

STRATEGIEN ZUR OPTIMIERUNG
EINER ALLOGENEN
KOLONKARZINOMZELLBASIERTEN
TUMORVAKZINE: EINFLUSS VON
ZYTOKINEN UND KOSTIMULATION

KIVANC KARACAY

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

STRATEGIEN ZUR OPTIMIERUNG
EINER ALLOGENEN
KOLONKARZINOMZELLBASIERTEN
TUMORVAKZINE: EINFLUSS VON
ZYTOKINEN UND KOSTIMULATION

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

KIVANC KARACAY

aus Giengen

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. G. Sauter
Priv. Doz. Dr. med. G. Längst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. G. Hartmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2005

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Fragestellung</u>	1
2	<u>Hintergrund</u>	3
2.1	Kolorektale Karzinome	3
2.2	Immunologische Effektormechanismen gegen Tumoren	4
2.3	Kostimulation der T-Zell Aktivierung	10
2.3.1	Das kostimulatorische Molekül B7-1	10
2.3.2	Das kostimulatorische Molekül 4-1BB-Ligand	12
2.4	Einfluss von Zytokinen	13
2.4.1	Interleukin-12	13
2.4.2	Interleukin-18	16
2.5	Mechanismen, mit denen Tumoren die Immunantwort unterlaufen	21
2.6	Die Tumorzelle als Antigen-präsentierende Zelle	23
2.6.1	Tumorassoziierte Antigene beim kolorektalen Karzinom	23
2.6.2	Genstransfer von kostimulatorischen Molekülen	24
3	<u>Methoden</u>	27
3.1	Kultur der Tumorzellen	27
3.1.1	Kulturmedium	27
3.1.2	Zelllinien	27

3.2	Isolierung von T-Lymphozyten	28
3.2.1	Präparation von mononukleären Zellen	28
3.2.2	Immunomagnetische T-Zell Isolation mittels <i>magnetic-activated cell sorting</i> (MACS)	29
3.3	Durchflusszytometrie	30
3.3.1	Prinzip	30
3.3.2	Methodik	31
3.4	T-Zell-Proliferationsassay	32
3.4.1	Prinzip	32
3.4.2	Inaktivierung von Tumorzellen	32
3.4.3	Stimulation und Inkubation der T-Zellen	33
3.4.4	Messung der Proliferation	34
3.5	Stimulation mononukleärer Zellen	35
3.6	Zytokinnachweis (Interferon-γ-ELISA)	35
3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.7.1	Materialien	36
3.7.2	Gewinnung der cDNA	37
3.7.3	Amplifikationsschritt	39
3.7.4	Sequenzierung der Polymerase-Kettenreaktion-Produkte	42
3.8	Konstruktion von Expressionsvektoren	43
3.8.1	Materialien	43
3.8.2	Transformation von kompetenten Zellen	44
3.8.3	Plasmid-DNA-Präparation	44
3.8.4	Herstellung der DNA-Fragmente	45
3.8.5	Ligation, Transformation und Selektion rekombinanter Klone	46
3.8.6	Sequenzierung der neuen Expressionsvektoren	47
3.9	Statistische Analyse	47

4 Ergebnisse 48

Erster Teil

4.1	T-Zellaktivierung durch B7-1-transfizierte HT-29 Kolonkarzinomzellen	48
4.1.1	Expression immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle auf transfizierten HT-29 Zellen	48
4.1.2	Inaktivierung der HT-29 Zellen für den Einsatz im T-Zell-Proliferationsassay	49
4.1.3	Isolation von T-Zellen für den Einsatz im T-Zell-Proliferationsassay	51
4.1.4	T-Zellaktivierung durch HT-29/B7-1 Zellen im T-Zell-Proliferationsassay	52
4.2	Einfluss von Interleukin-18 und Interleukin-12	56
4.2.1	Stimulation von mononukleären Zellen	57
4.2.1.1	<i>Induktion der Interferon-γ Synthese durch mononukleäre Zellen</i>	57
4.2.1.2	<i>Synergistischer Effekt von Interleukin-18 und Interleukin-12</i>	59
4.2.2	Stimulation von T-Zellen	60
4.2.2.1	<i>Einfluss auf die T-Zell-Proliferation in Anwesenheit mitogener Substanzen</i>	60
4.2.2.2	<i>Einfluss auf die T-Zell-Proliferation im T-Zell-Proliferationsassay</i>	63
4.2.2.3	<i>Induktion der Interferon-γ Synthese durch T-Zellen</i>	66

Zweiter Teil

4.3	Herstellung der Expressionsvektoren pTracer (4-1BB-L), pTracer (B7-1) und pTracer (B7-2)	70
4.3.1	Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf stimulierten mononukleären Zellen	71
4.3.2	Konstruktion von pTracer (4-1BB-L), pTracer (B7.1) und pTracer (B7.2)	73

5	<u>Diskussion</u>	79
5.1	B7-1-transfizierte HT-29 Kolonkarzinomzellen	79
5.2	Einfluss der Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18	85
5.3	4-1BB-Ligand als kostimulatorisches Molekül	92
5.4	Klinische Studien	95
5.5	Ausblick	98
6	<u>Zusammenfassung</u>	101
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	103
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	127
	Danksagung	129
	Veröffentlichungen	130
	Lebenslauf	132

1 Fragestellung

In den westlichen Industrieländern steht das kolorektale Karzinom in Bezug auf Mortalität und Inzidenz an dritter Stelle innerhalb der malignen Erkrankungen. Trotz Fortschritten in den Therapiemöglichkeiten macht die geringe Überlebensrate vor allem in metastasierten Stadien deutlich, dass nach neuen Therapieansätzen gesucht werden muss.

Fortschritte in der Tumorummunologie und Molekularbiologie haben in den letzten Jahren ein besseres Verständnis für die komplexe Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzelle ermöglicht. Auch wenn so eine wissenschaftliche Basis für die Durchführung immuntherapeutischer Studien geschaffen wurde, steht die immuntherapeutische Behandlung von Tumoren dennoch an ihren Anfängen. Das Ziel, das alle Therapieansätze gemeinsam verfolgen, ist die Aktivierung des Immunsystems, um gezielt maligne Zellen zu zerstören.

Effektoren der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort sind vor allem die T-Lymphozyten, die über ihren T-Zell-Rezeptor spezifisch Antigene erkennen und durch verschiedene Mechanismen zu einer Zerstörung der Tumorzelle führen können. Neben der Präsentation der Tumorantigene über MHC-Moleküle – in der Regel durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen – ist auch die Vermittlung eines kostimulatorischen Signals essenziell für eine effiziente Aktivierung der T-Lymphozyten. Die B7-Familie mit dem derzeit am Besten charakterisierten Mitglied B7-1 und auch die Liganden der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie mit 4-1BB-Ligand als Vertreter sind in der Lage als kostimulatorische Oberflächenmoleküle ein starkes Signal für die T-Zell-Aktivierung zu vermitteln. Physiologisch werden sie hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert.

In verschiedenen Tumormodellen konnte ein Gentransfer dieser kostimulatorischen Moleküle in Tumorzellen eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auslösen. Es gibt Hinweise darauf, dass die kostimulatorischen Moleküle ihre Wirkung gegenseitig potenzieren bzw. verstärken können, so dass durch Ko-Expression mehrerer kostimulatorischer Moleküle auf den Tumorzellen - speziell von B7-1 und 4-1BB-Ligand - gegebenenfalls eine effizientere Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort erreicht werden kann.

Zytokine, die entweder von den Tumorzellen selbst oder von den sie umgebenden Zellen ausgeschüttet werden, bestimmen wesentlich die Art und Weise, in der das Immunsystem reagiert. Für Interleukin-12 und Interleukin-18 alleine und in Kombination sind Antitumor-Effekte beschrieben worden. Auch die Kombination von Zytokinen mit kostimulatorischen Molekülen führte in murinen Tumormodellen zu einer effizienten Immunantwort.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss einer Kombination von Interleukin-12 mit Interleukin-18 auf die T-Zell-Aktivierung durch zunächst B7-1-transfizierte, humane, kolorektale Karzinomzellen untersucht werden. Im zweiten Teil sollte ein Expressionsvektor für 4-1BB-Ligand und neue Expressionsvektoren für B7-1 und B7-2 konstruiert werden, um Kolonkarzinomzellen mit mehreren kostimulatorischen Oberflächenmolekülen gleichzeitig transfizieren zu können. Damit soll ein Beitrag zur Optimierung von allogenen Tumorstoffen in der Therapie des kolorektalen Karzinoms geleistet werden.

2 Hintergrund

2.1 Kolorektale Karzinome

Sowohl bei den Krebsneuerkrankungen als auch bei den Krebssterbefällen stehen kolorektale Karzinome bei Frauen und Männern in Deutschland an zweiter Stelle. Für das Jahr 2000 wird die Zahl der Neuerkrankungen bei Männern auf 32.602, bei Frauen auf 34.175, die Zahl der Todesfälle auf insgesamt 28.987 geschätzt. Das entspricht einer Inzidenz von 81,3 bei Männern und 81,2 bei Frauen bzw. einer Mortalität von 34,0 bei Männern und 36,4 bei Frauen je 100.000 Einwohner, angegeben in altersstandardisierten Werten. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer inzwischen bei 52 % und für Frauen bei 55 % [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2004]. Bei fortgeschrittenem Tumorstadium sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf bis zu 7% [Tumorzentrum-München 1998]. Vergleichbare Zahlen kommen aus den USA, wo bei den für das Jahr 2005 geschätzten 1.372.910 malignen Neuerkrankungen kolorektale Karzinome bei Männern und Frauen an dritter Stelle stehen und darüber hinaus sowohl für Männer und als auch für Frauen die dritthäufigste Krebstodesursache sind (Jemal A et al. 2005; Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program of the National Cancer Institute (NCI)).

Die geschätzten Erkrankungsraten von Männern und Frauen zeigen in Deutschland nach dem zunehmenden Trend der letzten Jahrzehnte eine relative Stabilisierung auf hohem Niveau. Im Vergleich mit den Erkrankungsraten anderer EU-Länder steht die Inzidenz in Deutschland jedoch sowohl bei Männern als auch bei Frauen an erster Stelle in Europa [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2004].

Als Risikofaktoren gelten neben genetischen Veränderungen und familiären Erkrankungen wie z.B. die autosomal-dominant vererbte, familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das Lynch-Syndrom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) auch bestimmte Vorerkrankungen wie die Colitis ulcerosa. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren gehören der Konsum von Alkohol und Tabak (Giovannucci und Martinez 1996, Giovannucci et al. 1995) sowie der Genuss von

Lebensmitteln mit einem hohen Gehalt an chemischen Karzinogenen (Radikalbildnern). Umstritten ist die Bedeutung des Anteils von Fleisch und Fett sowie von Faserstoffen und Folsäure in der Nahrung.

Zu den klassischen stadienabhängigen Behandlungsansätzen gehört die operative Therapie, unterstützt durch neoadjuvante Therapien in Form von präoperativer Kurzzeitbestrahlung oder Radiochemotherapie sowie adjuvante Chemo- und Radiochemotherapie. Zur Palliativbehandlung stehen chirurgische, endoskopische, strahlentherapeutische, chemotherapeutische, medikamentöse und interventionelle radiologische Maßnahmen zur Verfügung. Der Einsatz erfolgt individuell abhängig von der vorliegenden Situation (Interdisziplinäre S3-Leitlinie, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Junginger und Lorenz 2004).

2.2 Immunologische Effektormechanismen gegen Tumoren

Die zur Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms angeführten Zahlen unterstreichen, dass zu den klassischen Therapieoptionen, Resektion, Radiatio und Chemo- bzw. Radiochemotherapie, nach weiteren Therapieansätzen gesucht werden muss. Bereits vor 100 Jahren wurde der Gedanke einer gezielten Aktivierung des Immunsystems zur effektiven Bekämpfung maligner Erkrankungen von Coley geäußert und in ersten Versuchen bei Patienten bestätigt (Coley 1909). Ausgehend von diesen ersten wissenschaftlich-theoretischen Ansätzen zur Tumorummunologie hat eine intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten dazu beigetragen, immunologische Zusammenhänge aufzuklären. Neue Erkenntnisse in der Tumorbiologie und die Entwicklung von Methoden, mit denen Tumorzellen und Komponenten des Immunsystems modifiziert werden können, haben das Interesse an immuntherapeutischen Ansätzen verstärkt.

Bei der Erkennung und Abtötung von Tumorzellen spielt die adaptive bzw. spezifische Immunantwort eine wichtige Rolle. Tumorzellen exprimieren zelleigene Proteine, die auch tumorassoziierte Antigene, Tumorabstoßungsantigene oder Tumorantigene (TAA) genannt werden und über die sie eine Aktivierung des Immunsystems auslösen können (Boon und Old 1997, Boon et al. 1994). Der Begriff der „Immunüberwachung“

maligner Tumoren durch das Immunsystem wurde bereits 1970 geprägt. Schon damals wurde spekuliert, dass diese „Immunüberwachung“ die Funktion von Lymphozyten ist (Burnet 1970). Im Gewebe unterschiedlicher Tumorentitäten konnten nach histologischer Aufbereitung Lymphozyten nachgewiesen werden, die als Tumorf infiltrierende Lymphozyten (TIL) bezeichnet wurden (Kawakami et al. 2000, Itho et al. 1988, Beldegrun et al. 1988). Inzwischen konnten bei unterschiedlichen Tumoren auch im peripheren Blut zirkulierende TAA-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Karanikas et al. 2001, Letsch et al. 2000, Lee et al. 1999).

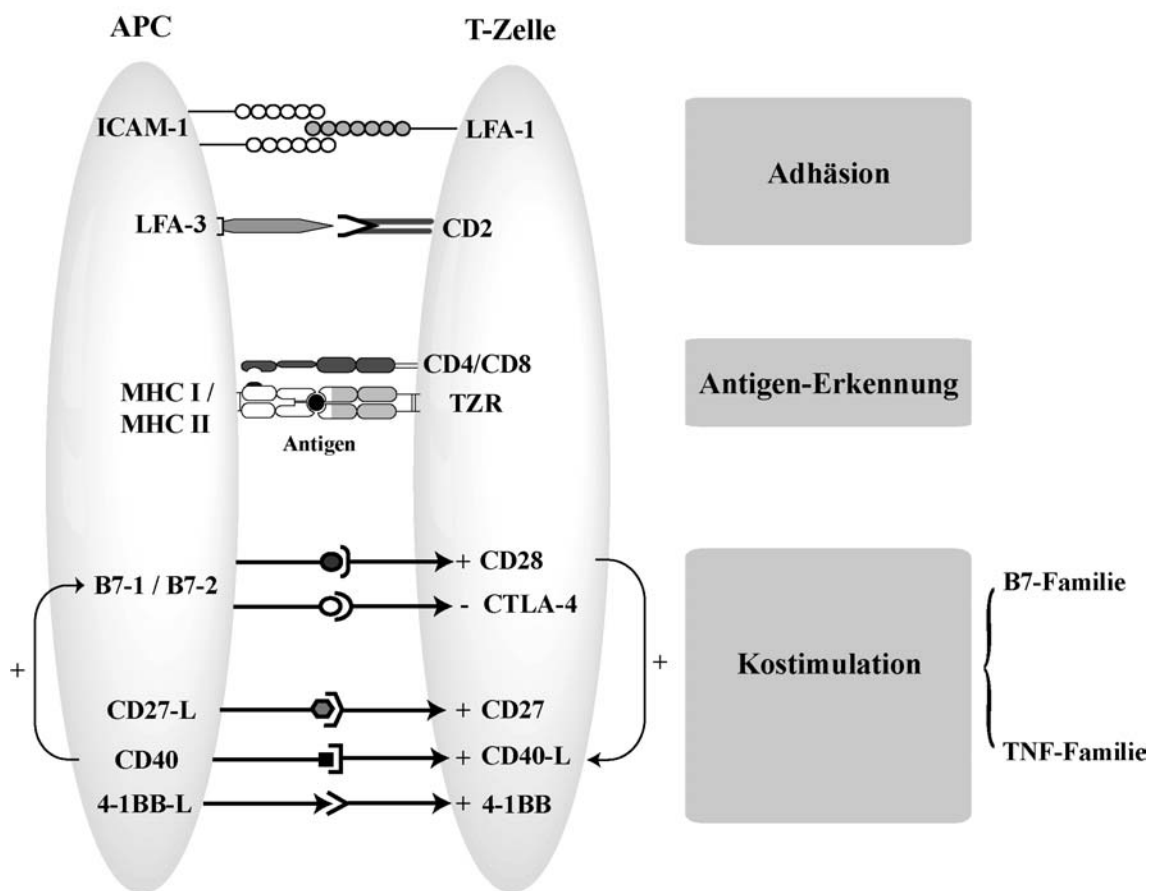


Abbildung 2.1 Für die T-Zell-Aktivierung notwendige Interaktionen zwischen Antigen-präsentierender Zelle (APC) und T-Zelle. [ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*; LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1* bzw. -3; CD, *cluster of differentiation*; MHC, *major histocompatibility complex*; TZR, T-Zell-Rezeptor; CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*; CD27-L, Ligand von CD27; CD40-L, Ligand von CD40; 4-1BB-L, Ligand von 4-1BB; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor.]

Bei der Entstehung tumorspezifischer Immunreaktionen haben vor allem T-Lymphozyten (T-Zellen) eine zentrale Bedeutung (Fuji et al. 1996). Das Erkennen von antigenen Strukturen durch die T-Zellen beruht auf direktem Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APC), der über T-Zell-Rezeptor, MHC-Molekül und Peptid-Antigen vermittelt wird.

Zur Erkennung fremder Antigene besitzen T-Zellen einen T-Zell-Rezeptor (TZR) auf ihrer Zelloberfläche. Die T-Zell-Rezeptoren jeder T-Zelle unterscheiden sich, da durch genetische Rekombination verschiedener Elemente auf DNA-Ebene eine Vielfalt von ca. 10^{16} verschiedenen Molekülen gebildet werden kann. MHC steht für *major histocompatibility complex* und bezeichnet eigentlich einen Genlocus auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, der ursprünglich im Zusammenhang mit Transplantationsabstoßungen entdeckt wurde. In diesem Genlocus werden zwei Oberflächenmoleküle kodiert, MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle, deren Hauptaufgabe die Antigen-Präsentation, d.h. das Vorzeigen von Antigenen in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche ist. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und binden im klassischen Modell der Antigen-Präsentation bevorzugt Peptide endogener Proteine (Pamer und Cresswell 1998). Die MHC-Klasse-II-Moleküle sind lediglich auf APCs, aktivierten T-Zellen und Epithelzellen des Thymus zu finden, können aber auch bei einigen anderen Zellen durch Interferon- γ (IFN- γ) induziert werden (Klein and Sato 2000). Im klassischen Modell der Antigen-Präsentation binden sie vor allem Peptide exogener Proteine (Watts 1997). T-Zellen erkennen körpereigene MHC-Moleküle über ihren TZR, sind aber tolerant gegenüber auf MHC-Molekülen präsentierten Selbstpeptiden (Selbsttoleranz). Anhand der CD (*cluster of differentiation*)-Oberflächenmoleküle werden T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterschieden.

Die T-Helferzellen werden durch das Oberflächenmolekül CD4 charakterisiert. Binden $CD4^+$ -T-Zellen mit ihren Rezeptoren an fremde bzw. antigene Peptide, die über MHC-Moleküle der Klasse II präsentiert werden, regen sie dadurch B-Zellen zu stärkerer Teilung, Differenzierung und Antikörperproduktion und Makrophagen zu gesteigerter Aktivität an. T-Helferzellen selbst reagieren auf den Kontakt mit fremdem Antigen mit starker Zellteilung und Produktion von Zytokinen.

Die zytotoxischen T-Zellen, charakterisiert durch das Oberflächenmolekül CD8, binden an Komplexe aus fremden Peptiden und MHC-Molekülen der Klasse I und reagieren ebenfalls mit starker Teilung und der Produktion von Zytokinen.

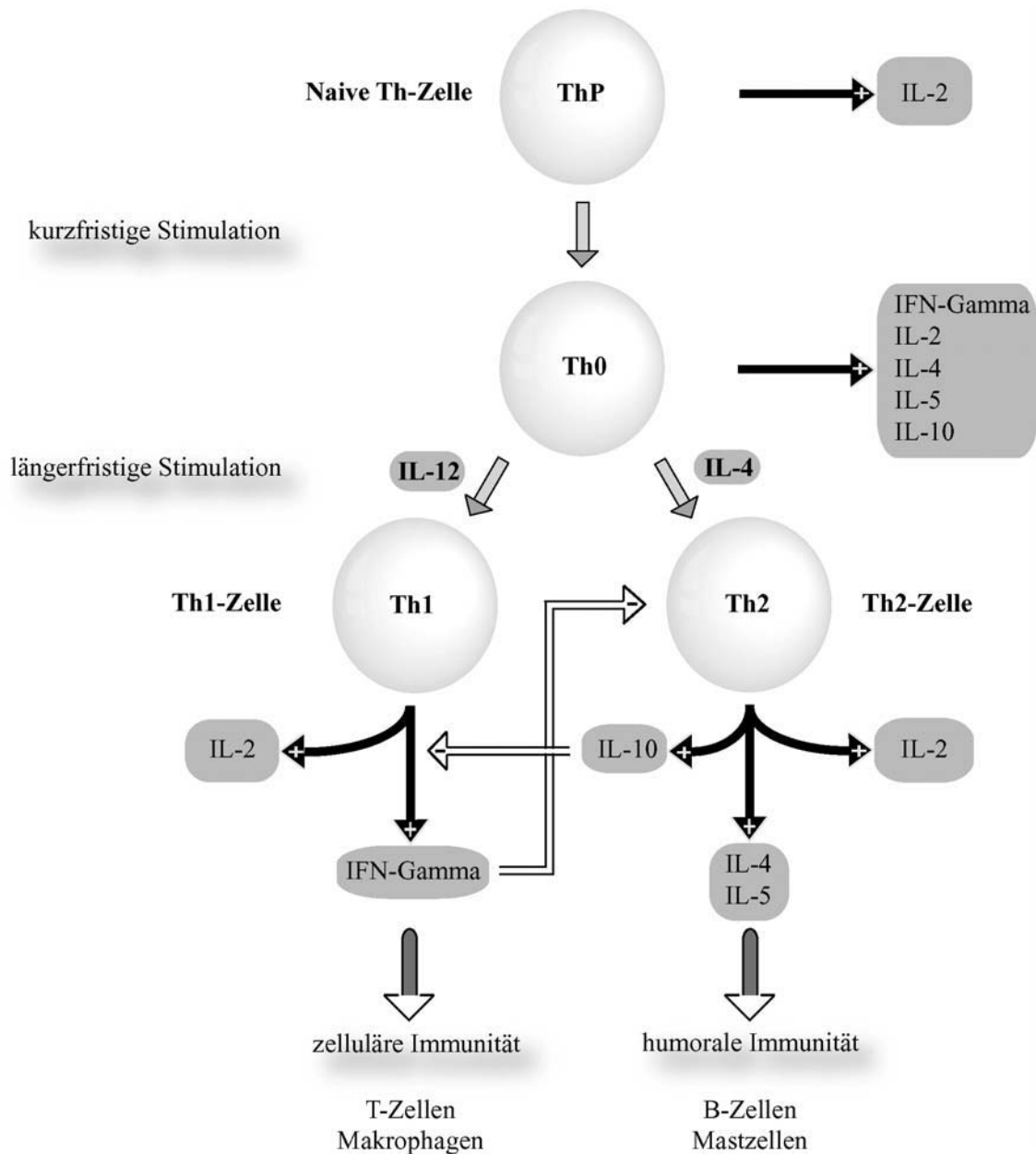


Abbildung 2.2 Differenzierung der CD4⁺-T-Helferzellen in Th1- und Th2-Zellen. [Th, T-Helferzelle; IL, Interleukin; IFN, Interferon]

Bei Makrophagen und dendritischen Zellen kann es auch zu einer Präsentation aufgenommenener Proteine oder Peptide über MHC-Klasse-I-Moleküle kommen. Die Aktivierung von T-Zellen über diesen Weg bezeichnet man als *cross-priming*. Zu den CD4⁺-T-Zellen gehören sowohl Th1- als auch Th2-Zellen, die sich in ihrem Zytokinprofil unterscheiden. Th1-Zellen produzieren vor allem IFN- γ und induzieren bevorzugt zelluläre Immunität. Sie aktivieren vor allem Makrophagen, die Antigene auf den MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren. Th2-Zellen dagegen zeichnen sich hauptsächlich durch Produktion von Interleukin-4 (IL-4) und IL-5 aus und bevorzugen die Aktivierung der humoralen Immunität.

Bei der Aktivierung von T-Zellen (Abbildung 2.1) wird zunächst über Adhäsionsmoleküle und deren Rezeptoren ein erster Kontakt zwischen APC und T-Zelle hergestellt. Diese Zell-zu-Zell-Interaktion wird vor allem über Integrine gesteuert, den *intercellular adhesion molecules* (ICAM) und den *lymphocyte function-associated antigens* (LFA). Auf Seite der APCs gehören dazu die Adhäsionsmoleküle LFA-3 und ICAM-1 und auf Seiten der T-Zellen CD2 und LFA-1 (Creusot et al. 2002, Davis 2002, Dustin und Colman 2002, Faroudi et al. 2002, Lee et al. 2002).

Durch die anschließende Bindung eines MHC-Moleküls mit einem fremden Peptid wird über den T-Zell-Rezeptor zwar ein erstes Signal in einer ruhenden, naiven T-Zelle ausgelöst. Dieses Signal reicht zu einer funktionellen Aktivierung der T-Zelle jedoch nicht aus. Bereits 1970 formulierten Bretscher und Cohn die Hypothese, dass zwei synergistische Signale zur Aktivierung von T-Zellen erforderlich seien. Signal „Eins“ stellt die spezifische Antigenerkennung über den T-Zell-Rezeptor dar, Signal „Zwei“ beinhaltet eine unspezifische, zusätzliche Aktivierung durch weitere Oberflächenmoleküle.

Inzwischen sind verschiedene kostimulatorische Oberflächenmoleküle identifiziert worden, darunter vor allem die Moleküle der B7-Familie und Liganden der Tumornekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor Familie, die alle mit den entsprechenden Rezeptoren auf den T-Zellen kostimulatorische Signale vermitteln können (Carreno und Collins 2002, Alegre et al. 2001, Watts und DeBenedette 1999, Bluestone 1995).

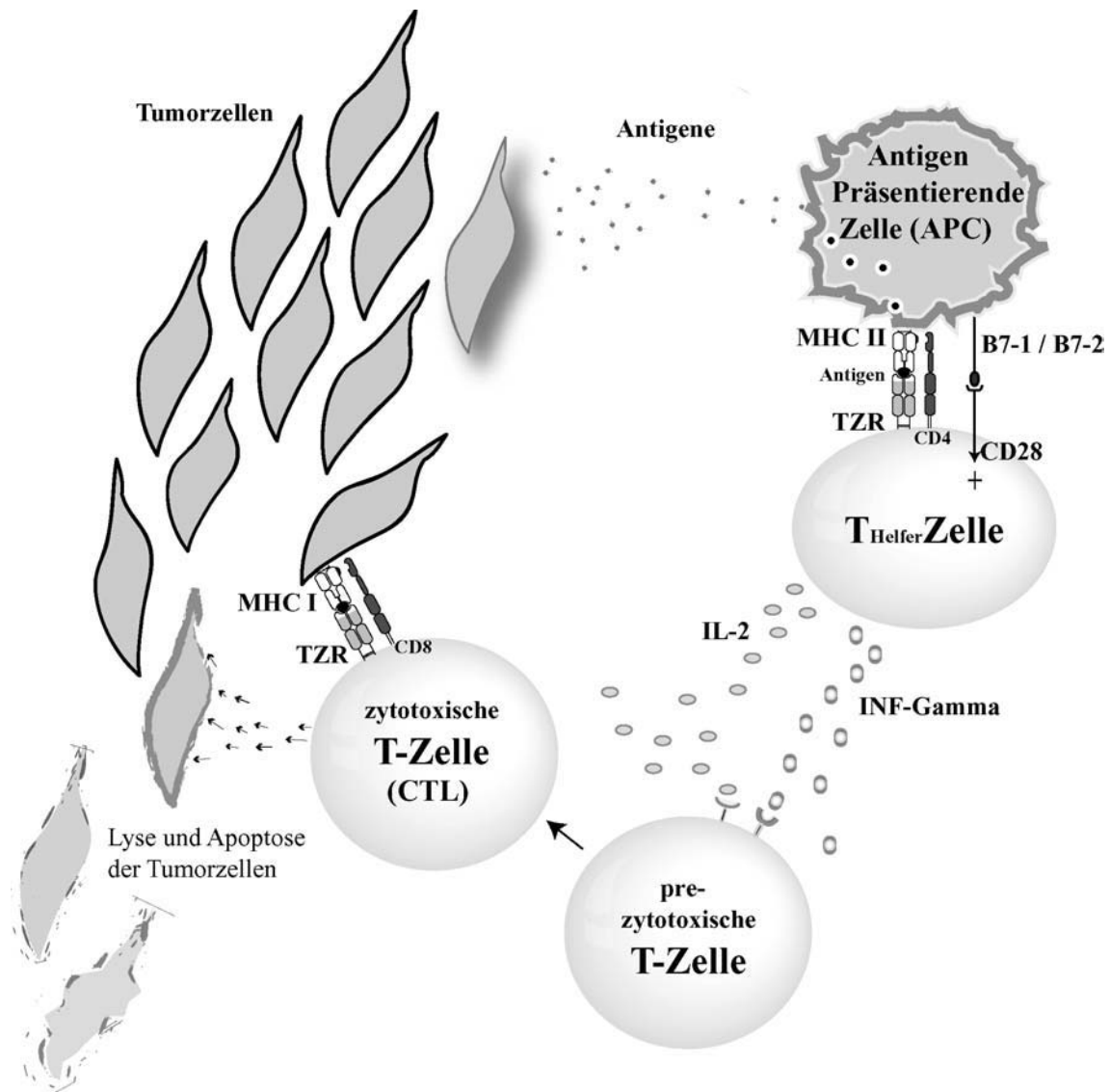


Abbildung 2.3 Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CTL). Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) sowie Kostimulation durch verschiedene Oberflächenmoleküle (hier Interaktion von B7-1 bzw. B7-2 mit CD28 dargestellt) aktiviert Th1-Zellen und induziert Sekretion der Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN-Gamma). Reifung der CTL durch Antigenerkennung und Zytokineinfluss führt letztendlich zur Abwehrreaktion gegenüber den Tumorzellen, die durch Lyse und Induktion von Apoptose eliminiert werden können. Fehlt die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen kann es zur Anergie bzw. spezifischen Toleranz gegenüber dem Antigen kommen.

Aktivierte T-Zellen beginnen mit einer starken Sekretion verschiedener Zytokine wie z.B. Interferon- γ , das die Antigenpräsentation der APC erhöhen kann, und Interleukin-2, das eine zusätzliche T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation vermitteln kann. Durch diese Proliferation entstehen unter anderem viele lytisch aktive T-Zellen, die Tumor- oder virusinfizierte Zellen auch ohne Kostimulation abtöten können, da für diese

Abtötung eine Bindung über den T-Zellrezeptor ausreicht (Seki et al. 2002, Krammer 2000). Sie eliminieren als fremd erkannte Zellen durch osmotische Lyse mittels Perforine, die Löcher in der Zellmembran hervorrufen, durch Granzyme, die als Proteasen intrazellulär agieren und Apoptose bewirken, und durch Fas-Ligand (CD95L), der an den Fas-Rezeptor (CD95) der Zielzelle bindet und ebenfalls zur Apoptose führt (Seki et al. 2002, Krammer 2000).

Binden ruhende, naive T-Zellen über ihren TZR an APCs, die keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren, so werden diese T-Zellen nicht aktiviert, d.h. eine Antigen gerichtete Abwehrreaktion bleibt durch Induktion von Anergie (Gimmi et al. 1993; Schwartz 1992) oder spezifischer Toleranz (Chamberlain et al. 1996, Boussiotis et al. 1994) aus.

2.3 Kostimulation der T-Zell-Aktivierung

2.3.1 Das kostimulatorische Molekül B7-1

Das erste Oberflächenmolekül, das als Rezeptor für kostimulatorische Signale auf den T-Zellen beschrieben wurde, war CD28 (June et al. 1990). Es kann durch eine Interaktion mit Molekülen der B7-Familie nach heutigem Wissensstand das stärkste kostimulatorische Signal vermitteln. Von der inzwischen gewachsenen Zahl der Liganden des CD28-Rezeptors (Carreno und Collins 2002, Coyle und Gutierrez-Ramos 2001) sind die kostimulatorischen Proteine B7-1 und B7-2 die bis jetzt am Besten untersuchten (Lenschow et al. 1996, Bluestone 1995, Robey und Allison 1995, Allison 1994).

Die T-Zell-Kostimulation durch die Moleküle der B7-Proteinfamilie beinhaltet positiv stimulatorische Eigenschaften, die über eine Bindung eines B7-Moleküls (z.B. B7-1 oder B7-2) an den CD28-Rezeptor vermittelt werden, sowie negativ regulatorische Eigenschaften, die durch die Bindung der beiden B7-Moleküle an den CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*)-Rezeptor vermittelt werden (Davis et al. 2003, Egen und Allison 2002, Egen et al. 2002, Greenwald et al. 2002, Howard et al. 1991). B7-1 und B7-2 besitzen zwei extrazelluläre Immunglobulindomänen (Ig-Domänen), einen

Transmembranbereich und eine kurze zytoplasmatische Domäne (Azuma et al. 1993, Freeman et al. 1993b, Freeman et al. 1989). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden ergibt eine Übereinstimmung von 25 %.

Das Molekulargewicht von B7-1 wird mit 55 kDa und das von B7-2 mit 70 kDa (Freeman et al. 1993a) angegeben. Der Genlocus von B7-1 und B7-2 erstreckt sich von 3q13.3 bis 3q21 (Selvakumar et al. 1992). Beide werden vor allem von den professionellen APCs, zu denen Dendritische Zellen, Langerhanszellen, Makrophagen und aktivierte Monozyten gehören, exprimiert (Inaba et al. 1994, Razi-Wolf et al. 1992, Freeman et al. 1989). Eine funktionelle Expression auf aktivierten T-Zellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Prabhu Das et al. 1995, Azuma et al. 1993b).

CD28 und CTLA-4 sind charakterisiert durch eine extrazelluläre Ig-Domäne, einen Transmembranbereich und zytoplasmatische Domänen mit verschiedenen Motiven, über die Signale vermittelt werden können (Schwartz et al. 2002). Die beiden B7-Moleküle haben trotz gleicher Bindestelle für CD28 und CTLA-4 unterschiedliche Eigenschaften. B7-2 ist auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen in geringen Mengen konstitutiv exprimiert und wird nach T-Zell-Bindung hochreguliert, während B7-1, dass eine höhere Affinität für CD28 und CTLA-4 besitzt, erst später auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Sharpe und Freeman 2002).

B7-1 und B7-2 sind gleich effektiv bei der Induktion einer T-Zell-Aktivierung (Rudy et al. 1997), aber sie aktivieren unterschiedliche Subpopulationen von T-Zellen (Freeman et al. 1995). Die Aktivierung von CD28 löst eine Kaskade von Reaktionen aus. B7-1 und B7-2 stimulieren gleichermaßen die Produktion von IL-2 and IFN- γ wie auch die Expression des IL-2-Rezeptors. Es kommt zu einer vermehrten Synthese von Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) (Thompson et al. 1989), CD40-Ligand und CTLA-4 mRNA werden aufreguliert (Lindsten et al. 1993). Die Produktion von IL-4 wird durch B7-2 stärker angeregt (Freeman et al. 1995). CD28 wird konstitutiv auf 95 % der CD4⁺- und auf 50 % der CD8⁺-T-Zellen exprimiert. Auch Natürliche Killerzellen (NK) exprimieren CD28 und lassen sich durch B7-1 zur Proliferation und Synthese von Zytokinen stimulieren (Schlienger et al. 1998).

Auf naiven T-Zellen wird CD28 konstitutiv stark exprimiert, während die konstitutive CTLA-4-Oberflächenexpression bei naiven T-Zellen nur sehr gering ist und durch eine T-Zell-Aktivierung hochreguliert wird. CTLA-4 hat eine höhere Affinität für die beiden B7-Moleküle als CD28 und sorgt so nach einer Stimulierung und Aktivierung durch einen negativen *feedback* Mechanismus dafür, dass die T-Zellaktivierung wieder reduziert wird (Gribben et al. 1995, Tivol et al. 1995, Waterhouse et al. 1995, Walunas et al. 1994).

2.3.2 Das kostimulatorische Molekül 4-1BB-Ligand

Bestimmte Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) - Liganden Familie, zu der TNF- α , Lymphotoxin- α , Lymphotoxin- β , CD27-Ligand, CD30-Ligand, CD40-Ligand und der FAS-Ligand zählen (Bazzoni und Beutler 1996), können eine kostimulatorische Wirkung bei der T-Zell-Aktivierung vermitteln (Hintzen et al. 1995). Das Protein 4-1BB (CD137) ist ein induzierbares T-Zell-Antigen und ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie. Zunächst wurde murines 4-1BB kloniert (Kwon et al. 1994) und der zugehörige Ligand charakterisiert (Goodwin et al. 1993). Homologe Proteine konnten auch im humanen System identifiziert werden (Zhou et al. 1995, Alderson et al. 1994).

Das humane CD137, ein Typ-I Transmembranprotein, besteht aus 255 Aminosäuren, wobei die Aminosäuresequenz zu 60 % identisch ist mit dem homologen, murinen Protein (Vinay und Kwon 1998). Das Molekulargewicht beträgt für das humane Protein 35 kDa. Das Gen für CD137 befindet sich auf Chromosom 1p36 in der Nachbarschaft mehrerer Gene, die für andere Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie kodieren. Mutationen in diesem Bereich stehen in Zusammenhang mit mehreren malignen Erkrankungen (Schwarz et al. 1997). Humanes CD137 wird aktivierungsabhängig von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert, vor allem aber auf aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (Vinay und Kwon 1998).

Bei dem Liganden für das humane CD137 handelt es sich um ein Typ-II Transmembranprotein, welches Homologien zu Mitgliedern der TNF-Familie aufweist. Das Gen für den humanen Liganden liegt auf Chromosom 19p3.3 (Alderson et al. 1994,

Goodwin et al. 1993). Die Expression von humanem CD137-Ligand konnte in aktivierten T-Zellen, in der monozytären Zelllinie THP-1 und in der Zelllinie MO-7E sowie in der EBV-transformierten B-Zelllinie MP-1 gezeigt werden (Alderson et al. 1994). Vor allem ist 4-1BB-L-Expression auf aktivierten APCs, darunter auch IFN- γ -aktivierte Makrophagen, aktivierte B-Zellen und Dendritische Zellen, zu finden (DeBenedette et al. 1997, Pollok et al. 1994, Goodwin et al. 1993). Auch konnte die mRNA für den Liganden in ruhenden, primären B-Zellen detektiert werden (Pauly 2000). Salih et al. (2000) schließlich konnten konstitutive Expression des CD137-Liganden sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in verschiedenen Karzinomzelllinien und in primären Tumorzellen zeigen.

Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass über eine Interaktion von 4-1BB-Ligand und 4-1BB ein starkes Signal für die T-Zell-Proliferation vermittelt wird. So kann durch Vernetzung von CD137 über monoklonale Antikörper die anti-CD3-induzierte Proliferation von T-Zellen gesteigert werden (Vinay und Kwon 1998, Schwarz et al. 1996, Alderson et al. 1994, Pollok et al. 1993). In ähnlicher Weise wird durch 4-1BB-Ligand die Proliferation von T-Lymphozyten, welche mit einer suboptimalen Konzentration an Phytohämagglutinin (PHA) aktiviert wurden, verstärkt (Vinay und Kwon 1998, Alderson et al. 1994, Goodwin et al. 1993).

Einige Experimente deuten darauf hin, dass die Induktion der T-Zell-Aktivierung dabei unabhängig von der Interaktion zwischen B7-1 und CD28 ist (DeBenedette et al. 1997), während andere Arbeiten postulieren, dass sowohl ein kostimulatorisches Signal durch CD28 als auch durch CD137 notwendig ist (Guinn et al. 1999, Melero et al. 1998a).

2.4 Einfluss von Zytokinen

2.4.1 Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) wurde ursprünglich als Produkt von B-Zelllinien, die mit dem Epstein-Barr Virus infiziert waren, identifiziert. Aufgrund seiner Eigenschaft, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu aktivieren, wurde es zunächst als *natural killer*

cell stimulatory factor (NKSF) (Kobayashi et al. 1989) bzw. als Aktivator von zytotoxischen T-Lymphozyten als *cytotoxic lymphocyte maturation factor* (CLMF) (Gately et al. 1986) benannt. Das Zytokin, das später in IL-12 unbenannt wurde, besteht aus zwei glykolisierten Untereinheiten, die entsprechend ihres Molekulargewichtes als p40 (Molekulargewicht 40 kDa) und p35 (Molekulargewicht 35 kDa) bezeichnet werden (Podlaski et al. 1992, Gubler et al. 1991, Stern et al. 1990). Die beiden Untereinheiten werden im endoplasmatischen Retikulum der Zelle über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden (Murphy et al. 2000).

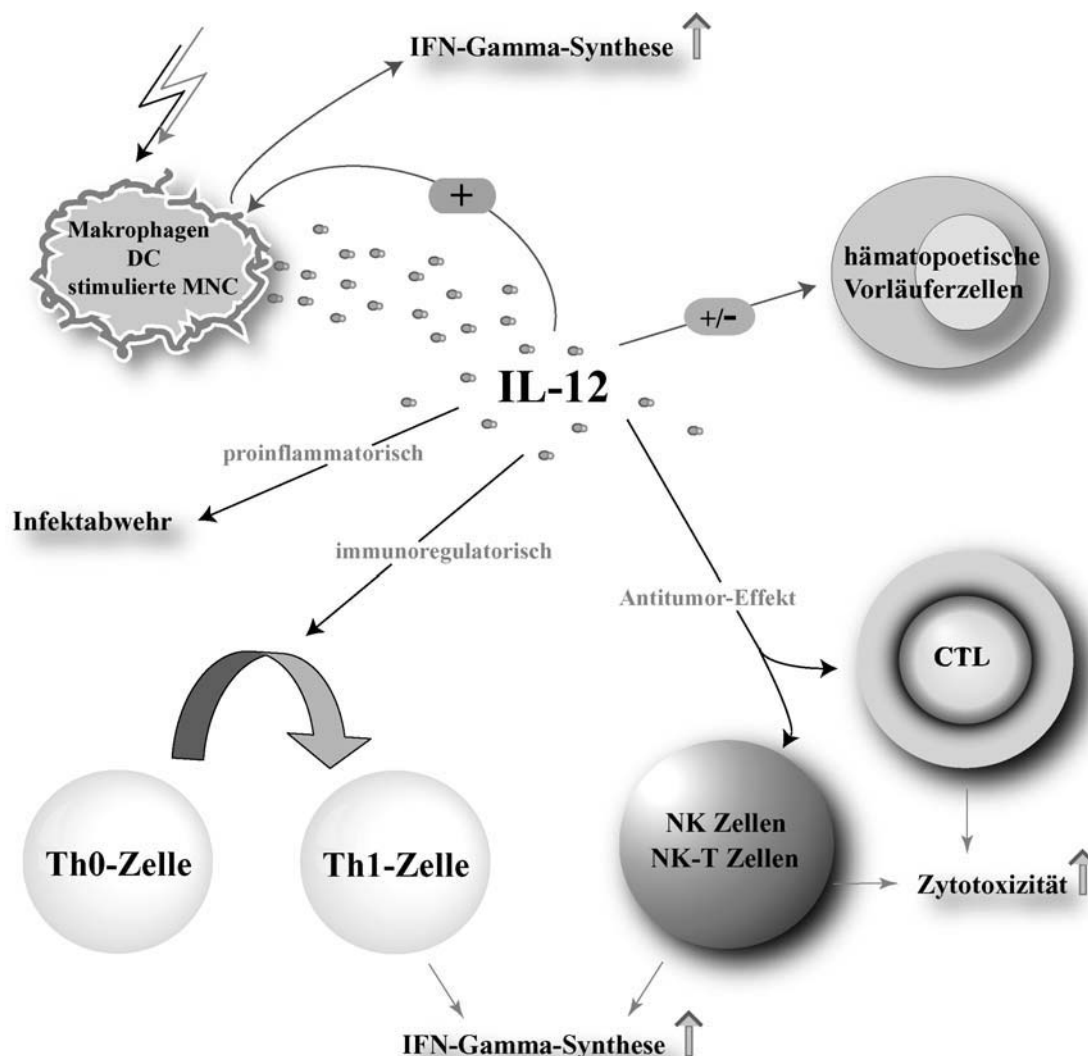


Abbildung 2.4 Aktivierung (Doppelpfeil) von Antigen-präsentierenden und phagozytierenden Zellen führt zur Produktion von Interleukin-12 (IL-12), das als pleiotropes Zytokin Effekte auf eine Vielzahl von verschiedenen Zellen ausübt. [DC, Dendritische Zelle; MNC, Mononukleäre Zellen; CTL, Cytotoxischer T-Lymphozyt, NK Zellen, Natürliche Killerzellen; NKT Zellen, Natürliche Killer T Zellen, Th0-Zelle, undifferenzierte T-Helferzelle; Th1-Zelle, T-Helferzelle Typ1, IFN-Gamma, Interferon-Gamma].

IL-12 stellt ein bedeutendes Zytokin in der zellulären Immunität dar (Gately et al. 1998). Es wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten (Germann und Rude 1995), Dendritischen Zellen und Mastzellen (Ma et al. 1997) freigesetzt. IL-12 bindet vor allem auf NK-Zellen und T-Lymphozyten an den IL-12-Rezeptor (Chizzonte et al. 1992) und induziert bei beiden Zelltypen die Produktion von IFN- γ (Tripp et al. 1993, Chan et al. 1991). Auch bei APCs, von denen es produziert wird, führt IL-12 zur Induktion der IFN- γ -Synthese (Frucht et al. 2001).

IL-12 steigert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen (Trinchieri und Gerosa 1996) und unterstützt die Differenzierung von CD4⁺-T-Lymphozyten in Th1-Zellen (Trinchieri 1994, Hisieh et al. 1993). Weiterhin zeigt IL-12 direkt stimulierende und indirekt hemmende Effekte auf hämatopoetische Vorläuferzellen (Jacobsen 1995, Bellone und Trinchieri 1994). Neben der IFN- γ -Synthese kann es aber auch in geringem Ausmaß die Synthese von GM-CSF und IL-10 in Th1-Lymphozyten und NK-Zellen induzieren (Gerosa et al. 1996, Wysocka et al. 1995). Zusammengefasst ist IL-12 ein wichtiger Faktor der Immunantwort vom Typ Th1.

IL-12 spielt auch bei der Tumorabwehr eine wichtige Rolle. In murinen Tumormodellen führt die systemische Gabe von IL-12 zu einem T-Zell-vermittelten Antitumor-Effekt mit einer Reduktion der Tumormasse und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gegenüber den Tumorzellen (Hunter et al. 1997, Mu et al. 1995, Zou et al. 1995, Nastala et al. 1994).

Auch der gentherapeutische Einsatz von IL-12 zeigt in murinen Tumormodellen therapeutisches Potential (Chen et al. 1997, Tahara et al. 1995). Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) ist IL-12 alleine oder in Kombination mit IL-2 in der Lage *in vitro* eine Lyse der AML-Blasten herbeizuführen (Stine et al. 1998, Vitale et al. 1998). Im murinen AML-Tumormodell hat die IL-12-Transfektion der AML-Zellen einen deutlichen therapeutischen Effekt und führt zu einer langfristigen Immunität. Bei murinen Kolonkarzinommodellen konnte ebenfalls ein Antitumor-Effekt für IL-12 nachgewiesen werden (Tamura et al. 2001, Mendiratta et al. 2000, Mendiratta et al. 1999).

Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse von *in vitro* Experimenten und *in vivo* Versuchen in murinen Tumormodellen (Lucas und Heller 2003, Shi et al. 2002) sind inzwischen vor allem beim Malignen Melanom und beim Nierenzellkarzinom auch Ergebnisse von klinischen Studien (Heinzerling et al. 2005, Alatrash et al. 2004, Motzer et al. 2001, Motzer et al. 1998) veröffentlicht worden. Eine Einschränkung erfährt die potentielle therapeutische Anwendung von IL-12 durch die Toxizität, die vor allem bei systemischer Applikation limitierend ist (Coughlin et al. 1997, Car et al. 1995).

Es gibt wohl entsprechend der biologischen Aktivität von IL-12 zwei Arten der Immunantwort, die durch IL-12 vermittelt werden können. Bei der ersten stehen NK-Zellen bzw. NKT-Zellen im Vordergrund. Diese Immunantwort spielt vor allem bei nicht-soliden Tumormodellen eine Rolle und ist unabhängig von konventionellen T-Zellen (Shin et al. 2001, Cui et al. 1997, Takeda et al. 1996). Die zweite Immunantwort wird hingegen vor allem durch antigenspezifische T-Zellen vermittelt und steht bei soliden Tumormodellen im Vordergrund (Le et al. 2001). Für den Antitumor-Effekt von IL-12 ist die Induktion der INF- γ -Synthese zwar notwendig (Yu et al. 1996, Brunda et al. 1995, Nastala et al. 1994), aber IFN- γ alleine ist nicht ausreichend, um den Effekt von IL-12 zu erklären. Vielmehr spielt die durch IL-12 ausgelöste Th1-Antwort über eine IFN- γ -vermittelte Aktivierung von körpereigenen Abwehrzellen eine zentrale Rolle bei der Abstoßung von Tumoren (Segal et al. 2002, Tsung et al. 1997).

2.4.2 Interleukin-18

Neben Interleukin-12 ist mittlerweile ein weiteres Zytokin bekannt geworden, das wesentlichen Einfluss auf die Induktion der Interferon- γ -Synthese hat. Es wurde erstmalig 1989 als *interferon gamma inducing factor* (IGIF) beschrieben (Nakamura et al. 1989) und 1995 das Gen von Okamura et al. kloniert. Im Verlauf wurde es in Interleukin-18 (IL-18) umbenannt. Aufgrund der primären und dreidimensionalen Struktur, des entsprechenden Rezeptors, der Signaltransduktion und der biologischen Effekte wird IL-18 zu der IL-1-Familie gerechnet, wobei besondere Ähnlichkeiten mit dem Zytokin IL-1 β bestehen. Wie IL-1 β wird auch IL-18 als inaktive Vorstufe synthetisiert und durch *IL-1 β converting enzyme* (ICE), auch Caspase-1 genannt, zum aktiven 18 kDa schweren IL-18 umgesetzt (Dinarello 1999).

Das humane Gen für IL-18 liegt auf Chromosom 11q22 und kodiert für die Proform des Proteins, die aus 193 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 24 kDa hat (Nolan et al. 1998, Ushio et al. 1996). Der Rezeptor für IL-18 besteht aus einem heterodimerischen Komplex mit einer Bindungskette (IL18R α) (Torigoe et al. 1997, Parnet et al. 1996) und einer Signalkette (IL18R β) (Born et al. 1998, Greenfelder et al. 1995), die beide aus der IL-1-Rezeptor-Familie stammen. Bei der Signaltransduktion spielt die Aktivierung der *IL-1 receptor activating kinase* (IRAK) und des *nuclear factor κ B* (NF κ B) eine wichtige Rolle, die eine Kaskade von Reaktionen auslösen (Robinson et al. 1997).

Die Produktion von IL-18 erfolgt vor allem aus dendritischen Zellen (Stoll et al. 1998), aktivierten Makrophagen (Okamura et al. 1995) und Kupffer-Zellen (Matsui et al. 1997). Zwischen IL-18 und IL-12 bestehen funktionelle Ähnlichkeiten hinsichtlich der Differenzierung von naiven Th-Zellen zu Th1-Zellen und der Induktion der IFN- γ -Synthese, für die ein synergistischer Effekt von IL-18 und IL-12 beschrieben wird (Okamura et al. 1995). Neben Th1-Zellen (Micallef et al. 1996) konnte auch aus CD8⁺-T-Zellen (Tomura et al. 1998a), NK-Zellen (Tomura et al. 1998b), B-Zellen (Yoshimoto et al. 1997) und Makrophagen (Munder et al. 1998) IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden, nachdem sie mit IL-12 und IL-18 stimuliert wurden.

Weiterhin ist IL-18 ein wichtiger Kofaktor bei der Verstärkung von Zytotoxizität und Proliferation von natürlichen Killerzellen. Sowohl die Perforin- als auch die Fas-vermittelte Zytotoxizität der NK-Zellen wird durch IL-18 gesteigert (Hyodo et al. 1999, Takeda et al. 1998, Tsutsui et al. 1996). IL-18 erhöht die Zytotoxizität von CD8⁺-T-Zellen (Okamoto et al. 1999). Hierbei fällt auf, dass CD8⁺-T-Zellen nach gleichzeitiger Stimulation des T-Zell-Rezeptors und des kostimulatorisch wirkenden Rezeptors CD28 mit entsprechenden Antikörpern und anschließender IL-12 Zugabe eine starke Expressionserhöhung des IL-18-Rezeptors zeigten (Tomura et al. 1998a). Diese Befunde legen eine Beteiligung von Interleukin-18 an der Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen nahe.

Als proinflammatorisches Zytokin führt IL-18 zur Freisetzung von Prostaglandinen, proinflammatorischen Zytokinen, Stickstoffmonoxid und Chemokinen (Puren et al. 1998a, Puren et al. 1998b). IL-18 trägt zur Immunabwehr von Infektionen mit

verschiedenen Pathogenen bei (Fujioka et al. 1999, Bohn et al. 1998, Kawakami et al. 1997). Für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen wie insulinabhängiger Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn wird mittlerweile ein Einfluss von IL-18 diskutiert (Monteleone et al. 1999, Olee et al. 1999, Rothe et al. 1997).

Welche Rolle spielt IL-18 in der Tumorummunologie? Zum einen gibt es Hinweise für eine endogene IL-18-Produktion durch Tumorzellen, wie das bereits für humane Prostatakarzinomzellen (Lebel-Binay et al. 2003), murine Melanomzellen (Cho et al. 2000) und Plattenepithelkarzinomzellen (Martone et al. 2004) gezeigt werden konnte. Bei den Prostatakarzinomzellen wird die IL-18-Expression als prognostisch günstiger Faktor bewertet, wohingegen bei den murinen Melanomzellen ein Fas-Ligand-vermitteltes Unterlaufen der Immunantwort diskutiert wird.

Zum anderen konnte in verschiedenen murinen Tumormodellen aufgezeigt werden, dass IL-18 über mehrere Mechanismen zur Tumorabwehr beiträgt. Zu diesen gehören die Induktion einer Th1-Antwort mit Sekretion von Interferon- γ (Heuer et al. 1999) sowie die Aktivierung von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (Micallef et al. 1997). Ein von IL-12 und IFN- γ unabhängiger Antitumor-Effekt von IL-18 bei murinen Melanomzellen (Osaki et al. 1998) zeigt, dass auch die Induktion der Fas-Ligand-Expression von NK- und T-Zellen (Dao et al. 1997) und die Perforin-vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen (Dao et al. 1998) ähnlich wie bei IL-12 eine wesentliche Rolle bei der Tumorabwehr durch IL-18 spielen (Hashimoto et al. 1999).

Synergistische Effekte von IL-12 und IL-18 im Bezug auf die IFN- γ -Synthese werden zum einen über die unterschiedlichen Signaltransduktionswege erklärt. Während IL-18 den IFN- γ -Promotor direkt über das *activating protein 1* (AP-1) aktivieren kann, benötigt IL-12 sowohl AP-1- als auch *signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4)-Aktivierung. Zum anderen führt IL-12 zu einer Hochregulation der Expression des IL-18-Rezeptors auf B-, T- und NK-Zellen (Kunikata 1998).

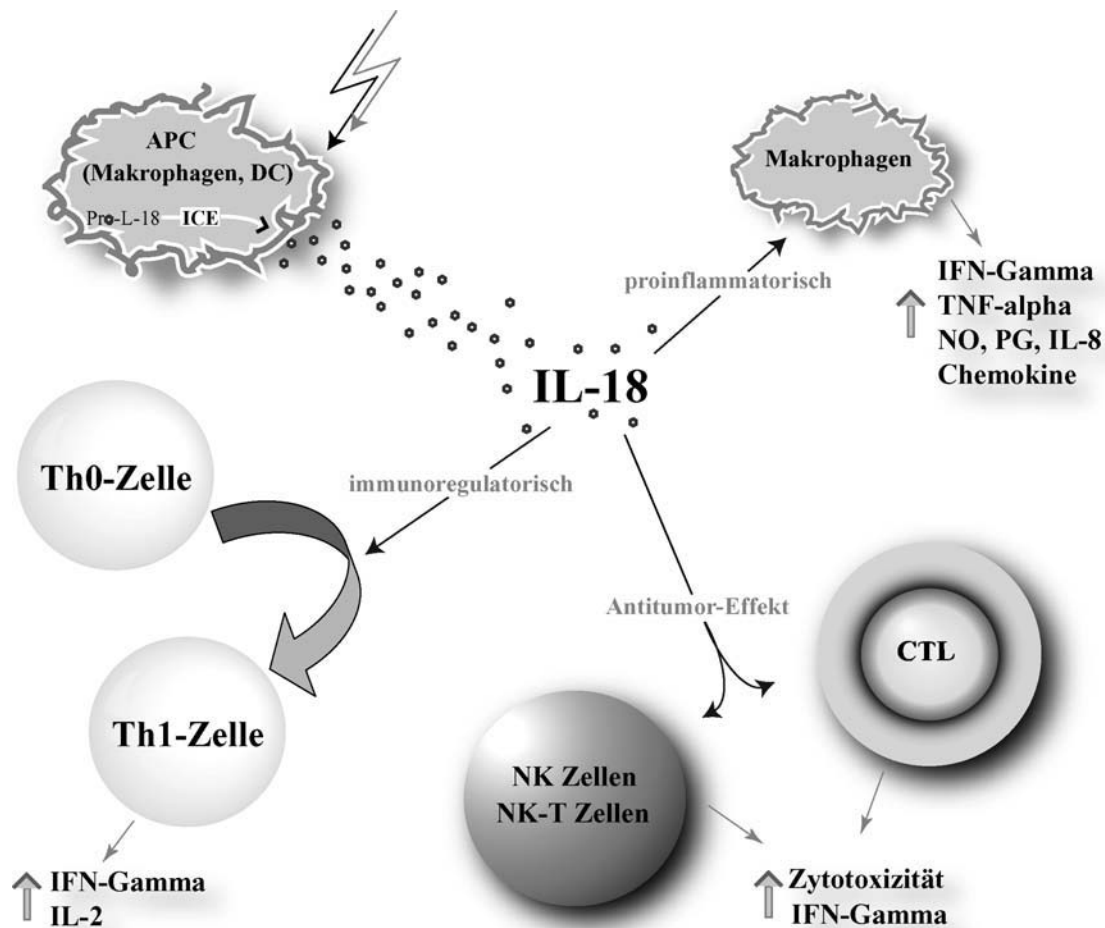


Abbildung 2.5 Aktivierung (Doppelpfeil) von Antigen-präsentierenden Zellen führt zur Produktion von Interleukin-18 (IL-18). Zunächst wird die Proform (Pro-IL-18) synthetisiert, aus der *IL-1 β converting enzyme* (ICE), auch Caspase-1 genannt, durch Spaltung das eigentliche IL-18 freisetzt. Als pleiotropes Zytokin übt IL-18 Effekte auf eine Vielzahl von verschiedenen Zellen aus. [DC, Dendritische Zelle; CTL, Cytotoxischer T-Lymphozyt, NK Zellen, Natürliche Killerzellen; NKT Zellen, Natürliche Killer T Zellen, Th0-Zelle, undifferenzierte T-Helferzelle; Th1-Zelle, T-Helferzelle Typ1, IFN-Gamma, Interferon-Gamma; TNF-alpha, Tumor-Nekrose-Faktor- α ; NO, Stickstoffmonoxid; PG, Prostaglandine; IL-8, Interleukin-8].

Im Hinblick auf synergistische Effekte von IL-12 und IL-18 bei der Tumorerabwehr spielt neben der Induktion von IFN- γ (Tamura et al. 2003) auch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 auf Tumorzellen und die Erhöhung der Zytotoxizität von NK-Zellen (Liebau et al. 2002) eine Rolle. Im Bezug auf die Inhibition einer Tumorangio-genese konnte im murinen Tumormodell ebenfalls ein synergistischer Effekt von IL-12 und IL-18 nachgewiesen werden (Coughlin et al. 1998).

2.5 Mechanismen, mit denen Tumoren die Immunantwort unterlaufen

Das Immunsystem übernimmt in einem komplexen und differenzierten Zusammenspiel all seiner Komponenten eine Schutzfunktion für den Organismus. Darunter fällt auch die Abwehr von körpereigenen, entarteten Zellen durch frühe, nicht-adaptive Abwehrreaktionen und durch die hier beschriebenen und bei Tumoren im Vordergrund stehenden Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems. Als „fremd“ können Tumorzellen dadurch erkannt werden, dass sie zelleigene Proteine, so genannte tumorassoziierte Antigene bzw. Tumorantigene, exprimieren. Diese werden durch den MHC-Klasse-I-Komplex präsentiert und von T-Zellen erkannt, d.h. in diesem Fall sind die Tumorzellen immunogen. Prinzipiell könnte so eine effektive Immunantwort induziert werden. Jedoch können maligne Zellen verschiedene Mechanismen zur Toleranzinduktion entwickeln und sind somit in der Lage, eine Immunantwort zu umgehen.

Toleranz ist ein Immunstatus, bei dem die Effektorzellen des Immunsystems nicht gegen fremde Antigene oder entartete Zellen des Organismus agieren bzw. aktiviert werden. Anergie, Dysfunktion von T-Lymphozyten, immunsuppressive Zytokine, und Immundeviation stellen verschiedene Wege zur Toleranzinduktion durch Tumorzellen dar. Die so genannten Tumorescapemechanismen, die häufig Moleküle auf Tumoren betreffen, die an der Antigenerkennung oder Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind, führen indirekt ebenfalls zur Immuntoleranz.

Wie in Abschnitt 2.2 erläutert, induziert eine Aktivierung von T-Lymphozyten ohne die Anwesenheit von kostimulierenden Molekülen Anergie, d.h. die Immunzellen existieren und sind auch spezifisch für ein Antigen, jedoch führen diese Zellen keine Funktion aus. Bei einigen kolorektalen Karzinomen konnte gezeigt werden, dass APCs in der Umgebung der Tumoren den T-Lymphozyten Tumorantigene präsentieren, jedoch nur ungenügend kostimulierende Moleküle exprimieren und so zu Anergie von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten führen (Chaux et al. 1996). Darüber hinaus führt eine unzureichende Kostimulation von T-Zellen zur Apoptose dieser immunkompetenten Lymphozyten, indem nicht genügend anti-apoptotische Moleküle heraufreguliert werden.

T-Zellen von Tieren sowie Patienten mit malignen Erkrankungen reagieren schlechter auf Stimulation als T-Zellen von gesunden Kontrollgruppen. Dies betrifft sowohl tumorinfiltrierende T-Lymphozyten wie auch T-Zellen im Blut. Es wird vermutet, dass Tumoren "Milieufaktoren" produzieren, die lokal und auch in der Umgebung die Struktur von Oberflächenproteinen und damit die Funktion von T-Zellen modulieren. Diese Dysfunktion von T-Lymphozyten betrifft sowohl den T-Zell-Rezeptor als auch intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle. Die Ursache solcher Dysfunktion von Immunzellen ist nicht eindeutig geklärt, jedoch deuten einige Daten darauf hin, dass der Tumor Faktoren sezerniert oder Rezeptoren exprimiert, die bestimmte Moleküle auf T-Zellen herunter regulieren (Fink et al. 1999). Auch für kolorektale Karzinome konnten immunsuppressive Effekte aufgezeigt werden (Luo et al. 2000). Dysfunktion ist mit Funktionsverlust von T-Zellen und somit mit Toleranz verbunden.

Der Mechanismus der Apoptose bei T-Lymphozyten wird primär durch die Interaktion von CD95 (Fas) und CD95-Ligand (Fas-Ligand) gesteuert. Die permanente Aktivierung von T-Zellen durch ein Antigen führt zur Heraufregulation von CD95 und CD95L, wodurch die Zellen in die Apoptose getrieben werden. Dieser Mechanismus wird als aktivierungsinduzierter Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) bezeichnet. Ursprünglich sollten durch diesen Mechanismus autoreaktive Immunzellen eliminiert werden, jedoch scheint durch diesen Pathomechanismus auch der Tumor tumorspezifische T-Zellen auszuschalten. Zudem ist für kolorektale Karzinome eine Induktion der Fas-Ligand-Expression, die mit dem Auftreten von Metastasen korreliert, beschrieben worden (Nozoe et al. 2003). Auch bei HT-29 Tumorzellen ist die Expression von Fas-Ligand bekannt (Eberl et al. 2000).

Über immunsuppressive Zytokine wird das Immunsystem moduliert, so dass im lokalen Milieu eine Toleranz gegenüber dem Tumor entsteht, der dadurch einen Proliferationsvorteil erzielt. Interleukin-10 und *transforming growth factor-β* (TGF-β) gehören zu dieser Gruppe von Zytokinen (Chouaib et al. 1997). Durch das Zytokin Interleukin-10 wird eine proinflammatorische Immunantwort vom Th1-Typ, die eine Tumorabstoßung induziert, unterdrückt. Des Weiteren verhindert IL-10 die Aktivierung von Makrophagen und die Expression von kostimulierenden Molekülen auf APCs. Die immunsuppressive Wirkung von TGF-β ist viel weitreichender als die Wirkung von IL-10. Dieses Zytokin blockiert die Proliferation von T-Lymphozyten durch die

Unterdrückung der Synthese von IL-2. Darüber hinaus wird die Synthese von IL-3, GM-CSF und von *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) gehemmt und dadurch das Wachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen unterdrückt. Diese immunsuppressiven Zytokine werden auch von kolorektalen Karzinomen sezerniert, um einer Immunantwort zu entgehen (Somasundaram et al. 2002, Kucharzik et al. 1997). Die Induktion einer Th1 oder Th2 Antwort beeinflusst die spezifische antitumorale Immunantwort entscheidend mit. Ghosh et al. vermutete, dass eine Th2 Immunantwort die Tumorprogression begünstigt (Gosh et al. 1995). In einem Tumormodell der Maus konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer Th2 Immunantwort durch den Tumor eine erfolgreiche Tumorabstoßung verhinderte.

Einige Mechanismen, durch die sich der Tumor einer erfolgreichen Immunüberwachung entzieht, basieren auf der Modulation der Expression von Molekülen, die direkt die Interaktion mit Immunzellen betreffen bzw. deren Aktivierung beeinflussen (Restifio et al. 1993). Für verschiedene Tumorentitäten, darunter auch für kolorektale Karzinome, ist die Herunterregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen und eine herabregulierte Expression der Transportproteine TAP-1 und TAP-2 (*transporter associated with antigen presentation*), die für den Transport von Peptiden in das endoplasmatische Retikulum - einem zentralen Schritt in der Antigenpräsentation - verantwortlich sind, beschrieben (Kaklamanis et al. 1994). Obwohl bei kolorektalen Karzinomen eine Reihe von Tumorantigenen charakterisiert wurden (Mulder et al. 1995, Yoshida et al. 1995, Kotera et al. 1994), können diese bei fehlendem MHC-I-Komplex nicht funktionell wirksam auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden. Daraus resultiert eine reduzierte Immunogenität der Tumorzelle.

Für eine erfolgreiche Immuntherapie müssen die Mechanismen der Toleranzinduktion durch den Tumor zunächst verstanden und dann überwunden werden.

2.6 Die Tumorzelle als Antigen-präsentierende Zelle

2.6.1 Tumorassoziierte Antigene beim kolorektalen Karzinom

Da T-Zellen eine zentrale Rolle bei der immunologischen Kontrolle von Tumoren spielen, stellte vor über zehn Jahren die Entdeckung des ersten humanen tumorassoziierten Antigens (TAA), dem so genannten MAGE-1, einen Durchbruch in der Tumorimmunologie dar (van der Bruggen et al. 1991). TAAs werden über MHC-Moleküle präsentiert und können so vom Immunsystem erkannt werden. Während zunächst nur die Charakterisierung von TAAs möglich war, gegen die bereits CTLs etabliert worden waren (Wölfel et al. 1993, van den Eynde et al. 1989), konnten in den letzten Jahren effizientere Strategien entwickelt werden. Zu diesen gehört auch die SEREX-Methode, bei der TAAs über serologische Methoden identifiziert werden können (Sahin et al. 1997). Bei den TAAs können fünf verschiedene Gruppen unterschieden werden, die Differenzierungsantigene, überexprimierte Antigene, so genannte *cancer-testis*-Antigene, mutierte Antigene und virale Antigene (Renkvist et al. 2001, Coulie et al. 1999, Boon und Old 1997).

Auch bei kolorektalen Karzinomen wurden tumorassoziierte Antigene gefunden (Mulder et al. 1995, Yoshida et al. 1995, Kotera et al. 1994). Zu diesen zählen unter anderen das Carcinoembrionale Antigen (CEA), die Tumorsuppressorgene ras und p53, Erythrozyten Polyagglutinations-Antigene T, Tn und Tk sowie die Glycoproteine Tag-72 und Ep-CAM (*epithelial cell adhesion molecule*). Peptidfragmente von CEA können HLA-restringiert eine zytotoxische T-Zell-Antwort bedingen (Tsang et al. 1995).

Mehrere klinische Studien der Phase I wurden bei Patienten mit kolorektalem Karzinom inzwischen unter Einsatz von TAA durchgeführt (Mosolits et al. 2004, Ullenhag et al. 2004, Sato et al. 2004). Die bisherigen Ergebnisse der antigenspezifischen Peptidvakzinationen sind zwar im Rahmen der jeweiligen Studie durchaus als positiv zu beurteilen, erfahren aber eine Relativierung im Hinblick auf das Ziel, eine wirksame, allgemein anwendbare Therapiestrategie zu etablieren, die letztendlich zu einer Heilung des Tumorleidens führen soll.

2.6.2 Gentransfer von kostimulatorischen Molekülen

Wegen der zahlreichen unterschiedlichen Mechanismen, die von malignen Zellen benutzt werden, um der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen, werden auch verschiedene Wege für eine erfolgreiche Immuntherapie verfolgt. Über die Entwicklung von so genannten Tumorstoffen, die die Immuntoleranz des Abwehrsystems durchbrechen sollen, wird versucht eine effiziente, dauerhafte Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren. Da bei der Tumorbekämpfung die zelluläre adaptive Immunantwort im Vordergrund steht, sollte bei Tumorstoffgaben die Physiologie der T-Zell-Aktivierung berücksichtigt werden. Wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben, sind die Interaktionen zwischen den Tumorzellen und dem Immunsystem sehr komplex. Tumorstoffe können als extrazellulär aufgenommene Proteine von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert und über MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Zellen präsentiert werden. Die Kostimulation spielt dabei eine wesentliche Rolle für eine effiziente Aktivierung der T-Zellen. Viele Tumorzellen präsentieren aber auch auf ihrer eigenen Zelloberfläche endogene Tumorstoffe über den MHC-I-Komplex.

Die Transfektion von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen scheint dabei ein viel versprechender Ansatz in der Behandlung von malignen Tumoren zu sein. In zahlreichen Grundlagenarbeiten wurde gezeigt, dass durch die Transfektion des kostimulatorischen Membranproteins B7-1 in Zellen verschiedener Tumorentitäten, die nativ kein B7-1 exprimierten, eine erfolgreiche Tumorbekämpfung induziert werden konnte (Baskar 1996, Chamberlain et al. 1996, Fujii et al. 1996, Gajewski 1996). Die Transfektion des kostimulatorischen Membranproteins B7-1 führte somit zur Auslösung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort (Chen et al. 1992, Townsend et al. 1994), d.h. die Tumorzellen selbst können die Rolle von "professionellen" APCs übernehmen.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Transfektion des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls 4-1BB-Ligand. *In vitro* induzierten 4-1BB-Ligand-transfizierte Tumorzellen die Aktivierung von T-Zellen und peripheren mononukleären Zellen (Yoshida et al. 2003) und führten *in vivo* im murinen Tumormodell zu einer deutlich verstärkten Immunantwort gegen die Tumorzellen (Guinn et al. 2001).

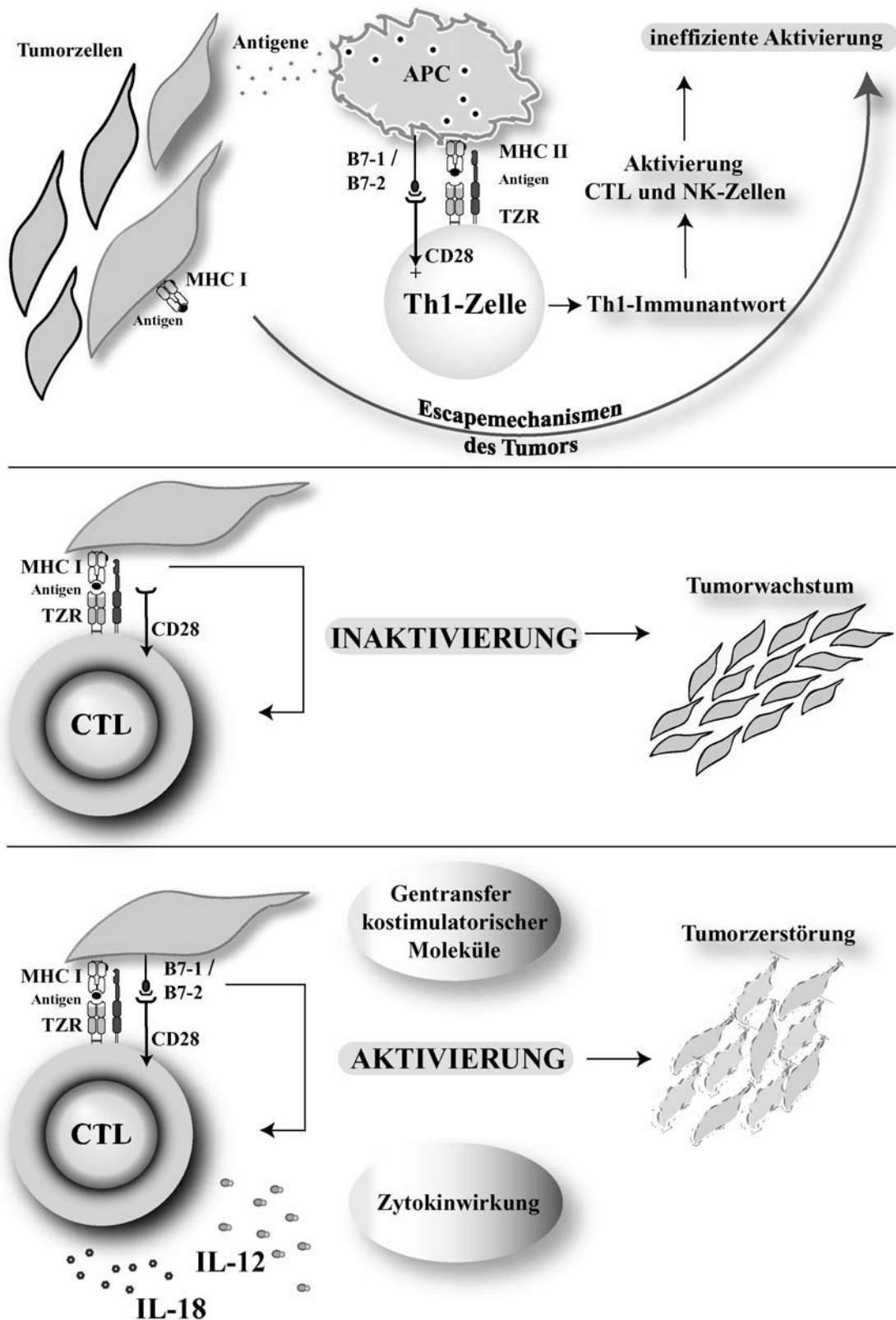


Abbildung 2.6 Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CTL) im Rahmen einer Antitumor-Immunantwort. Oben der „klassische Weg“ durch eine Antigen-präsentierende Zelle. Fehlen kostimulatorische Signale (mittlere Abbildung) werden CTL inaktiviert. Durch Transfektion von Tumorzellen mit kostimulatorischen Molekülen und in Anwesenheit von Zytokinen kann eine effektive Antitumor-Antwort induziert werden (unten).

Die primäre Immunogenität der verwendeten Tumorzelllinien ist für diesen Ansatz von erheblicher Bedeutung (Chen et al. 1994) und limitiert die Anwendbarkeit für schwach immunogene Tumoren. So konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion mit B7-1 alleine in manchen Tumormodellen nicht ausreichend für die Induktion einer wirksamen T-Zell-vermittelten Immunantwort war (Baskar et al. 1995). Auch die Transfektion von 4-1BB-Ligand führte bei schwach immunogenen Tumoren nicht zu einer effizienten Immunantwort (Xiang 1999). Bei einigen murinen Tumormodellen konnte die Kombination von B7-Molekülen mit 4-1BB-Ligand eine effektivere Immunantwort induzieren als beide kostimulatorischen Moleküle alleine (Guinn et al. 1999, Melero et al. 1998).

Zytokine, die entweder von den Tumorzellen selbst oder von den sie umgebenden Zellen ausgeschüttet werden, bestimmen wesentlich die Art und Weise, in der das Immunsystem reagiert. Für IL-12 und IL-18 alleine (Heuer et al. 1999, Chen et al. 1997) und in Kombination (Hikosaka et al. 2004, Liebau et al. 2002, Coughlin et al. 1998) sind Antitumor-Effekte beschrieben worden. Auch die Kombination von Zytokinen mit kostimulatorischen Molekülen führte zu einer effizienten Immunantwort. Das konnte vor allem in murinen Tumormodellen für die Kombinationen B7-1 und IL-12 (Hull et al. 2000, Zitvogel et al. 1996), 4-1BB-Ligand und IL-12 (Martinet et al. 2002, Martinet et al. 2000, Chen et al. 2000) sowie B7-1 und IL-18 (Cho et al. 2000) gezeigt werden. Arbeiten, in denen der Effekt von IL-12 und IL-18 in Kombination mit B7-1- und / oder 4-1BB-Ligand-Transfektion beschrieben wird, sind in der Literatur nicht zu finden.

Die Tumorzelllinie HT-29 erscheint zur Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung von IL-12 und IL-18 in Kombination mit der Transfektion der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und / oder 4-1BB-Ligand bei kolorektalen Karzinomen besonders geeignet. HT-29 gehört zu den experimentell am häufigsten eingesetzten kolorektalen Tumorzelllinien, ist bereits sehr gut charakterisiert und die Ergebnisse zahlreich veröffentlicht worden. Relevante immunologische Eigenschaften wie die Expression von MHC-Molekülen (Donnet-Hughes et al. 1995), Adhäsionsmolekülen (Kelly et al. 1992) und Tumorantigen (Guadagni et al. 1990) sind bereits beschrieben und lassen sich durch IFN- γ regulieren.

3 Methoden

3.1 Kultur der Tumorzellen

3.1.1 Kulturmedium

Für die Zubereitung des Kulturmediums wurde RPMI-1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalen Kälberserum (FKS) (beides Biochrom, Berlin), 2 mM L-Glutamin (GibcoBRL, Paisley, USA), 100 µg/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA) versetzt. Das beschriebene, supplementäre Kulturmedium wurde für die Kultivierung der Zellen und die Verdünnung der einzelnen Substanzen eingesetzt.

3.1.2 Zelllinien

Die humane, kolorektale Tumorzelllinie HT-29 (ATCC HTB-38) wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) erworben und bereits im Vorfeld in der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Universität München, unter Prof. Dr. med. S. Endres erfolgreich mit Plasmid-DNA, die für B7-1 kodiert und ein Neomycinresistenzgen enthält, transfiziert. Das Plasmid (ein Adeno-assoziiertes Virus (AAV)-Plasmid) wurde freundlicherweise von Dr. med. U. Hacker und Dr. med. T. Röhnisch (Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. M. Hallek, Genzentrum der Universität München) zur Verfügung gestellt.

Die B7-1 cDNA wird durch einen CMV-Promotor, die Neomycinkassette durch einen SV40-Promotor gesteuert. Das Plasmid enthält zwei *inverted terminal repeats* (ITR) und eine für die Ampicillinresistenz kodierende Sequenz (Wendtner et al. 1997). In den Versuchen wurde mit Wildtyp, B7-1- und Neomycin-Transfektanten der HT-29 Tumorzellen gearbeitet. Die Tumorzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Trypsinierung und Mediumwechsel wurden jeden 2. bis 3. Tag ca. 10 % der Tumorzellen umgesetzt.

3.2 Isolierung von T-Lymphozyten

3.2.1 Präparation von mononukleären Zellen

Zur Präparation der Zellen modifiziert nach Böyum (1968) wurden freiwilligen Probanden durch Punktion einer Armvene Blut entnommen. Diese waren nach eigenen Angaben nüchtern, gesund und hatten in den letzten 14 Tagen keine Medikamente eingenommen.

Das Blut wurde unter sterilen Bedingungen in 50 ml Perfusorspritzen (Braun, Melsungen), die 50 I.E. Na-Heparin pro ml Blut enthielten, abgenommen. Pro 15 ml heparinisiertes Blut wurde ein Trennröhrchen (LeukoSep, Greiner, Frickenhausen) mit 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung (Spezifische Dichte 1,077 g/ml, Biochrom, Berlin) beschichtet und zentrifugiert. Dadurch gelangte die Ficoll-Lösung durch die Filterscheibe in den unteren Teil des Röhrchens.

Es wurde nun 15 ml heparinisiertes Blut und 15 ml sterile NaCl-Lösung (0,9 %) zugegeben. Die durch die anschließende Zentrifugation bei 1000 g und Raumtemperatur (RT) an der Grenzschicht entstandenen Zellringe wurden abpipettiert und mit NaCl (0,9 %) auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgten 3 Waschschrte durch Zentrifugation und Resuspension in NaCl (0,9 %).

Um die für den T-Zell-Proliferationsassay benötigten, hochaufgereinigten T-Zellen aus den vorliegenden mononukleären Zellen zu isolieren, wurden diese als Vorbereitung für den nächsten Schritt (siehe 3.2.2) nach dem dritten Waschgang in PBS Dulbecco's (Gibco) (mit 0,5 % FKS und 2 mM EDTA, steril filtriert, 4 °C) aufgenommen. Die Zellviabilität und Zellzahl wurde nach Trypanblau-Färbung durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt.

3.2.2 Immunomagnetische T-Zell Isolation mittels *magnetic-activated cell sorting* (MACS)

Das *magnetic-activated cell sorting* ermöglicht eine Selektion von Zellen mit definierten Oberflächenmolekülen. Bei positiver Selektion werden die erwünschten Zellen, bei negativer Selektion, der so genannten Depletion, die nicht erwünschten Zellen markiert und angereichert.

Dabei können Zellen direkt in einem Schritt mit spezifischen, gegen diese definierten Oberflächenmoleküle gerichteten und gleichzeitig metallisch konjugierten Antikörpern oder indirekt über einen zweiten Schritt, bei dem der metallisch konjugierte Antikörper gegen den ersten spezifischen Antikörpern gerichteten ist, markiert werden. Die so markierten Zellen durchlaufen eine Säule, deren Magnetismus gezielt ein- und ausgeschaltet werden kann.

Bei positiver Selektion bleiben nur die anzureichernden Zellen in der Säule und können nach Abschalten des Magnetismus aus der Säule eluiert werden. Bei der Depletion durchlaufen die erwünschten Zellen unmarkiert die Säule und werden im Durchlauf (*flow-through*) aufgefangen.

Für die Selektion von T-Zellen wurde ein VarioMACS Gerät mit Depletionssäulen vom Typ BS für bis zu 10^8 markierte Zellen verwendet. Der *Pan T Cell Isolation Kit* (alles von Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) führte durch eine Depletion aller Nicht-T-Zellen aus einer *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC)-Suspension mittels indirekter Markierung zur Isolation von hochaufgereinigten CD3⁺-T-Zellen.

Dabei wurden alle Nicht-T-Zellen (v.a. B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, Dendritische Zellen, Thrombozyten) zunächst mit einem Hapten-konjugierten CD11b-, CD16-, CD19-, CD36- und CD56-Antikörper-Cocktail inkubiert. Durch die anschließende Inkubation mit monoklonalen Anti-Hapten-Antikörpern, die mit MACS MicroBeads metallisch konjugiert sind, wurden die oben genannten Zellen magnetisch markiert und depletierten im Magnetfeld der MACS-Säule.

Die Reinheit der so erhaltenen T-Zellen konnte unter Einsatz der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Mit dieser Methodik wurden erfolgreich T-Zellen von verschiedenen Spendern isoliert und ohne Verzögerung in den Proliferationsassays eingesetzt.

3.3 Durchflusszytometrie

3.3.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (*fluorescent-activated cell sorting*, FACS) stellt ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar. Gemessen werden dabei optische Signale unterschiedlicher Qualität, Fluoreszenz und Streulichtemission, die beim Kontakt eines Partikels mit einem Lichtstrahl entstehen. Das Messprinzip beruht auf der Methode der „hydrodynamischen Fokussierung“, bei der mittels zweier Flüssigkeitsströme, Hüll- und Probenstrom, die Zellen kontinuierlich hintereinander aufgereiht und mit hoher Geschwindigkeit auf die Meßstelle zugeführt und im rechten Winkel von der Lichtquelle, einem LASER (*light amplification by stimulated emission of radiation*), bestrahlt werden.

Bei der hier angewandten Methode der Immunofluoreszenz liegen die Farbstoffe, die Fluorochrome, an monoklonale Antikörper konjugiert vor, mit denen die Zellen markiert werden. Vom Messpunkt aus wird das Streulicht des einfallenden Lichts im engen Winkel (0-10°) (Vorwärtsstreulicht, *forward angle light scatter*, FSC) und im rechten Winkel (Seitwärtsstreulicht, *side scatter*, SSC) gemessen. FSC liefert Informationen über die Zellgröße, SSC über Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle.

Die optischen Signale werden über Photodetektoren in elektrische Signale umgewandelt und logarithmisch über einen Bereich von 4 Dekaden verstärkt. Die in Volt registrierte Signalintensität wird über einen Analog-/Digitalwandler in eine Klassenzahl konvertiert und vom angeschlossenen Computer als Listendatei gespeichert. Um die Datenauswertung auf die Zellpopulation einzugrenzen, die von Interesse ist, wird die weitere Analyse nur in einem bestimmten Bereich der Parameter durchgeführt. Dieses Auswertungsfenster wird auch *gate* oder *bitmap*, der Vorgang des Eingrenzens auch *gating* genannt.

Die Einparameterdarstellung der Messergebnisse beschreibt als Histogramm die Verteilung eines Parameters (Zelleigenschaft) innerhalb einer Population (Zellpopulation). Die korrelierte Zweiparameterdarstellung zeigt die Relationen zwei verschiedener Parameter eines Partikels an (z.B. Korrelation von FCS mit SSC einer Zelle), graphisch als Zweiparameter-Punktehistogramm (*dot plot*) dargestellt. Die Punktdichte steht dabei für die Häufigkeitsverteilung einer Eigenschaft.

3.3.2 Methodik

In dieser Arbeit wurde ein Durchflusszytometer mit luftgekühltem Argonionen-Laser mit einer 488-nm-Emissionslinie und 15 mW Leistung eingesetzt (Coulter Epics XL-MCL, Hialeah, Florida, USA). Die Markierung der Zellen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Pro Messung wurden dafür 10^5 Zellen in 50 μ l FACS-Puffer (PBS mit 4 % FKS) aufgenommen und nach Zentrifugation (400 g, 4 °C, 5 Minuten) 5 μ l Antikörper zugegeben. Es wurden Antikörper verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder R-Phycoerythrin (PE) konjugiert waren. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte für 20 bis 30 Minuten bei 4 °C. Überschüssige Antikörper wurden vor Messung mit FACS-Puffer ausgewaschen.

Die Einstellungen des Durchflusszytometers wurden vor jeder Messung mit Partikeln von definierter Größe und Fluoreszenzintensität geeicht (Kalibrierung der Lasereinstellung, Immuno Check, Coulter, Hialeah, USA) und während der Messungen beibehalten. Als Bezugsgröße für jede Messung wurden Zellen mit einem definiert nicht-spezifisch bindenden Antikörper des gleichen Isotyps und der gleichen Farbstoffkonjugation inkubiert und gemessen (Isotypkontrolle).

Die Signalverstärkung für FSC, SSC und Fluoreszenzen wurde so gewählt, dass aufgrund der unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften der Zellen im Punktehistogramm ein Zielbereich für die als positiv zu bewertenden Zellen eingegrenzt werden konnte. Durch eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) konnten avitale Zellen ausgeschlossen werden.

Isotypkontrolle	FITC-konjugierte monoklonale Maus Antikörper (FITC-AK) IgG1, IgG2a
	PE-konjugierte monoklonale Maus Antikörper (PE-AK) IgG1, IgG2a
T-Zell-FACS	FITC CD3, CD4, CD8, CD14, CD20 PE CD20
Tumorzellen-FACS	FITC B7-1, MHC-I (HLA-A, B, C), MHC-II (HLA-DR, DP, DQ) PE MHC-II (HLA-DR, DP, DQ)

Tabelle 3.1 Antikörper, die in der Durchflusszytometrie eingesetzt wurden (alle Antikörper von Pharmingen, San Diego, USA).

3.4 T-Zell-Proliferationsassay

3.4.1 Prinzip

Binden *in vivo* MHC-Antigen-Komplexe auf der Oberfläche von APCs an den TZR, kommt es zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. Diesem Ansatz folgend wurde im vorliegenden Proliferationsassay eine allogene, polyklonale Population aus T-Zellen gesunder Blutspender (siehe 3.2) mit Tumorzellen als APCs konfrontiert. Neben der Antigenpräsentation wurde auch der Einfluss von Zytokinen, die eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielen, untersucht. Die Quantifizierung der T-Zell-Proliferation erfolgte über die Messung eingebauter, radioaktiv markierter Nukleotide.

3.4.2 Inaktivierung von Tumorzellen

Als Inaktivierungsverfahren wurde die Bestrahlung mit UV-B Licht (302 nm, LKB 2011 Macrovue Transilluminator, Bromma, Schweden) gewählt. Um eine geeignete Bestrahlungsdauer festzulegen, wurde eine Testreihe durchgeführt. Hierbei zeigte sich,

dass bei einer Bestrahlungsdauer von 60 Sekunden die Eigenproliferation der Tumorzellen unterbunden wurde, ohne die Expression der Oberflächenmoleküle (MHC-I, MHC-II und B7-1) zu verändern. Je 5×10^3 Tumorzellen wurden entsprechend dem jeweiligen Pipettierschema in 100 μ l Kulturmedium in eine unbeschichtete 96-Loch (*well*) Rundbodenplatte (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5 prozentiger CO₂ Atmosphäre für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die 96-*well* Platte für 60 Sekunden einem homogenen UV Bestrahlungsfeld ausgesetzt.

3.4.3 Stimulation und Inkubation der T-Zellen

Das optimale Verhältnis Tumorzelle (Target) zu T-Zelle (Effektor) wurde in einem gesonderten Titrationsversuch bestätigt und betrug 1:10. T-Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, isoliert und in Kulturmedium aufgenommen. Pro *well* wurden zu den Tumorzellen je 5×10^4 T-Zellen pipettiert.

Zur Antigen-abhängigen Proliferation der T-Zellen durch Antigen-präsentierende Tumorzellen muss ein weiterer Kostimulus, z.B. in Form von Lectinen, eingesetzt werden. Zur submitogenen Stimulation der T-Zellen diente das Lectin Concanavalin A (ConA, Sigma, MO, USA) in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml. Zu einer maximalen Stimulation der T-Zellen führte die Zugabe des Lectins Phytohämagglutinin (PHA, Boehringer Mannheim) in einer Konzentration von 5 μ g/ml. Die reine PHA-Stimulation der T-Zellen war als Kontrolle ein Bestandteil aller Assays.

Humanes Interleukin-12 (IL-12, R&D Systems, Wiesbaden) und humanes Interleukin-18 (IL-18, R&D Systems, Wiesbaden; Chemicon, Temecula, CA) wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll in Lösung gebracht und je nach Versuchsaufbau bzw. Pipettierschema in Konzentrationen von 0 bis 100 ng/ml pro *well* eingesetzt: Kein Interleukin, nur IL-12, nur IL-18 oder IL-12 und IL-18 in Kombination. Die 96-*well* Platten wurden für 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Allgemeiner Versuchsansatz: Duplikate mit 200 µl Endvolumen			
T-Zellen	Tumorzellen	ConA (0,5 µg/ml) ja/ nein	Interleukine ja/ nein
Versuchsansatz			
T-Zellen	HT29/B7-1	ja	ja
Kontrollen			
T-Zellen	HT29/B7-1	ja	nein
T-Zellen	HT29/B7-1	nein	ja/ nein
T-Zellen	HT29/neo	ja/ nein	ja/ nein
T-Zellen	HT29/Wildtyp	ja/ nein	ja/ nein
	HT29/B7-1	ja/ nein	ja/ nein
	HT29/neo	ja/ nein	ja/ nein
	HT29/Wildtyp	ja/ nein	ja/ nein
T-Zellen		ja/ nein	ja/ nein
T-Zellen		PHA (5 µg/ml)	ja/ nein

Tabelle 3.2 Übersicht über die Versuchsansätze im T-Zell-Proliferationsassay

3.4.4 Messung der Proliferation

Nach 3 Tagen wurden 0,5 µCi/well radioaktiv markiertes [methyl-3H]-Thymidin (Amersham, Buckinghamshire, UK) zugegeben. Zur Auswertung wurden die Zellen 24 Stunden später mittels eines MicroCell Harvesters (Skatron, Transby, Dänemark) auf Filtermatten gefällt und getrocknet. Nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit wurde die in den Zellen inkorporierte Radioaktivität in einem 1205 Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter (Wallac Oy, Turku, Finnland) gemessen.

3.5 Stimulation mononukleärer Zellen

PBMC wurden für die Stimulation mit Interleukinen und anschließende Messung der Interferon- γ -Konzentration im ELISA und für die Präparation von cDNA nach Stimulation mit *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) und Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt. Die Isolation der PBMC erfolgte entsprechend Abschnitt 3.2.1. Nach dem letzten Waschriff der Isolation wurden die PBMC in Kulturmedium aufgenommen und in einer Zelldichte von 10^6 PBMC/ ml in 24-well Platten (Falcon, Becton, Dickinson, UK) ausgesät. Je nach Versuchsaufbau wurde das Kulturmedium mit IL-12 und IL-18 in Konzentrationen von 0 ng/ ml bis 100 ng/ ml supplementiert. Als Kostimulus wurde ConA in submitogener Konzentration von 0,5 μ g/ml eingesetzt. Die Stimulation mit PHA (5 μ g/ml) diente als Kontrolle. Die Inkubationsdauer im Brutschrank betrug 3 Tage. Für die cDNA-Gewinnung wurden PBMC für 20 Stunden mit 1000 U/ml rhGM-CSF (Bachem, Heidelberg bzw. Novartis, Basel, Schweiz) und 10 ng/ml LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma, München) inkubiert.

3.6 Zytokinnachweis (Interferon- γ -ELISA)

Zur Bestimmung der Interferon- γ (IFN- γ)-Konzentration in den zellfreien Überständen der T-Zell-Proliferationsassays und der PBMC-Stimulation wurde ein kommerzieller *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) entsprechend dem Protokoll des Herstellers (human IFN- γ , QuantikineTM, R&D Systems, MN, USA) durchgeführt.

Die IFN- γ Standards und Proben wurden in eine mit einem spezifischen anti-IFN- γ -Antikörper vorbeschichtete 96-well Polystyren-Platte pipettiert, um vorhandenes IFN- γ zu binden. Nach Inkubation und mehreren Waschriffen wurde ein spezifischer, polyklonaler und mit einem Enzym gekoppelter anti-IFN- γ -Antikörper zugegeben und der nicht gebundene Überschuss wieder abgewaschen. Durch dieses Enzym wurde mit nächsten Schritt die hinzupipettierte Substratlösung in einen Farbstoff umgesetzt, dessen Intensität proportional zur initial gebundenen IFN- γ -Menge und über die Messung der Optischen Dichte zu quantifizieren war.

3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.7.1 Materialien

Reaktionsgefäße „Eppendorf-Tube“	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml <i>safe lock</i>	Eppendorf, Hamburg
RNAse freies H ₂ O (DEPC-H ₂ O)	Aqua dest. mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) autoklaviert	
Mineralöl	autoklaviert	Sigma, München
Gelkammer	Wide Mini Sub TM Cell	Bio Rad, München
Agarose		Sigma, München
TBE-Puffer	Elektrophoresepuffer = Tris-Borat-EDTA-Puffer	
	Tris (Tris-hydroxy-Aminomethan) (0,1M)	Paesel+Lorei & Co, Frankfurt
	Borsäure (0,1M)	Sigma, München
	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (2mM)	Titriplex III, Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid		Sigma, München
Blaupuffer, 10x	Glycerol in Aqua bidest. , Bromphenolblau	Sigma, München

Tabelle 3.3 Materialien für PCR

Weitere Geräte, Laborchemikalien und Enzyme sind im Text vermerkt.

3.7.2 Gewinnung der cDNA

RNA-Präparation

Die Isolation der RNA wurde modifiziert nach Chomczynski und Sacci (1987) mit Trizol Reagent (Ein-Phasen-Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, Total RNA Isolation Reagent, GibcoBRL, Karlsruhe) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Der Überstand von stimulierten MNC wurde abgenommen und 10 Minuten bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die adhärenen Zellen in der Kulturflasche mit Trizol Reagent (1 ml pro $5-10 \times 10^6$ Zellen) lysiert und dieses Lysat auf das Zellpellet in den vorher dekantierten Eppendorf-Tubes gegeben. Nach leichtem Vortexen und Inkubation bei RT für 5 Minuten wurde pro ml Trizol Reagent je 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, die Tubes verschlossen und nach ca. 15 Sekunden langem, vorsichtigem Mischen für weitere 3 Minuten bei RT inkubiert.

Zur Phasenauftrennung erfolgte eine Zentrifugation bei maximal 12000 g, 15 Minuten bei 4 °C, nach der sich oben eine wässrige Phase mit der RNA, eine Interphase und am Boden eine organische Phase mit den Membrantrümmern und Proteinen bildete. Die wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und auf Eis gestellt. Die RNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Isopropylalkohol (Isopropanol) und Zentrifugation bei 12000 g, 15 Minuten bei 4 °C nach Inkubation für 10 Minuten.

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zum weiteren Reinigen der als gelartige Pellet vorliegenden RNA je 1 ml Ethanol (75 %) pro ml Trizol Reagent zugeben. Nach kurzem Vortexen wurde durch Zentrifugation (7500 g, 4°C, 5 Minuten) die RNA erneut pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet bei offenem Deckel an der Luft getrocknet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Pellets nicht zu trocken wurden, da sie ansonsten nur schwer wieder gelöst werden konnten. Im nächsten Schritt wurde das RNA-Pellet in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und durch Inkubation bei 55-60 °C für 10 Minuten gelöst.

Anschließend wurde die Konzentration mittels eines Photometers bestimmt. Von den Proben wurden zunächst 1:100 Verdünnungen, falls diese keine Ergebnisse erbrachten 1:10 Verdünnungen, mit Aqua dest. hergestellt und die optische Dichte (O.D.) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentration, angegeben in $\mu\text{g/ml}$, lässt sich aus dem Produkt der O.D. bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 40 errechnen. Das O.D. Verhältnis 260 nm/280 nm gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der RNA. Bei reiner RNA sollte die Ratio $> 1,8$ betragen. Nach Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit 2 μl RNase Inhibitor (RNasin, Behringer Mannheim) versehen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

cDNA-Synthese

Um aus der vorliegenden RNA die für die PCR erforderliche cDNA zu gewinnen, wurde ein Reverse-Transkriptase-Assay durchgeführt. Dafür wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Tube 1 μg der RNA sowie 1 μl Oligo-dT Primer (25 pmol/ μl) (Boehringer Mannheim) mit Aqua bidest. auf 7 μl aufgefüllt, mit Mineralöl beschichtet und 10 Minuten bei 68°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Mit dem „Mastermix“ wurde das Eppendorf-Tube auf ein Volumen von 20 μl aufgefüllt und 75 Minuten bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Von dieser cDNA wurden 5 μl in der folgenden PCR eingesetzt.

5 x Superscript-Plus-Puffer	GibcoBRL, Berlin	4 μl
Superscript-plus MoMuLV-Reverse Transcriptase	GibcoBRL, Berlin	0,5 μl
RNasin® Ribonuclease-Inhibitor (40 U/ μl)	Promega, WI, USA	0,5 μl
dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer Mannheim	4 μl
BSA (Bovine serum albumin) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Boehringer Mannheim	2 μl
DTT (Dithiothreitol) (100 mM)	Boehringer Mannheim	2 μl

Tabelle 3.4 „Mastermix“ für die cDNA-Synthese.

3.7.3 Amplifikationsschritt

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine Vervielfältigung von gezielten DNA-Abschnitten, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, möglich (Kaminski et al. 1993, Saiki et al. 1988). Dabei laufen mehrere Zyklen von Aufschmelzen (Denaturierung) des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung (*Annealing*) sequenzspezifischer Oligonukleotide mit einem freien 3'-OH-Ende (*Primer*) an die Ausgangs-DNA (*Template, Matrix*) und Synthese des komplementären Strangs (*Elongation*) nacheinander ab, was durch Einsatz einer hitzestabilen Polymerase ermöglicht wird. Das Ausgangsprodukt wird so theoretisch exponentiell vervielfältigt, d.h. geringe DNA-Mengen können verstärkt (amplifiziert) und z.B. durch Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen oder zur weiteren Verwendung wie Klonierung eingesetzt werden.

Primer

Anhand publizierter Sequenzen für 4-1BB-Ligand, B7-1 und B7-2 wurden geeignete Primerpaare ausgewählt und von der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) nach dem Phosphoramidit-Verfahren synthetisiert und entsalzt.

DNA	Primer	Sequenz (5' zu 3')	[°C]
4-1BB-Ligand Alderson MR <i>et al.</i> (1994)	h-4-1BBL-1/16	ATGGAATACGCCTCTG	48
	h-4-1BBL-765/751	TTATTCCGACCTCGG	46
B7-1 Freeman GJ <i>et al.</i> (1989)	h-B7-1-1/15	ATGGGCCACACACGG	50
	h-B7-1-867/851	TTATACAGGGCGTACAC	50
B7-2 Azuma M <i>et al.</i> (1993)	h-B7-2-1/15	ATGGGACTGAGTAAC	44
	h-B7-2-972/956	TTAAAAACATGTATCAC	42

Tabelle 3.5 Primersequenzen. Links sind die Referenzen für die Nukleotidsequenzen angegeben, rechts die Annealingtemperatur der Primer in °C.

Weitere sechs Primer wurden durch eine 12 bp-Sequenz [TATAGCGGCCGC], die eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NOT-I [GC//GGCCGC] enthielt und an das 5'-Ende der in Tabelle 3.5 dargestellten Nukleotidsequenz angehängt wurde, konstruiert. Als Kontrollprimer dienten Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) Primer ([GAPDH]-Forward und Reverse Primermix R&D Systems, Wiesbaden) mit folgenden Sequenzen:

GAPDH Forward Primer	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH Reverse Primer	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

Die Gibco-Primer wurden in Aqua bidest. gelöst und die theoretisch berechnete Konzentration über eine Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Dazu wurden für ein 2,5 % Agarosegel 3 g Agarose und 120 ml TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben erhitzt. Vor dem Gießen des Gels wurde 6 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Als Marker diente die 100 bp DNA Ladder (GibcoBRL, Paisley, GB) und eine definierte Menge des GAPDH-Primermix.

Von 1:10, 1:20 und 1:100 Verdünnungen der Primer wurden je 10 µl mit 1 µl Blaupuffer in die Geltaschen eingefüllt, die Elektrophorese zunächst bei 50 V gestartet, bis die Proben ins Gel eingelaufen waren, und dann bei 100 V bis zum Ende weitergeführt. Das Gel wurde unter UV-Licht (LKB 2011 Macrovue Transilluminator, Bromma, Schweden) mit einem Polaroid-Negativfilm (Polaroid Type 665 Positive/Negative Black & White Instant Pack Film, Sigma, München) mit Blende 4,5 und je nach Signalstärke 30 – 60 s Belichtungszeit fotografiert (Polaroid MP4 Land Camera Polaroid, Cambridge, USA). Das Negativ wurde in einer 18 prozentigen Natriumsulfidlösung (Sigma, München) entwickelt. Die Konzentration der Primer konnte im Vergleich zum Kontrollprimer und anhand der 100 bp DNA Ladder abgeschätzt werden.


PCR-Reaktion

Das PCR-Reaktionsvolumen betrug 25 μ l. Von jedem Primer wurden pro Reaktion 3 pmol, d.h. von einem Primerpaar insgesamt 6 pmol in 5 μ l sowie 15 μ l „Mastermix“ in das Reaktionsgefäß pipettiert und nach kurzem Mischen mit 50 μ l Mineralöl beschichtet. Die cDNA (5 μ l) wurde, erst kurz bevor die Eppendorf-Tubes in den Thermocycler (Thermocycler 100, Biomed, Theres) gegeben wurden, hinzugefügt.

dNTP	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM	PCR Nucleotide Mix, Boehringer Mannheim	1,0 μ l
10x NH4 Buffer	160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670 mM Tris-Cl, pH 8.8, 25 °C, 0.1 % Tween -20)	Pan Biotech, Aidenbach	2,5 μ l
BSA	Bovine Serum Albumin (50 μ g/ μ l)	Boehringer Mannheim	1 μ l
MgCl₂	(50 mM)	Pan Biotech, Aidenbach	1,0 μ l
PanScript DNA Polymerase	(5 U/ μ l)	Pan Biotech, Aidenbach	0,3 μ l
Aqua bidest			9,25 μ l

Tabelle 3.6 “Mastermix” für PanScript DNA Polymerase (Pan Biotech, Aidenbach)

Die PCR wurde überwiegend mit der PanScript DNA Polymerase und dem folgenden Programm durchgeführt:

Initialer Denaturierungsschritt	95°C	60 s	
Weitere Denaturierungsschritte	95°C	60 s	
Primärannealingschritt	48°C/ 53°C/ 58°C	30 s	
Syntheseschritt	72°C	30 s	
Finaler Syntheseschritt	72°C	300 s	

Annealing-Temperatur und $MgCl_2$ Konzentration (1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM) variierten bei einigen Versuchen abhängig von den eingesetzten Primern.

Gelelektrophorese

PCR-Produkte können durch Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen werden. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden DNA-Fragmente durch die Maschenstruktur des Agarosegels nach ihrer Größe und Form aufgetrennt und können durch Ethidiumbromid, welches in den Doppelstrang interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Ein 1,5 % Agarosegel wurde mit 20 μ l PCR-Produkt und 2 μ l Blaupuffer pro Spur beladen. Als Marker dienten DNA Molecular Weight Marker III (0,12 – 21,2 kbp, Konzentration 0,25 μ g/ μ l, Boehringer Mannheim) sowie die 1 kb DNA Ladder (0,5 – 12 kbp, Konzentration 1,0 μ g/ μ l) und die 100 bp DNA Ladder (beide GibcoBRL Paisley, GB). Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt und das Gel im Anschluss fotografiert.

3.7.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Unter ultraviolettem Licht wurden die Banden mit dem Skalpell herausgeschnitten, gewogen und in ein 2,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit dem Gel Extraktions-Kit *Jet Quick Spin Column Technique* (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen, D) wurde die DNA entsprechend dem Protokoll des Herstellers aus der Agarose isoliert. Die Konzentrationsabschätzung des PCR-Produkts erfolgte nach demselben Prinzip wie in Abschnitt 3.7.4 (Primer) über eine 1,5 % Agarosegel-Elektrophorese.

Die Sequenzierung wurde durch die MediGenomix GmbH (Planegg/Martinsried) mit den bei der PCR eingesetzten Primern durchgeführt. Das Sequenzierungsergebnis wurde mit dem Software-Programm DNAsis (Version 6,0; Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit den publizierten Sequenzen verglichen.

3.8 Konstruktion von Expressionsvektoren

3.8.1 Materialien

LB - Medium (pro Liter)

Bacto Trypton	(BD Difco, NJ, USA)	10 g
Bacto Hefeextrakt	(BD Difco, NJ, USA)	5 g
NaCl		5 g
NaOH (5M)		0,2 ml

In 1000 ml Aqua bidest., pH 7,0. Mindestens 25 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

LB - Agar Platten (pro Liter)

Bacto Trypton	(BD Difco, NJ, USA)	10 g
Bacto Hefeextrakt	(BD Difco, NJ, USA)	5 g
Bacto Agar	(BD Difco, NJ, USA)	15 g
NaCl		5 g
NaOH (5M)		0,2 ml

In 1000 ml Aqua bidest., pH 7,0. Mindestens 25 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Auf 55 °C abkühlen, Antibiotikum hinzufügen und Platten gießen.

Antibiotika

Ampicillin	(Sigma, München)
Kanamycin	(Invitrogen, Groningen, NL)

TE Puffer (pro Liter)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris, 1M, pH8,0)	10 ml (10 mM)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA, Titriplex III, pH 8,0)	2 ml (1mM)
Aqua bidest.	Add 1 L

TAE - Puffer (pro Liter)

Tris	40 mM
Natriumacetat	40 mM
EDTA (pH 8,5)	1 mM

3.8.2 Transformation von kompetenten Zellen

Kompetente Zellen (DH5-alpha Competent Cells, Clontech, CA, USA) wurden nach einer modifizierten Variante des Hanahan-Protokolls (Maniatis et al. 1989, Hanahan 1983) mit Plasmid-DNA transformiert und positive Klone auf Antibiotika-haltigen LB-Agar Platten selektiert.

Plasmid	Genomische Sequenz	Erhalten von	Antibiotika	
			Resistenz	Selektion
pSUB/Cep4-B7-1 (AAV Vektor)	B7-1 Sequenz in pSUB/Cep4	Genzentrum Universität München (Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. M. Halleck)	Ampicillin	50 µg/ml
pSUB/Cep4-B7-2 (AAV Vektor)	B7-2 Sequenz in pSUB/Cep4		Ampicillin	50 µg/ml
pCR-BluntII- Topo-4-1BBL	4-1BBL Sequenz in pCR-Topo-Blunt II (Invitrogen, NL)		Kanamycin	50 µg/ml
pTracer CMV2		Invitrogen, NL	Ampicillin	50 µg/ml

Tabelle 3.7 Plasmide, die in *E.coli* DH5αF' amplifiziert wurden.

3.8.3 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden in Abhängigkeit von der weiteren Verwendung verschiedene Methoden verwendet:

Isolation von Plasmid-DNA nach der Minipräparationsmethode

Die Minipräparation der positiven Klone erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Birnboim et al. (1979) und Ish-Horowicz et al. (1981). Dabei wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse isoliert. Je 2 ml Übernachtskultur wurden pelletiert und in 100 µl Lysepuffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTA,

pH 8,0; 100 µg/l RNase) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl alkalische SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS) zugesetzt. Die Proteine und Zellbruchstücke wurden durch Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,5) ausgefällt. Der Überstand wurde mit 400 µl Phenol:Chloroform (1:1) gereinigt und anschließend abzentrifugiert (5 min, 12000 g, 4 °C). Die DNA wurde durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol (100 %) gefällt und durch erneute Zentrifugation (5 min, 12000 g, 4 °C) pelletiert. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

Isolation hochreiner Plasmid-DNA für die Sequenzierung und Ligation

In Abhängigkeit von der benötigten Menge an Plasmid-DNA wurden der *QIAGEN-tip 500 Endofree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) und der *Wizard® Plus Midiprep und Maxiprep DNA Purification System-Kit mit Vac-Man™ Laboratory Vacuum Manifold* (Promega, Mannheim) entsprechend dem Herstellerprotokoll für die Isolation verwendet.

3.8.4 Herstellung der DNA-Fragmente

Restriktionsverdau

Die Spaltung der DNA mit den Restriktionsendonukleasen Nru I, Not I, Xba I und Asp 718I (alle Boehringer Mannheim) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in den jeweiligen Inkubationspuffern durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze mit TE-Puffer auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Aus den Plasmiden pSUB/Cep4-B7-1, pSUB/Cep4-B7-2 und pCR-BluntII-Topo-4-1BBL wurde ein Insert, das die jeweilige genomische DNA-Sequenz enthielt, herausgeschnitten. Der Vektor pTracer CMV2 wurde für die Ligation linearisiert.

Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in 0,8 - 1,5 prozentigen Agarosegelen mit 1 x TAE als Gelpuffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid im Gel bei 150 V und 0,15 A aufgetrennt. Als Marker dienten der DNA Molecular Weight Marker III (Boehringer Mannheim) und 1 Kb DNA Ladder (GibcoBRL).

DNA-Gelextraktion

Spezifische DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Gelextraktions-Kit *Jet Quick Spin Column Technique* (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen) isoliert. Die Konzentration wurde photometrisch über die Messung der optischen Dichte bestimmt.

3.8.5 Ligation, Transformation und Selektion rekombinanter Klone

Bei der Klonierung von genomischen DNA-Fragmenten wurden 50 ng linearisierte Vektor-DNA pTracer CMV2 (Invitrogen) in einem Volumen von 20 µl mit der 5- bis 10-fach molaren Menge des isolierten DNA-Fragmentes in 2 µl 10 x Ligationspuffer und 0,5 µl T4-DNA Ligase (5 Units/µl, Fermentas) gemischt und mindestens 1 Stunde bei 22 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde die T4 DNA Ligase durch Erhitzen auf 65 °C für 10 Minuten inaktiviert. Die Transformation in den Bakterienstamm DH5-alpha wurde nach dem Hanahan-Protokoll durchgeführt (Maniatis et al. 1989). Positive Klone wurden durch DNA-Minipräparationen und anschließende Restriktionsanalysen identifiziert und für eine Retransformation eingesetzt. Die dabei selektierten positiven Klone wurden über eine Midipräparation aufgereinigt.

3.8.6 Sequenzierung der neuen Expressionsvektoren

Die Sequenzierung wurde durch die MediGenomix GmbH (Planegg/Martinsried) mit den für die genomische DNA-Sequenz spezifischen Primern (siehe Abschnitt 3.7.3) und Standard-Primern durchgeführt. Das Sequenzierungsergebnis wurde mit dem Software-Programm DNAsis (Version 6,0; Pharmacia, Uppsala, Schweden) analysiert und anhand des Programms BLAST (*Basic local alignment search tool*, Altschul et al.1997) mit den publizierten Sequenzen verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.9 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wird als Standardfehler des Mittels (*standard error of mean*, S.E.M.) dargestellt. Der zweiseitige Student t-Test für verbundene Stichproben wurde zum Vergleich der Mittelwerte durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

Erster Teil

4.1 T-Zellaktivierung durch B7-1-transfizierte HT-29 Kolonkarzinomzellen

4.1.1 Expression immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle auf transfizierten HT-29 Zellen

Vor Einsatz der transfizierten HT-29 Zellen im T-Zell-Proliferationsassay wurde durchflusszytometrisch die Expression von Oberflächenmarkern, die zur Induktion einer T-Zell-Aktivierung beitragen, untersucht. Sowohl die HT-29/neo Zellen, die mit einem nur für die Antibiotikaresistenz kodierenden Kontrollvektor transfiziert worden waren, als auch die B7-1-Transfektanten zeigten dabei eine hohe Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und eine erwartungsgemäß fehlende Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen.

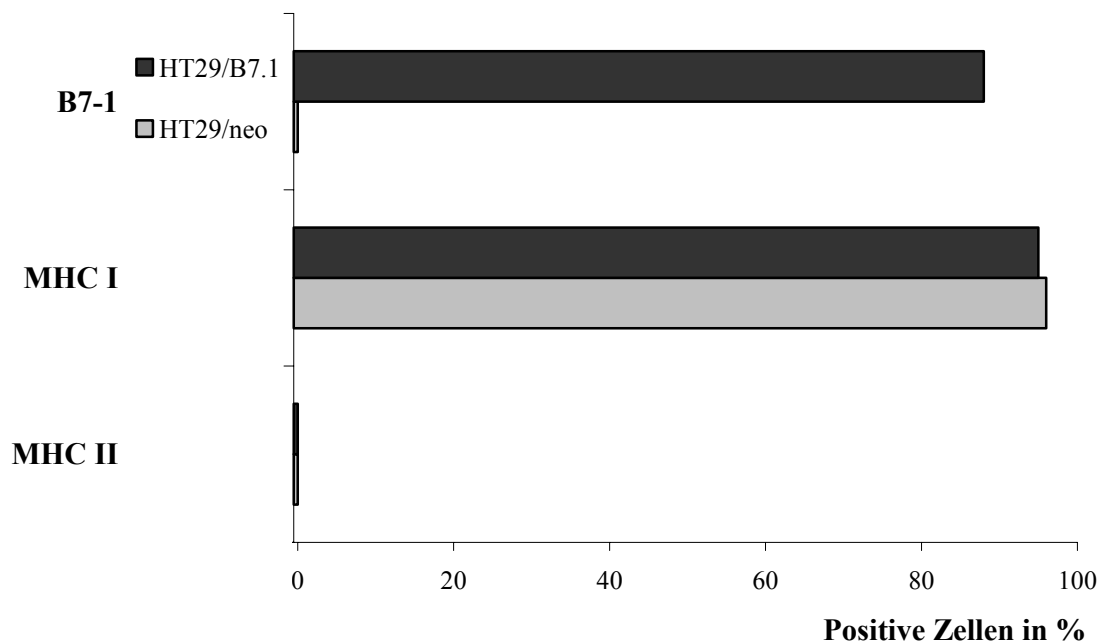


Abbildung 4.1 Expression von MHC I, MHC II und B7-1 auf transfizierten HT-29 Kolonkarzinomzellen. Das kostimulatorische Molekül B7-1 wird von 88 % der HT-29/B7-1 Zellpopulation exprimiert. Fehlende B7-1-Expression bei den mit einem Neomycinresistenz-Gen transfizierten HT-29 Zellen.

4.1.2 Inaktivierung der HT-29 Zellen für den Einsatz im T-Zell-Proliferationsassay

Im T-Zell-Proliferationsassay dienen die Tumorzellen als „Target“ für die T-Zellen, die wiederum als „Effektor“ durch die Konfrontation mit den Tumorzellen aktiviert werden. Als Maß für diese Aktivierung wird die Proliferationsrate der T-Zellen über Einbau und Messung von radiaktiv markiertem [³H]-Thymidin quantifiziert. Dabei ist eine Eigenproliferation der Tumorzellen unerwünscht. Als Inaktivierungsmethoden finden unter anderem die Fixierung in 1 % Paraformaldehyd und die radioaktive Bestrahlung Verwendung.

Als Alternative zu den oben genannten Inaktivierungsmethoden wurde zusätzlich die Bestrahlung der Tumorzellen mit einer ultravioletten (UV) Lichtquelle untersucht. Die Zellen wurden dabei einer homogenen Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 302 nm ausgesetzt.

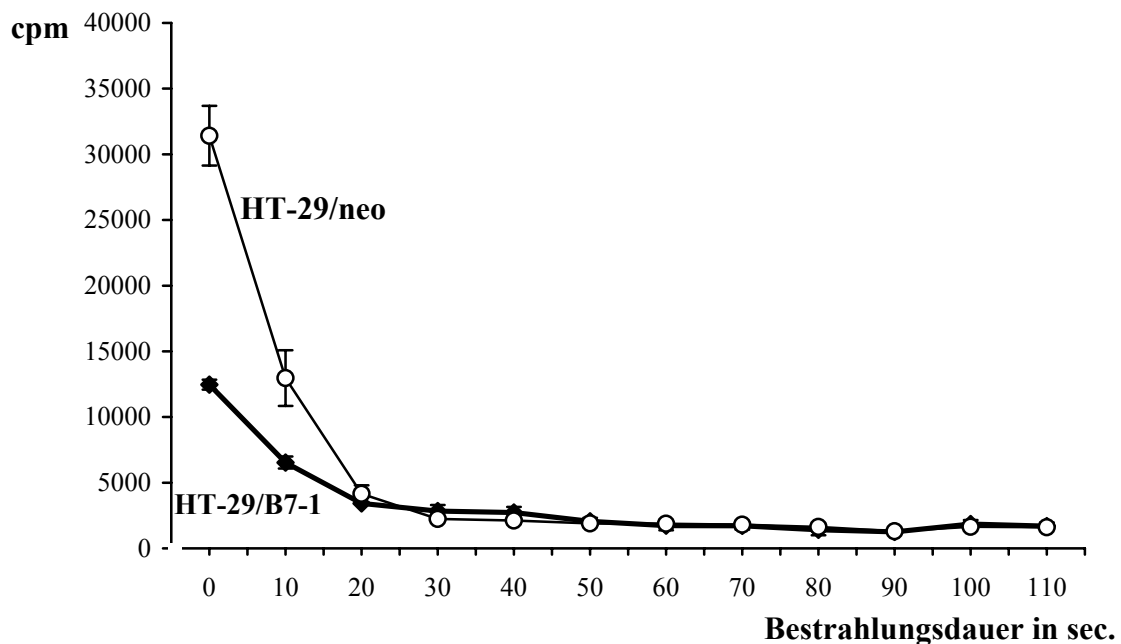


Abbildung 4.2 Proliferation der transfizierten Tumorzellen HT29/B7-1 und HT-29/neo in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit einer UV-B Lichtquelle (302 nm). Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen zunächst 48 h und nach Zugabe von [³H]-Thymidin (0,5 µCi/well) weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Die in den Zellen inkorporierte Radioaktivität wurde als *counts per minute* (cpm) gemessen. Darstellung der Mittelwerte von Triplikaten eines repräsentativen Versuchs ± S.E.M.

Von einer ausreichenden Hemmung der Tumorzellproliferation war in diesem Versuchsaufbau ab einer UV-B-Bestrahlungsdauer von 40 Sekunden auszugehen. In weiteren Versuchen erwies sich durchschnittlich eine Bestrahlung von 60 Sekunden für die Inaktivierung von Tumorzellen als geeignet.

Im nächsten Schritt wurden die HT-29/B7-1 Zellen im Hinblick auf die Expression von MHC Klasse I- und II- Molekülen und des kostimulatorischen Moleküls B7-1 vor und nach Bestrahlung untersucht. Die Tumorzellen wurden in 3 Fraktionen geteilt, die erste Fraktion wurde keiner Bestrahlung ausgesetzt. Die zweite Fraktion wurde in einer Cäsiumquelle 150 Minuten bei 100 rad/min bestrahlt, so dass die Strahlendosis insgesamt 15.000 rad betrug. Die dritte Fraktion wurde für 60 Sekunden mit einer UV-B Lichtquelle bestrahlt. Das Ergebnis der anschließenden, durchflusszytometrischen Untersuchung ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

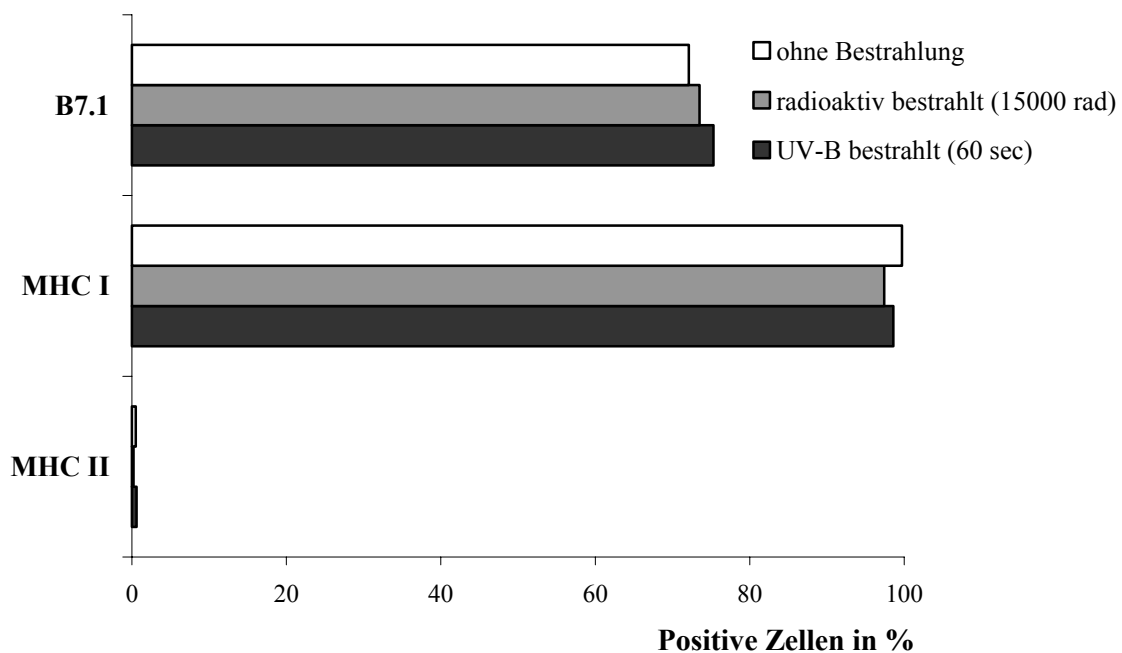


Abbildung 4.3 Expression von B7-1, MHC I und MHC II auf HT-29/B7-1 Zellen: vor (ohne Bestrahlung) und nach Bestrahlung a) mit einer Cäsiumquelle, Strahlendosis 15.000 rad b) mit einer UV-B Lichtquelle (302 nm) für 60 Sekunden. Die Expression der Oberflächenmoleküle blieb in beiden Fällen nach Bestrahlung unverändert.

Bei der Fixierung der Tumorzellen in 1% Paraformaldehyd fiel die T-Zell-Proliferation geringer aus als bei einer Inaktivierung durch radioaktive oder ultraviolette Bestrahlung.

Die UV-Bestrahlung wiederum bot gegenüber der radiaktiven Bestrahlung den Vorteil der kürzeren Bestrahlungsdauer und der leichteren Umsetzung, so dass im weiteren Verlauf die Tumorzellen hauptsächlich durch UV-B-Bestrahlung inaktiviert wurden.

4.1.3 Isolation von T-Zellen für den Einsatz im T-Zell-Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay war die Isolation hochaufgereinigter T-Zellen erforderlich. Bei der dafür gewählten Methode wurden im ersten Schritt periphere mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) aus 100 ml Vollblut humaner, gesunder Blutspender über eine Ficoll-Dichte-Zentrifugation präpariert. Über das *magnetic-activated cell sorting* (MACS) wurden mittels Antikörpermarkierung CD3-positive Zellen (T-Zellen) aus den PBMC isoliert. Der Erfolg der Zellsortierung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst.

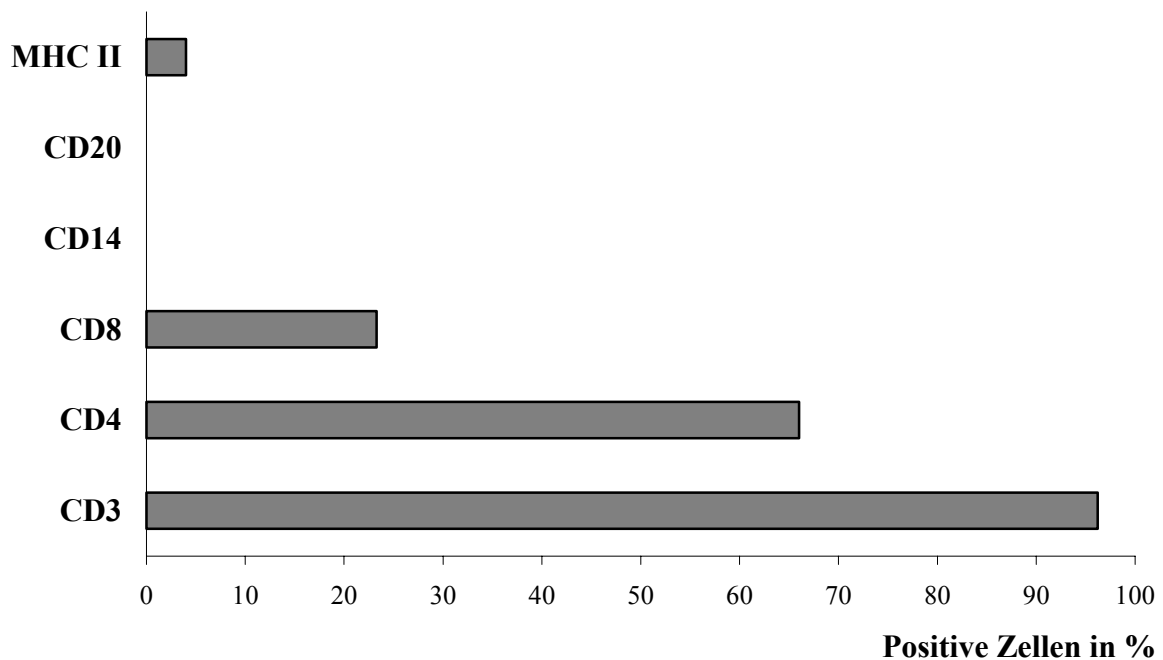


Abbildung 4.4 Oberflächenmarkerexpression der mittels MACS isolierten Zellpopulation. 96 % der Zellen waren positiv für CD3, 66 % waren positiv für CD4, 23 % waren positiv für CD8. Damit lag eine hochreine T-Zellpopulation vor. CD14- und CD20-positive Zellen konnten nicht nachgewiesen werden, wodurch Verunreinigungen durch B-Zellen ausgeschlossen werden konnten. Die Expression von MHC II auf 4 % der Zellen weist auf eine geringe Verunreinigung durch Monozyten hin.

4.1.4 T-Zellaktivierung durch HT-29/B7-1 Zellen im T-Zell-Proliferationsassay

Das Potential der B7-1-Transfektanten, eine T-Zellaktivierung auszulösen, wurde zunächst unter dem Gesichtspunkt des Effektor/Target-Verhältnisses untersucht. Eine konstante Anzahl an T-Zellen desselben Spenders wurde dafür mit einer unterschiedlichen Anzahl an inaktivierten Tumorzellen konfrontiert. Bei einem Verhältnis 10:1 von T-Zellen zu HT-29/B7-1 Zellen war die T-Zellaktivierung signifikant höher ($p < 0,05$) als bei einem Verhältnis von 5:1, 20:1 und 40:1.

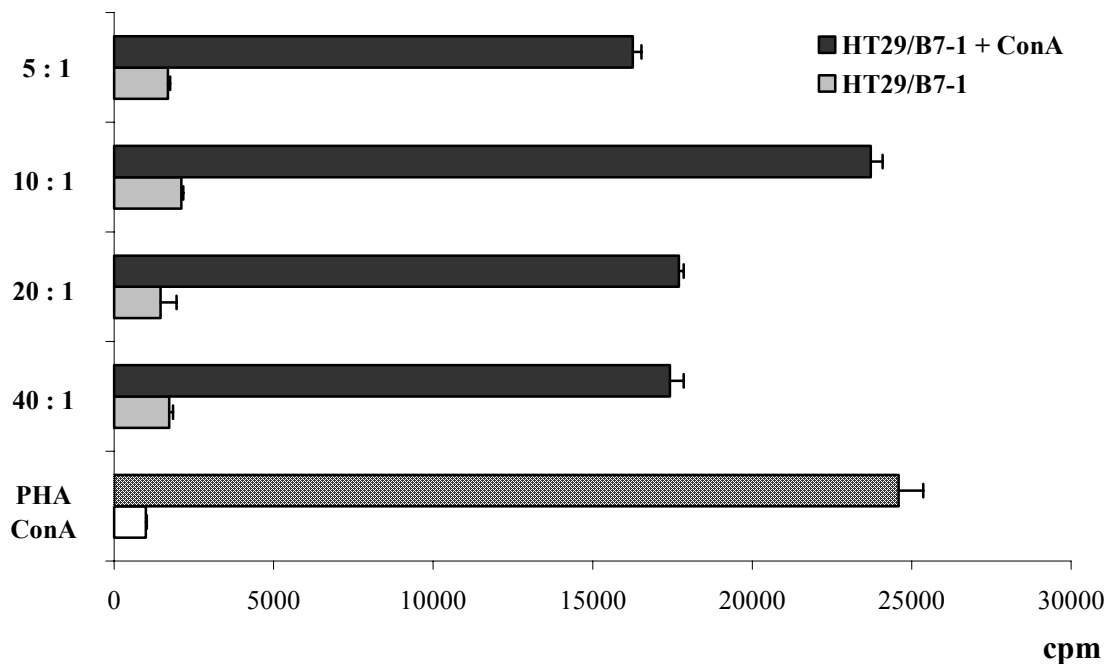


Abbildung 4.5 T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von B7-1-transfizierten HT-29 Zellen. Je 50×10^3 T-Zellen von einem Spender wurden im Verhältnis 5:1, 10:1, 20:1 und 40:1 mit inaktivierten HT-29/B7-1 Zellen konfrontiert und nach Zugabe von $[^3\text{H}]$ -Thymidin ($0,5 \mu\text{Ci/well}$) an Tag 3 weitere 24 Stunden inkubiert. Angegeben sind die *counts per minute* (cpm) an Tag 4 als Maß für die in den Zellen inkorporierte Radioaktivität. Für jeden Ansatz sind zwei Balken dargestellt, oben Tumorzellen und T-Zellen in Anwesenheit von Concanavalin A (ConA) in suboptimaler Konzentration ($0,5 \mu\text{g/ml}$), unten Tumorzellen und T-Zellen ohne ConA. Weiterhin sind als Kontrollen die T-Zell-Proliferation ohne Anwesenheit von Tumorzellen unter Zugabe von Phytohämagglutinin (PHA) in mitogener Konzentration ($5 \mu\text{g/ml}$) zur maximalen Stimulation der T-Zellen und in Anwesenheit von ConA in suboptimaler Konzentration ($0,5 \mu\text{g/ml}$) aufgezeigt. Darstellung der Mittelwerte von Duplikaten eines repräsentativen Versuchs \pm S.E.M.

Wie aus Abbildung 4.5 hervorgeht, war zur B7-1-abhängigen Proliferation der T-Zellen ein weiterer Kostimulus, hier in Form des Lectins Concanavalin A (ConA), notwendig.

Dabei wurde ConA in einer submitogenen Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt und führte als alleiniger Stimulus nicht zu einer gesteigerten Proliferation der T-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde die primär CD2-vermittelte maximale Stimulation der T-Zellen durch das Lectin Phytohämagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 5 µg/ml als Kontrolle in allen T-Zell-Proliferationsassays eingesetzt.

Als Kontrolle zu den B7-1-Transfektanten der HT-29 Zellen dienten mit einem nur für die Neomycinresistenz kodierenden Kontrollvektor transfizierte Zellen (HT-29/neo) und untransfizierte HT-29 Zellen (Wildtyp) gleichermaßen. Weder die Stimulation mit HT-29/neo noch mit Wildtyp-Zellen führte zu einer T-Zell-Proliferation, wie aus Abbildung 4.6 ersichtlich wird ($p = 0,036$).

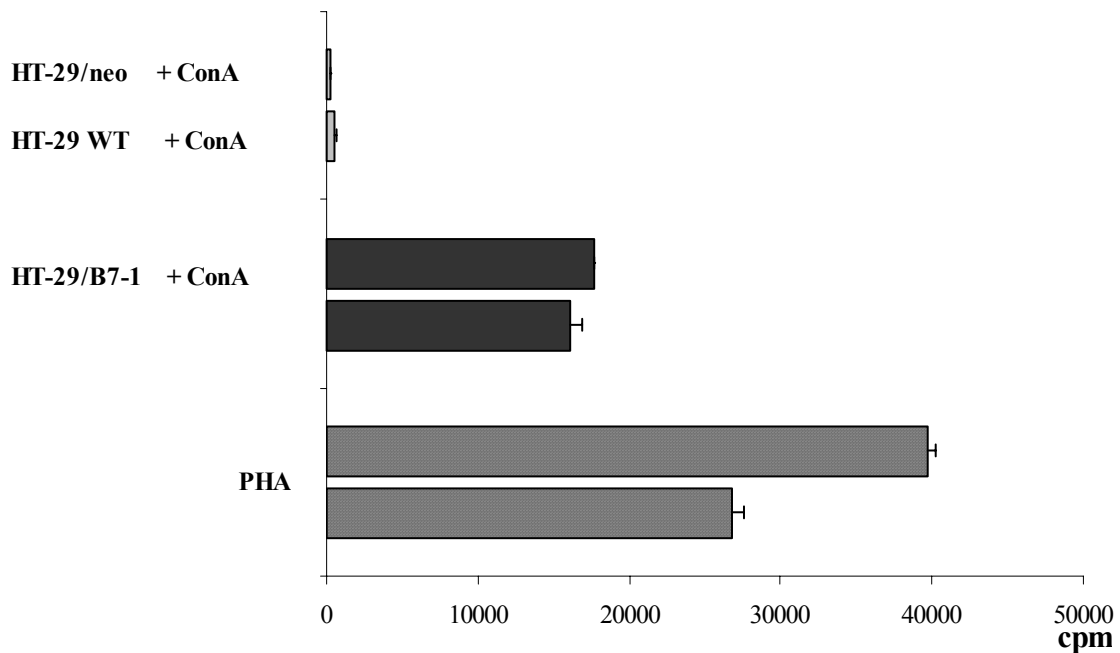


Abbildung 4.6 T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von B7-1-Transfektanten und Neomycinresistenzgen-Transfektanten (HT-29/neo) sowie Wildtyp Zellen der HT-29 Zelllinie (HT-29 WT) in zwei unabhängigen Proliferationsassays. Für jeden Ansatz sind zwei Balken dargestellt, oben Assay Nr.1 mit HT-29/neo Zellen als Kontrolle, unten Assay Nr. 2 mit HT-29 Wildtyp Zellen als Kontrolle. ConA wurde in allen T-Zell-/Tumorzell-Ansätzen in submitogener Konzentration (0,5 µg/ml) zugegeben. Die PHA (5 µg/ml)-Stimulation der T-Zellen ohne Anwesenheit von Tumorzellen diente als Kontrolle der maximal möglichen T-Zell-Stimulation. Darstellung der Mittelwerte von Duplikaten \pm S.E.M.

Abbildung 4.7 zeigt die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnis für fünf weitere, voneinander unabhängige Versuche. Für einen Versuchsansatz kamen jeweils nur T-Zellen von einem Spender zum Einsatz. Der Vergleich von B7-1-positiven und B7-1-negativen HT-29 Zellen zeigte, dass das transfizierte kostimulatorische Molekül funktionell aktiv war. Weiter war zu sehen, dass die T-Zell-Proliferation mit derselben Tumorzelllinie bei T-Zellen von verschiedenen Spendern unterschiedlich stark ausfiel.

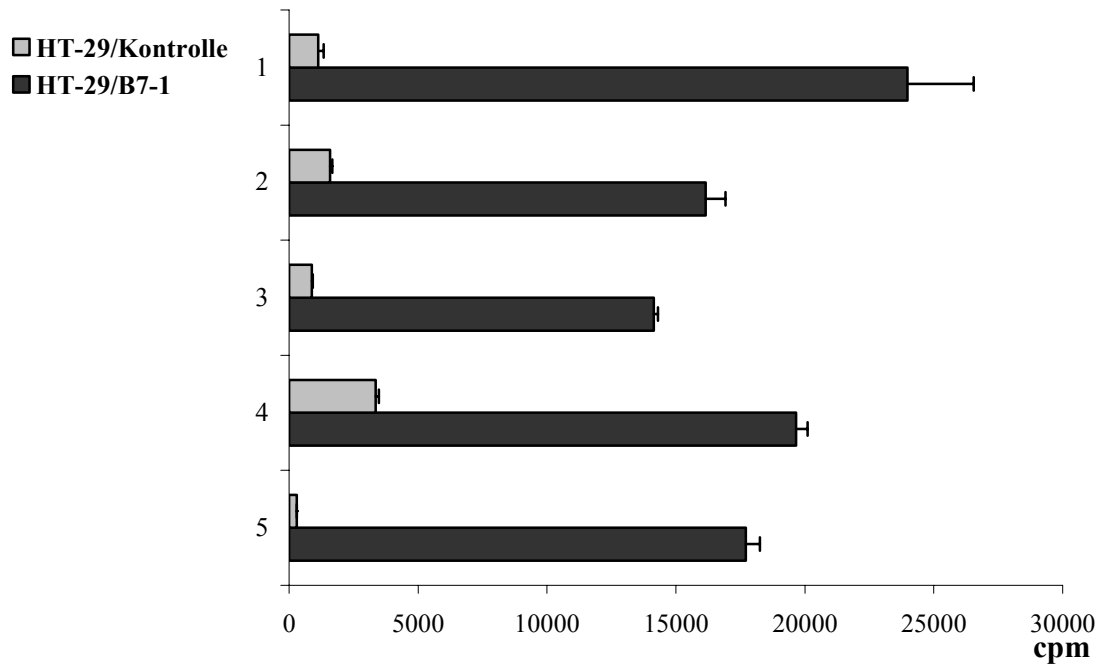


Abbildung 4.7 T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen in fünf voneinander unabhängigen Versuchen. Es wurden HT-29/neo Zellen und HT-29 Wildtyp Zellen als Kontrolle eingesetzt. Die T-Zellen stammten für jeden Versuchsansatz von verschiedenen Spendern. Darstellung der Mittelwerte von Duplikaten \pm S.E.M.

Innerhalb eines T-Zell-Proliferationsassays wurden mehrere Kontrollen eingesetzt, um sicherzustellen, dass die gemessenen counts pro Minute nur auf die Proliferation der T-Zellen in Anwesenheit von B7-1 exprimierenden Tumorzellen zurückzuführen waren. Nur Versuche, bei denen in den Kontrollansätzen bis auf den Ansatz mit PHA-Stimulation keine Proliferation zu verzeichnen war, wurden weiter ausgewertet. Abbildung 4.8 zeigt beispielhaft einen kompletten Versuchsansatz mit allen Kontrollen.

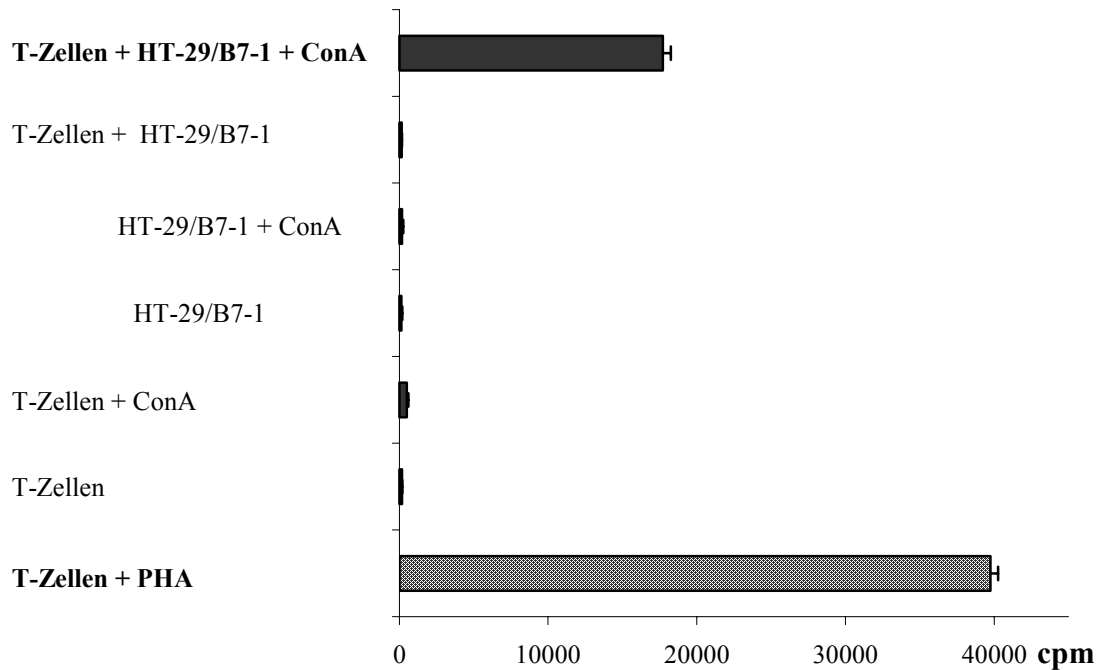


Abbildung 4.8 Kompletter Versuchsansatz eines T-Zell-Proliferationsassays mit HT-29/B7-1 Zellen. Voraussetzung für eine Proliferation waren die Konfrontation der T-Zellen mit B7-1-exprimierenden HT29-Zellen und die gleichzeitige Anwesenheit von Concanavalin A in submitogener Konzentration (0,5 µg/ml). In allen Negativ-Kontrollen fehlte eine Proliferation, während die Proliferation der Positiv-Kontrolle mit PHA (5 µg/ml)-Stimulation der T-Zellen aufzeigte, dass die T-Zellen grundsätzlich aktivierbar waren. Darstellung der Mittelwerte der Duplikate eines repräsentativen T-Zell-Proliferationsassays ± S.E.M.

Zusammenfassend lässt sich zu den Versuchen mit HT-29 Zellen sagen, dass Zellen, die mit dem kostimulatorischen Molekül B7-1 transfiziert worden waren, im Gegensatz zu untransfizierten oder mit einem Kontrollvektor transfizierten Zellen in der Lage waren eine T-Zell-Proliferation auszulösen. Voraussetzung dafür war aber die gleichzeitige Anwesenheit des Lectins Concanavalin A in submitogener Konzentration (0,5 µg/ml). In dieser Konzentration führte Concanavalin A weder alleine noch in Anwesenheit von Tumorzellen, die kein B7-1 exprimierten, zu einer messbaren T-Zell-Aktivierung. Die Tumorzellen konnten nach Inaktivierung durch UV-B Bestrahlung im Assay eingesetzt werden. Dabei lag das optimale Effektor/Target Verhältnis bei 10:1. Die T-Zell-Proliferation bei Konfrontation mit derselben Tumorzelllinie fiel bei T-Zellen von verschiedenen Spendern unterschiedlich stark aus.

4.2 Einfluss von Interleukin-18 und Interleukin-12

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Steigerung der Immunogenität von B7-1-transfizierten Kolonkarzinomzellen im Hinblick auf eine T-Zell-Aktivierung. Unter diesem Gesichtspunkt wurde im Weiteren der Einfluss der Zytokine Interleukin (Interleukin)-18 und Interleukin-12 untersucht. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, wird in der Literatur die Induktion der Interferon-(IFN)- γ Synthese als Wirkung für beide Zytokine beschrieben. Ebenfalls aus der Literatur bekannt ist, dass beide Zytokine in Kombination einen synergistischen Effekt in Bezug auf die Induktion der Interferon- γ -Synthese aufweisen können.

Der Einfluss von Interleukin-18 und Interleukin-12 wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Im ersten Ansatz wurden mononukleäre Zellen (PBMC) mit Interleukin-18 und Interleukin-12 stimuliert und anschließend im Überstand die Interferon- γ -Konzentration mittels eines humanen Interferon- γ -ELISA bestimmt. So konnte die biologische Aktivität der Zytokine überprüft werden.

Im zweiten Ansatz wurde der Effekt von Interleukin-18 und Interleukin-12 auf T-Zellen, die zuvor aus PBMC aufgereinigt wurden, untersucht. Dabei wurde unterschieden zwischen dem Effekt auf die Induktion der Interferon- γ -Synthese und dem Effekt auf die T-Zell-Proliferation. Entsprechend wurde wie bei den PBMC die Interferon- γ -Konzentration im Überstand von stimulierten T-Zellen mittels ELISA bestimmt. Um die relative DNA-Syntheserate und damit die Zellteilungsaktivität quantitativ erfassen zu können, wurde zudem die relative [^3H]-Thymidin-Einbaurrate als „cpm“, d.h. *counts per minute*, ermittelt.

Bei der Stimulation von T-Zellen mit Interleukin-12 und Interleukin-18 wurde weiterhin unterschieden zwischen T-Zellen, die ohne die Anwesenheit von Tumorzellen durch ein Mitogen (Concanavalin A in submitogener Konzentration und Phytohämagglutinin in mitogener Konzentration) aktiviert wurden, und T-Zellen, die durch Kostimulation mit B7-1-transfizierten HT-29 Tumorzellen aktiviert wurden.

4.2.1 Stimulation von mononukleären Zellen

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) aus 100 ml Vollblut humaner, gesunder Blutspender wurden über eine Ficoll-Dichte-Zentrifugation präpariert und mit Interleukin-18 und Interleukin-12 stimuliert. Nach 72 Stunden wurde die Interferon- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen.

4.2.1.1 Induktion der Interferon- γ Synthese durch mononukleäre Zellen

Induktion der Interferon- γ -Synthese durch Interleukin-18

Die PBMC wurden mit Interleukin-18 in einer Konzentrationsreihe von 0 ng/ml bis 100 ng/ml stimuliert. Als Kostimulus wurde Concanavalin A in submitogener Konzentration (0,5 μ g/ml) zugegeben.

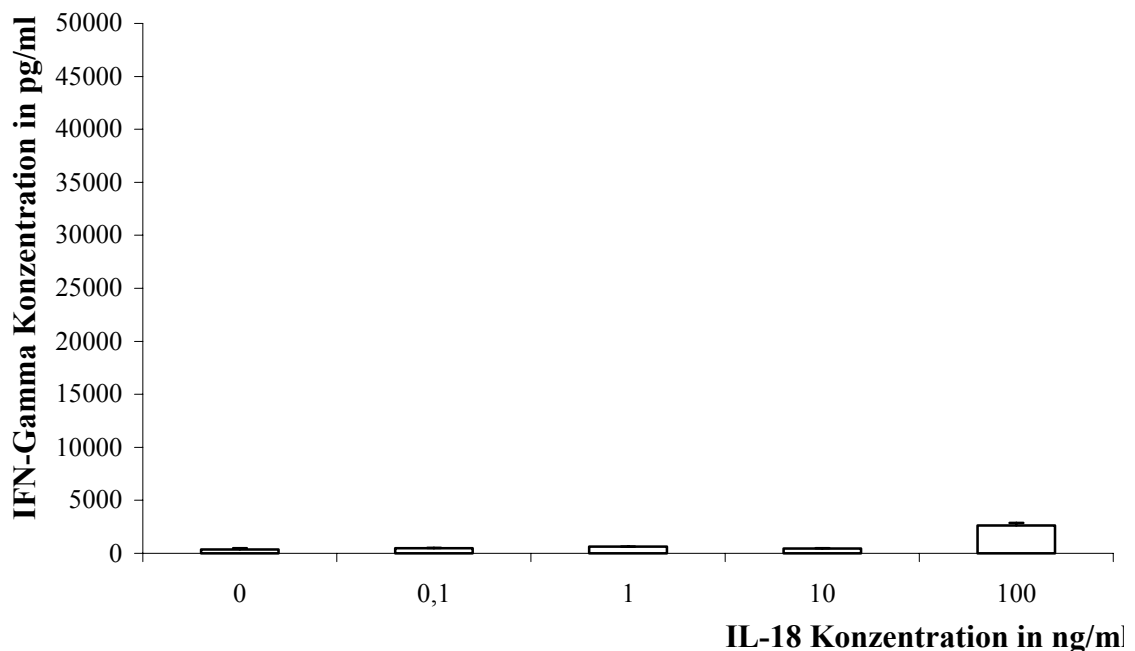


Abbildung 4.9 Interferon- γ -Konzentration im Überstand von humanen PBMC nach Stimulation mit rekombinantem Interleukin-18. 10^6 PBMC wurden mit ConA (0,5 μ g/ml) und den angegebenen Interleukin-18-Konzentrationen für 72 Stunden inkubiert. Eine signifikante Induktion der Interferon- γ -Synthese war erst bei einer IL-18-Konzentration von 100 ng/ml zu beobachten ($p = 0,04$). Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm S.E.M.

Versuche mit rekombinantem Interleukin-18 eines anderen Herstellers lieferten vergleichbare Ergebnisse, so dass die fehlende Induktion der Interferon- γ -Synthese bei niedrigen Interleukin-18-Konzentrationen eher auf die unausreichende Kostimulation durch Concanavalin A in submitogener Konzentration zurückzuführen war. Insgesamt waren Interleukin-18-Konzentrationen > 10 ng/ml erforderlich, um eine Steigerung der Interferon- γ -Synthese zu bewirken.

Induktion der Interferon- γ -Synthese durch Interleukin-12

Parallel zu der Stimulation mit Interleukin-18 wurden humane PBMC mit Interleukin-12-Konzentrationen bis zu 100 ng/ml für 72 Stunden stimuliert und die Interferon- γ -Konzentration im Überstand bestimmt.

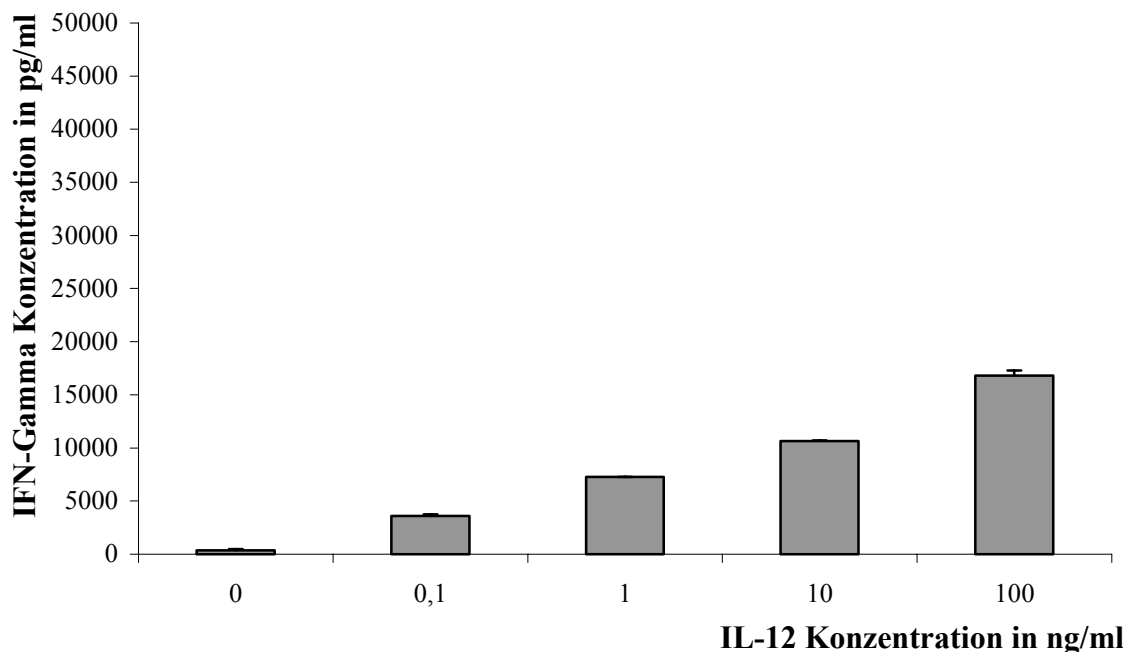


Abbildung 4.10 Interferon- γ -Konzentration im Überstand von humanen PBMC nach Stimulation mit rekombinantem Interleukin-12. 10^6 PBMC wurden mit ConA (0,5 μ g/ml) und den angegebenen Interleukin-12-Konzentrationen für 72 Stunden inkubiert. Es war eine IL-12-konzentrations-abhängige Induktion der Interferon- γ -Synthese zu beobachten. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm S.E.M.

Im Gegensatz zu Interleukin-18 zeigte Interleukin-12 auch bei niedrigen Konzentrationen einen deutlichen Effekt auf die Interferon- γ -Synthese der PBMC. Die Interferon- γ -Synthese konnte Interleukin-12-konzentrationsabhängig gesteigert werden.

Auch ohne den Zusatz von Concanavalin A in submitogener Konzentration konnte die Interferon- γ -Synthese durch Interleukin-12 induziert werden. Die dabei gemessenen Interferon- γ -Konzentrationen im Überstand der PBMC fielen aber deutlich geringer aus als mit Concanavalin A.

4.2.1.2 Synergistischer Effekt von Interleukin-18 und Interleukin-12

Im nächsten Ansatz wurden humane PBMC für 72 Stunden mit einer Kombination von Interleukin-18 und Interleukin-12 stimuliert. Beide Interleukine wurden dabei in den Konzentrationen 0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml eingesetzt.

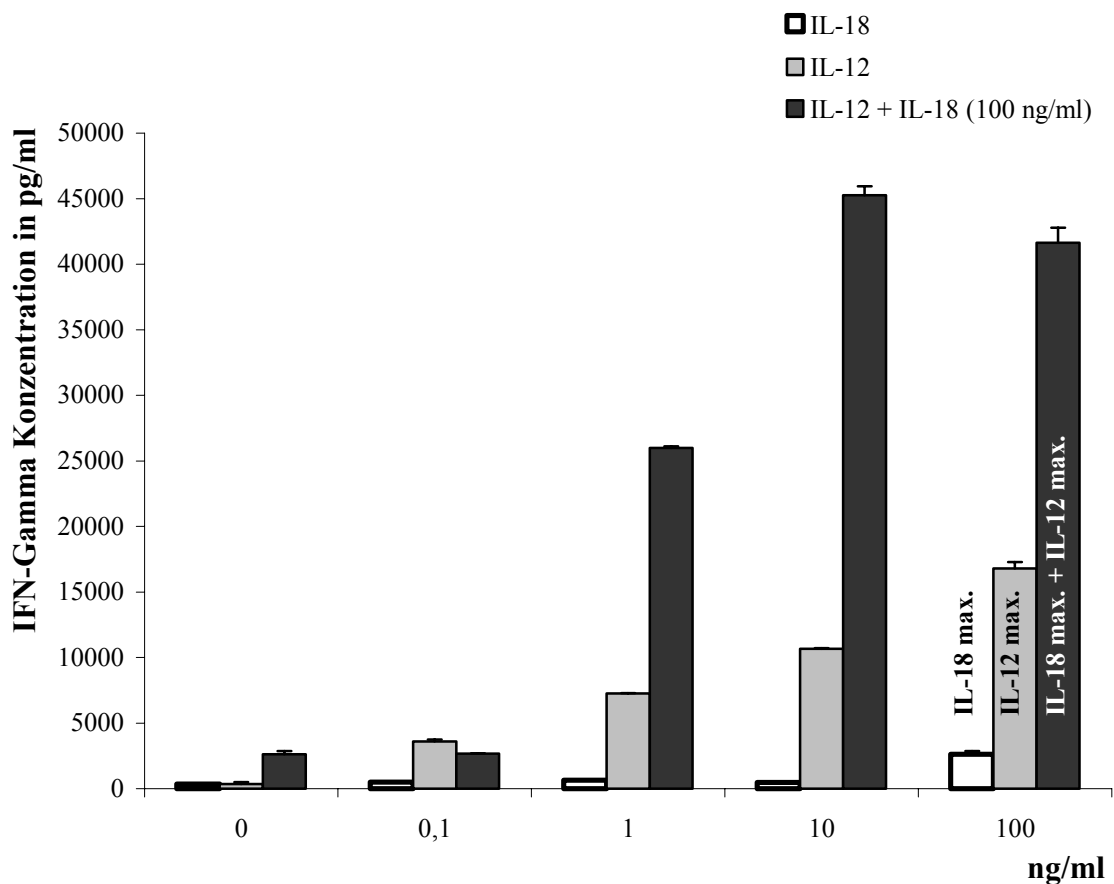


Abbildung 4.11 Interferon- γ -Konzentration im Überstand von humanen PBMC nach Stimulation mit rekombinantem IL-18 und IL-12. 10^6 PBMC wurden mit ConA (0,5 μ g/ml) und IL-18 sowie IL-12 in Kombination für 72 Stunden inkubiert. Für jede Konzentrationseinheit sind 3 Balken dargestellt, IL-18 alleine (links), IL-12 alleine (Mitte) und die Kombination von IL-12 in zunehmenden Konzentrationen in Kombination mit IL-18 (100 ng/ml) (rechts). Der Zusatz von IL-18 (100 ng/ml) führte ab einer IL-12-Konzentration von 1 ng/ml zu einem Anstieg der Interferon- γ -Konzentration im Vergleich zu alleiniger Stimulation mit IL-12 und alleiniger maximaler Stimulation mit IL-18 (100 ng/ml). Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm S.E.M.

Der oben beschriebene Anstieg der Interferon- γ -Konzentration mit zunehmenden Interleukin-12-Konzentrationen konnte ab einer Interleukin-12-Konzentration von 1 ng/ml durch den Zusatz von Interleukin-18 (100 ng/ml) gesteigert werden. Dieser Anstieg ging, wie in Abbildung 4.12 dargestellt wird, über einen rein additiven Effekt hinaus.

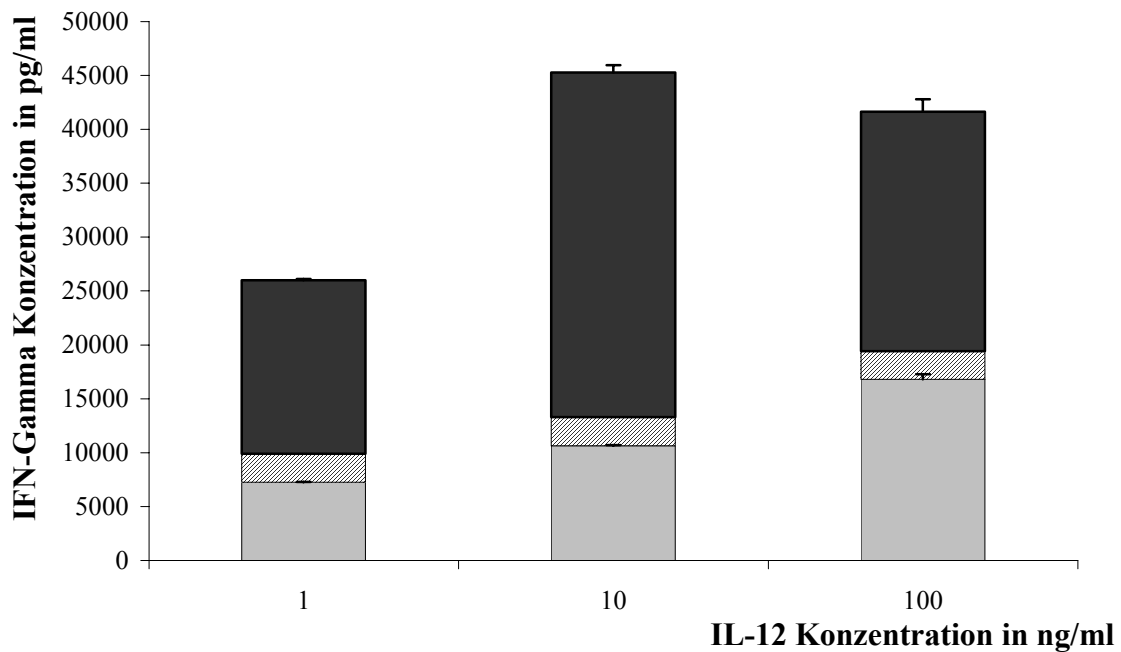


Abbildung 4.12 Teilergebnis aus Abbildung 4.11. Interferon- γ -Konzentration im Überstand von humanen PBMC nach Stimulation mit rekombinatem IL-18 (100 ng/ml) und IL-12 in zunehmenden Konzentration unter Zusatz von ConA in submitogener Konzentration (0,5 μ g/ml), dargestellt durch die Gesamthöhe der Balken. Der untere graue Abschnitt der Balken steht für die reine IL-12 Stimulation der PBMC ohne IL-18. Die Höhe des mittleren schraffierten Abschnitts gibt die Interferon- γ -Konzentration bei alleiniger Stimulation mit IL-18 (100 ng/ml) wieder. Der dunkle obere Abschnitt gibt die Zunahme der Interferon- γ -Konzentration bei Kombination von IL-12 und IL-18, die über einen reinen additiven Effekt hinausgeht, wieder. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm S.E.M.

4.2.2 Stimulation von T-Zellen

4.2.2.1 Einfluss auf die T-Zell-Proliferation in Anwesenheit mitogener Substanzen

Es wurde der Frage nachgegangen, in welchem Maß die Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18 die Proliferation der T-Zellen beeinflussen können, zunächst anhand von T-Zellen, die zusätzlich zu den Interleukinen mit einem Mitogen stimuliert wurden, d.h. ohne die Anwesenheit von Tumorzellen.

Einfluss von Interleukin-12 und Interleukin-18

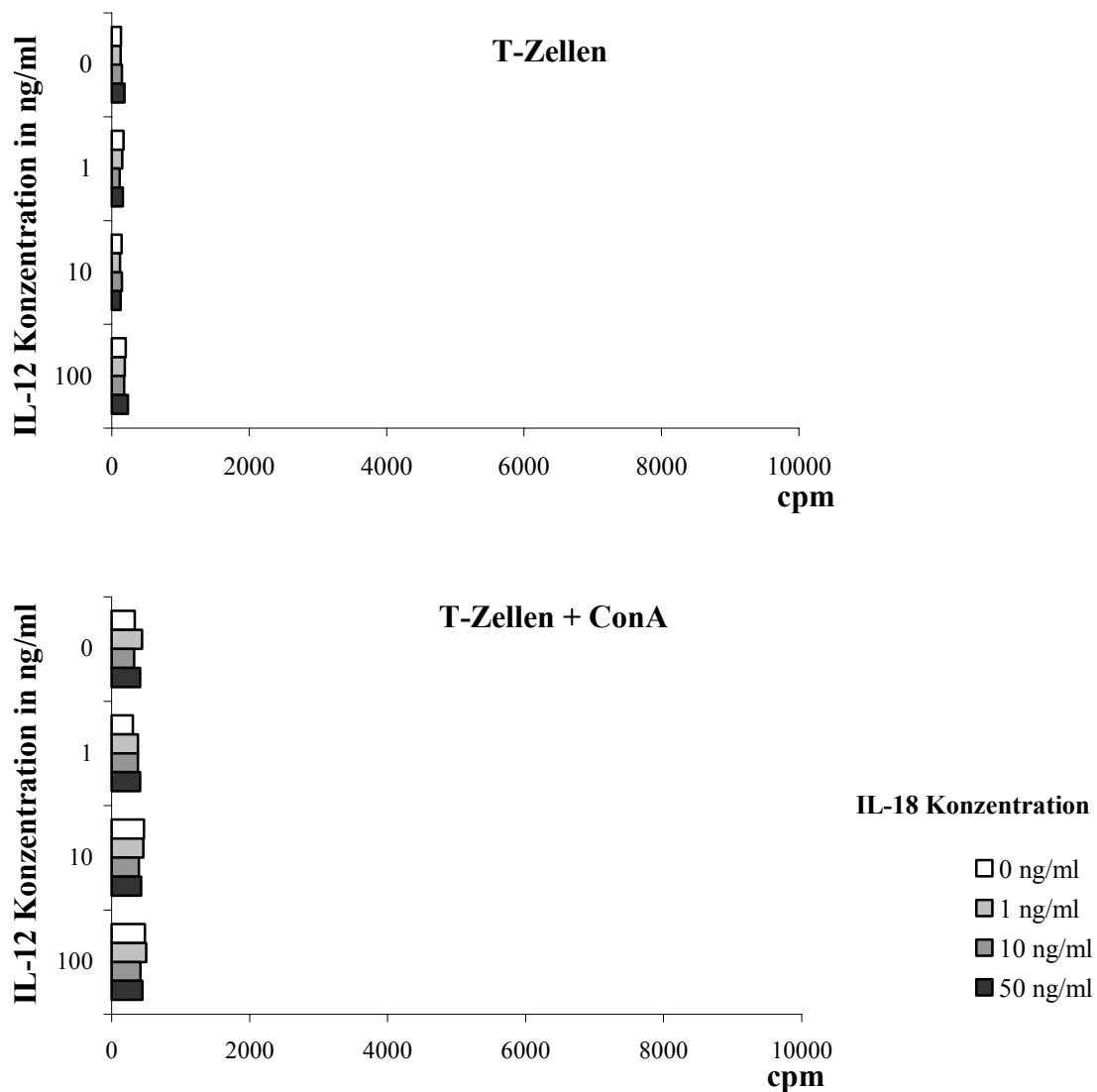


Abbildung 4.13 T-Zell-Proliferation ohne den Zusatz von Concanavalin A (oberes Bild) und mit Zusatz von Concanavalin A in submitogener Konzentration (unteres Bild) in Abhängigkeit von IL-12 und IL-18 Stimulation – in Kombination der beiden Interleukine und für jedes Interleukin alleine. 5×10^4 humane T-Zellen eines Spenders wurden 72 Stunden mit IL-12 und IL-18 in den entsprechenden Konzentrationen und Kombinationen stimuliert und die Proliferationsrate über die relative [^3H]-Thymidin-Einbaurate als „cpm“, d.h. *counts per minute*, ermittelt. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm S.E.M.

Weder für Interleukin-12 noch für Interleukin-18 konnte eine Zunahme der T-Zell-Proliferation durch entsprechende Stimulation der T-Zellen verzeichnet werden. Die Zugabe des Lectins Concanavalin A in submitogener Konzentration (0,5 $\mu\text{g/ml}$) führte in allen Ansätzen zu einem leichten Proliferationsanstieg (durchschnittlich um Faktor 2) unabhängig von den jeweiligen Interleukin-12- und Interleukin-18-Konzentrationen.

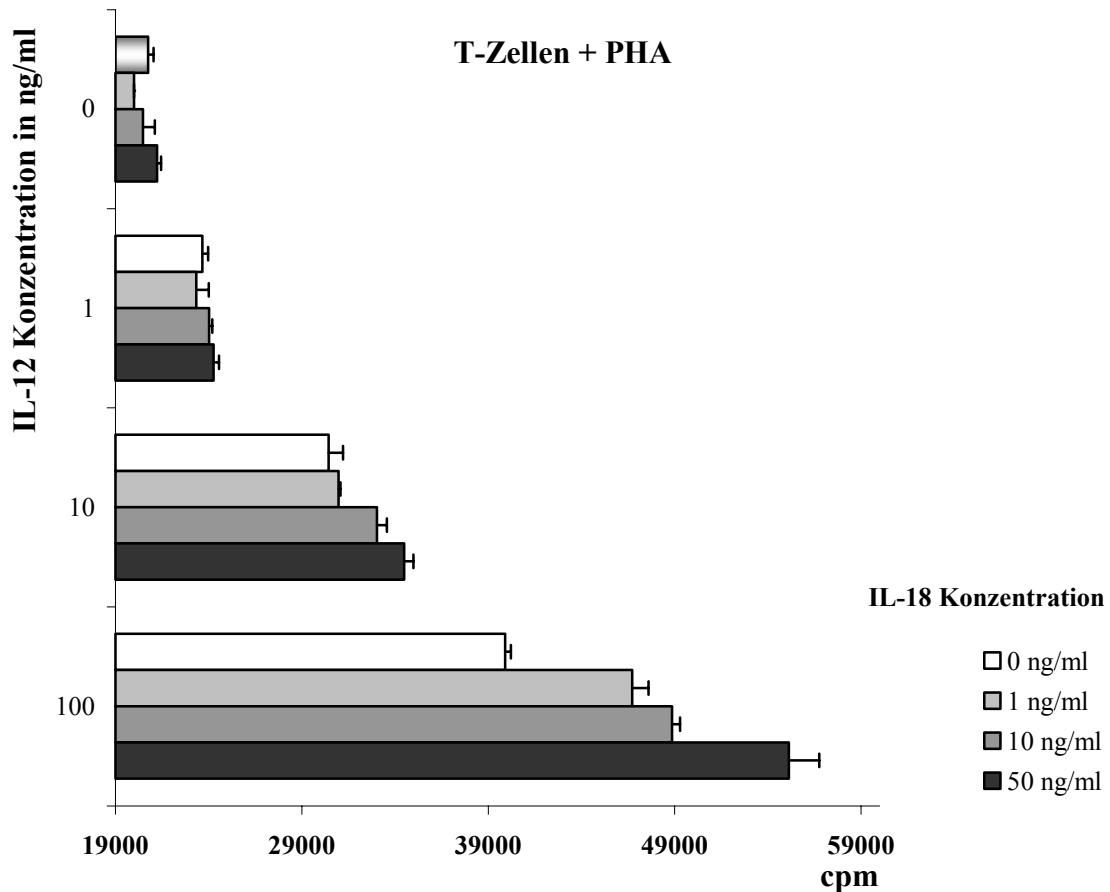


Abbildung 4.14 T-Zell-Proliferation unter Zusatz von Phytohämagglutinin (PHA) in mitogener Konzentration (5 µg/ml) in Abhängigkeit von der Stimulation mit IL-12 und IL-18. 5×10^4 humane T-Zellen eines Spenders wurden 72 Stunden mit IL-12 und IL-18 in den entsprechenden Konzentrationen und Kombinationen stimuliert und die Proliferationsrate über die relative [^3H]-Thymidin-Einbaurate als *counts per minute* (cpm) ermittelt. Darstellung der Mittelwerte der Duplikate eines repräsentativen T-Zell-Proliferationsassays \pm S.E.M.

Wie Abbildung 4.14 zeigt, führte PHA (5 µg/ml) alleine bereits zu einer hohen Proliferationsrate (oberster Balken). Diese Proliferation konnte durch den alleinigen Zusatz von Interleukin-18 nicht gesteigert werden (obere Balkengruppe). Hingegen führte der alleinige Zusatz von Interleukin-12 mit zunehmenden Interleukin-12-Konzentrationen zu einer gesteigerten T-Zell-Proliferation (weiße Balken). Ab einer Interleukin-12-Konzentration von 10 ng/ml konnte diese Proliferation durch den Zusatz von Interleukin-18 weiter gesteigert werden (untere zwei Balkengruppen). Dabei führten zunehmende Interleukin-18-Konzentrationen auch zu einer Zunahme der Proliferation, so dass die höchste Proliferationsrate bei Kombination der höchsten Interleukin-18- und Interleukin-12-Konzentrationen zu verzeichnen war (unterster Balken). Von einem synergistischen Effekt auf die T-Zell-Proliferation war dabei aber nicht auszugehen.

4.2.2.2 Einfluss auf die T-Zell-Proliferation im T-Zell-Proliferationsassay

Der Fragestellung, ob durch humanes, rekombinantes Interleukin-18 und/ oder Interleukin-12 die T-Zell-Aktivierung unter dem Einfluss des kostimulatorischen Moleküls B7-1, verstärkt werden kann, wurde in einer Serie von T-Zell-Proliferationsassays nachgegangen. Wie bereits in Abschnitt 4.1.4 erläutert, wurden UV-inaktivierte HT-29/B7-1 Zellen im Verhältnis 1:10 mit aufgereinigten T-Zellen eines Spenders und unter Zusatz von Concanavalin A in submitogener Konzentration (0,5 µg/ml) und den Interleukinen Interleukin-12 und Interleukin-18 für 72 Stunden inkubiert und die Proliferationsrate der T-Zellen über Einbau und Messung von radiaktiv markiertem [³H]-Thymidin quantifiziert.

Einfluss von Interleukin-18

Die alleinige Zugabe von Interleukin-18 zum Versuchsansatz führte zu keiner Steigerung der T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Tumorzellen, wie aus Abbildung 4.15 zu ersehen ist.

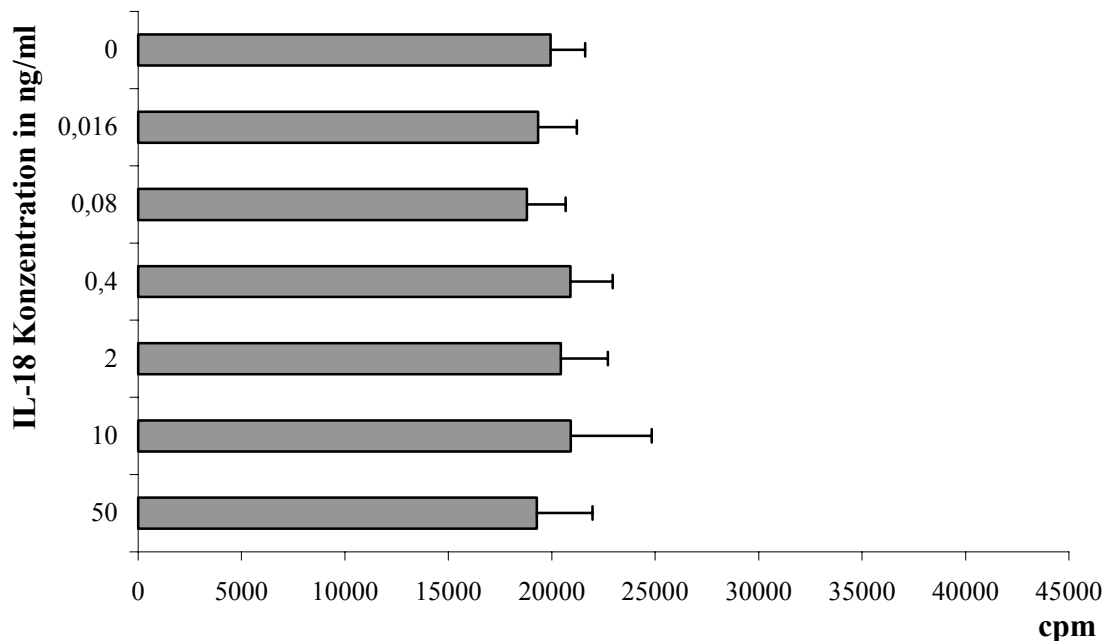


Abbildung 4.15 T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen und ConA in submitogener Konzentration in Abhängigkeit von **IL-18 Stimulation**. Angegeben ist die Proliferationsrate als *counts per minute* (cpm). Darstellung der Mittelwerte ± S.E.M für vier unabhängige Versuche.

Einfluss von Interleukin-12

Im Gegensatz zu Interleukin-18 war Interleukin-12 in der Lage, die T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von B7-1-transfizierten Tumorzellen konzentrationsabhängig zu steigern. Bei einer Interleukin-12-Konzentration von 10 ng/ml war die T-Zell-Proliferation durchschnittlich um 50 %, bei einer Konzentration von 100 ng/ml durchschnittlich um 100 % erhöht. Die Proliferationswerte unter Interleukin-12 Stimulation schwankten zwischen verschiedenen Spendern. Ohne Concanavalin A in submitogener Konzentration war die alleinige Zugabe von Interleukin-12 nicht ausreichend, um eine T-Zell-Aktivierung in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen auszulösen.

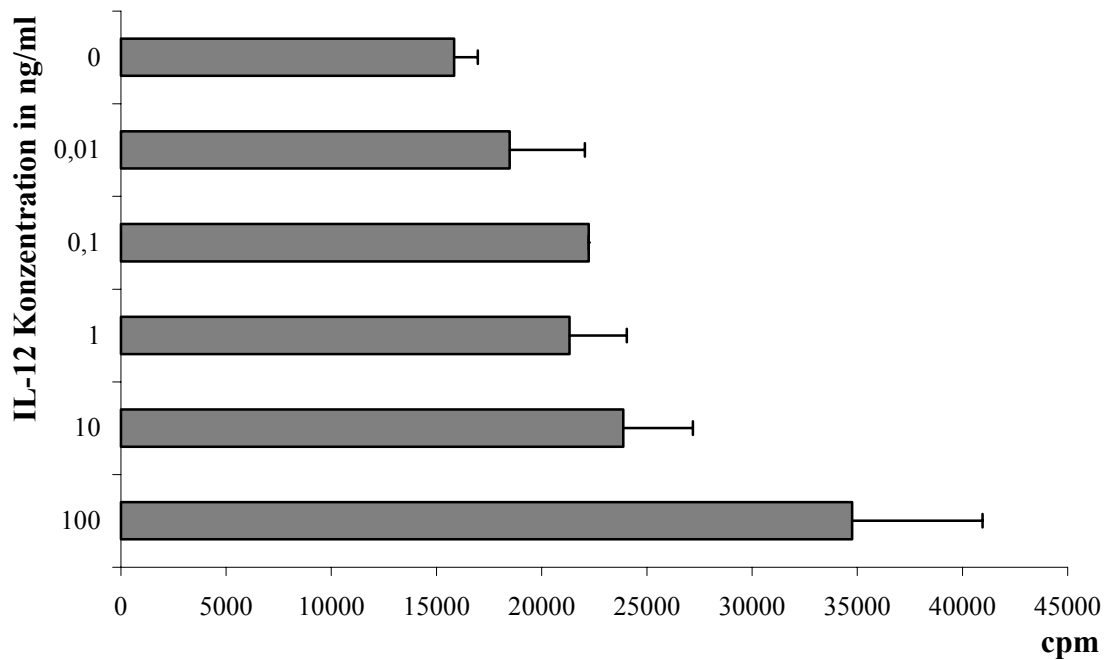


Abbildung 4.16 T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen und ConA in submitogener Konzentration in Abhängigkeit von **IL-12 Stimulation**. Angegeben ist die Proliferationsrate als *counts per minute* (cpm). Darstellung der Mittelwerte \pm S.E.M für drei unabhängige Versuche.

Einfluss der Kombination von Interleukin-12 und Interleukin-18

Interleukin-12 alleine konnte zwar mit zunehmender Konzentration einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation der T-Zellen in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen ausüben. Dieser Effekt wurde aber durch die zusätzliche Gabe von Interleukin-18 im Gegensatz zu den Versuchen mit PHA-stimulierten T-Zellen nicht verstärkt. Die durch HT-29/B7-1 Zellen ausgelöste Aktivierung der T-Zellen war hingegen bereits bei niedrigen Interleukin-12-Konzentrationen und in Anwesenheit von ConA in submitogener Konzentration signifikant erhöht ($p < 0,0003$).

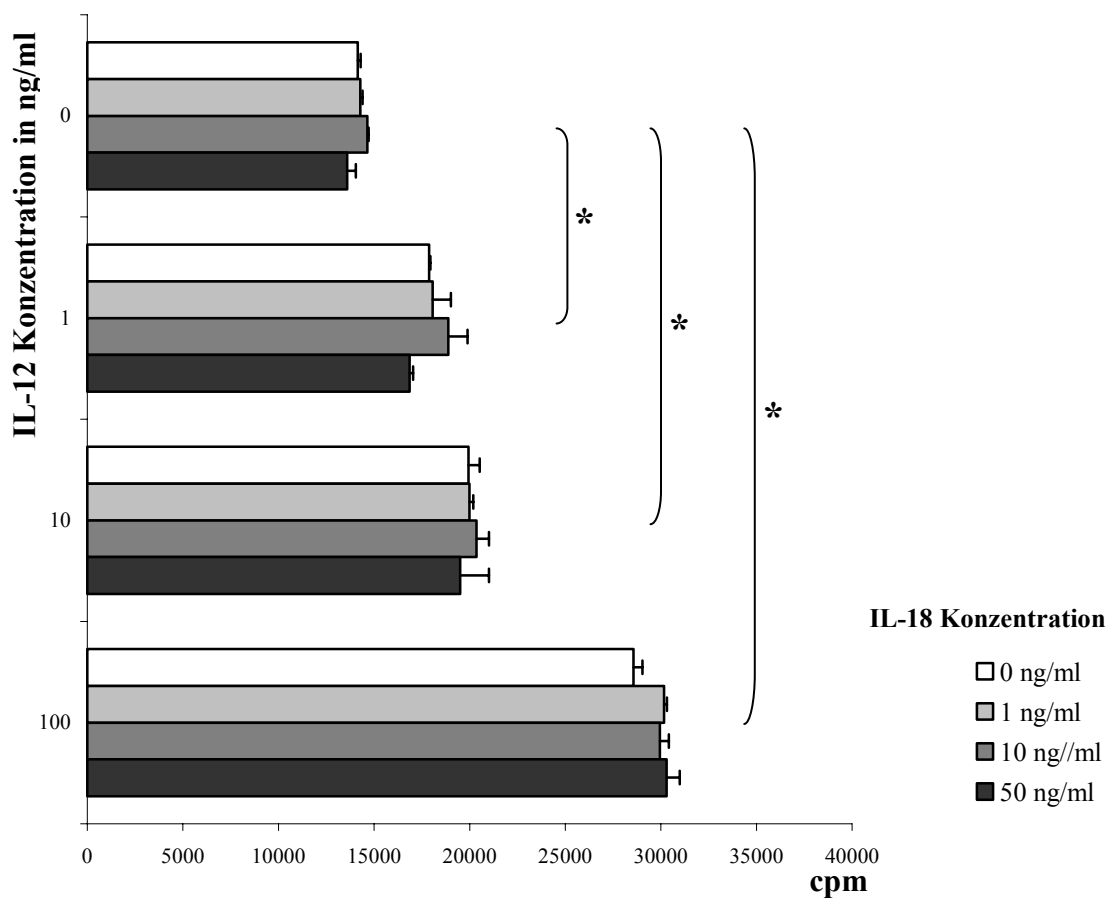


Abbildung 4.17 T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen und ConA in Abhängigkeit von der Stimulation mit IL-12 und IL-18. Humane T-Zellen eines Spenders wurden 72 Stunden mit IL-12 und IL-18 in den entsprechenden Konzentrationen und Kombinationen stimuliert. Angegeben ist die relative Proliferationsrate als *counts per minute*. Die Sterne [*] kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede für den Vergleich der T-Zell-Proliferationsraten mit [IL-12 = 0 ng/ml] und [IL-12 = 1 ng/ml] ($p = 0,003$) bzw. [IL-12 = 10 ng/ml und 100 ng/ml] ($p < 0,003$). Darstellung der Mittelwerte für drei unabhängige Versuche \pm S.E.M.

4.2.2.3 Induktion der Interferon- γ -Synthese durch T-Zellen

Parallel zu den oben dargestellten Versuchen mit PBMC wurde im Überstand von T-Zellen, die mit den Zytokinen Interleukin-18 und Interleukin-12 stimuliert wurden, die Interferon- γ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. T-Zellen wurden zusätzlich zu den Zytokinen entweder mit dem Lectin Phytohämagglutinin (PHA) in mitogener Konzentration (5 $\mu\text{g/ml}$) oder mit HT-29/B7-1 Tumorzellen in Anwesenheit des Lectins Concanavalin A in submitogener Konzentration (0,5 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Zunächst wurde der Einfluss der Stimulation mit nur einem Interleukin und im nächsten Schritt mit Interleukin-18 und Interleukin-12 in Kombination untersucht.

Einfluss von Interleukin-18

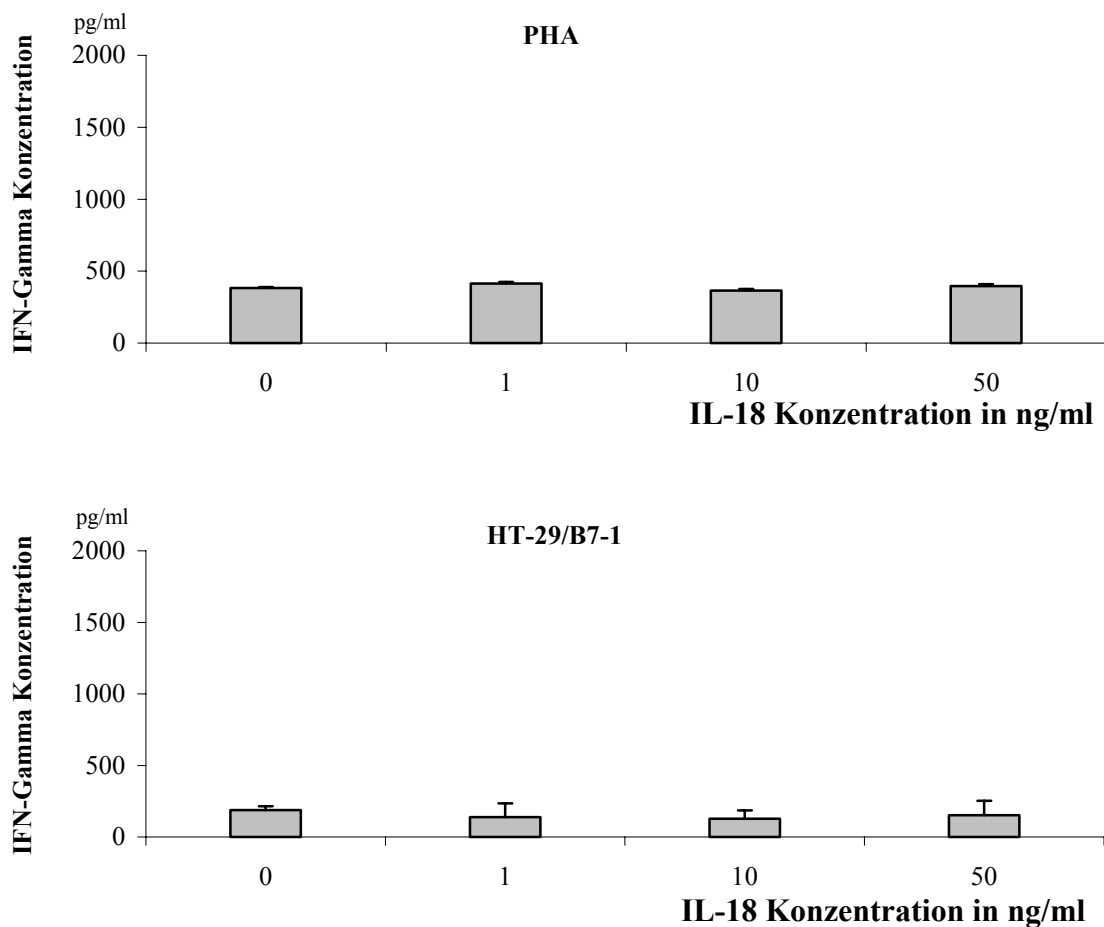


Abbildung 4.18 Interferon- γ -Konzentration im Überstand von IL-18-stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von PHA (5 $\mu\text{g/ml}$) (oben) und HT-29/B7-1 Tumorzellen mit ConA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) (unten). In beiden Ansätzen führte die zusätzliche Stimulation mit IL-18 zu keinem signifikanten Anstieg der Interferon- γ -Konzentration im Überstand. Es sind die Mittelwerte \pm S.E.M aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Vergleichbar mit den Ergebnissen zur T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit Interleukin-18 zeigte sich keine verstärkte Induktion der Interferon- γ -Synthese durch den Zusatz von Interleukin-18 zu T-Zellen, weder in Anwesenheit von PHA (5 μ g/ml) noch von HT-29/B7-1 Zellen (Abbildung 4.18).

Einfluss von Interleukin-12

Mit zunehmenden Konzentrationen führte dagegen die Stimulation mit Interleukin-12 zu einem Anstieg der Interferon- γ -Konzentration sowohl bei T-Zellen in Anwesenheit von PHA (5 μ g/ml) als auch von HT-29/B7-1 Zellen. Dieser Effekt zeigte eine Signifikanz ab einer Interleukin-12-Konzentration von 10 ng/ml verglichen mit der Interferon- γ -Synthese ohne Stimulation mit Interleukin-12 ($p = 0,03$) (Abbildung 4.19).

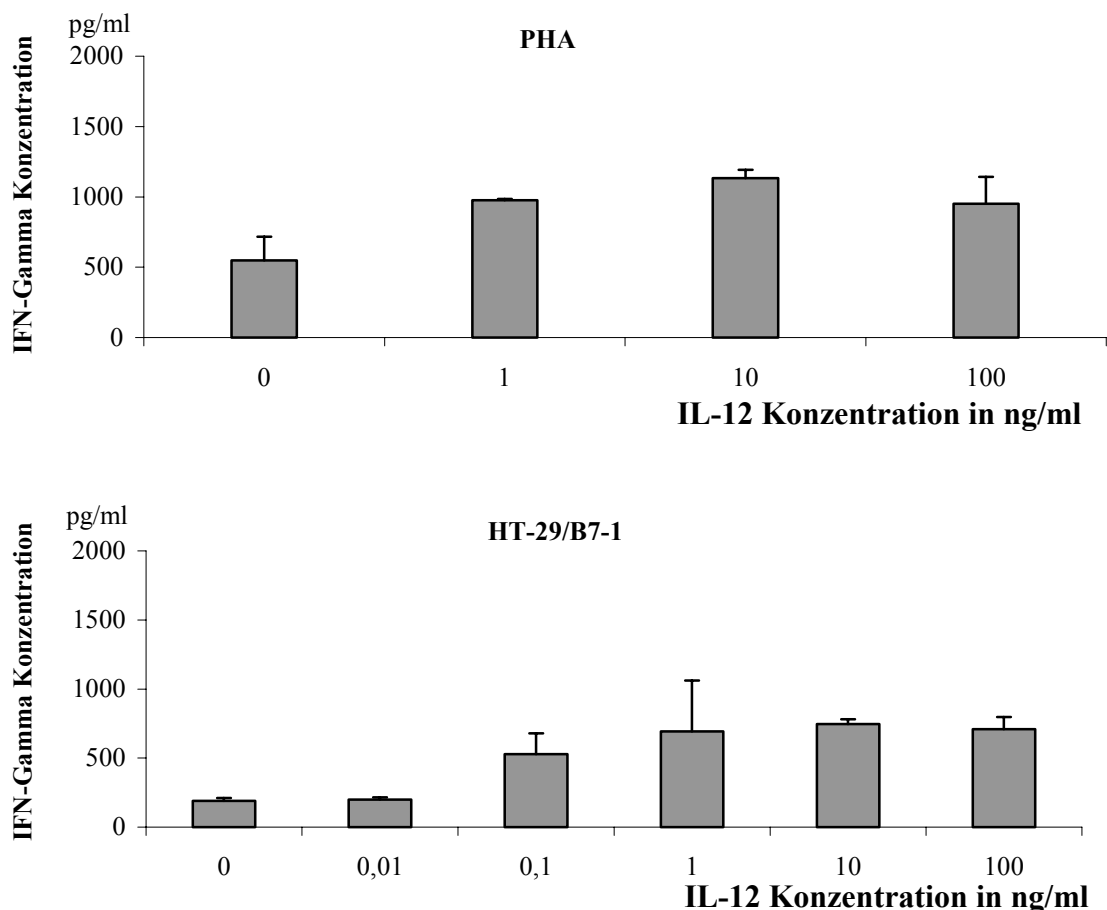


Abbildung 4.19 Interferon- γ -Konzentration im Überstand von IL-12-stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von PHA (5 μ g/ml) (oben) und HT-29/B7-1 Tumorzellen mit ConA (0,5 μ g/ml) (unten). Die zusätzliche Stimulation mit IL-12 führt bei einer Konzentration von 10 ng/ml zu einem signifikanten Anstieg der Interferon- γ -Konzentration ($p = 0,03$) Es sind die Mittelwerte \pm S.E.M aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Einfluss von Interleukin-18 und Interleukin-12 in Kombination

Die Zugabe von Interleukin-12 zum Versuchsansatz führte bereits in niedriger Konzentration zu einer Erhöhung der Interferon- γ -Konzentration durchschnittlich um den Faktor 3 bei PHA-Stimulation ($p = 0,0001$) bzw. Faktor 6 in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen ($p = 0,001$). Mit zunehmenden Interleukin-12-Konzentrationen kam es zu einer Suppression der Interferon- γ -Synthese. Bei einer Interleukin-12-Konzentration von 100 ng/ml war die Interferon- γ -Konzentration um durchschnittlich 37 % niedriger bei PHA-Stimulation ($p = 0,018$) bzw. um 30 % in Anwesenheit von HT-29/B7-1 Zellen ($p = 0,008$) als die jeweils maximal gemessene Interferon- γ -Konzentration. Dieser Effekt wurde unabhängig von der Interleukin-18-Konzentration beobachtet, d.h. durch die zusätzliche Stimulation mit Interleukin-18 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml) konnte kein weiterer Effekt auf die Interferon- γ -Synthese verzeichnet werden.

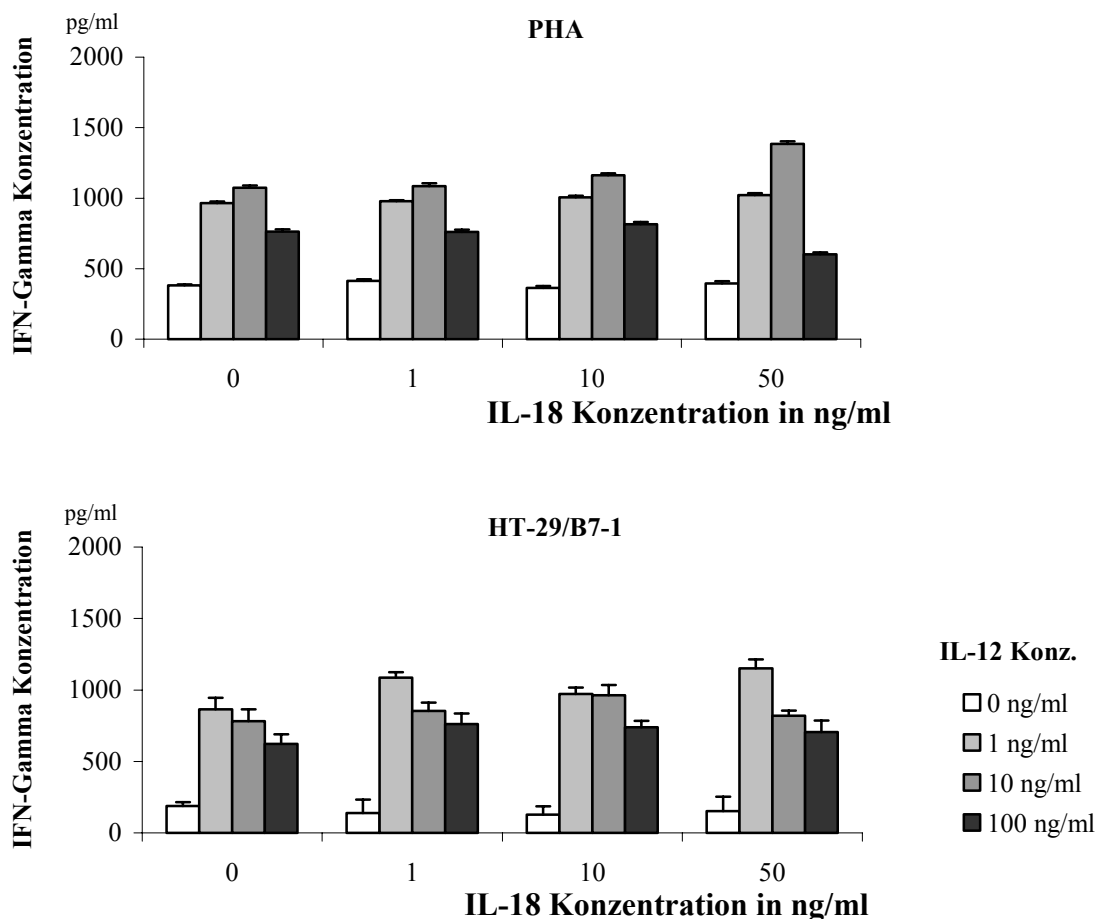


Abbildung 4.20 Interferon- γ -Konzentration im Überstand von IL-12- und IL-18-stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von PHA (5 μ g/ml) (oben) und HT-29/B7-1 Tumorzellen mit ConA (0,5 μ g/ml) (unten). Es sind die Mittelwerte \pm S.E.M aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich zu der Wirkung von Interleukin-18 und Interleukin-12 sagen, dass für Interleukin-12 ein Effekt auf die Aktivierung von PBMC und T-Zellen gezeigt werden konnte. In Form von erhöhter Induktion der Interferon- γ -Synthese war dieser Effekt bei PBMC und T-Zellen zu verzeichnen. Bei T-Zellen führte Interleukin-12 in Anwesenheit eines weiteren Stimulus in Form eines Mitogens (PHA) oder B7-1-vermittelter Kostimulation zu gesteigerter T-Zell-Proliferation. Für Interleukin-18 konnte keine erhöhte Induktion der Interferon- γ -Synthese bei PBMC und T-Zellen und keine gesteigerte T-Zell-Proliferation nachgewiesen werden.

Die Kombination von Interleukin-12 und Interleukin-18 führte bei PBMC zu einem synergistischen Effekt auf die Induktion der Interferon- γ -Synthese. Bei PHA-stimulierten - nicht aber bei B7-1-stimulierten - T-Zellen konnte eine durch Interleukin-12 gesteigerte T-Zell-Proliferation durch Interleukin-18 noch weiter gesteigert werden, ohne dass dabei ein synergistischer Effekt festgestellt werden konnte. Im Hinblick auf die Induktion der Interferon- γ -Synthese konnte weder bei PHA-Stimulation noch bei B7-1-vermittelter Kostimulation von T-Zellen ein zusätzlicher Effekt durch die Kombination von IL-12 mit IL-18 festgestellt werden.

Zweiter Teil

4.3 Herstellung der Expressionsvektoren pTracer (4-1BB-L), pTracer (B7-1) und pTracer (B7-2)

Neben den kostimulatorischen Oberflächenproteinen B7-1 und B7-2, die über die Interaktion mit dem Rezeptor CD28 auf T-Zellen nach heutigem Wissensstand die stärksten kostimulatorischen Signale vermitteln (Bluestone 1995, Robey und Allison 1995, Allison 1994) sind weitere Oberflächenmoleküle identifiziert worden, die eine kostimulatorische Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung ausüben können (Mueller 2000, Whitmire und Ahmed 2000, Watts und DeBenedette 1999). Zu diesen zählt auch der Ligand von 4-1BB, einem Protein, das als induzierbares T-Zell-Antigen und Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie (Vinay und Kwon 1998) über eine Interaktion mit 4-1BB-Ligand ein starkes Signal für die T-Zell-Aktivierung liefern kann (Cannons et al. 2001, DeBenedette et al. 1997). Wie B7-1 und B7-2 wird auch 4-1BB-Ligand auf aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen, darunter Makrophagen, Dendritische Zellen und aktivierte B-Zellen, exprimiert (DeBenedette et al. 1997, Alderson et al. 1994, Goodwin et al. 1993).

Durch die Transfektion der kolorektalen Karzinomzellen HT-29 mit 4-1BB-Ligand alleine und in Kombination mit den B7-Molekülen sollte das Ziel, die Immunogenität der HT-29 Tumorzellen zu steigern, weiterverfolgt werden. Zunächst wurde der Frage, inwieweit durch Stimulation von PBMC die Expression dieser kostimulatorischen Oberflächemoleküle induziert werden kann, unter Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion nachgegangen. Im nächsten Schritt wurden die für eine stabile Transfektion der Tumorzellen mit B7-1, B7-2 und 4-1BB-Ligand erforderlichen Expressionsvektoren kloniert.

4.3.1 Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf stimulierten mononukleären Zellen

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde unter Einsatz der in Abschnitt 3.7.2 beschriebenen cDNA aus stimulierten PBMC und mit den in Abschnitt 3.7.3 angegebenen Primern die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle B7-1, B7-2 und 4-1BB-Ligand untersucht.

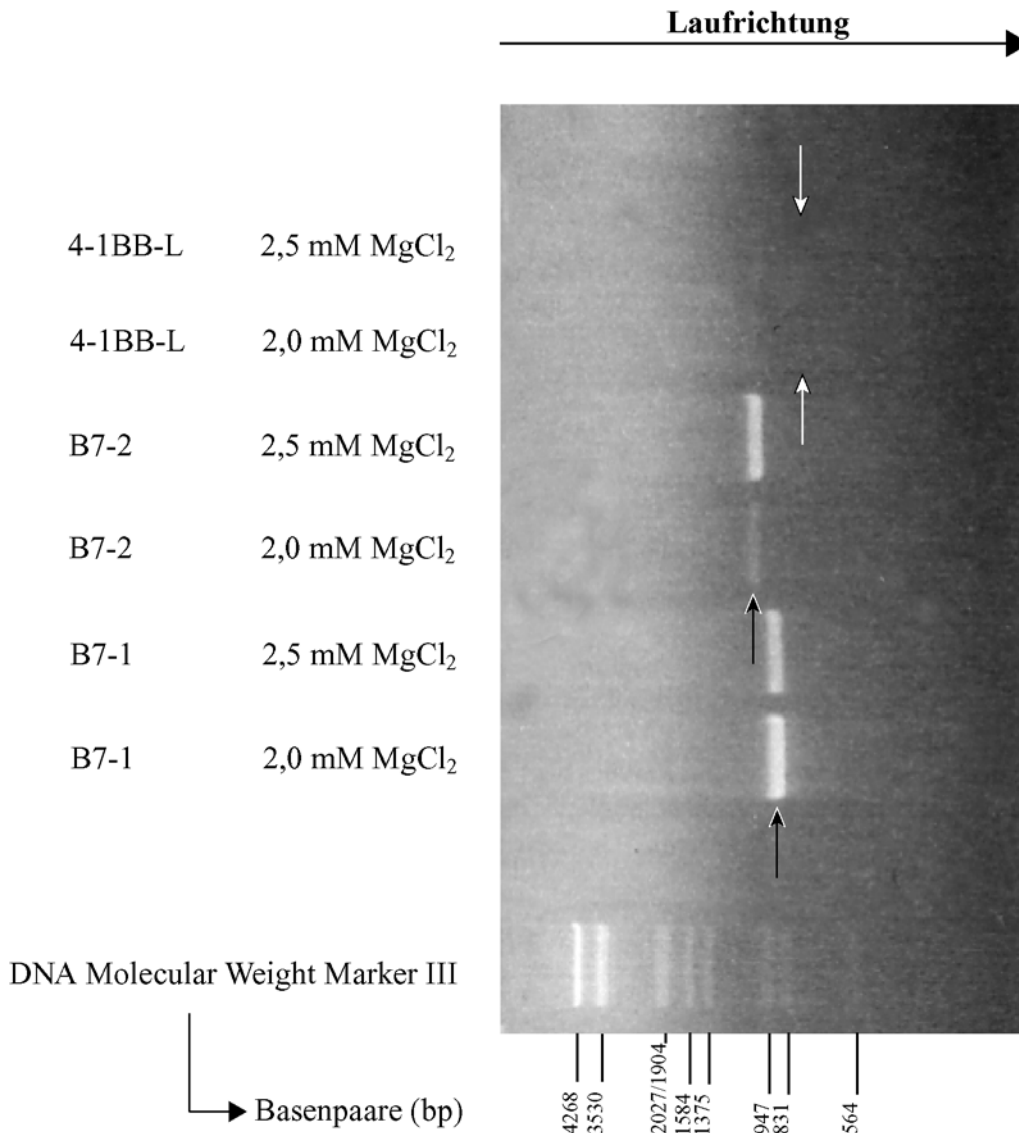


Abbildung 4.21 Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf PBMC. Für die PCR diente cDNA von PBMC, die für 20 Stunden mit 1000 U/ml *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) und 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurden, als Template. Die PCR wurde mit zwei unterschiedlichen Magnesiumchlorid (MgCl₂)-Konzentrationen (2,0 mM und 2,5 mM) durchgeführt. Kontrollen bestanden in PCR-Ansätzen ohne cDNA und PCR mit GAPDH-Primern (Kontrollen nicht dargestellt). Dargestellt sind positive Banden für B7-1 und B7-2 (schwarze Pfeile) und fehlende Banden für 4-1BB-Ligand (weiße Pfeile). Exemplarische Darstellung eines PCR-Ergebnisses.

Abbildung 4.21 zeigt stellvertretend für eine Reihe von Polymerase-Kettenreaktionen, dass durch Stimulation von PBMC eine Expression der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 nachzuweisen war. Die Banden für B7-1 und B7-2 entsprechen in ihrer Größe den kodierenden DNA-Sequenzen (CDS) für B7-1 und B7-2 in der Literatur (Tabelle 4.1). Trotz Variation von Stimulations- und PCR-Bedingungen war hingegen eine eindeutige Amplifikation des 4-1BB-Ligand-Gens nicht möglich (leere Bande in Abbildung 4.21).

Kostimulatorisches Oberflächenmolekül	Länge der CDS in Basenpaaren (bp)	Referenz
B7-1	867	Freeman et al. 1989
B7-2	972	Azuma et al. 1993
4-1BB-Ligand	765	Alderson et al. 1994

Tabelle 4.1 Länge der kodierenden DNA-Sequenz (CDS) von B7-1, B7-2 und 4-1BB-Ligand.

Als Kontrolle für die Funktionalität der Primer dienten Polymerase-Kettenreaktionen mit Plasmid-DNA, die die entsprechenden Gene für B7-1, B7-2 und 4-1BB-Ligand enthielt. Beispielhaft ist in Abbildung 4.22 das Ergebnis einer PCR mit Primern für 4-1BB-Ligand dargestellt. Als DNA wurde der Sequenzierungsvektor pCR-BluntII-Topo (Invitrogen), der die genomische Sequenz für 4-1BB-Ligand enthielt und freundlicherweise von Dr. med. U. Hacker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. M. Hallek, Genzentrum der Universität München, zur Verfügung gestellt wurde, eingesetzt. Die positiven Bande unterhalb der 831 bp-Marke des „Molecular Weight Marker III“ decken sich mit der in der Literatur für die 4-1BB-Ligand-Sequenz angegebenen Größe von 765 bp.

Für B7-1 und B7-2 erbrachte die PCR mit Plasmid-DNA vergleichbare Ergebnisse. Die aus den Gelen aufgereinigten PCR-Produkte wurden durch die Firma MediGenomix (Planegg/ Martinsried) sequenziert und die Sequenzierungsergebnisse mit Hilfe des Software-Programms DNAsis (Version 6,0; Pharmacia, Uppsala, Schweden) analysiert und anhand des Programms BLAST (*Basic local alignment search tool*, Altschul et al. 1997) mit den publizierten Sequenzen verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

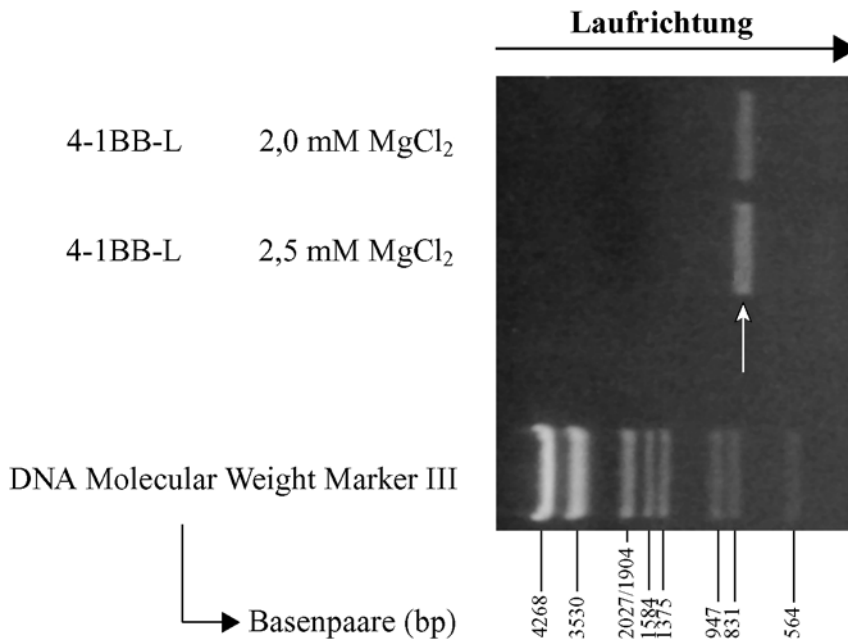


Abbildung 4.22 PCR mit 4-1BB-Ligand-Primerpaar und Plasmid-DNA (Sequenzierungsvektor pCR-BluntII-Topo [Invitrogen] mit der genomischen Sequenz für 4-1BB-Ligand). Die PCR wurde mit zwei unterschiedlichen Magnesiumchlorid (MgCl₂)-Konzentrationen (2,0 mM und 2,5 mM) und einer Kontrolle durch PCR-Ansatz ohne DNA (nicht dargestellt) durchgeführt. Dargestellt sind positive Bande für 4-1BB-Ligand (weißer Pfeil).

Die Sequenzierung mit spezifischen Primern (Abschnitt 3.7.3) ergab durchschnittliche Nukleotidsequenzen von 650 bp. Der Vergleich dieser PCR-Produkt-Sequenzen anhand des BLAST-Programms lieferte 98 % bis 100 % Übereinstimmung mit den publizierten Sequenzen für alle drei der untersuchten, kostimulatorischen Moleküle.

4.3.2 Konstruktion von pTracer (4-1BB-L), pTracer (B7-1) und pTracer (B7-2)

Für eine Transfektion der Tumorzellen mit 4-1BB-Ligand bzw. eine Kotransfektion mit 4-1BB-Ligand und den B7-Molekülen war die Konstruktion von geeigneten Expressionsvektoren erforderlich. Es wurde die Klonierung von einheitlichen Expressionsvektoren für 4-1BB-Ligand, B7-1 und B7-2 angestrebt. Von den zwei Alternativen – Klonierung der PCR-Produkte oder Klonierung von DNA-Fragmenten aus einem Ausgangsvektor – wurde die letztgenannte favorisiert.

pTracer (4-1BB-L)

Als Ausgangsvektor für 4-1BB-Ligand diente der Sequenzierungsvektor pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen), der die genomische Sequenz für 4-1BB-Ligand enthielt (aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. M. Hallek, Genzentrum der Universität München). Nach Transformation von kompetenten Zellen wurden ausreichende Mengen des Plasmids über die Maxipräparationsmethode isoliert und mit den Restriktionsenzymen Asp 718 I und Xba I verdaut. Die DNA-Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (Abschnitt 3.8).

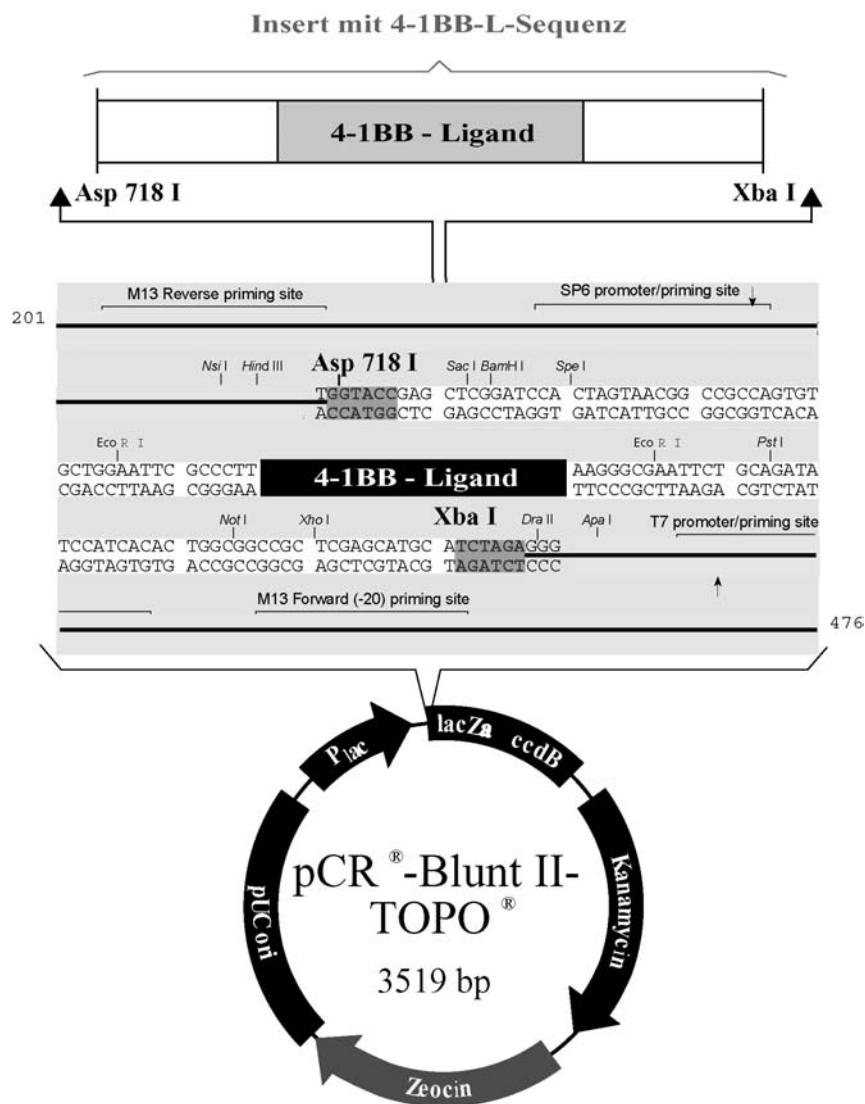


Abbildung 4.23 Ausgangsvektor für 4-1BB-Ligand. Das PCR-Produkt für 4-1BB-Ligand war im Vorfeld in den Sequenzierungsvektor pCR-Blunt II- TOPO (Invitrogen) kloniert worden. Durch die Restriktionsenzyme Asp 718 I und Xba I konnte die genomische Sequenz für 4-1BB-Ligand aus dem Sequenzierungsvektor geschnitten werden (Insert). [pUC Vektor (*multi copy plasmid*) mit *origin of replication* (pUC_{ori}) und mit lac-regulatorischer Region (Promotor P_{lac}, Operator) und lacZ-Gen (lacZ α) als Marker; ccdB, *control of cell death*-Gen]

Parallel wurde auch der Zielvektor pTracer-CMV2 (Invitrogen) amplifiziert und mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert (Abbildung 4.24) und aufgereinigt. In einer Ligasereaktion wurde das Insert mit der 4-1BB-Ligand-Sequenz in den Zielvektor kloniert (Abschnitt 3.8.5) und kompetente Zellen mit dem neuen Expressionsvektor transformiert. Nach Selektion der positiven Klone auf antibiotikahaltigen Agarplatten, konnten diese durch DNA-Minipräparationen und anschließende Restriktionsanalysen identifiziert (Abbildung 4.25) und für eine Retransformation eingesetzt werden. Die weitere Amplifizierung und Aufreinigung der positiven Klone erfolgte über Midipräparationen.

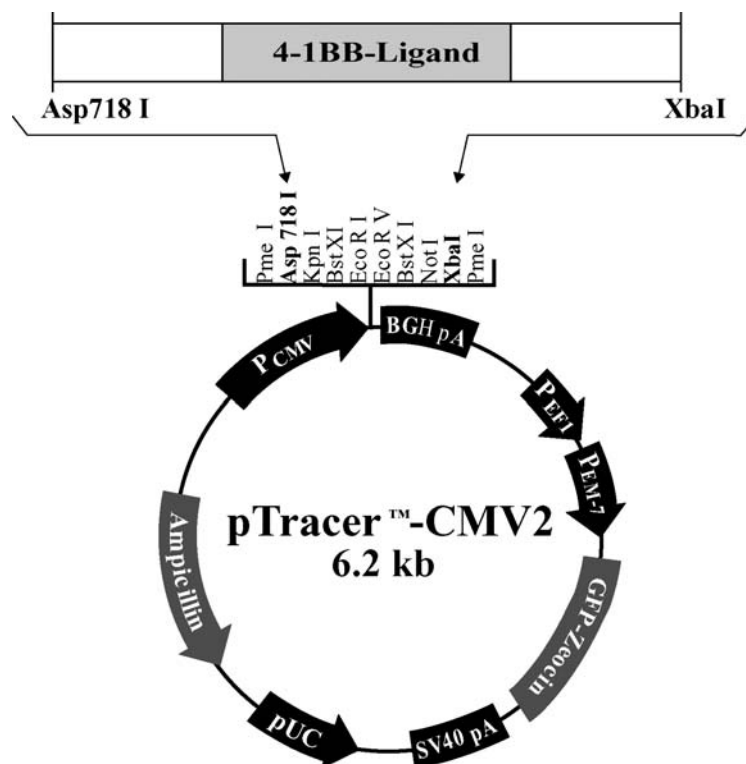


Abbildung 4.24 Zielvektor pTracer-CMV2 [Invitrogen] mit *multiple cloning site*. Über die Restriktionsenzyme Asp 728 I und Xba I konnte das Insert aus dem Ausgangsvektor einkloniert werden. Bei dem pTracer-CMV2 handelt es sich um einen pUC Vektor (*multi copy plasmid*) mit *origin of replication* (pUC) und CMV-Promotor (P_{CMV}) [*bovine growth hormone polyadenylation signal* (BGH pA); *human EF-1 α promoter* (P_{EF1}); *EM-7 promoter* (P_{EM-7}); *SV40 polyadenylation signal* (SV40 pA), Ampicillinresistenzgen (Ampicillin) und Fusion des Zeocinresistenzgens mit dem Gen für Grün fluoreszierendes Protein (GFP-Zeocin)].

Eine Besonderheit des Expressionsvektors pTracer-CMV2 lag in der konstitutiven Expression einer optimierten Form des Grün fluoreszierendes Proteins (GFP), einem kleinen, sehr stabilen Protein, das aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert worden ist.

Durch Fusion mit dem Zeocinresistenzgen (GFP-Zeocin, Abbildung 4.24) ermöglicht dieser Lumineszenzfarbstoff die schnelle Selektion von erfolgreich transfizierten Zellen. Diese können mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie identifiziert werden und durch *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) separiert werden.

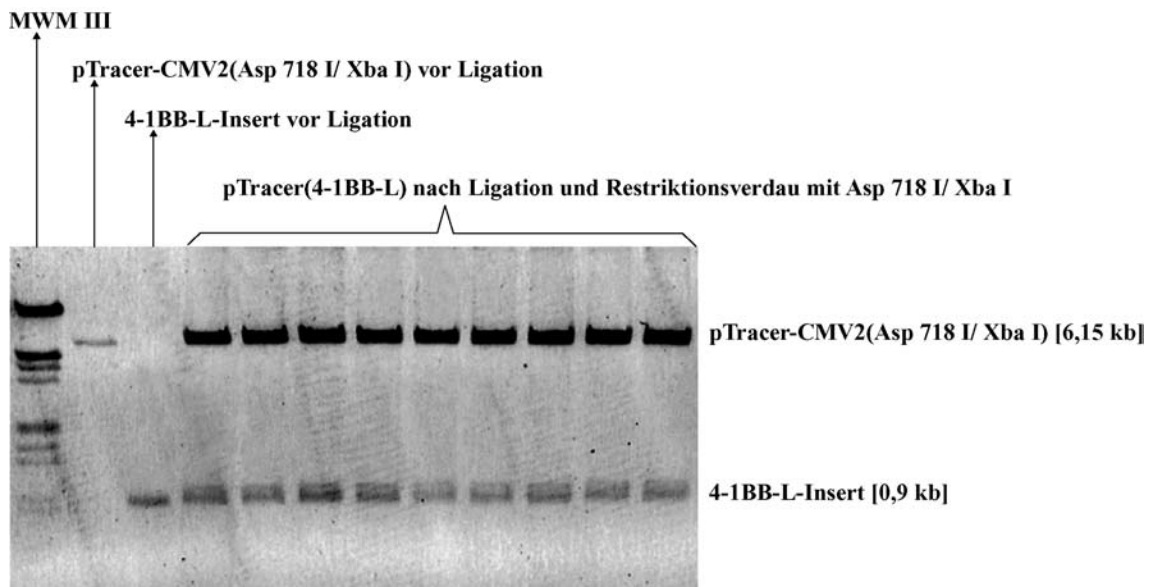
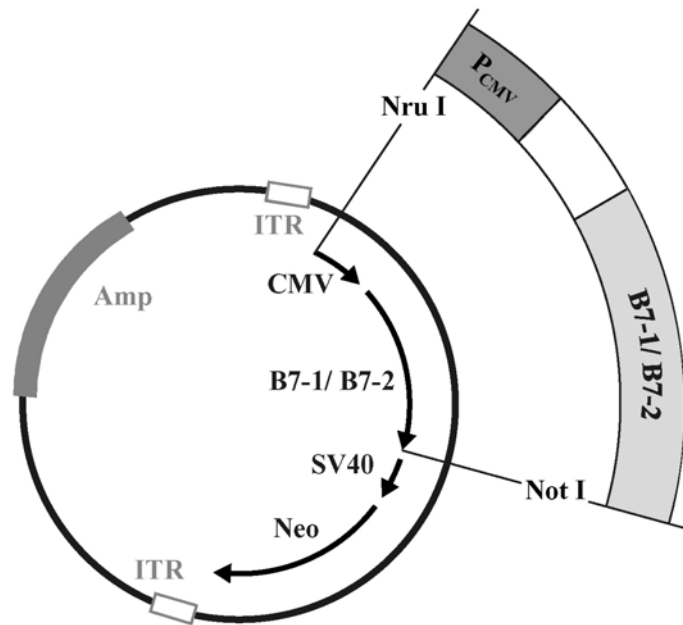


Abbildung 4.25 Restriktionsanalyse nach Selektion der positiven Klone des neuen Expressionsvektors pTracer (4-1BB-L) auf antibiotikahaltigen Agarplatten und anschließender DNA-Miniprparationen. Im Gel aufgetragen sind von links nach rechts Molecular weight marker III, mit Asp 718 I/ Xba I linearisierter Zielvektor pTracer-CMV2, aus dem Ausgangsvektor pCR-Blunt II- TOPO(4-1BB-L) ausgeschnittenes Insert mit 4-1BB-Ligand-Sequenz, 9 Klone des neuen Expressionsvektors pTracer (4-1BB-L) nach Restriktionsverdau mit Asp 718 I/ Xba I. Bei allen 9 Klonen war die Klonierung erfolgreich.

pTracer (B7-1) und pTracer (B7-2)

Das Vorgehen bei B7-1 und B7-2 war identisch. Als Ausgangsvektor dienten die Plasmide pSUB/Cep4-B7-1 und pSUB/Cep4-B7-2 (Abbildung 4.26), die im Vorfeld freundlicherweise von Dr. med. U. Hacker und Dr. med. T. Röhnisch (Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. M. Hallek, Genzentrum der Universität München) zur Verfügung gestellt worden waren. Bei den Plasmiden (Adeno-assoziiertes Virus (AAV) -Plasmid) wird die cDNA für B7-1 und B7-2 durch einen CMV-Promotor, die Neomycinkassette durch einen SV40-Promotor gesteuert. Das Plasmid enthielt zwei *inverted terminal repeats* (ITR) und eine für die Ampicillinresistenz kodierende Sequenz (Wendtner et al. 1997)

Abbildung 4.26 Das Plasmid pSUB/Cep4-B7-1 bzw. -B7-2, ein für B7-1 bzw. B7-2 kodierendes AAV-Plasmid mit CMV-Promotor (CMV, P_{CMV}) und Neomycinresistenzgen (Neo) mit SV40-Promotor. Die beiden Plasmide dienen als Ausgangsvektor, aus denen über die Restriktionsenzyme Nru I und Not I die cDNA für B7-1 bzw. B7-2 und der CMV-Promotor, der ursprünglich aus dem Vektor pCMV-pTracer [Invitrogen] stammte, ausgeschnitten wurden. (Amp, Ampicillinresistenzgen; ITR, *inverted terminal repeat*).



Nach Restriktionsverdau des Ausgangsvektors pSUB/Cep4-B7-1 bzw. -B7-2 und des Zielvektors pTracer-CMV2 mit den Restriktionsenzymen Nru I und Not I wurden die DNA-Fragmente über Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (vgl. Abschnitt 3.8). In einer Ligasereaktion wurde das jeweilige Insert in den Zielvektor kloniert (Abbildung 4.27). Es folgten wie für 4-1BB-Ligand beschrieben die Schritte Transformation, Selektion der positiven Klone, DNA-Minipräparation, Restriktionsanalyse, Retransformation und weitere Aufreinigung der positiven Klone über Plasmid-Midipräparation (vgl. Abschnitt 3.8.5).

In Abbildung 4.28 ist schematisch der Aufbau der neu klonierten Expressionsvektoren pTracer(4-1BB-Ligand), pTracer(B7-1) und pTracer(B7-2) dargestellt. Nach Identifikation der positiven Klone mittels Restriktionsanalyse wurden diese durch die Firma MediGenomix (Planegg/ Martinsried) sequenziert und die Ergebnisse mit Hilfe des Software-Programms DNAsis (Version 6,0; Pharmacia, Uppsala, Schweden) und anhand des Programms BLAST (*basic local alignment search tool*, Altschul et al.1997) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] analysiert. Es sollte dabei sichergestellt werden, dass die einklonierte cDNA sich in der richtigen Orientierung für eine Expression befand und ein Start (ATG)- und Stopp (TAG)-Codon vorhanden waren.

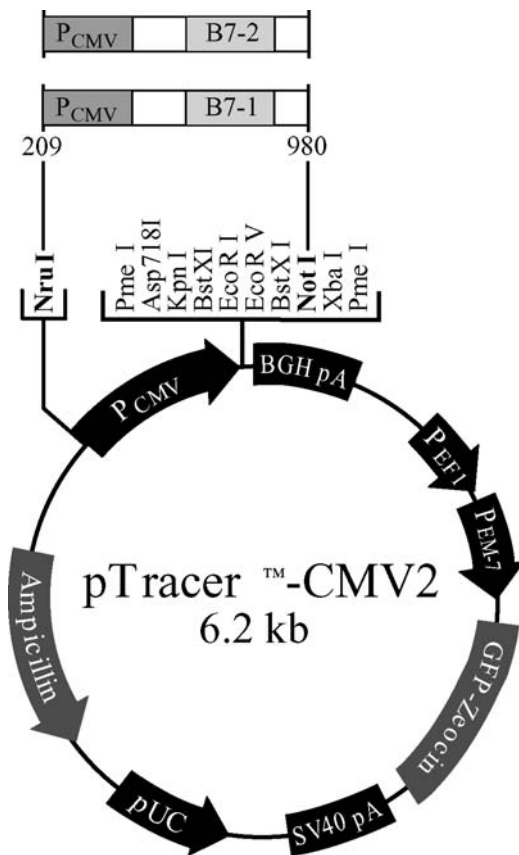


Abbildung 4.27 Zielvektor pTracer-CMV2 [Invitrogen] mit *multiple cloning site*. Über die Restriktionsenzyme Nru I und Not I wurde das Insert mit dem „neuen“ CMV-Promotor und der cDNA für B7-1 bzw. B7-2 aus dem Ausgangsvektor pSUB/Cep4-B7-1 bzw. -B7-2 einkloniert

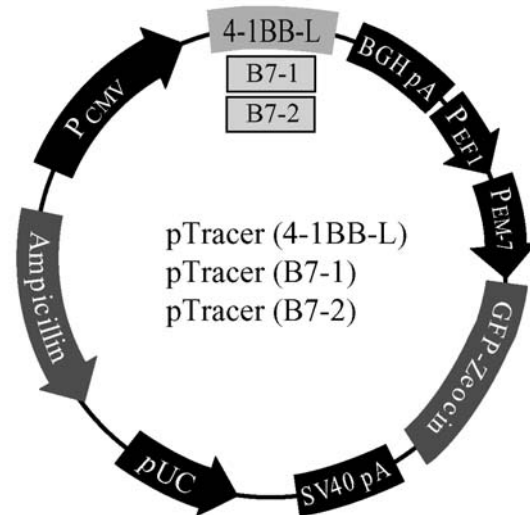


Abbildung 4.28 Schematische Darstellung der drei neuen Expressionsvektoren für 4-1BB-Ligand, B7-1 und B7-2. (*origin of replication* (pUC); CMV-Promotor (P_{CMV}); *bovine growth hormone polyadenylation signal* (BGH pA); *human EF-1 α promoter* (P_{EF1}); *EM-7 promoter* (P_{EM-7}); *SV40 polyadenylation signal* (SV40 pA), Ampicillinresistenzgen (Ampicillin), Fusion des Zeocinresistenzgens mit dem Gen für Grün fluoreszierendes Protein (GFP-Zeocin).

Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass das jeweilige Insert insgesamt in 2 Klone von pTracer(4-1BB-L), 4 Klone von pTracer(B7-1) und 1 Klon von pTracer(B7-2) in der richtigen Orientierung und mit einer 99 % bis 100 % Übereinstimmung des Sequenzergebnisses mit den publizierten Sequenzen für 4-1BB-Ligand, B7-1 und B7-2 einkloniert worden war.

5 Diskussion

5.1 B7-1-transfizierte HT-29 Kolonkarzinomzellen

Eine Aktivierung von T-Zellen durch HT-29 Kolonkarzinomzellen im T-Zell-Proliferationsassay war an zwei Bedingungen gebunden: an die Transfektion mit dem kostimulatorischen Oberflächenmolekül B7-1 und an die Anwesenheit eines Lektins. Nicht modifizierte (Wildtyp) und Kontrollvektor-transfizierte HT-29 Zellen lösten keine Proliferation ruhender T-Zellen aus. Da es sich um einen allogenen Ansatz handelt, d.h. Tumorzellen und T-Zellen mit unterschiedlichem HLA-Hintergrund in einer *mixed lymphocyte-tumor-cell culture* (MLTC) zusammengebracht werden, wäre auch für Tumorzellen, die kein B7-1 exprimieren, eine ausreichende Antigenpräsenz theoretisch denkbar gewesen. Dass dem nicht so ist, lässt sich mit einer primär geringen Immunogenität von HT-29 Kolonkarzinomzellen vereinbaren.

Von den drei Signalen, die zur Induktion einer effektiven T-Zell-Aktivierung mindestens erforderlich sind, Adhäsion, Antigenerkennung und Kostimulation (Schultze et al. 1996), können HT-29 Zellen zumindest zwei liefern. Die HT-29 Zellen, die in den Versuchen eingesetzt wurden – mit und ohne Transfektion von B7-1 – exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle in einem hohem Maß (> 90 %), während, wie in der Literatur für HT-29 bereits beschrieben (Liu et al. 1997), keine Expression von MHC-Klasse-II-Moleküle zu verzeichnen war. Ein repräsentatives Ergebnis, verglichen mit der durchflusszytometrischen Untersuchung an 70 kolorektalen Zelllinien, die zeigte, dass alle Zelllinien MHC-Klasse-I exprimierten (bei 60 der 70 waren sogar mehr als 99 % der Zellen positiv für MHC-Klasse-I) (Diederichsen et al. 1998).

Für kolorektale Karzinome sind eine Reihe von tumorassoziierten Antigenen (TAA) beschrieben (Mulder et al. 1995, Yoshida et al. 1995, Kotera et al. 1994). Auch bei HT-29 Zellen wurden TAA, zu denen CEA, colon antigen 3, myc, myb, ras, fos, sis, p53 und CA19-9 zählen (Han und Nair 1995), gefunden. Bezüglich des Antigenpektrums repräsentiert diese Zelllinie den Prototyp einer kolorektalen Tumorzelle. Somit sind theoretisch die Voraussetzungen für eine MHC-I restringierte Antigenpräsentation erfüllt.

Im Vergleich zu den kolorektalen Karzinomzellen exprimieren normale Epithelzellen des Kolons MHC-Klasse-I-Moleküle und LFA-3 (CD58) auf der Zelloberfläche, jedoch nicht MHC-Klasse-II-Moleküle, B7-1 oder ICAM-1 (CD54) (Bloom et al. 1995, Moller et al. 1991).

HT-29 Zellen exprimieren des Weiteren konstitutiv ICAM-1 (CD 54) und LFA-3 (CD58) (Liu et al. 1997), zwei Adhäsionsmoleküle, denen auch ein kostimulatorisches Potential zugeschrieben wird. Zwar wurde die Rolle, die die Adhäsionsmoleküle bei der T-Zell-Aktivierung spielen sollen, in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert. So kommen einzelne Veröffentlichungen zu dem Schluss, dass ICAM-1 nicht suffizient stimulieren würde (Hagerty 1996). In anderen Arbeiten wird ausgesagt, dass ICAM-1 zwar kostimulatorisch wirkt, jedoch keine IL-2-Produktion hervorruft (Boussiotis et al. 1993). Auch für LFA-3 wird ein proliferativer Effekt, jedoch ohne ein *priming* von T-Zellen induzieren zu können, beschrieben (Kufer und Zetl et al. 2001).

Andere Veröffentlichungen zeigen für ICAM-I und LFA-3 eindeutig kostimulatorische Effekte (Gaglia et al. 2000, Kim et al. 1999, Damle et al. 1992). Diese können sowohl unabhängig von einer B7-1/CD28 Kostimulation wirksam sein (Gaglia et al. 2000, Kim et al. 1999) als auch mit B7-1 additive bzw. synergistische Effekte aufweisen (Hargreaves et al. 1995, Umlauf et al. 1995, Gerli et al. 1993, Damle et al. 1992). Hodge et al. (1999) verglichen die kostimulatorische Potenz von ICAM-I, LFA-3 und B7-1, indem sie die murine Adenokarzinomzelllinie MC38 sowohl mit je einem Molekül, als auch mit den möglichen Kombinationen aus je zwei Molekülen und letztlich mit allen drei Molekülen (TRICOM-Vektor) transfizierten. Dabei zeigte sich, dass eine Transfektion mit dem TRICOM-Vektor allen anderen Alternativen überlegen war. *In vitro* führten TRICOM-transfizierte Tumorzellen zu einer stärkeren T-Zell-Aktivierung, gemessen an der höheren T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion (IL-2 und IFN- γ). *In vivo* brachte das Beimpfen mit TRICOM-transfizierten Tumorzellen signifikant längere Überlebenszeiten für die Versuchstiere. Somit können für Adhäsionsmoleküle und B7-1 additive Effekte angenommen werden. Interessant ist dabei, dass in den *in vitro* Versuchen eine zusätzliche Stimulation der T-Zellen durch ConA oder Anti-CD3-Antikörpern notwendig war, während die *in vivo* Effekte ohne zusätzliche Stimulanzen möglich waren.

Ganz unabhängig davon, ob nun ICAM-1 (CD 54) oder LFA-3 (CD58) eine rein adhäsive Wirkung oder durchaus kostimulatorisches Potenzial haben, sie spielen auf jeden Fall bei der T-Zell-Aktivierung eine wesentliche Rolle. Ihre Expression auf HT-29 Tumorzellen alleine reichte aber alleine nicht aus, um eine T-Zell-Proliferation – auch nicht in Anwesenheit von Lektinen – zu induzieren.

Neben Adhäsionsmolekülen und MHC-Klasse-I restringierter Präsentation von Tumorantigenen tragen B7-1-transfizierte HT-29 Zellen auch ein kostimulatorisches Oberflächenmolekül, dessen funktionelle Wirksamkeit experimentell nachgewiesen werden konnte. In den *in vitro* Versuchen konnte eine T-Zell-Proliferation nur durch die Expression von B7-1 auf HT 29 Zellen induziert werden. Voraussetzung für diese Induktion war aber die Anwesenheit von ConA. Ohne submitogene Konzentrationen dieses Lektins waren B7-1-transfizierte HT-29 Tumorzellen alleine nicht ausreichend immunogen. Diese Beobachtung deckt sich mit Angaben für B7-1-transfizierte kolorektale Tumorzellen in der Literatur (Lindauer et al. 1998, Habicht et al. 1995).

Lektine sind Proteine (Concanavalin A) oder Glycoproteine (Phytohämagglutinin), die über mindestens zwei Zuckerbindungsstellen verfügen und ein Agglutinations- bzw. Präzipitationsvermögen besitzen (Min et al. 1992). Im Bezug auf die Aktivierung von Lymphozyten scheinen Lektine am T-Zell-Rezeptor mit den assoziierten Molekülen anzusetzen (Chilson und Kelly-Chilson 1989). Im Gegensatz zu einer Antigen-vermittelten Aktivierung handelt es sich nicht um eine spezifische Bindung, sondern um eine polyklonale Aktivierung. Da der T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche mit glykosylierten Molekülen, insbesondere CD3, aber auch mit CD2, CD4, CD5 und CD8 in Verbindung steht, muss von einer unspezifischen Aktivierung durch Bindung an die vorhandenen Saccharid-Strukturen ausgegangen werden. Als Folge der Aktivierung kommt es zur IL-2 Synthese der Lymphozyten, jedoch nur in Anwesenheit von kostimulatorischen Molekülen (Umetsu et al. 1987), d.h. Lektinen wird eher eine verstärkende als eine initiierende Potenz im Rahmen der T-Zell-Aktivierung zugesprochen. Das zeigt sich auch in der geringeren Aktivierbarkeit von aufgereinigten T-Zellen im Unterschied zu PBLs durch Lektine (Schmidtke und Hatfield 1976). Davon abweichend führt Phytohämagglutinin auch ohne zusätzliche kostimulatorische Signale zur T-Zell-Proliferation (Kilpatrick 1988).

Wenn also die T-Zell-Aktivierung durch B7-1-transfizierte HT-29 Tumorzellen letztendlich von der Zugabe des Lektins ConA in submitogener Konzentration abhängt, scheint es sich bei der fehlenden T-Zell-Aktivierung durch B7-1-exprimierende Tumorzellen ohne Lektine unter anderem auch um eine mangelnde T-Zell-Rezeptor-Stimulation zu handeln.

Für zwei andere kolorektale Zelllinien wurde jedoch in der Literatur eine T-Zell-Aktivierung ohne zusätzliche Stimulanzen im Sinne von Lektinen bzw. Mitogenen in Anwesenheit von B7-1-exprimierenden Karzinomzellen beschrieben (Miyazono et al. 1999, Lindauer et al. 1998). Die verwendeten Karzinomzellen zeigten dabei ein unterschiedliches Expressionsprofil, waren wohl aber in der Lage, eine ausreichende T-Zell-Rezeptor-Stimulation auszulösen.

Als weiterer Erklärungsversuch kommt eine mögliche immunsuppressive Wirkung der kolorektalen Karzinomzellen in Betracht. Durch verschiedene Mechanismen sind Tumorzellen in der Lage, Immuntoleranz zu induzieren (Ahmad et al. 2004). Auch für kolorektale Karzinome konnten immunsuppressive Effekte mit Dysfunktion von T-Zellen verbunden mit Funktionsverlust aufgezeigt werden (Luo et al. 2000). Des Weiteren werden IL-10 und *transforming growth factor-beta* (TGF- β) als immunsuppressive Zytokine auch von kolorektalen Karzinomen sezerniert, um einer Immunantwort zu entgehen (Somasundaram et al. 2002, Kucharzik et al. 1997). Da es sich bei den HT-29 Zellen im T-Zell-Proliferationsassay um bestrahlte, also avitale und mehrmals gereinigte Tumorzellsuspensionen handelt, sind diese immunsuppressiven Effekte eher unwahrscheinlich.

Der Mechanismus der Apoptose bei T-Lymphozyten über die Interaktion von CD95 (Fas) und CD95-Ligand (Fas-Ligand) kann durch permanente Aktivierung von T-Zellen ausgelöst werden. Dieser Mechanismus, auch als aktivierungsinduzierter Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) bezeichnet, soll eigentlich dazu dienen, autoreaktive Immunzellen zu eliminieren. Diesen Mechanismus scheinen auch Tumorzellen zu nutzen, um tumorspezifische T-Zellen auszuschalten. Durch Herabregulation von CD95 schützen Tumorzellen sich selbst und durch die Expression von CD95L können sie Lymphozyten in die Apoptose treiben, so dass eine T-Zell-Proliferation verhindert wird (Strand et al. 1996). Für kolorektale Karzinome ist eine

Induktion der Fas-Ligand-Expression, die klinisch mit dem Auftreten von Metastasen korreliert, beschrieben worden (Nozoe et al. 2003). Auch bei HT-29 Tumorzellen ist die Expression von Fas-Ligand bekannt (Eberl et al. 2000). Das Verhältnis zwischen Tumorzellen und T-Zellen scheint letztendlich darüber zu entscheiden, ob Tumorzell-induzierte Apoptose der T-Zellen oder T-Zell-Proliferation unter kostimulatorischen Einflüssen überwiegt (Lang et al. 2000). CD28/B7-1-vermittelten Signalen scheint auch hier eine wichtige Rolle zuzukommen (Boise et al. 1995), indem sie T-Zellen vor dem AICD während der Aktivierungsphase (Noel et al. 1996), als auch in der zytolytischen Phase schützen (Daniel et al. 1997).

Zu bedenken ist auch eine Signaltransduktion über den CTLA 4-Rezeptor, für den eine vielfach höhere Affinität für B7-Moleküle beschrieben ist. Auf naiven T-Zellen wird CTLA-4 nur sehr gering exprimiert und erst durch eine T-Zell-Aktivierung hochreguliert. Die positiven kostimulatorischen Signale, die durch die Bindung von B7-1 an CD28 hervorgerufen werden, kann CTLA-4 sowohl durch die höhere Affinität zu B7-1 (Carreno et al. 2000) als auch durch eigene, inhibierende Signaltransduktion (Lee et al. 1998) verhindern. Inzwischen sind neue Mitglieder der B7-Familie beschrieben worden (Coyle und Gutierrez-Ramos 2001). Zu diesen gehört auch PD-1, ein weiterer inhibierende Rezeptor mit Expression auf aktivierten B- und T-Lymphozyten, der ebenfalls über einen negativen *feedback* Mechanismus dafür sorgt, dass die T-Zellaktivierung wieder reduziert wird (Freeman et al. 2000, Agata et al. 1996).

In einem theoretischen Stufenmodell für die Aktivierung von T-Zellen findet bei niedrigem kostimulatorischem Signal - aber suffizienter TZR-Aktivierung - eine schnelle CTLA-4-Expression statt, um den Vorgang frühzeitig zu limitieren (Chambers et al. 2001). Durch Blockade von CTLA-4 wurde für einige Tumorzelllinien eine Abstoßung nach Transplantation beschrieben (Shrikant et al. 1999, Sotomayor et al. 1999). Die zusätzliche B7-1-Transfektion zur CTLA-4-Blockade führte in anderen Arbeiten zu einer Steigerung der T-Zell-Antwort (Van Ginderachter et al. 2000).

Eine Proliferation von Tumorzellen ist weder im T-Zell-Proliferationsassay noch bei einem Einsatz von modifizierten Tumorzellen als Vakzine erwünscht. Als Inaktivierungsmethode wurde für diese Arbeit die Bestrahlung mit UV-B Licht gewählt.

In den meisten publizierten Arbeiten hingegen wird die radioaktive Bestrahlung mit Gamma-Strahlen analog zur Radiatio bei klinischen Tumoren verwendet. Zur UV-B Bestrahlung von Tumorzellen, die T-Zellen als Target dienen sollen, gibt es nur sehr wenige Angaben in der Literatur. Umezumi et al. (1993) untersuchten den Effekt von UV-B Bestrahlung auf Melanom- und Nierenkarzinomzellen im Hinblick auf die Expression von Oberflächenmolekülen und der Fähigkeit, zytotoxische T-Zellen (CTL) zu aktivieren. Bestrahlte Tumorzellen induzierten CTL-Aktivität, die auch gegen unbestrahlte Tumorzellen gerichtet war. Bereits in einer früheren Arbeit von Gorelik et al. (1991) führte UV-C Bestrahlung bei einem nicht-immunogenem Fibrosarkom zur Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen und zur Tumorabstoßung in Mäusen. In beiden Arbeiten war dieser Effekt unabhängig von dem Expressionsmuster der Tumorzellen.

In einer neueren Veröffentlichung (Ishii et al. 2003) wurden kolorektale Tumorzellen (darunter auch HT-29 Zellen) nach Gamma-Bestrahlung oder UV-B Bestrahlung mit Dendritischen Zellen (DC) ko-kultiviert und phänotypische sowie funktionelle Veränderungen der DCs untersucht. Dabei führte die Ko-Kultur mit UV-B bestrahlten Tumorzellen zu einer stärkeren Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf den DCs, die wiederum eine effizientere Stimulation von allogenen T-Lymphozyten bewirkten. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung vor und nach UV-B Bestrahlung der HT-29 Zellen konnte keine Veränderung der Oberflächenexpression von MHC-Molekülen und B7-1 festgestellt werden. Hinsichtlich der T-Zell-Proliferation konnte kein Unterschied zwischen radioaktiv bestrahlten und UV-B bestrahlten Tumorzellen verzeichnet werden. Inwieweit je nach Bestrahlungsart ein Unterschied in der Immunogenität der Tumorzellen vorliegt, kann nur durch *in vivo* Versuche geklärt werden.

Auch wenn in vielen Fällen MHC-Moleküle, Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle der B7-Familie ausreichend sein können, ist sicher davon auszugehen, dass es zusätzliche Faktoren gibt, die für die Initiierung und Amplifikation einer T-Zell-Antwort alleine oder im Zusammenwirken mit den bisher beschriebenen Faktoren wichtige Funktion innehaben.

5.2 Einfluss der Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18

Ein „drittes Signal“ kann durch proinflammatorische Zytokine vermittelt werden (Curtsinger et al. 2003). Zwei Vertreter dieser Zytokin-Gruppe, IL-12 und IL-18, aktivieren vor allem die zelluläre Immunität, unter anderem indem sie eine Th1-Differenzierung der T-Helferzellen induzieren (Okamura et al. 1995, Trinchieri 1994). Im Bezug auf die Induktion der IFN- γ -Synthese ist ein synergistischer Effekt für IL-12 und IL-18 beschrieben (Micallef et al. 1996). IFN- γ hingegen hat sich in vielfacher Hinsicht als potenter Immunmodulator erwiesen. Auch für die Immunogenität von HT-29 Tumorzellen wurde ein positiver Effekt von IFN- γ beschrieben (Han und Nair et al. 1995).

Um zu überprüfen, welchen Einfluss IL-12 und IL-18 auf die T-Zell-Aktivierung durch HT-29 Kolonkarzinomzellen haben können, wurde eine Reihe von Stimulationsversuchen durchgeführt, in denen die Zytokine alleine und in Kombination eingesetzt wurden (Übersicht Abbildung 5.1). Parallel zu den Versuchen mit T-Zellen wurde auch der Effekt beider Zytokine auf PBMCs untersucht, um so Daten zur biologischen Aktivität der Zytokine zu erhalten.

Dabei zeigte sich, dass IL-18 alleine nur bei PBMCs zu einer signifikanten Induktion der IFN- γ -Synthese führte - allerdings erst in sehr hohen Konzentrationen und nur in Anwesenheit von ConA in submitogener Konzentration. Ganz im Gegensatz dazu zeigte IL-12 bei PBMCs bereits in niedrigen Konzentrationen eine konzentrationsabhängige Induktion der IFN- γ -Synthese. Bei T-Zellen konnte IL-18 weder die IFN- γ -Synthese noch eine (verstärkte) T-Zell-Proliferation induzieren, unabhängig davon ob T-Zellen in Anwesenheit von HT-29 Tumorzellen oder Mitogenen stimuliert wurden. IL-12 hingegen hatte bei T-Zellen, die mit PHA oder [HT-29/B7-1 Zellen und ConA] stimuliert wurden, einen steigernden Effekt sowohl auf T-Zell-Proliferation als auch auf IFN- γ -Synthese. Bei naiven T-Zellen oder in Anwesenheit von ConA in submitogener Konzentration führte auch IL-12 nicht zu einer T-Zell-Aktivierung.

Die Kombination von IL-12 und IL-18 führte bei PBMCs zu einem synergistischen Effekt auf die IFN- γ -Induktion, während bei PHA-stimulierten T-Zellen zwar kein synergistischer jedoch ein steigender Effekt auf die T-Zell-Proliferation zu verzeichnen war. In allen anderen Ansätzen mit T-Zellen hingegen brachte die Kombination der beiden Zytokine keinen zusätzlichen Effekt verglichen mit den Ergebnissen, die durch IL-12 alleine erreicht werden konnten.

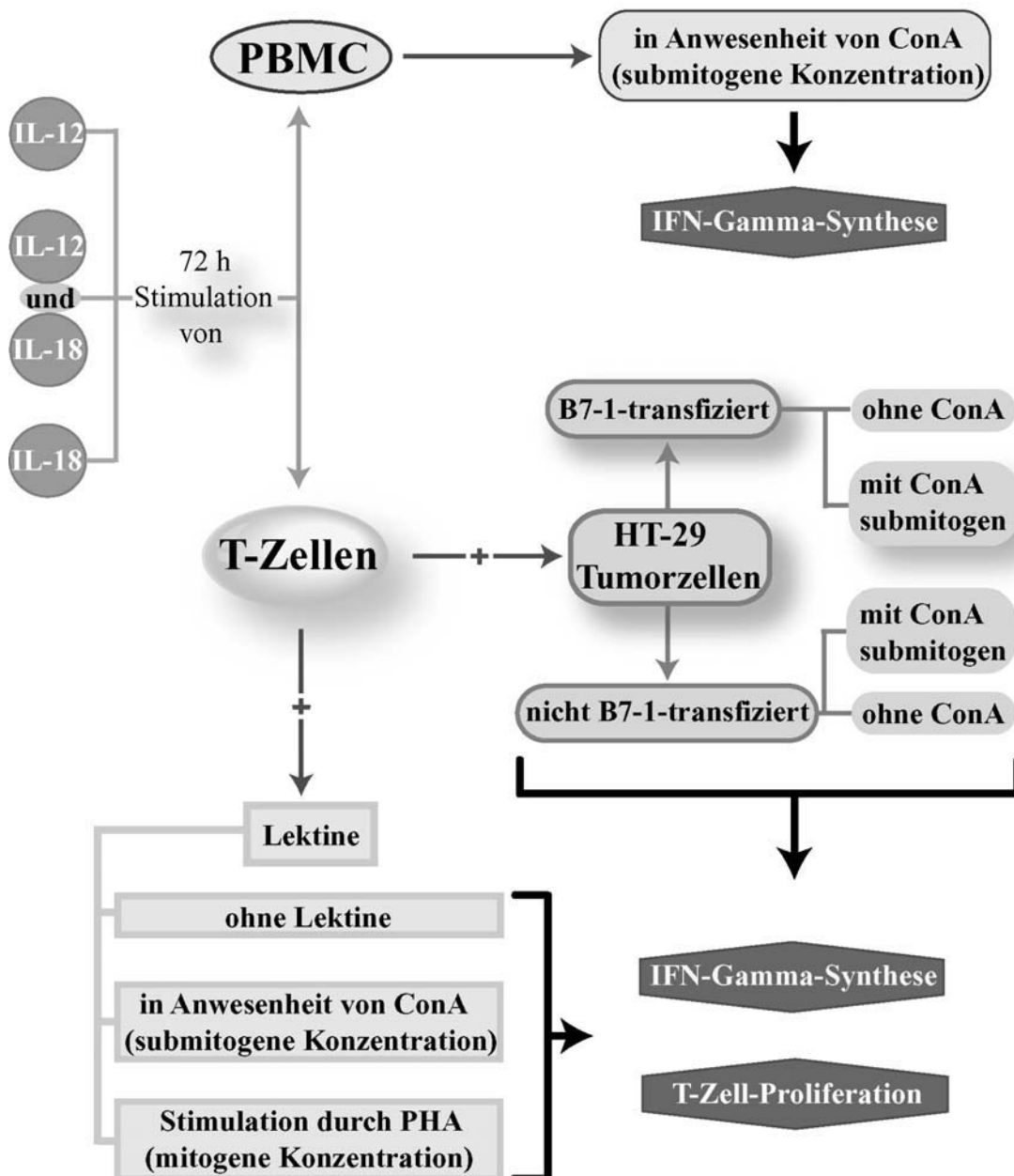


Abbildung 5.1 Schematische Übersicht der Versuche, die zur Untersuchung der Effekte von IL-12 und IL-18 durchgeführt wurden. Weitere Ausführungen im Text.

Festzuhalten ist, dass die Anwesenheit von Concanavalin A und von B7-1 weiterhin eine Bedingung für die T-Zell-Aktivierung in Anwesenheit von HT-29 Tumorzellen darstellte. Weder IL-18 noch IL-12 noch die Kombination von beiden konnte – auch nicht in hohen Konzentrationen - ohne ConA und ohne die Expression von B7-1 zu einer T-Zell-Aktivierung in Anwesenheit von HT-29 Tumorzellen führen. IL-12 konnte diese T-Zell-Aktivierung verstärken, d.h. sowohl die Proliferationsrate der T-Zellen als auch die gemessene IFN- γ -Konzentration im Überstand konnten durch exogenes, rekombinantes IL-12 ca. um den Faktor zwei erhöht werden. Aus den vorliegenden Daten lässt sich folgern, dass bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen i) Stimulation mit IL-12 einen zusätzlichen Stimulus benötigte, um einen Effekt auf T-Zellen auszuüben, ii) IL-18 nur in Kombination mit IL-12 messbare Effekte zeigte und iii) B7-1-vermittelte T-Zell-Aktivierung durch IL-12, aber nicht durch IL-18 verstärkt werden konnte.

Auch in anderen Arbeitsgruppen wurde die IL-12-abhängige, synergistische IFN- γ -Produktion von PBMCs durch IL-18-Stimulation beschrieben. So kamen Kawashima und Miossec (2003) - in einem anderen Zusammenhang - zu vergleichbaren Ergebnissen im Hinblick auf die Stimulation von PBMC mit IL-12 und IL-18. Mit einem anti-IL18-Rezeptor Antikörper konnte Kunikata et al. (1998) sowohl eine Bindung von IL-18 an den Rezeptor verhindern, als auch die Expression des IL-18-Rezeptors auf den Zellen bestimmen. Dabei zeigte sich, dass humane PBMC ohne Vorstimulation nur eine sehr schwache Expression des IL-18-Rezeptors aufwiesen. Diese konnte erst durch Stimulation mit IL-12 oder mit einem Mitogen (PHA oder ConA; beide wurden in zwei- bis fünffach höheren Konzentrationen als in dieser Arbeit eingesetzt) erhöht werden, wobei die Kombination von beiden zu einer weiteren Erhöhung der IL-18-Rezeptor Expression führte. Bei einer genaueren Untersuchung der verschiedenen Zelltypen, zeigte sich, dass IL-12- und Mitogen-Stimulation vor allem die Expression des IL-18-Rezeptors auf NK-Zellen hochregulierten, während die Expression auf CD8⁺-T-Zellen nicht in dem Maße beeinflusst wurde.

Der Effekt von IL-12 und IL-18 auf T-Zellen im Hinblick auf eine IFN- γ -Produktion wurde unter anderem auch in der Arbeit von Tominaga et al. (2000) untersucht. Vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen führte IL-12 oder IL-18 alleine zu keiner Aktivierung von T-Zellen, während beide Zytokine in sehr hohen Konzentration

(100 ng/ml) kombiniert einen synergistischen Effekt auf die IFN- γ -Synthese auch bei T-Zellen zeigten. Allerdings wurden die T-Zellen – verglichen mit der vorliegenden Arbeit - über einen doppelt so langen Zeitraum stimuliert.

Tomura et al. (1998) konnten aufzeigen, dass die Kombination von IL-12 und IL-18 bei CD8⁺-T-Zellen die IFN- γ -Synthese stärker induziert als bei CD4⁺-T-Zellen, verbunden mit einer höheren Expression des IL-18-Rezeptors auf CD8⁺-T-Zellen. Interessant ist weiterhin, dass der IL-12-Rezeptor erst nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors und Vermittlung eines kostimulatorischen Signals über CD28 auf den T-Zellen hochreguliert wurde, so dass IL-12 auch nur auf dementsprechend aktivierten T-Zellen eine Wirkung zeigen konnte. TZR- und CD28- vermittelte Aktivierung zusammen mit rekombinantem IL-12 führten zu einer Hochregulation des IL-18-Rezeptors vor allem auf CD8⁺-T-Zellen. Diese Bedingungen waren eigentlich auch in dem Ansatz mit HT-29/B7-1-Zellen gegeben, dennoch führte IL-18 zu keiner Verstärkung der T-Zell-Aktivierung in Anwesenheit von HT-29/B7-1-Zellen, IL-12 und ConA.

Bereits 1994 beschrieb Kubin et al. in einem *in vitro* Modell einen synergistischen Effekt von IL-12 und B7-1-vermittelter Kostimulation auf die IFN- γ -Produktion von T-Zellen. Sowohl durch ein CTLA-4-Immunglobulin, das B7-1-vermittelte Signale blockierte, als auch durch IL-10, einem „Gegenspieler“ von IL-12, konnte dieser Effekt inhibiert werden.

Die fehlenden Effekte von IL-18 auf PBMC und T-Zellen können mehrere Gründe haben. Denkbar wäre, dass a) es sich bei dem eingesetzten IL-18 um ein nicht (mehr) biologisch aktives Protein handelte, b) die Zellen keinen Rezeptor für IL-18 exprimierten oder c) die Wirkung von IL-18 durch andere Faktoren blockiert wurde. Zum einen wurden IL-18-Produkte von verschiedenen Herstellern eingesetzt, die alle vergleichbare Ergebnisse lieferten. Zum anderen deutete eine Untersuchung von mehreren, rekombinanten IL-18 Präparationen, darunter auch kommerziell erhältliches IL-18, darauf hin, dass zwei Formen des rekombinanten IL-18 vorliegen müssen, die sich in ihrer biologischen Aktivität grundsätzlich unterscheiden (Kikkawa et al. 2000). Durch zwei verschiedene Antikörper konnten die beiden IL-18-Formen diskriminiert werden, wobei die inaktive Form zu keiner Steigerung der IL-12-vermittelten IFN- γ -Synthese führte. Inwieweit eine derartige Überlegung für die in der vorliegenden Arbeit

eingesetzten IL-18-Präparate in Frage kommt, ließe sich nur durch entsprechende durchflusszytometrische Untersuchungen beantworten, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

In der Arbeit von Tomura et al. (1998) wurde unter anderem auch die simultane mit der sequenziellen Stimulation verglichen. Dabei zeigte sich, dass die IFN- γ -Konzentrationen bei gleichzeitiger Stimulation über TZR, CD28 und IL-12 mit IL-18 viel geringer ausfielen als bei Vorstimulation mit TZR, CD28 und IL-12 und erst anschließender IL-18-Zugabe. Durch die zeitlich verschobene Hochregulation der IL-18-Rezeptor Expression konnte IL-18 bei dementsprechend voraktivierten T-Zellen seine Wirkung besser entfalten. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine simultane Stimulation handelt, könnte das ein Erklärungsversuch für die fehlenden Effekte durch IL-18 sein.

Seit kurzem ist neben IL-18 auch ein lösliches Protein bekannt, dass durch Bindung an IL-18 dessen Wirkungen aufheben bzw. verhindern kann (Aizawa et al. 1999, Novick et al. 1999). Von diesem so genannten *IL-18 binding protein* (IL-18BP) liegen mehrere Isoformen vor, die eine unterschiedlich starke inhibitorische Potenz aufweisen (Kim et al. 2000). Während IL-18 von normalen Kolonepithelien sezerniert wird und in Kolonkarzinomzellen die Sekretion von IL-18 gestört oder nicht mehr vorhanden ist (Pages et al. 1999), scheinen Kolonkarzinomzellen in der Lage zu sein, IL-18BP nach Stimulation mit IFN- γ zu produzieren (Paulukat et al. 2001, Muhl et al. 2000). Auch bei PBMC konnte nach Stimulation mit Th1-Zytokinen - vor allem mit IL-12 und IFN- γ , aber auch mit IL-18 - eine Erhöhung der Expression von IL-18BP festgestellt werden, wobei der Effekt von IL-12 wohl über IFN- γ vermittelt wurde (Veenstra et al. 2002). Unter den PBMCs wurde IL-18BP hauptsächlich von Monozyten produziert, T-Zellen zeigten keine Expression von IL-18BP-mRNA.

Bei PBMCs scheint es sich um einen negativen *feedback* Mechanismus zu handeln, um über die IFN- γ / IL-18BP-Achse eine überschießende, proinflammatorische Reaktion zu verhindern. Für Tumorzellen hingegen könnte die Induktion der IL-18BP-Expression eine weitere Möglichkeit darstellen, einer Immunantwort zu entgehen. Da es sich aber bei dem vorliegenden Ansatz um ein Zusammentreffen von avitalen Tumorzellen und T-Zellen handelt, ist es eher unwahrscheinlich, dass ein solcher Mechanismus für die

fehlenden Effekte von IL-18 verantwortlich sein könnte. Interessant ist aber, dass bei Patienten mit Nierenzellkarzinom oder Melanom in fortgeschrittenen Stadien, denen rekombinantes IL-12 intravenös verabreicht wurde, eine signifikante Erhöhung des IL-18BP-Plasmaspiegels festzustellen war (Veenstra et al. 2002).

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl von Arbeiten, die in murinen Tumormodellen den Antitumor-Effekt von B7-1-transfizierten Tumorzellen untersucht haben (Baskar 1996, Chamberlain et al. 1996, Fujii et al. 1996). Shawler et al. (2002) konnten in *in vitro* Versuchen für verschiedene, humane, kolorektale Tumorzelllinien, die B7-1-transfiziert wurden, ein Potential als allogene Tumorzellvakzine demonstrieren. Auch für IL-12-Transfektion wird in zahlreichen *in vivo* Arbeiten mit Mäusen ein therapeutisches Potenzial beschrieben (Tamura et al. 2001, Chen et al. 1997, Tahara et al. 1995). Die IL-18-Transfektion von Tumorzellen wurde bisher ebenfalls untersucht, jedoch ist die Zahl der Veröffentlichungen verglichen mit IL-12 noch sehr gering (Yoshimura et al. 2001, Tasaki et al. 2000, Heuer et al. 1999, Osaki et al. 1999). In einigen Arbeiten konnte die *in vivo* IL-18-Expression bei tumortragenden Mäusen durchaus zur Tumorabstoßung und zur Generierung einer Immunität gegenüber den Tumorzellen führen, während in anderen Arbeiten IL-18-transfizierte Tumorzellen keinen Effekt (Yoshida et al. 1998) zeigten.

Die Kombination von Zytokinen und/ oder kostimulatorischen Molekülen war ein logischer nächster Schritt auf der Suche nach neuen Ansätzen in der Tumorthherapie. Eine murine Adenokarzinomzell-Vakzine, die mit B7-1, ICAM-1 und LFA-3 transfiziert wurde (TRICOM-Vektor), zeigte eine stärkere immunogene Wirkung und signifikant längere Überlebenszeiten als Vakzinen, die mit B7-1, ICAM-1 und LFA-3 alleine oder mit Zweier-Kombinationen transfiziert waren (Hodge et al. 1999). In einer Weiterentwicklung des TRICOM-Vektors wurde dieser mit dem tumorassoziierten Antigen CEA und GMCSF kombiniert, wodurch eine noch effektivere Vakzinierungsstrategie zur Verfügung stand (Grosenbach et al. 2001).

Die Kombination von IL-12 und IL-18 in murinen Tumormodellen zeigte in einigen Arbeiten eine synergistische Verstärkung der Immunantwort gegenüber verschiedenen Tumoren (Tatsumi et al. 2003, Coughlin et al. 1998). Einige Veröffentlichungen berichten über synergistische Effekte für die Kombination von IL-12- und B7-1-

Expression der murinen Tumorzellen bzw. zeigen auf, dass Kostimulation eine wichtige Voraussetzung für die IL-12-Wirkung darstellt (Guckel et al. 1999, Zitvogel et al. 1996). In verschiedenen murinen Tumormodellen (Melanom, Prostatakarzinom, Mamma- und Kolonkarzinom) wurde ein *in vivo* Vergleich von IL-12-transfizierten versus IL-12- und B7-1-transfizierten Tumorzellen durchgeführt (Li et al. 2003, Putzer et al. 2002, Hull et al. 2000, Chong et al. 1998, Putzer et al. 1997). Dabei war die Doppeltransfektion in verschiedener Hinsicht der alleinigen Transfektion von IL-12 überlegen. Sie zeichnete sich vor allem durch effektivere Tumorregression und länger andauernde Immunität gegenüber dem Tumor aus.

Zu der *in vivo* Kombination von IL-18 mit B7-1 hingegen liegen vergleichsweise wenige Daten vor. In einer Arbeit von Cho et al. (2000) wird für murine, B7-1-transfizierte Melanomzellen zusammen mit systemisch appliziertem IL-18 ein synergistischer Effekt im Sinne einer Tumorabstoßung und längerer Überlebenszeiten der Tiere beschrieben. In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit (Chung et al. 2004) führten murine Fibroblasten - mit B7-1 und IL-18 transfiziert und einem Ovalbumin (OVA)-Epitop als Modell-Antigen beladen - zur Induktion von spezifischen CTLs gegen OVA-exprimierende Tumorzellen. Immunisierung mit Fibroblasten, die jeweils nur B7-1 oder IL-18 exprimierten, führte nicht zur Induktion einer zytotoxischen Immunantwort in den Mäusen.

Das Zusammenspiel von IL-12, IL-18 und CD28-vermittelter Kostimulation wurde bisher nur *in vitro* zum Beispiel anhand der Stimulation von T-Zellen (Tomura et al. 1998) oder murinen NK-Zellen mit exogenen Zytokinen und einem anti-CD28-Antikörper untersucht (Walker et al. 1999). Dabei zeigte sich, dass IL-12-vermittelte NK-Zell-Aktivierung und folglich die IFN- γ -Synthese der NK-Zellen durch IL-18 und durch anti-CD28 verstärkt werden konnte. Während IL-18 vor allem die Transkriptionsrate des IFN- γ -Gens erhöhte, führte CD28-Kostimulation zu einer Stabilisierung der IFN- γ -mRNA Expression innerhalb der NK-Zellen. Vergleichbare Ergebnisse bzw. Veröffentlichungen für *in vivo* Ansätze, die IL-12, IL-18 und kostimulatorische Moleküle im Hinblick auf eine Antitumor-Immunantwort kombinieren, sind bis dato nicht bekannt.

5.3 4-1BB-Ligand als kostimulatorisches Molekül

Neben der B7-1 Familie wurden inzwischen mehrere Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie identifiziert, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von kostimulatorischen Signalen spielen (Hintzen et al. 1995). Zu diesen gehört auch CD137 (4-1BB), ein Typ-I Transmembranprotein, das aktivierungsabhängig von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert wird, vor allem aber auf aktivierten $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen (Vinay und Kwon 1998) zu finden ist.

Bei dem Liganden für CD137 (4-1BB-L) handelt es sich um ein Typ-II Transmembranprotein (Goodwin et al. 1993). 4-1BB-Ligand wird auf aktivierten APCs, darunter auch IFN- γ -aktivierte Makrophagen, aktivierte B-Zellen und Dendritische Zellen – exprimiert (DeBenedette et al. 1997, Pollok et al. 1994). Zu bemerken ist, dass Salih et al. (2000) konstitutive Expression des 4-1BB-Liganden sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in verschiedenen Karzinomzelllinien und in primären Tumorzellen zeigen konnten. Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass über eine Interaktion von 4-1BB-Ligand und 4-1BB ein starkes Signal für die T-Zell-Proliferation vermittelt wird (Vinay und Kwon 1998, Schwarz et al. 1996, Alderson et al. 1994, Pollok et al. 1993).

Mehrere Untersuchungen beschreiben, dass $CD8^+$ -T-Zellen durch CD137 ein stärkeres kostimulatorisches Signal erfahren als $CD4^+$ -T-Zellen. So proliferieren gereinigte $CD8^+$ -T-Zellen aus der Maus auf ein kostimulatorisches Signal durch CD137 stärker als $CD4^+$ -T-Zellen (Tan et al. 2000a, Shuford et al. 1997). In anderen Experimenten hingegen spielt die Interaktion von 4-1BB und 4-1BB-Ligand gleichermaßen bei der Stimulierung von $CD8^+$ - und $CD4^+$ -T-Zellen eine Rolle. Aus vergleichenden Untersuchungen von Cannons et al. (2001) geht hervor, dass ein kostimulatorisches Signal durch 4-1BB-Ligand sowohl eine Steigerung der Proliferation und Verstärkung der Effektorfunktion von $CD8^+$ -T-Zellen als auch eine Erhöhung der Zytokinproduktion von $CD4^+$ -T-Zell bewirkt.

Einige Experimente deuten darauf hin, dass die Induktion der T-Zell-Aktivierung dabei unabhängig von der Interaktion zwischen B7-1 und CD28 ist (DeBenedette et al. 1997). Bei einem starken Signal durch den T-Zellrezeptor ist CD137 im Hinblick auf die Kostimulation ruhender T-Lymphozyten ähnlich potent wie CD28. Ist der Stimulus durch den T-Zell-Rezeptor hingegen schwach, so liefert CD28 ein potenteres Signal an die ruhenden T-Zellen (Saoulli et al. 1998). Es gibt auch verschiedene Hinweise darauf, dass für eine optimale T-Zellantwort sowohl ein kostimulatorisches Signal durch CD28 als auch durch CD137 notwendig ist (Guinn et al. 1999, Melero et al. 1998a, Hurtado et al. 1995).

Anhand von murinen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass etablierte, schwach immunogene Tumoren (ein Sarkom und ein Mastozytom) in einem Mausmodell unter der Verabreichung von stimulierenden Antikörpern gegen 4-1BB zur Rückbildung gebracht werden konnten (Melero et al. 1997). Murine, dendritische Zellen (DC), die mit adenoviralen Vektoren für 4-1BB-Ligand und einem tumorassoziierten Antigen transfiziert wurden, waren in der Lage spezifische CTLs zu generieren (Wiethe et al. 2003). Durch die Expression von 4-1BB-Ligand wurde die Expression von B7-1 und B7-2 auf den dendritischen Zellen hochreguliert sowie die unspezifische Aktivierung von T-Zellen – eine bei Immunisierung mit adenoviralen Vektoren häufig auftretende „Nebenwirkung“ – reduziert. Weiter war es mit einem adenoviralen Vektor, der die cDNA für humanes 4-1BB-Ligand enthielt, möglich, mehrere Adenokarzinomzelllinien erfolgreich zu transfizieren und die *in vitro* Immunantwort von T-Zellen und PBMCs zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Ko-Kultur von transfizierten Tumorzellen mit PBMCs zu einem signifikanten Anstieg der Synthese von IFN- γ , IL-2 und GM-CSF führte (Yoshida et al. 2003).

In einem murinen Lymphommodell konnte der kostimulatorische Einfluss von 4-1BB-Ligand mit dem von B7-2 verglichen werden. Diese trotz konstitutiver Expression von B7-2 sehr aggressiven B-Zell-Lymphomzellen zeigen rasches Tumorwachstum in syngenen Mäusen. Nach Immunisierung mit Tumorzellen, die durch Transfektion entweder B7-2 auf höherem Niveau oder 4-1BB-Ligand exprimierten, konnten die Tumoren abgestoßen und ein immunologisches Gedächtnis aufgebaut werden. Auch in CD28-defizienten Mäusen konnten 4-1BB-Ligand-transfizierte Tumorzellen im Gegensatz zu B7-2-Transfektanten abgestoßen werden, jedoch fiel die Immunantwort

bei erneutem Kontakt mit Tumorzellen schwächer aus. Die CTL-Aktivität und die Produktion von IFN- γ und IL-2 war bei Splenozyten, die CD28-defizienten Mäusen entnommen wurden, *in vitro* stark vermindert. Daraus wurde abgeleitet, dass unabhängig von CD28-vermittelter Kostimulation zwar die 4-1BB-Ligand-vermittelte Antitumor-Antwort induziert, nicht aber eine langfristige, protektive Immunität gewährleistet werden kann (Guinn et al 2001). In einer anderen Arbeit konnte durch Transfektion von B7-1 konstitutiv exprimierenden Tumorzellen mit 4-1BB-Ligand in den Mäusen, die mit den modifizierten Tumorzellen immunisiert wurden, sowohl eine Tumorabstoßung als auch eine Immunität gegenüber Wildtyp-Tumorzellen beobachtet werden (Mogi et al. 2000).

Die Genterapie mit IL-12 konnte bei einem murinen, orthotopischen Kolonkarzinom zwar eine gewisse Immunantwort induzieren, jedoch nur in einem geringen Umfang. Die Kombination mit systemischer Applikation eines agonistischen anti-4-1BB-Antikörpers hingegen führte zu einer effektiveren Antitumor-Antwort, vermittelt vor allem durch CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen (Chen et al 2000). Ähnliche Ergebnisse brachten Immunisierungsversuche bei Mäusen mit kolorektalem Karzinom durch Injektion eines adenoviralen Vektors, der für IL-12 und 4-1BB-Ligand kodiert. Der Vorteil der Kombination von IL-12 und 4-1BB-Ligand zeigte sich durch längere Überlebenszeiten der Tiere und einer Immunität gegenüber dem Wildtyp-Tumor (Martinet et al. 2000). Vermittelt wurden die antitumoralen Effekte vor allem durch CD8⁺-T-Zellen. Wie aus Depletionsstudien *in vivo* hervorgeht, sind auch NK1.1-Zellen an diesem Prozess beteiligt, vermutlich jedoch nicht als Effektoren der zytotoxischen Antwort (Chen et al. 2000, Martinet et al. 2000, Melero et al. 1998b).

Vor diesem Hintergrund kann 4-1BB-Ligand bei der Aktivierung einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion gerade bei für zum Teil schwach immunogene Kolonkarzinome von Bedeutung sein, vor allem auch in Kombination mit B7-1 bzw. mit Zytokinen.

5.4 Klinische Studien

Von den in dieser Arbeit beschriebenen Zytokinen IL-12 und IL-18 sowie den kostimulatorischen Molekülen B7-1 und 4-1BB-Ligand sind IL-12 und B7-1 sowohl *in vitro* als auch im murinen Tumormodell bereits sehr gut untersucht bzw. charakterisiert worden. Inzwischen konnten aus den gewonnenen Daten erfolgreich Ansätze für klinische Studien im Rahmen der Tumorthherapie entwickelt werden, die vor allem mit IL-12 und in vergleichsweise geringerem Umfang mit B7-1 durchgeführt wurden bzw. werden. Für das kolorektale Karzinom wurden bisher Vakzinen sowohl mit B7-1 als auch mit IL-12 eingesetzt.

Dabei handelt es sich aber bei den Ansätzen mit B7-1 nicht um Tumorzellvakzinen, sondern um die direkte Applikation von verschiedenen, viralen Vektoren. Neben Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren wurden in einigen Studien auch Pockenviren eingesetzt, zu denen unter anderem Vaccinia (Pockenvakzine) und Fowlpox (Vogelpockenvakzine) gehören. Bei einem zweistufigen „*prime / boost*“-Regime wird zuerst eine definierte Menge genetisches Material in einem viralen Vektorimpfstoff verabreicht, um das Immunsystem zu aktivieren (*prime*). Danach wird ein zweiter viraler Vektorimpfstoff zur Auffrischung (*boost*) verabreicht.

Erst kürzlich wurden die Daten einer Phase-I-Studie, bei der die viralen Vaccinia- und Fowlpox-Vektoren zusammen mit der TRICOM-Vakzine (B7-1, ICAM-1 und LFA-3) im Rahmen der Behandlung von CEA-exprimierenden Karzinomen eingesetzt wurden, veröffentlicht (Marshall et al. 2005). 58 Probanden - davon 34 Patienten mit kolorektalem Karzinom mit Fernmetastasen – wurden in drei Studienarme aufgeteilt. Eine Gruppe wurde einmal mit dem veränderten Vaccinia-Virus-Impfstoff immunisiert, gefolgt von drei Impfungen mit der Vogelpocken-Vakzine im Abstand von jeweils vier Wochen (VFFF). Bei der zweiten Gruppe wurde zu diesem Immunisierungsschema noch das Zytokin GM-CSF hinzugefügt, das die Immunantwort weiter verstärken sollte. Die dritte Probandengruppe bekam ausschließlich die Vogelpocken-Vakzine vier Mal im Abstand von je einem Monat (FFFF). Es konnte eine CEA-spezifische, hauptsächlich zelluläre Immunantwort bei den Geimpften nachgewiesen werden, am stärksten in der VFFF-Gruppe, die zusätzlich GM-CSF erhalten hatte. Vor allem CEA-spezifische, zytotoxische T-Zellen vermehrten sich unter dem Einfluss der Vakzine, die

CEA-Antigen-Konzentrationen im Blut nahmen ab. Bei einem Patienten konnte eine komplette Remission beobachtet werden. Bei 23 weiteren Patienten stabilisierte sich die Krankheit für im Mittel acht Monate. Eine Phase-II-Studie mit demselben Regime wurde mittlerweile ebenfalls abgeschlossen, die Daten jedoch noch nicht publiziert. Ein weiterer Studienansatz, der in einem Canarypox-Vektor die Gene für B7-1 und CEA (ALVAC-CEA/B7-1-Vektor) kombinierte, wurde in den USA und Kanada erprobt (Von Mehren et al. 2000, Horig et al. 2000). Auch hier sind mittlerweile Phase-II-Studien abgeschlossen.

Autologe, B7-1-transfizierte Tumorzellen wurden zusammen mit systemischer IL-2-Applikation beim metastasierenden Nierenzellkarzinom in einer Phase-I-Studie erprobt (Antonia et al. 2002) und nun in einer Studie der zweiten Phase weitergeführt. Klinische Studien mit B7-1-transfizierten, allogenen Tumorzellen sind bisher vor allem beim Mammakarzinom durchgeführt worden (Guckel et al. 2005, Dols et al. 2003, Schoof et al. 1998). Aber auch beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) liegen mittlerweile erste Ergebnisse aus Phase-I-Studien mit B7-1-transfizierten, allogenen Tumorzellen vor (Raez et al. 2004, Raez et al. 2003).

Bei einem Großteil der klinischen Studien mit IL-12 wurde das rekombinante Zytokin intravenös (Wadler et al. 2004), subkutan (Alatrash et al. 2004, Motzer et al. 2001) oder direkt in den Tumor (Van Herpen et al. 2003) appliziert. Limitierend für die systemische Applikation von IL-12 ist neben der Zytotoxizität vor allem auch, dass bei wiederholter Applikation die Wirkung stark abnehmen kann (Portielje et al. 2003, Rakhit et al. 1999). Einige Studien untersuchten den gentherapeutischen Effekt von IL-12. So wurden IL-12-transfizierte, autologe Fibroblasten in einer Phase-I-Studie peritumoral injiziert (Kang et al. 2001) oder virale Vektoren mit dem IL-12-Gen wurden direkt in den Tumor – auch beim kolorektalen Karzinom (Sangro et al. 2004) – appliziert (Ren et al. 2003). Der Einsatz von autologen, IL-12-transfizierten Tumorzellen im Rahmen von klinischen Studien wurde vor allem für das Melanom beschrieben (Moller et al. 2000, Sun et al. 1998).

Die klinischen Erfolge beschränken sich zurzeit auf eine mehr oder weniger ausgeprägte Verlängerung der mittleren Überlebenszeiten. Von den unterschiedlichen

Vakzinationsstrategien sind bis dato eigentlich nur deren klinische Sicherheit für den Patienten und ihre Praktikabilität belegt.

Phase	Behandlung	Tumor	Stand	Referenz
I	B7-1 Gen-modifizierte, autologe Tumorzellvakzine und systemische IL-2-Applikation	Nierenkarzinom	A	<i>Antonia et al. 2002</i>
II	B7-1 Gen-modifizierte, autologe Tumorzellvakzine und subkutane IL-2-Applikation	Nierenkarzinom	R	
I	CD80-modifizierte, allogene Mammakarzinomzelllinie; mit und ohne GM-CSF; mit und ohne BCG	Mammakarzinom	A	<i>Schoof et al. 1998</i>
I	Sequentielle Vakzinierung mit rk-Fowlpox-CEA(6D)-TRICOM-Vektor (B7.1/ICAM-1/LFA-3) alleine und sequentiell mit rk-Vaccinia-CEA(6D)-TRICOM-Vektor; mit und ohne GM-CSF	CEA-exprimierende Karzinome	A	<i>Marshall et al. 2005</i>
II	Sequentielle Vakzinierung mit rk-Vaccinia-CEA(6D)-TRICOM und rk-Fowlpox-CEA(6D)-TRICOM (B7.1/ICAM-1/LFA-3)-Vektor mit GM-CSF, in Verbindung mit adjuvanter Chemotherapie	Mammakarzinom	A	<i>noch nicht publiziert</i>
I	ALVAC-CEA/B7-1-Vektor	Adenokarzinom	A	<i>Von Mehren et al. 2000</i> <i>Horig et al. 2000</i>
I	ALVAC-CEA/B7-1-Vektor; mit und ohne GM-CSF	Adenokarzinom	A	<i>Von Mehren et al. 2001</i>
II	ALVAC-CEA/B7-1-Vektor in Kombination mit Chemotherapie; mit oder ohne Tetanus Toxoid	Kolorektales Karzinom; Metastasierend oder Stadium III	A	<i>noch nicht publiziert</i>
II	ALVAC-CEA/B7-1-Vektor in Kombination mit Chemotherapie	Kolorektales Karzinom; Stadium III	A	<i>noch nicht publiziert</i>
I/II	Fluorouracil und IL-12-geprimte T-Zellen mit GM-CSF und IFN- α -2b	Nierenkarzinom, Kolorektales Karzinom	R	
I	IL-12 und IL-2	Solide Tumoren	R	
I	IL-12	Abdominale Tumoren	N	

Tabelle 5.1 Einige klinische Studien mit IL-12 und B7-1 in den USA. Angaben zu aktuellen Studien stammen vom *National institutes of health (clinical trials)*. Die Anzahl der Studien mit IL-12 ist sehr groß, so dass nur exemplarisch drei Studien dargestellt wurden. [A, abgeschlossen; N, nicht abgeschlossen; R, Rekrutierung von Patienten; GM-CSF, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; BCG, Bacillus-Calmette-Guérin-Impfstoff; Fowlpox, Vaccinia und Canarypox (ALVAC) aus der Gruppe der Pockenviren; CEA, carcinoembryonales Antigen]

5.5 Ausblick

Im Rahmen von multimodalen Therapiekonzepten wird versucht, die Immuntherapie als adjuvante Therapie auch für das kolorektale Karzinom zu etablieren. Berichte über die erfolgreiche Aktivierung unspezifischer Immunmechanismen (unspezifische Immuntherapien) beim kolorektalen Karzinom betreffen vor allem die Deaktivierung immunsupprimierender Eigenschaften des Tumors oder der konventionellen Tumorthérapien (Kelly et al. 1999, Isenberg et al. 1995). Solche antisuppressiven Interventionen richten sich gegen Mechanismen, die die spezifische Immunaktivität hemmen und sind in dieser Hinsicht beim kolorektalen Karzinom letztlich als Support für spezifische Immuntherapien zu verstehen.

Ein Beispiel für ein nicht antisuppressives, sondern aktiv unspezifisch wirkendes Agens stellt Levamisol dar, das bereits seit längerem beim kolorektalen Karzinom in der Kombination mit 5-Fluorouracil zusammen zum Standard gehört. Die genauere Analyse des aktivierenden Mechanismus deutet allerdings auch hier darauf hin, dass vor allem die spezifische Immunantwort über eine Induktion von IL-18 im Vordergrund steht (Czeto et al. 2000).

Adoptive Immuntherapie, bei der das Immunsystem durch Verabreichung von *in vitro* aktivierten Lymphozyten aktiviert werden soll, spielt beim kolorektalen Karzinom eine untergeordnete Rolle. Die weitaus größte Anzahl Erfolg versprechender Immuntherapie-Ansätze für das kolorektale Karzinom betreffen die spezifischen Immuntherapien. Neuere Ansätze sind auf dem Gebiet der passiven, spezifischen Immuntherapie entwickelt, in klinischen Studien eingesetzt und zum Teil bereits zur Therapie zugelassen worden. Durch die randomisierte Studie von Riethmüller und Mitarbeitern (Riethmüller et al. 1996, Riethmüller et al. 1994) konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine Immuntherapie mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 17-1A Antigen (Panorex) in der Lage war, die Prognose beim Lymphknotenpositiven Kolonkarzinom zu verbessern, was zu einer Zulassung des Antikörpers führte. Neuere klinische Studien ergaben jedoch, dass die zwischenzeitlich weiterentwickelte und verbesserte Chemotherapie einen größeren Behandlungserfolg bietet als der monoklonale Antikörper, so dass die Zulassung im Jahr 2000 zurückgenommen wurde.

Aktuelle Antikörper-Therapiestrategien beim metastasierten kolorektalen Karzinom beinhalten unter anderem die Hemmung wachstumsfaktorvermittelter, zellulärer Proliferations- und Differenzierungsprozesse und Konzepte zur Angiogenese-Inhibition. Dazu gehört auch der gegen den *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor gerichtete chimäre Antikörper Cetuximab (Cunningham et al. 2004, Saltz et al. 2004), der seit 2004 in Kombination mit Irinotecan zur Behandlung von EGFR-positiven, metastasierten kolorektalen Karzinomen eingesetzt werden kann, wenn eine Irinotecan-haltige Chemotherapie zuvor versagt hat. Mittlerweile laufen auch klinische Studien mit den Antikörpern Bevacizumab gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Rezeptor (Emmanouilides et al. 2004, Price 2004) und dem vollständig humanen Antikörper Panitumumab gegen den (EGF)-Rezeptor.

Ein generelles Problem der Antikörpertherapie solider Tumoren liegt in der unzureichenden Zugänglichkeit des Zielantigens. So konnte anhand von Biodistributionsstudien bei Patienten mit kolorektalem Karzinom nach intravenöser Applikation des A33-Antikörpers zwar eine spezifische Anreicherung im Tumorareal bzw. im Bereich von Metastasen gezeigt werden (Welt et al. 1990). Wurde der Tumor aber biopsiert bzw. reseziert, so fiel eine inhomogene Antikörperverteilung mit vornehmlicher Anreicherung im Randbereich auf. Zentral gelegene Tumoranteile werden folglich aufgrund von Tumornekrosen, inhomogener Antigenverteilung sowie einem erhöhten interstitiellen Gewebedruck mit herkömmlichen Antikörperkonstrukten nicht erreicht.

Die aktiv spezifische Immunisierung mit modifizierten Tumorzellen hat den Vorteil, dass Zellen als Ganzes alle relevanten Tumorproteine und -peptide beinhalten sollten (Offringa et al. 2000). Autologe Vakzinierung bietet durch Verwendung von patienteneigenem Tumormaterial einen optimalen Match von Tumorzellen zu den zu behandelnden metastatischen Tumorzellen. Da jeder Tumor mehrere Antigene trägt, wird es durch Verwendung der autologen Antigencocktails schwer, *Immunescape*-Varianten zu bilden, die gleichzeitig alle im Impfstoff vorhandenen Antigene verloren haben. Jedoch hat dieses Verfahren auch einige Nachteile: i) die aufwendige, individualisierte Herstellung, ii) die begrenzte Materialmenge, die in der Regel nur im Rahmen von operativen Eingriffen gewonnen werden kann, iii) der geringere

Reinheitsgrad der Tumorantigene, die von den normalen, nicht entarteten Zellanteilen des Tumorgewebes nicht vollständig getrennt werden können.

Aus diesen Nachteilen können im Umkehrschluss die Vorteile einer allogenen Vakzine abgeleitet werden, die grundsätzlich in großen Mengen herstellbar ist und sogar auf dem üblichen Pharmavertriebsweg zum Einsatz gebracht werden könnte. Problematisch sind allogene Vakzinen im Hinblick auf das Antigenpektrum und das potentielle Risiko einer Übertragung von Viren (zum Beispiel Retroviren).

Auch wenn die klinische Datenlage bei kontrollierten Studien eher für den Einsatz autologer Vakzinen beim kolorektalen Karzinom zu sprechen scheint (Harris et al. 2000, Schirmacher et al. 1999, Vermorken et al. 1999), bieten allogene Ansätze zumindest für die experimentelle Entwicklung neuer Immunstrategien, neuer Möglichkeiten zur Modifikation der Genexpression und des Gentransfers sowie für die Untersuchung verschiedener immunmodulatorischer Mechanismen sicher Vorteile. Da die T-Zell-Antwort eine kritische Größe für die Autoimmunität gegen Tumoren ist, muss die notwendige weitere Entwicklung von Vakzinen, die nicht patienteneigenes Antigenmaterial verwenden, darauf abzielen, eine möglichst breite Palette von Signalen, die zur T-Zell-Aktivierung beitragen, abzudecken.

6 Zusammenfassung

Das derzeitige Konzept zur Herstellung von Tumorzellvakzinen geht davon aus, dass die T-Zell-Antwort eine kritische Größe für die Autoimmunität gegen Tumoren ist. Die Herstellung von Vakzinen muss also darauf abzielen, die T-Zell-Antwort zu steigern. Dazu bieten sich drei Verfahren an: i) die Verstärkung der Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen, ii) die Verstärkung der Kostimulation von T-Zellen als Voraussetzung für eine optimale T-Zell-Aktivierung und iii) die lokale Freisetzung von Zytokinen.

Im Rahmen der aktiv-spezifischen Immunisierung werden genmodifizierte Tumorzellen als zelluläre Impfstoffe eingesetzt, um eine körpereigene Immunantwort zu erzeugen. Durch Gentransfer kostimulatorischer Moleküle können Tumorzellen dabei Antigen-präsentierende Eigenschaften verliehen werden. Eine wichtige Rolle bei der gegen die Tumorzellen gerichteten Immunantwort spielen unter anderem durch die Induktion einer Th1-Immunantwort auch proinflammatorische Zytokine. Vor diesem Hintergrund scheint es sinnvoll, verschiedene Ansätze zu kombinieren: die Immunstimulation mit Zytokinen und die Aktivierung der Immunzellen über kostimulierende Moleküle wie B7-1, B7-2 und 4-1BB-Ligand.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 auf die *in vitro* T-Zell-Aktivierung durch B7-1-transfizierte, humane, kolorektale HT-29 Tumorzellen untersucht. Die HT-29 Zellen zeichneten sich durch hohe Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-3 aus. In der *mixed lymphocyte-tumor-cell culture* (MLTC) wurden dafür durch UV-Bestrahlung inaktivierte und genetisch modifizierte Tumorzellen mit hochaufgereinigten, humanen T-Zellen unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von rekombinantem IL-12 und IL-18 inkubiert. Als Parameter für die T-Zell-Aktivierung dienten sowohl T-Zell-Proliferation als auch IFN- γ -Synthese.

Es konnte gezeigt werden, dass die B7-1-vermittelte T-Zell-Proliferation durch IL-12 und nicht durch IL-18 gesteigert werden konnte. Dabei war die T-Zell-Aktivierung abhängig von der Anwesenheit eines zusätzlichen Stimulans in submitogenen Konzentrationen. Im Gegensatz zu dem synergistischen Effekt in Bezug auf die IFN- γ -

Synthese bei peripheren mononukleären Zellen, konnte die Kombination von IL-12 und IL-18 bei T-Zellen in Anwesenheit von B7-1-transfizierten Tumorzellen keinen zusätzlichen, steigernden Effekt auf die Proliferation oder die IFN- γ -Synthese ausüben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden ein Expressionsvektor für 4-1BB-Ligand, einem weiteren kostimulatorischen Molekül aus der TNF-Liganden-Familie, und neue Expressionsvektoren für B7-1 und B7-2 konstruiert, um eine zukünftige Untersuchung der Kombination von mehreren kostimulatorischen Molekülen mit den Zytokinen zu ermöglichen. Dies scheint ein sinnvoller Ansatz zu sein, da aus den Ergebnissen zu schließen ist, dass die Expression von MHC-Molekülen, Adhäsionsmolekülen und dem kostimulatorischen Molekül B7-1 auf den HT-29 Tumorzellen – auch bei Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und IL-18 – nicht ausreicht, um eine T-Zell-Aktivierung *in vitro* ohne zusätzliche Stimulanzen zu induzieren.

Mehrgleisige Ansätze, die neben neuen Tumorantigenen auch verschiedene kostimulatorische Moleküle mit Zytokinen kombinieren, können dazu beitragen, trotz der Komplexität des immunologischen Netzwerks Tumorvakzinen mit therapeutischem Potential zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

- 1) Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* (1996) **8**:765
- 2) Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* (2004) **53(10)**:844
- 3) Aizawa Y, Akita K, Taniai M, Torigoe K, Mori T, Nishida Y, Ushio S, Nukada Y, Tanimoto T, Ikegami H et al. Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS Lett* (1999) **445**:338
- 4) Alatrash G, Hutson TE, Molto L, Richmond A, Nemec C, Mekhail T, Elson P, Tannenbaum C, Olencki T, Finke J, Bukowski RM. Clinical and immunologic effects of subcutaneously administered interleukin-12 and interferon alfa-2b: phase I trial of patients with metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma. *J Clin Oncol* (2004) **22(14)**:2891
- 5) Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, Din WS, Goodwin RG. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol* (1994) **24**:2219
- 6) Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* (2001) **1**:220
- 7) Allison JP. CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* (1994) **6**:414
- 8) Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search Programs. *Nucleic Acids Res* (1997) **25**:3389
- 9) Antonia SJ, Seigne J, Diaz J, Muro-Cacho C, Extermann M, Farmelo MJ, Friberg M, Alsarraj M, Mahany JJ, Pow-Sang J, Cantor A, Janssen W. Phase I trial of a B7-1 (CD80) gene modified autologous tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* (2002) **167(5)**:1995
- 10) Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. In Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (Hrsg.). Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends, Saarbrücken (2004)
- 11) Asada H, Kishida T, Hirai H, Satoh E, Ohashi S, Takeuchi M, Kubo T, Kita M, Iwakura Y, Imanishi J, Mazda O. Significant antitumor effects obtained by autologous tumor cell vaccine engineered to secrete interleukin (IL)-12 and IL-18 by means of the EBV/lipoplex. *Mol Ther* (2002) **5(5 Pt 1)**:609
- 12) Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* (1993a) **366**:76
- 13) Azuma M, Yessel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T-lymphocytes. *J Exp Med* (1993b) **177**:845
- 14) Baskar S, Glimcher L, Nabavi N, Jones RT, Ostrand-Rosenberg S. Major histocompatibility complex class II+B7-1+ tumor cells are potent vaccines for stimulating tumor rejection in tumor-bearing mice. *J Exp Med* (1995) **181**:619

- 15) Baskar S. Gene-modified tumor cells as cellular vaccine. *Cancer Immunol Immunother* (1996) **43**:165
- 16) Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* (1996) **334**:1717
- 17) Beldegrun A, Muul LM, Rosenberg SA. Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation characterization and antitumor activity. *Cancer Res* (1988) **49**:206
- 18) Bellone G, Trinchieri G. Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/ IL- 12 on human hematopoiesis. *J Immunol* (1994) **153**:930
- 19) Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* (1979) **7(6)**:1513
- 20) Bloom S, Simmons D, Jewell DP. Adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-3 and B7 are not expressed by epithelium in normal or inflamed colon. *Clin Ex Immuno* (1995) **101**:157
- 21) Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* (1995) **2**:555
- 22) Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Kurimoto M, Heesemann J, Autenrieth IB. IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J Immunol* (1998) **160(1)**:299
- 23) Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* (1995) **3**:87
- 24) Boon T, Cerottini JC, Eynde B van der, Bruggen P van der, Pel A van. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* (1994) **12**:337
- 25) Boon T, Old LJ. Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* (1997) **9**:681
- 26) Boussiotis VA, Freeman GJ, Gray G, Gribben J, Nadler LM. B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J Exp Med* (1993) **178**:1753
- 27) Boussiotis VA, Freeman GJ, Griffin JD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM. CD28 is involved in maintenance and reversal of human alloantigen-specific clonal anergy. *J Exp Med* (1994) **180**:1665
- 28) Boussiotis VA, Gribben JG, Gribben GF, Freeman GF, Nadler LM. Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr Opin Immunol* (1994) **6**:797
- 29) Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood (paper IV). *Scand J Clin Lab Invest* (1968) **21**:77 + 107
- 30) Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* (1970) **169**:1042
- 31) Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoulakis M, Garotta G, Gately MK. Role of interferon- γ in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J Immunother Emphas Tumor Immunol* (1995) **17**:71

- 32) Bubenick J. Gene transfer for immunotherapy of cancer. *Gene Ther* (1996) **3**:944
- 33) Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research* (1970) **13**:1
- 34) Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH. 4-1BB Ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* (2001) **167**(3):1313
- 35) Car BD, Eng VM, Schnyder B, LeHir M, Shakhov AN, Woerly G, Huang S, Aguet M, Anderson TD, Ryffel B. Role of interferon-gamma in interleukin 12-induced pathology in mice. *Am J Pathol* (1995) **147**:1693
- 36) Carreno BM et al. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol* (2000) **165**:1352
- 37) Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* (2002) **20**:29
- 38) Chamberlain RS, Carroll MW, Bronte V, Hwu P, Warren S, Yang JC, Nishimura M, Moss B, Rosenberg SA, Restifo NP. Costimulation enhances the active immunotherapy effect of recombinant anticancer vaccines. *Cancer Res* (1996) **56**:2832
- 39) Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* (2001) **19**:565
- 40) Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Popisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G. Induction of interferon- γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* (1991) **173**:869
- 41) Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* (1996) **74**:975
- 42) Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* (1992) **71**:1093
- 43) Chen L, Chen D, Block E, O'Donnell M, Kufe DW, Clinton SK. Eradication of murine bladder carcinoma by intratumor injection of a bicistronic adenoviral vector carrying cDNAs for the IL-12 heterodimer and its inhibition by the IL-12 p40 subunit homodimer. *J Immunol* (1997) **159**:351
- 44) Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* (1994) **179**:523
- 45) Chen SH, Pham-Nguyen KB, Martinet O, Huang Y, Yang W, Thung SN, Chen L, Mittler R, Woo SL. Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Mol Ther* (2000) **2**(1):39
- 46) Chilson OP, Kelly-Chilson AE. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur J Immunol* (1989) **19**:389

- 47) Chizzonite R, Truitt T, Desai BB, Nunes P, Podlaski FJ, Stern AS, Gately MK. IL-12 Receptor. I. Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts. *J Immunol* (1992) **148**:3117
- 48) Cho D, Kim TG, Lee W, Hwang YI, Cho HI, Han H, Kwon O, Kim D, Park H, Houh D. Interleukin-18 and the costimulatory molecule B7-1 have a synergistic anti-tumor effect on murine melanoma; implication of combined immunotherapy for poorly immunogenic malignancy. *J Invest Dermatol* (2000) **114(5)**:928
- 49) Cho D, Song H, Kim YM, Houh D, Hur DY, Park H, Yoon D, Pyun KH, Lee WJ, Kurimoto M, Kim YB, Kim YS, Choi I. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* (2000) **60(10)**:2703
- 50) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) **162**:156
- 51) Chong H, Todryk S, Hutchinson G, Hart IR, Vile RG. Tumour cell expression of B7 costimulatory molecules and interleukin-12 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a local antitumour response and may generate systemic protective immunity. *Gene Ther* (1998) **5**:223
- 52) Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* (1997) **18**:493
- 53) Chung SW, Cohen EP, Kim TS. Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte and prolongation of the survival of tumor-bearing mice using interleukin-18-secreting fibroblasts loaded with an epitope peptide. *Vaccine* (2004) **22(20)**:2547
- 54) Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WM. Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* (1998) **101(6)**:1441
- 55) Coughlin CM, Wysocka M, Trinchieri G, Lee WM. The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12. *Cancer Res* (1997) **57**:2460
- 56) Coulie PG, Ikeda H, Baurain J-F, Chiari R. Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv Cancer Res* (1999) **76**:213
- 57) Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* (2001) **2**:203
- 58) Creusot RJ, Mitchison NA, Terazzini NM. The immunological synapse. *Mol Immunol* (2002) **38**:997
- 59) Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M. Requirement for V α 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science (Wash)* (1997) **278**:1623
- 60) Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* (2004) **351(4)**:337

- 61) Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine. *The Journal of Immunology* (2003) **171**:5165
- 62) Czeto C, Gillespie K, Mathison G. Levamisol induces Interleukin-18 and shifts Type1/Type2 cytokine balance. *Immunology* (2000) **100**:217
- 63) Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* (1992) **148**:1985
- 64) Daniel PT, Kroidl A, Cayeux S, Bargou R, Blankenstein T, Dorken B. Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J Immunol* (1997) **159**:3808
- 65) Dao T, Mehal WZ, Crispe IN. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J Immunol* (1998) **161**:2217
- 66) Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H. Interferon- γ -inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper cells. *Cell Immunol* (1997) **173**:230
- 67) Davis DM. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol* (2002) **23**:356
- 68) Davis SJ, Ikemizu S, Evans EJ, Fugger L, Bakker TR, van der Merwe PA. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol* (2003) **4**:217
- 69) DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH. Costimulation of CD282 T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* (1997) **158**:551
- 70) Diederichsen AC, Stenholm AC, Kronborg O, Fenger C, Jensenius JC, Zeuthen J, Christensen PB, Kristensen T, Ostenhom AC. Flow cytometric investigation of immune-response-related surface molecules on human colorectal cancers. *Int J Cancer* (1998) **79**:283
- 71) Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* (1999) **103** (1 Pt 1):11
- 72) Dols A, Smith JW 2nd, Meijer SL, Fox BA, Hu HM, Walker E, Rosenheim S, Moudgil T, Doran T, Wood W, Seligman M, Alvord WG, Schoof D, Urba WJ. Vaccination of women with metastatic breast cancer, using a costimulatory gene (CD80)-modified, HLA-A2-matched, allogeneic, breast cancer cell line: clinical and immunological results. *Hum Gene Ther* (2003) **14(11)**:1117
- 73) Donnet-Hughes A, Schiffrin EJ, Huggett AC. Expression of MHC antigens by intestinal epithelial cells. Effect of transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta 2). *Clin Exp Immunol* (1995) **99**:240
- 74) Dunussi-Joannopoulos K, Runyon K, Erickson J, Schaub RG, Hawley RG, Leonard JP. Vaccines With Interleukin-12-Transduced Acute Myeloid Leukemia Cells Elicit Very Potent Therapeutic and Long-Lasting Protective Immunity. *Blood* (1999) **94(12)**:4263
- 75) Dustin ML, Colman DR. Neural and immunological synaptic relations. *Science* (2002) **298**:785

- 76) Eberl LP, Egidy G, Pinet F, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* (2000) **36**:354
- 77) Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* (2002) **16**:23
- 78) Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* (2002) **3**:611
- 79) Emmanouilides C, Pegram M, Robinson R, Hecht R, Kabbinavar F, Isacoff W. Anti-VEGF antibody bevacizumab (Avastin) with 5FU/LV as third line treatment for colorectal cancer. *Tech Coloproctol* (2004) **8(1)**:50
- 80) Faroudi M, Zaru R, Favier B, Valitutti S. New insights to the functional role of the T cell-antigen presenting cell immunological synapse. *Biol Res* (2002) **35**:133
- 81) Fink J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today* (1999) **20**:158
- 82) Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* (2000) **192(7)**:1027
- 83) Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Gribben JG, Ng JW, Kim J, Goldberg JM, Hathcock K, Laszlo G. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med* (1993a) **178**:2185
- 84) Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* (1995) **2**:523
- 85) Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol* (1989) **143**:2714
- 86) Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VJ, Lombard LA, Gray GS, Nadler LM. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* (1993b) **262**:909
- 87) Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* (2001) **22**:556
- 88) Fujii H, Inobe M, Kimura F, Murata J, Murakami M, Onishi Y, Azuma I, Uede T, Saiki I. Vaccination of tumor cells transfected with the B7-1 (CD80) gene induces the anti-metastatic effect and tumor immunity in mice. *Int J Cancer* (1996) **66**:219
- 89) Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type I infection. *J Virol* (1999) **73**:2401
- 90) Gaglia JL, Greenfield EA, Mattoo A, Sharpe AH, Freeman GJ, Kuchroo VK. Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient T cells. *J Immunol* (2000) **165**:6091

- 91) Gajewski TF. B7-1 but not B7-2 efficiently costimulates CD8+ T lymphocytes in the P815 tumor system in vitro. *J Immunol* (1996) **156**:465
- 92) Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/ interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* (1998) **16**:495
- 93) Gately MK, Wilson DE, Wong HL. Synergy between recombinant interleukin 2 (rIL 2) and IL 2-depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses in vitro. *J Immunol* (1986) **136**:1274
- 94) Gerli R, Agea E, Muscat C, Tognellini R, Fiorucci G, Spinozzi F, Cernetti C, Bertotto A. Activation of cord T lymphocytes. III. Role of LFA-1/ICAM-1 and CD2/LFA-3 adhesion molecules in CD3-induced proliferative response. *Cell Immunol* (1993) **148**:32
- 95) Germann T, Rude E. Interleukin-12. *Int Arch Allergy Immunol* (1995) **108**(2):103
- 96) Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Paiola F, Scupoli MT, Aste-Amezaga M, Frank I, Trinchieri G. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med* (1996) **183**(6):2559
- 97) Ghosh P, Komschlies KL, Cippitelli M, Longo DL et al. Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst* (1995) **87**:147
- 98) Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) **90**:6586
- 99) Giovannucci E, Martinez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: A review of the evidence. *J Nat Cancer Inst* (1996) **88**(23):1717
- 100) Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* (1995) **87**(4):265
- 101) Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA et al. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* (1993) **10**:2631
- 102) Gorelik E, Begovic M, Duty L, Herberman RB. Effect of ultraviolet irradiation on MCA102 tumor cell immunogenicity and sensitivity to tumor necrosis factor. *Cancer Res* (1991) **51**(5):1531
- 103) Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol* (2002) **14**:391
- 104) Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E, Barber M, Restivo VA Jr, Ke X, Gray GS, Nadler LM. CTLA-4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) **92**:811
- 105) Grosenbach DW, Barrientos JC, Schlom J, Hodge JW. Synergy of vaccine strategies to amplify antigen-specific immune responses and antitumor effects. *Cancer Research* (2001) **61**:4497

- 106) Guadagni F, Witt PL, Robbins PF, Schlom J, Greiner JW. Regulation of carcinoembryonic antigen expression in different human colorectal tumor cells by interferon-gamma. *Cancer Res* (1990) **50**:6248
- 107) Gubler U, Chua AO, Schönhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) **88**:4143
- 108) Guckel B, Meyer GC, Rudy W, Batrla R, Meuer SC, Bastert G, Wallwiener D, Moebius U. Interleukin-12 requires initial CD80-mediated T-cell activation to support immune responses toward human breast and ovarian carcinoma. *Cancer Gene Ther* (1999) **6(3)**:228
- 109) Guckel B, Stumm S, Rentzsch C, Marme A, Mannhardt G, Wallwiener D. A CD80-transfected human breast cancer cell variant induces HER-2/neu-specific T cells in HLA-A*02-matched situations in vitro as well as in vivo. *Cancer Immunol Immunother* (2005) **54(2)**:129
- 110) Guinn BA, Bertram EM, DeBenedette MA, Berinstein NL, Watts TH. 4-1BBL enhances anti-tumor responses in the presence or absence of CD28 but CD28 is required for protective immunity against parental tumors. *Cell Immunol* (2001) **210(1)**:56
- 111) Guinn BA, DeBenedette MA, Watts TH, Berinstein NL. 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine. *J Immunol* (1999) **162(8)**:5003
- 112) Habicht A, Lindauer M, Galmbacher P, Rudy W, Gebert J, Schackert HK, Meuer SC, Moebius U. Development of immunogenic colorectal cancer cell lines for vaccination: expression of CD80 (B7.1) is not sufficient to restore impaired primary T cell activation in vitro. *Eur J Cancer* (1995) **31A**:2396
- 113) Hagerty DT. Intercellular adhesion molecule-1 is necessary but not sufficient to activate CD4+ T cells. Discovery of a novel costimulator on kidney tubule cells. *J Immunol* (1996) **156**:3652
- 114) Han JS, Nair PP. Flow cytometric identification of cell surface markers on cultured human colonic cell lines using monoclonal antibodies. *Cancer* (1995) **76**:195
- 115) Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* (1983) **166(4)**:557
- 116) Hargreaves R, Logiou V, Lechler R. The primary alloresponse of human CD4+ T cells is dependent on B7 (CD80), augmented by CD58, but relatively uninfluenced by CD54 expression. *Int Immunol* (1995) **7**:1505
- 117) Harris J, Ryan L, Hoover H, Stuart R, Oken M, Benson A et al. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and II colon cancer with autologous tumor cell vaccine. Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* (2000) **18(1)**:148
- 118) Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, Lotze MT, Tahara H. Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol* (1999) **163(2)**:583

- 119) Heinzerling L, Burg G, Dummer R, Maier T, Oberholzer PA, Schultz J, Elzaouk L, Pavlovic J, Moelling K. Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. *Hum Gene Ther* (2005) **16(1)**:35
- 120) Heuer JG, Tucker-McClung C, Hock RA. Neuroblastoma cells expressing mature IL-18, but not proIL-18, induce a strong and immediate antitumor immune response. *J Immunother* (1999) **22(4)**:324
- 121) Hikosaka S, Hara I, Miyake H, Hara S, Kamidono S. Antitumor effect of simultaneous transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes and its mechanism in a mouse bladder cancer model. *J Urol* (2004) **11(8)**:647
- 122) Hintzen RQ, Lens SM, Lammers K, Kuiper H, Beckmann MP, van Lier RA. Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol* (1995) **154**:2612
- 123) Hisieh C, Macatonia SE, Tripp CS et al. Listeria-induced Th1 development in ab-TCR transgenic CD4⁺ T cells occurs through macrophage production of IL-12. *Science* (1993) **260**:547
- 124) Hodge JW, Sabzevari H, Yafal AG, Gritz L, Lorenz MG, Schlom J. A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation. *Cancer Res* (1999) **59**:5800
- 125) Horig H, Lee DS, Conkright W, Divito J, Hasson H, LaMare M, Rivera A, Park D, Tine J, Guito K, Tsang KW, Schlom J, Kaufman HL. Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. *Cancer Immunol Immunother* (2000) **49(9)**:504
- 126) Howard TA, Rochelle JM, Seldin MF. CD28 and CTLA-4, two related members of the Ig supergene family, are tightly linked on proximal mouse chromosome 1. *Immunogenetics* (1991) **33**:74
- 127) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 128) Hull GW, Mccurdy MA, Nasu Y, Bangma CH, Yang G, Shimura S, Lee HM, Wang J, Albani J, Ebara S, Sato T, Timme TL, Thompson TC. Prostate cancer gene therapy: comparison of adenovirus-mediated expression of interleukin 12 with interleukin 12 plus B7-1 for in situ gene therapy and gene-modified, cell-based vaccines. *Clin Cancer Res* (2000) **6(10)**:4101
- 129) Hunter SE, Waldburger KE, Thibodeaux DK, Schaub RG, Goldman SJ, Leonard JP. Immunoregulation by interleukin-12 in MB49.1 tumor-bearing mice: Cellular and cytokine-mediated effector mechanisms. *Eur J Immunol* (1997) **27**:3438
- 130) Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, Kwon BS. Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* (1995) **155(7)**:3360
- 131) Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura Si, Yamauchi H, Hiroishi K, Takeda K, Tagawa Yi et al. IL-18 Up-Regulates Perforin-Mediated NK Activity Without Increasing Perforin Messenger RNA Expression by Binding to Constitutively Expressed IL-18 Receptor. *J Immunol* (1999) **162**:1662
- 132) Immunobiology. 5thed., Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. New York and London: Garland Publishing (2001)

- 133) Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* (1994) **180**:1849
- 134) Interdisziplinäre S3-Leitlinie. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des kolorektalen Karzinoms. Herausgeber Prof. Dr. Junginger Th (Mainz), Prof. Dr. Lorenz W (Marburg). Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2004
- 135) Isenberg J, Stoffel B, Wolters U, Beuth J, Stützer H, Ko H et al. Immunostimulation by propionibacteria – effects on immune status and antineoplastic treatment. *Anticancer Research* (1995) **15**:2363
- 136) Ish-Horowicz D, Burke JF. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* (1981) **9(13)**:2989
- 137) Ishii S, Hiroishi K, Eguchi J, Mitamura K. Dendritic cell maturation induced by delivery of ultraviolet-mediated apoptotic colorectal cancer cell lines. *Anticancer Res* (2003) **23(3B)**:2457
- 138) Itoh K, Platsoucas CD, Balch CM. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med* (1988) **68**:1419
- 139) Jacobsen SEW. IL-12, a direct stimulator and indirect inhibitor of hematopoiesis. *Res Immunol* (1995) **146**:506
- 140) June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* (1990) **11**:211
- 141) Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* (2002) **2**:251
- 142) Kaklamanis L, Townsend A, Doussis-Anagnostopoulou IA, Mortensen N, Harris AL, Gatter KC. Loss of major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen presentation (TAP) in colorectal cancer. *Am J Pathol* (1994) **145**:505
- 143) Kaminski WE, Jendraschek E, Kiefl R, von Schacky C. Dietary ω -3 fatty acids lower levels of platelet-derived growth factor mRNA in human mononuclear cells. *Blood* (1993) **81**:1871
- 144) Kang WK, Park C, Yoon HL, Kim WS, Yoon SS, Lee MH, Park K, Kim K, Jeong HS, Kim JA, Nam SJ, Yang JH, Son YI, Baek CH, Han J, Ree HJ et al. Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* (2001) **12(6)**:671
- 145) Karanikas V, Colau D, Baurain JF, Chiari R, Thonnard J, Gutierrez-Roelens I, Goffinet C, Van Schaftingen EV, Weynants P, Boon T und Coulie PG. High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with long survival. *Cancer Res* (2001) **61**:3718
- 146) Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN-gamma production. *J Immunol* (1997) **159**:5528

- 147) Kawakami Y, Dang N, Wang X, Tupesis J, Robbins PF, Wang RF, Wunderlich JR, Yannelli JR, Rosenberg SA. Recognition of shared melanoma antigens in association with major HLA-A alleles by tumor infiltrating T lymphocytes from 123 patients with melanoma. *J Immunother* (2000) **23**:17
- 148) Kawashima M and Miossec P. Decreased response to IL-12 and IL-18 of peripheral blood cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* (2004) **6**:R39
- 149) Kelly CP, O'Keane JC, Orellana J, Schroy PC, Yang S, LaMont JT, Brady HR. Human colon cancer cells express ICAM-1 in vivo and support LFA-1-dependent lymphocyte adhesion in vitro. *Am J Physiol* (1992) **263**:G864
- 150) Kelly M, King J, Cherian M, Dwerryhouse J, Finlay I, Adams W et al. Randomized trial of preoperative cimetidine in patients with colorectal carcinoma with quantitative assessment of tumor-associated lymphocytes. *Cancer* (1999) **85(8)**:1658
- 151) Kikkawa S, Shida K, Okamura H, Begum NA, Matsumoto M, Tsuji S, Nomura M, Suzuki Y, Toyoshima K, Seya T. A comparative analysis of the antigenic, structural, and functional properties of three different preparations of recombinant human interleukin-18. *J Interferon Cytokine Res* (2000) **20(2)**:179
- 152) Kilpatrick DC. Accessory cell paradox: monocytes enhance or inhibit lectin-mediated human T-lymphocyte proliferation depending on the choice of mitogen. *Scand J Immunol* (1988) **28**:247
- 153) Kim JJ, Tsai A, Nottingham LK, Morrison L, Cunnning DM, Oh J, Lee DJ, Dang K, Dentchev T, Chalian AA, Agadjanyan MG, Weiner DB. Intracellular adhesion molecule-1 modulates β -chemokines and directly costimulates T cells in vivo. *J Clin Invest* (1999) **103**:869
- 154) Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Pro Natl Acad Sci USA* (2000) **97**:1190
- 155) Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* (2000) **343**:702
- 156) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* (1989) **170(3)**:827
- 157) Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res* (1994) **54**:2856
- 158) Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* (2000) **407**:789
- 159) Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med* (1994) **180(1)**:211
- 160) Kucharzik T, Luger N, Winde G, Domschke W, Stoll R. Colon carcinoma cell lines stimulate monocytes and lamina propria mononuclear cells to produce IL-10. *Clin Exp Immunol* (1997) **110**:296

- 161) Kufer P, Zettl F, Borschert K, Lutterbüse R, Kischel R, Riethmüller G. Minimal costimulatory requirements for T cell priming and TH1 differentiation: Activation of naive human T lymphocytes by tumor cells armed with bifunctional antibody constructs. *Cancer Immunity* (2001) **1**:10
- 162) Kunikata T, Torigoe K, Ushio S, Okura T, Ushio C, Yamauchi H, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M. Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell Immunol* (1998) **189**(2):135
- 163) Kwon BS, Kozak CA, Kim KK, Pickard RT. Genomic organization and chromosomal localization of the T-cell antigen 4-1BB. *J Immunol* (1994) **152**:2256
- 164) Lang S, Atarashi Y, Nishioka Y, Stanson J, Meidenbauer N, Whiteside TL. B7.1 on human carcinomas: costimulation of T cells and enhanced tumor-induced T-cell death. *Cell Immunol* (2000) **201**:132
- 165) Le HN, Lee NC, Tsung K, Norton JA. Pre-existing tumor-sensitized T cells are essential for eradication of established tumors by IL-12 and cyclophosphamide plus IL-12. *J Immunol* (2001) **167**:6765
- 166) Lebel-Binay S, Thiounn N, De Pinieux G, Vieillefond A, Debre B, Bonnefoy JY, Fridman WH, Pages F. IL-18 is produced by prostate cancer cells and secreted in response to interferons. *Int J Cancer* (2003) **106**(6):827
- 167) Lee KM et al. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* (1998) **282**:2263
- 168) Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. Characterization of circulation T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature Med* (1999) **5**:677
- 169) Lee SJ, Hori Y, Groves JT, Dustin ML, Chakraborty AK. Correlation of a dynamic model for immunological synapse formation with effector functions: two pathways to synapse formation. *Trends Immunol* (2002) **23**:492
- 170) Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* (1996) **14**:233
- 171) Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Nagorsen D, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C. High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer* (2000) **87**:659
- 172) Li ZH, Wen XY, Mandelbaum S, Falcioni N, Hawley TS, Hawley RG, Stewart AK. Improved therapeutic outcome following combination immunogene vaccination therapy in murine myeloma. *Leuk Lymphoma* (2003) **44**(10):1775
- 173) Liebau C, Merk H, Schmidt S, Roesel C, Karreman C, Prisack JB, Bojar H, Baltzer AW. Interleukin-12 and interleukin-18 change ICAM-I expression, and enhance natural killer cell mediated cytolysis of human osteosarcoma cells. *Cytokines Cell Mol Ther* (2002) **7**(4):135
- 174) Lindauer M, Rudy W, Guckel B, Doeberitz MVK, Meuer SC, Moebius U. Gene transfer of costimulatory molecules into a human colorectal cancer cell line: requirement of CD54, CD80 and class II MHC expression for enhanced immunogenicity. *Immunology* (1998) **93**(3):390

- 175) Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, Lombard DB, Freeman GJ, Nadler LM, Gray GS. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* (1993) **151**:3489
- 176) Liu ZX, Sugawara S, Hiwatashi N, Noguchi M, Rikiishi H, Kumagai K, Toyota T. Accessory cell function of a human colonic epithelial cell line HT-29 for bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* (1997) **108(3)**:384
- 177) Lucas ML, Heller R. IL-12 gene therapy using an electrically mediated nonviral approach reduces metastatic growth of melanoma. *DNA Cell Biol* (2003) **22(12)**:755
- 178) Luo JS, Kammerer R, von Kleist S. Comparison of the effects of immunosuppressive factors from newly established colon carcinoma cell cultures on human lymphocyte proliferation and cytokine secretion. *Tumour Biol* (2000) **21(1)**:11
- 179) Ma X, Aste-Amezaga M, Gri G, Gerosa F, Trinchieri G. Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chem Immunol* (1997) **68**:1
- 180) Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- 181) Marshall JL, Gulley JL, Arlen PM, Beetham PK, Tsang KY, Slack R, Hodge JW, Doren S, Grosenbach DW, Hwang J, Fox E, Odogwu L, Park S, Panicali D, Schlom J. Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA(6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas. *J Clin Oncol* (2005) **23(4)**:720
- 182) Martinet O, Divino CM, Zang Y, Gan Y, Mandeli J, Thung S, Pan PY, Chen SH. T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB Ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. *Gene Ther* (2002) **9(12)**:786
- 183) Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, Chen SH. Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* (2000) **92(11)**:931
- 184) Martone T, Bellone G, Pagano M, Beatrice F, Palonta F, Emanuelli G, Cortesina G. Constitutive expression of interleukin-18 in head and neck squamous carcinoma cells. *Head Neck* (2004) **26(6)**:494
- 185) Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Hyodo Y, Hayashi N, Hiroishi K, Kawada N, Okamura H, Nakanishi K, Higashino K. Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J Immunol* (1997) **159**:97
- 186) Melero I, Bach N, Hellström KE, Aruffo A, Mittler RS, Chen L. Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol* (1998a) **28(3)**:1116
- 187) Melero I, Johnston JV, Shufford WW, Mittler RS, Chen L. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* (1998b) **190(2)**:167

- 188) Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, Mittler RS, Chen L. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* (1997) **3**:682
- 189) Mendiratta SK, Quezada A, Matar M, Thull NM, Bishop JS, Nordstrom JL, Pericle F. Combination of interleukin 12 and interferon alpha gene therapy induces a synergistic antitumor response against colon and renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* (2000) **11(13)**:1851
- 190) Mendiratta SK, Quezada A, Matar M, Wang J, Hebel HL, Long S, Nordstrom JL, Pericle F. Intratumoral delivery of IL-12 gene by polyvinyl polymeric vector system to murine renal and colon carcinoma results in potent antitumor immunity. *Gene Ther* (1999) **6(5)**:833
- 191) Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* (1996) **26**:1647
- 192) Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res* (1997) **57(20)**:4557
- 193) Min W, Dunn AJ, Jones DH. Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. *EMBO J* (1992) **11(4)**:1303
- 194) Miyazono Y, Kamogawa Y, Ryo K, Furukawa T, Mitsuhashi M, Yamauchi K, Kameoka T, Hayashi N. Effect of B7.1-transfected human colon cancer cells on the induction of autologous tumour-specific cytotoxic T cells. *J Gastroenterol Hepatol* (1999) **14**:997
- 195) Mogi S, Sakurai J, Kohsaka T, Enomoto S, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Tumour rejection by gene transfer of 4-1BB ligand into a CD80(+) murine squamous cell carcinoma and the requirements of co-stimulatory molecules on tumour and host cells. *Immunology* (2000) **101(4)**:541
- 196) Moller P, Moller H, Sun Y, Dorbic T, Henz BM, Wittig B, Schadendorf D. Increased non-major histocompatibility complex-restricted lytic activity in melanoma patients vaccinated with cytokine gene-transfected autologous tumor cells. *Cancer Gene Ther* (2000) **7(7)**:976
- 197) Moller P, Momburg F, Koretz K, Moldenhauer G, Herfarth C, Otto HF, Hammerling GJ, Schlag P. Influence of major histocompatibility complex class I and II antigens on survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* (1991) **51**:729
- 198) Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Juliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's Disease. *J Immunol* (1999) **163**:143
- 199) Mosolits S, Markovic K, Frodin JE, Virving L, Magnusson CG, Steinitz M, Fagerberg J, Mellstedt H. Vaccination with Ep-CAM protein or anti-idiotypic antibody induces Th1-biased response against MHC class I- and II-restricted Ep-CAM epitopes in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* (2004) **10(16)**:5391
- 200) Motzer RJ, Rakhit A, Schwartz LH, Olencki T, Malone TM, Sandstrom K, Nadeau R, Parmar H, Bukowski R. Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* (1998) **4(5)**:1183

- 201) Motzer RJ, Rakhit A, Thompson JA, Nemunaitis J, Murphy BA, Ellerhorst J, Schwartz LH, Berg WJ, Bukowski RM. Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Interferon Cytokine Res* (2001) **21(4)**:257
- 202) Mu J, Zou JP, Yamamoto N, Tsutsui T, Tai XG, Kobayashi M, Herrmann S, Fujiwara H, Hamaoka T. Administration of recombinant interleukin 12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes. *Cancer Res* (1995) **55**:4404
- 203) Mueller DL. T cells: A proliferation of costimulatory molecules. *Curr Biol* (2000) **10(6)**:R227
- 204) Muhl H, Kampfer H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J. Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) **267(3)**:960
- 205) Mulder JW, Wielenga VJ, Polak MM, van den Berg FM, Adolf GR, Herrlich P, Pals ST, Offerhaus GJ. Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis. *Gut* (1995) **36**:76
- 206) Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* (1998) **187**:2103
- 207) Murphy FJ, Hayes MP, Burd PR. Disparate intracellular processing of human IL-12 preprotein subunits: atypical processing of the p35 signal peptide. *J Immunol* (2000) **164**:839
- 208) Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun* (1989) **57(2)**:590
- 209) Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. *J Immunol* (1994) **153**:1697
- 210) Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol* (1996) **157**:636
- 211) Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. The human interleukin-18 gene IL-18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics* (1998) **51**:161
- 212) Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* (1999) **10**:127
- 213) Nozoe T, Yasuda M, Honda M, Inutsuka S, Korenaga D. Fas ligand expression is correlated with metastasis in colorectal carcinoma. *Oncology* (2003) **65(1)**:83
- 214) Offringa R, van der Burg SH, Ossendorp F, Toes RE, Melief CJ. Design and evaluation of antigenspecific vaccination strategies against cancer. *Curr Opin Immunol* (2000) **12**:576
- 215) Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, Ikegami H, Kurimoto M. Development of CD8+ effector T cells is differentially regulated by IL-18 and IL-12. *J Immunol* (1999) **162**:3202

- 216) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* (1995) **378**:88
- 217) Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* (1999) **162**:1096
- 218) Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor IL-18. *Gene Ther* (1999) **6(5)**:808-15
- 219) Osaki T, Peron JM, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* (1998) **160(4)**:1742
- 220) Pages F, Berger A, Henglein B, Piqueras B, Danel C, Zinzindohoue F, Thiounn N, Cugnenc PH, Fridman WH. Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: consequences for tumor immune surveillance. *Int J Cancer* (1999) **84(3)**:326
- 221) Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* (1998) **16**:323
- 222) Paulukat J, Bosmann M, Nold M, Garkisch S, Kampf H, Frank S, Raedle J, Zeuzem S, Pfeilschifter J, Muhl H. Expression and Release of IL-18 Binding Protein in Response to IFN- γ . *J Immunol* (2001) **167**:7038
- 223) Pauly S. Untersuchungen zur Funktion des CD137-/CD137-Ligand-Systems in antigenpräsentierenden Zellen. Dissertation, Regensburg 2000
- 224) Podlaski FJ, Nanduri VB, Hulmes JD, Pan YC, Levin W, Danho W, Chizzonite R, Gately MK, Stern AS. Molecular characterization of interleukin 12. *Arch Biochem Biophys* (1992) **294(1)**:230
- 225) Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS. 4-1BB T cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti- μ -primed splenic B cells. *Eur J Immunol* (1994) **24**:367
- 226) Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Kim KK, Pickard RT, Kwon BS. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* (1993) **150(3)**:771
- 227) Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* (1989) **7**:1407
- 228) Poon MA, O'Connell MJ, Wieland HS et al. Biochemical modulation of fluorouracil with leucovorin: Confirmatory evidence of improved therapeutic efficacy in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* (1991) **9**:1967
- 229) Portielje JE, Lamers CH, Kruit WH, Sparreboom A, Bolhuis RL, Stoter G, Huber C, Gratama JW. Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-8 responses. *Clin Cancer Res* (2003) **9(1)**:76
- 230) Prabhu Das MR, Zamvil SS, Borriello F, Weiner HL, Sharpe AH, Kuchroo VK. Reciprocal expression of co-stimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T-cells following activation. *Eur J Immunol* (1995) **25**:207

- 231) Price N. Bevacizumab improves the efficacy of 5-fluorouracil/leucovorin in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* (2004) **4(2)**:89
- 232) Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNF alpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* (1998a) **101(3)**:711
- 233) Puren AJ, Razeghi P, Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. *J Infect Dis* (1998b) **178(6)**:1830
- 234) Putzer BM, Hitt M, Muller WJ, Emtage P, Gauldie J, Graham FL. Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) **94(20)**:10889
- 235) Putzer BM, Rodicker F, Hitt MM, Stiewe T, Esche H. Improved treatment of pancreatic cancer by IL-12 and B7.1 costimulation: antitumor efficacy and immunoregulation in a nonimmunogenic tumor model. *Mol Ther* (2002) **5(4)**:405
- 236) Raez LE, Cassileth PA, Schlesselman JJ, Padmanabhan S, Fisher EZ, Baldie PA, Sridhar K, Podack ER. Induction of CD8 T-cell-IFN-gamma response and positive clinical outcome after immunization with gene-modified allogeneic tumor cells in advanced non-small-cell lung carcinoma. *Cancer Gene Ther* (2003) **10(11)**:850
- 237) Raez LE, Cassileth PA, Schlesselman JJ, Sridhar K, Padmanabhan S, Fisher EZ, Baldie PA, Podack ER. Allogeneic vaccination with a B7.1 HLA-A gene-modified adenocarcinoma cell line in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* (2004) **22(14)**:2800
- 238) Rakhit A, Yeon MM, Ferrante J, Fettner S, Nadeau R, Motzer R, Bukowski R, Carvajal DM, Wilkinson VL, Presky DH, Magram J, Gately MK. Down-regulation of the pharmacokinetic-pharmacodynamic response to interleukin-12 during long-term administration to patients with renal cell carcinoma and evaluation of the mechanism of this "adaptive response" in mice. *Clin Pharmacol Ther* (1999) **65(6)**:615
- 239) Razi-Wolf Z, Freeman GJ, Galvin F, Benacerraf B, Nadler LM, Reiser H. Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecules expressed by peritoneal exudate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) **89**:4210
- 240) Ren H, Boulikas T, Lundstrom K, Soling A, Warnke PC, Rainov NG. Immunogene therapy of recurrent glioblastoma multiforme with a liposomally encapsulated replication-incompetent Semliki forest virus vector carrying the human interleukin-12 gene-a phase I/II clinical protocol. *J Neurooncol* (2003) **64(1-2)**:147
- 241) Renkvist N, Castelli C, Robbins PF und Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* (2001) **50**:3
- 242) Restifio NP, Kawakami Z, Marincola F, Irvine KR et al. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenetherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother* (1993) **14**:182
- 243) Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel R, Raab K, Höffken R, Gruber R, Pichlmair H, Hirche H, Pichlmayr R. Monoclonal antibody (MAB) adjuvant therapy of Dukes C colorectal carcinoma: 7-year update of a prospective randomized trial. *ASCO Proc* (1996) **15**:1385

- 244) Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Pichlmair H, Hirche H., Pichelmayer R, Buggisch P, Witte J. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes`C colorectal carcinoma. *Lancet* (1994) **343**:1177
- 245) Robey E, Allison JP. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today* (1995) **16**:306
- 246) Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* (1997) **99**:469
- 247) Rudy W, Guckel B, Siebels M, Lindauer M, Meuer SC, Moebius U. Differential function of CD80- and CD86-transfected human melanoma cells in the presence of IL-12 and IFN-gamma. *Int Immunol* (1997) **9**:853
- 248) Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* (1997) **9**:709
- 249) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* (1988) **239**:487
- 250) Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA, Kiener PA. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol* (2000) **165**(5):2903
- 251) Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* (2004) **22**(7):1201
- 252) Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olague C, Sola J, Sadaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* (2004) **22**(8):1389
- 253) Saoulli K, Lee SY, Cannons JL, Yeh WC, Santana A, Goldstein MD, Bangia N, DeBenedette MA, Mak TW, Choi Y, Watts TH. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med* (1998) **187**(11):1849
- 254) Sato Y, Maeda Y, Shomura H, Sasatomi T, Takahashi M, Une Y, Kondo M et al. A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *J Cancer* (2004) **90**(7):1334
- 255) Schirmacher V, Haas C, Bonifer R, Ahlert T, Gerhards R, Ertel C. Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle Disease Virus. *Gene Therapy* (1999) **6**:63-73
- 256) Schlienger K, Uyemura K, Jullien D, Sieling PA, Rea TH, Linsley PS, Modlin RL. B7-1, but not CD28, is crucial for the maintenance of the CD4+ T cell responses in human leprosy. *Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih* (1998) **15**:210

- 257) Schmidtke JR und Hatfield S. Activation of Purified Human T Cells by Mitogens: Diminished mitogen-induced deoxyribonucleic acid synthesis in human T cells compared with autologous peripheral blood lymphocytes. *Infection and Immunity* (1976) **13(4)**:1061
- 258) Schoof DD, Smith JW 2nd, Disis ML, Brant-Zawadski P, Wood W, Doran T, Johnson E, Urba WJ. Immunization of metastatic breast cancer patients with CD80-modified breast cancer cells and GM-CSF. *Adv Exp Med Biol* (1998) **451**:511
- 259) Schultze J, Nadler LM, Gribben JG. B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev.* (1996) **10**:111
- 260) Schwartz JC, Zhang X, Nathenson SG, Almo SC. Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol* (2002) **3**:427
- 261) Schwarz H, Arden K, Lotz M. CD137, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is located on chromosome 1p36, in a cluster of related genes, and colocalizes with several malignancies. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) **235(3)**:699
- 262) Schwarz H, Blanco FJ, von Kempis J, Valbracht J, Lotz M. ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* (1996) **87(7)**:2839
- 263) Segal JG, Lee NC, Tsung YL, Norton JA, Kangla T. The Role of IFN- γ in Rejection of Established Tumors by IL-12: Source of Production and Target. *Cancer Res* (2002) **62**:4696
- 264) Seki N, Brooks AD, Carter CR, Back TC, Parsonneault EM, Smyth MJ, Wiltout RH, Sayers TJ. Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin. *J Immunol* (2002) **168**:3484
- 265) Selvakumar A, Mohanraj BK, Eddy RL, Shows TB, White PC, Dupont B. Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B lymphocyte activation antigen B7. *Immunogenetics* (1992) **36**:175
- 266) Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* (2002) **2**:116
- 267) Shawler DL, Bartholomew RM, Garrett MA, Trauger RJ, Dorigo O, Van Beveren C, Marchese A, Ferre F, Duffy C, Carlo DJ, Sherman LA, Gold DP, Sobol RE. Antigenic and immunologic characterization of an allogeneic colon carcinoma vaccine. *Clin Exp Immunol* (2002) **129(1)**:99
- 268) Shi F, Rakhmilevich AL, Heise CP, Oshikawa K, Sondel PM, Yang NS, Mahvi DM. Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model. *Mol Cancer Ther* (2002) **1(11)**:949
- 269) Shin T, Nakayama T, Akutsu Y, Motohashi S, Shibata Y, Harada M, Kamada N, Shimizu C, Shimizu E, Saito T, Ochiai T, Taniguchi M. Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated V α 14 NKT cells. *Int J Cancer* (2001) **91**:523
- 270) Shrikant P, Khoruts A, Mescher MF. CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. *Immunity* (1999) **11**:483

- 271) Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* (1997) **186(1)**:47
- 272) Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S, Monos D, Peritt D, Marincola F, Cai D, Birebent B, Bloome E, Kim J, Berencsi K, Mastrangelo M, Herlyn D. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* (2002) **62(18)**:5267
- 273) Sotomayor EM, Borrello I, Tubb E, Allison JP, Levitsky HI. In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) **96**:11476
- 274) Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan Y-CE, Quinn P M, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, Gately MK. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) **87**:6808
- 275) Stine KC, Warren BA, Becton DL. Interleukin-12 (IL-12) enhances lysis of non-lymphoid leukemia cell lines in vitro. *Leucemia* (1998) **12**:1204
- 276) Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Muller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12- dependent Th1 development. *Eur J Immunol* (1998) **28**:3231
- 277) Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-a mechanism of immune evasion? *Nat Med* (1996) **2**:1361
- 278) Sun Y, Jurgovsky K, Moller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, Schadendorf D. Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* (1998) **5(4)**:481
- 279) Tahara H, Zitvogel L, Storkus WJ, Zeh HJ, 3rd, McKinney TG, Schreiber RD, Gubler U, Robbins PD, Lotze MT. Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J Immunol* (1995) **154**:6466
- 280) Takeda K, Seki S, Ogasawara K, Anzai R, Hashimoto W, Sugiura K, Takahashi M, Satoh M, Kumagai K. Liver NK1.1+ CD4+ $\alpha\beta$ T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J Immunol* (1996) **156**:3366
- 281) Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* (1998) **8**:383
- 282) Tamura T, Nishi T, Goto T, Takeshima H, Dev SB, Ushio Y, Sakata T. Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer. *Hum Gene Ther* (2001) **12(10)**:1265
- 283) Tamura T, Nishi T, Goto T, Takeshima H, Ushio Y, Sakata T. Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth. *Anticancer Res* (2003) **23(2B)**:1173

- 284) Tan JT, Ha J, Cho HR, Tucker-Burden C, Hendrix RC, Mittler RS, Pearson TC, Larsen CP. Analysis of expression and function of the costimulatory molecule 4-1BB in alloimmune responses. *Transplantation* (2000) **70(1)**:175
- 285) Tasaki K, Yoshida Y, Maeda T, Miyauchi M, Kawamura K, Takenaga K, Yamamoto H, Kouzu T, Asano T, Ochiai T, Sakiyama S, Tagawa M. Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18, which activate type 1 helper T cells. *Cancer Gene Ther* (2000) **7(2)**:247
- 286) Tatsumi T, Huang J, Gooding WE, Gambotto A, Robbins PD, Vujanovic NL, Alber SM, Watkins SC, Okada H, Storkus WJ. Intratumoral delivery of dendritic cells engineered to secrete both interleukin (IL)-12 and IL-18 effectively treats local and distant disease in association with broadly reactive Tc1-type immunity. *Cancer Research* (2003) **63**:6378
- 287) Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/ cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) **86**:1333
- 288) Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4-Ig. *Immunity* (1995) **3**:541
- 289) Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* (2000) **12(2)**:151
- 290) Tomura M, Maruo S, Mu J, Zhou XY, Ahn HJ, Hamaoka T, Okamura H, Nakanishi K, Clark S, Kurimoto M, Fujiwara H. Differential capacities of CD4+, CD8+, and CD4-CD8- T cell subsets to express IL-18 receptor and produce IFN-gamma in response to IL-18. *J Immunol* (1998a) **160**:3759
- 291) Tomura M, Zhou XY, Maruo S, Ahn HJ, Hamaoka T, Okamura H, Nakanishi K, Tanimoto T, Kurimoto M, Fujiwara H. A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. *J Immunol* (1998b) **160**:4738
- 292) Townsend SE, Su FW, Atherton JM, Allison JP. Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7- transfected tumors. *Cancer Res* (1994) **54**:6477
- 293) Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* (1996) **59(4)**:505
- 294) Trinchieri G. Interleukin-12: A Cytokine Produced by Antigen-Presenting Cells With Immunoregulatory Functions in the Generation of T-Helper Cells Type 1 and Cytotoxic Lymphocytes. *Blood* (1994) **84(12)**:4008
- 295) Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) **90**:3725
- 296) Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* (1995) **87**:982

- 297) Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* (1997) **158**:3359
- 298) Tsutsui H, Nakanishi K, Matsui K, Higashino K, Okamura H, Miyazawa Y, Kaneda K. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol* (1996) **157**:3967
- 299) Ullenhag GJ, Frodin JE, Jeddi-Tehrani M, Strigard K, Eriksson E, Samanci A, Choudhury A, Nilsson B, Rossmann ED, Mosolits S, Mellstedt H. Durable carcinoembryonic antigen (CEA)-specific humoral and cellular immune responses in colorectal carcinoma patients vaccinated with recombinant CEA and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* (2004) **10(10)**:3273
- 300) Umetsu DT, Katzen D, Chatila T, Miller R, Jabara HH, Maher M, Oettgen H, Terhorst C, Geha RS. Requirements for activation of human peripheral blood T cells by mouse monoclonal antibodies to CD3. *Clin Immunol Immunopathol* (1987) **43**:48
- 301) Umezu Y, Augustus LB, Seito D, Hayakawa K, Ross MI, Eton O, Swanson DA, Itoh K. Increase in the ability of human cancer cells to induce cytotoxic T lymphocytes by ultraviolet irradiation. *Cancer Immunol Immunother* (1993) **37(6)**:392
- 302) Umlauf SW, Beverly B, Lantz O, Schwartz RH. Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics. *Mol Cell Biol* (1995) **15**:3197
- 303) Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Fuji M, Torigoe K et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* (1996) **156**:4274
- 304) Van den Eynde B, Hainaut P, Herin M, Knuth A, Lemoine C, Weynants P, van der Bruggen P, Fauchet R, Boon T. Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int J Cancer* (1989) **44**:634
- 305) Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* (1991) **254**:1643
- 306) Van Ginderachter JA, Liu Y, Geldhof AB, Brijs L, Thielemans K, De Baetselier P, Raes G. B7-1, IFN gamma and anti-CTLA-4 co-operate to prevent T-cell tolerization during immunotherapy against a murine T-lymphoma. *Int J Cancer* (2000) **87**:539
- 307) Van Herpen CM, Huijbens R, Looman M, De Vries J, Marres H, Van De Ven J, Hermsen R, Adema GJ, De Mulder PH. Pharmacokinetics and immunological aspects of a phase Ib study with intratumoral administration of recombinant human interleukin-12 in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a decrease of T-bet in peripheral blood mononuclear cells. *Clin Cancer Res* (2003) **9(8)**:2950
- 308) Veenstra KG, Jonak ZL, Trulli S, Gollob JA. IL-12 Induces Monocyte IL-18 Binding Protein Expression Via IFN- γ . *J Immunol* (2001) **168**:2282
- 309) Vermorken JB, Claessen A, Tinteren H van, Gall H, Ezinga R, Meijer S et al. Active specific immunotherapy for stage II and III human colon cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* (1999) **353(9150)**:345

- 310) Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* (1998) **10(6)**:481
- 311) Vitale A, Guarini A, Latagliata R, Cignetti A, Foa R. Cytotoxic effectors activated by low-dose IL-2 plus IL-12 lyse IL-2-resistant autologous acute myeloid leukaemia blasts. *Br J Haematol* (1998) **101**:150
- 312) von Mehren M, Arlen P, Gulley J, Rogatko A, Cooper HS, Meropol NJ, Alpaugh RK, Davey M, McLaughlin S, Beard MT, Tsang KY, Schlom J, Weiner LM. The influence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and prior chemotherapy on the immunological response to a vaccine (ALVAC-CEA B7.1) in patients with metastatic carcinoma. *Clin Cancer Res* (2001) **7(5)**:1181
- 313) von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, Rogatko A, Meropol N, Cooper HS, Davey M, McLaughlin S, Schlom J, Weiner LM. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* (2000) **6(6)**:2219
- 314) Wadler S, Levy D, Frederickson HL, Falkson CI, Wang Y, Weller E, Burk R, Ho G, Kadish AS. A phase II trial of interleukin-12 in patients with advanced cervical cancer: clinical and immunologic correlates. *Gynecol Oncol* (2004) **92(3)**:957
- 315) Walker W, Aste-Amezaga M, Kastelein RA, Trinchieri G, Hunter CA. IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma. *J Immunol* (1999) **162**:5894
- 316) Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* (1994) **1**:501
- 317) Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* (1995) **270**:985
- 318) Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* (1997) **15**:821
- 319) Watts TH, DeBenedette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* (1999) **11**:286
- 320) Welt S, Divgi CR, Real FX et al. Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody A33. *J Clin Oncol* (1990) **8**:1894
- 321) Wendtner CM, Nolte A, Mangold E, Buhmann R, Maass G, Chiorini JA, Winnacker EL, Emmerich B, Kotin RM, Hallek M. Gene transfer of the costimulatory molecules B7-1 and B7-2 into human multiple myeloma cells by recombinant adeno-associated virus enhances the cytolytic T cell response. *Gene Ther* (1997) **4**:726
- 322) Whitmire JK, Ahmed R. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* (2000) **12(4)**:448
- 323) Wiethe C, Dittmar K, Doan T, Lindenmaier W, Tindle R. Provision of 4-1BB ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells expressing a human tumor-associated antigen. *J Immunol* (2003) **170(6)**:2912

- 324) Wölfel T, Hauer M, Klehmann E, Brichard V, Ackermann B, Knuth A, Boon T, Meyer Zum Büschenfelde KH. Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL). *Int J Cancer* (1993) **55**:237
- 325) Wysocka M, Kubin M, Vieira LQ, Ozmen L, Garotta G, Scott P, Trinchieri G. Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur J Immunol* (1995) **25(3)**:672
- 326) Xiang J. Expression of co-stimulatory 4-1BB ligand induces significant tumor regression and protective immunity. *Cancer Biother Radiopharm* (1999) **14(5)**:353
- 327) Yoshida H, Katayose Y, Unno M, Suzuki M, Kodama H, Takemura S, Asano R, Hayashi H, Yamamoto K, Matsuno S, Kudo T. A novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* (2003) **52(2)**:97
- 328) Yoshida K, Bolodeoku J, Sugino T, Goodison S, Matsumura Y, Warren BF, Toge T, Tahara E, Tarin D. Abnormal retention of intron 9 in CD44 gene transcripts in human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* (1995) **55**:4273
- 329) Yoshida Y, Tasaki K, Kimurai M, Takenaga K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Antitumor effect of human pancreatic cancer cells transduced with cytokine genes which activate Th1 helper T cells. *Anticancer Res* (1998) **18(1A)**:333
- 330) Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) **94**:3948
- 331) Yoshimura K, Hazama S, Iizuka N, Yoshino S, Yamamoto K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Noma T, Oka M. Successful immunogene therapy using colon cancer cells (colon 26) transfected with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and the I κ gkappa leader sequence. *Cancer Gene Ther* (2001) **8(1)**:9
- 332) Yu WG, Yamamoto N, Takenaka H, Mu J, Tai XG, Zou JP, Ogawa M, Tsutsui T, Wijesuriya R, Yoshida R, Herrmann S, Fujiwara H, Hamaoka T. Molecular mechanisms underlying IFN- γ -mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12. *Int Immunol* (1996) **8**:855
- 333) Zhou Z, Kim S, Hurtado J, Lee ZH, Pollock KE. Charakterisation of human homologue of 4-1BB and its Ligand. *Immunol Lett* (1995) **45**:67
- 334) Zitvogel L, Robbins PD, Storkus WJ, Clarke MR, Maeurer MJ, Campbell RL, Davis CG, Tahara H, Schreiber RD, Lotze MT. Interleukin-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumors. *Eur J Immunol* (1996) **26(6)**:1335
- 335) Zou JP, Yamamoto N, Fujii T, Takenaka H, Kobayashi M, Herrmann SH, Wolf SF, Fujiwara H, Hamaoka T. Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity: Response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production by anti-tumor T cells. *Int Immunol* (1995) **7**:1135

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	<i>activating protein-1</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	Kodierende DNA-Sequenz
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CLMF	<i>cytotoxic lymphocyte maturation factor</i> , Interleukin-12
CMV	Zytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
dATP	Desoxy-Adenosin-Tri-Phosphat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	Desoxy-Cytosin-Tri-Phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Tri-Phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Tri-Phosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thionosin-Tri-Phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
Ep-CAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Zentripetalbeschleunigung der Erde
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
h	Stunde/Stunden
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozyten-Antigen
I.E.	Internationale Einheiten
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICE	<i>IL-1β converting enzyme</i> , Caspase-1
IFN- γ	Interferon- γ , Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IGIF	<i>interferon gamma inducing factor</i> , Interleukin-18
IL	Interleukin
IRAK	<i>IL-1 receptor activating kinase</i>

ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton (Molekulargewicht)
LFA-1/-3	<i>lymphocyte function-associated antigen-1/-3</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MLTC	<i>mixed lymphocyte-tumor-cell culture</i>
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MWM III	<i>molecular weight marker III</i>
neo	Neomycin-Resistenzgen
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NKSF	<i>natural killer cell stimulatory factor</i> , Interleukin-12
NK-T	Natürliche Killer-T-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
O.D.	Optische Dichte
p	Statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PG	Prostaglandine
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
rh	Rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	<i>standard error of mean</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec.	Sekunden
SSC	<i>side scatter</i>
STAT4	<i>signal transducer and activator of transcription 4</i>
TAA	Tumorantigene, tumorassoziierte Antigene
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Elektrophorese-Puffer
TAP-1/2	<i>transporter associated with antigen presentation 1/2</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Puffer aus Tris und EDTA
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
Th0	undifferenzierte T-Helfer-Lymphozyten
Th1/2	T-Helfer-Lymphozyten Typ 1/2
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Tris-Hydroxy-Aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/v	<i>weight/volume</i> , Verhältnis Masse/Volumen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres danke ich für die die Überlassung eines interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die jederzeit gewährte Unterstützung.

PD Dr. med. Gunther Hartmann danke ich für die kontinuierliche Betreuung sowie seine Diskussionsbereitschaft und Geduld. Dr. rer. nat. Christoph Brunner möchte ich für die Einführung in die Molekularbiologie und die gute Zusammenarbeit danken.

Für ihre große Hilfsbereitschaft danke ich Frau Angela Hackl, Chemielaborantin, und Frau Rosemarie Kiefl, PTA, die mich bei der Einarbeitung in die experimentellen Techniken unterstützt haben.

Herrn Dr. med. Martin Bidlingmaier danke ich für die Möglichkeit, Messungen an dem FACS-Gerät in der Endokrinologischen Abteilung, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München durchzuführen. Herrn Prof. Dr. med. Michael Hallek und Dr. med. Ulrich Hacker danke ich für die freundliche Überlassung der Vektoren. Für die freundliche Bereitstellung der Messgeräte bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Pape, Institut für Immunologie der Universität München.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich Dr. med. Dietmar Wassilowsky und meinen Co-Doktoranden Dr. med. Julia Seiderer und Angelika Schlamp danken.

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der Doktorarbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden:

1. **Akgöbek K**, Brunner C, Wassilowsky D, Seiderer J, Hacker U, Endres S.
Immunotherapy of colorectal cancer: T-cell activation induced by gene transfer of B7.1 and 4-1BB-Ligand and combined effects of IL-12 and IL-18.
Biological Therapy of Cancer 5th International Symposium, München 1999
The European Journal of Cancer (1999) **35** Suppl. 5, S37:73
2. **Akgöbek K**, Brunner C, Wassilowsky D, Seiderer J, Hacker U, Endres S.
Immunotherapy of colorectal cancer: T-cell activation induced by gene transfer of B7.1 and 4-1BB-ligand and combined effects of IL-12 and IL-18.
Seventh Meeting of the European Society of Gene Therapy, München 1999
3. **Akgöbek K**, Brunner C, Wassilowsky D, Seiderer J, Hacker U, Endres S.
Immuntherapie beim kolorektalen Karzinom: Aktivierung der T-Zell- Immunität durch Gentransfer von B7.1 und 4-1BB-L und synergistischer Effekt der Zytokine IL-12 und IL-18.
Research Festival, P127, Großhadern 1999

Weitere Abstracts:

1. Brunner C, Schlamp A, Seiderer J, Bidlingmaier M (I), **Akgöbek K**, Eigler A, Hartmann G, Endres S.
TNF-a- and CpG-oligodeoxynucleotide-enhanced dendritic cell maturation and protection against experimental murine colon carcinoma.
Biological Therapy of Cancer 5th International Symposium 1999, München
The European Journal of Cancer (1999) **35** Suppl. 5, S30:62

-
2. Seiderer J, Brunner C, Bidlingmaier M (1), Schlamp A, **Akgöbek K**, Eigler A, Lehr HA (2), Hartmann G, Endres S.

Dendritic cell maturation enhances T-cell-activation potential in vitro and protection against experimental murine colon carcinoma in vivo.

Research Festival, Großhadern 1999, V80

Lebenslauf

Kivanc Karacay

Persönliche Daten

Geburtsname Akgöbek
Geburtstag / -ort 11. November 1975, Giengen an der Brenz
Familienstand verheiratet
Staatsangehörigkeit deutsch (seit 1996), ehemals türkisch

Schulbildung

Juni 1995 Abitur am Margarete-Steiff-Gymnasium, Giengen

Studium

1995 Studienbeginn Humanmedizin an der Universität Freiburg
1997 Ärztliche Vorprüfung an der Universität Freiburg
1997 Hochschulwechsel an die Universität München (LMU)
1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 Ärztliche Prüfung an der Universität München (LMU)

Arzt im Praktikum

2002 Diakonie-Klinikum Stuttgart,
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Klinikum Stuttgart, Städtische Frauenklinik Berg
2003 Gesundheitsamt Stuttgart
2004 Approbation als Ärztin

Wissenschaftliche Tätigkeit

1998 - 2000 Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische
Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München
(Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres)

Giengen im März 2005