

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. D. Körholz

**Verstärkung einer IL-2-initiierten Immunantwort gegen eine Zelllinie der Ewing-
Tumor-Familie durch Stimulation des kostimulatorischen Rezeptors CD137**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. (doctor medicinae)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Caspar David Kühnöl

geboren am 2. August 1978 in Dresden

Betreuer: Herr PD Dr. med. habil. Jürgen Föll

Gutachter: Herr Prof. Dr. Dieter Körholz

Herr Prof. Dr. Meinolf Suttorp

Herr PD Dr. med. habil. Carl Friedrich Classen

Datum der Verteidigung: 15. November 2010

Referat

Zielsetzung: Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, in welchem Ausmaß die Immunantwort von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gegen eine Ewing-Tumor-Zelllinie durch einen Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 allein oder in Kombination mit Interleukin 2 (IL-2) in Stärke und Spezifität verändert werden kann und welche Gene hierbei beteiligt sind.

Methoden: PBMC wurden mit einem Antikörper gegen CD137, mit CD137L-transfizierten Tumorzellen, jeweils mit oder ohne Gabe von IL-2, in An- oder Abwesenheit von Zellen der Linie A673 inkubiert. Die dadurch erhaltenen stimulierten PBMC wurden auf verschiedenen Zelllinien restimuliert und die Granzym B- und Interferon gamma-Sekretion mittels ELISPOT gemessen. Die Anzahl der PBMC und Tumorzellen wurde erfasst und die PBMC wurden durchflusszytometrisch untersucht. Die gleichen Substanzen wurden in Tierversuchen (NOD/SCID-Mausmodell) angewandt. In Mikroarray-Untersuchungen von stimulierten PBMC wurden Gene erfasst, die im Zusammenhang mit einer veränderten Immunantwort durch Koinkubation von IL-2 und einem Antikörper gegen CD137 stehen könnten.

Ergebnisse: Die Koinkubation von IL-2 mit Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen steigerte die Immunantwort gegen Tumorzellen der Linie A673 im Vergleich zur Inkubation nur mit IL-2 (reduzierte Anzahl von Tumorzellen, gesteigerte Anzahl von PBMC und aktivierten Lymphozyten, gesteigerte Sekretion von Interferon gamma und Granzym B). Tierexperimentelle Untersuchungen in einem NOD/SCID-Mausmodell zeigten eine verminderte Anzahl von Tumoren in den Mäusen, die mit IL-2 oder IL-2-transgenen Tumorzellen therapiert wurden. Die zusätzliche Stimulierung mit Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen zeigte ein geringfügiges Verzögern des Wachstums dieser Tumoren. In Mikroarray-Analysen konnten beim Ansatz mit IL-2 in Kombination mit Antikörpern gegen CD137 Gene identifiziert werden, die eventuell mit einer verstärkten Immunantwort in Verbindung zu bringen wären.

Schlussfolgerung: Mithilfe der Stimulation des kostimulatorischen Rezeptors CD137 konnte eine IL-2-initiierte Immunantwort gegen Zellen einer Ewing-Tumor-Zelllinie gesteigert werden.

Kühnöl, Caspar David.: Verstärkung einer IL-2-initiierten Immunantwort gegen eine Zelllinie der Ewing-Tumor-Familie durch Stimualtion des kostimulatorischen Rezeptors CD137. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2009.

Meinen Eltern

In Erinnerung an A. J.

Inhaltsverzeichnis

	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	VII
1	Einleitung	1
1.1	Ewing-Tumore	1
1.1.1	Grundlagen und Epidemiologie	1
1.1.2	Molekulare Genetik	1
1.1.3	Therapie	2
1.1.4	Prognose	3
1.2	Immuntherapie	4
1.2.1	Immuntherapie mit Antikörpern	5
1.2.2	Anti-Tumormechanismen durch monoklonale Antikörper	6
1.2.3	Immuntherapie mit Zytokinen	8
1.2.4	Immuntherapie mit Tumorzellimpfung	9
1.2.5	Adoptive Immuntherapie	9
1.3	Kostimulation von T-Zellen	10
1.3.1	Kostimulatorische Moleküle	11
1.4	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Verwendete Zellen	15
2.1.2	Antikörper	16
2.1.3	Mikroarrays	17
2.1.4	Geräte	17
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.6	Software	22
2.1.7	NOD/SCID Mausstamm	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Methoden der Zellkultur	23
2.2.2	Isolierung von PBMC aus Blutprodukten	24
2.2.3	Gemischte Lymphozyten-Tumorzellkultur zur Stimulation von Lymphozyten	24
2.2.4	Durchflusszytometrische Analyse	26
2.2.5	MACS-Separation von Zellen der Linie A673-4-1BBL	26

2.2.6	IL-2 ELISA	26
2.2.7	BrdU Proliferationstest	27
2.2.8	Interferon gamma-ELISPOT , Granzym B-ELISPOT	27
2.2.9	Tierversuche	28
2.2.10	Mikroarray-Analyse	31
2.2.11	Statistische Auswertung von Messergebnissen	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Stimulation von PBMC mit IL-2 und Antikörper α CD137 <i>in vitro</i>	34
3.1.1	Ergebnisse der Zellzahlen und durchflusszytometrischen Untersuchungen	34
3.1.2	Ergebnisse des BrdU-Proliferationstests	37
3.2	Stimulation von PBMC mit Tumorzellen in Kombination mit IL-2, IL-2-transgenen Tumorzellen, CD137L-transfizierten Tumorzellen und Antikörper α CD137 <i>in vitro</i>	38
3.2.1	IL-2-transfizierte Tumorzellen (SBVGA1) produzieren IL-2	38
3.2.2	Nachweis von CD137L auf Zellen der Linie A673-4-1BBL	39
3.2.3	Ergebnisse der Zellzahlen	39
3.2.4	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen	42
3.2.5	Ergebnisse der ELISPOT-Untersuchungen	44
3.3	<i>In vivo</i> -Experimente	49
3.3.1	<i>In vivo</i> -Experimente mit Antikörper α CD137 und IL-2	49
3.3.2	<i>In vivo</i> -Experimente mit IL-2-transfizierten und CD137L- transfizierten Tumorzellen	51
3.4	Genexpression nach Kostimulation mit IL-2 und Antikörper α CD137	53
4	Diskussion	57
4.1	Methodische Aspekte	57
4.2	Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Experimente	59
4.3	Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Experimente	63
4.4	Mikroarray-Analysen	65
4.5	Schlussfolgerung	68
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	70
	Thesen	80
	Lebenslauf	

Erklärungen

Publikationshinweise mit Ergebnissen dieser Arbeit

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

α	anti
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
ADCC	antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
ASK-1	<i>apoptosis signal-regulating kinase-1</i>
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CCP1	<i>Cytotoxic Cell Proteinase 1</i>
CD	Differenzierungsantigen-Cluster (<i>cluster of differentiation</i>)
CDC	komplementvermittelte Lyse (<i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRADD	<i>Caspase and RIP adaptor with death domain</i>
cRNA	komplementäre RNA (<i>complementary RNA</i>)
CTLA	Antigen von zytotoxischen T-Zellen (<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DLI	Spender-Lymphozyten-Infusion (<i>donor lymphocyte infusion</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EFT	Tumor der Ewing-Familie (<i>Ewing family tumour</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>Epidermal-Growth-Factor-Receptor</i>)
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunospot</i>
ETS	<i>E twenty-six</i>
EURO-E.W.I.N.G	<i>European Ewing Tumor Working Initiative of National Groups</i>
EWS	Ewing-Sarkom-Gen
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated-Death-Domain</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FLI-1	<i>friend leukemia virus integration 1</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FOS	<i>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
g	Gravitation
g	Gramm
G418	Geneticin
GITR	<i>glucocorticoid-induced-tumor necrosis factor receptor</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GvHD	Transplantat-Wirt-Reaktion (<i>Graft-versus-Host-Disease</i>)
GvL	Transplantat gegen Leukämie (<i>Graft versus Leukemia</i>)
Gy	Gray

h	Stunde
H	im rechten Winkel zum Diameter L stehender Durchmesser
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HCl	Salzsäure
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HLA	menschlicher Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>human leukocyte antigen</i>)
HMOX1	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>
HVEM	<i>Herpes-Virus entry mediator</i>
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
IDDM	insulinabhängiger Diabetes mellitus (<i>insulin dependent diabetic mellitus</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
ILA	<i>induced by lymphocyte activation</i>
i.p.	<i>intraperitoneal</i> (in die Bauchhöhle)
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
jun	<i>jun-oncogene</i>
KIR2DS5	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 5</i>
KMT	Knochenmarkstransplantation
L	längster Diameter
LAK	lymphokinaktivierte Killerzellen
LFA	leukämieinhibitorischer Faktor (<i>leukemia inhibitory factor</i>)
LILRB1	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1</i>
M	Molar
M.	Morbus
MAF	<i>macrophage-activating factor</i>
MACS	Magnet-aktivierte Zellsortierung (<i>magnet activated cell sorting</i>)
mAK	monoklonaler Antikörper

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
mL	Milliliter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
MLR	gemischte Lymphozyten-Tumorzellkultur (<i>mixed leukocyte reaction</i>)
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i>
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p	P-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	<i>programmed death</i>
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PHA-P	Phytohämagglutinin-P
PNET	Primitiv neuroektodermaler Tumor
RAIDD	<i>Receptor interacting protein (RIP) associated ICH-1/ CED-3-homologous protein with a death domain</i>
RANK	<i>receptor activator of NFκB</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription-PCR
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
s.c.	<i>subcutan</i> (unter die Haut)
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SSPE	Natriumchlorid/-phosphat/EDTA (<i>saline/sodium phosphate/EDTA</i>)
TCGF	<i>T cell growth factor</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZ	Tumorzellen
U	Einheit (<i>unit</i>)
V	Volumen
v/v	Volumenprozent
VA	Virginia
Vol.	Volumen
°C	Grad Celsius
11CTP	Biotin-11-cytidine-5'-triphosphate
16UTP	Biotin-16-uridine-5'-triphosphate

1 Einleitung

1.1 Ewing-Tumore

1.1.1 Grundlagen und Epidemiologie

Maligne Erkrankungen bei Kindern im Alter unter 15 Jahren waren mit einer Inzidenz von ca. 15/100000 in den Jahren 1998 bis 2007 insgesamt selten. Der Anteil an Knochentumoren aller malignen Erkrankungen in diesem Zeitraum im Kindesalter betrug 4,6%, Ewing-Tumore waren davon ca. 46%. Nach dem Osteosarkom sind sie die zweithäufigsten primär malignen Knochentumore im Kindesalter, die jährliche Inzidenz beträgt ca. 3 Erkrankungen pro 1 Million Bevölkerung [Kinderkrebsregister Mainz (2008)]. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 10. und 19. Lebensjahr; prädisponiert war die männliche Bevölkerung mit einem Verhältnis von 1,5:1 [Hense HW *et al.* (1999)].

Seine Erstbeschreibung erfuhr der Tumor bereits im 19. Jahrhundert (in einer Zusammenstellung beschrieben von Sevier [Sevier CE (1930)]), erste Fallserien wurden von James Ewing publiziert [Ewing J (1921), (1924), (1939)].

Bevorzugt manifestiert sich das Ewing-Sarkom am wachsenden Skelett im Bereich der Diaphysen langer Röhrenknochen, sowie an platten Knochen (30% Femur, 12% Tibia, 10% Humerus, 8,5% Becken, 8% Fibula) [Schajowicz F (1994)]. Neben der ossären Beteiligung sind auch andere Organe beschrieben, die durch Ewing-Tumore befallen wurden. So zum Beispiel Lunge [Lee YY *et al.* (2007)], Niere [Funahashi Y *et al.* (2009)], Gehirn [Kazmi SA *et al.* (2007)] und Pankreas [Movahedi-Lankarani S *et al.* (2002)]. Die Ätiologie des Ewing-Sarkoms ist trotz Hinweisen in der molekularen Grundlagenforschung bisher nicht vollständig geklärt.

1.1.2 Molekulare Genetik

Das Ewing-Sarkom ist definiert als Rundzellsarkom mit unterschiedlich ausgeprägter Expression neuronaler Marker wie zum Beispiel das Protein S100 und die neuronenspezifische Enolase (NSE), welche für die Unterscheidung zum PNET herangezogen werden. [Schmidt D *et al.* (1991)]. Im Gegensatz zum PNET ist beim Ewing-Sarkom lichtmikroskopisch, immunhistochemisch oder elektronenmikros-

kopisch keine neuroektodermale Differenzierung nachweisbar [Ushigome S *et al.* (2002)].

Bei 95% der Patienten mit einem Ewing-Sarkom findet sich eine Mutation des Chromosoms 22, überwiegend eine 11/22-Translokation (q24/q12). Dabei kommt es zur Fusion des EWS-Gens (Ewing-Sarkom-Gen) von Chromosom 22 mit dem FLI-1 Gen (*friend leukemia virus integration 1*) von Chromosom 11. Das so gebildete Fusionsprotein wirkt als aberranter Transkriptionsfaktor [May WA *et al.* (1993)] und wird mittels RT-PCR bei 78% der Ewing-Tumor-Zelllinien und bei 91% im Gewebe der primären Ewing-Tumore gefunden [Dockhorn-Dworniczak B *et al.* (1994)]. Das durch FLI-1 kodierte Protein beinhaltet eine DNA-Bindungsdomäne, die kennzeichnend für die ETS-Familie (*erythroblastosis virus transforming sequence*) ist. Neben der EWS/FLI-1 sind auch noch andere alternative Fusionen von EWS mit Mitgliedern der ETS-Genfamilie bekannt. Wegen ihrer bekannten Zuordnung zum Ewing-Tumor werden diese zur molekularen Diagnostik herangezogen [Kovar H (1998)].

1.1.3 Therapie

Bei der Therapie des Ewing-Tumors spielt bis heute neben der Chemotherapie und der Chirurgie die Strahlentherapie (schon James Ewing beschrieb die Strahlensensibilität) eine große Rolle [Ewing J (1921), Dunst J *et al.* (1991), Schuck A *et al.* (2003)].

Neben der Strahlensensibilität ist der Tumor auch gegen bestimmte Chemotherapeutika sensibel. Durch die Kombination verschiedener Zytostatikagruppen mit unterschiedlichen Wirkungsweisen (Alkylierung, Inhibition von Mitose, DNA-Topoisomerase II und DNA-Synthese) konnte das erkrankungsfreie Intervall signifikant verlängert werden [Craft AW *et al.* (1997), Jürgens H (1995), Rodriguez-Galindo C *et al.* (2007)].

Multinationale Therapiestudien sind bei Erkrankungen mit niedriger Inzidenz (insbesondere in der pädiatrischen Onkologie wegen der geringen Patientenzahlen) im Vergleich zu anderen malignen Erkrankung mit hoher Inzidenz von großer Bedeutung [Paulussen M *et al.* (2001b), Rodriguez-Galindo C *et al.* (2007)]. Das heutige Behandlungskonzept basiert auf den Ergebnissen der EURO-E.W.I.N.G.-99-Studie (*European Ewing Tumor Working Initiative of National Groups*), welche 1999

gegründet wurde. Die Therapie besteht aus einer primären neoadjuvanten Chemotherapie mit sechs Therapieblöcken (Kombination aus Vincristin, Ifosfamid, Etoposid, Doxorubicin), welche alle Patienten erhalten. Anschließend erfolgt eine chirurgische Lokalthherapie, bei der, wenn möglich, eine vollständige Entfernung des Tumors erreicht werden sollte [Paulussen M *et al.* (2001a), Schuck A *et al.* (2003)].

Durch die stetige Verbesserung der chirurgischen Möglichkeiten und durch den Einsatz modernster Techniken, wie z. B. verlängerbarer Endoprothesen im Bereich der Extremitäten, können mittlerweile in den meisten Fällen gute kosmetische, extremitätenerhaltende Operationsergebnisse erzielt werden [Kotz R *et al.* (2002), Winkelmann W (1999)]. Bei der operativen Planung sollte berücksichtigt werden, dass Ewing-Tumore hochmaligne sind und die Tendenz zur schnellen Ausbreitung in das umliegende Gewebe haben. Wichtig ist daher auch die Einbeziehung des initialen Biopsiekanals in die Therapieplanung [Kotz R *et al.* (2002), Winkelmann W, Jürgens H (1989), Winkelmann W (1999)].

Die Intensität der nachfolgenden adjuvanten Chemotherapie und einer eventuellen zusätzlichen Strahlentherapie ist von der primären Tumorausbreitung (Tumorzusammenhang, multifokale Tumore, Lungenmetastasen) und dem Ansprechen auf die initiale Chemotherapie abhängig. Bei großer Tumorausbreitung und schlechtem initialen Ansprechen erfolgt eine Intensivierung der adjuvanten Chemotherapie und eine zusätzliche Bestrahlung der primären Tumorlokalisation.

Außerdem steht für diese Patienten eine Hochdosischemotherapie (Kombination aus Melphalan mit Busulfan oder Treosulfan) mit nachfolgender Stammzelltransplantation (vorab autologes Stammzell-Rescue) zur Verfügung [Ladenstein R *et al.* (2007)].

Die Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate durch Anwendung von multimodalen Therapiekonzepten [Jürgens H *et al.* (1988)] hat gezeigt, dass Ewing-Tumore auch ohne Nachweis von Filiarisierung als systemische Erkrankung behandelt werden müssen; somit ist die systemische Therapie eventuell der lokalen Therapie vorzuziehen [Schuck A *et al.* (2003)].

1.1.4 Prognose

Seit den 1950er und 1960er Jahren sind die 5-Jahres-Überlebensraten für alle malignen Erkrankungen bei Kindern im Alter von unter 15 Jahren von weniger als

10% bis 20% auf heute über ca. 80% angestiegen. Bei Erkrankungen wie Morbus Hodgkin und Retinoblastom liegen sie bei mehr als 95% [Kinderkrebsregister Mainz (2008)].

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Erkrankung an einem Ewing-Tumor beträgt (für alle Stadien der Erkrankung) ca. 67%; die 10- und 15-Jahres-Überlebensraten betragen 58% und sind somit deutlich schlechter als bei den meisten onkologischen Erkrankungen im Kindesalter [Kinderkrebsregister Mainz (2008)]. Bei Patienten mit primären Metastasen, hauptsächlich Lungenmetastasen, überleben 35% die ersten fünf Jahre nach Diagnose [Jürgens H *et al.* (1988)]. Unbehandelt kommt es zur Tumorprogression mit letalem Verlauf, Spontanheilungen sind nicht bekannt.

Somit hat der Ewing-Tumor, verglichen mit der Prognose anderer kindlicher Tumore, aber auch im Vergleich mit Tumoren im Erwachsenenalter, trotz großer Fortschritte in der Radiochemotherapie und in den operativen Möglichkeiten insgesamt eine schlechte Prognose.

1.2 Immuntherapie

In unserem Körper werden ständig entartete körpereigene Zellen gebildet, welche durch unsere angeborene und erworbene immunologische Abwehr effizient erkannt und normalerweise zerstört werden. Bei einer Krebserkrankung kann unsere immunologische Abwehr die Tumorzellen durch z.B. Ausbildung von so genannten *Escape*-Mechanismen nicht mehr ausreichend erkennen, wodurch sie sich dem Angriff unseres Immunsystems entziehen können. Die Idee, welche der Immuntherapie gegen eine Tumorerkrankung zu Grunde liegt, ist die körpereigene Abwehr so zu modifizieren, dass Krebszellen wieder effizient erkannt und zerstört werden können. Zur Anwendung kommen diese Ideen zum Beispiel bei der Verwendung spezifischer Antikörper, die Tumorzellen markieren und dadurch wieder erkennbar für das Immunsystem machen (z.B. Antikörper gegen CD20 (Rituximab)), oder durch Antikörper, die spezifische immunologische Abwehrvorgänge verstärken können (Antikörper gegen CD134 oder CD137).

Auch durch Gabe immunstimulatorischer Zytokine oder durch die Tumorzellimpfung (Impfung mit Tumorlysat-beladenen autologen dendritischen Zellen) wird versucht die körpereigene Abwehr so zu stimulieren, dass Tumorzellen zerstört werden.

Das Ziel der Immuntherapie ist dabei in erster Linie die häufig schon frühzeitig entstandene Ansiedlung von Tumorzellen (Mikrometastasen) aufzuspüren und zu vernichten. Zu erwähnen ist, dass einzelne Tumorzellen die Fähigkeit haben sich vor der Chemotherapie durch ein langes Verweilen in der Ruhephase zu schützen (These von Tumorstammzellen). Warum sie zu einem späteren Zeitpunkt wieder proliferieren und Metastasen bilden können, ist bisher nicht geklärt.

1.2.1 Immuntherapie mit Antikörpern

Die Geschichte der Antikörpertherapie reicht über 100 Jahre zurück. Schon damals gab es die Idee Tumorstrukturen durch Antikörper zu binden und zu zerstören [Ehrlich P (1900)]. Ein großer Schritt auf dem Gebiet der Antikörpertherapie gelang Milstein und Köhler in den 1970er Jahren mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern durch die Hybridomtechnik [Köhler G, Milstein C (1975)]. Monoklonale Antikörper werden von Nachkommen der B-Zellen bzw. Plasmazellen sezerniert und sind spezifisch gegen ein Antigen gerichtet.

Hybridomtechnik

In der von Köhler und Milstein 1975 veröffentlichten Arbeit wurde das Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper beschrieben: Ein Tier, in der Regel eine Maus, wird wiederholt mit einem Antigen immunisiert. Nach mehreren Wochen bis Monaten wird die Milz entnommen und aus dieser B-Zellen selektiert, welche mit Myelomzellen fusioniert und somit immortalisiert werden. Nicht fusionierte Myelomzellen werden in HAT-Medium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium) depletiert; nur durch das von Milzzellen in das Fusionsprodukt gebrachte Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) können die entstandenen Hybridome im HAT-Medium überleben [Janeway CA *et al.* (2002)]. Einzelne Hybridome werden auf ihre Antikörperproduktion (und die Spezifität des Antikörpers) getestet und kloniert. Mit dieser Methode ist es nicht nur möglich eine große Menge eines monoklonalen Antikörpers herzustellen, es können auch Antikörper gegen verschiedenste Antigene erzeugt werden [Marx U *et al.* (1997)].

1.2.2 Anti-Tumormechanismen durch monoklonale Antikörper

Komplementvermittelte Lyse

Bei der komplementvermittelten Lyse (CDC) bindet ein Antikörper an Tumorzellen, wodurch eine Komplementkaskade ausgelöst wird, durch die es zur Lyse der antikörperbeladenen Tumorzellen kommt. Dabei werden über Spaltungsreaktionen aus inaktiven Plasmakomponenten proteolytische Enzyme, welche kovalent an die Erregeroberfläche binden können. Zu Beginn der Bildung des Membranangriffskomplexes wird durch Spaltung des Komplementfaktors C5 der Faktor C5b freigesetzt, der sich im weiteren Verlauf an die Faktoren C6 und C7 anlagert. Dieser so entstandene Komplex besitzt die Fähigkeit sich in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran einzuschieben. Die sich anfügende Bindung von C8 und bis zu 16 Molekülen C9 komplettieren den Komplex, der als Ergebnis eine Pore in der Membran bildet, die zum Austritt von Wasser und Enzymen aus der Tumorzelle und somit zum Verlust der Homöostase und zur Zerstörung führt [Golay J *et al.* (2000), Di Gaetano N *et al.* (2003), Janeway CA *et al.* (2002)].

Der chimäre Maus/Mensch-Anti-CD20-Antikörper IDEC-2B8 (Rituximab) ist der Prototyp eines Anti-Lymphomantikörpers. Dieser Antikörper vermittelt seine zytotoxische Wirkung hauptsächlich durch die komplementvermittelte Lyse [Hiddemann W *et al.* (2001)].

Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität

Ein weiterer wichtiger Mechanismus für den Effekt von monoklonalen Antikörpern ist die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) [Graziano RF, Fanger MW (1987), Gong Q *et al.* (2005)]. Die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität wird ausgelöst, wenn die Fc-Rezeptoren, z. B. einer NK-Zelle, mit an einer Zelloberfläche gebundenen Antikörpern (IgG1- und IgG3-Subklassen) in Kontakt treten. Es folgt ein zytotoxischer Angriff der NK-Zellen inklusive Freisetzung zytoplasmatischer Granula (Perforine, Granzyme). Die Folge ist eine Permeabilität und Lyse der Tumorzelle [Bokemeyer C, Panse J (2005)].

Induktion von Apoptose

Die Induktion von Apoptose ist ein weiterer wichtiger Mechanismus, der durch die Anwendung monoklonaler Antikörper bei der Tumorbekämpfung Bedeutung findet.

Tumorzellen können während der Entstehung die Fähigkeit zur Apoptose verlieren. Ein Antikörper gegen den auf verschiedenen Tumoren verstärkt gefundenen Oberflächenrezeptor EGFR (*Epidermal-Growth-Factor-Receptor*) kann intrazelluläre Apoptosewege aktivieren. Dabei wird durch die Interaktion von Antikörper mit dem EGF-Rezeptor das intrazelluläre Enzym Caspase 3 als Schlüsselstelle der Apoptose induziert. [Ciardiello F, Tortora G (2001)].

Blockade von Zytokinen und Zytokinrezeptoren

Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes von monoklonalen Antikörpern bietet sich durch Blockade von Zytokinen oder Zytokinrezeptoren und die damit verbundene Hemmung ihrer Funktionen. Ein Beispiel für die Zytokinblockade ist der chimäre Antikörper Infliximab, welcher erfolgreich bei M. Crohn und bei der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird. Dieser Antikörper unterbricht die Entzündungskaskade durch Bindung an humanes TNF alpha [Dwivedi RC *et al.* (2009)].

Beispiele für den Einsatz von Zytokinrezeptorantikörpern sind Daclizumab und Basiliximab, welche als Antagonisten an CD25 zur Prophylaxe und der Therapie der akuten Allograft-Abstoßung nach Organtransplantationen eingesetzt werden [Beniaminovitz A *et al.* (2000), Thistlethwaite JR *et al.* (2000)].

Konjugierte Antikörper (Immunotoxine, Radioimmuntherapie, Zytostatikaimmunkonjugate)

Konjugierte Antikörper besitzen die Fähigkeit mit an diese Antikörper gekoppelten zytotoxischen Substanzen Tumorzellen spezifisch anzugreifen. Eine dieser Möglichkeiten ist die Kombination mit Immunotoxinen (Peptidtoxine), wie zum Beispiel bakteriellen Toxinen (Pseudomonasexotoxin, Diphtherietoxin) oder einem pflanzlichen Toxin (Ricin A) [Schnürch HG (1997)]. Ein Vorteil der Therapie mit Immunotoxinen ist die scheinbare Unabhängigkeit zum Zellzyklus. Ruhende Tumorzellen könne so besser aufgespürt und eliminiert werden. Ein Nachteil ist die mögliche Entwicklung von Anti-Toxin-Antikörpern, welche die Wirkung der Immunotoxine bei mehrfacher Anwendung neutralisieren könnten [Borchmann P *et al.* (2001)].

Bei der Radioimmuntherapie kommen gewebe- oder tumorspezifische Antikörper, die mit Radioisotopen beladen sind, zum Einsatz. Die Reichweite der Strahlung ist abhängig von der ausgesandten Strahlenart. Die Bandbreite der Reichweite liegt

zwischen einigen Nanometern (Auger-Elektronen) und im Millimeterbereich bei Alphastrahlern [Dahle J *et al.* (2007)]. Häufig verwendete Isotope sind ^{131}I od oder ^{90}Y ttrium. Gute Erfahrungen konnten bei der Behandlung von Patienten mit einem Rezidiv eines indolenten Non-Hodgkin-Lymphoms gemacht werden. Zur Anwendung kamen Konjugate mit an CD20 gekoppeltem ^{131}I od (Tositumomab-Tiuxetan) und ^{90}Y ttrium (Ibritumomab) [Witzig TE *et al.* (1999), Kaminski MS *et al.* (2000)].

Zytostatikaimmunkonjugate sind Verbindungen zwischen monoklonalen Antikörpern und bekannten zytotoxischen Medikamenten, wie zum Beispiel Gemtuzumab-Zogamicin (CMA-676). Hierbei ist Calicheamycin an einen Anti-CD33-Antikörper gebunden und findet Anwendung bei Rezidiven der AML bei Patienten über 60 Jahren [Bernstein ID (2000)].

1.2.3 Immuntherapie mit Zytokinen

Zytokine sind lösliche oder membranständige Botenstoffe, welche für die Regulation von interzellulärer und intrazellulärer Kommunikation entscheidend sind. Sie steuern Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese und spielen eine tragende Rolle in der Kanzerogenese oder bei Tumor-*Escape*-Mechanismen. Einerseits haben sie Schlüsselrollen in der Aktivierung des Immunsystems um das Wachstum des Tumors zu begrenzen, andererseits werden sie auch mit Tumorwachstum, Tumorangiogenese [Tyagi A *et al.* (2009)], Tumorinvasion und der Bildung von Metastasen in Zusammenhang gebracht [Lin EY *et al.* (2001)]. Auch bei der Reifung dendritischer Zellen im Rahmen einer Immunantwort kommt Zytokinen eine entscheidende Funktion zu [Sorg RV *et al.* (2003)].

Eine Reihe von Zytokinen wurde schon erfolgreich in der Behandlung von Tumorerkrankungen angewandt oder zeigte vielversprechende Ergebnisse in *in vitro*- oder Mausmodellen. So zum Beispiel IL-2 beim Melanom, beim Nierenzellkarzinom [Fisher RI *et al.* (2000), Atkins MB *et al.* (2000)] und beim Ewing-Tumor [Staege MS *et al.* (2004)], Interferon alpha bei der CML [Kantarjian HM *et al.* (1995)], TNF alpha beim kolorektalen Karzinom [Alexander HR Jr *et al.* (1998)], IL-12 beim kutanen T-Zelllymphom [Rook AH *et al.* (1999)] und GM-CSF beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [Salgia R *et al.* (2003)].

Trotz vielversprechender Ergebnisse bei der Behandlung von Tumoren mit Zytokinen sind teilweise starke Nebenwirkungen zu verzeichnen, die die klinische Nutzung begrenzen (zusammengefasst in [Vial T, Descotes J (1995)]).

1.2.4 Immuntherapie mit Tumorstimmung

Die Anfänge der Tumorstimmung gehen zurück in das Jahr 1777 als sich der englische Arzt Nooth im Selbstversuch Tumorgewebe eines Patienten injizierte [Nooth J (1806)].

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Anti-Tumor-Impfung. Die erste Möglichkeit ist die Gabe von antigenbeladenen dendritischen Zellen. Diese können aus peripheren Monozyten [Romani N *et al.* (1994)] mittels Selektion durch Adhärenz an Plastikoberflächen oder durch Leukapherese CD14-positiver Zellen gewonnen werden [Felzmann T *et al.* (2003)]. Bei beiden Varianten erfolgt die Zugabe von IL-4 und GM-CSF. Nach einer Inkubation von vier bis sechs Tagen kommt es nach Beifügung eines Zytokincocktails (TNF alpha, IL-1 beta, IL-6 und Prostaglandin) und Lysat von Tumorzellen oder einer Tumorzelllinie, eines Peptids oder eines Proteins zur Ausreifung dendritischer Zellen. Alternativ dazu kann auch ein Gentransfer zur Präsentation eines Antigens erfolgen [Westermann J *et al.* (2001)]. Die so generierten Zellen werden intrakutan appliziert und können ihre Antigene T-Zellen präsentieren.

Die zweite Möglichkeit der Tumorstimmung beinhaltet die Applikation von modifizierten Tumorzellen. Dabei werden Tumorzellen so verändert, dass sie zum einen durch Bestrahlung nicht mehr selbständig wachsen können und zum anderen auf der Oberfläche Moleküle tragen, welche die körpereigene immunologische Tumorstimmung verstärken sollen, wie zum Beispiel kostimulatorische Moleküle (CD80, CD137L) oder genetisch so modifiziert sind, dass sie Zytokine sezernieren, die eine Immunreaktion gegen den Tumor verstärken können (z.B. IL-2) [Staege MS *et al.* (2004)].

1.2.5 Adoptive Immuntherapie

Schon 1965 gab es von Mathé erste Beschreibungen von adoptiver Immuntherapie, als bei einer Knochenmarkstransplantation durch immunkompetente Zellen neben

einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*GvHD*) auch eine Transplantat-gegen-Leukämie-Wirkung (*GvL*) erzeugt wurde [Mathé G *et al.* (1965)]. Im Unterschied zur Tumorstimmung werden bei der adoptiven Immuntherapie Zellen appliziert, die ihre Anti-Tumorstimmung schon besitzen. Dies können lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK) [Rosenberg SA *et al.* (1986)] oder tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) sein [Schiltz PM *et al.* (1997)]. Durch den Transfer können diese spezifisch *ex vivo* generierten und stimulierten Zellen eine direkte Wirkung gegen den Tumor ausüben [Hanson HL *et al.* (2000)]. Andere Möglichkeiten sind die *in vitro*-Sensitivierung von T-Zellen gegen Tumorstimmung [Lipshy KA *et al.* (1997)], die adoptive Immuntherapie mit autologen NK-Zellen [Cervantes F *et al.* (1996), Uharek C *et al.* (2002)] (die besonders bei der AML eine wichtige Rolle zu spielen scheinen [Lowdell MW *et al.* (2002)]) und die Gabe von Donorlymphozyten (DLI) nach allogener KMT zur Steigerung des *GvL*-Effektes [Levine JE *et al.* (2008)].

1.3 Kostimulation von T-Zellen

Eine Immunantwort gegen ein körperfremdes Antigen unterliegt einer strengen Kontrolle des Immunsystems. Die vollständige Aktivierung einer T-Zelle *in vivo* und *in vitro* benötigt zwei unterschiedliche Signale. Der erste Teil der Aktivierung erfolgt über den T-Zellrezeptor, dem ein Antigen über ein MHC-Molekül präsentiert wird. Der zweite Teil erfolgt über ein kostimulatorisches Signal, vermittelt durch ein Rezeptor-Ligandenpaar [Schwartz RH (1990), Weiss A (1993)]. Das kostimulatorische Signal kann dabei durch unterschiedliche Zellen vermittelt werden (Monozyten, dendritische Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Endothel, Tumorstimmung). Durch das Fehlen eines kostimulatorischen Signals ist es einer T-Zelle nicht nur nicht möglich eine Immunität gegen einen autologen Tumor zu entwickeln, sondern sie wird auch anergisch [Koenen HJ *et al.* (2005)]. Zusätzlich kann bei fehlender Kostimulation ein Signaltransduktionsweg eingeschaltet werden, der zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt [Noel PJ *et al.* (1996), Schwartz RH (1990)]. Auch eine *in vitro*-Aktivierung von T-Zellen ist mit verschiedenen Methoden möglich. So zum Beispiel mit einem monoklonalen Antikörper gegen den T-Zellrezeptor [Weiss A (1993)], mit Lectinen, wie zum Beispiel Phytohämagglutinin-P (PHA-P), welche die T-Zelle aktivieren oder mit OKT3 als monoklonalem Antikörper gegen das T-Zellrezeptor-assoziierte Molekül CD3 [Kung P *et al.* (1979), Van Wauwe JP *et al.* (1980)].

1.3.1 Kostimulatorische Moleküle

Kostimulatorische Moleküle haben nach Bindung mit ihrem speziellen Liganden und bei vollständiger Aktivierung die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren, ihre zytotoxischen Fähigkeiten zu potenzieren und Zellvermehrung zu induzieren oder zu verstärken. In den letzten Jahren ist die Anzahl der Moleküle, die mit Kostimulation in Verbindung gebracht werden, stark angewachsen. Das als erstes beschriebene und wohl auch bekannteste kostimulatorische Molekül auf T-Zellen ist CD28 [Ledbetter JA *et al.* (1990)]. Es ist möglich die kostimulatorischen Moleküle in zwei größere Gruppen zu unterteilen: Zum einen in die Immunglobulin-Genfamilie (Ig-Genfamilie) und zum anderen in die Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie (TNFR-Familie). Bei dieser Unterteilung ist die Gruppe der Zytokine nicht berücksichtigt, welcher auch kostimulatorische Fähigkeiten zugesprochen werden.

Kostimulatorische Moleküle der Ig-Genfamilie

CD28 als bekanntester kostimulatorischer Rezeptor der Ig-Genfamilie wird auf etwa 50% der humanen CD8-T-Zellen und auf fast allen CD4-T-Zellen exprimiert. Die am besten untersuchten Liganden des CD28-Rezeptors sind B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) [Linsley PS *et al.* (1994)]. Durch die Kombination von Antigenkontakt (Präsentation durch MHC-Komplex) mit dem T-Zellrezeptor und gleichzeitiger Ligation von CD28 mit seinen Liganden werden verschiedene Effektorzellfunktionen ausgelöst, wie zum Beispiel die Sekretion und Produktion von Zytokinen und Chemokinen und die Expression weiterer Kostimulationsrezeptoren [Schwartz RH (1990), Weiss A (1993)].

CD28 und seine Liganden B7 sind konstitutiv auf den meisten T-Zellen bzw. auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Nach Interaktion von CD28 mit B7 wird auf der T-Zelle der Rezeptor CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, CD152) hochreguliert. Auch der CTLA-4-Rezeptor hat seine Liganden in den Molekülen B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) [Linsley PS *et al.* (1994)], die Affinität ist aber stärker als zum Rezeptor CD28 [(Collins AV *et al.* (2002), Linsley PS *et al.* (1994), van der Merwe PA *et al.* (1997)). Die Interaktion zwischen CTLA4 und B7 vermittelt eine hemmende Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung und hat somit wahrscheinlich Bedeutung bei der Verhinderung von Autoimmunprozessen [Egen JG, Allison JP (2002), Howard TA *et al.* (1991)]. Weitere bekannte Rezeptoren der Ig-Genfamilie

sind LFA-2 (CD2) [Chong AS *et al.* (1992)], ICOS (*inducible costimulator*) [Mesturini R *et al.* (2006)] und PD-1 (*programmed death 1*) [del Rio ML *et al.* (2005)].

Kostimulatorische Moleküle der TNFR-Familie

Aufgrund unterschiedlicher Mechanismen in der Signalgebung kann man die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie in zwei verschiedene Gruppen einteilen. Eine Gruppe besteht aus Rezeptoren, die intrazellulär eine sogenannte Todes-Domäne (*death domain*) besitzen und Apoptose auslösen können. Zu diesen Molekülen gehören unter anderen Fas (CD95) [Itoh N *et al.* (1991)] und der TRAIL-Rezeptor-1 (DR4) [Pan G *et al.* (1997), Sheridan JP *et al.* (1997), MacFarlane M *et al.* (1997)] mit ihren Liganden CD95L und TRAIL. Diese Rezeptoren können Moleküle wie TRADD (*TNF-receptor-associated-Death-Domain*) [Hsu H *et al.* (1995)], RAIDD (*Receptor interacting protein (RIP) associated ICH-1/ CED-3-homologous protein with a death domain*) [Duan H, Dixit VM (1997)], FADD (*Fas-associated-Death-Domain*) [Chinnaiyan AM *et al.* (1995)] und CRADD (*Caspase and RIP adaptor with death domain*) binden [Ahmad M *et al.* (1997)]. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade können Proteine wie die Caspase 8 herangezogen werden, die durch Spaltung anderer Caspasen die Apoptose initiieren [Shu HB *et al.* (1997)].

Die zweite Gruppe der TNFR-Familie besitzt keine derartige Todes-Domäne und vermittelt ihre Wirkung über einen der sechs bekannten TRAF (TNF-Rezeptor assoziierter Faktoren) [Rothe M *et al.* (1994), Takeuchi M *et al.* (1996), Cheng G *et al.* (1995), Cao Z *et al.* (1996)]. Zu dieser Gruppe gehören Rezeptoren wie zum Beispiel CD40 [Cheng G *et al.* (1995)], CD30 [Gedrich RW *et al.* (1996)], RANK (*receptor activator of NFκB*) [Anderson DM *et al.* (1997)], OX40 [Arch RH, Thompson CB (1998)], HVEM (*Herpes-Virus entry mediator*) [Marsters SA *et al.* (1997), Hsu H *et al.* (1997)], GITR (*glucocorticoid-induced-tumor necrosis factor receptor*) [Gurney AL *et al.* (1999), Kwon B *et al.* (1999)] und CD137 (4-1BB) [Arch RH, Thompson CB (1998), Foell JL *et al.* (2004)].

Das kostimulatorische Molekül CD137 (4-1BB)

CD137 (4-1BB, TNFRSF9) ist ein aus 256 Aminosäuren bestehendes Transmembranprotein der Klasse I und wurde das erste Mal auf aktivierten T-Zellen bei Mäusen und Menschen entdeckt [Kwon BS, Weissman SM (1989)]. Der ursprüngliche Name dieses Moleküls beim Menschen war ILA (*induced by*

lymphocyte activation) [Kwon BS, Weissman SM (1989), Schwarz H *et al.* (1993)]. Der Genort von CD137 ist 1p36, neben anderen Genen, die für Moleküle der TNFR-Familie kodieren. Exprimiert wird der Rezeptor auf aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen, NK-Zellen und Mastzellen [Vinay DS, Kwon BS (1999), Wilcox RA *et al.* (2002a), Futagawa T *et al.* (2002), Nishimoto H *et al.* (2005)].

Der natürliche Ligand von CD137 (4-1BB) ist CD137L (4-1BBL), ein Typ II Transmembranprotein mit dem Genort 19p3.3 [Alderson MR *et al.* (1994), Goodwin RG *et al.* (1993)]. Er wird exprimiert auf aktivierten T-Zellen, auf aktivierten APC (darunter auch IFN gamma-aktivierte Makrophagen), auf aktivierten B-Zellen, auf dendritischen Zellen [DeBenedette MA *et al.* (1997), Pollok KE *et al.* (1994), Goodwin RG *et al.* (1993)] und in verschiedenen Zelllinien wie THP-1 (Monozyten) und MP-1 (EBV-immortalisierte B-Zelle) [Alderson MR *et al.* (1994)].

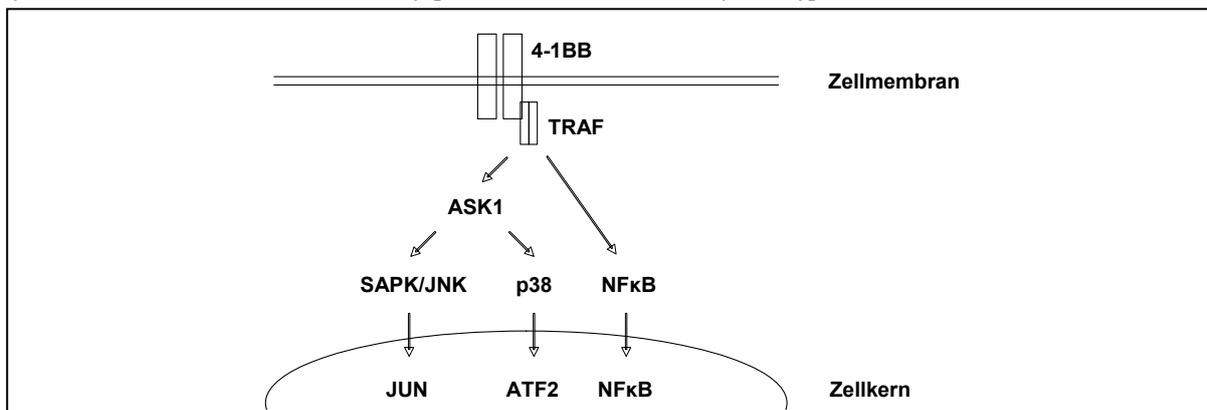


Abb. 1. Signalkaskade der CD137-Aktivierung. Gezeigt wird schematisch die intrazelluläre Signalkaskade nach einer Stimulation des Rezeptors CD137 (4-1-BB) [nach Cannons JL *et al.* (2000)].

Wird der Rezeptor CD137 stimuliert, erfolgt intrazellulär über TRAF-Moleküle eine Aktivierung von NFκB (*nuclear factor κB*) [Cannons JL *et al.* (2000), Saoulli K *et al.* (1998)] und über ASK-1 (*apoptosis signal-regulating kinase-1*) [Cannons JL *et al.* (1999)] eine Aktivierung von p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) und SAPK (*stress-activated protein kinase*)/JNK (*c-jun N-terminal kinase*). Über diese Wege werden Transkriptions- und Regulationsfaktoren (JUN, ATF2, NFκB [Cannons JL *et al.* (2000)]) für die Zellregulation und Zytokine (z.B. IL-4 und INF gamma) gesteuert.

Durch die Stimulation des Rezeptors CD137 auf T-Zellen (stärker auf CD8-positiven Zellen als auf CD4-positiven Zellen) werden die Zellproliferation [Cannons JL *et al.* (2001), Cooper D *et al.* (2002)] und die Zytokinproduktion der T-Zellen (z.B. IFN

gamma) aktiviert [Shuford WW *et al.* (1997)]. Ein weiterer Effekt der Stimulation von CD137 bei CD8-positiven T-Zellen ist der Schutz vor dem durch Aktivierung induzierten Zelltod (AICD, *activation-induced cell death*) [Hurtado JC *et al.* (1997)]. Außerdem hemmt die Interaktion mit CD137 die T-Zell-abhängige humorale Immunantwort, wobei die Wirkung vermutlich, unabhängig von CD8-positiven T-Zellen und B-Zellen, über eine Anergie CD4-positiver T-Zellen vermittelt wird [Mittler RS *et al.* (1999)]. Genaue Wirkmechanismen dieser hemmenden Wirkung sind jedoch im Einzelnen noch ungeklärt.

1.4 Zielsetzung

Trotz zahlreicher Therapieoptionen, auch bei refraktären Erkrankungen an einem Ewing-Tumor, ist im Besonderen bei diesen Patienten die Prognose immer noch schlecht. Eine intensive Forschung an Möglichkeiten der Verbesserung der Therapie bei fortgeschrittener Erkrankung ist zwingend notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob durch eine Stimulierung von PBMC mit Tumorzellen aus der Ewing-Tumor-Familie in Kombination mit einer Behandlung mithilfe eines Antikörpers gegen das kostimulatorische Molekül CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen, allein oder in Kombination mit Interleukin-2 (löslich oder in Form von IL-2-transgenen Tumorzellen), eine tumorzellspezifische, zytotoxische Immunreaktion erzeugt werden kann, die gegenüber einer Behandlung nur mit IL-2 bezüglich Zytotoxizität und Spezifität im Vorteil ist. Die Experimente im dargestellten System sollten die Möglichkeit einer adoptiven Immuntherapie als zusätzliche Therapieoption bei refraktärer Erkrankung untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Zellen

A673

Die Zelllinie A673 stammt aus einem Ewing-Tumor eines 15 Jahre alten Mädchens (ATCC (*American Type Culture Collection*)-Nr. CRL-1598) [Giard DJ *et al.* (1973)]. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS (*fetal calf serum*), Penicillin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL) kultiviert und zwei Mal in der Woche 1/10 verdünnt, dabei wurde jedes Mal frisches Medium dazu gegeben.

Diese Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Manassas, VA, USA) bezogen.

SK-N-MC

Die Zellen dieser Linie stammen aus einer Metastase im supraorbitalen Bereich bei einer 14 jährigen Patientin (ATCC-Nr. HTB-10, DSMZ-Nr. ACC 203) [Biedler JL *et al.* (1973)]. Bei Etablierung wurde die Zelllinie als Neuroblastom beschrieben, später wurde sie aber durch verschiedene Merkmale (z.B. EWS/FLI-1 Fusion) der Ewing-Tumorfamilie (EFT) zugeordnet [Dunn T *et al.* (1994)]. Die Zellen wurden in RPMI mit 10 % FCS, Penicillin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL) kultiviert und zwei Mal in der Woche 1/10 verdünnt, dabei wurde jedes Mal frisches Medium dazu gegeben.

Diese Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

SH-SY5Y

Diese Zelllinie entstand durch dreifache Klonierung (SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5 → SH-SY5Y) der ursprünglichen Zelllinie SK-N-SH, welche aus dem Knochenmark einer 4 jährigen Patientin mit einem metastasierten Neuroblastom 1970 etabliert werden konnte (ATCC-Nr. CRL-2266; DSMZ-Nr. ACC 209) [Biedler JL *et al.* (1973)]. Bei der Zelllinie handelt es sich um Neuroblastomzellen. Die Zellen wurden in RPMI mit 10 % FCS, Penicillin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL) kultiviert und zwei Mal in der Woche 1/10 verdünnt, dabei wurde jedes Mal frisches Medium dazu

gegeben. Diese Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) bezogen.

SBVGA1, SBVGA3

Die Zelllinie SBVGA1 ist eine genetische Modifikation der Zelllinie A673 und wurde mit der cDNA von IL-2 transfiziert. Als Kontrollzelllinie dieser Modifikation dient die Zelllinie SBVGA3, die mit dem Leervektor der Transfektion (mock) modifiziert wurde [Staege MS *et al.* (2003)]. Um eine stabile Transfektion aufrecht zu erhalten, wurde dem Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL)) 400 µg/mL G418 (Geneticin) zugegeben.

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Staege (Universität Halle) zur Verfügung gestellt.

A673-4-1BBL

Die Zelllinie A673-4-1BBL ist eine genetische Modifikation der Zelllinie A673 und wurde mit der cDNA von CD137L transfiziert. Zur Aufrechterhaltung einer stabilen Transfektion wurde dem Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL)) 2 µg/mL Blasticidin zugegeben.

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Föll und Herrn Dr. Staege (Universität Halle) zur Verfügung gestellt.

PBMC

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) konnten, mit Einwilligung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, von freiwilligen Spendern isoliert und über die Blutbank des Klinikums der Martin-Luther-Universität als *buffy coat* bezogen werden. Wurden HLA-spezifische Zellen benötigt, so waren die Spender typisiert.

2.1.2 Antikörper

Der bei dieser Arbeit verwendete Antikörper αCD137 (26G6) wurde aus Hybridomen gewonnen und freundlicherweise von Herrn Dr. Mittler (Atlanta, USA) zur Verfügung gestellt.

Die zur Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg) und Miltenyi (Bergisch Gladbach) bezogen (Zusammenfassung in Tabelle 1).

Tabelle 1. Antikörper. In vorliegender Arbeit verwendete Antikörper zur Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie.

Spezifität	Markierung	Klon	Isotyp
CD3	FITC	HIT3a	IgG2a, κ
CD3	FITC	UCHT1	IgG1, κ
CD4	PerCP	SK3	IgG1, κ
CD4	PE	SK3	IgG1, κ
CD8	PerCP	SK1	IgG1, κ
CD8	PE	RPA-T8	IgG1, κ
CD45	FITC	HI30	IgG1, κ
CD56	PE	B159	IgG1, κ
CD117	PE	104D2	IgG1
CD137	PE	4B4-1	IgG1, κ
CD137L	PE	C65-485	IgG1, κ
Isotyp-Kontrolle	FITC	G155-178	IgG2a, κ
Isotyp-Kontrolle	FITC	X40	IgG1
Isotyp-Kontrolle	PE	X40	IgG1
Isotyp-Kontrolle	PerCP	X40	IgG1

2.1.3 Mikroarrays

Die bei der Arbeit verwendeten Mikroarrays wurden von der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) bezogen. Zur Benutzung kam dabei der Genchip HG_U133A-Mikroarray (GEO-Nummer: GPL96).

2.1.4 Geräte

Tabelle 2. Verwendete Geräte. In vorliegender Arbeit verwendete Geräte zur Durchführung der Experimente.

Gerätetyp	Gerätebezeichnung	Hersteller
Bestrahlungsanlage	BIOBEAM 8000	STS-Steuerungstechnik & Strahlenschutz GmbH, Braunschweig

Brutschrank, begast	BBD 6620	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	FACScan	Becton-Dickinson, Heidelberg
ELISPOT-Mikroskop	Axioplan 2	Zeiss, Jena
ELISPOT-Kamera	Hitachi HV C20A	Japan
Feinwaage	BP221S	Sartorius, Göttingen
Fluidics Station	450	Affymetrix, Santa Clara, USA
Gelelektrophoresekammer	Wide Mini-Sub [®] Cell GT	Bio-Rad, München
Käfig	Typ II L	Ehret, Emmendingen
Kryokonservierungshilfe	Cryo Freezing Container	VWR, Darmstadt
Laborabzug		Bense, Hardeggen
Lichtmikroskop	Axiovert 25 HBO50	Zeiss, Jena
MACS-Separator	Separator für LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroarray-System	Gene Chip Instrument System	Affymetrix, Santa Clara, USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät	ELX808	Winooski, USA
pH-Messgerät	pH Meter pH 562	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Accujet	Brand, Wertheim
Schüttelwasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Spannungsquelle	Power-Pac 200	Bio-Rad, München
Spektrometer	DU 640	Beckmann, Krefeld
Sterilwerkbank	HeraSafe HS18	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
UV-Transilluminator	Fluor-S Multi-Imager	Bio-Rad, München
Vakuumabsaugsystem	BVC 21	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer	Vortex-Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe
Waage	BP2200	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Thermostat E1	Medingen, Freital
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	VWR, Darmstadt
Zentrifuge	Multifuge 1S-R	Heraeus, Darmstadt

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bei den Laborarbeiten vorliegender Arbeit wurden Einmalartikel der Firma Becton und Dickinson (BD), Bedford, USA (FACS-Röhrchen, Zellsiebe (70µm)), Becton und Dickinson (BD), Heidelberg (Einmalspritzen, Kanülen, Zentrifugenröhrchen), Braun, Melsungen (Einmalspritzen), Eppendorf, Hamburg (Pipettenspitzen, PCR-Reaktionsgefäße „*PCR-Clean*“, „*Phase Lock Gel*“ und „*Safe Lock*“), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Säulen (Größe LS) zur magnetischen Separation), Nalgene, Rochester, USA (Kryokonservierungsröhrchen) und TPP, Trasadingen, Schweiz (serologische Pipetten, Zellkulturplatten und -flaschen, Zentrifugenröhrchen) verwendet.

Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, fertige Reagenzien, Enzyme, Medien, Test-Kits, Antibiotika, Narkosemittel und Tierfutter.

Acrylamid (linear)	Ambion, Austin, USA
Agarose	PeqLab, Erlangen
Altromin 1324	Altromin, Lage
Ammoniumacetat	Ambion, Austin, USA
Antifoam	Sigma, Heidelberg
Biotin-11CTP	Enzo, New York, USA
Biotin-16UTP	Roche, Mannheim
Biotinylierter Anti-Streptavidin Antikörper	Vector, Burlingame, USA
Blasticidin S HCl	Invitrogen, Karlsruhe
BSA 50 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Buffer (First Strand, 5x)	Invitrogen, Karlsruhe
Buffer (Second Strand, 5x)	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
DEPC-Wasser	Ambion, Austin, USA
DMSO	Sigma, Steinheim
dNTP-Mix	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
E.coli DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
E.coli DNA Polymerase I	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA 0,5M	Ambion, Austin, USA

ELISPOT AEC Substrat Set	BD Pharmingen, Torreyana, USA
Ethanol (80 Vol.%)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 Vol.%)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml	Sigma, Heidelberg
Ficoll-Paque	Amersham, Buckinghamshire, UK
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
GeneChip Expression Hybridization Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Geneticin (G418)	Gibco, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Promega, Mannheim
Human Granzyme B ELISPOT Set	Becton-Dickinson, Torreyana, USA
Human Interferon Gamma ELISPOT Set	Becton-Dickinson, Torreyana, USA
IgG (Ziege) 10mg/ml	Sigma, Heidelberg
<i>Immunoassay IL-2</i>	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Interleukin-2 (human)	Roche, Mannheim
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumacetat	Sigma, Heidelberg
MEGAscript T7 Transcription Kit	Ambion, Austin, USA
MES	Sigma, Heidelberg
MicroBeads anti-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MOPS	Sigma, Heidelberg
Natriumacetat	Sigma, Heidelberg
Natriumchlorid 5M	Ambion, Austin, USA
Natriumhydroxid	Sigma, Heidelberg
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	BioWhittaker, East Rutherford, USA
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	Biochrom, Berlin
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma, Heidelberg
Reverse Transcriptase (Superscript II)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase H	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseZap	Ambion, Austin, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

RPMI 1640	Biochrom, Berlin
SSPE	Cambrex, Verviers, Belgien
Streptavidin-Phycoerythin	Molecular Probes, Eugene, USA
Tris/Azetat	Sigma, Heidelberg
TRizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
T7dT24 Primer 1µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blau	Gibco, Auckland, Neuseeland
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Tween 20	Calbiochem, Darmstadt
Wasser (steril)	Braun, Melsungen
X-VIVO 15	BioWhittaker, East Rutherford, USA

Zusätzlich wurden folgende Lösungen bei den Experimenten verwendet:

Kulturmedium: RPMI 1640 mit 10%FCS, Penicillin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL)

Einfriermedium: Kulturmedium mit 10% DMSO

Färbepuffer: MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) (12 x konzentriert), 5M NaCl, Tween 20 (0,05% (v/v)).

Fragmentierungspuffer: 200mM Tris/Azetat, 500mM CH₃COOK (Kaliumazetat), 150mM (CH₃COO)₂Mg (Magnesiumazetat), DEPC (DiethylenePyrocarbonate)-Wasser.

Hybridisierungspuffer: MES (2 x konzentriert), 5M NaCl (Natriumchlorid), 0,5M EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat), Tween (Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat) 20 (0,01% (v/v)), DEPC-Wasser.

MOPS: 200mM MOPS (3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure), 0,5M EDTA, 1M CH₃COONa (Natriumacetat), DEPC-Wasser (mit NaOH (Natriumhydroxid) auf pH 7,0 eingestellt).

Verdünnungspuffer: PBS, 10% FCS.

Waschpuffer A: SSPE (*Standard Sodium Phosphate EDTA*) (20 x konzentriert), Tween 20 (0,01% (v/v)), *Antifoam* 5%, DEPC-Wasser.

Waschpuffer B: 100mM MES, 0,1M NaCl, Tween 20 (0,01% (v/v)), DEPC-Wasser.

Waschpuffer 1: PBS, Tween 20 (0,01% (v/v)).

2.1.6 Software

Affymetrix *Microarray Suite* 5.0, Affymetrix (Programm zum Messen der Mikroarrays), Cellquest Pro, BD Biosciences (Programm zur Messung und Auswertung von durchflusszytometrischen Proben), KC-junior, Bio Tek (Programm zum Messen von Mikrotiter-Platten), KS-ELISPOT, Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Programm zur Messung von ELISPOT-Platten), Microsoft Excel, Microsoft (Programm zur Auswertung und Darstellung von Daten und Erstellen von Graphiken), Microsoft Formel-Editor 3.0, Microsoft (Programm zum Erstellen von mathematischen Formeln), Microsoft Power Point, Microsoft (Programm zur Bearbeitung von Graphiken), Microsoft Word, Microsoft (Programm zur Erstellung der Gesamtarbeit), SPSS 12.0, SPSS (Programm zur Signifikanzberechnung der *in vivo*-Experimente).

2.1.7 NOD/SCID Mausstamm

Der bei dem Tierversuch verwendete Mausstamm ist ein NOD.CB17-Prkdc scid/J-Mausstamm, entstanden aus einer Kreuzung eines C.BKa-Igh^b/IcrSz (CB-17) Donorstamms mit einem NOD/ShiLtSz Empfängerstamm (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, USA).

Die SCID-Maus ist gekennzeichnet durch eine homozygote Mutation für das Gen Prkcd. Durch diese Mutation haben die Mäuse (durch das Fehlen reifer B- und T-Zellen) weder eine humorale noch eine zelluläre Immunität. Die NOD-Maus ist gekennzeichnet durch einen T-Zell-vermittelten autoimmunen insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM) und durch diverse Immundefekte wie NK-Zell-Defizienz und Komplementfaktor C5-Mangel. Durch die Kreuzung einer NOD-Maus mit einer SCID-Maus entstand die NOD/SCID-Maus, die durch das Fehlen reifer T-Zellen keinen autoimmunen IDDM mehr aufweist. Zusätzliche Merkmale sind das Fehlen reifer B-Zellen, Lymphozytopenie und Hypogammaglobulinämie. Die NOD/SCID-Maus zeigt ein bis zu 10-fach höheres Anwachsen (*engraftment*) humaner PHSZ (pluripotente hämatopoetische Stammzellen) im Vergleich mit der SCID-Maus [van der Loo JC *et al.* (1998), Cashman JD *et al.* (1997), Pflumio F *et al.* (1996)].

Die Mäuse wurden von „*The Jackson Laboratory*“, Bar Harbor, USA bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank ausgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlendioxidgehalt kultiviert. Als Gefäße dienten sterile Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten, die mit dem entsprechenden Medium gefüllt waren. Standardmedium war RPMI 1640 mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL) (wenn nicht anders beschrieben).

Kultivieren von adhärennten Zellen

Etwa alle drei Tage wurde das Medium der adhärennt wachsenden Linien A673, SBVGA1, SBVGA3, A673-4-1BBL, SK-N-MC und SH-SY5Y gewechselt und die Zellen wurden in einem Verhältnis 1:10 verdünnt. Dabei wurde das Medium der Kultur abgesaugt, die Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und anschließend unter der Verwendung von Trypsin/EDTA-Lösung, welches den Flaschenboden bedeckte, im Brutschrank für fünf Minuten kultiviert. Danach wurden die durch die Trypsin/EDTA-Lösung jetzt nicht mehr adhärennten Zellen in Medium aufgenommen und im entsprechenden Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Ein angefeuchtetes Deckgläschen wurde auf die Neubauer-Zählkammer gedrückt, bis Newtonsche Ringe sichtbar wurden. Anschließend wurden 10 µL einer Mischung aus Zellsuspension und Trypan-Blau (Mischungsverhältnis zwischen 1:2 und 1:10) unter das Deckgläschen pipettiert und mithilfe eines Lichtmikroskops die 64 Grundquadrate der vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Zahl gezählter Zellen} \times 10^4 \times 0,25 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/mL}$$

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen von Zelllinien geerntet und gezählt (siehe 2.2.1); PBMC nach Ficoll-Aufreinigung wurden nur gezählt. Nach Zentrifugation (300g für sieben Minuten) wurden die Zellen (5×10^6 Zellen/mL bei Tumorzelllinien,

5×10^7 Zellen/mL bei PBMC) in 900 μ L des entsprechenden Mediums resuspendiert und mit 100 μ L DMSO in ein Kryokonservierungsröhrchen verbracht. Diese wurden in einer Kryokonservierungshilfe über Nacht bei -80 °C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingelagert wurden.

Beim Auftauen wurden die Kryokonservierungsröhrchen für ca. eine Minute im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und sofort folgend in etwa 10mL des entsprechenden Mediums überführt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (300g für sieben Minuten), der Überstand mittels Vakuumabsaugsystem abgesaugt und die Zellen in der gewünschten Konzentration resuspendiert.

2.2.2 Isolierung von PBMC aus Blutprodukten

Die Aufreinigung erfolgte mit Leucosep-Röhrchen und Ficoll-PaqueTM Plus Separationsmedium. 15,3mL des Separationsmediums wurden in die Leucosep-Röhrchen eingefüllt und bei 1000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden bis zu 30mL des Blutproduktes in die obere Fraktion der Leucosep-Röhrchen eingefüllt und bei 1000g für zehn Minuten im Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Das Ernten der angereicherten Zellfraktion erfolgte durch Überführen mittels Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen. Nach Auffüllen des Röhrchens mit PBS wurde für zehn Minuten bei 250g zentrifugiert. Folgend wurde der Überstand durch Vakuumabsaugsystem entfernt, das Zellpellet in bis zu drei Milliliter Lysepuffer suspendiert und für fünf Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Resuspendieren in PBS und Zentrifugieren wurden die gewonnenen PBMC in Kulturmedium überführt oder eingefroren.

2.2.3 Gemischte Lymphozyten-Tumorzellkultur zur Stimulation von Lymphozyten

Um die durch die Ficoll-Anreicherung gewonnenen PBMC zu stimulieren, wurden Lymphozyten (5×10^6) auf Tumorzellen der Linie A673 (1×10^6) kultiviert. Dies geschah in 6-Loch-Platten. Medium war normales Kulturmedium (5mL pro Vertiefung). Wurde der Kultur IL-2 zugesetzt, so handelte es sich um 100U/mL Kulturmedium.

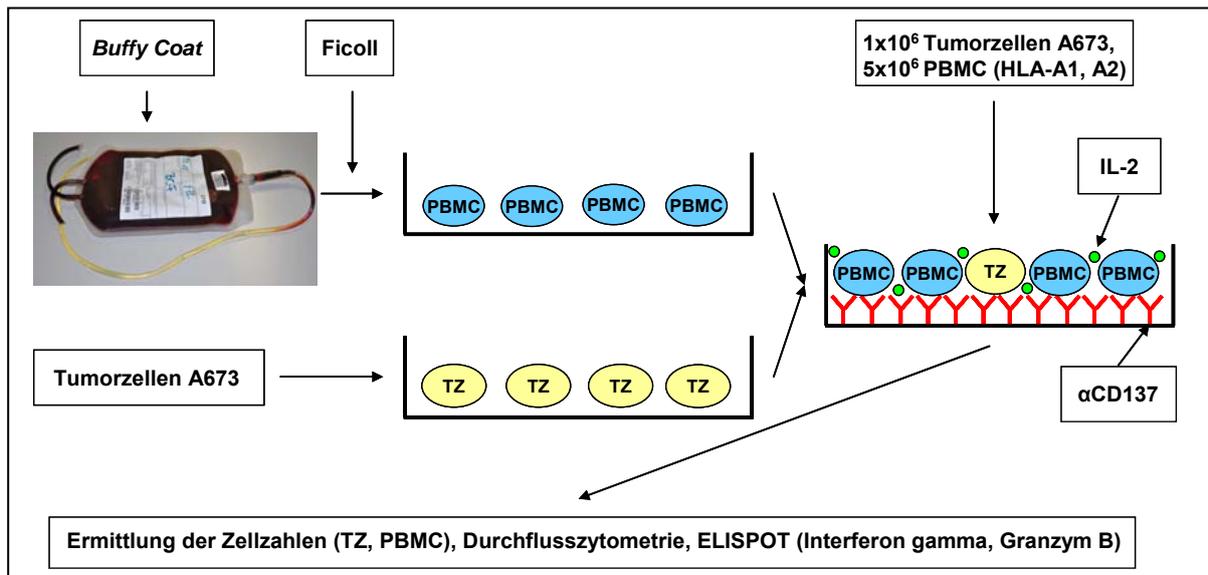


Abb. 2. Schema des Versuchsansatzes. Dargestellt ist das Schema des Versuchsansatzes mit IL-2 und Antikörper αCD137. Nach Ficoll wurden PBMC mit Tumorzellen der Linie A673 (TZ) in Anwesenheit des Antikörpers αCD137 und IL-2 kultiviert und nach fünf Tagen Untersuchungen zur Auswertung (Zellzahlen, Durchflusszytometrie, ELISPOT) zugeführt.

Kam der Antikörper αCD137 (26G6) zum Einsatz, wurden die Vertiefungen der 6-Loch-Platten über Nacht mit einer Antikörperlösung (10 µg/mL PBS) beschichtet. Wurden Tumorzellen der Linien SBVGA1, SBVGA3 oder A673-4-1BBL zugesetzt, so waren es (5×10^5). Außerdem waren die Zellen der Linien SBVGA1, SBVGA3 und A673-4-1BBL mit 90Gy bestrahlt.

Zu den im Kapitel 3 (Ergebnisse) näher beschriebenen Zeitpunkten wurden adhärenz und in Suspension befindliche Zellen separat geerntet und weiteren Untersuchungen zugeführt.

Bestrahlung von Tumorzellen

Die Bestrahlung erfolgte im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch freundliche Unterstützung der Mitarbeiter.

Die zu bestrahlenden Zellen wurden geerntet, gezählt und in einem Zentrifugenröhrchen in gewünschter Konzentration im entsprechenden Medium resuspendiert. In der Bestrahlungsanlage (Strahlungsquelle ¹³⁷Cs, Halbwertszeit 30 Jahre) wurden die Zellen in drei Zyklen zu je 30Gy bestrahlt. Die Anzahl der Zyklen ergab sich durch die Programmierung der Bestrahlungsanlage.

2.2.4 Durchflusszytometrische Analyse

Die für die Durchflusszytometrie bestimmten Zellen (ca. $0,5-1 \times 10^6$ Zellen) wurden geerntet, abzentrifugiert und in einem FACS-Röhrchen in 100 μ L PBS resuspendiert. In diese Röhrchen wurden 20 μ L einer entsprechenden Antikörperlösung zugesetzt und die erhaltene Antikörper-Zellsuspension für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit 1mL PBS gewaschen, bei 300g abzentrifugiert und in 0,5mL PBS resuspendiert. Es folgte die Messung am Durchflusszytometer (FACScan) mit Hilfe der Software CellQuestPro, BD Biosciences.

2.2.5 MACS-Separation von Zellen der Linie A673-4-1BBL

Die Durchführung der Aufreinigung von Zellen der Linie A673-4-1BBL orientierte sich am Herstellerprotokoll von Miltenyi Biotec zur magnetischen Aufreinigung mithilfe Anti-PE *MicroBeads*. 1×10^7 Zellen der Linie A673-4-1BBL wurden mit 10 μ L eines PE gefärbten Antikörpers gegen CD137L gefärbt und anschließend mit 20 μ L Anti-PE *MicroBeads* markiert. Mittels einer Säule zur magnetischen Separation (Größe LS) und dem MACS-Separator erfolgte die Aufreinigung der Zellen. Ein Teil der selektierten Zellen wurden zur Überprüfung der Transfektionsrate der Durchflusszytometrie zugeführt.

2.2.6 IL-2 ELISA

Zur Überprüfung der IL-2-Sekretion der Zellen der Linie SBVGA1 wurde eine ELISA-Untersuchung durchgeführt. Die Verrichtung des Experiments richtete sich nach den Angaben des Herstellers (R&D Systems GmbH, Wiesbaden). Bei zwei verschiedenen Konzentrationen (2×10^5 Zellen/mL Kulturmedium und 1×10^6 Zellen/mL Kulturmedium) von Zellen der Linie SBVGA1 (IL-2-transgen) wurden nach 24h Inkubation 100 μ L Überstand abgenommen und in eine mit Antikörper gegen IL-2 beschichteten Mikrotiterplatte des *Immunoassay-Kits* der IL-2-Detektion verbracht.

Nach Entwicklung und Stoppen der ELISA-Reaktion wurden die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 630nm) gemessen.

Die Konzentration an IL-2 wurde mithilfe der Berechnung der linearen Funktion ($y=f(x)+n$) der Eichkurve (Standardkurve) an den jeweiligen Abschnitten ermittelt. Die

Anstiege (f) der Abschnitte der Eichkurve wurden aus den benachbarten Koordinaten berechnet.

2.2.7 BrdU Proliferationstest

Die Durchführung des BrdU-Proliferationstests (Bromdesoxyuridin) richtete sich nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim). 5×10^6 PBMC eines nichttypisierten Spenders wurden nach Ficoll mit 5mL Kulturmedium pro Vertiefung in 6-Loch-Platten für fünf Tage inkubiert. Zur Stimulierung kamen der Antikörper α CD137 und IL-2 (100U/mL) zur Anwendung. Bei den Ansätzen mit dem Antikörper gegen CD137 wurden die Vertiefungen der Platten über Nacht bei 4°C mit Antikörperlösung (10 μ g α CD137/mL) beschichtet.

Nach fünf Tagen Inkubation wurden pro Ansatz drei Mal 1×10^5 PBMC auf drei Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verteilt (Triplets) und entsprechend den Herstellerangaben (Roche, Mannheim) mit BrdU versehen. Nach fünf Stunden Inkubation wurden im Mikrotiterplatten-Reader die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 630nm) gemessen.

2.2.8 Interferon gamma-ELISPOT , Granzym B-ELISPOT

Mit der ELISPOT-Untersuchung wurde die Sekretion von Interferon gamma und Granzyme B bei aktivierten T-Zellen und NK-Zellen identifiziert und quantifiziert. Die Wahl der Methode zum Nachweis der Zytokinsekretion von T-Zellen fiel auf die ELISPOT-Untersuchung, weil diese eine Möglichkeit mit hoher Spezifität und Sensitivität zum Nachweis zytokinproduzierender Zellen darstellt.

Eine ImmunoSpot™ ELISPOT Platte wurde über Nacht mit 100 μ L eines humanen IFN gamma- oder Granzym B-Antikörpers in PBS (Konzentration 5,0 μ g pro Milliliter) pro Vertiefung bestückt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Antikörperlösung abgeschüttet und 200 μ L Kulturmedium pro Vertiefung dazu gegeben; die Platte wurde im Brutschrank für zwei Stunden inkubiert. Dieser Schritt erfolgt zur Minimierung von unspezifischer Antikörperbindung.

Die Restimulation der PBMCs aus dem Überstand der gemischten Lymphozyten-Tumorzellkultur (MLR) erfolgt mit drei verschiedenen Tumorzelllinien: die Tumorzelllinie A673 (wurde bei der MLR verwendet), die Zelllinie SK-N-MC (Ewing-

Tumor-Familie) und die Zelllinie SH-SY5Y (Neuroblastom). Die Tumorzellen wurden geerntet, gezählt und in einem Verhältnis von 1×10^5 Zellen/mL resuspendiert. Die PBMC aus den Überständen der MLR wurden abzentrifugiert (zehn Minuten bei 300g) und in Kulturmedium resuspendiert (Verhältnis 5×10^5 Zellen/mL). Danach wurden jeweils drei Vertiefungen mit jeder Kombination von PBMC und Tumorzellen (je 100 μ L Zellsuspension) gefüllt und die Platte anschließend für fünf Stunden und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Nach Abschütten der Zellsuspensionen wurde alle Vertiefungen der Platte zweimalig mit deionisiertem Wasser (200 μ L pro Vertiefung) und zweimalig mit Waschpuffer 1 (200 μ L pro Vertiefung) gewaschen und anschließend mit 100 μ L eines biotinyliertem humanen Antikörpers gegen IFN gamma oder Granzym B in PBS (Konzentration 0,5mg pro Milliliter) befüllt. Nach Inkubation von zwei Stunden erfolgte zweifaches Waschen mit Waschpuffer 1 (200 μ L pro Vertiefung) und danach die Befüllung der Vertiefungen mit 100 μ L einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettich-Peroxidase. Wieder wurde die Platte für eine Stunde inkubiert, nachfolgend zwei Mal mit Waschpuffer 1 (200 μ L pro Vertiefung), zwei Mal mit PBS (200 μ L pro Vertiefung) gewaschen und anschließend mit 100 μ L der AEC-Substrat Lösung bestückt. Die Entwicklung der Farbreaktion wurde mit 100 μ L deionisiertem Wasser gestoppt und die verdünnte Entwicklerlösung abgeschüttet.

Nach Trocknen der Platte wurden die Böden der Vertiefungen auf einer Abdeckfolie ausgestanzt und die Spots mit dem ELISPOT-Mikroskop, -Kamera (Carl Zeiss) und Computer (Software KS ELISPOT) gemessen und ausgewertet. Von jedem Messwert der gezählten Spots wurde der Mittelwert aus einer Mediumkontrolle (Leerwert) abgezogen. Aus diesen berechneten Werten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen ermittelt und in der Graphik dargestellt.

2.2.9 Tierversuche

Haltung von Mäusen als Versuchstiere

Die Tierversuche dieser Arbeit wurden mit Mäusen vom NOD/SCID-Typ durchgeführt. Alle die Haltung betreffenden Begebenheiten wurden nach den Anforderungen des geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das Gesamtexperiment wurde vom Landesverwaltungsamt genehmigt.

Die Betreuung der Tiere oblag den Mitarbeiterinnen des Tierlabors des Zentrums für Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Käfige der Mäuse waren individuell ventilierte Boxen und bestanden aus Polycarbonat oder Polysulfon, die Grundfläche betrug 530cm². Angeschlossen waren die Boxen an ein Regalsystem mit Belüftungseinheit, um den hohen hygienischen Anforderungen bei der Haltung von NOD/SCID-Mäusen gerecht zu werden. Die Regalsysteme mit den Boxen befanden sich in einem Raum mit konstanter Temperatur von 20-21°C, die Luftfeuchtigkeit betrug ca. 54%; es herrschte ein jahreszeitenunabhängiger Tag-Nacht-Rhythmus (jeweils zwölf Stunden hell und dunkel). Das Streu (autoklaviert) und die Verbandswatte (autoklaviert) der Käfige wurden einmal pro Woche gewechselt. Zum gleichen Zeitpunkt wurde das Futter (Altromin 1324-sterilisiert) aufgefüllt und die Trinkflaschen mit autoklaviertem Wasser gewechselt. Gegebenenfalls wurden die Nahrungsvorräte schon eher erneuert.

Handhabung von Mäusen

Alle Handhabungen mit den Tieren wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt, Schutzkleidung (steriler Kittel, Mundschutz und sterile Handschuhe) wurden vom Untersuchenden getragen. Alle Gegenstände und Materialien, die mit den Mäusen in Berührung kamen, waren sterile Einmalgegenstände oder autoklaviert.

Bei Untersuchungen, Markierungen und Applikationen wurden die Mäuse vorsichtig auf das Gitter des Käfigs gesetzt. Damit sich die Maus der Prozedur nicht entziehen konnte, wurde das Fell des Tieres am Nacken mit Daumen und Zeigefinger gehalten und leicht gespannt. Dadurch war der Bewegungsfreiraum des Kopfes etwas eingeschränkt, die Maus hatte aber sicheren Halt auf dem Käfig. Das Untersuchen, Markieren und Injizieren konnte rasch und schonend erfolgen.

Injektion von Zellen

Vor der Injektion wurde die betreffende Hautpartie mit 80%-igem Alkohol desinfiziert. Tumorzellen wurden subkutan in den Nacken der Mäuse injiziert, PBMC, IL-2 und Antikörper α CD137 wurde intraperitoneal appliziert. Die Tumorzellen wurden vorher mit X-VIVO 15 kultiviert. Medium bei allen Injektionen war steriles PBS, das injizierte Volumen betrug 100 μ L.

Kontrolle des Tumorwachstums

Nach fünf bis sieben Tagen wurden die Tiere alle zwei Tage optisch und durch Palpation auf einen Tumor im Bereich des Nackens untersucht. War ein Tumor sichtbar oder tastbar, wurde die Größe des Tumors mithilfe einer Schieblehre bestimmt. Aus dem längsten Durchmesser (L) und dem im rechten Winkel dazu stehenden Durchmesser (H) wurde unter Verwendung der Formel

$$V = \frac{L \times H^2}{2}$$

das Volumen berechnet [Staege MS *et al.* (2004)].

Nach dem herbeigeführten Exitus der Maus wurde der Tumor entnommen und definitiv vermessen.

Kriterien der Versuchsdauer

Da die Tumoren der Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten anfangen zu wachsen und unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten hatten, war es nicht möglich, einen definitiven Versuchsendpunkt für alle Tiere von Beginn an fest zu legen. Betrug der größte Durchmesser mehr als 2cm, wurde der Versuch für das entsprechende Tier beendet. Würde eine zu hohe Belastung des Tumors am Tier festgestellt, wie beispielweise artfremdes Verhalten, Fremd- oder Autoaggression, anhaltende Teilnahmslosigkeit, Nahrungsverweigerung, rapider Gewichtsverlust, Bewegungslosigkeit, waren auch das Kriterien den Versuch für die Maus vorzeitig zu beenden. Nicht alle Tiere entwickelten während des Experiments einen Tumor. Auch diese Tiere wurden zusammen mit den letzten Tieren, dessen Tumor nach Ablauf der maximalen Versuchsdauer eine bestimmte Größe erreicht hatte, getötet. Die maximale Versuchsdauer betrug sechs Wochen.

Untersuchung der Tiere nach Ende des Experiments

Erfüllten die Tiere ein Kriterium für die Beendigung des Experiments oder wurde das Experiment insgesamt beendet, erfolgte eine Narkose durch Isofluran. Dabei wurde die Maus in ein verschliessbares Glasgefäß mit erhöhtem Boden, welcher mit Watte ausgelegt war, verbracht. Unter dem erhöhten Boden befanden sich ca. 10mL Isofluran, welches sich nicht im Kontakt mit der Maus befand. Nach Schliessen des Gefäßes zeigte die inhalative Wirkung von Isofluran rasch seine Wirkung (Schnappatmung). Vor Eintritt des Todes wurde der Maus mithilfe einer

heparinisierten Kapillare retrobulbär Blut entnommen und nachfolgend eine Dislokation von Wirbelkörpern durchgeführt. Nach Eintreten des Todes wurde das Tier auf einer Styroporunterlage fixiert. Zur Freilegung des Tumors wurde das Fell distal des Tumors geöffnet, womit es leicht von der Unterhaut ablösbar war. Der Tumor wurde entnommen und in ein mit 10mL PBS präpariertes Zentrifugenröhrchen verbracht. Anschließend wurde die Maus auf den Rücken gedreht und erneut befestigt. Das Öffnen des Peritoneums erfolgte mit einer Schere. Der Situs wurde optisch nach Metastasen untersucht und die Milz entnommen. Neben dem Feststellen der definitiven Tumorgöße wurden die Zellen der Milz (nach Zerkleinern der Milz und Sieben der Milzteile durch ein 70 µm Zellsieb) zusammen mit dem Blut der Maus mit durchflusszytometrischer Technik auf humane PBMC untersucht.

2.2.10 Mikroarray-Analyse

Das Protokoll, welches bei der Mikroarray-Analyse zur Anwendung kam, orientierte sich an den vom Hersteller gemachten Angaben (Affymetrix) und an Modifikationen von Herrn Dr. Staege (Universität Halle).

Isolation, Aufreinigung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Isolation (mittels TRIzol, Invitrogen) und die Aufreinigung (mithilfe *RNeasy Mini Kit*, Qiagen) der RNA erfolgte nach Angaben der Hersteller. Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde eine native Gelelektrophorese in neutralen Agarosegelen (1% Agarose in 1% MOPS-Puffer mit Ethidiumbromid-Lösung) durchgeführt.

Synthese der cDNA

Zu Beginn wurde 1µL eines T7-(dT)₂₄-Primers (Konzentration 1µg/µL) zur erhaltenen RNA (eingestellte Konzentration: 10µg/µL) dazu gegeben und bei 70°C für zehn Minuten inkubiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurde ein Reaktionsgemisch aus 4µL *First Strand Buffer* (5x konzentriert), 2µL DTT (0,1M), 1µL dNTP-Mix (10mM) und 2µL der reversen Transkriptase (Superscript II RT) hinzu gegeben und das Gemisch anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde dem Ansatz 130µL des Zweit-Strang-Gemisches, bestehend aus 30µL *Second Strand Buffer* (5x konzentriert), 3µL dNTP-Mix (10mM), 1µL *E.coli* Ligase (10U/µL), 4µL *E.coli* Polymerase I (10U/µL), 1µL RNaseH (2U/µL) und 91µL DEPC-

Wasser hinzu gefügt und das Gemisch bei 16°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10µL einer 0,5M EDTA-Lösung gestoppt. Die Aufreinigung der cDNA wurde durch Zugabe von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die gereinigte cDNA wurde mit dem äquivalenten Volumen Ammoniumacetat, Ethanol (96 Vol.%, 2,5 Volumenteile) und 0,5µL linearem Acrylamid vermengt. Die ausgefällte cDNA wurde anschließend einmal bei 16°C für 30 Minuten zentrifugiert und einmalig mit 0,5mL kaltem Ethanol (80%) gewaschen. Danach wurde die cDNA getrocknet und in 3µL DEPC-Wasser resuspendiert.

***In vitro*-Transkription und Fragmentierung der cRNA**

Die *in vitro*-Transkription der hergestellten cDNA erfolgte mit Hilfe des Kits MEGAscript T7 (Ambion, USA), 3,75µL Biotin-11CTP und 3,75µL Biotin-16UTP. Nach sechs Stunden Inkubation bei 37°C wurde die synthetisierte cRNA mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt und in 50µL DEPC-Wasser eluiert. Durch Zugabe von 4µL Fragmentierungspuffer in 16µL der Biotin-markierten cRNA (1µg/µL) und Inkubation für 35 Minuten bei 95°C erfolgte die Fragmentierung.

Hybridisierung

Das Protokoll, welches bei der Hybridisierung der Mikroarray-Genchips zur Anwendung kam, richtete sich nach den Angaben des Herstellers (Affymetrix).

Analyse der Genexpressionsdaten

Die bei der primären Bilderfassung gewonnenen Daten wurden mithilfe der Software *Microarray Suite* 5.0 auf einen Wert von 500 skaliert und in eine Textdatei überführt. Die dadurch erhaltenen Werte wurden anschließend in eine Microsoft Excel Datei überführt. Verglichen wurden die Ergebnisse (zwei verschiedenen Messungen; vor und nach Antikörperverstärkung) der Intensionsmessungen der Ansätze mit IL-2 in Kombination mit dem Antikörper αCD137 mit dem Ansatz nur mit IL-2. Nicht betrachtet wurden die Ergebnisse, bei denen die Intensitäten beider Vergleichswerte unter 100 lagen. Den dadurch ermittelten Genen wurden unter Verwendung der Fachliteratur Funktionen zugeordnet, die im Zusammenhang mit den beschriebenen Ergebnissen (siehe Ergebnisse) stehen könnten. Weitere statistische Auswertungen erfolgten wie im Kapitel 2.2.11 beschrieben.

2.2.11 Statistische Auswertung von Messergebnissen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden statistische Mittel zur Darstellung von Ergebnissen verwendet. Die gezeigten Mittelwerte von Messergebnissen berechneten sich nach folgender Formel:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Zusätzlich werden in einigen Abbildungen Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken gezeigt. Die Standardabweichungen berechneten sich nach der Formel:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Signifikanzberechnungen wurden bei allen *in vitro*-Experimenten unter Berücksichtigung des Student'schen T-Tests für zwei unabhängige Zufallsstichproben durchgeführt. Die Ermittlung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzberechnungen der *in vitro*-Experimente erfolgte mithilfe des Programms Microsoft Excel (Microsoft).

Bei den Auswertungen der Tierversuche wurden Signifikanzberechnungen nach Breslow mittels der Software SPSS durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Stimulation von PBMC mit IL-2 und Antikörper α CD137 *in vitro*

Ziel dieses Experiments war, Unterschiede zwischen verschiedenen Stimulationen von Lymphozyten zu erfassen. Stimulanzen der humanen PBMC waren humanes rekombinantes IL-2 (100U/mL), ein Antikörper gegen CD137 und die Kombination aus beiden. Als Negativkontrolle diente bei den Versuchen eine Kultur der PBMC nur mit Kulturmedium. Dabei wurden 6-Loch-Platten, wie im Kapitel Methoden beschrieben, mit dem Antikörper α CD137 über Nacht beschichtet. Vertiefungen ohne Antikörper enthielten über Nacht anstatt der Antikörperlösung PBS. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung oder das PBS abgesaugt und 5mL Kulturmedium mit PBMC (HLA-A1, A2) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro mL Kulturmedium in jede Vertiefung verbracht. Dort, wo vorgesehen, wurde 100U/mL IL-2 dazu gegeben. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die PBMC durch Abspülen geerntet, gezählt und für die Messung mittels Durchflusszytometrie vorbereitet (siehe Kapitel Methoden).

3.1.1 Ergebnisse der Zellzahlen und durchflusszytometrischen Untersuchungen

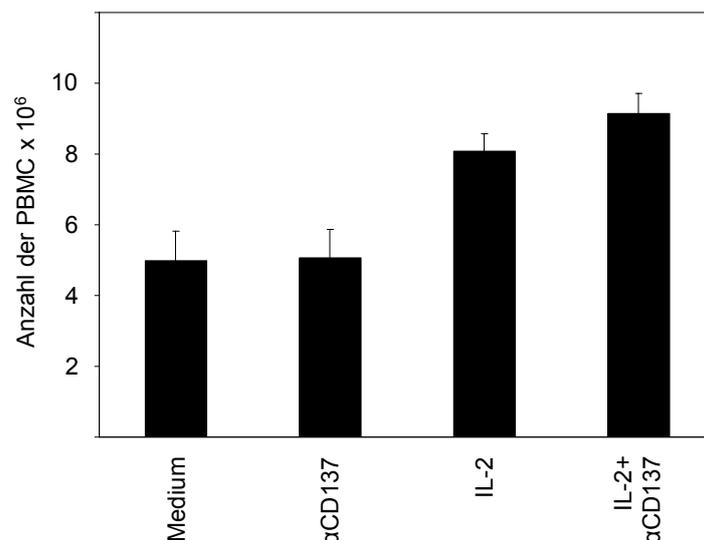


Abb. 3. Stimulation mit IL-2 und Antikörper α CD137 erhöht die Anzahl der PBMC. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der vitalen PBMC der verschiedenen Versuchsansätze aus drei unterschiedlichen Experimenten.

Die Abbildung 3 zeigt die Auswertung und graphische Darstellung der Zellzahlen. Die Ergebnisse zeigten, dass nach fünf Tagen in den Ansätzen mit IL-2 mehr PBMC vital waren (Mittelwerte $8,1 \times 10^6$ beim Ansatz mit IL-2 und $9,1 \times 10^6$ beim Ansatz mit IL-2 in Kombination mit dem Antikörper α CD137), als in den Ansätzen mit Medium (Mittelwert $5,0 \times 10^6$) oder nur mit dem Antikörper gegen CD137 ($5,1 \times 10^6$).

Abbildung 4 zeigt exemplarisch die verschiedenen Versuchsansätze im Vorwärts- und Seitwärtsstreuung bei der durchflusszytometrischen Untersuchung. Eine starke Aktivierung der Ansätze mit IL-2 wird durch die größere Streuung deutlich.

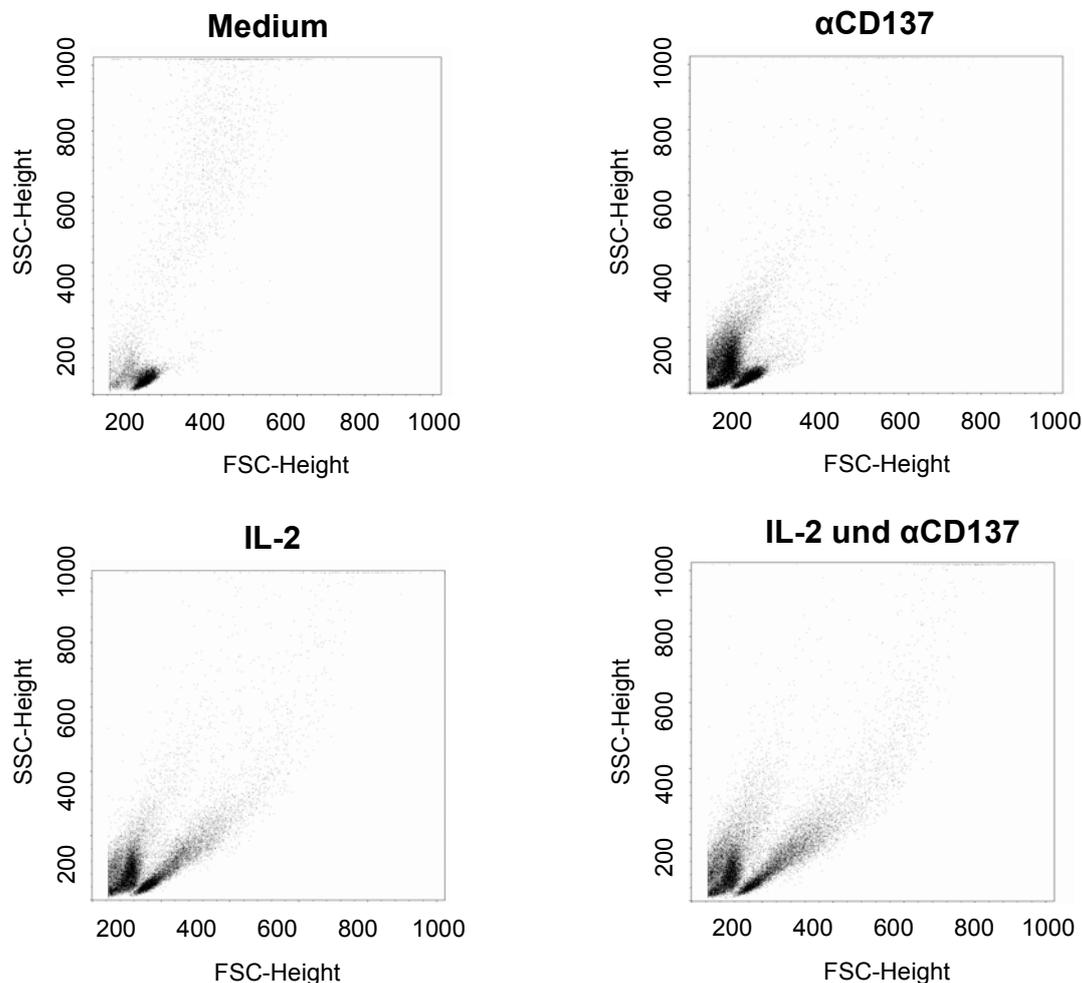


Abb. 4. Starke Aktivierung der PBMC durch IL-2 und Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2. Vorwärts- und Seitwärtsstreuung der PBMC nach fünf Tagen (ausgewählte Abbildungen eines Experiments). Erkennbar wurde die gesteigerte Aktivierung der PBMC durch Stimulation mit IL-2 (mit und ohne Antikörper α CD137) anhand der größeren Streuung im Diagramm.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung dargestellt. Analysiert wurden die relativen Anteile an CD4-positiven und CD8-

positiven T-Zellen, CD56-positiven NK-Zellen, CD3/56-positiven Zellen und die Anteile der CD4- und CD8-positiven T-Zellen, die zusätzlich CD137-positiv waren. Zur Analyse wurden alle der sich im Lymphozytenfenster befindlichen Ereignisse herangezogen. Deutlich wurde, dass sich die Mittelwerte der relativen Anteile der CD4- und CD8-positiven T-Zellen der untersuchten Ansätze nur wenig unterschieden. Bei den CD4-positiven T-Zellen wurden Werte zwischen 27,35% (Ansatz mit IL-2 und Antikörper α CD137) und 33,2% (Ansatz mit Antikörper α CD137) ermittelt. Die Analyse der CD8-positiven T-Zellen erbrachte Mittelwerte zwischen 25,95% (Ansatz mit IL-2 und Antikörper α CD137) und 28,6% (Ansatz mit Antikörper α CD137). Ähnlich verhielt es sich mit dem Anteil der gemessenen NK-Zellen. Die Mittelwerte lagen hier zwischen 6,2% (Ansatz mit Antikörper α CD137) und 7,05% (Ansatz mit IL-2 und Antikörper α CD137).

Tabelle 4. Erhöhter Anteil an CD3/CD56-positiven Zellen und erhöhte Expression von CD137 auf T-Zellen in den Ansätzen mit IL-2 und IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137. Gezeigt sind die Ergebnisse der FACS-Analyse zwei unterschiedlicher Experimente der Ansätze ohne Tumorzellen in Prozent der Zellen im Lymphozytenfenster.

	Medium	α CD137	IL-2	IL-2 + α CD137
CD3/CD4 Exp. 1	29,5	34,4	29,2	27,4
Exp. 2	33,6	32	30	27,3
Mittelwert	31,55	33,2	29,6	27,35
CD3/CD4/CD137				
Exp. 1	5,4	2,9	9,7	10,3
Exp. 2	2,9	4,4	9,9	14,5
Mittelwert	4,15	3,65	9,8	12,4
CD3/CD8 Exp. 1	28,2	27,9	26,3	25,8
Exp. 2	24,4	29,3	25,5	26,1
Mittelwert	26,3	28,6	25,9	25,95
CD3/CD8/CD137				
Exp. 1	1,2	1,1	13,4	13,8
Exp. 2	1,8	1,7	12,1	18,3
Mittelwert	1,5	1,4	12,75	16,05
CD56 Exp. 1	6,5	6,5	6,5	6,6
Exp. 2	7	5,9	6	7,5
Mittelwert	6,75	6,2	6,25	7,05
CD3/CD56 Exp. 1	2,2	3,3	6,4	8,1
Exp. 2	1,8	1,2	7	11,8
Mittelwert	2	2,25	6,7	9,95

Die CD3/CD56-positiven Zellen waren in der Relation am höchsten im Ansatz mit dem Antikörper IL-2 und Antikörper α CD137 (Mittelwert 9,95%). Im Vergleich dazu

waren beim Ansatz mit IL-2 6,7% der Zellen CD3/CD56-positiv, beim Ansatz nur mit dem Antikörper α CD137 2,25%. Sowohl bei den T-Helferzellen (CD4-positiv) als auch bei den zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) war beim Ansatz mit Antikörper α CD137 und IL-2 in Kombination eine deutlich höhere Rate an CD137 zu verzeichnen (Mittelwerte 12,4% und 16,05%) als beim Vergleichsansatz mit IL-2 (Mittelwerte 9,8% und 12,75%). Die Kontrollansätze nur mit Antikörper α CD137 oder Medium zeigten geringere Mittelwerte.

3.1.2 Ergebnisse des BrdU-Proliferationstests

Die in Abbildung 5 dargestellten Experimente zeigen, dass eine Stimulierung von PBMC mit einem Antikörper gegen CD137 die Proliferation im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht verstärkte. Dagegen konnte eine Inkubation mit IL-2 die Extinktion deutlich steigern, somit eine stärkere Proliferation vorweisen. Den höchsten Proliferationswert erreichte der Ansatz mit IL-2 in Kombination mit dem Antikörper α CD137, welcher signifikant ($p < 0,005$) höher war als der Wert des Vergleichsansatzes nur mit IL-2.

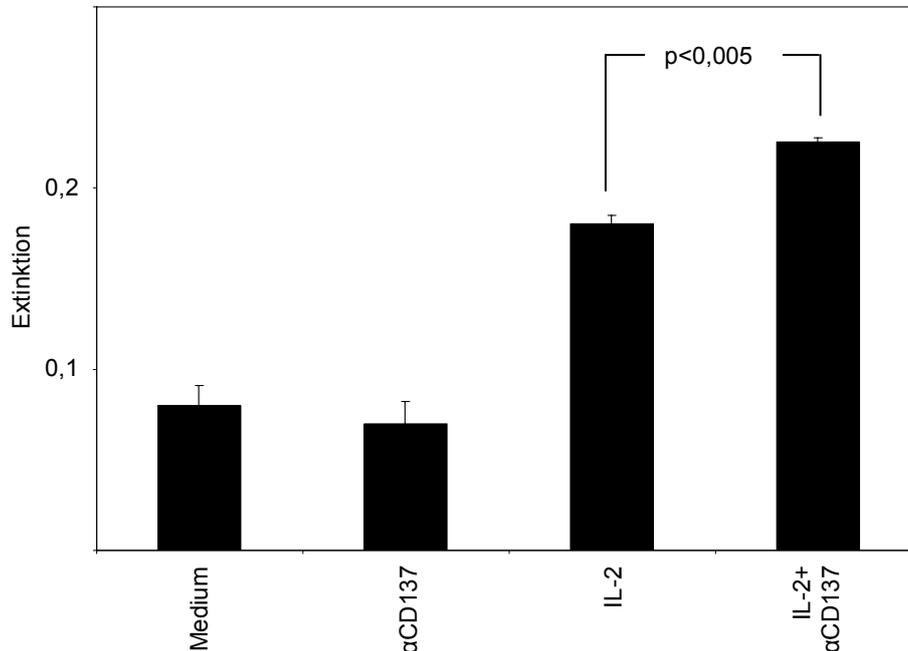


Abb. 5. Stimulation mit IL-2 und Antikörper α CD137 erhöht die Proliferation von PBMC. Gezeigt werden die Ergebnisse des Proliferationstests der PBMC mit BrdU nach 5 Tagen Inkubation. Die Auswertung erfolgte nach fünf Stunden Inkubation mit BrdU. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für drei Messwerte.

3.2 Stimulation von PBMC mit Tumorzellen in Kombination mit IL-2, IL-2-transgenen Tumorzellen, CD137L-transfizierten Tumorzellen und Antikörper α CD137 *in vitro*

Die folgenden Experimente bauten auf den im Kapitel 3.1 beschriebenen Versuchen auf. Die PBMC wurden in diesem Experiment mit Tumorzellen einer Tumorzelllinie der Ewing-Familie (A673) inkubiert. Neben dem bereits in 3.1 verwendeten humanen Antikörper α CD137 wurden auch CD137L-transfizierte Tumorzellen der gleichen Zelllinie (A673) verwendet (A673-4-1BBL). In Vorbereitung auf dieses Experiment wurde die Transfektionsrate der Zellen der Linie A673-4-1BBL bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2). Des Weiteren kamen IL-2-transgene Zellen der Linie SBVGA1 zur Anwendung. Das Zählen der Tumorzellen erfolgte nach vorsichtigem Ernten der sich in Suspension befindenden Zellen. Nachfolgend wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin/EDTA Lösung versetzt und nach zehnteiliger Inkubation im Brutschrank vorsichtig mit PBS ab gespült und gezählt.

3.2.1 IL-2-transfizierte Tumorzellen (SBVGA1) produzieren IL-2

Um die IL-2-Sekretion der Zellen der Linie SBVGA1 nachzuweisen wurde ein IL-2 *Immunoassay*-ELISA-Kit verwendet.

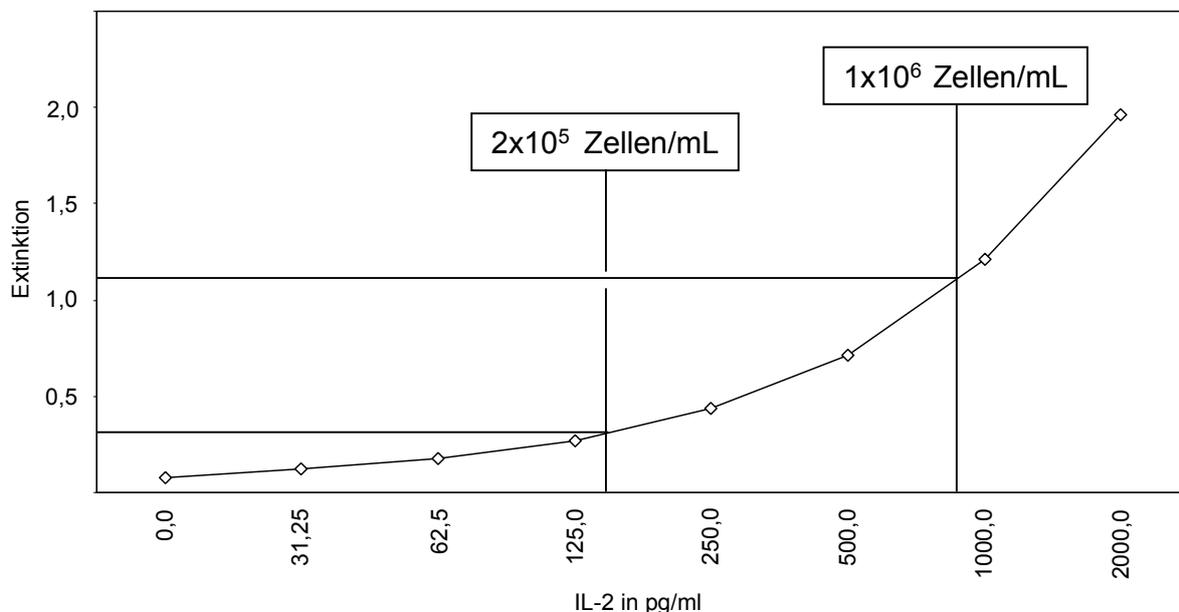


Abb. 6. IL-2-Produktion von Zellen der Linie SBVGA1. Graphisch dargestellt ist das Ergebnis der IL-2 *Immunoassay*-ELISA-Untersuchung zum Nachweis der IL-2-Sekretion der Zellen der Linie SBVGA1. Die Analyse der Überstände erfolgte nach 24h Inkubation.

Bei zwei verschiedenen Zellkonzentrationen (2×10^5 Zellen/mL und 1×10^6 Zellen/mL) wurde die IL-2-Sekretion in 24 Stunden ermittelt (siehe Kapitel 2.2.6 Material und Methoden). Im Ergebnis (siehe Abbildung 6) zeigte der Ansatz mit 2×10^5 Zellen/mL Kulturmedium eine Konzentration von 146 pg/mL IL-2 und der Ansatz mit 1×10^6 Zellen/mL Kulturmedium eine Konzentration von 871 pg/mL IL-2.

3.2.2 Nachweis von CD137L auf Zellen der Linie A673-4-1BBL

Um die Transfektionsrate der CD137L-positiven Zellen der Linie A673-4-1BBL zu erhöhen, wurden die Zellen mittels MACS-Separation positiv selektiert (siehe Kapitel Material und Methoden). Durch die Aufreinigung wurde eine Transfektionsrate von 60,95% erreicht (siehe Abbildung 7), die auch nach drei Wochen Zellkultur noch stabil war. Zu den jeweiligen Experimenten wurde die Transfektionsrate der Zellen überprüft (nicht gezeigt).

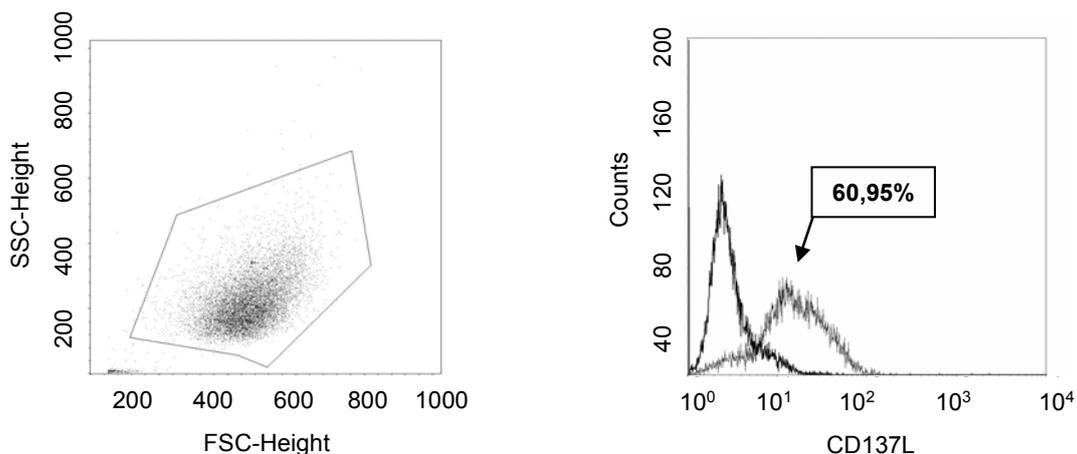


Abb. 7. Nachweis von CD137L auf Zellen der Linie A673-4-1BBL. Gezeigt wird die durchflusszytometrische Kontrolle der Transfektionsrate mit CD137L der Tumorzellen der Line A673-4-1BBL (im Vergleich Zellen der Linie A673).

3.2.3 Ergebnisse der Zellzahlen

Abbildung 8 zeigt eine drastisch reduzierte Tumorzellzahl beim Ansatz mit dem Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2 (Mittelwert $0,7 \times 10^6$), beim Ansatz mit Zellen der Tumorzelllinie A673-4-1BBL in Kombination mit IL-2 (Mittelwert $1,1 \times 10^6$) und auch im Ansatz mit IL-2 allein (Mittelwert $1,8 \times 10^6$). Der Antikörper α CD137 oder die Tumorzelllinie A673-4-1-BBL allein zeigten dagegen kaum Effekte auf die

Tumorzellzahl (Mittelwert $5,1 \times 10^6$) im Vergleich zum Ansatz nur mit Medium (Mittelwert $5,4 \times 10^6$) oder nur Tumorzellen ohne PBMC (Mittelwert $5,9 \times 10^6$).

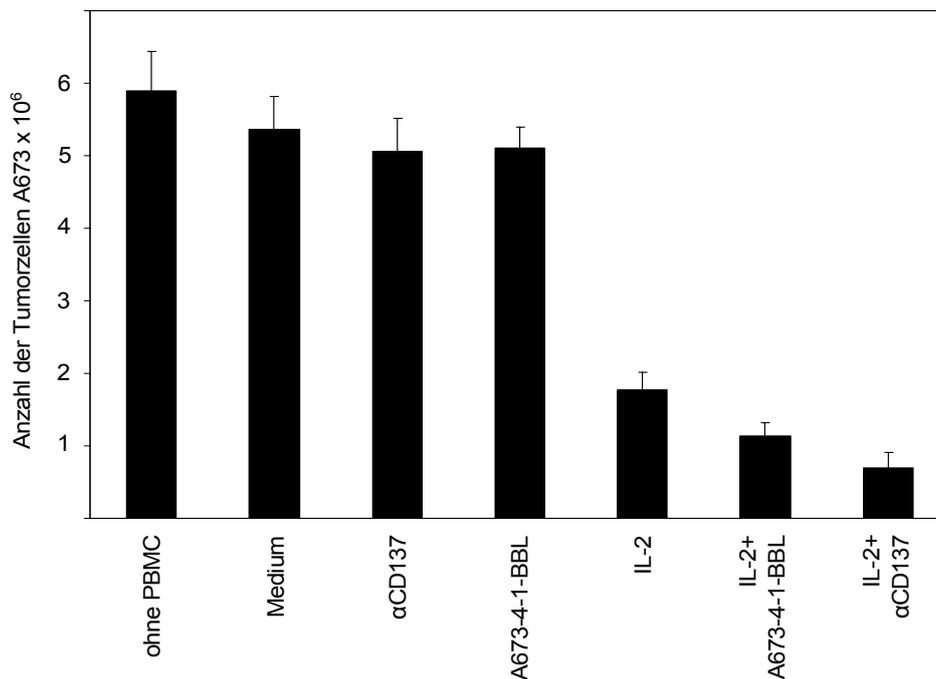


Abb. 8. Stimulation von PBMC mit IL-2 oder Antikörpern gegen CD137 bzw. CD137L-transfizierten Tumorzellen in Kombination mit IL-2 verringert die Tumorzellzahl. Gezeigt wird die Anzahl vitaler Tumorzellen der verschiedenen Ansätze nach fünf Tagen Inkubation. Zur Darstellung kommen Mittelwerte und Standardabweichungen drei unterschiedlicher Experimente.

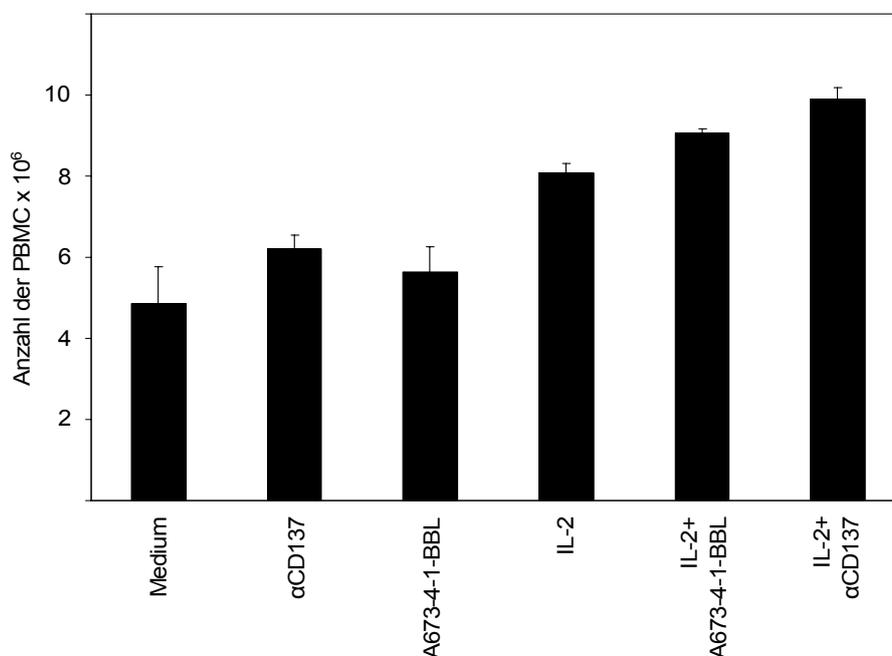


Abb. 9. Stimulation von PBMC mit IL-2 oder Antikörpern gegen CD137 bzw. CD137L-transfizierten Tumorzellen in Kombination mit IL-2 erhöht die Anzahl der PBMC. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der vitalen PBMC verschiedener Versuchsansätze von drei unterschiedlichen Experimenten.

Der Ansatz mit Antikörper α CD137 und IL-2 in Kombination hatte somit nur noch ca. 13% vitale Tumorzellen im Vergleich zum Kontrollansatz mit Medium und ca. 39% im Vergleich mit dem Ansatz mit IL-2 allein. Abbildung 10 zeigt repräsentative photographische Abbildungen der beschriebenen Ansätze nach Ernten der PBMC.

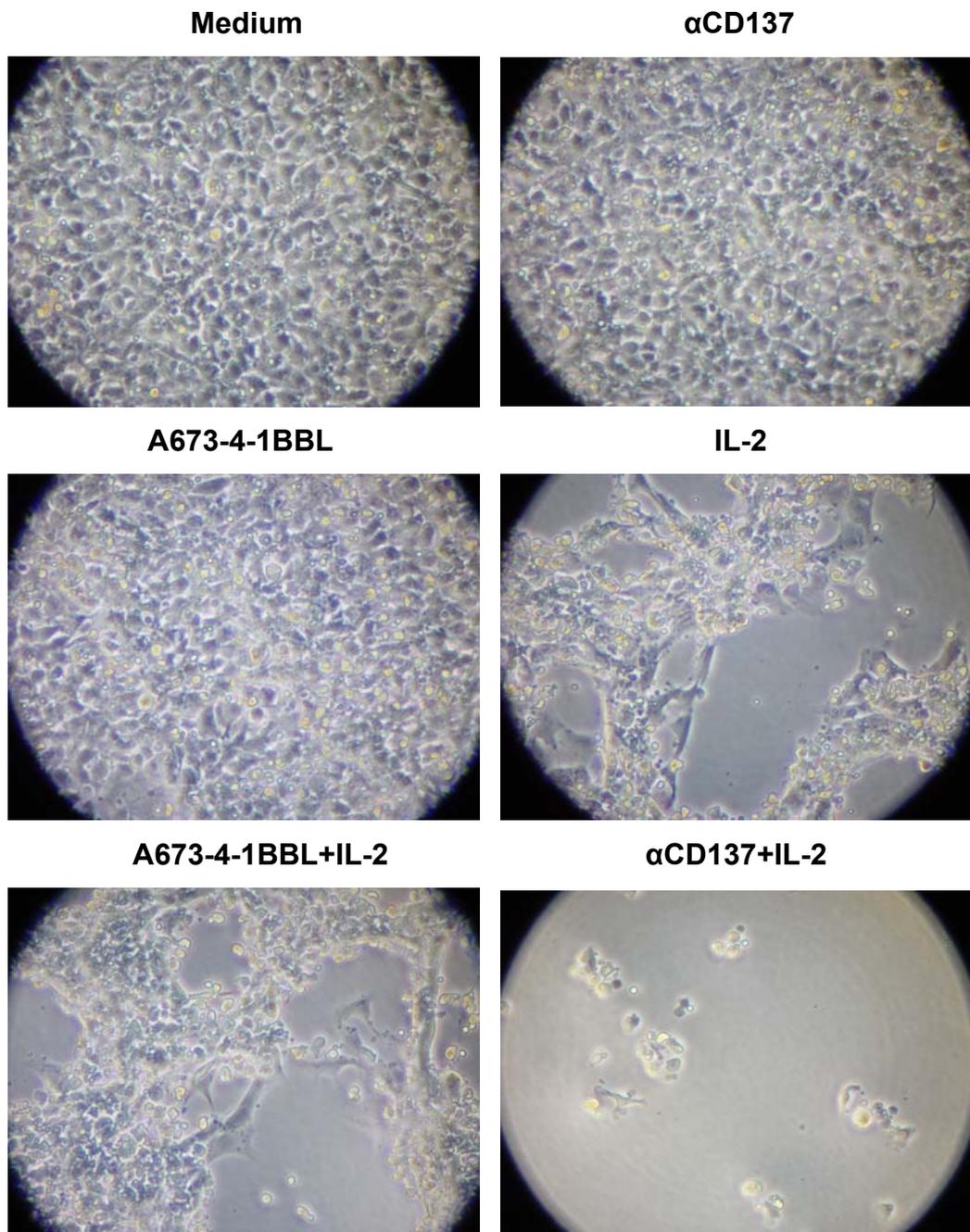


Abb. 10. Zerstörung von Tumorzellen durch Kostimulation mit dem Antikörper α CD137 und IL-2. Gezeigt werden Photos ausgewählter Ansätze von im Kapitel 3.2 beschriebenem Experiment. Die Aufnahmen erfolgten mittels Digitalkamera durch das Objektiv des Mikroskops und zeigen repräsentative Vertiefungen eines Experiments.

Die Analyse der PBMC (siehe Abbildung 9) zeigte die besten Effekte bezüglich der Zellproliferation und des Zellüberlebens in den Ansätzen mit dem Antikörper α CD137 (Mittelwert $9,9 \times 10^6$) und der Tumorzelllinie A673-4-1BBL (Mittelwert $9,1 \times 10^6$), beide in Kombination mit IL-2. Der Ansatz mit IL-2 allein erzielte im Mittelwert der drei Experimente eine Zellzahl von $8,1 \times 10^6$, die Ansätze mit dem Antikörper α CD137 allein (Mittelwert $6,2 \times 10^6$) oder mit den transfizierten Tumorzellen A673-4-1BBL (Mittelwert $5,6 \times 10^6$) zeigten kaum Unterschiede zum Ansatz nur mit Medium (Mittelwert $4,9 \times 10^6$).

3.2.4 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen

Tabelle 5 zeigt die Auswertungen der durchflusszytometrischen Untersuchungen zwei repräsentativer Experimente. Analysiert wurden die relativen Anteile an CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen, CD56-positiven NK-Zellen, CD3/56-positiven Zellen und der Anteil der CD4- und CD8-positiven Zellen, die zusätzlich CD137-positiv waren.

Ähnlich wie beim Versuch ohne Tumorzellen waren auch bei Inkubation mit Tumorzellen der Linie A673 die Anteile CD4- und CD8-positiver T-Zellen bei den unterschiedlichen Ansätzen ähnlich. Die CD4-positiven T-Zellen erreichten Anteile zwischen 26,15% (Medium) und 29,7% (IL-2 mit Antikörper α CD137). Bei den CD8-positiven T-Zellen bewegten sich die Mittelwerte zwischen 24,8% (IL-2) und 26,6% (A673-4-1BBL + IL-2). Unterschiedliche Ergebnisse erbrachte die Analyse der NK-Zellen. Erhöhte Anteile im Vergleich zeigten sich bei den Ansätzen mit A673-4-1BBL + IL-2 (12,65%), IL-2 (10,6%) und Antikörper α CD137 + IL-2 (10,2%); die Kontrollgruppen mit Medium, Antikörper α CD137 oder Zellen der Linie A673-4-1BBL erreichten Mittelwerte zwischen 5,65% und 7,05%. Die Analyse der CD3/CD56-positiven Zellen ergab im Vergleich erhöhte Mittelwerte bei den Ansätzen mit Antikörper α CD137 + IL-2 (8,75%) und Zellen der Linie A673-4-1BBL mit IL-2 (7,4%). Bei allen anderen Ansätzen wurden Mittelwerte zwischen 2,6% und 4,45% ermittelt. Die größten Unterschiede zeigten sich bei der Analyse der CD4- und CD8-positiven T-Zellen, die zusätzlich CD137 positiv waren. Der höchste Anteil der CD3/CD4/CD137-positiven Zellen wurde beim Ansatz mit Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2 gemessen (Mittelwert 12,25%). Auch die beiden anderen Ansätze mit IL-2 zeigten im Vergleich erhöhte Werte. In Kombination mit Zellen der

Linie A673-4-1BBL wurde ein Mittelwert von 11,0% ermittelt; der Ansatz nur mit IL-2 hatte einen Anteil von 7,35%. Die relativen Anteile der CD3/CD4/CD137-positiven Zellen aller anderen Ansätze waren zwischen 4,2% und 5,55%. Somit waren beim Ansatz mit Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2 ca. 67% mehr Zellen CD3/CD4/CD137-positiv als beim Ansatz mit IL-2 allein.

Tabelle 5. Erhöhter Anteil an potenziell zytotoxischen Zellen und erhöhte Expression von CD137 auf T-Zellen in den Ansätzen mit IL-2 und IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137 bzw. CD137L-transfizierten Tumorzellen. Gezeigt sind die Ergebnisse der FACS-Analyse zwei repräsentativer Experimente der Ansätze mit Tumorzellen.

	Medium	α CD137	A673-4-1BBL	IL-2	A673-4-1BBL +IL-2	α CD137 +IL-2
CD3/CD4 Exp. 1	28,4%	29,1%	27,9%	28,1%	28,0%	28,7%
Exp. 2	23,9%	26,8%	26,4%	26,7%	29,8%	30,7%
Mittelwert	26,15%	27,95%	27,15%	27,4%	28,9%	29,7%
CD3/CD4/CD137						
Exp. 1	2,4%	2,4%	3,7%	5,6%	8,9%	11,1%
Exp. 2	6,8%	6,0%	7,4%	9,1%	13,1%	13,4%
Mittelwert	4,6%	4,2%	5,55%	7,35%	11,0%	12,25%
CD3/CD8 Exp. 1	26,3%	25,2%	26,2%	25,3%	25,8%	25,3%
Exp. 2	25,5%	25,2%	26,5%	24,3%	27,4%	26,8%
Mittelwert	25,9%	25,2%	26,35%	24,8%	26,6%	26,05%
CD3/CD8/CD137						
Exp. 1	1,8%	1,6%	3,7%	5,8%	11,7%	13,2%
Exp. 2	4,5%	4,2%	6,3%	7,3%	9,5%	12,3%
Mittelwert	3,15%	2,9%	5,0%	6,55%	10,6%	12,75%
CD56 Exp. 1	5,8%	6,3%	6,2%	9,3%	12,5%	10,3%
Exp. 2	8,3%	7,7%	5,1%	11,9%	12,8%	10,1%
Mittelwert	7,05%	7,0%	5,65%	10,6%	12,65%	10,2%
CD3/CD56 Exp. 1	1,8%	1,4%	2,9%	3,2%	5,5%	7,0%
Exp. 2	5,5%	4,6%	2,3%	5,7%	9,3%	10,5%
Mittelwert	3,65%	3,0%	2,6%	4,45%	7,4%	8,75%

Die Analyse der CD3/CD8/CD137-positiven Zellen erbrachte ähnliche Ergebnisse. Auch hier war der Anteil bei den Ansätzen mit IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137 oder Zellen der Linie A673-4-1BBL am höchsten (12,75% bzw. 10,6%). Der Ansatz mit IL-2 allein erbrachte einen Anteil von 6,55%, alle anderen Versuchsansätze zeigten noch geringere Mittelwerte. Demnach waren beim Ansatz mit Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2 ca. 95% und beim Ansatz mit IL-2 in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL ca. 62% mehr Zellen CD3/CD8/CD137-positiv als beim Ansatz nur mit IL-2.

3.2.5 Ergebnisse der ELISPOT-Untersuchungen

Wie in den Vorversuchen (beschrieben in 3.1 und 3.2) wurden PBMC (HLA-A1, A2-positiv) mit Tumorzellen der Linie A673 in 6-Loch-Platten inkubiert. Ziel dieses Experiments war, Hinweise auf die Generierung von zytotoxischen T-Zellen (Produktion von Interferon gamma und Granzym B) durch Koinkubation mit dem Antikörper α CD137 (in An- oder Abwesenheit von IL-2) mittels ELISPOT zu gewinnen. Dabei wurden die PBMC der verschiedenen Ansätze mit Zellen drei verschiedener Tumorzelllinien auf vorher mit Antikörpern gegen humanes Interferon gamma oder Granzym B beschichteten 96-Loch-Platten restimuliert. Zur Anwendung kamen Zellen der bereits im Experiment verwendeten Tumorzelllinie (A673), des Weiteren Zellen einer anderen Linie aus der Familie der Ewing-Tumore (SK-N-MC) und schlussendlich Zellen einer Neuroblastom-Linie (SH-SY5Y). Die Kontrollzelllinien (SK-N-MC und SH-SY5Y) wurden zur Detektion der unspezifischen Reaktion verwendet. Zum Einsatz kamen ELISPOT-Kits zur Granzym B- und Interferon gamma-Detektion, Zytokine, welche vermehrt von aktivierten zytotoxischen Zellen sezerniert werden. Der Ablauf erfolgte wie im Kapitel 2.2.8 (Methoden) beschrieben. Bei einer ersten Durchführung wurden die Ansätze mit dem Antikörper α CD137 und IL-2 untersucht (inklusive Kontrollansätze). Eine nachfolgende Untersuchung hatte die Unterschiede der Spezifität der verschiedenen Ansätze mit transfizierten Tumorzellen (SBVGA1, SBVGA3, A673-4-1BBL) im Vergleich zu den Ansätzen mit den löslichen Komponenten (IL-2, Antikörper α CD137) zum Ziel (Versuchsaufbau siehe Methoden).

Granzyme B-ELISPOT

Die in Abbildung 11 dargestellte Graphik zeigt eine deutlich höhere Anzahl von Spots bei den Ansätzen, welche mit der Kombination IL-2 und dem Antikörper α CD137 oder nur mit IL-2 inkubiert waren. Hierbei war die Anzahl der Spots der PBMC, die mit Tumorzellen der Linie A673, Antikörper α CD137 und IL-2 inkubierten (nach Restimulation auf Zellen der Linie A673) signifikant höher ($p < 0,001$) als die Anzahl der Spots, die durch PBMC nach Inkubation mit Tumorzellen der Linie A673 und IL-2 ohne Antikörper (nach Restimulation auf Zellen der Linie A673) hervorgebracht wurden. Auffällig dabei war, dass die PBMC des Ansatzes mit IL-2 allein eher unspezifisch gegen alle drei Tumorzelllinien reagiert haben, die Sekretion von Granzym B nach Inkubation auf allen drei Tumorzelllinien nur geringe Unterschiede

aufwies. Beim Versuchsansatz mit Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2 erschien die Immunantwort spezifischer gegen die beiden Zelllinien der Ewing-Tumor-Familie zu sein. Die PBMC des Ansatzes mit dem Antikörper α CD137 ohne IL-2 zeigten kaum Unterschiede zum Kontrollansatz, bei welchem PBMC nur mit Tumorzellen stimuliert waren.

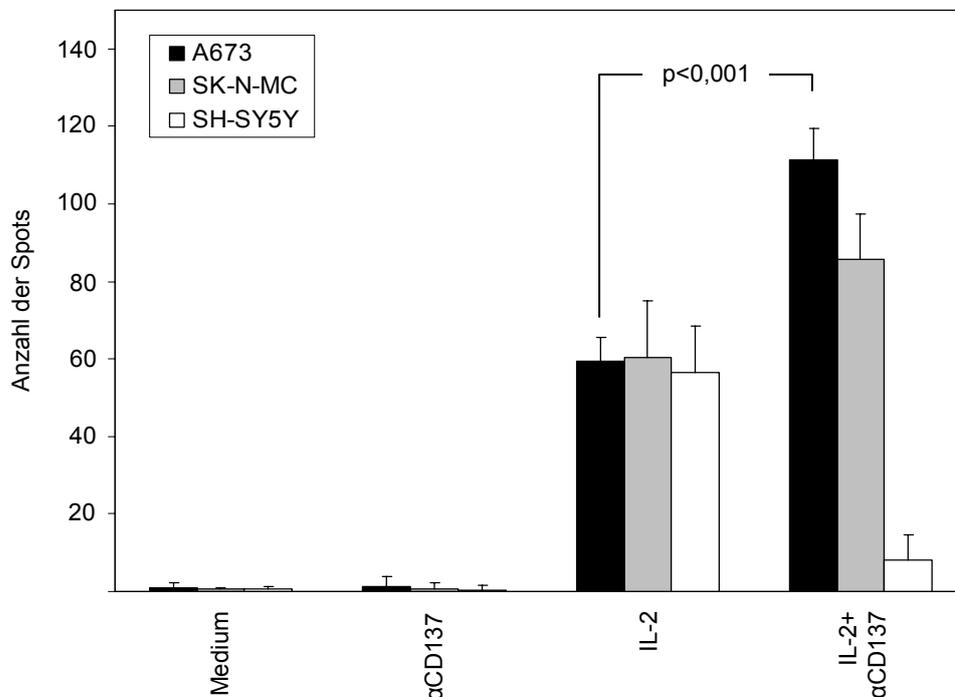


Abb. 11. Ewing-Tumorzell-spezifische Immunantwort durch Kostimulation mit Antikörper α CD137 und IL-2. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Granzym B-Spots von jeweils drei Messergebnissen (Triplets) zwei unterschiedlicher Experimente der Ansätze mit Antikörper α CD137 und IL-2 nach Restimulation auf der Versuchszelllinie (A673) und zwei Kontrollzelllinien (SK-N-MC, SH-SY5Y).

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Experimente mit Inkubation von transfizierten Tumorzellen im Vergleich mit den Ansätzen mit Antikörper α CD137 und IL-2. Der Ansatz mit Zellen der Linie SBVGA1 (IL-2-transgen) offenbarte einen signifikant höheren Wert ($p < 0,001$) nach Restimulation auf der Versuchszelllinie (A673) als der Ansatz mit IL-2. Diesbezüglich hatte der Ansatz mit Zellen der Linie SBVGA1 in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL nach Restimulation mit der Versuchszelllinie einen signifikant höheren Wert ($p < 0,05$) als der Vergleichsansatz nur mit Zellen der Linie SBVGA1. Des Weiteren war bei beschriebenen Kombinationsansatz die Immunantwort spezifischer bezüglich der verwendeten Tumorzelllinien. Der Ansatz mit der Kombination lösliches IL-2 mit CD137L-transfizierten Tumorzellen (A673-4-1BBL) zeigte eine signifikant höhere Anzahl von

Spots als im Vergleichsansatz mit IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137 ($p < 0,001$). Die Anzahl der Spots dieses Ansatzes war auch signifikant höher als im Ansatz nur mit IL-2-transgenen Zellen (SBVGA1) ($p < 0,001$) und im Ansatz mit IL-2-transgenen Zellen (SBVGA1) in Kombination mit CD137L-transfizierten Tumorzellen (A673-4-1BBL) ($p < 0,001$).

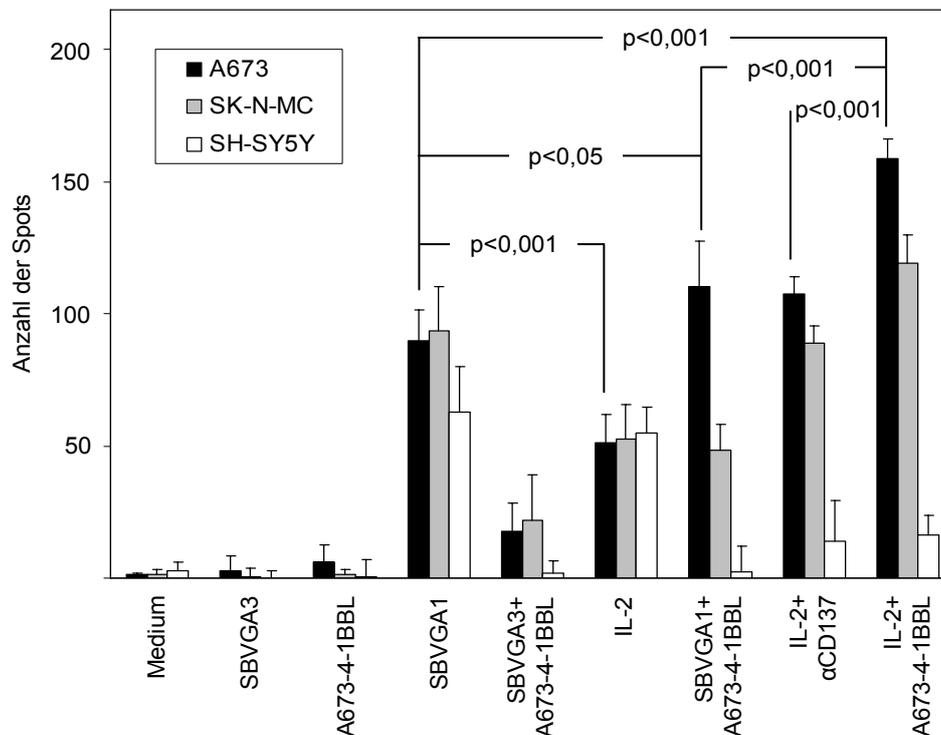


Abb. 12. Kostimulation mit Antikörper α CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen in Kombination mit IL-2 erhöht die Anzahl Granzym B-sezernierender Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Messergebnissen (Triplets) zwei unterschiedlicher Experimente mit transfizierten Tumorzellen, IL-2 und dem Antikörper α CD137 nach Restimulation auf der Versuchszelllinie (A673) und zwei Kontrollzelllinien (SK-N-MC, SH-SY5Y).

Die Spezifität der Immunreaktion konnte besonders bei den Kombinationsansätzen mit IL-2 und Tumorzellen der Linie A673-4-1BBL oder Tumorzellen der Linie SBVGA1 in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL im Vergleich zu den Ansätzen mit Zellen der Linie SBVGA1 oder IL-2 allein erhöht werden.

Interferon gamma-ELISPOT

In den Abbildungen 13 und 14 wird deutlich, dass im Vergleich die PBMC, die mit dem löslichen Antikörper α CD137 und IL-2 in Kombination mit der Versuchszelllinie (A673) inkubiert waren, deutlich mehr Interferon gamma-sezernierende Zellen nach Restimulation auf Zellen der Versuchszelllinie (A673) hervor brachten als die Zellen vom Ansatz nur mit IL-2 ($p < 0,001$).

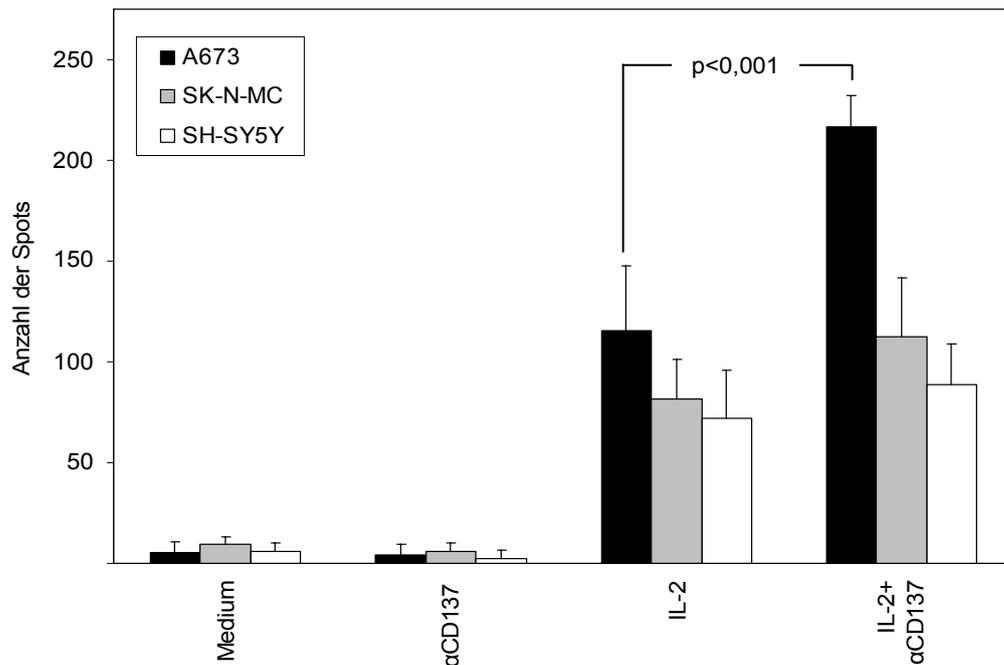


Abb. 13. Kostimulation mit Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2 erhöht die Anzahl Interferon gamma-sezernierender Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Interferon gamma-Spots von drei Messergebnissen (Triplets) zwei unterschiedlicher Experimente der Ansätze mit Antikörper α CD137 und IL-2 nach Restimulation auf der Versuchszelllinie (A673) und zwei Kontrollzelllinien (SK-N-MC, SH-SY5Y).

Erkennbar wurde auch eine deutlich geringere Anzahl von Interferon gamma-sezernierenden Zellen nach Restimulation der PBMC des Versuchsansatzes auf den Kontrollzelllinien, demnach eine spezifischere Immunantwort durch die zusätzliche Verwendung des Antikörper α CD137. Die Kontrollansätze mit Antikörper α CD137 allein oder nur mit Medium erreichten deutlich geringere Werte.

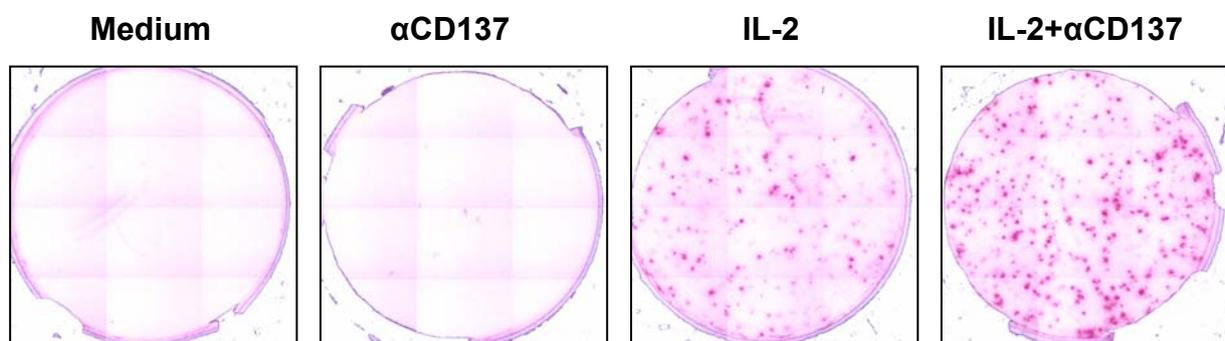


Abb. 14. Höchste Anzahl von Interferon gamma-Spots beim Ansatz mit IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137. Dargestellt sind photographische Bilder repräsentativer Vertiefungen einer 96-Loch-Platte während der Interferon gamma-ELISPOT-Analyse eines repräsentativen Experiments.

Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Unterschied zwischen den Ansätzen mit IL-2 und IL-2-transgenen Tumorzellen (SBVGA1) geringer ausfiel, als bei der Messung von Granzym B. Weiterhin war auch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Spots nach Restimulation auf der Versuchszelllinie (A673) im Vergleich des Ansatzes mit Zellen der Linie SBVGA1 und Zellen des Ansatzes mit Zellen der Linie SBVGA1 in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL erkennbar, dennoch war die Immunantwort deutlich spezifischer.

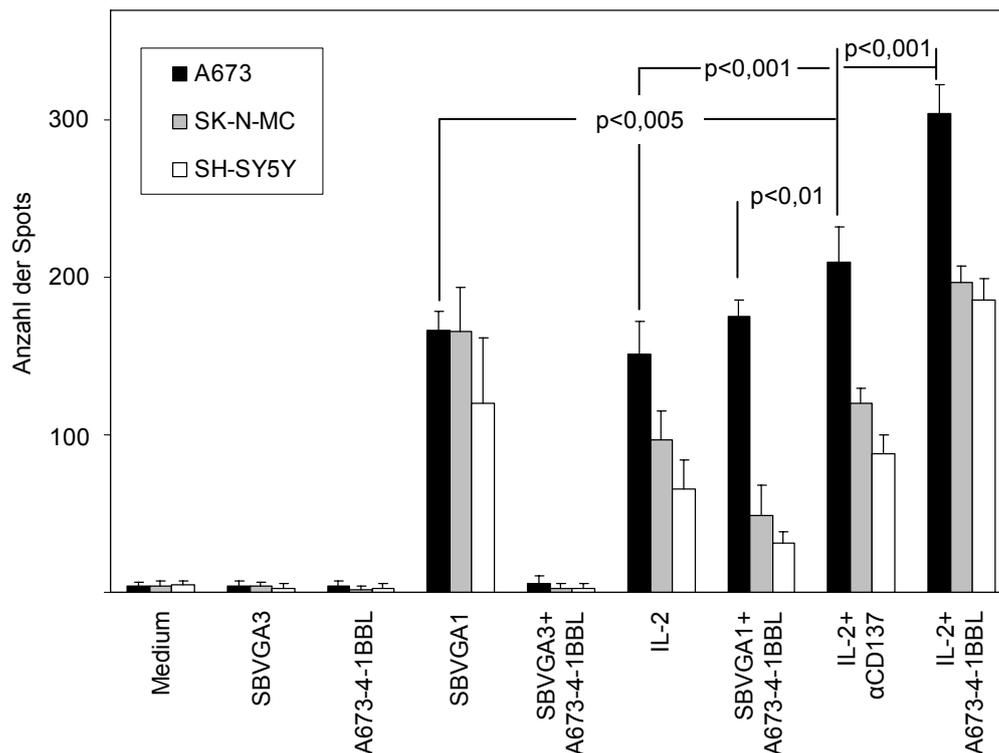


Abb. 15. Kostimulation mit Antikörper α CD137 oder CD137L-transfizierte Tumorzellen in Kombination mit IL-2 erhöht die Anzahl Interferon gamma-sezierender Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Messergebnissen (Triplets) zwei unterschiedlicher Experimente mit transfizierten Tumorzellen, IL-2 und dem Antikörper α CD137 nach Restimulation auf der Versuchszelllinie (A673) und zwei Kontrollzelllinien (SK-N-MC, SH-SY5Y).

Dagegen stellt sich der Vergleich der Immunantwort des Ansatzes mit IL-2 in Kombination mit CD137L-transfizierten Tumorzellen mit der des Ansatzes nur mit löslichem IL-2 ähnlich dar: auch beim Interferon gamma-ELISPOT war der Unterschied signifikant ($p < 0,001$), ohne deutliche Steigerung der Spezifität. Eine hohe Signifikanz zeigte sich auch im Vergleich des Ansatzes IL-2 in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL mit dem Ansatz IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137 ($p < 0,001$), auch hier ohne wesentliche Steigerung der Spezifität. Der Ansatz mit beiden transfizierten Tumorzellen (SBVGA1, A673-4-1BBL) zeigte nach

Restimulation auf der Versuchszelllinie, sowohl im Vergleich mit dem Ansatz mit löslichem IL-2 und Antikörper α CD137 ($p < 0,01$) als auch im Vergleich mit dem Ansatz mit IL-2 und CD137L-transfizierten Tumorzellen ($p < 0,001$) signifikant geringere Werte bei etwa gleicher Spezifität. Wie beim Granzym B-ELISPOT zeigten auch hier die Kontrollansätze nur mit Zellen der Linie SBVGA3, nur mit Zellen der Linie A673-4-1BBL oder nur mit Medium sehr geringe Werte.

3.3 *In vivo*-Experimente

Neben den *in vitro*-Experimenten (siehe oben) sollte in vorliegender Arbeit die Wirksamkeit des Antikörpers α CD137 in Kombination mit IL-2 auch in Tierexperimenten untersucht werden. Als Versuchstiere dienten NOD/SCID-Mäuse (siehe Kapitel Material). Die Haltung und Handhabung der Mäuse erfolgte wie im Kapitel Methoden beschrieben. Alle Tierexperimente wurden von der Ethikkommission geprüft, das Gesamtexperiment wurde vom Landesverwaltungsamt genehmigt (Aktenzeichen (Kürzel) I13G6).

Wie auch die *in vitro*-Versuche wurden die Experimente in zwei verschiedene Einheiten unterteilt. In einem ersten Experiment wurden der Antikörper α CD137 (26G6) und lösliches IL-2 eingesetzt, in einem zweiten Experiment waren die transfizierten Tumorzellen (A673-4-1BBL, SBVGA1) Gegenstand der Betrachtung.

3.3.1 *In vivo*-Experimente mit Antikörper α CD137 und IL-2

Am Tag Null erfolgte die Injektion von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen der Linie A673 s.c. (subkutan) im Bereich der rechten Flanke. Die Injektion der PBMC ($1,0 \times 10^7$ PBMC HLA-A1, A2) erfolgte am Tag sieben nach Injektion der Tumorzellen i.p. (*intra peritoneal*). Interleukin-2 (300U) und Antikörper α CD137 (10 μ g) wurden ebenfalls i.p. appliziert. Pro Versuchsgruppe wurden acht Mäuse eingesetzt.

Bei einigen Mäusen entwickelte sich während der gesamten Versuchsdauer kein Tumor (in Abbildung 16 nicht berücksichtigt). Insgesamt entwickelten sich die Tumoren der verschiedenen Versuchsgruppen ähnlich, jedoch war ein verzögertes Wachstum bei den Versuchsgruppen mit IL-2 und IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137 zu verzeichnen (siehe Abb. 17); ein signifikanter Unterschied dieser beiden Versuchsgruppen bestand dennoch nicht. Der Vergleich der Gruppen nur mit IL-2

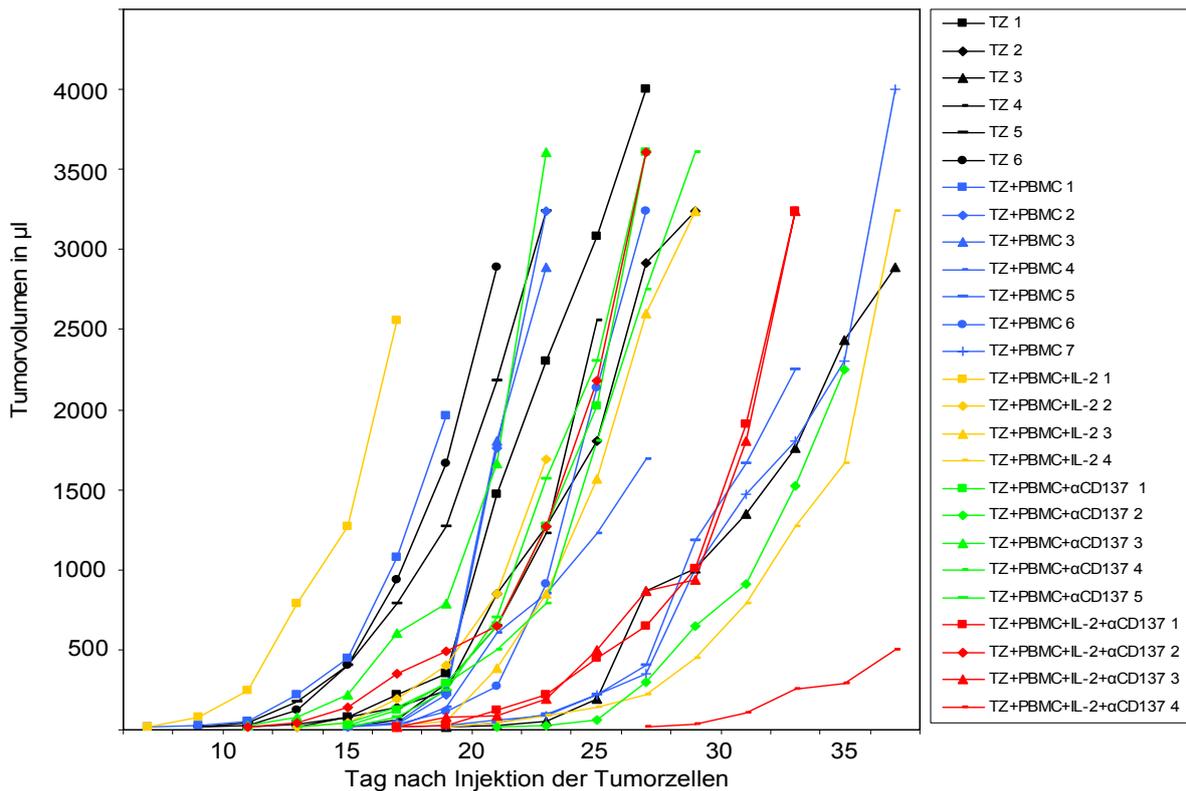


Abb. 16. Weniger Mäuse entwickeln einen Tumor bei Behandlung mit IL-2 oder IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137. Aufgetragen sind die Volumina der Tumoren jeder Maus aller Gruppen gegen den zeitlichen Verlauf des Experiments. Jede Versuchsgruppe hat eine eigene Farbe, jede Maus ein eigenes Symbol.

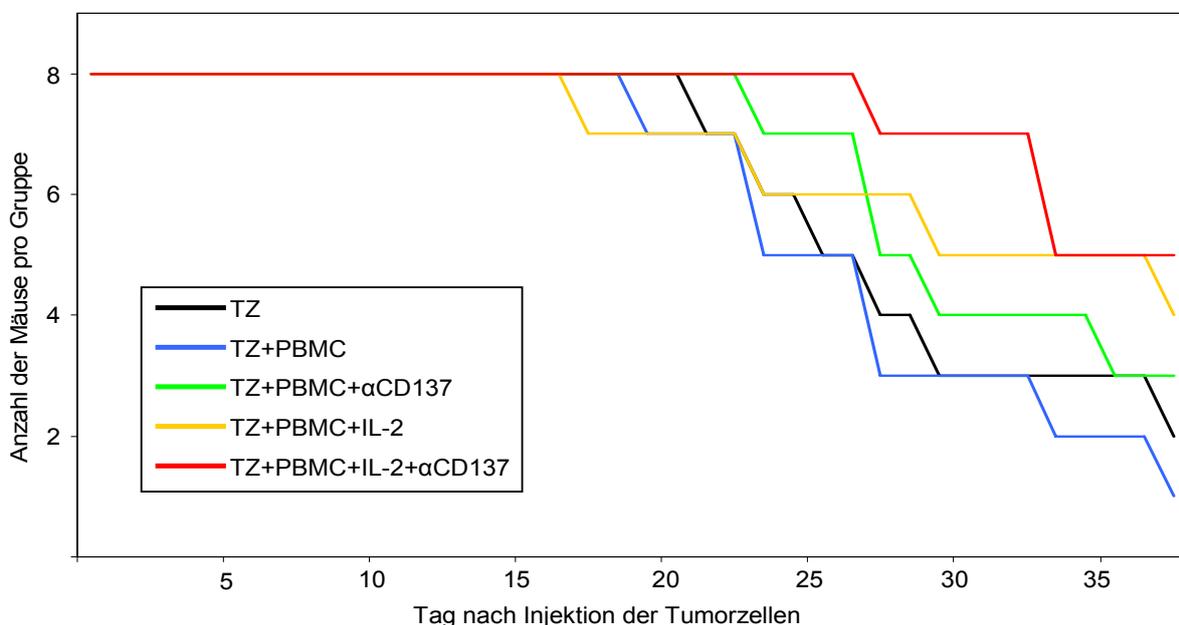


Abb. 17. Hinweise auf verzögertes Tumorstadium bei Therapie mit IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137. Aufgetragen sind die Anzahl der Mäuse pro Versuchsgruppe gegen den zeitlichen Verlauf des Experiments. Jede Gruppe hat eine eigene Farbe. Das Experiment wurde für jedes Versuchstier nach Erreichen der durch die Ethikkommission festgelegten Zielgröße des Tumors beendet. Am Tag 38 wurde das Experiment insgesamt beendet.

und Medium erbrachte keinen signifikanten Unterschied, jedoch war der Unterschied zwischen der Gruppe mit IL-2 in Kombination mit dem Antikörper gegen CD137 und der Gruppe mit Medium signifikant ($p < 0,05$). Auffällig war zusätzlich, dass bei beiden Versuchsgruppen mit IL-2 nur jeweils vier von acht Mäusen einen Tumor entwickelten. Das Experiment wurde nach Eintreten der durch die Ethikkommission festgelegten Maximalgröße eines Tumordiameters (größer als 2 cm) beendet.

Nach Exitus der Maus wurde die Milz entnommen, Zellen daraus gewonnen und diese zusammen mit (bei der anästhesierten Maus) retrobulbär entnommenem Blut der Durchflusszytometrie zugeführt. Es konnten keine vitalen humanen PBMC in der Milzsuspension und im peripheren Blut nachgewiesen werden; eine Untersuchung der Tumore nach PBMC erfolgte nicht.

3.3.2 *In vivo*-Experimente mit IL-2-transfizierten und CD137L-transfizierten Tumorzellen

Im folgenden Experiment sollten die Unterschiede der Wirkung von 4-1BBL-transfizierten Tumorzellen und IL-2-transgenen Tumorzellen auf das Tumorstadium von Zellen der Linie A673 untersucht werden.

Im Wesentlichen entsprach der Versuchsaufbau dem des Vorversuchs. An Stelle von löslichem IL-2 kamen Tumorzellen der Linie SBVGA1 (IL-2-transgene Tumorzellen der Linie A673, $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen pro Maus, mit 90Gy bestrahlt) zur Anwendung. Anstatt des löslichen Antikörpers α CD137 wurden 4-1BBL-transfizierte Tumorzellen ($1,5 \times 10^6$ Tumorzellen pro Maus, mit 90Gy bestrahlt) der Linie A673 verwendet. In jeder Versuchsgruppe waren acht Mäuse. Am Tag Null wurden $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen der Linie A673 im Bereich der rechten Flanke s.c. injiziert. Diesmal wurden zum gleichen Zeitpunkt an gleicher Stelle $1,0 \times 10^7$ PBMC (HLA-A1, A2) s.c. und, wo vorgesehen, Zellen der Linie SBVGA1, A673-4-1BBL verabreicht. Der gleiche Zeitpunkt und die gleiche Stelle wurden aufgrund einer möglichen besseren Darstellung der Wirksamkeit der zugeführten Substanzen gewählt.

Anders als beim *in vivo*-Experiment mit den löslichen Substanzen zeigten sich hier bereits am Anfang Unterschiede (Abbildungen 18 und 19). Die Mäuse, welche Tumorzellen ohne PBMC injiziert bekamen, entwickelten wesentlich eher Tumore als die Gruppe des Ansatzes mit Tumorzellen und PBMC (im Mittelwert ca. 12 Tage).

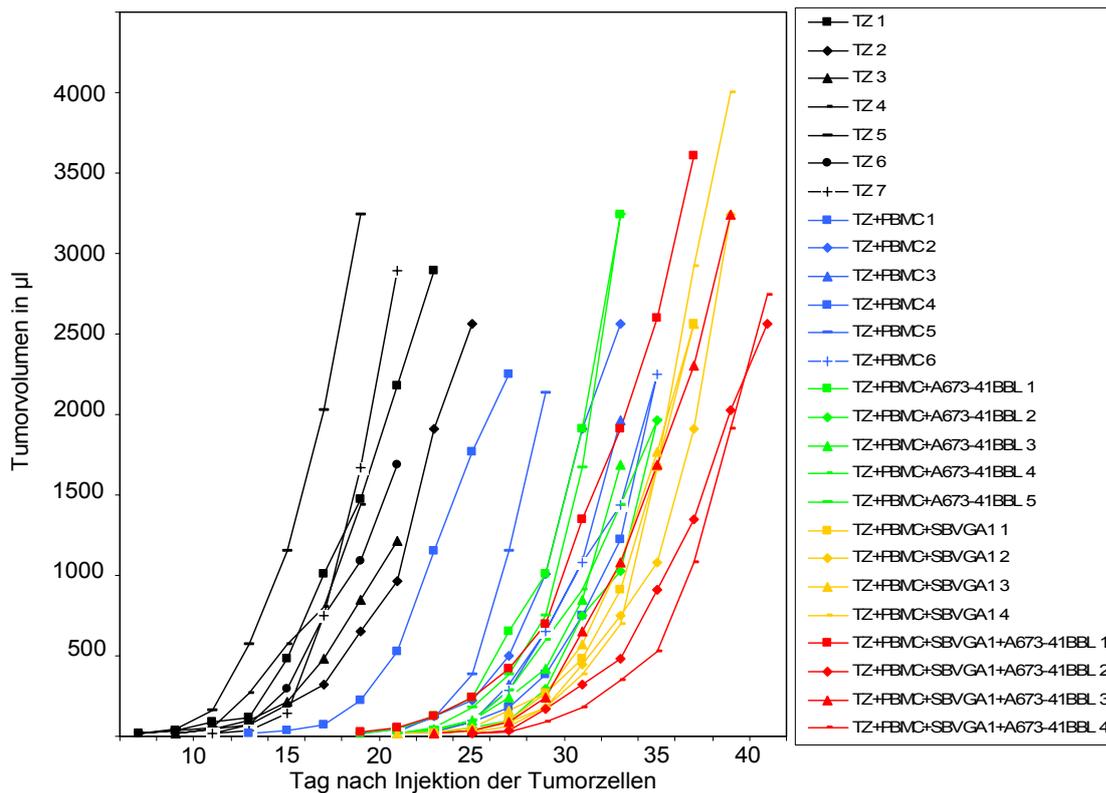


Abb. 18. Weniger Tumoren bei Behandlung mit IL-2-transgenen Tumorzellen mit und ohne Zellen der Linie A673-4-1BBL. Aufgetragen sind die Volumina der Tumoren jeder Maus aller Gruppen gegen den zeitlichen Verlauf des Experiments. Jede Versuchsgruppe hat eine eigene Farbe, jede Maus ein eigenes Symbol.

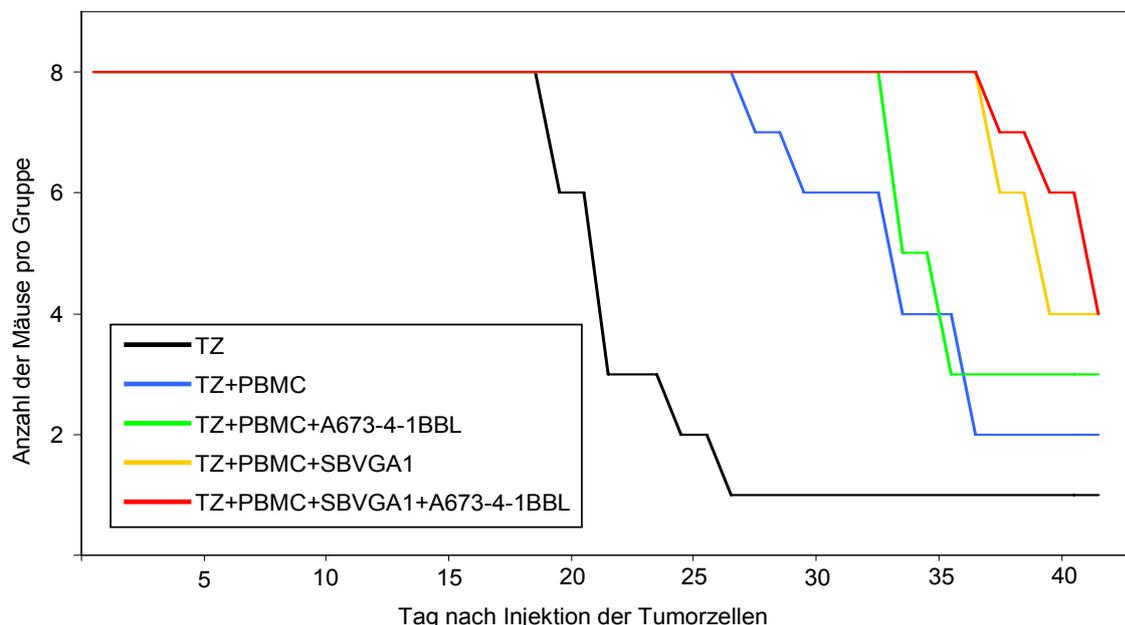


Abb. 19. Hinweise auf verzögertes Tumorwachstum bei Therapie mit IL-2-transgenen Zellen mit und ohne Zellen der Linie A673-4-1BBL. Aufgetragen sind die Anzahl der Mäuse pro Versuchsgruppe gegen den zeitlichen Verlauf des Experiments. Jede Gruppe hat eine eigene Farbe. Das Experiment wurde für jedes Versuchstier nach Erreichen der durch die Ethikkommission festgelegten Zielgröße des Tumors beendet. Die nach Tag 43 noch vorhandenen Mäuse entwickelten bis zu diesem Zeitpunkt keinen Tumor, das Experiment wurde an diesem Tag beendet.

Insgesamt wurde deutlich, dass die Mäuse, die mit Zellen der Linie SBVGA1 oder mit Zellen der Linie SBVGA1 in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL behandelt wurden, ihre Tumore später entwickelten, als die Mäuse der Kontrollgruppen (PBMC, A673-4-1BBL, nur Tumorzellen). In Abbildung 19 wird deutlich, dass sich auch in diesem Experiment ein verzögertes Erreichen der festgelegten Endgröße der Tumoren bei der Gruppe mit IL-2-transgenen Zellen (SBVGA1) in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL (zusätzliche Kostimulation) im Vergleich zur Gruppe nur mit Zellen der Linie SBVGA1 ergab. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ergaben sich bei allen Gruppen im Vergleich zur Gruppe nur mit Tumorzellen. Des Weiteren ergaben sich signifikante Unterschiede beim Erreichen der festgelegten Tumorendgröße zwischen der Versuchsgruppe mit Medium und jeweils den Gruppen mit IL-2-transgenen Zellen (SBVGA1) oder IL-2-transgenen Zellen in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL ($p < 0,05$). Auffällig war zusätzlich, dass nur vier von acht Mäusen, die mit Zellen der Linie SBVGA1 (mit oder ohne Zellen der Linie A673-4-1BBL) behandelt wurden, einen Tumor entwickelten. In der Gruppe der nur mit Zellen der Linie A673-4-1BBL behandelten Mäuse entwickelten fünf Tiere einen Tumor, in der Kontrollgruppe mit PBMC bekamen sechs und in der Gruppe ohne PBMC sieben Mäuse einen Tumor.

Auch bei diesem Experiment wurden den Mäusen nach Exitus die Milzen entommen, PBMC daraus gewonnen und zusammen mit dem bei noch vitalen Mäusen retrobulbär entnommenem Blut der Durchflusszytometrie zugeführt. Wie auch beim vorangegangenen Experiment waren keine vitalen humanen PBMC nachweisbar, die Tumore wurden auch in diesem Versuch nicht nach humanen PBMC untersucht.

3.4 Genexpression nach Kostimulation mit IL-2 und Antikörper α CD137

Ziel der Mikroarray-Untersuchungen war es Unterschiede in den Genexpressionsprofilen der PBMC zu erfassen, die mit IL-2 oder mit IL-2 in Kombination mit dem Antikörper α CD137 stimuliert wurden. Diese Untersuchungen sollten Hinweise geben, welche Gene an einer Kostimulation mit IL-2 und Antikörper α CD137 eventuell beteiligt sind. Es wurden pro Ansatz 5×10^6 PBMC von freiwilligen Spendern in 5 mL Kulturmedium mit dem Antikörper α CD137 (Vertiefungen wurden über Nacht bei 4°C mit einer Antikörperlösung ($10\mu\text{g/ml}$) beschichtet) und/oder IL2

(100U/ml) inkubiert. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und der Aufbereitung für die Mikroarrays zugeführt.

Gefunden wurden nach den im Kapitel Methoden (2.2.10) aufgeführten Kriterien insgesamt 256 Sondensätze; dabei waren im Vergleich zwischen dem Ansatz mit IL-2 in Kombination mit Antikörpern gegen CD137 und dem Ansatz nur mit IL-2 bei 134 Sondensätzen höhere Signalintensitäten und bei 122 Sondensätzen niedrigere Signalintensitäten. Die in Tabelle 6 und Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigen die Expressionsprofile der Gene, welche näher betrachtet wurden und potenziell mit der demonstrierten gesteigerten Immunantwort der Ansätze, in denen IL-2 und Antikörper α CD137 kombiniert verwendet wurden, in Verbindung gebracht werden könnten. Dabei wurden die in den ersten beiden Zeilen (Tabelle 6) aufgeführten Gene im Vergleich hochreguliert, die folgenden drei herunterreguliert.

Tabelle 6. Genexpression nach Kostimulation mit IL-2 und Antikörper α CD137. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten der Genexpressionen zwei unterschiedlicher Messungen. Betrachtet wurden Gene, die mit einer gesteigerten Immunantwort des Ansatzes mit IL-2 in Kombination mit Antikörper α CD137 in Verbindung gebracht werden könnten. In der ersten Spalte befindet sich der Name des Gens (Sondensatz-Nummer).

	PBMC Medium	PBMC α CD137	PBMC IL-2	PBMC IL-2 + α CD137
BCL-2 (203684)	48,40	72,05	55,00	192,00
KIR2DS5 (208203)	60,75	34,75	52,50	179,50
HMOX1 (203665)	310,70	245,60	279,00	149,50
FOS (209189)	1105,25	577,75	310,50	215,00
LILRB1 (213975)	7852,50	6052,45	3804,00	1899,50

Dem Gen BCL-2 (*B cell lymphoma 2*) wird die Unterdrückung der Funktion proapoptotischer Gene der BCL-2-Familie zugesprochen [Vaux DL *et al.* (1988)]. Im Versuchsansatz (IL-2 mit Antikörper α CD137) wurde ein Mittelwert der Intensität von 192 gemessen. Dieser Wert war deutlich höher als beim Vergleichsansatz mit IL-2 (55) und bei den Kontrollansätzen (Medium 48,4, Antikörper α CD137 72,05) und übertrifft im direkten Vergleich den Wert vom Vergleichsansatz um etwa den Faktor 3,49.

Ähnlich verhielt es sich bei den gemessenen Intensitäten bezüglich des Gens KIR2DS5 (*killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic*

tail, 5), bei dem aktivierende Funktionen von NK-Zellen und T-Zellen beschrieben wurden [Della Chiesa M *et al.* (2008)]. Auch hier war der Wert beim Versuchsansatz deutlich höher (179,5) als bei den anderen Ansätzen (Medium 60,75, Antikörper α CD137 34,75 und IL-2 52,5). Der Vergleich mit dem Ansatz nur mit IL-2 zeigte einen ca. 3,42-fach höheren Wert.

Von den Genen, die durch den Versuchsansatz im Vergleich zu allen anderen Ansätzen herunterreguliert wurden, zeigte das Gen LILRB1 (*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1*) den deutlichsten Unterschied. In der Literatur wird dieses Gen in Zusammenhang mit einer inhibierenden Wirkung auf die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen beschrieben [Saverino D *et al.* (2000)]. Hier zeigte der Versuchsansatz einen Mittelwert der Intensitäten von 1899,5 (ca. die Hälfte des Wertes vom Vergleichsansatz mit IL-2); die Werte der Kontrollansätze waren deutlich höher (Medium 7852,5, Antikörper α CD137 6052,45).

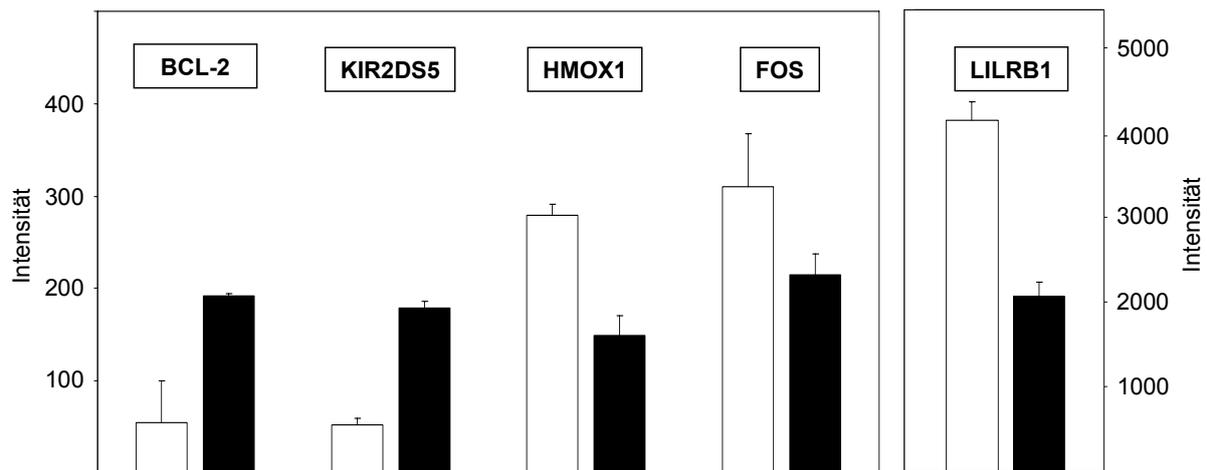


Abb. 20 Genexpression nach Kostimulation mit IL-2 und Antikörper α CD137. Gezeigt werden die Intensitäten von Genen, welche im Vergleich durch den Versuchsansatz (Antikörper α CD137 mit IL-2, schwarzer Balken) mit dem Vergleichsansatz (IL-2, weißer Balken) hoch oder herunter reguliert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Messungen.

Ein weiteres Gen, welches durch den Versuchsansatz herunterreguliert wurde, ist HMOX1 (*heme oxygenase (decycling) 1*). Eine Funktion, die diesem Gen zugeordnet werden könnte, ist die Inhibierung der T-Zellproliferation [Pae Ho *et al.* (2004), Song R *et al.* (2004)]. Hier differierte der Mittelwert der Intensitäten vom Versuchsansatz (Mittelwert 149,5) zum Vergleichsansatz nur mit IL-2 (Mittelwert 279) um ca. Faktor 0,54. Die Mittelwerte der Kontrollansätze ähnelten dem des Ansatzes nur mit IL-2 (Medium 310,7, Antikörper α CD137 245,6).

Ein letztes hier aufgeführtes Gen ist FOS (*v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), dessen Hochregulierung mit Apoptose in Zusammenhang stehen könnte [Smeyne RJ *et al.* (1993)]. Der Mittelwert der Intensitäten des Versuchsansatzes (IL-2 und Antikörper α CD137) war 215 und damit deutlich geringer als der des Vergleichsansatzes nur mit IL-2 (310,5). Die Kontrollansätze zeigten Werte von 1105,25 (Medium) und 577,75 (Antikörper α CD137).

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

Die Auswahl der Ewing-Tumorzelllinie, mit der die PBMC stimuliert wurden, erfolgte anhand vielfältiger Anwendungserfahrungen in zahlreichen Publikationen; HLA-A1, A2-positive PBMC wurden verwendet, weil die Tumorzelllinie A673 ebenfalls HLA-A1, A2-positiv [Staege MS *et al.* (2004)] war und somit eine möglichst geringe allogene Reaktivität der PBMC gewährleistet wurde. Zum Zweck der Gewinnung von Daten bezüglich der Spezifität der erzeugten Aktivierung der PBMC kam auch eine andere Tumorzelllinie (SK-N-MC) der Ewing-Tumor-Familie (EFT) zum Einsatz. Um mögliche EFT-spezifische Reaktionen zu erfassen, wurde als dritte Zelllinie eine Neuroblastomzelllinie verwendet. Neben löslichen Stimulanzen (IL-2, Antikörper gegen CD137) wurden auch CD137L-transfizierte Zellen der Linie A673 kultiviert. Hiermit sollte eine kontinuierliche Darbietung des natürlichen Liganden des Rezeptors CD137 (4-1BB) (als CD137-Antikörper-äquivalente Stimulierung) gesichert werden. Als kontinuierlicher IL-2-Produzent (um die geringe Halbwertszeit als mögliche Ursache einer diskontinuierlichen Stimulation zu eliminieren und die Toxizität von IL-2 (bei systemischer Applikation *in vivo*) zu verringern) kamen in manchen Experimenten Zellen der Linie SBVGA1 (IL-2-transgen) zur Anwendung. Bei beiden Zelllinien (A673-4-1BBL und SBVGA1) handelte es sich ursprünglich um Zellen der Linie A673, somit wurde die Wahrscheinlichkeit einer zusätzlichen allogenen Stimulierung der PBMC möglichst gering gehalten.

Zur Subklassifizierung der PBMC wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewendet (erste Veröffentlichung der Methode von Dittrich und Göhde) [Dittrich W, Göhde W (1969)]; über die Markierung von Oberflächenantigenen mit gefärbten Antikörpern konnten die PBMC verschiedenen Subpopulationen zugeordnet werden. Um die Spezifität der Immunantwort zu messen, wurde die Methode der ELISPOT-Untersuchung gewählt, die erstmals von Cecil Czerkinsky 1983 beschrieben wurde [Czerkinsky C *et al.* (1983)]. Analysiert wurden Interferon gamma- und Granzym B-Sekretion (auch bekannt als *Cytotoxic Cell Proteinase 1* (CCP1) oder Fragmentin 2 [Shi L *et al.* (1992)]). Mit dieser Methode war es möglich, Unterschiede in der Granzym B- und Interferon gamma-Sekretion der PBMC nach Restimulation mit der Zelllinie, mit der die PBMC in verschiedenen Ansätzen stimuliert wurden (A673), mit

Zellen einer anderen Zelllinie der Ewing-Tumor-Familie (SK-N-MC) und mit Neuroblastom-Zellen festzustellen. Durch den Nachweis von Interferon gamma und Granzym B (beide Moleküle werden von zytotoxischen Zellen produziert) konnte gemessen werden, wie viele eventuell zytotoxische T- oder NK-Zellen durch die *in vitro*-Immunsierung generiert wurden. Durch die Verwendung der zwei Kontrollzelllinien konnten Rückschlüsse auf die Spezifität (und auch auf die unspezifische Reaktion durch z. B. NK-Zellen) der erzeugten Immunantwort gezogen werden.

Granzym B ist eine Serinprotease, welche sich in zytoplasmatischen Granula von zytotoxischen Zellen befindet. Durch Freisetzung von Granzym B und Eintritt in die Zielzelle (rezeptorvermittelt oder über Membranporen) kann in der Zielzelle Apoptose ausgelöst werden [Smyth MJ *et al.* (1995)]. Interferon gamma ist ein lösliches Zytokin und einziges Mitglied der Klasse der Typ II-Interferone [Gray PW, Goeddel DV (1982)]. Interferon gamma (ursprünglich MAF-*macrophage-activating factor*) steht im Zusammenhang mit einer frühen Immunantwort gegen Infektionen durch NK-Zellen und mit einer adaptiven Immunantwort durch T-Zellen [Peterman GM *et al.* (1984)]. Die Kombination beider Nachweismethoden erschien sinnvoll, um Unterschiede in der Spezifität der Immunreaktionen von unterschiedlich stimulierten PBMC zu erfassen.

Um Unterschiede in der Proliferation von PBMC in den verschiedenen Versuchsansätzen zu messen, wurde die Methodik des BrdU-Tests benützt. Mit dieser Methode war es möglich (ohne radioaktive Substanzen im Gegensatz zum ³H-Thymidin-Proliferationstest) die Proliferation von PBMC zu messen. Die Unterschiede zwischen beiden Proliferationstestmethoden sind gering [Zätterström UK *et al.* (1992)].

Neben *in vitro*-Experimenten beinhaltet die vorliegende Arbeit auch *in vivo*-Experimente im Tiermodell. Um die gleichen Substanzen und Zelllinien der Vorversuche zu verwenden, wurde als Versuchstier die NOD/SCID-Maus gewählt, in welcher humane Tumorzellen und humane PBMC etabliert werden können. Ziel der Tierversuche war es, die immunmodulatorische Wirkung des kostimulatorischen Moleküls CD137 (Antikörper oder CD137L-transfizierte Tumorzellen) mit und ohne Stimulanz von IL-2 gegen Tumore der EFT zu testen. Neben den in der Literatur beschriebenen Effekten durch Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen CD137 gibt es auch Hinweise auf eine gesteigerte Immunreaktion im humanen

System durch Kostimulation von PBMC mittels Verwendung von CD137L-transfizierten Tumorzellen [Lu K *et al.* (2007)].

In einem weiteren Experiment wurden Mikroarray-Analysen bei humanen PBMC durchgeführt, welche mit einem Antikörper gegen CD137 allein oder in Kombination mit IL-2 stimuliert wurden. Diese Untersuchungen sollten erste Einblicke in die Genexpressionsprofile von PBMC, die mit Antikörper α CD137 in Kombination mit IL-2 stimuliert wurden, geben. Mit dieser Methode war es möglich RNA von biologischem Material zu analysieren und damit Rückschlüsse auf die durch diese RNA kodierten Proteine zu erhalten. Ergebnisse der Mikroarray-Analyse sind somit nicht das Proteom der Zellen, sondern das Transkriptom, was zusätzlich zum Proteom RNA erfasst, welche unter Umständen nicht in Proteine translatiert wird [Panning B *et al.* (1997), Mlynarczyk SK, Panning B (2000)].

4.2 Ergebnisse der *in vitro*-Experimente

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob ein Antikörper gegen CD137, mit oder ohne zusätzliche Stimulation durch IL-2, eine Immunantwort von PBMC nach Inkubation mit Zellen einer Ewing-Tumor-Zelllinie verstärken kann.

Bei ersten Experimenten ohne Stimulation mit Tumorzellen zeigte sich, dass der Antikörper α CD137 allein keinen Einfluss auf die Anzahl der vitalen PBMC im Vergleich zur Mediumkontrolle hatte, eine vollständige Aktivierung allein durch Bindung des verwendeten Antikörpers am Rezeptor CD137 konnte demnach nicht erreicht werden. Dies bestätigte sich auch in einem BrdU-Proliferationstest. Auch in der Literatur wird zur erfolgreichen Steigerung der Proliferation von PBMC durch einen monoklonalen Antikörper gegen CD137 eine zusätzliche Stimulation des CD3-Rezeptors mittels Antikörpern (als primäre Stimulation) angewandt [Cannons JL *et al.* (2001)]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im Versuch mit zusätzlicher Inkubation von Tumorzellen der Linie A673. Man könnte vermuten, dass durch die Anwesenheit der Tumorzellen ein ausreichend starkes Signal zur primären Aktivierung der PBMC erfolgt wäre, eine erfolgreiche Steigerung der Proliferation und Zytotoxizität durch Bindung mittels Antikörper am Rezeptor CD137 stattfinden hätte können. Die schwache Immunogenität der Zellen der Linie A673 [Staege MS *et al.* (2003, 2004)] schien allerdings für eine primäre Stimulation der PBMC nicht auszureichen; es zeigte sich keine erhöhte Proliferation oder Zytotoxizität (Zellzahlen, ELISPOT) der

PBMC sowohl im Ansatz nur mit Tumorzellen der Linie A673 als auch im Ansatz mit zusätzlicher Verwendung des Antikörpers gegen CD137. Auch in Experimenten mit CD137L-transfizierten Tumorzellen stellten sich die Ergebnisse ähnlich dar. Begründen ließe sich dies auch mit den in der Literatur beschriebenen Tumor-*Escape*-Mechanismen (z.B. aufgrund von Überexpression von Onkogenen [Seliger B *et.al.* (1996)]) von Tumorzellen. Hinsichtlich dieser Tumor-*Escape*-Mechanismen wurde die Zelllinie A673 bislang nicht untersucht. Eine zusätzliche Stimulation durch Interaktion am Rezeptor CD137 (Antikörper α CD137 oder Zellen der Linie A673-4-1BBL) konnte demnach auch kaum Effekte bezüglich der Proliferation oder Zytotoxizität zeigen, wie es sich auch in den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und beim ELISPOT widerspiegelte.

Deutliche Unterschiede zeigten sich bei der Verwendung von IL-2 (ursprünglich TCGF (*T cell growth factor*)) oder IL-2-transgenen Zellen, durch welche die Anzahl der PBMC gegenüber den Vergleichsansätzen ohne IL-2 (BrdU-Proliferationstest) gesteigert werden konnte (hier nach fünf Tagen) [Lowenthal JW *et al.* (1985), Yamada S, Ortaldo JR (1987)]. Die im Vergleich zu den Kontrollansätzen erhöhte Anzahl von aktivierten CD4- und CD8-positiven T-Zellen (ähnliche relative Anteile bei absolut erhöhter Anzahl der PBMC) und der erhöhte Anteil an NK-Zellen (beim Ansatz mit Tumorzellen) könnten die gezeigte verstärkte Zytotoxizität (verminderte Tumorzellzahl, erhöhte Anzahl von Spots in den ELISPOT-Untersuchungen) erklären. Die besonders in den ELISPOT-Untersuchungen dargestellte unspezifische Zytotoxizität ließe sich durch den erhöhten Anteil von NK-Zellen und die damit verbundenen Mechanismen der durch IL-2-induzierten unspezifischen Zytotoxizität erklären [Trinchieri G *et al.* (1984), Yamada S, Ortaldo JR (1987)]. Durch die Inkubation mit IL-2-transgenen Zellen konnte im Speziellen im Granzym B-ELISPOT die Anzahl der Spots im Vergleich zum Ansatz nur mit löslichem IL-2 signifikant erhöht werden. Erklärbar wäre dies durch den Umstand, dass IL-2 eine kurze Halbwertszeit hat [Staege MS *et al.* (2004)] und dass durch die stetige Darbietung von IL-2 (in Form von IL-2-transgenen Zellen der Linie SBVGA1) eine kontinuierliche unspezifische Aktivierung der PBMC erfolgen könnte [Trinchieri G *et al.* (1984), Yamada S, Ortaldo JR (1987), Staege MS *et al.* (2004)].

Die stärkste Steigerung der Proliferation zeigte sich in den Versuchsansätzen mit IL-2 und zusätzlicher Interaktion am kostimulatorischen Molekül CD137 mittels Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen (A673-4-1BBL)

(BrdU-Proliferationstest, Zellzahlen), was eine erfolgreiche Kostimulation anzeigen könnte, wie sie schon vielfach in der Literatur beschrieben wurde und auch Hinweise auf den Schutz vor dem durch Aktivierung induzierten Zelltod (AICD, *activation induced cell death*) geben könnte [Cannons JL *et al.* (2001), Cooper D *et al.* (2002)]. Eine zusätzliche Stimulation durch IL-2 als Verstärkung des schwachen ersten Signals vermittelt durch die Tumorzellen erschien notwendig um Effekte durch Interaktionen am Rezeptor CD137 durch Antikörper oder CD137L-transfizierten Tumorzellen zu ermöglichen.

Bei der Untersuchung der Subpopulationen der PBMC zeigten sich bei allen Ansätzen keine großen Unterschiede der relativen Anteile bezüglich der CD4- oder CD8-positiven T-Zellen. In der Literatur lassen sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der gesteigerten Proliferation von CD4- und CD8-positiven Zellen nach Inkubation mit einem Antikörper gegen CD137 finden. Einerseits wird eine deutlich erhöhte Proliferation von CD8-positiven T-Zellen im Vergleich zu CD4-positiven T-Zellen beschrieben [Shuford WW *et al.* (1997)], andererseits wurden diese Ergebnisse durch andere Experimente relativiert, bei denen eine nahezu gleiche Steigerung der Proliferation von CD4- und CD8-positiven Zellen, wie auch in den hier dargestellten Experimenten beobachtet wurde [Cannons JL *et al.* (2001)]. Eine Erklärung für dieses Phänomen der unterschiedlichen Wirkungen könnte zum Beispiel das Erkennen von unterschiedlichen Epitopen am Rezeptor CD137 durch verschiedene Antikörper sein. Eine weitere Möglichkeit der gesteigerten Proliferation und Zytotoxizität (deutlich erniedrigte Anzahl von Tumorzellen, auch im Vergleich mit dem Ansatz nur mit IL-2 oder nur IL-2-transgenen Zellen) der CD8-positiven T-Zellen wäre eine durch CD137 induzierte, aber IL-2-abhängige Proliferation von CD8-positiven Zellen [Shuford WW *et al.* (1997)], was auch erklären könnte, warum dieser Effekt nicht durch Inkubation mit dem Antikörper α CD137 allein, sondern nur bei Koinkubation mit IL-2 auftrat. Des Weiteren kann die Verwendung eines Antikörpers gegen CD137 NK-Zellen (CD56-positiv) zur Vermehrung und Zytokinproduktion (z.B. INF gamma) anregen, was aber nicht nur direkte zytolytische Effekte zur Folge hat, sondern auch für die Generierung von zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) eine wichtige Helferfunktion darstellt und somit zusätzlich die Zytotoxizität steigern könnte [Wilcox RA *et al.* (2002b)]. Bei allen Ansätzen mit IL-2 in Kombination mit Interaktion am Rezeptor CD137 (durch Antikörper oder CD137L-transfizierten Tumorzellen) wurde ein erhöhter Anteil von CD3/CD56-positiven Zellen deutlich. Eine erhöhte

Proliferation von CD3/D56-positiven Zellen durch Verwendung eines Antikörpers gegen CD137 wird in der Literatur beschrieben; eine verstärkte unspezifische zytotoxische Aktivität dieser Zellen vermittelt durch den Antikörper gegen CD137 oder durch CD137L-positive Tumorzellen ließe sich vermuten [Zhu BQ *et al.* (2008)], wie sich in den ELISPOT-Untersuchungen im hier dargestellten Modell zeigte. In der Literatur lassen sich auch Hinweise auf eine erhöhte spezifische Zytotoxizität vermittelt durch NKT-Zellen finden [Moreno M *et al.* (2008)]. Auch diese Effekte könnten die Ergebnisse der ELISPOT-Untersuchungen stützen. Deutlich wurde auch, dass durch die Stimulation mit IL-2 und besonders durch die Kombination von IL-2 mit dem Antikörper α CD137 die Expression des Rezeptors CD137 auf den Lymphozyten gesteigert werden konnte, somit eine mögliche Bindung des Antikörpers gegen CD137 oder des natürlichen Liganden mittels CD137L-transfizierter Tumorzellen ermöglicht wurde und eine gesteigerte Aktivierung anzeigte [Kwon BS, Weissman SM (1989), Schwarz H *et al.* (1993)].

Auch in den ELISPOT-Untersuchungen zeigten sich die höchsten Spot-Zahlen in den Ansätzen mit IL-2 und zusätzlicher Interaktion am kostimulatorischen Rezeptor CD137 (signifikant höher als beim Ansatz nur mit IL-2). Begründen ließe sich die erhöhte Anzahl von Spots mit der beschriebenen gesteigerten Anzahl von aktivierten PBMC (Durchflusszytometrie) und der damit gesteigerten Anzahl von potenziell zytotoxischen Zellen. Die insbesondere beim Granzym B-ELISPOT gezeigte Ewing-Tumor-spezifische Immunantwort durch den Versuchsansatz könnte sehr wahrscheinlich an ähnlichen Oberflächenantigenen auf beiden Tumorzelllinien der Ewing-Familie liegen; die Tumorzellen beider Linien wurden diesbezüglich im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die stärkste Sekretion von Granzym B und Interferon gamma zeigte sich jeweils beim Ansatz mit IL-2 in Kombination mit Zellen der Linie A673-4-1BBL. Eine starke zusätzliche primäre Stimulierung durch lösliches IL-2 und parallele kontinuierliche Darbietung des natürlichen Liganden von CD137 schien für eine starke Sekretion genannter Zytokine von Vorteil. Obwohl bei allen Ansätzen mit beiden Stimulanzen die Immunantwort bezüglich der Sekretion von Interferon gamma und Granzym B Ewing-Tumor-spezifischer wurde (im Vergleich zum Ansatz nur mit IL-2), konnte die kontinuierliche Darbietung von IL-2 (in Form von IL-2-transgenen Zellen der Linie SBVGA1) und dem natürlichen Liganden des Rezeptors CD137 (in Form von Zellen der Linie A673-4-1BBL) die Spezifität der Immunantwort gegenüber den Zellen, mit welchen die PBMC über fünf Tage

inkubierten, am deutlichsten erhöhen. Das könnte darauf hinweisen, dass eine kontinuierliche Darbietung von IL-2 in Kombination mit einer kontinuierlichen Darbietung des natürlichen Liganden des Rezeptors CD137 eventuell wichtige Faktoren für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer spezifischen Anti-Tumor-Antwort wären und dass möglicherweise durch eine Kostimulation am Rezeptor CD137 mittels CD137L-transfizierten Tumorzellen die Spezifität einer Anti-Tumor-Antwort erhöht würde.

Neben den hier gezeigten Experimenten wurden parallel Experimente in einem autologen *in vitro*-Tumormodell durchgeführt. Die aus einer Metastase einer Patientin mit einer rezidierten Erkrankung an einem Ewing-Tumor entwickelte Zelllinie wurde analog mit IL-2 und Antikörpern gegen CD137 kultiviert. Auch in diesem Modell zeigte sich durch diesen Versuchsansatz (im Vergleich zum Ansatz mit IL-2 allein oder nur Antikörpern gegen CD137) die stärkste Zytotoxizität und der größte Anteil an potenziell zytotoxischen Zellen (persönliche Mitteilung von Herrn PD Dr. J. Föll).

4.3 Ergebnisse der *in vivo*-Experimente

Neben den bereits angeführten *in vitro*-Experimenten wurden auch Experimente in einem Tiermodell (NOD/SCID) durchgeführt, um die immunmodulatorischen Effekte von IL-2 in Kombination mit einem Antikörper gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen zu untersuchen.

Beim Experiment mit dem Antikörper α CD137 und IL-2 konnte keine Gruppe einen deutlichen Vorteil bezüglich des Tumorwachstums aufweisen. Auffällig war jedoch, dass in beiden Gruppen, bei denen die Mäuse mit IL-2 therapiert wurden, nur vier von möglichen acht Mäusen überhaupt einen Tumor entwickelten. Dies könnte im Zusammenhang mit einer Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen stehen, die ein Tumorwachstum unterdrückten (mögliche Effekte im Kapitel 4.2 beschrieben). Obwohl kein deutlicher Unterschied zwischen der Versuchsgruppe, die mit IL-2 in Kombination mit Antikörpern gegen CD137 behandelt wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit IL-2 behandelt wurde, zu erkennen war, zeigte sich teilweise ein verzögertes Wachstum bei der Versuchsgruppe (als einzige Gruppe signifikant geringeres Tumorwachstum im Vergleich zur Mediumkontrolle), was Hinweise auf eine erfolgreiche gesteigerte Zytotoxizität durch die Behandlung mit dem Antikörper gegen CD137 in Kombination mit IL-2 geben könnte. Anzumerken

ist, dass eine wiederholte Gabe von Antikörpern gegen CD137 und IL-2 im Zusammenhang mit wiederholter Gabe von PBMC die Effekte durch erneute Stimulierung der T- und NK-Zellen eventuell verstärken könnte und das Tumorwachstum somit längerfristig unterdrückt werden könnte. Durch das xenogene System (humane PBMC und murines Gewebe) besteht die Möglichkeit, dass viele PBMC ihre Wirkung nicht direkt am Tumor ausüben konnten, eine wiederholte Gabe von PBMC auch in diesem Zusammenhang sinnvoll sein könnte. Dennoch könnte eine wiederholte systemische Gabe von IL-2 auch schwere Nebenwirkungen hervorrufen, welche unter Umständen die Vitalität beeinträchtigen könnten, wie es bei der Behandlung von Patienten bereits beobachtet wurde [Rosenberg SA *et al.* (1987)]. Diesbezüglich könnte auch die Verwendung von IL-2-transgenen Zellen von Vorteil sein, mittels welcher die kontinuierliche Darbietung von IL-2 in weniger hohen Dosen gewährleistet werden könnte [Steage MS *et al.* (2004)]. Des Weiteren sollte auf die Möglichkeit einer unspezifischen Aktivierung und Reaktion der humanen PBMC gegen das murine Gewebe hingewiesen werden. Diese unspezifische Reaktion könnte die spezifische Aktivität der PBMC gegen den Tumor verschleiern. In einem weiteren Experiment wurde überprüft, inwieweit IL-2-transgene Zellen und CD137L-transfizierte Zellen einen immunmodulatorischen Einfluss auf PBMC bezüglich des Tumorwachstums von Zellen der Linie A673 haben. Ähnliche Untersuchungen bezüglich CD137L-transfizierter Tumorzellen sind in der Literatur im murinen Modell (murine CD137L-transfizierte Tumorzellen) beschrieben [Lu K *et al.* (2007)]; Hinweise auf ein humanes Modell im NOD/SCID-System lassen sich bis jetzt noch nicht finden. Durch Verwendung der beiden aufgeführten Zelllinien sollte eine stetige Anwesenheit des natürlichen Liganden des kostimulatorischen Rezeptors CD137 und von IL-2 dargeboten werden, um eine permanente Stimulierung der PBMC zu gewährleisten und eventuelle Nebenwirkungen durch die einmalige hochdosierte Applikation von IL-2 zu vermeiden. In diesem Experiment wuchsen bei den Mäusen, die nur Tumorzellen injiziert bekamen, die Tumoren deutlich eher, als bei der Vergleichsgruppe mit zusätzlicher PBMC-Applikation. Ein Grund dafür könnte sein, dass in diesem Experiment die PBMC zeitgleich zur s.c. Tumorzellinjektion appliziert wurden, um eventuell mögliche Effekte deutlicher zu demonstrieren. Möglicherweise war in diesem *in vivo*-Modell (im Vergleich zu den *in vitro*-Vorversuchen) eine geringe Anti-Tumor-Antwort der PBMC ohne zusätzliche Stimulation nachweisbar, die durch eine unspezifische Aktivierung von z.B. NK-

Zellen gegen das murine Gewebe erzeugt wurde. Im Vergleich zum Experiment mit löslichen Substanzen trat das Tumorwachstum bei den Versuchsgruppen mit IL-2-transgenen Zellen, 4-1BBL-transfizierten Tumorzellen und beiden Stimulanzen in Kombination später auf. Bei den Versuchsgruppen, die mit IL-2-transgenen Zellen oder mit IL-2-transgenen Zellen in Kombination mit CD137L-transfizierten Zellen der Linie A673-4-1BBL behandelt wurden, entwickelten jeweils nur vier Mäuse einen Tumor. Die in der Abbildung 19 gezeigten Daten deuten darauf hin, dass eine Stimulation mit IL-2-transgenen Zellen in Kombination mit einer permanenten Darbietung des natürlichen Liganden des Rezeptors CD137 (in Form von Zellen der Linie A673-4-1BBL) eine Verzögerung des Wachstums palpabler Tumoren verursachen könnte. Möglicherweise geschah das auch mittels einer durch IL-2-initiierten unspezifischen Immunantwort, die durch die Kostimulation mittels natürlichem Liganden am Rezeptor CD137 spezifischer wurde. Auch in diesem Experiment wäre eventuell eine wiederholte Gabe von PBMC von Vorteil, da auch hier denkbar wäre, dass durch das xenogene System die Anti-Tumor-Wirkung der PBMC beeinflusst werden könnte.

Bei beiden Experimenten konnten *post mortem* in der Milz sowie im peripheren Blut keine humanen Zellen nachgewiesen werden. Das könnte einerseits daran liegen, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung keine PBMC mehr vital waren, oder aber dass sich reaktive PBMC in der direkten Umgebung des Tumors befanden. Eine Analyse der Tumoren bezüglich PBMC war nicht Gegenstand dieser Arbeit und sollte Inhalt weiterer Untersuchungen werden.

4.4 Mikroarray-Analysen

Wie im Ergebnisteil dargestellt, wurden durch die Kombination von IL-2 und Antikörpern gegen CD137 im Vergleich zum Ansatz nur mit IL-2 zwei Gene hochreguliert, deren Funktionen im Zusammenhang mit der dargestellten erhöhten Zytotoxizität stehen könnten: BCL-2 (*B-cell Lymphoma 2*) und KIR2DS5 (*killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 5*). BCL-2 ist ein Onkoprotein, welches in verschiedenen Zellen maligner Tumoren überexprimiert ist. Es gehört zu einer Familie von Genen, denen pro- und antiapoptotische Funktionen zugesprochen werden. BCL-2 hat dabei die Eigenschaft, proapoptotische Gene der BCL-2-Familie in ihrer Funktion zu unterdrücken [Vaux DL *et al.* (1988)]. Zusätzlich

vermutet man, dass dieses Gen auch antioxidierend wirkt und somit vor Apoptose schützt [Hockenbery DM *et al.* (1993)]. Die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse zeigten, dass Zellen des Ansatzes, welche die höchste Anti-Tumor-Aktivität besaßen, auch im besonderen Maße BCL-2 exprimierten. Durch dieses Gen ist es eventuell möglich, dass zytotoxische T-Zellen länger überleben und somit länger ihre Wirksamkeit gegenüber Tumorzellen ausüben könnten. Deutlich wurde, dass nur Zellen, welche mit IL-2 in Kombination mit dem Antikörper gegen CD137 inkubierten, BCL-2 hochregulierten. Die Ansätze nur mit IL-2, nur Antikörper gegen CD137 oder Medium waren nicht betroffen. In einer Publikation der Arbeitsgruppe von Kroon *et al.* wurde eine Hochregulierung von BCL-2 durch Inkubation mit einem Antikörper gegen CD137 ohne zusätzliche Inkubation mit IL-2 beschrieben [Kroon HM *et al.* (2007)]. In diesen Experimenten inkubierten die PBMC zusätzlich mit einem Antikörper gegen CD3, die PBMC waren also durch ein starkes primäres Signal aktiviert. In den hier durchgeführten Experimenten wurde wahrscheinlich durch IL-2 ein erstes Signal ausgelöst. Das ließe den Rückschluss zu, dass in den hier durchgeführten Experimenten nur durch die Kombination von IL-2 und Antikörpern gegen CD137 BCL-2 hochreguliert wurde und dadurch die zytotoxische Funktion der PBMC länger aufrecht erhalten werden konnte.

KIR2DS5 sind Transmembranproteine auf NK- und manchen T-Zellen [Henel G *et al.* (2006)]. Ihre Nomenklatur wird bestimmt durch die Anzahl der extrazellulären Immunglobulindomänen (2D) und durch die Größe ihrer zytoplasmatischen Domäne (S=*short*). In ihrer Funktion unterscheiden sie sich in inhibierende und aktivierende Proteine, je nach Größe der zytoplasmatischen Domäne (kurze Domäne bei aktivierender Funktion) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort [Della Chiesa M *et al.* (2008)]. Im Ergebnis der Mikroarray-Analyse wurde gezeigt, dass PBMC, welche mit IL-2 in Kombination mit dem Antikörper gegen CD137 inkubierten, KIR2DS5 im Vergleich zu allen anderen Ansätzen deutlich hochregulierten. Denkbar wäre, dass durch die Hochregulierung dieses Gens eine erhöhte Anti-Tumor-Aktivität der PBMC, vermittelt durch NK- oder T-Zellen, erzeugt wurde.

Neben den beschriebenen hochregulierten Genen fiel auf, dass beim Ansatz mit IL-2 und Antikörpern gegen CD137 in Kombination auch Gene herunterreguliert wurden, deren Funktionen mit der beobachteten erhöhten Anti-Tumor-Aktivität im Zusammenhang stehen könnten. Eins dieser Gene war FOS (*v-fos FBJ murine*

osteosarcoma viral oncogene homolog). FOS gehört zu einer Gruppe von vier Genen, die in Zusammenhang mit Proliferation, Differenzierung und Apoptose gebracht werden [Kalvelyte AV, Pabrezaite LC (1998)]. Dabei wurde festgestellt, dass eine Hochregulierung von FOS nicht in direktem Zusammenhang mit Apoptose steht, dennoch ist es bei apoptotischen Zellen hochreguliert. Des Weiteren könnten FOS-Produkte wichtige Komponenten sein, die beim Signalweg der Apoptose benötigt würden [Smeyne RJ *et al.* (1993)]. Bezugnehmend auf das Experiment könnte die Herunterregulierung von FOS bedeuten, dass die stimulierten PBMC weniger apoptotisch waren und dadurch, im Vergleich zu allen Kontrollansätzen, ihre Zytotoxizität länger aufrechterhalten konnten.

Ein weiteres Gen, was durch eine geringere Intensität auffiel, war HMOX1 (*heme oxygenase (decycling) 1*). HMOX1 ist ein wesentliches Gen beim Hämoglobin-Abbau. Zusätzlich wird in der Literatur beschrieben, dass HMOX1 und sein Nebenprodukt Kohlenstoffmonoxid (CO) die T-Zell-Proliferation unterdrücken [Pae HO *et al.* (2004), Song R *et al.* (2004)]. Des Weiteren wurde in einer anderen Arbeit beschrieben, dass HMOX1 von regulatorischen T-Zellen (CD4/CD25/FoxP3-positiv) exprimiert wird. Andaloussi und Lesniak zeigten, dass HMOX1 direkt mit der Expression von FoxP3 bei T-Zellen korreliert und eine Rolle bei der suppressiven Funktion von regulatorischen T-Zellen besitzen könnte [Andaloussi AE, Lesniak MS (2007)]. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass auch die PBMC des Versuchsansatzes aus dem Experiment weniger suppressive Effekte bezüglich der Anti-Tumor-Antwort auslösten, als die PBMC im Vergleichsansatz und in den Kontrollansätzen. Diese Daten könnten im Zusammenhang mit einer geringeren Expression von HMOX1 in Zusammenhang stehen.

Neben den bereits beschriebenen Genen war auch LILRB1 (*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 1*) eins der Gene, welches im Ansatz mit IL-2 und Antikörpern gegen CD137 eine deutlich geringere Intensität aufwies. LILRB1 befindet sich auf allen B-Zellen, auf einem Anteil der NK-Zellen (23-77%) und in geringerer Menge auf T-Lymphozyten (4-20%) [Cosman D *et al.* (1997), Colonna M *et al.* (1997)]. Das Produkt dieses Gens fungiert als Rezeptor für HLA-A, HLA-B und HLA-G Moleküle [Navarro F *et al.* (1999)]; eine Bindung von LILRB1 an HLA-Moleküle antigenpräsentierender Zellen führt zu einem inhibierenden Signal auf die CD3/TCR-vermittelte Aktivierung von T-Zellen [Saverino D *et al.* (2000)]. Eine Herunterregulierung dieses Gens könnte somit mit der erhöhten zytolytischen

Aktivität der PBMC dieses Ansatzes durch verminderte Hemmung der Aktivierung von T-Zellen in Verbindung gebracht werden.

Es ist zu vermuten, dass synergistische Effekte der beschriebenen regulierten Gene die zytotoxische Wirkung der T-Zellen durch eine Bindung mit Antikörpern gegen CD137 in Kombination mit IL-2 positiv beeinflussen können.

4.5 Schlussfolgerung

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine zusätzliche primäre Aktivierung von PBMC mit IL-2 (löslich oder in Form von IL-2-transgenen Zellen) in Kombination mit einer Interaktion am Rezeptor CD137 (durch Antikörper gegen CD137 oder CD137L-transfizierte Tumorzellen) eine spezifische zytotoxische Immunantwort gegen Zellen einer Ewing-Tumor-Zelllinie *in vitro* initiiert und verstärkt werden konnte. Messbar wurde dies in einer erhöhten Sekretion von zytotoxischen Substanzen (Interferon gamma und Granzym B), in erhöhten Anteilen an potenziell zytotoxischen Zellen und in einer erhöhten Zytotoxizität. Hinweise für diese Steigerung der Immunreaktion zeigten sich auch in Tierexperimenten, in welchen eine Verzögerung des Tumorwachstums in den Versuchsgruppen erkennbar wurde. Mikroarray-Analysen gaben Hinweise auf ein verändertes Genexpressionsprofil, welche die gezeigten Ergebnisse stützen könnten.

5 Zusammenfassung

Die in vorliegender Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass durch eine Stimulation von PBMC mit IL-2 in Kombination mit einer Interaktion am Rezeptor CD137, in Form eines Antikörpers gegen CD137 oder CD137L-transfizierter Tumorzellen, in Anwesenheit von Tumorzellen der Linie A673 eine Immunantwort erzeugt werden konnte, die zytotoxisch gegen die Tumorzellen der verwendeten Linie reagierten. Die dadurch generierte Immunantwort war stärker als die Immunantwort nach Inkubation der PBMC nur mit IL-2 und Tumorzellen. Darstellbar wurde dies durch eine deutlich verminderte Tumorzellzahl. In durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigte sich im Versuchsansatz ein höherer Anteil an aktivierten T-Zellen (CD8-positive T-Zellen, CD4-positive T-Zellen), auch die Proliferation der PBMC war im Vergleich zum Ansatz nur mit IL-2 erhöht. In einer Granzym B-ELISPOT-Messung zeigten sich die höchsten Messwerte in den Ansätzen mit Kombination von IL-2 und Interaktion am Rezeptor CD137 (durch Antikörper oder CD137L-transfizierte Tumorzellen), welche signifikant höher waren als die beim Ansatz nur mit IL-2. Deutlich wurde auch, dass mit zusätzlicher CD137-Interaktion die Immunantwort gegen die verwendeten Ewing-Tumor-Zellen spezifischer wurde. Auch im Interferon gamma-ELISPOT zeigten sich im Vergleich zum Ansatz nur mit IL-2 beim Ansatz mit beiden Substanzen signifikant höhere Messwerte. In einem NOD/SCID-Mausmodell war bemerkenswert, dass in den Ansätzen, in denen mit IL-2 (als lösliches Zytokin oder in Form von IL-2-transgenen Tumorzellen) therapiert wurde, weniger Mäuse einen Tumor entwickelten. Die zusätzliche Therapie mit einem Antikörper gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen zeigte keinen deutlichen Vorteil, allerdings war zeitweise ein verzögertes Wachstum der Tumoren im Experiment erkennbar. Die Analyse der Mikroarray-Daten erbrachte Hinweise auf Gene, die mit einer verstärkten Immunantwort durch eine Stimulation von IL-2 in Kombination mit dem Antikörper gegen CD137 in Verbindung zu bringen wären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf die Möglichkeit einer adoptiven Immuntherapie von Patienten, die an einer refraktären Erkrankung an einem Ewing Tumor leiden, bei der die aktuellen Therapieoptionen keine Remission oder kein Aufhalten des Fortschreitens der Erkrankung erreichen konnten.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP; *Cancer Res* 57:615-619 (1997).
- Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, Din WS, Goodwin RG: Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand; *Eur J Immunol* 24:2219 (1994).
- Alexander HR Jr, Bartlett DL, Libutti SK, Fraker DL, Moser T, Rosenberg SA: Isolated hepatic perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for unresectable cancers confined to the liver; *J Clin Oncol* 16:1479-1489 (1998).
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function; *Nature* 390(6656):175-179 (1997).
- Arch RH, Thompson CB: 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB; *Mol Cell Biol* 18(1):558-565 (1998).
- Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA: High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long term survival update; *Cancer J Sci Am* 6:11-14 (2000).
- Benjaminovitz A, Itescu S, Lietz K: Prevention of rejection in cardiac transplantation by blockade of interleukin-2 receptor with monoclonal antibody; *N Engl J Med* 342: 613-619 (2000).
- Bernstein ID: Monoclonal antibodies to the myeloid stem cells: therapeutic implications of CMA-676, a humanized anti-CD33 antibody calicheamicin conjugate; *Leukemia* 14:474-475 (2000).
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture; *Cancer Res* 33(11):2643-2652 (1973).
- Bokemeyer C, Panse J: Passive Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern; *Onkologie* 28 (4):9-13 (2005).
- Borchmann P, Riethmüller G, Engert A: Monoklonale Antikörper: Entwicklung und klinische Perspektiven; *Internist* 42:803-814 (2001).
- Cannons JL, Choi Y, Watts TH: Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response; *J Immunol* 165(11):6193-6204 (2000).
- Cannons JL, Hoeflich KP, Woodgett JR, Watts TH: Role of the stress kinase pathway in signaling via the T cell costimulatory receptor 4-1BB; *J Immunol* 163:2990-2998 (1999).
- Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH: 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy; *J Immunol* 167:1313-1324 (2001).
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1; *Nature* 383(6599):443-446 (1996).
- Cashman JD, Lapidot T, Wang JC, Doedens M, Shultz LD, Lansdorp P, Dick JE, Eaves CJ: Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from

- primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice; *Blood* 89(12):4307-4316 (1997).
- Cervantes F, Pierson BA, McGlave PB, Verfaillie CM, Miller JS: Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long-term culture; *Blood* 87(6):2476-2485 (1996).
- Cheng G, Cleary AM, Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D: Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling; *Science* 267:1494-1498 (1995).
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis; *Cell* 81(4):505-512 (1995).
- Chong AS, Boussy IA, Graf LH, Scuderi P: Stimulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and TNF-beta secretion in IL-2-activated T cells: costimulatory roles for LFA-1, LFA-2, CD44, and CD45 molecules; *Cell Immunol.* 144(1):69-79 (1992).
- Ciardello F, Tortora G: A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor; *Clin Cancer Res* 7:2958-2970 (2001).
- Collins, AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, Davis SJ: The interaction properties of costimulatory molecules revisited; *Immunity.* 17:201-210 (2002)
- Colonna M, Navarro F, Bellón T, Llano M, García P, Samaridis J, Angman L, Cella M, López-Botet M: A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells; *J Exp Med* 186(11):1809-1818 (1997).
- Cooper D, Bansal-Pakala P, Croft M: 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity; *Eur J Immunol* 32(2):521-529 (2002).
- Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML: A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules; *Immunity* 7(2):273-282 (1997).
- Craft AW, Cotterill SJ, Bullimore JA, Pearson D: Long term results from the first UKCCSG Ewing's Tumor Study (ET-1). United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG) and the Medical Research Council Bone Sarcoma Working Party; *Eur J Cancer* 33:1061-1069 (1997).
- Czerkinsky C, Nilsson L, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A: A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells; *J Immunol Methods* 65 (1-2):109-121 (1983).
- Dahle J, Borrebaek J, Jonasdottir TJ, Hjelmnerud AK, Melhus KB, Bruland ØS, Press OW, Larsen RH: Targeted cancer therapy with a novel low-dose rate alpha-emitting radioimmunoconjugate; *Blood.* 110(6):2049-2056 (2007)
- DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH: Costimulation of CD28 T lymphocytes by 4-1BB ligand; *J Immunol* 158:551 (1997).
- Della Chiesa M, Romeo E, Falco M, Balsamo M, Augugliaro R, Moretta L, Bottino C, Moretta A, Vitale M: Evidence that the KIR2DS5 gene codes for a surface receptor triggering natural killer cell function; *Eur J Immunol* 38(8):2284-2289 (2008).
- del Rio ML, Penuelas-Rivas G, Dominguez-Perles R, Ramirez P, Parrilla P, Rodriguez-Barbosa JI: Antibody-mediated signaling through PD-1 costimulates T cells and enhances CD28-dependent proliferation; *Eur J Immunol.* 35:3545-3560 (2005)
- Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al.: Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo; *J Immunol* 171:1581-1587 (2003).

- Dittrich W, Göhde W.: Impulse fluorometry of single cells in suspension; *Z Naturforsch B.* (3):360-361 (1969).
- Dockhorn-Dworniczak B, Schäfer KL, Dantcheva R, Blasius S, van Valen F, Burdach S, Winkelmann W, Jürgens J, Böcker W: Detection of EWS-/FLI-1 gene fusion transcripts by RT-PCR as a tool in the diagnosis of tumors of the Ewing sarcoma group; *Verh Dtsch Ges Pathol* 78:214-219 (1994).
- Duan H, Dixit VM: RAIDD is a new 'death' adaptor molecule; *Nature* 385:86-89 (1997).
- Dunn T, Prassman L, Hagag N, Viola MV: ERG gene is translocated in an Ewing's sarcoma cell line; *Cancer Genet Cytogenet* 76:19-22 (1994).
- Dunst J, Sauer R, Burgers JM, Hawliczek R, Kurten R, Winkelmann W, Salzer-Kuntschik M, Muschenich M, Jurgens H: Radiation therapy as local treatment in Ewing's sarcoma. Results of the Cooperative Ewing's Sarcoma Studies CESS 81 and CESS 86; *Cancer* 67:2818-2825 (1991).
- Dwivedi RC, Dhindsa N, Krokhin OV, Cortens J, Wilkins JA, El-Gabalawy HS: The effects of infliximab therapy on the serum proteome of rheumatoid arthritis patients; *Arthritis Res Ther.* 11(2):R32 (2009)
- Egen JG, Allison JP: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength; *Immunity* 16:23 (2002).
- Ehrlich P: On immunity with special references to cell life; *Proc Royal Soc London* 66:424-448 (1900)
- El Andaloussi A, Lesniak MS: CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas; *J Neurooncol* 83(2):145-152 (2007).
- Ewing J: Diffuse endothelioma of bone; *Proc NY Pathol Soc* 21:17-24 (1921)
- Ewing J: Further report of endothelial myeloma of bone; *Proc NY Pathol Soc* 24:93-100 (1924).
- Ewing J: A review of classifications of bone tumors; *Surg Gynecol Obstet* 68:971-976 (1939).
- Felzmann T, Witt V, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, Paul P, Hüttner K, Fritsch G: Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection; *Cytotherapy* 5:391-398 (2003).
- Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G: Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma; *Cancer J Sci Am* 6:55-57 (2000).
- Foell JL, Diez-Mendiondo BI, Diez OH, Holzer U, Ruck P, Bapat AS, Hoffmann MK, Mittler RS, Dannecker GE: Engagement of the CD137 (4-1BB) costimulatory molecule inhibits and reverses the autoimmune process in collagen-induced arthritis and establishes lasting disease resistance; *Immunology* 113:89-98 (2004)
- Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Mizutani K, Yoshino Y, Matsukawa Y, Sassa N, Okumura K, Gotoh M: Ewing's Sarcoma / Primitive Neuroectodermal Tumor of the Kidney; *Aktuelle Urol.* 17 (2009)
- Futagawa T, Akiba H, Kodama T, Takeda K, Hosoda Y, Yagita H, Okumura K: Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells; *Int Immunol* 14(3):275-286 (2002).
- Gedrich RW, Gilfillan MC, Duckett CS, Van Dongen JL, Thompson CB: CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor

- necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins; *J Biol Chem* 271(22):12852-12858 (1996).
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors; *J Natl Cancer Inst* 51(5):1417-1423 (1973).
- Golay J, Zaffaroni I, Vaccari T, et al.: Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis; *Blood* 95:3900–3908 (2000).
- Gong Q, Ou Q, Ye S, et al.: Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy; *J Immunol* 174:817–826 (2005).
- Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA et al.: Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor; *Eur J Immunol* 10:2631 (1993).
- Graziano RF, Fanger MW: FcγRI and FcγRII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells; *J Immunol* 139:3536–3541 (1987).
- Gray PW, Goeddel DV: Structure of the human immune interferon gene; *Nature* 298(5877):859-863 (1982).
- Gurney AL, Marsters SA, Huang RM, Pitti RM, Mark DT, Baldwin DT, Gray AM, Dowd AD, Brush AD, Heldens AD, Schow AD, Goddard AD, Wood WI, Baker KP, Godowski PJ, Ashkenazi A: Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR; *Curr Biol* 9:215-218 (1999).
- Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, Shiku H, Schreiber RD, Allen PM: Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy; *Immunity* 13(2): 265-276 (2000).
- Henel G, Singh K, Cui D, Pryshchep S, Lee WW, Weyand CM, Goronzy JJ: Uncoupling of T-cell effector functions by inhibitory killer immunoglobulin-like receptors; *Blood* 107(11):4449-4457 (2006).
- Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jürgens H: Deskriptive Epidemiologie der Ewing-Tumoren – Analysen der deutschen Patienten von EICES 1980-1997; *Klin. Pädiatrie* 211:271-275 (1999).
- Hiddemann W, Dreyling M, Unterhalt M: Aktuelle Entwicklungen in der Therapie follikulärer Keimzentrumslymphome; *Onkologie* 7:969-981 (2001).
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis; *Cell*. 75(2):241-251 (1993).
- Howard TA, Rochelle JM, Seldin MF: CD28 and CTLA-4, two related members of the Ig supergene family, are tightly linked on proximal mouse chromosome 1; *Immunogenetics* 33:74 (1991).
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-κB activation; *Cell* 81(4):495-504 (1995).
- Hsu H, Solovyev I, Colombero A, Elliott R, Kelley M, Boyle WJ: ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5; *J Biol Chem* 272(21):13471-13474 (1997).
- Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS: Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death; *J Immunol* 158(6):2600-2609 (1997).
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis; *Cell*. 66(2):233-243 (1991).

- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie; 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2002.
- Jürgens H: Interdisziplinäre Therapie des Ewing-Sarkoms; Schweiz Rundsch Med Prax 84:1005-1009 (1995).
- Jürgens H, Exner U, Gardner H et al.: Multidisciplinary treatment of Ewing's sarcoma of bone. A 6-year experience of an European Cooperative Trial; Cancer 61:23 (1988).
- Kalvelyte AV, Pabrezaite LC: Proto-oncogene expression in bovine peripheral blood leukemic lymphocytes during their spontaneous proliferation, differentiation and apoptosis in vitro; Leuk Res. 22(2):135-143 (1998)
- Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR et al.: Radioimmunotherapy with iodine (131) tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin Lymphoma: updated results and long-term follow up of the University of Michigan experience; Blood 96:1259-1266 (2000).
- Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M: Prolonged survival in chronic myelogenous leukaemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy; The leukaemia Service. Ann Intern Med 122:254-261 (1995).
- Kazmi SA, Perry A, Pressey JG, Wellons JC, Hammers Y, Palmer CA: Primary Ewing sarcoma of the brain: a case report and literature review; Diagn Mol Pathol 16(2):108-111 (2007).
- Kinderkrebsregister Mainz, Jahresbericht 2008, www.kinderkrebsregister.de
- Koenen HJ, Fasse E, Joosten I: Cyclosporine preserves the anergic state of human T cells induced by costimulation blockade in vitro; Transplantation 80:522-529 (2005).
- Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells producing antibodies to predefined specificity; Nature 256:495-497 (1975).
- Kotz R, Dominkus M, Zettl T et al.: Advances in bone tumour treatment in 30 years with respect to survival and limb salvage. A single institution experience; Int Orthop 26:197-202 (2002).
- Kovar H: Progress in the molecular biology of ewing tumors; Sarcoma 2:3-17 (1998)
- Kroon HM, Li Q, Teitz-Tennenbaum S, Whitfield JR, Noone AM, Chang AE: 4-1BB costimulation of effector T cells for adoptive immunotherapy of cancer: involvement of Bcl gene family members; J Immunother. 30(4):406-416 (2007)
- Kung P, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens; Science 206:347-349 (1979).
- Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, Xing L, Liu D, Wang SX, Kwon BS: Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand; J Biol Chem 274(10):6056-6061 (1999).
- Kwon BS, Weissman SM: cDNA sequences of two inducible T-cell genes; Proc Natl Acad Sci U S A 86(6):1963-1967 (1989).
- Ladenstein R, Whelan J, Oberlin O, Weston C, Jürgens H: Multivariate Analysis Based Risk Grouping of Ewing Tumors (ET) with Extra-Pulmonary Metastatic Disease (EPMD). Final Results from the EURO-E.W.I.N.G.99 Study; Monatsschr Kinderheilkd 155:987-998 (2007).
- Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, Grosmaire LS, Rabinovitch PS, Lindsten T, Thompson CB, June CH: CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways; Blood. 75(7):1531-1539 (1990)
- Lee YY, Kim do H, Lee JH, Choi JS, In KH, Oh YW, Cho KH, Roh YK: Primary pulmonary Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in a 67-year-old man; J Korean Med Sci 22:159-163 (2007).

- Levine JE, Barrett AJ, Zhang MJ, Arora M, Pulsipher MA, Bunin N, Fort J, Loberiza F, Porter D, Giral S, Drobyski W, Wang D, Pavletic S, Ringden O, Horowitz MM, Collins R Jr: Donor leukocyte infusions to treat hematologic malignancy relapse following allo-SCT in a pediatric population; *Bone Marrow Transplant.* 42(3):201-205 (2008)
- Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW: Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy; *J Exp Med.* 193(6):727-740 (2001).
- Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R: Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors; *Immunity.* 1:793-801 (1994)
- Lipshy KA, Kostuchenko PJ, Hamad GG, Bland CE, Barrett SK, Bear HD: Sensitizing T-lymphocytes for adoptive immunotherapy by vaccination with wild-type or cytokine gene-transduced melanoma; *Ann Surg Oncol* 4(4):334-341 (1997).
- Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V, Prentice HG: Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells; *Br J Haematol* 117(4):821-827 (2002).
- Lowenthal JW, Zubler RH, Nabholz M, MacDonald HR: Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes; *Nature* 315(6021):669-672 (1985).
- Lu K, Wu JY, Li BQ: Construction and expression of eukaryotic expression vector of human 4-1BB ligand gene in tumor cells and its antitumor activity in vitro; *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 23:511-514 (2007)
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES: Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL; *J Biol Chem* 272(41):25417-25420 (1997).
- Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, Gray CL, Rothe M, Ashkenazi A: Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1; *J Biol Chem* 272(22):14029-14032 (1997).
- Marx U, Embleton MJ, Fischer R, Gruber FP, Hansson U, Heuer J, de Leeuw WA, Logtenberg T, Merz W, Portetelle D, Romette J-L, Straughan DW: Monoclonal Antibody Production; The Report and Recommendation of ECVAM Workshop 23 (1997).
- Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M, Devries MJ, Tubiana M, Lalanne C, Binet JL, Papiernik M, Seman G, Matsukura M, Mery AM, Schwarzmann V, Flaisler A: Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: Chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects; *Blood* 25:179-196 (1965).
- May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Denny CT: Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation; *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5752-5756 (1993).
- Mesturini R, Nicola S, Chiocchetti A, Bernardone IS, Castelli L, Bensi T, Ferretti M, Comi C, Dong C, Rojo JM, Yagi J, Dianzani U: ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naïve CD4+ T cells; *Eur J Immunol.* 36(10):2601-2612 (2006).
- Mittler RS, Bailey TS, Klussman K, Trailsmith MD, Hoffmann MK: Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in

- vivo through the induction of helper T cell anergy; *J Exp Med* 190(10):1535-1540 (1999).
- Mlynarczyk SK, Panning B: X inactivation: Tsix and Xist as yin and yang. *Curr Biol*. 10:R899-903 (2000).
- Moreno M, Molling JW, von Mensdorff-Pouilly S, Verheijen RH, Hooijberg E, Kramer D, Reurs AW, van den Eertwegh AJ, von Blumberg BM, Scheper RJ, Bontkes HJ: IFN-gamma-producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses; *J Immunol*. 181(4):2446-2454 (2008).
- Movahedi-Lankarani S, Hruban RH, Westra WH, Klimstra DS: Primitive neuroectodermal tumors of the pancreas: a report of seven cases of a rare neoplasm; *Am J Surg Pathol* 26(8):1040-1047 (2002).
- Navarro F, Llano M, Bellón T, Colonna M, Geraghty DE, López-Botet M: The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells; *Eur J Immunol* 29(1):277-283 (1999).
- Nishimoto H, Lee SW, Hong H, Potter KG, Maeda-Yamamoto M, Kinoshita T, Kawakami Y, Mittler RS, Kwon BS, Ware CF, Croft M, Kawakami T: Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor; *Blood* 106(13):4241-4248 (2005).
- Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB: CD28 Costimulation Prevents Cell Death During Primary T Cell Activation; *J. Immunol*. 157 :636-642 (1996).
- Nooth J: Observations on the Treatment of Scirrhus Tumours of the breast; 2. Ausgabe, J. Johnson, S 13 (1806).
- Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT: Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production; *J Immunol* 172(8):4744-4751 (2004).
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL; *Science* 277(5327):815-818 (1997).
- Panning B, Dausman J, Jaenisch R: X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization; *Cell*. 90:907-916 (1997).
- Paulussen M, Ahrens S, Dunst J et al.: Localized Ewing tumor of bone: final results of the Ewing's Sarcoma Study CESS 86; *J Clin Oncol* 19:1818-1829 (2001a).
- Paulussen M, Ahrens S, Lehnert M et al.: Second malignancies after ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/Austrian/Dutch study; *Ann Oncol* 12:1619-1630 (2001b).
- Peterman GM, Stanton GJ, Altman LC, Klimpel GR: Interferon production and tumor cell killing by human lymphocytes stimulated in mixed-lymphocyte culture; *Cell Immunol*. 85(1):114-124 (1984)
- Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L: Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells; *Blood* 88(10):3731-3740 (1996).
- Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS: 4-1BB T cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti- μ -primed splenic B cells; *Eur J Immunol* 24:367 (1994).
- Rodriguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, Spunt SL, Rao BN, Santana VM, Navid F: Analysis of prognostic factors in ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital studies; *Cancer* 110(2):375-384 (2007)

- Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood; *J Exp Med.* 180(1):83-93 (1994)
- Rook AH et al.: Interleukin-12 therapy of cutaneous T-cell lymphoma induces lesion regressions and cytotoxic T-cell responses; *Blood* 94:902-908 (1999).
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Vetto JT, Seipp CA, Simpson C: A new approach of the therapy of cancer based on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2; *Surgery* 100(2):262-272 (1986).
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV: A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor; *Cell* 78(4):681-692 (1994).
- Salgia R et al.: Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma; *J Clin Oncol* 21:624-630 (2003).
- Saoulli K, Lee SY, Cannons JL, Yeh WC, Santana A, Goldstein MD, Bangia N, DeBenedette MA, Mak TW, Choi Y, Watts TH: CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand; *J Exp Med* 187(11):1849-1862 (1998).
- Saverino D, Fabbi M, Ghiotto F, Merlo A, Bruno S, Zarcone D, Tenca C, Tiso M, Santoro G, Anastasi G, Cosman D, Grossi CE, Ciccone E: The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions; *J Immunol* 165(7):3742-3755 (2000).
- Schajowicz F: Tumors and Tumorlike Lesions of Bone; Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1994.
- Schiltz PM, Beutel LD, Nayak SK, Dillmann RO: Charakterization of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human tumors for use as adoptive immunotherapy of cancer; *J Immunother* 20(5):377-386 (1997).
- Schmidt D, Herrmann C, Jürgens H, Harms D: Malignant peripheral neuroectodermal tumor and its necessary distinction from Ewing's sarcoma. A report from the Kiel Pediatric Tumor Registry; *Cancer* 68(10):2251-2259 (1991).
- Schnürch HG: Immunologische und innovative Therapieformen beim Ovarialkarzinom; *Der Gynäkologe* 30:141-150 (1997).
- Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, Kuhlen M, Konemann S, Rube C, Winkelmann W, Kotz R, Dunst J, Willich N, Jurgens H: Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials; *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55:168-177 (2003).
- Schwartz RH: A Cell Culture Model for T Lymphocyte Clonal Anergy; *Science* 248:1349-1356 (1990).
- Schwarz H, Tuckwell J, Lotz M: A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family; *Gene* 134(2):295-298 (1993).
- Seliger B, Harders C, Wollscheid U, Staeger MS, Reske-Kunz AB, Huber C: Suppression of MHC class I antigens in oncogenic transformants: association with decreased recognition by cytotoxic T lymphocytes; *Exp Hematol* 24:1275-1279 (1996).
- Sevier CE: Ewing's tumor (endothelial myeloma): report of an atypical case; *J Bone Joint Surg Am.* 12:929-955 (1930).

- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors; *Science* 277(5327):818-821 (1997).
- Shi L, Kraut RP, Aebersold R, Greenberg A: A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis; *J Exp Med*. 175:553-566 (1992).
- Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV: Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis; *Immunity*. 6(6):751-763 (1997)
- Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS: 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses; *J Exp Med* 186:47-55 (1997).
- Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI: Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo; *Nature* 363(6425):166-169 (1993).
- Smyth MJ, McGuire MJ, Thia KY: Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I; *J Immunol*. 154:6299-6305 (1995)
- Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA, Billiar TR, Otterbein LE, Choi AM: Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway; *J Immunol* 172(2):1220-1226 (2004).
- Sorg RV, Özcan Z, Brefort T, Fischer J, Ackermann R, Müller M, Wernet P: Clinical-Scale Generation of Dendritic Cells in an Closed System; *Journal of Immunotherapy* 26:374-383 (2003).
- Staege MS, Gorelov V, Bulankin A, Fischer U, Dumon K, Hohndorf L, Hattenhorst U, Kramm C, Burdach S: Stable transgenic expression of IL-2 and HSV1-tk by single and fusion tumor cell lines bearing EWS/FLI-1 chimeric genes; *Pediatr Hematol Oncol* 20(2):119-140 (2003).
- Staege MS, Hansen G, Baersch G, Burdach S: Functional and Molecular Charakterization of Interleukin-2 Transgenic Ewing Tumor Cells for In Vivo Immunotherapy; *Pediatr Blood Cancer* 43:23-34 (2004).
- Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV: Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins; *J Biol Chem* 271(33):19935-19942 (1996).
- Thistlethwaite JR, Nashan B, Hall M, Chodoff L, Lin TH: Reduced acute rejection and superior 1-year renal allograft survival with basiliximab in patients with diabetes mellitus. The Global Simulect Study Group; *Transplantation* 70:784-790 (2000).
- Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Sehra J, London L, Perussia B: Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2; *J Exp Med*. 160(4):1147-1169 (1984).
- Tyagi A, Singh RP, Ramasamy K, Raina K, Redente EF, Dwyer-Nield LD, Radcliffe RA, Malkinson AM, Agarwal R: Growth inhibition and regression of lung tumors by silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor-kappaB and signal transducers and activators of transcription 3; *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2(1):74-83 (2009)
- Uharek C, Tonn T, Uharek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann HG, Wels W: Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2- expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction; *Blood* 100:1265-1273 (2002).

- Ushigome S, Machinami R, Sorensen PH: Ewing sarcoma/Primitive neuroectodermal tumour (PNET). In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (Hrsg): Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone (WHO). IARC Press, Lyon, 298-300 (2002).
- van der Loo JC, Hanenberg H, Cooper RJ, Luo FY, Lazaridis EN, Williams DA: Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells; *Blood* 92(7):2556-2570 (1998).
- van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ: CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics; *J Exp Med.* 185:393-403 (1997).
- Van Wauwe JP, De Mey JR, Goossens JG: OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties; *J Immunol.* Jun 124(6):2708-2713 (1980).
- Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells; *Nature.* 335:440-442 (1988).
- Vial T, Descotes J: Immune-mediated side-effects of cytokines in humans; *Toxicology* 105(1):31-57 (1995).
- Vinay DS, Kwon BS: Relative abilities of 4-1BB (CD137) and CD28 to co-stimulate the response of cytokine deflected Th1 and Th2 cells; *Immunobiology* 200(2):246-263 (1999).
- Weiss A: T Lymphocyte Activation; Paul WE: Fundamental Immunology 3rd Ed., Raven Press, New York, S. 467-504 (1993).
- Westermann J, Wehnes E, Kopp J: Biotechnologische Herstellung von Zellen zur Tumorthherapie und Tumorstabilisierung; *Onkologie* 7:1097-1110 (2001).
- Wilcox RA, Chapoval AI, Gorski KS, Otsuji M, Shin T, Flies DB, Tamada K, Mittler RS, Tsuchiya H, Pardoll DM, Chen L: Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells; *J Immunol* 168(9):4262-4267 (2002a).
- Wilcox RA, Tamada K, Strome SE, Chen L.: Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity; *J Immunol.* 169:4230-4236 (2002b).
- Winkelmann W: Extremitätenerhalt bei malignen Knochentumoren; *Dtsch Ärztebl* 96:A1270-A1274 (1999).
- Winkelmann W, Jürgens H: Lokale Kontrolle bei Ewing Sarkomen. Vergleich der Ergebnisse nach intraläsionaler, marginaler und Resektion im gesunden Knochen; *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 127:424-426 (1989).
- Witzig TE, White CA, Wiseman GA et al.: Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma; *J Clin Oncol* 17:3793-3803 (1999).
- Yamada S, Ortaldo JR: Regulation of large granular lymphocytes and human T cell growth and function by recombinant interleukin 2. II. Acquisition of potent cytotoxic capabilities; *J Leukoc Biol.* 42(3):263-272 (1987).
- Zätterström UK, Johansson M, Källén A, Baldetorp B, Oredsson S, Wennerberg J, Killander D: Comparison of BrdUrd and [³H]TdR incorporation to estimate cell proliferation, cell loss, and potential doubling time in tumor xenografts; *Cytometry* 13(8):872-879 (1992).
- Zhu BQ, Song-Wen J, Yong-Qian S: CD137 enhances cytotoxicity of CD3(+)CD56(+) cells and their capacities to induce CD4(+) Th1 responses; *Biomed Pharmacother.* (2008)

Thesen

1. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 (26G6) oder CD137L-transfizierten Tumorzellen (A673-4-1BBL) allein verstärkt nicht die Proliferation der PBMC *in vitro*.
2. Steigerung der Zytotoxizität und Proliferation von PBMC durch Interaktion am Rezeptor CD137 benötigt im Tumormodell mit Zellen der Linie A673 eine suffiziente primäre Aktivierung durch IL-2.
3. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 und IL-2 verstärkt eine IL-2-initiierte Proliferation *in vitro*.
4. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 (26G6) oder CD137L-transfizierten Tumorzellen allein erhöht nicht den Anteil zytotoxischer Zellen oder deren Zytotoxizität *in vitro*.
5. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen und IL-2 erhöht den Anteil potenziell zytotoxischer Zellen und deren Zytotoxizität *in vitro*.
6. Inkubation von PBMC mit IL-2 erzeugt eine unspezifische Zytotoxizität *in vitro*.
7. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen und IL-2 oder IL-2-transgenen Tumorzellen verstärkt eine IL-2-initiierte Granzym B-Sekretion *in vitro*.
8. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen und IL-2 oder IL-2-transgenen Tumorzellen erhöht die Spezifität gegenüber Zellen der Ewing-Tumor-Familie bezüglich der Granzym B-Sekretion *in vitro*.
9. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 (26G6) oder CD137L-transfizierten Tumorzellen allein erhöht nicht deren Interferon gamma-Sekretion *in vitro*.
10. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen und IL-2 oder IL-2-transgenen Tumorzellen verstärkt eine IL-2-initiierte Interferon gamma-Sekretion *in vitro*.
11. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 oder CD137L-transfizierten Tumorzellen und IL-2 oder IL-2-transgenen Tumorzellen verzögern das Tumorwachstum in einem NOD/SCID-Mausmodell.
12. Koinkubation von PBMC mit Antikörpern gegen CD137 und IL-2 gibt Hinweise auf eine Veränderung des Genexpressionsprofils in Mikroarray-Analysen (Hochregulierung von BCL-2 und KIR2DS5; Herunterregulierung von HMOX1, FOS und LILRB1) bezüglich einer Verstärkung der Zytotoxizität *in vitro*.

Lebenslauf

Name: Caspar David Kühnöl.
Geburtsdatum: 2. August 1978.
Geburtsort: Dresden.
Nationalität: Deutsch.
Familienstand: Ledig, keine Kinder.
1983-1995: Externer Schüler der Hochschule für Musik „Carl Maria von Weber“, Dresden, Fach: Violine, Prof. H. Wenzel.
1985-1991: Grundschule.
1991-1997: Gymnasium.
1997: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife.
1997-1998: Zivildienst im Zentrallabor und in der Notaufnahme, Krankenhaus St. Joseph Stift in Dresden.
1999: Freiwilligendienst bei der Aktion Sühnezeichen Friedensdienste im Herrmann-Strauss-Hospital, Berlin.
1999-2001: Freiwilligendienst bei der Aktion Sühnezeichen Friedensdienste im „Jaffa Institute“, Tel Aviv, Israel.
2001-2007: Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
2003: Physikum.
2003-2004: Studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Prof. Dr. Dr. B. Fischer).
2004: Beginn der Promotionsarbeit im Forschungslabor für Krebskranke Kinder, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Prof. Dr. G. Horneff).
2004-2007: Mitglied der Berufungskommission C3 Nuklearmedizin, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
2005-2006: Wissenschaftliche Hilfskraft im Forschungslabor für Krebskranke Kinder, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Prof. Dr. R. Grabitz).
2006: Kurs: Tierschutz und Versuchstierkunde für experimentell tätige Mitarbeiter, Institut für Medizinische Grundlagenforschung, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
2007: Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung.
2007: Approbation.
Seit 2007: Arzt in Weiterbildung, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum der Medizinischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Prof. Dr. D. Körholz).
2008: Kurs: Prüfarzt für Klinische Studien, Koordinierungszentrum für Klinische Studien Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
Seit 2008: Ärztlicher Mitarbeiter im Kinderpalliativteam „Clara“ (PD Dr. C. Kramm).
2009: Ausbildungsstipendium der Sächsisch-Thüringischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin.
2009: Kurs: Pädiatrische Palliativmedizin, Akademie für Palliativmedizin und Hospizarbeit Dresden, Dresden.

Erklärungen

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Promotion selbständig und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind als solche kenntlich gemacht und vollständig angegeben.

Die vorliegende Promotion wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, 24. November 2009

(Caspar D. Kühnöl)

Hiermit erkläre ich, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist oder war.

Halle, 24. November 2009

(Caspar D. Kühnöl)

Publikationshinweise mit Ergebnissen dieser Arbeit

Posterpräsentationen

Föll J, Kühnöl CD, Horneff G, Staeger MS: Costimulation through CD137 enhances interleukin-2 driven immune responses against Ewing family tumor cells; Sarcoma meeting Stuttgart. 15.-17.06.2005, Stuttgart. Sarcoma 9:81-82 (2005)

Kühnöl CD, Staeger MS, Diwan O, Niu L, Burdach S, Mittler R, Föll J: Establishment of a specific immune response against Ewing family tumors with co-stimulating molecule CD137 and IL-2; 4th annual symposium of the association for immunotherapy of cancer. 04.-05.05.2006, Mainz. Cancer Immunol. Immunother. 56:419 (2006)

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn PD Dr. Jürgen L. Föll, der mich während meiner Promotionsarbeit und darüber hinaus immer vorzüglich und in beispielhafter Weise betreut und unterstützt hat. Des Weiteren geht gleicher Dank an Herrn PD Dr. Martin S. Staeger, der durch seine Unterstützung maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war.

Ich bedanke mich bei den kommissarischen Direktoren Herrn Prof. Dr. G. Horneff, Herrn Prof. Dr. R. Grabitz und bei meinen Lehrern Herrn Direktor Prof. Dr. D. Körholz und Herrn PD Dr. C. Kramm, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors für krebskranke Kinder, im Besonderen bei Frau Ines Volkmer für die Unterstützung bei den Mikroarray-Analysen, Herrn Ingo Neumann, Herrn Christoph Hutter, Frau Jenny Kaftan, Herrn Dr. Uwe Hattenhorst, Frau Manuela Hesse, Frau Daniela Max, Frau Marita Reiprich und Frau Corinna Giersberg für hilfreiche Unterstützungen und fruchtbare Diskussionen. Großer Dank geht an Herrn Dr. Robert Mittler für die Bereitstellung des Antikörpers gegen CD137 und an Herrn Prof. Dr. S. Burdach, der die Mikroarray-Genchips und die NOD/SCID-Mäuse zur Verfügung gestellt hat. Des Weiteren bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Dr. Ortrud Diwan mit ihren Mitarbeiterinnen Frau Erika Schlesinger, Frau Undine Musielinkski und Frau Janett Werquin für die Unterstützung bei der Durchführung von durchflusszytometrischen Analysen; bei Frau Dr. Elisabeth Rosenfeld mit ihren Mitarbeiterinnen Frau Constanze Gottschalk und Frau Martina Hennicke für die perfekte Unterstützung bei der Durchführung der Tierexperimente, den Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie für die Bereitstellung von Blutprodukten und Herrn Dr. Tobias Polte für hilfreiche Diskussionen. Für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Sibylle Slavik.

Ich danke meinen Eltern für ihre großzügige finanzielle Unterstützung, die mir den zeitlichen Freiraum gegeben hat, mich während des Studiums intensiv mit der Thematik auseinander zu setzen und meiner lieben Freundin Julia Hüfner, die mich oft entbehren musste.