

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie

Direktorin Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Gentherapeutischer Ansatz zur Immuntherapie von Lebertumoren

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jurek Marius Schwerg
aus Berlin

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 24.01.2011

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. G Tiegs

Inhaltsverzeichnis

Gentherapeutischer Ansatz zur Immuntherapie von Lebertumoren	1
1. Zielsetzung	5
2. Einleitung.....	6
2.1. Das hepatozelluläre Karzinom	6
2.2. Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und Ansätze der Gentherapie	6
2.3. Tumorzellen und das Immunsystem	9
2.4. T-Zell-Subpopulationen	10
2.5. Strategien des Tumors zur Umgehung des Immunsystems	11
2.6. Immunstimulatorische Gene.....	12
2.6.1. <i>single chain</i> Interleukin-12.....	12
2.6.2. Interleukin-2	14
2.6.3. Co-Stimulation durch 4-1 BBL.....	15
3. Material und Methoden	18
3.1. Material	18
3.1.1. Allgemein benötigte Geräte.....	18
3.1.2. Allgemein benötigte Programme	18
3.2. Methoden.....	18
3.2.1. Zellkultur	18
3.2.2. Transfektion von Tumorzelllinien	20
3.3. Etablierung eines Co-Kultur-Modells zur Untersuchung von synergistischen Effekten von Immunstimulatoren.....	20
3.4. Cytokin-Nachweis	22
3.4.1. Western-/Immunoblot	22
3.4.2. ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>).....	27
3.4.3. <i>Cytokine Array</i>	28
3.5. Analyse der Immunzellen und Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie	30
3.5.1. Durchflusszytometrische Analyse von Tumorzellen zur Transfektionskontrolle.....	30
3.5.2. Durchflusszytometrische Analyse der MOI (<i>multiplicity of infection</i>) von Tumorzellen	31
3.5.3. Durchflusszytometrische Analyse von murinen Immunzellen.....	31
3.5.4. Durchflusszytometrische Untersuchung von humanen PBMCs.....	33
3.6. Tierexperimentelle Arbeiten.....	34
3.6.1. Milzzellgewinnung.....	35
3.6.2. Tumor-Implantation.....	36
3.6.3. Injektion des adenoviralen Vektors.....	38
3.6.4. Der Operationsverlauf in Bildern.....	40
3.7. Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	42
3.8. Statistische Auswertung	42
3.9. Plasmide	44
4. Ergebnisse	46
4.1. Transfektion von Tumorzellen und Expression von Transgenen.....	46

4.2.	<i>In vitro</i> -Stimulation von Immunzellen durch scIL-12	48
4.2.1.	Induktion der IFN- γ Produktion durch scIL-12	48
4.2.2.	Murine Milzzellen reagieren konzentrationsabhängig auf scIL-12 mit IFN- γ -Produktion	49
4.2.3.	scIL-12 induziert die Cytokine einer T _{H1} -Immunantwort	50
4.3.	Nachweis synergistischer Effekte der Immunstimulatoren im murinen Co-Kultur-Modell	51
4.3.1.	Analyse mittels IFN- γ -ELISA	52
4.3.2.	Untersuchung zellspezifischer Aktivierung mittels Durchflusszytometrie	53
4.3.3.	Erfassung der Cytokin-Profiles mittels <i>Cytokine Array</i>	54
4.4.	Immunstimulatorische Effekte adenoviraler Infektion <i>in vitro</i>	56
4.5.	Nachweis synergistischer Effekte in einer <i>in vivo</i> -Mausstudie	58
4.5.1.	Untersuchung der antitumoralen Antwort auf Hepa 1-6 Tumorzellen	58
4.5.2.	Gentherapie mit scIL-12+4-1BBL+IL-2 verbessert das Überleben <i>in vivo</i>	59
4.6.	Nachweis synergistischer Effekte der Immunstimulatoren im humanen Co-Kultur-Modell	61
4.6.1.	Analyse mittels IFN- γ -ELISA	61
4.6.2.	Untersuchung zellspezifischer Aktivierung mittels Durchflusszytometrie	62
4.6.3.	Aktivierung von cytotoxischen T-Zellsubpopulationen gemessen mittels Durchflusszytometrie	64
4.6.4.	T _{H17} -Zellen gemessen durch Durchflusszytometrie	69
4.6.5.	Darstellung der gesamten Immunantwort mittels <i>Cytokine Array</i>	70
5.	Diskussion	72
5.1.	<i>Selektion der Cytokinkombinationen und Validierung</i> im murinen System	72
5.1.1.	Transfektion von Tumorzellen und Expression von Transgenen	72
5.1.2.	Überprüfung der biologischen Funktion von transgenen scIL-12	72
5.1.3.	Etablierung eines Co-Kultur-Modells	73
5.1.4.	Synergistische und additive Effekte von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 im murinen System	73
5.1.5.	Immunstimulatorische Effekte des adenoviralen Vektors	75
5.2.	Anwendung des adenoviralen Vektors <i>in vivo</i> (Tierstudie)	76
5.3.	<i>In vitro</i> -Untersuchungen humaner Immunzellen	78
5.3.1.	Aktivierung des Immunsystems	78
5.3.2.	Bedeutung der T-Zellsubpopulationen	79
6.	Zusammenfassung	82
7.	Anhang	83
7.1.	Abbildungen	83
7.2.	Abkürzungsverzeichnis	88
7.3.	Abbildungsverzeichnis	91
7.4.	Tabellenverzeichnis	93
8.	Literaturverzeichnis	94
9.	Danksagung	102
10.	Lebenslauf	103
11.	Erklärung	104

1. Zielsetzung

Die Initiierung einer antitumoralen Immunantwort durch den Gentransfer von immunstimulatorischen Mediatoren ist ein vielversprechendes Konzept in der Immuntherapie. Ein Ansatz ist der Transfer von Genen kodierend für immunstimulatorische Modulatoren in Tumorzellen zur Überwindung ihrer Immuntoleranz. Eine tumorspezifische Immunantwort könnte nicht nur den Primärtumor, sondern auch mögliche Metastasen eliminieren und ein Wiederauftreten von Tumorwachstum verhindern.

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Co-Kultur-Modells aus lebenden Tumorzellen zusammen mit Immunzellen, um additive und synergistische Effekte verschiedener Immunstimulatoren zu untersuchen. Dies ermöglicht es nicht nur, die Wirkung sezernierter Immunstimulatoren, sondern auch lebender Zell-Zell-Interaktionen zu untersuchen. Dadurch sollen effektivste Genkombinationen zur Abtötung der Tumorzellen gefunden werden.

In dieser Arbeit sollen *single chain* IL-12 (scIL-12), 4-1BB Ligand (4-1 BBL) und Interleukin-2 (IL-2) untersucht werden. Um den Unterschieden zwischen dem humanen und murinen Immunsystem Rechnung zu tragen, werden diese Experimente mit Zellen beider Spezies durchgeführt.

Die Aktivierung des T_{H1} -Weges wird exemplarisch mittels IFN- γ -ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ermittelt. Darüber hinaus wird die Immunantwort mit *Cytokine Arrays* und zellspezifisch mit Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wird der Vielfarb-Durchflusszytometrie eingesetzt, um die Aktivierung einzelner Subpopulationen wie natürlicher Killer-Zellen (NK-Zellen), T-Helferzellen (T_H -Zellen) und cytotoxischer T-Zellen (cT-Zellen) zu untersuchen. Außerdem kann die Aktivierung von verschiedener T-Zellsubpopulationen wie *effector memory* T-Zellen (T_{em}), *effector memory* RA⁺ T-Zellen (T_{EMRA}), *central memory* T-Zellen (T_{cm}), *effector* T-Zellen (T_{eff}) und naiven T-Zellen untersucht werden.

In vivo sollen die tumorlytischen Effekte von sc-IL-12, 4-1BBL und IL-2 in der Aktivierung des Immunsystems überprüft werden. Dafür soll ein syngenes und orthotopes Tumormodell in der Maus etabliert werden. Ein adenoviraler Vektor, kodierend für scIL-12, 4-1BBL und IL-2 wird intratumoral injiziert und dessen antitumorale Wirkung *in vivo* überprüft.

2. Einleitung

2.1. Das hepatozelluläre Karzinom

Primärer Leberkrebs ist die sechsthäufigste Krebsart (Gerolami R et al. 2003). Auf das hepatozelluläre Karzinom (HCC) entfallen 80% der primären Lebertumore, mit einer steigenden Tendenz (Bosch FX et al. 2004) und einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 7% trotz Behandlung (Carr BI et al. 2004). Die jährliche Mortalität von HCC wird auf 1 250 000 weltweit geschätzt (Schafer DF et al. 1999). Die Inzidenz steigt in den letzten Jahrzehnten auch in westlichen Ländern deutlich an und liegt bei 10-30 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr (Lovet JM et al. 2003). Neben den chronischen Virushepatitiden B, C und D, hereditären Lebererkrankungen und chemischen Karzinogenen ist in westlichen Ländern die alkoholinduzierte, chronische Hepatopathie die häufigste HCC-Ursache (Spangenberg HC et al. 2007). Zusätzlich ist die Leber der häufigste Ort für Metastasen, insbesondere bei gastrointestinalen Tumoren. Die Lebertransplantation eliminiert den Tumor und erlaubt oft die Heilung der Lebergrunderkrankung. Aufgrund des Mangels an Spenderorganen ist dies nur für eine Minderheit der Patienten eine Option. Einzelne Knoten können chirurgisch entfernt werden, doch ist mit hohem Rezidivrisiko zu rechnen. Regionale Behandlungen wie transarterielle Embolisation (TACE), perkutane Ethanol-Injektion, laserinduzierte Thermotherapie, Radiotherapie, und Mikrowellen-Koagulationstherapie mögen hilfreich sein, doch die Langzeitüberlebensrate bleibt gering. Konventionelle Strahlen- oder Chemotherapie sind weitgehend unwirksam bei HCC. Die Entwicklung neuer Tumortherapien ist dringend notwendig.

2.2. Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und Ansätze der Gentherapie

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden viele der molekularen Mechanismen, die zu der Entstehung der Malignität des Krebses führen, aufgedeckt und liefern nun Ziele für die Gentherapie. Gentherapie basiert auf dem Transfer von genetischem Material in die Tumorzellen, um ein Tumorwachstum zu verhindern. Tumore sind die häufigste Anwendung der Gentherapie (Edelstein ML et al. 2004).

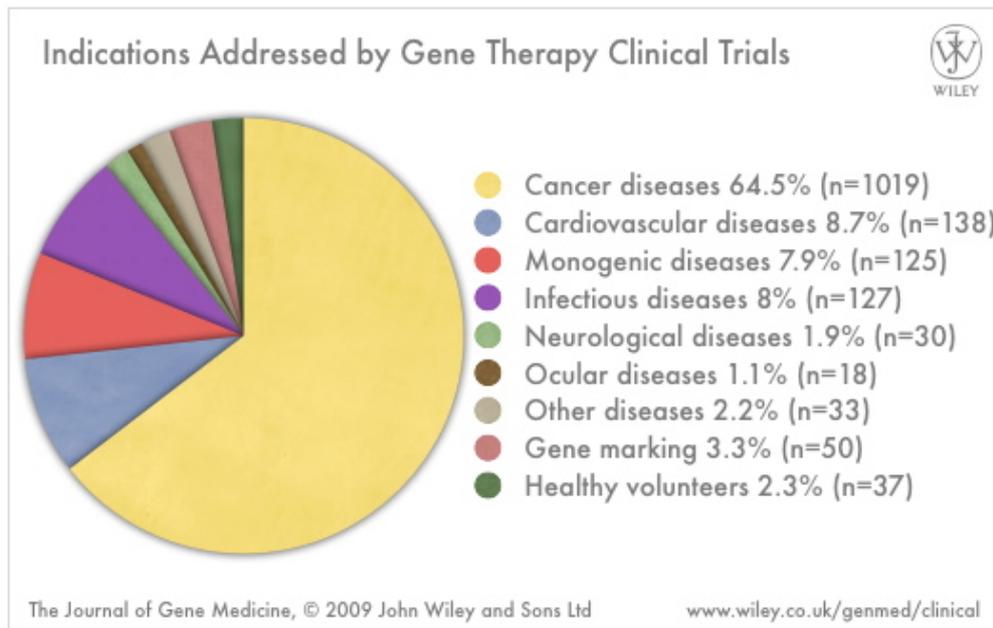


Abbildung 1: Indikationen für klinische Versuche in der Gentherapie bis 2009
www.wiley.co.uk/genmed/clinical 12.02.2010)

Ein Funktionsverlust bestimmter Gene führt zu Entstehung von Malignität (Kudson AG et al. 2001). Diese Tumorsuppressor-Gene kontrollieren die Proliferation und die Apoptose von Zellen, um einen gleichmäßigen Zellumsatz im Gewebe zu garantieren. Die Wiederherstellung der Funktion dieser Gene kann die Krebsentstehung rückgängig machen (Fang B et al. 2003). In mehr als 50% der menschlichen Tumoren liegt eine Mutation im Tumorsuppressor-Gen p53 vor. Funktionsverlust von p53 führt zu unkontrolliertem Wachstum und Verlust der von DNA-Schäden abhängigen Apoptose. Dies führt zur Akkumulation von Mutationen und zur Entstehung von Malignität. Der Transfer vom p53-Tumorsuppressor-Gen hat in verschiedenen Tiermodellen Effekte gezeigt. Ein adenoviraler Vektor, für p53 kodierend, ist zum ersten kommerziell vertriebenen Gentherapeutikum geworden (Peng Z et al. 2005). Ein großes Problem bei diesem Ansatz ist, dass in allen Krebszellen die Funktion des Tumorsuppressor-Gens wiederhergestellt werden muss. Dies ist mit den momentan angewendeten Gentherapie-Vektoren noch unmöglich.

Andere Mutationen, die zu Krebs führen, liegen in sogenannten Onkogenen. Onkogene sind Gene, die bei einer erhöhten Funktion zur Entstehung von Krebs führen. Der Therapieansatz in diesem Fall ist die Blockierung der Funktion. Die Wiederherstellung dieser Gene soll nicht nur die Proliferation hemmen, sondern auch die Empfindlichkeit für Apoptose wieder herstellen. Zum Beispiel führt die Inhibition

vom RAS-Onkogen nicht nur zur Aufhebung des mitotischen Signals, sondern hebt auch die Hemmung auf dem p53-Weg auf (Hallaschek-Wiener J et al. 2004). Eine Möglichkeit ist die Einführung einer Antisense-DNA. Diese führt zur Entstehung von cDNA-RNA-Hybriden, die in der Zelle durch Nukleasen abgebaut werden.

Eine weitere Variante ist die *gene-directed enzyme/pro-drug therapy (GDEPT)*. Sie basiert auf dem Transfer von exogenen Genen, welche eine nicht-toxische Vorstufe direkt im Tumor in ein zytotoxisches Chemotherapeutikum umwandeln. Diese Strategie ist nicht tumorspezifisch, muss also direkt in den Tumor appliziert werden. Doch dadurch ist es möglich, höhere Dosen eines Medikamentes lokal zu erreichen und dies mit geringeren Nebenwirkungen (Vassaux G et al. 2004). Beispielweise wandelt die Cytosin-Desaminase das Antimykotikum 5-Fluorocytosin in das zytotoxische 5-Fluorouracil um (Yazawa K et al. 2002).

Die Erkenntnis, dass das Wachstum von Tumoren direkt von der Vaskularisierung abhängt, führte zur Entwicklung der antiangiogenetischen Gentherapie. Antiangiogenese-Faktoren, wie Endostatin, wurden identifiziert und zeigten *in vivo* eine tumorinhibierende Wirkung (Mi J et al. 2006). Diese Strategie wird als sicherer angesehen, da sie nicht die vorhandenen Gefäße des normalen Gewebes betrifft. Besonders im HCC, mit seiner starken Vaskularisierung, wird ein starker therapeutischer Nutzen erhofft. Durch die Gentherapie können die Faktoren relativ konstant über einen längeren Zeitraum das Tumorwachstum hemmen. Tatsächlich war ein adenoviraler Vektor mit für Endostatin kodierender cDNA effektiver in der Wachstumshemmung als direkt injiziertes Endostatin (Liang ZH et al. 2004).

Es gibt auch die Strategie, die lytische Wirkung von Viren gegen Tumore einzusetzen. Die Idee ist, einen Virus zu benutzen, der bevorzugt Tumorzellen befällt und sich in ihnen repliziert. Dabei soll das normale Gewebe relativ intakt gelassen werden. Dies wird zum Beispiel durch das Einbauen von tumorspezifischen Promotoren zur Kontrolle von Virusproteinen erreicht. Dadurch wird der Virus nur in Tumorzellen replikationsfähig. Besonders in Kombination mit herkömmlichen Therapieansätzen haben onkolytische Viren schon Erfolge gezeigt (Garber K et al. 2006).

Eine sehr vielversprechende Variante der Gentherapie ist die Immuntherapie, welche die Grundlage dieser Arbeit ist. Sie basiert auf der Beobachtung, dass Tumorzellen ihre Charakteristika und ihre Umgebung verändern, um einer Erkennung durch das Immunsystem zu umgehen und eine Zerstörung des Tumors zu verhindern (siehe 2.5).

2.3. Tumorzellen und das Immunsystem

Die Funktion des Immunsystems besteht im Schutz des Körpers vor Schädigung durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten. Wie das erhöhte Auftreten von Malignität bei immundefizienten Patienten zeigt, ist auch der Schutz vor transformierten Zellen Teil der Aufgaben des Immunsystems. Das Immunsystem wird im Allgemeinen in ein angeborenes und ein adaptives System unterteilt. Das angeborene System ist für die erste Abwehr zuständig und reagiert auf allgemeine Strukturmerkmale. Es bildet jedoch nur eine räumlich und zeitlich begrenzte Immunantwort. Zum angeborenen Immunsystem gehören unter anderem Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und NK-Zellen. Insbesondere NK-Zellen erfüllen eine wichtige antitumorale Funktion (Soloski M et al. 2001).

Im Gegensatz dazu ist das adaptive Immunsystem antigenspezifisch. Durch das adaptive Immunsystem bildet sich eine Immunantwort gegen eine spezifische Struktur. Diese Immunantwort betrifft den gesamten Körper und kann zeitlich lang erhalten bleiben. Diese Eigenschaften können dazu genutzt werden, nicht nur einen Primärtumor, sondern auch Metastasen langfristig zu bekämpfen. Bei der adaptiven Immunantwort wird eine B-Zell- und eine T-Zell-Antwort unterschieden. Es wird angenommen, dass die T-Zell-Antwort für den antitumoralen Effekt des adaptiven Immunsystems verantwortlich ist. Cytotoxische T-Zellen sind in der Lage, maligne oder viral infizierte Zellen zu erkennen und zu zerstören. Diese cytotoxischen T-Zellen werden über den so genannten T_{H1} -Weg aktiviert, im Gegensatz zum T_{H2} -Weg, welcher die antikörpervermittelte B-Zellantwort initiiert.

Die verschiedenen Zellen des Immunsystems können über Oberflächenmarker unterschieden und identifiziert werden. Diese Marker werden im CD-System (cluster of differentiation) charakterisiert.

Zusätzlich zu den zellulären Bestandteilen des Immunsystems ist eine große Anzahl an interzellulären Signalpeptiden (Cytokinen) bekannt. Viele dieser Cytokine wie z.B. Interleukin-12 haben eine wichtige Funktion in der Regulation einer antitumoralen Immunantwort. Über diese Cytokine wird unter anderem die Entscheidung zwischen einer B-Zell- (T_{H2}) oder T-Zell- (T_{H1})-Antwort reguliert.

Eine effektive Immunantwort gegen einen Tumor erfordert die Aktivierung des adaptiven und des angeborenen Immunsystems. Sowohl NK- als auch T-Zellen werden für eine Langzeitimmunität benötigt (Pan PY et al. 2004).

2.4. T-Zell-Subpopulationen

Die Idee, das Immunsystem zu nutzen, um Tumore zu bekämpfen, gibt es schon länger. Doch obwohl man in der Vakzin-Forschung in der Lage war, eine immunologische Antwort auf Tumor-Antigene zu schaffen, kam es nicht zu größeren klinischen Erfolgen. Die Generierung von tumorreaktiven CD8+ T-Zellen allein ist ineffektiv, eine klinische Tumorregression zu bewirken (Klebanoff C et al. 2006).

Die Population der CD8+ T-Zellen kann noch in Subpopulationen unterteilt werden. In dieser Arbeit werden 5 verschiedene Subpopulationen unterschieden: naive T-Zellen, *central memory* T-Zellen (T_{cm}), *effector memory* T-Zellen (T_{em}), *effector memory* RA+ T-Zellen (T_{EMRA}) und *effector* T-Zellen (T_{eff}). Diese Subtypen unterscheiden sich nun in ihrem proliferativen Potential, ihrer Zytotoxizität, dem Überleben und der IL-2-Produktion. Das Scheitern bisheriger Bemühungen in der Immuntherapie lässt sich zum Teil auf die Aktivierung des falschen Subtypen zurückführen. Es besteht zwar noch keine Sicherheit, welcher Subtyp nun das größte Potential in der Immuntherapie hat, doch die höchste Bedeutung haben die T_{cm} - und T_{em} -Zellen (Perret R et al. 2008).

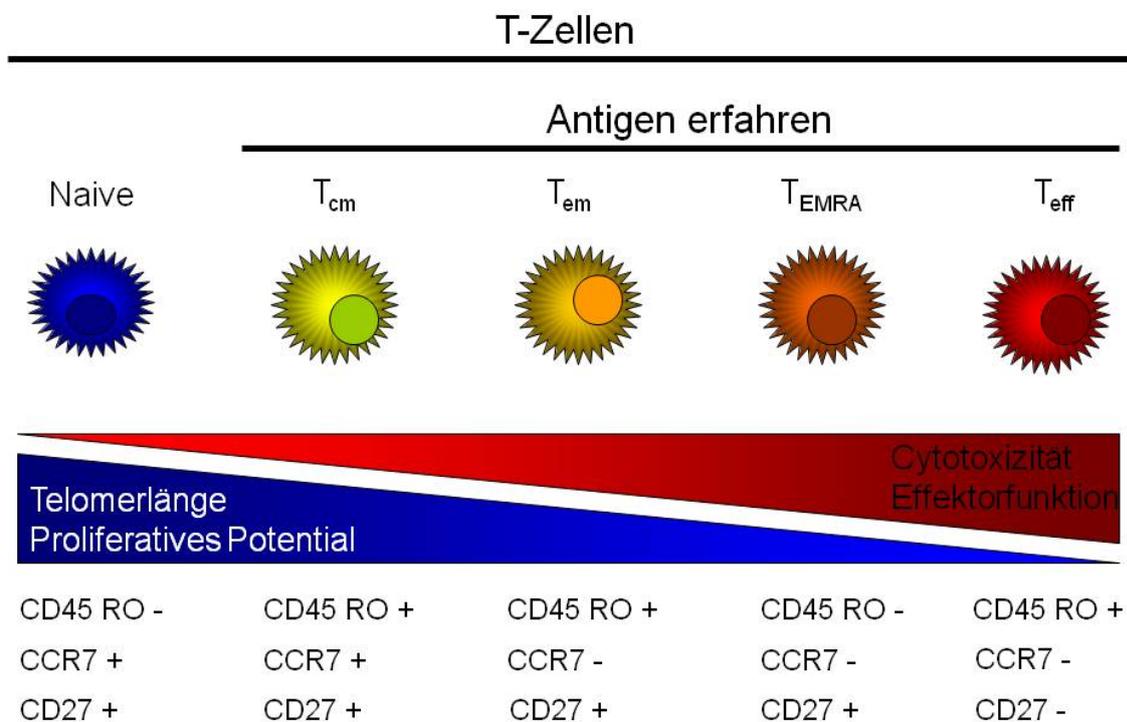


Abbildung 2: Schematische Einteilung der T-Zellsubpopulationen. T-Zellen lassen sich durch Oberflächenmarker in verschiedene Subpopulationen unterteilen und so in der Durchflusszytometrie unterscheiden.

T_{cm} sind antigenerfahrene Zellen, welche CD62L und CCR7 exprimieren. Diese Oberflächenmarker sind notwendig für die Immigration der Zellen in die T-Zellzonen der Lymphknoten und endothelialen Venolen. Im Gegensatz dazu sind T_{em} antigenerfahrene Zellen, welche diese Marker herunterreguliert haben und eine Neigung für die Immigration in periphere Gewebe, wie Lunge, Leber und entzündete Gewebe haben. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde den T_{em} die Aufgabe des Schutzes vor peripheren Belastungen und den T_{cm} die Aufgabe des Schutzes vor systemischen Belastungen zugewiesen (Salusto F et al. 1999). Von den T_{em} -Zellen sind die T_{EMRA} Zellen abzugrenzen. Es wird angenommen, dass T_{EMRA} Zellen aus den antigenerfahrenen T_{CM} durch homeostatische Cytokine entstehen (Geginat J et al. 2003). Ihre Rolle in der Krebstherapie ist noch umstritten. Eine Aktivierung und Generierung von tumorspezifischen T_{cm} und/oder T_{em} ist momentan einer der vielversprechendsten Ansätze in der Immuntherapie.

2.5. Strategien des Tumors zur Umgehung des Immunsystems

Es ist bekannt, dass bei Supprimierung des Immunsystems die Häufigkeit der Tumorentstehung im Menschen steigt. Doch auch im Menschen mit kompetentem Immunsystem kommt es zu Tumorerkrankungen. Über verschiedene Mechanismen schaffen es Tumore, dem Immunsystem zu entkommen und sich vor ihm zu verstecken. Einer der bekanntesten Mechanismen ist die Herunterregulation von HLA-1- (*human leucocyte antigen*) Molekülen (Algarra I et al. 1997). HLA-1 ist für die Präsentation der eigenen Identität einer Zelle gegenüber dem Immunsystem verantwortlich. Über die HLA-1 werden in der Zelle exprimierte Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert und so eine fremde Zelle oder eine virusbefallene Zelle erkennbar gemacht und zerstört. Durch die Herunterregulation von HLA-1 versteckt sich die Tumorzelle vor dem Immunsystem.

Eine weitere Möglichkeit der Tumorzellen sich vor dem Immunsystem zu tarnen, ist es, die Beladung der HLA-1-Proteine mit Tumorantigenen zu verhindern. Dies geschieht über Mutationen im TAP-Molekül. Das TAP ist für die Beladung der HLA-1 mit Peptiden verantwortlich. Fällt diese Beladung aus, präsentiert die Tumorzelle ihre Antigene nicht nach außen und wird so vom Immunsystem nicht erkannt (Khong HAT et al. 2002).

Auch die Effektormechanismen des Immunsystems werden umgangen. Zwei Todes-Rezeptoren, die eine wichtige Rolle spielen, sind Fas und TRAIL (Takeda K et al. 2002). Bei vielen Tumoren treten Mutationen in der cytoplasmatischen Domäne auf, welche für die Übertragung des Todessignals von der Immunzelle auf die Tumorzelle essentiell ist. Auch die Sekretion von löslichen Fas von Tumorzellen wurde beobachtet. Dieser lösliche Rezeptor blockiert den Fas-Ligand auf der Immunzelle und blockiert damit die Fas-Fas-Ligand-Interaktion zwischen Tumorzelle und Immunzelle (Nagao M et al. 1999).

Zusätzlich zum Antigen braucht eine Immunzelle eine Co-Stimulation für die optimale Aktivierung. Bei vielen Tumoren fehlen diese co-stimulatorischen Signale, was zum Beispiel bei T-Zellen zur Einnahme eines Ruhezustands führen kann (Schwartz RH et al. 1990). Die künstliche Einfuhr dieser Co-Stimulatoren zeigt experimentell eine Erhöhung der Immunogenität von Tumorzellen (Chen L et al. 1994).

Die Aktivierung oder Inhibition von Immunzellen hängt auch von der Präsenz oder Abwesenheit von zahlreichen Cytokinen in ihrer Umgebung ab. Tumorzellen produzieren viele verschiedene Cytokine und Chemokine welche die Entwicklung und Funktion der Immunzellen negativ beeinflussen können. Im Serum von Tumorpatienten wurde das Cytokin Interleukin-10 (IL-10) nachgewiesen. IL-10 hemmt die Funktion und Entwicklung von Dendritischen Zellen (DC) und führt zur erhöhten spontanen Apoptose (DeSmedt T et al. 1997). IL-10 hemmt die IL-12 Produktion und die Induktion von T-Helfer-Zellen des Typ 1 (Sharma S et al. 1999). Diese Effekte können den Tumor vor einer cytotoxischen T-Zell-Antwort schützen. Das Ziel dieser Arbeit ist es nun, das Mikromilieu des Tumors so zu verändern, dass es zu Initiierung einer Immunantwort gegen den Tumor kommt.

2.6. Immunstimulatorische Gene

Verschiedene Kombinationen von Cytokinen und Co-Stimulatoren werden in der Immuntherapie verwendet. In dieser Arbeit wurden die synergistischen Effekte von Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-2 (IL-2) und 4-1 BBL untersucht.

2.6.1. *single chain* Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) ist ein aus zwei Untereinheiten bestehendes heterodimeres Cytokin: eine große Untereinheit von 40 kD und eine kleinere von 35 kD. Die beiden Gene der Untereinheiten liegen separat und nicht verwandt. Sie sind über

Disulfid-Bindungen kovalent verbunden. Im *single chain* Interleukin-12 (scIL-12) sind die p35- und p40-Untereinheit über ein linker-Protein verbunden. Dies sichert die Expression von beiden Untereinheiten in gleichen Mengen durch Ablesen von der mRNA als ein Protein. Interleukin-12 (IL-12) spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von intrazellulären Parasiten und Bakterien, als auch in der organspezifischen Autoimmunität (Tricheri G 2003). Produziert wird IL-12 von aktivierten Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten und von Dendritischen Zellen (DC). IL-12 ist ein Cytokin mit einer stark aktivierenden Wirkung auf NK- und T-Zellen (Colombo MP 2002). Dies ist insbesondere wichtig in der Umpolarisierung der von CD4⁺ T-Zellen von einer T_{H2}-Antwort zu einer T_{H1}-Antwort, bei der Reaktivierung und dem Überleben von CD4⁺ T-Gedächtniszellen, als auch als wichtiges Signal für die CD8⁺ T-Zell-Differenzierung (Curtinsinger JM et al. 2003, Yoo JK et al. 2002, Wesa A et al. 2007). IL-12 unterstützt die Präsentation von Tumorantigenen durch die Hochregulation von MHC-Klasse 1 und 2 Molekülen. All diese Effekte sind stark assoziiert mit der Induktion der IFN- γ -Expression. Via IFN- γ werden Makrophagen stärker phagozytotisch und NK-Zellen stärker zytotoxisch. Außerdem zeigt IL-12 antiangiogenetische Eigenschaften über die Hochregulation von *IFN- γ induced protein* (IP-10) und *monokine induced by IFN- γ* (MIG) (Strieter RM et al. 1995). Auch die Produktion von Angiogenese-Faktoren der Tumorzellen wird über IL-12 gehemmt (Dias S et al. 1998).

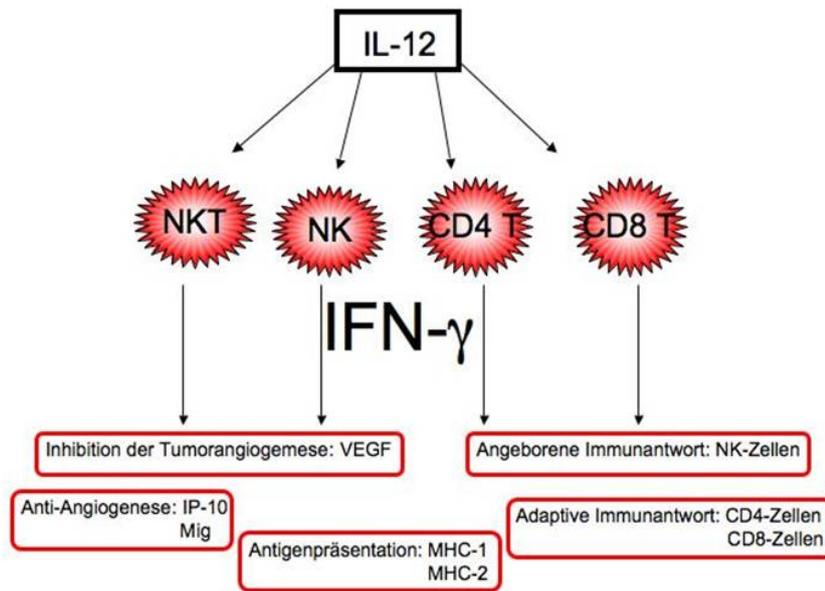


Abbildung 3: Schematische Darstellung der antitumoralen Wirkung von IL-12. IL-12 führt zur Stimulation von NKT, NK, CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen. Dies führt zu großen Teilen über IFN- γ zur antitumoralen Wirkung. Es kommt zur Hemmung der Angiogenese und zur Aktivierung der adaptiven und angeborenen Immunantwort.

IL-12 hat sich als einer der vielversprechendsten Kandidaten für eine Immuntherapie von Tumoren herauskristallisiert. Frühere Versuche zeigten eine starke Antitumorwirkung von scIL-12 im Tiermodell (Waehler R et al. 2004). Eine Kombination mit weiteren Immunstimulatoren könnte die antitumoralen Wirkungen verstärken und so zu einem klinischen Erfolg führen.

2.6.2. Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) wird natürlicherweise von T-Zellen produziert und dient als wichtiger Wachstumsfaktor und Aktivitätsfaktor für zytotoxische T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und B-Lymphozyten. Die Behandlung mit IL-2 führt zur Tumorrückbildung in Patienten mit fortgeschrittenen Nierenkarzinom, Kolonkarzinom und Melanomen (Rosenberg SA et al. 1998).

Immunantworten werden durch ein komplexes Zusammenspiel von Cytokinen reguliert. Eine geeignete Kombination von Cytokinen, welche sich verstärkende und ergänzende Wirkungen haben, könnte die effektivste Möglichkeit sein, eine therapeutische Immunantwort gegen einen Tumor zu verstärken. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-12 (IL-12)

verschiedene Immunfunktionen gegenseitig verstärken. IL-12 und IL-2 benutzen parallele intrazelluläre Signalweg (Bacon CM et al. 1995), regulieren gegenseitig die Expression des jeweiligen anderen Rezeptor hoch (Desai BB et al. 1992, Yanagida T et al. 1994) und verstärke additiv oder sogar synergistisch die Proliferation, die Cytokin-Produktion und cytolytische Funktion von T- und NK-Zellen (Gately MK et al. 1986, Chan SH et al. 1991, DeBlaker-hohle DF et al. 1995). IL-12 und Il-2 in Kombination verstärken die Expression von IFN- γ und TNF- α , als auch von IP-10 und MIG. Durch Letztere wird die Neovaskularisierung weiter gehemmt. Außerdem führt die Kombination zur Inhibition der Expression von VEGF, einen pro-Vaskularisierungsfaktor, und zur Induktion von vaskulären Endothelschäden mit Zerstörung bereits bestehender Vaskularisierung (Wigginton JM et al. 2001). Durch IL-2 in Ergänzung zu IL-12 wird auch das Priming von Makrophagen (Mak) gefördert. Diese produzieren mehr NO und werden so stärker phagozytotisch. Mehrere präklinische Studien belegen diesen synergistischen Effekt in Tiermodellen. Der starke Antitumoreffekt der Kombination der Cytokine korreliert mit der verstärkten Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen (Li D et al. 2001).

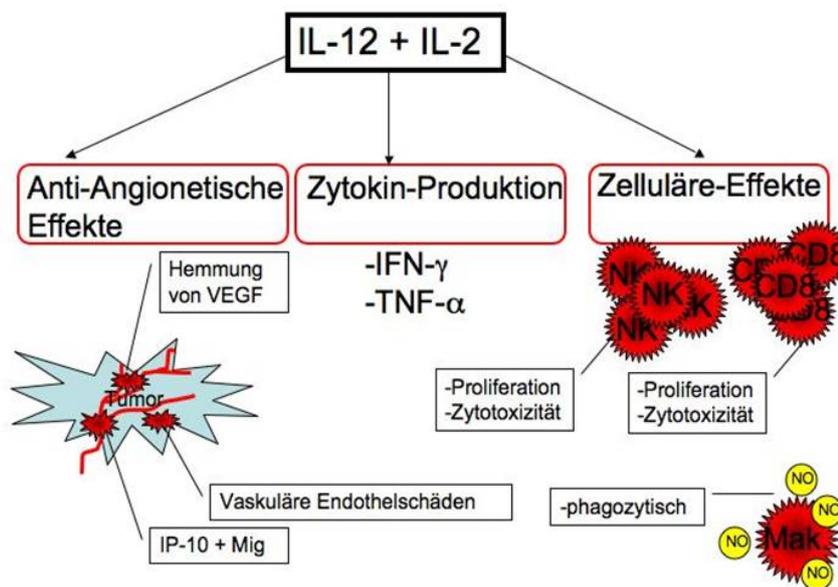


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkung von IL-2 mit IL-12. IL-2 und IL-12 zusammen führen zu einer Verstärkung der antiangiogenetischen Wirkung und Produktion von Cytokinen. Es kommt zu einer stärkeren Proliferation von NK- und CD8+ T-Zellen. Diese und auch Makrophagen werden stärker zytotoxisch bzw. phagozytotisch.

2.6.3. Co-Stimulation durch 4-1 BBL

4-1BB ist ein induzierbarer Rezeptor der *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptor-Superfamilie und wird auf der Oberfläche von aktivierten

T-Lymphozyten, natürlichen Killer-Zellen (NK) und Dendritischen Zellen (DC) exprimiert (Pollok KE et al. 1993, Melero I et al. 1998, Futagawa T et al. 2002). Sein natürlicher Ligand 4-1BBL wird exprimiert auf aktivierten Antigenpräsentierenden Zellen inklusive B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen (Cannons JL et al. 2001). 4-1BB : 4-1BBL-Interaktion führt zur verstärkten Aktivierung von sowohl NK-Zellen als auch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Für eine Immunantwort gegen Tumore spielt die zellvermittelte Immunreaktion eine entscheidende Rolle. IL-12 schafft eine starke, aber vorübergehende Immunantwort gegen den Tumor hauptsächlich über NK-Zellen. Die Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunantwort, zusätzlich zu den NK-Zellen, ist entscheidend für die Persistenz der antitumoralen Antwort und das Langzeitüberleben (Pham-Nguyen KB et al. 1999). Um naive T-Zellen zu aktivieren werden zwei Hauptsignale benötigt. Das erste Signal wird über das TCR (T-cell-receptor) : MHC : Ag (Antigen)-Komplex vermittelt. Das zweite Signal wird über Co-Stimulation übermittelt. Die Co-Stimulation bietet einen unabhängigen Stimulus in der Interaktion zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Ohne Co-Stimulation gehen antigengeprimte T-Zellen in Apoptose oder in Anergie. 4-1BBL mit anderen Co-Stimulatoren spielt eine wichtige Rolle in diesem komplexen Zusammenspiel (Vinay DS et al. 1998, Kwon B et al. 2000). Dieses Zusammenspiel ist essentiell für den Synergismus zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Pan PY et al. 2004). Die vermehrte Interaktion mit CD8⁺ T-Zellen führt nicht nur zur Expansion von CD8⁺ T-Zellen (Wen T et al. 2002, Shuford WW et al. 1997), sondern auch zur verstärkten Ausdifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu cytotoxischen Effektorzellen (Guintoli RL et al. 2002) und IFN- γ -Produktion von CD8⁺ Zellen.

Dies geschieht unter anderem durch die vermehrte Tumordinfiltration und MHC-2-Expression von DCs, welche dadurch ein effizienteres *Priming* von nativen T-Zellen und die Entwicklung einer stärkeren antitumoralen cytotoxischen T-Zell-Antwort bewirkt.

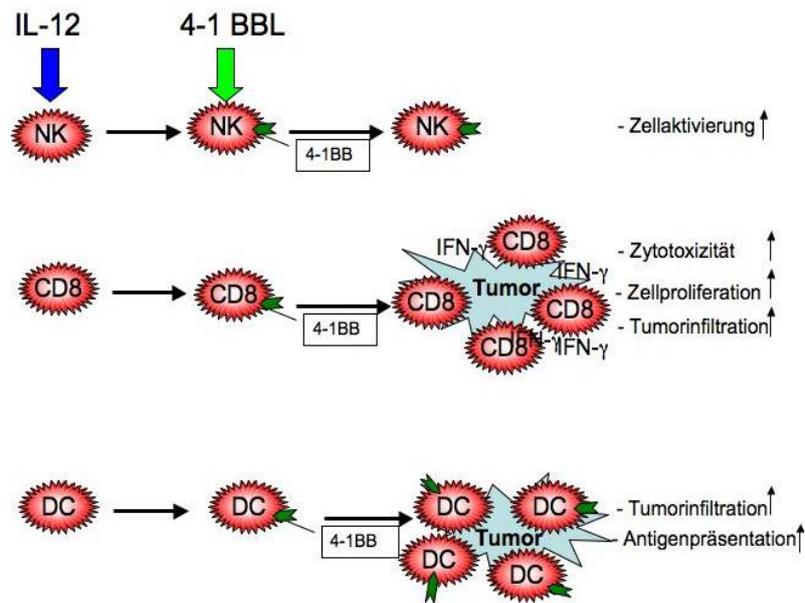


Abbildung 5: Schematische Darstellung der IL-12/4-1BBL-Synergie. IL-12 führt in NK-, CD8+ und Dendritischen Zellen zur Expression von 4-1BB. Dadurch kann dann 4-1BBL zur Aktivierung der Zellen führen. Es kommt zur verstärkten Tumorinfiltration von DCs und CD8+ Zellen. DCs präsentieren verstärkt Antigene. CD8+ Zellen differenzieren sich verstärkt zu cytotoxischen Effektor-Zellen, produzieren IFN- γ und proliferieren.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Allgemein benötigte Geräte

Autoklav, GVA 460	Fritz Gössner
Brutschrank, Typ 1705309900312	WTB binder
Eismaschine	Hoshizaki
Heizblock, Thermomixer compact	Eppendorf
Kühlschrank	Liebherr
Kühltruhe, -80°C	Kryotech
Laborpipetten	Eppendorf
Spülmaschine, Professional G7883	Miele
Tischzentrifuge, 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge, 5810 R	Eppendorf
Trockenschrank, 854 Typ SL50	Memmert
Mikroskop	Olympus
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik

3.1.2. Allgemein benötigte Programme

Exel 2002	Microsoft Corporation
Word 2002	Microsoft Corporation
Corel Draw X4	Corel Corporation
Prism 5	Graph Pad Software
Aida 2d Densiometry	Raytest

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Zelllinien:

CT-26 (murine Colonkarzinomzellen)	DSMZ Nr. ATCC-CRL- 2638
------------------------------------	----------------------------

Hepa 1-6 (murine hepatozelluläre Karzinomzellen)

DSMZ Nr. ACC 175

Huh-7 (humane hepatozelluläre Karzinomzellen)

Nakabayashi et al., 1982

Chemikalien:

RPMI 1640 + Glutamax-I	Invitrogen/Gibco
DMEM + Glutamax-I	Invitrogen/Gibco
MEM Sodium Pyruvat 100mM	Invitrogen/Gibco
HEPES 1M	Invitrogen/Gibco
Fetales Bovines Serum (FBS)	Lonza
Penicillin 10.000 U/ml	Invitrogen/Gibco
Streptomycin 10.000µg/ml	Invitrogen/Gibco
0,05% Trypsin-EDTA	Invitrogen/Gibco
DPBS-CaCl ₂ /MgCl ₂	Invitrogen/Gibco

Zusammensetzung der Medien:

RPMI für <i>CT-26</i> - Zellen	+ 1% Penicillin/Streptomycin, + 10% FBS, + 1mM HEPES, + 1mM Na-Pyruvat
DMEM für Hepa 1-6 Zellen	+ 1% Penicillin/Streptomycin, + 10% FBS
DMEM für Huh-7 Zellen	+ 1% Penicillin/Streptomycin, + 10% FBS

Material:

Zellkulturpipetten, steril (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner
15ml, 25ml sterile Gefäße	Greiner
6-Well- und 12-Well-Platten	Nunc
Pasteurpipetten	Assistent

Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ unter Wasserdampf im Inkubator gehalten. Der Inkubator wurde alle zwei Wochen mit Ethanol (70%) gereinigt. Alle Medien wurden kommerziell bezogen und die Zusätze steril hinzu gegeben. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Reinluftbank.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit einem Verhältnis von 1:4 bis 1:8 geteilt. Dafür wurden sie mit DPBS zweimal gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Trypsinisierung wurde mit Medium gestoppt und die Zellen bei 200g 5min zentrifugiert. Nach Resuspension mit frischem Medium wurde 1:4 bis 1:8 in T-75-Flasks weiterkultiviert. Alle benutzten Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt.

3.2.2. Transfektion von Tumorzelllinien

Material und Chemikalien:

FuGene HD	Roche
Eppendorfgefäße, 1,5ml	Eppendorf
Plasmide	Siehe Tabelle

Für die *in vitro*-Versuche wurden die Tumorzelllinien mit Kombinationen von Immunstimulatoren transfiziert. Die Transfektion fand in der Regel in 12-Well-Platten statt. Es wurden ein Tag vor der Transfektion 150 000 Zellen pro Well ausgesät. Jedes Well wurde mit 0,8µg DNA transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde FuGene HD verwendet. Zuerst wurde ein Transfektionsgemisch von 100µl pro Well angesetzt. Dafür wurden jeweils 3µl FuGene HD und das entsprechende DNA-Volumen in serumfreies Medium pipettiert. Das Gemisch wurde kurz gevortext und anschließend kurz bei 200g zentrifugiert. Nun wurde das Gemisch 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den Zellen durch frisches Medium ersetzt. Das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise hinzugegeben und für 2 Tage auf den Zellen belassen.

3.3. Etablierung eines Co-Kultur-Modells zur Untersuchung von synergistischen Effekten von Immunstimulatoren

Eine Aktivierung des Immunsystems resultiert nicht nur durch sezernierte (lösliche) Immunstimulatoren, sondern auch durch eine Rezeptor-Ligand-Bindung, welche nur mit lebenden Zell-Zell-Interaktionen möglich ist. Daher wurde ein Co-Kultur-Modell mit viablen Zellen etabliert. Dies ermöglicht nicht nur die Untersuchung der Reaktion tumoraler Antigene, sondern auch die Expression von Immunstimulatoren in sezernierter und membrangebundener Form. Durch die Co-Kultivierung von lebenden Immunzellen mit lebenden Tumorzellen sind die natürlichen Zell-Zell-Interaktionen *in vitro* möglich, ähnlich der *in vivo*-Situation.

Dafür wurden verschiedene murine Karzinomzelllinien ausgetestet. Eine optimale Wachstumskinetik und Transfizierbarkeit wurde bei Hepa 1-6 Zellen ermittelt. Für die Co-Kultur wurden Hepa 1-6 Zellen einen Tag vor Transfektion mit einer Zelldichte von $40 \times 10^3/\text{cm}^2$ ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit FuGene HD transfiziert. Um synergistische/additive Effekte quantitativ zu erfassen, wurden die Plasmide auf die gleiche Kopienzahl normiert und gegebenenfalls mit pUC18-Plasmid ausgeglichen. Nach 2 Tagen Transfektionszeit wurde eine Mediumprobe für scIL-12-ELISA abgenommen. Da alle Plasmide (außer dem nichtkodierenden Kontrollplasmid) scIL-12 unter einem CMV-Promotor enthalten, ist mit der scIL-12-Bestimmung die Transfektionseffizienz zu messen. Mit ähnlich großen Plasmiden war die scIL-12-Konzentration nach Transfektion zwischen den Wells nicht signifikant unterschiedlich und damit alle zusätzlichen Aktivierungen auf synergistische und additive Effekte der weiteren Immunstimulatoren zurückzuführen. Nach den 2 Tagen Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium mit frisch isolierten Milzzellen aus der zu Hepa 1-6 Zellen syngenen C-56-Maus ersetzt. Im Verlauf der Co-Kultur wurde jeden Tag 0,5ml Medium abgenommen und dieses bei 4°C zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Nach 3 Tagen Co-Kultur wurden die Milzzellen von den Hepa 1-6 Zellen mit PBS abgespült und zentrifugiert. Mit diesem System sollen nun die verschiedenen Immunstimulatoren ausgetestet, verglichen und kombiniert werden. Hierfür werden zellspezifische Effekte und Aktivierungen, als auch sezernierte Immunstimulatoren gemessen.

Bei höheren Anfangszelldichten als 40×10^3 Zellen/ cm^2 beginnen die Tumorzellen während der Co-Kultivierung übereinander zu wachsen. Dies führt einerseits schon während der Kultivierung zum Ablösen von ganzen Zellschichten, aber spätestens beim Abspülen der Milzzellen zum Ablösen der Tumorzellen und zur Verunreinigung der Milzzellfraktion. Die Verwendung von CT-26-Kolonkarzinomzellen erwies sich als nicht praktikabel, da die Proliferation dieser zu schnell war. Selbst beim Aussähen von ca. 15×10^3 Zellen/ cm^2 kam es zum Überwachsen der Zellen und Ablösen von ganzen Zellschichten. Darüber hinaus verbrauchten diese Zellen das Kulturmedium innerhalb von 2 Tagen, so dass eine 3-tägige Co-Kultur nicht möglich war.

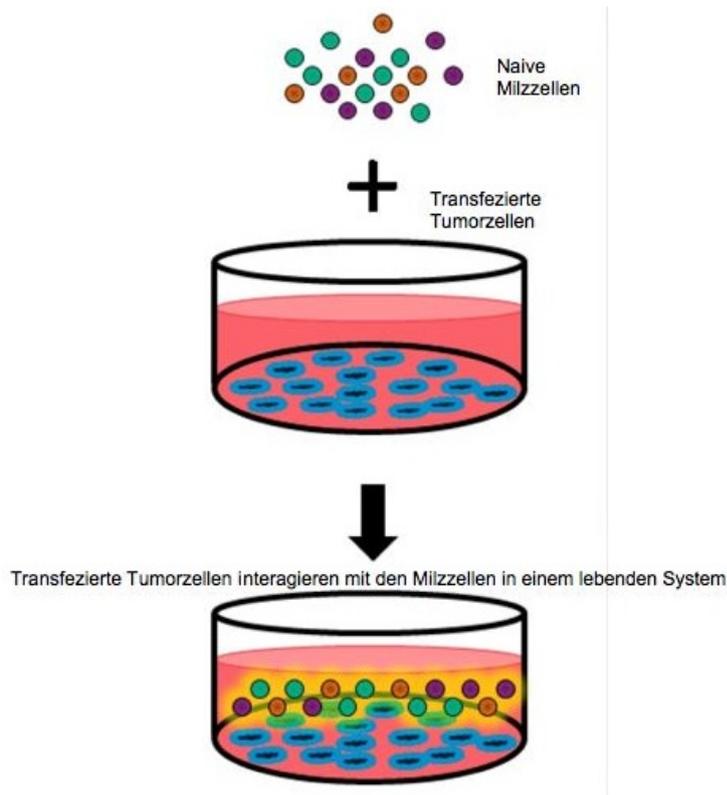


Abbildung 6: Schema des Co-Kultur-Modells. Frisch isolierte, nicht aktive Milzzellen der Maus werden zusammen mit transfizierten Tumorzellen kultiviert. Die Immunstimulatoren, gebildet von den Tumorzellen, aktivieren die Milzzellen und lösen so eine Immunreaktion aus, welche mit ELISA, FACS und *Cytokine Array* ausgewertet werden.

Zu Untersuchung der synergistischen und additiven Effekte im humanen Immunsystem wurde das Co-Kultur-System auf den Menschen übertragen. Als Tumorzelllinie wurde nun Huh-7, eine menschliche hepatozelluläre Karzinomzelllinie, und PBMC (peripheral blood mononuclear cells) als Immunzellen verwendet.

3.4. Cytokin-Nachweis

3.4.1. Western-/Immunoblot

Chemikalien:

Glycerin	Roth
TEMED	Roth
Amoniumpersulfat	Roth
Acrylamid	Roth
Ponceau S	Roth
Substratlösung, West dura Extended	Pierce

Duration	
Tris	Roth
Mercaptoethanol	Roth
Sodium decylsulfat (SDS)	Roth
EDTA	Roth
Methanol	Roth
NaCl	Roth
Bromphenolblue	Roth
Tween20	Roth
Glycin	Roth

Material:

Röntgenfilmkassette, X-omatic cassette	Kodak
Röntgenfilmentwickler	Kodak x-omat 1000
Röntgenfilm, Medical X-Ray Film	Fujifilm
Scanner	Amersham pharmacia biotech
Gel-Gießkammer	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Netzgerät	Bio-Rad
Nitrocellulose-Membran, Whatman	Schleicher&Schuell

Verwendete Antikörper:

Anti-murine-Interleukin-12 in goat Antikörper	Sigma
Anti murine-4-1BB Ligand Antikörper in rat, Clone 203942	R&D Sytems
Peroxidase-conjugated AffiniPure F ₂ -Fragment Donkey-Anti-Rat	Jackson Immuno Research
Peroxidase-conjugated AffiniPure F ₂ -Fragment Donkey Anti goat	Jackson Immuno Research

Selbst hergestellte Lösungen:

Proben-Puffer (denaturiert)	10 %Glycerin, 3% SDS 20%, 62mM upper Tris, 5mM EDTA, 15mM NaF,
-----------------------------	--

	0,4mM Mercapthoethanol
Proben-Puffer (nicht denaturiert)	10 %Glycerin, 3% SDS 20%, 62mM upper Tris, 5mM EDTA, 15mM NaF
Lower Tris	1,5M Tris, 1% SDS, pH 8,8
Upper Tris	0,5M Tris, 1%SDS, pH 6,8
Lauf-Puffer	0,1%SDS, 2,5mM Tris, 0,02 Glycin
Transfer-Puffer	2,5mM Tris, 0,02M Glycin, 20% Methanol
TrisBuffersaline TBS	0,02M Tris, 0,137M NaCl, pH 7,6
TrisBufferSaline-tween TBS-t	0,1%Tween20 in TBS
Load-Mix	0,05% Bromphenolblue in 25%Glycerin

Vorbereitung der Proben:

Zellen:

Zellen wurden in SDS-Puffer aufgenommen (ca. 1mio Zellen / 100µl SDS-Puffer). Falls denaturierende Bedingungen: für 10min bei 95°C erhitzen. Das Lysat wurde bei 13.000rpm für 10min zentrifugiert. Überstände wurden abgenommen (aliquotieren und eingefroren oder direkt weiterverwendet).

Proben wurden unter verschiedenen Bedingungen vorbereitet. Es wurden in jede Gel-Tasche eine Mischung aus Probe, Proben-Puffer und 1µl *Load-Mix* pipettiert, dass Volumen richtete sich nach der Breite des Gels und der Anzahl der Taschen. Meist wurden 10 Taschen verwendet bei einer Breite von 1,5mm. Das entspricht einem Volumen von 20µl pro Tasche.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Immunoblot-Gele:

	Trennungs-Gele	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	
1	50% Glycerin / H ₂ O _d	7.25	6.2	5.16	4.1	3.1	ml
2	Acrylamide/Bisacryl.	2.1	3.16	4.2	5.26	6.32	ml
3	Lower Tris	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	ml
4	TEMED	6	6	6	6	6	µl
5	10% Ammoniumpersulfat	64	64	64	64	64	µl

Sammel-Gel	4 %
H ₂ O _d	2.44 ml
Acrylamide/Bisacryl.	530 µl
upper Tris	1 ml
TEMED	4 µl
10% APS	30 µl

Die Gele wurden mit kalten Lösungen nach der Tabelle angesetzt. Zuerst wurden 50% Glycerin, Acrylamid (CAVE! Neurotoxisch) und Tris zusammenpipettiert. Die Polymerisation wurde mit TEMED und APS gestartet. Anschließend wurden zügig die Trennungs-Gele zwischen die eingespannten Glasplatten pipettiert. Trennungs-Gele wurden mit destilliertem Wasser überschichtet und eine Stunde zum Aushärten stehengelassen. Danach wurde das Wasser abgegossen und das Sammel-Gel über das Trennungs-Gel pipettiert. In das unausgehärtete Sammel-Gel wurden Probenaschenausparungen eingesetzt. Die Gele wurden für 45min ausgehärtet. Anschließend wurden die Probenausparungen entfernt und die Gele aus der Gießhalterung entfernt.

Elektrophorese:

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gesetzt und diese mit Lauf-Puffer gefüllt. Die mittlere Kammer wurde bis zum oberen Rand gefüllt, die seitlichen Kammern wurden mindestens bis zu den Elektroden gefüllt. Die Proben wurden vorsichtig in die Taschen pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophorese mit

~16mA (~50 V) für 60-90min gestartet, bis die Proben im Trenn-Gel angelangt waren. Nun wurde die Stromstärke auf ~18mA (100-150V) erhöht, bis der *Loadmix* den Boden des Gels erreicht hatte.

Transfer:

Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entfernt. Das Sammel-Gel wurde vom Trennungs-Gel abgeschnitten und das Trennungs-Gel wurde im Transfer-Puffer für 15min auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Im Transfer-Puffer wurde das „Transfer-Sandwich“ gebaut.

Die Transferkammer wurde mit kaltem Transfer-Puffer gefüllt und der Kühleinsatz eingesetzt. Der Transfer wurde entweder mit 20-30V konstant (~50mA) über Nacht in der Kühlbox durchgeführt und für die letzte Stunde auf 300-400mA konstant (100-200V) erhöht, oder der Transfer wurde über 2 Stunden bei 400mA konstant mit Wechsel des Kühleinsatz durchgeführt.

Der Transfer wurde durch die Übertragung des Mol-Markers auf die Nitrocellulose-Membran überprüft.

Ponceau-Färbung:

Die Membran wurde in destilliertem Wasser auf dem Schüttler für 5min inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Ponceau-S für 10min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Nun wurde die Membran mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen. Das Ponceau-S-Bild wurde mit dem Scanner dokumentiert.

Immunfärbung:

Die Ponceau-S-Färbung wurde durch 5min in TBS-t auf dem Schüttler abgewaschen. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran in Block-TBS-t für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler geblockt.

Nun wurde die Nitrocellulose-Membran mit der ersten Antikörper-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Darauf wurde die NC-Membran 3mal in TBSt für 15min auf dem Schüttler gewaschen. Die NC-Membran wurde darauf für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper (gegen rat oder goat) (1:20.000) in 5% Esel-Serum auf dem Schüttler inkubiert.

Die NC-Membran wurde 2mal für 10min in TBS-t gewaschen, danach 2mal für 10min in TBS gewaschen.

Detektion:

Zur Detektion wurde die ECL-Substratlösung 1:1 zusammenpipettiert und ca. 2min gewartet, pro Membran wurden ca. 0,8ml gemischtes Substrat verwendet. Die Membran wurde aus dem TBS genommen, abgeschüttelt und auf eine Glasplatte gelegt. Die Membran wurde mit Substratgemisch überschichtet und 3min inkubiert. Anschließend wurde das Substrat von der NC-Membran abgeschüttelt und die Membran in Folie einschlagen. Die eingeschlagene Membran wurde in einer Fotokassette fixiert. Nun wurde in einem Fotolabor unter Rotlicht weitergearbeitet. Röntgenfilme wurden für verschieden lange Zeitpunkte in der Kassette der Membran ausgesetzt. Der Röntgenfilm wurde nun entwickelt.

3.4.2. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Material und Geräte:

ELISA-Kit mouse IL-12 p70, Duo-Set	R&D Systems
ELISA-Kit mouse IFN- γ , Duo-Set	R&D Systems
ELISA-Kit human IL-12 p70, Duo-Set	R&D Systems
ELISA-Kit human IFN- γ , Duo-Set	R&D Systems
Substrat Reagent	R&D Systems
Reagent Diluent Concentrate 2, 10X	R&D Systems
96 Well Immuno Module	Nunc
Milchpulver	Roth
Albumin Fraktion 5	Roth
Schwefelsäure 2N	Roth
ELISA-Lesegerät	Amersham Bioscience Biotrack 2
Schüttler, Logic shaker	Neo Lab
Tween20	Roth
Saccharose	Roth

In dieser Arbeit wurden ELISA für murines IFN- γ , murines Interleukin-12, humanes IFN- γ und humanes Interleukin-12 durchgeführt. Alle Lösungen für die ELISA wurden nach Herstellerangaben vorbereitet.

Einen Tag vorher wurde eine 96-Well-Platte mit 100 μ l *coating-Puffer* (*Antikörper gegen Antigen*) pro Well beschichtet. Diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde der *coating-Puffer* durch dreimaliges Abklopfen

auf Zellstoff ausgeschüttet. Darauf wurden die Wells mit je 300µl Wasch-Puffer ausgewaschen und ausgeklopft. Dies wurde insgesamt 3mal wiederholt. Nun wurden 300µl Block-Lösung in jedes Well pipettiert und für 1 Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Block-Lösung ausgeklopft und wie oben ausgewaschen. Darauf wurde in jedes Well 100µl Standart bzw. Probe pipettiert. Der Standart wurde nach Herstellerangaben verwendet und jeweils für eine 3fache Bestimmung pipettiert. Die Platte wurde auf dem Schüttler für 2 Stunden inkubiert. Die Proben und der Standart wurden ausgeklopft und erneut wie oben ausgewaschen. 100µl *detection-Puffer* wurden nun in jedes Well pipettiert und wieder für 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde wie oben ausgeklopft und ausgewaschen. In jedes Well wurden 100µl Streptavidin-Lösung pipettiert. Die Platte wurde nun für nur 20min inkubiert, um danach wieder ausgeklopft und ausgewaschen zu werden. 100µl Substrat-Lösung wurden in jedes Well pipettiert und für 20min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde, ohne zu waschen oder auszuklopfen, die Reaktion mit 50µl Schwefelsäure pro Well gestoppt und mit dem ELISA-Lesegerät ausgelesen. Ausgewertet wurden die ELISAs nach Herstellervorschrift mit Prism4 von GraphPad.

3.4.3. Cytokine Array

Material und Geräte:

Proteom Proiler Array Kit; Maus bzw Mensch	R&D Sytems
Plastik Schalen	Roth
Schüttler, Logic shaker	Neo Lab
Chemilumineszenz-Detector	Fujifilm LAS 3000
Substrat Reagenz, Super Signal West Dura	Pierce

Der *Cytokine Array* dient dem semiquantitativen Nachweis einer Vielzahl von Cytokinen/Chemokinen. Auf einer Nitrocellulose-Membran sind 40 bzw. 36 verschiedene Antikörper in Dublikaten fixiert. Mit dieser Membran werden die Cytokine/Chemokine auf der Membran fixiert, um anschließend mit einem

Antikörper-Gemisch gegen die Cytokine/Chemokine, welche chemilumizent markiert sind, die Menge an Cytokinen/Chemokinen semiquantitativ bestimmen zu können.

Alle Reagenzien wurden vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Die *Pannels* wurden nur mit Handschuhen und Pinzetten berührt.

Als Proben wurden Überstände von Zellkulturen verwendet. Alle Proben wurden gleich nach dem Abnehmen bei 200g und 4°C zentrifugiert, um mögliche Zellen zu entfernen. Der nun entstandene Überstand wurde bei -80°C eingefroren und später für den *Cytokine-Array* verwendet.

2ml des Block-Puffers (Array-Buffer 4 bzw. 6) wurden in die vier Wells des 4-Well-Multi-dish pipettiert. Mit einer Pinzette wurde nun jeweils eine der *Pannels* mit der Arraynummer nach oben in den Block-Puffer platziert. Anschließend wurde 1 Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben vorbereitet. 1ml der Probe wurde mit 0,5ml des Array-Puffers 4 zusammenpipettiert, und mit Array-Puffer 5 auf 1,5ml aufgefüllt, falls nötig. Zu jeder Probe wurden 15µl des gelösten *Cytokine-Array Panel A Detection Antikörper Cocktail* pipettiert. Nach kurzem Vortexen wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und das Proben-/Antikörper-Gemisch hinzugeben. Über Nacht wurde bei 2-8°C auf einem Schüttler inkubiert.

Jede Membran wurde in ein separates Waschgefäß gegeben und mit 10ml 1x-Wasch-Puffer für 10min auf Schüttler gewaschen. Dies wurde noch 2mal wiederholt. Währenddessen wurden die 4-Well-Multi-dish mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Anschließend wurde Streptavidin-HRP in Array-Puffer 5 1:500 verdünnt und 1,5ml von der Verdünnung in jedes Well des 4-Well-Multi-Dish pipettiert.

Nun wurden die Membranen einzeln aus dem Wasch-Gefäß in die Streptavidin-HRP-Lösung gegeben. Dabei wurde überflüssiger Puffer abgetropft. Bei Raumtemperatur wurde auf einem Schüttler für 30min inkubiert. Jede Membran wurde, wie oben beschrieben, erneut 3mal gewaschen. Die Membranen wurden aus dem Wasch-Gefäß entfernt, überschüssiger Puffer abgetropft und auf einer Glasplatte mit ECL-Substrat-Reagenz für ca. 1min inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde abgetropft und die Membran in Plastikfolie luftblasenfrei eingewickelt. Die Membranen wurden nun mit einem Chemilumineszenz-Detektor ausgelesen und mittels der AIDA 2D *Densiometrie Software* ausgewertet.

3.5. Analyse der Immunzellen und Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine geeignete Methode, die Expression von Epitopen auf einer großen Zahl von Zellen zu untersuchen. Im murinen System wurden verschiedene Zelltypen auf die Expression von IFN- γ untersucht. Dies wurde als Aktivitätsmarker eingesetzt. Im humanen System wurden die verschiedenen Zelltypen auf die Expression von IFN- γ , TNF- α , IL-17 und CD69 untersucht. Außerdem wurde im humanen System zwischen den T-Zell-Subpopulationen mit Hilfe von CCR7, CD27 und CD45RO unterschieden.

Das Prinzip beruht darauf, dass Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Expression spezifischer Moleküle unterschieden werden können. Dabei werden Zellen, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch gefärbt wurden, durch Kapillaren geleitet und passieren einzeln einen Laserstrahl. Das durch die Zelle abgeleitete Streulicht gibt Aufschluss über die Beschaffenheit und Granularität der Zelle. Diese beiden Eigenschaften werden in einem Plot dargestellt, wobei das Seitwärtsstreulicht (SSC) als Maß für die Granularität gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC) als Maß für die Zellgröße aufgetragen wird. Zusätzlich kommt es durch den Laser zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, wodurch ein spezifisches Signal detektiert werden kann. Die Auswahl von Fluoreszenzen mit unterschiedlichen Emissionsspektren ermöglicht das parallele Färben verschiedener Moleküle. So können einzelne Subpopulationen unterschieden und auf ihre Eigenschaften und ihren Aktivierungszustand untersucht werden.

3.5.1. Durchflusszytometrische Analyse von Tumorzellen zur Transfektionskontrolle

Tumorzellen wurden mit eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) zur Ermittlung der Transfektionseffizienz transfiziert. Das Transfektionsgemisch wurde 4 Tage auf den Hepa 1-6 Tumorzellen belassen. Danach wurden die Tumorzellen mit Trypsin von den Wells abgelöst und anschließend per Durchflusszytometrie der Anteil der transfizierten (eGFP-positiven) Zellen bestimmt. Die Durchflusszytometrie wurden mit einem Beckman Coulter FC500 durchgeführt.

3.5.2. Durchflusszytometrische Analyse der MOI (multiplicity of infection) von Tumorzellen

Die MOI ist ein Maß für die Infizierbarkeit von Zellen. Zur Vorbereitung der *in vivo*-Versuche und der Untersuchung der adenoviralen Effekte *in vitro* wurde die MOI für die Hepa 1-6- und CT-26-Zelllinie bestimmt. Zur Bestimmung der Infizierbarkeit wurden Tumorzellen mit verschiedenen Konzentrationen von infektiösen Partikeln eines adenoviralen Vektors, kodierend für GFP, infiziert. Dafür wurden 500.000 Zellen in 6-Well-Platten 24 Stunden vor Infektion ausgesät. Vor der Infektion wurden die Zellen von zwei Wells abtrypsinisiert und gezählt. Anschließend wurden verschiedene Mengen vom Virus auf die übrigen Wells in 500µl Medium gegeben und nach 5 Stunden auf 5ml aufgefüllt. Nun wurden die Zellen für zwei Tage mit dem Virus kultiviert und anschließend der Anteil der infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.5.3. Durchflusszytometrische Analyse von murinen Immunzellen

Material:

Rat-Anti-Mouse CD49b/Pan NK-FITC, Clone: DX5	Becton&Dickenson
Hamster-Anti-Mouse CD69/VEA-PE, Clone:H1.2F3	Becton&Dickenson
Rat-Anti-Mouse CD4/L3T4-SPRD, Clone:GK1.5	Becton&Dickenson
Anti-mouse IFN-γ antibody, clone XMG1.2	Becton&Dickenson
Rat-Anti-Mouse CD8a/Lyt-2-PE/Cy7, Clone 53-6.7	Becton&Dickenson
Brefeldin A	Sigma-Chemie
FACS Gerät, FACSCalibur System	Becton &Dickenson
Phosphat gepufferte Salzlösung PBS	Invitrogen
Cohn II	Sigma-Chemie
FACS-Puffer	PBS + 3% FCS
Cytofix/Cytoperm kit, Saponin	BD Bioscience

Verschieden transfizierte Hepa 1-6 Tumorzellen wurden für 3 Tage mit frisch isolierten Milzzellen aus der C56/B6-Maus kultiviert. Am dritten Tag wurde 6 Stunden vor der Zellernte das Medium abgenommen und durch frisches Medium mit 0,1% Brefeldin A ersetzt. Brefeldin A blockiert den Golgi-Apparat und führt so zur Anreicherung von Cytokinen in der Zelle ohne die Genexpression zu verändern. So kann eine intrazelluläre IFN- γ -Färbung in der Durchflusszytometrie zur zellspezifischen Aktivitätsmessung genutzt werden.

Nach den 6 Stunden wurden die Milzzellen von den Tumorzellen abgespült. Dafür wurde das Medium mit den Milzzellen abgenommen und bei 200g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die restlichen, sich im Well befindlichen Milzzellen wurden mit PBS abgespült, um die Milzzellen von den Tumorzellen zu lösen. Das PBS mit den Milzzellen wurde mit dem Pellet aus dem Medium wieder bei 200g zentrifugiert. Anschließend wurden die Milzzellen für Durchflusszytometrie vorbereitet.

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen an murinen Zellen wurde ich tatkräftig von Dipl. Nancy Brewig am Bernard-Noch-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, unterstützt.

Das Zellpellet wurde in 1ml FACS-Puffer wieder aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 200g für 5min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μ l Cohn II Stammlösung (10mg/ml) resuspendiert. Nach 20min Inkubation bei 4°C wurde die Probe erneut mit 2ml FACS-Puffer aufgefüllt, mit 200g für 5min zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Nun wurden 100 μ l Antikörperlösung 1:50 in FACS-Puffer auf jedes Pellet gegeben und das Pellet durch Erschüttern gelöst. Darauf wurde für 30min bei 4°C inkubiert. Am Ende der extrazellulären Färbung wurde erneut mit FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Für die intrazelluläre Färbung wurden Zellen fixiert und permeabilisiert durch das *Cytofix/Cytoperm Kit* mit Saponin. Zuerst wurden die Zellen mittels Zugabe von jeweils 250 μ l BD Cytofix für 20min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen permeabilisiert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit je 1ml BD Perm für 5min bei 4°C gewaschen und zentrifugiert. Die fixierten, permeabilisierten Zellen wurden in je 50 μ l BD Perm mit dem INF- γ -Antikörper aufgenommen und für

30min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nun wurden die Zellen zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers erneut 2mal mit je 1ml BD Perm gewaschen.

Nach dem letzten Färbeschritt wurden die Zellen in 150µl FACS Puffer resuspendiert. Die Durchflusszytometrie wurde am BD FACScalibur FACS-Gerät durchgeführt und mittels CellQuest Pro ausgewertet.

3.5.4. Durchflusszytometrische Untersuchung von humanen PBMCs

Material:

FACS CantoII mit 3 Lasern	BD Bioscience
PBS	Invitrogen/Gibco
Fixation/Permeabilisation-Kit	eBioscience
Anti-cd3 APC-Alexa750 Antikörper	eBioscience
Anti-cd4 Percp-Cy5.5	BD Bioscience
Live/Dead aqua	Invitrogen
Anti-cd56 PE-Cy7	BD Bioscience
Anti-IFN-γ FITC	eBioscience
Anti-TNF-α PE	eBioscience
Anti-IL-17 Alexa647	eBioscience
Golgi-Stop	BD Bioscience
Anti-cd3 ucth 1 pacificblue	Ebioscience
Anti-cd45RO UCHL1 pe-cy7	Fluorochrom
Anti-CCR7 3D12 ax647	Fluorochrom
Anti-CD27 O323 fitc	eBioscience
Anti-CD69 FN50 PE	Fluorochrom

Für die Übertragung von den im Maus-System gesammelten Erfahrungen wurden humane periphere Blutzellen zusammen mit humanen hepatozellulären Karzinomzellen kultiviert. Die Karzinomzellen wurden wieder mit verschiedenen Immunstimulatoren transfiziert und anschließend die daraus folgende Aktivierung und Differenzierung der Immunzellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Für die Anreicherung der intrazellulären Cytokine wurde zur Co-Kultur, 5 Stunden bevor die Zellen entnommen wurden, 3µl Golgi-Stop auf 1,5ml Medium gegeben.

Es wurden die TNF- α - und/oder IFN- γ -postiven, CD3+CD4- zytotoxischen T-Zellen, CD3+CD4+ T-Helferzellen, CD56+CD3+CD4- Zellen und CD56+ NK-Zellen dargestellt. Es wurden die IL-17 postiven CD3+CD4+T_{H17}-Zellen dargestellt. Weiterhin wurden die verschiedenen Differenzierungsgrade der cytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unterschieden. Es wurde zwischen naiven T-Zellen (CCR7+,CD27+,CD45RO-), *central memory* T-Zellen (CCR7+,CD27+CD45RO+), *effector memory* T-Zellen (CCR7-,CD27+,CD45RO+), *effector memory* RA T-Zellen (CCR7-, CD27-,CD45RO-) und *effector* T-Zellen (CDR7-, CD27-,CD45RO+) unterschieden. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen humaner Immunzellen wurden mit tatkräftiger Unterstützung von Tilo Freiwald vom Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden am BD FACS CantoII in der 8-Farbenausführung mit 3 Lasern durchgeführt. Zuerst wurden die Oberflächenantigene gefärbt. Die Färbung erfolgte im FACS-Röhrchen. Die gewünschte Menge an Zellsuspension wurde anfangs mit 1ml PBS gewaschen. Nach dem Zentrifugieren und dem Abgießen des Überstandes wurde die verbliebene Flüssigkeit auf Zellstoff ausgeklopft. 50 μ l vorbereitete Antikörper-PBS-Gemisch (1:50) wurde hinzugegeben und für 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde erneut mit 1ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend folgte die intrazelluläre Anfärbung der Cytokine. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit je 100 μ l *fixation solution* fixiert und gevortext. Es folgten 20min Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Um die Zellen für die Antikörper durchgängig zu machen, wurden die Zellen 2mal mit je 1ml *permeabilisation buffer* gewaschen. Nun wurden 100 μ l Antikörper-*permeabilisations-buffer*-Germisch hinzugegeben und für 20min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1mal mit 1ml *permeabilisation buffer* gewaschen. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen in 400 μ l 2%igen PFA fixiert und bis zur Messung (max. 24 Stunden) in Dunkelheit gelagert.

3.6. Tierexperimentelle Arbeiten

Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden zwei Mausstämme verwendet. Die Gewinnung der Milzzellen für die Co-Kultivierung wurden aus C56/BL6-Mäusen durchgeführt. Diese wurden von der Eigenzucht der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bezogen. Die *in vivo*-Überlebensrate

wurde in BALB/c-Mäusen analysiert. Diese wurden von der Firma Charles River Lab bezogen.

Die Tierversuche wurden von der Behörde für Umwelt und Gesundheit, Amt für Gesundheits- und Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Lagerstraße 36, 20357 Hamburg genehmigt. Die Tierversuche wurden unter der Genehmigungsnummer Nr. 62-07 und die Organentnahmen unter dem Aktenzeichen ORG-393 durchgeführt. Meine selbstständige Tätigkeit im Tierversuchsbereich wurde mit der Ausnahmegenehmigung nach §9 ermöglicht.

3.6.1. Milzzellgewinnung

Geräte und Chemikalien:

Anatomische u. chirurgische Pinzetten	B Braun
Spitzschere	B Braun
PBS	Invitrogen
C57/b6-Maus	UKE/zentrale Tierhaltung
Metallsieb	B Braun
Spritze	B.Braun Melsung AG
18 G u 20G Nadel	B.Braun Melsung AG
Cell strainer	BD Bioscience
Zählkammer	Labor Optik
Präparierschere	B Braun
<i>Ery-Lysis-Puffer</i>	0,155M NH_4Cl , 0,010M KHCO_3 , 0,0001M EDTA; steril filtriert

Für die Co-Kulturen wurden weibliche C56/b6-Mäuse, 5-12 Wochen alt, nach einer CO_2 -Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet. Durch eine mediane Laparotomie wurde der Bauchraum eröffnet und die Milz rasch dargestellt. Die Milz wurde herausgeschnitten und in PBS auf Eis gelegt. Anschließend wurde unter einer Sterilbank weitergearbeitet.

Um die Milz zu zerkleinern wurde diese durch ein Metallsieb (Lochdurchmesser ca. 0,5mm) unter kaltem PBS gedrückt. Anschließend wurde das Metallsieb mit kaltem PBS durch gespült. Das gesamte PBS wurde im 50ml *Falcon* gesammelt. Zum Verkleinern größerer, zurückbleibender Klumpen wurden diese mit einer Spritze durch eine 18G Nadel und anschließend durch das Metallsieb gedrückt. Die gesamte

Zellsuspension wurde durch ein 100µm *cell strainer* in ein 50ml *Falcon* gefiltert und bei 200g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Nun wurde das Pellet in *Ery-Lysis-Puffer* (50ml) wieder aufgelöst. Die Suspension wurde für 10min bei Raumtemperatur im Lysis-Puffer inkubiert. Um die lysierten Erythrozyten zu entfernen, wurde erneut bei 200g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Medium aufgenommen. Das Pellet wurde durch leichte Erschütterungen im Medium gelöst. Mögliche neue Klumpen wurden in eine Spritze mit 20G Nadel aspiriert und wieder ausgestoßen, um sie zu lösen. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Zählkammer bestimmt.

3.6.2. Tumor-Implantation

Geräte:

Isoflurananlage	Eickenmeyer
Abluftpumpe	Gaymar
Operationslampe	Schott
Wärmekissen	Fine Science Tools
Spitzschere	B Braun
Präparierschere, gerade und gebogen	B Braun
Pinzette, anatomisch	B Braun
Nadelhalter	B Braun

Material:

Nahtmaterial (Vicryl 6.0)	Ethicon
Insulinspritzen	BD Diabetes
Wattestäbchen	Ratiomed/megro
Kompressen	Hartmann

Chemikalien:

Novalminsulfon-Tropfen	Rathiopharm
Baytril 5%	Bayer
Sauerstoff-medizinisch	TMG-Gase
Isofluran (Forene)	Abbott GmbH
Enthaarungsmousse	Veet

Histoacryl	Aesculap
Desinfektionsmittel, Cutasept	Bode Chemie
Phosphat gepufferte Salzlösung, PBS	Invitrogen

Weiblichen BALB/c-Mäuse (18-20g, 6-12wochen alt) wurden Kolonkarzinomzellen der Linie CT-26 in die Leber injiziert, um eine intrahepatische Metastase zu erzeugen. Die CT-26-Zellen entstammen der BALB/c-Maus, damit ist das Tumormodell als orthotop und syngen zu bezeichnen. Für die Langzeitüberlebensversuche wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in einem Volumen von $10 \mu\text{l}$ direkt in die Leber von 8 Wochen alten Mäusen injiziert.

Der Operationsablauf:

Die Mäuse wurden unter einer Gasnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch durchgeführt. Die Einleitung erfolgte in einem Narkosekäfig für Gasnarkosen mit Isofluran (2,5% Isofluran). Die narkotisierten Mäuse wurden auf Wärmekissen mit 37°C mit Gasnarkosemasken operiert. Der Fortbestand der Narkose wurde über eine Mausnarkosemaske sichergestellt (2,0% Isofluran). Die Operation erfolgte in Rückenlage.

Die Gliedmaßen wurden mit Hilfe von Klebeband distal vom Körper leicht fixiert. Anschließend wurde der Bauch mit Veet Enthaarungsmouse eingeschäumt. Nach ca. 30 Sekunden wurde der Schaum mit den Haaren mit einer kleinen Kompresse entfernt. Der Operationsraum wurde kurz mit Desinfektionsmittel behandelt.

Nun wurde das Abdomen mit einer paramedianen Laparotomie eröffnet. Zunächst wurde nur die Haut mit einer Pinzette angehoben und mit einer Spitzschere geöffnet und die Haut von der Muskelschicht leicht mobilisiert. Darauf wurde die Muskelschicht auf dieselbe Weise eröffnet, dabei galt es die darunter liegenden Organe zu schützen.

Nun wurde die Leber mit Hilfe von Wattetupfern dargestellt und mobilisiert. Um beim späteren Injizieren der Tumorzellen ein Durchstechen der Leber und eine Fehlinjektion zu verhindern, wurde die Leber mit den Wattetupfern aus dem Abdomen auf eine angefeuchtete Kompresse gelagert. Die Tumorzellen wurden vor dem Aufziehen auf eine Insulinspritze mit einer Pipette und abgeschnittenen Pipettenspitzen durchmischt.

Nun wurden mittels Insulinspritze die Tumorzellen in einen der Leberlappen vorsichtig injiziert. Um einen Rückfluss der Tumorzellen in den Bauchraum zu

verhindern, wurde die Injektion über ca. 30 Sekunden langsam durchgeführt. Darauf wurden weitere 30 Sekunden gewartet, bis die Spritze wieder aus dem Leberlappen gezogen wurde und anschließend nach dem Entfernen der Spritze die Injektionsstelle sofort mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen. Der Histoacryl-Gewebekleber wurde mittels Pipette genau platziert und auf ein Minimum von 2-3µl dosiert.

Die antibiotische und analgetische Versorgung der Tiere erfolgte über Baytril (1 Tropfen 1:10 verdünnt) und Metamizol (Novalminsulfon 1Tropfen 1:10 verdünnt) intraperitoneal.

Der Verschluss des Bauchraums erfolgt mit einer Muskel und einer Hautnaht. Es wurde jeweils eine fortlaufende Naht mit Rückstich durchgeführt. Als Nahtmaterial diente resorbierbares Vicryl der Stärke 6.0.

Die Tiere wurden nach der OP zu zweit in einem Käfig gehalten. Daher wurde jedes zweite Tier mit einem Ohrloch zur Identifikation markiert.

Zur Verbesserung der Regeneration nach der OP wurden die Käfige für 1 Stunde nach der OP durch eine Bodenheizung angewärmt. Nach ca. 1min wachten die Tiere langsam aus der Narkose wieder auf. Anfängliche Unsicherheit auf den Beinen besserte sich nach einer kurzen Regeneration von ca. 5min.

Zur weiteren postoperativen Schmerzbehandlung wurde allen operierten Tieren Metamizol (Novalminsulfon) zum Trinkwasser (2 Tropfen in 150 ml) hinzugegeben.

3.6.3. Injektion des adenoviralen Vektors

Geräte, Material und Chemikalien: siehe oben

Die Injektion des adenoviralen Vektors (1×10^8 infektiöse Partikel) in den Tumor erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Tumordinokulation. Die Behandlung erfolgte neun Tage nach der Tumorumplantation. Der Tumor hatte zu diesem Zeitpunkt eine Größe von ca. $3 \times 4 \text{ mm}^2$ erreicht. Der Schnitt für die Eröffnung des Bauchraums wurde lateral des ursprünglichen Schnittes gesetzt. Zum Teil war die Mobilisierung und Darstellung der Leber aufgrund von Verwachsungen der Leber mit anderen Organen oder dem parietalen Peritoneums erschwert. Bei Verwachsungen mit dem Peritoneum wurde die Leber mit der Spitzschere vorsichtig vom Peritoneum freipräpariert. Verwachsungen mit inneren Organen wurden aufgrund der Verletzungsgefahr belassen. Die Injektion des Adenovirus erfolgte unter

Sichtkontrolle direkt in den Tumor. Analgesie, Antibiose und Verschluss der Maus erfolgte wie bei der Tumorinokulation.

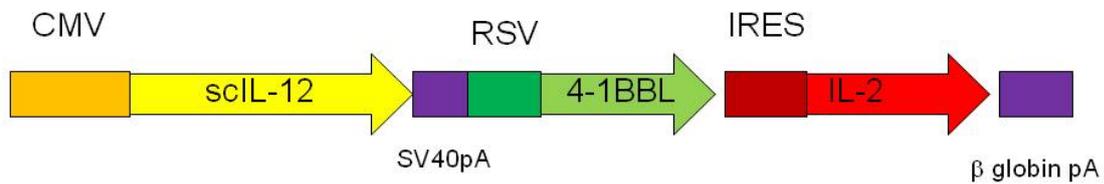


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Gene im Adenovirus. CMV: Promotor aus dem humanen Cytomegalievirus, scIL-12: murines einkettiges IL-12, SV40 pA: Polyadenylierungssequenz aus dem Simian Virus, RSV: Promotor aus dem Rous-Sarcoma Virus, 4-1BBL: muriner T-Zell-Co-Stimulator, IRES: Internal Ribosom Entry Site aus dem Encephalomyocarditis Virus, IL-2 murines IL-2, β globin pA: Polyadenylierungssignal des Globin-Gens.

3.6.4. Der Operationsverlauf in Bildern



Abbildung 8: Maus prä-OP. Die Extremitäten der Maus werden mit Klebeband fixiert. Der Kopf der Maus befindet sich in einer Maus-OP-Maske für die volare Narkose. Das Operationsfeld wird mit Veet Enthaarungsmousse enthaart und anschließend desinfiziert. Die Maus liegt auf einem elektrischen Wärmekissen.



Abbildung 9: Maus Hautschnitt. Die Haut der Maus wird mit Hilfe einer Pinzette angehoben und mit einer Spitzschere eröffnet. Die Haut wurde mit der Spitzschere vorsichtig von der Muskelschicht mobilisiert.



Abbildung 10: Eröffnung des Bauchraums: Die Muskelschicht wird mit einer Pinzette angehoben und mit einer Spitzschere eröffnet. Dabei wird auf die Schonung der inneren Organe geachtet. Die Leber ist im Situs sichtbar.



Abbildung 11: Lebermobilisation: Die Leber der Maus wird mit zwei Wattetupfern aus dem Situs auf eine Kompresse gelegt. Dafür wird ein Tupfer von rechts unter die Leber geführt und mit dem anderen die Leber fixiert. Die Kompresse wird vorher mit PBS bei Raumtemperatur angefeuchtet.



Abbildung 12: Leberdarstellung. Die Leber der Maus wird außerhalb des Körpers zur Injektion der Tumorzellen auf eine befeuchtete Kompresse gelagert. Die Leber und das darüber liegende Sternum sind sichtbar.



Abbildung 13: Tumorzellinjektion in die Leber. In den herausgelagerten Leberlappen werden durch eine Insulinspritze die Tumorzellen injiziert. Ein Gegendruck wird durch Auflegen eines Wattetupfers erzeugt. Die Injektion erfolgt beidhändig, wobei der eine Daumen zwischen Kolben und Körper der Spritze gesetzt wird und ein zu schnelles Injizieren verhindert. Die Spritze wird für ca. 30sec in der Leber gelassen. Kurz nach Herausziehen der Spritze wird die Injektionsstelle mit Histoacrylkleber verschlossen. Dieser wird mit einer Pipette aufgetragen.



Abbildung 14: Histoacryl-Verschluss der Injektionsstelle. Die Injektionsstelle wird mit Histoacrylkleber verschlossen, um einen Rückstrom der Tumorzellen zu verhindern. Der Histoacryl-Verschluss erfolgt auf der Kompresse. Kleinste Histoacryl-Tropfen im Magen-Darm Bereich führen zum Darmverschluss und zum Tod der Maus innerhalb weniger Tage.



Abbildung 15: Verschluss der Maus. Die Leber der Maus wurde nach Trocknen des Klebers in den Körper zurückverlagert. Nach Analgesie und Antibiose wird die Muskelschicht und die Hautschicht der Maus separat mit Vicryl 6.0 mit einer kontinuierlichen Naht mit Rückstich verschlossen.

3.7. Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Ficoll-Gradient, Biocoll	Biochrom
Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS	Invitrogen/Gibco
Ery-Lysis-Puffer	0,155M NH ₄ Cl, 0,010M KHCO ₃ , 0,0001M EDTA; steril filtriert
<i>Buffy-Coat</i>	Transfusionsmedizin/UKE

Der *Buffy Coat* wurde von dem Institut für Transfusionsmedizin des UKE zur Verfügung gestellt. Der *Buffy Coat* entsteht bei der Verarbeitung einer Vollblutspende zu Erythrozytenkonzentrat und gefrorenen Frischplasma als Nebenprodukt. Er ist die Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und dem Blutplasma, welche entsteht, wenn man gerinnungsgehemmtes Blut zentrifugiert.

Der *Buffy Coat* wurde gleichmäßig auf 4x 50ml Falcons verteilt und 1:1 auf 25ml mit PBS verdünnt. In weitere 4x 50ml Falcons wurden 12,5ml Ficoll gefüllt. Nun wurde jedes Falcon mit Ficoll vorsichtig mit dem *Buffy Coat*-PBS überschichtet. Anschließend wurde bei 900g für 20min bei 16°C ohne Bremse zentrifugiert. Die weiße Phase, welche die PBMC enthält, wurde vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und wieder in 2x 50ml PBS in *Falcons* resuspendiert. Nun wurde erneut bei 200g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet jeweils in 20ml Ery-Lysis-Puffer gelöst. Die PBMCs wurden nun für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde zweimal bei 200g für 7min zentrifugiert und jeweils das Pellet in RPMI aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit der Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Für die ersten Versuche für die IFN- γ -ELISA wurden einzelne Spender verwendet, für die späteren durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden 4 einzelne Spender vermischt. Dies bringt mit einem Versuch eine bessere Aussage über den Bevölkerungsdurchschnitt, aber auch das Problem der Reaktion der verschiedenen Spender aufeinander (siehe Diskussion).

3.8. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von Prism4 von Graph Pad durchgeführt. Alle Versuche wurden mit einem *one-way*-ANOVA ausgewertet. Bei Zeitverläufen wurde jeder einzelne Tag separat mit einem *one-way*-ANOVA

ausgewertet. Der *one-way*-ANOVA entspricht einem t-test für mehr als zwei Mittelwerte. Ab einem p-Wert von unter 0,05 wurden die Ergebnisse als signifikant (*) angesehen, ab einem p-Wert von 0,01 wurden die Ergebnisse als hochsignifikant (**) betrachtet.

3.9. Plasmide

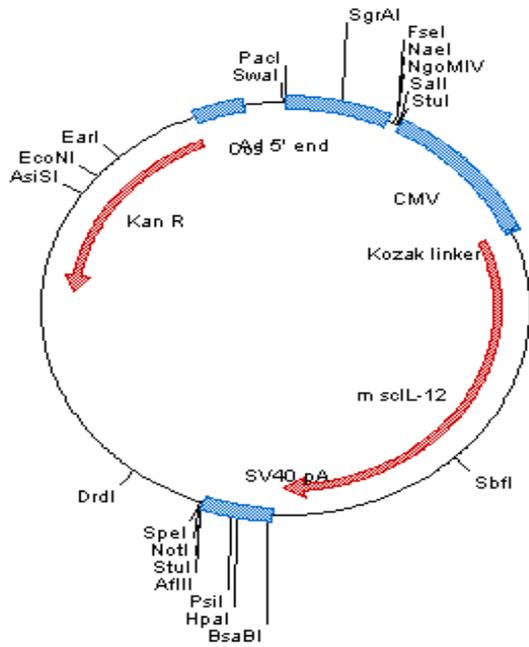


Abbildung 16: murines scIL-12 Plasmid

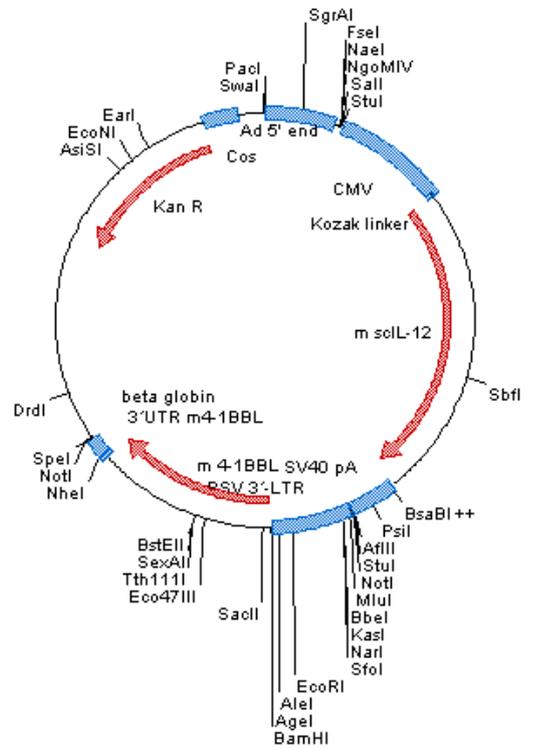


Abbildung 17: murines scIL-12+4-1BBL Plasmid

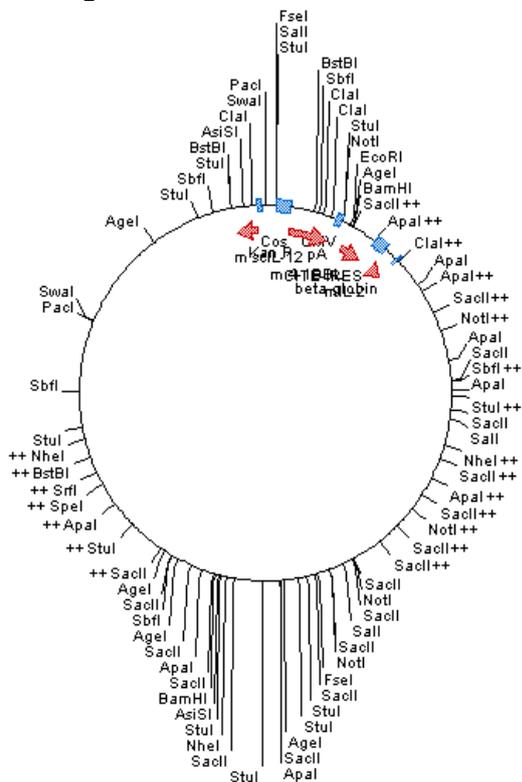


Abbildung 18: murines scIL-12+4-1BBL+IL-2 Plasmid

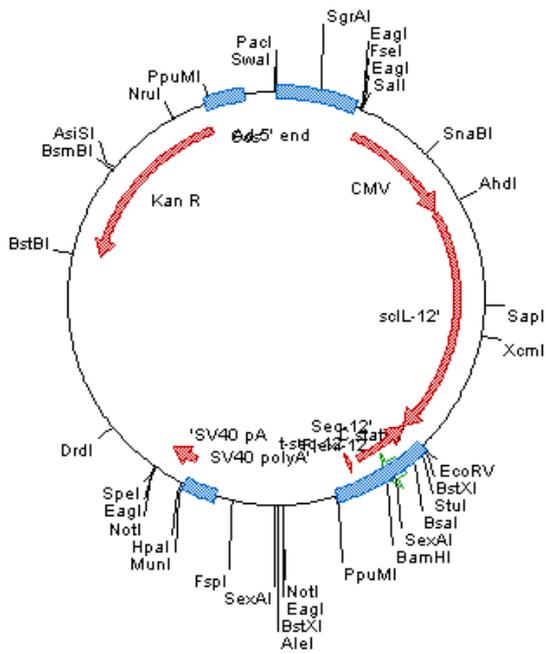


Abbildung 19: humanes scIL-12 Plasmid

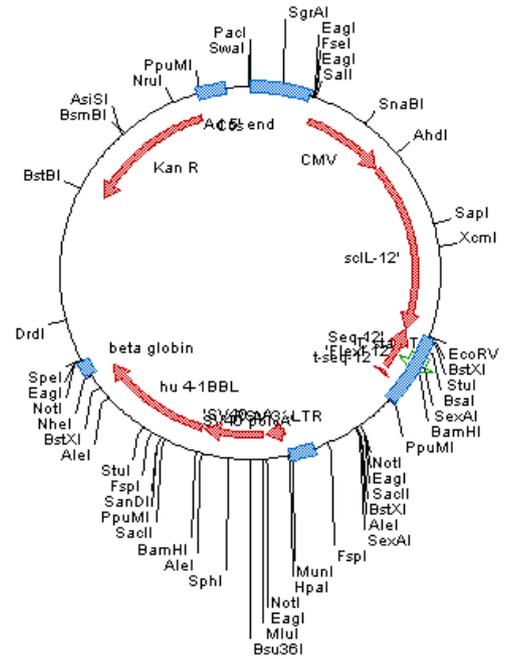


Abbildung 20: humanes scIL-12+4-1BBL Plasmid

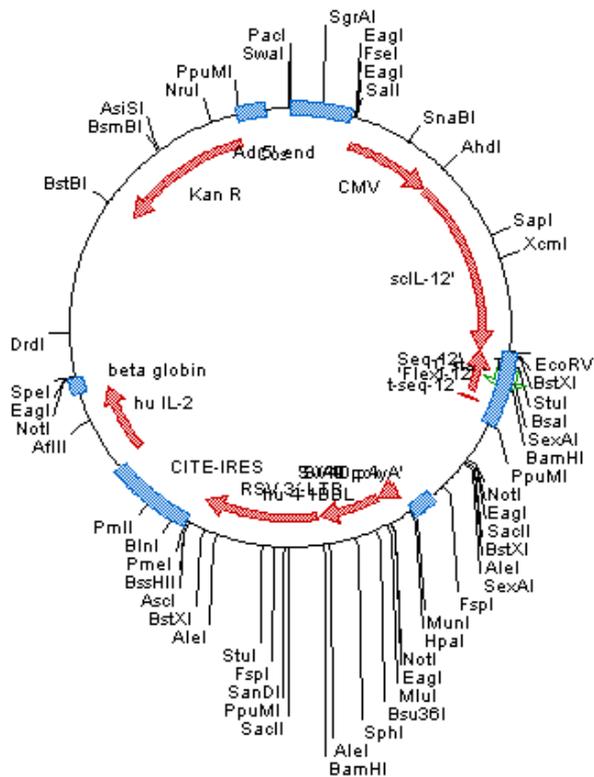


Abbildung 21: humanes scIL-12+4-1BBL+IL-2 Plasmid

4. Ergebnisse

Die Verwendung von IL-12 in der genetischen Immuntherapie hat in den ersten klinischen Studien nur zu geringfügigen Erfolgen geführt. In dieser Arbeit sollen die Vorteile einer Kombination von verschiedenen Immunstimulatoren in der Tumorthherapie aufgezeigt werden. Die Kombination von verschiedenen Immunstimulatoren verspricht eine stärkere und spezifischere Aktivierung des Immunsystems. In einem Co-Kultur-Modell, aus lebenden Hepa 1-6 Tumorzellen und Immunzellen, werden die Interaktionen zwischen den Immunzellen und den Tumorzellen näher untersucht. Dieses Modell erlaubt, die synergistischen und additiven Effekte verschiedener Immunstimulatoren und adenoviraler Antigene zu untersuchen und die Mechanismen besser zu verstehen. Dies kann zum Design besserer und effektiverer Vektoren in der Immuntherapie gegen Lebertumoren genutzt werden. Zur Untersuchung synergistischer und additiver Effekte zwischen einzelnen Immunstimulatoren wurden Zellen unterschiedlich transfiziert. Es wurde eine Transfektion einer adenoviralen Infektion bevorzugt, um Probleme der Titterschwankungen und der immunstimulatorischen Effekte der adenoviralen Antigene zu umgehen. Diese Arbeiten wurden mit humanen und murinen Zellen durchgeführt. Anschließend wurde überprüft, ob die gefundenen immunstimulatorischen Effekte *in vivo* zu einer antitumoralen Wirkung führen. Dafür wurde ein adenoviraler Vektor mit den Genen von drei Immunstimulatoren (scIL-12, 4-1BBL und IL-2) im murinen Modell *in vivo* getestet.

4.1. Transfektion von Tumorzellen und Expression von Transgenen

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden 500.000 Hepa 1-6 Zellen am Tag vor der Transfektion in 6-Well-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit einem nichtkodierenden Kontrollplasmid (pUC18) oder mit scIL-12-Plasmid mit jeweils 10% eGFP-Plasmid transfiziert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen auf eGFP analysiert. Es wurde eine mittlere Transfektionseffizienz von 69% +/- 1,9% SD bestimmt. (Abbildung 22).

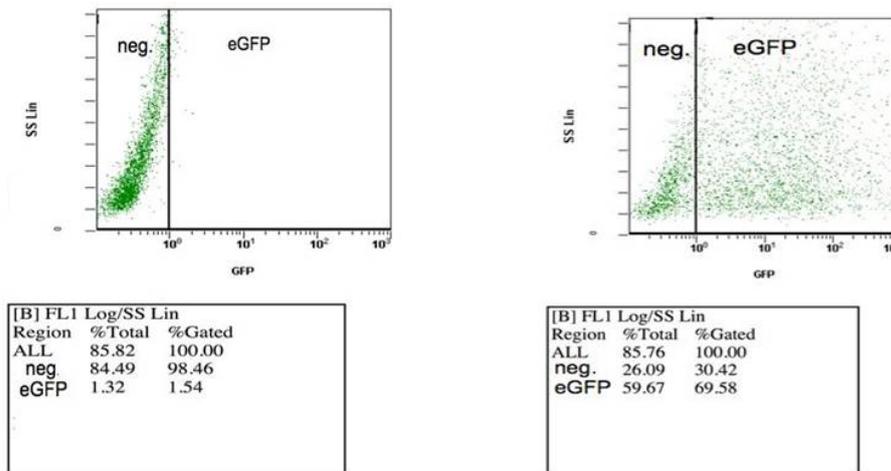


Abbildung 22: Transfektionskontrolle mit Durchflusszytometrie. Der linke Teil der Abbildung zeigt die nicht-transfizierte Kontrolle, rechts ist eine exemplarische Transfektion dargestellt. Im eGFP sind die transfizierten Zellen und in Gate neg. die nichttransfizierten Zellen dargestellt. Durchschnittlich wurde eine Transfektionseffizienz von 69% \pm 1,9% SD bestimmt. Hepa 1-6 Zellen (5 E5-Zellen/Well) wurden 1 Tag vor Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät. Zellen wurden mit Fugene HD für 4 Tage transfiziert. Zum Transfektionsgemisch mit den später verwendeten Konstrukten wurden 10% eGFP-Plasmid für pUC18 hinzugegeben. Anschließend wurde die Transfektionseffizienz mit Durchflusszytometrie bestimmt.

Nach dem Nachweis einer guten Transfektionseffizienz wurden Hepa 1-6 Zellen mit scIL-12- Plasmid transfiziert. Um die Produktion der Transgene nachzuweisen, wurden die konditionierten Überstände und die lysierten Zellen des Versuchs qualitativ auf scIL-12 mittels Western-Blot untersucht.

Exemplarisch wurde nur scIL-12 im Western-Blot nachgewiesen. Lediglich IL-12 wird als veränderte *single chain* (sc)-Variante verwendet.

Im Western-Blot ließ sich scIL-12 im konditionierten Medium und in den lysierten Zellen der scIL-12-transfizierten Zellkulturen bei ca. 70 kDa nachweisen (Abbildung 23). In der sezernierten Form, im Gegensatz zur intrazellulären Form, stellte sich scIL-12 als Doppelbande dar. Als Negativkontrolle wurden die Medien und Zellen der pUC18-transfizierten Zellen benutzt. Als Positivkontrolle dienten scIL12-konditionierte Referenzmedien aus adenoviraler Infektion mit einem scIL-12-Vektor.

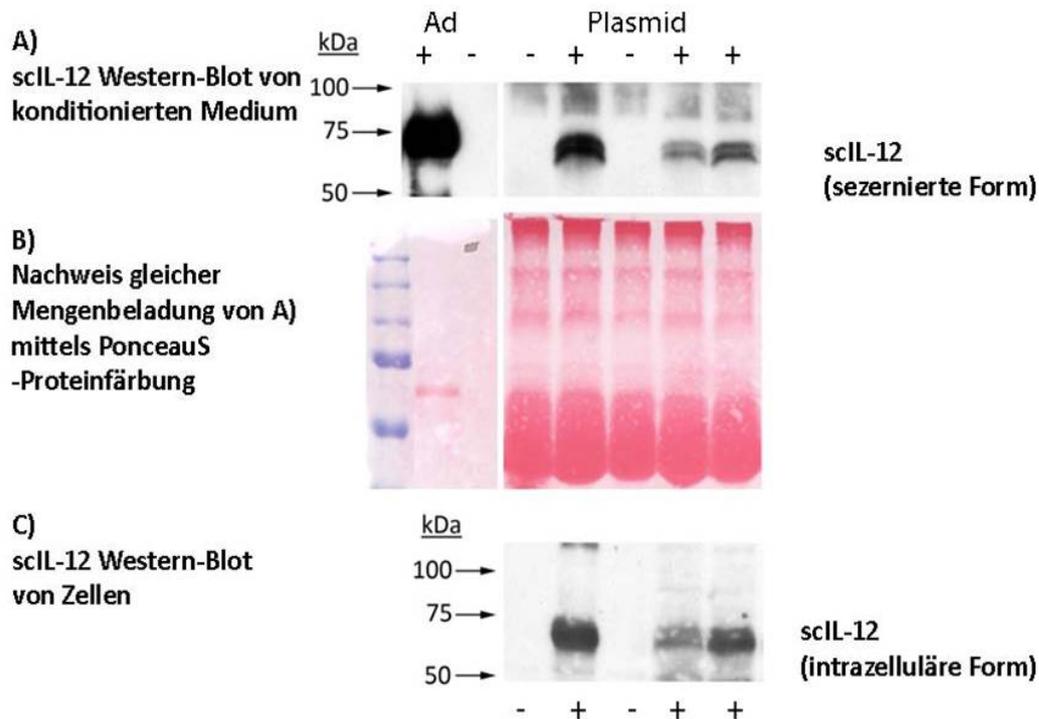


Abbildung 23: Nachweis von scIL-12 im Western-Blot. Im konditionierten Medium wurde eine scIL-12-spezifische Bande bei 70kDa gefunden. Im Gegensatz zu den Zellysaten (siehe c) ist in der sezernierten Form (siehe A) eine Doppelbande zu sehen, die vermutlich auf posttranslationale Glykolysierung zurückzuführen ist. Für den Western-Blot wurden 4 Tage transfizierte Hepa 1-6 Zellen und Medium verwendet. Als Negativprobe wurden Hepa 1-6 Zellen mit pUC18 transfiziert, als Positivprobe diente scIL-12-konditioniertes Referenzmedium aus adenoviraler Infektion mit einem scIL-12-Vektor.

Anschließend wurden die konditionierten Medien mittels ELISA quantitativ auf IL-12 untersucht. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Alle pUC18-transfizierten Zellen enthielten kein IL-12. Alle scIL-12-transfizierten Wells enthielten große Mengen. Es wurden Mengen zwischen $3 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ pg/ml IL-12 nachgewiesen.

4.2. *In vitro*-Stimulation von Immunzellen durch scIL-12

4.2.1. Induktion der IFN- γ Produktion durch scIL-12

Um die biologische Aktivität vom scIL-12, hergestellt durch die Tumorzellen, zu überprüfen, wurden Milzzellen der Maus zusammen mit scIL-12-enthaltendem Medium kultiviert.

Milzzellen wurden frisch aus der C57/BL6-Maus (syngen zu Hepa 1-6) isoliert. $1,9 \cdot 10^6$ Milzzellen wurden in Medium mit verschiedenen Konzentrationen mit scIL-12 (0 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) in Kombination mit verschiedenen

Konzentrationen Phytohämagglutinin (PHA, 0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml) zur Vorstimulation in 12-Well-Platten kultiviert. Jeden Tag wurden 0,5ml Medium zur späteren IFN-γ-Kontrolle durch ELISA bei -20° eingefroren. Eine Vorstimulation mit PHA zeigt alleine keine Stimulation der Milzzellen und steigert die IFN-γ-Sekretion initiiert durch scIL-12 nicht signifikant (Abbildung 24).

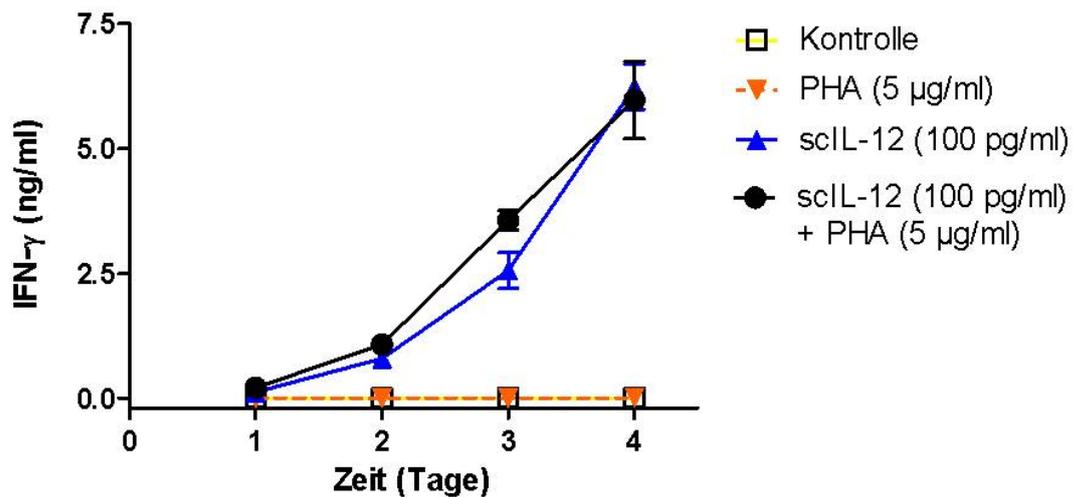


Abbildung 24: Milzzellstimulation mit und ohne PHA. $1,9 \cdot 10^6$ murine Milzzellen/cm² wurden *in vitro* mit/ohne 100 pg/ml scIL-12 und mit/ohne 5 µg/ml PHA stimuliert. Jeden Tag wurde mittels ELISA der IFN-γ-Gehalt im konditionierten Medium bestimmt. PHA alleine zeigt keine Stimulation der IFN-γ-Sekretion und PHA zeigt bis auf Tag 3 keine signifikante Steigerung der IFN-γ-Sekretion.

4.2.2. Murine Milzzellen reagieren konzentrationsabhängig auf scIL-12 mit IFN-γ-Produktion

Eine Erhöhung der scIL-12-Konzentration zur Stimulation der Milzzellen erhöhte die IFN-γ-Sekretion. Selbst bei unphysiologisch hoher Konzentration reagieren die Milzzellen mit höhere Sekretionen von IFN-γ. Eine Sättigung des Systems wurde nicht gezeigt (Abbildung 25).

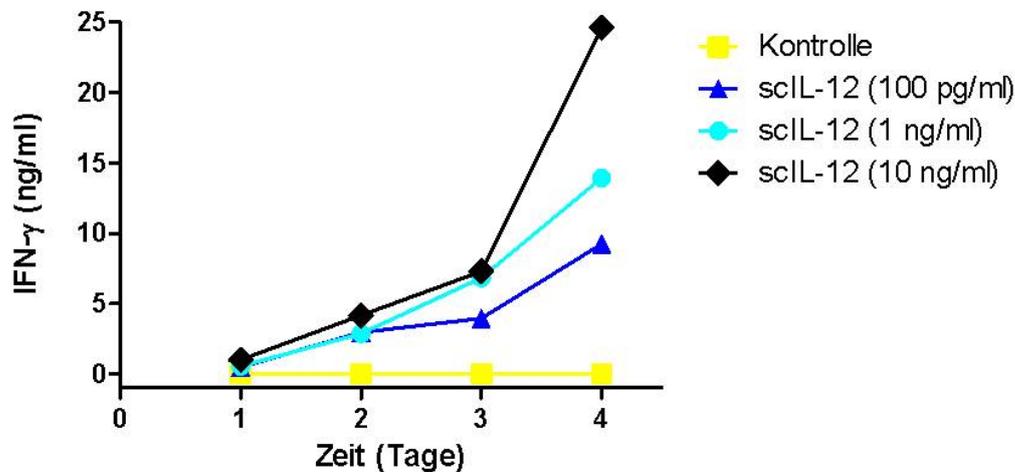


Abbildung 25: Milzzellstimulation mit verschiedenen Konzentrationen sclL-12. $1,9 \cdot 10^6$ murine Milzzellen/cm² wurden *in vitro* mit verschiedenen Konzentrationen sclL-12 über 4 Tage stimuliert. Jeden Tag wurde die IFN- γ -Konzentration durch ELISA bestimmt. Je höhere die sclL-12-Konzentration, desto höher die IFN- γ -Sekretion. Es wurde keine Sättigung des Systems gefunden.

4.2.3. sclL-12 induziert die Cytokine einer T_{H1}-Immunantwort

Um ein vollständigeres Bild von der Reaktion der Milzzellen auf das gebildete sclL-12 zu bekommen, wurde das konditionierte Medium auf weitere Cytokine und Chemokine mit einem *Cytokine Array* untersucht. Im *Array* wurde eine verstärkte Expression von Cytokinen der T_{H1}-Immunantwort nachgewiesen. Cytokine wie IFN- γ (B15–16), IP-10 (D1-2), MIG (D13-14) und GM-CSF (B7-8) zeigen eine klare Hochregulation. Bei Cytokinen der T_{H2}-Immunantwort Il-10 (C11-12) und IL-4 (C3-4), wurde keine verstärkte Expression nachgewiesen (Abbildung 26). Als Kontrolle diente Medium aus der Kultivierung von nicht-stimulierten Milzzellen.

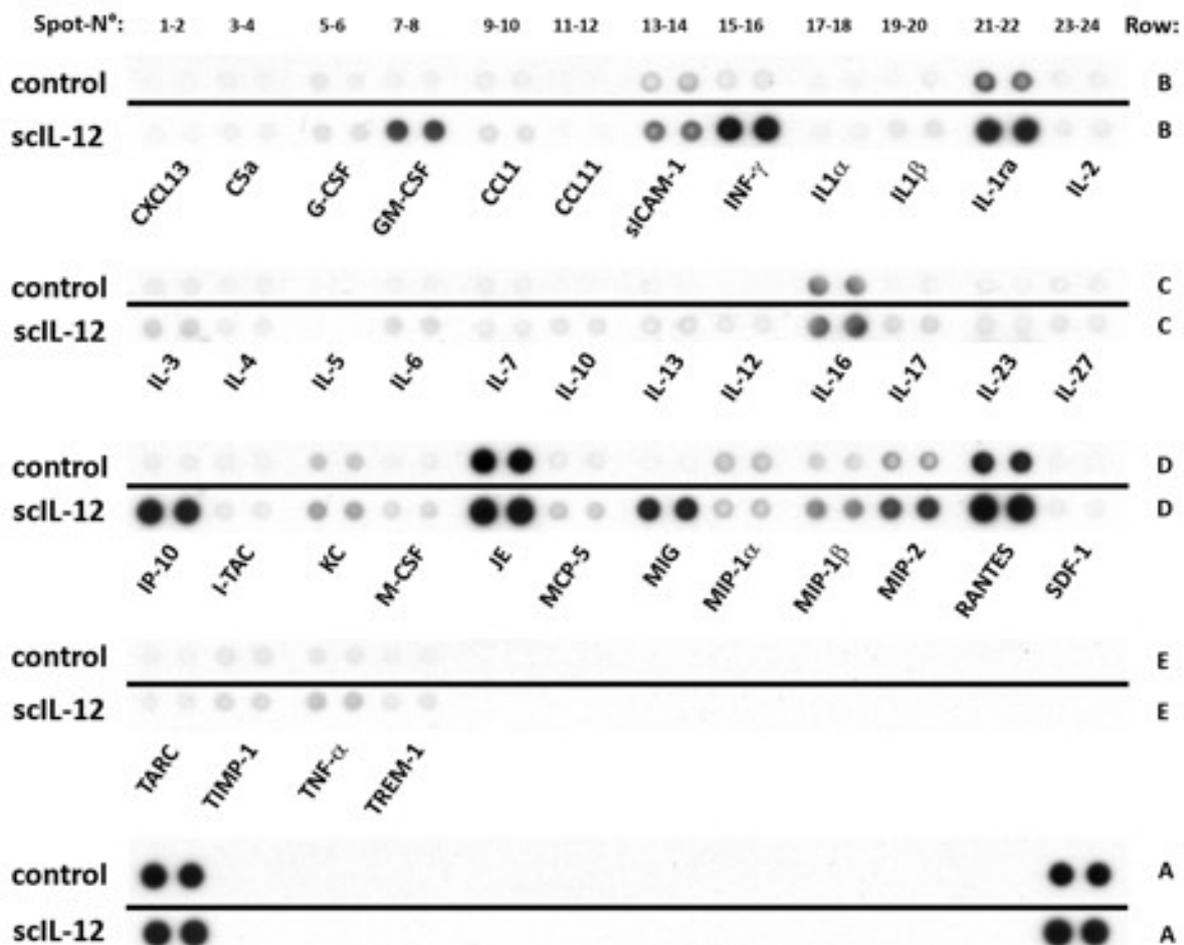


Abbildung 26: Cytokine Array von scIL-12-stimulierten, murinen Milzzellen. Der besseren Übersicht wegen wurden die beiden Bedingungen jeweils übereinander dargestellt. Die jeweilige obere Reihe zeigt die Analyse des Kontroll-Mediums. Die unteren Reihen zeigt die Analyse des konditionierten Mediums nach Stimulation mit scIL-12. Murine Milzzellen wurden für 3 Tage in konditioniertem Medium mit 100 pg/ml scIL-12 kultiviert. Anschließend wurde das Medium mittels *Cytokine Array* auf entstehende Cytokine und Chemokine analysiert. Als Kontrolle diente das Medium aus 3 Tagen kultivierten Milzzellen ohne scIL-12. Jeweils 1ml Medium wurde auf 40 Botenstoffe des Immunsystems getestet. Die vier Reihen (B, C, D, E) enthalten die jeweiligen Cytokine in Duplikaten nebeneinander. Die untersten Reihen (A) zeigen die Positivkontrolle für beide Bedingungen. Der *Cytokine Array* zeigt die Induktion einer T_{H1} -Antwort in den Milzzellen durch scIL-12.

4.3. Nachweis synergistischer Effekte der Immunstimulatoren im murinen Co-Kultur-Modell

Da eine effektive Immunantwort nicht nur durch sezernierte Botenstoffe, sondern auch durch Zell-Zell-Interaktionen von Rezeptoren hervorgerufen wird, wurden die Ansätze aus 4.1 und 4.2 kombiniert. Es wurde ein Co-Kultursystem von lebenden Tumorzellen und Milzzellen etabliert. Dies ermöglicht die Untersuchung der Mechanismen der synergistischen und additiven Effekte zwischen verschiedenen Immunstimulatoren zur Initiierung einer effektiven Immunantwort gegen den Tumor.

Der Ansatz dieser Immuntherapie ist, durch drei Immunstimulatoren eine Antwort des Immunsystems auf einem Tumor zu initiieren. Im Co-Kultur-Modell wurden deshalb die synergistischen Effekte zwischen scIL-12, 4-1BBL und IL-2 dargestellt. In den folgenden *in vitro*-Studien wird immer scIL-12 alleine mit scIL-12+4-1BBL und scIL-12+4-1BBL+IL-2 verglichen. 4-1BBL alleine zeigte keine aktivierenden Effekte (Ergebnisse nicht dargestellt). Die aktivierenden Effekte von IL-2 alleine wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, sind aber auch schon hinreichend aufgeklärt.

4.3.1. Analyse mittels IFN- γ -ELISA

Im Zeitverlauf zeigte eine Kombination aus scIL-12 mit 4-1 BBL und IL-2 eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Sekretion (Abbildung 27). Besonders am zweiten Tag zeigte die Kombination mit 4-1BBL und IL-2 eine Steigerung der Sekretion um das 6,2fache. Die Kombination von scIL-12 und 4-1BBL alleine zeigte eine Steigerung der Sekretion um mehr als das 1,6fache. Der steigernde Effekt der drei Immunstimulatoren ist am Tag 2 am stärksten, bleibt aber die gesamte Zeit signifikant erhalten. Die Kombination von scIL-12 mit 4-1BBL allein zeigt am ersten Tag seine größte Steigerung mit Faktor 2,1. Auch diese Tendenz bleibt über die Zeit erhalten, ist aber nicht signifikant.

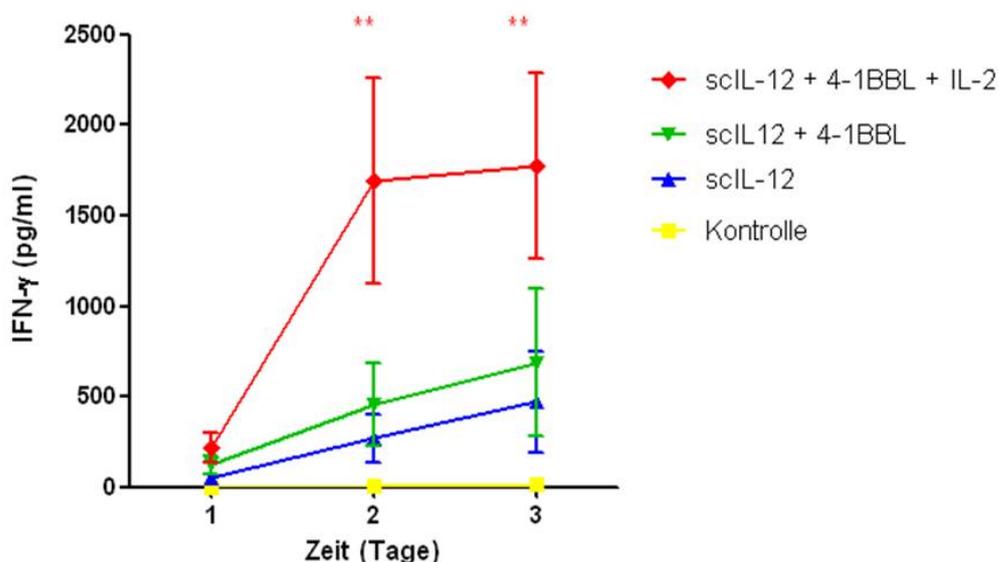


Abbildung 27: IFN- γ -Sekretion in der murinen Co-Kultur, induziert durch Kombination von Immunstimulatoren. Murine Milzzellen wurden für 3 Tage mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen (Hepa 1-6) co-kultiviert. Jeden Tag wurde konditioniertes Medium abgenommen und mittels ELISA auf INF- γ analysiert. Als Kontrolle dienten pUC18-transfizierte Tumorzellen mit murinen Milzzellen. Die Kombination von scIL-12 mit 4-1BBL und IL-2 zeigt eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Sekretion über die Zeit gegenüber den scIL-12-transfizierten Co-Kulturen. Die Resultate entstammen zwei unabhängigen Experimenten in dreifacher Ausführung für jede Bedingung. Die Werte werden als +/- SD dargestellt. **P \leq 0,001, für scIL-12+4-1BBL-IL-2 vs. scIL-12 und scIL-12+4-1BBL, *one way-ANOVA* test.

4.3.2. Untersuchung zellspezifischer Aktivierung mittels Durchflusszytometrie

Nach 3 Tagen Co-Kultivierung der Milzzellen mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen wurden die Milzzellen von den Tumorzellen ab gespült und mit Durchflusszytometrie auf ihre Aktivierung überprüft. Als Aktivierungsmarker wurde intrazelluläres IFN- γ angefärbt. Es wurden NK-Zellen, T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CD8+) auf ihre Aktivierung überprüft. Durch die Kombination der drei Immunstimulatoren wurde eine signifikante Erhöhung der Aktivierung von T-Helfer Zellen gegenüber scIL-12 alleine erreicht, die mit der Kombination mit nur 4-1BBL nicht erreicht wurde. Die Aktivierung der T-Helferzellen konnte fast auf 160% gesteigert werden. Die alleinige Steigerung durch 4-1BBL belief sich lediglich auf 130%.

Die Aktivierung der CD-8+ Zellen konnte gegenüber scIL-12 mit der Kombination der drei Immunstimulatoren sogar auf 170% signifikant gesteigert werden und gegenüber scIL-12 mit 4-1BBL noch signifikant auf 140%.

Die Aktivierung der NK-Zellen ist zwar durch die Kombination der Immunstimulatoren größer, doch nicht signifikant. Die Aktivierung hat sich in der Kombination mit 4-1BBL gegenüber scIL-12 auf 140% gesteigert, doch in der Kombination mit 4-1BBL und IL-2 lediglich auf 120%. Die Resultate entstammen drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit Dreifachbestimmung für jede Bedingung.

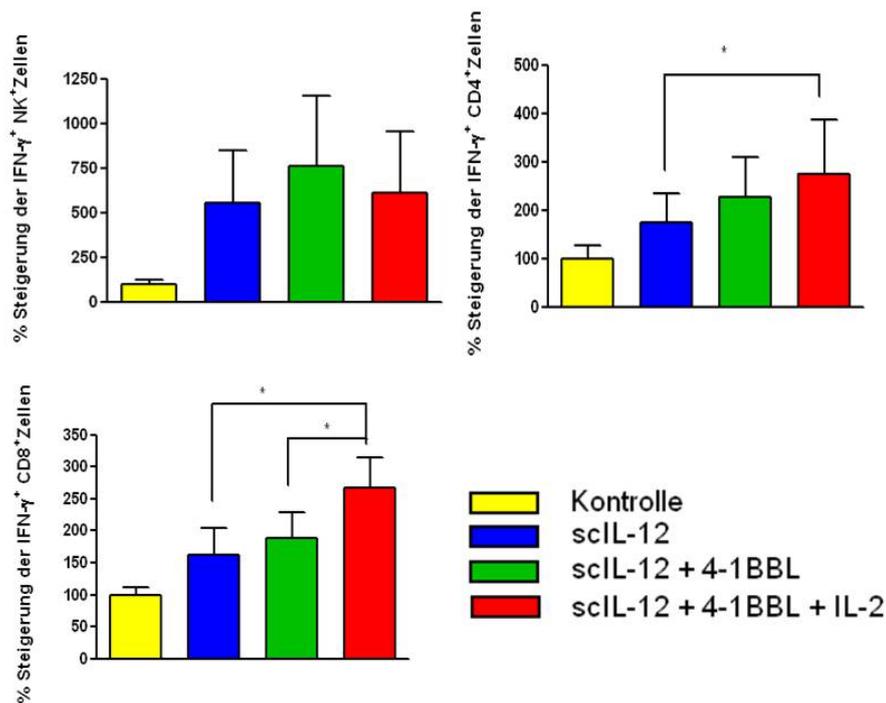


Abbildung 28: Durchflusszytometrie-Analyse der Zellaktivierung im Co-Kultur-Modell. Dargestellt ist die prozentuale Erhöhung der aktiven Milzzellen bezogen auf eine Co-Kultur ohne Transfektion mit Immunstimulatoren. Es wurden murine Milzzellen mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen für 3 Tage co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der intrazellulär IFN- γ -positiven Zellen bestimmt. Es wurde zwischen zytotoxischen T-Zellen (CD8+), T-Helferzellen (CD4+) und NK-Zellen (CD49b+) unterschieden. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit murinen Milzzellen. Die Kombination von scIL-12 mit 4-1BBL und IL-2 zeigt eine signifikante Erhöhung des Anteils der aktivierten T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen in Bezug auf nur scIL-12-transfizierte Co-Kulturen. Die Resultate stammen aus 2 unabhängigen Experimenten, jeweils in dreifacher Ausführung für jede Bedingung. Ergebnisse sind dargestellt als +/- SD. *P \leq 0,05; **P \leq 0,01 vs. scIL-12; one way-ANOVA Test.

4.3.3. Erfassung der Cytokin-Profiles mittels *Cytokine Array*

Um einen größeren Überblick über die Immunantwort auf die Immunstimulatoren zu erhalten, wurden die Medien aus der Co-Kultur zusätzlich mittels *Cytokine Array* analysiert. Dafür wurden Hepa 1-6 Tumorzellen mit den verschiedenen Plasmiden für scIL-12, scIL-12+4-1BBL und scIL-12+4-1BBL+IL-2 transfiziert. Nach zwei Tagen Transfektion wurden die Tumorzellen 3 Tage mit frisch aus der syngenen C57/BL6-Maus isolierten Milzzellen kultiviert. Anschließend wurden 1,5 ml Medium abgenommen und mittels *Cytokine Array* analysiert. Der *Cytokine Array* testete das Medium semiquantitativ auf 40 sezernierte Chemokine und Cytokine in Doppelbestimmung. Die Analyse der Medien der verschiedenen Transfektionen zeigte eine konstante Induktion einer T_{H1}-Immunantwort. Die gesteigerte Sezernierung von IFN- γ , aus dem ELISA, konnte bestätigt werden. Densitometrisch gemessen ergab sich eine Steigerung durch scIL-12 um das 2,5fache, durch scIL-12 + 4-1BBL um das

2,8fache und durch alle drei Immunstimulatoren um das 4,1fache. Weitere Cytokine wie G-CSF, IL-1 α , IL-6, IL-10, MIG konnten auch durch die Immunstimulation vermehrt detektiert werden (Abbildung 29). Andere Cytokine, wie GM-CSF, IP-10, KC, M-CSF, TNF- α und RANTES, wurden schon durch die Anwesenheit der Tumorzellen detektiert und blieben unter allen Bedingungen stark exprimiert. Insgesamt ließ sich eine vermehrte Detektion der Cytokine der T_{H1}-Antwort wie IFN- γ , GM-CSF, IP-10 und MIG beobachten, während die Cytokine der T_{H2}-Antwort wie IL-4, IL-6 und IL-10 kaum detektiert wurden. Ergänzend zu erwähnen ist die Herunterregulation von JE, welches durch scIL-12 auf das 0,9fache, durch scIL-12 + 4-1BBL auf das 0,7fache und durch alle drei Stimulatoren auf das 0,6fache gesenkt wurde.

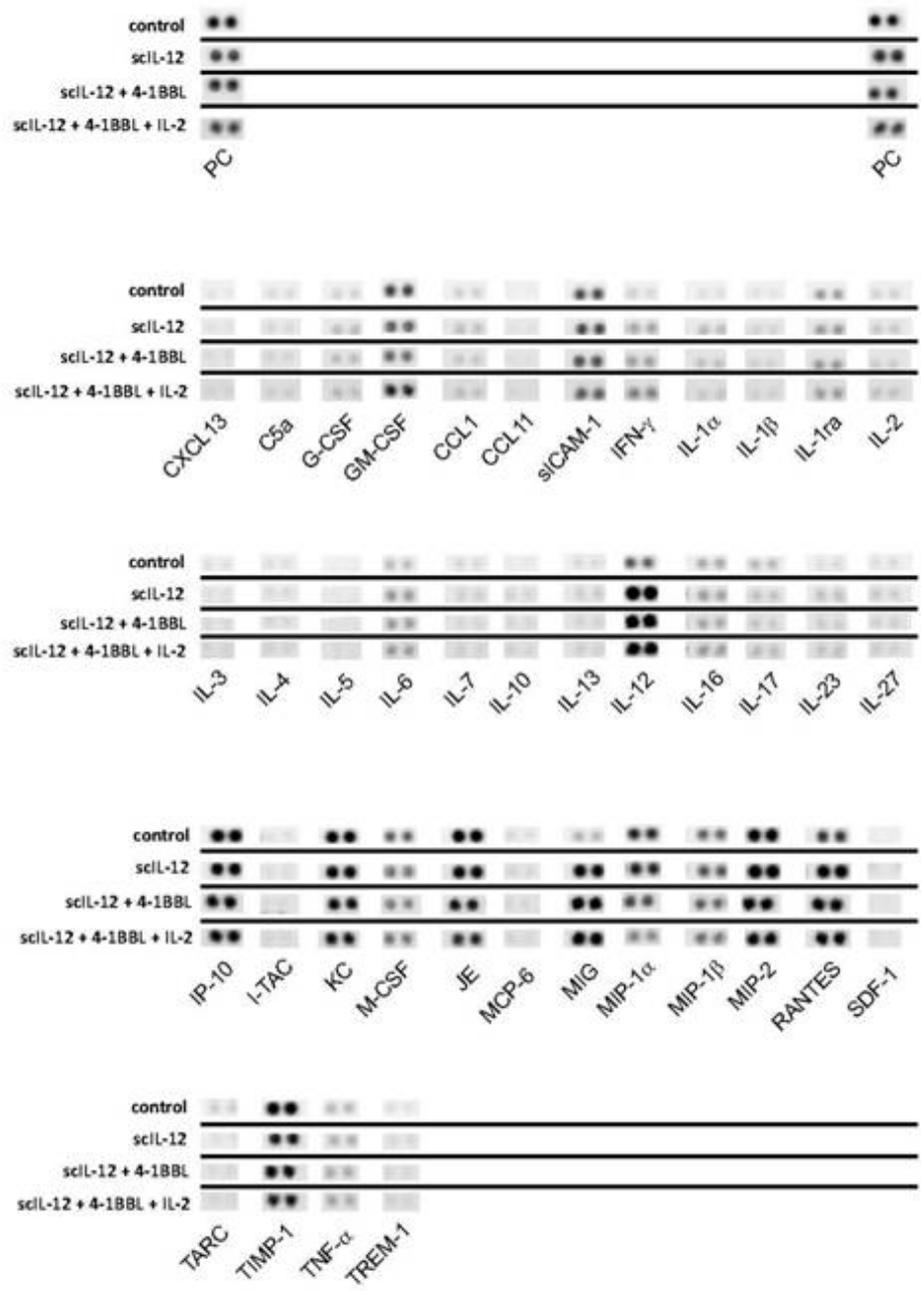


Abbildung 29: Cytokine Array der multiplen Immunstimulatoren. Der Cytokine Array zeigt die Induktion einer T_{H1} -gewichteten Immunantwort, gezeigt durch die Hochregulation der T_{H1} -Cytokine (IFN- γ , MIG, IP-10). Es wurden Hepa 1-6 Zellen mit den verschiedenen Kombinationen von Immunstimulatoren transfiziert und mit Milzzellen co-kultiviert. Die konditionierten Medien wurden am dritten Tag abgenommen und mittels Cytokine Array analysiert. Dargestellt ist eine Detektionsdauer von 2sec.

4.4. Immunstimulatorische Effekte adenoviraler Infektion *in vitro*

In der angestrebten Tumorthherapie werden die Immunstimulatoren scIL-12, 4-1BBL und IL-2 in einem Adenovirus als Vektor verpackt. Da auch die adenoviralen

Antigene einen immunstimulatorischen Effekt haben, werden diese hier genauer untersucht. Die Effekte wurden allein und in Kombination mit scIL-12, 4-1BBL und IL-2 untersucht. Dies wurde wieder mittels IFN- γ -ELISA und Durchflusszytometrie analysiert.

Zur Vorbereitung des Versuchs wurde die MOI (*multiplicity of infection*) für Hepa 1-6 Zellen bestimmt. Dafür wurden Hepa 1-6 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen eines adenoviralen Vektors, der für GFP kodiert, infiziert. Anschließend wurde der Anteil der infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Bei einer Anzahl von 100 infektiösen Partikeln pro Hepa 1-6 Zelle wurde eine 38% Infektion der Hepa 1-6 Zellen erreicht. In gleicher Weise wurde auch die MOI für CT-26 bestimmt. Es kam selbst bei 200 infektiösen Partikeln pro CT-26-Zelle zu keiner messbaren Infektion (Daten werden nicht gezeigt).

Zur Bestimmung adenoviraler Effekte auf die Stimulation durch die Cytokine wurden die Tumorzellen, wie schon in den vorhergehenden Versuchen, 2 Tage transfiziert. Diesmal wurden die Zellen vorher mit 200 infektiösen Partikeln/Tumorzellen für 5 Stunden im kleinen Volumen kultiviert und anschließend mit Medium aufgefüllt, ohne den Virus zu entfernen. Darauf folgte die Transfektion mit den Plasmiden für 2 Stunden mit anschließender Co-Kultivierung mit murinen Milzzellen. Nach 3 Tagen wurden die Milzzellen mittels Durchflusszytometrie auf ihre Aktivierung untersucht. Unten dargestellt ist die Steigerung der Aktivierung für die einzelnen Zellpopulationen und einzelnen Transfektionen „mit Virus“ gegen „ohne Virus“. Die Aktivierung der NK-Zellen steigt durch die vorherige Virusinfektion mit/ohne Immunstimulatoren durchschnittlich zwischen 159% und 230%. Auch ohne zusätzliche Immunstimulatoren zeigt sich eine Steigerung um 189% gegenüber einer Co-Kultur ohne Immunstimulatoren.

Auch bei den CD4+ Zellen zeigt sich eine verstärkte Aktivierung unabhängig von der Kombination der Immunstimulatoren. Die Steigerung der IFN- γ -Zellen liegt durchschnittlich zwischen 146% und 164%.

Bei den CD8+ Zellen zeigt sich meist keine Steigerung der Aktivierung durch die adenovirale Infektion. Lediglich bei Anwesenheit der drei Immunstimulatoren (scIL-12+4-1BBL+IL-2) zeigt sich eine Steigerung um 157% in der Aktivierung gegenüber den drei Immunstimulatoren ohne Adenovirusinfektion (Abbildung 30).

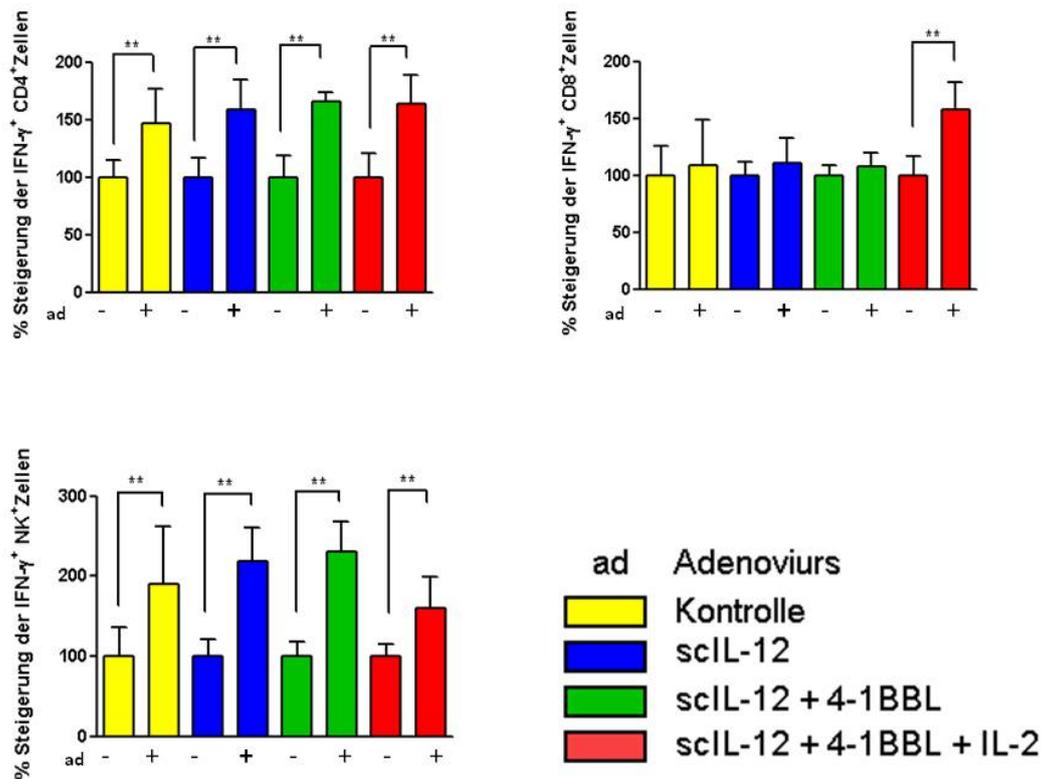


Abbildung 30: Relative Erhöhung der IFN- γ -positiven Zellen durch adenovirale Antigene. Murine Milzzellen wurden für drei Tage zusammen mit murinen Tumorzellen (Hepa 1-6) co-kultiviert. Die murinen Tumorzellen wurden zuvor mit(+)/ohne(-) Adenovirus infiziert und mit verschiedenen Immunstimulatoren transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf intrazelluläres IFN- γ analysiert. Es wurde zwischen cytotoxischen T-Zellen (CD8+), T-Helfer-(CD4+) und NK-Zellen (CD49b+) differenziert. Es wurde jeweils die relative Steigerung zur Transfektion ohne vorherige Virusinfektion dargestellt mit +/-SD. Die Ergebnisse entstammen 2 unabhängigen Experimenten in dreifacher Ausführung für jede Bedingung. *P \leq 0,05; **P \leq 0,01 t-test.

4.5. Nachweis synergistischer Effekte in einer *in vivo*-Mausstudie

4.5.1. Untersuchung der antitumoralen Antwort auf Hepa 1-6 Tumorzellen

Um die *in vitro*-Daten zu bestätigen, wurde ein murines Tumormodel *in vivo* etabliert. Zuerst wurde versucht, mit der gleichen Tumorzelle wie *in vitro* (Hepa 1-6) zu arbeiten. Diese wurde in eine syngene Maus (C57/BL6), nach Laparotomie orthotop in die Leber injiziert. Selbst bei hohen Zellzahlen von bis zu 10^9 Tumorzellen in die Leber oder in den Peritonealraum zeigte sich kein Tumorwachstum.

Dies wurde später *in vitro* durch die Erkennung des Immunsystems erklärt und gezeigt. Medien von Milzzellen in Kultur allein und in Co-Kultur mit Hepa 1-6 Zellen

wurden mittels *Cytokine Array* untersucht. Schon allein die Anwesenheit der Hepa 1-6 Zellen zeigte eine Aktivierung von Cytokinen der Immunabwehr. Es wurden Chemokine und Cytokine wie IP-10 oder GM-CSF nachgewiesen.

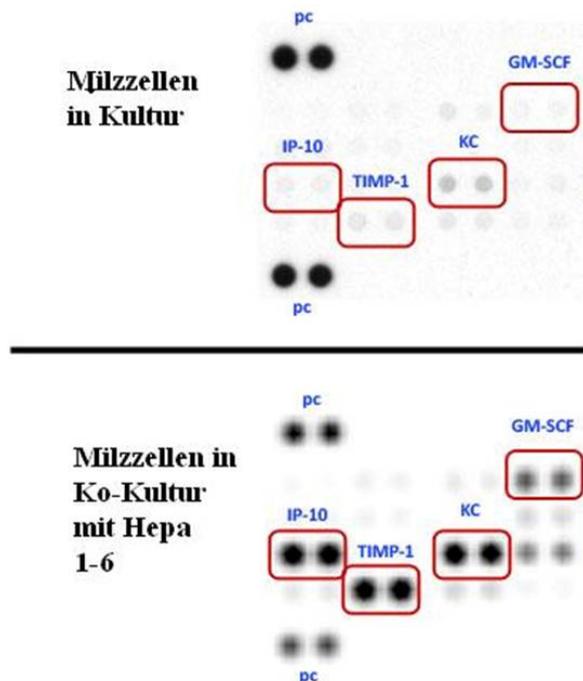


Abbildung 31: Cytokine Array der Immunantwort auf Hepa 1-6 Tumorzellen. Array-Analyse von Medien aus einer 3tägigen Kultivierung von Milzzellen bzw. Co-Kultivierung von Milzzellen und Hepa 1-6 Tumorzellen. Der untere Array im Vergleich zum oberen zeigt den Nachweis von antitumoralen Cytokinen wie IP-10, GM-CSF, KC und TIMP-1 allein durch die Anwesenheit von Hepa 1-6 Tumorzellen.

Da Hepa 1-6 Zellen mit der C57/BL6-Maus sich als ungünstiges *in vivo*-Modell herausstellte, wurde ein neues *in vivo*-Modell etabliert.

4.5.2. Genterapie mit scIL-12+4-1BBL+IL-2 verbessert das Überleben *in vivo*

Es wurde mit der Balb/c-Maus und der syngenem Kolonkarzinomlinie CT26 gearbeitet. Die Tumorzellen wurden in einer ersten Laparotomie als orthotopes, syngenes Tumormodel einer Kolonkarzinommetastase in die Leber injiziert. Eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Tumorzellen hat sich als optimal herausgestellt, um ein gutes Tumorstadium, einen genügend großen Abstand zwischen den OPs und keinen vorzeitigen Tod der Mäuse zu sichern. Für die Überlebensstudie wurden zwei Gruppen aus jeweils 9 Tiere behandelt. Eine Gruppe wurde mit einem adenoviralen Vektor kodierend für scIL-12, 4-1BBL und IL-2 behandelt. Als Kontrolle diente eine Gruppe behandelt mit einem adenoviralen Vektor kodierend für GFP. Die Mäuse

verstarben entweder tumorbedingt oder wurden gemäß der Abbruchkriterien mittels CO₂ und anschließender zervikalen Dislokation getötet.

Es überlebten signifikant mehr Tiere den Beobachtungszeitraum von 250 Tagen in der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe überlebten nur 2 Tiere 250 Tage, in der Gruppe behandelt mit scIL-12+4-1BBL+IL2 überlebten 5 von 9 Mäusen den Beobachtungszeitraum (Abbildung 32).

In der Kontrollgruppe starben die Mäuse früher als in den Verum-Gruppen. Alle Mäuse der Kontrollgruppe verstarben zwischen Tag 40 und Tag 70 post Behandlung. Die Mäuse der scIL-12+4-1BBL+IL-2-Gruppe verstarben am Tag 63, 64 und 98.

Alle verstorbenen Mäuse wurden post mortem obduziert. Es zeigte sich bei den meisten Tieren eine starke Gewichtszunahme mit intrahepatischer Ausbreitung des Tumors und eine multiple intraperitoneale Metastasierung. Die zwei zuerst verstorbenen Tiere aus der scIL-12+4-1BBL+IL-2-Gruppe zeigten eine starke Gewichtsabnahme und Dispnoe. In der Obduktion zeigte sich dann eine intrapulmonale Metastasierung.

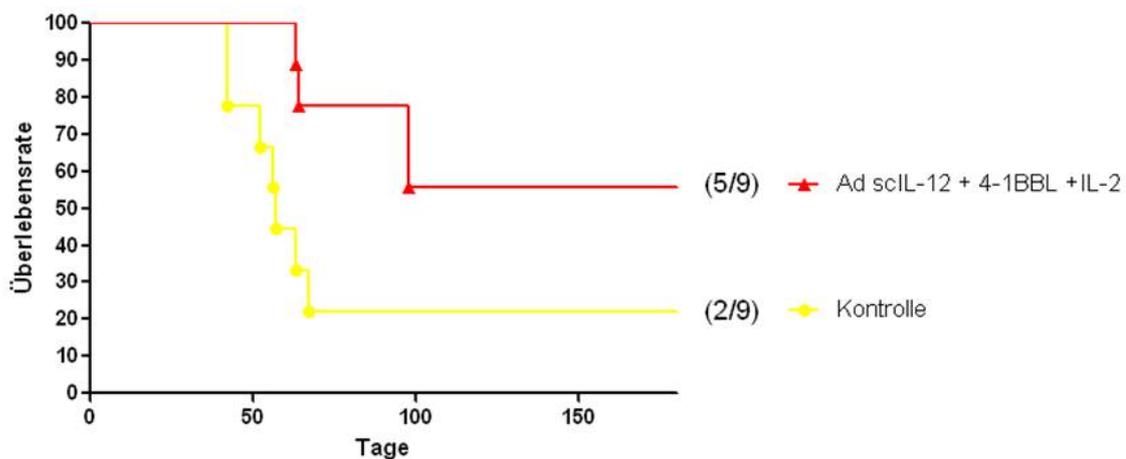


Abbildung 32: Überlebenskurve bei Behandlung intrahepatischer Tumore mit Immunstimulatoren. Am Tag 0 wurden jedem Tier intrahepatisch $1 \cdot 10^5$ C T-26 Tumorzellen implantiert. Am Tag 9 wurden jeweils 9 Tiere ein adenoviraler Vektor kodierend für GFP (Kontrolle) oder scIL-12+4-1BBL+IL-2 intratumoral injiziert. Anschließend wurde jeden Tag der Zustand der Mäuse überprüft. Es zeigte sich ein signifikant besseres Überleben bei den Gruppen behandelt mit Immunstimulatoren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kaplan Meyer, * $p < 0.05$, log-rank (Mantel-Cox) test.

4.6. Nachweis synergistischer Effekte der Immunstimulatoren im humanen Co-Kultur-Modell

Die Kombination von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 hat in der Maus *in vitro* synergistische Effekte in der Aktivierung des Immunsystems gezeigt. *In vivo* führte diese Aktivierung zu einer signifikant verbesserten Überlebensrate in der Maus.

Da sich das Immunsystem des Menschen und der Maus unterscheiden, wurden zur Bestätigung und Erweiterung der Erkenntnisse ein humanes Co-Kultur-Modell mit Huh-7 Tumorzellen und peripheren Blutmonozyten (PBMCs) etabliert. Anstelle der murinen Gene für scIL-12, 4-1BBL und IL-2 wurden nun die humanen verwendet.

Dafür wurde die Aktivierung des Immunsystems *in vitro* mittels IFN- γ -ELISA (4.6.1), zellspezifisch mittels Durchflusszytometrie (4.6.2-4.6.5) und mittels *Cytokine Array* (4.6.6) untersucht. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Aktivierung von NK-, CD56+/CD3+ T-, T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen ermittelt. Die Aktivierung wurde über intrazelluläre Färbung der Zellen auf IFN- γ und TNF- α ermittelt. Zellen, die für beide Cytokine positiv sind, werden als doppelt positiv bezeichnet und gelten als besonders aktiv. Außerdem wurde die Aktivierung der T-Zell-Subpopulationen wie naive, *central memory*, *effector memory*, *effector memory RA+* und *effector* T-Zellen überprüft.

4.6.1. Analyse mittels IFN- γ -ELISA

Zur Untersuchung synergistischer Effekte der verschiedenen Immunstimulatoren wurde die IFN- γ -Produktion von humanen PBMCs gemessen. Diese wurden analog zu den murinen Versuchen mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen co-kultiviert. Die Kombination von scIL-12 mit 4-1BBL erhöhte die IFN- γ -Produktion signifikant (Abbildung 33). Die Erweiterung der Stimulation mit IL-2 zeigte eine weitere signifikante Erhöhung der IFN- γ -Produktion.

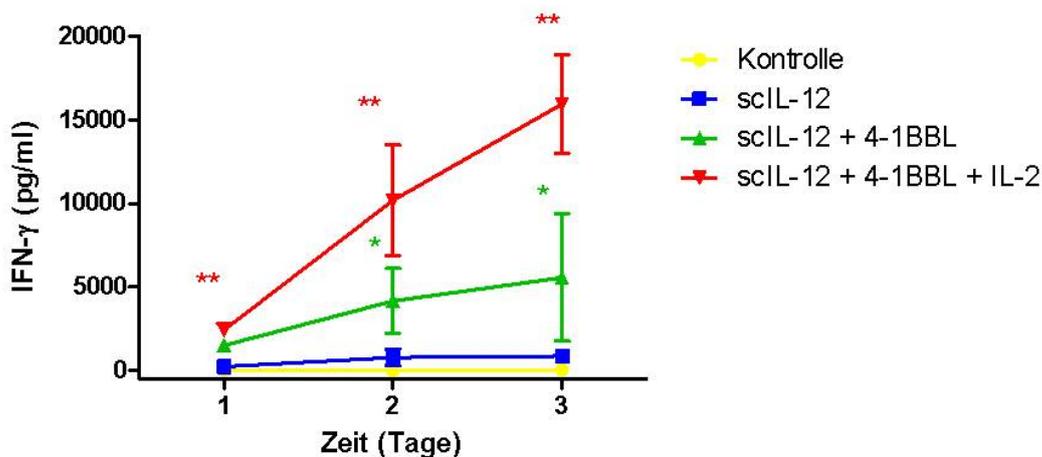


Abbildung 33: Zeitverlauf der IFN- γ -Sekretion von humanen PBMCs in der Co-Kultur mit Tumorzellen (Huh-7), transfiziert mit verschiedenen Immunstimulatoren. Humane PBMCs wurden über drei Tage mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen (Huh-7) co-kultiviert. Jeden Tag wurde konditioniertes Medium abgenommen und die IFN- γ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Sekretion von der Kombination von sclL-12 mit 4-1BBL gegen sclL-12 allein, sowie eine weitere signifikante Erhöhung von sclL-12 mit 4-1BBL und IL-2 gegen die Kombination von sclL-12 und 4-1BBL und sclL-12 alleine. Die Resultate entstammen 2 verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifacher Durchführung für jede Bedingung. Die Werte wurden als Durchschnitt \pm SD dargestellt. * $P < 0.05$, sclL-12+4-1BBL vs. sclL-12, ** $P < 0.001$ sclL-12+4-1BBL+IL-2 vs. sclL-12 oder vs. sclL-12 + 4-1BBL zu allen drei Zeitpunkten.

4.6.2. Untersuchung zellspezifischer Aktivierung mittels Durchflusszytometrie

Ähnlich dem murinen System wurde auch im humanen Co-Kultur-Modell die Aktivierung einzelner Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie erfasst. Im humanen System wurden die Untersuchungsparameter erweitert. Die Aktivierung der Zellen wurde durch intrazelluläre IFN- γ - und TNF- α -Färbung gemessen. Zellen, die intrazellulär für IFN- γ und TNF- α positiv waren, werden als doppelt positiv bezeichnet und gelten als stärkster Indikator auf Aktivität. Als Zellen des angeborenen Immunsystems wurden NK- und CD56 $^{+}$ /CD3 $^{-}$ -T-Zellen, als Zellen des adaptiven Immunsystems wurden T_H-Zellen und cT-Zellen auf ihre Aktivierung untersucht. Nähere Untersuchungen von T-Zellsubpopulationen sind in Kapitel 4.6.3 und 4.6.4 aufgeführt.

Dargestellt sind hier lediglich die Ergebnisse für die IFN- γ und TNF- α doppelt positiven Zellen. Die Ergebnisse für IFN- γ und TNF- α alleine sind im Anhang zu sehen. Da IFN- γ und TNF- α zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihre höchste

Sensitivität zeigten, wurden für IFN- γ der erste Tag und für TNF- α bzw. TNF- α und IFN- γ der zweite Tag dargestellt.

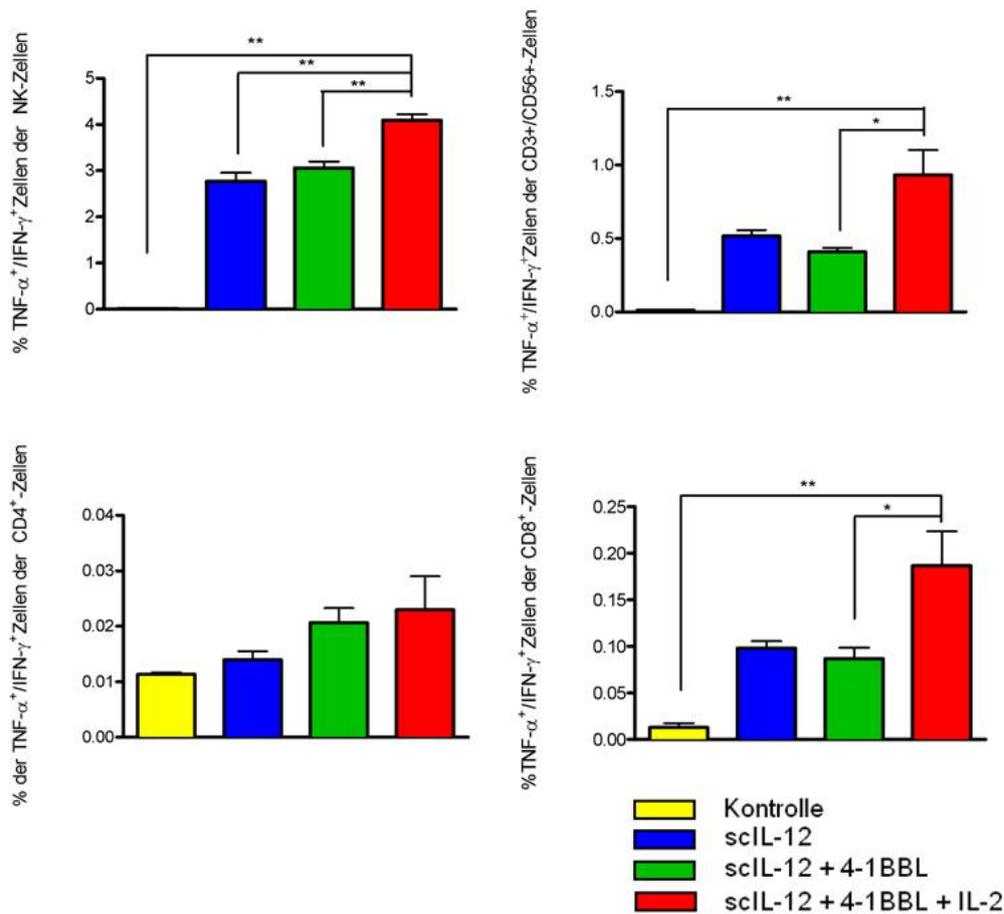


Abbildung 34: Durchflusszytometrie-Analyse der Zellaktivierung im humanen Co-Kultur-Modell. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ humanen Immunzellen. Links oben sind NK-Zellen, rechts oben CD3⁺/CD56⁺-Zellen, links unten CD4⁺ T-Helferzellen und rechts unten CD8⁺ cytotoxische T-Zellen dargestellt. Eine signifikante Steigerung des Anteils der aktivierten Zellen ist bei NK-Zellen, CD3⁺/CD56⁺-Zellen und cytotoxischen T-Zellen durch die Kombination der Immunstimulatoren zu sehen. Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der IFN- γ ⁺ und TNF- α ⁺ Zellsubpopulationen bestimmt. Daten für IFN- γ und TNF- α alleine sind im Anhang zu sehen. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Die Resultate stammen aus einem Experimenten in dreifacher Ausführung für jede Bedingung. Ergebnisse sind dargestellt als +/- SD. *P \leq 0,05; **P \leq 0,01; one way-ANOVA Test.

Der Anteil der IFN- γ ⁺, NK-, CD56⁺/CD3⁺- und cT-Zellen wurde bei allen Stimulationen signifikant gesteigert. Zwischen den einzelnen Kombinationen von Immunstimulatoren bestand kein signifikanter Unterschied (siehe Anhang). Für den Anteil der TNF- α -positiven Zellen fand sich lediglich bei den Zellen des adaptiven Immunsystems eine signifikante Steigerung, welcher allerdings durch die Kombination von scIL-12+4-1BBL+IL-2 signifikant gegenüber scIL-12 alleine gesteigert werden konnte (siehe Anhang).

Der Anteil der hoch aktiven doppelt positiven Zellen wurde durch die Immunstimulation stark gesteigert. Ohne Immunstimulation war deren Anteil nahezu nicht nachweisbar. Die Kombination von scIL-12+41BBL+IL-2 zeigte auch hier Vorteile gegenüber den anderen Stimulationen. Es wurde eine signifikante Steigerung des Anteils bei NK-, CD56+/CD3+-T-Zellen und cT-Zellen gegenüber scIL-12+4-1BBL alleine gefunden (Abbildung 34).

Bei den NK-Zellen waren doppelt positiv bei scIL-12 2,77% bei scIL-12+4-1BBL 3,06% und bei scIL-12+4-1BBL+IL-2 4,1%. Der Anteil der doppelt positiven CD56+/CD3+ T-Zellen war ohne Immunstimulator lediglich 0,04%, mit scIL-12 0,5%, mit scIL-12+4-1BBL 0,4% und mit allen drei Immunstimulatoren 0,93%. Für die T-Helferzellen zeigte sich keine signifikante Erhöhung des Anteils der IFN- γ , TNF- α oder doppelt positiven Zellen. In der Population der cT-Zellen war der Anteil der doppelt positiven Zellen ohne Simulator 0,01% durch scIL-12 0,1%, durch scIL-12+4-1BBL 0,09% und durch scIL-12+4-1BBL+IL-2 sogar 0,19% der cytotoxischen T-Zellen.

4.6.3. Aktivierung von cytotoxischen T-Zellsubpopulationen gemessen mittels Durchflusszytometrie

Die Population der cytotoxischen T-Zellen lässt sich in Subpopulationen unterteilen. In dieser Arbeit wird zwischen naiven T-Zellen (CCR7+, CD27+, CD45RO-), *central memory* T-Zellen (CCR7+, CD27+, CD45RO+), *effector memory* T-Zellen (CCR7-, CD27+, CD45RO+), *effector memory RA+* T-Zellen (CCR7-, CD27+, CD45RO-) und *effector* T-Zellen (CCR7-, CD27-, CD45RO+) unterschieden. Die Aktivierung wird mit CD69 als Aktivitätsmarker bestimmt. CD69 ist nur am ersten Tag der Co-Kultur positiv. Als ein früher Marker der Aktivierung wird er schon am zweiten Tag herunterreguliert (siehe Anhang). Daher sind hier die Aktivierungen der einzelnen Subpopulation am ersten Tag einer Co-Kultivierung von humanen PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen dargestellt. In Abbildung 35 ist die Aktivierung der Subpopulationen analog zu den vorherigen Abbildungen dargestellt.

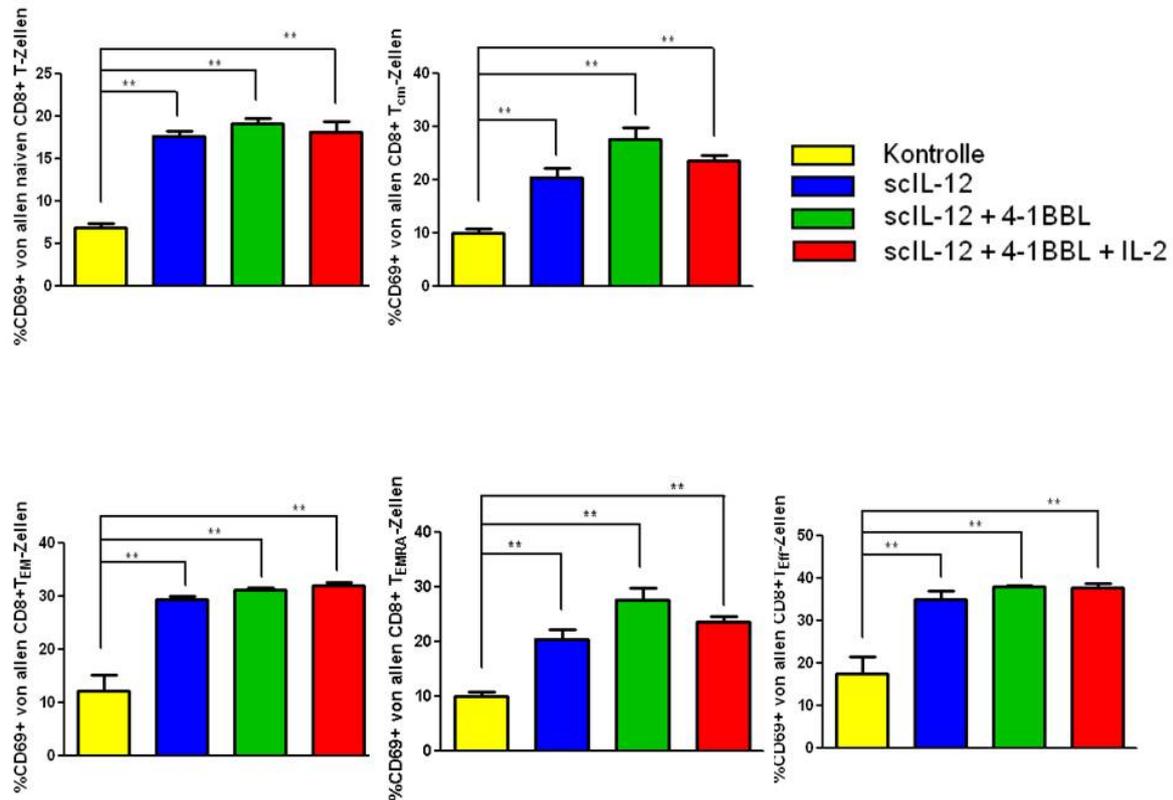


Abbildung 35: Durchflusszytometrie-Analyse der Aktivierung von humanen *memory* T-Zellsubpopulationen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD69 positiven humanen cytotoxischen T-Zellen. Links oben ist der Anteil der CD69+ naiven T-Zellen, rechts oben der CD69+ *central memory* cT-Zellen, links unten der *effector memory* cT-Zellen, unten in der Mitte der T_{EMRA} und rechts unten der *effector* cT-Zellen dargestellt. Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der CD69+ T-Zellsubpopulationen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Die Immunstimulatoren zeigten eine signifikante Erhöhung der CD69 positiven cytotoxischen T-Zellen in allen Subpopulationen. Die Resultate stammen aus einem Experimenten in dreifacher Ausführung für jede Bedingung. Ergebnisse sind dargestellt als +/- SD. *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; *one way*-ANOVA Test.

Der Anteil der aktivierten Zellen wurde in allen Subpopulationen unabhängig von der Immunstimulation signifikant gesteigert (siehe Abbildung 39). Bei den naiven cytotoxischen T-Zellen waren ohne jegliche Stimulation schon 6,75% der Zellen positiv für CD69. Dieser Anteil ließ sich mit Hilfe der Stimulatoren für scIL-12 auf 17,6%, für scIL-12+ 4-1BBL auf 19,1% und für scIL-12+4-1BBL auf 18,13% signifikant anheben. Zwischen den verschiedenen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Die *central memory* cT-Zellen zeigten einen Anteil von 9,88% ohne jeglichen Stimulator. Durch die Stimulatoren wurde der Anteil auf 20,4% durch scIL-12, auf 27,6% durch scIL-12+4-1BBL und auf 23,5% durch scIL-12+4-1BBL+IL-2 signifikant gegenüber der Kontrolle angehoben. Weiterhin war die Erhöhung des Anteils von 20,4% auf 27,6% durch die Kombination von scIL-12

mit 4-1BBL signifikant. Der Anteil der CD69 positiven Zellen ohne Stimulation lag bei den *effector memory* cT-Zellen bei 12,08%. Mit scIL-12 wurde er auf 29,4%, scIL-12+4-1BBL auf 31,2% und mit scIL-12+4-1BBL+IL-2 auf 31,8% signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Zwischen den Stimulatoren bestand kein signifikanter Unterschied. Bei den *effector* cT-Zellen wurde ein Anteil von 17,6% positiver Zellen für CD69 beobachtet. Dieser konnte mit den Stimulatoren durch scIL-12 auf 35,0%, durch scIL-12+4-1BBL auf 38,0% und durch scIL-12+4-1BBL+IL-2 auf 37,7% gegenüber der Kontrolle gesteigert. Zwischen den verschiedenen Stimulationen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Bei Betrachtung des Anteils der Subpopulationen an allen aktivierten CD8⁺ T-Zellen fällt auf, dass durch die Immunstimulation der Anteil der T_{EMRA} Zellen ansteigt (Abbildung 36). Die T_{EMRA} Zellen dominieren klar das Bild mit über 50% der aktivierten Zellen. Einen sehr geringen Anteil machen naive und *central memory* T-Zellen aus (gemeinsam weniger als 10%). *Effector* und *effector memory* T-Zellen machen jeweils 20% aus.

Alle Stimulationen erhöhen den Anteil der T_{EMRA} Zellen gegenüber der Kontrolle um ca. 10%. Interessanterweise sinkt genau um diese 10% der Anteil der T_{eff} Zellen.

CD69+ aktivierte CD8+ Subpopulationen am Tag 1

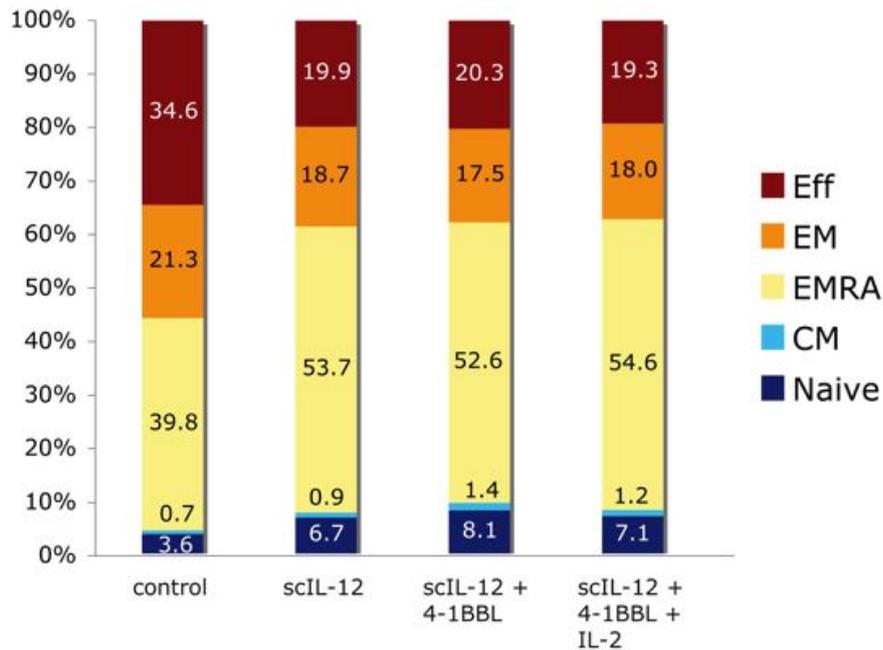


Abbildung 36: Darstellung der Anteile der aktivierten Subpopulationen an allen aktivierten cT-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der T-Zell-Subpopulationen an allen aktivierten CD8+ humanen T-Zellen für die verschiedenen Transfektionsbedingungen. Durch die Immunstimulation zeigt sich eine Vergrößerung der T_{EMRA} Population zu Lasten der T_{eff} Population. Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der CD69+ T-Zellsubpopulationen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Die Resultate stammen aus einem Experiment in dreifacher Ausführung für jede Bedingung.

Diese Steigerung der aktiven T_{EMRA} Subpopulation ist wahrscheinlich nicht auf eine Vergrößerung der Subpopulation zurückzuführen. Betrachtet man am ersten Tag den Anteil der Subpopulationen an der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen, d.h. aktive und nicht aktive, steigt der Anteil der T_{EMRA} nicht an (Abbildung 37). Vielmehr ist eine Vergrößerung des Anteils der naiven T-Zellen auf Kosten von *effector* und *effector memory* T-Zellen zu sehen. Beobachtet man die Subpopulationen über den Co-Kultur-Zeitraum von 3 Tagen, ist eine weitere Zunahme des Anteils der naiven und auch der *central memory* T-Zellen zu beobachten (Abbildung 38). Da kein Unterschied zwischen den einzelnen Stimulationen gezeigt wurde, wurden die einzelnen Bedingungen in Abbildung 38 zusammengefasst.

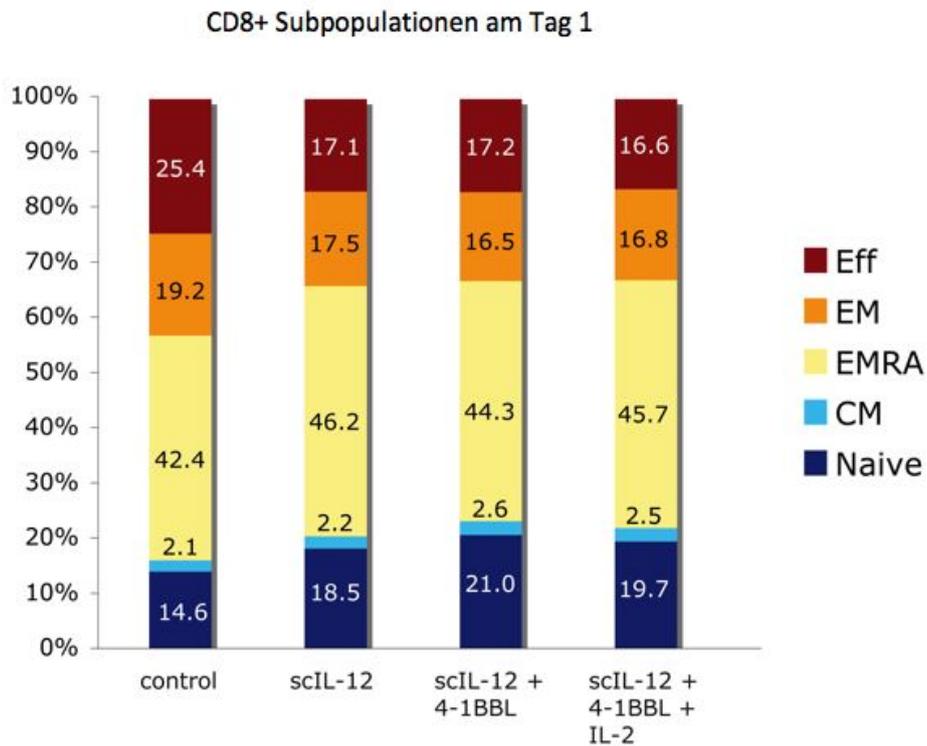


Abbildung 37: Darstellung der Anteile der Subpopulationen an allen cT-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der T-Zell-Subpopulationen an allen CD8+ humanen T-Zellen für die verschiedenen Transfektionsbedingungen. Durch die Immunstimulation zeigt sich eine Vergrößerung der naiven T-Zellen zu Lasten der T_{eff} und T_{EM} Population. Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der T-Zellsubpopulationen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Die Resultate stammen aus einem Experiment in dreifacher Ausführung für jede Bedingung.

Zeitverlauf der CD8+ Subpopulationen

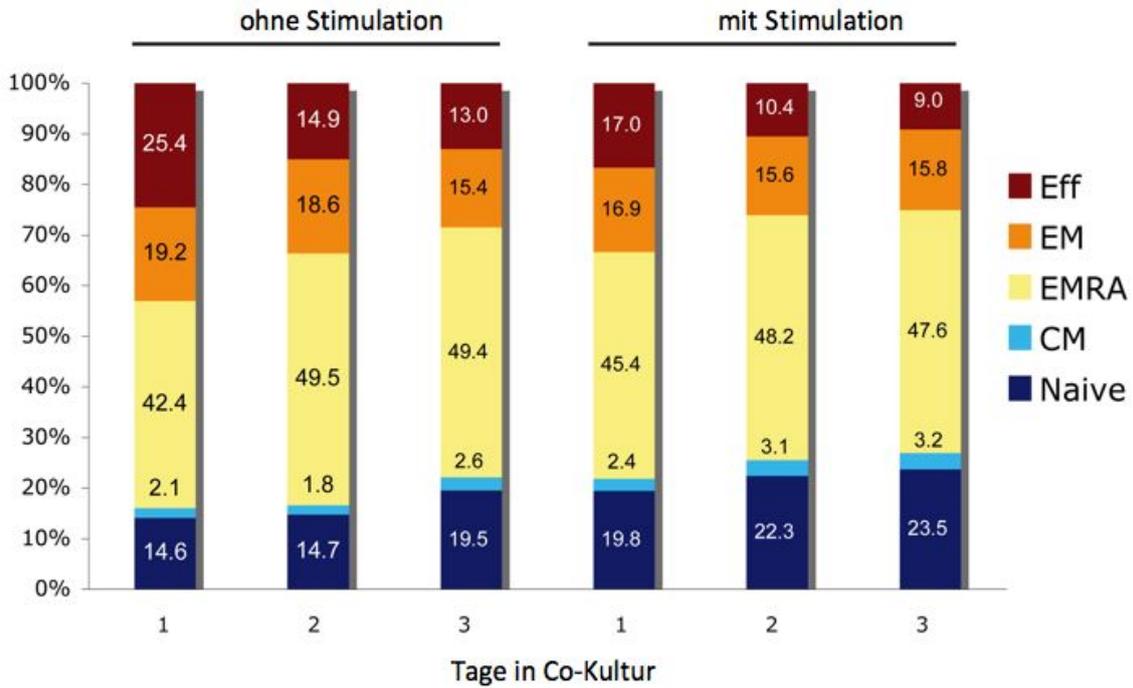


Abbildung 38: Zeitverlauf der Subpopulationen aller cT-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der T-Zell-Subpopulationen an allen CD8+ humanen T-Zellen. Die verschiedenen Stimulationen wurden hier zusammengefasst. Durch die Immunstimulation zeigt sich eine Vergrößerung der naiven und central memory T-Zellen zu Lasten der T_{eff} und T_{EM} Population. Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der T-Zellsubpopulationen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Die Resultate stammen aus einem Experiment in dreifacher Ausführung für jede Bedingung.

4.6.4. T_{H17}-Zellen gemessen durch Durchflusszytometrie

Eine Subpopulation der T-Helferzellen sind die T_{H17}-Zellen. Diese werden unter anderem durch ihre Produktion von IL-17 charakterisiert. Zwar ist die IL-17-Produktion nicht nur T_{H17}-Zellen vorbehalten, doch bevorzugt wird es in T_{H17}-Zellen exprimiert. Daher werden in dieser Arbeit die IL-17 positiven T-Helferzellen mit den T_{H17}-Zellen gleichgesetzt.

In den humanen Co-Kulturen kam es über die 3 Tage mit keiner Stimulation zu einem messbaren Anteil an IL-17+ T-Helferzellen. Es gab zu keinem Zeitpunkt und mit keiner Stimulation mehr als 0,03% IL-17+ T-Helferzellen. Es war kein Unterschied

über die Zeit oder zwischen den verschiedenen Stimulationen zu identifizieren (Daten werden nicht gezeigt).

4.6.5. Darstellung der gesamten Immunantwort mittels *Cytokine Array*

Um einen größeren Überblick über die initiierte Immunantwort zu erhalten, wurde ein *Cytokine Array* in der Co-Kultur durchgeführt. Dafür wurde das konditionierte Medium nach 3 Tagen Co-Kultur mit humanen PBMCs mittels *Cytokine Array* analysiert. Im *Cytokine Array* werden 36 Cytokine semiquantitativ in Doppelbestimmung dargestellt. Da das humane Co-Kultur-System nicht syngen war, zeigte sich durch die alleinige Co-Kultivierung der Tumorzelllinie mit humanen PBMCs erste Cytokine. Leider wurden die letzten beiden Reihen des scIL-12, 4-1BBL+IL-2 Arrays bei dem Versuch nicht ausreichend mit Medium benetzt und sind daher nicht klar auszuwerten. Aus Kostengründen konnte der Versuch nicht wiederholt werden.

Der Array zeigte eine klare Initiierung der Cytokine einer T_{H1}-Immunantwort (IFN- γ , RANTES). Es kam zu keiner Hochregulation der Cytokine der T_{H2}-Immunantwort (IL-10, IL-4). Andere antitumorale Chemokine und Cytokine, wie RANTES, IP-10, GM-CSF, welche schon im murinen *Cytokine Array* nachgewiesen wurden, konnten im humanen System bestätigt werden (Abbildung 39). Interessanterweise kommt es erst durch die Kombination von allen drei Immunstimulatoren zur Induktion von G-CSF im humanen System. Auch diese hat pro-inflammatorische und chemotaktische Funktionen, welche die antitumorale Wirkung unterstützen können.

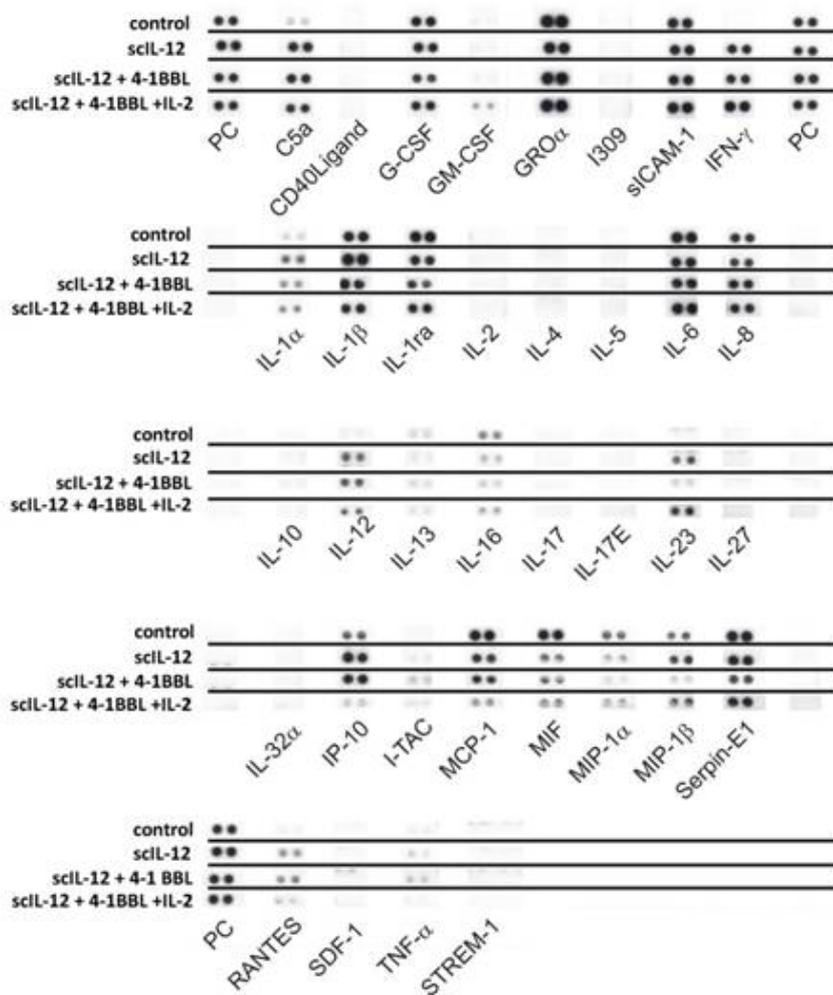


Abbildung 39: Humaner Cytokine Array der multiplen Immunstimulatoren. Der Cytokine Array zeigt die klare Induktion einer T_{H1}-Antwort, gezeigt durch die Hochregulation der T_{H1}-Cytokine. (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, G-CSF) Es wurden Huh-7 Zellen mit den verschiedenen Kombinationen von Immunstimulatoren transfiziert und mit humanen PBMCs co-kultiviert. Die konditionierten Medien wurden am dritten Tag abgenommen und mittels Cytokine Array analysiert.

5. Diskussion

5.1. Selektion der Cytokinkombinationen und Validierung im murinen System

5.1.1. Transfektion von Tumorzellen und Expression von Transgenen

Da eine virale Infektion von Tumorzellen, wie *in vivo* geplant, schlecht standardisierbar ist und der Effekt der viralen Antigene zunächst ausgeklammert werden sollte, wurde eine Plasmid-Transfektion einer Infektion vorgezogen. Als Tumormodel wurden zunächst Hepa 1-6 Zellen gewählt. Diese entstammen einem hepatozellulären Karzinom der C57/BL-6 Maus. Für die *in vitro*-Versuche wurde zunächst die Transfektionseffizienz der Zelllinie bestimmt. Hepa 1-6 Zellen zeigten eine sehr gute Transfizierbarkeit, mit einer mittleren Effizienz von ~70%.

Als einer der wichtigsten Immunstimulatoren in der Immunogenherapie hat sich IL-12 herauskristallisiert (Weiss JM et al. 2007). Auch in diesem System soll scIL-12 (siehe Einleitung) das Herzstück eines adenoviralen Vektors für die Tumorthherapie bilden. Daher wurde zunächst mit scIL-12 als alleinigem Transgen gearbeitet.

Nach der Transfektion wurde die Produktion der Transgene überprüft. Dafür wurde zunächst qualitativ die korrekte Produktion von scIL-12 mittels Western-Blot bestimmt und danach quantitativ mittels ELISA die Menge. Im Western-Blot zeigte sich eine klare Bande bei ca. 75 kDa. Es wurde im Western-Blot die sezernierte Form mit der intrazellulären Form des scIL-12 verglichen. Dabei zeigte sich bei der sezernierten Form eine Doppelbande, die wahrscheinlich auf eine posttranslationale Glykosylierung zurückzuführen ist.

Der quantitative Nachweis zeigte eine starke Produktion von IL-12, es wurden sehr hohe Konzentrationen von 3-1000 ng/ml gemessen.

5.1.2. Überprüfung der biologischen Funktion von transgenen scIL-12

Eine der Hauptwirkungen von IL-12 im Immunsystem ist die Aktivierung von NK-Zellen und des T_{H1}-Weges der adaptiven Immunantwort. Dies geschieht zu großen Teilen über IFN- γ -abhängige Wege. Daher wurde auch die biologische Aktivität vom transgenen scIL-12, durch seine Fähigkeit, murine Milzzellen zur

IFN- γ -Produktion anzuregen, überprüft. Es zeigte sich, dass murines scIL-12 keine Vorstimulation der Milzzellen durch PHA benötigte. Weiterhin waren frische Milzzellen in der Lage, konzentrationsabhängig auf scIL-12 zu reagieren. Selbst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen wurde eine Steigerung der IFN- γ -Antwort gezeigt. Dies zeigte für die zukünftigen Versuche, dass die obere Grenze für die IFN- γ -Produktion der frischen Milzzellen weit über den Konzentrationen liegt, mit denen gearbeitet wurde und damit mögliche verstärkende Effekte weiterer Immunstimulatoren durch IFN- γ -Messungen untersucht werden können.

Außerdem wurden mittels *Cytokine Array* weitere durch scIL-12-induzierte Proteine dargestellt. Die Initiierung der T_{H1}-Antwort konnte bestätigt werden. Im *Cytokine Array* zeigte sich eine Hochregulation von IFN- γ , IP-10, MIG und GM-CSF. Cytokine der T_{H2}-Antwort wie IL-10 und IL-4 wurden nicht nachgewiesen.

Das Cytokin IP-10 zeigt auch einen weiteren antitumoralen Wirkungsmechanismus von scIL-12 auf. IP-10 bewies in anderen Studien eine starke antiangiogenetische Wirkung, welche die stark von der Neovaskularisierung abhängigen Tumore hemmen und auch zerstören kann (Mei K et al. 2008).

5.1.3. Etablierung eines Co-Kultur-Modells

Da für die Initiierung einer effektiven Immunantwort gegen einen Tumor nicht nur sezernierte Stoffe verantwortlich sind, sondern auch Zell-Zell-Interaktionen, wurde ein Co-Kultur-Modell aus einer Tumorzelllinie und murinen Milzzellen bzw. humanen PBMCs etabliert. Dieses Modell ermöglicht die Untersuchung synergistischer Effekte zwischen zellgebundenen und löslichen Immunstimulatoren.

Mit diesem System wurden in dieser Arbeit die synergistischen Effekte zwischen IL-12, 4-1BBL und IL-2 untersucht. Es ermöglicht in Zukunft die Aufklärung weitere Effekte zwischen verschiedenen Immunstimulatoren und so das Design verbesserter Vektoren in der Immuntherapie von Tumoren.

5.1.4. Synergistische und additive Effekte von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 im murinen System

In den ersten klinischen Versuchen mit IL-12 (Sangro B et al. 2004) in der Immunogenherapie konnten die vielversprechenden Ergebnisse aus Tierstudien nicht wiederholt werden. Dies führte dazu, dass die ersten Gruppen Vektoren mit IL-12 und anderen Immunstimulatoren kombinierten. In der Literatur sind Tierversuche mit Kombinationen von IL-12 mit IL-2 oder 4-1BBL beschrieben (You TG et al. 2004,

Xu DP et al. 2005). In dieser Arbeit wurde die Kombination von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 beschrieben und untersucht. Noch nie wurden die Effekte der Kombination der drei Immunstimulatoren in diesem Umfang erforscht.

Es wurde zum Screening vorteilhafter Kombinationen verschiedener Immunstimulatoren in der Immunogenherapie ein Co-Kultur-Modell etabliert. Dies ermöglichte die Zell-Zell-Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen über Rezeptoren und Cytokine.

Es ermöglicht die Quantifizierung und Aufklärung, der synergistischen und additiven Effekte verschiedener Immunstimulatoren. Die Kombination von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 zeigte eine signifikant höhere IFN- γ -Produktion als scIL-12 allein über den Beobachtungszeitraum von 3 Tagen. Weitere durchflusszytometrische Analysen zeigten signifikant stärkere Aktivierung von T-Helferzellen und cytotoxischen T-Zellen, aber keine verstärkte NK-Zell-Aktivierung. Dies ist mit der verstärkten Ausbildung von 4-1BB auf den T-Zellen durch scIL-12 zu erklären, welches dann mit dem 4-1BBL auf den Tumorzellen interagieren kann, und so die Aktivierung verstärkt. Außerdem ist es über proliferationsfördernde Effekte von IL-2 zu erklären. Auf NK-Zellen scheint 4-1BBL und IL-2 keine verstärkend aktivierende Wirkung zu haben.

Dies ist ein vielversprechendes Ergebnis für einen zukünftigen Vektor in der Immunogenotherapie. Denn ein Hauptziel der Immunogenotherapie ist die Etablierung einer cytotoxischen T-Zellantwort. Diese könnte über Immungedächtnis und Antigenerkennung eine Antwort nicht nur gegen den Primärtumor, sondern auch gegen Metastasen und Residualtumore provozieren. Der fehlende Nachweis der erhöhten Aktivierung von NK-Zellen kann möglicherweise auf den späten Beobachtungszeitpunkt am dritten Tag erklärt werden. Die NK-Antwort ist Teil der angeborenen frühen, nicht-adaptiven Immunantwort. Am dritten Tag ist dessen Höhepunkt möglicherweise schon überschritten.

Die weitere Betrachtung der Immunantwort mittels *Cytokine Array* zeigte über die Kombination der Immunstimulatoren weiterhin eine T_{H1}-Immunantwort. Die Cytokine der T_{H2}-Immunantwort wie IL-10 und IL-4 sind kaum nachweisbar. Die T_{H1}-Antwort führt zu einer Aktivierung cytotoxischer T-Zellen gegen zelluläre Ziele wie z.B. Tumorzellen. Im Gegensatz dazu führt eine T_{H2}-Antwort zur Aktivierung der B-Zellen und einer Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger.

Außerdem kam es durch die Immunstimulation zur Induktion zahlreicher weiterer Cytokine und Chemokine mit antitumorale Wirkung. Einmal sind antiangiogenetische Chemokine wie IP-10 zu nennen. IP-10 führt in Kombination mit IL-12 zu einer verstärkten Tumorregression. Außerdem kommt es durch die Stimulation zur Sezernierung von zahlreichen chemotaktisch wirkend Chemokinen wie MIG (Tominaga M et al. 2007), GM-CSF, G-CSF (Uemura Y et al. 2006), RANTES (Lapteva N et al. 2009), KC (De Filippo K et al. 2008) und M-CSF. Über diese Chemokine wird eine proinflammatorische Umgebung beim Tumor geschaffen und Makrophagen, Granulozyten und T- und NK-Zellen aktiviert und angelockt.

5.1.5. Immunstimulatorische Effekte des adenoviralen Vektors

Die entwickelte Kombination von Immunstimulatoren soll zur Initiierung einer Immunantwort gegen den Tumor vom Tumor selbst exprimiert werden. Dafür wird ein Vektor benötigt, der die Gene von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 in den Tumor bringt. Verschiedene Gründe sprechen für die Verwendung eines adenoviralen Vektors. Adenoviren zeigen einmal einen Tumortropismus, es wird nur eine transiente Expression der Immunstimulatoren erreicht und die Gene der drei Immunstimulatoren lässt sich schwer in anderen Vektoren unterbringen.

Da das Immunsystem des Patienten auch auf die adenoviralen Antigene reagiert, wurden diese Mechanismen auch *in vitro* im Co-Kultur-Modell untersucht. Dabei zeigte sich eine verstärkte Aktivierung der NK-Zellen unabhängig von der Anwesenheit der verwendeten Immunstimulatoren. NK-Zellen, als Teil des angeborenen Immunsystems, reagieren auf bestimmte konservative Strukturen von Viren (Koyma S et al. 2008). Zellen des angeborenen Immunsystems reagieren z.B. auf adenovirale DNA-Strukturen (Nociari M et al. 2007).

Es zeigte sich außerdem eine Steigerung der Aktivierung von T-Helfer-Zellen unabhängig von der Anwesenheit von Immunstimulatoren, aber nur eine verstärkte Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen bei der Anwesenheit aller drei Immunstimulatoren. Da für die Initiierung einer T_{H1}-vermittelten, adaptiven, zytotoxischen T-Zell Antwort erst die T-Helfer-Zellen aktiviert werden müssen, welche dann die zytotoxischen T-Zellen aktivieren ist dies auch zu erklären. Die Anwesenheit von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 verstärkt und beschleunigt die Initiierung der Immunantwort, so dass erst durch alle drei Immunstimulatoren eine zusätzliche Aktivierung zu beobachten ist.

In der geplanten *in vivo*-Therapie soll der adenovirale Vektor direkt in den Tumor appliziert werden. Dadurch sollen zum größten Teil Tumorzellen infiziert werden und damit die Immunstimulatoren und auch die adenoviralen Antigene hauptsächlich dort wirken.

Die verstärkte Antwort des Immunsystems durch adenovirale Antigene ist zwar nicht tumorspezifisch, doch trifft sie durch die hauptsächlichliche Infektion des Tumors zum großen Teil maligne Zellen und unterstützt die Arbeit der Immunstimulatoren.

Die zusätzliche Aktivierung der Immunzellen kann über die Mechanismen und Cytokine der Immunantwort zu einer weiteren Änderung des Mikromilieus des Tumors führen und so die tumorspezifische Immunantwort fördern.

Weiter zu untersuchen ist der Effekt der Vorimmunisierung der zukünftigen Patienten durch Adenoviren. Ein Großteil der erwachsenen Deutschen besitzt bereits Antikörper gegen adenovirale Antigene. Dies könnte zu einer Abschwächung der Wirkung eines adenoviralen Vektors führen. Es könnte auch systemische Nebenwirkungen einer topischen Gabe eines adenoviralen Vektors minimieren.

5.2. Anwendung des adenoviralen Vektors *in vivo* (Tierstudie)

Zur Überprüfung der Effektivität des entwickelten Vektors wurde ein *in vivo*-Versuch in der Maus durchgeführt. Erste Versuche, Hepa 1-6 Tumorzellen orthotop in die Leber einer C56/BL6-Maus zu implantieren, schlugen fehl. Selbst größere Zellzahlen führten zu keinem Tumorwachstum. Spätere *Cytokine Array*-Untersuchungen zeigten eine Reaktion von Milzzellen auf die Anwesenheit von Hepa 1-6 Zellen. Cytokine wie IP-10 (Strieter RM et al. 1995), GM-CSF (Jean WC et al. 2004), TIMP-1 (Miyagi M et al. 2007) und KC (DeFilippo et al. K 2008) wurden hochreguliert. Bei IP-10 und GM-CSF sind antitumorale Wirkungen bekannt. Andere Gruppen, die mit Hepa 1-6 Zellen und C56/BL6-Mäusen arbeiten, implantieren die Tumorzellen subkutan (Dan Q et al. 2001), um ein Tumorwachstum zu erreichen. Da ein möglichst realitätsnahes Tumormodel untersucht werden wollte und Immunreaktionen in der Leber anders sein können als subkutan, wurde ein anderes Tumormodell bevorzugt.

Es wurde ein orthotopes, syngenes Model einer Kolonkarzinommetastase in der Leber etabliert. Dafür wurden die Tumorzelllinie CT26 und die Balb/c-Maus verwendet. $1 \cdot 10^5$ Tumorzellen wurden laparotomisch in die Leber implantiert. 9 Tage später wurde in einer zweiten OP ein adenoviralen Vektor in den Tumor injiziert. Es wurden

die Überlebensrate von einem Kontroll-Vektor kodierend für GFP mit einem Vektor kodierend für scIL-12+4-1BBL+IL-2 verglichen. In den Verum-Gruppen war das Überleben signifikant länger als in der Kontroll-Gruppe. Dies zeigt die generelle Wirksamkeit der Immunotherapie gegen Tumore.

Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten schon den Vorteil von scIL-12 allein *in vivo* (Waehler et al. 2005).

In dieser Arbeit wurde eine 55%ige Überlebensquote erreicht. In einer vergleichbaren Studie, im selben Tumormodell, erreichte man mit ähnlichen Virusdosen kodierend für IL-12 plus systemischer Gabe eines agonistischen Antikörpers für 4-1BBL 60%. In derselben Studie war bei Gabe eines Adenovirus, kodierend für IL-12 plus einer Gabe von einer 32fach höheren Virusdosis, kodierend für lösliches 4-1BBL, eine Überlebensquote von 40% zu erreichen (Xu DP et al. 2005). Die Kombination von scIL-12 mit 4-1BBL und

IL-2 zeigt nicht nur ein besseres Überleben, sondern ist auch sicherer in der Anwendung. Die Gabe von hohen Dosen eines adenoviralen Vektors kann tödliche Nebenwirkungen haben. Daher wurde in dieser Arbeit mit vergleichbar niedrigen Dosen gearbeitet. Durch die Organisation der drei Immunstimulatoren in einem Vektor kann die therapeutische Virusdosis minimiert werden. Anstelle der Gabe verschiedener Adenoviren für jeden Immunstimulator wurden in dieser Arbeit alle Immunstimulatoren in einen Virus verpackt. Daher können geringere Virusdosen appliziert werden als in vergleichbaren Arbeiten.

Außerdem kann durch die Kombination verschiedener Immunstimulatoren, die auch die Konzentration der einzelnen Immunstimulatoren kleiner gehalten werden. Gerade für IL-2 sind toxische Wirkungen in höheren Konzentrationen bekannt.

Ein weiterer Sicherheitsvorteil dieses Therapieansatzes ist die intratumorale Gabe. Die intratumorale Gabe ist Grundlage des Therapiekonzeptes. Durch die lokale Änderung des Mikromilieus des Tumors und die Expression stimulierender Rezeptoren auf den Tumorzellen wird der Tumor erkannt und zerstört. Der Virus wird nicht systemisch appliziert und wirkt auch nur lokal. Eine systemische Gabe von adenoviralen Vektoren geht mit dem stärkeren Risiko einer systemischen Reaktion, wie anaphylaktischem Schock, einher.

5.3. *In vitro*-Untersuchungen humaner Immunzellen

5.3.1. Aktivierung des Immunsystems

Die *in vitro*-Versuche im humanen System zeigten Ähnliches wie im murinen System. Die ELISA-Untersuchungen zeigten wie im murinen System eine klare Steigerung der IFN- γ -Sekretion stimuliert durch die Kombination.

Die Untersuchungen der Zellpopulationen mit dem Durchflusszytometer wurden lediglich einmal in dreifacher Ausführung für jede Bedingung durchgeführt und müssen daher, um ein genauer quantifiziertes Bild zu erhalten, wiederholt werden. NK-, und CD56+/CD3+ T-Zellen wurden stark aktiviert durch die Immunstimulatoren. Diese Zellen sind auch die stärksten Effektoren (Pan PY et al. 2004) für eine antitumorale Antwort des Immunsystems. Gerade beim stärksten Marker für Aktivität (Seder RA 2008), der doppelt positiven IFN- γ + und TNF- α + Zellen, zeigte sich der Vorteil der Kombination der drei Immunstimulatoren. Die Kombination zeigte für NK-, und für CD56+/CD3+ T-Zellen eine verstärkte Aktivierung. Dieser Synergismus wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt und gibt Hoffnung für die Wirksamkeit im Menschen *in vivo*.

Gerade CD56+/CD3+ spielen in der humanen Leber möglicherweise eine größere Rolle. Im peripheren Blut liegt ihr Anteil lediglich bei 2% der T-Zellen. Doch in der Leber sind 1/3 aller Zellen CD56+/CD3+ T-Zellen (Doherty DG et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass CD56+/CD3+ T-Zellen zytotoxische Eigenschaften von T-Zellen und NK-Zellen verbinden. Daher lässt ihre vermehrte Aktivierung durch die Kombination von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 insbesondere für intrahepatische Tumore ein starkes therapeutisches Potential annehmen. Gerade in der Krebsforschung mit autologem Immunzelltransfer haben CD56+/CD3+ T-Zellen stark an Bedeutung gewonnen. *In vitro* wird über multiple Cytokinstimulationen der Anteil der CD56+/CD3+ T-Zellen (nun *Cytokine-induced killer cells* CIK) gesteigert. Eine Retransfusion der geschaffenen CIK soll nun den Tumor zerstören. CIK-Zellen haben starke antitumorale Effekte gezeigt, bei geringen zytotoxischen Effekten gegen gesundes Gewebe (Lu PH et al. 1994). CIK-Zellen sind momentan in einer Phase 3 Studie in Erprobung.

Dieses Potential kann die entwickelte Kombination von Immunstimulatoren im Kampf gegen Tumore möglicherweise nutzen und verstärken. Neuste Forschungsergebnisse weisen auf einen Zusammenhang der CIK-Zellen und der

T_{EMRA} Zellen hin (Franceschetii M et al. 2009), deren verstärkte Aktivierung durch die Immunstimulation in 5.3.2 diskutiert wird.

Die humanen *in vitro*-Versuche haben einen noch zu diskutierenden Unterschied zu den murinen Versuchen. Die verwendete humane Tumorzelllinie ist verständlicherweise nicht syngon zu den PBMCs der Spender. Dies bringt fremde Antigene in den Versuch, die im murinen Modell nicht vorhanden waren. Wahrscheinlich hebt dies das Grundniveau der Aktivierung im Sinne einer Vorstimulation an, aber der große Teil der Aktivierung wird durch die Immunstimulation erreicht. Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden außerdem die PBMCs mehrerer Spender in einem Versuch zusammengefasst. Dies ermöglicht es zwar, eine bessere Aussage über die Durchschnittsbevölkerung zu machen, bringt aber erneut das Problem der zusätzlichen fremden Antigene. Auch in diesem Fall ist die Erhöhung des Grundniveaus wahrscheinlich. Doch das Aktivierungsmuster entsteht auf Basis dieser Grundstimulation durch die Immunstimulatoren und ist genauso ablesbar wie im murinen System.

5.3.2. Bedeutung der T-Zellsubpopulationen

Gerade in der Tumorstudienforschung und adoptiven T-Zell-Transfusion wird stark auf die verschiedenen Subpopulationen der cytotoxischen T-Zellen eingegangen. Bei der adoptiven T-Zell-Transfusionstherapie wird versucht, körpereigene T-Zellen *ex vivo* tumorspezifisch zu aktivieren und zu expandieren. Diese T-Zellen werden dann in den Patienten retransfundiert und sollen zur Tumorregression führen. Doch trotz der Generierung von tumorreaktiven CD8⁺ T-Zellen hat sich kein klinischer Erfolg eingestellt (Rosenberg SA et al. 2005).

Es scheint auf die Aktivierung der richtigen Subpopulation der cytotoxischen T-Zellen anzukommen. Doch die Diskussion, wie man diese Subpopulationen definiert und welche dann die effektivste für eine antitumorale Antwort ist, ist noch nicht abgeschlossen. In dieser Arbeit wurden die Subpopulation mit Hilfe der Durchflusszytometrie unterteilt (Klebanoff CA et al. 2006), im Gegensatz zur funktionellen Unterteilung (Badovinac VP et al. 2006).

Die *effector* cT-Zellen scheinen nur für eine kurzfristige Tumorantwort verantwortlich zu sein. Doch ob nun *effector memory* oder *central memory* cT-Zellen das richtige Ziel einer Immuntherapie sind, ist umstritten. Die Rolle der T_{EMRA} ist weiterhin ungeklärt. Um auszuschließen, dass die Stimulation nur eine Subpopulation und

möglicherweise die falsche betrifft, wurde die Aktivierung der einzelnen Subpopulationen erfasst. In allen Subpopulationen wurde die Aktivierung 2 bis 3fach gesteigert. Einen Vorteil in der Kombination der Stimulatoren konnte nicht gezeigt werden.

Selbstverständlich besteht bei dem Ansatz der Gentherapie dieser Arbeit mit *in vivo*-Aktivierung zu der *ex vivo*-Aktivierung der T-Zell-Transfusion der Unterschied der Antigenpezifität. Die Tumorspezifität der Immunzellen wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Doch zeigen andere Studien, dass in Tumorpatienten schon tumorspezifische T-Zellen vorhanden sein können (Lee PP et al. 1999). Durch Abwehrmechanismen des Tumors fallen diese wahrscheinlich in Anergie. Diese Zellen können möglicherweise durch einen Vektor mit Immunstimulatoren wieder aktiviert werden.

Bei der Betrachtung der aktivierten T-Zellen fällt auf, dass durch die Immunstimulation der Anteil der T_{EMRA} Zellen ansteigt. Um den gleichen Prozentsatz sinkt der Anteil der T_{eff} Zellen. T_{EMRA} Zellen sind ausdifferenzierte Effektor-Zellen, deren Aktivierung eine wichtige Rolle bei der sofortigen Abwehr des Tumors spielen kann. Interessanterweise gibt es neue Hinweise, dass T_{EMRA} Zellen mit $CD56+/CD3+$ Zellen identisch sind (Franceschetti M et al. 2009). Diese Zellpopulation ist bekannt für eine starke zytotoxische Aktivität, welche die Eigenschaften von NK- und cT-Zellen vereinigt.

Durch die Stimulation vergrößert sich auch der Anteil der *central memory* und naiven T-Zellen. Diese Subpopulation ist für ein großes proliferatives Potential bekannt.

Ob es nun durch die Stimulation zu einer Proliferation, zu einer Änderung der Oberflächenmarker oder zu einem besseren Überleben der Zellen kommt, soll in kommenden Experimenten geklärt werden. Eine verstärkte Bildung von *central memory* Zellen, als frühe T-Zellen, könnte eine wichtige Rolle bei der Bildung einer langfristigen T-Zellantwort gegen den Tumor spielen. Beim Vergleich der Transfektionen mit einem Normalkollektiv kommt es auch zu einer Vergrößerung der T_{EMRA} -Population, diesmal zu Lasten von *central memory* und naiven T-Zellen. Möglicherweise kommt es hier durch die Anwesenheit der Antigene zu einer Änderung der Identität.

Trotz der starken Aktivierung des Immunsystems kommt es nicht zur Generierung von T_{H17} -Zellen. Die T_{H17} -Zellen sind neben T_{H1} - und T_{H2} -Zellen die dritte Untergruppe der Effektor-T-Helferzellen. Die Rolle der T_{H17} -Zellen bei der

Infektabwehr ist zwar noch nicht endgültig geklärt, doch wird ihnen eine wichtige Rolle in Autoimmunerkrankungen zugeschrieben. Ein Zusammenhang zwischen T_{H17} -Zellen und Krankheiten des rheumatischen Formenkreis wird z.B. bei Psoriasis, rheumatoider Arthritis, systemischer Sklerose und Lupus erythematosus angenommen (Tesmer LA 2008). T_{H17} -Zellen scheinen eine reziprokes Verhalten zu T_{reg} -Zellen zu haben (Mucida D et al. 2007). Eine Hochregulation der T_{H17} -Zellen mit einer Herunterregulation der T_{reg} -Zellen wurde in verschiedenen Autoimmunerkrankungen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde aber auch das vermehrte Auftreten von T_{H17} -Zellen bei verschiedenen malignen Erkrankungen beobachtet (Kryczek I et al. 2007). T_{H17} -Zellen scheinen generell eine stark inflammatorische Wirkung zu haben. Bei Autoimmunkrankheiten bewirkt dies eine Reaktion des eigenen Immunsystems gegen Körper eigene Strukturen. Einige Tumore scheinen sich die angiogenetischen Effekte der Inflammation zu nutze zu machen, um so ihr Wachstum zu unterstützen (Kato T et al. 2001). Durch diesen Gegensatz der starken inflammatorischen und immunstimulatorischen Wirkung, die in unserem Therapie Ansatz gewünscht ist, und der Tumorwachstum unterstützenden Wirkung, ist die nicht-Bildung von T_{H17} -Zellen nicht abschließend zu bewerten. Erst ein besseres Verständnis der T_{H17} -Zellen oder erste klinische Studien werden zeigen, ob eine starke Induktion von T_{H17} -Zellen von Vorteil bei Tumorthherapie ist oder nicht.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Kombinationsstrategien zur immunterapeutischen Tumorthherapie. Es wurde ein Co-Kultur-Modell von Immunzellen und Tumorzellen als Screeningmethode für Immunstimulatoren entwickelt. In diesem Modell wurden im murinen und im humanen System die Vorteile der Kombination von IL-12 mit 4-1BBL und IL-2 untersucht.

Das murine und humane Modell wurde durch die Kombination mehrerer Untersuchungsmethoden evaluiert. Dabei wurden Untersuchungen wie Cytokin-ELISA (INF- γ und IL-12), *Cytokine Array* (>20 Cytokine) und eine Vielfarb-Durchflusszytometrie (FACS) eingesetzt, um die optimale Kombination für die antineoplastische Wirkung zu testen. Systeme dieser Art erfüllen die neuen Bestimmungen der europäischen Richtlinie (EMEA/125459/2006, Version 2008) von neuartigen Therapieverfahren zur Krebsbehandlung mittels Gentransfer.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen den synergistischen Effekt von *single-chain* Interleukin-12 mit dem T-Zell-Costimulator 4-1BBL und dem Interleukin-2. Sowohl die Expression von INF- γ , als auch weitere klassische T_{H1} wirkenden Cytokinen (z.B. IP-10) konnte durch die Kombination induziert werden. Als nächstes stand die Ermittlung der zellspezifischen Aktivierung im Vordergrund, welche mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde. Dabei wurde nicht nur die Aktivierung von NK-, T-Helfer- und cytotoxischer T-Zellen, sondern im Menschen auch die Aktivierung verschiedener Subpopulationen wie *effector memory*, *central memory*, *effector*, *effector memory RA+* und naiven T-Zellen und T_{H17}-Zellen untersucht. Die Kombination zeigt eine aktivierende Wirkung auf alle T-Zellsubpopulationen, ohne autoimmune T_{H17}-Zellen zu erzeugen. Es kommt insbesondere zu einer verstärkten Aktivierung von ausdifferenzierten Effektorzellen (T_{EMRA}) und zu vermehrter Bildung von frühen *memory* Zellen (*central memory*).

Im *in vivo*-Modell der Maus konnte durch einen adenoviralen Vektor, kodierend für scIL-12, 4-1BBL und IL-2, die Überlebensrate in einem hochgradig letal verlaufenden intrahepatischen Kolonkarzinommodell signifikant gesteigert werden.

Ein schneller Transfer der Erkenntnisse in klinische Studien ist wünschenswert. Diese Arbeit zeigt das hohe Potential der Kombination von scIL-12, 4-1BBL und IL-2 in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

7. Anhang

7.1. Abbildungen

-Humane NK-Zellen

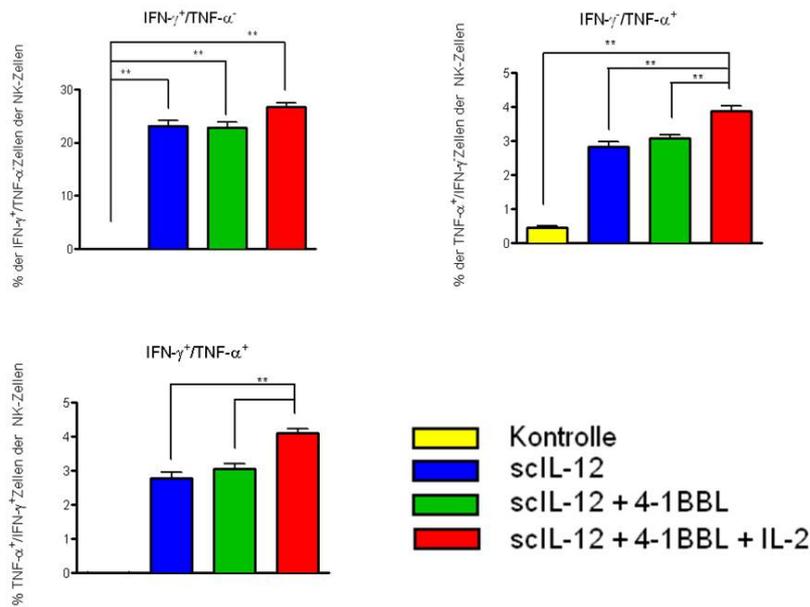


Abbildung 40: Durchflusszytometrie-Analyse von humanen NK-Zellen in der Co-Kultur. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der intrazellulär IFN- γ und/oder TNF- α positiven humanen NK-Zellen. Links oben IFN- γ^+ /TNF- α^- , rechts oben TNF- α^+ /IFN- γ^- und unten links doppelt positive IFN- γ^+ /TNF- α^+ . Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen für 3 Tage co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der intrazellulär IFN- γ und/oder TNF- α positiven Zellen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Für IFN- γ wurden die Ergebnisse von Tag 1 dargestellt für TNF- α und TNF- α /IFN- γ die Ergebnisse von Tag 2. Die Immunstimulatoren zeigten eine signifikante Erhöhung der IFN- γ^+ , der TNF- α^+ als auch der doppelt positiven NK-Zellen. Die Kombination von sclL-12 mit 4-1BBL und IL-2 zeigt eine signifikante Erhöhung des Anteils der TNF- α^+ als auch der doppelt positiven NK-Zellen in Bezug auf nur mit sclL-12 oder sclL-12+4-1BBL transfizierten Co-Kulturen. Die Resultate stammen aus einem Experimente in dreifacher Durchführung für jede Bedingung. Ergebnisse sind dargestellt als +/- SD. *P \leq 0,05; **P \leq 0,01; one way-ANOVA Test

-Humane CD56+/CD3+T-Zellen

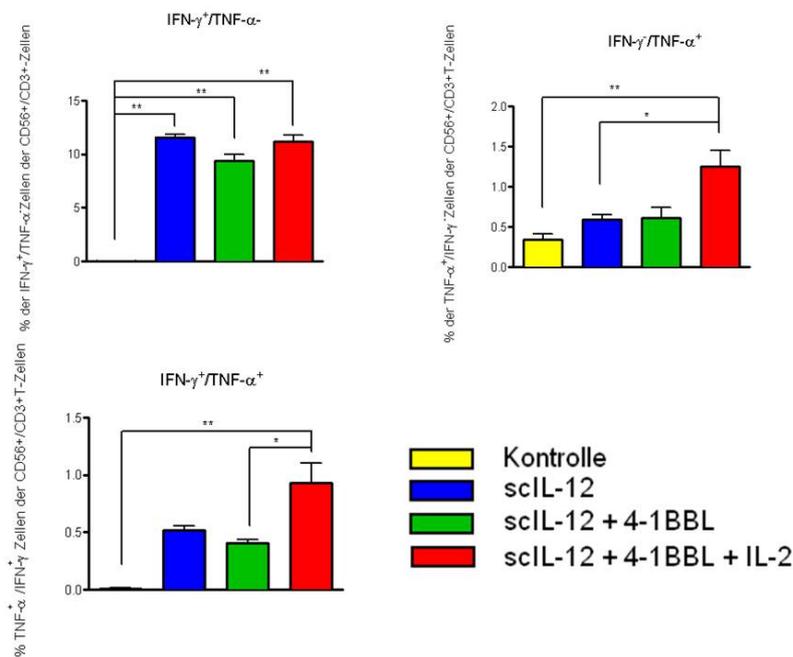


Abbildung 41: Durchflusszytometrische Analyse von humanen CD56+/CD3+ T-Zellen in der Co-Kultur. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der intrazellulär IFN- γ und/oder TNF- α positiven humanen CD56+ cytotoxische T-Zellen. Links oben IFN- γ ⁺/TNF- α ⁻, rechts oben TNF- α ⁺/IFN- γ ⁻ und unten links doppelt positive IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺. Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen für 3 Tage co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der intrazellulär INF- γ und/oder TNF- α positiven Zellen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Für IFN- γ wurde die Ergebnisse von Tag 1 dargestellt für TNF- α und TNF- α /IFN- γ die Ergebnisse von Tag 2. Die Immunstimulatoren zeigten eine signifikante Erhöhung der IFN- γ ⁺ positiven CD56+/CD3+ T-Zellen. Die Kombination von sclL-12 mit 4-1BBL und IL-2 zeigt eine signifikante Erhöhung des Anteils der TNF- α ⁺ CD56+/CD3+ T-Zellen in Bezug auf nur mit sclL-12, und eine signifikante Erhöhung der doppelt positiven CD56+/CD3+ T-Zellen gegenüber sclL-12+4-1BBL transfizierten Co-Kulturen. Die Resultate stammen aus einem Experimenten in dreifacher Durchführung für jede Bedingung. Ergebnisse sind dargestellt als +/- SD. *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; one way-ANOVA Test

-Humane T-Helferzellen

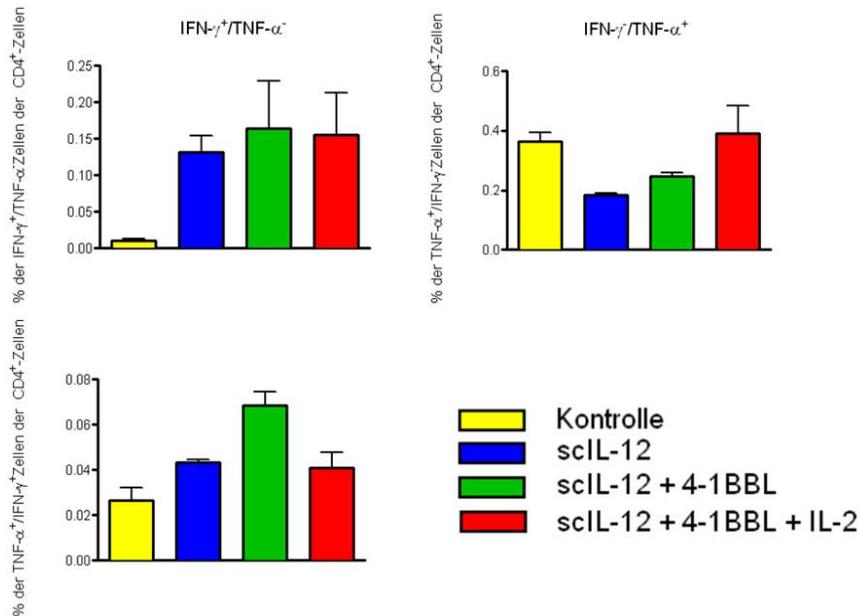


Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse von humanen T-Helferzellen in der Co-Kultur. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der intrazellulär IFN- γ und/oder TNF- α positiven humanen T-Helferzellen. Links oben IFN- γ^+ /TNF- α^- , rechts oben TNF- α^+ /IFN- γ^- und unten links doppelpositive IFN- γ^+ /TNF- α^+ . Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen für 3 Tage co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der intrazellulär IFN- γ und/oder TNF- α positiven Zellen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18-transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Für IFN- γ wurde die Ergebnisse von Tag 1 dargestellt für TNF- α und TNF- α /IFN- γ die Ergebnisse von Tag 2. Die Immunstimulatoren zeigten eine Erhöhung der IFN- γ positiven T-Helferzellen. Die Kombination von sclL-12 mit 4-1BBL und IL-2 zeigt eine Erhöhung des Anteils doppel positiven T-Helferzellen auf sclL-12+4-1BBL- oder sclL-12-transfizierten Co-Kulturen bezogen. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Transfektionen sind jedoch nicht signifikant. Die Resultate stammen aus einem Experimenten mit dreifacher Durchführung für jede Bedingung. Ergebnisse sind dargestellt als +/- SD.

-Humane cytotoxische T-Zellen

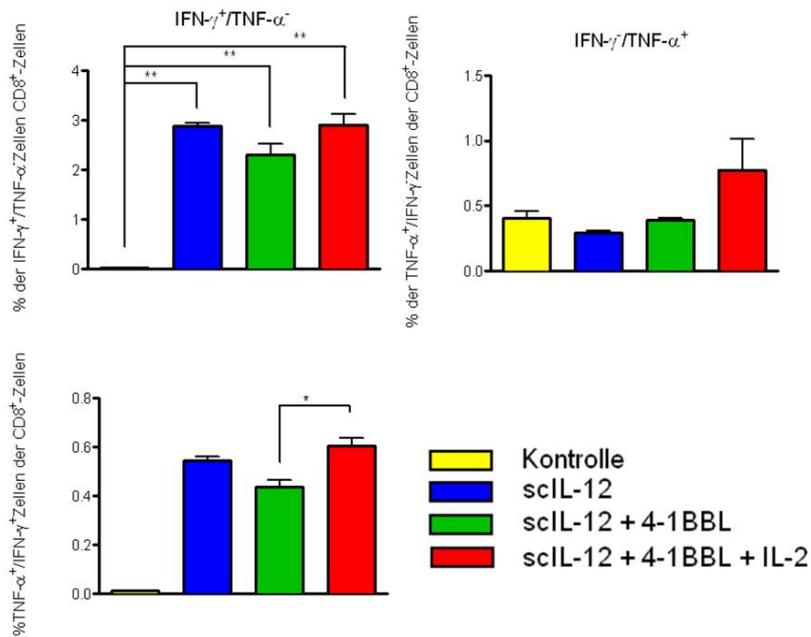


Abbildung 43: Durchflusszytometrieanalyse von humanen cytotoxische T-Zellen in der Co-Kultur. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der intrazellulär IFN- γ und/oder TNF- α positiven humanen cytotoxischer T-Zellen. Links oben IFN- γ^+ /TNF- α^- , rechts oben TNF- α^+ /IFN- γ^- und unten links doppelpositive IFN- γ^+ /TNF- α^+ . Es wurden humane PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen für 3 Tage co-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Anteil der intrazellulär IFN- γ und/oder TNF- α positiven Zellen bestimmt. Als Kontrolle diente eine Co-Kultur von pUC18 transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs. Für IFN- γ wurde die Ergebnisse von Tag 1 dargestellt für TNF- α und TNF- α /IFN- γ die Ergebnisse von Tag 2. Die Immunstimulatoren zeigten eine signifikante Erhöhung der IFN- γ^+ positiven cytotoxischen T-Zellen. Die Kombination von scIL-12 mit 4-1BBL und IL-2 zeigte eine signifikante Erhöhung des Anteils der doppel positiven cytotoxischen T-Zellen auf scIL-12+4-1BBL-transfizierten Co-Kulturen bezogen. Die Resultate stammen aus einem Experimenten mit in dreifacher Ausführung für jede Bedingung. Ergebnisse sind dargestellt als +/- SD. *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; one way-ANOVA Test

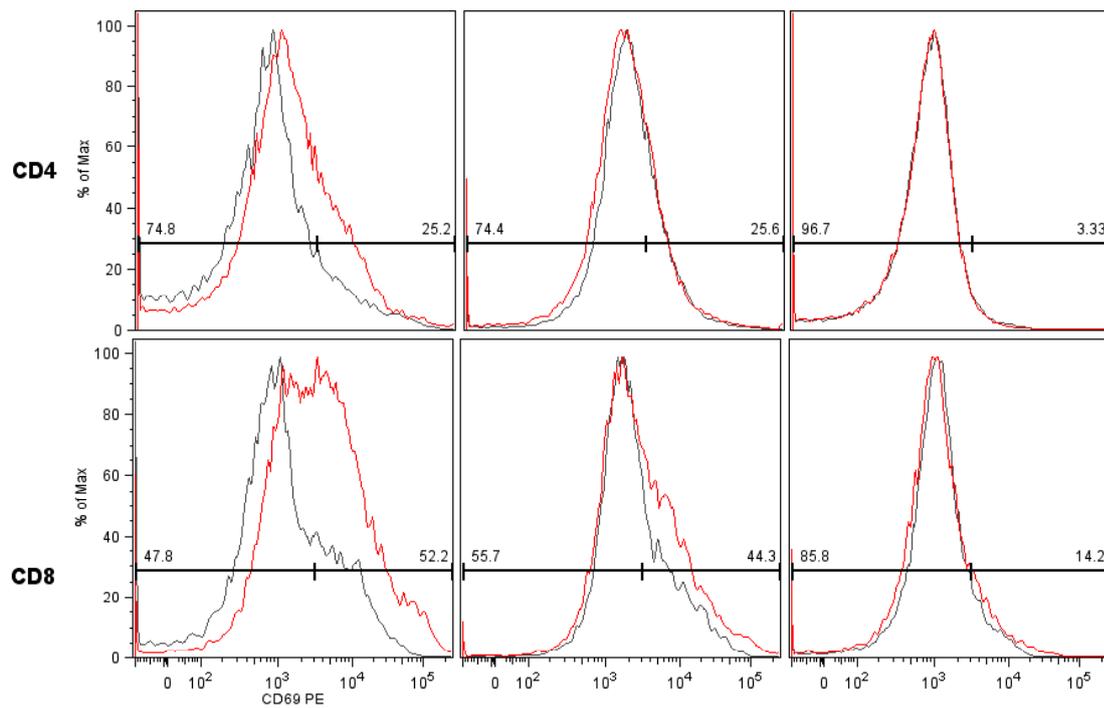


Abbildung 44: Darstellung des CD69 PE Signals in der Durchflusszytometrie über die Zeit. In rot ist das Signal stimulierter Zellen, in schwarz das Signal unstimulierter Zellen dargestellt. Von links nach rechts sind die Tage 1-3 einer Co-Kultivierung dargestellt. Der am Tag 1 noch deutlich hochregulierte CD69 Marker ist am Tag 2 schon bei CD4 Zellen (oben) vollständig, bei CD8+ fast vollständig wieder runterreguliert. Dies zeigt, dass die Verwendung von CD69 als Aktivitätsmarker nur am Tag 1 Sinn macht. CD69 wird als früher Aktivitätsmarker schon nach 24h herunterreguliert.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenoviral
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
CD	cluster of differentiation
cT	zytotoxische T-Zelle
D	Tag
DC	Dendritische Zelle
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagels's Medium
DPBS	Diphosphat gepufferte Salzlösung
ECL	Enhanced chemiluminescence luminol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescence protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
G	Gramm
G-CSF	Granulocyten Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Monozyten stimulierender Faktor
GDEPT	Gene-directed enzyme/pro-drug therapy
H	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	Interferon

IL	Interleukin
IP-10	Interferon induziertes Protein 10
IRES	Internal ribosom entry side
KC	Keratinocyte derived chemokine
Mak	Makrophagen
MHC	Major histon complex
MIG	Monokine-induced by Interferon- γ
MOI	multiplicity of infection
NC	Nitrocellulose
NK	Natürliche Killerzellen
PAH	Aminohippursäure
PBMC	Periphere Blumonozyten
PFA	Paraformaldehyd
pUC	Künstliches bakterielles Plasmid mit Ampicillin-
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial institute Medium
sc	singel chain
SD	Standartabweichung
SDS	Natriumdecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Seitwärtstreulicht
T_{cm}	<i>central memory</i> T-Zelle
T_{eff}	effector T-Zelle
T_{em}	<i>effector memory</i> T-Zelle
T_h	T-Helferzelle
TACE	transarterielle Embolisation
TAP	Transporter associated with antigen processing
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIMP-1	metallopeptidase inhibitor 1
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor

7.3. Abbildungsverzeichnis

		Seite:
Abbildung 1:	Indikationen für klinische Versuche der Genterapie bis 2008	7
Abbildung 2:	Schematische Einteilung der T-Zellsubpopulationen	10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der antitumoralen Wirkung von IL-12	14
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Wirkung von IL-2 mit IL-12	15
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der IL-12 mit 4-1BBL Synergie	17
Abbildung 6:	Schema des Co-Kultur-Modells	21
Abbildung 7:	Aufbau der Gene im Adenovirus	39
Abbildung 8-15:	Operationsverlauf in Bildern	40-41
Abbildung 16:	Plasmidkarte murines scIL-12	44
Abbildung 17:	Plasmidkarte murines scIL-12+4-1BBL	44
Abbildung 18:	Plasmidkarte murines scIL-12+4-1BBL+IL-2	44
Abbildung 19:	Plasmidkarte humanes scIL-12	45
Abbildung 20:	Plasmidkarte humanes scIL-12+4-1BBL	45
Abbildung 21:	Plasmidkarte humanes scIL-12+4-1BBL+IL-2	45
Abbildung 22:	Transfektionskontrolle von Hepa 1-6 mit Durchflusszytometrie	47
Abbildung 23:	Nachweis von scIL-12 im Western-Blot	48
Abbildung 24:	Milzzellstimulation mit und ohne PAH	49
Abbildung 25:	Milzzellstimulation mit verschiedenen Konzentrationen scIL-12	50
Abbildung 26:	<i>Cytokine Array</i> von scIL-12-stimulierten murinen Milzzellen	51

Abbildung 27:	IFN- γ -Sekretion in der murinen Co-Kultur induziert durch Kombination von Immunstimulatoren	52
Abbildung 28:	Durchflusszytometrische Analyse der Zellaktivierung im murinen Co-Kultur-Modell	54
Abbildung 29:	<i>Cytokine Array</i> der multiplen Immunstimulatoren in der murinen Co-Kultur	56
Abbildung 30:	Relative Erhöhung der IFN- γ positiven Zellen durch adenovirale Antigene	58
Abbildung 31:	<i>Cytokine Array</i> der Immunantwort auf Hepa 1-6 Tumorzellen	59
Abbildung 32:	Überlebenskurve bei Behandlung intrahepatischer Tumore mit immunstimulatorischer Gentherapie	60
Abbildung 33:	Zeitverlauf der IFN- γ -Sekretion von humanen PBMCs in der Co-Kultur	62
Abbildung 34:	Durchflusszytometrie-Analyse der Zellaktivierung im humanen Co-Kultur-Modell	63
Abbildung 35:	Durchflusszytometrie-Analyse der Aktivierung von humanen memory T-Zellsubpopulationen	65
Abbildung 36:	Darstellung der Anteile der aktivierten Subpopulationen an allen aktivierten cT-Zellen	67
Abbildung 37:	Darstellung der Anteile der Subpopulationen an allen cT-Zellen	68
Abbildung 38:	Zeitverlauf der Subpopulationen von allen T-Zellen	69
Abbildung 39:	Humaner <i>Cytokine Array</i> der multiplen Immunstimulatoren	71

Abbildung 40:	Durchflusszytometrie Analyse von humanen NK-Zellen in der Co-Kultur	84
Abbildung 41:	Durchflusszytometrie-Analyse von humanen CD56+/CD3+ T-Zellen in der Co-Kultur	85
Abbildung 42:	Durchflusszytometrische Analyse von humanen T-Helferzellen in der Co-Kultur	86
Abbildung 43:	Durchflusszytometrische Analyse von humanen cytotoxischen T-Zellen in der Co-Kultur	87
Abbildung 44:	Darstellung des CD69 PE Signals in der Durchflusszytometrie über die Zeit	88

7.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der Immunoblot-Gele	25
------------	-------------------------------------	----

8. Literaturverzeichnis

Algarra I, Callado A, Garrido F (1997) Altered MHC 1 antigens in tumors, *Int J Clin Lab Res* 27: 95-102.

Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA (1995) Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of JAK-2 and TYK-2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12, *J Exp Med* 181: 399-404.

Badovinac VP, Harty JT (2006) Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory, *Immunol Rev* 211: 67-80.

Betelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK (2008) Induction and effector functions of T_{H17} cells, *Nature* 453:1051-1057.

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R(2004) Primary liver cancer: worldwide incidence and trends, *Gastroenterology* 127: 218-224.

Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH (2001) 4-1BB ligand cell division, sustain survival, and enhances effector function of CD4 and CD8+ T-cells with similar efficacy, *J Immunol* 190: 167-172.

Carr BI (2004) Hepatocellular carcinoma: current management and future trends, *Gastroenterology* 127: 218-224.

Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G (1991) Induction of interferon- γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of responder cells and synergy with other inducers, *J Exp Med* 173: 869-879.

Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Hellström I, Hellström KE (1994) Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity, *J Exp Med* 179:523-533

Colombo MP, Tricheri G (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy, *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 155-168.

Curtisinger JM, Lins DC, Mescher MF (2003) Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8+ T cells: dissociating proliferation and development of effector functions, *J Exp Med* 197: 1141-1151.

Dan Q, Sanchez R, Delgado C, Wepsic HT, Morgan K, Chen Y, Jeffes EW, Lowell CA, Morgan TR, Jadus MR (2001) Non-immunogenic murine hepatocellular carcinoma Hepa 1-6 cells expressing the membrane from Macrophage colony stimulating factor rare requested *in vivo* and lead to CD8⁺ T-cell immunity against the parental tumor, *Mol Ther* 4(5): 427-437.

DeBlaker-Hohe DF, Yamauchi A, Yu CR, Horvath-Arcidiacono JA, Bloom ET (1995) IL-12 synergizes with IL-2 to induce lympholine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK-cells, *Cell Immunol* 165: 33-43.

DeFilippo K, Henderon RB, Laschinger M, Hogg N (2008) Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct signaling pathway, *J Immunol* 180: 4308-4315.

Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, Mongini PK, Chizzonite R, Gately MK (1992) IL-12 receptor, 2, Distribution and regulation of receptor expression, *J Immunol* 148: 3125-3132.

De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function, *Eur J Immunol* 27: 1229-1235.

Dias S, Boyed R, Balkwill F (1998) Il-12 regulates VEGF and MMPs in murine breast cancer model, *Int J Cancer* 78: 361-365.

Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farely C (1999) The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells and CD3⁺CD56⁺ natural T cells with distinct cytotoxic activities and T_{H1}, T_{H2} and Th₀ cytokine secretion patterns, *J Immunol* 163: 2314-2321.

Edelstein ML, Abdie MR, Wixon J, Edelstein RM (2004) Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 an overview *J Gen Med* 6: 567-602.

Fang B, Roth JA (2003) Tumor-suppressing gene therapy, *Cancer Biol Ther* 2:115-221

Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, Vago L, Fleischhauer K, Golay J, Introna M (2009) Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8⁺ cytotoxic T-EMRA lymphocytes *Exp Hematology* 37: 616-628.

Futagawa T, Akiba H, Kodama T, Takeda K, Hosoda Y, Yagita H, Okumura K (2002) Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells, *Int Immunol* 14: 275-286.

Garber K (2006) China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment, *J Natl Cancer Inst* 98: 298-300.

Gately MK, Wilson DE, Wong HL (1986) Synergy between recombinant interleukin 2 (rIL-2) and IL 2-depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human catolytic T lymphocytes responses *in vitro*, *J Immunol* 36:1274-1278.

Geginat J, Lanzavecchia and Sallusto F (2003) Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 101: 4260-4266.

Gerolami R, Uch R, Brechot C, Manoni P, Bagnis C (2003) Gene therapy of hepatocarcinoma: a long way from concept to the therapeutical impact, *Cancer Gene Therapy* 10: 649-660.

Giuntoli RL, Lu J, Kobayashi H, Kennedy R, Cellis E Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potential their proliferation, survival, and effector function, *Clin Cancer Res* 8: 922-931.

Halaschek-Wiener J, Wachek V, Kloog Y, Jansen B (2004) Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and downregulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells, *Cell Signal* 16: 1319-1327.

Jean WC, Spellman SR, Wallenfriedman MA, flores CT, Kurtz BP, Hall WA, Low WC (2004) Effects of combined granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-2 and interleukin-12 based immunotherapy against intracrainial glioma in rat, *J Neurooncol* 66: 39-49.

Kato T, Furumoto H, Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, Kamada M, Aono T (2001) Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer, *Biochem Biophys Res commun* 282:735-738.

Khong HT, Restifo NP (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of „tumor escape“ phenotypes, *Nature Imm* 3: 999-1005.

Klebanoff C, Gattinoni L, Restifo N (2006) CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy, *Immunological Rev* 211: 214-224.

Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S(2008) Innate immune response to viral infections, *Cytokine* 43: 336-341.

Kudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nat Rev Cancer* 1: 157-162

Kwon B, Moon Ch, Kang S et al. (2000) 4-1BB: still in the midst of darkness, *Mol Cells* 10: 119-126.

Kryczek I, Wie S, Zou L, Altuwarijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W(2007) Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and regulation by IL-2 in the tumor microenvironment, *J Immunol* 178:6730-3.

Lapteva N, Aldrich M, Weksberg D, Rollins L, Goltsova T, Chen SY, Huang XF (2009) Targeting the intratumoral dendritic cells by the oncolytic adenoviral vaccine expressing RANTES elicits potent antitumor immunity, *J Immunother* 32: 145-156.

Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM (1999) Characterisation of circulating T cells specific for tumor associated antigens in melanoma patients, *Nature Medicine* 6: 677-685.

Li D, Shugert E, Guo M, Bishop JS, O'Malley BW Jr (2001) Combination nonviral interleukin 2 and interleukin 12 gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(11): 1319-1324.

Liang ZH, Wu PH, Li L, Xue G, Zeng YX, Huang WL (2004) Inhibition of tumor growth in xenografted nude mice with adenoviral-mediated endostatin gene comparison with recombinant endostatin protein, *Chin Med J* 117: 1809-1814.

Llovet JM, Burroughs A, Briux J (2003) Hepatocellular carcinoma, *Lancet* 362: 1907-1917.

Lu PH, Negri RS (1994) A novel population of expanded human CD3+/CD56+ cells derived from T cells with potent *in vivo* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 153: 1687-1696.

Martinet O, Divino CM, Zang Y, Gan Y, Mandeli J, Thung S, Pan PY, Chen SH (2002) T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1 BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicates liver metastases of breast cancer, *Gene Therapy* 9: 786-792.

Mei K, Wang L, Tian L, Yu J, Zhang Z, Wei Y (2008) Antitumor efficacy of combination of interferon-gamma inducible protein 10 gene with gemcitabine, a study in murine model, *J Exp Clin Res* 5: 27-63.

Melero I, Jahnston JV, Shufford WW, Mittler RS, Chen L (1998) NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti 4-1BB monoclonal antibodies, *Cell Immunol* 190: 167-172.

Mi J, Sarraf-Yazadi S, Zhang X, Cao Y, Dewhirst MW, Kontos CD, Li CY, Clary BM (2006) A comparison of antiangiogenic therapies for prevention of liver metastases, *J Surg Res* 131: 97-104.

Miyagi M, Aoyagi K, Kato S, Shirouzu K (2007) The TIMP-1 gene transferred through adenovirus mediation shows a suppressive effect on peritoneal metastases from gastric cancer, *Int J Clin Oncol* 12(1): 17-24.

Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H (2007) Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid, *Science* 317: 256-260.

Nagao M, Nakajima Y, Hisanaga M, Kayagaki N, Kanehiro H, Aomatsu Y, Ko S, Yagita H, Yamada T, Okumura K, Nakano H (1999) The alteration of Fas Receptor and Ligand system in hepatocellular carcinomas: How do hepatoma cells escape from host immune surveillance *in vivo*?, *Hepatology* 30: 413-421.

Nociari M, Ocheretina O, Schoggins JW, Falck-Pedersen E (2007) Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of interferon regulatory factor 3 master regulator, *J Virol* 81: 4145-57.

Pan PY, Gu P, Li Q, Xu D, Weber K, Chen SH (2004) Regulation of dendritic cell function by NK cells: mechanisms underlying the synergism in the combination of IL-12 and 4-1BB activation, *J Immunol* 172: 4779-4789.

Peng Z (2005) Current status of genemedicine in China: recombination human Ad-p53 agent for treatment of cancer, *Hum Gene Ther* 16: 1016-1027.

Perret R, Rochese F (2008) Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8+ T-cell population provides the best protection against tumors?, *Tissue Antigens* 72: 187-194.

Pham-Nguyen KB, Yang W, Saxena R, Thung SN, Woo SL, Chen SH (1999) Role of NK and T-cell in IL-12 induced antitumor response against hepatic colon carcinoma, *Int J Cancer* 81: 813-819.

Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Kim KK, Pickard RT, Kwon BS (1993) Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function, *J Immunol* 150: 771-781.

Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, Royal RE, Kammula U, Restifo NP, Hughes MS, Schwartzentruber D, Berman DM, Schwarz SL, Ngo LT, Mavroukakis SA, White DE, Steinberg SM (2005) Tumor progression can occur despite the induction of very high self/tumor antigen specific CD8+ T cells in patients with melanoma, *J Immunol* 175: 6169-6176.

Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin 2: identification of antigens mediating response, *Ann surg* 228: 307-319.

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subtypes of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, *Nature* 401: 708-712.

Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olagüe C, Sola J, Sadaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J (2004) Phase 1 trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors, *J Clin Oncol* 22: 1389-1397.

Schafer DF, Sorell MF (1999) Hepatocellular carcinoma, *Lancet* 353: 1253-1257

Schwarz RH (1990) A cell culture model for T lymphocytes ylonal anergy, *Science* 248: 1349-1356.

Seder RA, Darrah PA, Roedere M (2008) T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design, *Nature Reviews: Immunol* 8: 247-259.

Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, Dubinett SM (1999) T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function, *J Immunol* 3 163: 5020-8.

Shuford WW, Klussmann K, Trichler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emsweiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS (1997) 4-1BB costimulatory signals preferentially induces CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification *in vivo* of cytotoxic T cell response, *J Exp Med* 186: 47-55.

Soloski MJ (2001) Recognition of tumor cells by innate immune system, *Curr Opin Immunol* 13: 154.

Spangenberg HC, Thieme R, Mohr L (2007) The hepatocellular carcinoma: Alternative Therapeutical Strategies, *Zentralbl Chir* 132: 322-327.

Strieter RM, Poliverine PJ, Arensberg DA, Kunkel SL (1995) The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis, *Shock* 4(3): 155-160.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2002) Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune-surveillance against tumor development, *J Exp Med* 195: 161-169.

Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA (2008) Th17 cells in human disease, *Immunol Rev* 223: 87-113.

Tominaga M, Iwashita Y, Ohta M, Shibata K, Ishio T, Ohmori N, Goto T, Sato S, Kitano S (2007) Antitumor effects of MIG and IP-10 genes transferred with poly(D,L-2-4-diaminobutyric acid) on murine neuroblastoma, *Cancer Gene Ther* 14: 696-705.

Tricheri G (2003) Interleukin-12 and regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat Rev Immunol* 3: 133-146.

Uemura Y, Kobayashi M, Nakata H, Kubota T, Bandobashi K, Saito T, Taguchi H (2006) Effects of GM-CSF and M-CSF on tumor progression of lung cancer: roles of MEK1/ERK and AKT/PKB pathways, *Int J Mol* 18: 365-373.

Vassaux G, Martin Duque P (2004) Use of suicide genes for cancer gene therapy: study of a different approaches, *Expert Opin Biol Ther* 4: 519-530.

Vinay DS, Kwon BS (1998) Role of 4-1BB in immune responses, *Semin Immunol* 10: 481-489.

Waehler R, Ittrich H, Mueller L, Krupski G, Ameis D, Schnieders F (2005) Low dose Adenoviral immunotherapy of rat hepatocellular carcinoma using single-chain interleukin-12, *Hum Gen Ther* 16: 307-317.

Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, Wiltrout RH (2007) Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combination, *Expert Opin Biol Ther*, 7(11): 1705-1721.

Wen T, Bukczynski J, Watts TH (2002) 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8+ T cell expansion, cytokine production, and development of cytolytic effector functions, *J Immunol* 168: 4897-4906.

Wesa A, Kallinski P, Tatsumi T, Storkus WJ (2007) Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient T_{H1}-type anti melanoma CD4+ response *in vitro*, *J Immunother* 30: 75-82.

Wigginton JM, Gruys E, Geiselhart L, Subleski J, Kornschlies KL, Park JW, Wiltrout TA, Nagahima K, Back TC, Wiltrout RH (2001) IFN- γ and Fas/FasL are required for antitumor and antiangiogenic effects of IL-12/pulse IL-2 therapy, *J Clin Invest* 108: 51-62.

Yanagida T, Kato O, Igarashi T, Inoue T, Nariuchi H (1994) Second signal activity of IL-2 in the proliferation and IL-2R expression of T-helper cell-1 clone, *J Immunol* 152: 4919.

Yazwa K, Fischer WE, Bruncicardi FC (2002) Current progress in suicide gene therapy for cancer, *World J Sur* 26: 783-789.

Yoo JK, Cho JH, Lee SW, Sung YC (2002) IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4 T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway, *J Immunol* 169: 3637-3643.

You TG, Wang HS, Yang JH, Quian QJ, Fan RF, Wu MC (2004) Transfection of IL-2 and/or IL-12 genes into spleen in treatment of rat liver cancer, *World J Gastroenterol* 10(15) 2190-2194.

Xu DP, Sauter BV, Huang TG, Meseck M, Woo SL, Chen SH (2005) The systemic administration of Ig-4-1BB ligand in combination with IL-12 gene transfer eradicates hepatic colon carcinoma, *Gene Therapy* 12: 1526-15.

9. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulrike Beisiegel aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf für die Bereitschaft die Funktion des Doktorvaters für die vorliegende Arbeit zu übernehmen.

Des Weiteren danke ich Dr. Frank Schnieders von der Provecs Medical GmbH, in dessen Laboratorium ich meine Doktorarbeit durchführen durfte und der mich bei der Weiterentwicklung meiner Ideen sehr unterstützt hat. Auch bei dem gesamten Labor der Provecs Medical GmbH möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei P.D. Dr. Karim Sultan, der mir mit seiner Betreuung und Unterstützung das Rüstzeug für die Laborarbeit und das wissenschaftliche Arbeiten erst zur Verfügung gestellt hat.

Weiter möchte ich mich gerne bei Frau Dipl. Biochemikerin Nancy Brewig vom Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin und Herrn cand. med. Tilo Freiwald vom Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die tatkräftige Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen bedanken.

10. Lebenslauf

Name: Jurek Marius Schwerg

Anschrift: Bremer Reihe 20, 20099 Hamburg

Geburtsdatum/-ort: 30.März 1983, Berlin

Schullaufbahn: 1989-1995 Bonhoefer-Grundschule, Berlin

1995-2002 Waldschul-Gymnasium, Berlin

Zivildienst: 2002-2003 Altenpflege im „Haus vom Guten Hirten“
Caritas Altenhilfe GmbH, Berlin

Studium: 2003-2004 Studium der Biochemie, FU Berlin

2004 Aufnahme des Studiums der
Humanmedizin, UKE

2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Note 1,0

Praktisches Jahr: 2009-2010 Orthopädie und Unfallchirurgie,
Tygerberg Hospital, Südafrika
Chirurgie, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf
Innere Medizin, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Famulaturen: 1 Monat Visceralchirurgie, Tygerberg Hospital
Südafrika

1 Monat Orthopädie und Unfallchirurgie,
Tygerberg Hospital Südafrika

1 Monat Notfallmedizin, Hadassah Medical Center,
Israel

1 Monat Kardiologie, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

11. Erklärung

Eigenständigkeitserklärung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....Hamburg, 12.02.2010