

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

**DNA-Vakzinierung zur Behandlung von
minimal residual disease bei Ph⁺ akuter
lymphoblastischer Leukämie im syngenem
Mausmodell**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Yvonne Rott

aus Düren

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Herting
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. April 2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15. April 2013

Für meine Familie, die mir diesen Weg ermöglichte und
ohne die ich dieses Ziel nie erreicht hätte.

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| Vorbemerkung | IV |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis | VI |
| Nomenklatur | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Philadelphia-Chromosom-positive Akute Lymphoblastische Leukämie | 1 |
| 1.1.1 Pathogenese | 1 |
| 1.1.2 Therapie der ALL..... | 3 |
| 1.2 Stand der Forschung..... | 6 |
| 1.2.1 Immuntherapie maligner Erkrankungen..... | 6 |
| 1.2.2 Vakzine..... | 7 |
| 1.3 Zielsetzung/Fragestellung | 12 |
| 2 Material und Methoden | 13 |
| 2.1 Material | 13 |
| 2.1.1 Geräte | 13 |
| 2.1.2 Lösungen/Medien/Puffer/Reagenzien | 13 |
| 2.1.3 Verbrauchs-/Labormaterialien | 15 |
| 2.1.4 Antikörper | 16 |
| 2.1.5 Zelllinien | 17 |
| 2.1.6 Syngenes BM185/Balb/c- Mausmodell..... | 17 |
| 2.1.7 MIDGE-Vektor | 19 |
| 2.1.8 dSLIM..... | 20 |
| 2.1.9 Poly-(β -Aminoester)..... | 21 |
| 2.1.10 Leukämiespezifische DNA-Vakzine..... | 22 |
| 2.1.11 Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib mesylate..... | 23 |
| 2.1.12 6-Mercaptopurin (6-MP) | 24 |
| 2.1.13 Anthocyane | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2 Methoden | 26 |
| 2.2.1 Zellkultur | 26 |
| 2.2.2 Narkose | 27 |
| 2.2.3 In vivo Zelldepletion | 27 |
| 2.2.4 Vakzinierung | 28 |
| 2.2.5 Komplexierung der Vakzine mit Poly-(β -aminoestern) | 28 |
| 2.2.6 Leukämiechallenge | 29 |
| 2.2.7 Therapie | 29 |
| 2.2.8 Bestimmung der CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen und NK-Zellen | 30 |
| 2.2.9 Alamar Blue Proliferationsassay | 31 |
| 2.2.10 Caspase Apoptoseassay | 32 |
| 2.2.11 Nachweis der Zytokinexpressions nach DNA-Vakzinierung | 32 |
| 3 Ergebnisse | 35 |
| 3.1 Optimierung der Basisvakzine BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM | 36 |
| 3.2 CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen sind an der Immunantwort beteiligt | 38 |
| 3.3 Antileukämischer Memory Effekt der DNA-Vakzine | 40 |
| 3.4 6-MP, Imatinib mesylate und Anthocyane inhibieren die Proliferation von Leukämiezellen und induzieren die Apoptose über Caspasen in vitro | 41 |
| 3.5 Die Vakzin-Monotherapie ist den Monotherapien Imatinib mesylate, Cyanidin-3- Rutinosid, OptiBerry® BX600 und 6-MP überlegen | 43 |
| 3.6 Die Kombination der DNA-Vakzine mit 6-MP führt zum Synergismus und zeigt die höchste Effizienz gegen eine präexistente Leukämie | 45 |
| 3.7 Die DNA-Vakzine induziert die mRNA-Expression der Transgene BCR-ABL, GM-CSF und IL-12 sowie verschiedener Zytokine | 46 |
| 4 Diskussion | 48 |
| 4.1 Optimierung der Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM | 49 |
| 4.2 Beteiligung der CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen und NK-Zellen an der Immunantwort | 51 |
| 4.3 Induktion eines antileukämischen Memory-Effekts der DNA-Vakzine | 54 |
| 4.4 Inhibition der Proliferation von Leukämiezellen durch 6-MP, Imatinib mesylate und Anthocyane in vitro | 54 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5 Die optimierte Vakzine ist die beste Monotherapie | 56 |
| 4.6 Die Kombination der DNA-Vakzine mit 6-MP erreicht die höchste Effizienz ... | 59 |
| 4.7 mRNA-Expression der Transgene und verschiedener Zytokine | 60 |
| 5 Zusammenfassung..... | 62 |
| Literaturverzeichnis..... | 63 |
| Danksagung | |
| Erklärung | |
| Kongressbeiträge/ Abstracts-Veröffentlichungen | |

Vorbemerkung

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

Köchling J, Rott Y, Arndt S, Marschke C, Schmidt M, Wittig B, Kalies K, Westermann J, Henze G.: Prevention and synergistic control of Ph(+) ALL by a DNA vaccine and 6-mercaptopurine. *Vaccine*. 2012 Sep 7;30(41):5949-55. Epub 2012 Jul 27.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der BCR-ABL-Fusionsgene | 2 |
| Abbildung 2: Therapieübersicht nach der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie | 4 |
| Abbildung 3: Therapieübersicht nach der EsPhALL Studie 2006 | 5 |
| Abbildung 4: Syngenes BM185/Balb/c-Mausmodell | 18 |
| Abbildung 5: Elemente des MIDGE-Vektors..... | 19 |
| Abbildung 6: Immunmodulator dSLIM | 20 |
| Abbildung 7: Poly-(β -Aminoester)..... | 21 |
| Abbildung 8: Strukturformel von Imatinib mesylate..... | 23 |
| Abbildung 9: Anthocyane | 25 |
| Abbildung 10: Überlebensrate der unbehandelten Kontrolle und mit unterschiedlichen DNA-Vakzinen immunisierten Mäusen | 37 |
| Abbildung 11: Nachweis der <i>in vivo</i> Depletionseffizienz mit FACS-Analyse..... | 39 |
| Abbildung 12: Zytotoxizität der nicht-immunsuppressiven Substanzen bei den Leukämiezelllinien BM185 (A) und K562 (B) | 42 |
| Abbildung 13: Leukämiekinetik nach Behandlung mit 6-MP oder DNA-Vakzine | 45 |
| Abbildung 14: Expression der kodierten Transgene, IL-4 und IFN- γ | 47 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Primersequenzen, Amplikongröße und Accession Number der analysierten Gene ^a | 33 |
| Tabelle 2: Optimierung der Basisvakzine BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM (V) durch die zusätzlichen Komponenten CD40-L, IL-12 oder IL-27 | 36 |
| Tabelle 3 : Komplexierung der Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM | 37 |
| Tabelle 4: Abhängigkeit der Vakzineffizienz von <i>in vivo</i> CD4 ⁺ -T-; CD8 ⁺ -T- oder NK-Zelldepletion | 38 |
| Tabelle 5: Effizienz der DNA-Vakzine, des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib mesylate, 6-MP und der Anthocyane | 44 |
| Tabelle 6: Vergleich der Vakzine-Monotherapie mit den Kombinationstherapien..... | 46 |

Nomenklatur

Abkürzungen

| | |
|-----------------|--------------------------------|
| for. | forward |
| i.c. | intracutan |
| i.m. | intramuskulär |
| i.p. | intraperitoneal |
| Kryo | Kryoröhrchen |
| Ph ⁺ | Philadelphia-Chromosom positiv |
| p.o. | per os |
| rev. | reverse |
| s.c. | subcutan |

Akronyme

| | |
|-------|---|
| ABL | Abelson murine leukeia virus |
| ADI | acceptable daily intake |
| ALL | Akute Lymphoblastische Leukämie |
| APC | Allophycocyanin |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| BCR | Breakpoint Cluster Region |
| BFM | Berlin Frankfurt Münster |
| CD40L | CD40-Ligand |
| CFSE | 5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester |
| CLL | Chronisch lymphatische Leukämie |
| CML | Chronisch myeloische Leukämie |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CpG | Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid |
| CTL | Zytotoxischer T-Lymphozyt |
| DC | Dendritische Zelle |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |

| | |
|---------------|--|
| FACS | Fluorescence-activated cell sorter |
| FBS bzw. FCS | Fötales Bovines Serum bzw. Fetal Calf Serum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HBSS | Hank´s Buffered Salt Solution |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| HGPRT | hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase |
| HPV | humane Papillomviren |
| ICAM | interzelluläre Adhäsionsmoleküle |
| ICE | Interleukin Converting Enzyme |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| ing LK | inguinale Lymphknoten |
| L-Glu | L-Glutamin |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M-BCR | major breakpoint cluster region |
| m-BCR | minor breakpoint cluster region |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| McCoy's | Medium benannt nach Name des Erfinders |
| MRD | Minimal residual disease |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| ODN | Oligodesoxynukleotide |
| PBMC | Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PDGFR | platelet derived growth factor receptor |
| PE | Phycoerithrin |
| RAS | Rat Sarcoma |
| RNA | Ribonukleinsäuren |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SDS | Sequence Detection System |
| TCR | T-Zellrezeptor |
| Th | T-Helfer |

| | |
|--------------|--|
| TLR | Toll-Like-Rezeptor |
| TNF α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| TPMT | Thiopurin-Methyltransferase |
| TrisHCL | Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid |
| TVT | Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz |
| UV | Ultraviolett |
| 6-MP | 6-Mercaptopurin |
| WHO | World Health Organization |
| XO | Xanthine Oxidase |

Maßeinheiten

| | |
|-----------------|-------------------|
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| g | Gramm |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| M | Molar |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| μ M | Mikromolar |
| μ m | Mikrometer |
| μ g | Mikrogramm |
| mm | Millimeter |
| Nm | Nanometer |

1 Einleitung

1.1 Philadelphia-Chromosom-positive Akute Lymphoblastische Leukämie

1.1.1 Pathogenese

Leukämien sind maligne Erkrankungen hämopoetischer Zellen. Nach Zelltyp wird zwischen myeloischen und lymphoblastischen Leukämien unterschieden, deren Verlauf chronisch oder akut sein kann. Diese Dissertation befasst sich ausschließlich mit der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), die mit 80-85% den größten Anteil der Leukämien im Kindesalter darstellt. Pro Jahr werden in Deutschland circa 550 ALL-Neuerkrankungen bei Kindern bis zum vollendeten 14. Lebensjahr diagnostiziert [1]. Die höchste Inzidenz zeigt sich im Alter von 2 bis 4 Jahren mit 6,5 Erkrankungen pro 100.000 Kinder im Jahr. Durch die maligne Transformation unreifer lymphatischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, Thymus oder lymphatischen Geweben, kommt es zu einer Proliferation von lymphatischen Blasten und Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Die Heilungschancen der an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankten Kinder liegen bei Ersterkrankung dank einer optimierten risikoadaptierten Polychemotherapie derzeit bei etwa 87%. Im Vergleich dazu lag die Fünfjahresüberlebensrate vor 1965 nur bei 5% [2]. Dennoch erleiden etwa 15-20%, das entspricht jedem siebten Kind mit ALL, ein Rezidiv, wobei nur 35-40% dieser Kinder kurativ behandelt werden können [3,4].

Die 1960 erstmals von Nowell und Hungerford als verkürztes Chromosom 22 (Philadelphia-Chromosom) beschriebene und nach ihrem Entdeckungsort benannte Philadelphia-Translokation wurde mit der Entstehung von Leukämien in Verbindung gebracht. Die Ursache für das verkürzte Chromosom 22 liegt wie Rowley 1973 [5] nachweisen konnte, in einer balancierten reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 (t(9;22)). Aufgrund der Translokation kommt es zur Fusion des Breakpoint-Cluster-Region (BCR)-Gens (Chromosom 22) mit dem c-ABL (Abelson murine leukemia virus)-Gen (Chromosom 9), wodurch das Fusionsgen BCR-ABL entsteht [6]. Die Ursachen der Translokation sind unbekannt, jedoch konnten Deininger et al. 1998 zeigen, dass es Risikofaktoren, wie ionisierende Strahlung gibt, die zu leukämieassoziierten Fusionsgenen führen können [7].

Während der Bruchpunkt auf Chromosom 9 zwischen Exon 1 und Exon 2 (a1 und a2) innerhalb des ABL-Gens liegt, gibt es auf Chromosom 22 drei mögliche Bruchpunkte, so dass Fusionsgene unterschiedlicher Größe sowie unterschiedlicher onkogener Potenz entstehen. Bei dem „major breakpoint“ (M-BCR) befindet sich der Bruchpunkt zwischen Exon 12 und 16 (b1-b5) entweder zwischen b2 und b3 (b2a2) oder zwischen b3 und b4 (b3a2). Beide Bruchpunkte führen zu einem Fusionsgen, das für das Fusionsprotein BCR-ABL^{p210} kodiert, wobei p210 insbesondere bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML), aber in geringerem Maße auch bei der Philadelphia-Chromosom-positiven ALL (Ph⁺-ALL), nachgewiesen wird. Der Bruchpunkt des „minor breakpoint“ (m-BCR) liegt im ersten Intron von BCR (e1a2) und führt zur Expression des Ph⁺-ALL spezifischen BCR-ABL^{p185} [6]. Das Fusionsprotein BCR-ABL^{p230} stammt von dem Bruchpunkt μ -BCR (e19a2) und ist bei Patienten mit chronisch neutrophiler Leukämie nachzuweisen (Abbildung 1) [8].

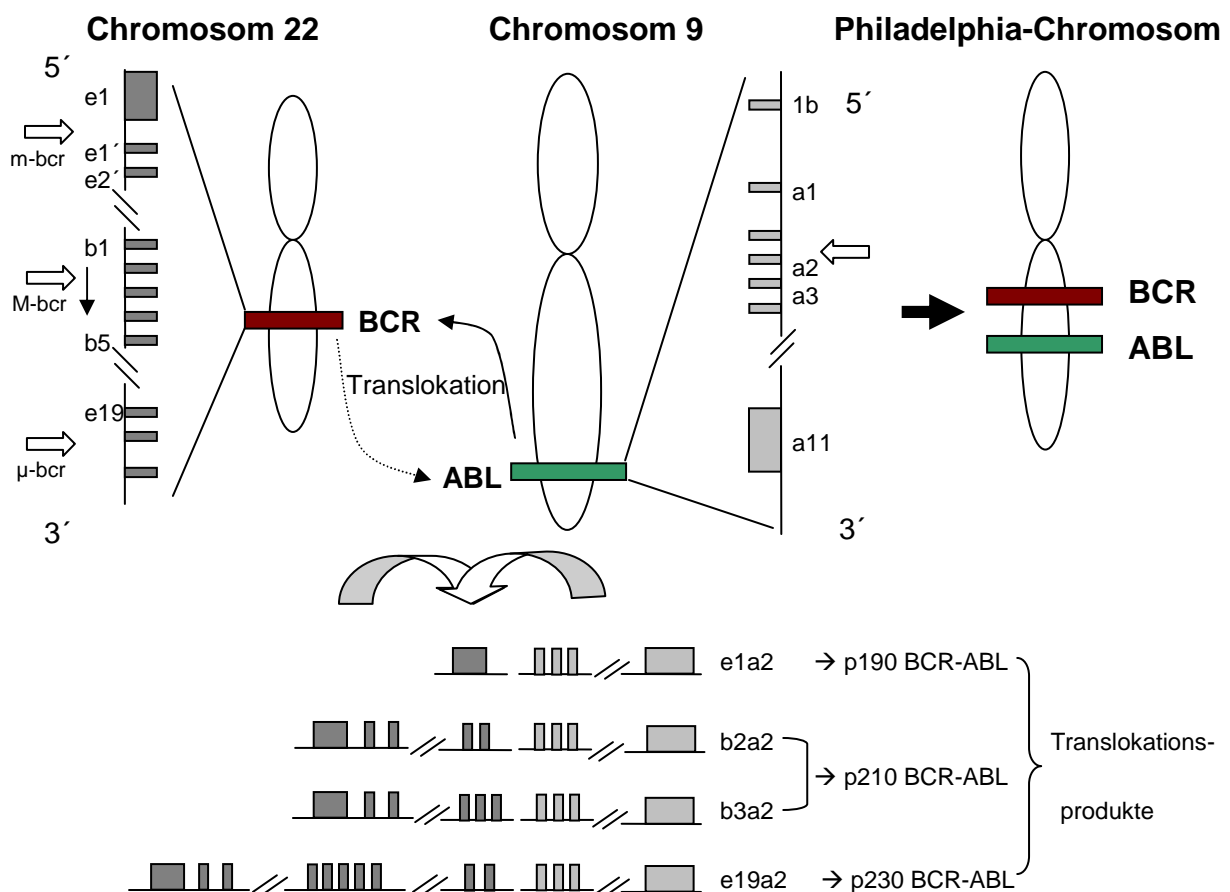


Abbildung 1: Schematische Darstellung der BCR-ABL-Fusionsgene (Faderl et al. 1999)
 Das Philadelphia-Chromosom entsteht aus einer balancierten reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und 22. Im oberen Teil der Abbildung sind die Gene bcr und abl mit Exonen (e1 bis e20 bzw. b1 bis b5 für bcr, a1 bis a11 für abl) und Bruchpunkten (\Rightarrow) dargestellt. Je nach Lage des Bruchpunktes von bcr (m-bcr, M-bcr, μ -bcr) entstehen die im unteren Teil der Abbildung aufgeführten Translokationen (e1a2, b2a2, b3a2, e19a2) mit den „Translokationsprodukten“ p190 BCR-ABL, p210 BCR-ABL oder p230BCR-ABL.

Die Fusion von BCR mit c-ABL führt unabhängig von dem Bruchpunkt zu einer konstitutiven Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase [9], der Induktion der Tyrosinphosphorylierung sowie der Inhibition der RAS-Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen. Bei 95% der Patienten mit CML und 25 bis 30% der adulten ALL-Patienten bzw. 3 bis 5% der erkrankten Kinder kann die reziproke chromosomale Translokation t(9;22)(q34;q11) und ein Transkript des BCR-ABL Fusionsgens nachgewiesen werden [6;10]. Der Befund einer definierten chromosomalen Translokation, die bei akuten Leukämien primär die Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene betrifft, korreliert signifikant mit dem Therapieerfolg und der Prognose [11]. Untersuchungen zeigten, dass die BCR-ABL Translokation ebenfalls bei 22 von 73 gesunden Erwachsenen und einem von 22 gesunden Kindern im Blut nachgewiesen werden kann, wo sie nicht zu einer Leukämie führt [12]. In diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit des Immunsystems, Tumore zu erkennen und zu eliminieren, Gegenstand wissenschaftlicher Debatten. Die Theorie der Immunosurveillance (Immunüberwachung) wurde bereits 1909 von Paul Ehrlich aufgestellt und später von Burnet und Thomas aufgegriffen [13,14]. Da es sich bei der vom Immunsystem gesteuerten Tumorabwehr um einen sehr komplexen Prozess handelt, wurde der Begriff „Immunoediting“ eingeführt [15-17]. Der Prozess des „Immunoediting“ wird in drei Phasen aufgeteilt, die als die drei „E´s“ des „Immunoediting“ bezeichnet werden: Eliminierung, Equilibrium und „Escape“ [18]. Die Eliminierungsphase spiegelt das klassische Konzept der Immunosurveillance wieder, indem die Tumorzellen durch Effektor-Immunzellen zerstört werden. In der zweiten Phase, dem Equilibrium, besteht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Eliminierung der Tumorzellen durch das Immunsystem. Mit „Escape“ wird die Phase bezeichnet, in der die Tumorzellen der immunologischen Überwachung entgehen, unkontrolliert proliferieren und der Tumor in Folge dessen klinisch detektierbar wird [18].

1.1.2 Therapie der ALL

Die Standardtherapie der ALL im Kindesalter ist eine aus drei Blöcken bestehende Polychemotherapie, die mit einer mehrere Wochen dauernden Induktionstherapie beginnt. Durch die Gabe von Zytostatika soll in dieser Phase eine komplette Remission erreicht werden. Die zweite Phase, die Konsolidierungstherapie, dient dazu, das Rezidiv-Risiko zu reduzieren. Auf die Konsolidierungsphase folgt die Re-

Induktionsphase, deren Zytostatika-Kombinationen und Dosierung im Wesentlichen identisch mit denen der Induktionsphase sind. An diese drei Phasen schließt sich die Erhaltungsphase an, die die Rezidivinzidenz signifikant senkt. Während der Erhaltungsphase bekommen die Patienten eine orale Chemotherapie mit Methotrexat (20 mg/m²/Woche) und 6-Mercaptopurin (50 mg/m²/Tag). Die Erhaltungstherapie wird bis zwei Jahre nach Behandlungsbeginn weitergeführt [19,20]. Die bei sehr hohem Rückfallrisiko empfohlene Stammzelltransplantation^a ist nicht Bestandteil der Studie AIEOP-BFM ALL 2009 (Abbildung 2), sondern der Studie ALL SZT-BFM 2003.

AIEOP-BFM ALL 2009

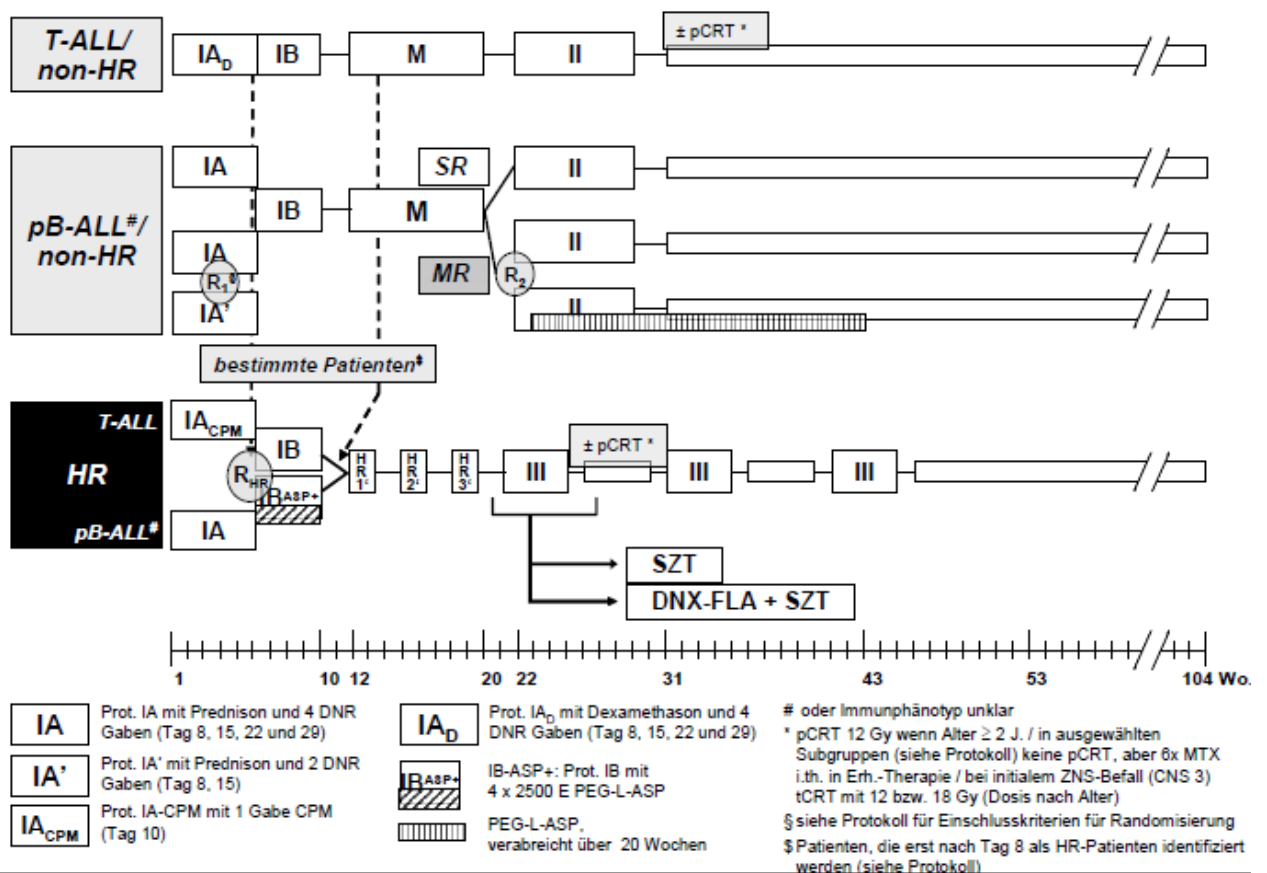


Abbildung 2: Therapieübersicht nach der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie

In Abhängigkeit von der Risikogruppe erhalten die Patienten unterschiedliche Therapien. Zu Beginn erhalten alle Patienten „Protokoll I“ (9 Wochen). Bei Patienten mit Standardrisiko (SR) oder mittlerem Risiko (MR) schließen sich „Protokoll M“ (8 Wochen) und „Protokoll II“ (7 Wochen) an. Hochrisikopatienten (HR) erhalten drei kurze (1 Woche), sehr intensive Therapieblöcke („HR-Blöcke“). Darauf folgt dreimal „Protokoll III“ (je 4 Wochen) mit anschließender Erhaltungstherapie. Zwischenzeitliche Therapiepausen dienen zur Erholung. Bei erhöhtem Risiko für ein cerebrales Rezidiv, ist eine Bestrahlung des Zentralnervensystems (CRT) vorgesehen. Daunorubicin (DNR), Cyclophosphamid (CPM), L-ASPARAGINASE (ASP), B-Vorläufer-ALL (pB-ALL), T-Linien-ALL (T-ALL).

^a Einige Hochrisikopatienten benötigen eine Stammzelltransplantation (SZT) nach dem 3. HR-Block (Studie ALL SZT-BFM 2003). Lässt sich die Leukämie auch noch nach dem 3. HR-Block nachweisen, bekommen diese Patienten vor der SZT eine weitere intensivierte Chemotherapie (DNX-FLA).

Alle Patienten werden zunächst 4 Wochen nach dem nationalen Therapieprotokoll AIEOP-BFM 2009 behandelt. Innerhalb dieser Zeit muß der Ph⁺-Status geklärt werden. Bei einem positiven BCR/ABL-Befund wird nach dem Behandlungsprotokoll der Studie EsPhALL^b fortgefahren (siehe Abbildung 3). Diese Studie prüft, ob Imatinib mesylate zu einem besseren Therapieansprechen der Leukämie führt.

EsPhALL

Good Risk

MRD
Zeitpunkte

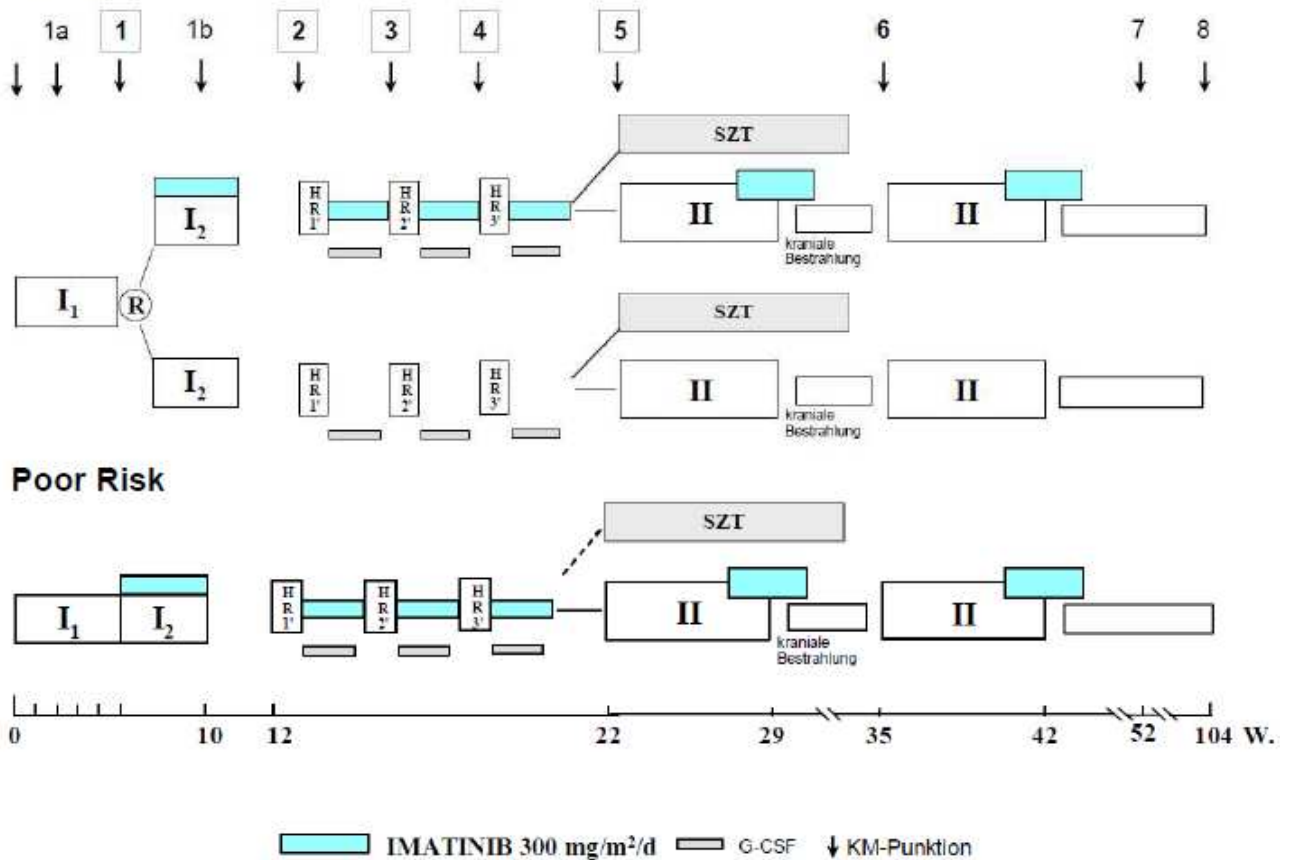


Abbildung 3: Therapieübersicht nach der EsPhALL Studie 2006 (Stand 25.09.2006)

Im Anschluss an die Behandlung nach dem Protokoll AIEOP-BFM2009 folgt Phase I₁ (4 Wochen) der Induktionstherapie nach dem Behandlungsprotokoll EsPhALL 2006. An Tag 78 beginnt die Konsolidierungstherapie, bestehend aus 3 HR-Blöcken (je 1 Woche). Auf die 3 HR-Blöcke folgen zwei Protokolle II, bestehend aus Phase IIa und IIb (je 4 Wochen), unterbrochen von einer 4-wöchigen Intervalltherapie. Während der Schädelbestrahlung in der Intervalltherapie erfolgen 2 i.th. Gaben MTX. Zwei Wochen nach dem 2. Protokoll II schließt sich die Erhaltungstherapie an. Imatinib wird in der zweiten Phase des Protokoll I parallel zur Chemotherapie für 28 Tage, im Anschluss an die HR-Blöcke für jeweils 14 Tage sowie im Anschluss und parallel zur zweiten Phase der beiden Protokolle für je 28 Tage verabreicht.

^b Seit Schließung der Randomisierung (31.12.2009) wird Imatinib nicht mehr risikoadaptiert, sondern allen Patienten der „Poor und Good Risk-Gruppe“ in einer täglichen Dosis von 300 mg/m² Körperoberfläche verabreicht. Der Behandlungszeitpunkt ohne Imatinib fällt damit weg.

1.2 Stand der Forschung

1.2.1 Immuntherapie maligner Erkrankungen

Zytokine steuern die Interaktion zwischen den Zellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems. So können Interferone und Interleukine zur Tumorabstoßung beitragen, das Tumorstadium hemmen oder eine Steigerung der Immunabwehr induzieren [21]. Der Einsatz monoklonaler Antikörper in der Krebstherapie induziert durch die Bindung an tumorassoziierte Oberflächenmoleküle [22] entweder die Apoptose des Tumors oder eine antiproliferative Wirkung [23-25]. Die T-Zell-basierte Tumorthherapie ist eine Therapieform, die über tumorspezifische T-Lymphozyten wirkt. Die T-Lymphozyten spielen bei der allogenen Knochenmarktransplantation eine bedeutende Rolle für die immunologische Abwehr residueller Leukämiezellen. Die adoptive T-Zelltherapie, bei der den Patienten *ex vivo* kultivierte tumorantigen-spezifische T-Lymphozyten injiziert werden, hat gezeigt, dass T-Zellen selbst große Tumormassen eliminieren können. Dennoch ist die adoptive T-Zelltherapie bei Tumorerkrankungen bisher nur in wenigen Fällen erfolgreich, z.B. malignes Melanom und CML. Für diese Einschränkung gibt es verschiedene Ursachen. Da Tumorzellen nur selten als körperfremd erkannt werden, sind tumorreaktive, zytotoxische T-Zellen schwer zu isolieren und stehen daher nicht für alle Tumorerkrankungen zur Verfügung. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, die für den adoptiven Transfer benötigte Menge T-Zellen innerhalb eines zeitlich begrenzten Rahmens zu generieren.

Die Vakzinierung mit inaktivierten Tumorzellen bzw. tumorspezifischen Antigenen stellt eine attraktive Strategie zur Behandlung von Tumoren bzw. zur Vorbeugung von Rezidiven dar. Das Ziel vieler Studien und auch der hier beschriebenen Arbeit ist es, konkrete Ansätze zur Optimierung der Vakzinen zu finden [26]. Der bisher beschrittene Weg zur Entwicklung von effektiveren Vakzinen ist im Folgenden dargestellt.

1.2.2 Der Weg zur effektiveren Vakzine

Die Bezeichnung Vakzine ist auf den Begriff Vakzination von lat. *vaccinus* (von *Kühen stammend*), ein ursprünglich im Jahr 1796 von Edward Jenner entwickeltes Verfahren zur Pockenschutzimpfung, zurückzuführen.

Im Gegensatz zur aktiven Impfung erfolgt die passive Impfung mit Antikörpern. Emil von Behring legte 1890 den Grundstein zur passiven Immunisierung indem er an Diphtherie erkrankte Kinder mittels Serumtherapie heilen konnte. Das Prinzip der passiven Impfung ist, dass die applizierten Antikörper an die Erreger binden und das Immunsystem entsprechend schnell reagieren kann. Im Gegensatz zur aktiven Impfung hält die Wirkung der passiven Impfung maximal einige Monate an, da in der Regel kein „immunologisches Gedächtnis“ gebildet wird.

Bei der auch als Vakzinierung bezeichneten aktiven Impfung, werden entweder Lebendimpfstoffe, welche abgeschwächte aber noch vermehrungsfähige Erreger beinhalten oder Totimpfstoffe, d.h. abgetötete oder fragmentierte Erreger, appliziert, die nicht in der Lage sind, die Krankheit auszulösen. Mit Hilfe der Impfung wird die Produktion spezifischer Antikörper durch die B-Lymphozyten induziert. Im Anschluss an die primäre Immunantwort differenzieren sich einige Lymphozyten zu den sogenannten „Gedächtniszellen“, die den Schutz gegen die entsprechenden Antigene aufrechterhalten. Diese ermöglichen bei einem erneuten Kontakt mit dem Erreger eine wesentlich schnellere Immunantwort.

Die Vakzintherapie wird hauptsächlich für die Prävention viraler und bakterieller Infektionen angewendet. Die Medizin war bis in das 19. Jahrhundert machtlos gegenüber Seuchen und Epidemien. Erst mit der Entwicklung der Impfung gelang es, Epidemien maßgeblich zu verhindern und so einen Meilenstein in der Geschichte der Medizin zu setzen.

Zu den wirksamsten Maßnahmen zur Prävention bestimmter Krebserkrankungen zählt die präventive Impfung gegen onkogene Viren, wie humane Papillomviren (HPV) sowie Hepatitis B -Viren. Die Impfung gegen Hepatitis-B-Viren senkt das Risiko eines Leberzellkarzinoms (hepatozelluläres Karzinom, HCC) erheblich, so dass in Taiwan die HCC-Inzidenz erheblich gesenkt werden konnte [27]. Ferner ist das

Zervixkarzinom, die dritt häufigste Krebserkrankung der Frau, ein impfpräventabler Tumor. Bereits seit Ende der 1970er Jahre ist bekannt, dass das Zervixkarzinom zu den durch HPV induzierten Krebserkrankungen gehört. 2006 wurde der erste Impfstoff gegen humane Papillomviren (HPV) zugelassen [28].

Inzwischen werden auch genmodifizierte Tumorzellen als Vakzine solider maligner Tumore im Tiermodell und klinischen Studien untersucht [29,30]. Da Lymphoblasten, wie die meisten Tumorzellen schlechte antigenpräsentierende Zellen (APCs) sind und keine ko-stimulatorischen Moleküle exprimieren, führt die Interaktion von T-Zellen und Leukämiezellen zur Anergie und Apoptose der T-Zellen [31,32]. Das Ziel der Therapie mit Leukämiezellvakzinen ist die Induktion einer tumorspezifischen T-zellvermittelten Immunität. Weltweit werden mehr als 70% der klinischen Studien mit viralen Vektoren durchgeführt. Hauptsächlich wird zwischen zwei viralen Vektorsystemen unterschieden, den Retroviren (RNA-Viren) und den Adenoviren (DNA-Viren). Die Retroviren stellen das bekannteste Vektorsystem dar. Aufgrund der stabilen Integration in das Genom des Wirtes (Persistenz) erreichen sie eine hohe Gentransfereffizienz sowie langlebige Expression des Transgens. Trotzdem weisen retrovirale Vektoren einige Nachteile auf. Neben der Abhängigkeit von der Proliferation der Targetzellen besteht die Gefahr von Rekombinationsereignissen [33]. Vorteile der Adenoviren gegenüber Retroviren sind dagegen der ausgedehnte Zelltropismus, ihre Unabhängigkeit von der Zellteilung und nachgewiesene hohe virale Titer, die einen effizienten Gentransfer *in vivo* sicherstellen. Auch Adenoviren weisen Nachteile auf, die ihre klinische Anwendung eingeschränken. Da Adenoviren nicht stabil ins Genom eingebaut werden, ist nur eine transiente Expression des Transgens möglich. Ferner induziert die Expression des viralen E2-Protein Entzündungsreaktionen und Toxizitäten, die eine wiederholte Applikation begrenzen [33]. Bei beiden Vektorsystemen, insbesondere bei Adenoviren, besteht zusätzlich das Risiko einer Immunantwort gegen virale Antigene.

Verschiedene Arbeiten konnten nachweisen, dass die Vakzinierung mit syngenen Leukämiezelllinien, welche durch retroviralen Transfer ko-stimulatorische Moleküle und Zytokine exprimieren, eine systemische Immunität gegenüber der Wildtyp-Leukämie im Mausmodell induziert [34-36]. Nachdem bei Kindern mit schwerer kombinierter Immundefizienz im Anschluss an die erfolgreiche gentherapeutische Behandlung Leukämien auftraten, gibt es Bedenken bei der klinischen Anwendung des retroviralen Gentransfers [37]. Aus den zuvor genannten Gründen werden

effiziente Alternativen in Form nicht viraler Gentransfermethoden, wie die Elektroporation oder den ballistischen Transfer (Gene Gun), deren Sicherheit und Funktionalität bereits verschiedene Arbeitsgruppen nachwiesen [38,39], gesucht. Trotz der Sicherheitsvorteile der nicht-viralen Transfermethoden gegenüber viralen Vektoren, wird aufgrund der wesentlich besseren Gentransfer-Effizienz in klinischen Studien nach wie vor auch mit viralen Vektorsystemen gearbeitet [40,41].

Im Vergleich zu den oben beschriebenen Leukämiezellvakzinen sind DNA-Vakzinen wesentlich einfacher und schneller herzustellen, kodieren allerdings lediglich für ein begrenztes Spektrum antigener Peptide, während Leukämiezellvakzinen über das komplette Antigenpektrum verfügen.

Bei der DNA-Vakzinierung werden Vektoren (Plasmide) verwendet, die als Transportvehikel zur Übertragung der DNA fungieren. Für die DNA-Vakzine wird das „*Gene of interest*“, das für ein leukämiespezifisches Antigen oder pro-inflammatorische Moleküle kodiert, in das Plasmid kloniert. Die Bestandteile des Plasmidvektors sind der Replikationsursprung, ein Antibiotika-Resistenz-Gen, ein Promoter für eine optimale Expression des Proteins in Säugerzellen sowie eine Polyadenylierungs-Sequenz, welche der Stabilisierung dient [42].

Die Prozessierung und Präsentation des kodierten Antigens kann über verschiedene Wege erfolgen [42]. Eine Möglichkeit ist die direkte Transfektion von professionellen Antigenpräsentierenden-Zellen (APCs), wie Dendritischen Zellen (DCs), welche nach Wanderung in die drainierenden Lymphknoten einer schnellen Antigenpräsentation dienen [43, 44]. Bei dem Weg des Cross-Priming werden somatische Zellen und/oder professionelle APCs transfiziert, das sezernierte Protein von anderen professionellen APCs aufgenommen und anschließend den T-Zellen präsentiert [45]. Erfolgt die Vakzinierung durch ballistischen Gentransfer, werden die in der Epidermis vorkommenden Keratinozyten und Dendritischen Zellen direkt transfiziert [46-48]. Hier erfolgt die Präsentation entweder direkt über die transfizierten DCs oder durch Cross-Präsentation. Bei der intramuskulären (i.m.) Applikation der Vakzine werden hauptsächlich Myozyten transfiziert [49]. Verglichen mit der intramuskulären Vakzinierung stellt die intradermale Vakzinierung den effizienteren Applikationsmodus dar [43]. Nachdem verschiedene Studien zeigen konnten, dass die Immunisierung mit Plasmid-DNA, die für das leukämiespezifische Antigen kodiert und *in vivo* exprimiert wird, wirksam ist, konnte nachgewiesen werden, dass die Ko-

Expression von Zytokinen, ko-stimulatorischen Molekülen oder Adhäsionsmolekülen die Vakzineffizienz verstärkt [50]. Bei einer Ko-Expression der Zytokine IL-2 und IL-12 [51,52], B7 als kostimulatorisches Molekül [53] und ICAM-1 und LAF-3 als Adhäsionsmoleküle [54] konnten verstärkte Immunantworten beobachtet werden.

Ferner wird die Vakzineffizienz durch nicht methylierte CpG-Motive, die für ihre immunstimulatorische Fähigkeit bekannt sind, verstärkt.

Die Verwendung von synthetischen CpG-Oligonukleotiden (CpG ODN) als Immunadjuvanz hat verglichen mit dem Freund'schen Adjuvanz den Vorteil, dass die CpG ODNs (Toll Like Rezeptor (TLR) -9 Agonisten) eine ähnliche Effizienz, aber eine deutlich geringere Toxizität aufweisen [55]. Darüber hinaus konnten bei der Anwendung von CpG ODNs in klinischen Studien keine Autoimmunreaktionen beobachtet werden [56]. Es zeigte sich, dass zusätzlich verabreichte CpG ODNs den Antitumoreffekt verstärken [39,57]. Plasmide enthalten einige hundert unmethylierte CpG Dinukleotide, so dass bereits eine gewisse Immunaktivierung durch die Plasmide selbst angenommen wird [58]. CpG-Motive rufen eine unspezifische Aktivierung des angeborenen Immunsystems hervor, wodurch B-Zellen zur Proliferation oder Antikörpersekretion angeregt werden [59] und die Zytokinsekretion von professionellen APCs wie Makrophagen und Dendritischen Zellen induziert wird [60,61]. Die Synthese der Zytokine IL-12 und IFN- α führt sekundär zu einer indirekten Aktivierung der Natürlichen-Killer-Zellen (NK).

Es wird zwischen zwei Klassen von CpG-Motiven unterschieden. CpG-Motive, deren Dinukleotide von den Basen Adenin und Thymin flankiert werden, zählen zu den „immunstimulierenden“ Motiven, die von den Basen Cytosin und Guanin flankierten dagegen zu den „neutralisierenden“ CpG-Motiven. So wurden auch in DNA-Vakzinen „neutralisierende“ CpG-Motive gefunden, die die Effekte der stimulierenden CpGs vermindern [58]. Um den stimulierenden Effekt der CpG-Motive zu gewährleisten, ist es erforderlich, die Menge der stimulierenden CpGs im „Rückgrad der Vakzine“ zu optimieren und die „neutralisierenden“ Formen der CpGs zu minimieren [50]. Weeratna et al. konnten ebenfalls zeigen, dass zu viele stimulierende CpG-Motive die Effizienz der DNA-Vakzine beeinträchtigen. Sie führten dies auf eine geringere Stabilität des Plasmids bzw. einen herunterregulierten CMV-Promotor zurück [50,58].

Als Alternative zu Plasmid-Vektoren wurden in Studien mit genetisch modifizierten Tumor- bzw. Leukämiezellvakzinen [39,62] und leukämiespezifischen DNA-Vakzinen [63] die Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression (MIDGE)-Vektoren eingesetzt. Diese weisen gegenüber Plasmiden folgende Vorteile auf: 1. enthält der Vektor nur die medizinisch notwendige genetische Information, d.h. bakterielle Regulationseinheiten die der Plasmidvermehrung dienen bzw. Antibiotikaresistenzen oder allergische Reaktionen induzieren können, fehlen. 2. sind MIDGE-Vektoren 2 kb bis 3kb kleiner als Plasmide, so dass mehr DNA in wesentlich kleinerem Volumen appliziert werden kann. Darüber hinaus wurden in einer klinischen Phase I/II-Studie keine relevanten Nebenwirkungen nachgewiesen [64]. Aufgrund der Vorteile gegenüber Plasmiden wurde in dieser Dissertation ausschließlich mit MIDGE-Vektoren gearbeitet.

1.3 Zielsetzung und Fragestellungen

Die Langzeiterheilungschancen von Kindern mit ALL konnten wie die Daten von 12 ALL-Studiengruppen belegen [65-76], in den vergangenen drei bis vier Jahrzehnten signifikant verbessert werden. Im Gegensatz hierzu haben Patienten mit Rezidiv einer Philadelphia Chromosom positiven akuten lymphoblastischen Leukämie (Ph⁺ALL) eine äußerst ungünstige Prognose und nur 35 bis 40% dieser Kinder können kurativ behandelt werden [3,4]. In der Regel kann die Leukämielast durch Polychemotherapie zwar deutlich reduziert, aber nicht immer vollständig eliminiert werden. Daher kommt dem Immunsystem grundsätzlich eine bedeutende Rolle bei der Eliminierung residueller Lymphoblasten zu. Im Anschluss an die Polychemotherapie sollte die Erhaltungstherapie daher die immunologischen Mechanismen verstärken, die eine dauerhafte Remission erst ermöglichen.

Das Ziel dieser Dissertation war die Etablierung einer neoadjuvanten Vakzintherapie zur Rezidivprophylaxe im syngenem BM185 Mausmodell. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass mit BCR-ABL^{p210} Bruchpunktpeptiden gepulste Dendritische Zellen, durch die Präsentation dieser Peptide auf MHC Klasse I Molekülen spezifische nicht-alloreaktive Zytotoxische T-Zellen gegen die CML induzieren [77-79]. Die Vakzinierung von CML-Patienten mit BCR-ABL^{p210} Bruchpunktpeptiden führte zu einer spezifischen Immunantwort [80]. Bisher liegen jedoch nur wenige Daten zu Vakzinierung mit translokationsspezifischer BCR-ABL^{p185} DNA und deren Potential spezifische CTLs gegen Ph⁺ ALL zu induzieren vor. Die vorliegende Dissertation konzentriert sich daher und angesichts der Vorteile von MDGE-Vektoren gegenüber Plasmid-Vektoren auf die DNA-Vakzinierung mit dem BCR-ABL^{p185} bruchpunktspezifischen MIDGE-Vektor. Im Rahmen dieser Zielsetzung ergeben sich folgende Fragestellungen.

- 1) Wie kann die Effizienz der Vakzine optimiert werden?
- 2) Welche immunologischen Mechanismen bzw. Zellpopulationen sind an dem anti-leukämischen Effekt der Vakzine beteiligt?
- 3) Kann *minimal residual disease* (MRD) durch eine DNA-Vakzine therapiert werden?
- 4) Ist die DNA-Vakzine mit der chemotherapeutischen Erhaltungstherapie kombinierbar oder kompromittiert die Chemotherapie mit 6-MP die Immunisierung?
- 5) Besteht ein Synergismus zwischen der DNA-Vakzine und den Anthozyanen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|--|-----------------------|
| Abdampf-Wasserbad 1023 GFL | Münstermann u. Scheel |
| Autoklav Systec 2540EL | Systec |
| Brutschrank Labotect Inkubator C200 | Labotect |
| Dual Timer Model No. TR118 | Oregon Scientific |
| Elektrische Pipettierhilfe Easypet® 4421 9V DC | Eppendorf |
| FACS-Canto | BD |
| Gelkammer | PEQLAB Biotechnology |
| Hettich Zentrifugen Universal 16A | Hettich |
| Hettich Zentrifugen Universal 320 | Hettich |
| Heizblock Unitek HB-130 | Hassa Laborbedarf |
| Labnet Minizentrifuge | Neolab (Hassa) |
| Laborwaage PT300-*D2 | Sartorius |
| Magnetrührer IKAMAG® RH Basic | IKA |
| Mikroskop Will Wilovert | Hund Wetzlar |
| MJ Research PTC-200 ThermoCycler DNA Engine | Peltier |
| Tecan Infinite F200 Fluoreszenzmessgerät | Tecan |
| Vortexer JK Minishaker Taquara RJ 22713-000 | IKA (Werner Hassa) |
| Werkbank Biological Safety Cabinets Class II | NUAIR |

2.1.2 Lösungen/Medien/Puffer/Reagenzien

| | |
|---------------------------------------|--------------|
| Agarose 100g | Roth |
| Alamar Blue Cell viability Reagent | Invitrogen |
| Aqua Delta Select Spüllösung | Delta Select |
| Desinfektionsmittel Softasept N 250ml | B Braun |
| DMSO Dimethyl Sulphoxide 5x5ml D2650 | Sigma |
| dNTP 0.5 mM | Promega |
| Dulbecco´s PBS (1X) without Ca/Mg | PAA |
| Dulbecco´s PBS (1X) w/o Ca/Mg | Biochrom AG |
| FBS | Biochrom AG |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (1X); GIBCO™ | Invitrogen |
| Helipur® 100ml | B. Braun Melsungen AG |
| Heparin-Natrium-5000-ratiopharm Antithrombotikum | Ratiopharm |
| L-Glutamin 200mM 100ml | PromoCell |
| 6x Loading Dye Solution 0,1ml #R0619 | Fermentas |
| Lysisbuffer | Sigma Aldrich |
| McCoy's mit 2,2g/l NaHCO ₃ F1015 | Biochrom AG |
| 2-Mercaptoethanol mind. 98% 100ml M3148 | Sigma |
| Penicillin/Streptomycin 10.000Units/ml | Gibco |
| Phosphat Buffered Saline pH 7.4 10stk P-5368 | Sigma |
| Red Blood Cell Lysing Buffer | Sigma |
| 100 U reverse Transkriptase Superskript II RNase H- | Invitrogen |
| RPMI1640 mit 5mg/l Phenolrot 2,0g/l NaHCO ₃ | Biochrom AG |
| T4 DNA Ligase M0202S | BioLabs |
| TRIZMA® base T1503 | Sigma |
| Trypanblau 100ml 0,4% | Gibco-Invitrogen |
| Substanzen für <i>in vivo</i> und/oder <i>in vitro</i> Experimente: | |
| OptiBerry® BX600 | Interhealth Nutraceuticals Inc., Benicia, USA |
| Cyanidin 3-O-Rutinosid C ₂₇ H ₃₁ ClO ₁₅ | PhytoPlan GmbH |
| Delphinidin 3-Glucosid C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₂ | PhytoPlan GmbH |
| dSLIM | Mologen AG |
| MIDGE BCR-ABL | Mologen AG |
| MIDGE GM-CSF | Mologen AG |
| MIDGE IL-12p35 | Mologen AG |
| MIDGE IL-12p40 | Mologen AG |
| MIDGE IL-27 | Mologen AG |
| MIDGE CD40-L | Mologen AG |
| 6-MP Puri Nethol® Mercaptopurin 50mg Ch.-B.906527 | GlaxoSmithKline |
| MTX Lantarel® FS 15mg Methotrexat-Dinatrium | Wyeth |
| STI571 (Imatinib) CGP057148B-AG-6 SAP No 149271 | Novartis Pharma AG |

Substanzen für die Narkose:

| | |
|---|------------------|
| Isofluran 250ml HDG9623 | Baxter |
| Ketanest® S Esketaminhydrochlorid 25mg/ml | Pfizer |
| NaCl Natriumchlorid-Infusionslösung 0,9% | Berlin Chemie |
| Rompun 2% Xylazinhydrochlorid | Bayer Healthcare |

Assay-Kits:

| | |
|---|------------------|
| Caspase-3/ CPP32 Fluorometric Assay Kit | BioVision |
| Caspase-8/ FLICE Fluorometric Assay Kit | BioVision |
| Caspase-9 Fluorometric Assay Kit | BioVision |
| innuPrep RNA Mini Kit | Analytic Jena AG |
| Myco Alert® sample Kit | Lonza |
| Venor® GeM Mycoplasma Detection Kit | Minerva biolabs |

2.1.3 Verbrauchs-/Labormaterialien

| | |
|--|-----------------------|
| BD Plastipak 1ml | Becton Dickinson GmbH |
| BD Discardit II 5ml | Becton Dickinson GmbH |
| Biosphere Fiter Tips 1250µl; 200µl; 20µl | Sarstedt |
| C-Chip Disposable Hemocytometer sterile | PAA |
| Cryo. S sterile PP mit Schraubverschluss | Greiner Bio One |
| Einmal-Injektionskanüle Gr.18 G26x1" 0,45x25mm | B Braun |
| FACS Canto Flow Cytometer | BD Biosciences |
| FACS-Röhrchen 5ml 75x12mm PS | Sarstedt |
| Falcon 15ml; 50ml Cellstar Tubes | Greiner Bio One GmbH |
| Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder ready to use 0,1µg/µl | Fermentas |
| Glasflasche 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml | Schott Duran |
| Handschuhe Peha soft powderfree vinyl | Hartmann |
| Handschuhe Nitril Venyl | Hartmann |
| Kaliper 0-150mm Electronic Digital Caliper | Whitworth |
| Kanüle 30G½; 25G5/8; 24G1; 27G¾; 20G1½ | BD Microlance |
| MF-Millipore GS Filter Unit 0,22µm | Millipore |
| Microvette® CB300 | Sarstedt |
| Multipette Plus | Eppendorf |
| Neubauer improved Zählkammer | REF0640010 Marienfeld |

| | |
|--|----------------------|
| Objektträger Menzel-Gläser 76x26mm ISO 8037/1 | In vitro diagnostics |
| Pipette 2,5µl; 10µl; 100µl; 200µl und 1000µl | Eppendorf |
| Pipettenspitze für Multipette 2.5 ml; 25ml; 50ml | Eppendorf |
| Pistill | Schuett Biotec |
| Plastibrand Messbecher 1000ml | Brand |
| PS Röhrchen GLKL 0,6ml 6,0/38mm | Greiner-Bio-One GmbH |
| Reaktionsgefäß 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml | Sarstedt |
| Serologische Pipette 10ml; 25ml | Sarstedt |
| Skalpell Art. Nr. 3607.1 | Carl Roth |
| Teflon-Einwegsonde | Scanbur |
| Trockenperlen mit Farbindikator 1000ml | NeoLab |
| Vorfrierer Cryo 1°C Freezing Container | Nalgene |
| 96er Well-Platte Cellstar TC-Plate | Greiner-Bio-One GmbH |
| Zellkulturflasche 175cm ² , 75cm ² , 25cm ² | Greiner-Bio-One GmbH |
| Zellsiebe 40µm blue BD cell strainer | BD Falcon |

2.1.4 Antikörper

| | |
|--|-------------------------------|
| Biotin anti-mouse IgM (II/41) | 0,5mg/ml |
| APC anti-mouse CD19 (1D3) | 0,2mg/ml |
| APC anti-mouse CD4 (L3T4) (RM4-5) | 0,2mg/ml |
| Streptavidin-PE | 0,5mg/ml |
| PE anti-mouse CD8a (Ly-2) (53-6.7) | 0,2mg/ml |
| PE Rat Anti-Mouse CD49b (DX5) | 0,2mg/ml |
| FITC anti-mouse CD3e (CD3 ε chain) (145-2C11) | 0,5mg/ml |
| PE rat IgG _{2a,k} isotype control | 0,2mg/ml |
| APC Rat IgG _{2a,k} isotype control | 0,2mg/ml |
| FITC Hamster IgG _{1,k} isotype control (anti-TNP) | 0,5mg/ml |
| anti-mouse CD4 (L3T4) Clone GK1.5 | eBioscience NatuTec |
| anti-mouse CD8a (Ly-2) Clone 53-6.7 | eBioscience NatuTec |
| Rabbit Anti-Mouse/Rat Asialo GM1 CL8955 | Cedarlane (antibodies-online) |
| →NK-Zell Antikörper | |

2.1.5 Zelllinien

Die Leukämiezelllinie BM185 wurde durch retrovirale Transduktion von Balb/c Knochenmarkstammzellen mit dem humanen 185kDa BCR-ABL-Fusionsgen generiert [36, 81, 82]. Der Phänotyp dieser Zelllinie entspricht einer prä-B-ALL mit Expression des 185kDa BCR-ABL Fusionsproteins (Abbildung 4a). Die intravenöse Injektion von 1000 Zellen führt innerhalb von 1 bis 2 Wochen zur prä-B-ALL und nach 3 Wochen zum Tod. Die subkutane Injektion induziert innerhalb von 1 bis 2 Wochen einen Tumor mit einem Durchmesser von über 20mm, der ca. 1 bis 2 Wochen nach Tumorentstehung ebenfalls zum Tod führt.

Die Zelllinie K562 ist eine humane chronisch myeloische Leukämie und wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Patientin in der Blastenkrise isoliert. Die Zellen tragen das Philadelphia Chromosom mit dem 210kDa BCR-ABL b3-a2 Fusionen [83].

Die Zelllinien BM185 und K562 wurden freundlicherweise von R. Stripecke beziehungsweise N. v. Neuhoff von der MHH zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Syngenes BM185/Balb/c- Mausmodell

Alle Tierexperimente wurden von der Ethikkommission und dem Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig Holstein genehmigt. Für die Durchführung der Experimente wurden sechs bis acht Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse (Charles River Laboratories Sulzfeld) mit einem Gewicht von 16 bis 18 g nach einer Eingewöhnungsphase von 1 bis 2 Wochen verwendet und in Makrolonkäfigen des Typ III in offener Haltung unter Standardbedingungen gehalten.

Das syngene BM185-Balb/c Mausmodell (Abbildung 4) wurde von Witte et al. [81] und Stripecke et al. [36] entwickelt. Es ist syngenes und immunkompetentes Mausmodell für die Philadelphia Chromosom positive ALL, das sowohl für die Vakzinierung mit genmodifizierten Leukämiezellen als auch translokations-spezifischer DNA verwendet werden kann. Das Modell basiert auf der Leukämie-

zelllinie BM185, die durch retrovirale Transduktion von Balb/c Knochenmarkstammzellen mit dem humanen BCR-ABL^{p185} Fusionsgen generiert wurde (Abbildung 4a) und den Phänotyp einer prä-B-ALL zeigt [36,81].

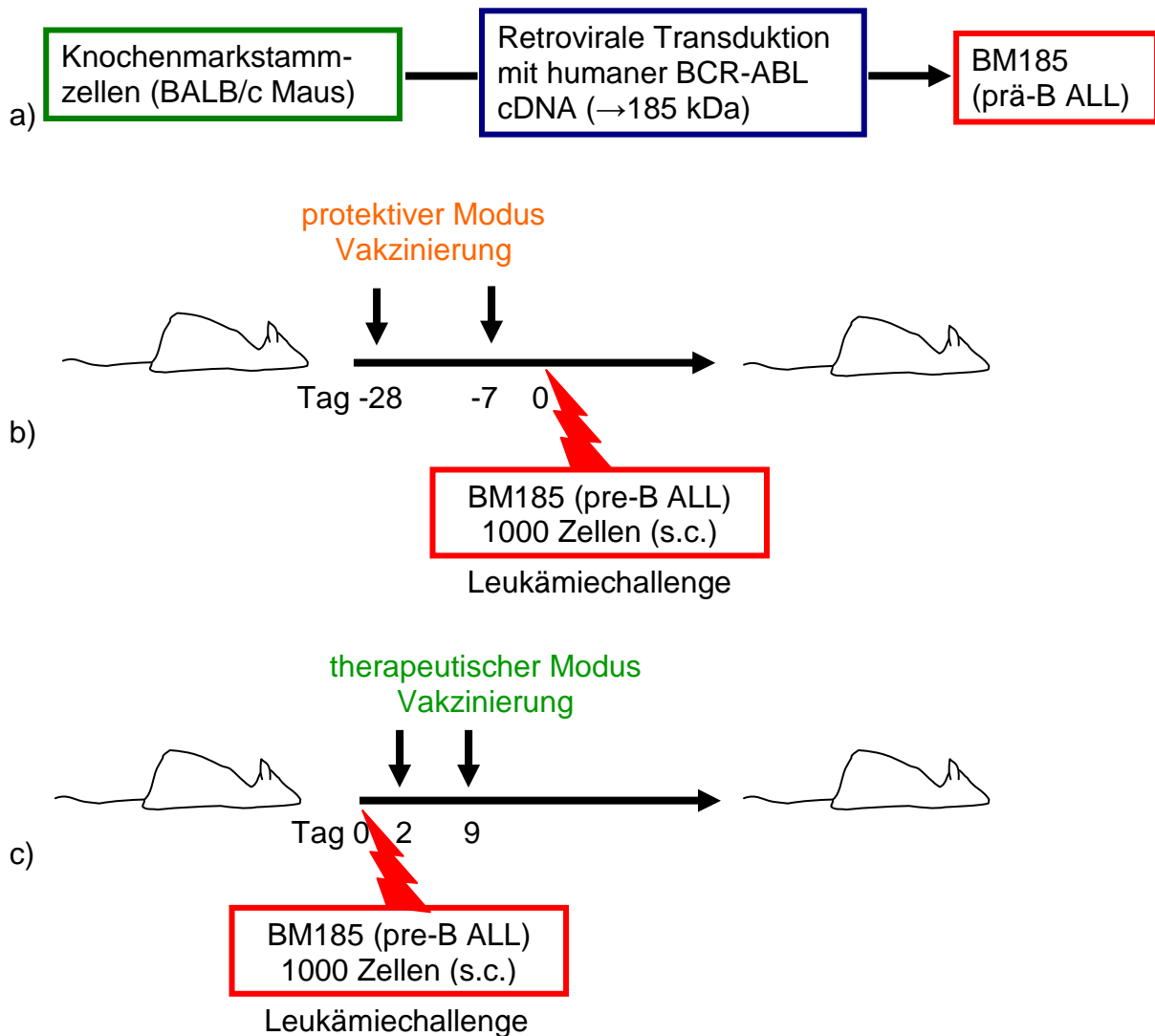


Abbildung 4: Sygenes BM185/Balb/c-Mausmodell

a) Generierung der murinen Leukämiezelllinie BM185 (prä-B-ALL) b) protektiver Modus und c) therapeutischer Modus der Vakzinierung. Im protektiven Modus erfolgte die intrakutane Vakzinierung an den Tagen -28 und -7 und im therapeutischen Modus an den Tagen 2 und 9. An Tag 0 erhielten die Mäuse den letalen Leukämiechallenge, der bei i.v.-Applikation innerhalb von 3 Wochen zum Tod führt und bei s.c. Applikation einen Tumor von > 2cm Durchmesser induziert.

2.1.7 MIDGE-Vektor

Der MIDGE-Vektor^c ist ein nicht-viraler Expressionsvektor, dessen doppelsträngiger Stamm sich aus dem CMV-Promotor, dem Transgen sowie einem Poly-A-Schwanz zusammensetzt. Der lineare DNA-Doppelstrang wird an beiden Enden durch einzelsträngige Haarnadelbereiche aus vier Thymidinnukleotiden stabilisiert, was die Inaktivierung durch Exonukleasen verhindert (Abbildung 5).

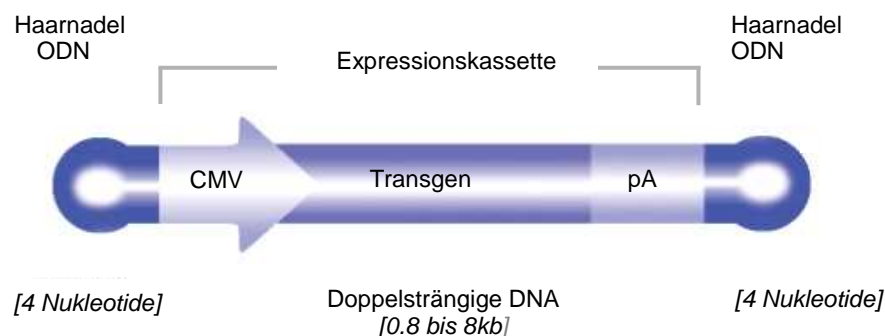


Abbildung 5: Elemente des MIDGE-Vektors (Minimalistic immunogenically defined gene expression) (Quelle: Mologen AG)

Die Konstruktion der MIDGE-Vektoren erfolgte wie bereits früher beschrieben aus dem Plasmid *pG* [62]. Die kodierende Sequenz des Transgens wurde *downstream* des CMV Promotor zwischen die Restriktionsstellen *KpnI* und *SacI* in den Plasmidvektor *pG* einkloniert und die Expressionskassette durch *EcoR1*-Restriktionsverdau aus dem *pG*-Plasmid geschnitten. Anschließend erfolgte die Zugabe von Oligodesoxyribonukleotiden (selbst-komplementäre Sequenz, mit vier Thymidinbasen) und die Inkubation mit T4-Ligase. Nicht ligierte Fragmente sowie unerwünschte Reste des Plasmidvektors wurden durch den Verdau mit einer T7-Polymerase entfernt und die MIDGE-Vektoren abschließend mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt.

Die Sequenz des MIDGE-BCR-ABL Vektors kodiert für ein t(9;22) translokations-spezifisches Peptid des humanen Fusionsprotein BCR-ABLp185 (5´-MFRDKSRSPS QNSQQSFDSSSPPTPQCHKRHRHCPVVVSEATIVGVRKTGQIWPNDGEGAFHGDA ---EALQRPV ASDFEPQGLSE-stop -3´) mit Bruchpunkt zwischen dem BCR Exon 1

^c Mologen AG, Berlin

und ABL Exon 2. Das translokationsspezifische Peptid AFHGDA–EAL besitzt die Ankernukleotide Phenylalanin (Position 2) und Leucin (Position 9), die für die Bindung an MHC Klasse I (H2-Kd) der Balb/c-Mäuse notwendig sind. Ferner wurden MIDGE-Vektoren verwendet, die für murines GM-CSF sowie murines IL-12 kodieren. Der murine IL-12 MIDGE-Vektor ist ein aus MIDGE IL-12p35 und MIDGE IL-12p40 bestehendes Heterodimer.

2.1.8 dSLIM

Das dSLIM-Molekül (double Stem Loop Immunomodulator) besteht ausschließlich aus nicht kodierender DNA. Die beiden einzelsträngigen „Loops“ tragen jeweils drei nicht methylierte CpG-Motive und sind über einen doppelsträngigen Stamm miteinander verbunden (siehe Abbildung 6).

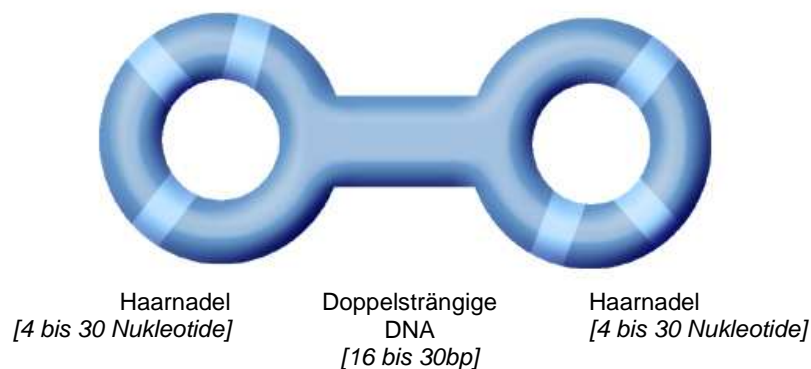


Abbildung 6: Immunmodulator dSLIM (double stem loop immunomodulator)
(Quelle: Mologen AG)

Die dSLIMs wirken als TLR-9 Agonisten und führen zu einer unspezifischen Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Die Herstellung der dSLIM-Moleküle erfolgte wie früher beschrieben [39]. Die MIDGE-Vektoren sowie dSLIM-Moleküle wurden von der Firma Mologen in Berlin bezogen.

2.1.9 Poly-(β-Aminoester)

Ein Nachteil nicht-viraler Gentransfermethoden ist die vergleichsweise niedrige Transfektionseffizienz [84]. Es müssen verschiedene zelluläre aber auch extrazelluläre Barrieren überwunden werden, um die Aufnahme der DNA im Zielgewebe zu gewährleisten. Die mit uns kooperierende AG von J.J. Green entwickelte Poly(β-Aminoester), die DNA zu nanometergroßen Partikeln (Abbildung 7b) komplexieren und dadurch die zelluläre Aufnahme erleichtern. *In vitro* und *in vivo* konnte eine gegenüber nicht komplexierter DNA signifikant höhere Transfektionseffizienz nachgewiesen werden. Anderson et al. und Green et al. zeigten eine gegenüber nicht komplexierter DNA 26fach, Akinc et al. sogar eine bis zu 67fach höhere Transfektionseffizienz [85-87]. Poly(β-Aminoester) haben ein Molekulargewicht zwischen 1 und 61 kDa [88] und bestehen aus einem Amin-Grundgerüst mit Estergruppen zu beiden Seiten (Abbildung 7a). Aufgrund hydrolytischer Spaltung der Estergruppen sind Polymere biologisch abbaubar und besitzen nur eine geringe Zytotoxizität [87].

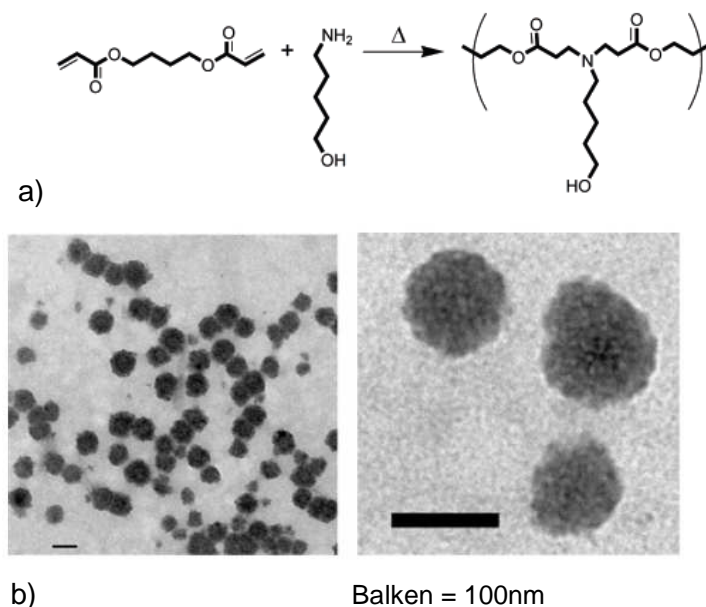


Abbildung 7: Poly-(β-Aminoester)

- a) Synthese des Poly-(β-Aminoester) C32-117 aus einem Diacrylat- und Amin-Monomer
 b) DNA-Polymer-Nanopartikel (Anderson et al. 2004 PNAS 101:16028)

Bei der Synthese „großer Bibliotheken“ von Poly(β-Aminoestern) waren die fünf wichtigsten Charakteristika das Molekulargewicht, die Partikelgröße nach Komplexierung, die Oberflächenladung, das Polymer/DNA-Verhältnis und die

Transfektions-Effizienz [88]. Es zeigte sich, dass sowohl das Molekulargewicht als auch das Polymer/DNA Verhältnis für die Transfektionseffizienz ausschlaggebend sind [88, 89]. Das Molekulargewicht des Polymers ist abhängig von der Anzahl der Polymer-Kationen/DNA-Anionen Interaktionen und beeinflusst die Bindungsaffinität vom Polymer zur DNA. Das Polymer/DNA-Verhältnis spiegelt das Ladungsverhältnis des positiv geladenen Polymer und negativ geladener DNA wieder, wodurch Transfektionsbedingungen, wie die Stabilität und die zelluläre Aufnahme des Komplexes, beeinflusst werden [88, 90].

Die Komplexierung mit dem Poly(β -Aminoester) C32-117 (Abbildung 7) (1,3-diaminopentane-terminated poly(5-amino-1-pentanol-co-1,4-butanediol diacrylate) führte *in vitro* als auch *in vivo* zu einer gegenüber nicht komplexierten DNA bis zu 26fach höheren Transfektionsrate [85, 87, 91].

2.1.10 Leukämiespezifische DNA-Vakzine

Die Basis-DNA-Vakzine setzt sich aus MIDGE-Vektoren zusammen, die für ein 84 Aminosäuren langes BCR-ABLp185 fusionsspezifisches Peptid und GM-CSF kodieren. Ferner enthält die Basis-DNA-Vakzine den Toll Like Rezeptor 9 (TLR-9) Agonisten dSLIM. Im Rahmen der Optimierungsexperimente wurden der Vakzine neben den MIDGE-Standardvektoren BCR-ABL und GM-CSF MIDGE-Vektoren hinzugefügt, die entweder für IL-12, IL-27 oder CD40-L kodieren. CD40-L ist bei der Aktivierung von APCs und der Einleitung humoraler sowie zellulärer Immunantworten beteiligt [92]. Interleukin-12 spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems und wurde in mehreren Studien als wirksames Zytokin zur immunologischen Behandlung von Tumoren im Tiermodell beschrieben [93-95]. Aufgrund der starken Antitumoraktivität von IL-27 im murinen Kolonkarzinom-Modell [96], wurde IL-27 ebenfalls in der vorliegenden Dissertation getestet. Als weitere Optimierungsstrategie wurde die DNA-Vakzine zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit Hilfe von Poly-(β -Aminoester) komplexiert.

2.1.11 Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib mesylate

Der von Druker et al. in Zusammenarbeit mit Novartis entwickelte und seit November 2001 in Deutschland zugelassene Wirkstoff Imatinib mesylate (Handelsname Glivec®, Novartis) ist chemisch ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat (Abbildung 8) und gehört zu den Signal-Transduktions-Inhibitoren (STI) [97]. Imatinib mesylate inhibiert die Tyrosinkinasen von ABL, BCR-ABL, PDGFR (platelet derived growth factor receptor) und c-kit-Rezeptor (Tyrosinkinase KIT) indem es selektiv an die ATP-Bindungsdomäne bindet. Die kompetitive Verdrängung von ATP durch Imatinib mesylate verhindert die Phosphorylierung von Substraten nachfolgender Signaltransduktionskaskaden. Indem Imatinib mesylate die onkogene Aktivität des BCR-ABL Fusionsproteins hemmt, wirkt es einer unkontrolliert gesteigerten Zellproliferation entgegen und induziert die Apoptose. Derzeit trägt Imatinib mesylate zum Erreichen einer Remission in der Therapie bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver CML und ALL, auch in der Blastenkrise bei. Imatinib mesylate induziert bei 82% der Patienten eine hämatologische Remission, wobei diese bei 69% der Patienten über einen Zeitraum von 4 Wochen bestehen bleibt. Selbst in der Blastenkrise führt Imatinib zu einer Ansprechrate von 52% und einer über 4 Wochen anhaltenden hämatologischen Remission in 31% der Patienten [98,99]. Bei 15 bis 20% der Patienten treten jedoch Resistenzen gegenüber Imatinib mesylate auf, die auf Punktmutationen in der Kinasedomäne und einer erhöhten Amplifikation des Onkogens zurückzuführen sind [100-104].

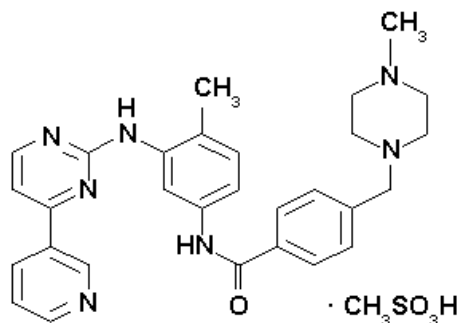


Abbildung 8: Strukturformel von Imatinib mesylate

2.1.12 6-Mercaptopurin

6-Mercaptopurin ist ein Zytostatikum, das insbesondere während der Erhaltungstherapie bei Leukämiepatienten [105] eingesetzt wird. Als Analogon der Nukleobasen Adenin und Guanin ist 6-MP ein Antimetabolit und ersetzt während der Zellteilung die Purinbasen Adenin und Guanin in der DNA, wodurch diese ihre Funktion verliert. 6-MP besitzt keine gegen Krebs gerichtete Aktivität, sondern wird als sogenanntes Prodrug sowohl intestinal als auch hepatisch abgebaut. Die Umwandlung der Purinbasen zu Nukleotiden über das Salvage-Pathway Enzym HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase) ist entscheidend für die Aktivierung und damit auch für den zytotoxischen Effekt von 6-MP [106]. 6-MP kann über die Xanthine Oxidase (XO) zu 6-Thiouric-Säure oder über die Thiopurin-Methyltransferase (TPMT) zu 6-Methylmercaptopurine abgebaut werden. TPMT weist einen hohen Grad an genetischem Polymorphismus auf [107, 108]. Dazu zählt eine deutlich verminderte Enzymaktivität oder sogar fehlende TPMT Aktivität, die durch Mutationen verursacht wird und zu einer erhöhten Toxizität selbst bei normaler 6-MP-Dosis führen kann [109]. Mercaptopurin ist ein wichtiger Bestandteil der Erhaltungstherapie bei akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) [110, 111]. Wie einige Studien zeigen, wird der TPMT-Polymorphismus als potentieller Risikofaktor für das Auftreten therapieabhängiger Sekundärmalignitäten angesehen [112-115]. Die von Stanulla et al. durchgeführte Genotypisierung von Patienten mit Sekundärmalignitäten widerspricht dieser Hypothese [116]. Darüber hinaus ist die Erhaltungstherapie unerlässlich, da eine Verkürzung der Erhaltungstherapie die ALL-Rückfallrate erhöht [117]. Die Frage war, ob es eine Alternative zu 6-MP gibt.

2.1.13 Anthocyane

Anthocyane (griech. anthos = Blüte, kyanos = blau) sind wasserlösliche Pflanzenfarbstoffe, die zu den Flavonoiden gehören. Im Zellsaft von Blüten, Früchten, Samen, häufig auch Sprossachsen und Blättern von Landpflanzen führen Anthocyane zur typischen blauschwarzen bis roten Färbung der Pflanzen. Sowohl die Struktur als auch der pH-Wert der Anthocyane haben Einfluss auf die Absorptionsmaxima (465 bis 560 nm) und folglich auf die Farbe (pH1-3 rot, pH4-6 farblos, pH>6 violett-blau). Anthocyane sind Glykoside, deren zuckerfreie Anthocyanidine (Aglykone)

die Farbträger darstellen. Die bekanntesten und am häufigsten vorkommenden Formen sind Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin. Laut „Joint Expert Committee of Food Additives“ der WHO besitzen Anthocyane lediglich eine sehr geringe Toxizität, sind jedoch weder reproduktionstoxisch noch mutagen, so dass es weder eine Mengenbeschränkung als Zusatzstoff (quantum satis) noch einen ADI-Wert (acceptable daily intake) gibt und Anthocyane als Lebensmittelzusatzstoff E163 zugelassen sind.

In Pflanzen erfüllen Anthocyane mehrere Aufgaben. Einerseits schützen sie diese aufgrund der Absorption von UV-Strahlen und verhindern damit Schädigungen in der Zelle und der DNA. Darüber hinaus sind Anthocyane Antioxidantien, die bei oxidativem Stress entstehende freie Radikale binden.

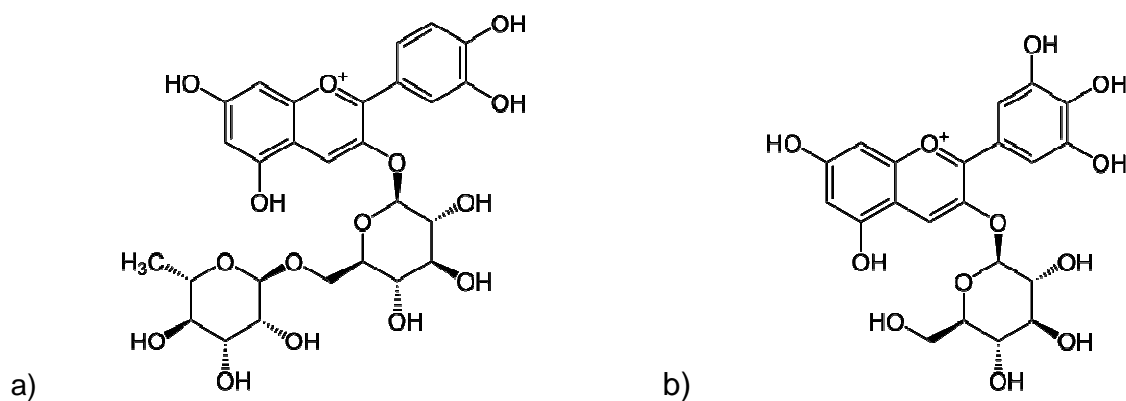


Abbildung 9: Anthocyane

a) Cyanidin-3-rutinosid ($C_{27}H_{31}ClO_{15}$), b) Delphinidin-3-glucosid ($C_{21}H_{21}ClO_{12}$)

Die aus der schwarzen Johannisbeere *Ribes nigrum* isolierten Anthocyane Cyanidin-3-rutinosid ($C_{27}H_{31}ClO_{15}$) und Delphinidin-3-glucosid ($C_{21}H_{21}ClO_{12}$) wurden von der Firma Phytoplan (Heidelberg) bezogen (Abbildung 9). Der Beerenextrakt OptiBerry® BX-600 ist eine standardisierte Mischung aus dem Extrakt der wilden Blaubeere *Vaccinium angustifolium*, Extrakt der Erdbeere *Fragaria chiloensis*, der Moosbeere *Vaccinium macrocarpon*, Extrakt der wilden Heidelbeere *Vaccinium myrtillus*, der Holunderbeere *Sambucus nigra* sowie Extrakt der Himbeere *Rubus idaeus*. Der Extrakt setzt sich aus über 80mg/g Anthocyanen zusammen, darunter sind Cyanidin (> 30mg/g), Delphinidin (> 30mg/g), Malvidin (>8mg/g) sowie Petunidin (>8mg/g).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Leukämiezelllinien wurden in RPMI1640 Medium mit 5% FBS (BM185) bzw. 10% FBS (K562), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin sowie 0.02% β -Mercaptoethanol im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert und alle zwei bis drei Tage auf 0,5 bis 0,3 x 10⁶ vitale Zellen/ml (BM185) und 0.1 bis 0.5 x 10⁶ Zellen/ml (K562) eingestellt.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 20 μ l Zellsuspension mit 20 μ l Trypanblau gemischt und 10 μ l dieser Mischung auf die Neubauer Zählkammer gegeben. Anhand der Trypanblaufärbung wurden die lebenden und toten Zellen (blau) in allen vier großen Quadraten (4 GQ) gezählt und die Lebendzellzahl nach Gleichung (1) berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl lebende Zellen in 4 GQ} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{4} \quad (1)$$

Die Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Mycoplasmen-Test (Venor®GeM) auf Kontaminationen überprüft. Der nach Herstellerangaben durchgeführte Test basierte auf der Polymerase-Kettenreaktion, die eine schnelle und sensitive Überprüfung der Zellkultur ermöglicht.

Das für die Kryokonservierung der Zellen verwendete Einfriermedium setzte sich aus 70% Medium (RPMI1640), 20% FBS und 10% DMSO zusammen und wurde vor Gebrauch steril filtriert. Die erforderliche Menge Zellsuspension (10 Mio. BM185-Zellen/ml; 5 bis 7 Mio. Zellen/ml HL-60 bzw. K562) wurde 5 Minuten bei 500*g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, das Pellet in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und 1 ml in jedes Kryoröhrchen überführt. Die Zellen lagerten für 24 bis 48 Stunden bei -80°C und wurden anschließend in Flüssigstickstoff überführt.

Bei Bedarf wurden die gefrorenen Zellen zügig im vorgewärmten Wasserbad aufgetaut und mit Medium gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturflasche im Brutschrank kultiviert.

2.2.2 Narkose

Die Kombinationsnarkose bestand aus 1,66 ml Rompun in 10 ml Ketanest S. Für die Applikation wurden 250 µl des Gemisches (Ketanest S + Rompun) mit 750 µl NaCl in einer 1 ml Tuberkulinspritze aufgezogen. Jeder Maus wurden für eine Narkosedauer von maximal 30 Minuten 200 bis 250 µl der Mischung aus Ketanest S, Rompun und NaCl intramuskulär in den linken hinteren Oberschenkel injiziert und die Maus bis zum Eintreten der Narkosewirkung in einen separaten Käfig gesetzt. Die Augen wurden zum Schutz gegen Austrocknung mit 0,9%iger NaCl-Lösung benetzt, die narkotisierten Mäuse gewogen und systematisch mit Ohrlöchern nummeriert. Zusätzliche Farbmarkierungen vermieden eine Doppelbehandlung bzw. Nichtbehandlung der Mäuse.

Bei Behandlungen mit Kurzzeitnarkose (i.p.-Applikation, Wiegen der Mäuse) wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Für die Inhalationsnarkose wurde ein kleines mit Isofluran getränktes Stück Watte in einen Becher gelegt, dieses mit etwas Papier abgedeckt und der Becher mit einem Deckel verschlossen. Die Maus wurde kurzzeitig in das Gefäß gesetzt, bei Wirkung der Narkose herausgeholt und sofort behandelt.

2.2.3 In vivo Zelldepletion

Sowohl die CD4⁺- als auch die CD8⁺-T-Zelldepletion erfolgte durch intraperitoneale Applikation von 200 µl des Antikörpers anti-mouse CD4 (L3T4) Klon GK1.5 bzw. anti-mouse CD8a (Ly-2) an den Tagen -35,-32,-29,-24,-21,-17,-14,-11,-7,-3. Die NK-Zellen wurden mittels intraperitonealer Injektion von 150 µl des polyklonalen Antikörpers Rabbit Anti-mouse/Rat Asialo GM1 an den oben genannten Tagen und zusätzlich an Tag -1,+2,+5 und +9 depletiert. Als Narkose für die Applikation der Depletionsantikörper diente Isofluran.

2.2.4 Vakzinierung

Die Rückenpartie der Mäuse wurde einen Tag vor der Behandlung rasiert. Am Tag der Vakzinierung wurden der Behandlungsbereich und die Arbeitsfläche desinfiziert und anschließend die Mäuse narkotisiert. Auf die Markierung mit Ohrlöchern und die Gewichtsbestimmung erfolgte die Immunisierung der Mäuse durch intrakutane Applikation von insgesamt 300 µl DNA-Vakzine in Form kleiner Bläschen á 10 µl in den Rücken an den Tagen -28 und -7 (protektiver Modus) vor bzw. an den Tagen 2 und 9 (therapeutischer Modus) nach dem Leukämiechallenge an Tag 0. Die Basis-DNA-Vakzine bestand aus 25 µg BCR-ABL- und 25 µg GM-CSF-MIDGE-Vektoren sowie 50 µg dSLIM-Moleküle. Zur Optimierung wurden der Basisvakzine 25 µg MIDGE-Vektoren zugefügt, die entweder für CD40-L, IL-12 oder IL-27 kodierten.

2.2.5 Komplexierung der Vakzine mit Poly-(β-aminoestern)

Für die Komplexierung der DNA-Vakzine mit Poly-(β-aminoestern) blieben die Polymere bis zum Gebrauch gefroren. Um die Anzahl der Frieren/Auftauen-Zyklen so gering wie möglich zu halten, wurden die Polymere in den Experimenten in entsprechend kleinen Mengen aliquotiert und eingefroren. Da Polymere unter wässrigen Bedingungen degradieren, wurden sie stets mit Trockenmittel gelagert. Die Verkapselung der Vakzine erfolgte für jede Maus separat und die anschließende Vakzinierung wurde innerhalb von weniger als 30 Minuten durchgeführt.

Zunächst wurde ein großes Aliquot des Polymers im Trockenbehälter aufgetaut (10 Minuten) und gründlich gemischt. Je Ansatz wurden anschließend 36 µl des Polymers in mehrere kleine Röhrchen (400 bis 500 µl) gefüllt. Die für die Ansätze aliquotierten Polymerröhrchen wurden entweder für kurze Zeit (< 1 Stunde) bei Raumtemperatur (RT) im Trockenapparat oder bei längerer Wartezeit im Gefrierschrank (-20°C) mit Trockenmittel aufbewahrt. Um die Verkapselung zu gewährleisten, wurde die DNA im Verhältnis 3:1 mit dem Polymer gemischt.

Von jedem MIDGE-Vektor (BCR-ABL, GM-CSF, IL-12p³⁵, IL-12p⁴⁰) wurden 25 µg (100 µg total) in ein Röhrchen gegeben und soviel 125 mM Natriumazetat-Lösung

(NaAc-Lsg.) zugefügt, dass die Endkonzentration 25 mM NaAc und das Endvolumen 125 µl betrug. Anschließend wurden 125 µl der Polymer-Lösung, bestehend aus 36 µl Polymer und 114 µl 25 mM NaAc, zu der 125 µl MIDGE-Vektor-Lösung pipettiert. Diese wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert und im Anschluss 50 µl PBS beziehungsweise dSLIMs (1 µg/µl) zu dem Gemisch gegeben und jeder Maus 300 µl intrakutan injiziert.

2.2.6 Leukämiechallenge

Für die subkutane Applikation von 1×10^3 Zellen (10 x LD50) der syngenen Ph⁺ ALL Zelllinie BM185 in die rasierte linke Glutealregion am Tag 0, befanden sich die BM185 Zellen im exponentiellen Wachstum mit einer Vitalität von mindestens 95%. Der Leukämiechallenge wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt, indem eine ausreichende Menge Zellsuspension zentrifugiert, anschließend mit HBSS+Heparin (20 U/ml) gewaschen und das Zellpellet in 5 ml HBSS mit Heparin (20 U/ml) resuspendiert wurde. Nach der Zellzählung wurde aus der 5 ml Stammlösung der Challenge mit 1×10^3 BM185-Zellen/100 µl hergestellt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Nach dem Leukämiechallenge wurden zweimal wöchentlich das Gewicht und täglich das Tumorstadium der Mäuse kontrolliert. Dazu wurden zwei perpendikuläre Durchmesser des Tumors gemessen und das Tumorstadium nach der Formel $TV = (d^2 \times D)/2$ (d = kleinster, D = größter Durchmesser in mm) berechnet. Erreichte der Tumor ein Volumen von über 6000mm³ oder war das Allgemeinbefinden der Mäuse schlecht (Gewichtsverlust >1 g innerhalb einer Woche) wurden die Mäuse getötet.

2.2.7 Therapie

Im Anschluss an den letalen Leukämiechallenge erhielten die Mäuse unterschiedliche Therapien. Von Tag 1 bis 21 nach dem Leukämiechallenge erhielten die Mäuse unter Inhalationsnarkose tägliche intraperitoneale (i.p.) Applikationen von 25 mg/kg Imatinib mesylate bzw. 50 mg/kg Cyanidin-3-Rutinosid in 200 µl Injektionsvolumen. Die tägliche orale Gabe von 50 mg pro m² Körperoberfläche 6-MP (Dosis an das ALL BFM 2009 Protokoll angepasst) bzw. 500 mg/kg/Tag Beerenextrakt erfolgte ab Tag 1 über einen Zeitraum von 21 Tagen. Mit Hilfe der flexiblen Teflon-Magensonde

konnten der Maus 100 µl der 6-MP-Lösung bzw. der Beerenextrakt-Lösung gastral appliziert werden.

Berechnung der Körperoberfläche:
$$\sqrt{\frac{\text{Gewicht [kg]} \times \text{Größe [cm]}}{3600}}$$

2.2.8 Bestimmung der CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen

Für die wöchentliche Blutentnahme wurden die Vorgaben (Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz) der maximalen Entnahme von 7,5% des Gesamtblutvolumens eingehalten. Zu Beginn der Experimente waren die Mäuse 6 bis 8 Wochen alt und wogen ca. 17 g. Während der Experimente, Zeitraum von 60-90 Tagen, stieg das Körpergewicht auf bis zu 20 g an, so dass den Mäusen maximal 200 µl Blut pro Woche entnommen wurde. Zunächst wurde der Schwanz mit Alkohol desinfiziert und anschließend mit einer Injektionsnadel die Vene der Schwanzspitze punktiert. Die Entnahme des erforderlichen Blutvolumens erfolgte durch leichtes Massieren in Richtung Schwanzende, wo das aus der Schwanzvene tretende Blut mit einer Microvette aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt wurde.

Der Maus wurden 50 µl Blut mit einer Microvette mit Heparin aus der Schwanzvene entnommen (s.o.) und mit 1 ml PBS in ein 15ml Reaktionsröhrchen überführt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Anschließend erfolgte ein 5 Minuten Zentrifugationsschritt der Blutprobe bei 4°C und 500*g. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit 2 ml Red Blood Cell Lysing Buffer pro 50 µl Blut resuspendiert und für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Lyse folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 500*g. Das Pellet wurde für die spätere FACS-Messung mit 100 µl PBS (0.01 M) resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Die Effizienz der unter 2.2.3 beschriebenen Zelldepletion wurde über einen Zeitraum von 14 Wochen durch die Messung von Blutproben von 6 parallel zum Experiment zusätzlich depletierten Mäusen am Durchflußzytometer überprüft. Für den Nachweis der CD4⁺-T-Zelldepletion wurden die Blutproben mit 5 µl APC konjugiertem anti-mouse CD4 und 2 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem anti-mouse CD3e markiert. Die Markierung der Blutproben der CD8⁺-T-Zelldepletion erfolgte mit 5 µl phycoerythrin (PE)-konjugiertem anti-mouse CD8a sowie 2 µl FITC-konjugiertem

anti-mouse CD3e. Die Markierung mit 5 µl phycoerythrin (PE) konjugiertem rat anti-mouse CD49b und 2 µl FITC-konjugiertem anti-mouse CD3e diente dem Nachweis der erfolgreichen NK-Zelldepletion. Der bei allen Proben verwendete FITC-konjugierte CD3-Antikörper ermöglichte die Differenzierung zwischen CD3⁺ T-Zellen und CD3⁻ NK-Zellen. Nach dem Mischen wurden die markierten Proben für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend mit 2ml PBS für 5 Minuten bei 250* g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die in 100µl PBS resuspendierten Proben mit dem Durchflusszytometer (FACS-Canto) gemessen. Die Detektion der Lymphozyten erfolgte anhand des Vorwärtsstreulichtes (FSC = Forward Scatter), das ein Maß für das Volumen der Zelle ist und des Seitwärtsstreulichtes (SSC = Sidewards Scatter), das ein Maß für die Granularität der Zelle ist. Für die Auswertung wurden die Daten von 10.000 Ereignissen erfasst.

2.2.9 Alamar Blue Proliferationsassay

Mit Hilfe des Alamar Blue Assays wurde die Proliferation der Leukämiezelllinien BM185 und K562 nach Behandlung mit Imatinib mesylate, 6-MP, Cyanidin-3-Rutinosid, Delphinidin-3-Glucosid (Endkonzentrationen 100 µM, 10 µM, 1 µM) und des Beerenextraktes (Endkonzentrationen 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml) untersucht. Hierbei wurden zunächst 2 mM bzw. 2 mg/ml Stammlösungen und anschließend 1:10 Verdünnungsreihen angesetzt, so dass die erhaltenen Lösungen in einer Konzentration von 200 µM, 20 µM und 2 µM bzw. 200 µg/ml, 20 µg/ml und 2 µg/ml vorlagen. Der Assay erfolgte in 96-Wellplatten mit 10.000 vitalen Zellen in 100 µl Medium pro Well und die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit 100 µl der jeweiligen Konzentration der Substanzen inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden pro 100 µl Volumen Zellsuspension 10 µl Alamar Blue® Reagenz auf die Zellen gegeben (Ansatz in 96-Well-Platte). Die metabolische Aktivität von lebenden und proliferationsfähigen Zellen wandelt das Alamar Blue Reagenz in ein messbares Fluoreszenzsignal um. Die Stärke des Signals ist dabei proportional zu der Anzahl lebender Zellen und entspricht der metabolischen Aktivität. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem Tecan Infinite 200 unmittelbar nach der Zugabe des Alamar Blue Reagenz bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm im 15 Minuten-Takt, wobei die Platten zwischenzeitlich bei 37°C und 5% CO₂ weiter inkubiert wurden.

2.2.10 Caspase Apoptoseassay

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, spielt in Eukaryonten eine bedeutende Rolle bei der Embryonalentwicklung, aber auch der Entfernung „entarteter“ Zellen [118]. Sie wird durch die Aktivierung von Caspasen der ICE-Familie (Interleukin Converting Enzyme) induziert. Die 13 beim Menschen vorkommenden Caspasen werden in drei Gruppen unterteilt: 1. die proinflammatorischen Caspasen, denen bei der Apoptose keine wesentliche Rolle zukommt. 2. die Initiator-Caspasen (z.B. Caspase 8 und 9), sie kontrollieren und regulieren die Apoptose und aktivieren die Effektor-Caspasen (z.B. Caspase 3). Anhand des fluorimetrischen Caspase-Assays ist es möglich, die Enzymaktivität verschiedener Caspasen zu untersuchen, dabei korreliert die Intensität des fluoreszierenden Lichtes direkt mit der Caspaseaktivität. Dieser Assay basiert auf dem Nachweis einer veränderten Fluoreszenz aufgrund von abgespaltenem Substrat. Die Fluoreszenzmessung erfolgt mit Hilfe des Tecan Infinite 200 mit einem 400 nm Exzitationsfilter sowie 505 nm Emissionsfilter.

Der fluorimetrische Caspase-Assay für die Caspasen 3, 8 und 9 wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Leukämiezelllinien BM185 und K562 wurden 48 Stunden mit Imatinib mesylate (100 μM), 6-MP (100 μM) oder Cyanidin (100 μM) bzw. Beerenextrakt (100 $\mu\text{g/ml}$), sowie eine nicht behandelte Kontrolle bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden 1 bis 5×10^6 Zellen pro Ansatz zentrifugiert, die Zellpellets in jeweils 50 μl Zelllysisbuffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Beenden der Lyse wurden 50 μl 2x Reaktionspuffer (10 mM DTT) zu jedem Reaktionsansatz gegeben und die Ansätze auf 96-Wellplatten überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 μl des jeweiligen 1mM Substrates (Caspase 3: DEVD-AFC; Caspase 8: IETD-AFC; Caspase 9:LEHD-AFC; Endkonzentration 50 μM) je Well gefolgt von einer 1 bis 2 Stunden dauernden Inkubationsphase bei 37°C.

2.2.11 Nachweis der Zytokinexpressions nach DNA-Vakzinierung

Die frisch präparierten inguinalen Lymphknoten (ingLK) vakzinierter und unbehandelter Kontrollmäuse sowie die Haut der Vakzinationsstelle bzw. Ohrhaut (Kontrolle) wurden 16 Stunden und 24 Stunden nach der Vakzinierung in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Zur Isolation der RNA

wurden die angefertigten 12 µm Kryoschnitte direkt in 700 µl Lysisbuffer gelöst. Die RNA wurde anschließend nach Herstelleranleitung isoliert. Die gefrorenen Proben wurden bei RT aufgetaut und für eine Minute geschüttelt. Nach Trennung der Lysate wurden diese in RNeasy Mini Spin Säulen überführt und die RNA im Anschluss an mehrere Waschschrte in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Zur Erhöhung der Konzentration wurde das finale Volumen der extrahierten RNA-Lsg. auf 8 µl reduziert. Nach 15 minütiger Inkubation mit DNase I wurde die RNA 10 Minuten bei 70°C erhitzt und unmittelbar danach auf Eis heruntergekühlt. Die Synthese der cDNA wurde mit 200 ng Random Primer, 0.01 M DTT, 1x Reaktionsbuffer, 0.5 mM dNTP und 100 U reverse Transkriptase Superskript II RNase H- in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Proben wurden für 50 Minuten bei 42°C inkubiert [119].

Tabelle 1: Primersequenzen, Amplikongröße und Accession Number der analysierten Gene^a

| Oligo Name ^b | 5' Nucleotid Sequenz | Size (bp) | Accession Number |
|-------------------------|--------------------------------|-----------|------------------|
| MLN51 for | ccaagccagccttcattcttg | 134 | NM_138660.2 |
| MLN51 probe | cacgggaacttcgaggtgtgcctaac | | |
| MLN51 rev | taacgcttagctcgaccactctg | | |
| IFN γ for | gcaaggcgaaaaaggatgc | 98 | NM_008337.2 |
| IFN γ probe | tgccaagtttgaggtaacaacccacag | | |
| IFN γ rev | gaccactcggatgagctcattg | | |
| IL2 for | tcccaggatgctcaccttc | 98 | NM_008366.2 |
| IL2 probe | cttgccaagcaggccacagaattg | | |
| IL2 rev | atgccgcagaggtccaag | | |
| IL4 for | gagactcttcgggcttttcg | 96 | NM_021283.1 |
| IL4 probe | cctggattcatcgataagctgcaccatg | | |
| IL4 rev | aggcttccaggaagtctttcag | | |
| BCR-ABL for | gaactcgcaacagtccttcga | 64 | AF113911.1 |
| BCR-ABL rev | ccggtgccgcttatgg | | |
| BCR-ABL probe | agcagcagtccccccacgcc | | |
| IL12p40 for | gagcactccccattcactctctc | 140 | NM_008352.2 |
| IL12p40 probe | ctctacgaggaacgcaccttctggttacac | | |
| IL12p40 rev | tgattggacttcggtagatgctc | | |
| GM-CSF for | ttcctgggcattgtggctca | 68 | NM_009969.4 |
| GM-CSF rev | aaggccgggtgacagtga | | |
| GM-CSF probe | agcctctcagcaccaccgcc | | |
| TNF α for | ccctcacactcagatcatcttctc | 100 | NM_013693 |
| TNF α rev | tggtcagccactccag | | |
| TNF α probe | ctgtagcccacgtcgtagcaaacccac | | |

^a National Resource for Molecular Biology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

^b for, forward; rev, reverse.

Im Anschluss an die reverse Transkription wurde die cDNA dem qPCR Master Mix Plus zugefügt und mit Hilfe des Sequence Detection System (SDS) ABI 7900 amplifiziert. Das Design der TaqMan Sonden sowie forward (for) und reverse (rev) Primer erfolgte mittels der Software Primerexpress von Applied Biosystems bzw. Clone Manager version 7.01 von Sci Ed Central. Die optimale Primerkonzentration sowohl für die forward als auch die reverse Primer lag bei 900 nM und für die TaqMan Sonde bei 200 nM. Die Primersequenzen, Größe der Amplikons und die Accession Numbers sind in Tabelle 1 dargestellt.

Zur Bestimmung der Cycles of threshold (ct, Schwellenwert-Zyklen) wurde die gleiche Menge cDNA verwendet und die Anzahl der Kopien Zytokin-cDNA über das Housekeeping-Gen *MLN51* normiert. Bei einer geringen Anzahl von Transkripten, wurde ein ct von 40, die maximal mögliche ct Größe bei Verwendung des TaqMan-Systems, für die Berechnungen verwendet.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation schließt an frühere Experimente der Arbeitsgruppe an, in denen die Effizienz der Prä-Immunisierung mit MIDGE-Vektoren die für ein leukämiespezifisches Peptid kodieren, gegen einen letalen Leukämiechallenge mit 1×10^3 BCR-ABLp185-exprimierenden Leukämiezellen untersucht wurde. Im Vergleich zur nicht-vakzinierten Kontrolle zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der leukämiefreien und gesamten Lebensdauer bei den mit BCR-ABLp185-MIDGE-Vektoren vakzinierten Mäusen. Ebenso lag die Überlebensrate der Kontrolle und der vakzinierten Gruppe bei 0%. Wurden zusätzlich GM-CSF-MIDGEs appliziert, zeigte sich eine Steigerung der Überlebensrate auf 21%, und sowohl die leukämiefreie als auch gesamte Lebensdauer waren gegenüber der nicht-vakzinierten Gruppe signifikant länger. Eine weitere Verbesserung der Vakzineffizienz wurde durch den Toll-like-Rezeptor Agonisten dSLIM erreicht [63].

Darüber hinaus wurde untersucht, inwiefern die Wirksamkeit der DNA-Vakzine von der leukämiespezifischen Sequenz und unspezifischen Komponenten abhängig ist. Es zeigte sich, dass weder dSLIM noch GM-CSF als Einzelkomponente die Lebensdauer signifikant verlängerte und keine Maus überlebte. Auch wenn die Vakzine GM-CSF/dSLIM zu einer Überlebensrate von 14% führte, waren weder die leukämiefreie noch die gesamte Lebensdauer signifikant länger gegenüber der nicht-vakzinierten Kontrollgruppe. Dagegen wurde sowohl die leukämiefreie als auch die gesamte Lebensdauer der Mäuse, die die Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM erhielten signifikant verlängert und die Überlebensrate erhöhte sich auf 17% [63].

Damit basiert die anti-leukämische Effizienz der DNA-Vakzine auf dem Gentransfer leukämiespezifischer BCR-ABL Sequenzen, wobei aufgrund der schwachen antigenen Potenz des BCR-ABL spezifischen Fusionspeptids zusätzlich unspezifische Immunmodulatoren wie GM-CSF und dSLIM erforderlich sind [63].

3.1 Optimierung der Basisvakzine BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob zusätzliche MIDGE-Vektoren, die für die Initiation und Modulation der Immunantwort wichtige kostimulatorische Moleküle und Zytokine wie CD40-L, IL-12 oder IL-27 kodieren, die Vakzineffizienz steigern.

Tabelle 2: Optimierung der Basisvakzine BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM (V) durch die zusätzlichen Komponenten CD40-L, IL-12 oder IL-27

| | Lebensdauer leukämiefrei [t] | | | Lebensdauer gesamt [t] | | | Überlebensrate [%] |
|------------|------------------------------|-----------|--------|------------------------|-----------|--------|--------------------|
| | MW | CI95% | P* | MW | CI95% | P* | |
| Kontrolle | 10.8 | 9.7-11.9 | 0.0909 | 23.8 | 22.5-25.2 | 0.0364 | 0/12 [0] |
| Vakzine | 19.7 | 7.6-31.7 | --- | 31.5 | 22.8-40.2 | --- | 2/12 [17] |
| V + CD40-L | 21.6 | 10.1-33.1 | 0.0663 | 32.3 | 23.9-40.8 | 0.3642 | 2/12 [17] |
| V + IL-27 | 39.4 | 23.3-55.4 | 0.0191 | 44.5 | 32.5-56.6 | 0.0575 | 6/11 [55] |
| V + IL-12 | 56.1 | 47.4-64.8 | 0.0004 | 57.4 | 51.5-63.2 | 0.0006 | 10/11 [91] |

Die Daten wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen, ausgehend vom Leukämiechallenge am Tag 0 erhoben. CI = Konfidenzintervall; *p < 0.05 Signifikanzniveau nach dem einseitigen Mann Whitney Test; MW = Mittelwert; t = Tage; V = Vakzine

Die Vakzinierung mit dem zusätzlichen, für CD40-L kodierenden MIDGE-Vektor führte weder zu einer signifikant längeren leukämiefreien Zeit, noch gesamten Lebensdauer im Vergleich zur Basisvakzine-Gruppe. Im Gegensatz dazu führte der für IL-27 kodierende MIDGE-Vektor zu einer deutlich erhöhten Überlebensrate von 55% und einer signifikant längeren leukämiefreien und gesamten Lebensdauer. Die größte Steigerung der Vakzineffizienz erreichte der zusätzliche für IL-12 kodierende MIDGE-Vektor. Die Vakzinierung führte zu einer signifikant längeren leukämiefreien als auch gesamten Lebensdauer verglichen mit den mit der Basisvakzine behandelten Mäusen und einer Überlebensrate von 91% (Tabelle 2, Abbildung 10) [215].

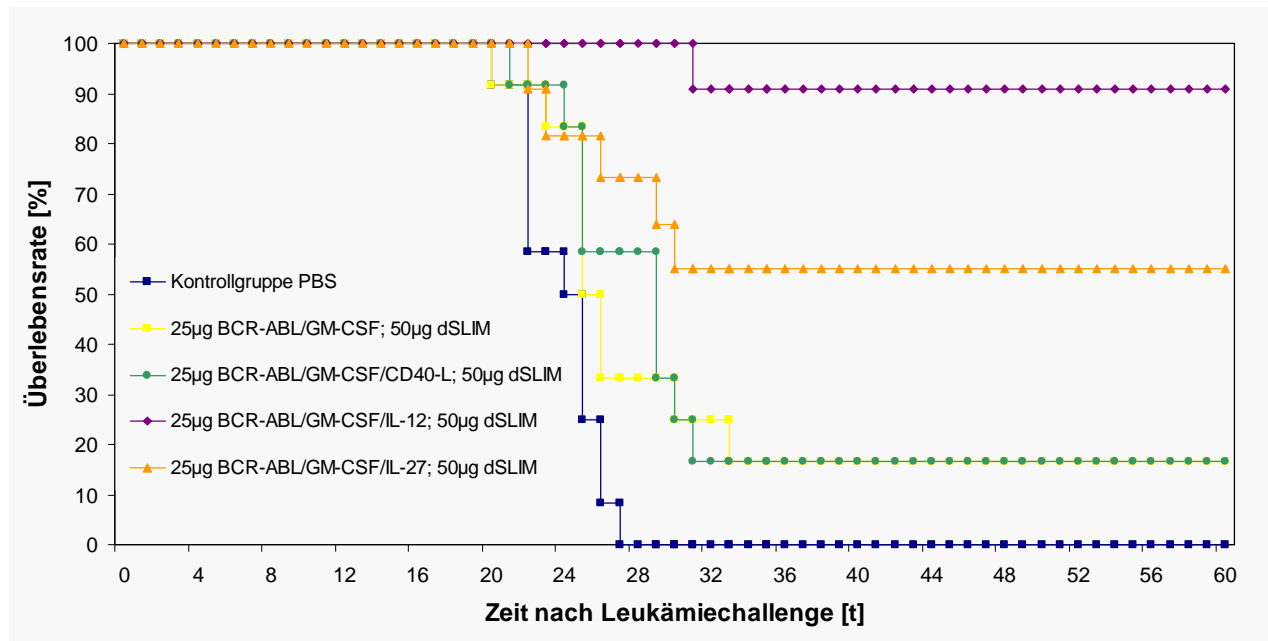


Abbildung 10: Überlebensrate der unbehandelten Kontrolle und mit unterschiedlichen DNA-Vakzinen immunisierten Mäusen

Neben der Vakzinierung mit zusätzlichen MIDGE-Vektoren wurde untersucht, ob die Komplexierung der DNA-Vakzine in Nanopartikel über die Erhöhung der Transfektionseffizienz zu einer Optimierung der Vakzine führt. Die in Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass weder die leukämiefreie noch die gesamte Lebensdauer der Mäuse durch die Komplexierung der Vakzine signifikant verlängert wurde.

Tabelle 3 : Komplexierung der Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM

| | Lebensdauer leukämiefrei [t] | | | Lebensdauer gesamt [t] | | | Überlebensrate [%] |
|-----------------|------------------------------|-----------|--------|------------------------|-----------|--------|--------------------|
| | MW | CI 95% | P* | MW | CI 95% | P* | |
| Vakzine | 26.2 | 15.6-36.8 | --- | 36.9 | 29.5-44.4 | --- | 5/18 [28] |
| C32-117 Vakzine | 28.7 | 17.2-40.1 | 0.4810 | 38.4 | 30.2-46.7 | 0.3695 | 6/18 [33] |
| C32-118 Vakzine | 30.3 | 19.3-41.2 | 0.1551 | 41.3 | 33.4-49.2 | 0.3114 | 6/18 [33] |

Die Daten wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen, ausgehend vom Leukämiechallenge am Tag 0, erhoben. CI = Konfidenzintervall; *p < 0.05 Signifikanzniveau nach dem einseitigen Mann Whitney Test; MW = Mittelwert; t = Tage

Ferner führte die Dosiserhöhung von 25 µg auf 50 µg weder zu einer signifikant längeren leukämiefreien (49.4 Tage vs. 48.5 Tage) und gesamten (52.7 Tage vs. 52.2 Tage) Lebensdauer, noch zu einer gesteigerten Überlebensrate (75% gegenüber 77%). Damit war die Wirkung der Vakzine zumindest in dem getesteten Dosisbereich dosisunabhängig.

3.2 CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen sind an der Immunantwort beteiligt

Es wurde untersucht, welche Zellpopulationen an der Vakzinwirkung beteiligt sind. In *in vivo* Depletionsexperimenten wurden zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von fünf Wochen selektiv die CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen oder NK-Zellen der an den Tagen -28 und -7 mit BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM vakzinierten Mäuse depletiert. Die Depletionseffizienz wurde mittels FACS-Messung von Blutproben bei sechs parallel zum Experiment depletierten Mäusen kontrolliert.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Vakzineffizienz von *in vivo* CD4⁺-T-; CD8⁺-T- oder NK-Zelldepletion

| | Lebensdauer leukämiefrei [t] | | | Lebensdauer gesamt [t] | | | Überlebensrate [%] |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------|---------------|------------------------|-----------|---------------|--------------------|
| | MW | CI 95% | P* | MW | CI 95% | P* | |
| Kontrolle | 8.7 | 7.4-9.9 | 0.0002 | 20.8 | 19.0-22.6 | 0.0002 | 0/6 [0] |
| Nicht depletiert | 50.1 | 40.5-59.6 | --- | 53.3 | 46.8-59.7 | --- | 14/18 [78] |
| CD4 ⁺ -T-Zelldepletion | 12.3 | 11.5-13.2 | 0.0002 | 25.0 | 25.0 | 0.0002 | 0/6 [0] |
| CD8 ⁺ -T-Zelldepletion | 38.3 | 13.2-63.4 | 0.1735 | 44.7 | 26.8-62.6 | 0.1567 | 3/6 [50] |
| NK-Zelldepletion | 10.8 | 10.0-11.6 | 0.0002 | 26.2 | 22.2-30.2 | 0.0005 | 0/6 [0] |

Die Daten wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen, ausgehend vom Leukämiechallenge am Tag 0, erhoben. CI = Konfidenzintervall; *p < 0.05 Signifikanzniveau nach dem einseitigen Mann Whitney Test; MW = Mittelwert; t = Tage

Wie Abbildung 11 zeigt, waren beide T-Zellpopulationen bereits zum Zeitpunkt der 1. Vakzinierung fast komplett und die NK-Zellen zu 70% depletiert. Im Verlauf der weiteren Antikörperapplikationen sank der Anteil NK-Zellen nach vier Wochen auf ein Minimum von 10% bis zum Tag der Leukämieapplikation, während die T-Zellen nahezu vollständig depletiert waren. Trotz vier zusätzlicher NK-Depletionen an den Tagen -1, +2, +5 und +9 wurde keine vollständige Depletion der NK-Zellen erreicht.

Bereits eine Woche nach Beendigung der Antikörperapplikation wurden ca. 40% der initialen NK-Zellzahl nachgewiesen.

Obwohl die NK-Zellen nicht komplett depletiert wurden (vergleiche Abbildung 11), konnte die Vakzine die Leukämie nicht verhindern, so dass keine NK-Zell depletierte Maus den Leukämiechallenge überlebte. Verglichen mit der vakzinierten, nicht depletierten Gruppe war die durchschnittliche leukämiefreie und die gesamte Lebensdauer signifikant verkürzt (Tabelle 4). Die CD4⁺-T-Zelldepletion führte ebenfalls zu einer gegenüber der nicht depletierten Vakzingrouppe signifikant verkürzten leukämiefreien und gesamten Lebensdauer (Tabelle 4) sowie einer Überlebensrate von 0%. Die CD8⁺ T-Zelldepletion zeigte dagegen einen geringeren Einfluss auf die Vakzineffizienz, was nicht auf eine unvollständige CD8-Zelldepletion zurückzuführen ist (Abbildung 11). Die leukämiefreie und gesamte Lebensdauer waren gegenüber der nicht depletierten Vakzingrouppe moderat verkürzt und 50% der Mäuse überlebten (Tabelle 4).

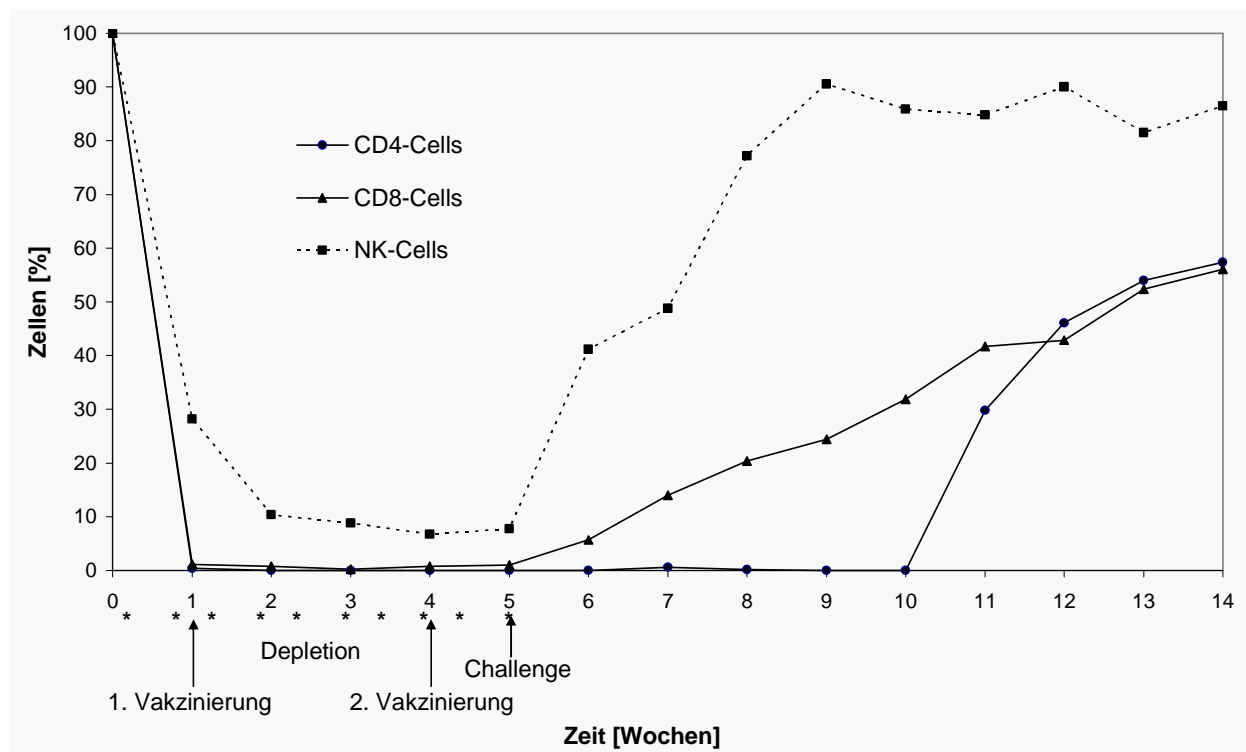


Abbildung 11: Nachweis der *in vivo* Depletionseffizienz mit FACS-Analyse. Darstellung des prozentualen Anteils von CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen in Balb/c Mäusen nach intraperitonealer Applikation der anti-CD4, anti-CD8 oder anti-asialo GM1 Depletionsantikörper. * Depletion

Die Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM kann die Leukämie ($10 \times LD_{50}$) effektiv verhindern, wobei die $CD4^+$ T-, $CD8^+$ T- und die NK-Zellen an der anti-leukämischen Wirkung der Vakzine (BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM) beteiligt sind. Die Hauptrolle kommt in dieser Phase der Immunisierung den $CD4^+$ T-Zellen und NK-Zellen zu, d.h. es wird sowohl eine adaptive als auch angeborene Immunantwort induziert.

3.3 Antileukämischer Memory Effekt der DNA-Vakzine

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die protektive Vakzine die überlebenden Mäuse ebenfalls gegen einen erneuten Leukämiechallenge schützt. Die überlebenden Mäuse der Vakzingrouppe erhielten einen zweiten Leukämiechallenge mit 10^3 BM185-Zellen am Tag 60. Drei von 6 Mäusen überlebten und alle Mäuse zeigten eine im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle signifikant längere leukämiefreie (40.5 Tage vs. 10.8 Tage $p = 0.021$) und gesamte (46.2 Tage vs. 23.8 Tage; $p = 0.033$) Lebensdauer (Daten nicht aufgeführt). Dieses Resultat zeigt die Induktion eines antileukämischen Memory-Effektes.

Mit dem Ziel, die klinische Situation von minimal residual disease (MRD) im Mausmodell abzubilden, wurde ausgehend von der erfolgreichen Prä-Immunisierung in den darauffolgenden Experimenten untersucht, ob die Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM auch bei prä-existenter Leukämie therapeutisch wirksam ist.

Die meisten malignen Erkrankungen sind mit einer Dysregulierung der Apoptose assoziiert, so dass gegenüber der Apoptose resistente Zellen der Kontrolle des Immunsystems entgehen. Bei der Ph^+ -ALL ist die dysregulierte ABL-Tyrosinkinase für die Inhibition der Apoptose verantwortlich. In mehreren Arbeiten wurde eine antiproliferative Aktivität der Anthozyane in Tumorzellkulturen sowie Tiermodellen gezeigt. In der vorliegenden Dissertation wurde die Zytotoxizität des nicht-immunsuppressiven Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib mesylate, der Anthozyane Cyanidin-3-Rutinosid, Delphinidin-3-Glukosid und des anthozyan reichen Beerenextraktes im Vergleich zu dem in der Dauertherapie der ALL eingesetzten immunsuppressiven Chemotherapeutikum 6-MP zunächst *in vitro* im Alamar Blue Assay und anschließend *in vivo* im syngenem Mausmodell untersucht.

3.4 6-MP, Imatinib mesylate und Anthocyane inhibieren die Proliferation von Leukämiezellen und induzieren die Apoptose über Caspasen in vitro

Mit Hilfe des Alamar Blue Proliferationsassays wurde die Wirkung der nicht-immunsuppressiven Substanzen Imatinib mesylate, Beerenextrakt OptiBerry BX-600, Delphinidin-3-Glukosid, Cyanidin-3-Rutinosid sowie des immunsuppressiven Chemotherapeutikum 6-MP auf die Proliferation der Leukämiezelllinien K562 und BM185 untersucht.

Die Proliferation der Zelllinien K562 und BM185, die BCR-ABL Fusionsproteine exprimieren, wurde im Dosisbereich von 1-100 μM signifikant durch Imatinib mesylate gehemmt. Die Inhibition durch den Beerenextrakt war dagegen bei beiden Zelllinien dosisabhängig und nur bei einer Dosis von 100 $\mu\text{g/ml}$ signifikant. Während Delphinidin-3-Glukosid die Proliferation der Zelllinien dosisabhängig inhibierte, zeigte Cyanidin-3-Rutinosid keine inhibierende Wirkung auf die Proliferation der Zelllinie K562. Die Proliferation der BM185-Zellen wurde dagegen dosisabhängig durch Cyanidin-3-Rutinosid inhibiert.

Verglichen mit der durch Beerenextrakt, Delphinidin-3-Glukosid und Cyanidin-3-Rutinosid erzielten Proliferationshemmung der Zelllinien K562 und BM185 war die durch Imatinib mesylate hervorgerufene Inhibition signifikant höher. Nur die Proliferation der BM185-Zellen wurde bei einer Konzentration von 100 μM Anthocyane und 100 $\mu\text{g/ml}$ des anthozyanreichen Beerenextrakts annähernd wie durch Imatinib mesylate inhibiert. Ferner zeigte der Beerenextrakt in beiden Zelllinien eine anti-proliferative Wirkung, die isolierten Anthocyane Cyanidin-3-Rutinosid und Delphinidin-3-Glukosid hingegen nur in einer beziehungsweise zwei Zelllinien (Abbildung 12).

Die inhibierende Wirkung von 6-MP war in den getesteten Zelllinien dosisabhängig. Eine signifikante Proliferationshemmung konnte bei den Zelllinien BM185 ($p = 0,0017$ Daten nicht dargestellt) und K562 bei einer Konzentration von 100 μM nachgewiesen werden (Abbildung 12).

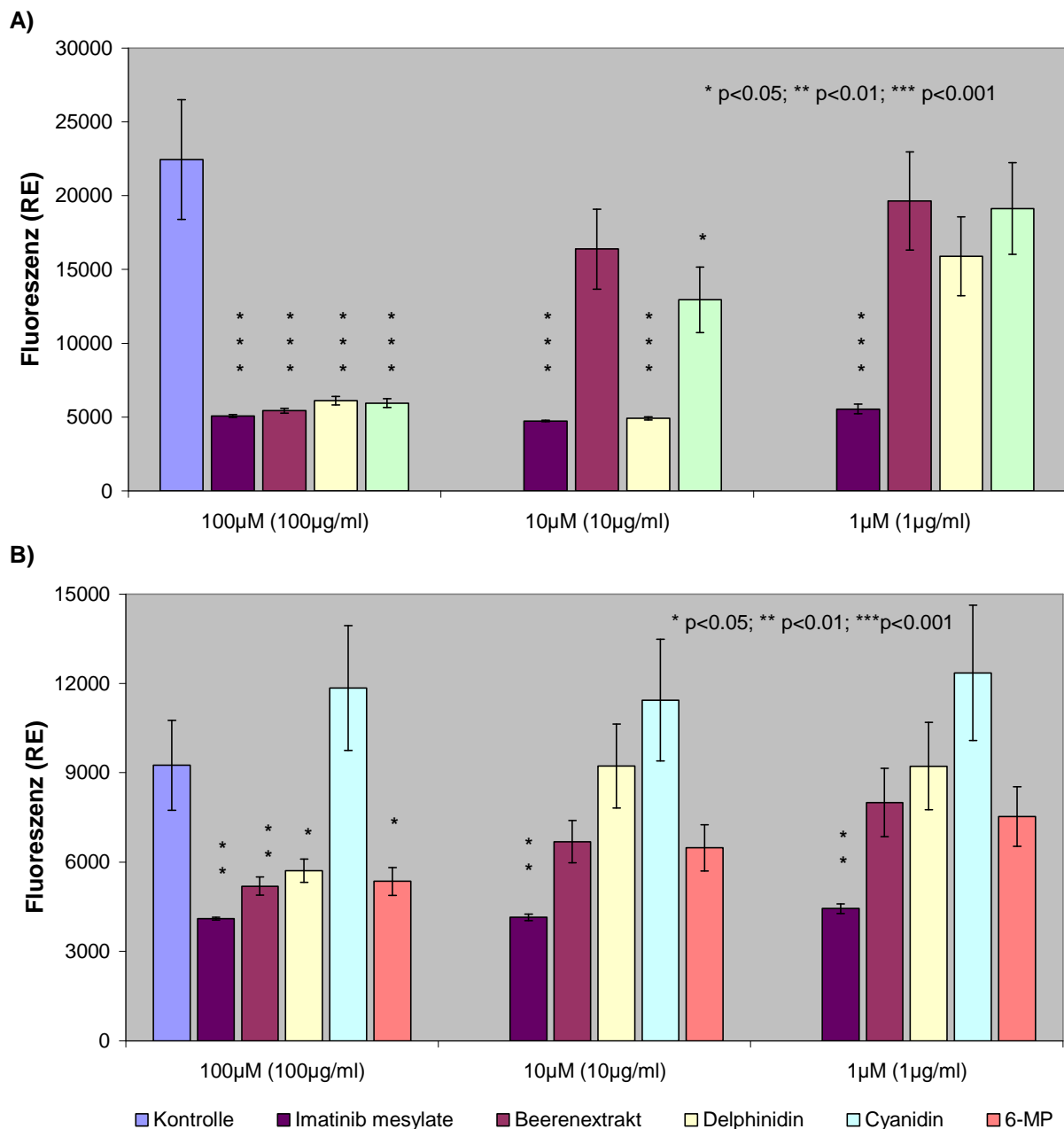


Abbildung 12: Zytotoxizität der nicht-immunsuppressiven Substanzen bei den Leukämiezelllinien BM185 (A) und K562 (B). In der Grafik ist die Fluoreszenz (Mittelwert ± SD) in relativen Einheiten (RE) dargestellt.

Mit Hilfe des *in vitro* Caspase Apoptoseassay wurde untersucht, ob die Caspasen 3, 8 und 9 durch Imatinib mesylate, OptiBerry BX-600, Cyanidin-3-Rutinosid und 6-MP aktiviert werden.

Während Imatinib mesylate in der Zelllinie BM185 die Caspasen 3 ($p < 0.01$) und Caspase 9 ($p < 0.01$) induzierte, führte die Inkubation mit 6-MP zur Hochregulation der

Caspase 3 ($p < 0.001$), Caspase 8 ($p < 0.01$) und Caspase 9 ($p < 0.01$). Der Beerenextrakt und Cyanidin-3-Rutinosid führten dagegen nur bei Caspase 8 ($p < 0.05$) zu einer Expressionssteigerung. Bei der Zelllinie K562 wurde die Apoptose durch Imatinib mesylate und 6-MP über die Expressionssteigerung der Caspasen 3, 8 und 9 ($p < 0.0001$) induziert, während der Beerenextrakt und Cyanidin-3-Rutinosid nur über Caspase 8 wirkten ($p < 0.0001$ bzw. $p < 0.05$) (Daten nicht aufgeführt).

3.5 Die Vakzin-Monotherapie ist den Monotherapien Imatinib mesylate, Cyanidin-3-Rutinosid, OptiBerry® BX600 und 6-MP überlegen

Die *in vitro* nachgewiesene inhibierende Wirkung von Imatinib mesylate, Cyanidin-3-Rutinosid, OptiBerry® BX600 und 6-MP auf die Proliferation verschiedener Leukämiezelllinien, wurde anschließend *in vivo* im syngenem BM185/Balb/c-Mausmodell untersucht. Die Effizienz der Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM wurde mit einer konventionellen Chemotherapie verglichen. Dazu wurde eine Mausgruppe mit 6-MP, einer Standardkomponente der Erhaltungstherapie bei ALL behandelt. Eine weitere Frage war, ob die nicht-immunsuppressiven Substanzen Imatinib mesylate, das Anthocyan Cyanidin-3-Rutinosid sowie der Beerenextrakt OptiBerry® BX600 ebenfalls die Proliferation der murinen Prä-B-ALL im syngenem Balb/c Mausmodell inhibieren und eine Alternative zu 6-MP darstellen. Die Mäuse erhielten im Anschluss an den Leukämiechallenge entweder keine Behandlung, die intrakutane Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM an Tag 2 und 9 oder täglich von Tag 1 bis 21 Imatinib mesylate, Cyanidin-3-Rutinosid, Beerenextrakt oder 6-MP.

Die vakzinierten Mäuse zeigten im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle eine signifikant längere leukämiefreie sowie gesamte Lebensdauer, und 56% der Mäuse überlebten den Leukämiechallenge (Tabelle 5). Dagegen hatte keine der nicht-immunsuppressiven Substanzen (Imatinib mesylate, Cyanidin, BX) einen Effekt auf die Leukämieentwicklung. Weder die leukämiefreie noch die gesamte Lebensdauer war gegenüber der unbehandelten Kontrolle länger, und keine Maus überlebte (Tabelle 5). Die Behandlung mit 6-MP führte zu einer Überlebensrate von 10%. Verglichen mit der Kontrolle wurde außerdem eine signifikante Verlängerung der leukämiefreien und gesamten Lebensdauer erzielt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Effizienz der DNA-Vakzine, des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib mesylate, 6-MP und der Anthocyane

| | Lebensdauer leukämiefrei [t] | | | Lebensdauer gesamt [t] | | | Überlebensrate [%] |
|---------------|------------------------------|-----------|-------------------|------------------------|-----------|-------------------|--------------------|
| | MW | CI 95% | P* | MW | CI 95% | P* | |
| Kontrolle | 9.9 | 9.3-10.5 | --- | 21.6 | 20.5-22.8 | --- | 0/17 [0] |
| Vakzine | 40.7 | 32.9-48.4 | <0.0001 | 46.4 | 41.0-52.0 | <0.0001 | 19/34 [56] |
| Imatinib i.p. | 9.6 | 8.9-10.3 | 0.31 | 21.1 | 19.8-22.3 | 0.18 | 0/14 [0] |
| 6-MP p.o. | 20.4 | 10.3-30.5 | <0.0001 | 35.2 | 28.3-42.1 | <0.0001 | 1/10 [10] |
| Cyanidin i.p. | 10.0 | 8.5-11.5 | 0.43 | 20.3 | 18.9-21.7 | 0.05 | 0/10 [0] |
| BX p.o. | 10.1 | 8.9-11.3 | 0.50 | 20.4 | 18.7-22.2 | 0.15 | 0/10 [0] |

Die Daten wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen, ausgehend vom Leukämiechallenge am Tag 0, erhoben. CI = Konfidenzintervall; *p < 0.05 Signifikanzniveau nach dem einseitigen Mann Whitney Test; MW = Mittelwert; t = Tage

Insgesamt hatte die Monotherapie mit den nicht-immunsuppressiven Substanzen Imatinib mesylate, Beerenextrakt oder Cyanidin-3-Rutinosid im Gegensatz zu der Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM keinen Effekt auf die Leukämieentwicklung.

Gegenüber der Kontrolle konnte sowohl in der vakzinierten als auch der mit 6-MP behandelten Mausgruppe ein verlangsamtes Tumorstadium nachgewiesen werden. Der Vergleich der vakzinierten und der mit 6-MP behandelten Gruppe zeigte, dass durch die Vakzine eine signifikant längere leukämiefreie Lebensdauer erreicht wurde (p<0.01). Die Tumorgenetik der vakzinierten und mit 6-MP behandelten Gruppe zeigt dagegen, dass 6-MP verglichen mit der Vakzine zu einem retardierten Tumorstadium und einem geringeren durchschnittlichen Tumorstadium führt (Abbildung 13) [215].

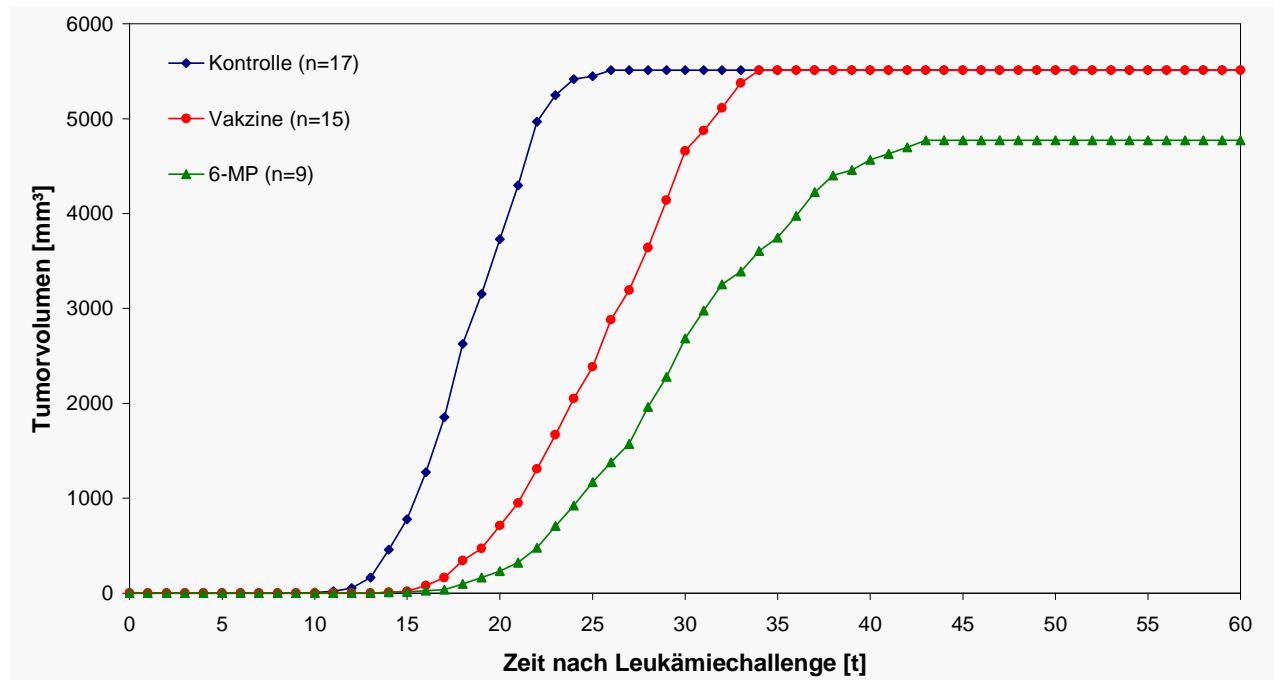


Abbildung 13: Leukämiekinetik nach Behandlung mit 6-MP oder DNA-Vakzine

Dargestellt ist das durchschnittliche Tumorstadium von Mäusen, die an Tag 0 eine lethale subkutane Dosis Leukämiezellen (10 xLD50) erhielten und an der Applikationsstelle einen Tumor entwickelten. Die Mäuse erhielten entweder keine Behandlung (Kontrolle) oder die Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM an den Tagen 2 und 9 oder 6-MP (50mg/m²/Tag) von Tag 1-21. n = Anzahl der Mäuse mit Entwicklung eines Tumors

3.6 Die Kombination der DNA-Vakzine mit 6-MP führt zum Synergismus und zeigt die höchste Effizienz gegen eine präexistente Leukämie

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Kombination der Vakzine mit jeweils einer der drei Substanzen zum Synergismus und einer verstärkten Proliferationshemmung der Leukämiezellen führt. Ferner wurde untersucht, ob 6-MP die Vakzinwirkung beeinträchtigt oder synergistisch wirkt.

Die Kombination der Vakzine mit Imatinib und die Kombination mit Cyanidin-3-Rutinosid zeigte im Vergleich zur Vakzine keine signifikante Verlängerung der leukämiefreien sowie gesamten Lebensdauer. Obwohl die Monotherapie mit Beerenextrakt keinen therapeutischen Effekt hatte, waren sowohl die leukämiefreie als auch die gesamte Lebensdauer der Mäuse nach Kombinationstherapie (Beerenextrakt und Vakzine) im Gegensatz zur Vakzin-Monotherapie signifikant länger, und 90% der Mäuse überlebten (Tabelle 6). Die höchste Effizienz zeigte die Kombination der Vakzine mit 6-MP. Alle Mäuse überlebten den Leukämiechallenge (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der Vakzine-Monotherapie mit den Kombinationstherapien Vakzine (V) und Imatinib mesylate bzw. 6-MP, Beerenextrakt (BX) oder Cyanidin

| | Lebensdauer leukämiefrei [t] | | | Lebensdauer gesamt [t] | | | Überlebens- rate [%] |
|--------------|------------------------------|-----------|---------------|------------------------|-----------|---------------|-------------------------|
| | MW | CI 95% | P* | MW | CI 95% | P* | |
| Vakzine | 40.7 | 32.9-48.4 | - | 46.4 | 41.0-52.0 | - | 19/34 [56] |
| V + Imatinib | 35.8 | 22.9-48.7 | 0.2655 | 42.7 | 33.3-52.1 | 0.2436 | 6/14 [43] |
| V + BX | 56.2 | 47.6-64.8 | 0.0350 | 58.0 | 53.5-62.5 | 0.0329 | 9/10 [90] |
| V + Cyanidin | 43.2 | 27.6-58.8 | 0.3415 | 47.6 | 36.1-59.1 | 0.4496 | 6/10 [60] |
| V + 6-MP | 60 | 60 | 0.0329 | 60 | 60 | 0.0329 | 10/10 [100] |

Die Daten wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen, ausgehend vom Leukämiechallenge am Tag 0, erhoben. CI = Konfidenzintervall; *p < 0.05 Signifikanzniveau nach dem einseitigen Mann Whitney Test; MW = Mittelwert; V = Vakzine; t = Tage

Bei diesem Experiment muß besonders hervorgehoben werden, dass bei Behandlung der Mäuse keine Beeinträchtigung der Vakzineffizienz durch 6-MP, sondern eine synergistische Wirkung von 6-MP und der leukämiespezifischen DNA-Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12 /dSLIM nachgewiesen wurde.

3.7 Die DNA-Vakzine induziert die mRNA-Expression der Transgene BCR-ABL, GM-CSF und IL-12 sowie verschiedener Zytokine

Mit Hilfe der Kryoschnitte wurde die Expression der Transgene *BCR-ABL*-, *GM-CSF*; und *IL-12* nach Applikation der DNA-Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM untersucht. Ferner wurde untersucht, ob die Vakzine zu einer gesteigerten Expression der nicht von der Vakzine kodierten Zytokine *IL-4* und *IFN-γ* führt.

Die Expressionsanalyse zeigte 16 Stunden nach der Vakzinierung eine gesteigerte mRNA-Expression von *BCR-ABL*, *GM-CSF* und *IL-12* an der Vakzinierungsstelle (Abbildung 14). Während die Expression von *IFN-γ* gesteigert war, wurde keine signifikant höhere Expression von *IL-4* beobachtet (Daten nicht aufgeführt).

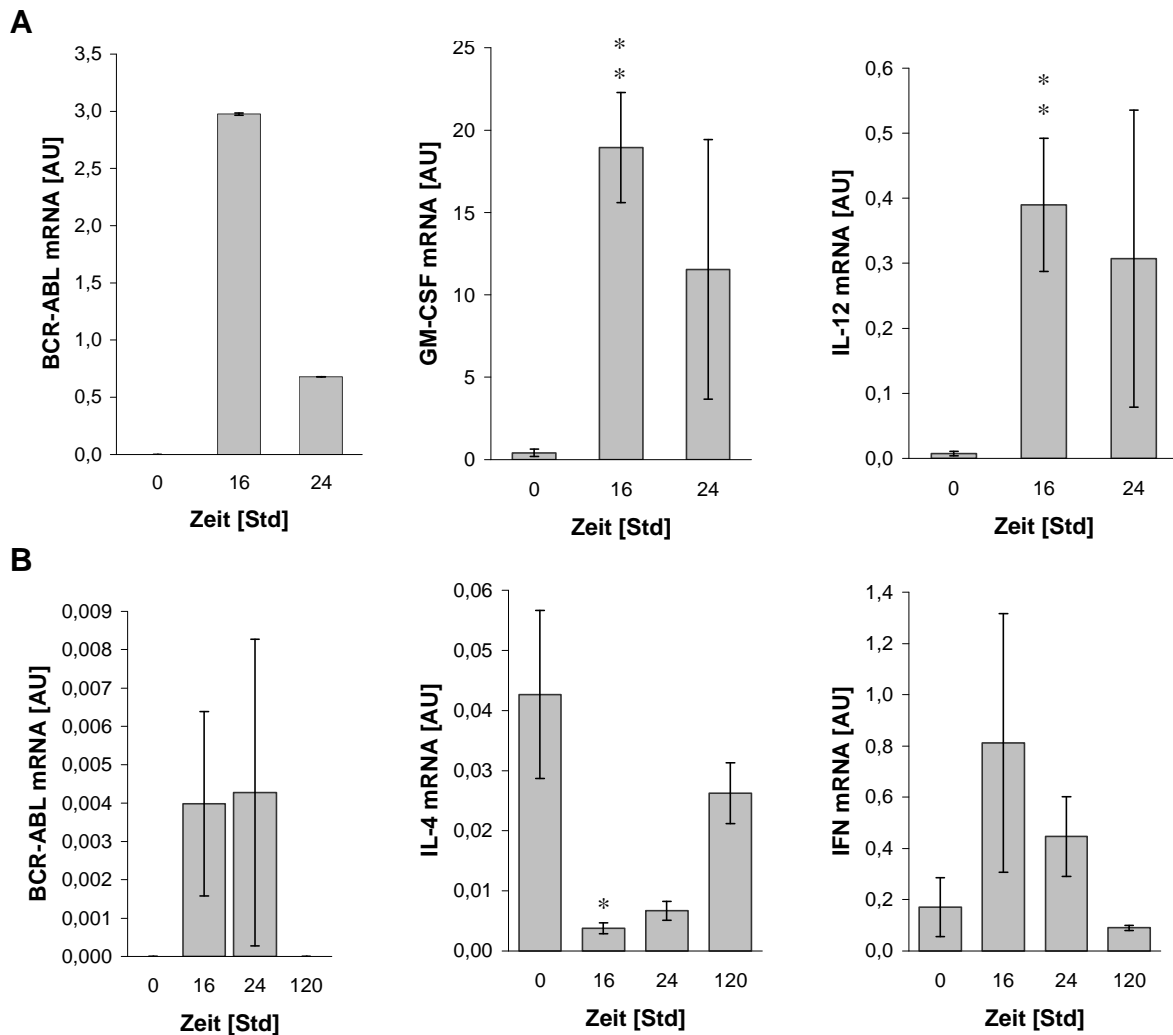


Abbildung 14: Expression der kodierten Transgene, IL-4 und IFN- γ . Expression der BCR-ABL, GM-CSF und IL-12 mRNA 0, 16 und 24 Stunden nach der Vakzinierung an der Vakzinationsstelle (A). Expression von BCR-ABL, IL-4 und IFN- γ imRNA n den regionalen inguinalen Lymphknoten 0, 16, 24 und 120 Stunden nach der Vakzinierung (B). Die mRNA-Expression (Mittelwert \pm SD), dargestellt in relativen Einheiten (AU) wurde mit dem Basisniveau vor der Vakzinierung verglichen. $p < 0,05$ signifikant, Signifikanzniveau nach dem one tailed Student t-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

In den inguinalen Lymphknoten zeigte die Analyse bei BCR-ABL 16 Stunden nach der Vakzinierung eine signifikant stärkere Expression, während die mRNA-Expression von IFN- γ zu beiden Zeitpunkten nur mäßig gesteigert wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei IL-4 eine Suppression der mRNA-Expression nach der Vakzinierung (Abbildung 14) [215].

4 Diskussion

Trotz der erfolgreichen Behandlung der ALL mit risikoadaptierter Chemotherapie, insbesondere bei Kindern mit ALL, kann die Leukämiebelastung häufig nicht vollständig eliminiert werden. In Folge dessen ist das ALL-Rezidiv nach wie vor eine der Haupttodesursachen bei Kindern und Adoleszenten mit maligner Erkrankung [120,121]. Eine weitere Intensivierung der Chemotherapie für Patienten mit Hochrisiko-ALL ist aufgrund toxischer Nebenwirkungen limitiert, so dass neue Therapiestrategien für die Erhaltungstherapie entwickelt werden sollten, um die Rückfallrate zu senken.

Es konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem eine bedeutende Rolle bei der Eliminierung residueller Lymphoblasten spielt [122]. Ferner bestärkt der nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation beobachtete „Graft versus leukemia“-Effekt die immuntherapeutischen Ansätze für die ALL-Erhaltungstherapie. Die im Vergleich zur allogenen Transplantation höhere Rückfallrate bei autologer Transplantation zeigt eine signifikante therapeutische Immunaktivität der transplantierten Zellen [123-125]. Eine Immunsuppression ist mit einem gesteigerten Rückfallrisiko verbunden [126]. Daher sollte untersucht werden, ob mit Hilfe immuntherapeutischer Strategien die residuellen Lymphoblasten eliminiert und die minimale Resterkrankung (MRD) effektiver behandelt werden kann.

Tumorzellen sind schlechte Antigenpräsentierende Zellen (APCs) und exprimieren keine kostimulatorischen Moleküle, so dass die Interaktion von T-Zellen und Tumor- bzw. Leukämiezellen zur Anergie und Apoptose der T-Zellen führt [34,35]. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Vakzinierung von Mäusen mit syngenen BCR-ABL^{p185} exprimierenden Leukämiezellen, die modifiziert wurden, um kostimulatorische Moleküle und Zytokine zu exprimieren, eine systemische Immunität gegenüber der Wildtyp-Leukämie induziert [36,39,127]. Die klinische Applikation leukämiezellbasierter Vakzinen ist aufgrund der schwierigen und durch die Notwendigkeit von Gewebekulturmanipulationen aufwendigen Kulturbedingungen humaner Leukämiezellen eingeschränkt. Eine attraktive Alternative ist die DNA-Vakzinierung mit Expressionsvektoren, die für tumorspezifisches Antigen und Zytokine kodieren und in präklinischen Experimenten therapeutisch bei soliden Tumoren eingesetzt wurde [42,128]. Bei der Immunisierung mit DNA-Vakzinen kommt den Dendritischen Zellen (DCs) eine besondere Rolle zu, weil sie die

gesamte Bandbreite von MHC Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen exprimieren, die für die Antigenprozessierung und Präsentation notwendig sind [129]. Die mit tumorspezifischer DNA transfizierten DCs können zu den regionalen Lymphknoten wandern, wo sie endogen synthetisierte Tumorantigene auf MHC Klasse I Molekülen präsentieren und CD8⁺ T-Zellen aktivieren [130].

In Folgeexperimenten wurden DNA-Vakzinen eingesetzt, die MIDGE-Vektoren die für ein BCR-ABL fusionspezifisches Peptid aus 83 Aminosäuren und murines GM-CSF kodieren sowie den Immunomodulator dSLIM enthalten. Die Vakzinierung mit BCR-ABL und GM-CSF führte zu einer Überlebensrate von 27% und CTL-Assays zeigten, dass die leukämiespezifische BCR-ABL-Sequenz der Vakzine für die Zytotoxizität essentiell ist [63].

4.1 Optimierung der Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM

Basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Basis-DNA-Vakzine mit Hilfe zusätzlicher MIDGE-Vektoren die für CD40-L, IL-27 oder IL-12 kodieren, optimiert werden kann.

Der verwendete CD40-Ligand gehört zur Tumornekrosefaktor-Familie und wird primär auf aktivierten T-Zellen exprimiert [131]. CD40-L bindet an CD40, das auf der Membran von APCs präsentiert wird. Diese Interaktion ist entscheidend an der Aktivierung von Antigenpräsentierenden Zellen und der Induktion einer humoralen sowie einer zellulären Immunantwort beteiligt [92]. Im syngenem BM185 Mausmodell wurde mit Hilfe von für CD40-L kodierenden MIDG-Vektoren keine verbesserte Vakzineffizienz erzielt (Tabelle 2, Abbildung 8). In anderen Arbeiten wurde ein synergistischer Effekt für die Kombination von IL-2 und CD40L und damit eine verbesserte Immunaktivierung nachgewiesen. Sie zeigten, dass eine effektive CD8⁺-T-Zellantwort gegen Tumorantigene abhängig von CD40-CD40L induzierten CD4⁺-T-Helferzellen ist [132-134]. Das legt nahe, dass CD40L alleine nur einen geringen antileukämischen Effekt ausübt und erst durch Kombination mit IL-2 eine deutlich verbesserte Vakzineffizienz erreicht.

Die zweite Komponente zur Optimierung der Basisvakzine war das zur IL-12-Familie gehörende Interleukin-27 (IL-27). Durch IL-27 werden naive CD4⁺ T-Zellen zur Proliferation sowie die Sekretion von Interferon gamma (IFN- γ) induziert. Hisada et

al. beschrieben eine starke Antitumoraktivität des IL-27 im murinen Kolonkarzinom-Modell [96]. In dem syngenen BM185 Mausmodell führte die Vakzinierung mit dem für IL-27 kodierenden MIDGE-Vektor zu einer signifikant längeren tumorfreien Zeit verglichen mit der Basisvakzine und einer Überlebensrate von 55%. Damit konnte auch in diesem murinen Leukämiemodell eine antileukämische Aktivität von IL-27 nachgewiesen werden.

Interleukin-12 (IL-12) wurde bereits in mehreren vergleichbaren Studien als potentes Zytokin zur Eliminierung von Tumorzellen, unter anderem aufgrund seiner antiangiogenischen Eigenschaften, der Vermeidung von Metastasen sowie der Auslösung einer lang anhaltenden Antitumorimmunität in Tiermodellen beschrieben [93,94,135-137]. Zudem zeigte sich, dass genetisch modifizierte IL-12 exprimierende Leukämiezellvakzinen im Mausmodell potente Stimulatoren des Immunsystems sind, die sowohl eine protektive als auch therapeutische antileukämische Immunität hervorrufen [95]. Die nach Prä-Immunisierung der Mäuse mit dem zusätzlich für IL-12 kodierenden MIDGE-Vektor erhaltenen biometrischen Daten bestätigen die Effektivität von IL-12 zur Eliminierung von Leukämiezellen. In klinischen und präklinischen Studien wurde bei systemischer Applikation von IL-12 eine durch einen erhöhten IFN- γ Spiegel hervorgerufene Toxizität nachgewiesen [138]. Im Gegensatz dazu wurden bei Applikation von IL-12 Genexpressionsvektoren via Gene-Gun [139,140] und auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten für IL-12 kodierenden MIDGE-Vektoren keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet. Damit kann die systemische Toxizität durch eine lokale und effiziente Expression von IL-12 vermieden werden [141].

Durch die Komplexierung mit Poly- β -Aminoestern wurde in mehreren *in vitro* Studien [88,90,142-144] eine gegenüber nicht komplexierter DNA gesteigerte Transfektionseffizienz nachgewiesen, so dass die Komplexierung in *in vivo* Studien getestet wurde [145,146]. Obwohl die Komplexierung mit Poly(β -Aminoestern) auch *in vivo* eine gegenüber nackter DNA bis zu 26fach höhere Transfektionsrate erzielt [85,87,91], führte die Komplexierung in den vorliegenden Experimenten nicht zu einer Optimierung der Vakzineffizienz (Tabelle 3). In früheren *in vivo* Studien wurde eine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Applikationsmodus nachgewiesen. So führte die intratumorale Injektion der komplexierten Vakzine zu einer höheren Transfektionseffizienz als die intramuskuläre Injektion der Vakzine. Im Gegensatz

dazu war die Transfektionsrate der nicht komplexierten Vakzine bei intramuskulärer Applikation im Vergleich zur intraperitonealen Applikation höher [87]. Darüber hinaus zeigten Zugates et al., dass die intraperitoneale Applikation der komplexierten Vakzine verglichen mit der intravenösen Applikation eine höhere Transfektionseffizienz aufweist [91]. Wie in den *in vitro* Studien beschrieben, spielen darüber hinaus verschiedene Faktoren eine Rolle für die Transfektionseffizienz. Dazu gehören das Molekulargewicht, die Partikelgröße, die Oberflächenladung des Komplexes sowie das optimale Polymer/DNA-Verhältnis. Das Polymer C32-117 bzw. C32-118 wurde mit optimalem Polymer/DNA-Verhältnis verwendet. Diese Faktoren scheiden daher als Ursache für die nicht verbesserte Vakzineffizienz aus. Auch wenn die Effizienz der DNA-Vakzine nicht verbessert wurde, ist eine fehlgeschlagene Komplexierung der Vakzine fraglich, da die Vakzineffizienz trotz der Komplexierung in Nanopartikel unverändert bleibt. Die alleinige Applikation des Polymers induzierte keine Antitumorwirkung.

4.2 Beteiligung der CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen an der Immunantwort

Die durchgeführte *in vivo* T- und NK-Zelldepletion sollte Aufschluss darüber geben, welche Zellpopulationen für den antileukämischen Effekt der DNA-Vakzine verantwortlich sind. In anderen Studien wurde nachgewiesen, dass für die CML typische BCR-ABL^{p210} Bruchpunktpeptide spezifische nicht-alloreaktive CTLs induzieren [78], indem sie auf MHC Klasse I und MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden [12,79]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits früher zeigen, dass die Expression des BCR-ABL^{p185} Fusionspeptids für die Effektivität der DNA-Vakzine (BCR-ABL/GM-CSF/dSLIM) erforderlich ist und die Effektivität mit der Aktivität spezifischer CTLs korreliert [63]. Ferner konnten Stripecke et al. in T-Zelldepletionsstudien nachweisen, dass CD8⁺ T-Zellen sowie CD4⁺ T-Zellen die Effektorzellen in dem BM185 Zellvakzinmodell sind [36]. Während der Vakzineffekt in der vorliegenden Dissertation durch Depletion der CD4⁺ T- oder NK-Zellen vollkommen aufgehoben wurde, führte die CD8⁺ T-Zelldepletion lediglich zu einer verminderten Vakzinwirkung (Tabelle 4). Die CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen sind demzufolge essentiell für den durch die DNA-Vakzine hervorgerufenen antileukämischen Effekt, und die CD8⁺ T-Zellen spielen eine eher untergeordnete Rolle. Der in der Vakzine enthaltene TLR-9 Agonist dSLIM und IL-12 aktivieren sowohl

das adaptive als auch das angeborene Immunsystem [61,62]. Zudem ist bekannt, dass IL-12 neben der Stimulation von CD4⁺ T-Zellen ebenfalls die Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen fördert und zur Produktion von IFN- γ führt, so dass die Antitumoraktivität von diesen beiden Zelltypen vermittelt werden kann [147,148]. Neben der stimulierenden Wirkung von IL-12 auf antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen [149,150] konnte auch ein verminderter IL-12 Effekt bei Depletion der CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden [135]. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die von Gruber et al. durchgeführte Depletionsstudie zur systemischen Applikation von rekombinanten murinen IL-12 nach i.v. Challenge. Es zeigte sich, dass die alleinige Gabe von IL-12 eine präexistente Leukämie verhindern kann und dieser Schutz von CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen kombiniert vermittelt wurde. Die Depletion einzelner Zellpopulationen hatte keine Wirkung auf die Überlebensrate der Mäuse, die simultane Depletion der CD4 und CD8-Zellen senkte dagegen die Überlebensrate. Den geringsten Schutz gegen den Leukämiechallenge wiesen die Mäuse mit zusätzlicher Depletion der NK-Zellen auf. Gruber et al. schlossen daraus, dass die anderen Zellpopulationen die Schutzfunktion der fehlenden Population teilweise kompensieren und aufrechterhalten können [151]. Ferner zeigten Gruber et al., dass die CTL-Aktivität beziehungsweise NK-Aktivität alleine für den Schutz der Mäuse nicht ausreichend ist, während beide Populationen zusammen eine additive Wirkung hatten. Nach Gruber et al. ist die Aktivierung zusammen mit der durch IL-12 vermittelten Expansion der NK und CD8-Zellen Bedingung für die Eliminierung der Krankheit. Ein Grund für die in der vorliegenden Arbeit vollkommen aufgehobene Vakzineffektivität nach der CD4⁺ T-Zelldepletion könnte der Mangel der von Chang et al. beschriebenen Stimulation der NK-Zellen sein. Die NK-Zellen werden durch IL-2 Sekretion der CD4⁺ T-Zellen stimuliert, so dass es bei der durch Depletion der CD4⁺ T-Zellen herabgesetzten IL-2-Produktion zu einer beeinträchtigten NK-Zellfunktion kommt [152,153]. In mehreren Maustumormodellen wurde eine Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen gezeigt, die zu einer effektiven Antitumorantwort beiträgt [154,155]. Zahlreiche Studien, die eine Abhängigkeit der CTL-Induktion von der Stimulation durch CD4⁺ T-Zellen belegen [156-158] bieten eine weitere Erklärung für die nach CD4⁺-Depletion vollkommen aufgehobene Vakzinwirkung. Die CD4⁺ T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle während des Priming naiver CD8⁺ T-Zellen und gewährleisten eine ausreichende Aktivierung und Funktion der tumorspezifischen CTLs [155]. Nach Toes et al. sind CTL-Antworten unter nicht entzündlichen

Bedingungen, wie den meisten Krebsformen, wesentlich stärker von T-Helferzellen abhängig [159]. Ferner sind CpGs effektive Immunadjuvantien von Tumorstoffen [55,160] und fördern die Entwicklung einer Th1-Immunantwort und antigenspezifischer CTLs [161,162], wobei den DCs eine Schlüsselrolle bei der Modulation der Immunantwort zukommt [55,59,163]. So wurde in früheren Studien bei zusätzlicher Gabe von GM-CSF eine Steigerung des Antitumoreffektes beobachtet [164], wobei die Kombination mit dSLIMs die Immunantwort in Richtung einer Th1-vermittelten Immunantwort förderte [39]. Die 1987 von Doherty postulierte Abhängigkeit der CTLs von NK-Zellen [165] wurde durch verschiedene Studien bestätigt [166,167]. Eine Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen an der CTL-Induktion wird dagegen kontrovers diskutiert. Während Adam et al. einen alternativen Weg der CTL-Induktion nachwies [168], war die durch NK-Zellen initiierte CD8⁺ T-zell-abhängige Tumorstoffabstoßung laut Geldhof auf einen Klassenwechsel zurückzuführen [169]. Ferner wurde die Annahme, dass durch die DNA-Vakzinierung direkt transfizierte DCs auch ohne Hilfe der CD4⁺ T-Zellen in der Lage sind CD8⁺ CTLs unmittelbar zu stimulieren, von Maecker und Porgador widerlegt [156,170]. Die bei den Depletionsexperimenten erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass für ein optimales CTL-Priming die zusätzliche Hilfe von CD4⁺ T-Zellen notwendig ist [171,172]. Zudem belegen die Daten der vorliegenden Dissertation, dass die NK-Zellen trotz der stimulierenden Funktion von IL-12, nicht die Aufgabe der CD4⁺ T-Zellen übernehmen können. Die moderate Beeinträchtigung der Vakzinwirkung nach CD8⁺ T-Zell-depletion zeigt, dass leukämiespezifische CTLs allein für die Leukämieabwehr nicht ausreichen. Da die Depletion der NK-Zellen die Vakzinwirkung ebenfalls vollkommen aufhebt, reagiert das Immunsystem offenbar durch ein komplexes Zusammenspiel dieser drei Zellpopulationen. Ein weiterer Beleg für ein Zusammenwirken der NK- und CD4⁺ T-Zellen bei der Induktion einer gegen den Tumor gerichteten CTL-Aktivität ist die Abhängigkeit der CD8⁺ T-Zellantwort von IL-2. Zum einen ist die Induktion der CD8⁺ T-Zellen abhängig von durch CD4⁺ T-Helferzellen bereitgestelltem IL-2 [38,173,174], darüber hinaus können neben den CD4⁺ T-Zellen auch die NK-Zellen IL-2-Produzenten sein und dadurch die gegen den Tumor gerichtete T-Zellantwort unterstützen [173]. Damit hängt eine effektive Antitumorimmunität von den CD4⁺ T-Zellen ab, die verschiedene Arme des Immunsystems dirigieren [155]. Durch die hier verwendete DNA-Vakzine (BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM) wird sowohl eine adaptive als auch angeborene Immunantwort induziert, wobei die

Dendritischen Zellen ein direktes Bindeglied darstellen [175,176]. Während die CD8⁺ T-Zellen aufgrund ihrer Abhängigkeit von CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen eine untergeordnete Rolle spielen, übernehmen die CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen die Hauptaufgabe bei der immunologischen Tumorabwehr.

4.3 Induktion eines antileukämischen Memory-Effekts der DNA-Vakzine

Mit dem 60 Tage nach dem ersten Challenge durchgeführten Rechallenge wurde untersucht, ob die protektive Vakzine die überlebenden Mäuse erneut schützt. Die Überlebensrate von 50% und die im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle signifikant längere tumorfreie und gesamte Lebensdauer deuten auf einen antileukämischen Memory-Effekt der Vakzine hin. Der Mechanismus der zur Generierung eines immunologischen „CTL-Gedächtnisses“ führt, wurde bereits früher untersucht. So zeigten Gruber et al. und Bourgeois et al., dass Gedächtniszellen auf die Hilfe der CD4⁺ T-Zellen angewiesen sind [151,171]. Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Depletionversuche (Tabelle 5) zeigten darüber hinaus, dass den CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle bei dem antileukämischen Vakzineffekt zukommt. Die CD4⁺ T-Zellen sind somit offenbar nicht nur für das CTL-Priming sondern ebenfalls für die Induktion des CD8⁺ „T-Zellgedächtnis“ verantwortlich und die hier eingesetzte Vakzine konnte ein „immunologisches Gedächtnis“ erzeugen.

4.4 Inhibition der Proliferation von Leukämiezellen durch 6-MP, Imatinib mesylate und Anthocyane *in vitro*

Die nicht-immunsuppressiven Substanzen Imatinib mesylate, OptiBerry BX-600, Delphinidin-3-Glukosid, Cyanidin-3-Rutinosid sowie das zu den Immunsuppressiva gehörende 6-MP wurden *in vitro* bezüglich ihrer Wirkung auf die Proliferation der Leukämiezelllinien K562 und BM185 untersucht.

Übereinstimmend mit früheren *in vitro* Studien zeigte Imatinib mesylate eine signifikante anti-proliferative Aktivität in den BCR-ABL positiven Zelllinien BM185 und K562 [97,177-180]. Diese war im getesteten Dosisbereich von 1-100 µM dosisunabhängig. Der Beerenextrakt zeigte eine dosisabhängige anti-proliferative Aktivität, die in beiden Zelllinien lediglich bei einer Konzentration von 100 µg/ml

signifikant war. Cyanidin-3-Rutinosid zeigte zwar keine Wirkung auf die K562 Zellen, in der BM185 Zelllinie dagegen einen signifikanten dosisabhängigen Effekt bei einer Konzentration von 100 μ M und 10 μ M. Die 100 μ M - Konzentration zeigte eine ähnlich anti-proliferative Wirkung wie Imatinib mesylate, Beerenextrakt und Delphinidin-3-Glukosid. Die in 100 μ g/ml Beerenextrakt enthaltene Menge Cyanidin und Delphinidin ist verglichen mit der 100 μ M Konzentration der isolierten Einzelkomponenten 10 bis 15mal geringer. Trotzdem konnte in beiden Zelllinien ein anti-proliferativer Effekt des Beerenextraktes nachgewiesen werden, während die isolierten Anthocyane Cyanidin-3-Rutinosid und Delphinidin-3-Glukosid lediglich in einer oder zwei Zelllinien eine Wirkung zeigten. Eine mögliche Erklärung ist ein synergistischer Effekt der in dem Beerenextrakt enthaltenen Anthocyane.

Während mit dem Alamar Blue Assay die Wirkung der Testsubstanzen auf die Proliferation der Zelllinien BM185 und K562 getestet wurde, sollte der Apoptoseassay klären, ob eine Apoptose über die Caspasen induziert wird. Da die Caspasen 8 und 9 zu den Initiator-Caspasen zählen, die die Apoptose kontrollieren und regulieren und später die Effektor-Caspasen, z.B. Caspase 3, aktivieren, wurden diese drei Caspasen untersucht. Während die Aktivierung der Caspase 8 über den extrazellulären Signalweg erfolgt, wird Caspase 9 über den intrinsischen (mitochondrienabhängigen) Weg aktiviert. Beide Wege enden in der Effektorphase der Apoptose, bei der Caspase 3 von den Initiator-Caspasen 8 und/oder 9 aktiviert wird, so dass mindestens zwei Caspasen an der Apoptose beteiligt sind [181,182].

Die Inkubation der Zelllinie K562 mit Imatinib mesylate aktivierte die Caspasen 3, 8 und 9, in der Zelllinie BM185 dagegen lediglich Caspase 3 und 9. Es ist bekannt, dass Imatinib mesylate die Proliferation von BCR-ABLp210 und BCR-ABLp185 exprimierenden Leukämiezellen hemmt und die Apoptose über die Aktivierung der Caspase 3 induziert [178-180,183]. Ferner beschreibt die Studie von Jacques et al., dass Imatinib mesylate über die Caspasen 3 und 9 eine mitochondrienabhängige Apoptose in der Zelllinie K562 induziert [184]. Dagegen ist unklar, warum in der BCR-ABL positiven Zelllinie K562 nach Inkubation mit Imatinib mesylate eine Beteiligung der Caspase 8 beobachtet wurde. Nach Jacquelin et al. ist eine direkte Beteiligung der Caspase 8 unwahrscheinlich, da K562 Zellen gegenüber Fas-L oder Trail (**T**umor **N**ecrosis **F**actor **R**elated **A**poptosis **I**nducing **L**igand) killing unempfindlich sind [184]. Im Gegensatz zu Imatinib mesylate führte die Inkubation

mit 6-MP in beiden Zelllinien zur Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9, was sich mit der früher beschriebenen durch Krebsmedikamente über den mitochondrialen Weg eingeleiteten Aktivierung der Caspase 9 deckt [181]. Eine andere Studie zum Einfluss von 6-MP auf T-Zellen zeigte ebenfalls eine deutliche Induktion der Caspase 3 und 9, jedoch nur eine mäßige Aktivierung der Caspase 8 [182].

In den Zelllinien BM185 und K562 wurde sowohl durch Cyanidin-3-Rutinosid als auch den Beerenextrakt ausschließlich die Caspase 8 induziert. Entgegen der in verschiedenen Arbeiten bei Krebszellen gezeigten Induktion der Caspase 3-Aktivierung durch Cyanidin-3-Rutinosid bzw. Cyanidin-3-Glukosid [185,186], konnte in der vorliegenden Dissertation keine Caspase 3-Aktivität nachgewiesen werden. Nachdem Feng et al. eine zeitabhängige Induktion der Apoptose nachweisen konnten [185], ist die Inkubationszeit ein wichtiger Aspekt. Darüber hinaus kontrollieren und regulieren die Initiator-Caspasen 8 und 9 die Apoptose und aktivieren erst später die Effektor-Caspase 3. Im Anschluss an die Inkubation mit Cyanidin-3-Rutinosid in den BM185 und K562-Zellen wurde zwar Caspase 8, aber nicht Caspase 3 nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung ist, dass nicht die Effektor-Caspase 3 aktiviert wird, sondern nicht untersuchte Effektor-Caspasen wie Caspase 6 oder 7 durch Cyanidin-3-Rutinosid aktiviert werden.

4.5 Die optimierte Vakzine ist die beste Monotherapie

Die Behandlung der Mäuse mit der optimierten Vakzine an den Tagen 2 und 9 führte im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle zu einer signifikant längeren leukämiefreien sowie gesamten Lebensdauer und 56% der Mäuse überlebten (Tabelle 5). Im Gegensatz zur Monotherapie mit Imatinib mesylate, Cyanidin-3-Rutinosid oder dem anthozyan reichen Beerenextrakt führte die Monotherapie mit 6-MP zu einer signifikant verlängerten leukämiefreien und gesamten Lebensdauer und einer Überlebensrate von 10%. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die leukämiespezifische DNA-Vakzine im Vergleich zu 6-MP effizienter ist. Anthocyane verfügen über eine umfassende Bioaktivität, dazu zählen eine starke anti-oxidative Aktivität und der Einfluss auf die Zellzykluskontrolle [187]. Ferner zeigten frühere Studien, dass Cyanidin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* über chemopräventive Aktivität verfügt [188] und zudem in verschiedenen humanen Krebszelllinien

apoptotisch wirkt [185]. Entgegen der in diesen Studien und der bei den *in vitro*-Experimenten der vorliegenden Arbeit beobachteten Wirkung auf BM185 Zellen, war weder die Monotherapie mit Beerenextrakt oder Cyanidin-3-Rutinosid noch die Behandlung mit Imatinib mesylate zur Therapie einer prä-existenten Leukämie ausreichend. Obwohl Studien *in vitro* oder im Tiermodell auf ein verringertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Arthritis und Krebs aufgrund des Konsums von Anthocyanen mit anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften deuten [189], ist die Übertragbarkeit auf den Menschen bisher fraglich. Eine mögliche Erklärung liefern Wang und Stoner mit ihrer Annahme, dass die geringen im Blut nachgewiesenen Mengen der Anthocyane (10^{-8} to 10^{-7} M) weit unter der *in vitro* für einen anti-karzinogenen Effekt benötigten Menge liegt [190]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis des Beerenextraktes von 500 mg/kg/Tag ist mit der von Stoner et al. verwendeten 45 g Dosis gefriergetrockneter Himbeeren vergleichbar, die täglich Testpersonen verabreicht wurde. Die Dosis war gut verträglich und Stoner et al. konnten Anthocyane als auch das Polyphenol Ellagsäure in quantifizierbarer Menge im Plasma und Urin der Testpersonen nachweisen [191]. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass nicht die Dosis der Einzelkomponenten, sondern die Kombination mit anderen Therapieansätzen wie der DNA-Vakzine ausschlaggebend für die erfolgreiche Behandlung von MRD sind.

Zahlreiche *in vitro* Studien [97,177-180] und auch *in vivo* Studien mit immun-kompetenten Mäusen oder Nacktmäusen [97,192] konnten eine inhibierende Wirkung von Imatinib mesylate auf die Abl Tyrosinkinase BCR-ABL positiver Zellen nachweisen. Zudem wird Imatinib mesylate bereits seit Jahren in der Therapie bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver CML und ALL eingesetzt [193,194]. Allerdings entwickeln 15 bis 20% der Patienten Resistenzen gegenüber Imatinib mesylate [100-104]. Imatinib mesylate führt zwar zu einer hämatologischen Vollremission, diese ist bei der Mehrzahl der Patienten jedoch nur von kurzer Dauer, wenn sie keine Stammzelltransplantation erhalten [195-197]. Angesichts der *in vitro* Ergebnisse ist die mit Imatinib mesylate als Monotherapie *in vivo* erzielte Unwirksamkeit unerwartet. Ferner führte die einmalige tägliche Applikation von Imatinib mesylate bereits in zwei anderen Arbeiten zu einer erfolgreichen Inhibition der ABL-Tyrosinkinase [97,177], so dass in der vorliegenden Dissertation ebenfalls dieses Applikationsintervall für Imatinib mesylate verwendet wurde.

Aufgrund der spezifischen Pharmakokinetik liegt Imatinib mesylate in der Maus in einer zu geringen Konzentration vor und ist bei einer hoch proliferativen Leukämiezelllinie nicht wirksam. In einer Studie von Weisberg et al. wird beschrieben, dass die Halbwertszeit von Imatinib mesylate in Mäusen im Vergleich zum Menschen signifikant kürzer ist und Imatinib mesylate als Einzelsubstanz sogar in einer Konzentration von 50 mg/kg keinen nennenswerten Effekt aufwies [198]. Um eine effiziente Wirkung zu gewährleisten, muß somit ein kontinuierlicher Konzentrationsspiegel aufrechterhalten bleiben. Da le Coutre et al. darüber hinaus zeigen konnten, dass die zweimal tägliche intraperitoneale Applikation von 50 mg/kg Imatinib mesylate zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums führte, während die einmalige tägliche intraperitoneale Dosis keine Wirkung zeigte, könnte das Applikationsintervall eine Erklärung für die *in vivo* beobachtete Unwirksamkeit sein. Ferner führte die wesentlich höhere orale Dosis gegenüber der intraperitonealen Dosis nicht zu einem signifikanten Unterschied hinsichtlich des tumorfreien Überlebens [192].

Aufgrund der komplexen Eigenschaften der Leukämien ist eine adäquate Übertragung vom Zellkultursystem in das Tiermodell nicht möglich, so dass die *in vitro* beobachtete Wirksamkeit BCR-ABL exprimierender Zelllinien nicht mit der Wirksamkeit *in vivo* assoziiert ist [199]. Untersuchungen der Signalwege in Ph⁺ ALL und CML Tiermodellen zeigten, dass durch BCR-ABL aktivierte Src-Kinasen in Imatinib mesylate behandelten Mäusen aktiv bleiben und Imatinib somit nicht alle von BCR-ABL aktivierten Signalwege inaktiviert [97,200-202], und die Src-Kinasen über einen Abl-Kinase unabhängigen Weg die Phosphorylierung von BCR-ABL induzieren können [203,204]. Von Warmuth et al. *in vitro* getestete dual-spezifische Src/Abl Kinase-Inhibitoren verringerten das Wachstum und die Überlebensrate von Zellen mit Imatinib mesylate resistenten Kinasen [205]. Dies ist eine Erklärung dafür, dass die Monotherapie mit Imatinib mesylate und damit die alleinige Blockierung der BCR-ABL Kinase in unserem Mausmodell nicht ausreicht, um die Leukämie zu kontrollieren. Hu et al. zeigten, dass trotz der bei Inhibierung beider Kinaseaktivitäten durch Dasatinib erreichten kompletten B-ALL Remission, die Eliminierung der Dasatinib insensitiven Leukämienstammzellen für eine Heilung der B-ALL und CML in Mäusen erforderlich ist [201]. Die Immuntherapie ist damit für die Eliminierung von MRD essentiell und wurde im Folgenden als Kombinationstherapie eingesetzt.

4.6 Die Kombination der DNA-Vakzine mit 6-MP erreicht die höchste Effizienz

Die Kombinationstherapie bestand aus den in der Monotherapie eingesetzten Substanzen sowie der DNA-Vakzine (Immuntherapie) und wurde hinsichtlich ihrer antileukämischen Wirkung untersucht. Eine Frage war, ob der antileukämische Effekt der DNA-Vakzine durch 6-MP negativ beeinflusst wird oder alternativ eine synergistische Wirkung bei der Behandlung von MRD nachzuweisen ist. Trotz der zuvor angenommenen immunsuppressiven Wirkung von 6-MP resultierte die Kombinationsbehandlung in einer signifikant längeren leukämiefreien und gesamten Lebensdauer verglichen mit den Mäusen, die die Vakzine erhielten und alle Mäuse überlebten. Während der Beerenextrakt alleine keinen therapeutischen Effekt zeigte, führte die Kombination mit der optimierten DNA-Vakzine verglichen mit der Vakzine zu einer signifikant verlängerten leukämiefreien sowie gesamten Lebensdauer und einer Überlebensrate von 90%. Dagegen konnte weder die Kombination der Vakzine mit Imatinib mesylate noch mit Cyanidin-3-Rutinosid den antileukämischen Effekt verstärken. Die Absorptionsrate von Anthocyanen liegt wie Studien belegen sowohl bei Nagern als auch Menschen unter 1% [191,206]. Ob die nach oraler Applikation des Beerenextraktes absorbierte Menge des Cyanidin-3-Rutinosid für eine anti-leukämische Wirkung ausreicht, ist fraglich. Die absorbierte Menge Cyanidin-3-Rutinosid nach oraler Applikation des Beerenextraktes ist jedoch geringer, als die nach intraperitonealer Applikation von Cyanidin-3-Rutinosid, so dass die erhaltenen Ergebnisse nicht auf eine Dosisabhängigkeit zurückzuführen sind. Vielmehr könnte der Effekt der Anthocyane *in vivo* zumindest zum Teil durch die Hydrolyse der Anthocyane zu Anthocyanidinen im Organismus vermittelt werden [207,208], da Anthocyanidine wesentlich potentere Inhibitoren des Zellwachstums sind als ihre zugehörigen Glykoside [207]. Der synergistische Effekt bei Kombination der Vakzine mit dem Beerenextrakt ist darüber hinaus wahrscheinlich auf die biologische Aktivität der übrigen im Beerenextrakt enthaltenen Anthocyane Delphinidin, Malvidin und Petunidin zurückzuführen. In weiteren mit Nagern durchgeführten Studien, konnte ebenfalls eine durch verschiedene Chemotherapien hervorgerufene verstärkte Effektivität der Immuntherapie nachgewiesen werden [209-211]. Zudem zeigte eine Studie, dass 6-MP keine immunsuppressive Wirkung auf die NK-zellvermittelte Tumorabstoßung bei Kombination einer NK-zellbasierten Immuntherapie mit 6-MP hat [212].

Bei den Zelldepletionen wurde gezeigt, dass die NK-Zellen eine bedeutende Rolle bei der antileukämischen Immunantwort spielen, wodurch ebenfalls die anti-leukämische Wirkung der Vakzine bei einer prä-existenter Leukämie zu erklären ist. Im therapeutischen Modus stellt der Wettlauf zwischen dem Tumorwachstum und einer tumorspezifischen Immunantwort einen wichtigen Faktor bei der Abstoßung der Tumorzellen dar [213]. Aufgrund der kurzen Verdopplungszeit (12h) der hoch malignen BM185 Zellen *in vitro* und dass sich die CTLs erst 7 Tage nach der Vakzinierung bilden, liegt die Tumorlast zu diesem Zeitpunkt bereits bei 16 Millionen Zellen [214]. Daher halten die NK-Zellen die Tumorlast offenbar so lange auf einem niedrigen Niveau, bis die leukämiespezifischen CTLs intervenieren können.

4.7 mRNA-Expression der Transgene und verschiedener Zytokine

Im Anschluss an die leukämiespezifische Immunisierung wurde durch Messung der *BCR-ABL*-; *GM-CSF*; sowie *IL-12*- Expression in den regionären Lymphknoten und der Haut die Zytokinexpression analysiert. Zudem wurde getestet, ob die Vakzine zu einer gesteigerten Expression von *IL-4*, *IFN-γ* oder *TNF-α* führt.

Die Expressionsanalyse ergab eine zeitabhängige, gegenüber der Kontrolle signifikante Expression von *GM-CSF*, *IFN-γ* und *IL-12p⁴⁰* in der Haut. Die Expression von *BCR-ABL*- und *TNF-α* war sowohl 16 als auch 24 Stunden später im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Damit konnte in der Haut eine Expression der in der Vakzine enthaltenen Komponenten *BCR-ABL*, *GM-CSF* und *IL-12p⁴⁰* nachgewiesen werden. Die Messung von Interleukin 4 zeigte weder nach 16 noch 24 Stunden eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Expression. Verglichen mit den in der Haut generierten Daten, wurde in den Lymphknoten nur *IL-12p⁴⁰* 24 Stunden nach der Vakzinierung signifikant stärker exprimiert. *IL-4* wurde dagegen 16 Stunden nach Injektion signifikant schwächer exprimiert als bei der Kontrolle und es wurde keine Änderung der *IFN-γ*-Expression beobachtet. Diese Daten sind angesichts der zuvor aufgrund der Depletionsergebnisse angenommenen immunologischen Mechanismen unerwartet. Wie die Depletionsstudie zeigte, sind die NK-Zellen an der Immunantwort beteiligt, so dass *IL-12* neben der stimulierenden Wirkung auf die *CD4⁺* T-Zellen ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf die NK-Zellen hat. Eine signifikante Expression von *IL-12* konnte in der Haut nur 16 Stunden, in den regionären

Lymphknoten dagegen ausschließlich 24 Stunden nach Vakzinierung nachgewiesen werden. Folglich beträgt der Zeitraum bis zu einem möglichen Nachweis der Expression in den Lymphknoten mehr als 16 Stunden. Da BCR-ABL in den Mäusen nicht exprimiert wird, ist eine „Expressionssteigerung“ bei BCR-ABL schneller sichtbar als bei IL-12, das auch sonst in Mäusen exprimiert wird. Obwohl Interleukin-4 in der Maus konstitutiv exprimiert wird, führt die Vakzine dazu, dass IL-4 im Lymphknoten signifikant weniger exprimiert wird als in der Kontrolle. Chang et al. und Cervantes et al. zeigten, dass durch IL-2 Sekretion der CD4⁺ T-Zellen die NK-Zellen stimuliert werden [152,153]. Da den CD4⁺ T-Zellen, wie den NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei dem antileukämischen Effekt zukommt, sollte die Expression von IL-2 gesteigert sein. Es wurde bereits früher gezeigt, dass CpGs die Entwicklung einer Th1-Immunantwort und antigenspezifischer CTLs fördern [39,57,160-162]. Angesichts einer Th1 Immunantwort wäre eine Steigerung der IL-2- und *IFN-γ*-Expression zu erwarten und könnte die verringerte IL-4 Expression erklärt werden. Abgesehen vom Zeitpunkt der Expressionsanalyse kann die untersuchte Region des Lymphknotens ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse haben. Für eine endgültige Aufklärung dieser Ergebnisse sind daher weitere Experimente erforderlich. Mit Hilfe der Expressionsanalyse wurde jedoch eindeutig die Expression des leukämiespezifischen Bruchpunktpeptids BCR-ABLp185 in der Haut und den regionären Lymphknoten nachgewiesen.

5 Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 550 Kinder bis zum vollendeten 14. Lebensjahr an Leukämie. Dank einer optimierten risikoadaptierten Polychemotherapie können zwar etwa 80 bis 85% der Kinder geheilt werden, dennoch erleiden circa 15 bis 20% ein Rezidiv mit wesentlich schlechterer Prognose. Eine weitere Intensivierung der Chemotherapie für Patienten mit Hochrisiko ALL ist aufgrund toxischer Nebenwirkungen limitiert, so dass neue Therapiestrategien für die Erhaltungstherapie entwickelt werden müssen, um die Rückfallrate zu senken. Da dem Immunsystem bei der Eliminierung residueller Lymphoblasten eine bedeutende Rolle zukommt, sollte die Erhaltungstherapie die immunologischen Mechanismen verstärken, die eine dauerhafte Remission erst ermöglichen. In der angefertigten Dissertation wurde daher die Immunisierung der Mäuse mit einer leukämiespezifischen DNA-Vakzine, bestehend aus Vektoren die für BCR-ABL und GM-CSF kodieren und dem TLR-9 Agonisten dSLIM optimiert. Während die Effizienz der DNA-Vakzine mit Hilfe der zusätzlichen für IL-12 oder IL-27 kodierenden MIDGE-Vektoren signifikant gesteigert werden konnte, war der zusätzliche für CD40L kodierende MIDGE-Vektor unwirksam. Darüber hinaus führte weder die Komplexierung, noch die Dosiserhöhung zu einer weiteren Steigerung der Vakzineffizienz. Ferner konnte gezeigt werden, dass die optimierte DNA-Vakzine BCR-ABL/GM-CSF/IL-12/dSLIM in immunisierten Mäusen nicht nur zur Prävention einer Ph⁺ ALL führt, sondern ebenfalls eine präexistente Ph⁺ ALL erfolgreich therapieren kann. Durch Zelldepletionsassays konnte nachgewiesen werden, dass der immunologische Effekt der Vakzine hauptsächlich von den NK- und CD4⁺ T-Zellen hervorgerufen wird, die CD8⁺ T-Zellen dagegen in geringerem Maße beteiligt sind. Darüber hinaus zeigte sich ein synergistischer Effekt von oral appliziertem Anthocyanin reichem Beerenextrakt oder 6-MP mit der optimierten Vakzine im therapeutischen Modus. Damit stellt die Kombinationstherapie mit Beerenextrakt sowie 6-MP eine hocheffiziente Behandlungsform von MRD in Mäusen und gleichzeitig einen Ansatz zur Optimierung der konventionellen Erhaltungstherapie dar. Es ist wahrscheinlich, dass die Kombination von Chemotherapie und leukämiespezifischer DNA-Vakzine verglichen mit der herkömmlichen Erhaltungstherapie einen Ph⁺ ALL-Rückfall effizienter verhindern kann. Daher sollten zukünftige Studien an die hier gewonnenen Erkenntnisse anknüpfen und den Weg für klinische Studien ebnen.

Literaturverzeichnis

01. Deutsches Kinderkrebsregister 2008
02. Kaatsch P Jahresbericht 2008 des Deutschen Kinderkrebsregisters, www.kinderkrebsregister.de
03. Henze G 20 Jahre Studien zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL-REZ BFM) WIR Informationsschrift der Aktion für krebskranke Kinder e.V. (Bonn) 2004.
04. Yiallourous M. Kinderkrebsinfo ALL Stand 05.01.2011
05. Rowley JD. 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243(5405):290-293.
06. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. 1999. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 341(3):164-172.
07. Deininger MW, Bose S, Gora-Tybor J, Yan XH, Goldman JM, Melo JV. 1998. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res.* 58(3):421-425.
08. Melo JV. 1996. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88(7):2375-2384.
09. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. 1984 An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37(3):1035-1042.
10. Sawyers CL. 1999. Chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 340(17):1330-1340.
11. Shivdasani RA, Orkin SH. 1996. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87(10):4025-4039.
12. Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. 1995. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 86(8):3118-3122.
13. Burnet, F.M. 1957. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J.* 1(5023):841-847.
14. Thomas, L. 1982. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J. Biol. Med.* 55(3-4): 329–333.
15. Swann JB, Smyth MJ. 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 117(5):1137-1146.

16. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21(2):137-148.
17. Kim R, Emi M, Tanabe K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121(1):1–14.
18. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. 2004. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22:329–360.
19. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, Aricò M, Zimmermann M, Mann G, De Rossi G, Stanulla M, Locatelli F, Basso G, Niggli F, Barisone E, Henze G, Ludwig WD, Haas OA, Cazzaniga G, Koehler R, Silvestri D, Bradtke J, Parasole R, Beier R, van Dongen JJ, Biondi A, Schrappe M. 2010. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 115(16):3206-14.
20. www.bfm-international.org AIEOP-BFM ALL 2009
21. Immuntherapien gegen Krebs: Die klinische Anwendung rückt näher. *Deutsches Ärzteblatt* 2009; 106(48): A2403-2409
22. Glennie MJ, Johnson PW. 2000. Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today.* 21(8):403-410.
23. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. 1998. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 91(5):1644-1652.
24. Vitale C, Romagnani C, Falco M, Ponte M, Vitale M, Moretta A, Bacigalupo A, Moretta L, Mingari MC. 1999. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(26):15091-15096.
25. Meng R, Smallshaw JE, Pop LM, Yen M, Liu X, Le L, Ghetie MA, Vitetta ES, Ghetie V. 2004. The evaluation of recombinant, chimeric, tetravalent antihuman CD22 antibodies. *Clin Cancer Res.* 10(4):1274-1281.
26. „Krebsimmuntherapien: Standards und Innovationen“ Huber C, Rammensee H-G, Wölfel T, Britten C. Deutscher Aertzte-Verlag 2008.
27. Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, Chu HC, Wu TC, Yang SS, Kuo HS, Chen DS; Taiwan Hepatoma Study Group. 2009. Decreased Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis B Vaccinees: A 20-Year Follow-up Study. *J Natl Inst* 101(19):1348–1355.
28. Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR. 2008. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* 113(10):3036–3046.

29. Chen CH, Wu TC. 1998. Experimental vaccine strategies for cancer immunotherapy. *J Biomed Sci* 5(4):231-252.
30. Restifo NP, Rosenberg SA. 1999. Developing recombinant and synthetic vaccines for the treatment of melanoma. *Curr Opin Oncol* 11(1):50-57.
31. Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, Ohtake S, Hirashima K, Emi N, Saito K, Hirano M, Shinohara K, Takeuchi M, Taketazu F, Tsunoda S, Ogura M, Omine M, Saito T, Yazaki Y, Ueda R, Hirai H. 1996. Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia* 10(7):1168-1176.
32. Schwartz RH. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248(4961):1349-1356.
33. Walther W., Ulrike Stein U. 2000. Viral Vectors for Gene Transfer- A Review of Their Use in the Treatment of Human Diseases. *Drugs* 60(2): 249-271.
34. Matulonis UA, Dosiou C, Lamont C, Freeman GJ, Mauch P, Nadler LM, Griffin JD. 1995. Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells. *Blood* 85(9):2507-2515.
35. Arceci RJ. 1998. The potential for antitumor vaccination in acute myelogenous leukemia. *J. Mol. Med.* 76(2):80-93.
36. Stripecke R, Skelton DC, Gruber T, Afar D, Pattengale PK, Witte ON, Kohn DB. 1998. Immune response to Philadelphia Chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia induced by Expression of CD80, Interleukin 2, and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor. *Hum. Gene Ther.* 9(14):2049-2062.
37. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. 2003. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348(3):255-256.
38. Sun Y, Jurgovsky K, Möller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, Schadendorf D. 1998. Vaccination with IL-12 gene modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 5(4):481-490.
39. Köchling J, König-Merediz SA, Stripecke R, Buchwald D, Korte A, Von Einsiedel HG, Sack F, Henze G, Seeger K, Wittig B, Schmidt M. 2003. Protection of Mice against Philadelphia Chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia by Cell-based Vaccination Using Nonviral, Minimalistic Expression Vectors and Immunomodulatory Oligonucleotides. *Clin Can Res* 9(8):3142-3149.
40. Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Jo Wixon, J. (2007) Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an Update *The Journal of Gene Medicine* 9(10):833–842.
41. Gao, X., Kim, K.-S., Liu, D. 2007. Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next; *The AAPS Journal* 9(1):E92- E104.

42. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol.* 18:927-74.
43. Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. 1996. Gene Vaccination with Naked Plasmid DNA: Mechanism of CTL Priming. *J. Exp. Med.* 184(4):1555-1560.
44. Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J, Walker CM. 1996. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(16):8578-8583.
45. Albert ML, Frieda S, Pearce A, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. 1998. Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188(7):1359–1368.
46. Takashima A, Morita A. 1999. Dendritic cells in genetic immunization. *J Leukoc Biol.* 66(2):350-356.
47. Tüting T, Storkus WJ, Falo LD Jr. 1998. DNA immunization targeting the skin: molecular control of adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 111(2):183-188.
48. Porgador, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. 1998. Predominant Role for Directly Transfected Dendritic Cells in Antigen Presentation to CD8⁺T Cells after Gene Gun Immunization. *J Exp. Med* 188(6):1075-1082.
49. Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, Troilo PJ, Pauley CJ, Harper LB, Griffiths TG 2nd, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Pacchione SJ, Wang Z, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. 2000. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 43(4-6):273-281.
50. Weeratna RD, McCluskie MJ, Comanita L, Wu T, Davis HL. 2000. Optimization strategies for DNA Vaccines. *Intervirology.* 43(4-6):218-226.
51. Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. 1997. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J. Virol.* 71(1):169-178.
52. Sin JI, Kim JJ, Arnold RL, Shroff KE, McCallus D, Pachuk C, McElhiney SP, Wolf MW, Pompa-de Bruin SJ, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Weiner DB. 1999. IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4⁺ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge. *J. Immunol.* 162(5):2912-2921.
53. Pasquini S, Xiang Z, Wang Y, He Z, Deng H, Blaszczyk-Thurin M, Ertl HC. 1997. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants. *Immunol Cell Biol.* 75(4):397-401.
54. Kim JJ, Tsai A, Nottingham LK, Morrison L, Cunnning DM, Oh J, Lee DJ, Dang K, Dentchev T, Chalian AA, Agadjanyan MG, Weiner DB. 1999. Intracellular

- adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells in vivo. *J Clin Invest.* 103(6):869-877.
55. Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(20):10833-10837.
 56. Krieg AM. 2007. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest.* 117(5):1184-1194.
 57. Sandler AD, Chihara H, Kobayashi G, Zhu X, Miller MA, Scott DL, Krieg AM. 2003. CpG oligonucleotides enhance the tumor antigen-specific immune response of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-based vaccine strategy in neuroblastoma. *Cancer Res.* 63(2):394-399.
 58. Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Eflers SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. 1998. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12631-12636.
 59. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374(6522):546-549.
 60. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(7):2879-2883.
 61. Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 161(6):3042-3049.
 62. Schakowski F, Gorschlüter M, Junghans C, Schroff M, Buttgereit P, Ziske C, Schöttker B, König-Merediz SA, Sauerbruch T, Wittig B, Schmidt-Wolf IG. 2001. A Novel Minimal-Size Vector (MIDGE) Improves Transgene Expression in Colon Carcinoma Cells and Avoids Transfection of Undesired DNA. *Mol Ther.* 3(5):793-800.
 63. Köchling J, Prada J, Bahrami M, Stripecke R, Seeger K, Henze G, Wittig B, Schmidt M. 2008. Anti-tumor effect of DNA-based vaccination and dSLIM immunomodulatory molecules in mice with Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia. *Vaccine* 26(36):4669-4675.
 64. Wittig B, Märten A, Dorbic T, Weineck S, Min H, Niemitz S, Trojaneck B, Flieger D, Kruopis S, Albers A, Löffel J, Neubauer A, Albers P, Müller S, Sauerbruch T, Bieber T, Huhn D, Schmidt-Wolf IG. 2001. Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial. *Hum Gene Ther.* 12(3):267-278.

65. Conter V, Aricò M, Valsecchi MG, Basso G, Biondi A, Madon E, Mandelli F, Paolucci G, Pession A, Rizzari C, Rondelli R, Zanesco L, Masera G. 2000. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) acute lymphoblastic leukemia studies, 1982-1995. *Leukemia* 14(12):2196-2204.
66. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H. 2000. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. *Leukemia* 14(12):2205-2222.
67. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD, Bleyer WA. 2000. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia* 14(12):2223-2333.
68. Harms DO, Janka-Schaub GE. 2000. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 14(12):2234-2239.
69. Kamps WA, Veerman AJ, van Wering ER, van Weerden JF, Slater R, van der Does-van den Berg A. 2000. Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984-1991. *Leukemia* 14(12):2240-2246.
70. Silverman LB, Declerck L, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Lipton JM, Cohen HJ, Sallan SE. 2000. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia* 14(12):2247-2256.
71. Vilmer E, Suciù S, Ferster A, Bertrand Y, Cavé H, Thyss A, Benoit Y, Dastugue N, Fournier M, Souillet G, Manel AM, Robert A, Nelken B, Millot F, Lutz P, Rialland X, Mechinaud F, Boutard P, Behar C, Chantraine JM, Plouvier E, Laureys G, Brock P, Uyttebroeck A, Margueritte G, Plantaz D, Norton L, Francotte N, Gyselinck J, Waterkeyn C, Solbu G, Philippe N, Otten J. 2000. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. Children Leukemia Cooperative Group. *Leukemia* 14(12):2257-2266.
72. Gustafsson G, Schmiegelow K, Forestier E, Clausen N, Glomstein A, Jonmundsson G, Mellander L, Mäkipernaa A, Nygaard R, Saarinen-Pihkala UM. Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO). *Leukemia* 14(12):2267-2275.
73. Maloney KW, Shuster JJ, Murphy S, Pullen J, Camitta BA. 2000. Long-term results of treatment studies for childhood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986-1994. *Leukemia* 14(12):2276-2285.

74. Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Behm FG, Raimondi SC, Gajjar A, Razzouk B, Campana D, Kun LE, Relling MV, Evans WE. 2000. Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *Leukemia* 14(12):2286-2294.
75. Tsuchida M, Ikuta K, Hanada R, Saito T, Isoyama K, Sugita K, Toyoda Y, Manabe A, Koike K, Kinoshita A, Maeda M, Ishimoto K, Sato T, Okimoto Y, Kaneko T, Kajiwara M, Sotomatsu M, Hayashi Y, Yabe H, Hosoya R, Hoshi Y, Ohira M, Bessho F, Tsunematsu Y, Tsukimoto I, Nakazawa S. 2000. Long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia in Tokyo Children's Cancer Study Group 1981-1995. *Leukemia* 14(12):2295-2306.
76. Eden OB, Harrison G, Richards S, Lilleyman JS, Bailey CC, Chessells JM, Hann IM, Hill FG, Gibson BE. 2000. Long-term follow-up of the United Kingdom Medical Research Council protocols for childhood acute lymphoblastic leukaemia, 1980-1997. Medical Research Council Childhood Leukaemia Working Party. *Leukemia* 14(12):2307-2320.
77. Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, Mackinnon S, Yang SY, Sette A, et al. 1996. Specific human cellular immunity to BCR-ABL oncogene-derived peptides. *Blood* 87(9):3587-3592.
78. Nieda M, Nicol A, Kikuchi A, Kashiwase K, Taylor K, Suzuki K, Tadokoro K, Juji T. 1998. Dendritic cells stimulate the expansion of BCR-ABL specific CD8⁺ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukaemia. *Blood* 91(3):977-983.
79. Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP, Lemonnier FA, Leblond V, Langlade-Demoyen P. 1998. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukaemia. *J Clin Invest* 101(10):2290-2296.
80. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Kolitz J, Scheinberg DA. 2000. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood* 95(5):1781-1787.
81. McLaughlin J, Chianese E, Witte ON. 1989. Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol Cell Biol*. 9(5):1866-1874.
82. Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON. 1995. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 82(6):981-988.
83. Lozzio CB, Lozzio BB. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45(3):321-334.
84. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 4(5):346-358.

85. Green JJ, Zugates GT, Tedford NC, Huang YH, Griffith LG, Lauffenburger DA, Sawicki JA, Langer R, Anderson DG. 2007. Combinatorial Modification of Degradable Polymers Enables Transfection of Human Cells Comparable to Adenovirus. *Adv. Mater* 19(19):2836–2842.
86. Akinc A, Lynn DM, Anderson DG, Langer R. 2003. Parallel synthesis and biophysical characterization of a degradable polymer library for gene delivery. *J Am Chem Soc.* 125(18):5316-5323.
87. Anderson DG, Peng W, Akinc A, Hossain N, Kohn A, Padera R, Langer R, Sawicki JA. 2004. A polymer library approach to suicide gene therapy for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(45):16028-16033.
88. Anderson DG, Akinc A, Hossain N, Langer R. 2005. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters). *Mol Ther.* 11(3):426-434.
89. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. 1999. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res.* 45(3):268-275.
90. Green JJ, Chiu E, Leshchiner ES, Shi J, Langer R, Anderson DG. 2007. Electrostatic ligand coatings of nanoparticles enable ligand-specific gene delivery to human primary cells. *Nano Lett.* 7(4):874-879.
91. Zugates GT, Peng W, Zumbuehl A, Jhunjhunwala S, Huang YH, Langer R, Sawicki JA, Anderson DG. 2007. Rapid optimization of gene delivery by parallel end-modification of poly(beta-amino ester)s. *Mol Ther.* 15(7):1306-1312.
92. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 94(5): 1931-1936.
93. Rakhmilevich AL, Janssen K, Turner J, Culp J, Yang NS. 1997. Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology: superior antitumor activity of interleukin-12. *Hum Gene Ther.* 8(11):1303-1311.
94. Cavallo F, Signorelli P, Giovarelli M, Musiani P, Modesti A, Brunda MJ, Colombo MP, Forni G. 1997. Antitumor efficacy of adenocarcinoma cells engineered to produce Interleukin 12 (IL-12) or other cytokines compared with exogenous IL-12. *J Natl Cancer Inst.* 89(14):1049-1058.
95. Dunussi-Joannopoulos K, Leonard JP. 2001. Interleukin-12 gene therapy vaccines: directing the immune system against minimal residual leukemia. *Leuk Lymphoma.* 41(5-6):483-492.
96. Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna ML, Aoki T, Koyanagi Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2004. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res.* 64(3):1152-1156.

97. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 2(5):561-566.
98. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. 2002. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99(10):3530-3539.
99. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM, Sawyers CL. 2002. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 99(6):1928-1937.
100. Weisberg, E. & Griffin, J.D. 2000. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 95(11):3498-3505.
101. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293(5531):876-880.
102. Hofmann WK, Jones LC, Lemp NA, de Vos S, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Ottmann OG, Koeffler HP. 2002. Ph(+) acute lymphoblastic leukemia resistant to the tyrosine kinase inhibitor STI571 has a unique BCR-ABL gene mutation. *Blood* 99(5):1860-1862.
103. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. 2002. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16(11):2190-2196.
104. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. 2002. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2(2):117-125.
105. Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR, Sykes MP, Tan TC, Leone LA, Karnofsky DA, Craver LF, Dargeon HW, Rhoads CP. 1953. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood* 8(11):965-999.
106. Lennard L. 1992. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol.* 43(4):329- 339.

107. Weinshilboum RM, Sladek SL. 1980. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet.* 32(5):651-662.
108. Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle JR. 1993. Metabolic polymorphisms. *Pharmacol Ther.* 57(2-3):129-160.
109. Wang L, Nguyen TV, McLaughlin RW, Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M, Weinshilboum RM. 2005. Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allozyme misfolding and aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(26):9394-9399.
110. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G, Zimmermann M, Lampert F, Havers W, Niethammer D. 1994. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 84(9):3122-3133.
111. Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJ. 1995. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood* 85(3):751-756.
112. Weinshilboum R. 2001. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos.* 29(4):601-605.
113. Schmiegelow K, Al-Modhwahi I, Andersen MK, Behrendtz M, Forestier E, Hasle H, Heyman M, Kristinsson J, Nersting J, Nygaard R, Svendsen AL, Vettenranta K, Weinshilboum R; Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology. 2009. Methotrexate/6-mercaptopurine maintenance therapy influences the risk of a second malignant neoplasm after childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Blood* 113(24):6077-6084.
114. Thomsen JB, Schrøder H, Kristinsson J, Madsen B, Szumlanski C, Weinshilboum R, Andersen JB, Schmiegelow K. 1999. Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells: relation to thiopurine metabolism. *Cancer* 86(6):1080-1086.
115. Zhou S. 2006. Clinical pharmacogenomics of thiopurine S-methyltransferase. *Curr Clin Pharmacol.* 1(1):119-128.
116. Stanulla M, Schaeffeler E, Möricke A, Coulthard SA, Cario G, Schrauder A, Kaatsch P, Dördelmann M, Welte K, Zimmermann M, Reiter A, Eichelbaum M, Riehm H, Schrappe M, Schwab M. 2009. Thiopurine methyltransferase genetics is not a major risk factor for secondary malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia on Berlin-Frankfurt-Münster protocols. *Blood* 114(7):1314-1318.
117. Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, Ludwig WD, Ritter J, Harbott J, Mann G, Klingebiel T, Zintl F, Niemeyer C, Kremens B, Niggli F, Niethammer D, Welte K, Stanulla M, Odenwald E, Riehm H, Schrappe M. 2010. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute

- lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 24(2):265-284.
118. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88(3):347-354.
119. Kalies K, Blessenohl M, Nietsch J, Westermann J. 2006. T cell zones of lymphoid organs constitutively express Th1 cytokine mRNA: specific changes during the early phase of an immune response. *J Immunol.* 176(2):741-749.
120. Pädiatrie, Springer Verlag Christian P. Speer, Manfred Gahr, 3. Auflage 2009
121. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, Heatley SL, Holmfeldt L, Collins-Underwood JR, Ma J, Buetow KH, Pui CH, Baker SD, Brindle PK, Downing JR. 2011. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 471(7337):235-239.
122. Hegazy AN, Klein C. 2008. Ex vivo priming of CD4 T cells converts immunological tolerance into effective antitumor immunity in a murine model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22(11):2070-2079.
123. Bunin N, Carston M, Wall D, Adams R, Casper J, Kamani N, King R; National Marrow Donor Program Working Group. 2002. Unrelated marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *Blood* 99(9):3151-3157.
124. Ringdén O, Labopin M, Gorin NC, Schmitz N, Schaefer UW, Prentice HG, Bergmann L, Jouet JP, Mandelli F, Blaise D, Fouillard L, Frassoni F; Acute Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. 2000. Is there a graft-versus-leukaemia effect in the absence of graft-versus-host disease in patients undergoing bone marrow transplantation for acute leukaemia? *Br J Haematol.* 111(4):1130-1137.
125. Weisdorf D, Bishop M, Dharan B, Bolwell B, Cahn JY, Cairo M, Giralt S, Klein J, Lazarus H, Litzow M, Marks D, McCarthy P, Miller C, Milone G, Russell J, Schultz KR, Sierra J, Wiernik P, Keating A, Loberiza F, Kollman C, Horowitz M. 2002. Autologous versus allogeneic unrelated donor transplantation for acute lymphoblastic leukemia: comparative toxicity and outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 8(4):213-220.
126. Locatelli F, Zecca M, Rondelli R, Bonetti F, Dini G, Prete A, Messina C, Uderzo C, Ripaldi M, Porta F, Giorgiani G, Giraldo E, Pession A. 2000. Graft versus host disease prophylaxis with low-dose cyclosporine-A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA-identical sibling bone marrow transplantation: results of a randomized trial. *Blood* 95(5): 1572-1579.
127. Stripecke R, Skelton DC, Pattengale PK, Shimada H, Kohn DB. 1999. Combination of CD80 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor coexpression by a leukemia cell vaccine: preclinical studies in a murine model recapitulating Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hum Gene Ther.* 10(13): 2109-2122.

128. M. A. Liu. 2003. DNA vaccines: a review. *J. Int. Med.* 253(4):402-410.
129. Hart DN. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90(9):3245-3287.
130. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr. 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med.* 2(10):1122-1128.
131. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 76(6):959-962.
132. Lode HN, Xiang R, Pertl U, Förster E, Schoenberger SP, Gillies SD, Reisfeld RA. 2000. Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4(+) T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction. *J Clin Invest.* 105(11):1623-30.
133. Murphy WJ, Welniak L, Back T, Hixon J, Subleski J, Seki N, Wigginton JM, Wilson SE, Blazar BR, Malyguine AM, Sayers TJ, Wiltrott RH. 2003. Synergistic anti-tumor responses after administration of agonistic antibodies to CD40 and IL-2: coordination of dendritic and CD8⁺ cell responses. *J Immunol.* 170(5):2727-33.
134. Rousseau RF, Biagi E, Dutour A, Yvon ES, Brown MP, Lin T, Mei Z, Grilley B, Popek E, Heslop HE, Gee AP, Krance RA, Popat U, Carrum G, Margolin JF, Brenner MK. 2006. Immunotherapy of high-risk acute leukemia with a recipient (autologous) vaccine expressing transgenic human CD40L and IL-2 after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 107(4):1332-41.
135. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. 1993. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med.* 178(4):1223-1230.
136. Gee MS, Koch CJ, Evans SM, Jenkins WT, Pletcher CH Jr, Moore JS, Koblisch HK, Lee J, Lord EM, Trinchieri G, Lee WM. 1999. Hypoxia-mediated apoptosis from angiogenesis inhibition underlies tumor control by recombinant interleukin 12. *Cancer Res.* 59(19):4882-4889.
137. Tahara H, Zeh HJ 3rd, Storkus WJ, Pappo I, Watkins SC, Gubler U, Wolf SF, Robbins PD, Lotze MT. 1994. Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res* 54(1):182-189.
138. Car BD, Eng VM, Lipman JM, Anderson TD. 1999. The toxicology of interleukin-12: a review. *Toxicol Pathol.* 27(1):58-63.
139. Rakhmilevich AL, Timmins JG, Janssen K, Pohlmann EL, Sheehy MJ, Yang NS. 1999. Gene gun-mediated IL-12 gene therapy induces antitumor effects in the absence of toxicity: a direct comparison with systemic IL-12 protein therapy. *J Immunother.* 22(2):135-144.

140. Rakhmilevich AL, Turner J, Ford MJ, McCabe D, Sun WH, Sondel PM, Grota K, Yang NS. 1996. Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(13):6291-6296.
141. Meko JB, Yim JH, Tsung K, Norton JA. 1995. High cytokine production and effective antitumor activity of a recombinant vaccinia virus encoding murine interleukin 12. *Cancer Res.* 55(21):4765-4770.
142. Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M. 2005. Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluations. *Mol Pharm* 2(5):357–366.
143. Zugates GT, Anderson DG, Little SR, Lawhorn IE, Langer R. 2006. Synthesis of poly(beta-amino ester)s with thiol-reactive side chains for DNA delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 128(39):12726-12734.
144. Green JJ, Shi J, Chiu E, Leshchiner ES, Langer R, Anderson DG. 2006. Biodegradable polymeric vectors for gene delivery to human endothelial cells. *Bioconjug Chem.* 17(5):1162-1169.
145. O'Hagan D, Singh M, Ugozzoli M, Wild C, Barnett S, Chen M, Schaefer M, Doe B, Otten GR, Ulmer JB. 2001. Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines. *Journal of Virology* 75(19): 9037–9043.
146. Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M. 2005. Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 2. In vivo distribution and tumor localization studies. *Pharm Res* 22(12): 2107–2114.
147. Trinchieri G. 1994. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84(12):4008-4027.
148. Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3(2):133-146.
149. Mortarini R, Borri A, Tragni G, Bersani I, Vegetti C, Bajetta E, Pilotti S, Cerundolo V, Anichini A. 2000. Peripheral burst of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and infiltration of metastatic lesions by memory CD8⁺ T cells in melanoma patients receiving interleukin 12. *Cancer Res.* 60(13):3559-3568.
150. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 162(6):3256-3262.
151. Gruber TA, Skelton DC, Kohn DB. 2005. Recombinant murine interleukin-12 elicits potent antileukemic immune responses in a murine model of Philadelphia

- chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Gene Ther.* 12(10):818-824.
152. Chang WC, Fujimiya Y, Casteel N, Pattengale P. 1989. Natural killer cell immunodeficiency in patients with chronic myelogenous leukemia. III. Defective interleukin-2 production by T-helper and natural killer cells. *Int J Cancer.* 43(4):591-597.
153. Cervantes F, Pierson BA, McGlave PB, Verfaillie CM, Miller JS. 1996. Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long-term culture. *Blood* 87(6):2476-2485.
154. Romerdahl CA, Kripke ML. 1988. Role of helper T-lymphocytes in rejection of UV-induced murine skin cancers. *Cancer Res.* 48(9):2325-2328.
155. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 188(12):2357-2368.
156. Maecker HT, Umetsu DT, DeKruyff RH, Levy S. 1998. Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via class II MHC. *J Immunol.* 161(12):6532-6536.
157. Keene JA, Forman J. 1982. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 155(3):768-782.
158. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. 1997. Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *J Exp Med.* 186(1):65-70.
159. Toes RE, Ossendorp F, Ofringa R, Melief CJ. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med.* 189(5):753-756.
160. Liu HM, Newbrough SE, Bhatia SK, Dahle CE, Krieg AM, Weiner GJ. 1998. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92(10):3730-3736.
161. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. 1998. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15553-15558.
162. Lipford GB, Sparwasser T, Zimmermann S, Heeg K, Wagner H. 2000. CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 pre-disposition to antigen-driven responses. *J Immunol.* 165(3):1228-1235.
163. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol.* 28(6):2045-2054.

164. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC. 1993. 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(8):3539-3543.
165. Doherty PC, Allan JE. 1987. Anti-asialo GM1 eliminates both inflammatory process and cytotoxic T-cell function in the lymphocytic choriomeningitis adoptive transfer model. *Cell Immunol.* 107(1):1-7.
166. Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ. 2002. Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol.* 3(1):83-90.
167. Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P. 2003. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol.* 171(5):2366-2373.
168. Adam C, King S, Allgeier T, Braumüller H, Lüking C, Mysliwietz J, Mocikat R. et al. 2005. DC-NK cell cross talk as a novel CD4⁺ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106(1):338-344.
169. Geldhof AB, Van Ginderachter JA, Liu Y, Noël W, Raes G, De Baetselier P. 2002. Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation. *Blood* 100(12):4049-4058.
170. Porgador A, Gilboa E. 1995. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 182(1):255-260.
171. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. 2002. A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science* 297(5589):2060-2063.
172. Sun JC, Bevan MJ. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300(5617):339-342.
173. Kurosawa S, Harada M, Matsuzaki G, Shinomiya Y, Kobayashi N, Nomoto K. 1995. Early-appearing tumour-infiltrating natural killer cells play a crucial role in the generation of anti-tumour T lymphocytes. *Immunology.* 85(2):338-346.
174. Wilson EB, Livingstone AM. 2008. Cutting edge: CD4⁺ T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8⁺ T cell responses. *J Immunol.* 181(11):7445-7448.
175. Mocikat R. Ein neuer Pfad der Immunaktivierung. *Jahresbericht der GSF* 2003:87-90.
176. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. 1999. Dendritic cells directly

- trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat Med.* 5(4):405-411.
177. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB. 1996. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56(1):100-104.
178. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. 1997. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 90(9):3691-3698.
179. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ. 1997. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 90(12):4947-4952.
180. Beran M, Cao X, Estrov Z, Jeha S, Jin G, O'Brien S, Talpaz M, Arlinghaus RB, Lydon NB, Kantarjian H. 1998. Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). *Clin Cancer Res.* 4(7):1661-1672.
181. Salvesen GS. 2002. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ.* 9(1):3-5.
182. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M. 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 46(8):497-510.
183. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, Di Nicola M, Biondi A, Corneo GM, Belotti D, Pogliani E, Lydon NB. 1997. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL⁺ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 23(3):380-394.
184. Jacquelin A, Herrant M, Legros L, Belhacene N, Luciano F, Pages G, Hofman P, Auberger P. 2003. Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J.* 17(14):2160-2162.
185. Feng R, Ni HM, Wang SY, Tourkova IL, Shurin MR, Harada H, Yin XM. 2007. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *J Biol Chem.* 282(18):13468-13476.
186. Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Chiang CL, Yang SF, Hsieh YS. 2005. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. *Nutr Cancer.* 53(2):232-243.
187. Lazzè MC, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi AI, Stivala LA, Bianchi L. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 25(8):1427-1433.

188. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X. 2006. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem.* 281(25):17359-17368.
189. Prior RL, Wu X. 2006. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res.* 40(10):1014-1028.
190. Wang LS, Stoner GD. 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* 269(2):281-290.
191. Stoner GD, Sardo C, Apseoff G, Mullet D, Wargo W, Pound V, Singh A, Sanders J, Aziz R, Casto B, Sun X. 2005. Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. *J Clin Pharmacol.* 45(10):1153-1164.
192. le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. 1999. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst.* 91(2):163-168.
193. Champagne MA, Capdeville R, Krailo M, Qu W, Peng B, Rosamilia M, Therrien M, Zoellner U, Blaney SM, Bernstein M; Children's Oncology Group phase 1 study. 2004. Imatinib mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome-positive leukemia: results from a Children's Oncology Group phase 1 study. *Blood*104(9):2655-2660.
194. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. 2000. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 95(5):1758-1766.
195. Ottmann OG, Pfeifer H. 2009. Management of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:371-81.
196. Koo HH. 2011. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Korean J Pediatr.* 54(3):106-10.
197. Chen H, Liu KY, Xu LP, Liu DH, Chen YH, Zhao XY, Han W, Zhang XH, Wang Y, Zhang YY, Qin YZ, Liu YR, Huang XJ. 2012. Administration of imatinib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation may improve disease-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 5:29.
198. Weisberg E, Catley L, Wright RD, Moreno D, Banerji L, Ray A, Manley PW, Mestan J, Fabbro D, Jiang J, Hall-Meyers E, Callahan L, DellaGatta JL, Kung AL, Griffin JD. 2007. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL⁺ leukemias. *Blood* 109(5):2112-2120.

199. Van Etten RA. 2002. Studying the pathogenesis of BCR-ABL⁺ leukemia in mice. *Oncogene* 21(56):8643-8651.
200. Hu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Van Etten RA, et al. Li S. 2004. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 36(5):453-461.
201. Hu Y, Swerdlow S, Duffy TM, Weinmann R, Lee FY, Li S. 2006. Targeting multiple kinase pathways in leukemic progenitors and stem cells is essential for improved treatment of Ph⁺ leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(45):16870-16875.
202. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB. Abl Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 Inhibits In Vitro Signal Transduction Mediated by c-Kit and Platelet-Derived Growth Factor Receptors. *JPET* 295(1):139-145.
203. Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker BJ, Emmerich B, Hallek M. 1996. Activation of Src Kinases p53/56^{lyn} and p59^{hck} by p210^{bcr/abl} in Myeloid Cells. *Cancer Res* 56(15):3589-3596.
204. Warmuth M., Bergmann M., Prieß A., Häuslmann K., Emmerich B., Hallek M. 1997. The Src Family Kinase Hck Interacts with Bcr-Abl by a Kinase-independent Mechanism and Phosphorylates the Grb2-binding Site of Bcr. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (52):33260–33270.
205. Warmuth M, Simon N, Mitina O, Mathes R, Fabbro D, Manley PW, Buchdunger E, Forster K, Moarefi I, Hallek M. 2003. Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases. *Blood* 101(2):664-672.
206. He J, Magnuson BA, Lala G, Tian Q, Schwartz SJ, Giusti MM. 2006. Intact anthocyanins and metabolites in rat urine and plasma after 3 months of anthocyanin supplementation. *Nutr Cancer*. 54(1):3-12.
207. Cooke D, Schwarz M, Boocock D, Winterhalter P, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH. 2006. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis--relationship with tissue anthocyanin levels. *Int J Cancer*. 119(9):2213-2220.
208. Bitsch R, Netzel M, Sonntag S, Strass G, Frank T, Bitsch I. 2004. Urinary excretion of cyanidin glucosides and glucuronides in healthy humans after elderberry juice ingestion. *J Biomed Biotechnol* 5(2004):343–345.
209. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. 2003. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res*. 63(15):4490-4496.
210. Emens LA, Jaffee EM. 2005. Leveraging the activity of tumor vaccines with cytotoxic chemotherapy. *Cancer Res*. 65(18):8059-8064.

211. Bourquin C, Schreiber S, Beck S, Hartmann G, Endres S. 2006. Immunotherapy with dendritic cells and CpG oligonucleotides can be combined with chemotherapy without loss of efficacy in a mouse model of colon cancer. *Int J Cancer*. 118(11):2790-2795.
212. Markasz L, Stuber G, Vanherberghen B, Flaberg E, Olah E, Carbone E, Eksborg S, Klein E, Skribek H, Szekely L. 2007. Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Mol Cancer Ther*. 6(2):644-654.
213. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, Shiku H, Schreiber RD, Allen PM. 2000. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 13(2):265-276
214. Gruber TA, Skelton DC, Kohn DB. 2002. Requirement for NK cells in CD40 ligand-mediated rejection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol*. 168(1):73-80.
215. Köchling J, Rott Y, Arndt S, Marschke C, Schmidt M, Wittig B, Kalies K, Westermann J, Henze G.: Prevention and synergistic control of Ph(+) ALL by a DNA vaccine and 6-mercaptopurine. *Vaccine*. 2012 Sep 7;30(41):5949-55. Epub 2012 Jul 27.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Joachim Köchling für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit nationale und internationale Kongresse besuchen zu können bedanken. Herrn Professor Dr. Jürgen Westermann danke ich für die Bereitschaft die universitäre Betreuung meiner Arbeit als Doktorvater zu übernehmen. Weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Hendrik Ungefroren und seine Mitarbeiter, die mir Ihre Räumlichkeiten und Analysegeräte zur Verfügung gestellt haben. Ohne die Unterstützung der Kolleginnen und Kollegen hätte diese Arbeit nicht durchgeführt werden können. Deshalb danke ich ganz besonders Stefanie Arndt für die sehr gute, gewissenhafte Zusammenarbeit und Einarbeitung sowie den Mitarbeitern der AG Hiort, die mir mit Ratschlägen, Kooperationsbereitschaft und durch eine angenehme Atmosphäre, die Arbeit in vieler Hinsicht erleichtert hat. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Ralf Werner und Frau Dr. Helga Grötsch für den wissenschaftlichen Austausch, dem Team der Tierhaltung unter Leitung von Herrn Dr. Noel, Herrn Prof. Hartmut Merz und den Mitarbeitern der Pathologie, Winfried Wünsche für die Nutzungsmöglichkeit des Isotopenlabors und Kathrin Kalies aus dem Institut für Anatomie.

Nicht zuletzt bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit durch die José Carreras Stiftung, die Lübeck Hilfe für krebskranke Kinder sowie der Klinik für Kinder und Jugendmedizin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Egbert Herting. Herzlichen Dank auch an alle kritischen Korrekturleser des Manuskriptes sowie Manuel Schmidt, Renata Stripecke und Elisabeth Buchdunger.

Ganz besonders möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir außerhalb der Arbeit unermüdlich die nötige seelisch-moralische Unterstützung, Förderung und Motivation gegeben haben. Dieser Dank geht in erster Linie an meine Familie und Freunde.

Vielen Dank!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder vorher noch gleichzeitig in gleicher oder ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und mich bisher noch keinen anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 24.09.2012

Yvonne Rott

Kongressbeiträge/ Abstracts-Veröffentlichungen

Köchling J, Rott Y, Arndt S, Marschke C, Schmidt M, Wittig B, Kalies K, Westermann J, Henze G.: Prevention and synergistic control of Ph(+) ALL by a DNA vaccine and 6-mercaptopurine. *Vaccine*. 2012 Sep 7;30(41):5949-55. Epub 2012 Jul 27.

Köchling J, Rott Y, Arndt S, Green J, Anderson D, Langer R, Stripecke R, Schmidt M, Henze G, Bucsky P: Prevention of Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia by DNA vaccination using a non-viral vector system and nanoparticle delivery. *Eur J Paed* 167: 371, 2008. 44. Arbeitstagung für pädiatrische Forschung Göttingen 2008

Rott Y, Arndt S, Green J, Anderson D, Stripecke R, Schmidt M, Wittig B and Köchling J: Optimization of a BCR-ABL specific DNA vaccine against Ph⁺ ALL using a nonviral vector system and nanoparticle delivery. *Blood* 112: 4625, 2008. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*

Rott Y and Köchling J: Synergismus von BCR-ABL spezifischer DNA-Vakzine und Imatinib als Rezidivprophylaxe bei Ph⁺ akuter lymphoblastischer Leukämie im syngenem Mausmodell. *Pädiatrie hautnah* 22: 266-267, P43, 2010.

Rott Y, Arndt S, Green J, Anderson D, Stripecke R, Schmidt M, Westermann J and Köchling J: DNA vaccination against Ph⁺ ALL using a nonviral vector system and nanoparticle delivery. 2. Rostocker Symposium für Tumorummunologie im Kindesalter 2008.

Rott Y, Arndt S, Green J, Anderson D, Stripecke R, Schmidt M, Westermann J and Köchling J: DNA-Vakzine zur Behandlung minimaler Resterkrankung (MRD) bei ALL. 2. Lübecker Doktorandentag 2008.

Rott Y, Arndt S, Green J, Stripecke R, Wittig B, Schmidt M, and Köchling J: CD8⁺ T cells and natural killer cells are essential for the immunization by a BCR-ABL-specific DNA vaccine against Ph⁺ ALL. *Mol Ther* 17: S155, 2009 (Abstract). 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, San Diego.

Rott Y, Arndt S, Marschke C, Stripecke R, Wittig B, Schmidt M and Köchling J: Synergism between Imatinib mesylate and a BCR-ABL-specific DNA vaccine against pre-established Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia in syngeneic mice. Blood 114:1201, 2009 (Abstract). 51st ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans.

Rott Y, Arndt S, Green J, Stripecke R, Schmidt M, und Köchling J: CD8⁺ T-Zellen und NK- Zellen vermitteln die protektive Wirkung einer Ph⁺ ALL spezifischen DNA-Vakzine. 3. Rostocker Symposium für Tumorummunologie im Kindesalter 2009.

Rott Y, Sagner M, Ungefroren H, Schmidt M, Wittig B, Herting E and Köchling J: Antileukemic Efficacy of Anthocyanins In-Vitro and In-Vivo and In Combination with a DNA Vaccine Against Ph⁺ Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood (ASH Abstracts) 2010; 116: 3267. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando.

Rott Y, Schmidt M, Wittig B, Herting E and Köchling J: Synergism Between Chemotherapy with 6-Mercaptopurine and DNA Vaccination Against Ph⁺ Acute Lymphoblastic Leukemia In Syngeneic Mice. Blood (ASH Abstracts) 2010; 116: 3265. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando.

Rott Y, Stripecke R, Wittig B, Schmidt M, Westermann J und Köchling J: Synergismus von BCR-ABL spezifischer DNA-Vakzine und Imatinib als Rezidivprophylaxe bei Ph⁺ akuter lymphoblastischer Leukämie im syngenem Mausmodell. 59. Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck 2010.