

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. A.C. Feller

---

**Immunmodulatorische Therapiestrategien des grosszelligen  
anaplastischen Lymphoms in der immunkompetenten Maus**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von

Martin Hölzemann

aus Stuttgart

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Merz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Wagner

3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Knobloch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2007

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 18.12.2007

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	4
TABELLENVERZEICHNIS .....	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
PROJEKTVERZEICHNIS .....	8
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1 Das grosszellige anaplastische Lymphom.....	9
<b>2 Stand der Forschung</b> .....	<b>13</b>
2.1 ALCL .....	13
2.1.1 Humanes ALCL.....	13
2.1.2 Murines ALCL .....	16
2.2 Immunsystem und Zytokinexpression des ALCL: Das T <sub>H2</sub> -Modell der T-Zell-Antwort .....	18
2.3 Therapiestrategien in der Immuntherapie .....	20
2.3.1 Immunogenitätsverstärkung.....	20
2.3.2 CpG-Oligodesoxynucleotide bewirken eine unspezifische Immunstimulation .....	22
<b>3 Zielsetzung</b> .....	<b>25</b>
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
4.1 Material .....	26
4.1.1 Versuchstiere .....	26
4.1.2 Tumorzellen .....	26
4.1.3 Ganzzell-Vakzine .....	27
4.1.4 Adjuvanzien.....	27
4.1.5 Antikörper.....	28
4.2 Methoden .....	29
4.2.1 Zellkultur.....	29
4.2.2 Immunvakzinierung, Immuntherapie und Tumorzell-Injektion .....	30
4.2.3 Dokumentation und Kontrolle des Tumorwachstums .....	31
4.2.4 Überblick über die durchflusszytometrischen Messungen .....	32
4.2.5 Gewinnung des Lymphknotenmaterials für die durchflusszytometrische Messung .....	33
4.2.6 Durchflusszytometrie .....	34
4.2.6.1 Auswertung der durchflusszytometrischen Messung .....	36
<b>5 Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
5.1 Beeinflussung des Tumorwachstums in der immunkompetenten Maus durch verschiedene Methoden der Immuntherapie.....	39
5.1.1 Wachstumsverlauf in der Tumor-Maus (Proj. TW80) .....	39
5.1.2 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen und bestrahlter Tumorzellen (Proj. TW81).....	40

5.1.3 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen, bestrahlter Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanus- Impfstoffen (Proj. TW83).....	41
5.1.4 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen und CpG-Oligodesoxynucleotiden (Proj. TW84) .....	42
5.1.5 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden und bestrahlter Tumorzellen (Proj. TW85) .....	43
5.1.6 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen, bestrahlter Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden und Diphtherie, Pertussis, Tetanus-Impfstoffen (Proj. TW87).....	44
5.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie .....	44
5.2.1 Allgemeines.....	44
5.2.2 Relatives Leukozytenverhältnis im murinen LK.....	45
5.2.2.1 LK der unbehandelten Maus.....	45
5.2.2.2 Veränderungen des Leukozytenverhältnisses nach alleiniger Tumorgabe (Projekt 80) .....	46
5.2.2.3 Veränderungen des Leukozytenverhältnisses nach Tumorgabe in Kombination mit bestrahlten Tumorzellen (Projekt 81).....	47
5.2.2.4 Veränderungen der relativen Leukozytenzahlen nach Tumorgabe und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Projekt 82) .....	49
5.2.2.5 Auswirkungen auf die relativen Leukozytenzahlen nach Tumorgabe, bestrahlten Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Projekt 83).....	50
5.2.2.6 Vergleich der Leukozytenzahlen nach Tumoringokulation mit 10 <sup>5</sup> vitalen TS1G6-Zellen und Therapie mit CpG-Oligodesoxynucleotiden (Projekt 84) bzw. CpG und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Projekt 86) .....	52
5.2.2.7 Vergleich der Leukozytenzahlen nach Tumoringokulation und therapeutischer Gabe bestrahlter Tumorzellen in Kombination mit CpG-Oligodesoxynucleotiden (Projekt 85).....	53
5.2.2.8 Vergleich der Leukozytenzahlen nach Tumoringokulation und Kombinationstherapie mittels bestrahlter Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj. 87) .....	55
5.2.3 Absolutes Leukozytenverhältnis im murinen LK.....	56
5.2.3.1 Kontrollgruppe.....	56
5.2.3.2 Tumormaus (Proj. 80).....	57
5.2.3.3 Tumorgabe und bestrahlte Tumorzellen (Proj. 81).....	59
5.2.3.4 Tumorgabe, bestrahlte Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj.83) .....	60
5.2.3.5 Tumoringokulation, Gabe bestrahlter Tumorzellen und CpG- Oligodesoxynucleotide (Proj. 85) .....	62
5.2.3.6 Tumorgabe, bestrahlte Tumorzellen in Kombination mit CpG-Oligodesoxynucleotiden und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj. 87).....	63
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>68</b>
6.1 Die Durchflusszytometrie .....	68
6.2 Grenzen und Möglichkeiten der bisherigen Therapiestrategien .....	69
6.3 Wirkung der Immuntherapie auf die leukozytäre Zellzusammensetzung des Lymphknotens .....	71
6.3.1 Leukozytenbild im untherapierten Lymphknoten .....	71
6.3.2 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumoringokulation (Proj. 80).....	72

6.3.3 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumorinokulation und zusätzlicher Gabe von bestrahlten Tumorzellen (Proj. 81).....	72
6.3.4 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumorinokulation und kombinierter Gabe von bestrahlten Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj. 83) bzw. bestrahlten Tumorzellen, Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe und CpG-Oligodesoxynucleotiden (Proj. 87) .....	74
6.3.5 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumorinokulation und kombinierter Gabe von bestrahlten Tumorzellen und CpG-Oligodesoxynucleotiden (Proj. 85) .....	75
6.4 Die Bedeutung des simultanen Vakzinierungsansatzes - Grenzen der subsequenten Vakzinierungs-Therapie .....	78
6.4.1 Der simultane Therapieansatz.....	78
6.4.2 Der subsequente Therapieansatz.....	79
6.5 Schlussfolgerungen .....	81
<b>7 Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
LITERATURVERZEICHNIS.....	86
DANKSAGUNG.....	95
LEBENS LAUF .....	96

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau eines Durchflusszytometers .....	34
Abbildung 2: Lympozytengatesetzung.....	37
Abbildung 3: Dot-plot Darstellung.....	37
Abbildung 4: Histogrammdarstellung .....	38
Abbildung 5: Dot-plot-Darstellung der Isotypkontrolle .....	38
Abbildung 6: Mediankurve des Tumorwachstums nach Applikation von $10^5$ vitalen Tumorzellen .....	40
Abbildung 7: Tumorwachstumsverlauf nach Verabfolgung von $10^5$ vitalen Tumorzellen und Simultangabe von bestr. TS1G6-Zellen .....	41
Abbildung 8: Tumorwachstumsverlauf nach Verabfolgung von $10^5$ vitalen Tumorzellen und CpG-Oligodesoxynucleotiden.....	42
Abbildung 9: Tumorwachstumsverlauf nach Verabfolgung vitaler Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden und bestr. TS1G6-Zellen .....	43
Abbildung 10: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen im LK der unbehandelten Maus .....	45
Abbildung 11: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen nach Tumorinokulation .....	46
Abbildung 12: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen von Kontrollmaus und Tumormaus.....	47
Abbildung 13: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in Proj. 81 .....	48
Abbildung 14: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen von Kontrollmaus und Proj. 81..	48
Abbildung 15: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in Proj. 82 .....	49
Abbildung 16: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen von Kontrollmaus und Proj. 82 .....	50
Abbildung 17: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in Proj. 83.....	51
Abbildung 18: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen von Kontrollmaus und Proj. 83 .....	51
Abbildung 19: Vergleich des prozentualen B-Zell- und T-Zell-Anteils der Proj. 80 bis 83 und der Kontrollgruppe .....	52
Abbildung 20: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen der Kontrollmaus und Proj. 82, 84 und 86 .....	53

Abbildung 21: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen der Kontrollmaus mit den Proj. 81 und 85 .....	54
Abbildung 22: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen der Kontrollmaus mit den Proj. 83 und 87.....	55
Abbildung 23: Vergleich der Indizes innerhalb der gesamten Messreihe.....	56
Abbildung 24: Absolute Zahlen der Leukozyten in der Kontrollmaus .....	57
Abbildung 25: Absolute Zahlen der Leukozyten in Proj. 80.....	58
Abbildung 26: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen zwischen Kontrollmaus und Proj. 80 .....	58
Abbildung 27: Absolute Zahlen der Leukozyten in Proj. 81 .....	59
Abbildung 28: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen zwischen Kontrollmaus und Proj. 81.....	60
Abbildung 29: Absolute Zahlen der Leukozyten in Proj. 83.....	61
Abbildung 30: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen zwischen Kontrollmaus und Proj. 81 und 83 .....	61
Abbildung 31: Absolute Zahlen der Leukozyten in Proj. 85.....	62
Abbildung 32: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen zwischen Proj. 83 und 85 .....	63
Abbildung 33: Absolute Zahlen der Leukozyten in Proj. 87.....	64
Abbildung 34: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen zwischen Proj. 85 und 87 .....	64
Abbildung 35: Vergleich der Gesamtzellzahlen innerhalb der Messreihe.....	65
Abbildung 36: Übersichtsdarstellung der absoluten Leukozytenzahlen .....	65
Abbildung 37: Übersichtsdarstellung des CD25/CD3 Verhältnisses innerhalb der Messreihe.....	67

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: FITC-Antikörper, PE-Antikörper.....	28
Tabelle 2: FITC/PE-Antikörperkombination.....	29
Tabelle 3: Überblick über die durchflusszytometrischen Messungen.....	32
Tabelle 4: Übersicht der Therapieergebnisse hinsichtlich Tumorwachstumsbeginn und Tumorfreiheit.....	66

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALCL	Anaplastic Large Cell Lymphoma
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (=Oncovin), Prednisolon-Regime
MACOB-B	Methotrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon, Bleomycin-Regime
COPADM	Methotrexat, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon-Regime
IPI	International Prognostic Index
TH0	T-Helferzelle vom Typ 0
TH1	T-Helferzelle vom Typ 1
TH2	T-Helferzelle vom Typ 2
TH3	T-Helferzelle vom Typ 3
IL	Interleukin
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
ODN	Oligodesoxynucleotid
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
DPT	Diphtherie, Pertussis, Tetanus-Kombinationsimpfstoff
CD	Cluster of Differentiation
EMA	Epitheliales Membranantigen

NPM	Nukleophosmin
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
JAK	Janus Protein Tyrosin Kinase
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
DNA	Desoxyribonucleid Acid
cDNA	copy Desoxyribonucleid Acid
LK	Lymphknoten
NK	Natürliche Killerzelle
Ig	Immunglobulin
OT	Orale Toleranz
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender-Faktor
BCG	Bacille-Calmette-Guerin
LPS	Lipoteichonsäure
TLR	Toll-like Receptor
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
PBS	Phosphate Buffered Saline
Gy	Gray
CG	Cytosin-Guanosin
FITC	Fluoresceinisithiocyanat
PE	Phycoerithrin
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
DAPI	Diamino-phenylindol-di-hydrochlorid
FACS	Fluorescence-activated Cell-sorting
Proj.	Projekt
s.c.	subcutan
bds.	beidseits
Tab.	Tabelle
Abb.	Abbildung
FSC	Forward Light Scatter
SSC	Side Scatter

TW	Tumorwachstumskontrolle
DC	Dendritische Zelle
GELA	Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
DLBCL	Diffuse Large-B-Cell-Lymphoma
R-CHOP	Rituximab-erweitertes CHOP-Regime
RICOVER	Rituximab CHOP-over60
GMP	Good Medical Practice
n	Zahl der Versuchstiere
D	Diphtherie-Adsorbat-Impfstoff
P	Azellulärer Pertussis-Adsorbat-Impfstoff
T	Tetanus-Adsorbat-Impfstoff

## PROJEKTVERZEICHNIS

Projektnummer	Verwendete Substanzen u. Spritzschema
Projekt 80	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal
Projekt 81	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal / bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal
Projekt 82	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal / DPT; bds. s.c. inguinal
Projekt 83	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal / bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal DPT; bds. s.c. inguinal
Projekt 84	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal / CpG-ODN; bds. s.c. inguinal
Projekt 85	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal / bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal CpG-ODN; bds. s.c. inguinal
Projekt 86	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal / CpG-ODN; bds. s.c. inguinal DPT; bds. S.c. inguinal
Projekt 87	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal / bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal / CpG-ODN; bds. s.c. inguinal / DPT; bds. s.c. inguinal

## 1 Einleitung

### 1.1 Das grosszellige anaplastische Lymphom

Beim großzelligen anaplastischen Lymphom (ALCL) handelt es sich um eine besonders aggressive Variante des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL). NHL manifestieren sich zu 75% im Lymphsystem und zu 25% primär extranodal (Thiemes Innere Medizin, 1999). Das ALCL zeigt eine Altersverteilung mit 2 deutlichen Gipfeln in der 2. und 7. Lebensdekade, wobei der Anteil des ALCL an der Gesamtzahl der Non-Hodgkin-Lymphome bei ca. 2% bis 8% liegt.

Die bisherigen Therapieansätze in Form von Polychemotherapie nach dem CHOP-Schema (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Prednisolon) oder dem neueren MACOB-B (Methotrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon, Bleomycin) (Zinzani et al. 1998) bzw. COPADM-Schema (Methotrexat, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) (Brugieres et al. 1998) zeigen in Kombination mit einer Radiatio vor allem im fortgeschrittenen Stadium nach wie vor nicht nur unbefriedigende Heilungsergebnisse (mehr als 50% Rezidive nach Fanin et al. 1996), sondern auch häufig die unerwünschten Nebenwirkungen dieser Therapiemethoden in Form von Immunsuppression, Knochenmarkdepression und Anämie. Infolgedessen ist das Risiko für Infektionserkrankungen und sekundäre Neoplasien deutlich erhöht, so dass bis zu 20% der Patienten an den Folgen der Therapie versterben (Riley et al. 1999). Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt, abhängig vom international prognostic index (IPI), ca. 20% bis 70% (Haris et al. 1994).

Vor dem Hintergrund dieser nach wie vor ungünstigen Prognose ist das Interesse an verbesserten Therapiemöglichkeiten gleichbleibend hoch, wobei aber vor allem im Hinblick auf die oben beschriebenen gravierenden Nebenwirkungen der bislang gebräuchlichen Methoden auch nach grundsätzlich anderen Ansätzen geforscht wird. Hierbei gewinnt die Immuntherapie zunehmend an Bedeutung.

Dabei ist das Prinzip der Immuntherapie kein neuer Therapieansatz. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts experimentierte Coley mit Bakterienlysaten, welche er als

Impfstoffe einzusetzen versuchte, um somit eine immunstimulierende Wirkung im Organismus seiner Patienten zu erreichen (Branda et al. 1996). Dieser Grundgedanke ist in den letzten Jahren weiterentwickelt worden, und so findet sich heute eine breite Palette verschiedener Ansätze, um mittels immuntherapeutischer Verfahren eine Stimulation des Immunsystems und somit eine Tumorabwehr zu erzielen.

Ein aktueller Ansatz bedient sich der **Zytokine** als hochwirksame Immunstimulanzien. Mit Hilfe von sog.  $T_{H1}$ -Zytokinen (z.B. IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12) lässt sich eine zytotoxische Immunantwort hervorrufen, wohingegen eine  $T_{H2}$ - oder B-Zell-Antwort supprimiert wird (vgl 2.2). Analog dazu kann man die B-Zell-Antwort durch Neutralisation der  $T_{H2}$ -Zytokine mittels spezifischer Antikörper oder löslicher Zytokinrezeptoren unterdrücken (Dranoff et al. 1993). Bei der systemischen Anwendung von Zytokinen muss jedoch deren breites Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum einschränkend in Betracht gezogen werden.

Prinzipielle Ähnlichkeiten mit der Zytokintherapie hat die **Zell-Transfer-** oder adoptive-cell-therapy (Egeter et al. 2000; Ohta et al. 1997). Hierbei wird jedoch nicht eine Verschiebung des  $T_{H1}/T_{H2}$ -Zell-Verhältnisses über interne Steuermechanismen angestrebt, sondern vielmehr durch Zugabe von in vitro stimulierten T- oder NK-Zellen das Potential der zellulären Immunantwort erhöht.

Des Weiteren haben sich Therapiestrategien herausgebildet, welche die auf einigen Tumorzellen exprimierten spezifischen Antigene als Ansatzpunkt der Immuntherapie nutzen. So lässt sich beispielsweise eine Immunantwort des Organismus nach Gabe von **monoklonalen Antikörpern** gegen Tumoroberflächen-Antigene erzielen. In klinischen Versuchen wurden anti-idiotypische Antikörper bei der Therapie des B-Zell-Lymphoms eingesetzt. Durch die Bindung an spezifische Oberflächen-Immunglobuline werden das Komplementsystem klassisch aktiviert und betroffene Tumorzellen ausgeschaltet.

Besteht keine hinreichende Kenntnis über die molekularbiologische Struktur der Tumorantigene oder werden diese von der Tumorzelle schlichtweg nicht exprimiert, so kann mittels Gabe von inaktivierten und somit kurzfristig nicht mehr

teilungsfähigen Tumorzellen eine Immunisierung erreicht werden (**Ganzzell-Vakzinierung**). Das Immunsystem wird auf diesem Wege mit den attenuierten Tumorzellen „vertraut“ gemacht, wodurch eine gerichtete Antwort auch ohne Kenntnis spezifischer Tumorstrukturen möglich wird (Berd et al. 1990; Pardoll 1998) (vgl. 2.3.1).

Auch **molekulargenetische Ansätze** werden mittlerweile zur Tumorabwehr eingesetzt. So lassen sich Tumorzellen mit bestimmten Genen transfizieren, so dass es zur Ausbildung von MHC oder kostimulatorischen Molekülen wie CD 86 (B7.2) auf den Tumorzellen kommt. Durch diese Veränderungen wird die Immunogenität der Tumorzelle verstärkt (Dranoff et al. 1993; Plautz et al. 1993).

Versuche mit Vakzinen aus Tumor-DNA-Fragmenten oder rekombinanter Virus/Bakterien-DNA (**CpG-Oligodesoxynucleotide**) in Kombination mit adjuvant wirkenden Impfstoffen wie Diphtherie, Pertussis oder Tetanus lassen ebenfalls Erfolge verbuchen, welche vor allem auf die ausgelöste Entzündungsreaktion zurückzuführen sein dürften. Die lokale Kumulation von Abwehr- und Antigen-präsentierenden Zellen ermöglicht dann die spezifische Präsentation und Erkennung von Tumor-Antigenen (Pardoll 1998; Pan et al. 1995; Wang et al. 1995).

Um diese komplexen Therapieansätze weiterzuentwickeln und für den Menschen nutzbar zu machen, ist es sinnvoll, sie zunächst an einem geeigneten Tiermodell zu erproben. Lange Zeit war es lediglich möglich, das Wachstum humaner ALCL Zellen in SCID-Mäusen ohne intaktes Immunsystem zu induzieren. Zwar wird in der Literatur ein ALCL-Modell in der immunkompetenten Maus beschrieben, jedoch handelt es sich hierbei um den seltenen B-Zell Typ des großzelligen anaplastischen Lymphoms (Kuefer et al. 1997), und die Erzeugung derartiger Tumore gelingt nur über genetisch aufwendige Verfahren mit Transfer von retroviral infizierten hämatopoetischen Stammzellen. Gerade aber die Intaktheit des Immunsystems ist Voraussetzung zur Beurteilung eines immuntherapeutischen Behandlungsansatzes.

Die Bedeutung des Immunsystems bei der Tumorabwehr lässt sich anhand des erhöhten Risikos maligner Entartung bei immunsupprimierten Patienten illustrieren. Diese sind unter anderem besonders anfällig für Tumore der Haut und lymphoproliferative Erkrankungen (Thiemes Innere Medizin, 1999, S. 1439).

Aber auch ein intaktes Immunsystem ist nicht ausnahmslos in der Lage, maligne entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Ursächlich sind spezielle Mechanismen, derer sich Tumorzellen bedienen, um der Immunkontrolle zu entgehen:

- Bedingt durch immunologisch vermittelten Selektionsdruck kommt es zur Herunterregulation der MHC-Expression auf den Tumorzellen, wodurch die T-Zell Interaktion kompromittiert wird (1. Signal der T-Zell-Aktivierung) (Wallich et al. 1985).
- Kostimulatorische Signale, welche ebenfalls für die T-Zell Aktivierung wichtig sind, werden von Tumorzellen nicht ausgesandt (2. Signal der T-Zell Aktivierung (Greenfield et al. 1998; Pardoll 1998).
- Tumorzellen können befähigt sein, supprimierende Zytokine (z.B. IL-10, TGF- $\beta$ ) auszuschütten und dadurch eine Immunsuppression bewirken (Pardoll 1998).

Folgende Annahmen liegen der vorliegenden Arbeit zugrunde:

- 1) Das Immunsystem kann eine entscheidende Rolle bei der Tumorabwehr innerhalb des Organismus spielen.
- 2) Das großzellige anaplastische Lymphom produziert Zytokine, welche die  $T_{H1}/T_{H2}$  Balance stören.
- 3) Mit Hilfe unspezifischer (CpG-ODN, DPT) und spezifischer (Ganzzell-Vakzinierung) Methoden werden Veränderungen innerhalb des Immunsystems des erkrankten Organismus erzielt, welche sich günstig auf die Tumorabwehr auswirken.

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 ALCL

#### 2.1.1 Humanes ALCL

Das grosszellige anaplastische Lymphom umfasst eine heterogene Gruppe von Non-Hodgkin-Lymphomen, welche nach zyto- und histomorphologischen Kriterien weiter unterteilt werden kann. Gut 60% der ALCL weisen einen TZR-Genotyp und einen T-Zell-Phänotyp auf und werden entsprechend der Kiel-Klassifikation zu den T-Zell-Lymphomen gerechnet. Circa 30% werden aufgrund der Tatsache, dass sie weder T- noch B-Zell Antigene exprimieren zum so genannten Null-Zell-Typ gezählt (Thiemes Innere Medizin, 1999, S. 911). Geno- und phänotypisch dem B-Zell-Typ zuzuordnen sind die verbleibenden 10% der ALCL (de Kan et al. 1993).

Während sich der T- und der Null-Zell-Typ in biologischer und prognostischer Hinsicht ähneln, zeigt der B-Zell-Typ diesbezüglich einige Unterschiede. Tritt das T-Zell-Lymphom z.B. überwiegend bei jungen Erwachsenen auf, so findet man den B-Zell-Typ, welcher sich im Vergleich mit dem T-Zell-Typ als therapieresistenter gezeigt hat, vor allem bei Patienten fortgeschrittenen Alters.

Innerhalb der T-Zell-Lymphome können zusätzlich weitere Entitäten abgegrenzt werden:

- Primär systemisches ALCL
  - anaplastische Lymphomkinase-positiv (ALK-pos)
  - anaplastische Lymphomkinase-negativ (ALK-neg)
- Primär kutanes ALCL

Histologisch identifiziert sich das CD-30 positive ALCL vor allem durch große Blasten mit häufig unregelmäßiger Form und blass-blauem Zytoplasmasaum, wobei die Zellen zumeist in zusammenhängenden Verbänden vorliegen. Außer diesen Hodgkin- bzw. Sternberg-Reed-ähnlichen Zellen finden sich innerhalb des

Tumorverbandes auch kleinere Tumorzellen in unterschiedlicher Dichte und granulomtypische Epitheloidzellen, Histiozyten, Plasmazellen und Lymphozyten. Auch Fibrosierungen und Sklerosierungen können beobachtet werden (a:Merz et al. 1991; b:Merz et al. 1991; Sgrignoli et al. 1997). Die heterogene zelluläre Zusammensetzung des Tumors macht eine Unterscheidung der Varianten mit klassischer, kleinzelliger, riesenzelliger und lympho-histiozytischer Erscheinung möglich.

Die Tumorausbreitung innerhalb des Lymphknotens erfolgt charakteristischerweise über den Randsinus und die T-Zell Zone, woraus letztendlich die Zerstörung der physiologischen Lymphknotenarchitektur resultiert (Kadin et al. 2003). Darüber hinaus ist auch eine extranodale Manifestation, beispielsweise in Knochenmark, Leber, Haut und Milz dokumentiert (Feller et al. 2000).

Obwohl bisher die exakte zelluläre Abstammung des primär-systemischen ALCL nicht bekannt ist, so gibt es doch Hinweise dafür, dass es aus entarteten zytotoxischen T-Zellen hervorgehen könnte. Entsprechend finden sich überwiegend T-Zell assoziierte Oberflächenantigene (CD-3, CD-25, CD-45) und Aktivierungsantigene (CD-25, CD-30, CD-71) auf den Zellen des ALCL (de Kan et al. 1993; Foss et al. 1996; Haris et al. 1994; a:Merz et al. 1991; Sgrignoli et al. 1997). Des Weiteren lassen sich das epitheliale Membranantigen (EMA) und die zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B immunhistologisch nachweisen (Foss et al. 1996).

Feller und Merz konnten 1995 zeigen, dass die Tumorzellen mit IL-4, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 Zytokine produzieren, welche dem T<sub>H2</sub>-Profil entsprechen. Besonders hervorzuheben ist dabei die Bedeutung von IL-9 für die Lymphomentstehung in der Maus, welche unter 2.1.2-murines ALCL- eingehender beschrieben wird (Feller 1995).

Bei 12%-50% der am ALCL vom T- oder Null-Zell-Typ erkrankten Patienten findet sich eine charakteristische Translokations-Mutation (Thiemes Innere Medizin 1999, S. 912). Diese Translokation t(2;5) (p23;q35) resultiert in einem als Nukleophosmin/anaplastische Lymphomkinase (NPM/ALK) bezeichneten

Fusionsgen, bei welchem das NPM-Gen des Chromosoms 5 mit dem ALK-Gen des Chromosom 2 fusioniert. NPM ist ein ubiquitär vorkommendes Gen, das an der Steuerung ribosomaler Proteine beteiligt ist und dessen Expression Zellzyklus-abhängig erfolgt. ALK wird unter normalen Umständen nicht im hämatopoetischen System gefunden, da sie die Funktion einer Transmembran-Rezeptorkinase für Insulinrezeptoren erfüllt (Thiemes Innere Medizin, 1999, S. 912).

Das Genprodukt dieses pathologischen Fusionsgens bewirkt offensichtlich eine unregelte Proliferation der betroffenen Zellen und ist so maßgeblich an der Entstehung des ALCL beteiligt (Lange et al. 2003; Kadin et al. 2003). Der exakte Mechanismus der NPM-ALK assoziierten Onkogenese ist nicht abschließend geklärt, eine Beteiligung des Tyrosin-phosphorylierten STAT3-Proteins (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Lai et al. 2004; Chiarle et al. 2005; Shi et al. 2006), sowie der Jak2 (Janus-Protein-Thyrosin-Kinase2), welche bei der Phosphorylierung der STAT-Proteine bedeutsam ist, werden in der Literatur beschrieben (Thompson 2005; De Paepe et al. 2003). Die eingangs beschriebene Unterscheidung des primär systemischen ALK-positiven vom ALK-negativen ALCL innerhalb der T-Zell Gruppe basiert auf dem Vorhandensein bzw. dem Fehlen des beschriebenen Fusionsgens. In den darüber hinaus beschriebenen immunhistologischen Merkmalen stimmen beide Subentitäten weitgehend überein. Während das ALK-positive ALCL jedoch vornehmlich für den ersten Peak innerhalb der Altersverteilungskurve verantwortlich ist, eine relativ günstige Prognose hat (10-Jahresüberlebensrate 71%-90%) und in einigen Fällen ein kleinzelliges histomorphologisches Bild aufweist, so findet man die ALK-negative Variante, ähnlich wie den B-Zell-Typ des ALCL, vornehmlich bei älteren Patienten und mit deutlich schlechterer Prognose (10-Jahresüberlebensrate 15%-37%), wobei bislang jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist, ob der Prognose-Unterschied tatsächlich mit der Ausbildung der ALK-Translokations-Expression korreliert oder lediglich auf den Altersunterschied der Erkrankten zurückzuführen ist.

Bei ALCL vom B-Zell-Typ findet sich, wie auch bei anderen B-Zell-NHL, in einem Teil der Fälle eine Umlagerung des bcl-2 und des bcl-6 Gens. Bcl-2 hat

physiologischerweise die Funktion eines Anti-Apoptose-Gens und bcl-6 steuert als Transkriptionsfaktor die Differenzierung der B-Lymphozyten in den Keimzentren.

Bedingt durch diese Translokations-Mutation, gelangt das bcl-2 Gen vom Chromosom 18 und das bcl-6 Gen vom Chromosom 3 in die Nähe der Gene, welche für die Immunglobulinentstehung verantwortlich sind (14q32; 2p14; 22q11). Diese Umlagerung kann bei ansonsten erhaltener Struktur zu einer Überexpression der betroffenen Gene und somit zur Zellentartung beitragen (Thiemes Innere Medizin, 1999, S. 912).

1997 beschrieb Delsol et al einen neuen Subtyp des großzelligen B-Zell-Lymphoms. Dieser zeichnet sich durch Expression der full-length ALK Rezeptor-Kinase und ein Fehlen der t (2;5) Translokation und dem daraus resultierenden NPM/ALK-Gen aus. Morphologisch imponieren diese Zellen als große immunoblastenähnliche Zellen mit großen zentralen Nucleoli. Anders als beim ALCL wird das CD30-Oberflächenmolekül bei dieser Entität nicht exprimiert.

### 2.1.2 Murines ALCL

Lange Zeit stand kein *immunkompetentes* Tiermodell zur Verfügung, so dass die neu erdachten immunologischen Therapiestrategien zur Behandlung des ALCL nicht hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen überprüft werden konnten. Erst mit der Entwicklung eines Tiermodells des ALCL in der syngenesischen immunkompetenten Maus durch die Arbeitsgruppe um J. van Snick wurde die Möglichkeit der auf den Menschen übertragbaren immunologischen Therapiekontrolle geschaffen (Uytenhove et al. 1991).

Van Snick gelang es in einem ersten Schritt, einen KLH-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Klon aus Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) stimulierten T-Zellen der immunkompetenten syngenesischen C57Bl/6-Maus zu isolieren und in Kultur zu halten. Durch Zugabe des Wachstumsfaktors IL-9 war es möglich, einen Klon zu selektionieren, der IL-9 abhängig zum Wachstum befähigt war. Diese so

entstandene TS1-Zelllinie wurde in einem zweiten Schritt mit IL-9 cDNA transfiziert (pMGneo IL-9-Vector). Das Ergebnis dieser Transfektion waren Zellen (TS1G6), welche zu einer selbständigen Produktion des IL-9 Wachstumsfaktors und somit zur in vitro Teilung ohne exogene Wachstumsfaktorzugabe in der Lage waren (Uyttenhove et al. 1991; van Snick et al. 1989). In der C57Bl/6 Maus wurde rasch progredientes Tumorwachstum in 100% der Fälle innerhalb eines Zeitraumes von 9 bis 22 Tagen nach Injektion einer Tumordosis  $\geq 10^4$  Zellen beobachtet.

Wichtig für die Übertragbarkeit dieses so gewonnenen Tiermodells auf den Menschen ist die Vergleichbarkeit hinsichtlich Morphologie, Wachstumsverhalten, Vorhandensein und Beschaffenheit, der für das ALCL typischen Oberflächenmerkmale. Tatsächlich finden sich große Ähnlichkeiten im Wachstumsverhalten des murinen mit dem humanen ALCL. Auch in der Maus beobachtet man große, zusammenhängend wachsende zytoplasmareiche Zellen mit prominenten Kernen, wodurch die Zellen an Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen erinnern. Ebenso zeigt sich das beim humanen ALCL beschriebene Vorkommen von Lymphozyten und Granulozyten des eosinophilen und neutrophilen Typs in vergleichbarer Form beim murinen ALCL. Hinsichtlich des Wachstums beobachtet man zunächst eine lokale Infiltration per continuitatem, später treten lymphogene und hämatogene Metastasen u.a. in Lymphknoten, Milz, Leber, Pankreas und Lunge hinzu. Der Befall des LK zeigt dieselben Stadien wie sie auch beim humanen ALCL beobachtet werden: Befall des Randsinus, Infiltration der T-Zell Zone und schließlich komplette Zerstörung des Lymphknotens.

Bei Betrachtung der Oberflächenmerkmale des murinen ALCL lässt sich eine monoklonale T-Zell-Rezeptor Rekombination als Beweis dafür nachweisen, dass die Tumorzellen ursprünglich von ein und derselben T-Zelle ausgegangen sind. Darüber hinaus finden sich die bereits unter 2.1.1 erwähnten Oberflächenmarker CD4, CD25, CD30 und CD 71. Wie bei einem Teil der Fälle von humanen ALCL lässt sich bei der murinen Form die Expression des ALK-Genproduktes ebenso nicht nachweisen (Rudolph et al. 2006; Bittner et al. 2000).

Die TS1G6-Lymphomzellen zeigen ein  $T_{H2}$ -Zytokinprofil, bei dem neben IL-9 auch IL-4, IL-5 und IL-10 exprimiert werden. Van Snick konnte mit Hilfe seiner Versuche an der Maus die Bedeutung des Zytokins IL-9 für die Entstehung und das Wachstum eines aggressiven Lymphoms aus  $CD4^+$  T-Zellen aufzeigen. Feller und Merz zeigten 1995, dass 50% der humanen ALCL- und Hodgkin-Zellen IL-9 exprimieren, wohingegen andere B- und T-Zell-Lymphome dazu nicht in der Lage sind. Die physiologische Funktion von IL-9 besteht in der Stimulation der Mastzell-, Erythrozyten- und Megakaryozytenreifung, darüber hinaus spielt es eine Rolle beim Wachstum bestimmter T-Zell Klone und dem Immunglobulin-Switch (Modi et al. 1991).

## 2.2 Immunsystem und Zytokinexpression des ALCL: Das $T_{H2}$ -Modell der T-Zell-Antwort

Das spezifische Immunsystem unterteilt sich in einen zellulären (T-Zell-) und einen humoralen (B-Zell-) Anteil. Innerhalb der T-Zell-Population unterscheidet man des Weiteren zytotoxische T-Zellen von T-Helferzellen. Die Population der T-Helferzellen lässt sich in 2 phänotypisch verschiedene Subpopulationen aufgliedern, welche sich hinsichtlich Zytokin-Expression und Wirkung unterscheiden:  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$ -Lymphozyten.

Während Allergene und Parasiten z.B. über IL-4 eine  $T_{H2}$ -Antwort induzieren, kommt es bei viralen und (intrazellulär) bakteriellen Infektionen zu einer  $T_{H1}$ -Antwort, welche v.a. durch IL-12 und IFN- $\gamma$  hervorgerufen wird. Diese beiden Subsysteme sind über eine gegenseitige Hemmung miteinander verschaltet und so in der Lage, bei Aktivierung des einen Schenkels, den anderen, nicht angesprochenen Schenkel zumindest vorübergehend zu unterdrücken, um eine maximale Wirkung des aktivierten Subsystems zu gewährleisten. IL-4 stimuliert dementsprechend nicht nur die Bildung von  $T_{H2}$ -Zellen, sondern supprimiert gleichzeitig die Entstehung der  $T_{H1}$ -Lymphozyten. IL-12 und IFN- $\gamma$  regen im Gegenzug einerseits die Bildung von  $T_{H1}$ -Zellen an, hemmen aber gleichzeitig die Expression von  $T_{H2}$ -Lymphozyten.

Die exakten Abläufe und Stimuli, welche zur Differenzierung dieser beiden Untergruppen führen, sind noch nicht hinreichend bekannt, jedoch weiß man, dass beide aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der so genannten  $T_{H0}$ -Zelle hervorgehen und sich durch unterschiedliche Rezeptoren und nachgeschaltete Effektorzellen unterscheiden.  $T_{H1}$ -Zellen rekrutieren v.a. Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen;  $T_{H2}$ -Zellen stimulieren eosinophile Granulozyten und bewirken eine Antikörperproduktion vom IgG1- und IgE-Typ.

Darüber hinaus wurden in jüngerer Zeit die sog.  $T_{H3}$ -Zellen (regulatorische Lymphozyten) beschrieben. Diese sezernieren u.a. den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , welcher die Expression inflammatorischer Leukozyten herabreguliert und somit eine ungewollte Abwehrreaktion verhindern kann. Im Rahmen der „oralen Toleranz“ (OT) kommt diesen Zellen besondere Bedeutung zu, verhindern sie doch eine Abwehrreaktion des Immunsystems auf harmlose, oral zugeführte Antigene z.B. in Nahrungsmitteln oder Stäuben.

Feller und Merz zeigten 1995, dass das ALCL die Zytokine IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 freisetzt und somit ein  $T_{H2}$ -Zytokinprofil aufweist. Die klassischen  $T_{H1}$ -Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  konnten hingegen ebenso wenig wie GM-CSF nachgewiesen werden. Die einseitige Produktion der  $T_{H2}$ -Zytokine durch das humane wie auch das murine ALCL führt somit zu einer Verschiebung des bereits erwähnten Gleichgewichts der T-Helferzell-Subpopulationen zumindest in dem lokalen Mikromilieu des Tumors. Der oben beschriebene Hemmmechanismus bewirkt eine verminderte Aktivität der zytotoxischen T-Zellen (Scott et al. 1991).

Janeway und Travers zeigten 1997 die Bedeutung der T-Zellen auf. Sie injizierten bestrahlte und somit teilungsunfähige Tumorzellen in die Maus und konnten eine unterschiedlich stark ausgeprägte Tumorabstoßung bei sekundärer Tumorapplikation in diesen Mäusen nachweisen. Dieser immunologisch bedingte Schutzmechanismus war in Mäusen, bei denen das T-Zell-System ausgeschaltet wurde, nicht nachweisbar.

## 2.3 Therapiestrategien in der Immuntherapie

### 2.3.1 Immunogenitätsverstärkung

Im Gegensatz zur meist raschen und effektiven Immunantwort des Körpers auf virale oder bakterielle Infektionen, ist der immunologische Schutz des Körpers vor Tumoren häufig mangelhaft und unzureichend. Grundsätzlich wurde zwar das Vorhandensein von gegen den Tumor gerichteten T-Zellen in mehreren Tiermodellen und auch in einigen humanen Tumoren gezeigt, jedoch scheint die Frequenz bzw. die immunologische Potenz dieser Immunzellen lokal nicht ausreichend zu sein, um den Organismus adäquat vor einer Tumorentstehung und progredientem Tumorwachstum zu schützen (Rosendahl et al. 1998; Stover et al. 1991). In diesem Zusammenhang gelang es Roth et al. 1994 eine antigenabhängige Tumorzell-Lyse nach Applikation zytotoxischer T-Zellen nachzuweisen, wodurch die grundsätzliche Wirksamkeit des Immunsystems im Kampf gegen den Tumor belegt wurde. Die in der Einleitung erwähnten Mechanismen des Tumors wie Downregulation der MHC-Expression, Unterdrückung des kostimulatorischen Signals und die Ausschüttung immunsupprimierender Zytokine, welche darauf abzielen, die Immunkontrolle zu umgehen, verhindern aber offensichtlich eine effektive Kontrolle der Entstehung und Proliferation maligner Zellen.

Ein nahe liegendes Ziel der immunologischen Tumorthherapie lässt sich aus dem oben Erwähnten ableiten: die grundsätzlich vorhandene und prinzipiell auch effektive Bekämpfung der Tumorzellen durch das Immunsystem bzw. die T-Zellen muss verstärkt und die Immunsuppression durch Tumorzell-Zytokine oder die supprimierende Interaktion von Tumorzellen und Immunzellen gestoppt werden. Die Überwindung der Immuntoleranz und Steigerung der Immunogenität eines Tumors könnte also vor dem Hintergrund des Gesagten einen viel versprechenden Ansatz darstellen, um eine durch das Immunsystem vermittelte und kontrollierte Tumorremission zu erreichen. Vorstellbar und in verschiedenen Studien bereits beschrieben (Sinkovics 1999; Horvath 1998) ist eine Immunvakzinierung mittels

körpereigener und durch vorhergehende Bestrahlung teilungsunfähig gemachter Tumorzellen.

Auch innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurden in Vorversuchen Tumorzellvakzinierungsversuche erfolgreich durchgeführt. Dabei führte die Vakzinierung mit bestrahlten Tumorzellen zu einer Aktivierung des Immunsystems und konsekutiv zu einem Schutz vor Tumorwachstum nach Injektion von vitalen Tumorzellen. Dieser zuverlässige Schutz ließ sich jedoch nur dadurch erreichen, dass die Versuchstiere vor Applikation der Tumorzellen prophylaktisch vakziniert worden waren. Ansätze, in denen die Vakzinierung simultan, d.h. zeitgleich mit der Tumorgabe durchgeführt wurde, waren erfolgreicher als subsequentes Vorgehen, bei welchem die Vakzinierung erst bei nachweisbarem Tumorwachstum erfolgte. Bei diesem „therapeutischen“ Vorgehen ließ sich in der großen Mehrzahl der Fälle lediglich eine Verzögerung des Tumorwachstums erreichen. Nur bei einer kleinen Zahl der Versuchstiere ließ sich nach simultaner Gabe von wenigen Tumorzellen ( $10^4$ ) und mehrfacher Impfung eine vollständige Remission erreichen. Diese Tiere wehrten auch nach Ablauf einer Frist von 6 Monaten eine erneute Applikation von Tumorzellen erfolgreich ab, was sich auf eine auf T-Gedächtniszellen gestützte Recall-Antwort zurückführen lässt. Diese sekundäre Immunantwort läuft schneller und effizienter ab als die Erstantwort auf das „Fremd“-Antigen.

Es erscheint daher lohnenswert, diesen speziellen Ansatz zur Verbesserung der Immunogenität von Tumoren etwas genauer zu betrachten. 1996 zeigte Schweighoffer anhand des malignen Melanoms in der Maus, dass der Einsatz von Recall-Antigenen zu einer verbesserten Tumorabwehr führt. Mit BCG vorimmunisierten Mäusen wurden transfizierte Tumorzellen verabreicht, welche ein Fragment des *heat shock* Antigens von *Mycobacterium bovis* enthielten. Die resultierende Recall-Immun-Antwort zeigte eine verbesserte zelluläre Immunantwort mit Anstieg der  $T_{H1}$ -Zellen, der Dendritischen Zellen und der NK-Zellen. Diese ursprünglich gegen das transfizierte BCG-Fragment gerichtete Reaktion schloss auch die Tumorantigene ein. Nachfolgend wurden unveränderte Melanomzellen von den vorimmunisierten Tieren zuverlässig erkannt und abgewehrt, wohingegen nicht vorimmunisierte Tiere erkrankten. Die Exprimierung

von Recall-Antigenen in Tumorzellen stellt demzufolge einen wirkungsvollen Ansatz der Immunvakzinierung dar.

Im Rahmen der Versuche unserer Arbeitsgruppe fanden vor allem die Antigene des Diphtherie-, des Pertussis- und des Tetanus-Toxins Verwendung. Durch die systematisch durchgeführten Reihenimpfungen in den westlichen Ländern finden sich bei einem Großteil der Bevölkerung bereits Antikörper bzw. T-Gedächtniszellen, welche im Rahmen der Recall-Antwort zur Tumor-Vakzinierung rekrutiert werden können. Die Tatsache, dass der durch Immunvakzinierung mit Zellen eines bestimmten Tumor-Typs erreichte Schutz sich nicht auf andere Tumoren ausweiten ließ, zeigt die Spezifität des immunologischen Schutzes aber damit auch gleichzeitig dessen Beschränkungen auf.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, existieren darüber hinaus noch weitere Möglichkeiten, um die Immunogenität eines Tumors zu steigern und somit die Wirksamkeit der immunologischen Abwehrreaktion zu verbessern. Durch Transfizierung mit Gensequenzen kostimulatorisch wirkender Proteine genetisch veränderte Tumorzellen spielen dabei ebenso eine Rolle wie der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Tumor-Oberflächen-Immunglobuline. Auch mittels genetisch modifizierter Tumorzellen lässt sich die Immunogenität und damit die Regressionsrate steigern. Transfiziert man Tumorzellen beispielsweise mit der Sequenz eines kostimulierenden Moleküls wie B7 oder der eines Zytokins wie GM-CSF, erhöht sich die Immunogenität der transfizierten Tumorzelle (Pardoll 1998).

### 2.3.2 CpG-Oligodesoxynucleotide bewirken eine unspezifische Immunstimulation

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, über so genannte *pattern-recognition-receptors* Bakterienbestandteile wie Lipoteichonsäuren (LPS), Peptidoglykane, Lipopeptide, und Formylmethionin als fremd zu erkennen und im Rahmen einer unspezifischen Abwehrreaktion zu neutralisieren (Krieg et al. 1995). Ebenfalls zu den Liganden dieser unspezifischen Rezeptoren gehören bestimmte

Gensequenzen bakterieller DNA (Messina et al. 1991). Bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems in Form von Makrophagen, Dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen mittels bakterieller und synthetisch hergestellter, unmethylierter CpG-Oligonucleotide spielt eine spezielle Rezeptorgruppe eine zentrale Rolle (Ashkar et al. 2002). Dies ist die Klasse der Toll-like-Rezeptoren, welche in der Zellmembran von Vertebraten und Nichtvertebraten exprimiert werden. Der TLR9 ist verantwortlich für die Vermittlung der immunologischen Erkennung bakterieller DNA-Sequenzen, er scheint insbesondere auch bei der Erkennung synthetischer, unmethylierter CpG-Oligonucleotide eine bedeutsame Rolle zu spielen. In Tierversuchen mit TLR9-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese nicht länger zur Erkennung der unmethylierten CpG-Oligonucleotid-Sequenzen in der Lage waren (Chuang et al. 2002)

Im Vergleich bakterieller, prokaryotischer DNA mit eukaryotischer DNA treten für die Initiierung einer unspezifischen Immunreaktion bedeutsame Unterschiede zu Tage. So enthält bakterielle DNA eine Vielzahl an CpG-Dinucleotiden, welche in unmethyliertem Zustand vorliegen. Eukaryotisches Erbmateriale zeigt diese Sequenzen aufgrund von CpG-Suppression und Methylierungen praktisch nicht. Das vertebrale Immunsystem ist aufgrund dieser Unterschiede in der Lage, eukaryotische von prokaryotischer DNA zu unterscheiden (Crooke 1991; Sparwasser et al. 1997). Nach Applikation bakterieller Gensequenzen mit nicht-methylierten CpG-Dinucleotiden in die Maus konnten Krieg et al. 1995 zeigen, dass es in den Versuchstieren zu einer deutlichen B-Zell-Proliferation mit gesteigerter Immunglobulin-Sekretion kam. Nach selektiver Eliminierung der CpG-Dinucleotide bei ansonsten unveränderten Gensequenzen ließ sich hingegen keine Immunstimulation mehr nachweisen.

Das Erkennen der Bedeutung der unmethylierten CpG-Dinucleotid-Sequenzen für die immunstimulatorische Wirkung führte zur Entwicklung synthetischer Oligodesoxynucleotide wie 12p40, 1668, 1758 und 1643. Dabei ist die Wirkung dieser künstlichen CpG-ODN mit den Wirkungen der bakteriellen Sequenzen vergleichbar. Eine optimal stimulierende Wirkung auf die B-Zellen zeigen dabei solche CpG-ODN, welche durch Phosphothiolierung gegen den Abbau durch

Nukleasen geschützt sind und deren CpG-Sequenzen umrahmt sind von zwei 3' Pyrimidinen und zwei 5' Purinen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Wirkungen der CpG-ODN auf das Immunsystem festhalten (Klinman et al. 1996; Stacey et al. 1996; Sparwasser et al. 1997):

- Induktion proinflammatorischer Zytokine ( $T_{H1}$ -Profil)
- B-Zell-Stimulation mit verstärkter Antikörper-Produktion
- Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und Dendritischen Zellen

Die direkt aktivierende Wirkung der CpG-ODN auf Dendriten, Monozyten und Makrophagen bewirkt eine massive Zytokinproduktion und -freisetzung. Da es sich hierbei vornehmlich um Zytokine des  $T_{H1}$ -Profil handelt (IL-6, IL-12, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  etc.), unterhält und verstärkt sich die angestoßene Kaskade der Immunantwort kontinuierlich. Darüber hinaus resultiert eine indirekte Aktivierung von T-Lymphozyten durch die Zytokine. Auf den B-Zellen kommt es zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle. Das beschriebene  $T_{H1}$ -Milieu bewirkt insbesondere eine Ausschüttung des IgG2a-Antikörper-Isotyps. Die Zellen des Monozyten-/Makrophagen-Systems zeigen, ähnlich wie die B-Zellen, eine verstärkte Expression kostimulatorisch wirksamer Moleküle. Auch die Antigen-Präsentation durch die APZ findet verstärkt statt.

### **3 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Möglichkeiten der immunologischen Therapie des großzelligen anaplastischen Lymphoms zu erläutern und deren Nutzen für einen möglichst kurativen Therapieansatz in einem Tiermodell zu belegen. Der bisherige Mangel an Erfolg versprechenden Therapien in der Behandlung dieses aggressiven Lymphoms, lässt eine weiterführende Grundlagenforschung hinsichtlich der beteiligten immunologischen Mechanismen notwendig und sinnvoll erscheinen.

Insbesondere folgende Fragestellungen sollten mit Hilfe dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welche immunologischen Veränderungen werden durch die Therapie im Immunsystem, z.B. bezüglich dessen zellulärer Zusammensetzung (im Lymphknoten), bewirkt?
- Welche Synergien/Effekte ergeben sich aus der Kombination einzelner immuntherapeutischer Ansätze?
- Welche Korrelation besteht zwischen den beobachteten Veränderungen innerhalb des Immunsystems mit den Überlebenszeiten der Mäuse (unter Einbeziehung weiterer Daten der Arbeitsgruppe)?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente verwendeten wir weibliche, ca. 6 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse, welche von der Charles River GmbH, Sulzfeld bezogen wurden. Hierbei handelt es sich um einen syngen (genetisch identischen) immunkompetenten Mausstamm. In der Tierversuchsanstalt der Medizinischen Universität zu Lübeck erfolgte die Haltung entsprechend der in §9 des Tierschutzgesetzes vorgegebenen Tierhaltungs-Bestimmungen. In durchsichtigen Polykarbonkäfigen des Typs III (42 x 26 x 15 cm) wurden je 6 Mäuse auf Hobelspänen gehalten. Mittels einer Zeitschaltuhr wurde der künstliche Tag-Nacht-Rhythmus weitgehend unverändert gehalten, eine Klimaautomatik sorgte für konstante thermische Umweltbedingungen. Nach Standardbedingungen erfolgte die Futter- und Wasserzuteilung. Ein Genehmigungsbescheid des Ministeriums für Umwelt, Natur und Forst des Landes Schleswig-Holstein lag für sämtliche beschriebene Tierversuche vor.

#### 4.1.2 Tumorzellen

Aus dem C57Bl/6 Mausstamm isolierte die Arbeitsgruppe um van Snick T-Zellen, welche *in vitro* zur Vermehrung die Zugabe des Wachstumsfaktors IL-9 benötigten. Nach Transfektion der Tumorzellen mit dem IL-9-Gen waren diese zur autonomen, IL-9 unabhängigen Proliferation fähig. Somit war die immortalisierte Zelllinie TS1G6 entstanden (Uttenhove et al. 1991). Die Zellen wachsen *in vitro* als nicht adhärenente Einzelzellen. Bei subcutaner Applikation von  $\geq 10^4$  Tumorzellen in die C57Bl/6 Maus zeigte sich nach 9 bis 22 Tagen ein Tumorwachstum an der Injektionsstelle. Die TS1G6-Zelllinie, die von van Snick zur Verfügung gestellt wurde, führte zum Wachstum eines großzelligen anaplastischen Lymphoms in der verwendeten syngen C57Bl/6 Maus.

Hinsichtlich Morphologie, Wachstumsverhalten und Immunphänotyp ähnelt das murine ALCL dem humanen ALCL ausgesprochen stark (vgl. Einleitung bzw. Stand der Wissenschaft). Für die Versuche wurde eine Tumordosis von  $10^5$  Zellen, suspendiert in 200µl PBS-Lösung, s.c. in die rechte Flanke bzw. für die durchflusszytometrischen Messungen in den Rücken injiziert. In den Vakzinierungsversuchen wurde die gleiche Zellzahl verwandt.

#### 4.1.3 Ganzzell-Vakzine

Die Ganzzell-Vakzinierung erfolgte mit  $10^5$  Tumorzellen, welche in PBS suspendiert und im Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck bestrahlt wurden. Die Bestrahlung erfolgte mit insgesamt 70 Gy (zweimal 35 Gy) in einer Gamma-Bestrahlungsanlage OB29/4 der Firma STS-Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH, Braunschweig. Durch die Bestrahlung verloren die Zellen die Fähigkeit zur Teilung und starben nach ca. 14 Tagen ab.

#### 4.1.4 Adjuvanzen

In den verschiedenen Versuchsgruppen fanden zwei unspezifische Adjuvanz-Typen Anwendung: 1) Impfstoffpräparate und 2) CpG-Oligodesoxynucleotide.

1) Diphtherie-Adsorbat-Impfstoff (Behring, Marburg),

Azellulärer-Pertussis-Adsorbat-Impfstoff (Merieux, Leimen),

Tetanus-Adsorbat-Impfstoff (Merieux, Leimen),

Diphtherie-, Pertussis-, Tetanus- (DPT) Kombinationsimpfstoff (Merieux, Leimen)

Alle Impfstoffe enthielten zusätzlich Natriumtetraborat als Konservierungsstoff, Aluminiumhydroxid als Adjuvanz und Spuren von Formaldehyd. Darüber hinaus

waren Wasser und Salze für Injektionszwecke enthalten. Am Tag 0 wurde jeweils der DPT-Kombinationsimpfstoff verabreicht, die Wiederholung erfolgte dann mittels der Einzelimpfstoffe, um eventuelle unerwünschte Effekte zu vermeiden.

- 2) CpG-Oligodesoxynucleotid IL-12p40 (AGCTATCACCGTTCCAAGG)  
(Tibmolbiol, Berlin)

Dieses synthetische Oligodesoxynucleotid enthält, in Analogie zu bakterieller DNA, unmethylierte CG-Dinucleotide, welche von zwei 5' Purinen und zwei 3' Pyrimidinen eingerahmt sind. Zum Schutz vor vorzeitigem Abbau durch Nukleasen ist IL-12p40 synthetisch phosphothioliert.

#### 4.1.5 Antikörper

Die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper (Rat/Hamster Anti-Mouse) stammten sämtlich von der Firma Becton Dickinson, Heidelberg. Zwei unterschiedliche Klassen von Antikörpern fanden Verwendung, zum einen Fluorescein-konjugierte (FITC), zum anderen R-Phycoerythrin-konjugierte (PE) Antikörper.

<u>FITC-Antikörper</u>	<u>PE- Antikörper</u>
IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>
CD3	CD3
CD4	CD4
CD8	CD8
CD19	CD86

Tabelle 1: FITC-Antikörper, PE-Antikörper

In den verschiedenen Therapieansätzen kamen die folgenden Antikörperkombinationen zur Anwendung.

<u>FITC-Antikörper</u>	<u>PE-Antikörper</u>	
IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	<b>Isotypenkontrolle</b>
CD19	CD3	<b>B-Zellen/T-Zellen</b>
CD3	CD4	<b>T-Zellen/T-Helferzellen</b>
CD3	CD8	<b>T-Zellen/ Zytotox. T-Zellen</b>
CD4	CD8	<b>T-Helferzellen/ Zytotox. T-Zellen</b>
	CD86	<b>Dendriten, Makrophagen</b>
CD3	CD25	<b>T-Zellen/Aktiv. T-Zellen</b>

Tabelle 2: FITC/PE-Antikörperkombinationen

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Die Kultur der TS1G6-Tumorzellen erfolgte in Kulturschalen bei +37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Typ BB6220 CU). Das verwendete Nährmedium bestand aus RPMI-1640 (Gibco, Berlin), 2 mmol/l L-Glutamin und 10% fetalem hitzeinaktiviertem Kälberserum. Der Austausch des Mediums erfolgte regelmäßig alle 3 Tage. Ebenfalls regelmäßig erfolgte das Auftauen von zuvor eingefrorenen Tumorchargen, um eventuelle Veränderungen der Tumorzellen durch die Kultur zu kontrollieren. Der Umgang mit den

Tumorzellen fand stets in einer sterilen Arbeitshütte (Lamin Air HB2448, Kendro Laboratory Products, Osterode) statt.

Alle 3 Tage wurden die kultivierten Zellen morphologisch auf Kontaminationen hin untersucht. Hierfür verwendeten wir ein Lichtmikroskop der Firma Leitz, Wetzlar. In regelmäßigen Abständen erfolgte mit Hilfe der DAPI-Färbung (4,6-Diamino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) eine Untersuchung auf Mycoplasmen-Kontamination. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer verwendet, wobei die gezählten Zellen in 16 Quadranten  $\times 10^4$  der Zellzahl/ml entsprach.

#### 4.2.2 Immunvakzinierung, Immuntherapie und Tumorzell-Injektion

Die Verabfolgung der vitalen Tumorzellen erfolgte subcutan (am Tag 0) in die rechte Mausflanke. Im Anschluss an einen Waschschrift wurden  $10^5$  der vitalen Tumorzellen in 200  $\mu$ l PBS-Lösung resuspendiert und nachfolgend injiziert. In den Vakzinierungsversuchen wurden  $10^5$  Tumorzellen mit 70 Gy bestrahlt und subcutan in die *linke* Flanke injiziert. Simultan zur Tumorinokulation erfolgte die Therapiegabe ebenfalls am Tag 0 in die linke Flanke. Dieses Vorgehen ermöglichte in den Wachstumskontrollen die klare Unterscheidung von lokalem Tumorwachstum (rechte Flanke) durch die vitalen Zellen einerseits und Granulombildung (linke Flanke), hervorgerufen durch die Immuntherapie andererseits.

Für die durchflusszytometrischen Messungen erfolgte die Inokulation der vitalen Tumorzellen ( $10^5$  pro Ansatz) jeweils subcutan dorsal am Tag 0. Die Therapie in Form von  $10^5$  bestrahlten TS1G6-Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden (10 nmol/50  $\mu$ l PBS-Lösung) bzw. DPT-Impfstoffpräparaten (50  $\mu$ l pro Maus) hingegen wurde simultan beidseits subcutan inguinal verabreicht, um mehr drainierendes Lymphknotenmaterial für die FACS-Messungen zu erhalten.

Bewusst wurde es vermieden, den potentiell zytotoxisch wirkenden Impfstoff in den Tumor zu spritzen, um eine toxische Wirkung auf die Tumorzellen und somit eine Ergebnisverfälschung zu umgehen.

Die Applikation der bestrahlten Tumorzellen erfolgte in allen Vakzinierungsversuchen im 10-Tages Abstand, die Gabe der CpG-ODN und der Impfstoffpräparate wurde jeweils an Tag 4, 8 und 12 wiederholt. In den durchflusszytometrischen Messversuchen erfolgte die Wiederholung sämtlicher Therapiebausteine jeweils an Tag 4, 8 und 12. Die FACS-Analyse fand jeweils an Tag 14 statt.

#### 4.2.3 Dokumentation und Kontrolle des Tumorwachstums

Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich kontrolliert und Besonderheiten bzgl. des Gesundheitszustandes festgehalten. Zweimal wöchentlich wurde die Tumorgöße der Versuchstiere mittels einer Schieblehre bestimmt und dokumentiert. Aufgrund von Vorversuchen, welche gezeigt hatten, dass ab einer Tumorgöße von 1,2 cm im Durchmesser ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorlag, welches in der Regel nach weiteren 10 bis 14 Tagen letal endete, wurden die Tiere bei einer messbaren Tumorgöße von 1,2 cm durch CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich in der überwiegenden Zahl der Fälle bei diesen Tieren noch keine Verschlechterung des Allgemeinzustandes feststellen. Tiere, die kein nachweisbares Tumorwachstum zeigten, wurden über einen Zeitraum von mindestens 120 Tagen nach den oben genannten Maßgaben kontrolliert.

#### 4.2.4 Überblick über die durchflusszytometrischen Messungen

<u>Projektnummer</u>	<u>Verwendete Substanzen u. Spritzschema</u>
Proj. 80	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal
Proj. 81	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal
Proj. 82	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal DPT; bds. s.c. inguinal
Proj. 83	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal DPT; bds. s.c. inguinal
Proj. 84	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal CpG-ODN; bds. s.c. inguinal
Proj. 85	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal CpG-ODN; bds. s.c. inguinal
Proj. 86	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal CpG-ODN; bds. s.c. inguinal DPT; bds. S.c. inguinal
Proj. 87	vitale TS1G6-Zellen; s.c. dorsal bestr. TS1G6-Zellen; bds. s.c. inguinal CpG-ODN; bds. s.c. inguinal DPT; bds. s.c. inguinal

Tabelle 3: Überblick über die durchflusszytometrischen Messungen

#### 4.2.5 Gewinnung des Lymphknotenmaterials für die durchflusszytometrische Messung

14 Tage nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Applikation sakrifiziert. In jedem Versuchsansatz befanden sich lediglich 2 Tiere (vorgegeben durch die Aufsichtsbehörde für den Tierschutz des Landes Schleswig-Holstein), die beiden inguinalen Lymphknoten eines jeden Tieres wurden präpariert und in PBS-Lösung aufgenommen. Zwischen zwei Objektträgern wurde der Lymphknoten vorsichtig zerdrückt. Das auf dem Objektträger makroskopisch sichtbare Material enthielt Zellverbände, einzelne Zellen sowie Debris, welche in 5 ml PBS-Lösung aufgenommen wurden. Nach Durchführung von zwei Waschschritten über jeweils 5 min bei 1300 U (Varifuge 3 OR, IKendro Laboratory Products, Osterode) erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in PBS-Lösung (200 µl pro später durchzuführender FACS-Messung). Die Suspension wurde auf Falcon-Röhrchen verteilt, welche mit dem verwendeten Durchflusszytometer kompatibel waren (Falcon 2054 Polystyren-Reagenzgläser, Becton Dickinson, Heidelberg).

Nach Zugabe eines Fc-gamma-Blockers (1µl pro Falcon, Fc-gamma-II/III-Blocker Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32, Becton Dickinson, Heidelberg), welcher eine unspezifische Antikörperbindung verhindern sollte, wurden die Zellen bei Zimmertemperatur 15 min inkubiert. Im Anschluss an diesen ersten Inkubationsschritt erfolgte die Antikörper-Inkubation nach standardisierten Vorgaben des Herstellers, Becton Dickinson. In jedes Falcon-Röhrchen wurden 5 µl des entsprechenden Antikörpers gegeben, der nach vorschriftsmäßiger Durchmischung 20 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubierte.

Nach erneutem Waschen der Zellsuspension (5 min bei 1300 U) mit 3 ml PBS-Lösung pro Falcon wurde schließlich das Zellpellet eines jeden Röhrchens in 300 µl PBS-Lösung aufgenommen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte nach vorsichtigem Schütteln der Suspension jeweils im direkten Anschluss.

Jeder Ansatz einer Messreihe umfasste 2 Tiere, deren inguinale Lymphknoten beidseits für die durchflusszytometrischen Messungen gepoolt wurden. Es wurden 2 Messreihen durchgeführt, die Mittelwerte sind als Ergebniswerte dargestellt.

#### 4.2.6 Durchflusszytometrie

Die Methode der durchflusszytometrischen Messung ist seit ca. 30 Jahren bekannt und beruht im Wesentlichen auf der Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen einzelner Zellen oder Partikeln. Die folgende Abbildung stellt schematisch den Aufbau eines Durchflusszytometers dar.

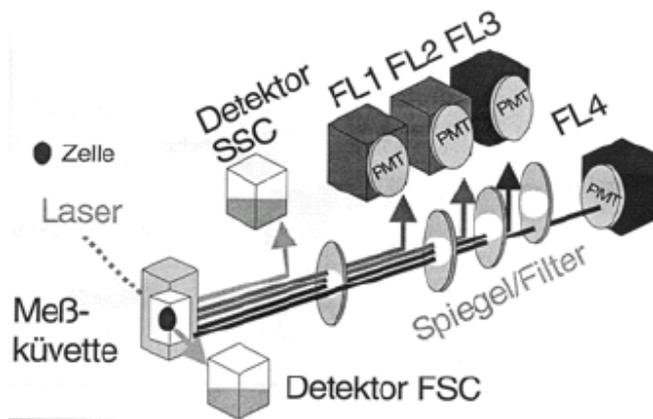


Abbildung 1: Aufbau eines Durchflusszytometers

Das Gerät besteht aus drei Einheiten: einem Flüssigkeitskreislauf, einem optischen System und einer Datenverarbeitungseinheit. Die zu untersuchenden Zellen müssen als Suspension vorliegen (Kleine et al. 1994; Melamed et al. 1990). Mit Hilfe optischer Messprinzipien ist es möglich, verschiedene morphologische und biochemische Parameter der Zellen zu ermitteln und auszuwerten.

In einem ersten Arbeitsschritt erfolgt die Beladung der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen, welche in Form von monoklonalen Antikörpern an bestimmte Oberflächenmoleküle der zu untersuchenden Zellen binden, so dass eine

Differenzierung einzelner Zelltypen möglich wird. Ein im Flüssigkeitssystem erzeugter Unterdruck aspiriert die Zellsuspension und eine umgebende Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) beschleunigt diese. Die enthaltenen Zellen werden nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung hintereinander angeordnet durch die Messküvette gesogen und dort von einem energiereichen Lichtstrahl getroffen.

Ein Argonlaser, welcher Licht der Wellenlänge 488 nm aussendet, bildet das Herzstück des optischen Messsystems. Das emittierte Licht liegt im Absorptionsbereich der bedeutendsten Fluoreszenzfarbstoffe. Beim Auftreffen des Lichtes auf die Zellen kommt es zu einem ungleichmäßigen Streueffekt. Die stärkste Streuung erfolgt in einem Winkel  $\leq 10$  Grad vom Einfallswinkel des Lichtes, so genanntes Vorwärtsstreulicht oder engl. forward light scatter (FSC). Das Ausmaß der Streuung korreliert direkt proportional mit der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht, engl. side scatter (SSC), welches im rechten Winkel zum einfallenden Licht abgelenkt wird, spiegelt das Ausmaß der intrazellulären Granularität wider.

Das Anregungsspektrum der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe liegt im Bereich der Wellenlänge des einfallenden Lichts und ist in etwa gleich dem Absorptionsspektrum. Das Licht des Argonlasers führt zu einer Anregung der Farbmoleküle, dabei werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Kehren die Elektronen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, senden sie Energie in Form von Licht aus. Diese Erscheinung bezeichnet man als Fluoreszenz. Das optische System des Durchflusszytometers registriert die Fluoreszenz und ermittelt daraus mit Hilfe einer Datenverarbeitungssoftware (Cell Quest, Becton Dickinson) die gebundene Farbstoffmenge auf der betreffenden Zelle.

Um mit einer Wellenlänge eine möglichst gleichmäßige und zeitgleiche Anregung zu erreichen, müssen die jeweiligen *Absorptionsmaxima* der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe möglichst ähnlich sein. Grundsätzlich anders verhält es sich mit den verschiedenen *Emissionsmaxima*, welche sich bezüglich ihrer Wellenlänge deutlich unterscheiden sollten, um eine exakte Auswertung der erhobenen Daten

zu erreichen. In den vorliegenden Messungen wurde die Zweifarben-Immunfluoreszenzanalyse verwendet. Das grünfluoreszierende Fluoreszeinisithiocynat (FITC) wurde gegen das rotfluoreszierende R-Phycoerythrin (PE) gemessen.

#### 4.2.6.1 Auswertung der durchflusszytometrischen Messung

Um bei der Auswertung der Daten ausschließlich untersuchungsrelevante Zellen zu ermitteln, machten wir Gebrauch von der „gating“-Funktion des Durchflusszytometers (Abb. 2). So wurde gewährleistet, dass ausschließlich untersuchungsrelevante Zellen in den Messungen berücksichtigt wurden. Der zu untersuchende Zellausschnitt wurde dabei jeweils so gewählt, dass lediglich Zellen, welche im Bereich 200-800 auf der forward-light-scatter (FSC) Achse lagen, berücksichtigt wurden. Auf diese Weise wurde verhindert, dass unspezifisch angefärbte Detrituspartikel oder Zellkonglomerate in die Messung mit einbezogen wurden. Dabei war eine exakte Unterscheidung von Dendriten und Lymphozyten jedoch nicht sicher möglich. Die Einstellungen für das Zellgate wurden im Laufe der Messung nicht mehr verändert. Die am Durchflusszytometer durchgeführten Messungen (mindestens 16.000 Zellen/Messung) ließen sich mit Hilfe der Software CellQuest (Becton Dickinson) darstellen und auswerten. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit Hilfe eines Argonlasers bei einer Wellenlänge von 488 nm.

Zwei unterschiedliche Darstellungsvarianten wurden benutzt: zum einen die „dot-plot“-Zweiparameterdarstellung (Abb. 3), zum anderen die Darstellung in Histogramm-Form (Einparameterdarstellung, Abb. 4). Die Einstellungen für Detektion und Verstärkung, welche neben der Möglichkeit, anhand des Messergebnisses für die Isotyp-Kontrolle eine Feineinstellung für die folgenden Messungen vornehmen zu können außerdem die Gefahr von Fehlmessungen birgt, wurden während der laufenden Messung nicht verändert.

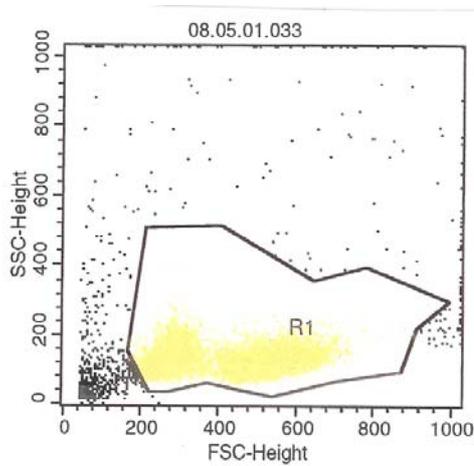


Abbildung 2: Lymphozytengatesetzung

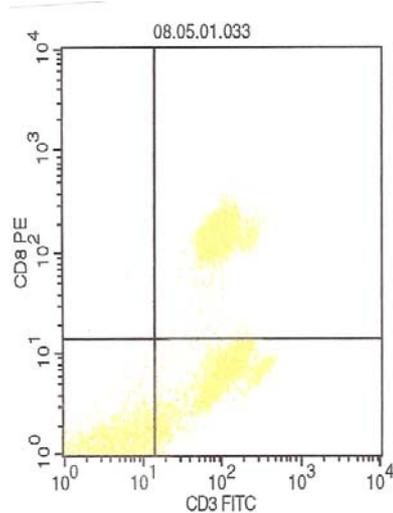


Abbildung 3: Dot-plot Darstellung

Um verlässliche Messergebnisse zu erhalten, mussten vor jeder Messreihe weitere Einstellungen am Zytometer vorgenommen werden. Um einer Verfälschung der Fluoreszenzmessungen vorzubeugen, musste die Autofluoreszenz der untersuchten Zellen mit Hilfe ungefärbter Negativproben ermittelt und das Zytometer so eingestellt werden, dass diese bei den Messungen unberücksichtigt blieb. Die Festlegung der Quadranten erfolgte nach Messung der Isotypenkontrolle (IgG<sub>1</sub>-FITC und IgG<sub>2a</sub>-PE, Abb. 5). Nach Einstellung der Quadranten lagen in der anschließenden Kontrollmessung mehr als 95% der Zellen im linken unteren Quadranten. Ebenso wie die Einstellungen für das Zellgate und die Detektion/Verstärkung wurde die Quadranten-Einstellung im Verlauf der Messung nicht verändert.

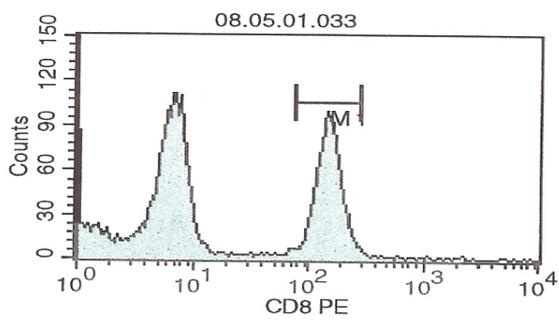
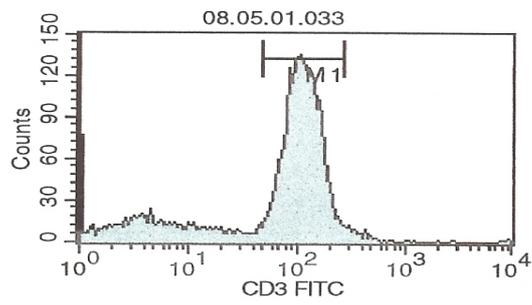


Abbildung 4: Histogrammdarstellung

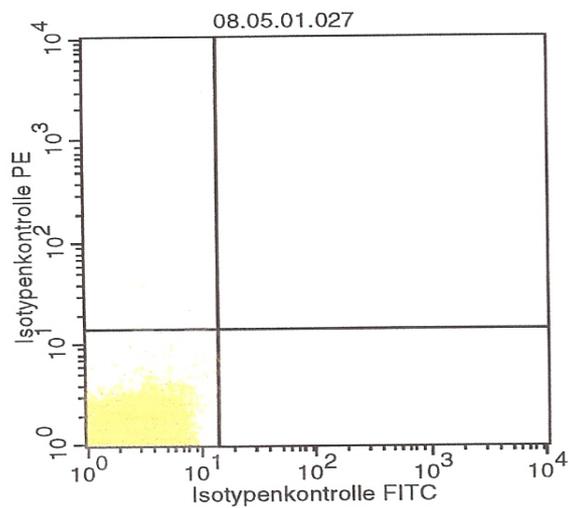


Abbildung 5: Dot-plot-Darstellung der Isotypkontrolle

## Ergebnisse

### 5.1 Beeinflussung des Tumorwachstums in der immunkompetenten Maus durch verschiedene Methoden der Immuntherapie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Immuntherapien auf die Wachstumsverläufe und Überlebenszeiten der mit  $10^5$  vitalen TS1G6-Tumorzellen inokulierten Mäuse beobachtet, in der Hoffnung, neue Wege der Therapie des ALCL aufzeigen zu können. Hierbei fanden sowohl unspezifische Arten der Immunstimulation, z.B. mittels CpG-Oligodesoxynucleotiden oder der Recall-Antigene der Impfstoffpräparate Diphtherie, Pertussis oder Tetanus, wie auch spezifische Stimulanzen, welche aus Zell-Lysaten des Tumors gewonnen wurden (Ganzzell-Vakzinierung) Anwendung.

#### 5.1.1 Wachstumsverlauf in der Tumor-Maus (Proj. TW80)

Die subcutane Injektion von  $10^5$  vitalen TS1G6-Tumorzellen in die rechte Flanke bewirkte bei allen untherapierten syngenen C57Bl/6 Mäusen ein messbares Tumorwachstum. Aus technischen Gründen konnten Tumoren kleiner als 0,2 cm nicht nachgewiesen werden. Bei einer Tumorlast von  $10^5$  Zellen zeigte sich durchschnittlich nach knapp 17 Tagen ein zu messendes Tumorwachstum. Nach 22 Tagen wies der Primärtumor eine Größe von 0,5 cm, nach 28 Tagen von 0,7, nach 35 Tagen von 1,0 cm und nach durchschnittlich 42 Tagen von 1,5 cm auf (Abb. 6).

Vorversuche innerhalb unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass der Metastasierungsprozess nach 3-4 Wochen mit Infiltration der ipsi- und kontralateralen inguinalen und axillären Lymphknoten einsetzt. Nach 4-5 Wochen führt die weitere Metastasierung auf hämatogenem und lymphogenem Wege zur Infiltration der inneren Organe wie Leber, Milz, Pankreas, Lungen, Nieren, weiterer Lymphknoten und des Thymus. Auch klinisch zeigten die Versuchsmäuse

Anzeichen einer progredienten malignen Erkrankung wie Kachexie und Aszitesbildung.

Aus ethischen Gründen wurden Mäuse mit einer Tumorgöße von 1,2 cm getötet, da der Allgemeinzustand der Mäuse in diesem Stadium noch nicht beeinträchtigt, das Tumorstadium jedoch offensichtlich nicht mehr aufzuhalten war.

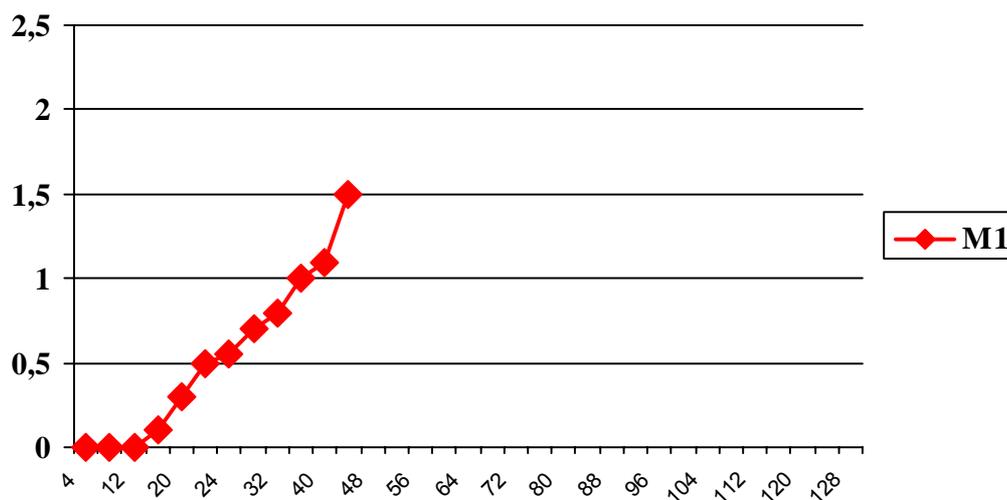


Abbildung 6: Tumorstadiumsverlauf nach Applikation von  $10^5$  vitalen Tumorzellen (x-Achse: Zeitverlauf in Tagen; y-Achse: Tumorstadium in cm; n=6)

### 5.1.2 Tumorstadiumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen und bestrahlter Tumorzellen (Proj. TW81)

In diesem Ansatz wurden  $10^5$  vitale Tumorzellen in die rechte Flanke s.c. injiziert, die simultane Immunisierung mit  $10^5$  bestrahlten Tumorzellen erfolgte kontralateral links und wurde im 10-Tages-Abstand wiederholt. Die Ergebnisse (Abb. 7) zeigten, dass 2 von 6 Mäusen gänzlich tumorfrei blieben. Eine dritte Maus zeigte ein im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verzögertes Tumorstadium. Der Wachstumsbeginn war hier am 35. Tag stark verzögert und der weitere Wachstumsverlauf wies vorübergehend eine komplette Remission zwischen dem 45. und 54. Tag auf.

Somit blieben 33% der Versuchstiere dieses Ansatzes tumorfrei und weitere 16% zeigten ein deutlich verlangsamtes Tumorwachstum.

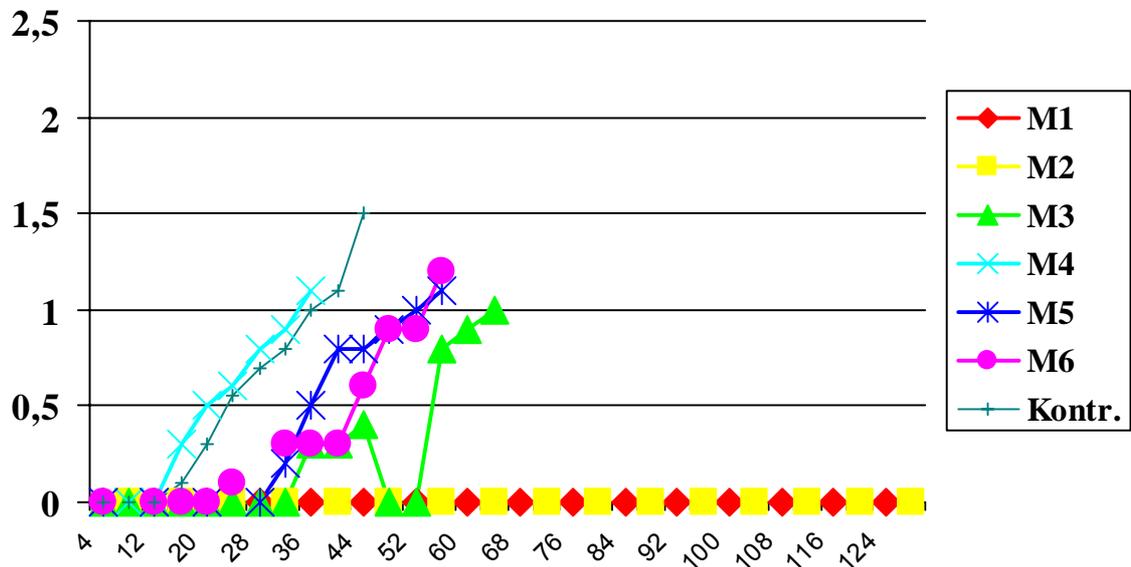


Abbildung 7: Tumorwachstumsverlauf nach simultaner Verabfolgung von  $10^5$  vitalen Tumorzellen und Simultangabe von bestr. TS1G6-Zellen (x-Achse: Zeitverlauf in Tagen; y-Achse: TumorgroÙe in cm; n=6)

### 5.1.3 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen, bestrahlter Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanus- Impfstoffen (Proj. TW83)

Simultan wurden  $10^5$  vitale Tumorzellen in Kombination mit  $10^5$  bestrahlten Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis- bzw. Tetanus-Impfstoff injiziert. Die vitalen Zellen wurden dabei s.c. in die rechte und die Therapie in die linke Flanke injiziert. Die Wiederholungsapplikation der bestrahlten Tumorzellen fand alle 10 Tage statt, der Impfstoff wurde an den Tagen 4, 8 und 12 wiederholt. 2 der 5 Mäuse dieses Ansatzes blieben während des Beobachtungszeitraumes tumorfrei. 1 Maus zeigte messbares Tumorwachstum am 66. Tag und 2 Mäuse am 21. bzw. 28. Tag. 60% der Mäuse dieser Gruppe profitierten somit deutlich von der verabreichten Therapie, die restlichen 40% zeigten einen weniger stark ausgeprägten Nutzen,

aber immer noch eine deutlich messbare Wachstumsverzögerung im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

#### 5.1.4 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen und CpG- Oligodesoxynucleotiden (Proj. TW84)

Simultan wurden  $10^5$  vitale Tumorzellen in Kombination mit CpG-Oligodesoxynucleotiden subcutan in die rechte Flanke appliziert. Die lokale Nähe des Tumors zur verabreichten Therapie war beabsichtigt. CpG-Oligodesoxynucleotide erzielen ihre maximal stimulatorische Wirkung, wenn sie möglichst nah am Wirkort injiziert werden (Lonsdorf et al. 2003) und sind im Gegensatz zum DPT-Impfstoff nicht zytotoxisch. Die Gabe des Oligonucleotids wurde an den Tagen 4, 8 und 12 wiederholt.

Dieses Schema schützte 1 von 9 Mäusen gänzlich vor der Tumorentstehung. Bei 2 weiteren Mäusen zeigte sich mit messbarem Primärtumor am 43. bzw. 68. Tag eine deutliche Wachstumsverzögerung. 3 Mäuse zeigten einen verspäteten Wachstumsbeginn (26. bzw. 37. Tag). Lediglich 3 Versuchsmäuse zeigten einen Wachstumsverlauf, welcher weitgehend der Kontrollgruppe entsprach. Somit profitierten 66,6% der Tiere dieses Ansatzes von dem gewählten Therapieschema und nur 33,3% ließen keinen Nutzen aus der Therapie erkennen (Abb. 8)

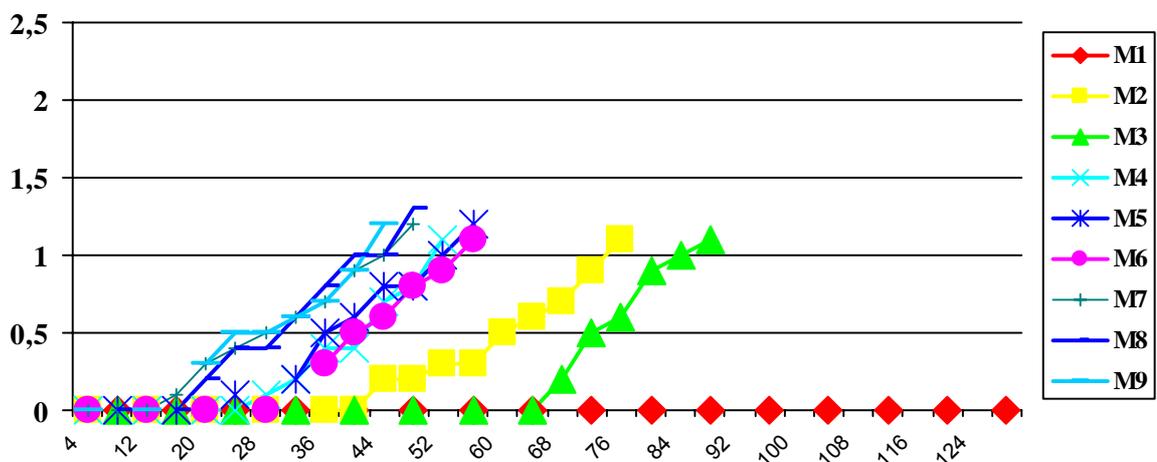


Abbildung 8: Tumorwachstumsverlauf nach simultaner Verabfolgung von  $10^5$  vitalen Tumorzellen und CpG-Oligodesoxynucleotiden (x-Achse: Zeitverlauf in Tagen; y-Achse: Tumorgröße in cm; n=9)

5.1.5 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen, CpG- Oligodesoxynucleotiden und bestrahlter Tumorzellen (Proj. TW85)

10<sup>5</sup> vitale Tumorzellen wurden zusammen mit CpG-Oligodesoxynucleotiden subcutan rechts injiziert. Zeitgleich fand die Ganzzell-Vakzinierung mittels 10<sup>5</sup> bestrahlten TS1G6-Zellen ebenfalls s.c. in die kontralaterale linke Flanke statt, um eine bessere systemische Wirkung zu erzielen. Die Applikation der bestrahlten Zellen wurde alle 10 Tage durchgeführt, die Gabe der Oligodesoxynucleotide wurde an den Tagen 4, 8 und 12 wiederholt. Die Auswertung dieses Projektes (vgl. Abb. 9) zeigte einen Schutz vor Tumorwachstum innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei 3 der 9 Versuchsmäuse. 3 weitere Tiere entwickelten stark verzögert Tumoren (47., 69. bzw. 86. Tag) und ließen auch im Anschluss ein verlangsamtes Wachstum des Primärtumors erkennen. Die 3 restlichen Tiere dieser Gruppe zeigten ebenfalls ein verzögertes Tumorwachstum (36., 34., 19. Tag)

In diesem Ansatz profitierten 100% der Versuchstiere von der verwendeten Therapie. 33% konnten ein Tumorwachstum innerhalb des Beobachtungszeitraumes erfolgreich abwehren, 33% zeigten ein stark verzögertes und 33% ein verzögertes Tumorwachstum.

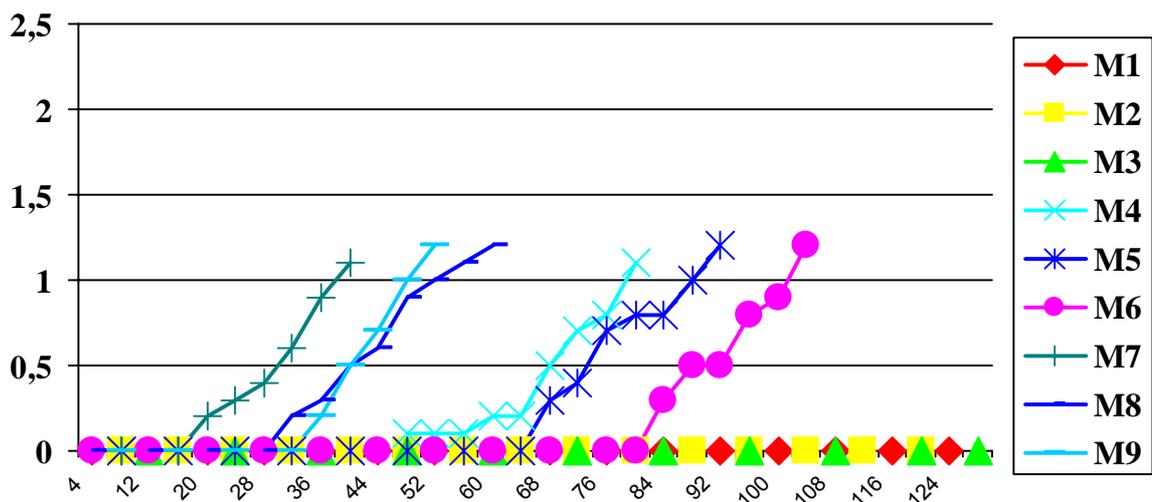


Abbildung 9: Tumorwachstumsverlauf nach simultaner Verabfolgung vitaler Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden und bestr. TS1G6-Zellen (x-Achse: Zeit/Tage; y-Achse: Tumorgröße in cm; n=9)

5.1.6 Tumorwachstumsverlauf bei simultaner Applikation vitaler Tumorzellen, bestrahlter Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden und Diphtherie, Pertussis, Tetanus-Impfstoffen (Proj. TW87)

$10^5$  vitale Tumorzellen wurden in Kombination mit CpG-Oligodesoxynucleotiden s.c. in die rechte Flanke injiziert, die Therapie in Form von bestrahlten Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanus-Impfstoffkombination wurde s.c. in die linke Flanke gespritzt. Die Applikation der CpG-Oligodesoxynucleotide und des DPT Impfstoffes wurde an den Tagen 4, 8 und 12, die der bestrahlten Tumorzellen im 10-Tages- Abstand wiederholt.

In diesem Ansatz blieben 3 von 6 Mäusen im Beobachtungszeitraum tumorfrei. 2 Mäuse zeigten Tumorwachstum am 21. und 1 Maus am 29. Tag. 50% der Versuchstiere profitierten somit deutlich von dem gewählten Therapieschema, während die übrigen 50% lediglich eine geringe Tumorwachstumsverzögerung zeigten.

## 5.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

### 5.2.1 Allgemeines

Um die Auswirkungen der verabreichten Therapie auf das Immunsystem der Versuchstiere zu beurteilen, verwendete unsere Arbeitsgruppe die Methode der Durchflusszytometrie. Mit Hilfe dieses analytischen Verfahrens lassen sich die relativen Konzentrationen verschiedener Antigene auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma von Zellen bestimmen. Auf diese Weise ist es möglich, auf die anteilige Zusammensetzung einer Zellpopulation im untersuchten Gewebe zurück zu schliessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufbereitetes Material der inguinalen Lymphknoten der Versuchsmäuse untersucht und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellzahl des jeweiligen Lymphknotens ermittelt. Im Verlauf der Messungen wurde deutlich, dass die Dendritischen Zellen des Lymphsystems (CD 86+) keine

so einheitliche Population bilden, dass sie unter Zuhilfenahme des scatter-gates eindeutig von der Lymphozytenpopulation zu trennen wären. Aus praktischen Gründen wurde die Summe aus T-(CD3+), B-(CD19+) und NK-(CD16/32+) Zellen, welche innerhalb des Lymphozytengates idealerweise 100% beträgt, mit 95,8% gleichgesetzt.

## 5.2.2 Relatives Leukozytenverhältnis im murinen LK

### 5.2.2.1 LK der unbehandelten Maus

Das Untersuchungsmaterial wurde jeweils aus den inguinalen Lymphknoten der beiden Versuchsmäuse eines jeden Projektes gewonnen. In jedem Ansatz wurden 16.000 Zellen gemessen und anhand der spezifischen Oberflächenmerkmale als B-Zellen, T-Zellen oder DC erkannt, wobei die Software CellQuest Verwendung fand. Abbildung 10 stellt das relative Verhältnis der leukozytären Zellen im Lymphknoten einer unbehandelten Maus (Kontrollmaus) dar.

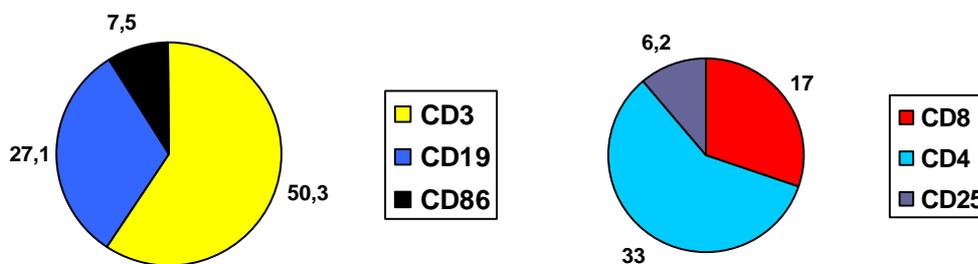


Abbildung 10: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in % im LK der unbehandelten Maus (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

Der Anteil der CD4+ T-Helferzellen ist demnach, wie beim Menschen auch, etwa doppelt so hoch wie der CD8+ Anteil der zytotoxischen T-Zellen. Die Positivität für CD25, einen Oberflächenmarker, welcher insbesondere bei aktivierten

Lymphozyten und Makrophagen, in geringerem Maße auch bei im Ruhezustand befindlichen Zellen nachweisbar ist, zeigt, dass nur ca. 6% der T-Zellen im aktivierten Zustand vorliegen.

#### 5.2.2.2 Veränderungen des Leukozytenverhältnisses nach alleiniger Tumorgabe (Projekt 80)

Nach Injektion von  $10^5$  vitalen TS1G6-Tumorzellen in den Rücken der Maus wurden die beiden inguinalen LK der Maus reseziert und gepoolt an Tag 14 durchflusszytometrisch untersucht. Es ließen sich eindrucksvoll die Veränderungen im zellulären Immunsystem der Maus nachweisen.

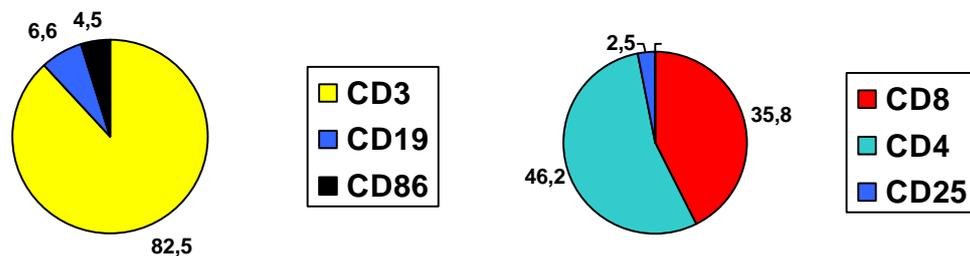


Abbildung 11: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in % nach Tumoringektion (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

Die alleinige Tumorgabe bewirkt eine starke relative Zunahme der T-Zellpopulation auf 82,5%, wohingegen der Anteil der B-Zellen auf 6,6% supprimiert wird. Die CD86+ Dendritischen Zellen zeigen einen leichten Abfall auf 4,5%. Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen (im Folgenden als „Index“ bezeichnet) ist von 1,9 in der Kontrollgruppe auf 1,3 nach Tumorgabe vermindert worden, was vor allem durch

die starke relative Zunahme der CD8+ Zellen erreicht wird. Im Hinblick auf die CD25+ aktivierten T-Zellen wird deutlich, dass die Inokulation der Maus mit Tumorzellen eine supprimierende Wirkung auf die Aktivität der T-Zellen ausübt. Der Anteil der CD25+ Zellen sinkt von 6% in der Kontrolle auf 2,5% in der Tumormaus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die alleinige Tumorgabe das relative Verhältnis der murinen Lymphozyten stark verändert wird.

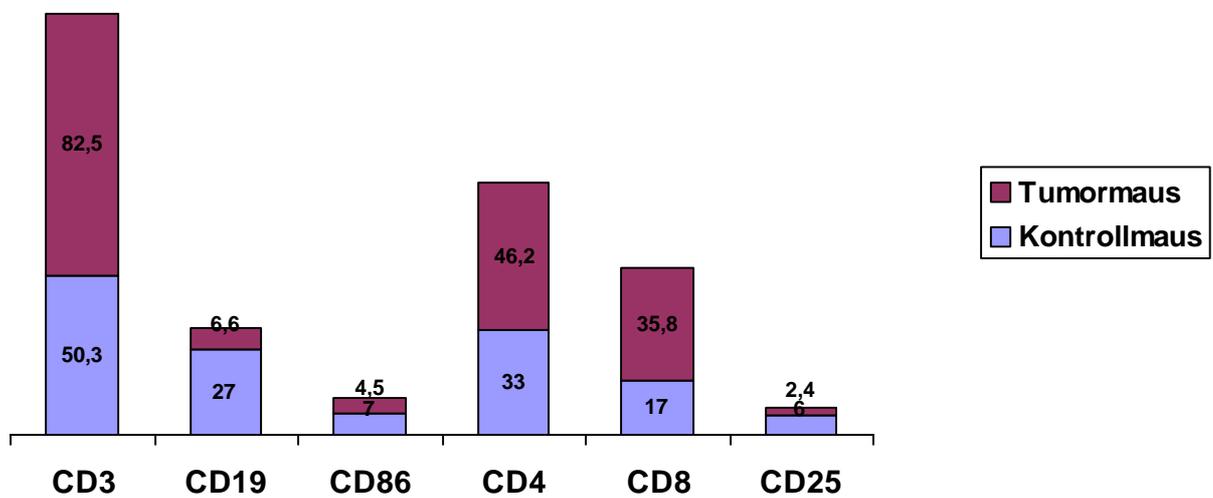


Abbildung 12: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen in % von Kontrollmaus (n=4) und Tumormaus (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

### 5.2.2.3 Veränderungen des Leukozytenverhältnisses nach Tumorgabe in Kombination mit bestrahlten Tumorzellen (Projekt 81)

In diesem Therapieansatz wurden die vitalen TS1G6-Tumorzellen wiederum in den Rücken, die Therapie in Form von bestrahlten Tumorzellen beidseits s.c. in die Inguinalregion gespritzt. Das Diagramm zeigt die Veränderungen der leukozytären Zellen innerhalb des untersuchten LK-Gewebes.

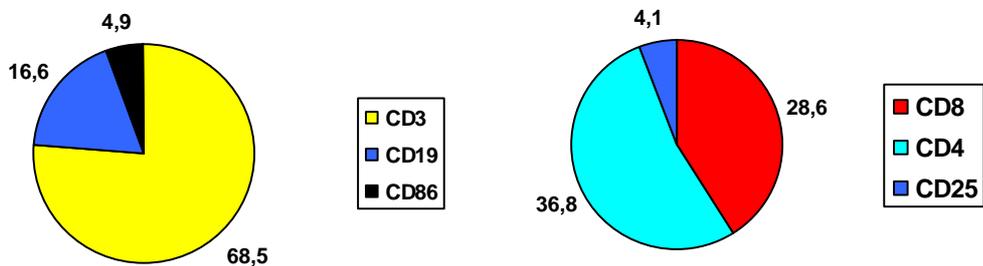


Abbildung 13: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in % nach Tumorgabe und Therapie mit bestr. TS1G6-Zellen (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

Im Vergleich mit der Kontrolle fällt wiederum der starke Anstieg der CD3+ T-Zellen auf (68,5%). Die CD19+ B-Zellen sind ähnlich, wenngleich nicht ganz so deutlich wie in Projekt 80 durch die Therapie supprimiert worden (16,6%). Der Index liegt bei 1,3 und die Zahl der aktivierten T-Zellen bei 4,1%.

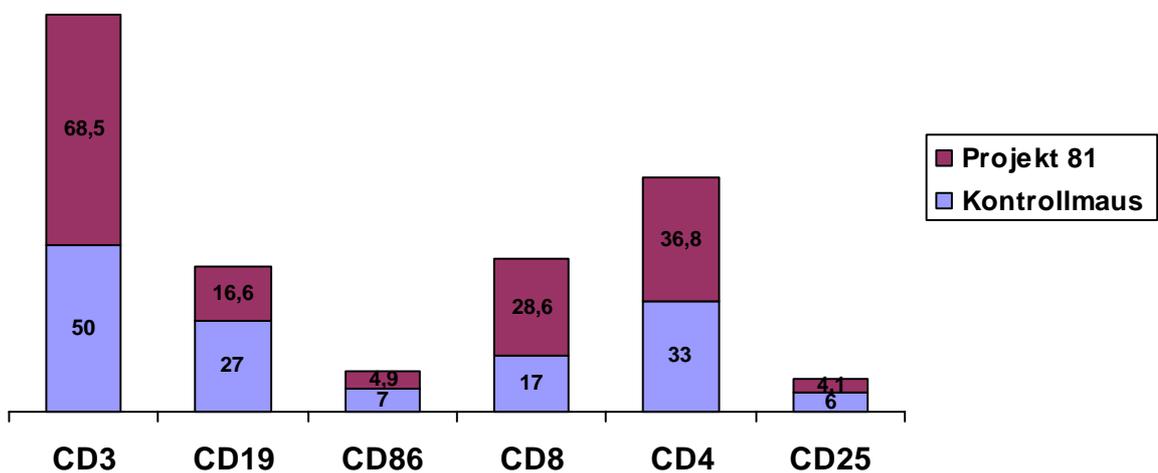


Abbildung 14: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen in % von Kontrollmaus (n=4) und Projekt 81 (Tumorgabe mit bestr. TS1G6-Zellen) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

#### 5.2.2.4 Veränderungen der relativen Leukozytenzahlen nach Tumorgabe und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Projekt 82)

In Übereinstimmung mit den anderen Therapieansätzen wurden  $10^5$  vitale Tumorzellen in den Rücken der Versuchsm Maus und die Therapie in Form von DPT beidseits inguinal s.c. inokuliert. Abweichend von den vorangegangenen Ansätzen kam es in diesem Ansatz zu einer relativen Supprimierung der T-Zellen auf 38,3%, welche somit deutlich unterhalb des Niveaus der Kontrolle lagen. Auch der Anteil der B-Zellen lag mit 16,0% unterhalb der Kontrolle. Der Index wurde mit 1,2 berechnet und die aktivierten T-Zellen machten lediglich 2,6% aus. Auffällig war die starke Zunahme der DC auf 18,2%, dem höchsten gemessenen Wert für diese Zellpopulation.

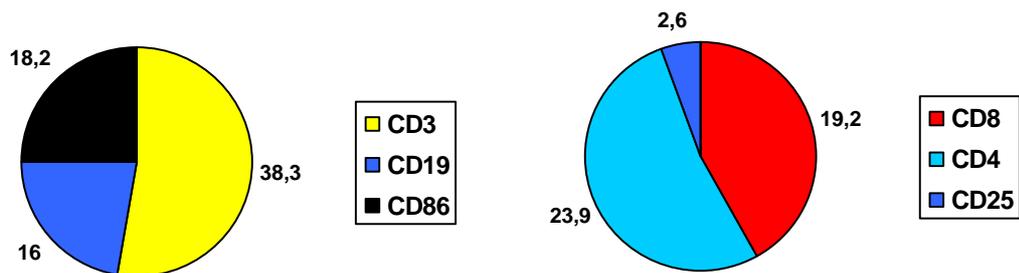


Abbildung 15: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in % nach Tumorgabe und Therapie mit Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusimpfstoff (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

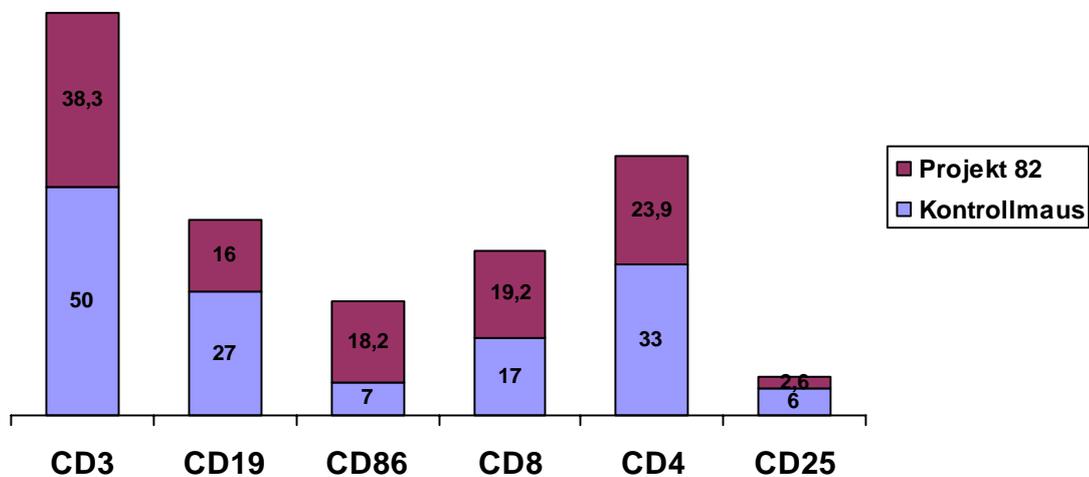


Abbildung 16: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen in % von Kontrollmaus (n=4) und Projekt 82 (Tumorgabe plus Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusimpfstoff) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

#### 5.2.2.5 Auswirkungen auf die relativen Leukozytenzahlen nach Tumorgabe, bestrahlten Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Projekt 83)

Die kombinierte Therapie aus bestrahlten Tumorzellen und DPT nach Tumordinokulation zeigte vor allem deutliche Veränderungen hinsichtlich der CD19+ B-Zellen. Diese stiegen relativ auf 39,8%, den höchsten gemessenen Wert innerhalb der Messreihe. Der T-Zell-Anteil lag mit 33,4% unterhalb des Kontrollgruppen-Wertes und der Index mit 1,5 höher als in den vorangegangenen Ansätzen, jedoch deutlich niedriger als der Vergleichswert der Kontrolle. Der DC-Anteil lag mit 7,0% auf dem Niveau der Kontrollgruppe und die relative Anzahl der aktivierten T-Zellen mit 4,3% unter der Kontrollgruppe. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Werte, mit Ausnahme der B-Zellen, deutlich unterhalb der Vergleichswerte der Kontrollgruppe lagen.

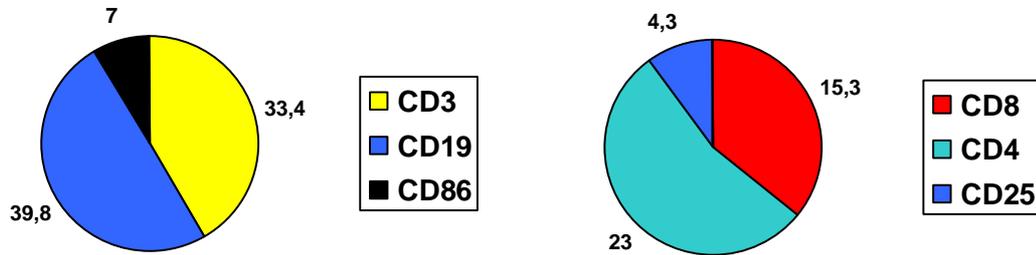


Abbildung 17: Relatives Verhältnis der leukozytären Zellen in % nach Tumorgabe und Therapie mit bestr. TS1G6-Zellen und Diphterie-, Pertussis-, Tetanusimpfstoff (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

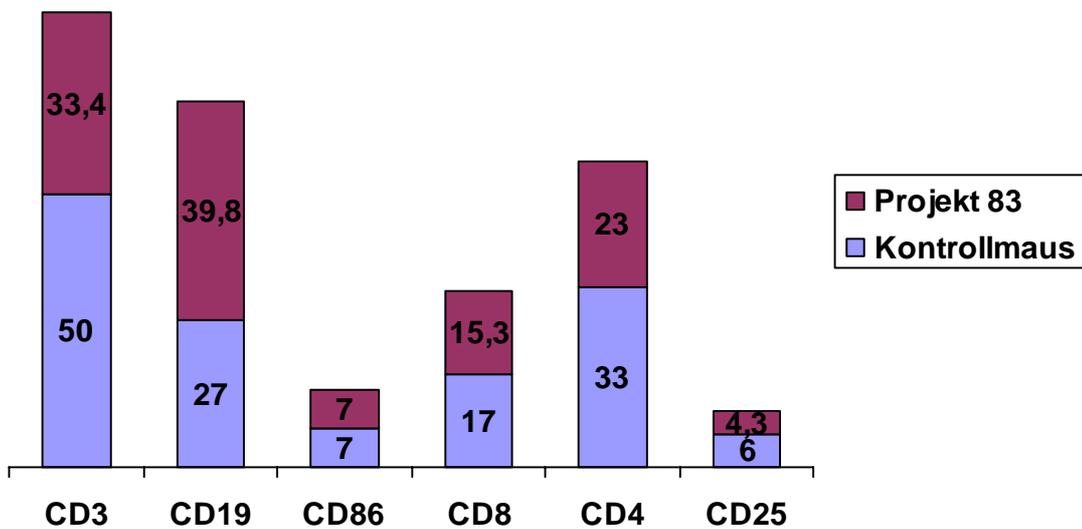


Abbildung 18: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen in % von Kontrollmaus (n=4) und Projekt 83 (Tumorgabe mit bestr. TS1G6-Zellen und Diphterie-, Pertussis-, Tetanusimpfstoff) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

Die nachstehende Abbildung (Abb. 19) zeigt vergleichend den prozentualen B-Zell- und T-Zell-Anteil der Projekte 80 bis 83 und der Kontrollgruppe:

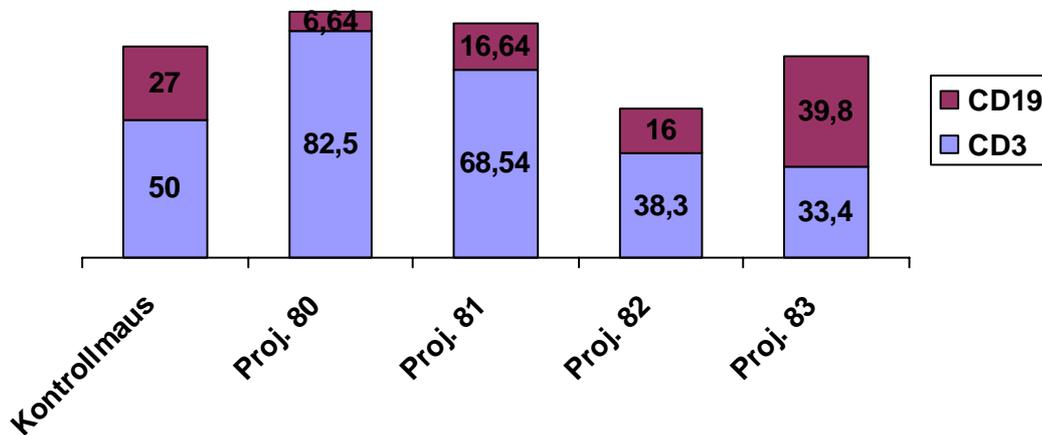


Abbildung 19: Vergleich des prozentualen B-Zell- und T-Zell-Anteils der Projekte 80 bis 83 und der Kontrollgruppe (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

Legende zu Abb. 19: Kontrollmaus (unbehandelt);  
 Proj. 80 vitale TS1G6-Zellen  
 Proj. 81 vitale TS1G6-Zellen mit bestr. TS1G6-Zellen  
 Proj. 82 vitale TS1G6-Zellen mit DPT  
 Proj. 83 vitale TS1G6-Zellen mit bestr. TS1G6 und DPT

#### 5.2.2.6 Vergleich der Leukozytenzahlen nach Tumorinokulation mit $10^5$ vitalen TS1G6-Zellen und Therapie mit CpG-Oligodesoxynucleotiden (Projekt 84) bzw. CpG und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Projekt 86)

Die Tumorgabe erfolgte in diesen Ansätzen wiederum in den Rücken, die Therapie s.c. in die rechte und linke Inguinalregion der Maus. Die Ergebnisse des Therapieansatzes mit CpG-Oligodesoxynucleotiden einerseits und des Kombinationsansatzes aus CpG und DPT andererseits sind sehr ähnlich, weichen jedoch von den Ergebnissen des Projektes 82 (Therapie mit DPT allein) deutlich ab.

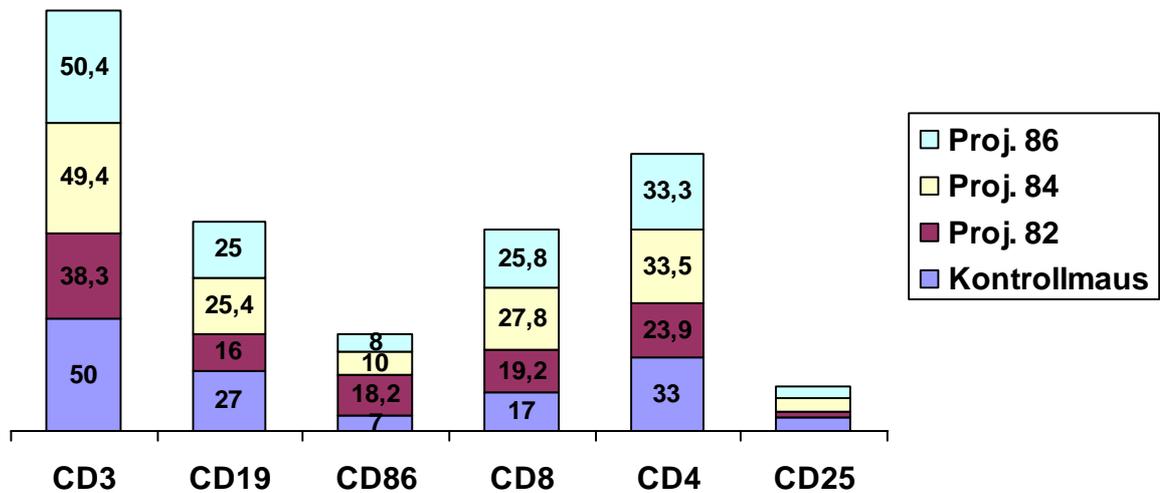


Abbildung 20: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen der Kontrollmaus (n=4) mit den Projekten 84 (Tumorgabe und CpG-Oligodesoxynucleotiden), 86 (Tumorgabe, CpG-Oligodesoxynucleotide plus DPT) bzw. Projekt 82 (Tumorgabe plus DPT) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

Der Vergleich der Projekte 84 und 86 lässt erkennen, dass die Auswirkungen der CpG-Therapie auf das Immunsystem durch die zusätzliche Gabe von DPT praktisch nicht beeinflusst werden. Lediglich die Werte der DC und der aktivierten T-Zellen werden durch das zusätzlich verabreichte DPT leicht nach unten korrigiert. Auch beim Vergleich der beiden Projekte mit der Kontrollgruppe treten kaum Unterschiede zu Tage. Allein der Wert der zytotoxischen T-Zellen liegt mit 27,8% in Projekt 84 bzw. 25,8% in Projekt 86 deutlich über den Werten der Kontrollgruppe mit 17,0%.

#### 5.2.2.7 Vergleich der Leukozytenzahlen nach Tumoringokulation und therapeutischer Gabe bestrahlter Tumorzellen in Kombination mit CpG-Oligodesoxynucleotiden (Projekt 85)

Sowohl die Inokulation der Mäuse mit den Tumorzellen als auch die Verabreichung der Therapie erfolgte nach dem vorgestellten Spritzschema.

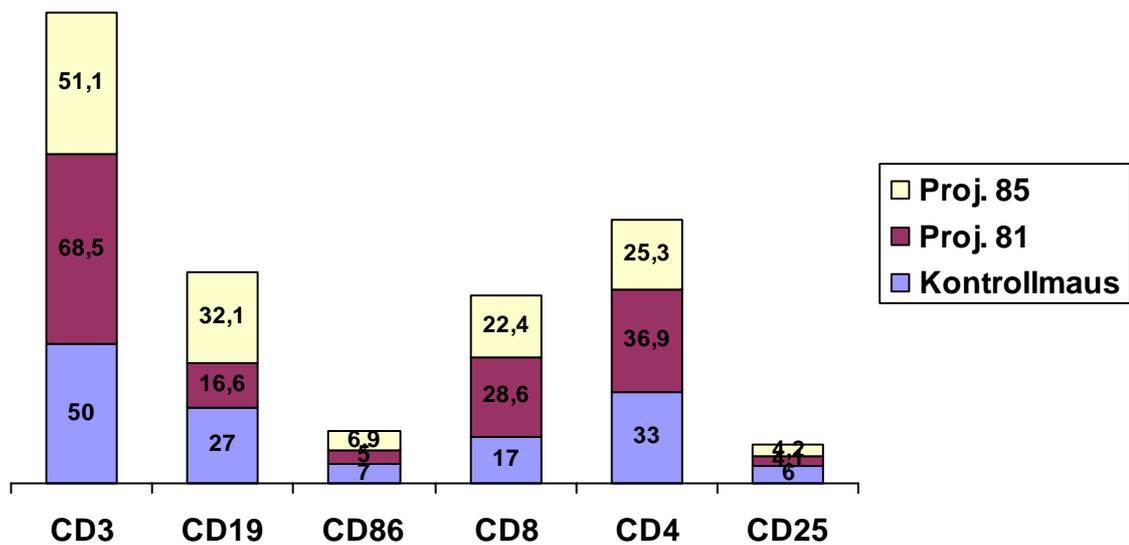


Abbildung 21: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen in % der Kontrollmaus (n=4) mit den Projekten 81 (Tumorgabe und bestr. TS1G6-Zellen) und 85 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen und CpG-Oligodesoxynucleotide) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

Die Daten suggerieren, dass die durch die bestrahlten Zellen in Projekt 81 sichtbar werdenden Veränderungen im Immunsystem der Maus durch die zusätzliche Gabe von CpG-Oligodesoxynucleotiden in Projekt 85 teilweise nivelliert werden. Besonders der durch die bestrahlten TS1G6-Zellen verursachte Anstieg der T-Zellen und Abfall der B-Zellen wird durch die zusätzliche CpG-Gabe in Projekt 85 teilkompensiert, so dass die Werte mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar sind. Der Index weicht allerdings mit 1,1 signifikant vom Vergleichswert der Kontrollgruppe (1,94) ab. Diese Veränderung in Projekt 85 wird durch einen relativen Abfall der CD4+ Helferzellen und einen relativen Anstieg der CD8+ zytotoxischen T-Zellen verursacht.

5.2.2.8 Vergleich der Leukozytenzahlen nach Tumorinokulation und Kombinationstherapie mittels bestrahlter Tumorzellen, CpG-Oligodesoxynucleotiden und Diphterie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj. 87)

Auffällige Veränderungen werden durch diesen Therapieansatz vor allem innerhalb der CD19+ B-Zellpopulation erzielt. Ähnlich wie in Projekt 83 scheint die kombinierte Gabe bestrahlter TS1G6-Zellen mit DPT einen starken B-Zell-Anstieg zu bewirken. Darüber hinaus liegt der Index mit 1,2 (wie in allen Therapie-Projekten) deutlich unterhalb des Index der Kontrollgruppe. Das Verhältnis der beiden Subpopulationen des T-Zell-Systems wird also stets deutlich zugunsten der Zytotoxischen verschoben.

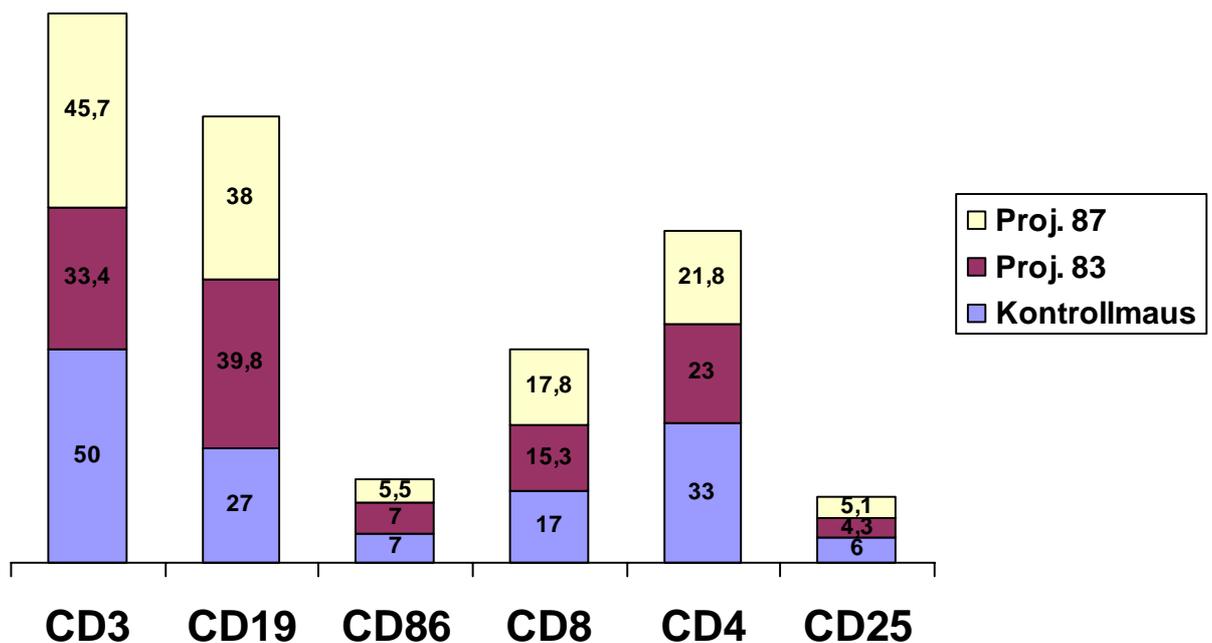


Abbildung 22: Vergleich der relativen Leukozytenzahlen in % der Kontrollmaus (n=4) mit den Projekten 83 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen und DPT) und 87 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen, DPT und CpG-Oligodesoxynucleotide) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

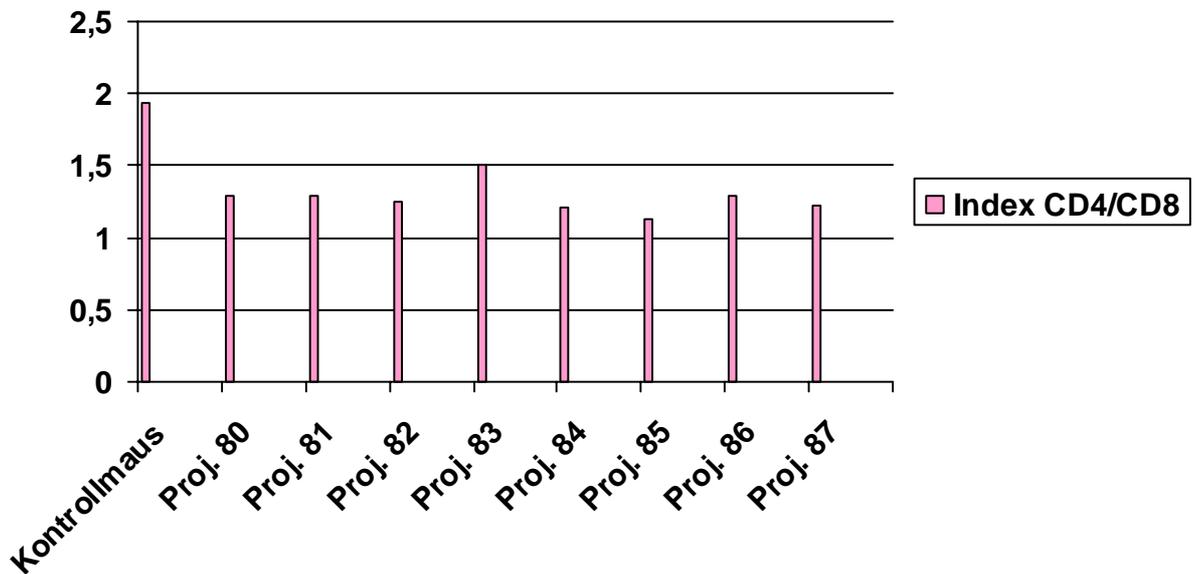


Abbildung 23: Vergleich der Indizes (CD4+ Zellen/CD8+ Zellen) innerhalb der gesamten Messreihe (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

### 5.2.3 Absolutes Leukozytenverhältnis im murinen LK

Die Ermittlung der absoluten Leukozytenzahlen der beiden gepoolten inguinalen Lymphknoten eines jeden Versuchsansatzes erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und mit den in der Durchflusszytometrie bestimmten relativen Anteilen der einzelnen Leukozytenpopulationen. Anhand dieser Werte ließ sich für jede Leukozytenpopulation die absolute Zellzahl errechnen.

#### 5.2.3.1 Kontrollgruppe

Die Summe aus CD3+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen und CD86+ DC (im Folgenden bezeichnet als „Gesamtzellzahl“) ergibt in der Kontrollmaus 1,68 Millionen Zellen. Hierbei bilden die T-Zellen mit 1,0 Mio. Zellen die größte, die B-Zellen mit 0,54 Mio. Zellen die zweitgrößte und die DC mit 0,14 Mio. Zellen die drittgrößte Population. Die Zahl der CD25+ aktivierten T-Zellen errechnete sich mit 0,12 Mio. Zellen.

Der Index berechnet sich wie folgt:

$$\text{CD4+ Zellen} / \text{CD8+ Zellen} = 0,66 \text{ Mio.} / 0,34 \text{ Mio.} = 1,94$$

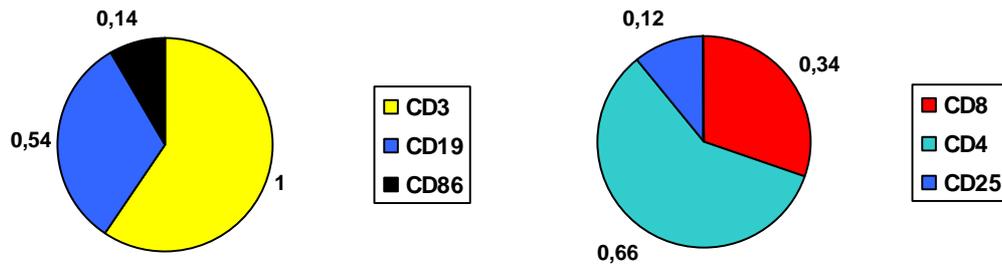


Abbildung 24: Absolute Zahlen (in Mio. Zellen) der Leukozyten in der Kontrollmaus (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

### 5.2.3.2 Tumormaus (Proj. 80)

Die Injektion von  $10^5$  vitalen Tumorzellen s.c. in den Rücken der Versuchsmaus führte zu einer sichtbaren Zunahme der Gesamtzellzahl im LK auf 2,24 Mio. Zellen. Die Zahl der CD3+ T-Zellen stieg dabei auf 1,97 Mio. Zellen, die der CD19+ B-Zellen fiel hingegen auf 0,16 Mio. Zellen und die CD86+ DC blieben mit 0,11 Mio. annähernd konstant. Ebenfalls rückläufig war der Wert für die aktivierten T-Zellen (0,06 Mio.) Der Index ermittelt sich wie folgt:

$$\text{CD4+ Zellen} / \text{CD8+ Zellen} = 1,1 \text{ Mio.} / 0,86 \text{ Mio.} = 1,28$$

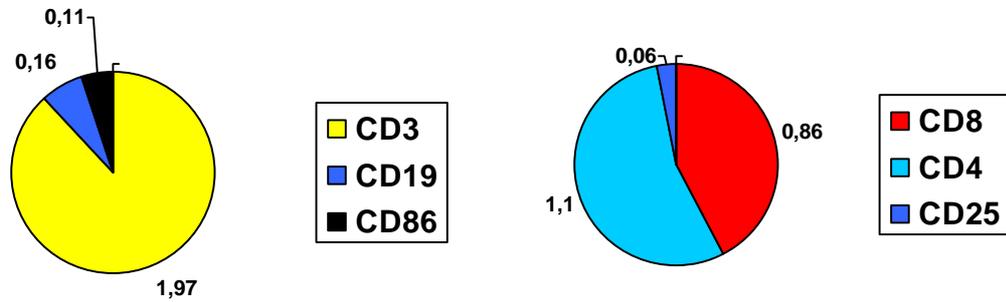


Abbildung 25: Absolute Zahlen (in Mio. Zellen) der Leukozyten in Proj. 80 (Tumorgabe) (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

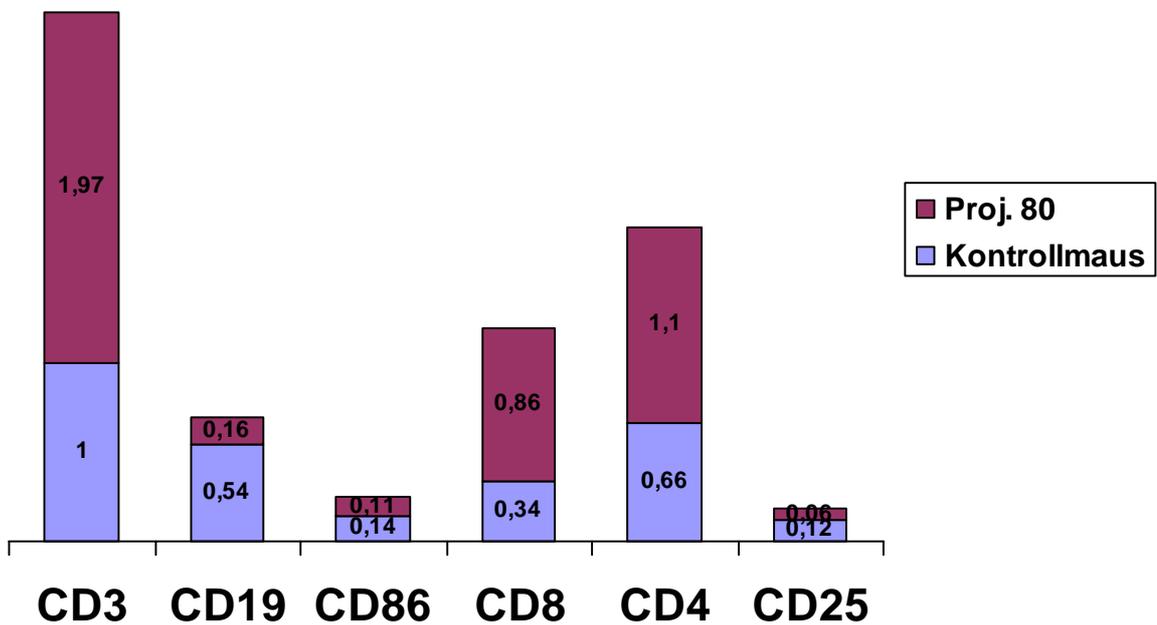


Abbildung 26: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen (in Mio. Zellen) zwischen Kontrollmaus (n=4) und Tumormaus (Proj. 80) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

### 5.2.3.3 Tumorgabe und bestrahlte Tumorzellen (Proj. 81)

Die zusätzliche Gabe bestrahlter Tumorzellen bewirkte einen fulminanten Anstieg der Zellzahl innerhalb des LK. Die Gesamtzellzahl überstieg mit 10,46 Mio. Zellen den Wert der Kontrollgruppe um annähernd das 10-fache. Die T-Zellzahl zeigte im Vergleich mit der Kontrolle einen nahezu 8-fachen Anstieg auf 7,95 Mio. Zellen. Die B-Zellen stiegen von 0,54 Mio. in der Kontrollgruppe auf 1,93 Mio. Zellen in der Therapiegruppe. Einen ähnlichen Anstieg verzeichneten die DC, welche mit 0,58 Mio. Zellen berechnet wurden. Aber nicht nur die absolute Zahl der Immunzellen veränderte sich durch die Gabe der spezifisch wirksamen Therapie, auch die Anzahl aktivierter T-Zellen stieg deutlich von 0,12 Mio. auf 0,48 Mio. Zellen. Der Index verschob sich zugunsten der zytotoxischen Zellen und erreichte einen Wert von 1,29.

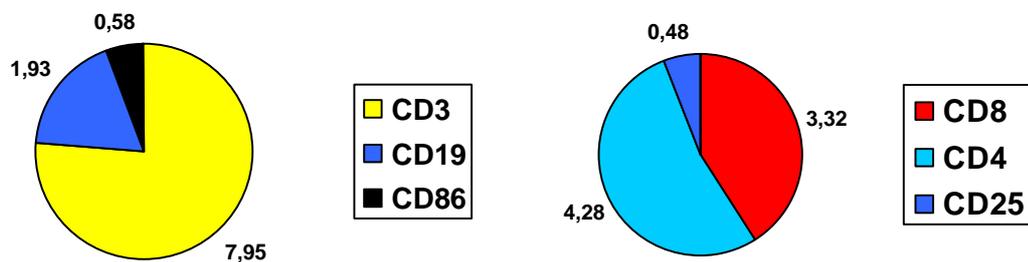


Abbildung 27: Absolute Zahlen (in Mio. Zellen) der Leukozyten in Proj. 81 (Tumorgabe und bestr. TS1G6-Zellen) (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

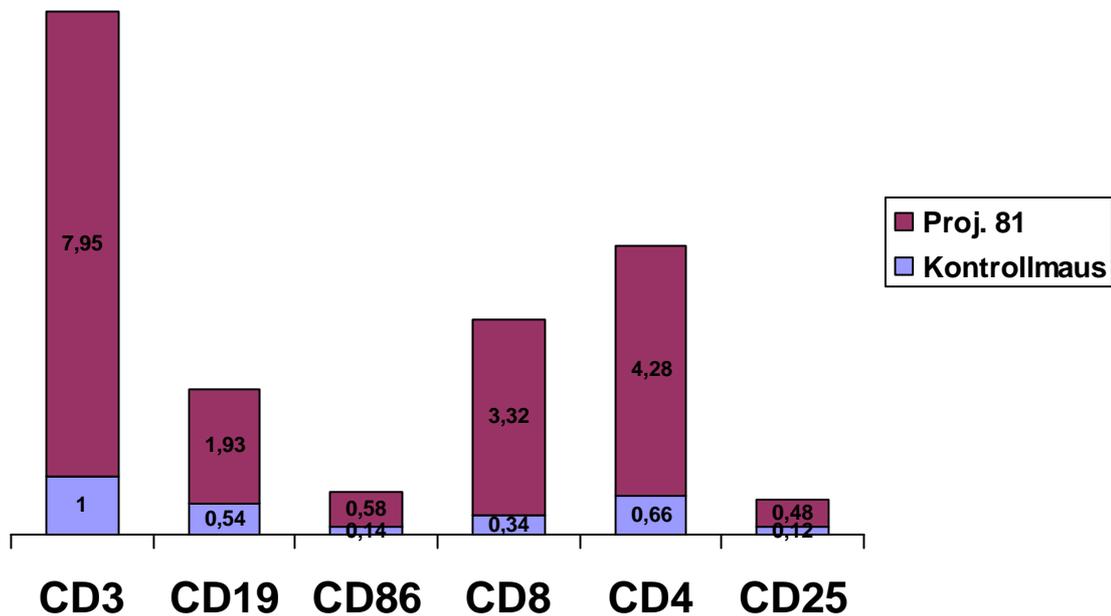


Abbildung 28: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen (in Mio. Zellen) zwischen Kontrollmaus (n=4) und Proj. 81 (Tumorgabe und bestr. TS1G6-Zellen) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

#### 5.2.3.4 Tumorgabe, bestrahlte Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj.83)

Inokuliert man die Maus nicht nur mit den vitalen TS1G6-Tumorzellen und der spezifischen Therapie in Form der bestrahlten TS1G6-Zellen, sondern darüber hinaus mit dem unspezifischen Immunstimulans Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusimpfstoff, werden weitere markante Veränderungen innerhalb des Immunsystems der Versuchsmaus deutlich. In diesem Ansatz lag die T-Zellzahl bei 6,73 Mio., die Zahl der B-Zellen stieg dramatisch an auf 7,97 Mio. Zellen und die DC zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg auf 1,4 Mio. Zellen. Die Gesamtzellzahl ergab somit 16,1 Mio. Zellen. Die einsetzende Aktivierung des Immunsystems ließ sich an den auf 0,85 Mio. gestiegenen aktivierten T-Zellen ablesen. Der Wert für den Index errechnet sich mit 1,51.

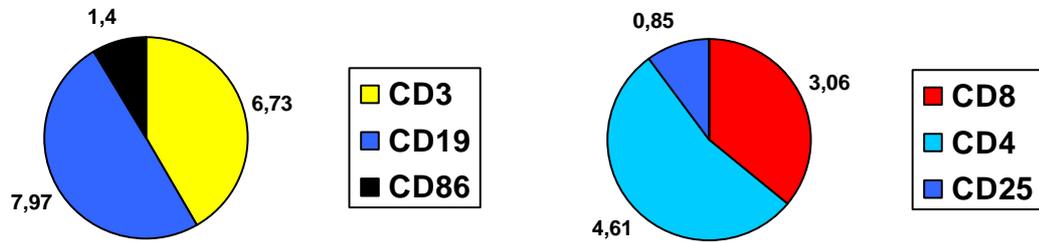


Abbildung 29: Absolute Zahlen (in Mio. Zellen) der Leukozyten in Proj. 83 (Tumorgabe und bestr. TS1G6-Zellen plus DPT) (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

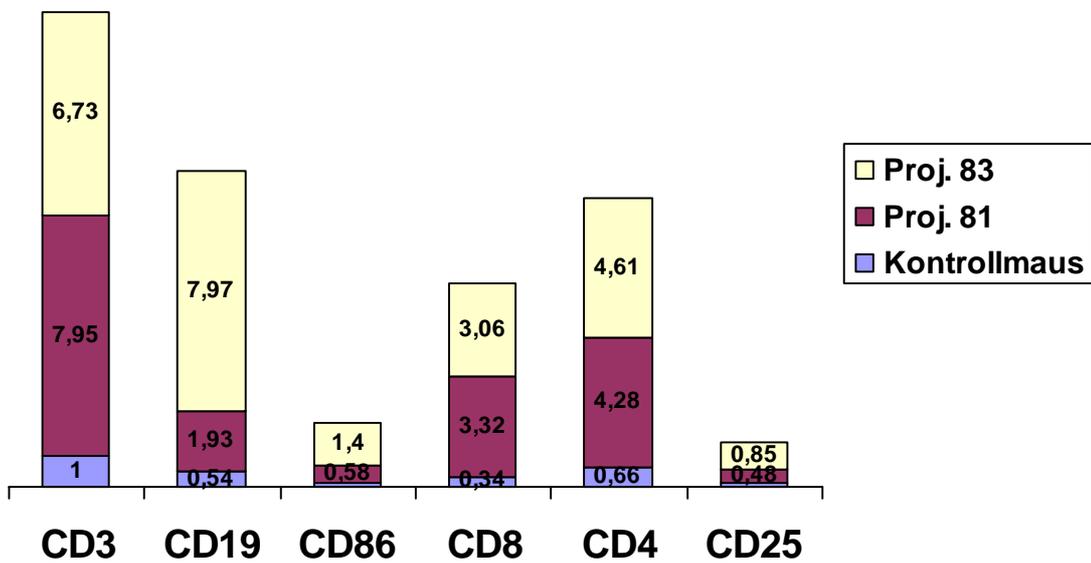


Abbildung 30: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen (in Mio. Zellen) zwischen Kontrollmaus (n=4), Proj. 81 (Tumorgabe und bestr. TS1G6-Zellen) und Proj. 83 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen und DPT) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

### 5.2.3.5 Tumoringokulation, Gabe bestrahlter Tumorzellen und CpG-Oligodesoxynucleotide (Proj. 85)

Der Austausch des DPT gegen CpG-ODN als Zusatz zur Impfung mit bestrahlten TS1G6-Zellen führte zu insgesamt verminderten Zahlen für die einzelnen Leukozytenpopulationen. Die Gesamtzellzahl lag in diesem Ansatz mit 10,14 Mio. Zellen deutlich unter dem Wert des unter 5.2.3.4 beschriebenen Ansatzes (16,1 Mio.). Der T-Zell Wert lag bei 5,75 Mio., der B-Zell Wert bei 3,61 Mio. Zellen. Mit 0,78 Mio. Zellen fanden sich deutlich weniger DC als in Proj. 83. Die Berechnung der aktivierten T-Zellen ergab einen Wert von 0,47 Mio., welcher ebenfalls deutlich niedriger war als in Proj. 83. Auch der Index ergab mit 1,13 einen leicht geringeren Wert.

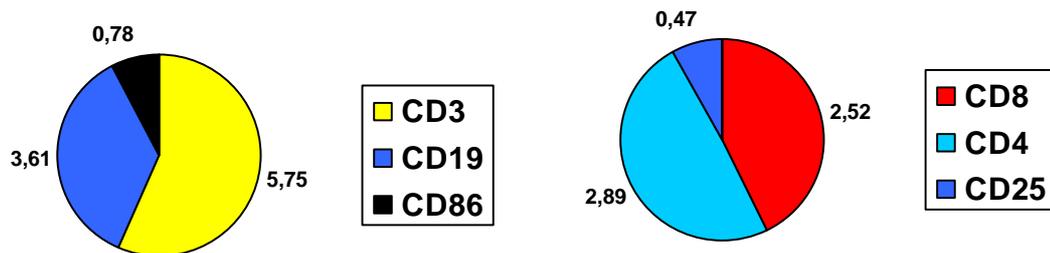


Abbildung 31: Absolute Zahlen (in Mio. Zellen) der Leukozyten in Proj. 85 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen und CpG) (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

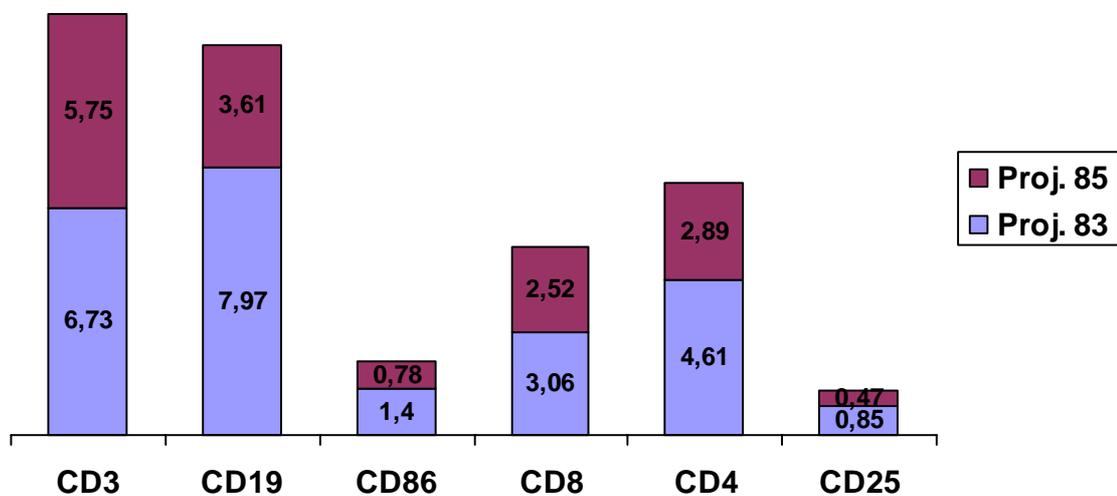


Abbildung 32: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen (in Mio. Zellen) zwischen Proj. 83 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen und DPT) und Proj. 85 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen und CpG-Oligodesoxynucleotide) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

#### 5.2.3.6 Tumorgabe, bestrahlte Tumorzellen in Kombination mit CpG-Oligodesoxynucleotiden und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj. 87)

Insgesamt weichen die Zahlen des Maximal-Therapie-Ansatzes nur geringfügig vom Ansatz des Projektes 85 (ohne zusätzliche Gabe von DPT) ab. Auffällig ist jedoch, dass alle Werte geringer ausfallen als in Proj. 85. Einzige Ausnahme bilden die B-Zellen (4,18 Mio.) und die aktivierten T-Zellen (0,56 Mio.). Die Gesamtzellzahl beläuft sich auf 9,82 Mio. Zellen, es finden sich 5,03 Mio. T-Zellen und 0,61 Mio. DC. Der Index ist mit 1,23 leicht vergrößert.

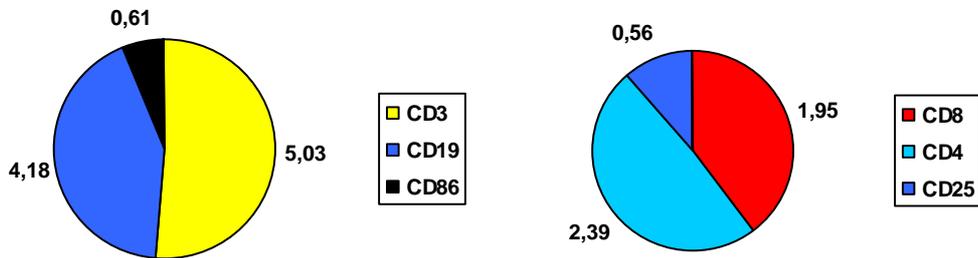


Abbildung 33: Absolute Zahlen (in Mio. Zellen) der Leukozyten in Proj. 87 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen mit CpG und DPT) (n=4, gemittelte Werte beider Messreihen)

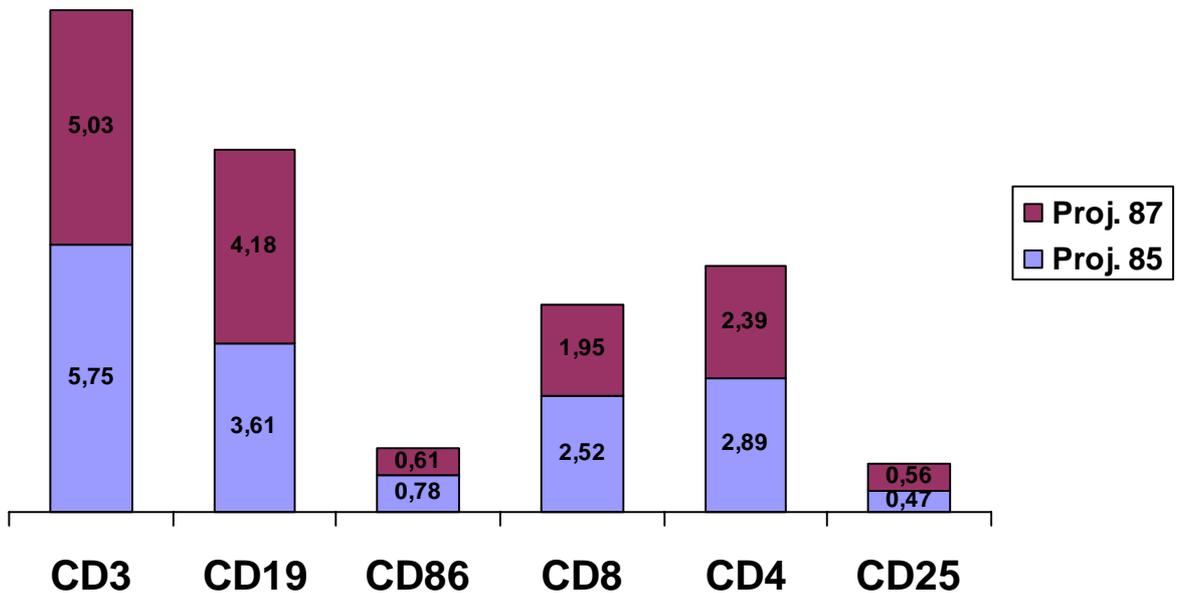


Abbildung 34: Vergleich der absoluten Leukozytenzahlen (in Mio. Zellen) zwischen Proj. 85 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen und CpG-ODN) und Proj. 87 (Tumorgabe, bestr. TS1G6-Zellen, CpG-ODN und DPT) (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

Der Umstand, dass durch sukzessive Addition einzelner Therapiemodule keine weitere Stimulation des Immunsystems erreicht werden kann wird auch bei Betrachtung der Gesamtzellzahlen der einzelnen Therapieansätze im Vergleich deutlich.

Die nachstehende Abbildung 35 zeigt im Überblick die Gesamtzellzahlen (in Mio. Zellen) der einzelnen Therapieansätze:

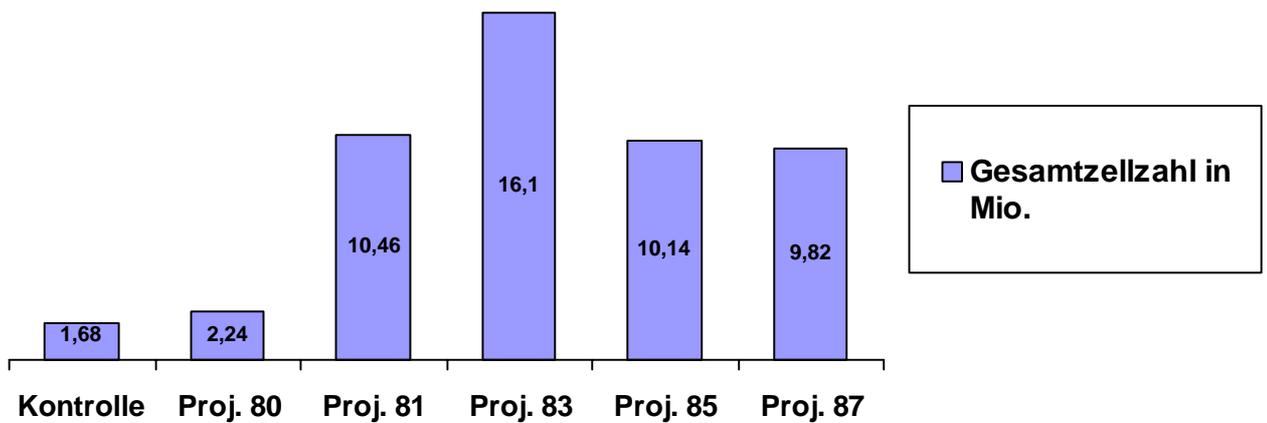


Abbildung 35: Vergleich der Gesamtzellzahlen (in Mio. Zellen) innerhalb der Messreihe (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

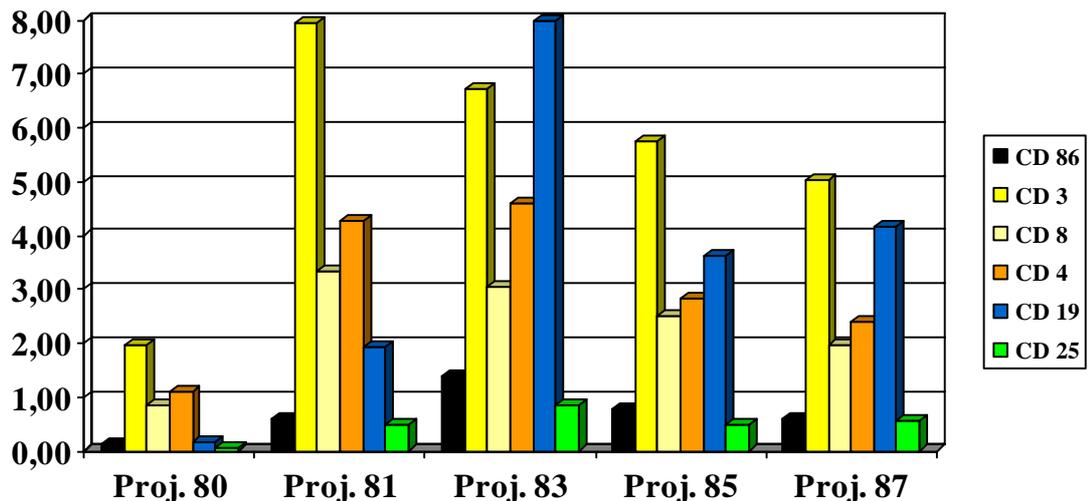


Abbildung 36: Übersichtsdarstellung der absoluten Leukozytenzahlen in Millionen Zellen (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

<b><u>Therapieergebnis</u></b> <b><u>der</u></b> <b><u>Wachstumsprojekte</u></b>	<b>TW 80</b> (n=6)	<b>TW 81</b> (n=6)	<b>TW 83</b> (n=5)	<b>TW 85</b> (n=9)	<b>TW 87</b> (n=6)
Gemittelter Tumorwachstums-Beginn (in Tagen)	17	21,5	38,3	48,5	23,6
Anteil der unter Therapie tumorfreien Tiere (in %)	0	33	40	33	50
Anteil der von d. Therapie profitierenden Tiere (in %)	entfällt	50	100	100	100

Tabelle 4: Übersicht der Therapieergebnisse hinsichtlich Tumorwachstumsbeginn und Tumorfreiheit

Bei Betrachtung der Abbildung 36 und Tabelle 4 werden die Zusammenhänge zwischen den immunologischen Veränderungen der FACS-Projekte 80, 81, 83, 85 und 87 und den Therapieergebnissen der äquivalenten Tumorwachstumskontrollen (TW80, TW81, TW83, TW85, TW87) sichtbar. Auffällig ist vor allem die Tatsache, dass in allen Wachstumskontrollen ein deutlicher Benefit hinsichtlich Tumorfreiheit und Zeitpunkt des gemittelten Tumorwachstums besteht.

So profitierten 100% der Tiere in den Projekten TW83, TW85 und TW87 von der jeweiligen Therapie und 50% der Tiere der Gruppe TW81. Der Überlebensvorteil der Wachstumskontrollen ergibt sich dabei aus dem Vergleich mit den untherapierten Tieren des Projekts TW80.

Der Anteil der unter der Therapie tumorfreien Tiere war mit 50% in Projekt TW87 am größten, gefolgt von 40% in Projekt TW83. In den Projekten TW81 und TW85 blieben jeweils 33% der Tiere im Beobachtungszeitraum tumorfrei. Der gemittelte Tumorwachstumsbeginn wurde mit 48,5 Tagen in Projekt TW85 maximal verzögert, jedoch zeigten auch die Projekte TW83, TW87 und TW81 mit 38,3 bzw. 23,6 und 21,5 Tagen einen zum Teil deutlich verzögerten Tumorwachstumsbeginn im Vergleich mit dem untherapierten Projekt TW80.

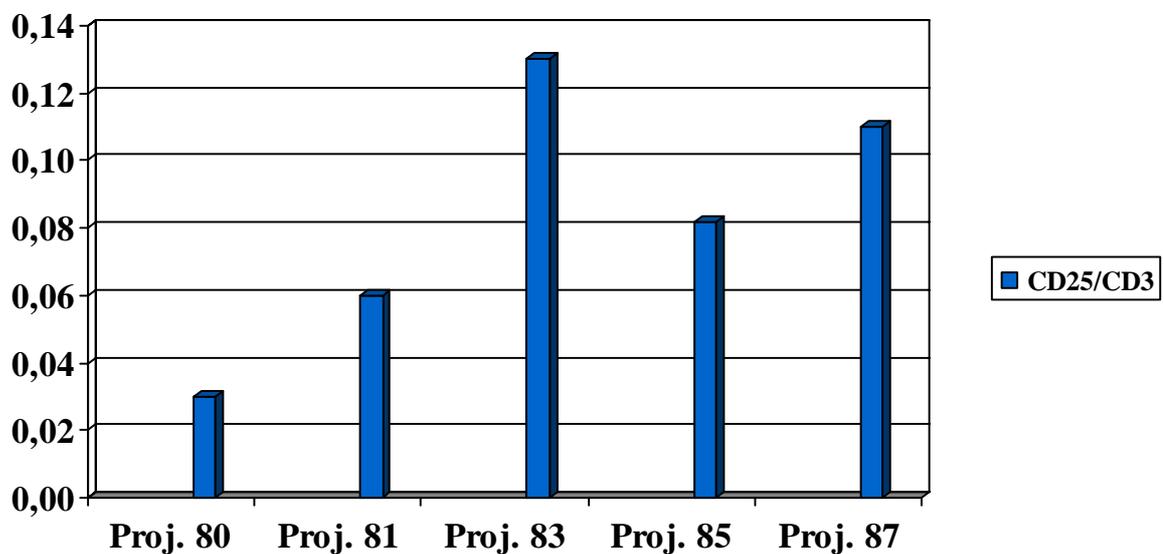


Abbildung 37: Übersichtsdarstellung des CD25/CD3 Verhältnisses innerhalb der Messreihe (n=4) (gemittelte Werte beider Messreihen)

Betrachtet man vergleichend die Ergebnisse bezüglich Tumorfreiheit (Tab. 4) mit den errechneten Quotienten aus CD25+ aktivierten T-Zellen und CD3+ T-Zellen (Abb. 37), so wird deutlich, dass ein hoher Anteil aktivierter T-Zellen an der Gesamt-T-Zellzahl mit einem hohen Anteil an Tumorfreiheit korreliert. So zeigen die Projekte TW87 und TW83 mit 50% bzw. 40% die höchste Quote an Tumorfreiheit und in Korrelation dazu die mit Abstand größten CD25/CD3 Quotienten.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, unter Ausnutzung optischer Messprinzipien, Aussagen über verschiedene Zelleigenschaften wie Größe und Granularität zu treffen (vgl. Material und Methoden, 4.2.6). Mögliche systematische Fehlerquellen bei der Verwendung des Durchflusszytometers ergeben sich u.a. durch die Auswahl des zu messenden Zellausschnitts bzw. aus den verschiedenen Möglichkeiten zur Grundeinstellung des Zytometers. Weitere Besonderheiten im Umgang und in der Bewertung von durchflusszytometrisch ermittelten Daten sind das Problem der *ausschnitthaften Darstellung* und das Problem der *Momentaufnahme*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden pro Messung jeweils 16.000 Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Obwohl dieser Wert sich als ausreichend groß erwiesen hat, wird dennoch nur ein *Ausschnitt* der im Lymphknoten befindlichen Zellen bestimmt. Die relativen Veränderungen innerhalb einer Messung machen keine Aussage über die tatsächliche, die absolute Veränderung einzelner Zellpopulationen im gesamten Lymphknoten des betreffenden Versuchstieres. Trotz einer relativen Abnahme z.B. der B-Zellen in einer FACS-Messung kann ein absoluter Anstieg der B-Zellen im betreffenden Lymphknoten vorliegen. Die Bedeutung der Errechnung der absoluten Zellzahlen wird hier sichtbar: die Veränderungen innerhalb des 16.000-Zellen-Ausschnitts mögen relativ betrachtet gravierend sein, bezogen auf die Gesamtveränderung muss jedoch die absolute Zellzahl im Lymphknoten berücksichtigt werden, um eine Aussage über die immunstimulatorische Wirkung einer Therapie machen zu können.

Des Weiteren ist der Zeitpunkt der zytometrischen Messung bedeutsam bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde der 14. Tag nach initialer Tumorinokulation als optimaler Messzeitpunkt bestimmt, da jetzt bereits deutliche Reaktionen des Immunsystems auf die verabreichte

Therapie sichtbar werden, ohne dass progredientes Tumorwachstum zu einer Verzerrung der Ergebnisse führt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Durchflusszytometrie direkt mit den Wachstumsverläufen der Therapieprojekte, so muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei den FACS-Ergebnissen lediglich um *Momentaufnahmen* handeln kann, wohingegen die Wachstumskurven Ergebnisverläufe über bis zu 120 Tagen liefern, wobei teilweise auch nicht-lineare Verläufe mit Regression zu beobachten waren. Vor diesem Hintergrund ist es zwar sinnvoll, die immunologischen Veränderungen innerhalb des Lymphknotens den Verläufen der äquivalenten Wachstumsprojekte gegenüber zu stellen. Direkte Rückschlüsse auf den dauerhaften Therapieerfolg können jedoch bei alleiniger Betrachtung der einmalig erzielten FACS-Ergebnisse vor dem Hintergrund der erwähnten Unterschiede nur bedingt gezogen werden.

Gegenstand dieser Arbeit war es daher zum einen, die immunologischen Veränderungen im Lymphknoten selbst im Rahmen der Grundlagenforschung zu beobachten, und zum anderen, diese Beobachtungen mit dem langfristigen Therapieerfolg in Einklang zu bringen. Dabei war die Fallzahl der im Rahmen dieser Arbeit insgesamt untersuchten Tiere gering, so dass eine zuverlässige statistische Aussage nicht möglich war. Die dargestellten Zahlen und Wachstumsverläufe zeigen jedoch eine Tendenz auf, welche ggf. in Folgearbeiten mit höheren Tierzahlen statistisch abzusichern wäre.

## 6.2 Grenzen und Möglichkeiten der bisherigen Therapiestrategien

Die bis Mitte der 90er Jahre verfügbaren Therapiemöglichkeiten des ALCL beschränkten sich größtenteils auf Hochdosis-Chemotherapie ggf. in Kombination mit einer Radiatio. Nach Fanin et al 1996 zeigen diese Schemata jedoch nicht nur unbefriedigende Heilungsergebnisse (mehr als 50% Rezidive), sondern verursachen auch häufig die typischen unerwünschten Nebenwirkungen in Form von Immunsuppression, Knochenmarkdepression und Anämie mit den daraus

resultierenden Komplikationen wie Infektionen und Sekundärneoplasien (Riley et al. 1999; Berge et al. 1999). Seit einigen Jahren wird stadienabhängig vor allem bei jüngeren Patienten nicht selten zu der erwähnten Hochdosistherapie auch ein Stammzelltransfer durchgeführt, im wesentlichen, um die Toxizität der Therapie auf das Knochenmark zu verringern. Die Effizienz dieses Verfahrens ist aber bisher nicht zweifelsfrei belegt (Milpied et al. 2004).

Immuntherapeutische Strategien könnten eine neue Säule in der Bekämpfung des ALCL darstellen. Auch wenn der Einsatz dieser Therapiemöglichkeit heute bereits vereinzelt klinisch zum Tragen kommt, beispielsweise bei der Behandlung des malignen Melanoms (Rosenberg et al. 1998), scheint es doch sinnvoll und notwendig, zunächst ein umfangreiches Wissen über die Grundlagen der immuntherapeutischen Behandlung und ihrer Wirkung auf das Immunsystem zu erlangen, um so die bestehenden immuntherapeutischen Therapieansätze optimieren zu können.

Eine kombinierte Immun-Chemotherapie wird auch für B-Zell-Lymphome bereits erfolgreich durchgeführt. Durch den klinischen Einsatz von monoklonalen Antikörpern, und hier insbesondere CD20 antigen-spezifischer Antikörper, begann eine neue Ära in der Therapie aggressiver B-NHL. Der Prototyp dieser neuen Generation an biologisch aktiven Substanzen ist Rituximab. Nachdem Rituximab zunächst in der Monotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Lymphom seine Wirksamkeit gezeigt hatte, fand es rasch Einzug in die Primärtherapie insbesondere in Kombination mit dem CHOP-Regime. Die Überlegenheit einer Kombinationstherapie im Vergleich zu einer alleinigen CHOP-Therapie wurde eindrücklich durch die französische GELA-Arbeitsgruppe für Patienten mit Diffuse Large-B-Cell-Lymphoma (DLBCL) im Alter über 60 Jahren untermauert. Die kürzlich veröffentlichten 5-Jahresdaten wiesen ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben von 58% für den R-CHOP gegenüber 45% für den CHOP Arm auf ( $p = 0.0073$ ).

Die RICOVER Studie bestätigt diese Daten und suggeriert zudem eine Überlegenheit für den Einsatz des zeitverkürzten CHOP-14-Regimes in

Kombination mit Rituximab. Da in der RICOVER-Studie kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen sechs und acht Therapiezyklen zu verzeichnen war, gelten sechs Zyklen CHOP-14 mit Rituximab in dem Alterskollektiv über 60 Jahren als Standard (Pfreundschuh et al. 2005).

Das unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung stehende Tiermodell scheint geeignet, Informationen über das Wachstum, die Immunogenität und die tumorinduzierten Veränderungen im Immunsystem zu liefern. Da auch hinsichtlich Morphologie, Histologie und Tumorausbreitungsmuster deutliche Parallelen zum humanen ALCL bestehen, lassen die gefundenen Ergebnisse möglicherweise Rückschlüsse auf die Vorgänge im Menschen zu.

### 6.3 Wirkung der Immuntherapie auf die leukozytäre Zellzusammensetzung des Lymphknotens

#### 6.3.1 Leukozytenbild im untherapierten Lymphknoten

Um Aussagen über die tumor- bzw. therapieinduzierten Veränderungen in der leukozytären Zusammensetzung des Lymphknotens machen zu können, bedarf es der genauen Kenntnis des Zellbildes im unbehandelten Lymphknoten der Maus. In Vorversuchen wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers das Leukozytenprofil der C57Bl/6 Maus erstellt (Kontrollgruppe) (vgl. 5.2.2.1). Die somit ermittelten Werte bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Ghosh et al. 1999), welche eine ähnliche leukozytäre Zusammensetzung im Lymphknoten bereits gezeigt haben.

Zusätzliche Informationen lieferte die Errechnung der absoluten Leukozyten-Werte im Lymphknoten der Kontrollmaus. Nicht nur die Verschiebungen innerhalb der einzelnen Subpopulationen der leukozytären Zellen waren hier beeindruckend, sondern auch die Veränderungen der Gesamtzellzahl innerhalb des Lymphknotens bei verschiedenen Therapieansätzen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 6.3.2 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumorinokulation (Proj. 80)

Nach Applikation vitaler TS1G6-Zellen fiel durchflusszytometrisch eine starke, sowohl relativ wie auch absolut betrachtete Zunahme der T-Zellzahl auf (vgl. 5.2.2.2 und 5.2.3.2). Janeway und Travers zeigten 1997 die Bedeutung der T-Zellen für die immunologische Tumorabwehr auf, indem sie teilungsunfähige Tumorzellen in die Maus injizierten und bei sekundärer Tumorapplikation in diesen Mäusen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Tumorabstoßung nachweisen konnten. Dieser immunologisch bedingte Schutzmechanismus war in Mäusen, bei denen das T-Zell System ausgeschaltet wurde, nicht nachweisbar (Janeway und Travers 1997, 12:18). Der deutliche, sowohl relative wie auch absolute Anstieg der T-Zellen lässt sich also als Hinweis darauf interpretieren, dass die mit Tumorzellen inokulierten Mäuse über eine endogene Amplifizierung der T-Zellproduktion versuchen, den proliferierenden, zum Messzeitpunkt aber noch sehr kleinen Tumor abzuwehren.

Der T-Zell-Anstieg geht mit einem (relativen wie absoluten) Abfall der B-Zellen einher (vgl. 5.2.2.2 und 5.2.3.2). Der in der Literatur beschriebene  $T_{H2}$ -Shift nach Tumorinokulation (Bittner et al. 2000; Scott et al. 1991), lässt sich somit an Tag 14 nach Tumorinokulation nicht nachweisen. Dies kann als weiterer Hinweis für die Wichtigkeit des frühzeitigen Einsatzes immunmodulatorischer Therapieansätze im Verlaufe einer Tumorerkrankung gewertet werden (vgl. Vorteile des simultanen gegenüber dem subsequenten Ansatz).

### 6.3.3 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumorinokulation und zusätzlicher Gabe von bestrahlten Tumorzellen (Proj. 81)

Die Analyse der durchflusszytometrisch ermittelten Daten für die anteilige Zusammensetzung der Leukozytenpopulation zeigt einen im Vergleich zur Kontrolle deutlichen relativen wie auch absoluten Anstieg der CD3+ T-Zellen auf. Besonders eindrucksvoll innerhalb dieses Versuchsansatzes ist jedoch die starke absolute Zunahme der Gesamtzellzahl innerhalb des untersuchten

Lymphknotengewebes. Des Weiteren vervielfachte sich auch die absolute Zahl der B-Zellen sowie der Dendritischen bzw. der aktivierten CD25+ T-Zellen nach Tumorinokulation und Gabe von bestrahlten TS1G6-Zellen (vgl. 5.2.2.3 und 5.2.3.3).

Auch der Vergleich mit dem in 6.3.2 diskutierten Ansatz aus alleiniger Tumorgabe ohne zusätzliche Verabreichung von bestrahlten TS1G6-Zellen zeigt einige bedeutsame Veränderungen. Sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Werte für T- und B-Zellen liegen in diesem Ansatz absolut betrachtet deutlich niedriger. Die zusätzliche Gabe des Ganzzell-Vakzins führt also zu einer ausgeprägten Stimulation aller untersuchten leukozytären Zellpopulationen innerhalb des Lymphknotens. Betrachtet man nun ergänzend den Therapieerfolg innerhalb des entsprechenden Wachstumsprojekts (vgl. 5.1.2), so wird deutlich, dass es durch den alleinigen therapeutischen Einsatz der Ganzzell-Vakzine nicht nur zu einer Verzögerung des Tumorwachstumsbeginns von 17 Tagen in der Kontrolle auf 21,5 Tagen in der Therapiegruppe kommt, sondern dass darüber hinaus 33% der Tiere (n=6) im Beobachtungszeitraum gänzlich tumorfrei bleiben.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die durch die Immuntherapie mittels Ganzzellvakzinen innerhalb des Lymphknotens beobachteten immunologischen Veränderungen eine Korrelation zum Tumorwachstum aufweisen. Das Immun-Enhancement bleibt im vorliegenden Ansatz somit nicht nur auf die zelluläre Ebene beschränkt, sondern zeigt deutlich positive und in Abhängigkeit von der Impfstrategie variable Auswirkungen auf das Überleben der Tiere.

#### 6.3.4 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumorinokulation und kombinierter Gabe von bestrahlten Tumorzellen und Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe (Proj. 83) bzw. bestrahlten Tumorzellen, Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusgabe und CpG-Oligodesoxynucleotiden (Proj. 87)

Relativ betrachtet zeigt der Ansatz aus therapeutischer Gabe von bestrahlten TS1G6-Zellen und DPT im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlichen Abfall der CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei gleichzeitig starkem Anstieg der B-Zellen (vgl. 5.2.2.5). Der um CpG-Oligodesoxynucleotide erweiterte Ansatz zeigt im Vergleich hierzu einen erhöhten T-Zell Anteil und einen nahezu gleich hohen Anteil an CD19<sup>+</sup> B-Zellen (vgl. 5.2.2.8).

Einen anderen Eindruck vermittelt jedoch die Betrachtung der absoluten Werte. Mit 16,1 Mio. Zellen zeigt der Ansatz aus bestrahlten Zellen und DPT den größten Wert für die Gesamtzellzahl innerhalb der Messreihe. Dieser Wert wird vor allem von der hohen Zahl an B-Zellen getragen, aber auch die T-Zellzahl ist die zweithöchste der Messreihe. Des Weiteren verzeichnen die CD86<sup>+</sup> Dendritischen Zellen und die CD25<sup>+</sup> aktivierten T-Zellen die höchsten Werte der Messreihe (vgl. 5.2.3.4). Der um die zusätzliche CpG-ODN-Gabe erweiterte Ansatz zeigt ebenfalls außergewöhnlich hohe B-Zellzahlen, wenngleich die Werte für T-Zellen, Dendritische Zellen und aktivierte T-Zellen deutlich niedriger ausfallen (vgl. 5.2.3.6).

Die kombinierte Gabe von bestrahlten TS1G6-Zellen mit DPT scheint somit eine ausgeprägte B-Zell proliferative Wirkung auf das Immunsystem zu entwickeln, welche sich durch zusätzliche Applikation weiterer Therapiebestandteile nicht ohne weiteres steigern lässt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Betrachtung des langfristigen Therapierfolges der beiden beschriebenen Ansätze. Die therapeutische Gabe von bestrahlten TS1G6-Zellen kombiniert mit DPT bewirkt in den Wachstumsprojekten eine Verzögerung des gemittelten Tumorwachstumsbeginns von 17 Tagen (Kontrolle) auf 38,3 Tagen unter Therapie (vgl. 5.1.3). Die in der Literatur

beschriebene (Qin et al. 1998; Böcker et al. 2002) Beschleunigung des Tumorwachstums durch B-Zell-Stimulation (enhancement) kann mit Hinblick auf die gefundenen Ergebnisse für das ALCL nicht bestätigt werden. Durch die zusätzliche Gabe von CpG-ODN kann eine Tumorfreiheit von 50% innerhalb der Therapiegruppe (n=6) und eine Verzögerung des Tumorwachstums von im Mittel 6,6 Tagen erzielt werden (vgl. 5.1.6).

Hinsichtlich der immunologischen Veränderungen innerhalb des Lymphknotens macht die vergleichende Betrachtung der einzelnen Zellzahlen deutlich, dass die Veränderungen jeweils komplex sind, und dass für die verschiedenen „Impfstrategien“ Veränderungen im Immunsystem des Versuchstieres bewirkt werden, die sich aber nicht einfach quantitativ erfassen lassen. Durch Verabreichung der Therapie kommt es u.a. zu einem starken Anstieg der Gesamtzellzahl im Lymphknoten, wobei jedoch deutliche Unterschiede innerhalb der verschiedenen Therapieansätze zu Tage treten, und die Zellzahl nicht allein den Therapieerfolg bestimmt. Bedeutsam sind wohl einerseits die Ausnutzung von Synergien (z.B. antigenpräsentierende Dendritische Zellen, T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen) und die Reduktion supprimierender Effekte (z.B. T-Suppressor-Zellen, regulatorische T-Zellen). Durch Maximierung der Therapie im Sinne einer Summation einzelner Therapiebestandteile lässt sich erstaunlicherweise die Zellzahl nicht weiter steigern, vielmehr scheint es zu einer supprimierten Wirkung einzelner Therapiebestandteile auf die Zellzahl zu kommen (vgl. Abb. 35).

#### 6.3.5 Leukozytenbild im Lymphknoten nach Tumorinokulation und kombinierter Gabe von bestrahlten Tumorzellen und CpG-Oligodesoxynucleotiden (Proj. 85)

Die Analyse der relativen durchflusszytometrisch ermittelten Zahlen zeigt weder bei den T-Zellen, noch bei den B-Zellen signifikante Veränderungen zur Kontrollgruppe (vgl. 5.2.2.7). Die Errechnung der absoluten Werte hingegen lässt deutliche Veränderungen innerhalb der leukozytären Zusammensetzung des

Lymphknotens zutage treten. Die Gesamtzellzahl liegt mit 10,14 Mio. Zellen um annähernd das 10-fache über dem entsprechenden Wert der Kontrolle. Die absoluten Werte für T-Zellen und B-Zellen liegen ebenso wie die Dendritischen Zellen und die aktivierten T-Zellen deutlich über den Werten der Kontrolle (vgl. 5.2.3.5).

Die Betrachtung der langfristigen Therapiergebnisse des entsprechenden Wachstumsprojekts zeigt einen mit im Mittel 48,5 Tagen deutlich verzögerten Tumorwachstumsbeginn (Tumormaus: 17 Tage) (vgl. 5.1.5). Die absolut erhöhten Lymphozyten-Zahlen innerhalb der FACS-Projekte korrelieren also wiederum deutlich mit einer Verzögerung des gemittelten Tumorwachstumsbeginns.

Darüber hinaus gehen erhöhte Werte innerhalb der B-Zell-Population mit einem deutlich gesteigerten Anteil an Tumorfreiheit einher (vgl. TW83 und TW87). Das oben bereits erwähnte B-Zell-induzierte enhancement lässt sich somit für das ALCL nicht belegen.

Wie bereits erwähnt, scheint jedoch nicht allein der Wert der jeweiligen Lymphozytenpopulation maßgeblich für ein langfristig positives Therapieergebnis zu sein, auch das Verhältnis einzelner Lymphozyten-Subpopulationen zueinander ist bedeutsam bei der Auswertung der zu beobachtenden immunologischen Veränderungen. Die vergleichende Analyse des Quotienten aus CD25+ aktivierten T-Zellen und CD3+ T-Zellen (vgl. Abb. 37) mit den Zahlen für die Tumorfreiheit (Tab. 4) innerhalb der Messreihe macht deutlich, dass ein hoher Anteil aktivierter T-Zellen an der Gesamt-T-Zellzahl mit einem hohen Anteil an Tumorfreiheit korreliert. So zeigen die Projekte TW87 und TW83 mit 50% bzw. 40% die höchste Quote an Tumorfreiheit und in Korrelation dazu die mit Abstand größten CD25/CD3 Quotienten (vgl. 5.2.3.4 und 5.2.3.6). Die Kombination aus bestrahlten TS1G6-Zellen und DPT scheint also nicht nur eine B-Zell Proliferation zu bewirken, auch der Anteil der aktivierten T-Zellen an der Gesamt-T-Zellzahl steigt bei Einsatz dieses Therapieschemas deutlich an.

Die Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der aktivierten CD25+ T-Zellen macht jedoch insbesondere vor dem Hintergrund der in der Literatur beschriebenen

immunsupprimierenden CD25<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation eine differenzierte Betrachtung dieser Zellart erforderlich. Bei den CD25<sup>+</sup> T-Zellen handelt es sich offenbar um eine sehr heterogene, in ihrer immunologischen Wirkung höchst unterschiedliche Lymphozytenpopulation. So zeigen neuere Studien den Stellenwert der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Kontrolle autoimmuner Erkrankungen auf (Shevach et al. 2002). Circa 10% der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten koexprimieren demnach das Oberflächenmerkmal CD25 und werden als „suppressor T cells“ bezeichnet. Diesen Zellen kommt große Bedeutung in der Unterdrückung autoimmuner Erkrankungen wie der autoimmunen Gastritis, dem Typ-I-Diabetes oder der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung zu.

In Tierversuchsstudien kam es durch den Transfer von CD45RB<sup>hi</sup> T-Zellen in SCID-Mäuse zur Entwicklung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen in den betreffenden Versuchstieren. Wurden simultan CD25<sup>+</sup> T-Zellen transfiziert, ließ sich keine spezifische Darmerkrankung auslösen. Ein anderer Versuchsansatz bediente sich eines Mausmodelles, welchem sämtliche T-Zellen fehlten (nu/nu Mäuse). Durch Inokulation der Tiere mit CD25<sup>-</sup> T-Zellen kam es zur Ausbildung einer autoimmunen Gastritis. Bei simultaner Übertragung von CD25<sup>-</sup> und CD25<sup>+</sup> T-Zellen ließ sich keine Autoimmunerkrankung induzieren. Diesem protektiven Effekt der CD25<sup>+</sup> T-Zellen könnte eine Konkurrenz der CD25<sup>+</sup> T-Zellen um Rezeptorbindungsstellen, Zytokine oder kostimulatorische Signale in der lymphopenen Maus zugrunde liegen (Stockinger et al. 2001).

Die exakten immunologischen Mechanismen und Hintergründe (zytokinvermittelte vs. zellkontaktabhängige Immunsuppression, beteiligte Zytokine und darüber hinaus gehende Begleitumstände wie externe Entzündungsreize oder die Beteiligung weiterer Immunzell-Entitäten) sind im Detail derzeit noch größtenteils unerforscht, bzw. durch kontroverse Studienlage nicht eindeutig zuzuordnen. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich ein unterstützender immunologischer Effekt der aktivierten CD25<sup>+</sup> T-Zellen aufzeigen. Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen, zum Teil kontroversen Studienergebnisse scheint die weitere Erforschung der exakten Zusammensetzung und Unterteilung der CD25<sup>+</sup> T-

Zellpopulation hinsichtlich immunsupprimierender bzw. immunstimulierender Wirkung lohnenswert.

#### 6.4 Die Bedeutung des simultanen Vakzinierungsansatzes - Grenzen der subsequenten Vakzinierungs-Therapie

Kernstück der immunmodulatorischen Therapieschemata unserer Arbeitsgruppe war die Verwendung von Ganzzell-Vakzinen, durch zweimalige Bestrahlung mit insgesamt 70 Gy teilungsunfähig gemachte Tumorzellen der TS1G6-Zelllinie.

Vorversuche innerhalb unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich u.a. mit den Unterschieden hinsichtlich des Therapieerfolges bei Verwendung eines simultanen und eines subsequenten Ansatzes.

Zunächst wurden der Tumorwachstumsverlauf sowie die minimale Tumorzelldosis ermittelt. Dabei erwies sich eine Dosis von  $10^4$  Tumorzellen als Minimaldosis, um bei allen Versuchstieren ein progredientes Tumorwachstum hervorzurufen. Die Vakzine wurden zunächst ohne weitere Adjuvanzen simultan zur Tumorinokulation verabfolgt.

##### 6.4.1 Der simultane Therapieansatz

Die Applikation einer Tumordosis von  $10^4$  vitalen Zellen mit simultaner Vakzinierung ergab bei 50% der Tiere (n=6) kein Tumorwachstum, ein weiteres Tier zeigte einen verzögerten Wachstumsverlauf. Bei Steigerung der Dosis auf  $10^5$  vitale TS1G6-Zellen bei simultaner Vakzinierung konnten noch 33% der Versuchstiere (n=6) vor einem Tumorwachstum geschützt werden. Bei einem weiteren Tier erfolgte der Wachstumsbeginn verzögert, der weitere Verlauf war von einer vorübergehenden kompletten Remission geprägt (vgl. 5.1.2). In beiden Versuchsansätzen zeigte sich, dass die Tumorinzidenz signifikant geringer war als

in der Kontrollgruppe, in welcher 100% der Tiere progredientes Tumorwachstum zeigten.

Eine weitere Steigerung der initialen Tumorlast auf  $10^6$  vitale Zellen führte bei allen Tieren dieses Ansatzes (n=3) zum Tode, jedoch ließ sich auch hier bei 66% noch ein verzögertes Tumorwachstum erkennen. Steigende initiale Tumorlast führt erwartungsgemäß zu einer Verschlechterung des Therapieerfolgs. Es lässt sich ableiten, dass eine Zunahme der Tumorlast zu einer Überbeanspruchung des grundsätzlich zur Tumorabwehr befähigten Immunsystems führt und/oder dass von vitalen Tumorzellen sezernierte Faktoren mit immunsupprimierendem Effekt bei steigender Tumormasse eine Dämpfung der Immunantwort verursachen. Die adjuvante Gabe von unspezifisch wirksamen immunstimulierenden Präparaten wie CpG-Oligodesoxynucleotide, Diphtherie- Pertussis- Tetanus-Impfstoffen oder Kombinationen aus beiden Gruppen kann eventuell zu einer Verbesserung der Immunpotenz führen.

Zu diesem Zweck wurden von unserer Arbeitsgruppe zusätzlich die unter 5.1.3 bis 5.1.6 beschriebenen Versuchsansätze hinsichtlich ihrer Wirksamkeit untersucht, wobei Tumorfreiheit innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 120 Tagen bei bis zu 50% der Versuchstiere bei einer initialen Tumorlast von  $10^5$  vitalen Tumorzellen erreicht werden konnte (Ansatz mit Kombinationstherapie aus bestrahlten TS1G6-Zellen, CpG-ODN und DPT). Die kombinierte Therapie aus bestrahlten Tumorzellen und DPT zeigte eine Tumorfreiheit bei 40% der Tiere, ebenfalls nach Inokulation von  $10^5$  vitalen Tumorzellen. Unspezifische Immunstimulation kann also den spezifischen, durch Ganzzell-Vakzinierung hervorgerufenen Immunschutz noch deutlich verbessern, so dass bei identischer Tumorlast weitaus günstigere Therapieverläufe beobachtet werden können.

#### 6.4.2 Der subsequente Therapieansatz

Im Rahmen des subsequenten Ansatzes fand die Vakzinierung am Tag 14 nach Inokulation mit vitalen TS1G6-Zellen bei einer messbaren Tumorgröße von 0,4 cm

statt. Bei einmaliger Vakzinierung konnte in keinem Fall eine Vollremission nachgewiesen werden, unabhängig von der gewählten initialen Tumorlast ( $10^4$ ,  $10^5$  oder  $10^6$  vitale Zellen). Bei zweimaliger Vakzinierung im Abstand von 14 Tagen wurde –wie schon bei der Simultantherapie– die Bedeutsamkeit der zu Beginn der Immuntherapie vorhandenen Tumormasse deutlich. So konnte bei 50% der Tiere (n=6) des Ansatzes mit  $10^4$  vitalen Zellen eine komplette Remission nachgewiesen werden. Allerdings kam es in einem Fall zu einem an Tag 56 nachgewiesenen Tumorrezidiv. In der Gruppe mit initialer Tumorlast von  $10^5$  Zellen (n=6) zeigte ein Tier eine vorübergehende Vollremission, jedoch konnte keines der Tiere dauerhaft geheilt werden. Der Ansatz (n=6), in welchem initial  $10^6$  vitale TS1G6-Zellen appliziert wurden, brachte erwartungsgemäß den schlechtesten Therapieerfolg. Alle Tiere dieses Ansatzes zeigten ein unverändertes Tumorwachstum.

Der simultane Versuchsansatz ist im Hinblick auf die Übertragung der Therapiergebnisse auf den Menschen von besonderer Bedeutung. Zustände mit sehr geringem persistierendem Tumorgewebe, wie sie z.B. bei Vollremission nach Chemotherapie auftreten, entsprechen dem beschriebenen Schema der simultanen Vakzinierung in der Maus. Der Vergleich mit den Ergebnissen der subsequenten Therapie und der Ergebnisauswertung der Versuche mit steigender initialer Tumorlast zeigt, dass die Prognose um so günstiger ist, je geringer die initiale Tumormasse ist. Der subsequente Ansatz entspräche beim Menschen einer Situation mit klinisch nachweisbarem Tumorwachstum. Diese Situation stellt an das Immunsystem und analog dazu an eine eventuelle Immuntherapie weitaus größere Anforderungen als ein Zustand nach Vollremission.

Die unter 6.4.1 und 6.4.2 dargestellten Zusammenhänge empfehlen die Immuntherapie als neuen und nebenwirkungsarmen Ansatz zur Therapie des großzelligen anaplastischen Lymphoms und als einen viel versprechenden Weg, die hohe Rate der Rezidive nach chirurgischer oder radio-/chemotherapeutischer Therapie (bis zu 50% nach Fanin et al. 1996) zu senken. Die Immuntherapie kann somit nachweislich einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung des ALCL leisten.

## 6.5 Schlussfolgerungen

In der Behandlung des großzelligen anaplastischen Lymphoms kommen bisher vor allem radio- und chemotherapeutische Verfahren zur Anwendung, welche das therapieimmanente Risiko von Knochenmarkdepression, Sekundärneoplasien und Infektionskrankheiten beinhalten. Die Prognose ist trotz intensiver Therapie mäßig gut (mehr als 50% Rezidive nach Fanin et al. 1996). Insbesondere bei Vorliegen einer „minimal residual disease“, könnte das Rezidivrisiko und somit die Langzeitprognose durch Einsatz der beschriebenen immuntherapeutischen Ansätze deutlich verbessert werden.

In den vorgestellten Ganzzell-Tumor-Vakzinierungsversuchen ließ sich eine hohe Rate an Tumorfreiheit insbesondere nach Applikation einer Dreifachkombination aus bestrahlten TS1G6-Zellen, Diphtherie- Pertussis- Tetanusimpfstoff und CpG-Oligodesoxynucleotiden nachweisen. Durch den Einsatz der Ganzzell-Vakzinierung in Kombination mit den Adjuvantien CpG- ODN und DPT werden verschiedene Schenkel der Immunabwehr gleichzeitig stimuliert. Durch Präsentation der tumorspezifischen Oberflächenantigene im Rahmen der Vakzinierung werden spezifische Abwehrmechanismen aktiviert, was eine gerichtete Immunantwort ermöglicht. Unterstützend wirkende, unspezifische Adjuvantien verstärken diese gerichtete Immunantwort und führen gleichzeitig zu einer insgesamt verbesserten Abwehrlage des Organismus, wodurch eventuell auch eine Verminderung des Infektionsrisikos erreicht werden kann.

Die im Rahmen der Versuche unserer Arbeitsgruppe verwendeten Antigene des Diphtherie-, Pertussis- und Tetanus-Toxins erschienen uns vor allem deshalb besonders geeignet, da durch die systematisch durchgeführten Reihenimpfungen in den westlichen Ländern sich bei einem Großteil der Bevölkerung bereits Antikörper bzw. T-Gedächtnis Zellen nachweisen lassen, welche im Rahmen der Recall-Antwort zur Tumor-Vakzinierung rekrutiert werden können. Die Tatsache, dass der durch Immunvakzinierung mit Zellen eines bestimmten Tumor-Typs erreichte Schutz sich nicht auf andere Tumoren ausweiten ließ, zeigt die Spezifität des immunologischen Schutzes auf. In klinischen Studien werden CpG-ODN

derzeit auf Unverträglichkeitsreaktionen und Nebenwirkungen hin untersucht. In Tierversuchen waren jedoch keine nennenswerten negativen Begleitreaktionen nachweisbar, weshalb auch dieses Adjuvanz im Rahmen der Versuche unserer Arbeitsgruppe Verwendung fand.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten verdeutlicht die Veränderungen zellulärer Bestandteile des Lymphknotens, die durch Immunstimulation hervorgerufen wurden. Die absolute Lymphozytenzahl innerhalb des stimulierten Lymphknotens steigt massiv an, das Aktivierungsniveau der T-Zellen erhöht sich und es kommt zu einer Verschiebung der T-Zell-Subpopulation zu Gunsten der CD8+ zytotoxischen Zellen. Diese Veränderungen belegen, dass die in den vorgestellten Versuchen erzielten Therapieverbesserungen wohl auf immunologisch-zellulärer Ebene begründet liegen.

## 7 Zusammenfassung

Der Anteil des grosszelligen anaplastischen Lymphoms (ALCL) an der Gesamtzahl der Non-Hodgkin-Lymphome liegt bei 2%-8%. Die bisherigen Therapieschemata, bestehend aus Chemo- und/oder Radiotherapie liefern nur unbefriedigende Heilungsergebnisse (mehr als 50% Rezidive nach Fanin et al. 1996) und führen in bis zu 20% der Fälle zu letalen Nebenwirkungen (Riley et al. 1999). Vor diesem Hintergrund scheint die Etablierung neuer, nebenwirkungsarmer Therapieansätze notwendig und sinnvoll.

Mit Hilfe eines Tiermodells des ALCL untersuchte unsere Arbeitsgruppe den therapeutischen Nutzen verschiedener immunmodulatorischer Therapiestrategien in der immunkompetenten syngen C57Bl/6-Maus. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zellulären Veränderungen innerhalb des Immunsystems mit den ermittelten Überlebenszeiten der Tumorwachstums-Versuche in Einklang zu bringen, hierbei wird deutlich, dass eine Immuntherapie mittels der beschriebenen Behandlungsansätze (CpG-ODN, DPT, Ganzzell-Vakzine) zu einer Verbesserung der Immunogenität des Tumors führt. Die somit zu erzielende höhere Effizienz des Immunsystems bei der Tumorabwehr, unter Berücksichtigung der beschriebenen Co-Effekte, wird auf zellulärer Ebene (Steigerung der Gesamtzellzahl im Lymphknoten, erhöhte T-Zellzahl, gesteigertes Niveau der T-Zell-Aktivierung) ebenso deutlich wie bei Betrachtung der durch die Immuntherapie günstig beeinflussten Verlaufsdaten der Tiere. Nahezu alle Tiere profitierten von einer Immuntherapie (unabhängig von deren Art) und bei einem signifikanten Anteil der Tiere konnte das Tumorwachstum vollständig verhindert werden. Wir konnten belegen, dass das Immunsystem nicht nur relevant ist für die Geschwindigkeit des Tumorwachstums, sondern dass durch Beeinflussung des Immunsystems das Tumorwachstum relevant moduliert oder unterdrückt werden kann.

Die Durchführung einer unterstützenden immunmodulatorischen Therapie v.a. zur Rezidivprophylaxe und bei Vorliegen einer „minimal residual disease“ nach Radio-/Chemotherapie ist auch beim Menschen möglich und wird bereits heute zur Bekämpfung einiger Malignome eingesetzt (Therapie des malignen Melanoms,

Rosenberg et al. 1998; kombinierte Immun-Chemotherapie des B-Zell-Lymphoms, Feugier et al. 2005).

Für das hier vorgeschlagene Modell ist zu bemerken, dass ähnliches nur im individuellen Heilversuch durchgeführt werden kann, da Tumorzellen streng genommen kein Medikament darstellen (nicht reproduzierbar herstellbar, keine GMP-Bedingungen) und weil darüber hinaus Tumore heterogen sind und die zelluläre Zusammensetzung variiert. Zudem lassen sich Probleme durch die Vakzinierung mit körpereigenen Nicht-Tumorzellen im Sinne einer Autoreaktion nicht ausschließen.

Die vergleichende Analyse der zellulären Veränderungen innerhalb des Lymphknotens und der Tumorzellwachstumsverläufe in den Versuchstieren ergab darüber hinaus, dass der Einsatz einer komplexen Kombination von Adjuvantien mit vermeintlich additivem Effekt nicht gleichzeitig auch eine Maximalwirkung nach sich zieht. Vielmehr ist vorstellbar, dass möglicherweise durch ein „Zuviel“ an Immunstimulation eine Anergie oder Hyporeaktivität ausgelöst wird. Eine Steigerung der absoluten Zahlen an leukozytären Zellen im untersuchten Lymphknoten korreliert ebenfalls nicht zwingend mit einem größeren Effekt auf das Tumorzellwachstum (vgl. 6.3.4, 5.2.3.6 und Tab. 4). Andererseits lassen sich aber anhand der vorliegenden Daten auch günstige Synergieeffekte unter geeigneten Stimulationsbedingungen ableiten. Wie unter 5.2.3.6 ausgeführt, ist dabei wohl vor allem das Verhältnis einzelner Lymphozyten-Subpopulationen zueinander maßgeblich für ein positives Therapieergebnis.

Unter 6.3.4 wird die stark B-Zell proliferative Wirkung einer kombinierten Verabreichung bestrahlter TS1G6-Zellen mit DPT analysiert. In den Therapiestudien, welche parallel von der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, zeigte sich unter Einfluss dieses Therapieschemas eine Verzögerung des mittleren Tumorzellwachstumsbeginns, sowie eine Protektion vor Tumorentstehung in 40% der Versuchstiere. Dieses positive Ergebnis der Kombinationstherapie widerspricht der in der Literatur beschriebenen Beschleunigung des Tumorzellwachstums unter B-Zell-Stimulation (enhancement) (Qin et al. 1998; Böcker et al. 2002). Die Komplexität

der durch immunmodulierende Einflüsse hervorgerufenen Wirkungen auf das Immunsystem und somit auf den Gesamtorganismus tritt hier einmal mehr zu Tage und belegt die Bedeutung noch vieler weiterer Untersuchungen auf dem Gebiet immunologischer Therapieansätze.

## LITERATURVERZEICHNIS

Alexander K, Daniel W.G, Diener H.-C. et al: Thiemes Innere Medizin, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York, 1999

Ashkar AA, Rosenthal KL: Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med.* 2(6), 545-56 (2002)

Berd D, Maguire H.C. Jr, Mc Cue P, Mastrangelo M.J: Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin Oncol.* 8 (11), 1858-1867 (1992)

Berge R.L, Dukers D.F, Oudejans J.J, Pulford K, Ossenkuppele G.J, de Jong D, Misere F.M.M, Meijer C.J.L.M: Adverse Effects of activated cytotoxic T-lymphocytes on the clinical outcome of nodal Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Blood*, Vol. 993, No. 8, 2688-2696 (1999)

Bittner C, Feller A.C, Renauld J.C, Lange K, Pietrzik R, Jenetzky C, Briesse J, Gaiser T, Müller A, Wiedemann G.J, van Snick J, Merz H: An animal model for anaplastic large cell lymphoma in the immunocompetent syngenic C57Bl/6 mouse. *Lab Invest* 80, 1523-1531 (2000)

Böcker W, Denk H, Heitz P.U: Allgemeine Tumorphathologie. In: Pathologie, 2. Auflage, 163-211, Urban und Fischer, München, Jena (2001)

Branda R.F, Moore A.L, Lafayette A.R, Mathews L, Hong R, Zon G, Brown J, McCormack T: Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Lab Clin Med.* 128, 329-338 (1996)

Brugieres L, Deley MC, Pacquement H, Mequerian-Bedoyan Z, Robert A, Pondarre C, Terrier-Lacombe MJ, Leverger G, Devalck C, Rodare C, Delsol G, Hartmann O: CD30+ anaplastic large cell lymphoma in children: analysis of 82 patients enrolled in two consecutive studies of the French Society of Pediatric Oncology. *Blood* 92, 3591-3598 (1998)

Burnet F.M: The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27 (1970)

Chuang TH, Lee J, Kline L, Mathison JC, Ulevitch RJ: Toll-like receptor 9 mediates CpG DNA signaling.

J Leukoc Biol. 71, 538-44 (2002)

Chiarle R, Simmons WJ, Chai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, Karras JG, Levy DE, Inghirami G: Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target.

Nat Med 11, 623-29 (2005)

Conrad CT, Ernst NR, Dummer W, Brocker EB, Becker J.C: Differential expression of transforming growth factor beta 1 and interleukin 10 in progressing and regressing areas of primary melanoma.

J Exp Clin Cancer Res 18, 225-232 (1999)

Crooke RM: In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. Anticancer Drug Des 6, 609-646 (1991)

de Kann R, van't Veer M.B: Clinical features of CD30 (Ki-1) positive anaplastic large-cell lymphoma (ALCL). Review of the literature

Netherlands Journal of Medicine 43, 277-284 (1993)

Delsol G, Lamant L, Mariame B, Pulford K, Dastugue N, Brousset P, Rigal-Huguet F, al Saati T, Cerretti DP, Morris SW, Mason DY: A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation.

Blood 1, 89 (5), 1483-90 (1997)

De Paepe P, Baens M, van Krieken H, Verhasselt B, Stul M, Simons A, Poppe B, Laureys G, Brons P, Vandenberghe P, Speleman F, Praet M, De Wolf-Peeters C, Marynen P, Wlodarska I: ALK activation by the CLTC-ALK fusion is a recurrent event in large B-Cell lymphoma.

Blood 102, 2638-41 (2003)

Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor stimulates potent, specific and long-lasting anti-tumor immunity.

Proc Natl Acad Sci USA 90, 3539-3543 (1993)

Egeter O, Mocikat R, Ghoreschi K, Dieckmann A, Röcken M: Eradication of Disseminated Lymphomas with CpG DNA Activated T-Helper-1 Cells from Nontransgenic Mice.

Cancer Research 60, 1515-1520 (2000)

Fanin R, Sivistri F, Geromin A, Cerno M, Infanti L, Zaja F, Barillari G, Svignano C, Rinaldi C, Damiani D, Buffoni A, Biffoni F, Baccarini M: Primary systemic CD30 (Ki-1)-positive anaplastic large cell lymphoma of the adult: sequential intensive treatment with the F-MACHOP regimen (+/- radiotherapy) and autologous bone marrow transplantation.

Blood 87, 1243-1248 (1996)

Feugier P, Van Hoof A, Sebban C et al: Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte.

J Clin Oncol 23(18), 4117-4126 (2005)

Foss HD, Anagnostopoulus I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummel JA, Hummel M, Stein H: Anaplastic large cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules.

Blood 88, 4005-4011 (1996)

Freund M: Hämatologie. In: Thiemes Innere Medizin, 1. Auflage, 911-913, Thieme, Stuttgart, New York (1999)

Ghosh A, Sinha P, Das T, Sa G, Ray PK: S. aureus Superantigen Protein A expands CD4+/CD8+/CD19+/CD34+ cells in mice: A potential Immunorestorer  
Biochemical and Biophysical Research Communications 256, 142-146 (1999)

Girndt M, Köhler H: Nephrologie. In: Thiemes Innere Medizin, 1. Auflage, 1439, Thieme, Stuttgart, New York (1999)

Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK: CD28/B7 co-stimulation: a review.  
Crit Rev Immunol 18, 389-418 (1998)

Haris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peters C, Falini B, Gatter C, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles D, Mason D, Muller-Hermelink HC, Pileri SA, Ralfkiaer E, Warnke RA: A revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Group.

Blood Vol 84, no 5, 1361-1392 (1994)

Janeway C.A. und Travers P. In: Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, (1998)

Kadin ME, Carpenter C: Systemic and primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas.

Semin Hematol. 40(3), 244-56, (2003)

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Medizinische Mikrobiologie, 9. Auflage, 73-89, Thieme, Stuttgart, New York (1998)

Klinman DM, Yi AK, Baucage SL, Conover J, Krieg AM: CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and Interferon-gamma.

Proc Natl Acad Sci, 2879-2883 (1996)

Krieg A, Matson S, Waldschmidt TH, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky G, Klinman DM: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.

Nature 374, 546-549 (1995)

Kuefer MU, Look AT, Pulford K, Behm FG, Pattengale PK, Mason DY, Morris SW: Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice.

Blood 90, 2901-2906 (1997)

Lai R, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Ramdas L, Goy AH, Cutler C, Fujio Y, Kunisada K, Amin HM, Gilles F: Signal transducer and activator of transcription-3 activation contributes to high tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma.

Am J Pathol, 164, 2251-58, (2004)

Lange K, Uckert W, Blankenstein T, Nadrowitz R, Bittner C, Renauld JC, van Snick J, Feller AC, Merz H: Overexpression of NPM-ALK induces different types of malignant lymphomas in IL-9 transgenic mice.

Oncogene, 22(4), 517-27 (2003)

Lennert K und Feller A: Large Cell Anaplastic Lymphoma of T-Cell Type (Ki-1+). In: Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas. 2<sup>nd</sup> Edition, 229-244, Springer, Berlin (1992)

Liu Y, Wegner RH, Zhao M, Nielsen PJ: Distinct Costimulatory Molecules are required for the Induction of Effector and Memory Cytotoxic T-Lymphocytes. J Exp Med, Vol. 185, No. 2, 251-261 (1997)

Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hanson J, Pisa P, Zhang QJ, Masucci MG, Kissling R: IL-10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T-cells and downregulates HLA class1 expression. J Exp Med 180, 2371 (1994)

a: Merz H, Fliedner A, Orscheschek K, Binder T, Sebald W, Müller-Hermelink HK, Feller AC: Cytokine expression in T-cell lymphomas and Hodgkin's disease. Possible implication in autocrine and paracrine production as a potential basis for neoplastic growth. Am J Pathol 139, 1173-1180 (1991)

b: Merz H, Houssiau FA, Orscheschek K, Renauld JC, Fliedner A, Herin M, Noel H, Kadin M, Müller-Hermelink HK, Van-Snick J, et al: IL-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. Blood 78, 1311-1317 (1991)

Milpied N, Deconinck E, Gaillard F et al: Initial treatment of aggressive lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell support. N Engl J Med 350(13), 1287-1295 (2004)

Lonsdorf AS, Kuekrek H, Stern BV, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M: Intratumor CpG-Oligodeoxynucleotide Injection Induces Protective Antitumor T Cell Immunity The Journal of Immunology 171, 3941-46 (2003)

Messina JP, Gilkeson DS, Piszky DS: Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. J Immunol 147, 1759 (1991)

Modi WS, Pollock DD, Mock BA, Banner C, Renauld JC, van Snick J: Regional localization of the human glutaminase (GLS) and interleukin-9 (IL9) genes by in-situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 57(2-3), 114-6 (1991)

Ohta A, Sato N, Yahata T, Ohmi Y, Santa K, Sato K, Tashiro H, Habu S, Nishimura T: Manipulation of TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub> balance in vivo by adoptive transfer of antigen-specific TH<sub>1</sub> or TH<sub>2</sub> cells.

J Immunol Methods 10; 209(1): 85-92 (1997)

Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Horstman A, Vos W, Baak JPA, Kluin PM, van der Valk P, Walboomers JMM, Meijer CJMM: Analysis of major histocompatibility complex class 1 expression in Reed-Sternberg cells in relation to the cytotoxic T-cell response in Epstein-Barr Virus positive and negative Hodgkin's Disease.

Blood 87, 3844 (1996)

Pan ZK, Ikonomidis G, Lazenby A, Pardoll DM, Paterson Y: A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumor antigen protects mice against lethal tumor cell challenge and causes regression of established tumors.

Nat Med 1, 471-477 (1995)

Pardoll DM: Cancer vaccines.

Nat Med 4, 525-531 (1998)

Pfreundschuh M, Schmits R, Zeynalova S, Lengfelder E, Franke A, Steinhauer H, Reiser M, Clemens M, Nickenig C et al. German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL), Medizinische Klinik I, Saarland University Medical School, Homburg, Saarland, Germany: Six, Not Eight Cycles of Bi-Weekly CHOP with Rituximab (R-CHOP-14) Is the Preferred Treatment for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Results of the RICOVER-60 Trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL).

Blood 106(11), abstract 13 (2005)

Plautz GE, Yang ZY, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel G.J: Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors.

Proc Natl Acad Sci USA 90 (10), 4645-4649 (1993 May 15)

Qin Z, Richter G, Schüler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T: B-cells inhibit induction of T-cell-dependent tumor immunity.

Nature Medicine Vol. 4, No. 5, 627-630 (1998)

Riley LC, Hann IM, Wheatey K, Stevens RF: Treatment-related deaths during induction and first remission of acute myeloid leukaemia in children treated on the Tenth Medical Research Council acute myeloid leukaemia trial (MRC AML10).

Br J Haematol 106, 436-444 (1999)

Rosenberg SA, Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Restifo NP: Apoptotic Death of CD8+ T-lymphocytes after immunization: Induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells.

J Immunol 161, 5313-5320 (1998)

Rosendahl A, Kristensson K, Hansson J, Riesbeck K, Kalland T, Dohlsten M: Perforin and IFN-gamma are involved in the antitumor effects of antibody-target superantigens.

The Journal of Immunology 160, 5309-5313 (1998)

Roth C, Rochlitz C, Kourilsky P: Immune Response against Tumors.

Adv Immunol 57, 281-351 (1994)

Rudolph C, Bittner C, Feller AC, Merz H, Schlegelberger B: Cytogenetic characteristics of a murine in vitro model for the human anaplastic large cell lymphoma (ALCL).

Cytogenet Genome Res. 114(3-4), 292-5 (2006)

Schweighoffer T: Tumor cells expressing a recall antigen are powerful cancer vaccines.

Eur J Immunol 26, 2559-2564 (1996)

Scott P, Kaufmann SHE: The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection.

Immunology Today Vol. 12, No. 10, 346-348 (1991)

Sgrignoli A, Abati A: Cytologic diagnosis of anaplastic large cell lymphoma.

Acta Cytologica Vol. 41, No. 4, 1048-1052 (1997)

Sparwasser T, Mithke T, Lipford G, Borschert K, Häcker H, Heeg K, Wagner HBacterial DNA causes septic shock.

Nature 386, 336 (1997)

Shevach EM: CD4+CD25+ Suppressor T Cells: More Questions than Answers

Nat Rev Immunol 2(6), 389-400 (2002)

Shi X, Franko B, Frantz C, Amin HM, Lai R: JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells.

Br J Haematol 135(1), 26-32 (2006)

Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA: Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA.

J Immunol 157, 2116-2122 (1996)

Stockinger B, Barthlott T, Kassiotis G: T cell regulation: a special job or everyone's responsibility?

Nature Immunol. 2, 757-758 (2001)

Stover CK, Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SB, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom BR: New use of BCG for recombinant vaccines.

Nature 351, 456-460 (1991)

Taga K, Tosato G: IL-10 inhibits human T-cell proliferation and IL-2 production.

J Immunol 148, 1143 (1992)

Thompson JE: JAK Protein Kinase Inhibitors.

Drug News Perspect 18, 305-10 (2005)

Tilly H, Gaulard P, Lepage E, Dumontet C, Diebold J, Plantier I, Berger F, Symann M, Petrella T, Lederlin P, und Briere J: Primary anaplastic large-cell lymphoma in adults: clinical presentation, immunophenotype and outcome.

Blood 90, 3727-3734 (1997)

Urban JL, Burton RC, Holland JM, Kripke ML, Schreiber H: Mechanisms of syngenic tumor rejection. Susceptibility of host-selected progressor variants to various immunological effector cells.

J Exp Med 155, 557-573 (1982)

Uyttenhove C, Druetz C, Renauld JC, Herin M, Noel H, Van-Snick J: Autonomous growth and tumorigenicity induced by P40/interleukin 9 cDNA transfection of a mouse P40-dependent T-Cell line.

J Exp Med 173, 519-522 (1991)

Uyttenhove C, Maryanski J, Boon T: Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression.

J Exp Med 157, 1040-1052 (1983)

van Snick J, Goethals A, Renauld JC, van Roost E, Uyttenhove C, Rubira M, Moritz R, Simpson R: Cloning and Characterization of a cDNA for a new mouse T-cell growth factor.

J Exp Med 169, 363-368 (1989)

Wallich R, Bulbuc N, Hammerling GJ, Katzav S, Segal S, Feldman M: Abrogation of metastatic properties of tumor cells by de-novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection.

Nature 315, 301-305 (1985)

Wang M, Beonte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP: Active immunotherapy of cancer with a non-replicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen.

J Immunol 154, 4685-4692 (1995)

Wortzel RD, Philipps C, Schreiber H: Multiple tumor-specific antigens expressed on a single tumor cell.

Nature 304, 165-167 (1983)

Zinzani PL, Martelli M, Maganoli M, Zaccaria A, Ronconi F, Cantonetti M, Bocchia M, Maara R, Gobbi M, Falini B, Gherlinzoni F, Moretti L, De-Renzo A, Mazza P, Pavone E, Sabattini E, Amendola A, Bendani M, Pileri SA, Mandelli F, Tura S: Anaplastic large cell lymphoma Hodgkin`s-like: a randomized trial of ABVD versus MACOB-B with and without radiation therapy.

Blood 92, 790-794 (1998)

## DANKSAGUNG

Dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. med. A. C. Feller danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Versuchsmaterialien.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. H. Merz, danke ich sehr herzlich für das Überlassen des Themas der vorliegenden Arbeit und seine regelmäßige und kontinuierliche Unterstützung bei allen praktischen und bürokratischen Problemen.

Bei meiner Betreuerin, Frau Dr. med. C. Bittner möchte ich mich für die akribische Einarbeitung in die Laborarbeit, ihre tatkräftige Unterstützung und für ihre Bereitschaft bedanken, dass sie auch nach ihrem Ausscheiden stets als Ansprechpartnerin präsent war.

Mein herzlicher Dank gilt insbesondere auch meinen Eltern, Elga und Hartmut Hölzemann, sowie meinem Bruden Hendrik Hölzemann, deren Unterstützung mir das Studium ermöglicht hat und die mir auch darüber hinaus stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Constanze Gawehn danke ich sehr herzlich für Ihre konstruktive Kritik und Ihre Verbesserungsvorschläge hinsichtlich der äußeren Gestaltung der Arbeit.

## LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten**

Name: Martin Hölzemann  
Adresse: Goßlerstrasse 18  
12161 Berlin  
Geburtsdatum: 01.12.1976  
Geburtsort: Stuttgart

### **Schulbildung**

1983-1987 Gemeinschaftsgrundschule Wiehl  
1987-1996 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Wiehl

### **Studium und Berufstätigkeit**

10/96-04/99 Beginn des Medizinstudiums an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
04/99 Physikum  
04/99-10/03 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck  
04/00 1. Staatsexamen  
05/00 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Pathologie  
08/02 2. Staatsexamen  
12/03 3. Staatsexamen  
05/04-07/06 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Chirurgischen Klinik I der Charité-Campus Benjamin Franklin Berlin  
08/06 Assistenzarzt der Chirurgischen Abteilung des St. Hedwig-Krankenhauses Berlin