

Aus der Klinik für Urologie  
der Universität zu Lübeck

Direktor : Prof. Dr. med. D. Jocham

**Standardisierter Vergleich der immuntherapeutischen Potenz  
verschiedener BCG-Stämme, atypischer Mykobakterien und  
*E. coli***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

Henning Braasch

aus Lübeck

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Böhle
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.02.2005

gez.: Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

**Meinen Eltern  
in Dankbarkeit**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
1.1. Das Harnblasenkarzinom	12
1.2. Stadienorientierte Therapie	15
1.3. Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms mit BCG	17
0.4. BCG in der Therapie verschiedener Malignome	18
0.5. Wirkmechanismus der intravesikalen Immuntherapie mit BCG	19
1.6. Entstehung und Eigenschaften der verschiedenen BCG-Stämme und Nachweis genetischer Unterschiede	24
1.7. Problematik	26
1.8. Fragestellung	28
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
2.1. Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen	29
2.2. Bakterien und Bakterienkulturen	31
2.2.1. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Präparationen	31
2.2.2. Kultur von BCG	32
2.2.3. Keimzahlbestimmung von BCG	33
2.2.4. Atypische Mykobakterien	33
2.2.5. Konzentrationsbestimmung der atypischen Mykobakterien	35
2.2.6. <i>E. coli</i> Laborstamm XL1-blue	36
2.3. Zellkulturen	36
2.3.1. BT-A	36
2.3.2. SBC-7	36
2.3.3. T-24	36

2.3.4. HCV-29	37
2.3.5. Kulturbedingungen	37
2.4. Zytotoxizitätsassay	37
2.4.1. Gewinnung mononukleärer Zellen	39
2.4.2. Effektorzellstimulation	39
2.4.3. Präparation der Zielzellen für den Zytotoxizitätsassay	40
2.4.4. Ansatz des Zytotoxizitätsassays und Berechnung der spezifischen Lyse	41
2.5. Adhäsionsassay	43
2.5.1. Präparation des Monolayers aus Blasentumorzellen	45
2.0.1. Markierung und Präparation der Bakterien, Durchführung und Berechnung der Adhäsion	45
3. ERGEBNISSE	47
3.1. Ergebnisse der Adhäsionsassays	47
3.1.1. Adhäsion der verschiedenen BCG-Stämme und <i>E. coli</i> an Blasentumorzellen	47
3.1.2. Adhäsion der atypischen Mykobakterien	50
3.2. Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays	52
3.2.1. Vergleich des durch die verschiedenen BCG-Stämme und <i>E. coli</i> induzierten zytotoxischen Potentials gegen Tumorzellen	52
3.2.2. Vergleich des durch die verschiedenen atypischen Mykobakterien induzierten zytotoxischen Potentials gegen Tumorzellen	55
3.3. Vergleich des zytotoxischen Potentials der mit unterschiedlichen Konzentrationen von BCG-Connaught und –Tice induzierten BAK-Zellen	57
3.4. Vergleich der BCG-Stämme bei „non-respondern“	59

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
4.1.	Diskussion der eigenen Methodik	61
4.1.1.	Keimzahlbestimmung der verschiedenen Bakterien	61
4.1.2.	Adhäsionsassay	61
4.1.3.	Zytotoxizitätsassay	62
4.2.	Literaturübersicht	64
4.2.1.	Literaturübersicht über die verschiedenen BCG-Stämme in der Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms	64
4.2.2.	Literaturübersicht über den Vergleich der verschiedenen BCG-Stämme in experimentellen in-vitro und in-vivo Studien	69
4.3.	Kritischer Vergleich der eigenen Untersuchungen und Ergebnisse mit früheren in-vitro Studien	72
4.3.1.	Vergleich der Ergebnisse verschiedener Adhäsionsassays	72
4.3.2.	Vergleich verschiedener immunstimulatorischer Studien	75
4.4.	Relevanz der vorliegenden Ergebnisse für die Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG)	76
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>97</b>
7.1.	Extinktionsgeraden der atypischen Mykobakterien und <i>E. coli</i>	97
7.2.	Berechnung der Bakterienkonzentration über die gemessene Extinktion	100
7.3.	Literaturübersicht über die verwendeten BCG-Stämme	101
7.3.1.	BCG in der Immuntherapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms	101
7.3.2.	Verschiedene in-vivo und in-vitro Untersuchungen	103
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>104</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>106</b>

## **ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
ADM	Adriamycin
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BAK-Zellen	BCG-aktivierte Killer-Zellen
CD	Cluster Designation
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
FKS	Fetales Kälber-Serum
FN	Fibronektin
G	Differenzierungsgrad eines Tumors
HBSS	Hank´s balanced salt solution
HS	Human-Serum
IL-2	Interleukin-2
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IS6110	Insertionssequenz 6110 (wird zur Typisierung der Mykobakterien verwendet)
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killer-Zellen
M	Metastasierungsstadium eines Tumors
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMC	Mitomycin C
MNZ	Mononukleäre Zellen
mpt64	Gen der Tuberkulose-DNA, kodiert die Proteine MBT64 und MPB64

N	Lymphknotenstadium eines Tumors
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline
RD	region of deletion
T	Infiltrationstiefe eines Tumors
TNF	Tumornekrosefaktor
TUR	Transurethrale Elektresektion
UICC	Union Internationale Contre le Cancer (Unio internationalis contra cancrum)
UK	unstimulierte Kontrolle ( in früheren Publikationen „NK“ genannt)

## 1. EINLEITUNG

Die intravesikale Instillation von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) hat sich als effektive Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms der Harnblase erwiesen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es unter der Immuntherapie mit BCG zu einer deutlichen Senkung der Rezidivrate kommt und der Tumorprogress ebenfalls therapeutisch relevant beeinflusst wird. Zugleich haben diverse Studien die Überlegenheit einer Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika wie Adriamycin, Doxorubicin, Thiotepa und Mitomycin C gezeigt.

Bereits seit Einführung von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in die Immuntherapie verschiedener Tumore wird die Frage diskutiert, ob auch Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen den Therapieerfolg beeinflussen. Während bisher keine klinischen Studien existieren, die die Effektivität der verschiedenen Stämme direkt vergleichen, zeigte eine Studie von van der Meijden et al., dass die Immuntherapie mit BCG-RIVM und die Chemotherapie mit Mitomycin C die gleiche Effektivität in der Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms aufwiesen, während BCG-Tice eine geringere therapeutische Wirkung als Mitomycin C erzielte. Die Ergebnisse dieser umstrittenen Studie weisen auf die Bedeutung eines Vergleiches der verschiedenen BCG-Stämme unter standardisierten in-vitro Bedingungen und auf die Notwendigkeit weiterer klinischer Studien hin.

Der genaue Wirkmechanismus der Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin ist zur Zeit nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings wird vermutet, dass der Erfolg der Immuntherapie durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Brosman et al. postulierten, dass die Fähigkeit des Immunsystems des Patienten, auf mykobakterielle Antigene zu reagieren, eine geringe Tumormasse und der direkte Kontakt zwischen Tumorzelle und den BCG-Bakterien Voraussetzung für eine therapeutisch effektive Therapie sind. Diese Hypothese war ebenfalls von Zbar aufgestellt worden.

Andere Autoren vermuten, dass der Erfolg der Immuntherapie unter anderem von der Viabilität der Mykobakterien, der Anzahl der verwendeten Bakterien, dem Therapieschema aber auch von dem verwendeten BCG-Stamm abhängig ist.

Obwohl sich alle BCG-Stämme von dem originär von Albert Calmette und Camille Guérin attenuierten Ursprungsstamm aus dem Pasteur-Institut in Lille ableiten, führte die nachfolgende Subkultivierung der Stämme zu einer Vielzahl von Tochterlinien, die eine Heterogenität in Hinblick auf ihr Genom und potentiell auf ihre Immunität aufweisen. Neuere DNA-Analysen der verschiedenen BCG-Stämme haben tatsächlich genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen nachweisen können . Da lebende BCG nicht über längere Zeit gelagert werden konnten, mussten die zur Impfung bzw. Immuntherapie benötigten Bakterien immer relativ frisch aus fortlaufenden Kulturen gewonnen werden. Behr et al. sehen in der fortlaufenden Kultur die Ursache für die genetischen Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen und konnten nachweisen, dass das Fortschreiten der Evolution der BCG-Stämme für die bisher aufgetretenen genetischen Veränderungen der Mykobakterien verantwortlich war . Dieser Umstand betont wiederum die Notwendigkeit, die BCG-Stämme engmaschig hinsichtlich ihrer sich ändernden genetischen und immunologischen Eigenschaften zu untersuchen.

Zusätzlich konnten weitere Faktoren nachgewiesen werden, die ebenfalls Einfluss auf den Therapieerfolg der Immuntherapie mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) nehmen könnten. So wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen desselben Stammes beobachtet. Shapiro et al. untersuchten die Keimzahl und die Wachstumsgeschwindigkeit zweier Chargen von BCG-Pasteur, Institute Armand-Frappier, Laval, Quebec, Kanada. Nach Herstellerangaben sollten beide Chargen  $10^7$  CFU (colony forming units) pro Milligramm Lyophilisat enthalten. Die Autoren konnten nachweisen, dass die erste Charge nach einer Kulturdauer von 3 Wochen lediglich  $10^6$  CFU/mg enthielt, während bei der zweiten Charge bereits nach einer in-vitro Kulturdauer von 2 Wochen die angegebene Bakterienkonzentration von  $10^7$  CFU/mg bestätigt werden konnte. In derselben Arbeit wiesen die Autoren eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen eingesetzter BCG-Konzentration und Anti-Tumoreffekt nach. Daher muss nach Meinung der Autoren auch die Variabilität zwischen den verschiedenen Chargen bei der Beurteilung des Therapieerfolges einer Immuntherapie mit BCG berücksichtigt werden .

Ratliff et al. konnten nachweisen, dass die Mykobakterien nach der Rekonstitutionierung und Verdünnung des Lyophilisats zu makroskopisch sichtbaren Konglomeraten aggregieren, wodurch die Effizienz der Immuntherapie reduziert wird . Daher wurden die Mykobakterien teilweise mit Detergentien versetzt, um die Aggregation zu verhindern. Allerdings verursacht der Zusatz von Detergentien während der Kultur und bei der

Instillation der Bakterien in die Harnblase ebenfalls eine Reduktion der Immunantwort und des Adhäsionsvermögens in-vitro und in-vivo .

Die besondere Bedeutung einer effektiven Adhäsion der Mykobakterien an die epithelialen Tumorzellen wird dadurch deutlich, dass hierin der initiale Schritt der Immuntherapie des oberflächlichen Blasenkarzinoms mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vermutet wird . In einem zweiten Schritt kommt es dann zur Generierung von zytotoxischen Zellen, die BCG-aktivierte Killerzellen, kurz BAK-Zellen genannt werden . Diese zwei Schritte der Immuntherapie konnten in der vorliegenden Arbeit in einem Adhäsionsassay und einem Zytotoxizitätsassay unter standardisierten in-vitro Bedingungen simuliert werden.

Die Mykobakterien wurden dabei unter optimalen Kulturbedingungen kultiviert, um Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen auf den Stamm und nicht auf unterschiedliche Präparation oder Wachstumsbedingungen zurückführen zu können.

Zusätzlich wurden 6 atypische mykobakterielle Stämme und *E. coli* in den oben beschriebenen Assays untersucht, um zu klären, ob auch diese Bakterien unter in-vitro Bedingungen immuntherapeutisch relevante Eigenschaften besitzen.

## 1.1. Das Harnblasenkarzinom

Die Tumore der Harnblase lassen sich allgemein in benigne und maligne Tumore einteilen. Hinsichtlich ihres histologischen Ursprungs unterscheidet man mesenchymale und epitheliale Tumore.

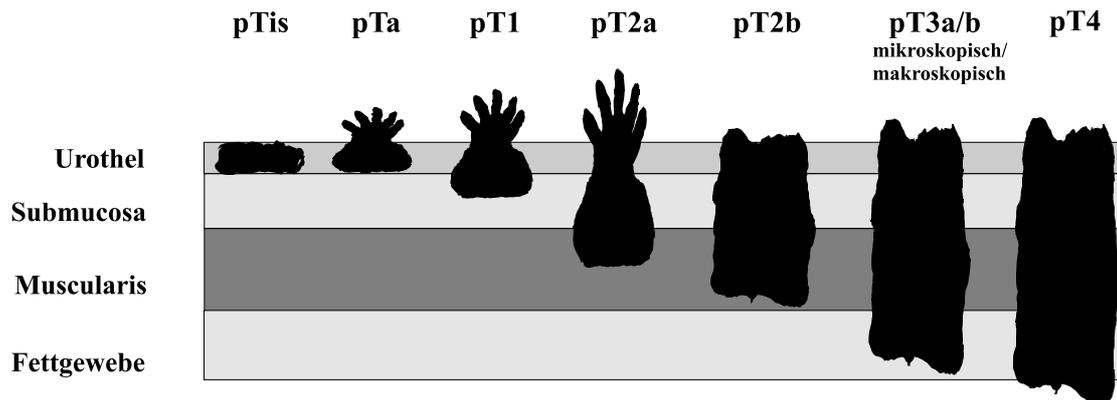
Das Harnblasenkarzinom ist der fünfthäufigste maligne Tumor des Mannes und der siebthäufigste maligne Tumor der Frau. Die Inzidenz beträgt 17-19 pro 100.000 Einwohner. Mit 2-3% aller malignen Tumorerkrankungen ist das Harnblasenkarzinom der häufigste Tumor der ableitenden Harnwege . Dabei liegt das Maximum der Tumorzinzidenz in der 5. bis 7. Lebensdekade .

Die Einteilung der Tumorausdehnung des oberflächlichen Urothelkarzinoms erfolgt durch die TNM-Klassifikation der UICC (1997). Dabei beschreibt das T-Stadium die Infiltrationstiefe des Tumors, während der Befall der regionären Lymphknoten durch das N-Stadium klassifiziert wird. Das Vorhandensein von Fernmetastasen wird durch das M-Stadium beschrieben. Die Abbildung (Abb. 1.1) zeigt die Unterteilung des T-Stadiums in grafischer Darstellung. Nicht dargestellt ist die Unterteilung des Tumorstadiums pT4 in die Stadien pT4a und pT4b bei Infiltration von Prostata bzw. Uterus und Vagina einerseits und der Infiltration von Becken- bzw. Abdominalwand andererseits.

Die histopathologische Differenzierung der Karzinome wird durch das G-Stadium beschrieben. Während es sich bei einem G1-Karzinom um einen hochdifferenzierten Tumor handelt, ist ein G2-Tumor nur mäßig differenziert und ein G3-Tumor schlecht differenziert.

60 - 70% der Harnblasenkarzinome treten multifokal auf . Dabei sind die meisten Tumore an der Seiten- und Hinterwand bzw. dem Trigonum der Harnblase lokalisiert.

75 - 85% der Urothelkarzinome der Harnblase wachsen oberflächlich bzw. papillär und werden daher den Tumorstadien TIS, Ta und T1 zugeordnet. (Abb. 1.1)



**Abb. 1.1** : TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

15-25% der Urothelkarzinome sind bei Diagnosestellung bereits muskelinvasiv und werden durch die Tumorstadien T2-T4 klassifiziert. Ein T4-Tumor hat die Blasenwand bereits überschritten.

Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Metastasierungswahrscheinlichkeit herstellen. Während bei einem TIS in 20-80% der Fälle bereits Metastasen vorliegen, liegt die Metastasierungswahrscheinlichkeit der Tumorstadien Ta und T1 lediglich bei 5%. Bei einem T2 Tumor liegt bereits in 30% der Fälle eine Metastasierung vor. Die Metastasierungsrate der T4 Tumore steigt auf 60% zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad hergestellt werden. Während es sich bei einem Carcinoma in situ, das einem TIS Tumorstadium entspricht, definitionsgemäß in 100% der Fälle um einen schlecht differenzierten G3-Tumor handelt, sind 65% der papillären Tumore (Ta) gut differenziert (G1). Bei einem T1-Tumorstadium handelt es sich in 48% der Fälle um einen mäßig differenzierten G2-Tumor und in 39% um einen schlecht differenzierten G3-Tumor. Es wird deutlich, dass mit Ausnahme des Carcinoma in situ (Tis) eine Entdifferenzierung auch zu einer Zunahme der Infiltrationstiefe führt. Das Carcinoma in situ hingegen wächst nur oberflächlich und zeigt keine Infiltration, d.h. es überschreitet die Basallamina nicht, bildet aber unbehandelt aggressive und muskelinvasive Tumore aus.

Von weiterer klinischer und therapeutischer Bedeutung sind die Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit des Harnblasenkarzinoms. Die hierdurch bedingte unterschiedliche Prognose und der unterschiedliche zu erwartende Verlauf der Tumorerkrankung sind wiederum wichtige Parameter, die bei der Festlegung der Behandlungsstrategie beachtet werden müssen. Die Untersuchung der Rezidivrate und des Tumorprogresses in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades führt zu der Definition von Risikogruppen. So beträgt die 1-Jahres-Rezidivrate bei gut und mäßig differenzierten Tumoren (G1-G2) lediglich 30-38%, bei schlecht differenzierten Karzinomen aber bereits 70%. Die 3-Jahres-Rezidivrate nach Resektion des Tumors ohne weitere Therapie beträgt bei einem gut differenzierten Tumor 50%. Diese Rezidivrate steigt jedoch auf 60% bei mäßig (G2) und sogar auf 80% bei schlecht (G3) differenzierten Tumoren an. Bei multifokalen Tumoren erhöht sich die Rezidivwahrscheinlichkeit zusätzlich.

Die Progressions- und Metastasierungsneigung der oberflächlichen Harnblasenkarzinome wird ebenfalls durch den Tumor- und Differenzierungsgrad bei Diagnosestellung bestimmt. So kommt es bei einem Differenzierungsgrad von G1 in 2%, von G2 in 11% und von G3 bereits in 45% der Fälle zu einem Tumorprogress mit Muskelinvasion und Metastasierung. Während bei papillären Tumoren (Ta) nur 4% der Tumore zu einem Tumorprogress neigen, zeigen bereits 30% der T1 Tumore dieses Verhalten. Das tumorbiologische Verhalten des in 5% der Harnblasenkarzinome auftretenden Carcinoma in situ (CIS) zeigt sogar bei 31-83% der Patienten einen Tumorprogress, wie auch aufgrund der schlechten Differenzierung (G3) zu erwarten ist.

## 1.2. Stadienorientierte Therapie

Um die Therapie und Diagnostik des Harnblasenkarzinoms zu standardisieren und zu optimieren, wurden im Auftrag der Deutschen Krebsgesellschaft und ihren wissenschaftlichen Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Krebshilfe, der Deutschen Gesellschaft für Urologie und anderen Institutionen Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms entwickelt . Die Leitlinien beschreiben detailliert die durchzuführende Diagnostik, die Untersuchungsverfahren zum prätherapeutischen staging, die histo-pathologische Diagnostik und die Therapie des Urothelkarzinoms.

Die transurethrale Elektroresektion (TUR) stellt den initialen Schritt zur Diagnosesicherung und Therapie des Harnblasenkarzinoms dar. Die Histologiegewinnung ermöglicht die Bestimmung des Differenzierungsgrades, der Infiltrationstiefe und der Tumorausdehnung. In Abhängigkeit vom Tumorstadium erfolgt die Resektion unter kurativer oder palliativer Zielsetzung.

Da es in 20-40% der Fälle zu einer Persistenz des Tumors nach einmaliger TUR kommt, schließt sich an die erste TUR mindestens eine weitere Resektion nach einigen Tagen an. Nach 3 Monaten erfolgen routinemäßige Kontrollcystoskopien und Biopsieentnahmen.

Aufgrund des oberflächlichen und nicht infiltrativen Wachstums der pTa- und pT1-Tumore erfolgt die Resektion hier in kurativer Zielsetzung. Weiter fortgeschrittene Tumorstadien (pT2-pT3) können unter Umständen zwar lokal vollständig reseziert werden, aufgrund des zu erwartenden Lymphknotenbefalls ist jedoch nur von einer palliativen Resektion auszugehen. Bei muskelinvasiven Tumoren und die Blase überschreitenden Tumoren ist daher eine radikale Zystektomie indiziert. Dies gilt auch für das therapierefraktäre und rezidivierende T1-G3 Karzinom .

Verschiedene klinische Studien konnten zeigen, dass selbst nicht infiltrativ wachsende Tumore nach alleiniger TUR in bis zu 70% der Fälle zu Rezidiven neigen und dass in 25% der Fälle eine Progredienz des Tumorstadiums und des Differenzierungsgrades im Rezidiv zu erwarten ist . Diese Zahlen machen die Notwendigkeit weiterer therapeutischer Maßnahmen in der Therapie des Harnblasenkarzinoms deutlich.

Methode der Wahl ist die intravesikale Instillationstherapie . Lediglich monofokale Tumore des Stadiums pTa G1 bedürfen aufgrund ihrer hohen Differenzierung und des

damit verbundenen geringen Rezidiv- und Progressionsrisikos keiner weiteren adjuvanten Therapie. Adjuvante Therapieindikationen bestehen daher für die Tumorstadien pT1 G1-2, die primären pT1 G3 Tumoren, das Carcinoma in situ und den rezidivierenden pTa Tumor . Therapeutisch kommt bei den oben genannten Tumorstadien die Instillationstherapie mit Zytostatika wie Mitomycin C und Doxorubicin oder eine Immuntherapie mit BCG in Frage.

Neueste Studien versuchen die Effekte einer lokalen Chemotherapie mit Epirubicin und der Immuntherapie mit BCG zu kombinieren, um den Therapieerfolg zu optimieren. Eine Instillation von Chemotherapeutika ist unmittelbar nach der TUR-B möglich, während die BCG-Instillation erst nach 2 Wochen indiziert ist, um eine systemische BCG-Infektion zu vermeiden. Durch eine frühzeitige Instillation der Chemotherapeutika wird die Implantation flottierender Tumorzellen verhindert und das Auftreten von Rezidiven reduziert. Allerdings konnte in ersten Untersuchungen keine Steigerung der Effektivität durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Immuntherapie mit BCG nachgewiesen werden. Die Kombinationstherapie führte sogar zu einer Steigerung der Nebenwirkungsrate .

### **1.3. Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms mit BCG**

Die intravesikale BCG-Instillationstherapie gilt heute als anerkannte Rezidivprophylaxe der nicht infiltrativen Tumorstadien (pTis, pTa, pT1) und wurde von Ratliff et al. als „golden standard“ in der Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms bezeichnet .

In großen prospektiv-randomisierten Studien konnte die Überlegenheit der BCG-Immuntherapie hinsichtlich der Zeitspanne bis zum Auftreten eines Tumorrezidivs und hinsichtlich des Tumorprogresses gegenüber anderen Instillationstherapien gezeigt werden. Die BCG-Instillationstherapie bewies wiederholt eine größere therapeutische Effektivität als Adriamycin, Doxorubicin und Mitomycin C .

Zur Zeit werden sowohl verschiedene Therapieschemata und Bakterienkonzentrationen als auch verschiedene BCG-Stämme in der BCG-Therapie eingesetzt. Nach der primären Resektion des Harnblasenkarzinoms mittels TUR und mindestens einer weiteren Nachresektion erfolgt nach Abheilung der Resektionswunde die Instillation von  $2,5-7,5 \times 10^8$  viablen Keimen mittels Einmalkatheder, wobei die Mykobakterien zwei Stunden in der Harnblase verbleiben sollten. Es folgen insgesamt 6 Zyklen der Instillationstherapie im wöchentlichen Abstand. Zur Boosterung schließt sich eine Erhaltungstherapie nach 3, 6, 12, und 18 Monaten an. In neueren Therapieprotokollen wird die Erhaltungstherapie auch länger als 18 Monate fortgesetzt. Lamm et al. konnten zeigen, dass diese Erhaltungstherapie zu einer weiteren Reduktion der Rezidivrate führt .

Neuere Studien verwenden sogenannte low-dose Protokolle, in denen die Konzentration der verwendeten Mykobakterien reduziert wurde, um die Rate und Schwere der Nebenwirkungen zu reduzieren. Allerdings zeigen erste Studien zwar die Effektivität der low-dose Therapie, eine signifikante Reduktion der Nebenwirkungsrate konnte bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden .

#### **1.4. BCG in der Therapie verschiedener Malignome**

Die Ursprünge der Immuntherapie verschiedener maligner Tumore liegen in der Beobachtung des amerikanischen Chirurgen Coley, der bereits im letzten Jahrhundert - nach Heilung eines an einem Lymphosarkom erkrankten Patienten im Anschluss an zwei Erysipel-infektionen - gefilterte Bakterienextrakte (Coley's Toxin) zur adjuvanten Immuntherapie einsetzte.

Alberte Calmette und Camille Guérin legten 1921 die Grundlage der BCG-Immuntherapie, indem sie *M. bovis* aus der Galleflüssigkeit von Rindern isolierten und weiter kultivierten. Dieser abgeschwächte Erreger konnte aufgrund seiner geringeren Virulenz als relativ sicherer Impfstoff gegen die Tuberkulose eingesetzt werden.

Nachdem Freund et al. die immunogene Wirkung speziell von Mykobakterien untersucht hatten, wandten Mathé et al. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) als adjuvante systemische Therapie bei der akuten lymphoblastischen Leukämie an. Allerdings konnten erste klinische Erfolge nicht reproduziert werden. Bacillus Calmette-Guérin wurde in der Folgezeit in in-vitro Studien und in der Therapie verschiedener solider Tumore wie dem malignen Melanom und dem Mammakarzinom eingesetzt, ohne allerdings den erwünschten Therapieerfolg zu erzielen.

Lewis und Loom hatten 1924 zeigen können, dass es nach systemischer BCG-Applikation zu einer Stimulation des Immunsystems der verwendeten Meerschweinchen kam.

### **1.5. Wirkmechanismus der intravesikalen Immuntherapie mit BCG**

Hinsichtlich der Harnblase bewiesen Coe und Feldmann bereits 1966, dass die Harnblase auf einen antigenen Reiz mit einer Immunantwort vom verzögerten Typ reagiert (delayed type hypersensitivity, DTH). Somit stellte die Blase ein ideales Organ für eine Immuntherapie dar. 1976 führten Morales et al. die intravesikale Instillationstherapie mit BCG in die Behandlung des oberflächlichen Urothelkarzinoms der Harnblase beim Menschen ein.

Der genaue Wirkmechanismus der BCG-Immuntherapie ist bis heute nicht geklärt. Droller hatte bereits 1986 zwei Theorien aufgestellt. Danach könnte durch die BCG-Instillation in die Harnblase eine erosive Zystitis induziert werden, die eine Abschilferung des Urothels und somit auch eine Eradikation der malignen Zellen bewirkt. Andererseits könnte über eine Aktivierung immunkompetenter Zellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen eine anhaltende Tumorüberwachung induziert werden.

Die guten Therapieerfolge bei der Behandlung des Carcinoma in situ könnten für eine Abschilferung der malignen Zellen nach einer BCG-Instillation sprechen. Allerdings konnten Guinan et al. unterschiedliche zelluläre Infiltrate nach BCG-Instillation und nach der Instillation von Thiotepa, einem Zytostatikum, nachweisen. Für diese Aktivierung von immunkompetenten Zellen sprechen eine Vielzahl von in-vitro Studien.

So konnten Ratliff et al. im Tierversuch nachweisen, dass der Wirkmechanismus der BCG-Immuntherapie T-Zell abhängig ist. Die Instillation von Bacillus Calmette-Guérin in die Harnblasen von athymischen Nacktmäusen, in denen zuvor ein Tumorwachstum induziert worden war, zeigte keinen therapeutischen Effekt. Nach T-Zell-Transfer konnte jedoch ein Erfolg der Immuntherapie mit BCG nachgewiesen werden.

Böhle et al. beschrieben 1990 eine massive Infiltration der Harnblasenwand mit mononukleären Zellen nach BCG-Instillation. Dieses Infiltrat bestand überwiegend aus T-Zellen - mit einem deutlichen Übergewicht der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T-Helfer/Inducer-Zellen). Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen kehrte sich dabei von einem Verhältnis von 1:2 zu einem Verhältnis von 2:1 nach der BCG-Therapie zugunsten der CD-4<sup>+</sup> Zellen um.

Dieselbe Arbeitsgruppe konnte den Nachweis von Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) im Urin von Patienten nach BCG-Instillation erbringen . Der Nachweis von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch Prescott et al. lieferte einen weiteren Beweis für immunologische Vorgänge in der Harnblase während und nach einer BCG-Instillationstherapie .

Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte im Urin der mit BCG behandelten Patienten eine Vielzahl von Zytokinen nachgewiesen werden. Bisher wurden TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und IL-12 im Urin detektiert .

Der Nachweis der Zytokine im Urin führte dann zu der Frage, welche Rolle diese Zytokine im Rahmen der Immunantwort spielen. So konnten Böhle und Thanhäuser in einem in-vitro Modell nachweisen, dass IFN- $\gamma$  und IL-2 für die Induktion von BCG-aktivierten Killerzellen (BAK-Zellen) essentiell sind .

Der Einfluss der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-10 auf die lokale Tumor-Surveillance bzw. die BCG-Therapie im Mausmodell wurde von Riemensberger et al. untersucht . Die Autoren konnten zeigen, dass IFN- $\gamma$ -KO-(knock out) Mäuse und IL-12-KO-Mäuse nach Transplantation von Tumorzellen wesentlich früher starben als Wildtyp-Mäuse, denen sogar eine größere Anzahl an Tumorzellen instilliert wurde. Die Autoren konnten weiterhin demonstrieren, dass IFN- $\gamma$  und IL-12 essentiell für eine erfolgreiche BCG-Immuntherapie im Mausmodell sind. Die IFN- $\gamma$ -KO-Mäuse und IL-12-KO-Mäuse starben trotz BCG-Therapie genauso schnell aufgrund des Urothelkarzinoms wie die nicht behandelte Kontrollgruppe. Eine Immuntherapie der IL-10-KO mit BCG zeigte sogar eine bessere Überlebensrate in dieser Gruppe als in der Wildtyp-Kontrolle. Die Autoren zogen aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung, dass die TH-1 Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  essentiell für eine effektive Immuntherapie mit BCG sind. Zudem scheinen beide Zytokine eine wichtige Rolle bei der Immunosurveillance zu spielen. IL-10 hingegen hat im Mausmodell einen negativen Effekt auf eine BCG-Immuntherapie und die Aggregation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen sowie NK-Zellen in der Blasenwand.

Den positiven Effekt einer Blockade von IL-10 auf die BCG-Immunantwort konnten Ratliff et al. ebenfalls nachweisen .

Die Aggregation der immunkompetenten Zellen vor allem in der Submucosa der Blasenwand wurde als BCG-induzierte Granulombildung bezeichnet . Diese Granulome konnten noch nach mehr als zwei Jahren nach der letzten BCG-Instillation nachgewiesen werden .

In neueren Studien konnten Durek et al. mittels PCR zeigen, dass die BCG-DNA auch noch 24 Monate nach der letzten Instillation nachweisbar ist. Es ist daher davon auszugehen, dass lebende Mykobakterien über Jahre hinweg in der Harnblase persistieren und so zu einer andauernden Immunstimulation führen .

Die Beteiligung des humoralen Immunsystems ist ebenfalls anzunehmen, da Lamm et al. belegen konnten, dass es zu einer Erhöhung des Immunglobulintiters im Serum nach BCG-Instillation kommt .

Weiterhin konnten B-Lymphozyten in den oben beschriebenen Granulomen nachgewiesen werden. Kuster et al. hatten IgA-Antikörper im Urin während der BCG-Therapie und persistierende IgG-Antikörpertiter im Serum der behandelten Patienten gefunden . Allerdings ist davon auszugehen, dass es durch die Instillation von Bacillus Calmette-Guérin primär zu einer lokalen Immunantwort der Harnblase kommt.

Böhle et al. konnten dann 1993 in einem in-vitro Zytotoxizitätsassay beweisen, dass es durch die Stimulation mit BCG zu einer Aktivierung von nicht MHC-restringierten zytotoxischen Zellen kommt. Die in-vitro Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes führte zu einer deutlichen Lyse von Tumorzellen im Zytotoxizitätsassay, während die gleichen Tumorzellen resistent gegenüber der zytotoxischen Aktivität von unstimulierten natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) waren. Die Stimulation der MNZ mit IL-2 führte ebenfalls zu einer effektiven Lyse der Tumorzellen .

Die durch BCG aktivierten immunkompetenten Zellen wurden durch den Nachweis der Expression von CD8<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup> näher charakterisiert. Die immunkompetenten Zellen wurden, analog zu den durch die Stimulation mit IL-2 generierten lymphokin-aktivierten Killer-(LAK-)Zellen, BCG-aktivierte Killer-(BAK-) Zellen genannt. Diese BAK-Zellen unterscheiden sich jedoch von den LAK-Zellen durch ihren Aktivierungsmodus, ihre Kinetik und durch die für die Induktion benötigten Zellpopulationen. Es konnte gezeigt

werden, dass für die Induktion der BAK-Zellen die Freisetzung von IL-2 und IFN- $\gamma$  notwendig ist, da eine Blockierung dieser Zytokine durch Antikörper die Induktion der BAK-Zellen verhinderte. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass zur Induktion der BAK-Zellen Makrophagen und CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, die die oben angeführten Zytokine freisetzen, notwendig sind.

Neueste Daten von Brandau et al. aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die BAK-Zellen den NK-Zellen zuzuordnen sind. Die Autoren stimulierten zunächst in einem etablierten und auch in dieser Arbeit verwendeten Zytotoxizitätsassay die mononukleären Zellen des peripheren Blutes über 7 Tage mit BCG und entfernten anschließend die NK-Zellen. Die verbliebenen Zellen zeigten nur noch ein geringes zytotoxisches Potential gegen die Blasentumorzelllinie T-24. Lediglich die stimulierten CD3<sup>-</sup> / CD56<sup>+</sup> NK-Zellen führten zu einer effektiven Lyse der Tumorzellen. Bei den BAK-Zellen handelt es sich also um eine Subpopulation von stimulierten NK-Zellen. Diese Ergebnisse konnten in-vivo im Mausmodell bestätigt werden.

Dieselben Autoren konnten belegen, dass die lytische Aktivität der BAK-Zellen Perforin vermittelt ist. In einer weiteren Arbeit wiesen dieselben Autoren die Expression von Perforin und CD16 auf den BAK-Zellen nach. Sowohl Perforin als auch CD16 sind charakteristische Marker für aktivierte NK-Zellen.

Da die Lyse von Tumorzellen über Perforin einen Zellkontakt zwischen der Effektorzelle und der Zielzelle voraussetzt, untersuchten Suttman et al. die Rolle des „Leukozyten-Funktion-assoziierten Antigens-1“ (LFA-1). LFA-1 besteht aus den zwei Domänen CD11a und CD 18 und bindet an CD54, das dem „interzellularen Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) entspricht. Die Autoren konnten unter in-vitro Bedingungen nachweisen, dass BAK- und LAK-Zellen mehr CD11a und CD18 exprimieren als unstimulierte mononukleäre Zellen. Durch Antikörper gegen CD11a und CD18 konnte der zytotoxische Effekt der BAK- und LAK-Zellen gegen Tumorzellen aufgehoben werden. Die Adhäsion der BAK- und LAK-Zellen an die Tumorzellen in vitro konnte im Phasenkontrastmikroskop bestätigt werden.

Ferner ist die direkte Interaktion von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) mit urothelialen Tumorzellen untersucht worden. Dabei konnte eine primäre Adhäsion von BCG an die Tumorzellen mit sekundärer Internalisation bzw. Phagozytose nachgewiesen werden .

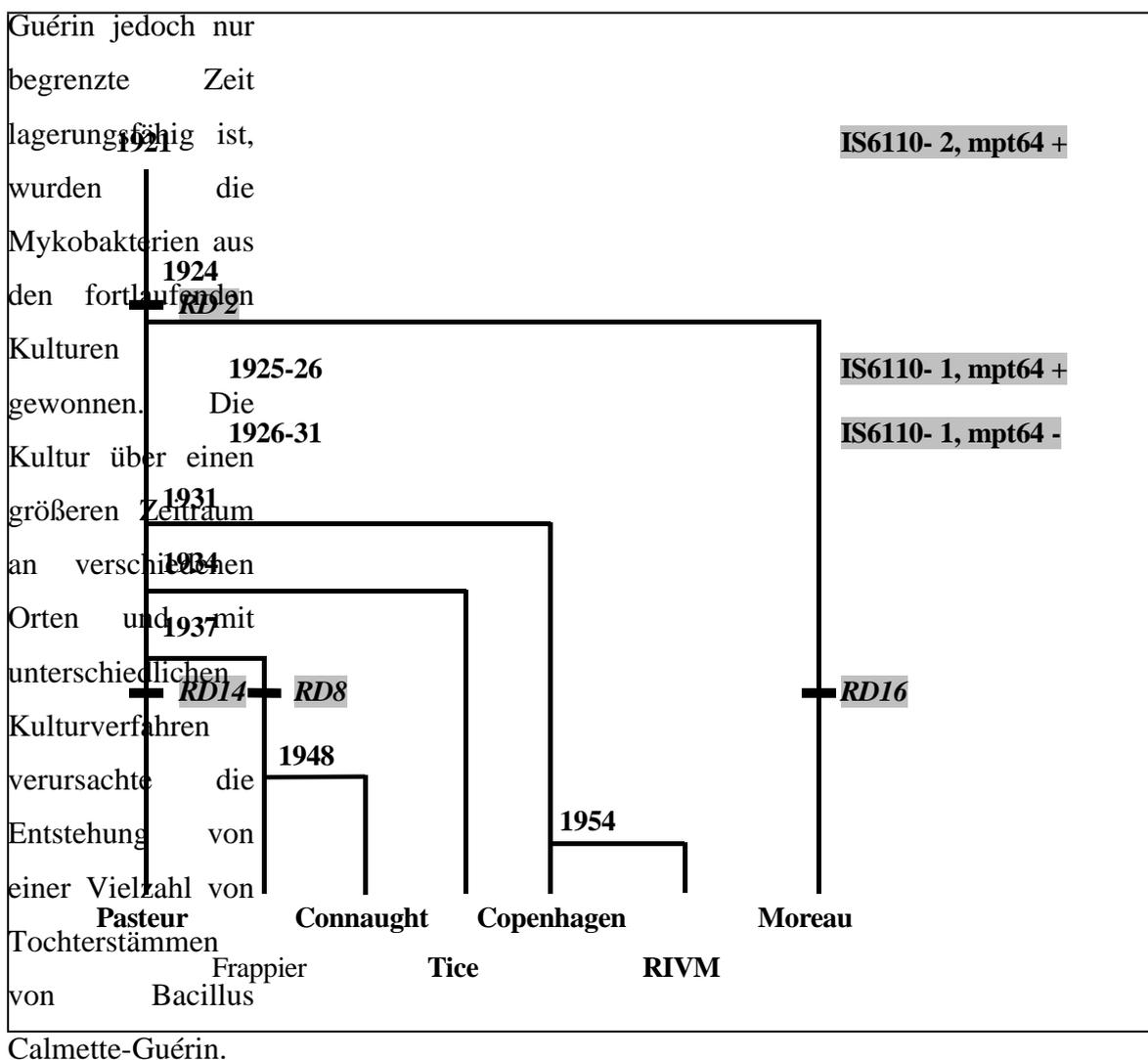
Ratliff et al. konnten zeigen, dass in der Adhäsion der Mykobakterien ein initialer Schritt der Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin zu sehen ist. Dabei binden die Mykobakterien unter Umständen an Fibronectin (FN). Verhindert man die Bindung von BCG an die Tumorzellen durch anti-FN-Antikörper, so ist auch ein Effekt einer BCG-Immuntherapie im Mausmodell nicht mehr nachweisbar .

Böhle und Brandau gaben in ihrem 2003 erschienen Artikel im Journal of Urology einen Überblick über die bisher zum Wirkmechanismus der BCG-Immuntherapie publizierte Daten. Die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen konnten in einem Modell zum Wirkmechanismus der BCG-Immuntherapie einfließen, wobei die Autoren Studiendaten aus der lokalen Immunantwort in behandelte Patienten, aus Immuntherapien in Tiermodellen und in-vitro Modellen in einen Gesamtkontext stellten . Wie oben angeführt ist nach Meinung der Autoren in der Bindung der Mykobakterien an das Urothel der Harnblase der erste entscheidende Schritt der Immuntherapie des Harnblasenkarzinoms mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) zu sehen. Dabei erfolgt die Adhäsion der Mykobakterien an die Urothelzellen über Fibronectin. Die hohe Konzentration an Mykobakterien direkt nach der Instillation führt zudem zu einer verringerten Proliferationsrate und Viabilität der verbliebenen Tumorzellen. BCG aktiviert in einem zweiten Schritt Antigen präsentierende Zellen und Urothelzellen, so dass Granulozyten und andere immunkompetente mononukleäre Zellen in die Wand der Harnblase einwandern. Auch durch diese Zellen wird ein für die Differenzierung von TH1-T-Zellen (T-Helfer-1-T-Zellen) notwendiges Zytokin-Muster hervorgerufen. Zugleich bilden sich Granulome aus. Die wichtigsten Wirkmechanismen könnten nach Meinung der Autoren dann in einer direkten Antitumor-Aktivität von IFN- $\gamma$  und der zytotoxischen Aktivität der aktivierten NK-Zellen liegen.

## 1.6. Entstehung der verschiedenen BCG-Stämme und Nachweis genetischer Unterschiede

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) wurde von Calmette und Guérin attenuiert, indem sie in einem Zeitraum von 1908 bis 1921 einen Stamm von *Mykobakterium bovis* (*M. bovis*) 230 mal passagierten. Ihr Ziel war es, einen Impfstoff gegen das *Mykobakterium tuberculosis* zu entwickeln, der sich durch eine deutlich reduzierte Virulenz bei erhaltener Immunogenität auszeichnen sollte.

Da zur Impfung jedoch lebende Mykobakterien benötigt wurden, Bacillus Calmette-



**Abb. 1.2 : Stammbaum der verwendeten BCG-Stämme und deren genetische Veränderungen.** Seit 1921 sind mindestens 2 genetische Veränderungen aufgetreten. Ausschnitt aus Behr et al.

Während BCG-Pasteur als direkter Nachfolger des von Calmette und Guérin attenuierten Stammes, der im 1. Weltkrieg verloren ging, anzusehen ist, entstanden Stämme wie BCG-Connaught, -Tice und -Copenhagen in der Zeit nach 1931.

Die Abbildung 1.2 zeigt den genetischen Stammbaum der in dieser Arbeit verwendeten BCG-Stämme. Die Grafik basiert auf den genetischen Analysen von Behr et al. . Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass alle vor 1921 existierenden Stämme 2 Kopien der Insertionssequenz (IS) IS6110 besitzen. In der Zeit von 1925 bis 1931 ging dann zunächst eine Kopie der Insertionssequenz IS6110 verloren, anschließend folgte der Verlust des mpt64 Gens. Allen nach 1931 entstandenen Stämmen fehlen diese beiden Komponenten. Während BCG-Pasteur durch IS6110- 2 und mpt64+ genetisch charakterisiert wird, sind alle anderen Stämme IS6110- 1 und mpt64 -.

Ferner konnten die Autoren nachweisen, dass auch eine unterschiedliche Nomenklatur bezüglich der verschiedenen BCG-Stämme existiert. So wurde lange vermutet, dass es sich bei BCG-Copenhagen und -Denmark um die gleichen Stämme handelte, oder BCG-Copenhagen der vor 1931 benutzte Stamm war. Allerdings fanden die Autoren zwei verschiedene als BCG-Copenhagen bezeichnete BCG-Stämme, von denen einer noch zwei IS6110 Kopien der andere jedoch nur noch eine besaß. Gemäß Abb. 1.2 war dann der erste Stamm auch mpt64 +, muss also vor 1925 entstanden sein, während der zweite Stamm mpt64 – war. Diese Genkonstellation konnte dann auch für BCG-Denmark nachgewiesen werden.

Behr et al. konnten auch nachweisen, dass die Attenuierung von *M. bovis* zu Bacillus Calmette-Guérin zu einer Deletion der DNA-Region RD1 (region of deletion) geführt hat . Die weitere Kultivierung von BCG-Pasteur führte zu weiteren Deletionen von RD2 und RD14. Da BCG-Tice und BCG-Copenhagen nach 1931, also nach dem RD2-Verlust entstanden sind, fehlt auch ihrer DNA diese Region. Ein RD14 Verlust ist jedoch nicht nachweisbar.

Es wird deutlich, dass – bedingt durch die fortlaufende Kultivierung von Bacillus Calmette-Guérin und die Anpassung der Bakterien an die Laborbedingungen– die Evolution zu einer genetischen Vielfalt der BCG-Tochterstämme geführt hat.

## 1.7. Problematik

Seit Einführung von Bacillus Calmette-Guérin in die Immuntherapie verschiedener Tumore wird vermutet, dass auch der BCG-Stamm neben weiteren Faktoren die Effektivität einer Immuntherapie beeinflussen könnte. Zudem haben sich genetische Unterschiede zwischen den Stämmen gezeigt, die auch immunologisch relevante Unterschiede hervorrufen könnten.

Bisher wurden jedoch nur sehr wenige klinische Studien veröffentlicht, die die immuntherapeutische Potenz der verschiedenen BCG-Stämme vergleichen. In der Studie von Witjes et al. war die immuntherapeutische Potenz von BCG-RIVM und –Tice im Vergleich zu einer Instillationstherapie mit Mitomycin C unter standardisierten Bedingungen untersucht worden. Die Autoren hatten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen nachweisen können.

Während Lamm et al. in ihrer 1992 veröffentlichten Studie 120 mg BCG-Connaught verwendeten, wurden von derselben Arbeitsgruppe in einer Studie aus dem Jahr 1991 lediglich 50 mg BCG-Tice zur Therapie eingesetzt. Da jedoch verschiedene in-vitro Studien gezeigt haben, dass das zytotoxische Potential der BAK-Zellen von der zur Stimulation eingesetzten Bakterienkonzentration abhängig ist, können Unterschiede in den genannten Studien nicht ausschließlich auf den zur Therapie verwendeten BCG-Stamm, sondern auch auf die unterschiedliche Bakteriendosis zurückgeführt werden.

Zusätzlich wurden bei den in Tabelle 7.2 aufgeführten klinischen Studien verschiedene Therapieprotokolle verwendet. Während sich bei der eben schon angeführten Studie von Lamm et al. auf die 6 wöchentlichen Instillationen eine Erhaltungstherapie nach 12 Wochen durch 3 weitere wöchentliche Instillationen anschloss, fehlt diese Erhaltungstherapie beispielsweise in der oben genannten Studie von Witjes et al. Durch die unterschiedlichen Therapieansätze kann die Frage, ob therapeutisch relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen existieren, nicht geklärt werden. (siehe auch Tab. 7.2)

Ebenso lässt eine Analyse der bisher unter in-vitro Bedingungen durchgeführten Untersuchungen keine Aussage darüber zu, ob immuntherapeutisch relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen existieren. Während einige Studien keine Unterschiede zwischen den BCG-Stämmen nachwiesen, zeigten andere Untersuchungen zwar die Überlegenheit des einen oder des anderen BCG-Stammes, ohne jedoch eine abschließende Aussage zuzulassen.

So konnten zwar Rajala et al. keine Unterschiede zwischen BCG-Connaught, -Pasteur, -RIVM, -Tice und -Evans hinsichtlich der direkten zytotoxischen Wirkung gegen die Blasentumorzelllinie T-24 nachweisen, eine andere Studie von Bartlett et al. aus dem Jahr 1980 wies jedoch die Überlegenheit von BCG-Tice in der Therapie des Leberzellkarzinoms im Meerschweinchen-Modell nach .

Leider wurden in allen in Tabelle 7.3 aufgeführten Studien unterschiedliche Versuchsansätze verwendet. Ein standardisierter Vergleich von für die Immuntherapie des Urothelkarzinoms relevanten Parametern ist bisher nicht durchgeführt worden.  
(siehe auch Tab. 7.3)

## 1.8. Fragestellung

Um mögliche Unterschiede zwischen den BCG-Stämmen nachweisen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit 6 verschiedene, kommerziell erhältliche BCG-Stämme unter standardisierten, optimalen Bedingungen kultiviert und anschließend in-vitro evaluiert.

Mit der Adhäsion der Mykobakterien an epitheliale Tumorzellen und der Induktion von zytotoxischen Killer-Zellen wurden zwei entscheidende Parameter der BCG-Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms untersucht.

Als Vergleich wurden 6 verschiedene atypische Mykobakterien-Stämme und 1 Stamm von *E. coli* herangezogen, indem diese hinsichtlich der oben genannten Parameter genauer analysiert wurden.

Folgende Fragen sollten mit diesem Ansatz eruiert werden:

1. Existieren quantitative bzw. qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten BCG-Stämmen hinsichtlich der Adhäsion an epithelialen Tumorzellen?
2. Existieren quantitative bzw. qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen hinsichtlich der Induktion von zytotoxischen Killerzellen?
3. Welches Potential besitzen atypische Mykobakterien und *E. coli* hinsichtlich der Adhäsion an epitheliale Tumorzellen?
4. Führt die Stimulation von MNZ mit atypischen Mykobakterien und *E. coli* zu einer Induktion von zytotoxischen Killerzellen?
5. Ist die Induktion von Zytotoxizität in der menschlichen Harnblase an spezielle BCG-Stämme gebunden?

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen**

#### **Antibiotikallösung (Biochrom, Berlin):**

Penicillin/Streptomycin ( $10^4$ E/ml/ $10^4$ µg/ml)

#### **Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen)**

... diente zum Ansetzen aller Puffer und Lösungen

#### **Ficoll-Paque (Pharmarcia, Freiburg)**

... diente zur Blutauftrennung

#### **Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS; Biochrom, Berlin)**

... die Gebrauchslösung wurde aus Trockensubstanz (Hank´s BSS 9,86 g/l) und  $\text{NaHCO}_3$  (0,35 g/l) mit aqua ad injectabilia hergestellt. Diese wurde anschließend sterilfiltriert und auf einen pH-Wert von 7,2 bei 280-290 osm eingestellt und bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **Humanserum (HS; Forschungszentrum Borstel)**

... wurde von gesunden Spendern verschiedener Blutgruppen aus Vollblut gewonnen und durch Erwärmung auf  $56^\circ\text{C}$  über 30 Minuten hitzeinaktiviert.

#### **Kochsalzlösung (NaCl 0,9%; Braun, Melsungen)**

#### **L-[ $^3\text{H}$ ]-Methionin (Amersham Buchler, Braunschweig)**

... wies eine spezifische Aktivität von 70-85 Ci/mMol auf und wurde in Methionin-freiem RPMI 1640 aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **Lockemann eiweißfreie Nährlösung für Mykobakterien**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  nach Sörensen 1,5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  nach Sörensen 4,0g,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O}$  2,5g, Asparagin 5,0g, Natriumsulfat 5,0g, Magnesiumchlorid $\cdot\text{H}_2\text{O}$  0,1g, Glycerin 20 ml, 1 % Ferriammoniumsulfatlösung  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , Aqua dest. 1 l, 10 ml 1-n-NaOH, wurde auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt und über 15 min bei  $121^\circ\text{C}$  autoklaviert.

## **Löwenstein-Jensen**

1. Salzlösung: 2,4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,24g  $\text{MgSO}_4$ , 0,6g Magnesiumcitrat, 3,6g Asparagin, 12ml Glycerin bidest. Die Reagentien werden einzeln in je 100 ml dest. Wasser gelöst. Danach werden die Reagentien zusammengegossen und nach Zugabe des Glycerins mit dest. Wasser auf 600 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgt eine Sterilisation bei  $112^\circ\text{C}$  im Autoklaven.
2. Malachitgrün-Lösung: 2g Malachitgrün werden in 100 ml dest. Wasser gelöst und filtriert. Für einen Ansatz werden 20 ml benötigt.
3. Kartoffelemulsion: zu 200 ml der Salzlösung werden 20 ml der Malachitgrün-Lösung gegeben, danach werden 30g Kartoffelmehl zugesetzt und durch Rühren gleichmäßig verteilt. Der Rest der Salzlösung wird aufgekocht und der Kartoffelemulsion unter weiterem Rühren zugefügt. Die Kartoffelemulsion wird ebenfalls sterilisiert.
4. Eimasse: Frische Hühnereier werden mechanisch gereinigt, mit Alkohol abgeflammt, aufgeschlagen und die Eimasse gründlich homogenisiert. Insgesamt wird 1 Liter Eimasse (20-25 Eier) benötigt.
5. Fertigstellung des Nährbodens: 1000 ml Eimasse und die 620 ml der Kartoffelemulsion werden gründlich gemischt, zu je 5 ml in Glasröhrchen abgefüllt und koaguliert.

## **7 H 10-Agar nach Middelbrook**

... ist als Trockensubstanz mit „enrichment“ kommerziell erhältlich

## **PBS, Phosphat gepufferte Salzlösung**

... besteht aus 0,9 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,7 mM  $\text{KCl}$ , 140 nM  $\text{NaCl}$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , gelöst in aqua ad injectabilia (pH 7,4; 265 osm).

## **RPMI 1640 (Biochrom, Berlin)**

... wurde aus Trockensubstanz (RPMI 1640, 10,40 g/l) und  $\text{NaHCO}_3$  (2 g/l) mit aqua ad injectabilia hergestellt. Diese Lösung wurde sterilfiltriert, ein pH von 7,2 bei 280-290 osm eingestellt und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

## **RPMI 1640 ohne L-Methionin (Biochrom, Berlin)**

... kam in Verbindung mit L- $^3\text{H}$ -Methionin (Amersham Buchler, Braunschweig) zur Anwendung.

## **Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint eco plus, Carl Roth, Karlsruhe)**

... zur Bestimmung der in der auszuwertenden Probe enthaltenden Radioaktivität

### **Trypanblau (Fluka, Buchs, Schweiz)**

... diente zur Vitalitätsprüfung der Zellen in der Neubauer Zählkammer

### **Trypsin (Serva, Heidelberg)**

... die Trypsinlösung wurde aus 2,5 g Trypsin, 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1150 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 200 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ad 1000 ml aqua ad injectabilia hergestellt und steril filtriert.

## **2.2. Bakterien und Bakterienkulturen**

### **2.2.1. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Präparationen**

Es wurden insgesamt 6 verschiedene Stämme von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) verwendet. Diese wurden entweder ausgehend von kommerziell erhältlichen und in der Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms eingesetzten Präparaten oder aus eingefrorenen, zuvor kultivierten Proben in Kultur genommen und dann auf Löwenstein-Jensen Agar kultiviert.

#### **2.2.1.1. Bacillus Calmette-Guérin Stamm Connaught**

BCG-Connaught lag ausgehend von ImmuCyst<sup>®</sup> Institut Merieux GmbH als Lyophilisat vor. 231 mg Trockensubstanz wurden in Lockemann-Nährmedium resuspendiert und anschließend in Kulturröhrchen auf Löwenstein-Jensen Schrägagar kultiviert.

#### **2.2.1.2. Bacillus Calmette-Guérin Stamm Copenhagen**

Der Stamm lag als in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Präparat vor und wurde uns dankenswerter Weise von Frau Dr. Rüscher-Gerdes (Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Nach Auftauen und Resuspendierung in Lockemann Flüssigkulturmedium erfolgte wiederum die Kultur auf Löwenstein-Jensen Schrägagar.

#### **2.2.1.3. Bacillus Calmette-Guérin Stamm Moreau**

BCG-Moreau lag ebenfalls als in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Präparat vor. Auch dieser Stamm wurde uns von Frau Dr. Rüscher-Gerdes zur Verfügung gestellt. Das Procedere entsprach dem von BCG-Copenhagen.

#### **2.2.1.4. Bacillus Calmette-Guérin Stamm Pasteur**

BCG-Pasteur lag als Suspension (75 mg) ausgehend von IMMUN BCG PASTEUR F, PASTEUR VACCINS, Paris vor. Die Suspension wurde wiederum in Lockemann-Flüssigkulturmedium resuspendiert und auf Löwenstein-Jensen Schrägagar kultiviert.

#### **2.2.1.5. Bacillus Calmette-Guérin Stamm RIVM**

BCG-RIVM wurde ausgehend von BCG-S-medac (medac GmbH, Hamburg) kultiviert. Eine Durchstechflasche BCG-S-medac enthält mindestens  $2 \times 10^8$  lebende BCG-Keime. Nach der Resuspendierung mit Lockemanns-Flüssigkulturmedium erfolgte auch hier die Kultur auf Löwenstein-Jensen-Schrägagar.

#### **2.2.1.6. Bacillus Calmette-Guérin Stamm Tice**

BCG-Tice lag als Lyophilisat mit durchschnittlich  $5 \times 10^8$  lebenden Mykobakterien als Präparat Onco TICE<sup>®</sup> HOMONCO (Organon Technika Medizinische Produkte GmbH, Eppelheim) vor. Auch hier erfolgte zunächst die Resuspendierung in Lockemanns-Flüssigkulturmedium und anschließend die Kultur auf Löwenstein-Jensen Schrägagar.

### **2.2.2. Kultur von Bacillus Calmette-Guérin (BCG)**

Alle verwendeten Stämme wurden parallel unter konstanten Bedingungen bei  $+37^\circ\text{C}$  auf Löwenstein-Jensen Schrägagar unter normalem  $\text{CO}_2$  Partialdruck für jeweils 3 Wochen in Kulturröhrchen kultiviert.

Bevor die Mykobakterien in den Versuchen eingesetzt wurden, erfolgten zunächst 2 Passagen, um die Unterschiede der verschiedenen Ausgangspräparationen auszugleichen.

Die Mykobakterienkolonien wurden jeweils nach 3 Wochen mit einer Öse von dem Löwenstein-Jensen Schrägagar abgehoben und in NaCl resuspendiert. Ausgehend von dieser Suspension wurden die neuen Kulturröhrchen der nächsten Passage beimpft.

Der größte Teil der Suspension wurde in den unten beschriebenen Assays eingesetzt. Dafür wurden die Mykobakterien, die teilweise noch in größeren, relativ festen Kolonien vorlagen, in Kolbenmörsern weiter zerkleinert und anschließend durch Kanülen der Größe 1 (0,9x40) und der Größe 20 (0,4x19) (Microlance<sup>®</sup>, Becton Dickinson) gespritzt. Dieses Verfahren wurde neu entwickelt, um eine möglichst homogene Suspension zu erhalten.

### 2.2.3. Keimzahlbestimmung von *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)

Die Keimzahlbestimmung von *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) erfolgte photometrisch. Nach Resuspendierung der frisch geernteten Mykobakterien in 10 ml Lockemann-Flüssigkulturmedium wurde die Extinktion der Suspension gegen das Kulturmedium abgeglichen und in einer 96 well Platte bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Die Umrechnung der gemessenen Extinktion auf die dazu gehörige Konzentration erfolgte anhand der in verschiedenen Publikationen etablierten Formel

$$\text{Extinktion (E)} = 719 \times \log (\text{Konzentration(K)}) - 4322.$$

Daraus ergibt sich für die Konzentration :

$$\log(K) = (E + 4322)/719$$

$$K = 10^{(E + 4322)/719} .$$

Dabei ist K die Bakterienkonzentration in colony forming units pro Milliliter (cfu/ml).

Die Regressionsgerade der Extinktionskurve war nach dem unten beschriebenen Prinzip erstellt worden.

Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgte die Einstellung einer Stammlösung von  $1 \times 10^7$  cfu/ml durch weitere Verdünnung mit Lockemann-Flüssigkulturmedium.

Die so ermittelten rechnerischen Konzentrationen wurden wiederum über Verdünnungsreihen in anschließenden Bakterienkulturen im Bereich der ermittelten Zehnerpotenz bestätigt, indem die Kolonien ausgezählt wurden.

### 2.2.4. Atypische Mykobakterien

Definitionsgemäß werden alle Mykobakterien, bei denen es sich nicht um Tuberkulosebakterien (*M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. africanum*) oder um Leprabakterien (*M. leprae*) handelt, als atypische Mykobakterien (alte Bezeichnung) oder nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM) oder MOTT (mycobacteria other than tubercle bacilli) bezeichnet.

Insgesamt wurden 6 verschiedene Stämme atypischer Mykobakterien verwendet. Alle Stämme wurden zuvor in flüssigem Stickstoff gelagert und wurden uns wiederum von Frau Dr. Rüscher-Gerdes zur Verfügung gestellt. Dabei wurden 4 verschiedene Untergruppen der atypischen Mykobakterien eingesetzt.

Nach Kultur wurden die Mykobakterien wiederum mit einer Öse abgeimpft, in NaCl resuspendiert, und ein Teil der Suspension zur Beimpfung der Kulturröhrchen für die nächste Passage verwendet.

#### **2.2.4.1. *Mykobakterium kansasii***

*Mykobakterium kansasii* ist ein photochromogenes Mykobakterium, das sich bei Wachstum unter Lichteinfluß gelb färbt. *M. kansasii* wurde wie die oben genannten BCG-Stämme auch bei 37°C auf Löwenstein-Jensen Schrägagar kultiviert. Die Kulturdauer betrug wiederum 3 Wochen.

#### **2.2.4.2. *Mykobakterium gordonae***

*Mykobakterium gordonae* ist ein skotochromogenes Mykobakterium, das auch ohne Licht gelblich gefärbt ist. *M. gordonae* wurde unter den bereits beschriebenen Standardkulturbedingungen kultiviert.

#### **2.2.4.3. *Mykobakterium avium* und *Mykobakterium avium intracellulare***

Diese beiden Stämme gehören zu den langsam wachsenden atypischen Mykobakterien. Die Kultur erfolgte hier auf 7H10-Agar nach Middlebrook bei 37°C. Um eine ausreichende Anzahl an Mykobakterien nach 3 Wochen zu erhalten, wurde die Anzahl der Kulturröhrchen erhöht.

#### **2.2.4.4. *Mykobakterium chelonae***

*Mykobakterium chelonae* ist ein schnell wachsendes Mykobakterium. Die Kultur erfolgte auf Löwenstein-Jensen Schrägagar bei 31°C, wobei die Kulturdauer bis zur weiteren Verwendung 14 Tage betrug.

#### **2.2.4.5. *Mykobakterium vaccae***

*Mykobakterium vaccae* ist ebenfalls ein schnell wachsendes Mykobakterium. Die Kultur erfolgte hier jedoch wiederum unter den Standardkulturbedingungen für BCG.

Stamm	Farbeigenschaft	Medium	Temperatur	Kulturdauer / Wochen
<i>M. kansasii</i>	photochromogen	Löwenstein-Jensen	37°C	3
<i>M. gordonae</i>	skotochromogen	Löwenstein-Jensen	37°C	3
<i>M. avium</i>	keine	Middle-brook	37°C	3
<i>M. avium intracellulare</i>	keine	Middle-brook	37°C	3
<i>M. chelonae</i>	keine	Löwenstein-Jensen	31°C	2
<i>M. vaccae</i>	keine	Löwenstein-Jensen	37°C	3

**Tab. 2.1. Zusammenfassung der Kulturbedingungen der atypischen Mykobakterien**

### 2.2.5. Konzentrationsbestimmung der atypischen Mykobakterien

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte auch hier in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm. Da keine Eichkurven zur Verfügung standen, wurden diese neu erstellt.

Ausgehend von einer Bakteriensuspension unbekannter Konzentration erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe in drei 1:1 Verdünnungsschritten. Anschließend wurden die jeweiligen Extinktionswerte bestimmt. Die Keimzahlbestimmung erfolgte wiederum über weitere Verdünnungsschritte durch Auszählen der Bakterienkolonien nach Kultur unter den oben angeführten Bedingungen.

Die ermittelten Werte wurden in einem Microsoft Excel<sup>®</sup> Diagramm graphisch aufgetragen und die jeweiligen Regressionsgeraden ermittelt. (Anhang Abb. 7.1 – 7.6) Aus der Funktion der Regressionsgeraden erfolgte dann die Berechnung der zu bestimmenden Bakterienkonzentration in cfu/ml. (Anhang Tab. 7.1)

Die so erhaltenen Ergebnisse konnten erneut über eine sich anschließende Kultur im Bereich der jeweiligen Zehnerpotenz der Konzentration bestätigt werden.

Das Einstellen der benötigten Konzentrationen erfolgte analog zu den Bacillus Calmette-Guérin Stämmen mit Lockemann-Flüssigkulturmedium.

### **2.2.6. *E. coli* Laborstamm XL1-blue**

Der Laborstamm XL-1 blue wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Gerdes, Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt. Die Kultur erfolgte für einen Tag in flüssigem LB-Medium. Die Konzentration wurde wiederum anhand einer von mir selbst ermittelten Eichkurve photometrisch bestimmt und mit LB-Medium auf  $1 \times 10^7$  cfu/ml eingestellt. (Anhang Abb. 7.7 und Tab. 7.1)

## **2.3. Zellkulturen**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit verschiedenen Blasen-tumorzelllinien durchgeführt, die ständig in Kultur gehalten wurden.

Eine nach Abschluss dieser Dissertation mit späteren Passagen durchgeführte Analyse der Zelllinien BT-A und SBC-7 zeigte, dass es sich zu dem späteren Zeitpunkt bei beiden Zelllinien um Hela-Zellen handelte. Es ist daher nicht ganz auszuschließen, dass auch in der vorliegenden Arbeit bereits Hela-Zellen verwendet wurden. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Zytotoxizitätsassay und im Adhäsionsassay keine Unterschiede zwischen der internationalen Standardzelllinie T-24 und den verwendeten Zelllinien auftraten. Weiterhin konnte nach Abschluss dieser Arbeit von der Arbeitsgruppe in Borstel nachgewiesen werden, dass das immunologische Verhalten von international etablierten Urothelkarzinom-Zelllinien dem der Hela-Zellen entspricht.

### **2.3.1. BT-A**

Die Zelllinie BT-A wurden im Forschungszentrum Borstel in der Arbeitsgruppe von van der Bosch et al. aus einer Gewebeprobe eines pTaG3 Blasen-tumors etabliert .

### **2.3.2. SBC-7**

Die Zelllinie SBC-7 wurde aus einem pTaG1-2 Blasen-tumor etabliert .

### **2.3.3. T 24**

Diese international häufig verwendete Blasen-tumorzelllinie wurde uns dankenswerterweise von Prof. Dr. K.H. Kurth (Universität Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich ebenfalls um einen G3 Tumor .

#### **2.3.4. HCV-29**

Diese Zelllinie, die aus normalem Urothel etabliert wurde, wurde uns von Frau Prof. Dr. Knüchel (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

#### **2.3.5. Kulturbedingungen**

Alle Zelllinien wurden in Kulturflaschen (Falcon Gewebekulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>, BECTON DICKINSON, HEIDELBERG) in 30 ml RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% Antibiotikallösung passagiert.

Zur Passage wurde das Medium von den adhären Zellen abgesaugt und anschließend 5 ml Trypsinlösung hinzupipettiert.

Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen abgesaugt und das Trypsin durch Zugabe von 1 ml FKS inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit RPMI 1640 zweimal gewaschen. Danach wurden die Zellen in 2-5 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde in einer Probe, die mit Trypanblau in einem Verhältnis von 20:1 (190µl Zellsuspension und 10µl Trypanblau) versetzt wurde, in einer Neubauer-Zählkammer (BRAND, Ludwigshafen) bestimmt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für die anschließende Passage in eine neue Kulturflasche in 30 ml Kulturmedium ausgesät, während die übrigen Zellen für die unten beschriebenen Versuche verwendet oder verworfen wurden. Alle verwendeten Zelllinien wurden zweimal wöchentlich passagiert.

#### **2.4. Zytotoxizitätsassay**

Der in dieser Arbeit verwendete Zytotoxizitätsassay wurde von unserer Arbeitsgruppe in Anlehnung an Leibold und Bridge weiterentwickelt und ist bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben worden.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsaufbau ist in Abb. 2.1 kurz skizziert worden.

# Zytotoxizitätsassay

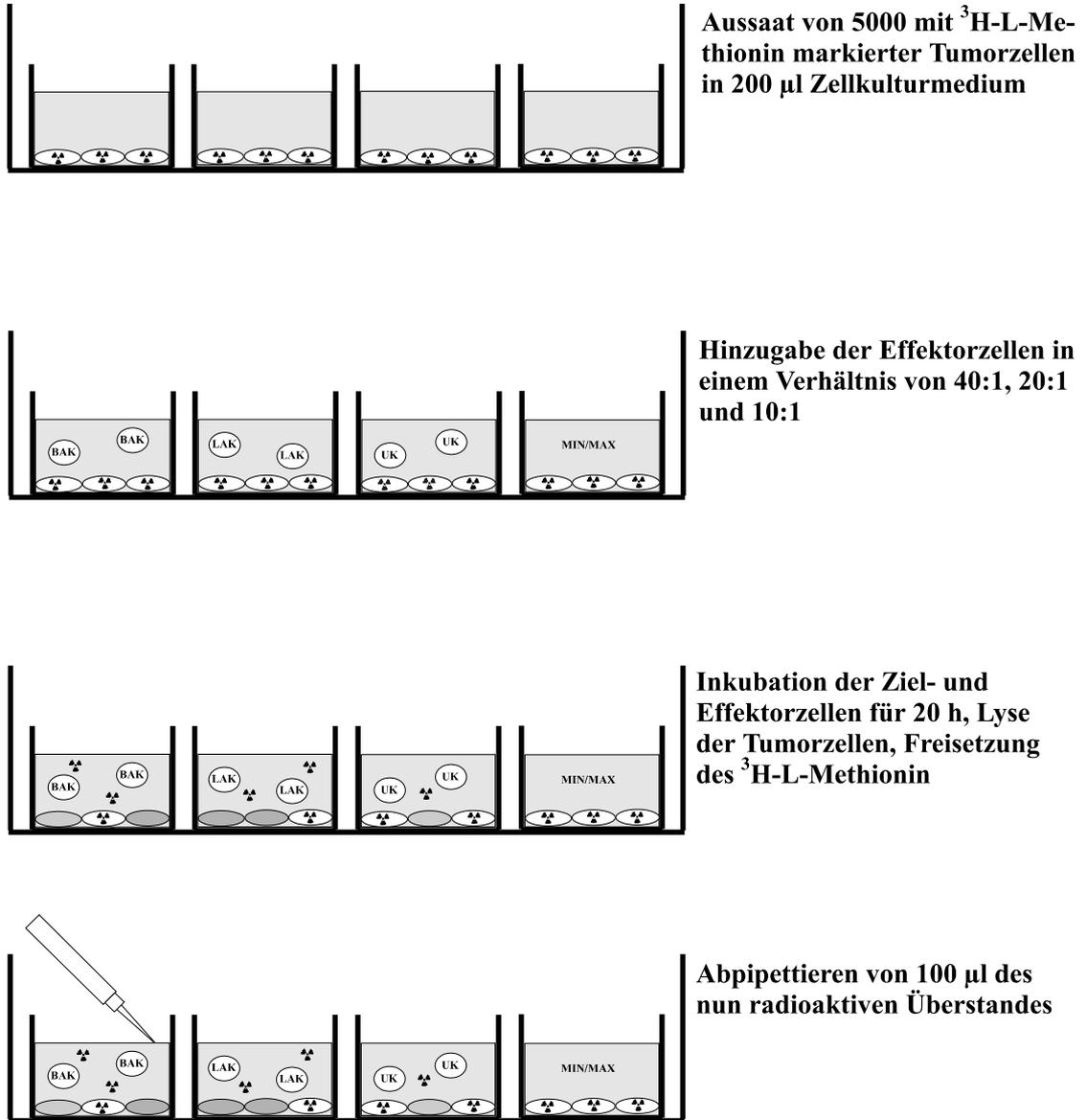


Abb. 2.1 : Zytotoxizitätsassay

#### **2.4.1. Gewinnung mononukleärer Zellen**

Vollblut gesunder Spender wurde zunächst mit Heparin versetzt (20E/ml). Anschließend wurden die mononukleären Zellen über eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Paque isoliert. Dafür wurde das Vollblut zu gleichen Volumenanteilen mit HBSS gemischt. Je 20 ml dieses Gemisches wurden auf 5 ml Ficoll-Paque geschichtet und für 45 Minuten (180 s Anlaufzeit) bei 400 g und 22°C zentrifugiert. Die nun auf der Trennschicht zwischen Plasma und Ficoll sedimentierten mononukleären Zellen (MNZ) wurden mit einer Pipette abgenommen, anschließend zweimal mit HBBS gewaschen (10 min, 400g, 4°C) und in Kulturmedium (RPMI 1640 mit 5% HS) aufgenommen.

#### **2.4.2. Effektorzell-Stimulation**

Die mononukleären Zellen (MNZ) wurden nun zur Induktion von LAK- bzw. BAK-Zellen mit Interleukin-2 (IL-2) bzw. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimuliert. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  mononukleäre Zellen in 6-well Flachbodenplatten (Nunc, Roskilde Dänemark) in RPMI 1640 mit 5% inaktiviertem Humanserum (HS) mit 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (PS)-Lösung für 7 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zur Induktion von BAK-Zellen erfolgte die Zugabe von  $3,75 \times 10^4$  cfu BCG aus den frischen Kulturen.

Um das durch die verschiedenen BCG-Stämme induzierte zytotoxische Potential vergleichen zu können, wurden alle 6 BCG-Stämme parallel in einer Konzentration von  $3,75 \times 10^4$  cfu/ml zur BAK-Zell-Induktion eingesetzt.

Auch die atypischen mykobakteriellen Stämme und *E. coli* wurden in der genannten Konzentration zur Stimulation der MNZ verwendet, um zu überprüfen, ob auch die Bakterien in der Lage sind, ein zytotoxisches Potential gegen Tumorzellen zu induzieren. Auch diese Bakterien wurden aus frischen Kulturen gewonnenen.

LAK-Zellen wurden durch die Stimulation von wiederum  $1 \times 10^6$  MNZ mit IL-2 (800 U/ml) generiert.

Das Gesamtvolumen pro well betrug dabei 5 ml. Die Zellen, die später als unstimulierte Kontrolle eingesetzt wurden, wurden nur in Medium ohne weitere Zusätze parallel kultiviert. Wurden Bakterien als Stimulus verwendet, wurde dem Medium kein Antibiotikum zugesetzt.

$1 \times 10^6$ MNZ + $3,75 \times 10^4$ cfu BCG	⇒ 7 Tage ⇒	<b>BAK-Zellen</b>
$1 \times 10^6$ MNZ + 800 U/ml IL-2	⇒ 7 Tage ⇒	<b>LAK-Zellen</b>
$1 \times 10^6$ MNZ	⇒ 7 Tage ⇒	<b>unstimulierte Kontrolle (UK)</b>

Nach 7 Tagen wurden die teilweise adhärennten Zellen mit einem Gummischaber gelöst, abpipettiert, gewaschen und anschließend mit Trypanblau auf ihre Vitalität untersucht. Gleichzeitig wurden die Zellen gezählt (Neubauer-Zählkammer (BRAND, Ludwigshafen)). Anschließend wurde eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

#### **2.4.3. Präparation der Zielzellen für den Zytotoxizitäts-Assay**

Die zuvor kultivierten Zellen der oben angeführten Blasen-tumorzelllinien wurden mit Trypsin aus den Kulturflaschen enzymatisch gelöst und anschließend das Trypsin mit FKS inhibiert. Nach der Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen zweimal mit Methionin-freiem Medium gewaschen. Die Zellen wurden darauf in 1 ml RPMI 1640 ohne L-Methionin (10% FKS, 1% Antibiotikalösung) aufgenommen und, wie oben ebenfalls beschrieben, gezählt. Jetzt wurde eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in Falcon Tubes (10 ml, Becton Dickinson, Heidelberg) eingestellt und  $20 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-L-Methionin hinzugegeben. Durch den Einbau des radioaktiven [ $^3\text{H}$ ]-L-Methionin wurden die Blasen-tumorzellen markiert. Die Dauer des Markierungsvorganges betrug 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ .

Anschließend wurden die Zellen mit Methionin-haltigem Medium gewaschen (120 s Anlaufzeit, 10 min, 400g,  $20^\circ\text{C}$ ) und auf eine Konzentration von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt. Zuletzt wurden  $200 \mu\text{l}$  der Zellsuspension in eine Flachboden-Mikrotiterplatte (96-well, F-Form, Falcon 3072; Becton Dickinson, Heidelberg) pipettiert, so dass jedes well 5000 Tumor-Zellen enthielt.

Die Zellen wurden anschließend für 20 Stunden im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) kultiviert, um die Adhäsion der Zellen der adhärennt wachsenden Zelllinien zu gewährleisten.

Das Medium, das auch von den Zellen freigesetztes [<sup>3</sup>H]-L-Methionin enthielt, wurde nun abgesaugt. Anschließend wurden 100µl Standard-Kulturmedium in jedes well wieder hinzugegeben.

#### **2.4.4. Ansatz des Zytotoxizitäts-Assays und Berechnung der spezifischen Lyse**

Als Effektor-Zellen dienten BAK- und LAK-Zellen und die Zellen der unstimulierten Kontrolle. Nach der Stimulation lagen die Zellen – wie oben beschrieben – in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml vor.

Ausgehend von dieser Zellkonzentration wurde zweimal eine 1:1 Verdünnungsreihe hergestellt, so dass zusätzlich Konzentrationen von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml und  $5 \times 10^5$  Zellen/ml vorlagen. Je 100µl je Effektorzelltyp und Zellkonzentration wurden nun zu den radioaktiv markierten Zielzellen im daraus resultierenden Verhältnis 40:1, 20:1 und 10:1 hinzupipettiert.

1.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml  $\Rightarrow$   $2 \times 10^5$  Zellen/ 100µl  
 $\Rightarrow$  200.000 Effektor-Zellen : 5.000 Tumor-Zellen = **40:1**
2.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml  $\Rightarrow$   $1 \times 10^5$  Zellen/ 100µl  
 $\Rightarrow$  100.000 Effektor-Zellen : 5.000 Tumor-Zellen = **20:1**
3.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml  $\Rightarrow$   $5 \times 10^4$  Zellen/ 100µl  
 $\Rightarrow$  50.000 Effektor-Zellen : 5.000 Tumor-Zellen = **10:1**

Zur späteren Bestimmung der Maximal-Freisetzung wurden in nicht mit Effektor-Zellen belegte wells 100µl SDS/Triton-X-100 pipettiert, um eine komplette Lyse der Tumorzellen herbeizuführen. Zur Bestimmung der Spontan-Freisetzung erfolgte die Zugabe von 100µl Kulturmedium.

Die Tumor- (Ziel-)zellen und Effektorzellen wurde für 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> koinkubiert. Alle Ansätze wurden in triplets durchgeführt.

Hinzuweisen ist darauf, dass durch die Stimulation mit den 6 verschiedenen BCG-Stämmen auch 6 unterschiedlich stimulierte BAK-Zell-Spezies verwendet wurden. Mit den Effektor-Zellen, die mit den 6 verschiedenen Stämmen atypischer Mykobakterien und *E. coli* stimuliert worden waren, wurde ebenso verfahren.

Nach der ca. 20 stündigen Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen, die zu einer Zytolyse der Tumorzellen durch die Effektorzellen und somit zu einer Freisetzung des [<sup>3</sup>H]-L-Methionin führte, wurden je 100µl Überstand pro well abpipettiert und in mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Zählröhrchen (Pony-vials, 6 ml, Canberra Packard, Frankfurt a. M.) überführt. Nach dem Durchmischen von radioaktivem Überstand und Szintillationsflüssigkeit wurde die freigesetzte Radioaktivität des [<sup>3</sup>H]-L-Methionin (Experimentielle-Freisetzung) in einem Beta-Counter (Tricarb, 460 M, Canberra Packard) bestimmt. Mit Hilfe der ebenso bestimmten Spontan- und Maximal-Aktivität wurde die spezifische Lyse je well in Prozent berechnet.

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \frac{\text{EXPERIMENTIELL} - \text{SPONTAN}}{\text{MAXIMAL} - \text{SPONTAN}}$$

Je triplet wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (Microsoft Excel<sup>®</sup>) und die Werte anschließend graphisch dargestellt. Für einen Teil der gezeigten Grafiken wurden die Einzelergebnisse je Effektorzellkonzentration (z.B. 40:1), Stimulus (z.B. BCG-Connaught, IL-2, *M. avium*) und Tumorzelllinie (SBC-7, BT-A, T-24) zusammengefasst.

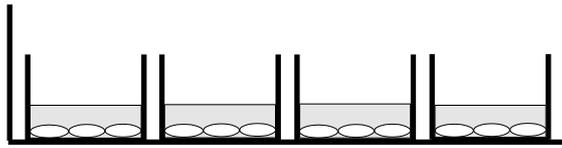
Die Signifikanzuntersuchungen wurden analog zu früheren Publikationen mit dem student's t-test (Microsoft Excel<sup>®</sup>) durchgeführt. Die Normalverteilung der erhobenen Daten konnte stichprobenartig im Rahmen der Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik des UKL nachgewiesen werden. Auf eine weitere statistische Analyse der Daten musste verzichtet werden, da es sich bei der Auswertung der vorliegenden Arbeit um eine explorative Datenanalyse handelt. Eine detaillierte statische Analyse ist erst nach Auswertung dieser Arbeit über eine gezielte Versuchsplanung bei zukünftigen Untersuchungen möglich.

## **2.5. Adhäsionsassay**

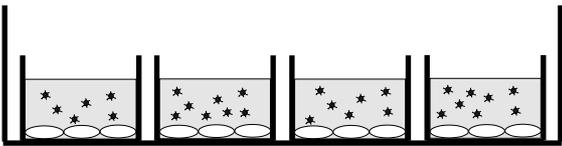
Der Adhäsionsassay wurde ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe modifiziert und in dieser Form etabliert. Dieser modifizierte Adhäsionsassay ist u.a. von Schneider publiziert worden .

Der Versuchsablauf des Adhäsionsassays ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt.

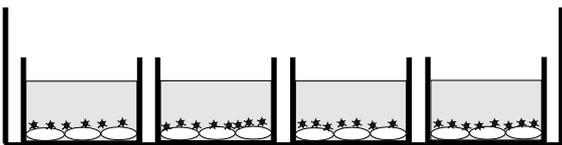
# Adhäsionsassay



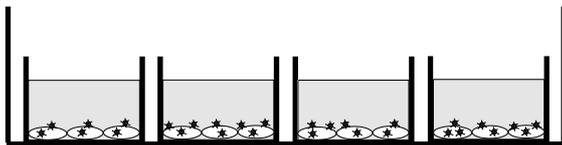
Aussaat eines Monolayers aus Tumorzellen  
(40.000 Zellen in 100  $\mu$ l je well)  
Kultur für 20 h



Hinzufügen der mit  $^3\text{H}$ -L-Methionin radioaktiv markierten Bakterien



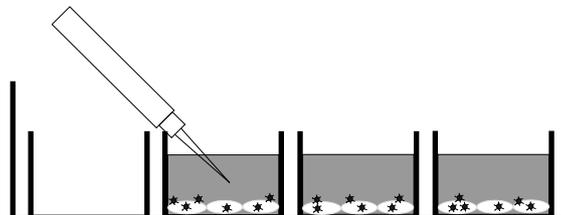
Anzentrifugieren der Bakterien mit 440 g für 15 min



Koinkubation der Bakterien und Tumorzellen für 4h; Adhäsion und Phagozytose der Bakterien



Überkopfzentrifugieren mit 195g für 10 min, Ausschlagen des Überstandes, nicht adhärenzte bzw. phagozytierte Bakterien werden entfernt



Zytolyse der Tumorzellen mit Triton/SDS, komplettes Abpipettieren des Überstandes einschließlich der radioaktiv markierten Bakterien, Auswertung

Abb. 2.2 : Adhäsionsassay

### **2.5.1. Präparation des Monolayers aus Blasentumorzellen**

Die Tumorzellen wurden aus den laufenden Zellkulturen gewonnen und auf eine Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml (Gesamtvolumen 10 ml,  $4 \times 10^6$  Zellen) mit Medium ohne PS, das zu einer Abtötung der Bakterien geführt hätte, eingestellt. Pro well wurden anschließend 100  $\mu$ l in eine 96-well Flachbodenplatte (Falcon 3072, F-Form; Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät, so dass  $4 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l in jedem well enthalten waren. Die Zellen wurden in einer Plattenzentrifuge kurz anzentrifugiert und für 24 h kultiviert, um eine ausreichende Adhärenz der Tumorzellen zu gewährleisten. Auch in diesem Assay wurden die Tumorzelllinien BT-A, SBC-7 und T-24 verwendet.

### **2.5.2. Markierung und Präparation der Bakterien, Berechnung der Adhäsion**

Alle 6 BCG-Stämme sowie die 6 atypischen Mykobakterien-Stämme und *E. coli* wurden hinsichtlich ihres Adhärenzvermögens an den Blasentumorzellen untersucht.

Zunächst wurden  $1 \times 10^8$  cfu der BCG-Stämme in 5 ml Lockemann's Flüssigkulturmedium resuspendiert und anschließend mit 20  $\mu$ Ci [ $^3$ H]-L-Methionin für 5 Tage in Bakterienkulturröhrchen radioaktiv markiert.

Anschließend wurden die Mykobakterien zweimal in PBS gewaschen. Nach photometrischer Keimzahlbestimmung wurde eine Stammlösung von  $10^7$  cfu/ml in PBS hergestellt (Gesamtvolumen mindestens 6 ml).

Ausgehend von dieser Konzentration wurden bezüglich der BCG-Stämme je 2 ml der Konzentrationen  $5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$  und  $1,25 \times 10^6$  cfu/ml durch weitere Verdünnung mit PBS hergestellt.

100  $\mu$ l je Konzentration und BCG-Stamm wurden wiederum in triplets zu den adhärennten Tumorzellen hinzupipettiert.

Ein weiteres triplet der Bakterien wurde je Konzentration direkt in die mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint eco plus, Carl Roth, Karlsruhe) gefüllten Zählröhrchen (Pony-vials, 6 ml, Canberra Packard, Frankfurt a. M.) überführt. Dieses triplet diente jeweils der Bestimmung der Maximalaktivität.

Die Mykobakterien wurden 15 min bei 440g in der Plattenzentrifuge an den Monolayer aus Tumorzellen anzentrifugiert und für 4 h koinkubiert. Anschließend wurden die wells durch Eintauchen der Flachbodenplatte in eine mit PBS gefüllte Schale aufgefüllt und die Platte über Kopf zentrifugiert (10 min, 195g).

Nachdem der Überstand vorsichtig herausgeschlagen worden war, wurden je well 100 µl Triton-X-100/SDS hinzugefügt, um sowohl Tumorzellen als auch phagozytierte bzw. adhärenente Mykobakterien jetzt vollständig in die mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint eco plus, Carl Roth, Karlsruhe) gefüllten Zählröhrchen (Pony-vials, 6 ml, Canberra Packard, Frankfurt a. M.) überführen zu können. Abschließend erfolgten die Messung der Radioaktivität in einem Beta-Counter (Tricarb, 460 M, Canberra Packard) und die Berechnung der Adhäsion in Prozent nach der Formel :

$$\text{Adhäsion (\%)} = \frac{\text{experimentielle Aktivität}}{\text{MAXIMAL - AKTIVITÄT}}$$

Anschließend wurden wiederum der Mittelwert und die Standardabweichung je triplet berechnet (Microsoft Excel<sup>®</sup>) und anschließend grafisch aufgetragen.

Wiederum wurden die Ergebnisse der Einzelversuche je Zelllinie und Konzentration zusammengefasst. Mit den atypischen Mykobakterien und *E. coli* wurde analog verfahren. Allerdings wurden hier Bakterienkonzentrationen von  $1 \times 10^9$  cfu/ml verwendet, da die gemessene Radioaktivität sonst nicht auswertbar gewesen wäre.

Die statistische Auswertung der Zusammenfassung der Adhäsionsassays erfolgte analog zu früheren Publikationen über den student's t-test (Microsoft Excel<sup>®</sup>). Hinsichtlich der erhobenen Daten war im Rahmen der Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik des UKL wiederum stichprobenartig die Normalverteilung der Daten nachgewiesen worden.

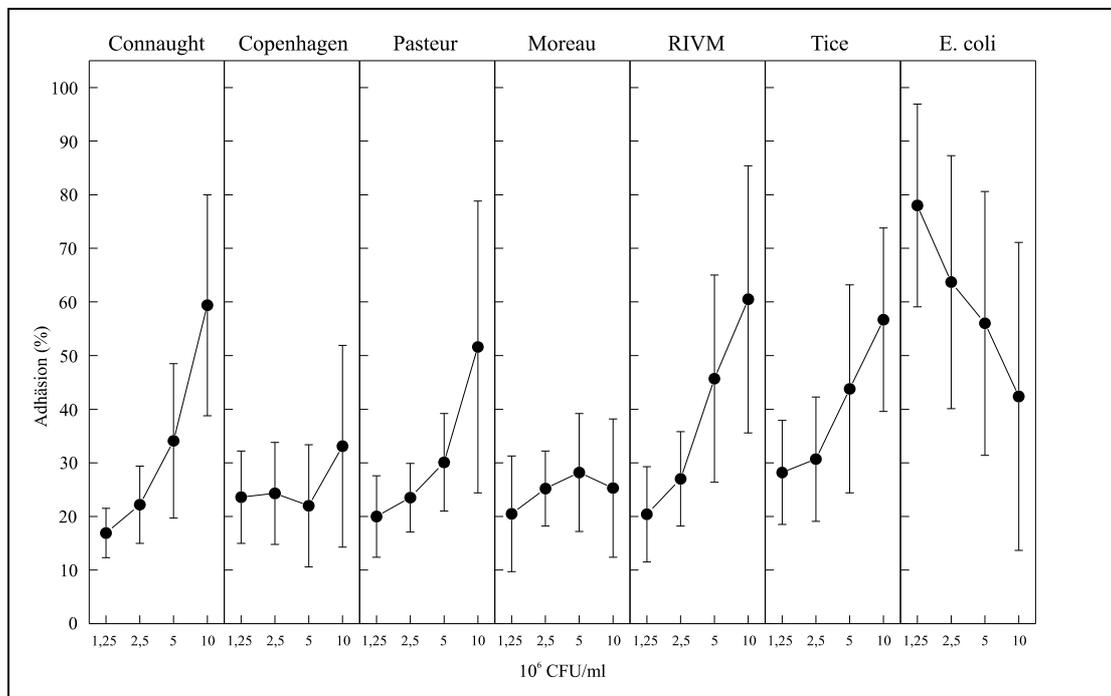
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Ergebnisse der Adhäsionsassays

##### 3.1.1. Adhäsion der verschiedenen BCG-Stämme und *E. coli* an Blasentumorzellen

In der Adhäsion von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) an den Blasentumorzellen sowie an normalem Urothel liegt der initiale Schritt der Immuntherapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms. Daher kommt dem Vergleich des Adhäsionsvermögens der unterschiedlichen Bakterienstämme eine wichtige Rolle in dieser Arbeit zu. Grundlage der Untersuchungen waren die Ergebnisse von Schneider et al. , der die optimale Inkubationszeit der Mykobakterien mit den Tumorzellen, die auch der Instillationsdauer während der BCG-Immuntherapie entspricht, sowie die im Adhäsionsassay eingesetzten Bakterienkonzentrationen ermittelt hatte.

Zunächst wurde das Adhäsionsverhalten der 6 verschiedenen BCG-Stämme an den Blasentumorzelllinien untersucht. Exemplarisch werden im folgenden die Ergebnisse mit der Tumorzelllinie SBC-7 gezeigt, die insgesamt den Ergebnissen der anderen untersuchten Zelllinien entsprechen. (Abb. 3.1)



**Abb. 3.1** : Adhäsion der BCG-Stämme und *E. coli* an der Tumorzelllinie SBC-7. BCG-Copenhagen und –Moreau adhäreren deutlich ( $p < 0,001$ ) schlechter als BCG-Tice

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse von insgesamt 5 Versuchen.

Als wichtigstes Ergebnis wird deutlich, dass alle untersuchten BCG-Stämme an der untersuchten Tumorzelllinie adhären. Dabei nimmt bis auf BCG-Moreau bei allen anderen 5 BCG-Stämmen der prozentuale Anteil der adhären und phagozytierten Mykobakterien, die ebenfalls miterfasst wurden, mit steigender Bakterienzahl zu. Eine Sättigung der Adhäsionskurven wird mit Ausnahme von BCG-Moreau in den vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht erreicht. Schneider hatte in früheren Publikationen eine Sättigung der Bindungskurve bei einer BCG-Konzentration von  $5 \times 10^6$  cfu/ml nachweisen können.

In der aktuellen Untersuchung werden jedoch Unterschiede im Adhäsionsvermögen zwischen den einzelnen BCG-Stämmen deutlich. Während BCG-Connaught, -Pasteur, -RIVM und -Tice in der höchsten verwendeten Bakterienkonzentration zu 50 – 60% (der eingesetzten Bakterien) an den Tumorzellen adhären, liegt das Adhäsionsvermögen von BCG-Copenhagen und -Moreau in derselben Konzentration lediglich bei 30 %. Der statistische Vergleich des Adhäsionsvermögens von BCG-Copenhagen und -Moreau auf der einen Seite und BCG-RIVM und -Tice auf der anderen Seite zeigt eine deutliche Tendenz. ( $p < 0,001$ ; student's t-test). Aufgrund des Versuchsaufbaus sollte hier, wie auch hinsichtlich der folgenden Ergebnisse nicht von signifikanten Unterschieden gesprochen werden. Diese Aussage wäre nur möglich gewesen, wenn 2 Stämme direkt miteinander verglichen worden wären.

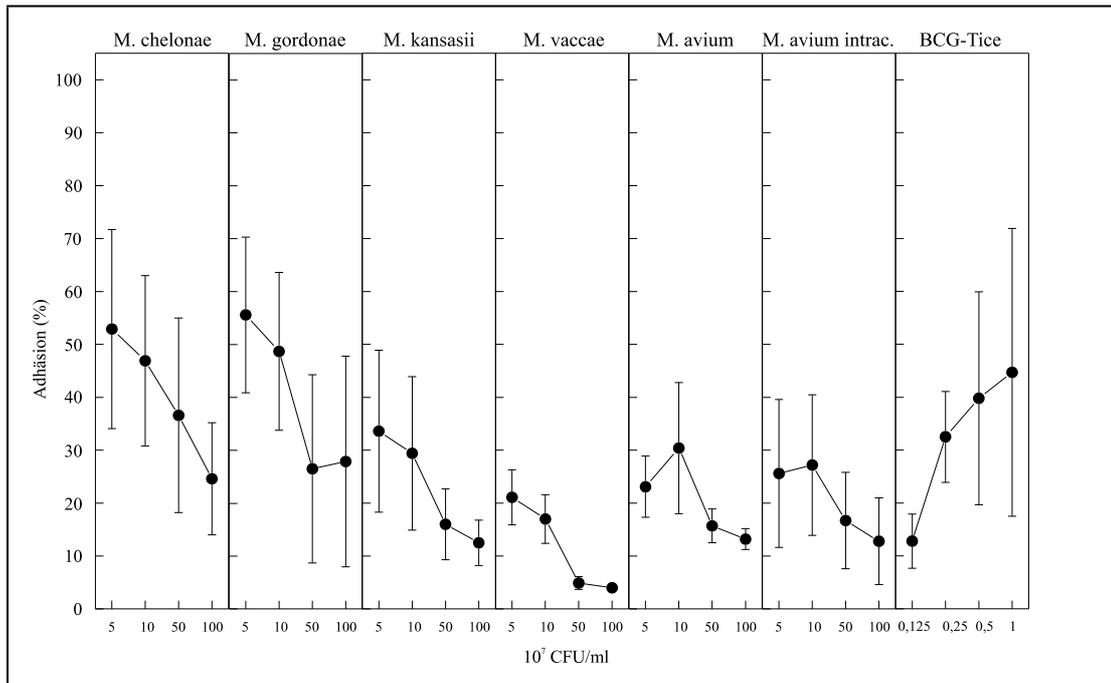
Weiterhin wird deutlich, dass eine Erhöhung der Bakterienkonzentration zu einer Steigerung der Adhäsion führt. Lediglich bei BCG-Moreau ist eine Sättigung der Bindung erreicht, so dass hier eine Erhöhung der eingesetzten BCG-Konzentration zu keiner Erhöhung der relativen Adhäsion führt. Wie Abb. 3.2 zeigt, scheint aber auch bei BCG-Tice bei einer weiteren Steigerung der Bakterienkonzentration eine Sättigung der Bindungskurve erreicht zu werden. Hier flacht sich die Adhäsionskurve ab, so dass bei einer weiteren Steigerung der Bakterienkonzentration eine Abnahme der relativen Adhäsion zu erwarten ist. Der Unterschied bezüglich der relativen Adhäsion von BCG-Tice in den beiden Grafiken ist dadurch zu erklären, dass in Abb. 3.2 lediglich 2 Versuche zusammen gefasst worden sind, wobei das Adhäsionsverhalten in einem der beiden Versuche insgesamt relativ niedrig war.

*E. coli* zeigt ein gutes Adhäsionsvermögen an den Tumorzellen. (Abb. 3.1) Allerdings ist bei *E. coli* bereits in der geringsten Konzentration eine Sättigung der Bindung erreicht, so dass eine weitere Steigerung der eingesetzten Bakterienkonzentration zu einer Abnahme der adhärenen Bakterien im Verhältnis zu den eingesetzten Bakterien führt.

Diese Ergebnisse konnten mit den Zelllinien BT-A und HCV-29 bestätigt werden. Auf die grafische Darstellung dieser Ergebnisse ist aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet worden.

- Zusammenfassung :**
1. Alle untersuchten BCG-Stämme zeigen ein gutes Adhäsionsverhalten gegenüber epithelialen Tumorzellen. Hinsichtlich der Adhäsion existieren keine qualitativen Unterschiede zwischen den untersuchten BCG-Stämmen.
  2. Allerdings existieren quantitative Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen. BCG-Pasteur, - RIVM, -Tice und -Connaught besitzen ein besseres Adhäsionsvermögen als BCG-Copenhagen und -Moreau.
  3. *E. coli* adhärert ebenfalls gut an den epithelialen Tumorzellen.

### 3.1.2. Adhäsion der atypischen Mykobakterien



Weiterhin war von Interesse, ob nur Bacillus Calmette-Guérin an Urothelzellen bzw. an Tumorzellen adhärert oder ob auch atypische Mykobakterien dieses Verhalten zeigen.

**Abb. 3.2 :** Adhäsion der atypischen Mykobakterien an der Tumorzelllinie SBC-7

Die in Abb. 3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen die Zusammenfassung von insgesamt 3 Einzelversuchen, wodurch die relativ hohe Standardabweichung zu erklären ist. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Messung der Adhäsion der atypischen Mykobakterien bei höheren Keimzahlen durchgeführt werden musste, da der Einbau des [<sup>3</sup>H]-L-Methionin durch das einzelne atypische Mykobakterium geringer war als der Einbau durch die BCG-Bakterien. In der oben dargestellten Zusammenfassung der Adhäsionsassays mit der Zelllinie SBC-7 wurden die atypischen Mykobakterien in Konzentrationen von  $5 \times 10^7$  bis  $100 \times 10^7$  CFU/ml eingesetzt, während BCG-Tice in der von Schneider et al. ermittelten optimalen Konzentration von  $1,25 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  CFU/ml verwendet wurde .

Es wird deutlich, dass – wenn auch im unterschiedlichen Ausmaß – alle atypischen Mykobakterien an den Tumorzellen adhäreren.

Dabei besitzen *M. chelonae* und *M. goodii* mit über 50% relativer Adhäsion bei einer eingesetzten Bakterienkonzentration von  $5 \times 10^7$  cfu/ml ein gutes Adhäsionsvermögen, das dem von BCG in der Konzentration von  $1 \times 10^7$  cfu/ml vergleichbar ist. 50% der eingesetzten Mykobakterien adhäreren also an den Tumorzellen. Die übrigen atypischen Mykobakterien zeigen in der gleichen Konzentration ein deutlich geringeres Adhäsionsvermögen. Der statistische Vergleich der relativen Adhäsion von *M. avium* und *M. avium intracellulare* zu den gut adhäreren atypischen Mykobakterien weist eine deutliche Tendenz ( $p < 0,01$ ; student's t-test (*M. chelonae*)) auf.

Weiterhin wird deutlich, dass bei allen atypischen Mykobakterien bei einer Konzentration von  $5 \times 10^7$  cfu/ml bereits eine Sättigung der Bindungskurve erreicht ist. Bei allen Stämmen führt eine weitere Steigerung der Bakterienkonzentration zu einer Abnahme der relativen Adhäsion.

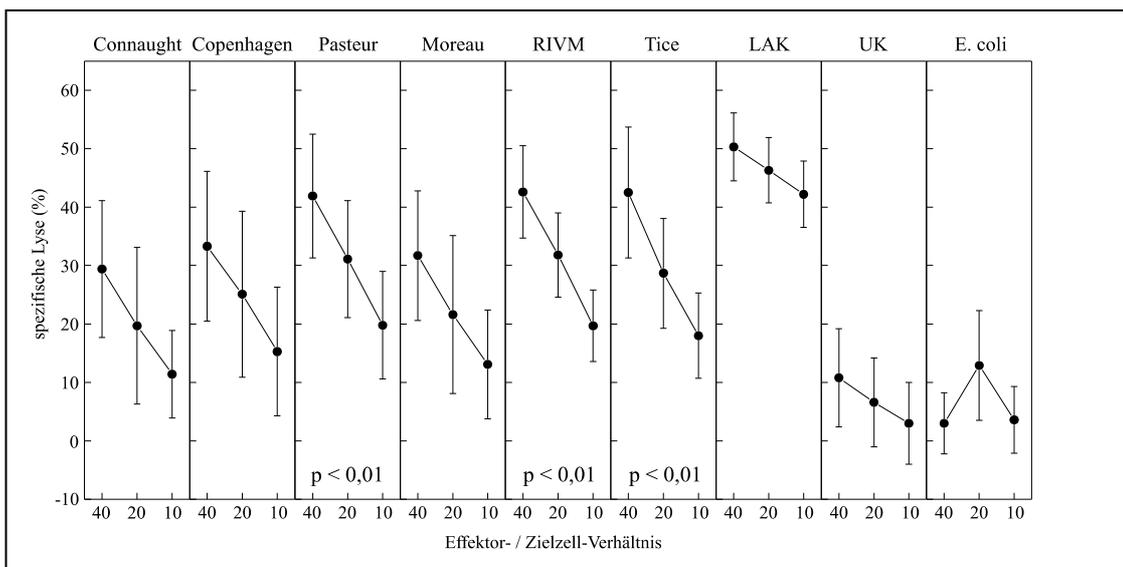
- Zusammenfassung :**
1. *M. chelonae* und *M. goodii* zeigen mit maximal 60% relativer Adhäsion ein dem der BCG-Stämme vergleichbares Adhäsionsverhalten.
  2. Alle Stämme der verwendeten atypischen Mykobakterien adhäreren an epithelialen Tumorzellen. Allerdings existieren quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen atypischen mykobakteriellen Stämmen. *M. avium* und *M. avium intracellulare* adhäreren deutlich schlechter an den epithelialen Tumorzellen als *M. chelonae* und *M. goodii*. Zudem bestehen quantitative Unterschiede im Vergleich der relativen Adhäsion der atypischen Mykobakterien auf der einen Seite und Bacillus Calmette-Guérin auf der anderen Seite.

## 3.2. Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays

### 3.2.1. Vergleich des durch die verschiedenen BCG-Stämme und *E. coli* induzierten zytotoxischen Potentials gegen Tumorzellen

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Stimulation von mononukleären Zellen (MNZ) des peripheren Blutes zu einer Induktion von CD8<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup> Zellen führt, die analog zu den Lymphokin-aktivierten Killer- (LAK-)zellen BCG-aktivierte Killer- (BAK-)zellen genannt werden. Diese aktivierten, immunkompetenten Zellen sind in der Lage, zu einer effektiven Lyse von Tumorzellen, die resistent gegen die zytotoxische Aktivität von unstimulierten, mononukleären Zellen sind, zu führen. Hierin liegt ein weiterer wichtiger Schritt der Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin. Die optimale Stimulationsdauer sowie die optimale Bakterienkonzentration waren von Thanhäuser in früheren Studien ermittelt worden. Diese optimalen Stimulationsbedingungen wurden für die folgenden Versuche übernommen.

Zunächst wurde die Frage untersucht, ob die Stimulation der MNZ mit den 6 verschiedenen Stämmen von Bacillus Calmette-Guérin zu einer effektiven Zytotoxizität gegen die Tumorzelllinien führt und ob Unterschiede im zytotoxischen Potential der BAK-Zellen durch die Stimulation mit den unterschiedlichen BCG-Stämmen auftreten. (Abb. 3.3)



**Abb. 3.3 :** Vergleich des durch die 6 verschiedenen BCG-Stämme und *E. coli* induzierten zytotoxischen Potentials gegen die Tumorzelllinie SBC-7. BCG-Pasteur, - RIVM und -Tice führen zu einer eindeutig höheren Stimulation der BAK-Zellen ( $p < 0,01$ ; student's t-test; 40:1) als BCG Connaught und -Moreau (UK = unstimulierte Kontrolle)

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Zusammenfassung von insgesamt 7 Versuchen mit der Tumorzelllinie SBC-7. Da das zytotoxische Potential der immunkompetenten Effektorzellen von Spender zu Spender differiert, ist bei 7 verschiedenen Spendern die resultierende Standardabweichung höher als in den früheren Publikationen.

Es wird deutlich, dass alle verwendeten Stämme von *Bacillus Calmette-Guérin* zu einer effektiven Stimulation der MNZ führen, die sich in der Lyse der Tumorzellen durch die BAK-Zellen zeigt. Während die Zellen der unstimulierten Kontrolle (UK) eine maximale spezifischen Lyse von 10% bewirken, werden bei einem Effektor-/Zielzellverhältnis von 40:1 mindestens 30% der Tumorzellen durch die unterschiedlich stimulierten BAK-Zellen lysiert.

Allerdings werden Unterschiede zwischen den mit verschiedenen BCG-Stämmen stimulierten BAK-Zellen auf hohem Niveau deutlich. So liegt das zytotoxische Potential der mit BCG-Connaught, -Copenhagen und -Moreau stimulierten BAK-Zellen bei 30% spezifischer Lyse, während die mit BCG-Pasteur, -RIVM und -Tice stimulierten Zellen bei demselben Effektor-/Zielzellverhältnis von 40:1 zu einer Lyse von mindestens 40% der Tumorzellen führen. Die statistische Analyse im t-test zeigt hier eine eindeutige Tendenz ( $p < 0,01$ ).

Weiterhin zeigt sich, dass auch die LAK-Zellen eine effektive Lyse der Tumorzellen hervorrufen, während die Tumorzellen resistent gegen die Aktivität der unstimulierten Kontrolle (UK) sind.

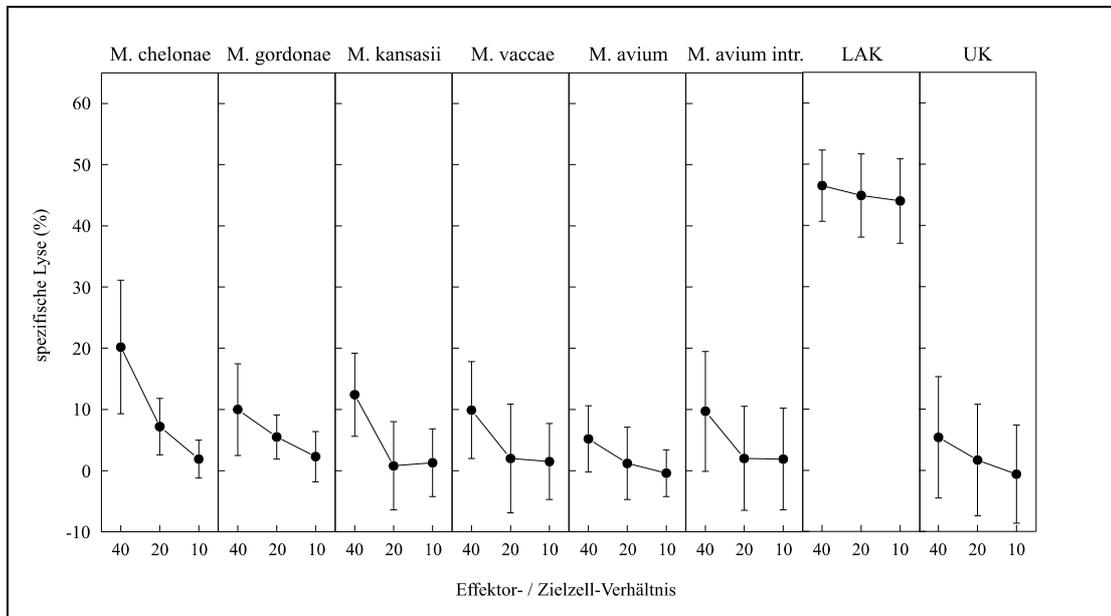
Die Stimulation der MNZ mit *E. coli* führte zu keiner Steigerung des zytotoxischen Potentials der Effektorzellen. Auch eine Steigerung der Bakterienkonzentration während der Stimulation um den Faktor 10 zeigte keinen Effekt. (Daten nicht abgebildet)

Die mit der Tumorzelllinie SBC-7 gewonnenen Daten konnten mit den Tumorzelllinien BT-A und T-24 bestätigt werden, wobei die Versuche mit allen 3 Tumorzelllinien parallel, also mit den gleichen Effektorzellen durchgeführt wurden.

- Zusammenfassung :** 1. Alle verwendeten BCG-Stämme führen zu einer effektiven Stimulation der MNZ mit daraus resultierender hoher Zytotoxizität der BAK-Zellen gegen epitheliale Tumorzellen. Hierin existieren keine qualitativen Unterschiede.
2. Es zeigen sich wiederum quantitative Unterschiede zwischen den untersuchten BCG-Stämmen. Mit BCG-Pasteur, -RIVM und -Tice stimulierte MNZ zeigen eine höhere BAK-Zytotoxizität als die mit den übrigen BCG-Stämmen stimulierten BAK-Zellen.
3. Die Stimulation von MNZ mit *E. coli* führt zu keiner Steigerung des zytotoxischen Potentials der Effektorzellen. Hier zeigen sich qualitative Unterschiede im Vergleich zu den BCG-Stämmen.

### 3.2.2. Vergleich des durch die verschiedenen atypischen Mykobakterien induzierten zytotoxischen Potentials gegen Tumorzellen

Weiterhin interessierte die Frage, ob auch die Stimulation der MNZ mit atypischen Mykobakterien zu einer effektiven Zytotoxizität führt. (Abb. 3.4)



**Abb. 3.4 :** Vergleich des zytotoxischen Potentials der mit atypischen Mykobakterien stimulierten Effektorzellen gegen die Tumorzelllinie SBC-7 (UK = unstimulierte Kontrolle)

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von 5 Versuchen, wobei die MNZ je Versuchsansatz wiederum von unterschiedlichen Spendern stammten.

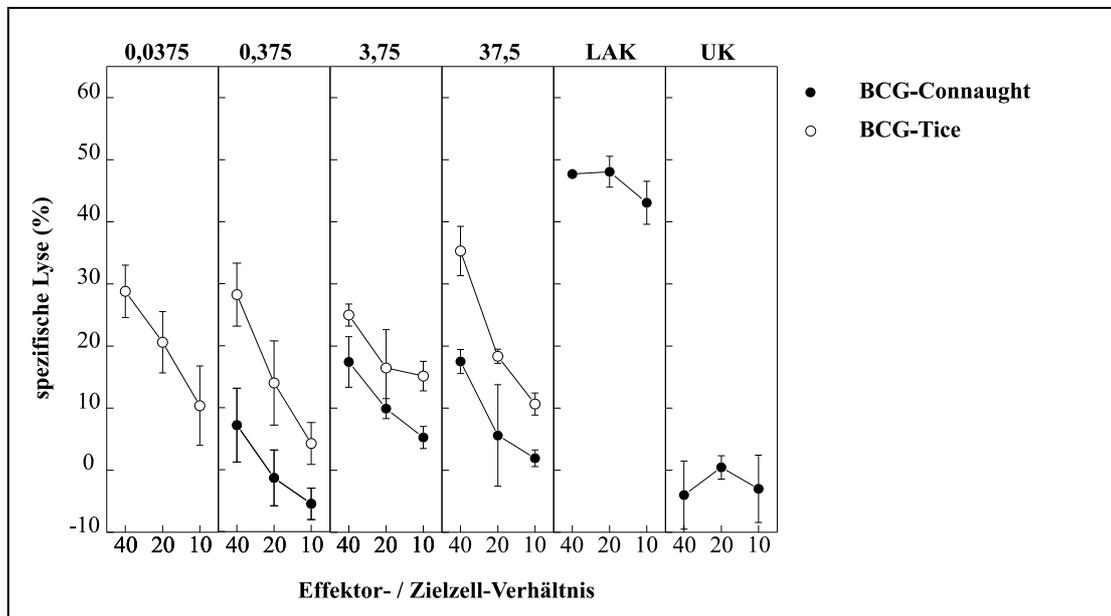
Es wird deutlich, dass außer *M. chelonae* kein weiterer Stamm zu einer effektiven Stimulation der MNZ führt. Die Steigerung des zytotoxischen Potentials der mit *M. chelonae* stimulierten Effektorzellen zeigt im Vergleich zum zytotoxischen Potential der unstimulierten Kontrolle (UK) eine eindeutige Tendenz ( $p < 0,01$ ; student's t-test). Allerdings ist das zytotoxische Potential mit 20% spezifischer Lyse deutlich geringer als das der mit Bacillus Calmette-Guérin stimulierten Effektorzellen. (Abb. 3.3) Dieser Unterschied konnte im Parallelansatz mit verschiedenen BCG-Stämmen bestätigt werden.

Das vorhandene zytotoxische Potential der MNZ wird durch die effektive Lyse der Tumorzellen durch die mit IL-2 stimulierten LAK-Zellen als Positivkontrolle bewiesen.

- Zusammenfassung :** 1. Die Stimulation der MNZ mit atypischen Mykobakterien führt zu keiner Erhöhung des zytotoxischen Potentials der Effektorzellen gegen epitheliale Tumorzellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Lediglich die mit *M. chelonae* stimulierten MNZ führen zu einer geringfügig erhöhten Lyse der Tumorzellen.
2. Es zeigen sich hinsichtlich der Fähigkeit zur Stimulation von MNZ und der daraus resultierenden Erhöhung des zytotoxischen Potentials gegen epitheliale Tumorzellen qualitative Unterschiede zwischen atypischen Mykobakterien und Bacillus Calmette-Guérin (BCG).

### 3.3. Vergleich des zytotoxischen Potentials der mit unterschiedlichen Konzentrationen von BCG-Connaught und -Tice induzierten BAK-Zellen

Frühere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass das zytotoxische Potential der BAK-Zellen neben der Stimulationsdauer auch von der Anzahl viabler Mykobakterien, mit denen die Effektorzellen stimuliert wurden, abhängig ist .



Bedingt durch die oben gefundenen Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen interessierte daher die Frage, wie sich die Veränderung der BCG-Konzentration während der Stimulation auf das zytotoxische Potential der BAK-Zellen auswirkt. (Abb. 3.5)

**Abb. 3.5 :** Einfluss der zur Stimulation verwendeten BCG-Konzentration von BCG-Connaught und -Tice ( $\times 10^4$ /cfu) auf die BAK-Zell-Aktivität (UK = unstimulierte Kontrolle)

Die Abbildung zeigt allerdings einen Einzelversuch mit der Tumorzelllinie SBC-7, so dass zunächst keine Aussagen hinsichtlich der Signifikanz der gefundenen Unterschiede möglich sind.

Die in Abb. 3.3 gezeigten Ergebnisse waren mit einer BCG-Stimulus-Konzentration von  $3,75 \times 10^4$  cfu gewonnen worden. In Abb. 3.5 wird deutlich, dass die Stimulation der MNZ mit einer um den Faktor 100 verringerten BCG-Tice-Konzentration zu keiner Reduktion des zytotoxischen Potentials der BAK-Zellen führt. Eine weitere Steigerung der Bakterienkonzentration um den Faktor 10 führt sogar zu einer weiteren Steigerung der Effektorzell-aktivität.

Bei BCG-Connaught führt die Steigerung der Bakterienkonzentration zu keiner Steigerung der Zytotoxizität der BAK-Zellen, während eine Verringerung der Bakterienkonzentration sogar ein Absinken der Zytotoxizität gegen die Tumorzellen bewirkt.

Der Vergleich der BAK-Zell-Zytotoxizität der beiden BCG-Stämme zeigt, dass die mit BCG-Connaught stimulierten BAK-Zellen wiederum eine geringere Lyse als die mit BCG-Tice stimulierten Effektor-Zellen bewirken. Dabei fällt auf, dass sogar eine um den Faktor 10 geringere Konzentration von BCG-Tice ein deutlich höheres zytotoxisches Potential induziert als die Standardkonzentration von BCG-Connaught. Auch die um den Faktor 100 verringerte Bakterienkonzentration ist effektiver als BCG-Connaught in der Standardkonzentration.

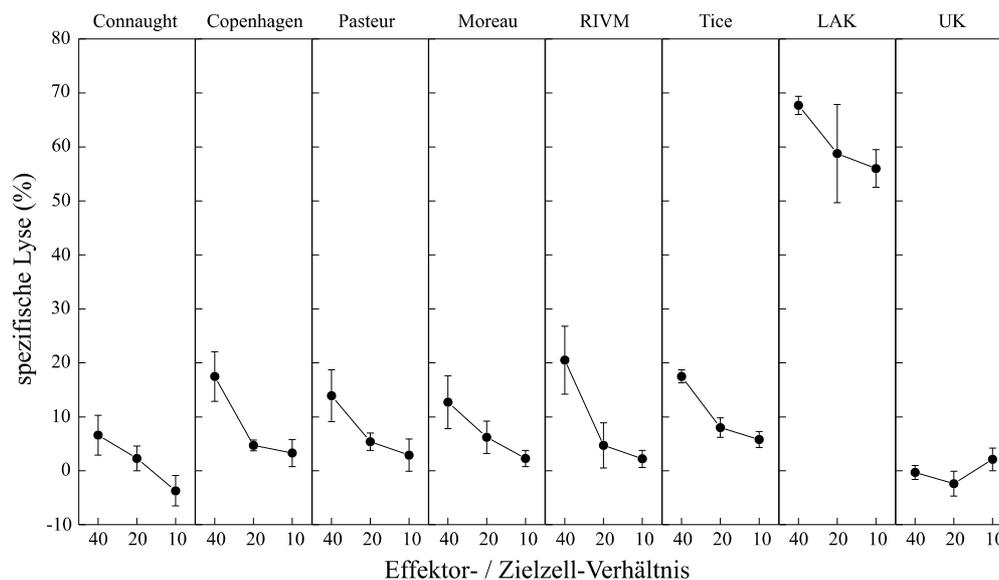
**Zusammenfassung :** 1. Die Höhe des zytotoxischen Potentials der BAK-Zellen und die damit verbundene Lyse der epithelialen Tumorzellen ist von der zur Stimulation eingesetzten BCG-Dosis abhängig.

2. In einem Einzelversuch konnte gezeigt werden, dass mit BCG-Tice trotz einer Reduktion der Standard-Stimulus-Konzentration um den Faktor 10 bzw. 100 ein höheres zytotoxisches Potential induziert wurde als mit BCG-Connaught in der Standardkonzentration. Auch hier scheinen quantitative Unterschiede zwischen den Stämmen zu existieren.

### 3.4. Vergleich der BCG-Stämme bei „non-respondern“

In unserer Arbeitsgruppe war in den vergangenen Jahren - trotz geringfügiger, interindividueller Unterschiede im zytotoxischen Potential der stimulierten MNZ von ungefähr 10% - wiederholt die Beobachtung gemacht worden, dass mononukleäre Zellen einiger Spender trotz Stimulation mit Bacillus Calmette-Guérin keine effektive Lyse der Tumorzellen bewirkten, während die Stimulation mit IL-2 hingegen effektiv war. Diese Spender wurden daher als „non-responder“ bezeichnet.

Daher interessierte uns die Frage, ob diese fehlende Stimulierbarkeit vom BCG-Stamm abhängig ist, d.h. ob ein anderer Stamm zu einer effektiveren BAK-Zell-Zytotoxizität führt.



**Abb. 3.6 :** Vergleich der BCG-Stämme bei „non-respondern“ (UK = unstimulierte Kontrolle)

Die Ergebnisse eines Einzelversuchs werden exemplarisch in Abb. 3.6 gezeigt. Es wird deutlich, dass zwar alle verwendeten BCG-Stämme die Suszeptibilität der Tumorzellen gegen die stimulierten Effektorzellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erhöhen. Allerdings erreichen die BAK-Zellen aller zur Stimulation verwendeten BCG-Stämme nicht das normale zytotoxische Potential. Geringe Unterschiede zwischen den Stämmen

werden auch hier deutlich. Das vorhandene zytotoxische Potential und die Stimulierbarkeit der Effektorzellen beweist die hohe LAK-Zell-Aktivität.

- Zusammenfassung :**
1. Die MNZ verschiedener gesunder Spender, so genannter „non-responder“, zeigen trotz Stimulation mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) unter in-vitro Bedingungen kein signifikant erhöhtes zytotoxisches Potential gegenüber epithelialen Tumorzellen.
  2. Diesbezüglich existieren keine qualitativen Unterschiede zwischen den untersuchten BCG-Stämmen.
  3. Lymphokin-aktivierte Killer- (LAK-) Zellen führen trotz der mangelnden Stimulierbarkeit der MNZ mit BCG zu einer effektiven Lyse der Tumorzellen.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Diskussion der eigenen Methodik**

#### **4.1.1. Keimzahlbestimmung der verschiedenen Bakterien**

Die Bestimmung der Keimzahl der verschiedenen Bakterien erfolgte photometrisch anhand selbst erstellter Eichkurven. Die so ermittelten Bakterienkonzentrationen konnten über Verdünnungsreihen und anschließende Kultur anhand der Anzahl der Kolonien zumindest in der Zehnerpotenz bestätigt werden. Eine genauere Keimzahlbestimmung war unter den gegebenen Umständen nicht möglich, da das Ziel dieser Methode der Konzentrationsbestimmung die Konzentration der viablen Keime war.

In früheren Untersuchungen konnte in unserer Arbeitsgruppe bewiesen werden, dass zur Induktion der BCG-aktivierten Killer- (BAK-) Zellen lebende Mykobakterien benötigt werden. Würde man die Keimzahl zum Beispiel über das Gewicht bestimmen, wäre keine Aussage über den Anteil der lebenden Mykobakterien möglich.

Allerdings werden mit der photometrischen Keimzahlbestimmung auch tote Bakterien und Zelltrümmer mitbestimmt. Dies erklärt auch die relativ große Ungenauigkeit dieser Methode. Da es aber vor allem auf die Anzahl der viablen Keime ankam, erwies sich die photometrische Keimzahlbestimmung als die am besten geeignete Methode.

Die Problematik, die Konzentration viabler Keime zu bestimmen, wird auch durch die Angaben der Pharmaindustrie bei den zur Immuntherapie eingesetzten Präparaten deutlich. Hier wird zum Beispiel von ImmuCyst® (BCG-Connaught) nur eine Mindestanzahl viabler Keime ( $1,8 \times 10^8$ ) zum Ende der Laufzeit der Präparate garantiert.

#### **4.1.2. Adhäsionsassay**

Da auch der Adhäsionsassay von der photometrischen Keimzahlbestimmung abhängig ist, liegt hier schon ein Ungenauigkeitsfaktor. Ein unterschiedlicher Einbau des [ $^3\text{H}$ ]-L-Methionin durch die verschiedenen Bakterienstämme wird allerdings nicht relevant, da für jeden Stamm und Ansatz die Maximalaktivität bestimmt wurde.

Ein weiteres Problem bei der Versuchsdurchführung war das Abreißen von Teilen des Monolayers aus Tumorzellen während des „Über-Kopf-Zentrifugierens“. Hier sollten die nicht adhärenen Bakterien von den Tumorzellen getrennt werden. Durch das Abreißen von Teilen des Monolayers ging mit den Tumorzellen ein Teil der adhärenen Bakterien vor der Auswertung verloren, so dass große Unterschiede innerhalb eines triplets auftraten. In diesen Fällen wurde der Versuchsansatz nicht weiter verwertet. Durch das Abreißen kleinerer Teile des Monolayers ist auch die relativ hohe Standardabweichung bei der Auswertung dieses Assays zu erklären.

Weiterhin ist anzumerken, dass bei diesem Versuchsaufbau nicht nur die adhärenen Mykobakterien, die sich an der Tumorzelloberfläche befinden, sondern auch die phagozytierten Mykobakterien, die sich bereits intrazellulär befinden, mitbestimmt werden.

#### **4.1.3. Zytotoxizitätsassay**

Der in dieser Arbeit verwendete Zytotoxizitätsassay ist international etabliert und wird von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendet .

Auch hier ist die zur Stimulation der Effektorzellen photometrisch bestimmte Keimzahl als eine mögliche Fehlerquelle zu nennen. Da es aber besonders in diesem Assay auf die Konzentration viabler Keime ankommt, stand keine genauere Methodik zur Keimzahlbestimmung zur Verfügung.

Eine weitere Fehlerquelle ist in der Konzentrationsbestimmung der Effektorzellen, die über die Auszählung der MNZ in der Neubauer-Zählkammer erfolgte, zu sehen. Allerdings wurde zunächst eine Stammkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml erstellt, die dann für alle Immunstimulantien verwendet wurde, so dass hier für alle Immunstimulantien gleiche Bedingungen und Konzentrationen an MNZ vorherrschten. Da die Konzentrationsbestimmung der verschiedenen BAK- bzw. LAK-Zellen wiederum, jetzt aber getrennt, in der Neubauer-Zählkammer erfolgte, ist hierin eine weitere Fehlerquelle zu sehen.

Weiterhin differiert das zytotoxische Potential der stimulierten MNZ von Spender zu Spender. Da aber pro Einzelversuch die Effektorzellen desselben Spenders verwendet wurden, ist dieser Faktor zunächst zu vernachlässigen. Doch kommt dieser Faktor bei der Zusammenfassung der Einzelergebnisse verschiedener Spender, wie in den oben gezeigten Abbildungen durchgeführt, zum Tragen. Hier ist der Hauptgrund für die relativ hohe Standardabweichung in den Abbildungen zu sehen. Durch den Parallelansatz aller verwendeten Stimulantien mit den mononukleären Zellen jeweils eines Spenders pro Einzelversuch spielt dieser Faktor bei einem Vergleich der immunstimulatorischen Potenz der verschiedenen Bakterien zumindest innerhalb des Einzelversuches keine Rolle.

Die Genauigkeit dieser Methode wird durch die geringe Standardabweichung innerhalb eines Triplets pro Ansatz unterstrichen.

## **4.2. Literaturübersicht**

### **4.2.1. Literaturübersicht über die verschiedenen BCG-Stämme in der Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms**

Verschiedene BCG-Stämme haben sich in der Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms etabliert. Die Frage, ob für die Therapie relevante Unterschiede zwischen den Stämmen bestehen, wird bereits seit Beginn der Immuntherapie unabhängig von dem zu therapierenden Tumor diskutiert .

Einige Autoren sehen in der Wahl des BCG-Stammes keinen den Therapieerfolg deutlich beeinflussenden Parameter . Dies ist nach Meinung der Autoren insbesondere für die Einführung neuer BCG-Stämme in die Immuntherapie in den Ländern der 3. Welt von Bedeutung, da die Tuberkuloseprophylaxe und die Immuntherapie mit selbst etablierten BCG-Stämmen selbstverständlich kostengünstiger ist als der Einsatz von etablierten BCG-Stämmen der großen Pharmakonzerne.

Jedoch existieren bisher nur wenige klinische Studien, die den Therapieerfolg der verschiedenen BCG-Stämme in der Immuntherapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms direkt vergleichen .

In der Tabelle 4.1 ist ein Überblick über klinische Studien mit den unterschiedlichen BCG-Stämmen zum Zeitpunkt dieser Arbeit dargestellt. Eine allgemein gültige Aussage über Unterschiede zwischen den BCG-Stämmen ist anhand dieser Datenlage nicht möglich. Die unterschiedlichen nicht standardisierten Parameter wie Therapieschema, eingesetzter Bakterienkonzentration und Präparation der Mykobakterien lassen jedoch auch einen indirekten Vergleich der klinischen Studien nicht zu.

Trotz unterschiedlicher Keimzahlen und Therapieschemata bewirkten alle Stämme eine deutliche Senkung der Rezidivrate des oberflächlichen Urothelkarzinoms. Allerdings zeigt sich, dass Unsicherheit hinsichtlich des optimalen Therapieschemas und der benötigten BCG-Dosis besteht.

Weiterhin konnte in verschiedenen Studien die größere therapeutische Effektivität einer BCG-Immuntherapie im Vergleich mit diversen Chemotherapeutika bewiesen werden.

So konnten Mori et al. bereits 1986 zeigen, dass die Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) zu einer Remissionsrate von 81% führt, während die Chemotherapie mit Adriamycin lediglich eine Remissionsrate von 46% bewirkte. Die Immuntherapie wurde in dieser Studie mit 120 mg BCG-Connaught durchgeführt.

Diese Ergebnisse konnten von Lamm et al. 1991 in der SWOG-Studie bestätigt werden, in der ebenfalls 120 mg BCG-Connaught zur Immunstimulation eingesetzt wurden. Hier betrug die komplette Remissionsrate einer BCG-Therapie der Tumorstadien pTa und pT1 37%, die einer Chemotherapie mit Adriamycin nur 17%. Die gleiche Studie zeigte, daß durch eine Therapie mit BCG eine komplette Remissionsrate beim Carcinoma in situ (CIS) von 45% erzielt wurde, während durch Adriamycin eine komplette Remissionsrate von lediglich 18% erreicht wurde. Alle diese Unterschiede waren signifikant.

Im Vergleich der BCG-Immuntherapie mit der Chemotherapie mit Mitomycin C konnten van-der-Meijden et al. 1988 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Effektivität der beiden Therapieformen finden. In dieser Studie wurde BCG-RIVM in einer Konzentration von  $1 \times 10^9$  CFU/50ml für die Immuntherapie verwendet.

Dagegen konnten Rintala et al. 1989 die größere Effektivität der BCG-Therapie im Vergleich zu der Mitomycin C-Therapie nachweisen. Hier lagen die Remissionsraten bei 97% und 91%. Diese Unterschiede waren signifikant. Allerdings wählten die Autoren mit BCG-Pasteur (75 mg) einen anderen BCG-Stamm als van-der-Meijden in der oben genannten Studie.

Die Frage, welchen Einfluss die verschiedenen BCG-Stämme einerseits und die unterschiedliche Bakterien-Masse bzw. -Konzentration andererseits auf den Therapieerfolg genommen haben, muss offen bleiben.

Krege et al. untersuchten in einer 1996 publizierten Multizenterstudie den Effekt einer adjuvanten Therapie mit Mitomycin C bzw. BCG im Vergleich zu der alleinigen transurethralen Resektion des Blasen Tumors. In dieser Studie wurden 20 mg Mitomycin C und 120 mg BCG verwendet. Die Autoren konnten den Nachweis erbringen, dass die adjuvante Therapie mit Mitomycin C und BCG zu einer signifikanten Abnahme der Rezidivrate führt. Unterschiede zwischen Mitomycin C und BCG bezüglich der Rezidivrate nach 20 Monaten konnten die Autoren jedoch nicht belegen. In dieser Studie

war ebenso kein Einfluss einer Immuntherapie mit BCG oder einer lokalen Chemotherapie mit BCG auf den Tumor-Progress nachweisbar.

Die Ergebnisse der von Lundholm et al. 1996 veröffentlichten prospektiven, randomisierten Studie mit 261 Patienten zeigen, dass die Patienten, die adjuvant mit 120 mg BCG-Pasteur behandelt wurden, eine niedrigere Rezidivrate und ein signifikant längeres tumorfreies Intervall aufwiesen als die Patienten, die mit 40 mg Mitomycin C behandelt worden waren .

Da eine Therapie mit Mitomycin C oder anderen Chemotherapeutika unmittelbar nach einer transurethralen Resektion möglich ist, wurden Therapieschemata entwickelt, in denen zunächst das Chemotherapeutikum appliziert wurde, worauf sich eine BCG-Immuntherapie anschloss. Witjes et al. untersuchten daher die Effektivität einer Therapie-Kombination aus Mitomycin C und BCG auf der einen Seite und einer alleinigen Mitomycin C Therapie auf der anderen Seite, wobei die Nebenwirkungsrate ebenfalls in die Studie einbezogen wurde . Die Autoren konnten keine Unterschiede zwischen beiden Therapiearmen hinsichtlich der Nebenwirkungsrate und der Therapie-Effektivität nachweisen. Allerdings hatten dieselben Autoren in einer weiteren Studie auch keine Unterschiede zwischen einer alleinigen Chemotherapie mit Mitomycin C gegenüber der BCG-Immuntherapie belegen können . In Hinblick auf die Verhinderung eines Tumorprogresses zeigte Mitomycin C bei Patienten mit einem Carcinoma in situ (CIS) sogar eine höhere Effektivität als BCG.

Sylvester, van der Meijden und Lamm publizierten 2002 eine Metaanalyse der bis dahin veröffentlichten randomisierten klinischen Studien, die entweder eine transurethrale Resektion (TUR) mit anschließender BCG-Therapie bzw. die alleinige TUR oder eine TUR mit einer anderen adjuvanten Therapie als BCG zum Inhalt hatten . Insgesamt konnten so 24 Studien mit 4863 Patienten in dieser Metaanalyse eingeschlossen werden. Die Autoren haben belegt, dass eine BCG-Immuntherapie das Risiko eines Tumorprogresses signifikant reduziert.

In einer weiteren Metaanalyse untersuchten Böhle et al. den Einfluss einer adjuvanten Immuntherapie mit BCG bzw. einer adjuvanten intravesikalen Chemotherapie mit Mitomycin C auf die Rezidiv- und Nebenwirkungsrate . Insgesamt wurden 11 klinische Studien erfasst, wobei die Daten von 1421 mit BCG behandelten und von 1328 mit Mitomycin C behandelten Patienten analysierten wurden. Die Metaanalyse der

Studiendaten ergab, dass eine adjuvante, intravesikale Therapie mit BCG – insbesondere wenn sich eine Erhaltungstherapie für mindestens 1 Jahr mit insgesamt 12 BCG-Instillationen anschließt – eine effektive Therapie darstellt, die sich gegenüber einer adjuvanten, intravesikalen Chemotherapie mit Mitomycin C hinsichtlich der Rezidivprophylaxe überlegen zeigt. Zugleich konnten die Autoren widerlegen, dass eine Erhaltungstherapie durch die erhöhte Anzahl an Instillationen zu einer gesteigerten Nebenwirkungsrate führt.

Lamm et al. hatten die Effektivität einer Erhaltungstherapie in der 2000 publizierte Studie der Southwest Oncology Group (SWOG) belegen können. Erwähnenswert ist, dass in dieser Studie während des initialen 6-wöchigen Therapie-Kurses zusätzlich zu der BCG-Instillation in die Harnblase eine perkutane BCG-Applikation erfolgte. Das mittlere rezidivfreie Intervall betrug in der Gruppe ohne Erhaltungstherapie 35,7 Monate und in der Gruppe mit Erhaltungstherapie 76,8 Monate. Dieser Unterschied zwischen den beiden Therapie-Armen wurde auch in der 5-Jahres-Überlebensrate deutlich.

Die Ergebnisse einiger randomisierter Studien sind in der Tabelle 4.1 kurz zusammengefasst worden.

Autor	Therapie	n = Patienten	CR	Signifikanz	Literatur
MORI et al. 1986 (SWOG)	<b>BCG- Connaught (120 mg)</b>	88	81%	p < 0,001	
	ADM	83	46%		
MARTINEZ- PINEIRO et al. 1990	<b>BCG-Pasteur (150 mg)</b>	67	87%	p < 0,002  p < 0,003	
	ADM	53	57%		
	Thiotepa	56	64%		
VAN-DER- MEIJDEN et al. 1990	<b>BCG-RIVM (1x10<sup>9</sup> CFU/50ml)</b>	170	67%	nicht signifikant	
	MMC	167	70%		
RINTALA et al. 1989 (Finnbladderl)	<b>BCG-Pasteur (75 mg)</b>	40	97%	p < 0,001	
	MMC	36	91%		
LAMM et al. 1991 SWOG					
pTa, pT1	<b>BCG- Connaught (120 mg)</b>	63	37%	p = 0,015	
	ADM	68	17%		
CIS	<b>BCG- Connaught (120 mg)</b>	64	45%	p < 0,001	
	ADM	67	18%		

**Tab. 4.1 :** Randomisierte Studien intravesikale BCG-Immuntherapie versus intravesikale Chemotherapie

Die Überlegenheit der BCG-Immuntherapie gegenüber allen bisher verwendeten Chemotherapieformen und die Effektivität aller bisher verwendeten Stämme bleibt als wichtigste Aussage der oben genannten Studie festzuhalten.

Allerdings zeigt die Einführung der low-dose-Protokolle bei erhaltener Effektivität der BCG-Therapie, dass momentan unter Umständen im Überdosisbereich therapiert wird. Die Frage, ob die Auswahl des BCG-Stammes den Therapieerfolg allgemein oder bei Dosisreduktion in einem low-dose-Therapieschema beeinflussen könnte, müssen zukünftige klinische Studien beantworten.

#### **4.2.2. Literaturübersicht über den Vergleich der verschiedenen BCG-Stämme in experimentellen in-vitro und in-vivo Studien**

Die Ergebnisse verschiedener in-vitro Modelle ließen bereits früh den Verdacht entstehen, dass Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen hinsichtlich der untersuchten Parameter vorhanden sind. Primär handelte es sich dabei um verschiedene Tiermodelle, in denen die direkte zytotoxische Wirkung bzw. das immunstimulatorische Potential von Bacillus Calmette-Guérin untersucht wurde. In-vitro Studien, in denen die für die Immuntherapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms relevanten Parameter unter der Verwendung verschiedener BCG-Stämme und atypischer Mykobakterien untersucht wurden, sind bisher nur selten unternommen worden. Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht über einige Studien, die verschiedene BCG-Stämme unter in-vitro Bedingungen untersucht haben.

Versucht man die Ergebnisse zusammenzufassen, wird deutlich, dass die Studien entweder keine Unterschiede zwischen den Stämmen hinsichtlich der untersuchten Parameter nachweisen konnten oder dass die Unterschiede nicht über alle Studien konstant waren. BCG-Pasteur hat dabei in den meisten Studien, die überhaupt Unterschiede zwischen den Stämmen gezeigt haben, besser als verschiedene andere BCG-Stämme abgeschnitten. Auf einige dieser Studien soll im folgenden etwas näher eingegangen werden.

So untersuchten Lagrange et al. 1977 die Lymphozytenproliferation und die T-Zell-Stimulation durch BCG-Pasteur, -Connaught, -Tice, -Phipps und -Glaxo unter in-vivo und in-vitro Bedingungen. Gleichzeitig wurden die Wachstumseigenschaften der BCG-Stämme beobachtet. Sie konnten zeigen, dass BCG-Glaxo in ihrer Studie am schlechtesten abschnitt, während BCG-Pasteur die besten immunstimulatorischen Eigenschaften zu besitzen schien. BCG-Glaxo bewies auch schlechtere Wachstumseigenschaften als die übrigen BCG-Stämme. Diese Ergebnisse zeigen wiederum, dass die Kulturbedingungen und das Wachstumsverhalten der BCG-Stämme das immuntherapeutische Potential beeinflussen .

Landi et al. hatten bereits 1977 den Einfluss des Wachstumsverhaltens verschiedener BCG-Stämme unter optimierten Kulturbedingungen auf die Virulenz der Mykobakterien in Goldhamstern in den Mittelpunkt ihrer Untersuchungen gestellt. Die meisten Bakterienkolonien erzielte diese Arbeitsgruppe mit BCG-Japan und BCG-Connaught, während der französische und der dänische BCG-Stamm (Synonyme für BCG-Pasteur und BCG-Copenhagen) die wenigsten Kolonien – also ein langsames Wachstumsverhalten - aufwies. Allerdings war die Virulenz der untersuchten BCG-Stämme unabhängig von deren Proliferationsvermögen. BCG-Pasteur und BCG-Copenhagen erwiesen sich als die virulentesten Stämme, während in dieser Studie BCG-Japan und BCG-Connaught am schlechtesten abschnitten . Der Einfluss des Wachstumsverhaltens der Mykobakterien auf die immunstimulatorische Potenz bzw. die Infektiosität konnte durch diese Studie also nicht bestätigt werden.

Hanna et al. hatten zuvor im Meerschweinchenmodell die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen beobachtet, indem sie die Tiere - nach der Exzision der intrakutan wachsenden Leberzellkarzinome - mit verschiedenen Präparationen unterschiedlicher BCG-Stämme immunisierten. Nur durch die „fresh-frozen“ BCG-Phipps und -Pasteur konnte ein reduziertes Größenwachstum von Lymphknotenmetastasen beobachtet werden, während die lyophilisierten, also unter Einwirkung von Vakuum präparierten BCG-Tice, -Pasteur und -Connaught, zu keiner Reduktion der Größe der Lymphknotenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe führten. Die histologische Aufarbeitung der Lymphknoten ergab analog zu der reduzierten Lymphknotengröße auch eine Verringerung der Metastasenanzahl in den Lymphknoten der Tiere, die mit den frisch gefrorenen BCG-Phipps und -Pasteur immunstimuliert worden waren. Allerdings starben alle Tiere

unabhängig von dem zur Immunisierung verwendeten BCG-Stamm nach drei Monaten . Diese Studie konnte wiederum Anhaltspunkte dafür liefern, dass Unterschiede zwischen verschiedenen BCG-Stämmen auch bei gleicher Präparation nachweisbar sind und dass das Präparationsverfahren das immunstimulatorische Potential der Bakterien maßgeblich beeinflusst.

Rajala und Lahde untersuchten den direkten zytotoxischen Effekt von BCG-Connaught, -Pasteur, -RIVM, -Tice und -Evans auf die Blasen tumorzelllinie T-24 und dessen Steigerung durch die Zugabe von IFN- $\gamma$  und Mitomycin C . Sie konnten geringe Unterschiede zwischen den Stämmen nachweisen. Der direkte zytotoxische Effekt von BCG konnte allerdings von unserer Arbeitsgruppe in früheren Studien nicht bestätigt werden.

Kreider und Bartlett studierten die zytotoxische und immunstimulatorische Wirkung verschiedener BCG-Stämme und *Corynebacterium parvum* (C. parvum) in der Therapie intrakutan wachsender Mammakarzinome in der Ratte . Sie konnten zeigen, dass C. parvum nach der Exzision des Primärtumors zu einer Verringerung der Metastasenzahl führte, während BCG-Connaught, -Pasteur, -RIVM, -Tice, und -Phipps zwar in mindestens einem Tier eine immunstimulatorische Wirkung aufwiesen, die antitumorale Potenz der BCG-Stämme aber schwächer als die von C. parvum war. Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen konnten nicht nachgewiesen werden. Lediglich BCG-Glaxo zeigte in diesem Modell keinen Effekt.

### **4.3. Kritischer Vergleich der eigenen Untersuchungen und Ergebnisse mit früheren in-vitro Studien**

#### **4.3.1. Vergleich der Ergebnisse verschiedener Adhäsionsassays**

Experimentelle Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten der verschiedenen BCG-Stämme an unterschiedliche epitheliale Tumorzelllinien existieren bisher nicht.

Ratliff et al. untersuchten unter anderem die Bindung verschiedener BCG-Stämme an Fibronectin (FN) . Sie hatten vorher nachweisen können, dass Fibronectin eines der extrazellulären Matrixproteine sein könnte, an das BCG auch in vivo bindet. Eine Bindung an Laminin, Kollagen bzw. Fibrinogen konnte von den Autoren ausgeschlossen werden. In ihrer Studie wurde die Bindung von BCG- Connaught, - Tice, - Pasteur und –Glaxo an mit Fibronectin beschichtete Mikrotiterplatten verglichen. Während BCG-Connaught, -Pasteur und -Tice gut und ohne signifikante Unterschiede an Fibronectin adhärirten, zeigte BCG-Glaxo ein wesentlich schlechteres Adhäsionsverhalten.

Die Arbeitsgruppe um Ratliff konnte in weiteren Studien nachweisen, dass dieses schlechte Bindungsvermögen an der Verwendung von Detergentien bei der Lyophilisierung von BCG-Glaxo lag . Wurde BCG-Glaxo in Abwesenheit von Detergentien lyophilisiert, wies der Stamm ähnlich gute Adhäsionseigenschaften wie die anderen BCG-Stämme auf. Der Einfluss von Detergentien, die auch in Instillations-Gel verwendet werden, auf die Adhäsion und Viabilität von Bacillus Calmette-Guérin konnte ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden .

Ratliff et al. konnten in der oben angeführten Studie erstmals nachweisen, dass BCG-Glaxo durch das schlechte Bindungsverhalten ebenfalls eine geringere immuntherapeutische Potenz im Mausmodell aufwies. Die Autoren folgern aus diesen Ergebnissen, dass in der Adhäsion von BCG an die Tumorzellen bzw. die vesikale Mukosa der initiale Schritt der Immuntherapie mit diesen Mykobakterien zu sehen ist.

Einen Unterschied bezüglich des Adhäsionsverhaltens der verwendeten BCG-Stämme konnte Ratliff in dieser Studie allerdings nicht nachweisen.

In einer weiteren Studie verglich die Arbeitsgruppe von Ratliff das Adhäsionsverhalten von verschiedenen BCG-Stämmen und einem Stamm von *M. kansasii*, der sich durch hohe

Adhäsionsfähigkeit für diese Studie anbot. Zudem wurde die durch die Bindung als ersten Schritt einer Immunreaktion initiierte immuntherapeutische Potenz der Bakterien untersucht.

Auch in dieser in-vitro Studie konnten keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten der unterschiedlichen BCG-Stämme an die Fibronectin beschichteten Mikrotiterplatten und an löslichem Fibronectin nachgewiesen werden. Dabei wurden die verschiedenen Stämme, wie auch in der vorliegenden Arbeit, nach vorheriger Kultur miteinander verglichen. Es zeigte sich weiterhin, daß auch *M. kansasii* als ein atypisches Mykobakterium eine hohe Affinität zu Fibronectin (FN) besitzt. Der Stamm von *M. kansasii* adhärierte sogar signifikant am besten.

Diese in-vitro Ergebnisse konnten in einem in-vivo Adhäsionsassay an der murinen Blasenmukosa bestätigt werden, was die Bedeutung der in-vitro Adhäsionsergebnisse und ihre Relevanz für die Verhältnisse in-vivo betont.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Vergleich der verschiedenen Mykobakterien in der Immuntherapie des Urothelkarzinoms (MB49) im Mausmodell durchgeführt. Auch hier zeigte der Stamm von *M. kansasii* eine größere immuntherapeutische Potenz als BCG-Pasteur, wodurch wiederum die Bedeutung der Adhäsion als initialer Schritt der Immuntherapie bestätigt werden konnte. Eine Immuntherapie mit *M. kansasii* wird klinisch zur Zeit jedoch nicht durchgeführt, da die Infektiosität und Pathogenität dieses Bakteriums zu hoch ist und eine Immuntherapie aus infektiologischer Sicht zu riskant erscheint. Zudem konnte das immunstimulatorische Potential von *M. kansasii* in nur wenigen Studien nachgewiesen werden.

Morales et al. konnten jedoch im Jahr 2001 in einer ersten klinischen Studie nachweisen, dass Zellwandbestandteile von *M. phlei* zu einer der Immuntherapie mit BCG vergleichbaren Reduktion der Rezidivrate des oberflächlichen Urothelkarzinoms führen.

Zusätzlich wurde in der oben genannten Studie von Ratliff et al. der Einfluss verschiedener Präparationsverfahren wie Lyophilisierung und Gefriertrocknung auf die immuntherapeutisch relevanten Parameter untersucht. Die Autoren vermuten, dass das Verklumpen der Mykobakterien die Adhäsion an FN und an Urothel negativ beeinflusst.

Diese Ergebnisse konnte ich nicht bestätigen. Obwohl auch in der vorliegenden Arbeit zuvor kultivierte Bakterien verwendet wurden, um die durch die Präparation verursachten

Einflussfaktoren auszuschließen, zeigten sich in meinen Untersuchungen Unterschiede zwischen den verschiedenen BCG-Stämmen.

*M. kansasii* bewies in der vorliegenden Arbeit lediglich ein geringes Adhäsionsvermögen und in dem unabhängig von der Adhäsion durchgeführten Zytotoxizitätsassay nur eine geringe immunstimulatorische Potenz. Möglicherweise ist dies auf den Stamm von *M. kansasii* zurückzuführen. Allerdings zeigten alle atypischen Mykobakterien ein schlechteres Adhäsionsvermögen als die verwendeten BCG-Stämme, so dass von einem grundlegenden Unterschied zwischen den atypischen Mykobakterien und Bacillus Calmette-Guérin ausgegangen werden kann.

Im Gegensatz dazu steht *E. coli*, das ein erwartet gutes Adhäsionsverhalten an Tumorzellen epithelialen Ursprungs zeigte, jedoch keine immunstimulatorische Eigenschaften im Zytotoxizitätsassay besaß.

#### 4.3.2. Vergleich verschiedener immunstimulatorischer Studien

Ebensowenig wie das Adhäsionsverhalten ist bisher das immunstimulatorische Potential der verschiedenen BCG-Stämme bezüglich der Induktion von zellvermittelter Zytotoxizität untersucht worden.

Verschiedene Studien hatten sich mit dem Einfluss der unterschiedlichen BCG-Stämme auf die Lymphozytenproliferation und die Lymphknotengröße beschäftigt. Diese Studien sind jedoch mit dieser Arbeit nicht zu vergleichen. Ratliff hatte wie oben beschrieben verschiedene BCG-Stämme im Mausmodell untersucht und keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Lagranderie vom Pasteur-Institut hatte bereits 1996 die Immunantwort von Mäusen nach Stimulation mit verschiedenen BCG-Stämmen erforscht. Hier hatten sich Unterschiede zwischen BCG-GLAXO, -Japan, -Prag, -Pasteur und dem russischen BCG-Stamm gezeigt. BCG-Prag und -Japan hatten schlechtere Ergebnisse in der T-Zell-Stimulation hinsichtlich der T-Zell-Proliferation, der Zytokinproduktion, der Immunantwort vom verzögerten Typ (DTH) und der zytotoxischen Aktivität gezeigt. Mäuse, die mit diesen beiden BCG-Stämmen immunisiert worden waren, konnten nach Infektion mit rekombinanten BCG-Pasteur und -Japan diese Mykobakterien nicht eliminieren. Der Autor folgert daraus, dass BCG-Japan und -Prag auch eine Infektion mit *M. tuberculosis* nicht verhindert hätten. In dieser Studie war erstmals der Nachweis für eine unzureichende Immunisierung und Immunstimulation aufgrund von immunologischen Unterschieden zwischen den BCG-Stämmen erbracht worden.

Dieser Sachverhalt betont die Bedeutung der vorliegenden Arbeit. Vor allem die steigende Zahl der in der Therapie eingesetzten BCG-Stämme und nachgewiesene genetische Unterschiede zwischen den Stämmen, die durch die Deletion verschiedener Gene verursacht wurde, zeigt die Notwendigkeit von vergleichenden Untersuchungen und weiteren in-vitro Studien, um die immuntherapeutische Potenz und Sicherheit der BCG-Stämme nachzuweisen. Dazu liefert die vorliegende Arbeit einen ersten Beitrag.

#### **4.4. Relevanz der vorliegenden Ergebnisse für die Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG)**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten BCG-Stämme sowohl ein gutes Adhäsionsvermögen als auch eine effektive immunstimulatorische Potenz besitzen. Diese Ergebnisse stimmen mit den in Tabelle 4.1 aufgeführten Daten der klinischen Studien überein, die gezeigt haben, dass alle verwendeten Stämme zu einer deutlichen Reduktion der Rezidivrate des oberflächlichen Urothelkarzinoms führen.

Die vorliegende Studie hat zwar keine qualitativen, jedoch quantitative Unterschiede zwischen den Stämmen zeigen können. Bereits seit Beginn der Immuntherapie des oberflächlichen Blasenkarzinoms mit Bacillus Calmette-Guérin war vermutet worden, dass neben der Viabilität der Mykobakterien und dem verwendeten Therapieschema auch der BCG-Stamm den Therapieerfolg der Immuntherapie beeinflusst .

Allerdings existierten bislang nur wenige klinische oder in-vitro Studien, die Unterschiede zwischen den BCG-Stämmen nachweisen konnten. Ratliff et al. vertraten die Meinung, dass die Wahl des BCG-Stammes den Therapieerfolg nicht beeinflusst, so dass auch BCG aus Ländern der 3. Welt sicher und effektiv ist .

Daher stellt sich nun die Frage, inwieweit die in-vitro gefundenen Unterschiede Relevanz für einen Therapieerfolg besitzen. Ratliff et al. hatten - wie oben beschrieben - nachweisen können, dass Unterschiede in der Adhäsion der Mykobakterien, die den initialen Schritt der Immuntherapie darstellt, auch den Erfolg einer Immuntherapie beeinflussen . Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit könnte sich daher die schlechtere Adhäsion von BCG-Connaught, -Copenhagen und -Moreau auch negativ auf den Therapieerfolg auswirken.

Allerdings ist davon auszugehen, dass die BCG-Immuntherapie zum jetzigen Zeitpunkt im Überdosisbereich ausgeführt wird. So kann eine geringere Affinität der Mykobakterien zu den potentiellen Bindungsstellen an den Blasen tumorzellen durch eine Erhöhung der Konzentration der Mykobakterien ausgeglichen werden. Daher sollte eine für einen Therapieerfolg ausreichende Adhäsion der Mykobakterien an der Mukosa bzw. den verbliebenen Tumorzellen erreicht werden. Die nachgewiesenen Unterschiede erlangen also bei den Standardprotokollen unter Beibehaltung der zur Zeit eingesetzten Bakteriendosis höchstwahrscheinlich keine Relevanz.

Es wird jedoch vermutet, dass die Schwere der Nebenwirkungen der BCG-Immuntherapie auch von der zur Therapie eingesetzten Bakterienkonzentration beeinflusst wird. In low-dose Protokollen wird daher versucht, durch Reduktion der BCG-Konzentration auch die Nebenwirkungsrate und die Schwere der Nebenwirkungen zu reduzieren. Die Reduzierung der verwendeten Keimzahl könnte bewirken, dass Stämme mit einer geringeren Affinität zu den Tumorzellen und daraus resultierender geringerer Adhäsion und Phagozytose eine nicht mehr ausreichende Adhäsion an den Blasentumorzellen zeigen. Eine geringere Adhäsion der Mykobakterien könnte dann zu einer ineffektiveren Immunantwort führen, die wiederum negativen Einfluss auf die Rezidivrate haben würde.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieselben BCG-Stämme, die eine geringere Adhäsionsfähigkeit besitzen, auch eine geringere immunstimulatorische Potenz aufweisen. Dabei wurden Adhäsion und immunstimulatorische Potenz der Mykobakterien unabhängig voneinander bestimmt.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität der BAK-Zellen von der zur Stimulation verwendeten Dosis an Mykobakterien abhängig ist. Dies würde bedeuten, dass BCG-Stämme, die schlecht an Blasentumorzellen adhären, - bedingt durch die niedrigere Bakterienkonzentration in der Blasenmukosa - auch zu einer verminderten Stimulation der immunkompetenten Zellen führen.

Da BCG-Connaught, -Copenhagen und -Moreau zusätzlich ein niedrigeres immunstimulatorisches Potential besitzen, könnte sich der Effekt der schlechteren Adhäsion mit dem Effekt der uneffektiveren Immunstimulation potenzieren bzw. zumindest negativ beeinflussen.

Daher ist ein Vergleich der verschiedenen BCG-Stämme im Mausmodell anzustreben, um den Effekt der schlechteren Adhäsion und der geringeren Immunstimulation einiger BCG-Stämme in-vivo zu überprüfen. Eine weitere interessante Frage wäre weiterhin, inwieweit sich diese Faktoren in-vivo beeinflussen und welchen Effekt die BCG-Dosis in Abhängigkeit vom BCG-Stamm auf die Immuntherapie hat.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine um den Faktor 100 geringere Konzentration von BCG-Tice eine höhere Zytotoxizität induziert als die Standardkonzentration von BCG-Connaught. Auch diese Ergebnisse könnten durch die Verminderung der Bakterienkonzentration in low-dose Protokollen relevant werden. Der

in-vitro Vergleich der Dosis-/Wirkungskurve hat hier erste Ergebnisse geliefert und muss auf weitere Stämme ausgedehnt werden. Als nächster Schritt sollte untersucht werden, inwieweit sich diese Daten in-vivo im Mausmodell bestätigen lassen.

In einem weiteren Versuch konnte ermittelt werden, dass so genannte „non-responder“ auf keinen der verwendeten BCG-Stämme mit der gewohnt hohen Zytotoxizität der MNZ reagieren. Für die Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms könnte man daher den Schluss ziehen, dass bei einem Therapieversagen eines BCG-Stammes der Wechsel zu einem anderem BCG-Stamm wenig sinnvoll erscheint. Jedoch bedarf die Frage, inwieweit ein Ansprechen der Patienten auf eine BCG-Immuntherapie durch in-vitro Versuche vorausgesagt werden kann und ob „non-responder“ unter in-vitro Bedingungen auch tatsächlich eine höhere Rezidivrate aufweisen, weiterer Untersuchungen.

Der genaue Wirkmechanismus der BCG-Immuntherapie ist bislang nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte sich nicht zur Aufgabe gestellt, die Aufklärung des Wirkmechanismus dieser Immuntherapie weiter voranzutreiben. Es konnte aber gezeigt werden, dass alle BCG-Stämme zu einer effektiven Stimulation von immunkompetenten Zellen führen, während die atypischen Mykobakterien einen eher zu vernachlässigenden Effekt zeigen. Hierin könnte ein für *Bacillus Calmette-Guérin* spezifischer Effekt liegen!

Im Gegensatz dazu konnte Ratliff gute immuntherapeutische Ergebnisse im Mausmodell mit *M. kansasii* erzielen, und Kreider konnte die immuntherapeutische Potenz von *C. parvum* in der Ratte nachweisen . Eine genauere Untersuchung der immunologisch relevanten Parameter der verschiedenen Bakterien könnte einen Beitrag zu der Antwort auf die Frage leisten, welche Faktoren zu einer Stimulation der immunkompetenten Zellen führen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint *Bacillus Calmette-Guérin* diese Faktoren zu besitzen, während die atypische Mykobakterien und *E. coli* diese Faktoren nicht oder in geringerer Ausprägung exprimieren.

Zhang hatte 1995 keine genetischen Unterschiede bezüglich verschiedener DNA-Fragmente zwischen BCG-Connaught und -Tice nachweisen können . Neuere genetische Untersuchungen der BCG-DNA durch Behr et al. haben hingegen die Deletion verschiedener Gene seit der Attenuierung von *Bacillus Calmette-Guérin* nachgewiesen . Alle bisher existierenden BCG-Stämme sind auf den Ursprungstamm von Calmette und Guérin zurückzuführen. Durch fortlaufende Kultivierung an verschiedenen Orten und unter unterschiedlichen Kulturbedingungen hat sich dann eine Vielzahl an Tochterstämmen

entwickelt, die sich durch die Deletion verschiedener Gene voneinander unterscheiden. Die Autoren sehen in der Anpassung der Mykobakterien an die Kulturbedingungen die Ursache für eine Schwächung des immunstimulatorischen Potentials.

Zudem gehen die Autoren davon aus, dass auch in Zukunft - bedingt durch die fortschreitende Evolution und die Selektion unter den in-vitro Kulturbedingungen - genetische Veränderungen in der BCG-DNA und eine Abschwächung der Virulenz der Mykobakterien zu erwarten sind. Daher ist es nicht zuletzt aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dringend erforderlich, die BCG-Stämme hinsichtlich der für die Immuntherapie relevanten Parameter unter standardisierten Bedingungen zu überwachen.

Ob eine Standardisierung der Kulturbedingungen und der Präparationen eine weitere genetische Veränderung und unter Umständen eine immunologische Schwächung der BCG-Stämme beeinflussen könnte und ob gezielte genetische Veränderungen die Effektivität der Immuntherapie eventuell sogar steigern können, werden weitere Studien zeigen müssen.

Die vorliegende Arbeit konnte den Nachweis erbringen, dass quantitative Unterschiede zwischen den untersuchten BCG-Stämmen bezüglich der Adhäsion an epitheliale Tumorzellen und der Immunstimulation existieren. Als Ursache für diese Unterschiede kommen genetische Veränderungen in Betracht, wie sie durch andere Autoren nachgewiesen werden konnten. Da sich die BCG-DNA auch in Zukunft verändern wird und somit parallele Veränderungen der immunologisch relevanten Parameter nicht auszuschließen sind, sollten die für die BCG-Immuntherapie relevanten Parameter unter standardisierten Bedingungen in reproduzierbaren Assays engmaschig kontrolliert werden. Bezüglich der zu standardisierenden Parameter und der zu verwendenden in-vitro Assays kann die vorliegende Arbeit erste Anhaltspunkte geben.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Immuntherapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms mit verschiedenen Stämmen von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) hat sich in der Vergangenheit als effektive Therapie erwiesen, die hinsichtlich Rezidivrate und Tumorprogress einer Instillationstherapie mit allen bisher verwendeten Chemotherapeutika überlegen ist. Allerdings wurde in der Literatur immer wieder die Frage diskutiert, ob auch die Auswahl eines BCG-Stammes den Erfolg der Immuntherapie beeinflussen könnte, zumal neuere Studien genetische Unterschiede zwischen den einzelnen BCG-Stämmen nachweisen konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals 6 verschiedene BCG-Stämme sowie 6 verschiedene atypische mykobakterielle Stämme und *E. coli* unter standardisierten Kultur- und Versuchsbedingungen hinsichtlich zweier für die Immuntherapie des Urothelkarzinoms entscheidender Parameter untersucht.

Im Vergleich der Adhäsionsfähigkeit an epithelialen Tumorzelllinien zeigt sich, dass alle verwendeten BCG-Stämme und *E. coli* gut an den Tumorzellen adhäreren, die atypischen Mykobakterien jedoch ein deutlich geringeres Adhäsionsvermögen aufweisen.

Während alle BCG-Stämme zu einer effektiven Stimulation der mononukleären Zellen (MNZ) im Zytotoxizitätsassay führen, bewirkt die Stimulation dieser Zellen mit den atypischen Mykobakterien und *E. coli* keine nennenswerte Steigerung der Zytotoxizität gegen epitheliale Tumorzelllinien.

Es existieren jedoch quantitative Unterschiede zwischen den BCG-Stämmen hinsichtlich der Adhäsion an Tumorzellen und der Induktion von BAK-Zellen und der damit verbundenen Zytotoxizität gegen die Tumorzellen. BCG- Pasteur, -RIVM und -Tice zeigten hier eindeutig bessere Ergebnisse als BCG-Connaught, -Copenhagen und -Moreau.

Eine um den Faktor 100 geringere Dosis von BCG-Tice induzierte sogar eine höhere BAK-Zell-Zytotoxizität als die Standarddosis von BCG-Connaught.

In früheren Studien hatte sich gezeigt, dass die mononukleären Zellen (MNZ) verschiedener Spender nach Stimulation mit BCG nicht das erwartete zytotoxische Potential erreichten. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass bei diesen

Spendern keiner der verwendeten Stämme zu einer deutlichen Steigerung des zytotoxischen Potentials führte.

Inwieweit diese unter in-vitro Bedingungen gewonnenen Ergebnisse für die Situation in-vivo relevant sind, müssen weitere Untersuchungen klären.

Allerdings führen der Nachweis von immunologisch relevanten Unterschieden zwischen den BCG-Stämmen einerseits und bereits vorhandene und weiterhin fortschreitende genetische Veränderungen andererseits zu der Forderung, die immuntherapeutisch bzw. genetisch relevanten Faktoren engmaschig unter standardisierten Bedingungen zu kontrollieren.

## **6. LITERATUR**

## 7. ANHANG

### 7.1. Extinktionsgeraden der atypischen Mykobakterien und *E. coli*

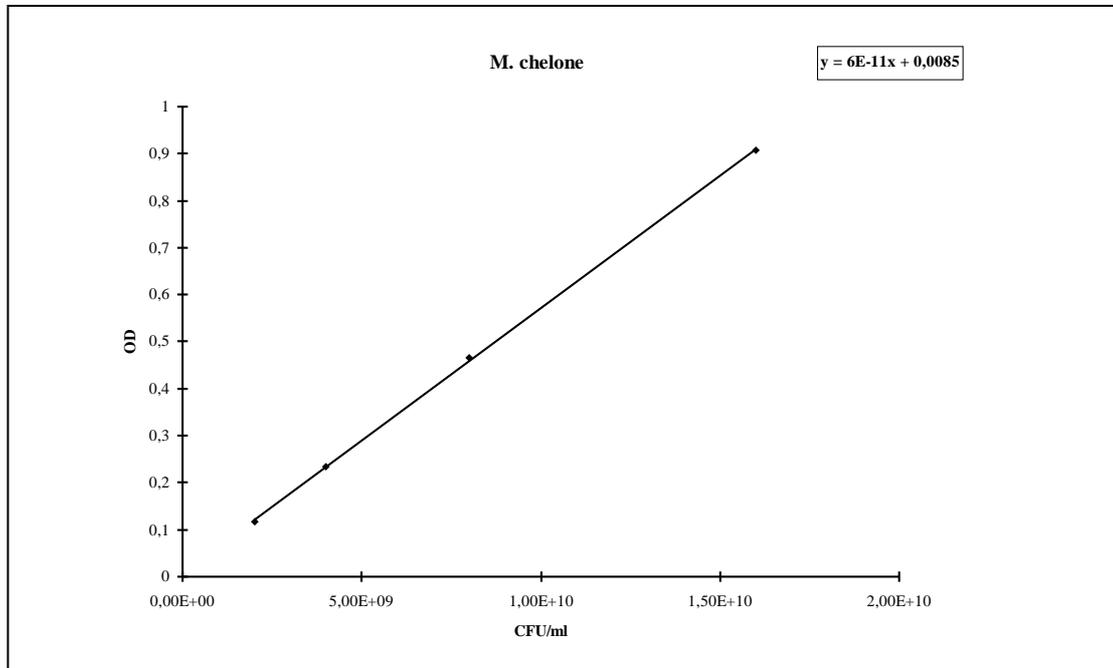


Abb. 7.1 : Extinktionsgerade für *M. chelonae*.

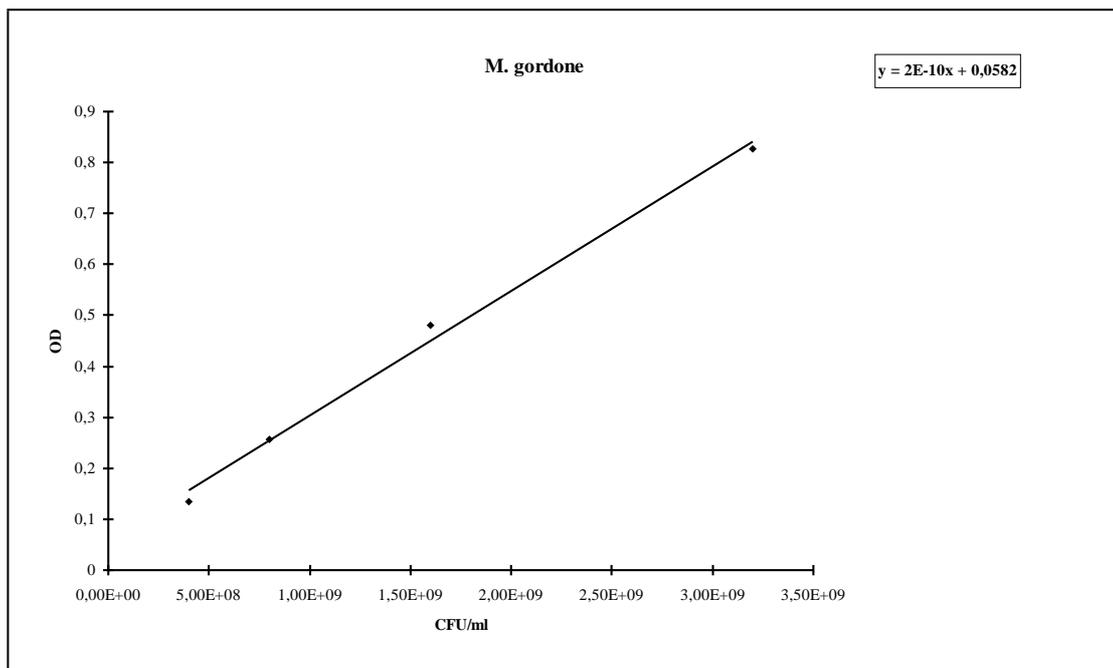
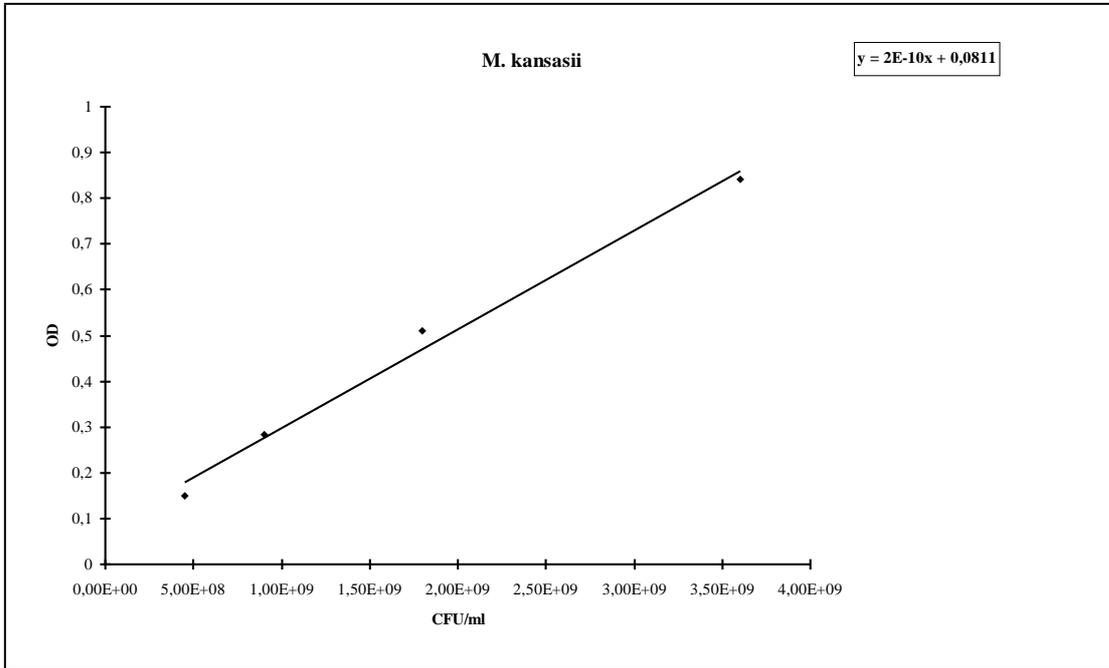
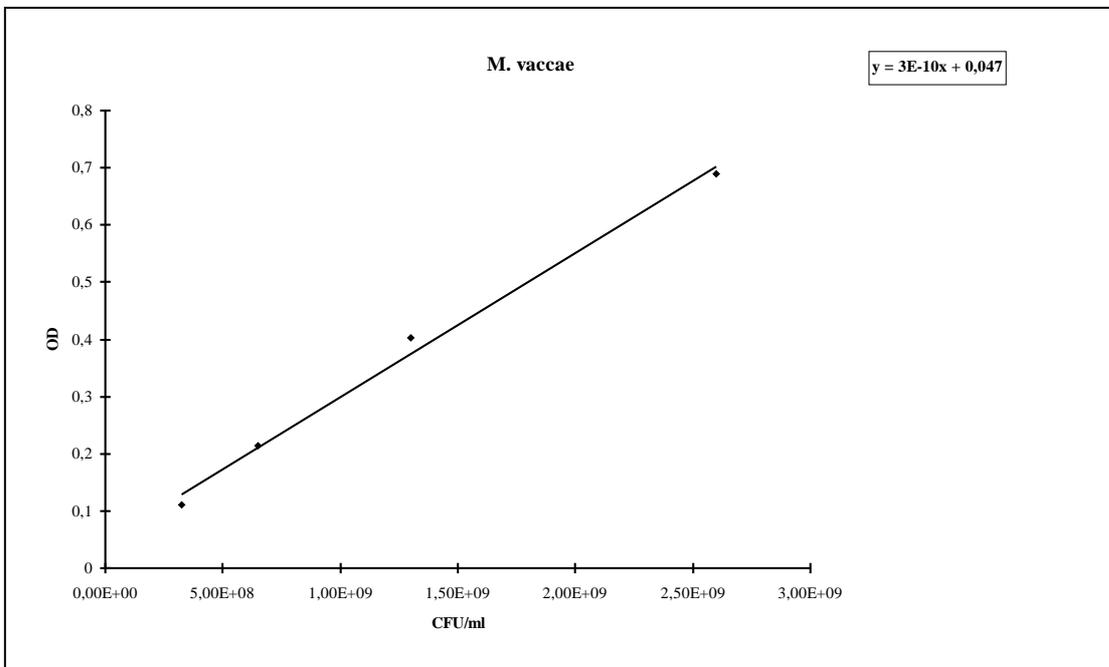


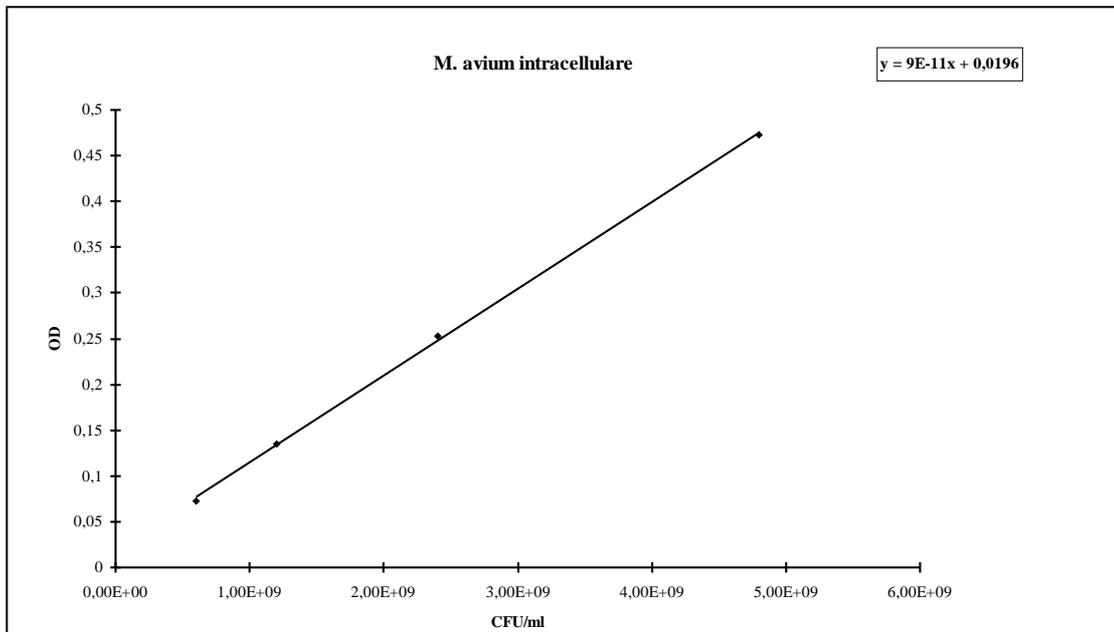
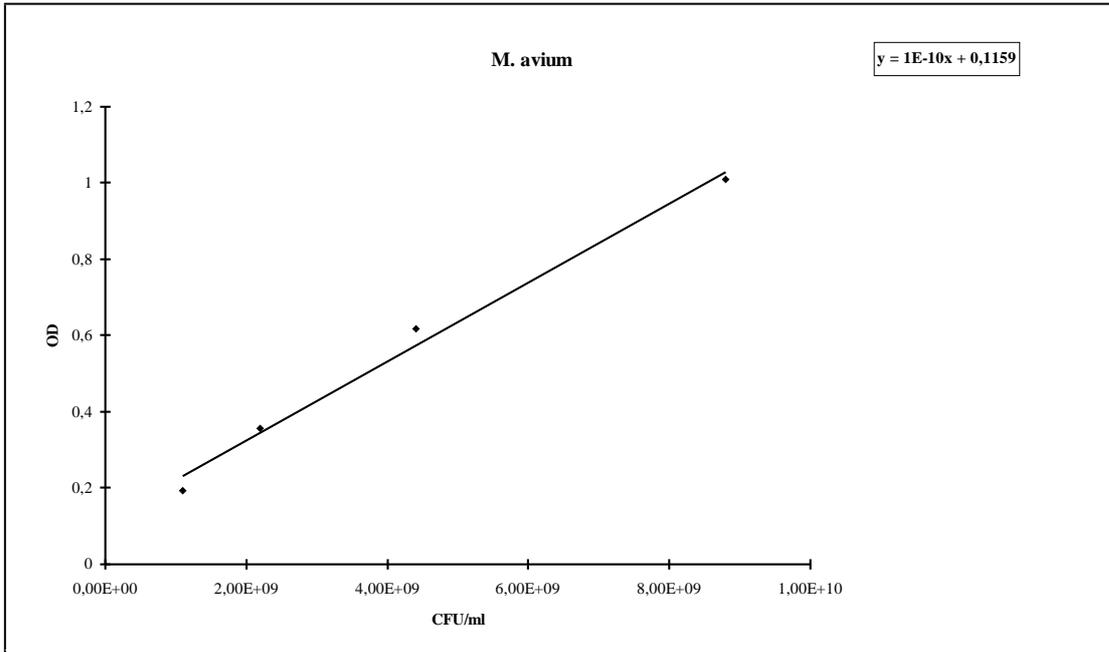
Abb. 7.2 : Extinktionsgerade für *M. gordonae*.



**Abb. 7.3 :** Extinktionsgerade für *M. kansasii*.



**Abb. 7.4 :** Extinktionsgerade für *M. vaccae*.



**Abb. 7.5 :** Extinktionsgerade für *M. avium*.

**Abb. 7.6** : Extinktionsgerade für *M. avium intracellulare*.

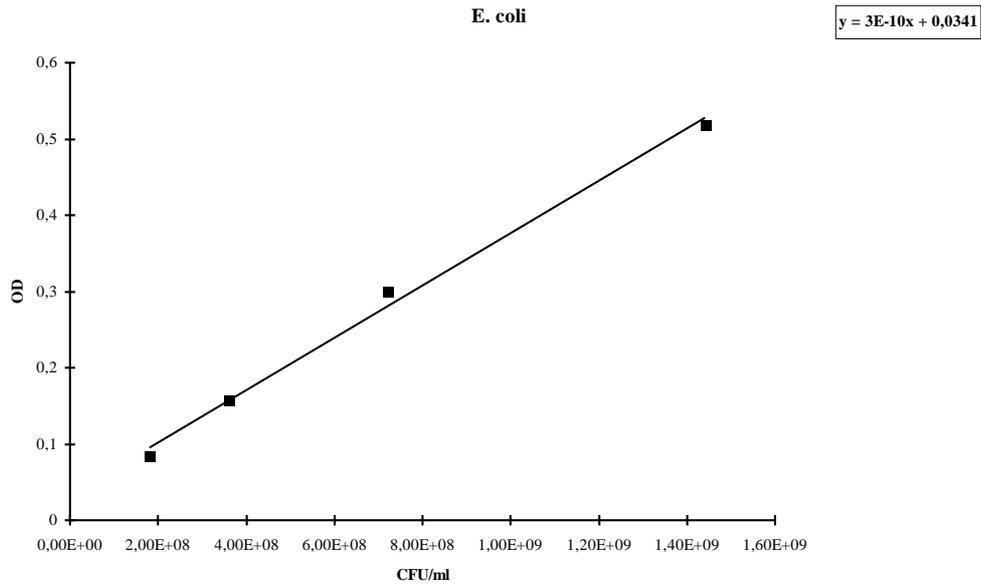


Abb. 7.7 : Extinktionsgerade für *E. coli*.

1.	<i>M. chelonae</i>	:	$\text{konz} = \text{OD} \times 1,67 \times 10^{10} - 1,42 \times 10^8$
2.	<i>M. abscessus</i>	:	$\text{konz} = \text{OD} \times 5,00 \times 10^9 - 2,01 \times 10^8$
3.	<i>M. fortuitum</i>	:	$\text{konz} = \text{OD} \times 5,00 \times 10^9 - 4,05 \times 10^8$
4.	<i>M. goodii</i>	:	$\text{konz} = \text{OD} \times 2,22 \times 10^9 - 1,57 \times 10^8$
5.	<i>M. neoaurum</i>	:	$\text{konz} = \text{OD} \times 1,00 \times 10^{10} - 1,16 \times 10^9$
6.	<i>M. neoaurum</i> (ATCC 49619)	:	$\text{konz} = \text{OD} \times 1,11 \times 10^{10} - 2,18 \times 10^8$
7.	<i>E. coli</i>	:	$\text{konz} = \text{OD} \times 2,22 \times 10^9 - 1,14 \times 10^8$
			$\text{konz} = \text{OD} \times 1,67 \times 10^{10} - 1,42 \times 10^8$
			$\text{konz} = \text{OD} \times 1,67 \times 10^{10} - 1,42 \times 10^8$

## 7.2. Berechnung der Bakterienkonzentration über die gemessene Extinktion

Tab. 7.1. Berechnung der Bakterienkonzentration

### 7.3. Literaturübersicht über die verwendeten BCG-Stämme

#### 7.3.1. BCG in der Immuntherapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms

Autor	Stamm	Konzentration	Therapieschema	Tumorstadium	n = Patienten	Erfolgsrate	Literatur
Lamm (1995)	Connaught		zusätzlich 3 Instillationen nach 3 Monaten	CIS, Ta, T1		CR = 87%, 83%, ÜR = 92%	
Mack, Frick (1995)	Connaught	Low dose, 27 mg, 3x10 <sup>8</sup> cfu	6x wöchentlich, 1x/Monat für 1 Jahr, Erhaltungstherapie	Hochrisikopatienten	25	CR = 84%	
Kalbe (1994)	Connaught	120 mg	monatlich für 1 Jahr		32	CR = 84%	
Bach, Russel (1992)	Connaught / Pasteur			pTis, pTa, pT1	26 / 78	CIS : CR = 92%, (88%/78%)	
Baretto (1992)	Connaught					CR = 74%	
Lamm (1992)	Connaught	120 mg	6x wöchentlich, 3x wöchentlich nach 12 Wochen			CR = 82%	
Romics, Christoph (1990)	Connaught / Pasteur	120/150 mg	6x wöchentlich	pTis, pTa, pT1 G1-2	26 / 13	CR = 74% / 85%	
Ovesen, Steven (1993)	Copenhagen		6x wöchentlich, 6x alle 14 Tage zusätzlich bei Rezidiv	CIS	42	CR = 68 %	
Ilari (1991)	Moreau		BCG intravesikal / oral	pTa, pT1	84	CR: 81%/60,7%	
Mack, Frick (1995)	Pasteur	75 mg low dose	6 x wöchentlich, monatlich für 1 Jahr, vierteljährlich im 2. Jahr	pT1, pTis	81	CR : 80%	
Pagano, Milani (1995)	Pasteur	75 mg low dose, 150 mg Standard		pT1, pTis, pTa	183	pTa: 70%/62%, pT1+pTis: 82%, 64%	
Merz, Studer (1995)	Pasteur	120 mg	6 x wöchentlich	pTis (primär/sekundär)	115	CR : 88%/78%	
Mack, Frick (1994)	Pasteur / Connaught						
Fellows, Wallace (1994)	Evans / Pasteur		6 x wöchentlich	pTa, pT1 Markertumor nicht reseziert	99	keine Unterschiede in Effektivität und NW	
Melekos, Dauaher (1993)	Pasteur		6 x wöchentlich, 1x nach 3 Monaten; zusätzlicher 4- Wochen-Kurs	pTa, pT1		CR : 68% (41% ohne BCG)	
Bach, Russel (1992)	Pasteur / Connaught			pTis, pTa, pT1	78/26	CR : 88,5%/73%, 92% bei CIS	
Mukherjee, Smith (1992)	Pasteur / Glaxo					keine Unterschiede, CR nach 5 J. 43%	
Eure, Schellhammer (1992)	Pasteur		6 x wöchentlich, (Wdh.)	pT1	30	CR : 66 %	
Rintala, Vaalasti (1991)	Pasteur / Mitomycin C			pTa-pT1	91	CR : 40%/58%	

Pagano, Garbeglio (1991)	Pasteur	75 mg low dose	6 x wöchentlich, 2. Kurs bei Rezidiv; 12 x monatlich, vierteljährlich für 1 J.	pTis, pTa, pT1	126	NW reduziert, CR : 57-74%	
Melekos, Barbalias (1990)	Pasteur		6 x wöchentlich, dann vierteljährlich; 2. Kurs bei Rezidiv				
Romics, Christoph (1990)	Pasteur, Connaught	150 mg / 120 mg	6 x wöchentlich	pTa-pT1	13/26	CR : 85%/74%	
Kaisary (1987)	Pasteur, Tice, Glaxo				21	alle effektiv	
Lamm (1981)	Pasteur	120 mg intravesikal, 5 mg intrakutan	6 x wöchentlich			CR : 78%	
van-der Meijden (1988)	RIVM / Mitomycin C	1x10 <sup>9</sup> cfu	6 x wöchentlich		308	Rezidivrate 29.8% BCG / 25% Mitomycin C	
Witjes, van-der-Meijden (1995)	RIVM / Tice / Mitomycin C	5x10 <sup>8</sup> cfu (BCG) / 30 mg	6 x wöchentlich (BCG)	pTis, pTa, pT1	437	Mitomycin C genauso effektiv wie RIVM aber effektiver als Tice	
DeJager, Lamm, Reitsma (1991)	Tice	1-8x10 <sup>8</sup> cfu = 50 mg	6 x wöchentlich, 12x monatlich	CIS	119	CR : 76%	
Khanna, Uhlmann (1991)	Tice / Adriamycin			pTa, pTis, pT1	158	CR : 68% / 57%, BCG insgesamt 85%	
Lamm (1991)	Tice	50 mg	6 x wöchentlich, dann 3x alle 2 Wochen, dann halbjährlich; zusätzlich percutan		66	Rezidivrate : 43%/42%	
Lamm (1990)	Tice	200 mg oral 3x pro Woche / 50 mg intravesikal u. intrakutan	6 x wöchentlich, dann 3x alle 2 Wochen, dann halbjährlich; zusätzlich percutan		88	Rezidivrate : 64% oral / 33% intravesikal	
Khanna, Uhlmann (1988)	Tice / Adriamycin				135	CR : 76% BCG / 52% ADR	
Khanna, Friedmann (1987)	Tice / Adriamycin				116	BCG niedrigere Rezidivrate	

**Tab. 7.2** Vergleich der verwendeten BCG-Stämme in unterschiedlichen klinischen Studien

## 6.2.2. Verschiedene in-vivo und in-vitro Untersuchungen

Autor	Stamm	Modell	Unterschiede	Literatur
De-Boer, Schamhart (1994)	Connaught / RIVM / Pasteur	Meerschweinchen, Bindung durch Pentosan Polyphosphat verbessert	keine	
Ratliff, Hanna (1994)	Connaught / Pasteur / RIVM / Tice	Aggregation der Bakterien nach Resuspendierung, negativer Effekt auf Therapieerfolg	keine	
Sparkes, Baretto (1992)	Connaught	Standardisierung der Produktion, cfu Wirksamkeitstestung		
Rajala, Lahde (1992)	Connaught, Pasteur, RIVM, Tice, Evans	Blasenkarzinomzelllinie T-24, direkter zytotoxischer Effekt der Bakterien, Erhöhung durch IFN, Mitomycin C	geringe Unterschiede zwischen den Stämmen	
Ratliff (1990)	Connaught / Tice / Amand Frappier / <i>M. kansasii</i>	Bindung an Fibronectin (FN), Mausmodell MB49	BCG Stämme kein Unterschied, <i>M. kansasii</i> bindet besser und ist effektiver in der Therapie im Mausmodell	
Ratliff (1988)	Connaught / Pasteur / Tice / Glaxo	Bindung an Fibronectin (FN)	Glaxo bindet schlechter und hat geringere Antitumor-Aktivität	
Kreider, Bartlett (1980)	Connaught / Pasteur / RIVM / Tice / Glaxo / Phipps	Ratte, Mammakarzinom (Adenokarzinom), unterschiedliche BCG-Präparationen, <i>C. parvum</i> , Bakterien direkt intratumoral	<i>C. parvum</i> deutlich überlegen, BCG keine Unterschiede, Glaxo nicht effektiv	
Willmott, Baldwin (1979)	Connaught / Pasteur / Tice / Glaxo	Ratte, Sarkom, direkt intratumoral, unterschiedliche Präparationen	Connaught deutlich besser als Glaxo, Pasteur besser als Glaxo, keine Unterschiede zwischen Tice und Glaxo	
Lefford (1978)	Connaught / Pasteur / Tice / Glaxo / Phipps / Birkhaug	Bakterien direkt in die Lunge appliziert	keine	
Lagrange (1977)	Connaught / Pasteur / Tice / Glaxo / PHIPPS	BCG-Vakzine, T-Zell abhängige Immunantwort, gleiche Wachstumsbedingungen der Bakterien	Pasteur besser als die anderen Stämme, Glaxo am schlechtesten	
Landi, Held (1977)	Connaught / Copenhagen / Pasteur / Japan	alle gefrieretrocknet, Anzahl lebender Bakterien und verbliebende Virulenz in Goldhamster	Pasteur und Copenhagen am besten, Japan am schlechtesten	
Hanna, Guttermann (1976)	gefrorene Pasteur / Tice / Phipps; lyophilisiert Connaught / Pasteur / Tice	Meerschweinchen, Leberzellkarzinom	frisch gefrorene Pasteur und Phipps etwas besser	
O'Connell, Schutt (1981)	Pasteur (gefroren / lyophilisiert) / Tice	Mensch, Mammakarzinom	kein Therapieerfolg, keine Unterschiede	
Baker, Taub (1978)	Pasteur / Tice / Glaxo	Lymphozyten-Assay	Pasteur am besten	
Witjes, van-der-Meijden (1993)	Tice / RIVM	Wirkung von Antikoagulantien auf FN-BCG-Bindung	keine	
Bartlett, Kreider (1980)	Tice, 8 verschieden Stämme bzw. Präparationen	Meerschweinchen, Leberzellkarzinom	lyophilisierte BCG-Tice am besten	

**Tab. 7.3** Vergleich der verwendeten BCG-Stämme unter in-vivo und in-vitro Bedingungen

## **8. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Namentlich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Flad danken, der es mir ermöglichte, diese Dissertation in seinem Bereich am Forschungszentrum Borstel anfertigen zu dürfen.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. J. Ulmer für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes, seine Einführung in wissenschaftliche Arbeitstechniken, sein kritisches Interesse und seine Motivation bei der Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe einschließlich der medizinisch-technischen Assistentinnen, die mich bei der Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützt haben.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Rüsç-Gerdes für die Bereitstellung der atypischen Mykobakterien und die Unterstützung bei der Kultur der BCG-Stämme und der atypischen Mykobakterien. Mein besonderer Dank gilt hier der medizinisch-technischen Assistentin, Frau Birte Schlüter, die mich bei der Kultur der Mykobakterien und bei der Keimzahlbestimmung entscheidend unterstützt hat.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten danke ich Frau Dipl. Stat. Gerlinde Dahmen aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik des UKL (Dir.: Prof. Dr. rer. nat. A. Ziegler).

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. Christoph Durek danken, der mich bereits während des experimentellen Teils dieser Dissertation in Borstel tatkräftig unterstützte und entscheidenden Anteil bei der Fertigstellung und Korrektur dieser Arbeit hat.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. D. Jocham, an dessen Klinik ich diese Dissertation anfertigen durfte und der mich während meiner Arbeit durch konstruktive Kritik unterstützte.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Böhle bedanken, der erst mein Interesse für die BCG-Immuntherapie weckte und mich sowohl während des experimentellen Teils als auch bei der Fertigstellung dieser Arbeit stets auf freundschaftliche Art unterstützte und mir bei Fragen und Problemen jederzeit mit motivierendem Rat und fundierter Kritik zur Verfügung stand.

## 9. LEBENS LAUF

Geburtsdatum : 22.02.1970  
Geburtsort : Lübeck  
Staatsangehörigkeit : deutsch  
Eltern : Volker Braasch, 1993 verstorben, Pastor  
Annemarie Braasch, Lehrerin

### Ausbildung

Schulbildung : 1976 - 1980 Grundschulbesuch in Lübeck  
1980 - 1989 Carl-Jacob-Burckhardt-Gymnasium in Lübeck  
Mai 1989 Allgemeine Hochschulreife

**Wehrdienst** : Juni 1989 - August 1990

**Studium** : Oktober 1990 Beginn des Studiums an der MUzL  
August 1992 Ärztliche Vorprüfung an der MUzL  
März 1994 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an d.  
MUzL  
März 1998 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an d.  
MUzL  
Mai 1999 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an d.  
MUzL

**Promotion** : November 1994 Experimenteller Teil der Doktorarbeit am  
Forschungszentrum in Borstel  
(Leiter : Prof. Dr. med. H.-D. Flad)  
Unterbrechung des Studiums für 1 Jahr  
Oktober 1995 Ende des experimentellen Teils

**Arzt im Praktikum** : Juli 1999 Klinik für Chirurgie des UKL  
(Dir.: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch)

**Assistenzarzt** : Januar 2001 Klinik für Chirurgie des UKL  
(Dir.: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch)