

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Mechanismen untersucht, wie Tumorzellen die Immunantwort unterdrücken können und welche Möglichkeiten bestehen, die Immunogenität von Tumorzellen zu steigern.

Die Wechselwirkung des Rezeptors CD40 auf Dendritischen Zellen mit seinem Liganden (CD40L) auf naiven T-Zellen ist essentiell für die Sekretion des  $T_H1$ -polarisierenden Faktors IL-12 und der Einleitung einer zytotoxischen, zellulären Immunantwort.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Tumorzelllinien die CD40L-abhängige IL-12 Sekretion von Dendritischen Zellen supprimieren. Hierzu wurden Monozyten *in vitro* mit IL-4 und GM-CSF zu Dendritischen Zellen differenziert und mit Lipopolysaccharid zur Reifung gebracht. Ko-Kultur-Experimente zeigten, dass die Suppression nicht durch einen löslichen Faktor der Tumorzellen, sondern durch ein Oberflächenmolekül ausgelöst wurde. In der Arbeitsgruppe war zuvor beschrieben worden, dass der Rezeptor CD40 sowohl auf vielen epithelialen als auch hämatopoetischen Tumoren hoch-reguliert ist. Mit Hilfe stabiler Transfektanten konnte hier gezeigt werden, dass eine Expression des Rezeptors CD40 auf Tumorzellen mit Dendritischen Zellen um das immunstimulatorische CD40L-Signal kompetieren kann. Damit kann die CD40 Expression auf Tumorzellen selbst als immunsuppressiver Mechanismus angesehen werden.

Zur Verstärkung der Immunogenität von Tumorzellen wurde das synthetische dsRNA-Analogon PolyIC eingesetzt. So führte die Stimulation von Dendritischen Zellen mit Überständen PolyIC-stimulierter C-4 I Zervixkarzinomzellen zu einer deutlich stärkeren IL-12 Sekretion als die direkte PolyIC Stimulation. Durch morphologische Untersuchungen, Zelltod-Analysen, sowie Aktivierung von Caspase-3 und Freisetzung von Lactatdehydrogenase konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von C-4 I Zellen mit PolyIC zur Induktion einer Mischform aus Apoptose und Nekrose führt. Hierdurch wurden die intrazellulären Alarmine HMGB-1 und IL-1 $\alpha$  freigesetzt. Neutralisationsexperimente mit Rezeptor/Fc-Konstrukten, einem natürlichen Rezeptorantagonisten und spezifisch blockierenden Antikörpern zeigten, dass endogenes IL-1 $\alpha$  mit exogenem PolyIC zu einer synergistischen Aktivierung Dendritischer Zellen führt. Dies könnte den starken immunstimula-

torischen Effekt der Überstände PolyIC-stimulierter C-4 I Karzinom-zellen erklären. Die hier erstmals beschriebene, synergistische Aktivität von endogenem IL-1 $\alpha$  und PolyIC nach Induktion von Zelltod könnte zur Verbesserung immunologisch-therapeutischer Ansätze beitragen.

## Abstract

In this study immunosuppressive mechanisms of tumor cells and options to enhance their immunogenicity were investigated.

The interaction between the CD40 receptor on dendritic cells and its ligand (CD40L) on naïve T cells is essential for IL-12 secretion by dendritic cells. This T<sub>H</sub>1-polarizing cytokine is important for the induction of cytotoxic cellular immune responses.

It could be demonstrated that different tumour cell lines suppress the CD40L-dependent IL-12 secretion in dendritic cells. To investigate this, monocytes were differentiated in dendritic cells using IL-4 and GM-CSF and matured with lipopolysaccharide. Co-culture experiments demonstrated that the observed suppression was not due to soluble factors, but depended on a surface molecule. As previously shown by our laboratory, the CD40 receptor is highly expressed on epithelial and hematopoietic tumours. Experiments with stable transfectants approved that the expression of CD40 receptor on tumour cells competes with dendritic cells for the immune stimulatory CD40L-signal. In summary, these results show that CD40 expression on tumour cells may have immune suppressive potential.

The dsRNA analogue PolyIC was used to amplify the immunogenicity of tumour cells. Stimulation of dendritic cells with supernatants of PolyIC-stimulated C-4 I cervical carcinoma cells resulted in a significantly stronger IL-12 secretion in comparison to dendritic cells being directly stimulated with PolyIC only. Examination of cell morphology, cell death analysis, activation of Caspase-3 and the release of lactate dehydrogenase revealed that stimulation of C-4 I cells with PolyIC led to a combined form of apoptosis and necrosis. During this process the intracellular alarmins HMGB-1 und IL-1 $\alpha$  were released from the tumor cells. Neutralization experiments with a receptor/Fc construct, a natural receptor antagonist and specific blocking antibodies demonstrated that the strong immunostimulatory capacity of supernatants from PolyIC-stimulated C-4 I carcinoma cells could be reduced to IL-1 $\alpha$  release. In this thesis, the synergistic activity of endogenous IL-1 $\alpha$  and PolyIC after induction of cell death has been described for the first time and may contribute to the improvement of immunologic therapeutic approaches.