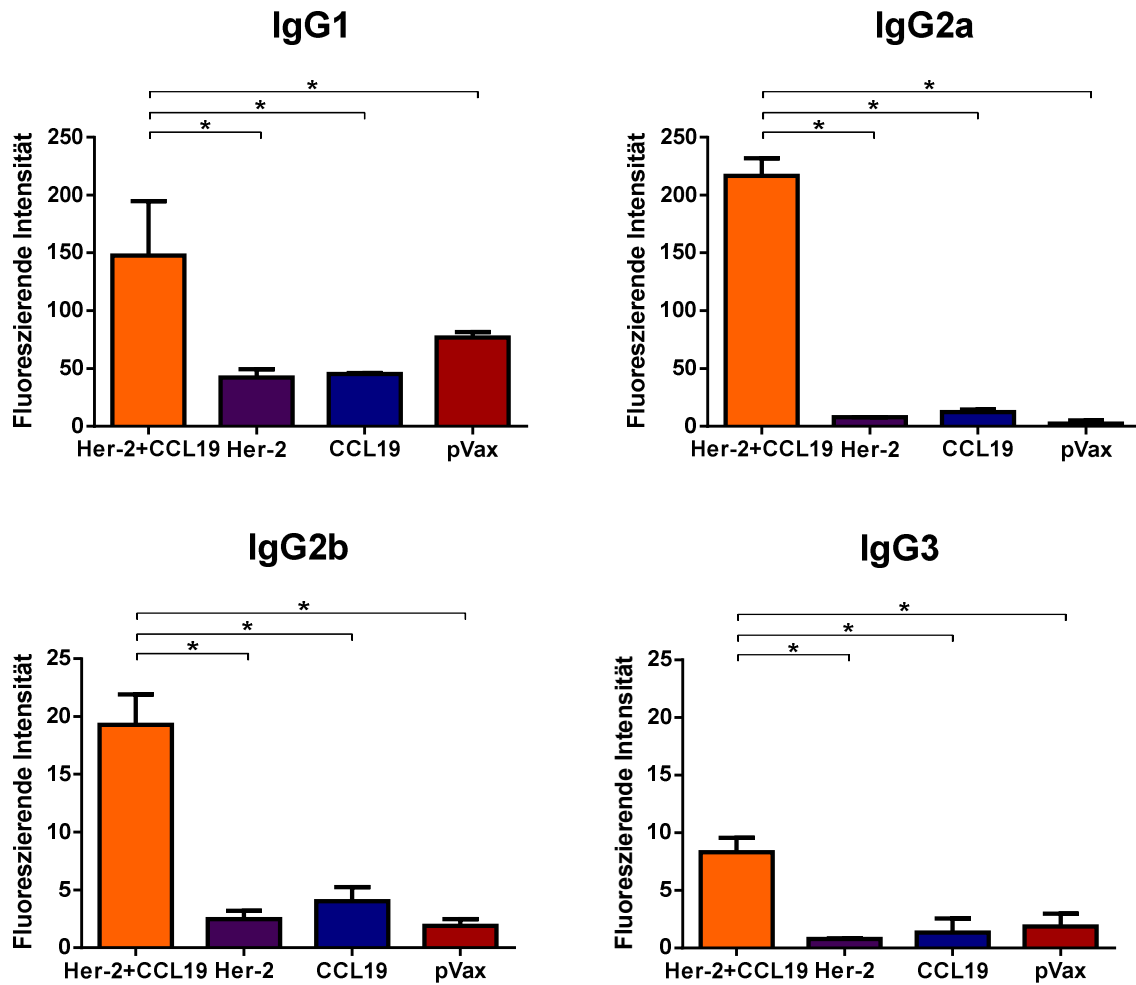


**Abb. 13 Dendritische Zellen und Monozyten**

Dendritische Zellen und Monozyten in Prozent der MHC-II+ Splenozyten Die Ergebnisse beziehen sich auf gepoolte Daten aus 2 Experimenten (siehe 4.3). Statistisch signifikante Unterschiede bestehen nicht.

**5.6 CCL19 als Adjuvans induziert eine verstärkte humorale anti-Her-2/neu Immunantwort**

Die Analyse der humoralen Antwort der Mäuse wurde durch einen durchflusszytometrischen Assay ermittelt (siehe 4.4). Nur nach Koexpression von CCL19 und Her-2/neu war eine spezifische humorale Anti-Her-2/neu Immunantwort zu erkennen. In der mit Her-2/neu- und CCL19-Plasmid-DNA vakzinieren Gruppe waren IgG1, IgG2a, IgG2b und auch IgG3 signifikant höher als in den anderen Gruppen (s. Abb. 14). Signifikante Unterschiede in der humoralen Immunantwort gegen Her-2/neu bestanden zwischen den anderen Gruppen (CCL19, Her-2/neu, pVax) nicht.



**Abb. 14**

Die Untersuchung von Her-2/neu spezifischen Antikörpern zeigt eine deutliche Verstärkung der humoralen Anti-Her-2/neu-Immunantwort durch Koexpression von CCL19. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Experiment mit gepooltem Serum von 7 Mäusen je Gruppe.

\* =  $p < 0,05$



## 5.7 Übersicht der Ergebnisse

EXPERIMENT	ERGEBNIS
Expression von Her-2/neu auf D2F2/E2	Die Expression von Her-2/neu auf den Tumorzellen betrug anhaltend über 90%.
Proliferative Her-2/neu-spezifische Immunantwort	Die T-Zellen proliferierten nach Immunisierung mit pDNA(Her-2/neu) am stärksten nach in vitro Stimulation mit D2F2/E2.
Tumor-Challenge	Die Kombination aus pDNA(Her-2/neu) und pDNA(CCL19) erweist sich als bester Schutz vor Entwicklung eines Her-2/neu+ Tumors nach subkutaner Injektion von D2F2/E2-Zellen.
FACS-Analyse von Milzzellen	Die phänotypische Analyse der Milzzellen ergab keine wesentlichen Unterschiede in den verschiedenen Gruppen.
T-Zellantwort	Her-2/neu-spezifische und Th1-polarisierte zelluläre Immunantwort nur nach Gabe von pDNA(Her-2/neu) plus pDNA(CCL19)
Humorale Immunantwort	Her-2/neu-spezifische humorale Immunantwort nur nach Gabe von pDNA(Her-2/neu) plus pDNA(CCL19)

## 6.0 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss das Chemokin CCL19 als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung auf die Immunisierung gegen ein etabliertes Tumorantigen (Her-2/neu) und die Entwicklung von Tumoren im Mausmodell zeigt. Ausgesucht wurde dieses Chemokin aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Induktion von spezifischer Immunität innerhalb der immunologischen Synapse (Rekrutierung von T-Zellen und dendritischen Zellen, die als wichtigster Vermittler einer Immunantwort nach DNA-Vakzinierung gelten) [51, 109, 110].

Impfstoffe in Form von bakteriellen Plasmiden bieten viele Vorteile. Sie sind in ihrer Herstellung einfach und kostengünstig, können mit Hilfe moderner Molekularbiologie leicht für jedes beliebige Protein hergestellt werden und stellen keine hohen Ansprüche an die Lagerung. Außerdem kodieren sie für multiple MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Epitope, was sich auch in der Induktion einer humoralen und zellulären Antwort zeigt, wobei zumindest bei der intramuskulären Injektion ein Überwiegen der Th1-Antwort nachgewiesen wurde, was die DNA Vakzinierung von der herkömmlichen Immunisierung mit Proteinen, die vor allem eine Antikörper-basierte Immunabwehr stimulieren, unterscheidet. Des Weiteren enthalten Plasmide unmethylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) Dinukleotide, die in bakterieller DNA 20mal häufiger vorkommen als in der von Wirbeltieren. Diese CpG-Motive wirken als intrinsisches Adjuvans, indem sie verschiedene Zellen des Immunsystems u.a. über die Bindung an den „Toll-like receptor 9“ (TLR9) aktivieren, zur Produktion unterschiedlicher Zytokine wie z. B. IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und - $\gamma$  führen und somit die Immunantwort verstärken [30, 111-117].

Als Zielantigen wurde in der vorliegenden Arbeit Her-2/neu gewählt, da es aufgrund der Expression auf der Oberfläche von Karzinomzellen in unterschiedlichen Geweben ein ideales Ziel für eine spezifische Immuntherapie durch Induktion sowohl einer humoralen als auch einer T-zellulären Immunantwort bietet und bereits klinisch Verwendung findet. Das Mausmodell mit Her-2/neu-Tumoren, das in dieser Arbeit zur Anwendung kam, ist etabliert und hat bereits mehrfach Verwendung gefunden [118, 119].

Ein Review über Tumorstimmung am Menschen aus dem Jahre 2004 mit insgesamt 1306 Patienten erkannte eine objektive klinische Regression nur bei 3,3% der Behandelten – im einzelnen je nach Tumorentität und Behandlungsart zwischen 2,6% und 7,0% [120]. Obwohl eine Induktion von humoraler und zellulärer Immunität in diesen Untersuchungen nachweisbar war, hatte diese keine Verbesserung der klinischen Situation zur Folge.

Dies trifft auch auf die ersten Studien zur klinischen Erprobung von aktiven Immunisierungen gegen Her-2/neu überexprimierende Tumore zu. So war es ebenfalls möglich, eine spezifische T-Zell Antwort gegen Her-2/neu zu erzeugen. Dennoch konnte man für die Patienten, die an den Studien teilnahmen, keine Regression des Tumors oder Verlängerung der Überlebenszeit erreichen [121-123].

Ursache hierfür ist zumindest zu einem großen Teil auch die fehlende Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Mausmodellen auf das menschliche Immunsystem. Dies betrifft z.B. die richtige Dosisfindung, Gewebeverteilung nach Applikation, Verabreichungsform und -weg und die unterschiedliche Expression von Rezeptoren auf den Immunzellen von Mensch und Maus [30, 124].

Verschiedene Techniken wurden entwickelt, um die Wirksamkeit der DNA Vakzine gegen Tumorantigene zu verbessern. Die so genannte „Second Generation Immunotherapy“ versucht die negative Regulation des Immunsystems, also die „Immune escape - Mechanismen“, durch Tumore zu überwinden oder die Stimulation gegenüber Zielantigenen zu verbessern [125].

So versucht man unter anderem die Aufnahme der Antigene durch dendritische Zellen zu verbessern, dendritische Zellen vermehrt an den Ort der Injektionsstelle zu rekrutieren oder durch die Koexpression von immunstimulatorischen Molekülen das Zytokinmilieu so zu verändern, dass damit Immunzellen aktiviert werden [126]. Auf diese Weise soll versucht werden, immunsuppressive Eigenschaften des Tumors zu überwinden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das Chemokin CCL19 als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung, da es dendritische Zellen und T-Zellen als zentrale Spieler der Immunreaktion rekrutiert und wesentlich zur Bildung der immunologischen Synapse beiträgt.

Die Ergebnisse der Tumor-Challenge-Experimente zeigen, dass die Ko-Expression von CCL19 den tumorprotektiven Effekt einer Her-2/neu DNA-Vakzine verbessern kann und bei mehr als der Hälfte der Tiere zum Schutz vor der Entstehung eines Tumors nach Injektion von Tumorzellen führt. Alleinige Expression von CCL19 bei den Mäusen führt nicht zu einer Inhibition des Tumorwachstums im Vergleich zur Gabe eines nicht kodierenden Vektors. Im Überleben der Mäuse zeigte sich bei diesen beiden Gruppen kein Unterschied.

Die Koexpression von CCL19 führt zu einer Verstärkung der zellulären und humoralen, Her-2/neu-spezifischen Immunantwort. Die Immunisierung mit pDNA(Her-2/neu) alleine konnte im verwendeten Tumormodell keine messbare Immunantwort induzieren.

Die Analyse der Leukozyten auf unterschiedliche Subgruppen – CD4+- und CD8+-T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen und Monozyten – ergab keinen quantitativen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. Auch aktivierte und Gedächtnis CD4+- sowie CD8+-T-Zellen waren gleich verteilt. Somit ergibt sich kein Hinweis auf eine quantitative systemische Vermehrung eines Zelltyps. Rückschlüsse auf die Zelltypen am Ort der Injektion oder im Lymphknoten lassen sich hieraus aber nicht ziehen.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen überein, die eine verstärkte humorale und zelluläre Immunantwort durch pDNA(CCL19) in Kombination mit einer DNA-Vakzine gegen Herpes simplex Virus beschreiben [127, 128]. Ähnliche Effekte wurden auch in einem Modell mit Lungentumoren nachgewiesen [86, 129].

Die erhöhte Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender antigenspezifischer T-Zellen im ELISPOT wie auch die Induktion von Anti-Her-2/neu-Antikörpern des Isotyps IgG2a demonstrieren eine Th-1 polarisierte Immunantwort. Es gilt als allgemein akzeptiert, dass eine Th1-polarisierte Immunantwort zu einer effektiven Tumorabstoßung führen kann [45, 130, 131].

Die Amplifikation einer Her-2/neu-spezifischen Immunantwort durch CCL19 wirft die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus auf. Die phänotypische Analyse der Splenozyten konnte keinen Unterschied zwischen den Gruppen zeigen. Dies macht es

unwahrscheinlich, dass die Wirkung von CCL19 über rein quantitative Mechanismen zu erklären ist.

T-Zellen wie auch Dendritische Zellen exprimieren den Rezeptor für CCL19 (CCR7) und kommen somit als Effektor in Betracht. Ferner spielt CCL19 auch eine Rolle in der Migration von Natürlichen Killerzellen und Neutrophilen Granulozyten [132, 133]. Somit kommen Mechanismen sowohl des angeborenen wie auch des adaptiven Immunsystems in Betracht. Zusammengefasst sind Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen, Neutrophile Granulozyten, B-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen diejenigen Zellen, die den Rezeptor für CCL19 exprimieren. Die verbesserte Tumorabstoßung nach Koexpression von CCL19 im verwendeten Maus-Tumormodell wird somit möglicherweise durch mehrere immunologische Mechanismen vermittelt.

Nachgewiesen ist außerdem, dass CCL19 die Effektivität von Dendritischen Zellen im Rahmen der Induktion einer Immunantwort deutlich steigern kann. Mehrere Untersuchungen zeigen eine Verstärkung der Migration, der Endozytose und der Antigenverarbeitung von dendritischen Zellen unter Einfluss von CCL19 [134-136]. Weiterhin verbessert CCL19 auch die Funktionalität von T-Zellen, wie z.B. die intranodale Motilität, um die Wahrscheinlichkeit und Häufigkeit des Zusammentreffens mit DC zu erhöhen [137]. Da die Wirkung von Dendritischen Zellen und T-Zellen jedoch unmittelbar voneinander abhängig ist, ist die Frage, welcher Zelltyp nun ursprünglich für den Effekt der Vakzine verantwortlich ist, experimentell schwer zu klären. So würde die Depletion einer Zellart automatisch auch die Funktionalität der anderen einschränken [138].

Aufgrund der Literatur ist anzunehmen, dass in unserem Modell auch Non-T-Zellen eine Rolle spielen könnten. Bei einem Vergleich von unterschiedlichen Her-2/neu-DNA-Vakzinen zeigte diejenige den besten tumorprotektiven Effekt, die eine zytotoxische Reaktion verursachte, aber gleichzeitig auch den höchsten Titer an Anti-Her-2/neu Antikörpern aufwies [139]. Auch in diesem Modell war die Antikörperantwort bevorzugt IgG2a-vermittelt. Dies lässt ein komplexes Zusammenspiel von zellulärer und humoraler Antwort vermuten [70, 130]. Auch wenn es sich um eine Th1-Antwort handelt, ist der Einfluss von Antikörpern nicht zu unterschätzen. Dies bedeutet nicht, dass zytotoxische Effektorzellen nicht auch in der Lage wären eine Tumorprotektion zu bewirken, aber ein Beweis für die Wirksamkeit von Antikörpern wird durch die klinische Anwendung des

Anti-Her-2/neu-Antikörpers Trastuzumab erbracht. So scheinen bei der Immunität gegen Her-2/neu sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten eine wichtige Rolle zu spielen [130].

Bei den Versuchen von Park et al. zeigte sich Tumormunität nach Einsatz eines adenoviralen, Her-2/neu-kodierenden Vektors in Abhängigkeit von induzierten Antikörpern. Der Vektor verursachte eine deutliche Wachstumsverzögerung der Tumore. Dieser Effekt konnte nicht bei B-Zell defizienten Mäusen beobachtet werden. Nach Depletion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen war die Vakzine jedoch weiterhin in der Lage einen entsprechenden Schutz zu erzeugen [140].

Ein anderes Modell mit Her-2/neu-transgenen Mäusen deutet auf ähnliche Mechanismen auch bei der DNA-Vakzinierung hin. Immunisierung mit DNA, die für Her-2/neu kodiert, führte zu einem verspäteten Wachstum der Tumore. Dieser Schutz war ebenfalls nach Depletion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vorhanden. Eine andere Vakzine, die für Her-2/neu-Protein kodierte, konnte zwar Her-2/neu reaktive T-Zellen induzieren, aber verursachte keine Bildung spezifischer Antikörper. Bei diesen Mäusen war keine Retardierung des Tumorwachstums nachweisbar. Der tumorprotektive Effekt der Her-2/neu-Vakzine beruhte hier folglich auf der Induktion von Antikörpern [141]. Eine Erklärung für die Effektivität von Antikörpern ist neben den immunologischen Effekten möglicherweise auch die Abhängigkeit der Tumorzellen von den Proliferations- und Überlebenssignalen des Her-2/neu-Rezeptors, der durch entsprechende Antikörper geblockt werden kann [70].

Tatsächlich konnten Reilly et al. zeigen, dass bei Mäusen zum vollständigen Schutz vor Wachstum eines Her-2/neu+ Tumors sowohl Her-2/neu-spezifische Antikörper als auch zytotoxische T-Zellen notwendig waren [142, 143].

Dies ist ein Vorteil von DNA-Vakzinen, die dadurch, dass sie für MHC Klasse I- und II-restringierte Epitope kodieren, sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten stimulieren [144].

In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Curcio et al. zu erwähnen. BALB/c-Mäuse wurden intradermal mit pDNA(Her-2/neu) immunisiert. Diese Mäuse waren komplett vor einem anschließenden Tumor-Challenge mit einer Her-2/neu-exprimierenden Tumorzelllinie geschützt. Wurden jedoch CD8<sup>+</sup>- oder CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

während der Immunisierung depletiert, wurde dieser Schutz entweder teilweise oder sogar vollständig aufgehoben. Die Mäuse entwickelten hiernach in der Mehrheit Tumore. Interessanterweise war ebenfalls keine Maus vor einem anschließenden Tumor-Challenge geschützt, wenn auf ähnliche Weise die Granulozyten depletiert wurden [145]. Mäuse, die einen Knockout für das IFN- $\gamma$ - oder das Perforin-Gen trugen, waren nach Vakzinierung dennoch vor Tumorwachstum geschützt. Allerdings entwickelten Mäuse, die einen Knockout für beide Gene trugen, allesamt auch nach Vakzinierung Tumore. Diese Untersuchungen weisen auf komplexe Mechanismen der Immunantwort nach DNA-Vakzinierung mit Einbezug des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems hin.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der DNA Vakzinierung wurden in Kapitel 1.3.1 erläutert. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Modell haben wir DNA in Form von Plasmiden intramuskulär in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Dennoch ist neben den für die entstehende Immunantwort wichtigen Zellen auch der eigentliche Wirkungsort von CCL19 unklar. Am wahrscheinlichsten scheint, dass CCL19 nach DNA-Vakzinierung vor allen Dingen im regionalen Lymphknoten exprimiert wird und dort die Interaktion von dendritischen Zellen und T-Zellen verstärkt. Hierfür spricht die Beobachtung, dass peripher in Extremitäten von Mäusen appliziertes CCL19 im Anschluss in regionalen Lymphknoten nachweisbar ist; ferner konnte bei CCL19-Knockout-Mäusen durch Gabe von CCL19 die Wanderung von T-Zellen in die Lymphknoten wiederhergestellt werden [146].

Auch Jalili et al. konnten belegen, dass die transdermale Applikation von Plasmiden, die für CCL21 – einem weiteren CCR7-Agonisten – kodieren, zu erhöhten Mengen an CCL21 in den regionalen Lymphknoten führte. Konsekutiv wurden in den regionalen Lymphknoten dieser Mäuse auch vermehrt dendritische Zellen und T-Zellen nachgewiesen [147]. Möglich ist allerdings auch, dass durch Expression und Wirkung von CCL19 am Injektionsort eine Bildung von Gewebe ähnlich dem von lymphatischen Organen stattfindet [87].

Zu beachten ist im Umgang mit Chemokinen jedoch, dass diese nicht nur Einfluss auf die Migration von Leukozyten nehmen, sondern auch auf normale Stromazellen oder eben Tumorzellen wirken. So nutzen bestimmte Tumorarten Chemokine, um die

Angiogene Genese voranzutreiben oder Matrixmetalloproteinasen zu aktivieren, um Gewebepenetration oder sogar Metastasenbildung zu unterhalten und Leukozyten an der Infiltration des Tumors zu hindern oder immunsuppressive Zellen zu akkumulieren [148, 149]. Die Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 durch Neoplasien ist verbunden mit Lymphknotenmetastasen bei Mamma-, Kolon- und Ösophaguskarzinomen. Die Mehrzahl der Metastasen von Melanomen exprimieren ebenfalls CXCR4 [150]. Die Überexpression ist bei den eben genannten Tumoren ebenfalls verbunden mit einer schlechteren klinischen Prognose. Insgesamt sind zuletzt 23 verschiedene Krebsarten mit einer Überexpression von CXCR4 beschrieben worden. Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen ermöglichen diesen somit ein ähnliches Migrationsverhalten wie den Leukozyten. Der Transport von Dendritischen Zellen entlang des Chemokingradienten zum lymphatischen Gewebe ähnelt der lymphatischen Ausbreitung von Tumorzellen.

Andererseits konnte im Mausmodell durch die alleinige Gabe von Chemokinen eine Regression von Tumorgewebe erreicht und auch Mäuse vor Tumorzellen geschützt werden, die nachfolgend injiziert wurden [151]. Die Injektion von CCL20 und CCL16 in verschiedene subkutane Tumore hat das Wachstum unterdrückt und das Überleben verlängert [152, 153]. Die hier insbesondere im Hinblick auf den Chemokinrezeptor CXCR4 bekannten Tumor-permissiven Effekte sind für CCL19 jedoch nicht beschrieben.

Die Vakzinierung der Mäuse in der vorliegenden Arbeit wurde durchgeführt, bevor eine Tumorlast vorhanden war. Immunsuppressive Eigenschaften der Tumorzellen hatten auf die initiale Immunreaktion nach der Vakzinierung keinen Einfluss. Dies spiegelt nicht den klinischen Alltag wider, wenn Patienten mit bereits großer Tumormasse zu behandeln sind. Eine effektive Immunantwort in dieser Situation zu induzieren, ist weitaus schwieriger. Des Weiteren erfolgte die Immunisierung gegen ein Antigen, das humane Anteile besitzt. Die D2F2/E2-Zellen sind zwar syngene mit den BALB/c-Mäusen, exprimieren aber humanes Her-2/neu, das nur zu 85% mit dem murinen Protein übereinstimmt, was die Induktion einer Immunantwort erleichtert.

Die Stärke des angewandten Tumormodells liegt allerdings darin, immunologische Effekte von Adjuvantien schnell zu erfassen. Der nächste Schritt ist dann der Einsatz der Vakzine in einem Her-2/neu-transgenen Mausmodell, wobei die Mäuse nach einer



gewissen Zeit endogen Her-2/neu+ Tumore entwickeln. Diese Versuche werden zeigen, ob CCL19 in der Lage ist, die Toleranz gegen Her-2/neu zu brechen. Diese Situation ist der tatsächlichen klinischen Situation bei Patienten mit Her-2/neu-positivem Tumorgewebe ähnlicher. Und in der Tat zeigen die Ergebnisse bisheriger Experimente, dass die Effektivität von DNA-Vakzinen in diesem Setting mit zunehmender Tumormasse und zunehmendem Alter der Mäuse abnehmen [70]. Eine Immunisierung ist aber auch hier möglich, da es T-Zellen gibt, die Autoantigene erkennen, nur ist es schwieriger, die Toleranz gegenüber diesen Antigenen zu durchbrechen. Dass es dennoch möglich ist, diese T-Zellen zu aktivieren, ist mehrfach gezeigt worden [154, 155].

Bei präklinischen Anwendungen haben sich mittlerweile bereits unterschiedliche Formen der Applikation von Plasmid-DNA etabliert. So kann intradermal, intramuskulär, subcutan, intravenös oder intraperitoneal injiziert werden. Auch gibt es Versuche mit DNA-gebundenen Aerosolen, die inhaliert werden. Bei der intradermalen Injektion werden Langerhans-Zellen direkt transfiziert und wandern anschließend zur Präsentation der Antigene in die lokalen Lymphknoten ein. Eine Sonderform der intradermalen Verabreichung stellt die „Gene Gun“ dar, wobei winzige, mit DNA beschichtete Goldteilchen durch hohen Druck in die Haut geschossen werden [156]. Der Vorteil dieser Methode ist die geringere Menge an DNA, die dafür benötigt wird.

Eine Th1-Polarisation erreicht man jedoch insbesondere durch intramuskuläre Injektion der Plasmide [157]. Intramuskuläre Immunisierung resultiert zusätzlich in der Transfektion von Myozyten, die genaueren Vorgänge hierbei wurden bereits unter 1.2.3 geschildert.

In unserem Modell haben wir uns nicht mit dem Effekt der Vakzine auf andere Organsysteme als den Tumor selbst beschäftigt. Diskussionspunkt bei der Frage nach möglichen Komplikationen von Her-2/neu-DNA-Vakzinen ist die Induktion von Autoimmunität, insbesondere die dadurch entstehende kardiale Toxizität, da Her-2/neu auch von Kardiomyozyten exprimiert wird. In klinischen Studien mit Anti-Her-2/neu-Antikörpern, aber auch mit Vakzinen gegen Her-2/neu, spielt dieses Problem allerdings bisher keine dominante Rolle [158-161]. Ferner kann der in dieser Arbeit verwendete Her-2/neu-Vektor aufgrund einer genetischen Veränderung in der Tyrosinkinase-

Domäne keine onkogene Wirkung entfalten. Durch Veränderung der Nukleotidsequenz im Plasmidvektor kommt es zum Umbau der Aminosäuresequenz. Auf diese Weise wird der Tyrosinkinase-abhängige Signalweg des Her-2/neu-Onkogens ausgeschaltet. Dieser Aspekt spielt besonders im Hinblick auf die potentielle Anwendung am Menschen eine entscheidende Rolle.

Mit Blick in die Zukunft ist die Minimale Resterkrankung (MRD) nach Operation und/oder systemischer Therapie des Mamma-Karzinoms eine interessante klinische Perspektive für eine Her-2/neu-DNA-Vakzine in Kombination mit CCL19. Besonders bei Minimaler Resterkrankung (MRD) bzw. der Prävention von Rezidiven könnte die Induktion einer effektiven Immunantwort zur Eradikation residueller Tumorzellen führen [120, 162]. Dieser Gedanke war grundlegend für das Design einer Studie an Patienten mit Brust- und Prostatakrebs, die eine Standardtherapie inklusive chirurgischer Maßnahmen abgeschlossen hatten. Um diese vor Rezidiven zu schützen, wurden sie anschließend mit Her-2/neu spezifischen Peptiden immunisiert. Mit dieser Strategie konnte die Rezidivrate gesenkt bzw. die Zeit bis zum Rezidiv verlängert werden [158, 163]. Diese ersten klinischen Studien zeigen, dass eine Vakzinierung gegen Her-2/neu nicht nur eine in vitro messbare Her-2/neu-spezifische Immunantwort induzieren kann, sondern darüber hinaus auch in der Lage ist, protektive Immunität zu vermitteln und somit vor erneutem Tumorwachstum zu schützen.

Der Einsatz von Her-2/neu-DNA-Vakzinen zusammen mit neuen Adjuvanzen wie z.B. CCL19 könnte demzufolge interessante klinische Perspektiven bieten.

## 7.0 Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
AG	Aktiengesellschaft
AID	Autoimmun Diagnostika GmbH
ANOVA	Analysis of variance
APC	Antigen präsentierende Zelle / Allophycocyanin
AKP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
BALB/c	Mausstamm
BCR-ABL	breakpoint cluster region - Abelson Murine Leukemia
BD	Becton Dickenson
BSA	Bovines Serum-Albumin
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) ligand receptor
CD	Cluster of differentiation
CEA	Karzinomembryonales Antigen
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CMV	Zytomegalie Virus
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin Dinukleotide
CX3CL	Chemokine (C-X3-C motif) ligand
CX3CR	Chemokine (C-X3-C motif) ligand receptor
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) ligand receptor
D2F2	Murine Mamma-Tumorzelllinie
D2F2/E2	Murine Mamma-Tumorzelllinie mit Expression von Her-2/neu
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E. coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELC	Ebstein-Barr-Virus-induziertes-Molekül-1-Ligand-Chemokin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked Immuno Spot
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum / Fetales Kälberserum
Flt3	Fms-like tyrosine kinase-3 ligand
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
G418	Aminoglykosid Antibiotikum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
Her	Human epidermal growth factor receptor
Her-2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HEV	High endothelial venules
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
iDC	unreife dendritische Zelle
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
IU	international unit
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRD	minimal residual disease / Minimale Resterkrankung
NF-κB	nuclear transcription factor kappa B
NK	Natürliche Killerzelle
NRG1	Neuregulin 1
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)

pcDNA3	Expressionsvektor
pCMV/E2	Expressionsvektor
pDNA	Plasmid Desoxyribonukleinsäure
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll- $\alpha$ Protein
PRR	Pattern recognition receptor
pRSV/neo	Selektionsvektor
PSA	Prostataspezifisches Antigen
pVax	Expressionsvektor
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SK-BR-3	Humane Mamma-Tumorzelllinie
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNT	Tris-NaCl-Tween
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
XCL	Chemokine (C motif) ligand
XCR	Chemokine (C motif) ligand receptor
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ M	Mikromolar

## 8.0 Literaturverzeichnis

1. Yan L, Hsu K and Beckman RA, *Antibody-based therapy for solid tumors*. Cancer J, 2008. **14**(3): p. 178-83.
2. Guinn BA, Kasahara N, Farzaneh F, Habib NA, Norris JS and Deisseroth AB, *Recent advances and current challenges in tumor immunology and immunotherapy*. Mol Ther, 2007. **15**(6): p. 1065-71.
3. Wiemann B and Starnes CO, *Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective*. Pharmacol Ther, 1994. **64**(3): p. 529-64.
4. Burnet FM, *Immunological aspects of malignant disease*. Lancet, 1967. **1**(7501): p. 1171-4.
5. Willimsky G and Blankenstein T, *The adaptive immune response to sporadic cancer*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 102-12.
6. Willimsky G and Blankenstein T, *Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 141-6.
7. Finn OJ, *Cancer immunology*. N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2704-15.
8. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ and Schreiber RD, *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
9. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, et al., *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells*. Science, 2001. **294**(5542): p. 605-9.
10. Straten P, Becker JC, Guldberg P and Zeuthen J, *In situ T cells in melanoma*. Cancer Immunol Immunother, 1999. **48**(7): p. 386-95.
11. Rosenberg SA, *A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 281-7.
12. Old LJ, *Cancer vaccines 2003: opening address*. Cancer Immun, 2003. **3 Suppl 2**(Suppl. 2): p. 1.
13. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ and Chen YT, *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy*. Immunol Rev, 2002. **188**: p. 22-32.

14. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT and Old LJ, *Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 615-25.
15. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ and Sherman LA, *Targeting p53 as a general tumor antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 11993-7.
16. Wong S and Witte ON, *The BCR-ABL story: bench to bedside and back*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 247-306.
17. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B and Klein L, *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1032-9.
18. von Boehmer H and Melchers F, *Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 14-20.
19. Mueller DL, *Mechanisms maintaining peripheral tolerance*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 21-7.
20. Matzinger P, *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
21. Linsley PS and Ledbetter JA, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 191-212.
22. Chen L, Linsley PS and Hellstrom KE, *Costimulation of T cells for tumor immunity*. Immunol Today, 1993. **14**(10): p. 483-6.
23. Algarra I, Collado A and Garrido F, *Altered MHC class I antigens in tumors*. Int J Clin Lab Res, 1997. **27**(2): p. 95-102.
24. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, et al., *CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2591-601.
25. Zou W, *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.
26. Vieweg J, Su Z, Dahm P and Kusmartsev S, *Reversal of tumor-mediated immunosuppression*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(2 Pt 2): p. 727s-732s.
27. Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
28. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD, *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.

29. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A and Felgner PL, *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 1990. **247**: p. 1465-8.
30. Gurunathan S, Klinman DM and Seder RA, *DNA vaccines: immunology, application, and optimization\**. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 927-74.
31. Tang DC, DeVit M and Johnston SA, *Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response*. Nature, 1992. **356**: p. 152-4.
32. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, et al., *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1745-9.
33. Weiner DB and Kennedy RC, *Genetic vaccines*. Sci Am, 1999. **281**(1): p. 50-7.
34. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW and Liu MA, *DNA Vaccines*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 617-48.
35. Rice J, Ottensmeier CH and Stevenson FK, *DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(2): p. 108-20.
36. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K and Falo LD, Jr., *DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1122-8.
37. Klein J and Sato A, *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
38. Klein J and Sato A, *The HLA system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(11): p. 782-6.
39. Grommé M and Neefjes J, *Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways*. Mol Immunol, 2002. **39**: p. 181-202.
40. Heath WR and Carbone FR, *Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 47-64.
41. Martinez-Kinader B, Lipford GB, Wagner H and Heeg K, *Sensitization of MHC class I-restricted T cells to exogenous proteins: evidence for an alternative class I-restricted antigen presentation pathway*. Immunology, 1995. **86**(2): p. 287-95.
42. Vyas JM, Van der Veen AG and Ploegh HL, *The known unknowns of antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 607-18.



43. Rock KL, *A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world.* Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 131-7.
44. Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T and Nishimura S, *The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology.* Cancer Chemother Pharmacol, 2000. **46 Suppl**: p. S52-61.
45. Hamilton DH and Bretscher PA, *Different immune correlates associated with tumor progression and regression: implications for prevention and treatment of cancer.* Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(8): p. 1125-36.
46. Winter H, Hu HM, Poehlein CH, Huntzicker E, Osterholzer JJ, Bashy J, Lashley D, Lowe B, Yamada J, et al., *Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies.* Immunology, 2003. **108**(3): p. 409-19.
47. Hohlfeld R and Engel AG, *The immunobiology of muscle.* Immunol Today, 1994. **15**(6): p. 269-74.
48. Wiendl H HR, Kieseier BC, *Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment.* Trends Immunol, 2005. **26**(7): p. 373-380.
49. Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ and Liu MA, *Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes.* Mol Med, 1997. **3**(6): p. 362-71.
50. Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM and Bona CA, *Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope.* J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1481-6.
51. Steinman RM, *The dendritic cell system and its role in immunogenicity.* Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
52. Corr M, Lee DJ, Carson DA and Tighe H, *Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1555-60.
53. Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J and Walker CM, *Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8578-83.

54. Corr M, von Damm A, Lee DJ and Tighe H, *In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4721-7.
55. Banchereau J and Steinman RM, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
56. Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG and Watts C, *Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 1997. **27**(1): p. 280-8.
57. Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A and Pieters J, *The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2417-25.
58. Sallusto F, Cella M, Danieli C and Lanzavecchia A, *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.
59. Janeway CA, Jr. and Medzhitov R, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
60. Takeda K, Kaisho T and Akira S, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
61. Krieg AM, *CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?* Nat Med, 2003. **9**(7): p. 831-5.
62. Sozzani S, *Dendritic cell trafficking: more than just chemokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**: p. 581-92.
63. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S and Lanzavecchia A, *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2760-9.
64. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, et al., *Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1617-25.
65. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O and Moser M, *Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1413-24.

66. Hart DN, *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
67. Moser M and Murphy KM, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. Nat Immunol, 2000. **1**(3): p. 199-205.
68. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M and Lanzavecchia A, *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
69. Bromley SK, Mempel TR and Luster AD, *Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 970-80.
70. Cavallo F, Offringa R, van der Burg SH, Forni G and Melief CJ, *Vaccination for treatment and prevention of cancer in animal models*. Adv Immunol, 2006. **90**: p. 175-213.
71. Prud'homme GJ, *DNA vaccination against tumors*. J Gene Med, 2005. **7**(1): p. 3-17.
72. Egan MA and Israel ZR, *The use of cytokines and chemokines as genetic adjuvants for plasmid DNA vaccines*. Clin Applied Immunol Rev, 2002. **2**: p. 255-87.
73. Ockert D, Schmitz M, Hampl M and Rieber EP, *Advances in cancer immunotherapy*. Immunol Today, 1999. **20**(2): p. 63-5.
74. Sun X, Hodge LM, Jones HP, Tabor L and Simecka JW, *Co-expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with antigen enhances humoral and tumor immunity after DNA vaccination*. Vaccine, 2002. **20**(9-10): p. 1466-74.
75. Charo J, Ciupitu AM, Le Chevalier De Prévile A, Trivedi P, Klein G, Hinkula J and Kiessling R, *A long-term memory obtained by genetic immunization results in full protection from a mammary adenocarcinoma expressing an EBV gene*. J Immunol, 1999. **163**: p. 5913-9.
76. Perales MA, Yuan J, Powel S, Gallardo HF, Rasalan TS, Gonzalez C, Manukian G, Wang J, Zhang Y, et al., *Phase I/II study of GM-CSF DNA as an adjuvant for a multipeptide cancer vaccine in patients with advanced melanoma*. Mol Ther, 2008. **16**(12): p. 2022-9.
77. Allen SJ, Crown SE and Handel TM, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.

78. Zlotnik A and Yoshie O, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
79. Moser B, Wolf M, Walz A and Loetscher P, *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
80. Viola A, Contento RL and Molon B, *T cells and their partners: The chemokine dating agency*. Trends Immunol, 2006. **27**(9): p. 421-7.
81. Stewart TJ and Smyth MJ, *Chemokine-chemokine receptors in cancer immunotherapy*. Immunotherapy, 2009. **1**(1): p. 109-27.
82. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, et al., *Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13803-9.
83. Kellermann SA, Hudakm S, Oldham ER, Liu YJ and McEvoy LM, *The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3859-64.
84. Bromley SK, Thomas SY and Luster AD, *Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 895-901.
85. Nomura T and Hasegawa H, *Chemokines and anti-cancer immunotherapy: anti-tumor effect of EBI1-ligand chemokine (ELC) and secondary lymphoid tissue chemokine (SLC)*. Anticancer Res, 2000. **20**(6A): p. 4073-80.
86. Hillinger S, Yang SC, Zhu L, Huang M, Duckett R, Atianzar K, Batra RK, Strieter RM, Dubinett SM, et al., *EBV-induced molecule 1 ligand chemokine (ELC/CCL19) promotes IFN-gamma-dependent antitumor responses in a lung cancer model*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6457-65.
87. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, Matloubian M and Cyster JG, *Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 424-33.
88. Arpino G, Gutierrez C, Weiss H, Rimawi M, Massarweh S, Bharwani L, De Placido S, Osborne CK and Schiff R, *Treatment of human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer xenografts with multiagent HER-targeted therapy*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(9): p. 694-705.

89. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE, *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
90. Alroy I and Yarden Y, *The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions*. FEBS Lett, 1997. **410**: p. 83-6.
91. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM and Hynes NE, *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO J, 1997. **16**: p. 1647-55.
92. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM and Tagliabue E, *Role of HER2/neu in tumor progression and therapy*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(23): p. 2965-78.
93. Iglehart JD, Kraus MH, Langton BC, Huper G, Kerns BJ and Marks JR, *Increased erbB-2 gene copies and expression in multiple stages of breast cancer*. Cancer Res, 1990. **50**(20): p. 6701-7.
94. Menard S, Pupa SM, Campiglio M and Tagliabue E, *Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6570-8.
95. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R and Leder P, *Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene*. Cell, 1988. **54**(1): p. 105-15.
96. Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ and Jolicoeur P, *Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene*. Cell, 1989. **57**(6): p. 931-6.
97. Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY and Hung MC, *HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 8027-31.
98. Karin M, *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
99. Wen XF, Yang G, Mao W, Thornton A, Liu J, Bast RC, Jr. and Le XF, *HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy*. Oncogene, 2006. **25**(52): p. 6986-96.

100. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire WL, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
101. Zhou D, Battifora H, Yokota J, Yamamoto T and Cline MJ, *Association of multiple copies of the c-erbB-2 oncogene with spread of breast cancer*. Cancer Res, 1987. **47**(22): p. 6123-5.
102. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-12.
103. Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, Zhou X, Xia W, Hortobagyi GN, et al., *Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis*. Cancer Cell, 2004. **6**(5): p. 459-69.
104. Baxevasis CN, Sotiriadou NN, Gritzapis AD, Sotiropoulou PA, Perez SA, Cacoullos NT and Papamichail M, *Immunogenic HER-2/neu peptides as tumor vaccines*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(1): p. 85-95.
105. Murray JL, Przepiorka D and Ioannides CG, *Clinical trials of HER-2/neu-specific vaccines*. Semin Oncol, 2000. **27**(6 Suppl 11): p. 71-5; discussion 92-100.
106. Piechocki MP, Pilon SA and Wei WZ, *Quantitative measurement of anti-ErbB-2 antibody by flow cytometry and ELISA*. J Immunol Methods, 2002. **259**(1-2): p. 33-42.
107. Mahoney KH, Miller BE and Heppner GH, *FACS quantitation of leucine aminopeptidase and acid phosphatase on tumor-associated macrophages from metastatic and nonmetastatic mouse mammary tumors*. J Leukoc Biol, 1985. **38**(5): p. 573-85.
108. Piechocki MP, Pilon SA and Wei WZ, *Complementary antitumor immunity induced by plasmid DNA encoding secreted and cytoplasmic human ErbB-2*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3367-74.
109. Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J and Walker CM, *Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996.
110. Corr M, von Damm A, Lee DJ and Tighe H, *In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer*. J Immunol 1999. **163**(9): p. 4721-7.
111. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T and Tokunaga T, *DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons*,

- activates natural killer cells and inhibits tumor growth. Microbiol Immunol*, 1992. **36**: p. 983-97.
112. Krieg AM, *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 709-60.
113. Klinman DM, *Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. Int Rev Immunol*, 2006. **25**(3-4): p. 135-54.
114. Klinman DM, Yamshchikov G and Ishigatsubo Y, *Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. J Immunol*, 1997. **158**(8): p. 3635-9.
115. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, et al., *Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. Nat Med*, 1997. **3**(8): p. 849-54.
116. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature*, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
117. Stevenson FK, *DNA vaccines and adjuvants. Immunol Rev*, 2004. **199**: p. 5-8.
118. Wei WZ, Shi WP, Galy A, Lichlyter D, Hernandez S, Groner B, Heilbrun L and Jones RF, *Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA. Int J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 748-54.
119. Lindencrona JA, Preiss S, Kammertoens T, Schuler T, Piechocki M, Wei WZ, Seliger B, Blankenstein T and Kiessling R, *CD4+ T cell-mediated HER-2/neu-specific tumor rejection in the absence of B cells. Int J Cancer*, 2004. **109**(2): p. 259-64.
120. Rosenberg SA, Yang JC and Restifo NP, *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 909-15.
121. Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR and Cheever MA, *Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. Clin Cancer Res*, 1999. **5**: p. 1289-97.
122. Disis ML, Rinn K, Knutson KL, Davis D, Caron D, dela Rosa C and Schiffman K, *Flt3 ligand as a vaccine adjuvant in association with HER-2/neu peptide-based vaccines in patients with HER-2/neu-overexpressing cancers. Blood*, 2002. **99**: p. 2845-50.
123. Disis ML, Gooley TA, Rinn K, Davis D, Piepkorn M, Cheever MA, Knutson KL and Schiffman K, *Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after*

- active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines.* J Clin Oncol, 2002. **20**(11): p. 2624-32.
124. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C and Klinman DM, *TLR-based immune adjuvants.* Vaccine, 2011. **29**(17): p. 3341-55.
125. Waldmann TA, *Immunotherapy: past, present and future.* Nat Med, 2003. **9**(3): p. 269-77.
126. Scheerlinck JY, *Genetic adjuvants for DNA vaccines.* Vaccine, 2001. **19**(17-19): p. 2647-56.
127. Toka FN, Gierynska M and Rouse BT, *Codelivery of CCR7 ligands as molecular adjuvants enhances the protective immune response against herpes simplex virus type 1.* J Virol, 2003. **77**: p. 12742–12752.
128. Eo SK, Lee S, Kumaraguru U and Rouse BT, *Immunopotential of DNA vaccine against herpes simplex virus via codelivery of plasmid DNA expressing CCR7 ligands.* Vaccine, 2001 **19**: p. 4685–4693.
129. Hillinger S, Yang SC, Batra RK, Strieter RM, Weder W, Dubinett SM and Sharma S, *CCL19 reduces tumour burden in a model of advanced lung cancer.* Br J Cancer, 2006. **94**(7): p. 1029-34.
130. Nanni P, Landuzzi L, Nicoletti G, De Giovanni C, Rossi I, Croci S, Astolfi A, Iezzi M, Di Carlo E, et al., *Immunoprevention of mammary carcinoma in HER-2/neu transgenic mice is IFN-gamma and B cell dependent.* J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2288-96.
131. Quaglino E, Iezzi M, Mastini C, Amici A, Pericle F, Di Carlo E, Pupa SM, De Giovanni C, Spadaro M, et al., *Electroporated DNA vaccine clears away multifocal mammary carcinomas in her-2/neu transgenic mice.* Cancer Res, 2004. **64**(8): p. 2858-64.
132. Braun SE, Chen K, Foster RG, Kim CH, Hromas R, Kaplan MH, Broxmeyer HE and Cornetta K, *The CC chemokine CK beta-11/MIP-3 beta/ELC/Exodus 3 mediates tumor rejection of murine breast cancer cells through NK cells.* J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4025-31.
133. Beauvillain C, Cunin P, Doni A, Scotet M, Jaillon S, Loiry ML, Magistrelli G, Masternak K, Chevailler A, et al., *CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes.* Blood, 2011. **117**(4): p. 1196-204.



134. Yanagawa Y and Onoe K, *CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4923-9.
135. Yanagawa Y and Onoe K, *CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells*. Blood, 2002. **100**(6): p. 1948-56.
136. Iijima N, Yanagawa Y, Clingan JM and Onoe K, *CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells*. Int Immunol, 2005. **17**(9): p. 1201-12.
137. Worbs T, Mempel TR, Bolter J, von Andrian UH and Forster R, *CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 489-95.
138. Sallusto F and Lanzavecchia A, *Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 134-40.
139. Pilon SA, Piechocki MP and Wei WZ, *Vaccination with cytoplasmic ErbB-2 DNA protects mice from mammary tumor growth without anti-ErbB-2 antibody*. J Immunol, 2001. **167**: p. 3201-6.
140. Park JM, Terabe M, Sakai Y, Munasinghe J, Forni G, Morris JC and Berzofsky JA, *Early role of CD4+ Th1 cells and antibodies in HER-2 adenovirus vaccine protection against autochthonous mammary carcinomas*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4228-36.
141. Jacob J, Radkevich O, Forni G, Zielinski J, Shim D, Jones RF and Wei WZ, *Activity of DNA vaccines encoding self or heterologous Her-2/neu in Her-2 or neu transgenic mice*. Cell Immunol, 2006. **240**(2): p. 96-106.
142. Reilly RT, Machiels JP, Emens LA, Ercolini AM, Okoye FI, Lei RY, Weintraub D and Jaffee EM, *The collaboration of both humoral and cellular HER-2/neu-targeted immune responses is required for the complete eradication of HER-2/neu-expressing tumors*. Cancer Res, 2001. **61**: p. 880-3.
143. Wolpoe ME, Lutz ER, Ercolini AM, Murata S, Ivie SE, Garrett ES, Emens LA, Jaffee EM and Reilly RT, *HER-2/neu-specific monoclonal antibodies collaborate with HER-2/neu-targeted granulocyte macrophage colony-stimulating factor secreting whole cell vaccination to augment CD8+ T cell effector function and tumor-free survival in Her-2/neu-transgenic mice*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 2161-9.

144. Baxevanis CN, Voutsas IF, Gritzapis AD, Perez SA and Papamichail M, *HER-2/neu as a target for cancer vaccines*. Immunotherapy, 2010. **2**(2): p. 213-26.
145. Curcio C, Di Carlo E, Clynes R, Smyth MJ, Boggio K, Quaglino E, Spadaro M, Colombo MP, Amici A, et al., *Nonredundant roles of antibody, cytokines, and perforin in the eradication of established Her-2/neu carcinomas*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1161-70.
146. Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinholt FP, von Andrian UH, Brandtzaeg P and Haraldsen G, *The CCR7 ligand *elc* (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment*. J Exp Med, 2001. **193**: p. 1105-12.
147. Jalili A, Pashenkov M, Kriehuber E, Wagner C, Nakano H, Stingl G and Wagner SN, *Induction of targeted cell migration by cutaneous administration of a DNA vector encoding a biologically active chemokine CCL21*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(6): p. 1611-23.
148. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD and Fidler IJ, *Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice*. Cancer Res, 1994. **54**(12): p. 3242-7.
149. Balkwill F, *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 540-50.
150. Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K and Cristofanilli M, *Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer*. Cancer, 2007. **109**(12): p. 2392-404.
151. Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, Chamberlain JS, Giedlin M, Aukerman L and Mule JJ, *T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2062-70.
152. Guiducci C, Di Carlo E, Parenza M, Hitt M, Giovarelli M, Musiani P and Colombo MP, *Intralesional injection of adenovirus encoding CC chemokine ligand 16 inhibits mammary tumor growth and prevents metastatic-induced death after surgical removal of the treated primary tumor*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4026-36.
153. Fushimi T, Kojima A, Moore MA and Crystal RG, *Macrophage inflammatory protein 3alpha transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth*. J Clin Invest, 2000. **105**(10): p. 1383-93.

154. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, Pfannenstiel LW, Armstrong TD, Machiels JP, Bieler JG, Emens LA, Reilly RT, et al., *Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1591-602.
155. Nagata Y, Furugen R, Hiasa A, Ikeda H, Ohta N, Furukawa K, Nakamura H, Furukawa K, Kanematsu T, et al., *Peptides derived from a wild-type murine proto-oncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1336-43.
156. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC and Robinson HL, *DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11478-82.
157. Feltquate DM, Heaney S, Webster RG and Robinson HL, *Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2278-84.
158. Peoples GE, Holmes JP, Hueman MT, Mittendorf EA, Amin A, Khoo S, Dehqanzada ZA, Gurney JM, Woll MM, et al., *Combined clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine for the prevention of recurrence in high-risk breast cancer patients: U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(3): p. 797-803.
159. Norell H, Poschke I, Charo J, Wei WZ, Erskine C, Piechocki MP, Knutson KL, Bergh J, Lidbrink E, et al., *Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 53.
160. Disis ML, Schiffman K, Guthrie K, Salazar LG, Knutson KL, Goodell V, dela Rosa C and Cheever MA, *Effect of dose on immune response in patients vaccinated with an her-2/neu intracellular domain protein--based vaccine*. J Clin Oncol, 2004. **22**(10): p. 1916-25.
161. Morse MA, Hobeika A, Osada T, Niedzwiecki D, Marcom PK, Blackwell KL, Anders C, Devi GR, Lyerly HK, et al., *Long term disease-free survival and T cell and antibody responses in women with high-risk Her2+ breast cancer following vaccination against Her2*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 42.
162. Sobol RE, *The rationale for prophylactic cancer vaccines and need for a paradigm shift*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(8): p. 725-31.

163. Gates JD, Carmichael MG, Benavides LC, Holmes JP, Hueman MT, Woll MM, Ioannides CG, Robson CH, McLeod DG, et al., *Longterm followup assessment of a HER2/neu peptide (E75) vaccine for prevention of recurrence in high-risk prostate cancer patients*. J Am Coll Surg, 2009. **208**(2): p. 193-201.

## 9.0 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Gerd Baldenhofer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Chemokine als Adjuvans bei der DNA Vakzinierung: CCL19 (ELC) verbessert den tumorprotektiven Effekt einer Her-2/neu DNA Vakzine“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 04.02.2014

---

Gerd Baldenhofer

## **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Gerd Baldenhofer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Nguyen-Hoai T, Baldenhofer G, Sayed Ahmed MS, Pham-Duc M, Vu MD, Lipp M, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, CCL21 (SLC) improves tumor protection by a DNA vaccine in a Her2/neu mouse tumor model, Cancer Gene Therapy, 2012

Beitrag im Einzelnen: Mitbeteiligung an Konzeption, Akquisition und Analyse der Daten, Manuskriptentwurf

Publikation 2: Nguyen-Hoai T, Baldenhofer G, Ahmed MS, Pham-Duc M, Gries M, Lipp M, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, CCL19 (ELC) improves TH1-polarized immune responses and protective immunity in a murine Her2/neu DNA vaccination model, Journal of Gene Medicine, 2012

Beitrag im Einzelnen: Mitbeteiligung an Konzeption, Akquisition und Analyse der Daten, Manuskriptentwurf

---

Gerd Baldenhofer

## **10.0 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11.0 Publikationsliste

Folgende Veröffentlichungen sind im Rahmen der Dissertation entstanden:

### 11.1 Publikationen

Nguyen-Hoai T, Baldenhofer G, Sayed Ahmed MS, Pham-Duc M, Vu MD, Lipp M, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

CCL21 (SLC) improves tumor protection by a DNA vaccine in a Her2/neu mouse tumor model. *Cancer Gene Therapy* 2012; 19 (1):69-76

Nguyen-Hoai T, Baldenhofer G, Ahmed MS, Pham-Duc M, Gries M, Lipp M, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

CCL19 (ELC) improves TH1-polarized immune responses and protective immunity in a murine Her2/neu DNA vaccination model. *Journal of Gene Medicine* 2012, 14 (2):128-37

### 11.2 Posterpräsentationen

Baldenhofer G, Nguyen-Hoai T, Höpken UE, Lipp M, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J. Chemokine als Adjuvans bei der DNA Vakzinierung: CCL19 (ELC) verbessert den tumorprotektiven Effekt einer Her-2/neu DNA Vakzine.

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Fachgesellschaft für Hämatologie und Onkologie in Wien, Oktober 2008

Westermann J, Nguyen-Hoai T, Baldenhofer G, Höpken U, Lipp M, Dörken B and Pezzutto A. CCL19 (ELC) as an Adjuvant for DNA Vaccination: Induction of a TH1-Type T Cell Response and Enhancement of Antitumor Immunity.

DC 2007, 5<sup>th</sup> International Meeting on Dendritic Cell Vaccination in Bamberg, Juli 2007



## 12. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Bernd Dörken (Direktor der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumormimmunologie der Charité Campus Virchow) für die Unterstützung meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Westermann für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die stete Ansprechbarkeit.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Tam Nguyen-Hoai für ihre tatkräftige Unterstützung und kompetente Anleitung und Betreuung.

Ferner danke ich allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors „Molecular Immunotherapy“ am Max-Delbrück-Center für Molecular Medicine in Berlin-Buch, die mir mit ihrem Rat zur Seite standen.

Besondere Erwähnung verdienen meine Eltern und meine beiden Brüder, Dirk und Kai, die mich stets bei meiner Dissertation unterstützt haben.