

Medizinische Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Zur Rolle des CD30 Liganden bei der Induktion einer
spezifischen Immunantwort gegen Melanomzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marion Eckert
aus München
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Hallek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. C. Hammer
Prof. Dr. D. Schendel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Clemens Wendtner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c.K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2002

Inhaltsverzeichnis	Seite
Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abkürzungen.....	V
<u>I. Einleitung</u>	1
1. Möglichkeiten der Tumorabwehr durch das menschliche Immunsystem.....	1
2. Ausbildung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen Tumorzellen.....	2
2.1. Kostimulation.....	3
3. Die Familie der TNF Liganden.....	4
3.1. Liganden aus der TNF-Familie potenzieren die Kostimulation von T-Zellen	5
4. Das CD30L/CD30 System.....	6
4.1. Struktur des CD30L.....	6
4.2. Vorkommen des CD30L und seines Rezeptors.....	7
4.3. Biologische Funktion des CD30/CD30L Systems.....	7
5. Das maligne Melanom als Modell für immuntherapeutische Ansätze	10
6. Tumorstimmung beim malignen Melanom.....	11
7. Zielsetzung der Arbeit.....	13
<u>II. Material</u>	14
1. Antikörper.....	14
1.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS).....	14
1.2. Antikörper für die Zellseparation (MACS).....	14
2. Chemikalien.....	15
3. Enzyme.....	16
3.1. Restriktionsenzyme.....	16
3.2. Sonstige Enzyme.....	16
4. Geräte.....	16
5. Blut, Zellen.....	17
6. Plasmide.....	17
7. Kits.....	18
8. Kompetente Bakterien.....	18
9. Lösungen, Puffer und Gele.....	18
10. Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	21

III. Methoden	23
1. Herstellung der Plasmide.....	23
2. Präparation der DNA.....	23
2.1. Transformation der Bakterien.....	23
2.2. DNA-Isolierung (Minipräp).....	23
2.3. Quantitative DNA-Messung.....	24
2.4. DNA-Präparation (Maxipräp).....	24
3. Verifizierung des Inserts nach Amplifizierung der DNA.....	25
3.1. DNA-Fragmentierung mittels Restriktionsenzymen.....	25
3.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	25
4. Zellkulturexperimente.....	26
4.1. Allgemeine Methoden.	26
4.1.1. Zellzählung.....	26
4.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	26
4.1.3. Ablösung der adhärenenden M3HK Zellen zur Weiterverarbeitung.....	27
4.1.4 Fixierung der M3HK-Zellen mit Paraformaldehyd.....	28
4.2. Vorbereitung der Melanomzellen.	28
4.2.1. Transfektion der Melanomzellen..	28
4.2.2. Selektion der transfizierten Melanomzellen.....	29
4.2.3. Positive Selektion der B7-1 und CD30L exprimierenden Zellen mittels MACS	29
4.3. Vorbereitung der T-Zellen.....	30
4.3.1. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus buffy coats.....	30
4.3.2. Isolierung von T-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten: negative Selektion mittels MACS.....	31
4.3.3. FACS-Analyse der isolierten und transfizierten Zellen.....	32
4.4. Vorversuche.....	33
4.4.1. Bestimmung der Oberflächenmarker auf den M3HK Zellen.....	33
4.4.2. Aufregulation von HLA-I und HLA-II auf den Transfektanten	33
4.4.3. Bestimmung der Aktivierungsmarker und der CD30 Expression auf T-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.....	33
4.5. Proliferationsassays.....	34
4.5.1. Ansatz der Proliferationsassays.....	34
4.5.2. Zellernte und Messung des Thymidineinbaus.....	35
4.6. Restimulationsassays.....	36
4.6.1. Prästimulation der T-Zellen.....	36
4.6.2. Messung der Expression von Aktivierungsmarkern bei Restimulation der T-Zellen mit M3HK/B7-1.....	37
4.6.3. Restimulationsassays.....	37
4.6.4. Restimulation von mit PHA prästimulierten T-Zellen.....	38

IV. Ergebnisse	39
1. Vorversuche.....	39
1.1. Expression von CD30L und B7-1 auf transfizierten M3HK-Zellen.....	39
1.2. Charakterisierung der transfizierten M3HK-Zellen.....	40
1.3. Steigerung der HLA-I- und -II-Expression auf Melanomzellen mittels IFN γ	42
1.4. Charakterisierung der isolierten T-Zellen.....	44
1.5. Expression von CD25, CD71 und CD30 nach Stimulation der T-Zellen mit bestrahlten M3HK/B7-1-Zellen und IL-2.....	44
1.6. Vergleich der Expression von CD25, CD30 und Ox40 nach Stimulation der T-Zellen mit Paraformaldehyd-fixierten oder bestrahlten M3HK/B7-1-Zellen und IL-2.....	46
1.7. Expression von CD25, CD30 und Ox40 nach Stimulation der T-Zellen mit PHA, IL-2 oder ConA ohne Zugabe von Melanomzellen.....	49
1.8. Expression von CD25 und CD30 nach Stimulation der T-Zellen mit verschiedenen M3HK Transfektanten in Anwesenheit von ConA und IL-2.....	50
2. Proliferationsexperimente.....	52
2.1. Proliferationsassays.....	52
3. Restimulationsexperimente.....	55
3.1. Expression von Aktivierungsmarkern bei Prästimulation mit M3HK/B7-1.....	55
3.2. Expression von Aktivierungsmarkern bei Prästimulation mit M3HK/CD30L <i>neo</i> , M3HK/B7-1 oder der Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30L <i>hygro</i>	58
3.3. Bestimmung der Proliferationsrate bei Restimulation mit M3HK/B7-1.....	59
3.4. Restimulation von mit PHA, ConA oder IL-2 prästimulierten T-Zellen.....	61
V. Diskussion	64
1. Diskussion der Versuchsergebnisse und der methodischen Probleme.....	65
1.1. Charakterisierung der Zelllinie M3HK und der Transfektanten.....	65
1.2. Expression von HLA-I und HLA-II.....	65
1.3. Aktivierung der T-Zellen.....	66
1.3.1. Aufregulation von CD30 auf T-Zellen.....	66
1.3.2. Veränderung der CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Ratio der T-Zellen.....	68
1.4. Induktion von CD30 auf T-Zellen durch die verschiedenen Transfektanten.....	69
1.5. Proliferationsassays	70
1.6. Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen bei Restimulation mit verschiedenen Transfektanten.....	72
1.7. Restimulationsassays.....	73
1.7.1. Restimulationsassays mit PHA-, ConA- und IL2-präaktivierten T-Zellen.....	74
2. Der Stand der Forschung hinsichtlich der Tumorimmunologie.....	75
3. Therapeutische Ansätze beim malignen Melanom.....	80
3.1. Tumorstimmulierung beim malignen Melanom.....	81

VI. Zusammenfassung..... 84

VII. Literaturverzeichnis..... 86

Verzeichnis der Abkürzungen

α -	gegen (anti -)
AAV	Adeno-associated virus
ALCL	großzellig-anaplastische Lymphomzellen (anaplastic large cell lymphoma cells)
AS	Aminosäure(n)
APC	antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungsmuster (cluster of differentiation)
CD30L	CD30 Ligand
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CTL's	Zytotoxische T-Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorting
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal calf serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HD	Hodgkins Disease (Morbus Hodgkin)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen (=MHC)
Ig	Immunglobulin

IFN γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin 2
kb	Kilobasen
LK	Lymphknoten
LT	Lymphotoxin
MACS	Magnetische Zellsortierung (Magnetic Cell Separation)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
M3HK/B7-1	mit B7-1 transfizierte M3HK-Zellen
M3HK/CD30L	mit CD30L transfizierte M3HK-Zellen
M3HK/B7-1+CD30L	mit B7-1 und CD30L transfizierte M3HK-Zellen
min.	Minute
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBL's	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered Saline)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sCD30	löslicher CD30-Rezeptor (soluble CD30)
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SV	Simian Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris-gepufferte EDTA

TIL's	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor - Rezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (enzymatische Einheit)
Ü/N	Über Nacht
v.a.	vor allem

I. Einleitung

Die Aufgabe des Immunsystems ist der Erhalt der physischen Integrität des Körpers. Es muss daher in der Lage sein, fremde wie auch körpereigene, veränderte Strukturen zu erkennen, um eine geeignete Abwehrreaktion auslösen zu können. Auch bei der Abwehr von Tumorzellen ist eine Beteiligung des Immunsystems nachgewiesen (Abbas, Lichtman et al. 1991). Obwohl Tumorzellen von körpereigenem Gewebe abstammen, kann der Prozess der malignen Transformation mit der Expression von Molekülen verbunden sein, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Spontane Remissionen von Melanomen (Bystryn 1995) und Nierenzellkarzinomen (Lokich 1997; Papac 1998), ebenso wie die vermehrte Tumorausbildung bei Erkrankungen oder Störungen des Immunsystems (HIV oder medikamentöse Immunsuppression), deuten auf eine Rolle des Immunsystems bei der Abwehr dieser Tumorarten hin. Anhand der vielen, ausgewachsenen Tumoren wird jedoch deutlich, dass die Tumorabwehr durch das Immunsystem häufig insuffizient ist. Ein Ziel der Tumormunologie ist es daher, die körpereigenen Abwehrmechanismen gegen Tumore zu verstärken. Man versucht dabei mit unterschiedlichen Methoden, die Immunabwehr zur Kontrolle und Abwehr von Tumorwachstum und Metastasierung anzuregen.

1. Möglichkeiten der Tumorabwehr durch das menschliche Immunsystem

Das menschliche Immunsystem hat verschiedenste Möglichkeiten, die Entstehung von Tumoren im Körper zu bekämpfen, wovon im Folgenden nur einige genannt werden sollen. Die unspezifische, zelluläre Abwehr durch Monozyten und Makrophagen wird durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, Stickoxiden, lysosomalen Enzymen sowie durch TNF α vermittelt (Abbas, Lichtman et al. 1991). Dazu müssen diese Zellen erst durch das aus T-Zellen freigesetzte IFN γ aktiviert werden. In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APC's), können Monozyten und Makrophagen auch Fragmente von Tumorzellen aufnehmen, diese über den MHC-Komplex den T-Zellen präsentieren, und damit die Brücke zur erworbenen, spezifischen Immunität bilden (Abbas, Lichtman et al. 1991). NK-Zellen zeigen *in vitro* eine spontane zytolytische Reaktion gegen verschiedene Tumorzellen. Diese wird durch Interaktion mit körpereigenen MHC-Klasse-I- (MHC-I, HLA-I) Molekülen inhibiert. Eine verringerte Expression von MHC-Molekülen, wie sie häufig bei Tumorzellen vorkommt, macht eine Zelle daher für NK-Zellen angreifbarer (Karlhofer, Ribaud et al. 1992). Durch Antikörperbindung können NK-Zellen aktiviert werden und eine spezifische Lyse der Zielzellen vermitteln (Trinchieri 1989). Durch Zytokine wie IFN γ , TNF oder IL-2 kann diese Fähigkeit noch verstärkt werden.

Die spezifische Abwehr von Tumorzellen erfolgt durch die T-Zellen. Sie erkennen Tumorproteine, deren Fragmente über den MHC-Komplex präsentiert werden und können diese antigenträgenden Zellen zerstören. Hinweise auf die Induktion einer spezifischen, T-Zell-vermittelten Immunreaktion gegen Tumore ergaben sich bereits 1957 durch Vakzinierung von Mäusen mit syngeneten Tumorzellen. Diese konnten in den Tieren eine Immunantwort induzieren, die einen Schutz bei erneuter Gabe von Tumorzellen vermittelte (Prenn und Main 1957). Zytotoxische T-Zellen (CTL's) spielen in der Abwehr immunogener Tumore eine große Rolle, da sie als wichtige Effektorzellen der zellulären Immunantwort fungieren (Melief und Kast 1992). Daher wurden bereits viele verschiedene Strategien entwickelt, die spezifische Antitumor-Antwort von CTL's zu verbessern, um Tumorzellen zu eliminieren. CTL's können Tumorzellen zum einen durch die Freisetzung toxischer Granula zerstören, welche die malignen Zellen lysieren (Shresta, Heusel et al. 1995), oder aber durch Ligand/Rezeptor-Interaktion die Apoptose der Zellen hervorrufen. Diese kann unter anderem durch verschiedenste Mitglieder der TNF Familie initiiert werden (Gravestain und Borst 1998; Degli-Esposti 1999; Rath und Aggarwal 1999).

2. Ausbildung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen Tumorzellen

Der Ausbildung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen Tumorzellen liegt ein enger Dialog zwischen den Zellen des Immunsystems zugrunde. Sie erfolgt generell in zwei Phasen:

In der induktiven Phase erkennt der antigenspezifische T-Zellrezeptor (TCR) der CD4⁺ T-Zellen ein Peptid, welches durch den MHC-Klasse-II-Komplex (MHC-II, HLA-II) der antigenpräsentierenden Zellen (APC's) präsentiert wird. Auf diese Erkennung hin schalten sich verschiedene andere Ligand-Rezeptorpaare (kostimulatorische Moleküle), wie insbesondere CD28/B7-1, CTLA-4/B7-2, CD40/CD40L, aber auch CD5/CD72 und ICAM-1/LFA-1, in die Kommunikation zwischen den Zellen ein. Daraufhin kommt es zur Freisetzung von Th1-Zytokinen (IL-2, IFN γ , TNF α), die der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen dienen sowie der Freisetzung von Th2-Zytokinen, die durch Stimulation von B-Zellen zur Produktion von Antikörpern führen. In der Effektorphase treten dann CD8⁺ T-Zellen in Kontakt mit dem antigenpräsentierenden MHC-I-Komplex der Tumorzellen. Es resultiert die Freisetzung von Zytokinen, die entweder zur Tumorzellzerstörung oder zur Unterdrückung der Immunantwort führen können (Hemmila und Chang 1999).

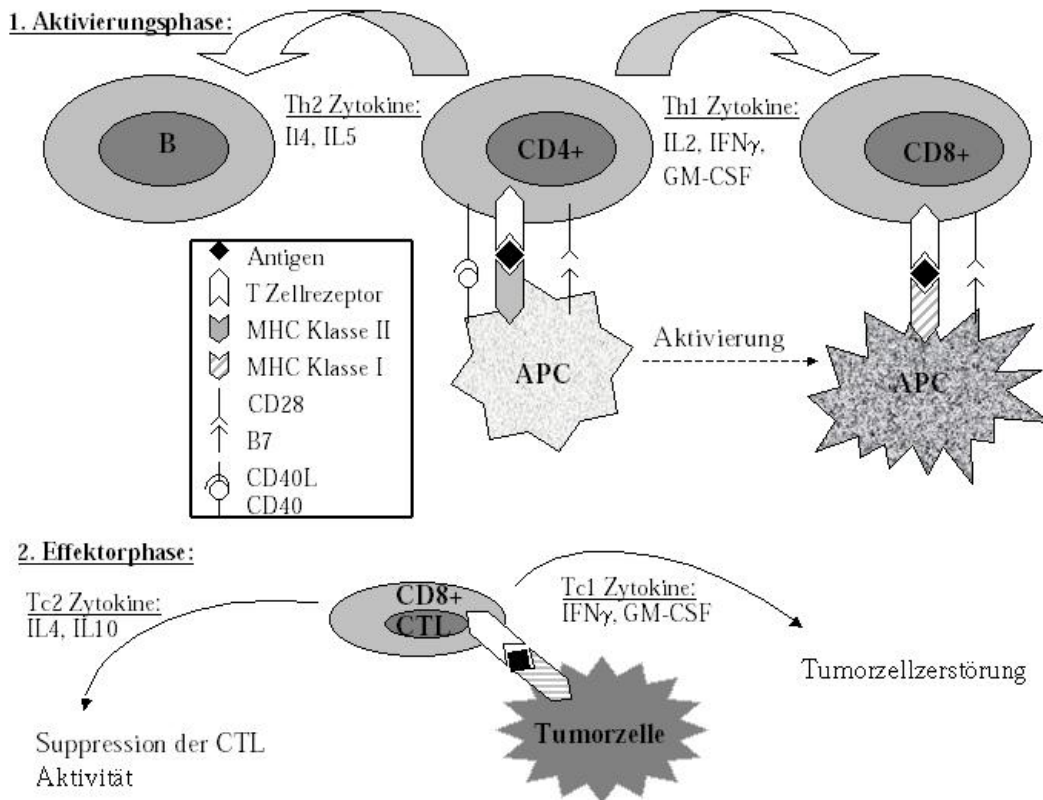


Abb. 1) Schema der zellulären Interaktionen bei der Aktivierung von T-Zellen im Rahmen der Tumorerkennung. **1.** In der Aktivierungsphase präsentieren APC's über MHC-II-Moleküle und Kostimulation mit CD28/B7 und CD40L/CD40 das Tumorantigen den CD4⁺ T-Zellen, oder über MHC-I den CD8⁺ T-Zellen. Dies führt zur Freisetzung von Th1-Zytokinen, welche die CD8⁺ T-Zellaktivierung fördern und APC's dazu stimulieren, die CD8⁺ T-Zellen für das Antigen zu primen. Th2-Zytokine aus CD4⁺ T-Zellen stimulieren die B-Zellen zur Antigenproduktion. **2.** Die Effektorphase wird von den CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Binden CD8⁺ T-Zellen nun mittels MHC-I an Tumorzellen, kommt es zu einer Typ I- oder Typ II-Zytokinantwort, die wiederum zur Tumorzellzerstörung oder zur Suppression der Immunantwort führt (Hemmila und Chang 1999).

2.1. Kostimulation

Für antitumorale Vakzinierungsstrategien ist die Stimulation von zytotoxischen T-Zellen (CTL's) bedeutsam, die wahrscheinlich als entscheidende Effektorzellen der zellulären Immunantwort fungieren (Melief und Kast 1992). Für ihre volle Aktivierung müssen CTL's mindestens zwei Signale empfangen: das Antigen-Erkennungssignal, vermittelt durch die Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem MHC-Komplex und Fragmenten des Fremdmoleküls sowie ein kostimulatorisches Signal. Als zentrale kostimulatorische Signale wurden die Stimulation der T-Zellantigene CTLA-4 durch B7-2 (CD86) oder CD28 durch B7-1 (CD80) auf antigenpräsentierenden Zellen identifiziert (Freeman, Gray et al. 1991; Schwartz 1992; Freeman, Gribben et al. 1993; Hathcock, Laszlo et al. 1993; Clark und Ledbetter 1994; June, Bluestone et al. 1994; Reiser und Stadecker 1996).

Inzwischen konnte in mehreren Tumormodellen gezeigt werden, dass B7-transduzierte Tumorzellen *in vivo* abgestoßen werden können und eine Vakzinierung mit diesen Zellen das Wachstum eines B7-negativen Wildtyp tumors unterdrückt (Chen, Ashe et al. 1992; Baskar, S. et al. 1993; Chen, McGowan et al. 1994; Matulonis, Dosiou et al. 1995). Es gibt jedoch mehrere Variablen, welche die Effizienz der B7-vermittelten Tumorabstoßung entscheidend beeinflussen, wie zum Beispiel die initiale Immunogenität des Tumors, die erzielte Dichte der B7-Moleküle auf der Tumorzelloberfläche (Wu, Huang et al. 1995), oder die Transduktion der Tumorzellen mit zusätzlichen Genen wie MHC-II (Baskar, S. et al. 1993; Heuer, Tucker-McClung et al. 1996). Eine weitere Möglichkeit, die Potenz von B7-transduzierten Tumorzellen zu steigern, besteht in der kombinierten Transduktion von Zytokingenen mit einem kostimulatorischen Gen, insbesondere für schwach immunogene Tumoren (Baskar, Glimcher et al. 1995).

3. Die Familie der TNF Liganden

Aktivierte T-Zellen exprimieren eine Reihe von Oberflächenproteinen, die eine zentrale Rolle in der zellkontaktabhängigen Interaktion mit Zellen des Immunsystems spielen. Neben den klassischen Molekülen B7-1 und B7-2 gibt es einige weitere Moleküle, die für diese Interaktionen von Bedeutung sind. Die Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie sind insbesondere für die Kostimulation interessant. Nachdem TNF α 1985 zum ersten Mal sequenziert wurde (Shirai, Yamaguchi et al. 1985), begannen sich in den 90er Jahren zwei Superfamilien herauszukristallisieren, von welchen TNF und seine Rezeptoren nur einige Vertreter sind. 1994 waren 12 verschiedene TNF-Rezeptoren (TNFR) sowie 8 dazugehörige Zytokine identifiziert. Die TNFR-Superfamilie besteht bis auf zwei Ausnahmen aus Typ I transmembranären Glykoproteinen. Die TNF-Ligand-Superfamilie (TNF, LT α , LT β , CD27L, 30L, 40L, 95L (=Fas Ligand), 4-1BBL, OX40L, TRAIL, TL1) dagegen wird von Typ II Transmembranglykoproteinen mit Ausnahme vom LT α , welches ausschließlich sezerniert wird, gebildet (Smith, Farrah et al. 1994).

Einige der Rezeptoren und Liganden existieren zusätzlich in löslicher Form, wie z.B. 4-1BB, TNF, CD95L und CD30. Die Liganden der Familie sind in der Lage, pleiotrope Effekte, die von Differenzierung, Proliferation und Aktivierung bis hin zum Zelltod reichen, auszulösen (Smith, Farrah et al. 1994; Kashii, Giorda et al. 1999). Sie erfüllen außerdem die verschiedensten Funktionen im Immunsystem: So ist CD40L ein zentrales Molekül bei der Interaktion von B- und T-Zellen, was sich bei der Erkrankung des X-gekoppelten Hyper-IgM-Syndroms widerspiegelt. Dieses wird auf Mutationen des CD40L zurückgeführt und ist gekennzeichnet durch absoluten Mangel aller Immunglobulinklassen, außer IgM, ebenso wie der Unfähigkeit von B-Zellen, eine antigenspezifische Antikörperantwort zu erbringen (Callard, Armitage et al. 1993). Fas dagegen spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose und der Entstehung von Toleranz,

weswegen Mutationen dieses Rezeptors mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden (Russell und Wang 1993). Eines ist ihnen jedoch allen gemeinsam: 1993 konnten Goodwin et al. zeigen, dass menschliche T-Zellen und CD4⁺ T-Zellklone verstärkt proliferieren, wenn sie mit einem beliebigen TNF-Liganden zusammen mit gegen CD3 gerichteten, monoklonalen Antikörpern inkubiert wurden (Goodwin, Din et al. 1993).

3.1. Liganden aus der TNF-Familie potenzieren die Kostimulation von T-Zellen

Die Bedeutung der klassischen kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 für die optimale Aktivierung von CTL's ist am besten untersucht. Daneben gibt es jedoch andere Moleküle mit potentieller kostimulierender Aktivität. Für die Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Liganden (TNFL)-Familie gibt es Hinweise, dass die meisten, wenn nicht sogar alle dieser Liganden, kostimulierend auf die T-Zell-Proliferation wirken (Goodwin, Din et al. 1993; Alderson 1995). Die meisten Liganden der TNF-Familie und ihre Rezeptoren werden auf T-Zellen exprimiert und spielen eine entscheidende Rolle in der T-Zell-vermittelten Immunität. TNF α , 4-1BB und CD30L werden auch auf aktivierten Makrophagen exprimiert, denen als antigenpräsentierende Zellen eine besondere Rolle in der T-Zell-Aktivierung zukommt. Insgesamt entfalten die Mitglieder der TNF-Liganden-Familie aufgrund ihrer Typ II Membranproteinstruktur ihre Wirkung vorzugsweise über direkten Zell-Zell-Kontakt. Die Wirkung ist eng an akzessorische Signale gekoppelt, wie z.B. an die gleichzeitige oder vorherige Interaktion zwischen B7-1 mit CD28, oder CD58 mit CD2. Dabei haben TNF-Liganden eine stark potenzierende Funktion in der Kostimulation von T-Zellen (Smith, Farrah et al. 1994). Als ein Vertreter der TNF-Liganden liefert CD27L (CD70) über seinen Rezeptor CD27, der auf ruhenden T- und B-Zellen exprimiert wird, ein akzessorisches Signal der T-Zellaktivierung (Hintzen, Lens et al. 1995). Diese Rezeptor-Ligand Interaktion resultiert in einer verstärkten Proliferation und zytolytischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen (Brown, Meek et al. 1995). In Gegenwart von IL-2 oder IL-12 wird durch CD27L-Stimulation auch eine Aktivierung der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen beobachtet (Yang, Agematsu et al. 1996).

Auch andere Mitglieder der TNF-Liganden-Familie haben kostimulierende Funktion für T-Zellen. In einem murinen B-Zellymphom-Modell konnte gezeigt werden, dass 4-1BBL eine entscheidende Rolle in der Kostimulation von IL-2 Produktion und Proliferation von T-Zellen spielt (DeBenedette, Chu et al. 1995). Dabei induzierte cAMP eine verstärkte Expression von 4-1BBL in einem B-Zell-Lymphom und führte zu einer Aufregulation der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2. Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch eine von der B7-1 - CD28 Interaktion unabhängige kostimulatorische Funktion von 4-1BBL auf T-Zellen besteht, die vor allem in einem Reaktivierungsprozess

proliferierender T-Zellen nach erfolgter Primärstimulation charakterisiert ist (DeBenedette, Shahinian et al. 1997; Hurtado, Kim et al. 1997). In einem Mausmodell konnte eine Regression schwach immunogener Sarkome induziert werden, indem der 4-1BB-Rezeptor auf aktivierten T-Zellen mittels monoklonaler Anti-4-1BB-Antikörper stimuliert wurde, was zu einer verstärkten CTL-Antwort von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führte (Melero, Shuford et al. 1997).

OX40 ist ein weiteres Molekül der TNF-Familie, das als T-Zell-Aktivierungsantigen ursprünglich in der Ratte entdeckt wurde. Exprimiert man rekombinanten OX40L in COS-Zellen, so wird die Proliferation von CD4⁺ Zellen, die mit Mitogenen (PHA, PMA) oder Anti-CD3-Antikörpern vorstimuliert waren, verstärkt (Godfrey, Fagnoni et al. 1994). Auch gibt es Hinweise dafür, dass die OX40L vermittelte Stimulation von OX40-positiven T-Zellen Adhäsionsmoleküle aufreguliert und die Adhäsion an vaskuläre Endothelzellen fördert (Imura, Hori et al. 1996). Daneben werden T-Zell-abhängige humorale Immunantworten entscheidend von der OX40/OX40L-Interaktion geprägt, da die Differenzierung von aktivierten B-Zellen in Immunglobulin produzierende Zellen von diesem Stimulationsprozess abhängig ist (Stuber und Strober 1996). Dass diese Aktivierung von B-Lymphozyten in einer Antitumorantwort neben der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielt, wurde bereits in einem murinen Plasmozytommodell für einen weiteren TNF-Liganden, Lymphotoxin (LT), gezeigt: J558L Zellen, die mit einem LT-Expressionsplasmid transfiziert wurden, unterdrückten das Tumorstadium durch Stimulation von aktivierten B-Zellen auch in Abwesenheit von aktivierten T-Lymphozyten (Qin und Blankenstein 1995)

4. Das CD30L/CD30 System

Ein weiteres Molekül der Familie der TNFR-Liganden ist der CD30L, der zusammen mit seinem Rezeptor im folgenden näher beschrieben werden soll:

4.1. Struktur des CD30L

Nach der erstmaligen Klonierung von CD30 im Jahr 1992, konnte dieses Molekül eindeutig der Gruppe der TNF-Rezeptor-Familie zugeordnet werden (Durkop, Latza et al. 1992). Bereits ein Jahr später gelang es, das Gen des dazugehörigen Liganden, CD30L, welches sich auf Chromosom 9q33 befindet, zu klonieren. Der CD30L gehört damit zur Familie der TNF-Rezeptor-Liganden wie auch TNF α , TNF β , CD40L, FasL, 4-1BBL, hat aber nur eine Sequenzhomologie von 12 - 18% mit den anderen Mitgliedern dieser Familie (Falini, Pileri et al. 1995). Das Molekül ist ein Typ II Transmembranglykoprotein mit multiplen N-gekoppelten Glykosylierungsstellen in der C-terminalen, extrazellulären Domäne, die bei den anderen TNF-Liganden nicht gefunden werden können. Diese aus 172 Aminosäuren bestehende Domäne ist jedoch homolog zu den extrazellulären

Domänen anderer TNF-Familienmitgliedern wie TNF α , TNF β , CD40L und stark konserviert, da hier die Rezeptorbindungsstelle liegt (Falini, Pileri et al. 1995). Über ein 22 Aminosäuren langes Transmembranstück ist der Ligand mit 40 Aminosäuren im Zytoplasma verankert (Horie und Watanabe 1998). Der Ligand kann über seinen Rezeptor Signale vermitteln, die in gegensätzliche Endpunkte wie Zelltod oder Proliferation münden können.

4.2. Vorkommen des CD30L und seines Rezeptors

Die Expression von CD30L wurde ursprünglich auf aktivierten T-Zellen, Monozyten und Makrophagen beschrieben (Wiley, Goodwin et al. 1996; Nicod und Isler 1997; Shimozato, Takeda et al. 1999). Später wurde dieses Molekül auch auf normalen und malignen B-Zellen sowie einigen anderen Zelltypen gefunden (Tab. 1). Ob eine lösliche oder abgespaltene Form des CD30L existiert, ist bisher nicht bekannt (Falini, Pileri et al. 1995).

Der Rezeptor CD30 wurde ursprünglich als ein Oberflächenmolekül definiert, welches auf Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen exprimiert wird (Schwab, Stein et al. 1982). Seither konnte es auf den verschiedensten Arten von Zellen und bei zahlreichen Erkrankungen nachgewiesen werden (Tab. 1). Der extrazelluläre Anteil von CD30 kann proteolytisch abgespalten werden (Hansen, Kisselva et al. 1995), wodurch eine lösliche Form des CD30 entsteht. In gesunden Individuen kommt dieses lösliche Molekül nur in geringen Konzentrationen im Serum vor, in verschiedenen Krankheiten wie unter anderem z.B. bei HIV, Morbus Hodgkin, aber auch bei atopischer Dermatitis und SLE wurden jedoch bereits erhöhte Serumkonzentrationen beschrieben, die mit der Aktivität der Erkrankung korrelierten (Pizzolo, Vinante et al. 1990; Caligaris-Cappio, Bertero et al. 1995; Frezzolini, Paradisi et al. 1997; Pizzolo, Vinante et al. 1997).

4.3. Biologische Funktionen des CD30/CD30L Systems

Das CD30/CD30L System induziert ebenso wie die restlichen Mitglieder der TNFR/TNFRL-Familie pleiotrope Effekte, die von Zelltyp, Differenzierungsstadium, Transformationsstatus und der Anwesenheit von anderen Stimuli abhängig sind. Dabei reicht das Spektrum dieser Effekte von Aktivierung, Differenzierung, Kostimulation und Proliferation bis hin zum Zelltod durch Apoptose. Die gemeinsame Funktion aller Mitglieder ist jedoch die T-Zell vermittelte, kontakt- und antigenabhängige Immunität.

Vorkommen von CD30	Vorkommen von CD30L
Expression ist streng abhängig von Aktivierung und Proliferation (Andreesen, Osterholz et al. 1984; Gerdes, Schwarting et al. 1986; Ellis, Simms et al. 1993; Gilfillan, Noel et al. 1998)	
normale und EBV transformierte B-Zellen, (Stein, Mason et al. 1985; Stein, Gerdes et al. 1987)	normale und maligne B-Zellen (Jumper, Nishioka et al. 1995; Gattei V. 1997; Trentin, Zambello et al. 1997; Cerutti, Kim et al. 2001)
aktivierte T-Zellen (CD4 ⁺ und CD8 ⁺), v.a. Th2-Subtyp (Alzona, Jäck et al. 1994; Del Prete, De Carli et al. 1995; Martinez, Villanueva et al. 1998)	aktivierte T-Zellen (Del Prete, Maggi et al. 1995; Shimozato, Takeda et al. 1999)
Kann auf Makrophagen nicht induziert werden (Stein, Gerdes et al. 1987)	Makrophagen/Monozyten, Alveolarmakrophagen in Sarkoidose (Nicod und Isler 1997)
Embryonalzelltumoren (Pallesen und Hamilton-Dutoit 1988; Pallesen 1990)	Keimzelltumoren (Pera, Bennett et al. 1997)
maligne Melanome (Polski und Janney 1999)	neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten (Wiley, Goodwin et al. 1996; von Wasielewski, Seth et al. 2000)
Hodgkin + Non-Hodgkin Lymphomzellen (Stein, Gerdes et al. 1987; Pallesen 1990)	
CD30 ⁺ großzelliges anaplastisches Lymphom (ALCL) (Stein und Dallenbach 1992)	
Aufregulation von CD30 nach Infektion mit Viren (HIV, EBV, HTLV) (Stein, Mason et al. 1985; Romagnani, Annunziato et al. 1996)	
lymphatisches Gewebe, insbesondere im Bereich der Keimzentren von LK, Milz und Thymus (Stein, Mason et al. 1985; Pallesen 1990)	Medulla des Thymus (Romagnani, Annunziato et al. 1998) Hodgkin Lymphome (Hsu und Hsu 2000; Molin, Fischer et al. 2001)

Tab. 1) Expression von CD30L und seinem Rezeptor CD30.

So kann CD30L über CD30 in Hodgkin-Zelllinien vom T-Zell Typ (HDLM-2) Proliferation auslösen (Hsu und Hsu 2000) oder bei Kostimulation mit anti-CD3 die Proliferation von aktivierten T-Zellen induzieren, er besitzt auf der anderen Seite aber auch die Fähigkeit der Induktion von Apoptose (Powell, Li et al. 1998; Romagnani, Annunziato et al. 1998). Die experimentellen Ergebnisse mit CD30-defizienten Mäusen zeigen, dass die Aktivierung von CD30 darüberhinaus für die negative Selektion von Thymozyten wichtig ist, indem es die Apoptose dieser Zellen induziert (Amakawa, Hakem et al. 1996). Mori et al. konnten zeigen, dass in sich spontan zurückbildenden Läsionen von CTCL's (cutaneous T-cell lymphomas), die Expression von CD30L auf molekularer Ebene höher ist als bei wachsenden Läsionen, auf immunhistochemischer Ebene war CD30L sogar nur in den sich zurückbildenden Läsionen nachweisbar (Mori, Manuelli et al. 1999).

Über CD30 können darüber hinaus Differenzierungssignale an Zellen vermittelt werden: CD30 wird vorzugsweise auf Th2-Zellen exprimiert. Del Prete et al. konnten zeigen, dass CD30L in Antigen-reaktiven Th2-Zellklonen die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-5 (entsprechend einem Th2-Zytokinprofil), in Th0-Klonen die von IFN γ , IL-4 und IL-5 induziert. Bei Blockade der CD30-CD30L-Interaktion verschiebt sich das registrierte Zytokinprofil in Richtung eines Th1-Zytokinprofils mit der Produktion von IFN γ und TNF β (Del Prete, De Carli et al. 1995). Auch B7-1 und B7-2 aktivieren die Differenzierung von T-Zellen. Dabei induziert B7-2 eher die Expansion von IL-4 produzierenden Th0/Th2-Zellen, B7-1 eher die von IL-2 produzierenden Th1-Zellen (Freeman, Boussiotis et al. 1995).

Auch Aktivierungssignale gehören zum Spektrum der auslösbaren Effekte durch CD30/CD30L. So können B-Zellen zur Sekretion von Immunglobulinen angeregt werden (Shanebeck, Maliszewski et al. 1995). CD30 und CD40 steigern in aus Reed-Sternberg Zellen gewonnenen Zelllinien die Zytokinproduktion. Aus Hodgkin-Zellen vermag CD30L TNF, IL-6 und LT α freizusetzen (Caproni, Bianchi et al. 1997; Grell, Zimmermann et al. 1999), aus CTL's dagegen IL-5 (Bowen, Lee et al. 1996), womit CD30L zu einem potentiellen Aktivator der CTL-Antwort wird.

In mit HIV infizierten CD4⁺ T-Zellen wird durch CD30 vermittelte Signale die HIV Replikation potenziert (Maggi, Annunziato et al. 1995). Dieser Effekt kann durch CD8⁺ T-Zellen, die CD30L auf ihrer Oberfläche tragen, sogar verstärkt werden. Damit tragen T-Zellen auf diesem Wege einerseits zur HIV Replikation, andererseits aber auch zum Zelltod der HIV infizierten CD4⁺ Zellen bei (Romagnani, Annunziato et al. 1996). CD30L vermittelt weiterhin die Steigerung der Expression von Aktivierungsantigenen und Adhäsionsmolekülen wie CD54, die in der Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen mit T-Zellen neben den Kostimuli wichtig sind.

CD30L selbst ist in der Lage, nach Crosslinking mit einem monoklonalen Antikörper in CD30L tragenden Neutrophilen die Produktion von IL-8 und einen „oxidativen burst“ zu bewirken, sowie in T-Zellen die metabolische Aktivität zu steigern, die Proliferationsrate zu erhöhen und die Produktion von IL-6 anzuregen (Wiley, Goodwin et al. 1996). Ebenso kann in B-Zellen der Antikörper-Isotypenswitch durch Aktivierung des CD30L mittels Bindung an CD30 verhindert werden (Cerutti, Schaffer et al. 2000). Er kann damit, genau wie die anderen Mitglieder der TNF Familie, Signale in zwei Richtungen vermitteln. Da aktivierte T-Zellen sowohl CD30 als auch CD30L exprimieren können, ist damit eine auto- und parakrine Stimulation der Zellen möglich.

CD30 ist ein Oberflächenprotein, welches im normalen menschlichen Gewebe nur selten vorkommt und über welches durch Interaktion mit seinem Liganden CD30L das Immunsystem aktiviert werden kann. Daher wird dieses Rezeptor/Liganden-Paar ein potentieller Angriffspunkt für Immuntherapien (Stein, Gerdes et al. 1987; Falini, Pileri et al. 1995).

5. Das maligne Melanom als Modell für immuntherapeutische Ansätze

Die Inzidenz des malignen Melanoms steigt derzeit weltweit um etwa 5% pro Jahr (Koh 1991). 1998 wurden 41.600 Neuerkrankungen und 7.300 Todesfälle verzeichnet (Mcgee, Price et al. 1999). War es früher einmal eine seltene Krankheit, so ist es heute einer der Tumoren, bei welchem die Inzidenz weltweit am schnellsten zunimmt (Haluska und Hodi 1998). In Europa liegt sie derzeit bei 10-12/100.000 Einwohnern, wobei sich die Anzahl der Patienten mit Melanom in den letzten 10-15 Jahren verdoppelt hat (Weiss, Herbst et al. 2000). Trotz steigender Inzidenz gibt es bisher keine befriedigenden therapeutischen Ansätze für fortgeschrittene Krankheitsstadien. Derzeit sind die einzig kurativen Optionen bei der Behandlung von Melanomen die frühzeitige Diagnose sowie die chirurgische Resektion (Mcgee, Price et al. 1999). Chemotherapie und Bestrahlung zeigten nur in Einzelfällen langanhaltende Remissionen und auch die vom FDA genehmigte hochdosierte Interferontherapie hat aufgrund der hohen Toxizität ihre Limitierungen (Kirkwood, Strawderman et al. 1996). Neuere klinische Studien mit niedrig dosierter IFN α -Therapie für Patienten mit Melanom im Stadium II nach chirurgischer Resektion, zeigten allerdings eine bessere Verträglichkeit und auch deutlich verlängerte 5-Jahres-Überlebensraten (Grob, Dreno et al. 1998; Pehamberger, Soyer et al. 1998). Andere Therapieversuche mit IL-2-aktivierten, tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL's) oder bispezifischen Antikörpern mit Bindungsstellen für die Effektorzellen, mit Radionukliden oder Zytostatika, konnten bisher keinen Durchbruch erzielen (Keilholz, Scheibenbogen et al. 1995). Die Therapie fortgeschrittener Stadien ist daher in den meisten Fällen nur palliativ (Garbe 1995). Beim metastasierten Melanom sind nur in etwa 20%-40% der Fälle mit einer systemischen Standard-Chemotherapie

Tumorrückbildungen zu verzeichnen (Legha, Ring et al. 1989), ohne dass eine entscheidende Lebensverlängerung erreicht wird. Diese Kombination aus hoher Prävalenz und starker therapeutischer Resistenz hat zu großem Interesse an der Entwicklung von Vakzinierungsstrategien gegen das maligne Melanom geführt.

6. Tumorstabilisierung beim malignen Melanom

Warum eignet sich das maligne Melanom für Vakzinierungstherapien? 1. Das Melanom ist der am meisten immunogene, bisher bekannte Tumor, 2. Die Antigene auf Melanomzellen unterscheiden sich von den Antigenen auf normalen adulten Melanozyten und viele von ihnen sind bereits gut charakterisiert (Tab. 2), 3. Diese Unterschiede können von Immunzellen erkannt werden, 4. Melanomzellen können durch diese Immunantworten *in vitro* zerstört werden (Bystryn 1998), 5. Immunantworten können durch kostimulatorische Moleküle verstärkt werden (Townsend und Allison 1993). Darüberhinaus können in bis zu 3-15% der Melanompatienten mit Metastasen keine Primärläsionen gefunden werden (Chang, Hynds Karnell et al. 1998), was darauf hinweist, dass sich Primärläsionen spontan zurückbilden können. Weiterhin gibt es histologische Anhaltspunkte für die spontane Zerstörung von Melanomzellen bei Erhalt der umgebenden normalen Melanozyten (Avril, Charpentier et al. 1992; Blessing und McLaren 1992; Bystryn 1998; Papac 1998). Die spontane Rückbildungsrate von Metastasen liegt bei ca. 3% (Bystryn 1995). Es wird angenommen, dass diese Schutzmechanismen immunologischen Ursprungs sind. So konnten aus dem Blut von Melanompatienten einerseits Anti-Melanom-Antikörper (Morton, Eilber et al. 1970), andererseits CTL's isoliert werden, die in der Lage waren, Tumorzellen *in vitro* zu zerstören (Topalian, Solomon et al. 1989). Durch Vakzinierungen könnte daher diese schützende Immunantwort potenziert werden. Die Charakterisierung von melanomassoziierten Antigenen wie z.B. MAGE-1, MAGE-3 oder Melan A/MART-1 (Tab. 2), aus deren Peptiden reine Antigen-Vakzine hergestellt werden können, stellt nur einen von verschiedenen Ansätzen zur Entwicklung von Vakzinen dar (Kawakami, Eliyahu et al. 1994; Marchand, Weynants et al. 1995).

Beim malignen Melanom gibt es bereits eine Vielzahl präklinischer Untersuchungen zur Tumorstabilisierung (Pardoll 1993; Bystryn 1998). Einige klinische Studien beschäftigen sich bereits erfolgreich unter anderem mit Vakzinen auf Peptidbasis, dendritischen Zellen oder Zytokintherapien (Rosenberg, Yang et al. 1994; Marchand, Weynants et al. 1995; Jaeger, Bernhard et al. 1996; Nestle, Alijagic et al. 1998). In einigen Melanomvakzinen wurden Melanome mit dem IL-2 Gen transfiziert, wobei in einem Teil der Studien eine effektive, systemische Immunantwort induziert werden konnte (Maass, Schmidt et al. 1995; Zatloukal, Schneeberger et al. 1995).

MAGE-1	HLA-A1 HLA-A24 HLA-Cw16	pMel-34/Tyrosinase	HLA-A2 HLA-A24 HLA-B44 HLA-A1 HLA-DR4
MAGE-2	HLA-A2		
MAGE-3	HLA-A1 HLA-A2 HLA-A24 HLA-B44 HLA-DR13	TRP-1/gp75	HLA-A31
		TRP-2	HLA-A31,A33 HLA-A2
BAGE	HLA-Cw16	pMel-17/gp100	HLA-A2 HLA-A24 HLA-A3 HLA-DR1,3,4
GAGE	HLA-Cw6		
PRAME	HLA-A24	Melan-A/MART-1	HLA-A2 HLA-B45.1
NY-ESO-1/CAG-3/LAGE	HLA-A2 HLA-A31	N-Acetyl-Gn-Transferase V	HLA-A2

Tab. 2) Melanom-assoziierte Antigene, die von zytotoxischen T Zellen (CTL 's) erkannt werden (Sun, Paschen et al. 1999).

Daneben wurde auch ein Vakzinierungseffekt mit B7-1 und B7-2 beim malignen Melanom gefunden (Townsend und Allison 1993; Yang, Darrow et al. 1997). Eine am National Cancer Institute durchgeführte Studie mit B7-transduzierten allogenen Melanom-Zelllinien erzielte in Abhängigkeit vom HLA-Typ der Induktor-Zelllinie eine streng HLA-assoziierte Lyse von Melanomzellen von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden (Fenton, Sznol et al. 1995). Neben der Bedeutung der B7-Moleküle für die direkte Tumorzellabstoßung wurde in anderen Untersuchungen auch herausgearbeitet, dass in intrinsisch nicht-immunogenen Tumoren eine alleinige B7-Transduktion nicht zu einer systemischen Tumorimmunität führt, sondern zusätzliche Signale nötig sind (Wu, Huang et al. 1995). Die Mitglieder der TNFR-Familie sind dafür aufgrund ihres Einflusses auf eine Vielfalt immunologischer Prozesse, davon nicht zuletzt die Aktivierung von T-Zellen, geeignete Kandidaten. Für einige Mitglieder der TNF-Familie konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch Ihre Expression auf Tumorzellen zu einer Verbesserung der Antitumorimmunität führen können (Couderc, Zitvogel et al. 1998).

7. Zielsetzung der Arbeit

Trotz steigender Inzidenz des malignen Melanoms gibt es keine befriedigenden therapeutischen Ansätze für fortgeschrittene Krankheitsstadien. In ersten präklinischen Vakzinierungsstudien wurde gezeigt, dass durch Transduktion kostimulatorischer Moleküle (B7-1, B7-2) in Melanomzellen eine direkte Tumorabstoßung induziert werden konnte. Für einige Mitglieder der TNF-Familie konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch Ihre Expression auf Tumorzellen zu einer Verbesserung der Antitumorimmunität führen können (Couderc, Zitvogel et al. 1998). Bei der Aktivierung von tumorspezifischen, zytotoxischen T-Zellen könnte verschiedenen Molekülen aus der TNF-Liganden-Familie neben dem bekannten, kostimulatorischen Molekül B7-1 eine besondere Rolle zukommen.

In dieser Arbeit sollten die Effekte des in Melanomzellen transfizierten TNF-Liganden CD30L im Vergleich zu B7-1 bei der Aktivierung von T-Zellen untersucht werden. Dazu mussten T-Zellen und transfizierte M3HK-Zellen zunächst bezüglich ihrer Expression von CD30-Rezeptor sowie verschiedenster, weiterer Oberflächenmoleküle charakterisiert werden.

Jedes dieser beiden Moleküle, CD30L und B7-1, sollte sowohl alleine als auch in Kombination stabil von Melanomzellen der Linie M3HK zur Expression gebracht werden und anschließend unter verschiedenen Stimulationsbedingungen auf die Fähigkeit hin untersucht werden, T-Zellen als primärer Stimulus zu aktivieren und CD30 sowie die Aktivierungsmarker CD25 und CD71 auf T-Zellen aufzuregulieren, diese zur Proliferation anzuregen und damit eine tumorspezifische, zytotoxische T-Zellantwort zu ermöglichen.

Sowohl für CD30L als auch für B7-1 wurde bereits gezeigt, dass sie präaktivierte T-Zellen kostimulieren. Im folgenden Schritt sollte daher die Fähigkeit der transfizierten Moleküle CD30L und B7-1 daraufhin untersucht werden, inwieweit sie ein sekundäres, die Aktivierung und Proliferation steigerndes Signal für T-Zellen vermitteln können, um möglicherweise ein zweites, späteres, kostimulatorisches Signal zu setzen, welches eine länger anhaltende Immunantwort gegen Tumorzellen ermöglicht.

II. Material

1. Antikörper

1.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

FITC konjugierte Antikörper gegen CD3, 45 (IgG1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
PE konjugierte Antikörper gegen CD3, 4, 8, 14, 16, 19, 54, 56, 71, 80, 95 (IgG1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
FITC oder PE konjugierte Maus- α -Human IgG1 Antikörper (Isotypkontrollen)	Immunotech, Marseille, Frankreich
FITC konjugierter Maus- α -Human CD25, 58 (IgG2 _a) Antikörper	Immunotech, Marseille, Frankreich
FITC konjugierter Maus- α -Human IgG2 _a Antikörper (Isotypkontrolle)	Immunotech, Marseille, Frankreich
Maus- α -Human IgG2 _b Antikörper	Immunotech, Marseille, Frankreich
FITC konjugierter Maus- α -Human HLA-I, CD134 (=Ox40R) Antikörper (IgG1)	Pharmingen, San Diego, USA
FITC konjugierter Maus- α -Human IgG1 Antikörper (Isotypkontrolle)	Pharmingen, San Diego, USA
FITC konjugierter Maus- α -Human HLA-II Antikörper (IgG2 _a)	Pharmingen, San Diego, USA
FITC konjugierter Maus- α -Human IgG2 _a Antikörper (Isotypkontrolle)	Pharmingen, San Diego, USA
FITC konjugierter Ziege- α -Maus IgG2 _b Antikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland

1.2. Antikörper für die Zellseparation (MACS)

Maus- α -Human CD30L Antikörper (IgG2 _b)	Genzyme, Cambridge, USA
Maus- α -Human CD80 Antikörper (IgM)	Pharmingen, San Diego, USA
IgM Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
IgG2 _{a,b} Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Pan T-Zell Isolierungs-Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
1. Hapten-Antikörper-Cocktail (Maus- α -Human CD11b, CD16, CD19, CD36, CD56 Antikörper)	
2. Anti-Hapten Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

2. Chemikalien

Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
Ammoniumacetat	Sigma, St. Louis, USA
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Bacto-Agar	Fisher Biotech, Fair Lawn, USA
Borsäure	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, USA
Concanavalin A	Sigma, St. Louis, USA
DMEM	Boehringer Bioproducts, Heidelberg, Deutschland
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
EDTA	Sigma, St. Louis, USA
Ethanol	QUANTUM, Tuscola, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
FCS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ficoll	Immuno GmbH, Heidelberg, Deutschland
Flüssigstickstoff	Linde, München, Deutschland
G418	GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
Gene amp 10x Puffer	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Glucose	Sigma, St. Louis, USA
HCl	Sigma, St. Louis, USA
Hefeextrakt	Sigma, St. Louis, USA
Hygromycin	Sigma, St. Louis, USA
IFN γ	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
IL-2	National Cancer Institute, Frederick, USA
IMDM	Boehringer Bioproducts, Heidelberg, Deutschland
Isoamylalkohol	Mallinckrodt AR, Paris, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Sigma, St. Louis, USA
Lipofectamine™	GibcoBRL, Gaithersburg, USA
L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland

β-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Sigma, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	Sigma, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Sigma, St. Louis, USA
PBS	GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
Penicillin-Streptomycin 100x	GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
Phenol	Clontech, Palo Alto, USA
PHA	DIFCO, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
REact 3 (Restriktionsenzym puffer 10x)	GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
SDS	Sigma, St. Louis, USA
Tris	Fisher Biotech, Fair Lawn, USA
Trizma [®] Hydrochlorid	Sigma, St. Louis, USA
Trizma Base	Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypton	Sigma, St. Louis, USA

Radioaktive Substanzen

[6- ³ H] Thymidin	Amersham International, Buckinghamshire, England
------------------------------	---

3. Enzyme

3.1. Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme (EcoRI, HindIII, PvuII, XbaI, BssHIII, NaeI) wurden von GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland, bezogen.

3.2. Sonstige Enzyme

RNase A	Sigma, St. Louis, USA
---------	-----------------------

4. Geräte

I. Zentrifugen

Zentrifuge 4K-1	Sigma-Zentrifugen, Osterode, Deutschland
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

II. Sonstige

Autoklav	Hirayama, Tokyo, Japan
Brutschrank 37°C	Labotech, Göttingen, Deutschland
Zellharvester	Wallac, Turku, Finnland
Durchflusszytometer (Epics XL-MCL)	Coulter Electronics Inc., USA
Einfriergerät	Cryoson, Schöllkrippen, Deutschland
Flüssigstickstofftank	Cryoson, Schöllkrippen, Deutschland
Microsealer Wallac 1495-021	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
Microbeta plus (Szintillationszähler)	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg Deutschland
Phasenkontrastmikroskop-2	Nikon, Tokyo, Japan
pH-Meter pH 530	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer (OD)	Pharmacia LKB, UltrospecIII, Schweden
Schüttler	Bühler, Tübingen, Deutschland
Schüttelinkubator (Orbital shaker)	Precision Scientific, VA, USA
Sterilbank	HA 2448 GS, Heraeus, Osterode, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vario MACS Gerät	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Waage	Bosch, Jungingen, Deutschland
Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
IKA Schüttler Typ MTS 2	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

5. Blut und Zellen

Die buffy coats stammten vom Blutspendedienst des BRK München, Deutschland

Die menschliche Melanom-Zelllinie M3HK wurde von der Firma Medigene, München, Deutschland, bezogen.

6. Plasmide

pcEXV-3 mit B7-1 Insert	M.K. Jenkins, University of Minnesota, USA
Rc/CMV	Invitrogen, San Diego, USA
pMAM	Clonetech, Heidelberg, Deutschland
CD30L cDNA	H.-J. Gruss, Immurex, Seattle, USA

7. Kits

Quiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit

Quiagen Inc., Chatsworth, USA

8. Kompetente Bakterien

Epicurian Coli[®] XL1-Blue Supercompetent Cells

Stratagene, Heidelberg, Deutschland

9. Lösungen, Puffer und Gele

Agarosegel 0.7% (2%)

0.7 g (2 g) Agarose
100 ml TBE

Ammoniumacetat 4M

77.1 g Ammoniumacetat
150 ml ddH₂O
mit ddH₂O auf 250 ml auffüllen
sterilfiltrieren

Ampicillinlösung (50 mg/ml)

0.5 g Ampicillin
10 ml H₂O

Aufschlusslösung 1

2.5 ml 2M Glucose
2.5 ml 1M Tris pH 8
2 ml 0.5M EDTA
Auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen und
sterilfiltrieren

Aufschlusslösung 2

0.8 g NaOH
5 ml SDS
auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen

EDTA 0.5M

93 g Na₂EDTA·2H₂O
10 g NaOH
350 ml ddH₂O
pH auf 8.0 mit 10N NaOH einstellen
mit ddH₂O auf 500 ml auffüllen

Gefriermedium

RPMI
10% DMSO
60% FCS
sterilfiltrieren

Kulturmedien

a) für Lymphozyten aus PBL's
(Iscove's Kompletmedium)

IMDM
10% FCS
100 U/ml Pen-Strep
Glutamin

b) für M3HK Melanomzellen

DMEM 4,5% Glucose + Glutamin
10% FCS
100 U/ml Pen-Strep

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
auf 1 l mit ddH₂O auffüllen
pH auf 7.5 einstellen

LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml)

500 ml LB-flüssig-Agar
500 µl Ampicillinlösung (50 mg/ml)

LB-Ampicillin-Agarplatten

1 l LB-flüssig-Agar
15 g Bacto-Agar
autoklavieren
wenn auf 50°C abgekühlt, 1ml
Ampicillinlösung (50 mg/ml) zugeben
und in Petrischalen gießen.

Lösung 3

29.44 g Kaliumacetat
mit ddH₂O auf 60 ml auffüllen

<u>Paraformaldehyd 1%</u>	90 ml ddH ₂ O 1 g Paraformaldehyd pH mit 1M NaOH auf 12 einstellen, rühren, bis sich Paraformaldehyd löst dann pH mit 1N HCl auf 7.4 einstellen sterilfiltrieren
<u>PBS/FCS</u>	98 ml PBS 2 ml FCS
<u>RNase A stock (2 mg/ml)</u>	10 mg RNase A 1M Tris 5M NaCl mischen, 15 min. in kochendes Wasser- bad geben, langsam auf Raumtempera- tur abkühlen lassen in Aliquoten bei -70°C aufbewahren
<u>SOC-Medium</u>	98 ml LB-flüssig-Agar 1 ml 2M Magnesiumlösung 1 ml 2M Glucoselösung sterilfiltrieren
<u>Stop-Puffer 6x</u>	0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylen-Cyanol 30% Glycerin in H ₂ O in TE
<u>TAE-Puffer</u>	0.04M Tris-Acetat 0.002M EDTA
<u>TBE 5x</u>	54 g Tris 27.5 g Borsäure 0.5M EDTA
<u>TE 10x</u>	50 ml 1M Tris, pH 7,5 10 ml 0.5M EDTA 440 ml ddH ₂ O

<u>TE</u> 1x	50 ml TE 10x 450 ml ddH ₂ O
<u>Tris</u> 1M	19.7 g Trizma Base 53.2 g Trizma HCl 350 ml ddH ₂ O pH auf 7.5 einstellen mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen sterilfiltrieren

Alle Sterilfiltrationen erfolgten mit einem 0.22 μ m Cellulose-Acetat-Filter der Firma Corning.

10. Sonstige Verbrauchsmaterialien

96 well Zellkultur - Mikrotiterplatten runder Boden	Corning, Corning, USA
6 well Zellkultur - Platten	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
24 well Zellkultur - Platten	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einfrierröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalpipetten, 5, 10, 25 ml	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Glasfaserfilter: Printer Filtermat A	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
Multi Lex - Melt on Scintillator Sheets	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
MACS Säulen RS ⁺ für die Separation von Melanomzellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Säulen VS ⁺ für die Separation von T-Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pipetten	Beckton Dickinson, Heidelberg und Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht und Bio-Rad, München, Deutschland
Reagenzien-Reservoirs 75 ml	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

5 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10 ml Röhrchen, steril	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
50 ml Röhrchen, steril	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sample Bag	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
Sterilfilter	Gelman Sciences, Ann Arbor, USA und Nalge, Hereford, England
Zellkulturflaschen 25, 75, 175 ml	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

III. Methoden

1. Herstellung der Plasmide

Aus dem Plasmid pcEXC-3 (Miller und Germain 1986) wurde das Insert B7-1 mit EcoRI herausgeschnitten und mit geglätteten ("blunt") Enden in den Zwischenvektor Rc/CMV, der an der HindIII Polylinkerstelle geöffnet worden war, einkloniert. Ein 4,2 kb großes Insert, welches die B7-1 cDNA mit CMV-Promotor und Neomycin-Kassette unter Kontrolle eines SV40 Promotors enthielt und mittels AccI-Restriktionsverdau herausgelöst war, wurde in den AAV-Vektor psub201 (Samulski, Chang et al. 1989) durch "blunt end"-Ligation (XbaI geöffnet) einkloniert (pAAV/B7-1). pAAV/Neo entstand ebenfalls durch "blunt end"-Ligation des BamHI Fragments von pMAM Neo in psub201. pAAV/CD30L (Neo) entstand durch CIP-Behandlung und anschließender Subklonierung der CD30L cDNA in Rc/CMV an der Schnittstelle von NotI. Das Insert wurde anschließend mit SalI herausgeschnitten und unter Verwendung der Klenow Polymerase durch „blunt end“-Ligation an der XbaI Schnittstelle in psub201 einkloniert. Das Kontrollplasmid pAAVRnLacZ, welches für das β -Galactosidase-Gen kodiert, wurde von Chiorini et al. 1995 bereits detailliert beschrieben (Chiorini, Wendtner et al. 1995).

2. Präparation der DNA

2.1. Transformation der Bakterien

Unter einer Bakterientransformation versteht man die Einbringung eines Plasmids in ein Bakterium mit dem Ziel, dass sich das Plasmid unter Ausnutzung des normalen Bakterienzyklus und -stoffwechsels vervielfältigt. Superkompetente Bakterien wurden mit je 100 ng der Plasmide mit den cDNAs für CD30L, B7-1 (Wendtner, Nolte et al. 1997) sowie den Leervektoren mit nur den entsprechenden Antibiotika transformiert und dazu entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Epicurian Coli[®] Competent and Supercompetent Cells) verfahren. Anschließend wurden die Bakterien auf Ampicillin enthaltenden Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2. DNA-Isolierung (Minipräp)

Eine der gewachsenen weißen Kolonien wurden von der Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen, auf eine neue Agarplatte gestrichen und der Zahnstocher dann in Röhrcchen mit 3 ml LB-Medium mit Ampicillin gesteckt und Ü/N bei 37°C geschüttelt. Die Agarplatte wurde Ü/N bei 37°C inkubiert und anschließend im Kühlraum aufbewahrt.

1.5 ml der Ü/N-Kulturen wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei maximaler Umdrehungszahl 2 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen, das Bakterienpellet in 100 μ l Aufschlusslösung 1 resuspendiert und bis zur Lösung des Pellets geschüttelt (Vortex). Nach Zugabe von 100 μ l Aufschlusslösung 2 wurde wiederum 1-3 min. geschüttelt, die Aufschlussreaktion durch Zugabe von 100 μ l Lösung 3 und Invertieren der Reaktionsgefäße gestoppt und 10 min. bei 4°C mit maximaler Drehzahl in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und dadurch von den ausgefallenen Proteinen getrennt. Durch Zugabe von 300 μ l 4M Ammoniumacetat und 600 μ l Isopropanol wurde die DNA 5 min. bei RT gefällt, anschließend bei -70°C für 5 min. inkubiert und 5 min. bei RT mit maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 100 μ l 70%igem, kaltem Ethanol gewaschen und wiederum für 5 min. zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 50 μ l TE Puffer resuspendiert.

2.3. Quantitative DNA-Messung

Die Bestimmung der Menge an isolierter DNA erfolgte mittels Messung der spezifischen optischen Dichte mit einem Spektrometer. Damit können die Absorptionswerte einer Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen und als deren Verhältnis dargestellt werden. Eine der Wellenlängen misst dabei die spezifische Absorption der Testsubstanz, die andere diejenige der Verunreinigungen. DNA absorbiert Wellenlängen von 260 nm, wogegen Proteine, die nach der Isolierung der Nukleinsäuren diese verunreinigen können, ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen. Das Gerät misst die Menge an Licht, die bei einer bestimmten Wellenlänge durch die Probe tritt relativ zu der Menge an Licht, die durch eine Referenzprobe tritt und gibt das Ergebnis als Absorptionseinheiten nach Berechnung mit dem Lambert Beer'schen Gesetz ($A = \log 100/T$; A = Absorption, T = Transmission, log = Logarithmus) an. Als Referenz wird reines Medium ohne die zu messende Testsubstanz verwendet. 4 μ l der in TE befindlichen DNA wurden zu 396 μ l dddH₂O gegeben, gemischt und im Vergleich zu reinem dddH₂O als Referenzprobe bei 260nm gegen 280 nm gemessen.

2.4. DNA-Präparation (Maxipräp)

Von der Agarplatte des plasmidhaltenden Klons (siehe Abschnitt 2.2.) wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml LB Medium mit Ampicillin überführt und 8 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die sogenannte Maxi-Präparation wurde sodann genau nach den Anweisungen des Herstellers mit dem Quiagen EndoFree Plasmid Kit durchgeführt und

abschließend wiederum die resultierenden DNA Mengen wie unter 2.3. beschrieben bestimmt.

3. Verifizierung des Inserts nach Amplifizierung der DNA

Nach Amplifizierung der Plasmide mit den Genen für CD30L, B7-1, Hygromycinresistenz und Neomycinresistenz wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt um die einzelnen Inserts in den Plasmiden zu überprüfen.

3.1. DNA-Fragmentierung mittels Restriktionsenzymen

Jeweils 1 μg DNA wurden daraufhin zur Überprüfung der Inserts mit verschiedenen Enzymen verdaut:

Plasmid	Enzym
pAAV neo c	PvuII
pAAV lacZ	EcoRI
pAAV/B7-1	BssHIII
pAAV/CD30L	NaeI

Tab. 3) Verwendete Restriktionsenzyme für den Verdau der einzelnen Plasmide.

Bei einem Gesamtvolumen von 10 μl wurden in das Reaktionsgefäß jeweils das entsprechende Volumen H_2O , 1 μl 10x Puffer, 1 μg der entsprechenden DNA, sowie zum Schluss 1 μl des jeweiligen Enzyms gegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die DNA anschließend 1 h bei 37°C, bzw. im Falle des BssHIII-Enzyms bei 50°C, verdaut, dann die Reaktion mit 2 μl 5x Stop-Puffer mit RNase gestoppt, und die DNA in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Während des Verdau wurde ein 2%iges Agarosegel gegossen. Dazu wurden 200 ml Agaroselösung in der Mikrowelle gekocht, bis alle Agarosekörnchen gelöst waren, die Lösung auf ca. 65°C abgekühlt, 13 μl Ethidiumbromid zugegeben, das Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen und zum Schluss ein Kamm für die Taschenbildung eingesetzt. Nach Verfestigung des Gels wurde die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt und jeweils 10 μl der Proben in die einzelnen Taschen aufgetragen. Zusätzlich wurden zur Messung der DNA-Fragmentlängen 5 μl HindIII Marker aufgetragen. Die auf das Gel aufgetragene DNA wurde bei einer Stromstärke von 40 mA über Nacht aufgetrennt.

4. Zellkulturexperimente

4.1. Allgemeine Methoden

4.1.1. Zellzählung

Die Zelldichten wurden in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Sie besteht aus neun großen Quadraten mit einem Volumen von je $0.1 \mu\text{l}$, von welchen 8 nochmals in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind, sowie das mittlere aus 25 kleinen Quadraten besteht. Um zu vermeiden, dass auch tote Zellen mitgezählt werden, wurde die Zellzählung in Gegenwart von Trypanblau durchgeführt. Dieser Farbstoff dringt in tote Zellen schnell ein und lässt sie unter dem Mikroskop schwach- bis tiefblau erscheinen, wogegen lebende Zellen den Farbstoff nur langsam aufnehmen und sich erst nach mehreren Minuten anfärben.

Zur Zählung wurde das Deckglas angehaucht und auf die Zählkammer geschoben. $90 \mu\text{l}$ 0.4%ige Trypanblaulösung wurden mit $10 \mu\text{l}$ Zellsuspension gemischt und unmittelbar darauf $20 \mu\text{l}$ dieser Mischung an die Kante des Deckglases pipettiert, so dass die Suspension durch Kapillarkräfte unter das Deckglas gezogen werden konnte. Unter dem Mikroskop wurden 4 große Quadrate ausgezählt und der daraus errechnete Mittelwert mit 100000 (Verdünnungsfaktor = 10, Volumen = $0.1 \mu\text{l} \times 10000$) multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Die Vitalität wurde aus dem Verhältnis der toten oder lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl errechnet.

4.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Von Zeit zu Zeit wurden verschiedene Zellpassagen eingefroren, um im Falle einer Kontamination oder bei Veränderung der Eigenschaften der Zellen in Kultur einen Vorrat zu haben. $2-5 \times 10^7$ Zellen/ml DMEM (4°C) wurden unter der Sterilbank in der entsprechenden Menge Gefriermedium (4°C) resuspendiert und zügig je 1.5 ml in Gefrierröhrchen, die auf Eis gelagert waren, pipettiert. Um die Kontaktzeit der noch ungefrorenen Zellen mit DMSO zu verkürzen, war die computergesteuerte Einfriermaschine zuvor schon eingeschaltet und vorgekühlt worden. Die Einfriermaschine wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt und lief in einem gesonderten Lymphozyten-Einfrierprogramm (Tab. 4).

Nach Ablauf des Programms wurden die Röhrchen mit den Zellen entnommen und für die langfristige Aufbewahrung sofort in flüssigem Stickstoff gelagert. In einem Computerarchiv wurden Zellart, Datum und der genaue Lagerort festgehalten.

SEGMENT	ENDTEMP. [°C]	LAUFZEIT [min]	RATE [°C/min]
1	0	10	-2
2	0	10	0
3	-9.5	7	-1.3
4	-28	0.2	-92.5
5	-25	0.8	3.7
6	-25	2.5	0
7	-15	1	10
8	-30	10.7	-1.4
9	-100	10	-7

Tab. 4) Schema des Einfrierprogramms für Lymphozyten.

Auch beim Auftauen der Zellen musste schnell gearbeitet werden, um die toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen auf ein Minimum zu beschränken. Die Röhren wurden nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff so lange bei 37°C inkubiert, bis der letzte Eiskristall geschmolzen war und die Zellen dann sofort in einem 15 ml Falcon Röhren mit 10 ml DMEM+10% FCS verdünnt. Sie wurden anschließend 10 min. bei 1500 rpm, 4°C pelletiert und nach Absaugen des Überstandes 2x mit 13 ml DMEM+10% FCS gewaschen und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Zuletzt erfolgte die Bestimmung der Viabilität und der Anzahl der Zellen.

4.1.3. Ablösung der adhärierenden M3HK-Zellen zur Weiterverarbeitung

Da Melanomzellen die Eigenschaft haben, an Plastik zu adhärieren, müssen sie, bevor sie für Experimente eingesetzt oder auch expandiert werden können, vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden. Das Medium wurde dazu mit einer 10 ml Pipette abgesaugt und verworfen. Die noch adhärierenden Zellen wurden dann mit 20°C warmem PBS gespült, um FCS Reste zu entfernen, die den nächsten Schritt behindern können. 2 ml Trypsin wurden auf die Zellen pipettiert und die verschlossene Flasche für 3-5 min. wieder hingelegt. Durch beklopfen der Flasche mit der Hand lösen sich die Zellen vom Boden. Damit das Trypsin nicht die Zellen selbst angreift, musste die gleiche Menge an Medium dazugegeben, die Zellen in sterile 15 ml Röhren überführt und zweimal jeweils 5 min. mit PBS gewaschen werden. Anschließend wurden die Zellen entweder auf neue Zellkulturflaschen verteilt oder in Versuchen eingesetzt und entsprechend weiterverarbeitet.

4.1.4. Fixierung der M3HK-Zellen mit Paraformaldehyd

Paraformaldehyd quervernetzt Proteine auf der Zelloberfläche und fixiert sie, sodass die Zelle nicht mehr lebens- und arbeitsfähig ist. Da die Oberflächenmarker in ihrer Struktur erhalten bleiben, können sie trotzdem spezifisch an die entsprechenden Liganden auf den T-Zellen binden und die T-Zelle auf diese Weise aktivieren. Vor Zugabe von Paraformaldehyd wurden die Melanomzellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend in 3 ml 1%igem Paraformaldehyd resuspendiert. Die Inkubation in Paraformaldehyd erfolgte für 5 Minuten bei RT. Dann wurden die fixierten Melanomzellen 3x mit PBS gewaschen, in PBS/FCS resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

4.2. Vorbereitung der Melanomzellen

4.2.1. Transfektion der Melanomzellen

Melanomzellen (M3HK) wurden mittels Lipofektion mit Plasmiden, die die DNA für die kostimulatorischen Moleküle B7-1 und CD30L oder die Leervektoren mit den Selektionsmarkern Neomycin und Hygromycin enthielten, transfiziert. Dazu wurden M3HK-Zellen in 75 ml Gewebekulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 50 - 80% bei 37°C, 5%CO₂ herangezüchtet. 500 µl serumfreies DMEM Medium wurden mit 150 µl Lipofectamin und weitere 500 µl DMEM Medium mit 20 µg der entsprechenden DNA vermischt. Die beiden Mischungen wurden anschließend zusammengegeben und 30 min. bei RT inkubiert. Dabei formen die im Lipofectamin enthaltenen Liposomen Komplexe mit der DNA, wodurch anschließend die Aufnahme der DNA in die Zellen erleichtert wird. Die ausgesäten Melanomzellen wurden in der Zwischenzeit einmal mit serumfreiem Medium gewaschen. 9 ml reines DMEM wurden dann zu der Liposomen/DNA Mischung pipettiert, diese nun insgesamt 10 ml auf die gewaschenen M3HK-Zellen gegeben und im Anschluss daran 5 Stunden bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium durch 20 ml frisches, Serum enthaltendes, aber antibiotikafreies Medium ersetzt und dieses nach weiteren 24 Stunden gewechselt. 48 Stunden nach der Lipofektion wurde die Expression der Moleküle zum ersten Mal mittels FACS gemessen und gleich im Anschluss daran die positiven Zellen mittels MACS selektiert. Die Zellen wurden daraufhin für 3 weitere Tage in antibiotikafreiem Medium gezüchtet. Die Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30L_{hygro} wurde durch sukzessive Transfektion erzeugt. Nach stabiler Expression von B7-1 auf den Zellen wurden diese zusätzlich mit dem CD30L_{hygro} Plasmid transfiziert und durch wiederholtes MACSen diejenigen Zellen selektiert, die beide Moleküle stabil auf der Oberfläche exprimierten.

4.2.2. Selektion der transfizierten Melanomzellen

Erst am 5. Tag nach der Lipofektion, bzw. dem 3. Tag nach der ersten MACS-Selektion, wurde das Medium durch komplettes, antibiotikaenthaltendes Medium (im Falle von M3HK/CD30L*hygro* 250 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin, bei M3HK/B7-1*neo* und M3HK/CD30L*neo* 500 $\mu\text{g/ml}$ Neomycin und bei der Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30L 500 $\mu\text{g/ml}$ Neomycin zusammen mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin) ersetzt. Die mit den Leervektoren neo und hygro transfizierten M3HK-Zellen wurden bereits 3 Tage nach Lipofektion mit der entsprechenden Menge Selektionsantibiotikum versetzt. Die Konzentration von Neomycin wurde nach 2 Wochen auf 700 $\mu\text{g/ml}$ Medium erhöht.

4.2.3. Positive Selektion der B7-1 und CD30L exprimierenden Zellen mittels MACS

Die erste Anreicherung der Melanomzellen, die B7-1 bzw. CD30L exprimierten, erfolgte gleich im Anschluss an die FACS-Analyse 48 Stunden nach Lipofektion gemäß dem Prinzip der positiven Selektion mittels magnetischer Zellseparation (MACS). Hierbei markiert man die exprimierten Moleküle mit magnetischen Kugeln, die an spezifische Antikörper gegen CD30L und B7-1 gehängt werden und trennt sie danach mittels eines Magneten von der restlichen Population ab. Weitere Anreicherungen wurden bis zu einer stabilen Expression von 99% ca. alle 10-14 Tage durchgeführt. Die Doppeltransfektante wurde dabei abwechselnd auf die Moleküle CD30L und B7-1 selektiert. Alle Waschschritte erfolgten bei 4°C und 1500 rpm. Bis zu 10^7 M3HK-Zellen wurden 10 min. lang mit PBS/FCS in einem 15 ml Falcon Röhrchen gewaschen und in 500 μl , 4°C kaltem PBS/FCS resuspendiert. Pro 10^7 Zellen wurden 20 μl spezifischer Antikörper (α -B7-1 bzw. α -CD30L) zu den Zellen gegeben und 20 min. bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die nun mit primärem Antikörper markierten Zellen dreimal je 10 min. mit 10 ml PBS/FCS gewaschen und wiederum in 500 μl PBS/FCS (4°C) resuspendiert. Dazu wurden pro 10^7 Zellen 20 μl , dem Isotyp des primären Antikörpers angepasster, ferrochromhaltiger Antikörper pipettiert (Abb. 2(1)), diese Mischung wiederum auf dem Schüttler für 20 min. bei 4°C inkubiert und dreimal gewaschen. Während des Waschens wurde eine RS+ Säule in den Magneten gehängt und mit 2 ml 4°C kaltem PBS/FCS gespült. Die in 500 μl PBS/FCS resuspendierten Zellen wurden sodann auf die Säule pipettiert und liefen ohne Druck langsam hindurch (Abb. 2(2)). Dabei blieben die markierten Zellen aufgrund des Magnetfelds in der Säule hängen. Die Säule wurde mit 5 ml PBS/FCS gewaschen und dann vom Magneten entfernt. Mit weiteren 2 ml PBS/FCS wurden nun die mit ferrochromhaltigem Antikörper markierten Zellen durch vorsichtigen und leichten Druck mit dem Kolben aus der Säule gewaschen und in einem sterilen 5 ml Röhrchen aufgefangen (Abb. 2(3)). Sie konnten dann in 25 ml Kulturflaschen überführt und mit 10 ml DMEM versetzt werden. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch frisches ersetzt, nach weiteren 48 Stunden erfolgte die

Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums (siehe Abschnitt 4.2.2.). Der Anteil B7-1- und CD30L-positiver Zellen konnte mittels FACS-Analyse bestimmt und durch kontinuierliche Selektion mit den entsprechenden Antibiotika sowie wiederholtem MACSen auf 99% gesteigert und erhalten werden.

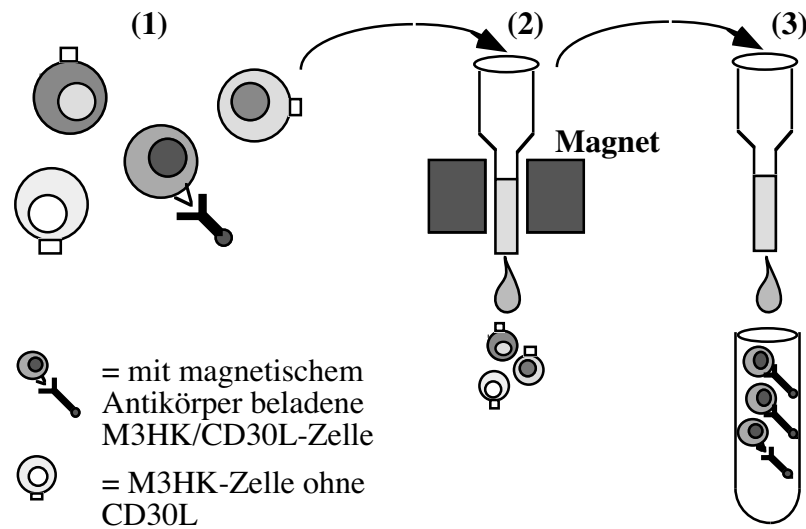


Abb. 2) Positive Selektion von M3HK/CD30L Melanomzellen.

4.3. Vorbereitung der T-Zellen

4.3.1. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus buffy coats

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen aus Blut macht man sich die verschiedenen Dichten der einzelnen Blutbestandteile zunutze. Bei der Zentrifugation von auf Ficoll liegendem Blut können die Erythrozyten den dichten Ficoll durchdringen, wogegen die restlichen Blutbestandteile (Thrombozyten, Lymphozyten und Granulozyten) in den Schichten im oder über dem Ficoll zurückbleiben.

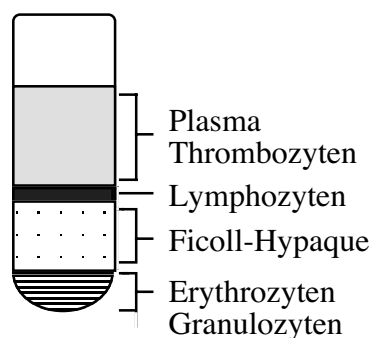


Abb. 3) Schema der Verteilung der einzelnen Blutbestandteile nach Zentrifugation von Blut durch Ficoll.

Die verschiedenen Zellarten können dann aus den einzelnen Schichten gewonnen werden. Buffy coats wurden 1:3 mit PBS verdünnt und je 15 ml davon so vorsichtig in 50 ml Falcon Röhrchen auf 15 ml auf Raumtemperatur erwärmten Ficoll pipettiert, dass sich die beiden Phasen nicht vermischten. Daraufhin wurden die Röhrchen mit 1800 rpm 30 min. lang bei Raumtemperatur zentrifugiert und dabei die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet. Aus der Phase zwischen dem Ficoll und dem Serum wurden die Lymphozyten mit einer 10 ml Pipette vorsichtig, ohne Ficoll mitzupipettieren abgesaugt. Sie wurden anschließend zweimal mit PBS/FCS gewaschen und dabei jeweils 10 min. mit 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5x50 ml Iscove's Kompletmedium aufgenommen und über Nacht bei 37°C in 175 ml Kulturflaschen kultiviert. Bei diesem Schritt können Thrombozyten und Mononukleäre Zellen am Flaschenboden anhaften und dadurch zum Großteil entfernt werden.

4.3.2. Isolierung von T-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten: negative Selektion mittels MACS

Die Isolierung der T-Zellen erfolgte durch negative Selektion mittels der MACS-Technik. Bei dieser Methode werden zuerst spezifische Maus- α -Human-Antikörper an die zu entfernenden Zelltypen gebunden und daran immunomagnetische Kugeln, die mit Ziegen- α -Maus-Antikörpern beschichtet sind, geheftet. Die so markierten Zellen werden mit Hilfe eines Magneten aus der Zellsuspension entfernt, sodass nur die gewünschte (T-Zell-) Population zurückbleibt und unbeeinflusst vom Magneten durch die Säule fließen kann.

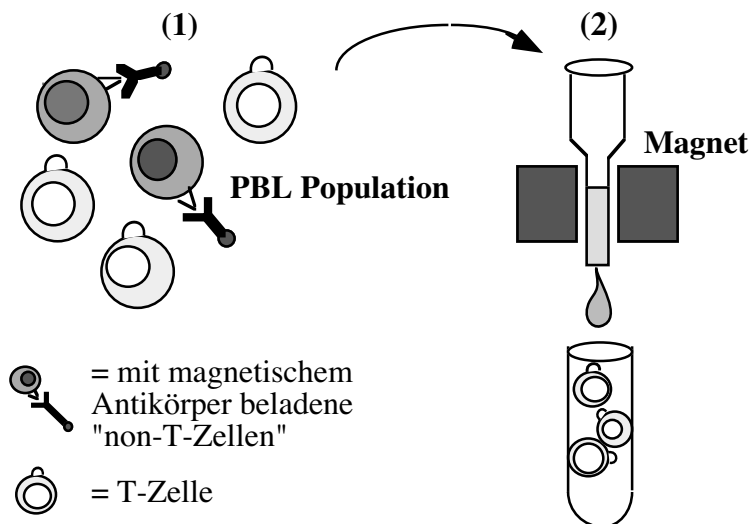


Abb. 4) Schematische Darstellung der negativen Selektion von T-Zellen mittels MACS.

Die Ü/N inkubierten Zellen wurden aus den Kulturflaschen in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, jede Flasche dann mit 10 ml Iscove's Kompletmedium gewaschen und diese 10 ml ebenfalls in ein Falcon Röhrchen pipettiert. Sie wurden 10 min. bei 4°C, 1500 rpm zentrifugiert, die Pellets in 10 ml Iscove's Kompletmedium zusammen aufgenommen und wie unter 4.1.1. beschrieben, gezählt. Pro 10^8 Zellen wurden 20 μ l des Hapten-Antikörpercocktails zugegeben und anschließend 20 min. bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit PBS/FCS gewaschen, wieder in 10 ml PBS/FCS aufgenommen und diesmal pro 10^8 Zellen 20 μ l des ferrochromhaltigen Antikörpers zugegeben und 30 min. bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Wiederum wurden die Zellen 3x mit PBS/FCS gewaschen, das Pellet in 5 ml PBS/FCS aufgenommen und vorsichtig auf die Säulen pipettiert. Die unmarkierten T-Zellen konnten dabei ungehindert durch die Säule hindurch laufen und in einem 5 ml Röhrchen aufgefangen, anschließend gezählt und eingefroren werden.

4.3.3. FACS-Analyse der isolierten und transfizierten Zellen

Die Bestimmung des Phänotyps und Prozentanteils der isolierten T-Zellen und transfizierten M3HK-Zellen erfolgte mittels Markierung der spezifischen Lymphozytenantigene CD3, 4, 8, 14, 16, 19, 45 und 56, bzw. der Moleküle HLA-I, HLA-II, B7-1 und CD30L mit an die Fluoreszenzfarbstoffe FITC oder PE gekoppelten monoklonalen Antikörpern und anschließender Analyse mit dem Epics Durchflusszytometer. Zur Bestimmung der Hintergrundfärbung wurden Färbungen gegen den jeweiligen Antikörper-Isotyp als Kontrolle durchgeführt.

Je 3×10^5 Zellen wurden dazu in 50 μ l PBS/FCS resuspendiert und mit je 4 μ l an FITC bzw. PE gekoppelter Antikörperlösung versetzt. Die verschiedenen Maus- α -Human Antikörper binden sich an die Oberflächenmarker und markieren die entsprechenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen, sodass sie mit dem FACS-Gerät analysiert werden können. Im Falle der T-Zellen wurden diese 10 min. mit je zwei verschiedenen, an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten, monoklonalen Antikörpern inkubiert, damit je zwei Oberflächenmoleküle gleichzeitig gemessen werden konnten. Daraufhin wurde überschüssiger Antikörper durch 8-minütiges zentrifugieren bei 1500 rpm mit PBS/FCS ausgewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 500 μ l PBS/FCS resuspendiert. Im Anschluss daran erfolgte die Analyse mit dem Epics Durchflusszytometer, bei welcher tote Zellen elektronisch von der Analyse ausgeschlossen wurden. Das der Datenanalyse zugrundeliegende Computerprogramm war "Coulter® Epics XL/XL-MCL System II Software". Die isolierten T-Zellen erreichten dabei eine Reinheit von bis zu 99%.

4.4. Vorversuche

4.4.1. Bestimmung der Oberflächenmarker auf den M3HK-Zellen

Um eventuelle Unterschiede in der Aktivierung von T-Zellen zu erfassen, die in der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmolekülen auf den Melanomzellen begründet liegen, wurden die verschieden transfizierten Melanomzellen zunächst bezüglich ihrer Expression von HLA-I, HLA-II sowie verschiedener Aktivierungs- und T-Zellmarker (CD3, 4, 8, 14, 45, 16, 56, 25, 30, 38, 54, 58, 95, 40L, 30L, 80(B7-1), 86(B7-2)) charakterisiert. Diese Bestimmungen wurden wiederum wie unter 4.3.3. beschrieben durchgeführt.

4.4.2. Aufregulation von HLA-I und HLA-II auf den Transfektanten

Um mögliche Unterschiede in der Aktivierung der T-Zellen aufgrund verschieden hoher HLA-II-Expression auf den Melanomzellen auszuschließen, wurde dieses durch Stimulation mit IFN γ auf allen Zellen aufreguliert. Es wurden 3×10^5 Zellen/3ml Medium/well in 6 well Platten ausgesät und 250 U/ml IFN γ zugegeben. Alle 24 h wurde das alte Medium gegen frisches, IFN γ enthaltendes Medium ausgetauscht. An jedem Messungstag wurden die Zellen wie unter 4.1.3. beschrieben mit 1 ml Trypsin pro well abgelöst und anschließend gewaschen. Die Messung der Expression von HLA-I, HLA-II, CD30L und B7-1 erfolgte ebenfalls alle 24 h an den Tagen 0, 1, 3, 4, 5, 6, 8 und 13 in der unter 4.3.3. beschriebenen Weise.

4.4.3 Bestimmung der Aktivierungsmarker und der CD30 Expression auf T-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen

Die Oberflächenmoleküle CD3, 4, 8, 14, 16, 19, 30, 45 und 56 sowie die T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD71 wurden auf den unstimulierten, frisch aufgetauten T-Zellen gemessen. Dann wurden zunächst je 2.5×10^5 mit 18.000 rad bestrahlte M3HK/B7-1 Zellen zusammen mit 2.5×10^6 T-Zellen pro well in 6 well Platten ausgesät und 0,5 μ g/ml Concanavalin A (ConA) hinzugegeben. Am Tag 3 erfolgte die Zugabe von 100 U/ml IL-2. Es erfolgte keine weitere Zugabe von ConA. Über 8 Tage hinweg wurde die Expression der einzelnen Oberflächenmarker CD3, 4, 8, 25, 30 und 71 wie unter 3.3.3. beschrieben gemessen. Da selbst bei Bestrahlungen mit 28.000 rad immer noch einzelne Tumorzellen überlebten und proliferierten, wurde der gleiche Ansatz nochmals mit Melanomzellen durchgeführt, die mit 1% Paraformaldehyd fixiert waren. Dabei wurde auch zwischen verschiedenen Zeitpunkten der IL-2 Zugabe (Tag 1 und 3) sowie der Stimulation mit 50 μ g/ml PHA (ohne IL-2 und ohne ConA) verglichen.

Ein anderer Ansatz, der genauso strukturiert war wie der oben beschriebene, sollte die Unterschiede bezüglich der Expression der Aktivierungsmarker bei Stimulation mit verschiedenen Transfektanten (M3HK/CD30L*neo*, M3HK/CD30L*hygro*, M3HK/B7-1 sowie der Doppeltransfektante) näher untersuchen.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Expression von CD25, CD30 und Ox40L auf T-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen gemessen. In eine 24 well Platte wurden 10^5 T-Zellen in je 1 ml Medium pro well ausgesät. Zu je einem well wurden 500 ng PHA, 100 U/ml IL-2 oder 0,5 μ g/ml ConA gegeben. Es wurden dabei keine Melanomzellen zugefügt. Die Platte wurde insgesamt 4 Tage lang bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert, wobei am 3. Tag bei allen Ansätzen das Medium mit dem entsprechenden Zusatz gewechselt wurde. Anschließend wurden an Tag 4 die Expressionen der einzelnen Marker gemessen.

4.5. Proliferationsassays

In den Proliferationsassays sollte nun getestet werden, inwieweit CD30L auf M3HK-Zellen alleine oder in Kombination mit B7-1 in der Lage ist, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Dies wurde verglichen mit der Proliferation von T-Zellen durch Stimulation mit den Kontrolltransfektanten sowie derjenigen der T-Zellen alleine, mit ConA- oder PHA-Zusatz. Vor Einsatz der M3HK-Zellen in den Assays wurden HLA-I und HLA-II wie unter 4.4.2. beschrieben 48 h lang aufreguliert und die Zellen anschließend vor Einsatz im Assay wie unter 4.1.4. beschrieben mit 1% Paraformaldehyd fixiert.

4.5.1. Ansatz der Proliferationsassays

Die Ansätze wurden im Triplikat in 96 well Mikrotiterplatten durchgeführt (Abb. 5). Die Zellkonzentrationen betragen:

T-Zellen: $10^5/100 \mu$ l Lymphozytenkulturmedium/Vertiefung

M3HK: $10^4/100 \mu$ l Lymphozytenkulturmedium/Vertiefung

Um einen Vergleich zwischen unspezifischer, maximaler oder submaximaler Stimulation der T-Zellen zu spezifischer Stimulation mit CD30L, B7-1 oder B7-1 und CD30L ziehen zu können, wurden im Ansatz einige der T-Zellen nur mit PHA oder ConA stimuliert. Jeweils in Reihe A der Titerplatte (Abb. 5) wurden als Kontrollen Tripletts von T-Zellen alleine, T-Zellen mit 0,5 μ g/ml ConA sowie mit 25 μ g/ml PHA versetzte T-Zellen gegeben. Die Vertiefungen der Reihen 1-3 dagegen waren mit den verschiedenen Melanomzellen alleine bestückt. 2 Tage vor Ansatz des Assays wurden die Melanomzellen wie unter 4.4.2. beschrieben mit IFN γ vorbehandelt und kurz vor ihrem Einsatz im Assay wie unter 4.1.4. beschrieben mit 1%igem PFA fixiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				T Zellen			T Zellen + ConA			T Zellen + PHA		
B	M3HK			→			→			→		
C	M3HK _{neo}			→			→			→		
D	M3HK _{hygro}			→			→			→		
E	M3HK/CD30L			→			→			→		
F	M3HK/B7-1			→			→			→		
G	M3HK/CD30L+B7-1			↓			↓			↓		
H												

Abb. 5) Schema des Ansatzes eines Proliferationsassays.

Zuerst wurden alle benötigten M3HK und T-Zellen in den entsprechenden Mengen Medien (ohne ConA, mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ConA oder mit 25 $\mu\text{g/ml}$ PHA) auf die berechnete Konzentration (10^6 T-Zellen/ml, 10^5 M3HK-Zellen/ml) eingestellt. Mit einer Multikanalpipette wurde nun die Platte so beschickt, dass in jede Vertiefung zuerst die entsprechende Anzahl an M3HK-Zellen in 100 μl Medium vorgelegt wurde und anschließend 10^5 T-Zellen in 100 μl Medium zugegeben wurden. Dabei wurde für jeden zu messenden Tag eine Platte beschickt. Die Platten wurden alle bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert und am 3. Tag des Assays in jede Vertiefung, außer zu den PHA-Zellen 100 U/ml IL-2 mit einer Klickpipette gegeben.

Die Messung der Proliferation erfolgte an verschiedenen Zeitpunkten in einem Zeitraum zwischen 2 bis 8 Tagen durch Messung von radioaktivem [³H]-Thymidin, welches in die DNA der sich teilenden Zellen eingebaut wird. In jede Vertiefung wurde für die letzten 6 Stunden der Inkubation 0,5 μCi [³H]-Thymidin ebenfalls mit einer Klickpipette zugesetzt. Die radioaktiven Platten wurden danach bei -20°C schnell eingefroren und nach 12 Stunden bis zur endgültigen Ernte und Messung der Platten bei -80°C aufbewahrt.

4.5.2. Zellernte und Messung des Thymidineinbaus

Die Proliferation der T-Zellen wurde mittels Einbau von [³H]-Thymidin in die sich teilenden Zellen gemessen. Der Inhalt der 96 well Platten mit den Triplikat-Ansätzen wurde mit einem Cell Harvester geerntet. Dieser saugt den Inhalt der 96 Vertiefungen gleichzeitig durch einen Glasfaserfilter, an welchem die DNA mit dem eingebauten [³H]-Thymidin hängen bleibt. Nach dem Auftauen der bei -80°C gelagerten Platten wurde zuerst einmal mit einer Waschplatte vorgespült und damit der Glasfaserfilter befeuchtet,

dann die eigentliche, zu messende Platte eingesetzt und der Inhalt der Vertiefungen durch den Filter gesaugt. Die Vertiefungen werden bei dem eingestellten Programm einige Male mit Wasser gespült und ausgesaugt, wodurch noch intakte Zellen lysiert und nicht inkorporiertes [^3H]-Thymidin ausgewaschen wird. Die durch diese Schritte freigesetzte DNA kann auf dem Glasfaserpapier haften bleiben. Anschließend wurde der Glasfaserfilter in Trockenpapier gelegt und 30 min. bei 80°C getrocknet. Danach wurde der Filter zusammen mit einem Szintillationswachsblatt in eine Plastikhülle eingeschweißt und dabei das Szintillationswachs geschmolzen. Diese Hülle mit dem Glasfaserfilter wurde anschließend in eine Messkassette eingepasst und in den Mikrozähler eingelegt. Nach der letzten zu messenden Kassette wurde eine Stopkassette in den Zähler eingelegt und das Messprogramm gestartet.

4.6. Restimulationsassays

In den Restimulationsassays sollte getestet werden, ob sich die Proliferation der T-Zellen bei einer zweiten Stimulation mit entweder den gleichen oder anderen die Immunantwort potenzierenden Molekülen steigern lässt. Ein weiteres Ziel war es, die Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern bei Restimulation zu untersuchen.

4.6.1. Prästimulation der T-Zellen

Vor Einsatz der Zellen in Restimulationsassays mussten die T-Zellen vorstimuliert werden. In 6 well Platten wurden je 5×10^5 mit $\text{IFN}\gamma$ stimulierte und mit PFA fixierte, verschiedene Transfektanten zusammen mit 5×10^6 T-Zellen und $0,5 \mu\text{g/ml}$ Medium ConA, in insgesamt 3 ml Medium pro well ausgesät sowie am 3. Tag 100 U/ml IL-2 zugegeben (Abb. 6).

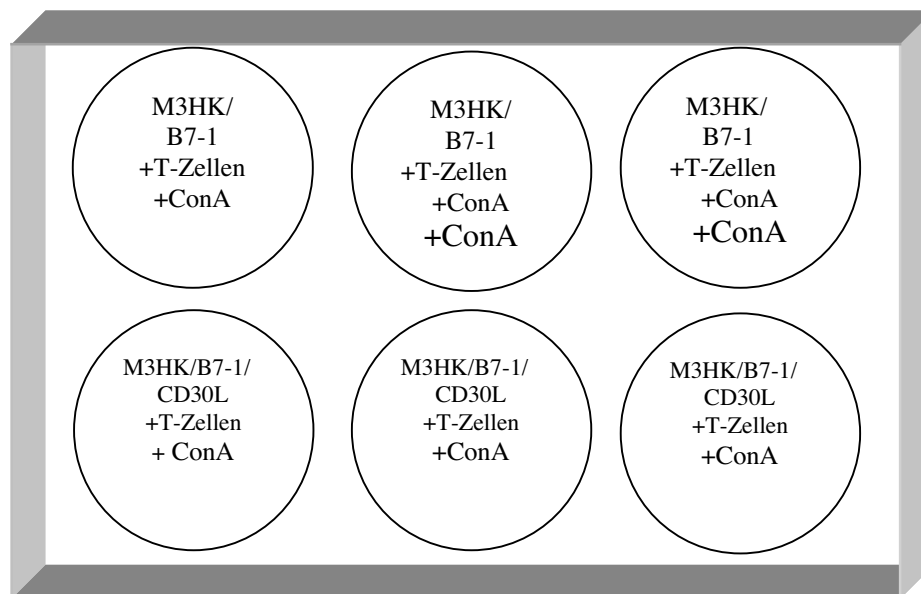


Abb. 6) Beispiel des Ansatzes einer Prästimulationsplatte.

Diese Vorstimulation bei 37°C, 5%CO₂ erfolgte über 5 Tage hinweg, da in vorangehenden Proliferationsassays die Proliferation an den Tagen 4 bis 6 am höchsten gewesen war. Es sollte untersucht werden, ob sich diese maximale Proliferation durch Restimulation mit frischen Tumorzellen noch steigern lässt.

4.6.2. Messung der Expression von Aktivierungsmarkern bei Restimulation der T-Zellen mit M3HK/B7-1

5 Tage nach Beginn der Prästimulation wurden die mit M3HK/B7-1, M3HK/CD30L oder M3HK/CD30L+B7-1 vorstimulierten T-Zellen aus der Platte in 10 ml Falcon Röhrchen überführt, zweimal mit PBS/FCS gewaschen und anschließend mit frischen, IFN γ -stimulierten und PFA-fixierten Tumorzellen restimuliert. Das Verhältnis von Tumor- zu T-Zellen (1:10) wurde dabei gewahrt und die Versuchsansätze wiederum in 6 well Platten entsprechend dem Prästimulationsansatz durchgeführt. Diesmal wurde IL-2 jedoch bereits ab dem ersten Restimulationstag hinzugefügt und der Zusatz von ConA erfolgte nur in ausgewählten Ansätzen. Die Expression von CD30, Ox40 und CD25 wurde anschließend über 5-13 Tage hinweg gemessen.

4.6.3. Restimulationsassays

5 Tage nach Beginn der Prästimulation wurden die T-Zellen aus der Platte in 10 ml Falcon Röhrchen überführt, zweimal mit Komplettmedium gewaschen und anschließend gezählt. Die Zellen wurden sodann gemäß dem abgebildeten Schema in die Vertiefungen verteilt. In der Querreihe A befanden sich die entsprechenden T-Zellen alleine ohne Melanomzellen, in den Längsreihen 1-3 dagegen die Melanomzellen ohne T-Zellen. Das Vorgehen und die Zellkonzentrationen entsprachen denjenigen des Proliferationsassays. Allerdings wurden bereits am ersten Tag des Assays 100 U/ml IL-2 zugegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				Vorstim. TZ			Vorstim. TZ +ConA			Vorstim. TZ + PHA		
B	M3HK/hygro + TZ			—			—			—		
C	M3HK/neo + TZ			—			—			—		
D	M3Hk/neo+hygro + TZ			—			—			—		
E	M3HK/CD30L + TZ			—			—			—		
F	M3HK/B7-1 + TZ			—			—			—		
G	M3HK/CD30L+B7-1+TZ			—			—			—		
H												

Abb. 7) Schema des Ansatzes eines Restimulationsansatzes.

4.6.4. Restimulation von mit PHA prästimulierten T-Zellen

In diesem Experiment sollte untersucht werden, wie T-Zellen, die zuvor 5 Tage lang mit PHA stimuliert waren, unter verschiedenen Restimulationsbedingungen proliferieren. In eine 24 well Platte wurden 10^5 T-Zellen in je 1 ml Medium pro Vertiefung ausgesät. Zu je einer Vertiefung wurden 500 ng PHA, 100 U/ml IL-2 oder 0,5 μ g/ml ConA gegeben. Es wurden dabei keine Melanomzellen zugefügt. Die Platte wurde insgesamt 4 Tage lang bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert, wobei am 3. Tag bei allen Ansätzen das Medium mit dem entsprechenden Zusatz gewechselt wurde. Am 5. Tag wurden diese Zellen mit M3HK/B7-1 oder M3HK/CD30L ohne weitere Zugabe von PHA 5 Tage lang restimuliert und anschließend die Proliferation wie unter 4.5.2. beschrieben gemessen. Das Prinzip und die Vorgehensweise sowie die jeweiligen Zellkonzentrationen pro Vertiefung entsprachen denjenigen der Proliferationsansätze (siehe Abschnitt 4.5.1.), das Design der Platten (Verteilung der Zellen, fehlende Zugabe von PHA etc.) war dem Versuch angepasst etwas verändert.

IV. Ergebnisse

1. Vorversuche

1.1. Expression von CD30L und B7-1 auf transfizierten M3HK-Zellen

Um im Hinblick auf spätere Versuche einen Vergleich ziehen zu können zwischen der Auslösung einer spezifischen Antitumorreaktion der T-Zellen durch den TNFR-Liganden CD30L und dem bekanntermaßen T-Zell-stimulierenden Molekül B7-1, wurden Melanomzellen der Linie M3HK mit CD30L, B7-1 oder beiden Molekülen transfiziert. Initial konnten diese Moleküle auf den untransfizierten M3HK-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 10A). Mittels Lipofektion wurden diese Moleküle in die M3HK-Zellen eingebracht. Die Zeit zwischen Lipofektion und anschließender Selektion mittels MACS sowie der Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums musste dabei optimiert werden, da die Zellen bei zu später Selektion durch MACS das Plasmid zum großen Teil wieder verloren hatten. Auch die Zeit bis zum Hinzufügen des entsprechenden Antibiotikums zur Selektion durfte nicht zu lange sein, allerdings war bei zu früher Zugabe die Toxizität und damit der Verlust an Zellen sehr groß. Bei der gewählten Zeit von 48 h bis zur ersten FACS-Messung mit anschließender MACS-Selektion sowie Zugabe des Antibiotikums 5 Tage nach Lipofektion starben über 90% der Zellen ab, die überlebenden 10% allerdings exprimierten das neue Molekül sehr stabil.

Bis zur endgültigen Transgenexpression von ca. 99% mussten die Zellen jedoch über mehrere Wochen hinweg wiederholt ca. alle 10-14 Tage per MACS auf die Oberflächenmoleküle selektiert werden. Dann zeigte sich eine fast 100% reine Zellpopulation, die CD30L exprimiert (Abb. 8).

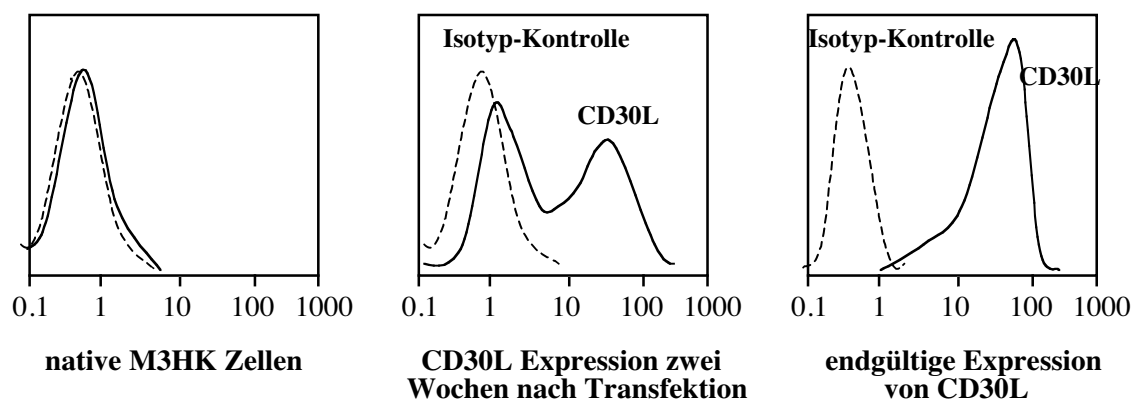


Abb. 8) Expression des CD30L an verschiedenen Zeitpunkten der Transfektion nach kontinuierlicher Selektion und wiederholter MACS-Separation. Abszisse: Fluoreszenzintensität (logarithmisch), Ordinate: relative Zellzahl (linear).

Die Doppeltransfektante wurde erzeugt durch Transfektion des CD30L in M3HK-Zellen, die das Molekül B7-1 bereits zu einem hohen Anteil exprimierten. Wiederholte, abwechselnde MACS-Separation mit anti-CD30L- oder anti-B7-1-Antikörpern, konnte die Expression beider Moleküle auf 99% steigern.

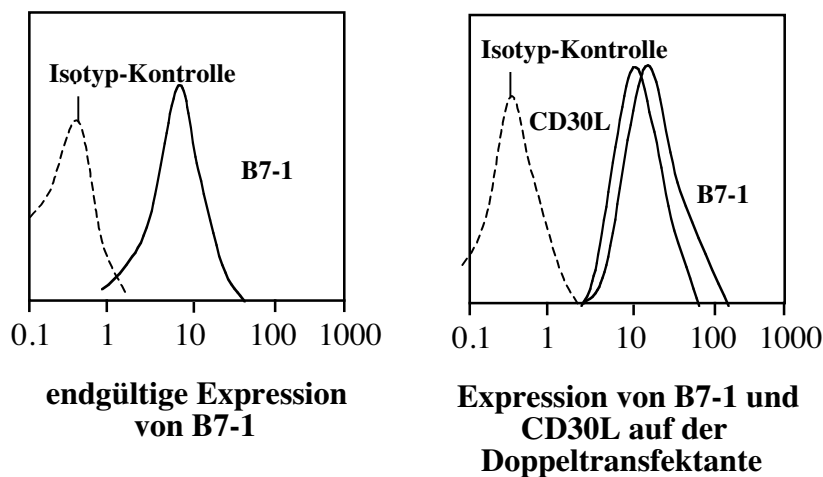


Abb. 9) Expression von B7-1 alleine und in Kombination mit CD30L nach mehrwöchiger Selektion und wiederholter MACS-Separation.

1.2. Charakterisierung der transfizierten M3HK-Zellen

Die verschieden transfizierten Melanomzellen wurden zunächst bezüglich ihrer Expression von HLA-I, HLA-II sowie Aktivierungs- und T-Zellmarkern (CD 3, 4, 8, 14, 16, 25, 30, 38, 45, 54, 56, 58, 80 (B7-1), 86 (B7-2), 95 (FasL), CD153 (CD30L), CD154 (40L)) charakterisiert. An vier verschiedenen Tagen wurden entsprechende FACS-Messungen durchgeführt. Die unterschiedlich transfizierten Melanomzellen exprimierten weder die T-Zell- bzw. Lymphozyten-Marker CD3, 4, 8, 14, 25, 38 und CD45 noch CD86, 95 oder CD154 (Daten nicht gezeigt). Ebenso wenig fand sich CD30 auf diesen unstimulierten Melanomzellen (Abb. 10A). Die Monozyten- und NK-Zellmarker CD16 und CD56 dagegen wurden von allen Transfektanten je nach Wachstumsdichte zwischen 20% und 60% exprimiert. Auch die Adhäsionsmoleküle CD58 und CD54 konnten auf den mit CD30L transfizierten M3HK-Zellen in geringerer Expression nachgewiesen werden, als auf der Doppeltransfektante, den M3HK/B7-1 und zum Teil auch den unbehandelten M3HK-Zellen. CD54 wurde dabei tendenziell immer höher exprimiert als CD58 (Abb. 10A).

Die Expression der transfizierten Moleküle CD30L und B7-1 (CD80) lag stabil bei 99% mit Ausnahme von M3HK/CD30L*neo* (Abb. 10A), bei welchem die Expression des CD30L etwas mehr schwankte (87-96%) und immer wieder durch MACS-Separation aufrecht erhalten werden musste.

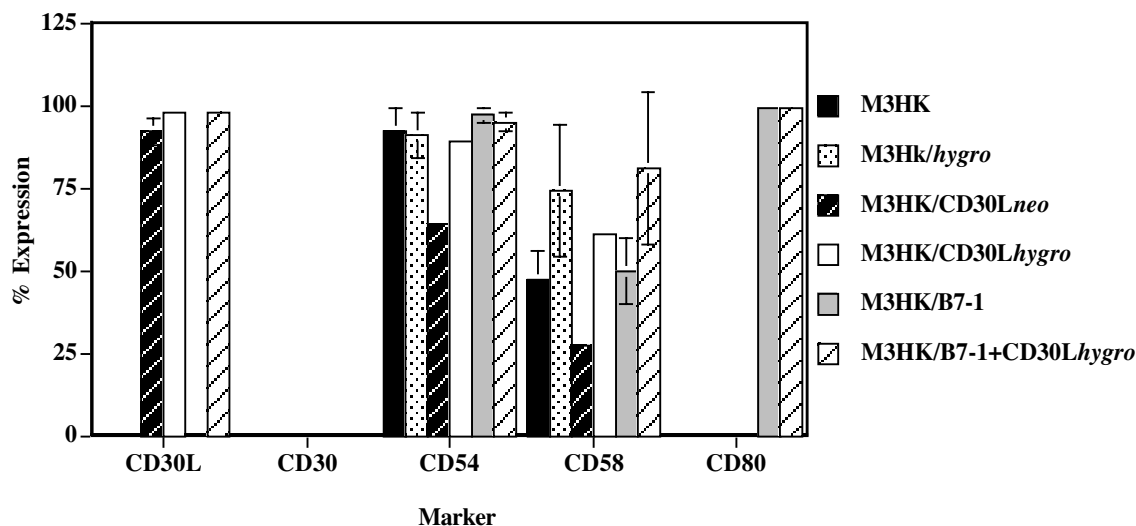


Abb. 10A) Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf unstimulierten Transfektanten und nativen Melanomzellen (Standardabweichungen sind für alle Marker auf allen Transfektanten dargestellt).

Ebenfalls Schwankungen unterworfen waren die Moleküle HLA-I und HLA-II, wobei HLA-I auf allen Transfektanten tendenziell mehr exprimiert wurde (63-88%) als HLA-II (15-54%). Am stärksten exprimierten untransfizierte M3HK-Zellen und die Kontrolltransfektante M3HK/hygro HLA-II mit respektive 36-59% und 42-64%, was im Gegensatz zu M3HK/CD30Lhygro und M3HK/CD30Lneo stand, bei welchen die Expression zwischen respektive 15-19% und 12-18% lag (Abb. 10B). M3HK/B7-1-Zellen exprimierten HLA-II zu 26-60%, die Doppeltransfektante zu 36-74%. Demzufolge scheinen die Transfektanten mit CD30L weniger HLA-II zu exprimieren, welches aber zur Aktivierung von T-Zellen benötigt wird.

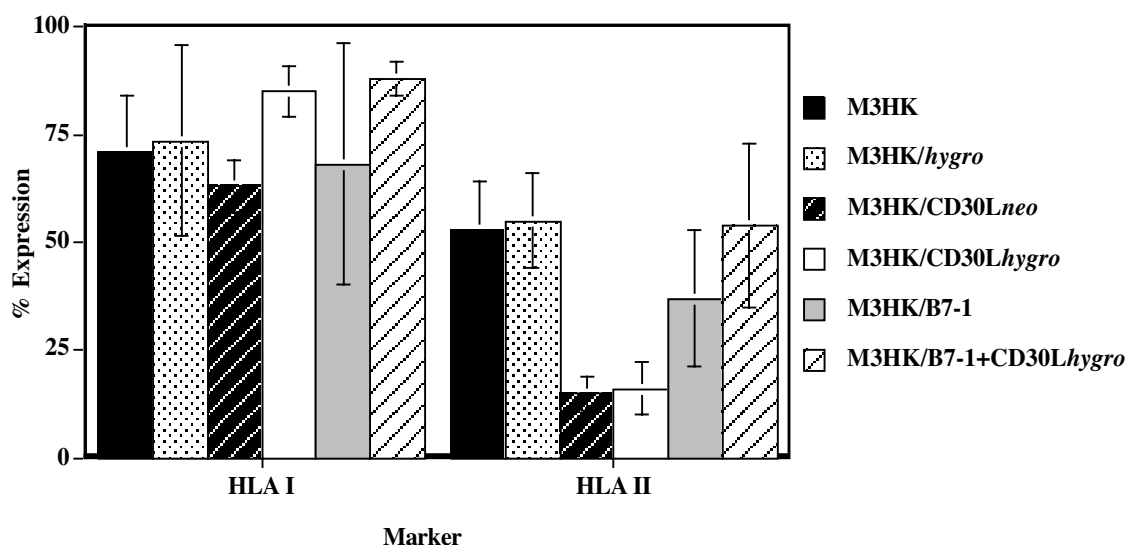


Abb. 10B) HLA-I- und HLA-II-Expression der verschiedenen, unstimulierten Transfektanten und nativen Melanomzellen.

1.3. Steigerung der HLA-I- und -II-Expression auf Melanomzellen mittels IFN γ

Um mögliche Unterschiede in der Aktivierung der T-Zellen aufgrund der verschiedenen hohen HLA-II-Expression auf den Melanomzellen auszuschließen, wurde dieses durch Stimulation mit IFN γ auf allen Zellen aufreguliert. Nach einer kurzen Anlaufphase lag in allen durchgeführten Experimenten am 2. oder 3. Stimulationstag die HLA-II-Expression bei fast allen Transfektanten bei 98% (Abb. 11B). Nur die HLA-II-Expression von M3HK/CD30Lneo zeigte sich in verschiedenen Versuchsansätzen als variabel. Am 2. und 3. Stimulationstag konnten in verschiedenen Experimenten Expressionen zwischen 75% bis 93% gemessen werden.

Auch die Expression von HLA-I stieg entsprechend dem Verlauf der HLA-II Expression bei allen Transfektanten bis auf 98% an (Abb. 11A).

Da im Verlauf diese hohen Expressionen nicht erhalten blieben (die HLA-I-Expression nahm bereits nach 3 Tagen ab, die von HLA-II erst nach 7-9 Tagen Stimulation) und auch die Transgenexpression trotz kontinuierlicher Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum nach 2-3 Tagen zum Teil stark abnahm (bei M3HK/CD30Lneo bis auf 36%) (Abb. 12), wurden die Zellen bereits 48 h nach Beginn der Stimulation mit 1%igem Paraformaldehyd fixiert und in Proliferationsassays eingesetzt.

Abb. 11A)

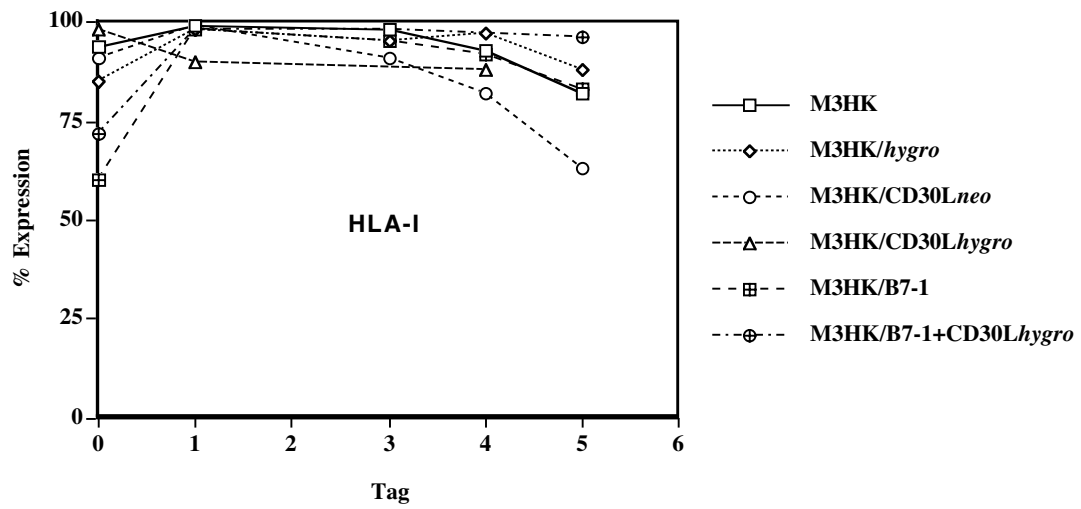


Abb. 11B)

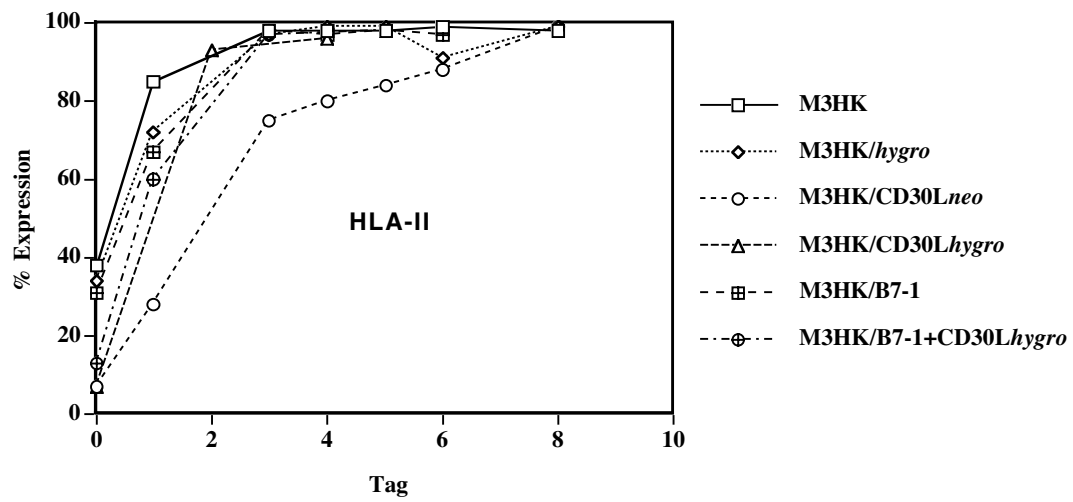


Abb. 11A+B) Aufregulation von HLA-I (11A) und -II (11B) zur gleichmässigen Expression auf allen Transfektanten.

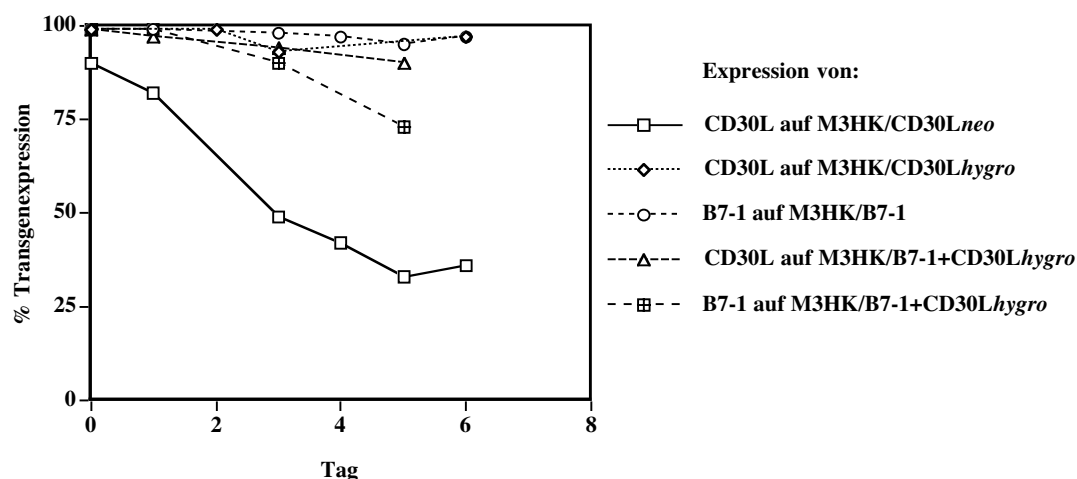


Abb. 12) Abnahme der Transgenexpression bei Stimulation der verschiedenen Transfektanten mit $IFN\gamma$.

1.4. Charakterisierung der isolierten T-Zellen

Nach Ficoll-Gradienten-Zentrifugation und anschließender Separation mittels MACS, konnten in der Regel T-Zellpopulationen mit einer Reinheit von über 98% isoliert werden. Die einzelnen, erhaltenen Populationen setzten sich z.B. folgendermaßen zusammen: CD3: 98,6%, CD4: 90,2%, CD8: 8,4%, CD19: 0,7%, CD56/16: 0,9%, CD45: 99,4%, CD14: 0,8% (Daten nicht gezeigt).

1.5. Expression von CD25, CD71 und CD30 nach Stimulation der T-Zellen mit bestrahlten M3HK/B7-1-Zellen und IL-2

Zunächst wurden die T-Zellen mit den bestrahlten Melanomzellen M3HK/B7-1 aktiviert, am dritten Tag 100 U/ml IL-2 hinzugegeben und über 8 Tage hinweg die Expression der einzelnen Oberflächenmarker gemessen. Dem Medium waren am Tag 0 500 μ g/ml ConA zugesetzt worden. Innerhalb der ersten drei Tage erfolgte bereits durch ConA und die Stimulation mit M3HK/B7-1 eine langsame Aufregulation aller Aktivierungsmarker (CD25 auf 55%, CD30 auf 20%). IL-2 jedoch beschleunigte und steigerte diesen Effekt noch weiter, sodass 48 Stunden nach Zugabe bereits die maximale Expression von CD30 (60%) und CD25 (97%) erreicht war (Abb. 13).

T-Zellen, die einzig und allein mit ConA, also ohne Tumorzellen und ohne IL-2 inkubiert wurden, exprimierten CD30 überhaupt nicht und CD25 nur mit ca. 5% (Daten nicht gezeigt). Auch in wiederholt durchgeführten Versuchsansätzen erreichte CD30 niemals ähnlich hohe Expressionswerte wie CD25 oder CD71.

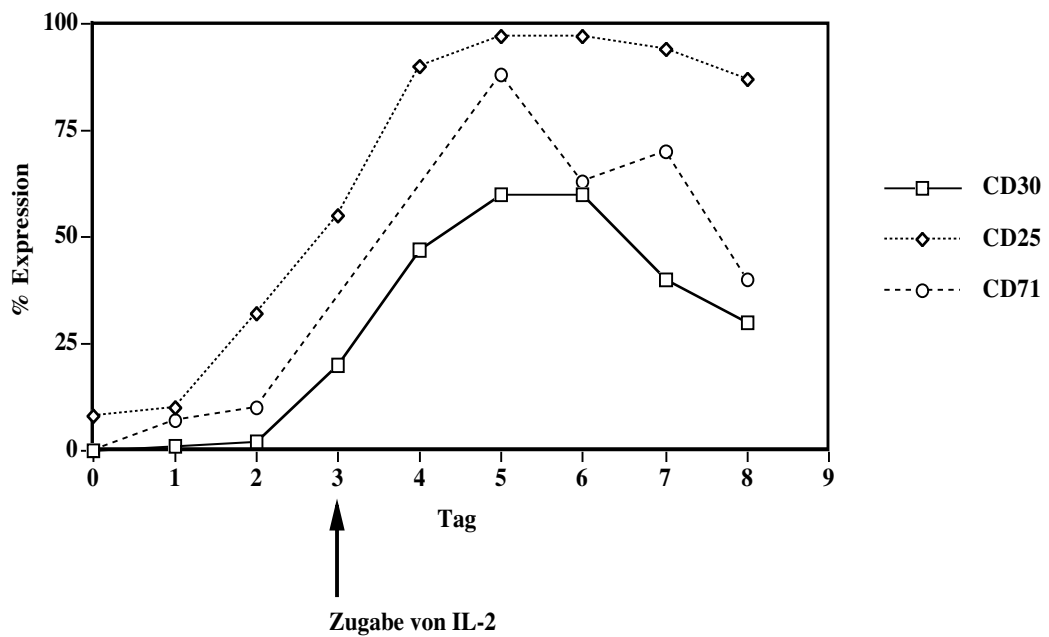


Abb. 13) Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen nach Stimulation der T-Zellen mit M3HK/B7-1 und IL-2.

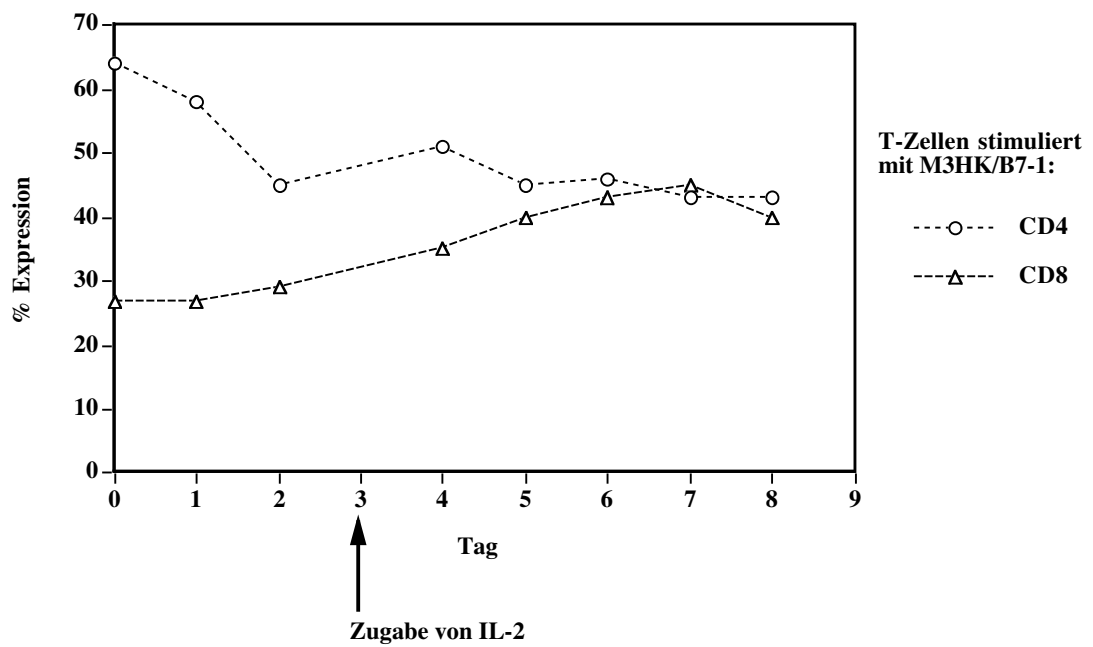


Abb. 14) Veränderung der CD4⁺/CD8⁺ Ratio nach Stimulation der T-Zellen mit M3HK/B7-1 und IL-2.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass T-Zellen, die in der oben beschriebenen Weise stimuliert wurden und damit ein kostimulatorisches Signal durch B7-1 erhalten, ihre $CD4^+/CD8^+$ Ratio verändern. Diese Ratio betrug am Anfang des Experiments 2,3, mit Beginn der Zugabe von IL-2 begann sie sich durch eine Verminderung des Anteils der CD4- und eine Erhöhung des Anteils der CD8-positiven T-Zellen stetig zu vermindern, bis sie am Tag 7 den Wert 0,95 erreicht hatte (Abb. 14). Bei alleiniger Stimulation der T-Zellen mit IL-2, ohne das kostimulatorische Signal von B7-1, konnte nur eine Verminderung des Anteils an $CD4^+$ Zellen verzeichnet werden, nicht jedoch ein Anstieg der $CD8^+$ Zellen (Abb. 17).

1.6. Vergleich der Expression von CD25, CD30 und Ox40 nach Stimulation der T-Zellen mit Paraformaldehyd-fixierten oder bestrahlten M3HK/B7-1-Zellen und IL-2

Die Inaktivierung der Melanomzellen mittels Bestrahlung stellte sich aufgrund sehr hoher benötigter radioaktiver Dosen und damit langen Bestrahlungszeiten zum einen als zu zeitaufwendig, zum anderen auch als unzuverlässig (selbst bei Dosen von 28.000 rad waren einige Zellen immer noch in der Lage sich nach einigen Tagen zu erholen und wieder zu proliferieren) heraus. Daher wurden zwei parallele Versuchsansätze zum einen mit Paraformaldehyd (PFA)-fixierten, zum anderen mit bestrahlten Tumorzellen durchgeführt um deren Effekt auf die Expression von CD25 und CD30 auf T-Zellen und damit Unterschiede in ihrer T-Zell-Aktivierungsfähigkeit zu vergleichen. In diesem Ansatz wurde zusätzlich der unterschiedliche Effekt der Zugabe von IL-2 an Tag 1 oder 3 untersucht. Wiederum konnte festgestellt werden, dass bei Stimulation der T-Zellen mit M3HK/B7-1 die Expression von CD30 auf den T-Zellen weit geringer war als die von CD25, unabhängig davon, ob die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert oder bestrahlt waren (Abb. 15). Auch die Kinetik der CD30-Expression sowie der Prozentsatz CD30-positiver T-Zellen unterschieden sich bei den verschiedenen Zell-Inaktivierungsmethoden nicht wesentlich, es konnte lediglich eine etwas verzögerte Aufregulation von CD25 sowie ein etwas rascherer Rückgang der CD30-Expression bei denjenigen T-Zellen beobachtet werden, die mit PFA-fixierten M3HK-Zellen stimuliert worden waren (Abb. 15). Daher nahmen wir Abstand von der Bestrahlung der Zellen und verwendeten für die Versuche nur noch mit Paraformaldehyd fixierte Tumorzellen.

Das Ausmaß der Expression von CD25, CD30, HLA-I und HLA-II unterschied sich bei Zugabe von IL-2 an zwei verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf des Experiments nicht signifikant. Lediglich CD25 konnte tendenziell bei IL-2-Zugabe gleich am 1. Tag des Versuchsansatzes etwas schneller aufreguliert werden als bei Zugabe an Tag 3 (Abb. 15 und 16). Dennoch wurden auch in diesem Versuchsansatz maximale Expressionen von CD30 und CD25 am 5. und 6. Tag des Experiments gemessen, unabhängig vom

Zeitpunkt der Zugabe von IL-2. T-Zellen, die nur mit IL-2, ohne M3HK-Zellen stimuliert wurden, exprimierten CD30 überhaupt nicht und CD25 nur in sehr geringem Maße (ca. 5%), unabhängig davon, ob IL-2 am Tag 1 oder 3 hinzugefügt wurde (Abb. 17 + Abb. 19).

In einer Reihe von Versuchen hatte sich gezeigt, dass die Fähigkeit CD30 auf der T-Zelle hochzuregulieren, von Spender zu Spender stark variierte. Bei einigen Spendern konnte die Expression dieses Moleküls auf bis zu 60% gesteigert werden (Abb. 15), bei T-Zellen anderer Spender konnte CD30 dagegen nur geringfügig auf 10-20% aufreguliert werden, obwohl CD25 wie immer hoch exprimiert wurde (Abb. 18).

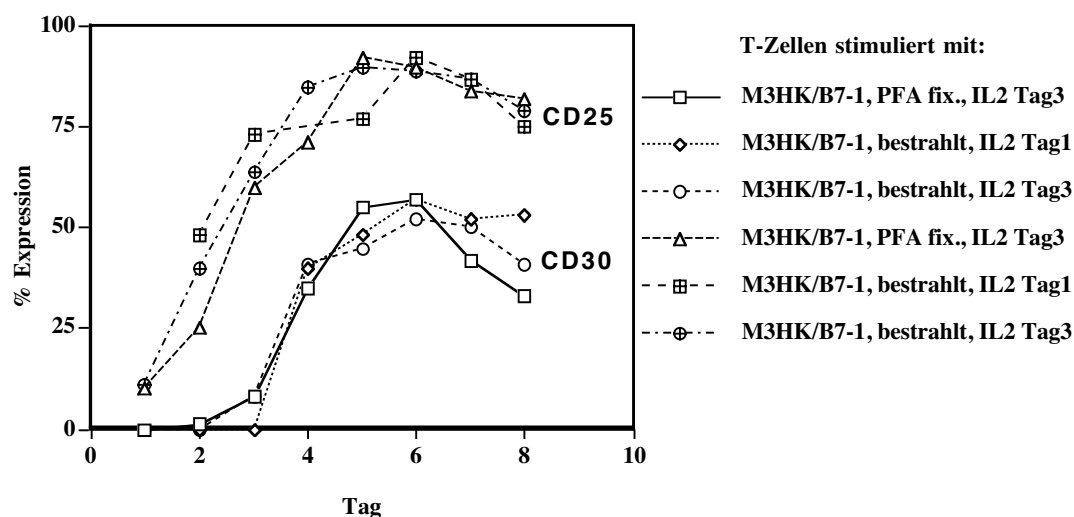


Abb. 15) Vergleich der CD25- und CD30-Expression auf T-Zellen nach Stimulation mit bestrahlten oder Paraformaldehyd-fixierten (PFA fix.) M3HK/B7-1 - Zellen mit Interleukin-2-Zugabe an Tag 1 oder 3.

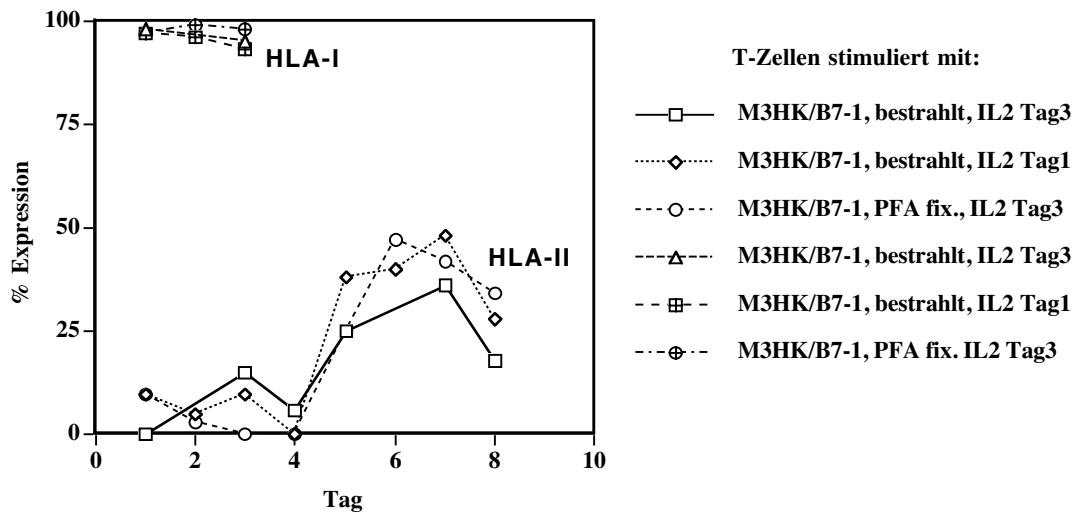


Abb. 16) HLA-I und -II-Expression auf T-Zellen nach Stimulation mit Paraformaldehyd fixierten oder bestrahlten M3HK/B7-1-Melanomzellen mit IL-2 Zugabe an Tag 1 oder 3.

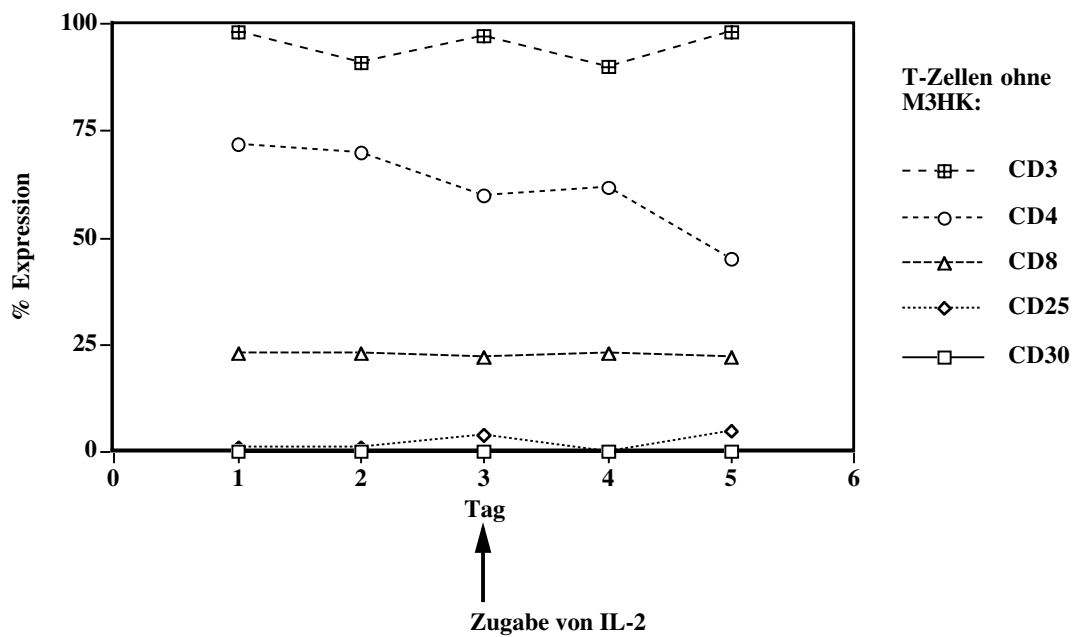


Abb. 17) Geringe Expression von CD25 und CD30 auf T-Zellen bei alleiniger Stimulation mit IL-2 am Tag 3.

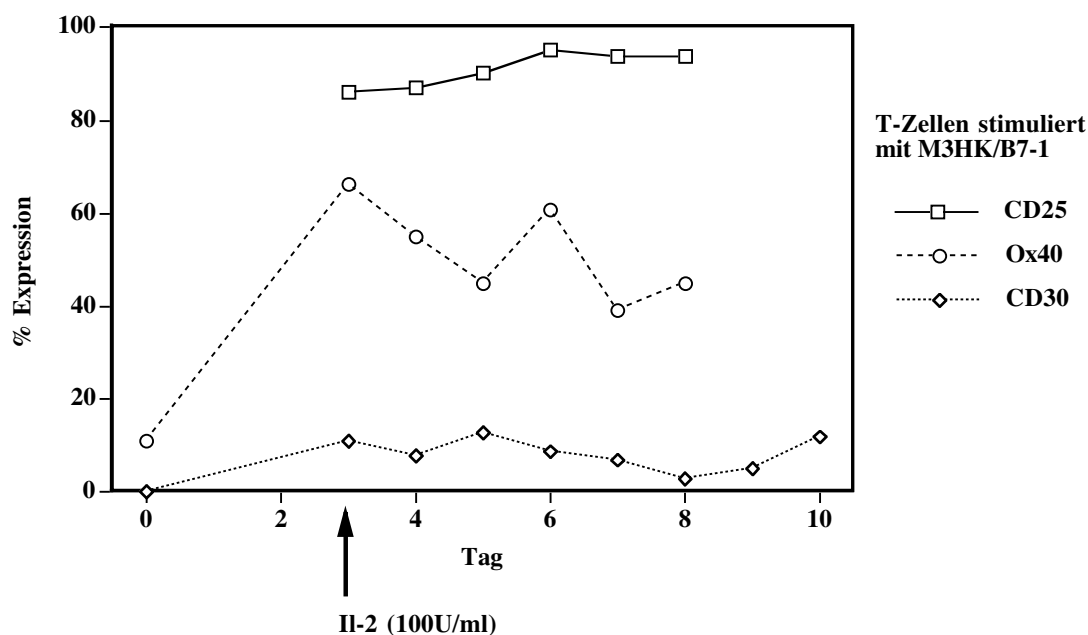


Abb. 18) Verminderte Fähigkeit anderer Spender-T-Zellen CD30 zu exprimieren (vgl. Abb.13) bei gleichbleibend hoher Expression von CD25 und Ox40.

1.7. Expression von CD25, CD30 und Ox40 nach Stimulation der T-Zellen mit PHA, IL-2 oder ConA ohne Zugabe von Melanomzellen

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Induzierbarkeit von CD25, CD30 und Ox40 auf T-Zellen, nach 4-tägiger Stimulation mit verschiedenen unspezifischen Stimuli (PHA, ConA und IL-2) ohne Zugabe von Tumorzellen verglichen. Wie bereits zuvor beobachtet (vgl. Abb. 17), konnte auch bei diesem Ansatz festgestellt werden, dass alleinige Stimulation mit IL-2 die Marker CD30 und CD25 nicht, bzw. nur geringfügig (in manchen Versuchen erreichte CD25 5%) aufzuregulieren vermag. Die Expression von Ox40 dagegen erreichte eine Expression von knapp über 20%. Auch PHA und ConA alleine können die Expression von CD30 nur in sehr geringem Maße beeinflussen (3%), diejenige von CD25 und Ox40 dagegen konnte dagegen auf 20-40% gesteigert werden (Abb. 19).

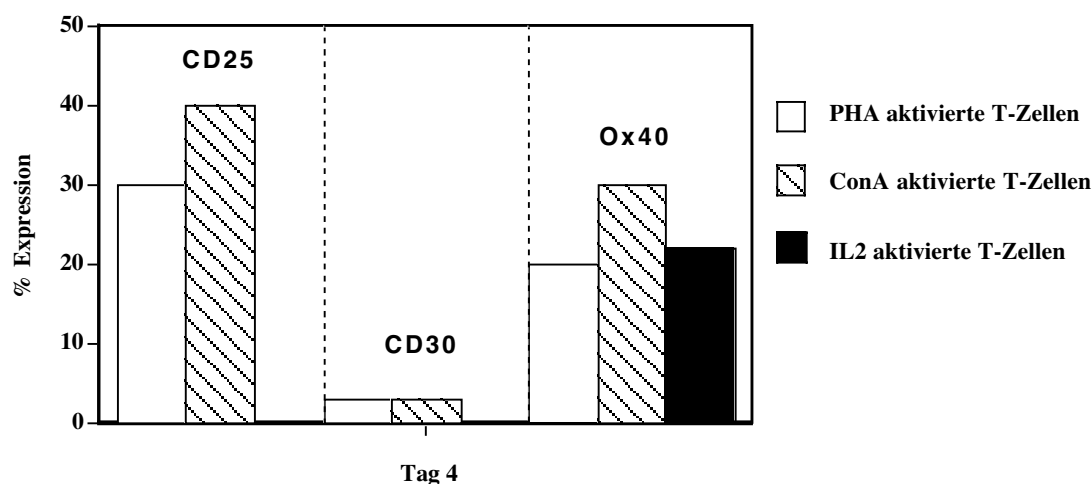


Abb. 19) Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern auf unterschiedlich aktivierten T-Zellen ohne Beteiligung von Melanomzellen.

1.8. Expression von CD25 und CD30 nach Stimulation der T-Zellen mit verschiedenen M3HK-Transfektanten in Anwesenheit von ConA und IL-2

Bei diesem Ansatz sollten die Unterschiede in der Expression der Aktivierungsmarker bei Stimulation mit verschiedenen Transfektanten (M3HK/CD30L*neo*, M3HK/CD30L*hygro*, M3HK/B7-1 sowie M3HK/B7-1+CD30L*hygro*) näher untersucht werden.

Hierbei konnte in zwei aufeinanderfolgenden Experimenten mit T-Zellen verschiedener Spender gezeigt werden, dass B7-1 eine höhere (Abb. 20B) oder gleich hohe Expression des Moleküls CD30 auf den T-Zellen zu induzieren vermag, als die Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30L*hygro*. In keinem Fall war durch die Doppeltransfektante eine höhere CD30-Expression erzielbar als durch M3HK/B7-1. Generell lag jedoch die Expression von CD30 - wie in allen anderen Experimenten - weit unter der von CD25. Dagegen war die Doppeltransfektante in der Lage, eine höhere Expression von CD25 zu induzieren als B7-1 (Abb. 20A). Allerdings hatte sich auch das Ausmaß der Expressionssteigerung von CD25 in den verschiedenen Experimenten als sehr variabel erwiesen. Je nach Eigenschaften der Spender-T-Zellen konnte bei gleichen experimentellen Bedingungen durch B7-1 die Expression von CD25 auf über 90% (Abb. 18) oder aber auch nur auf 40% gesteigert werden (Abb. 21). Durch Stimulation mit M3HK/CD30L*neo* oder M3HK/CD30L*hygro* war die Expression von CD30 auf den T-Zellen kaum beeinflusst (Abb. 20B). CD25 aber konnte durch CD30L auf einigen Spender T-Zellen auf bis zu 38% aufreguliert werden, auf anderen wiederum nur auf 12-15% (Abb. 20A + Abb. 21).

T-Zellen, die ohne Tumorzellen und nur mit ConA + IL-2 inkubiert waren, zeigten wiederum keine Steigerung der Expression von CD30 oder CD25 (Daten nicht gezeigt).

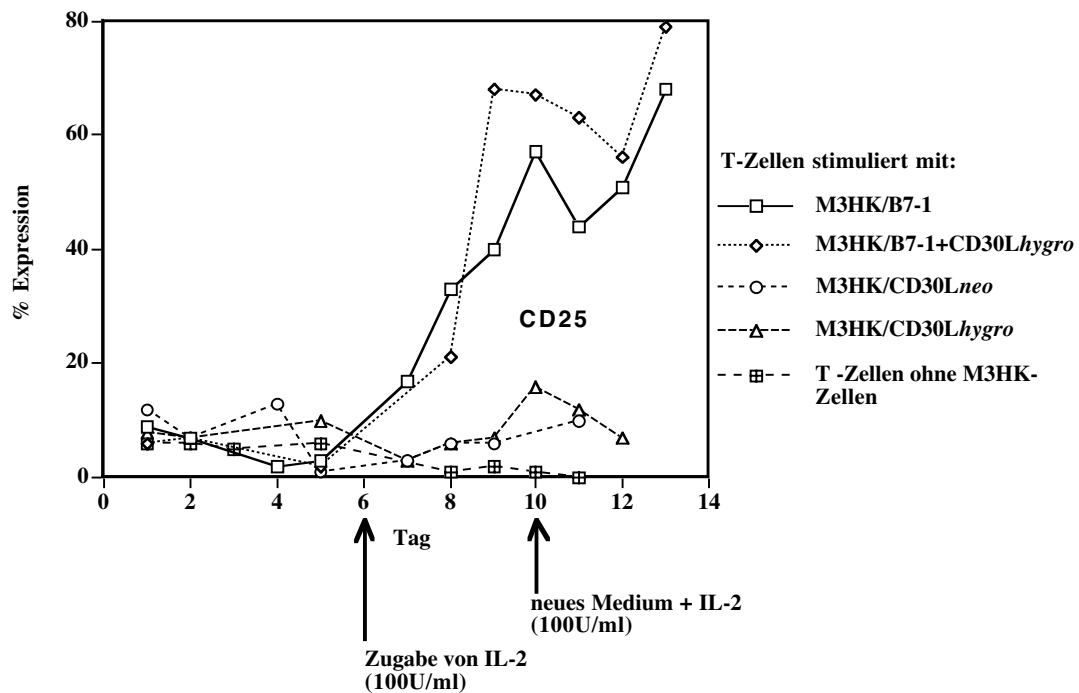


Abb. 20A) Expression von CD25 auf T-Zellen (Spender 2) nach Stimulation mit verschiedenen M3HK-Transfektanten.

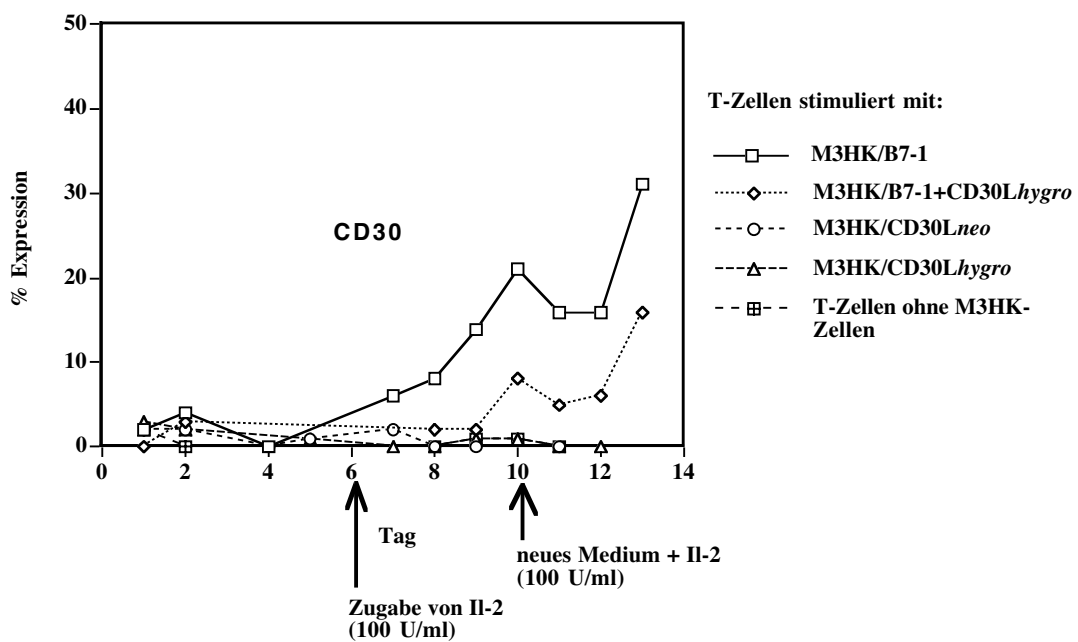


Abb. 20B) Expression von CD30 auf T-Zellen (Spender 2) nach Stimulation mit verschiedenen M3HK-Transfektanten.

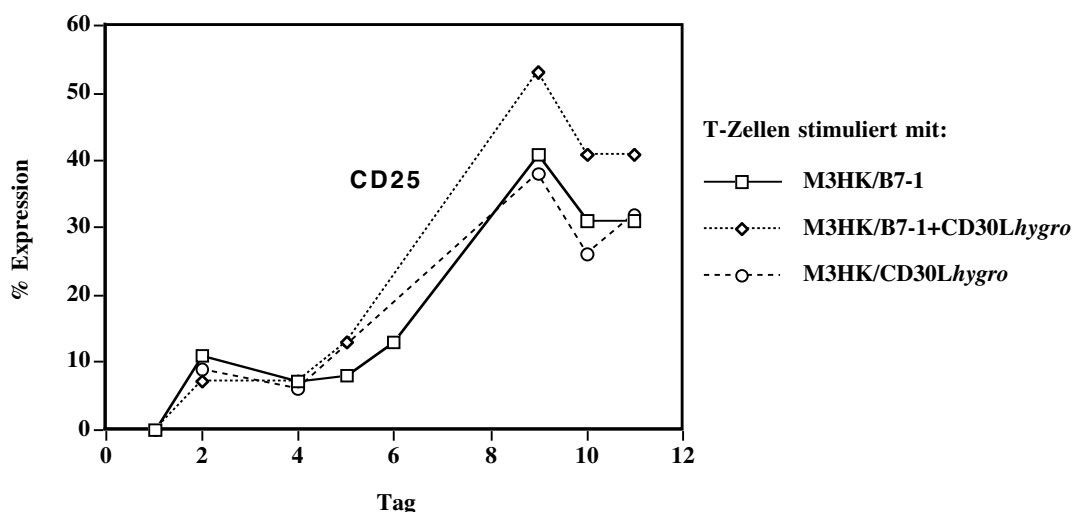


Abb. 21) Expression von CD25 auf T-Zellen (Spender 1) nach Stimulation mit verschiedenen M3HK-Transfektanten.

2. Proliferationsexperimente

In den Proliferationsassays sollte nun getestet werden, inwieweit CD30L und B7-1 auf M3HK-Zellen alleine beziehungsweise in Kombination in der Lage sind, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Diese Ansätze wurden unter verschiedenen Stimulationsbedingungen durchgeführt.

2.1. Proliferationsassays

Allen Assays gemeinsam war, dass T-Zellen ohne Zusatz von Mitogenen oder Tumorzellen nur geringfügig bis gar nicht proliferierten, dagegen eine maximale Proliferation durch Stimulation mit PHA sowie eine submaximale Proliferation durch Stimulation mit ConA (bei niedrigen Konzentrationen von 0.5 $\mu\text{g/ml}$) erreicht werden konnte (Abb. 22). In sechs verschiedenen Assays konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von T-Zellen, die unter Zugabe von IL-2 mit der Doppeltransfektante und ConA stimuliert wurden, die höchsten Werte zu erreichen vermochte. Die Proliferationsraten von mit der B7-1-Transfektante stimulierten T-Zellen lagen dann meist knapp unter denjenigen der Doppeltransfektante (Abb. 23). In anderen Assays (n=3) war dieser Unterschied weniger deutlich oder es zeigten sich unter Stimulation mit M3HK/B7-1 höhere Proliferationsraten als unter Stimulation mit der Doppeltransfektante (Abb. 24 + Abb. 25). Die alleinige Stimulation mit M3HK/CD30L jedoch ergab nie eine signifikante Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den untransfizierten (M3HK) oder den Kontroll-M3HK-Zellen (M3HK/*neo*) (Abb. 23). Die maximal erreichten cpm-

Werte unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen variierten ebenfalls stark von Spender zu Spender. In manchen Versuchen konnten bei Stimulation mit M3HK/B7-1 oder M3HK/B7-1+CD30L mit ConA cpm-Werte von 60000 bis 70000 erreicht werden (Abb. 23), in anderen Experimenten lagen diese nur zwischen 8000 – 9000 (vgl. Abb. 23 + Abb. 24). Auch ohne Zugabe von ConA wurde der Unterschied bezüglich der Proliferation von mit M3HK/CD30L stimulierten T-Zellen im Vergleich mit M3HK/B7-1 stimulierten T-Zellen deutlich (Abb. 25), auch wenn die cpm-Werte dann etwas niedriger waren. Maximale Proliferationsraten wurden in allen Assays zwischen dem 5. und 7. Tag des Experiments erreicht.

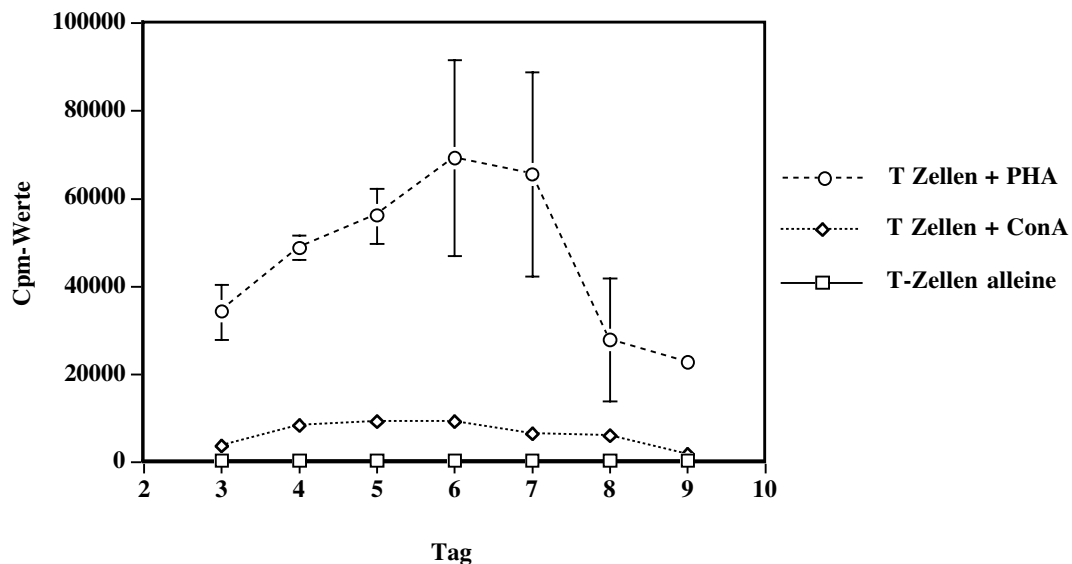


Abb. 22) Vergleich der Proliferation von T-Zellen unter maximaler Stimulation mit PHA oder submaximaler Stimulation mit ConA (0.5 µg/ml). Die Standardabweichungen sind bei allen drei Kurven und jedem Tag angegeben.

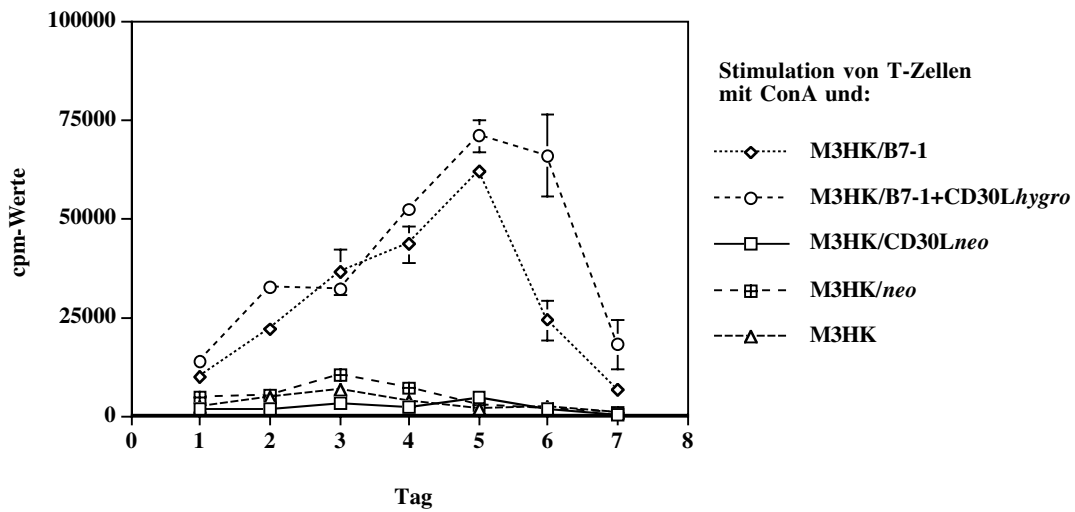


Abb. 23) Vergleich der Proliferation von T-Zellen bei Stimulation mit verschiedenen M3HK-Transfektanten unter IL-2 und ConA Zugabe (Spender 1). Die Standardabweichungen sind bei allen fünf Kurven und jedem Tag angegeben.

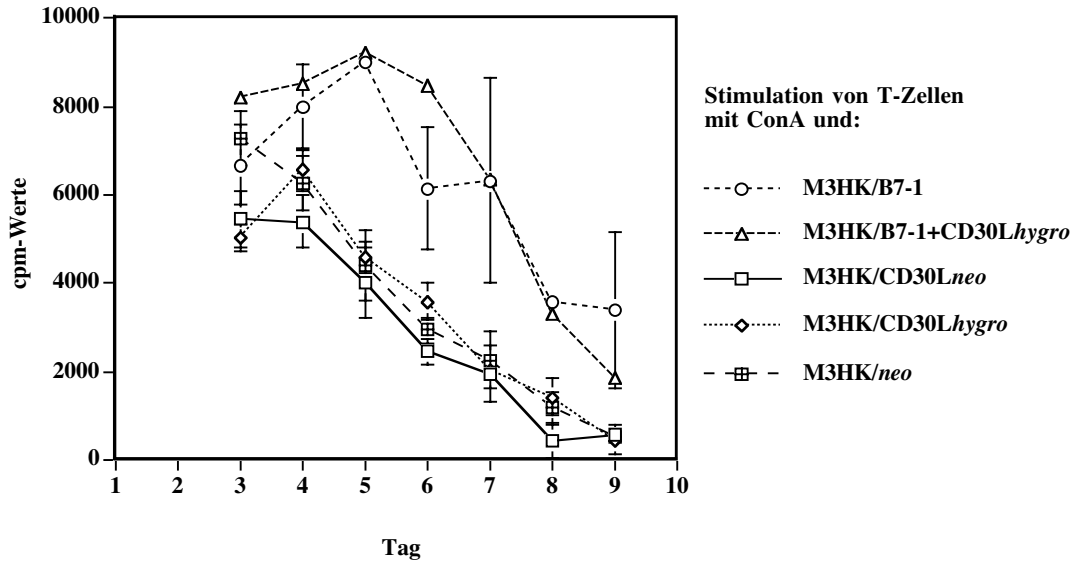


Abb. 24) Vergleich der Proliferation von T-Zellen bei Stimulation mit verschiedenen M3HK-Transfektanten unter IL-2 und ConA Zugabe (Spender 2). Die Standardabweichungen sind bei allen fünf Kurven und jedem Tag angegeben.

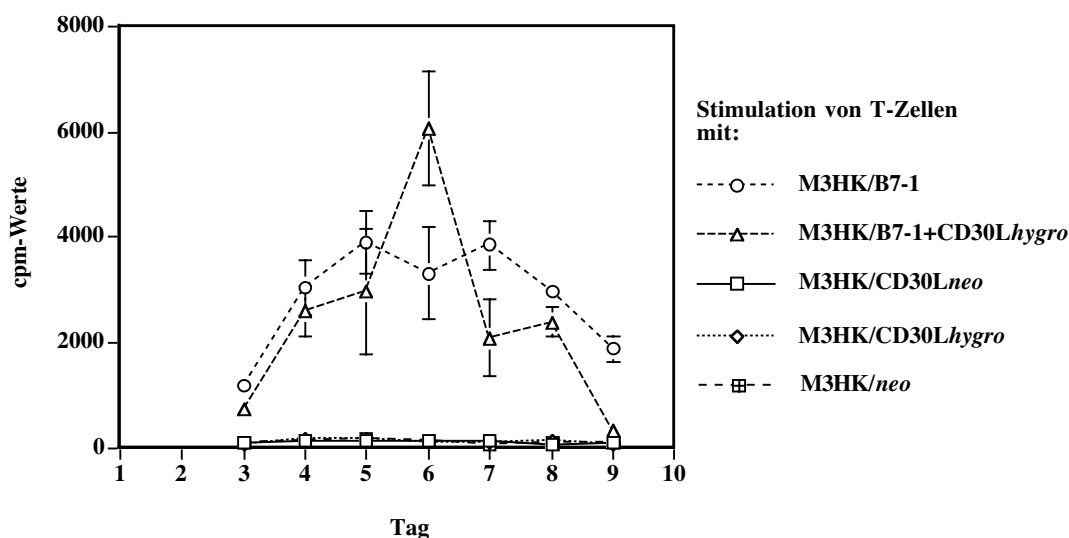


Abb. 25) Vergleich der Proliferation von T-Zellen bei Stimulation mit verschiedenen M3HK-Transfektanten in Gegenwart von IL-2, aber **ohne** ConA (**Spender 2**). Die Standardabweichungen sind bei allen fünf Kurven und jedem Tag angegeben.

3. Restimulationsexperimente

In den Restimulationsassays sollte die Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern von verschieden prä- und restimulierten T-Zellen bestimmt werden. T-Zellen, die 5 Tage lang mit M3HK/B7-1, M3HK/CD30Lneo oder der Doppeltransfektante (M3HK/B7-1+CD30Lhygro) vorstimuliert waren, wurden dazu mit M3HK/B7-1 oder M3HK/CD30L unter verschiedenen Bedingungen restimuliert und die Expression von CD25, CD30 und Ox40 gemessen. Ein weiteres Ziel war es, das Ausmaß der Proliferationsfähigkeit dieser verschieden stimulierten T-Zellen festzustellen.

3.1. Expression von Aktivierungsmarkern bei Prästimulation mit M3HK/B7-1

Ohne die weitere Zugabe von ConA sank bei Restimulation mit M3HK/B7-1 nicht nur die anfänglich hohe Expression von CD25 von über 90% auf 25% ab, sondern auch die Expressionen von CD30 und Ox40 nahmen ab (Abb. 27). Mit ConA jedoch blieb die hohe Expression von CD25 stabil, CD30 stieg von 13% auf 55% an und Ox40 blieb mit Werten zwischen 54% und 65 % ebenfalls relativ stabil (Abb. 26). Durch eine spätere, zweite Restimulation mit neuen M3HK/B7-1-Zellen und erneuter Zugabe von IL-2 und ConA konnte die Expression von CD30 sogar weiter auf 66% gesteigert werden.

Bei Restimulation mit M3HK/CD30L_{neo} unter Zugabe von ConA konnte dagegen festgestellt werden, dass CD30L nicht in der Lage war, die Expression von CD25 (90%) und Ox40 (48%) aufrechtzuerhalten. Die Expression dieser Moleküle sank innerhalb von 4 Tagen auf respektive 50% und 16% ab. Auch die Expression von CD30 konnte durch erneute Stimulation der Zellen mit CD30L nicht wesentlich gesteigert werden. Es konnte lediglich eine kurzzeitige, geringfügige Aufregulation von CD30 und CD25 beobachtet werden (Abb. 28).

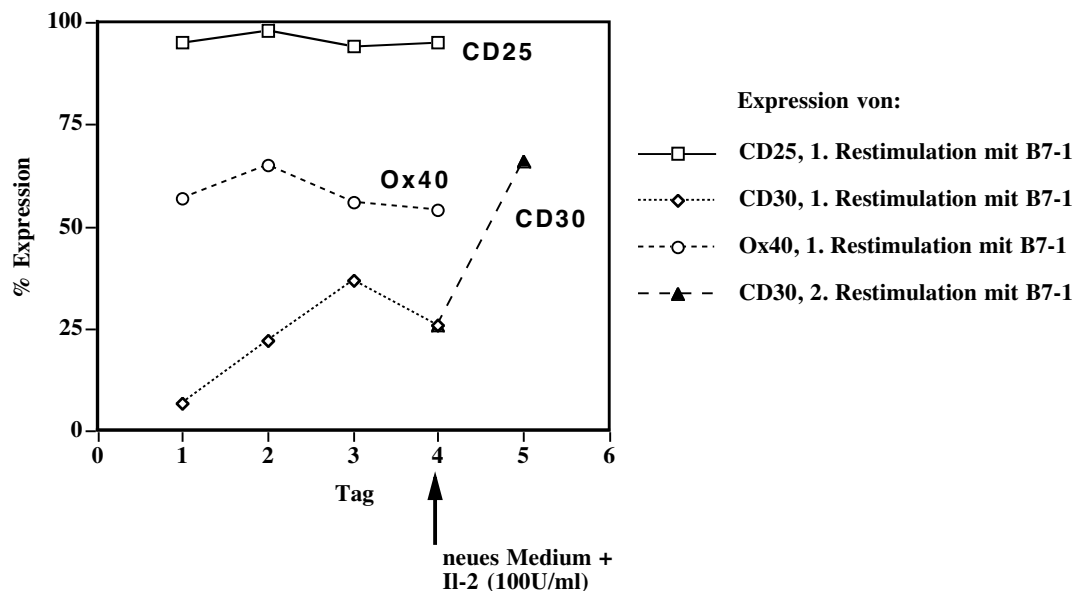


Abb. 26) Vergleich der Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen nach primärer Stimulation mit M3HK/B7-1 und Restimulation mit M3HK/B7-1 unter Zugabe von ConA und IL-2.

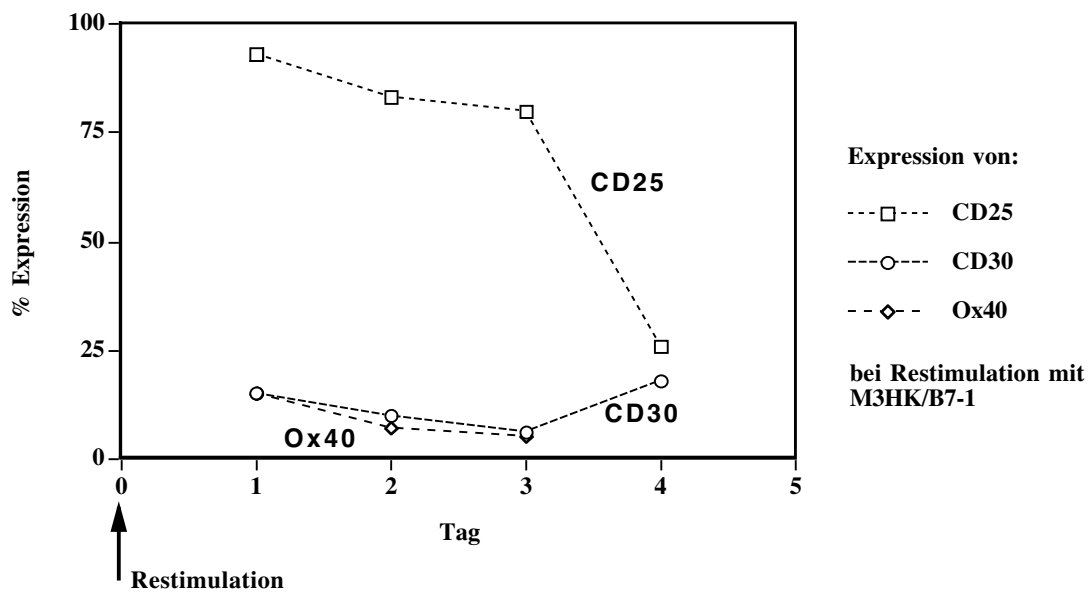


Abb. 27) Vergleich der Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen nach primärer Stimulation mit M3HK/B7-1 und Restimulation mit M3HK/B7-1 **ohne Zugabe von ConA und IL-2.**

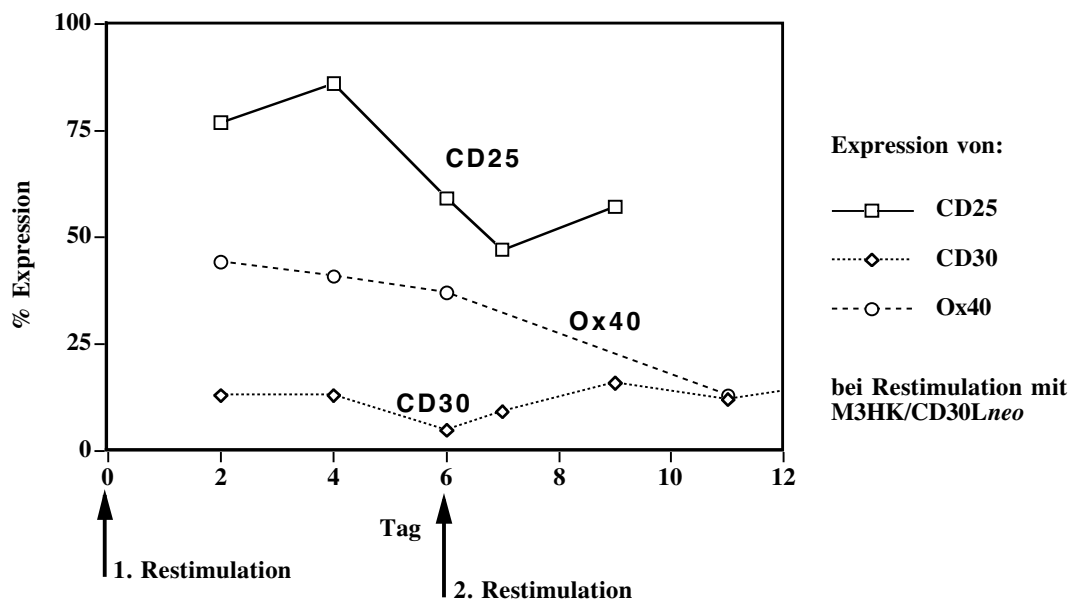


Abb. 28) Vergleich der Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen nach primärer Stimulation mit M3HK/B-1 und Restimulation mit M3HK/CD30Lneo **unter Zugabe von ConA und IL-2.**

3.2. Expression von Aktivierungsmarkern bei Prästimulation mit M3HK/CD30Lneo, M3HK/B7-1 oder der Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30Lhygro

Die Restimulation von mit M3HK/CD30L prästimulierten T-Zellen erwies sich als weniger effektiv als die von mit M3HK/B7-1 vorstimulierten Zellen. Die Expression von CD25 konnte bei Restimulation mit M3HK/B7-1 nicht aufrechterhalten werden, trotz Zugabe von ConA zum Restimulationsansatz. Sie sank von Werten über 80% auf unter 50%. Die Expression von CD30 blieb dabei unverändert niedrig (Abb. 29). Auch ergaben die mit der Doppeltransfektante prästimulierten T-Zellen bei Restimulation mit M3HK/B7-1 keine höhere Expression von CD30 oder CD25 im Vergleich zur Vorstimulation mit M3HK/B7-1. Ganz im Gegenteil lag die Expression dieser Moleküle sogar auf etwas geringerem Niveau als bei Prästimulation mit M3HK/B7-1 (Abb. 30). Auch die Restimulation dieser T-Zellen mit der Doppeltransfektante akzelerierte die Markerexpression nicht. Bei mit M3HK/B7-1 prästimulierten Zellen konnte kein Unterschied in der CD25-Expression beim Vergleich der Restimulation mit M3HK/B7-1 oder der Doppeltransfektante beobachtet werden, CD30 dagegen zeigte eine geringere Expression unter Restimulation mit der Doppeltransfektante (Daten nicht gezeigt). Die Expression von Ox40 zeigte sich bei Prä- und Restimulation mit M3HK/B7-1 als in geringem Maße aufregulierbar, bei einer zweiten Restimulation sank die Expression innerhalb 3 Tagen von 55% auf 12% ab.

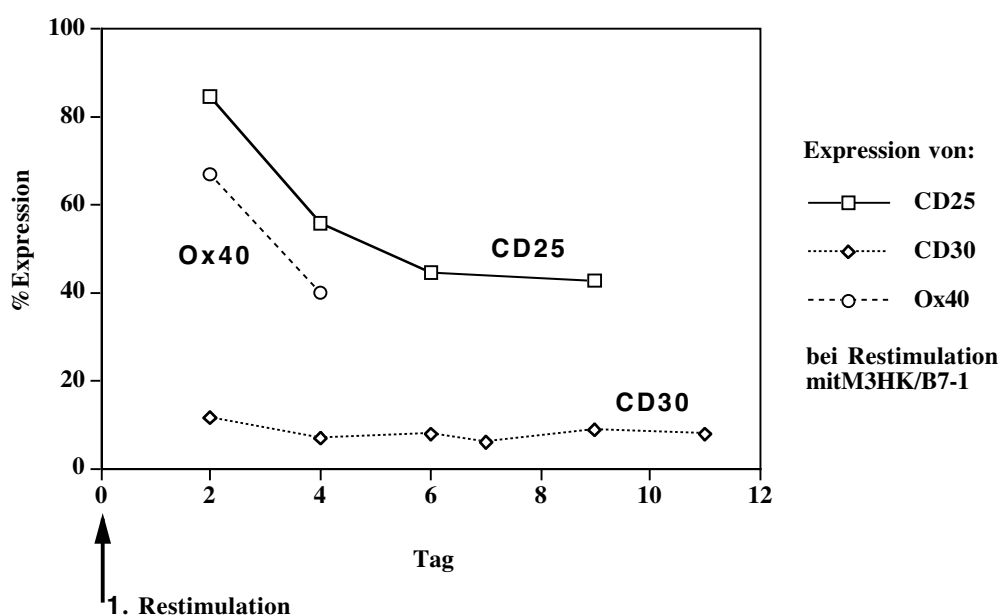


Abb. 29) Vergleich der Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen nach primärer Stimulation mit M3HK/CD30Lneo und Restimulation mit M3HK/B7-1 unter Zugabe von ConA und IL-2.

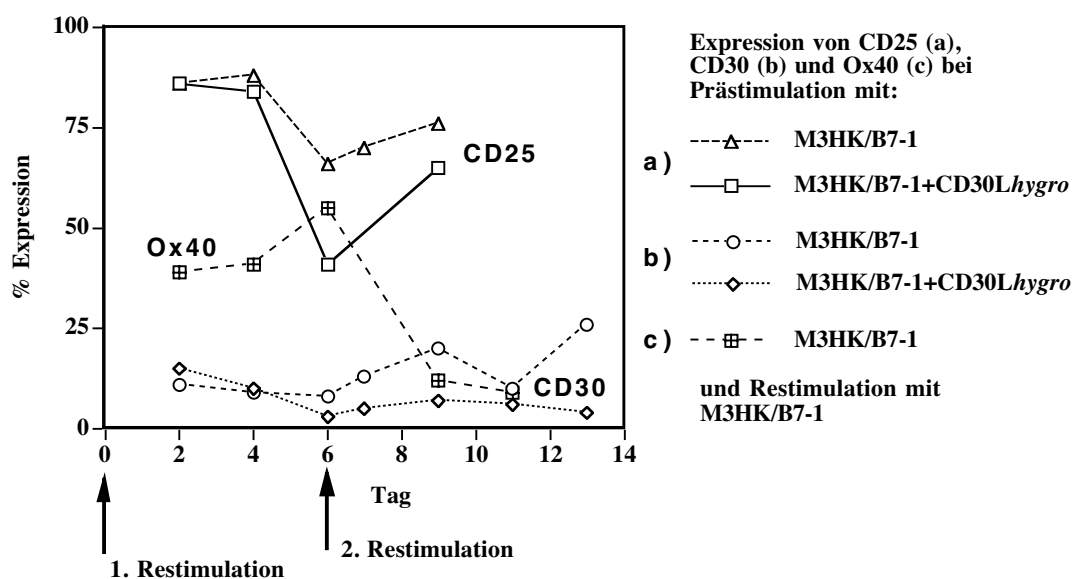


Abb. 30) Vergleich der Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen nach primärer Stimulation mit M3HK/B7-1 oder M3HK/B7-1+CD30Lhygro und Restimulation mit M3HK/B7-1 unter Zugabe von ConA und IL-2.

3.3. Bestimmung der Proliferationsrate bei Restimulation mit M3HK/B7-1

T-Zellen wurden fünf Tage lang mit M3HK/B7-1, M3HK/CD30Lneo oder der Doppeltransfektante vorstimuliert und sodann mit verschiedenen Transfektanten in 96 well Platten restimuliert, um Unterschiede in der nachfolgenden Proliferation zu erfassen. Es gestaltete sich als schwierig, diese Messungen vorzunehmen, da die T-Zellen während der Assays schon zu Beginn abstarben (Abb. 31). Es konnte aber in mehreren verschiedenen Ansätzen dieser Art die Tendenz festgestellt werden, dass die Restimulation von mit B7-1 prästimulierten Zellen durch M3HK/B7-1 zu besseren Proliferationsraten führt, als die nachfolgende Stimulation mit M3HK/CD30Lneo oder der Doppeltransfektante. Beim Vergleich der Restimulation von einerseits mit M3HK/B7-1 und andererseits mit M3HK/CD30L prästimulierten T-Zellen wurde deutlich, dass die Restimulation mit der Doppeltransfektante in beiden Fällen weniger effizient war, als die Restimulation mit M3HK/CD30L oder M3HK/B7-1. Die höchsten Proliferationsraten konnten immer bei mit B7-1 prästimulierten T-Zellen erzielt werden (Abb. 32). Die Proliferationsraten scheinen bei Restimulation mit M3HK/CD30Lneo höher zu liegen, jedoch ist die Hintergrundproliferation mit dieser Transfektante alleine ohne Zusatz von T-Zellen bereits höher als diejenige von M3HK/B7-1 (Abb. 32 + Abb. 33), was die Interpretation dieser Daten erschwert.

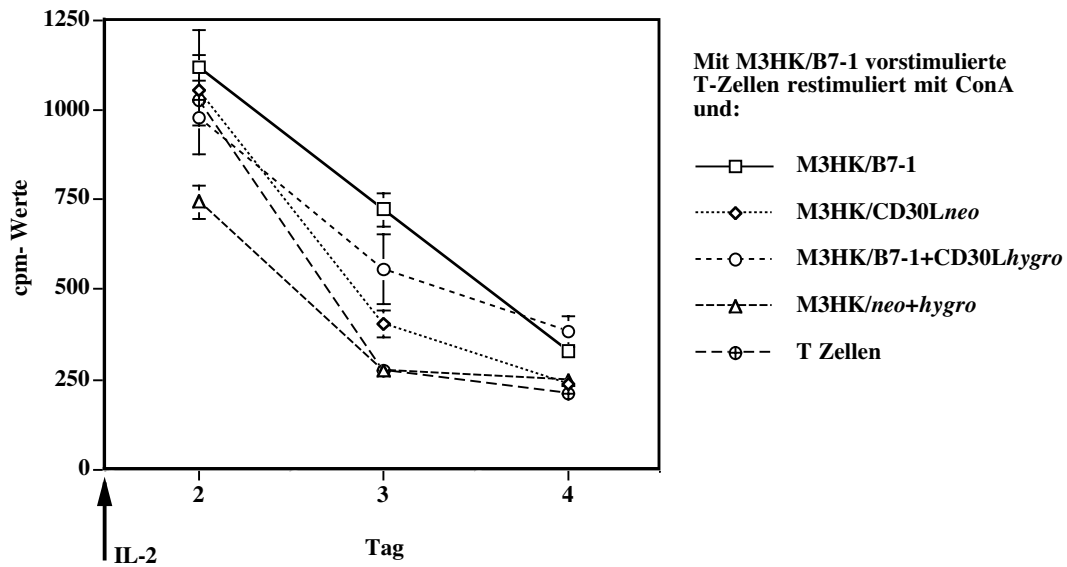


Abb. 31) Vergleich der Restimulation von mit M3HK/B7-1 vorstimulierten T-Zellen durch verschiedene Transfektanten unter Zugabe von ConA.

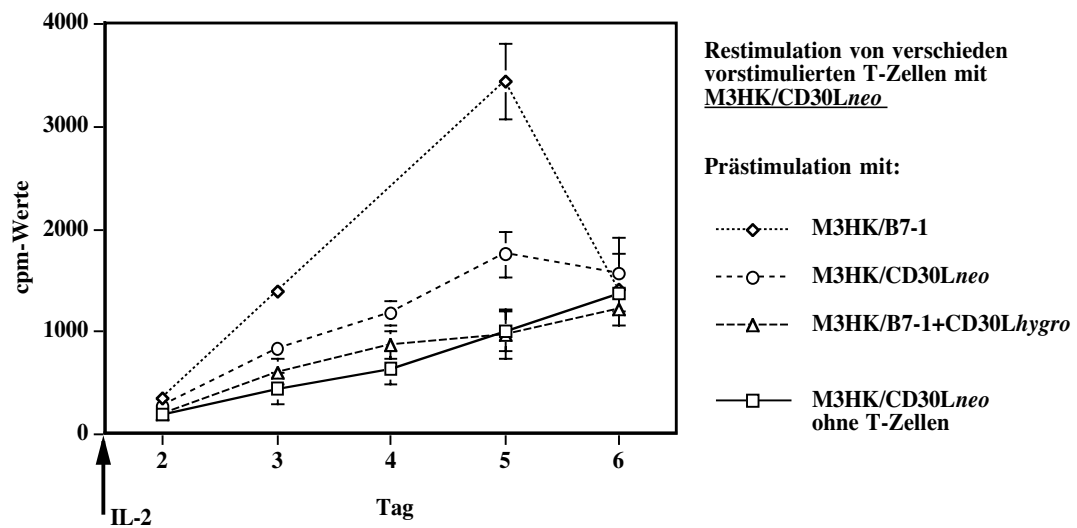


Abb. 32) Bestimmung der Proliferation bei Restimulation von verschieden prästimulierten T-Zellen mit M3HK/CD30Lneo in Anwesenheit von ConA.

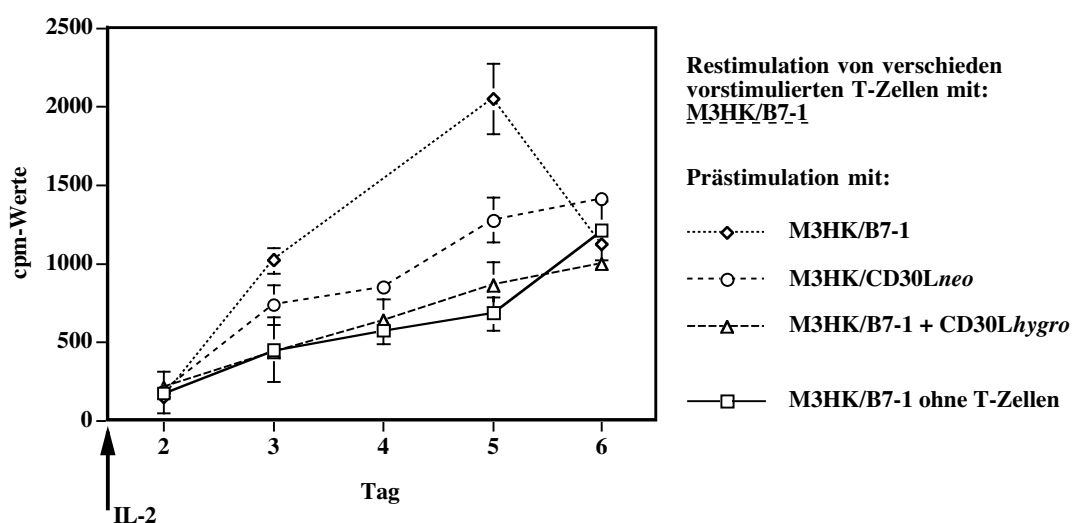


Abb. 33) Bestimmung der Proliferation bei Restimulation von verschieden prästimulierten T-Zellen mit M3HK/B7-1.

3.4. Restimulation von mit PHA, ConA oder IL-2 prästimulierten T-Zellen

Da sich die Messung von Restimulationsassays als so schwierig gestaltete, wurde ein anderer Ansatz gewählt, in welchem T-Zellen, die zuvor entweder mit PHA, ConA oder IL-2 über 5 Tage hinweg vorstimuliert waren, mit M3HK/B7-1 oder M3HK/CD30Lneo restimuliert und dabei die Proliferationsrate bestimmt. Dabei konnte in beiden durchgeführten Versuchen festgestellt werden, dass die Restimulation von mit PHA präaktivierten T-Zellen ohne ConA Zugabe zum Restimulationsansatz mit M3HK/CD30Lneo weniger effektiv war als die Restimulation mit M3HK/B7-1. Mit ConA im Versuchsansatz waren die Effekte genau umgekehrt. Hier führte die Restimulation mit M3HK/B7-1 zu geringerer Proliferation als mit M3HK/CD30L (Abb. 34). Ähnlich verhielt es sich bei den mit ConA vorstimulierten T-Zellen. Bei Restimulation mit M3HK/B7-1 in Gegenwart von ConA konnten geringere Proliferationsraten erzielt werden als durch Restimulation mit M3HK/CD30L oder auch der Kontrolltransfektante M3HK/neo. Ohne Zugabe von ConA zum Restimulationsansatz war die durch M3HK/B7-1 ausgelöste Proliferationsrate dreimal so hoch wie die durch M3HK/CD30L oder die Kontrolle induzierten Rate (Abb. 35).

Bei den mit IL-2 vorstimulierten T-Zellen konnte das Gegenteil beobachtet werden. In Abwesenheit von ConA vermochten M3HK/B7-1-Zellen die Proliferation weniger zu restimulieren als M3HK/CD30L-Zellen, wobei die cpm-Werte nicht signifikant höher waren als die von T-Zellen alleine. Nur unter Zugabe von ConA dagegen konnten mit M3HK/B7-1 signifikant höhere Proliferationsraten erzielt werden (Abb. 36). Die durch

Restimulation mit M3HK/CD30L erreichten Werte dagegen waren sowohl mit als auch ohne Zugabe von ConA entweder genauso hoch oder sogar niedriger als diejenigen der T-Zellen alleine.

Insgesamt kann durch alleinige Prästimulation mit IL-2 ohne einen weiteren Stimulus bei der Restimulation eine weitaus geringere Proliferationsrate erzielt werden, als durch Vorstimulation der T-Zellen mit entweder ConA oder PHA. Dies entspricht, wie unter Punkt 1.6. und 1.7. beschrieben, auch der niedrigen Expression der Aktivierungsmarker. Die suboptimale Prästimulation mit ConA erwies sich für nachfolgende Restimulationen geeigneter als die maximale Prästimulation mit PHA (Abb. 34 + Abb. 35 + Abb. 36). Damit konnten sowohl bei der Restimulation mit M3HK/CD30L unter Gegenwart von ConA als auch mit M3HK/B7-1 ohne Zusatz von ConA die höchsten cpm-Werte erzielt werden. Die Restimulation mit M3HK/B7-1 und ConA war dabei jedoch erneut effektiver als diejenige durch M3HK/CD30L.

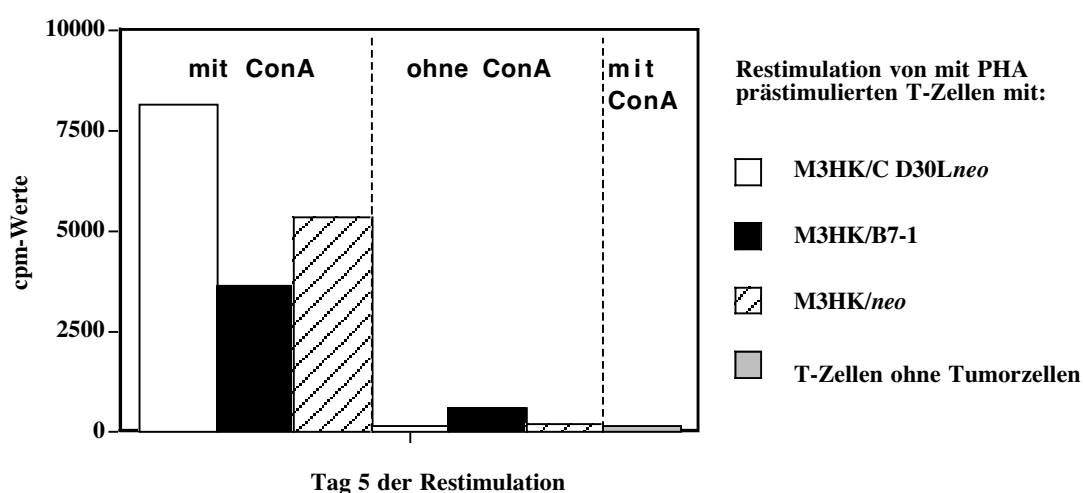


Abb. 34) Vergleich der Proliferationsraten von mit PHA maximal prästimulierten T-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Transfektanten in Abhängigkeit von ConA.

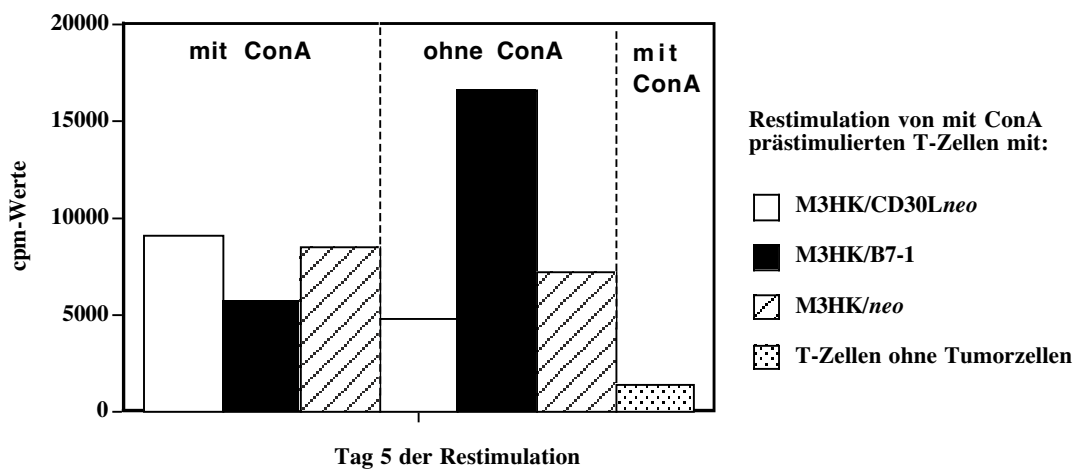


Abb. 35) Vergleich der Proliferationsraten von mit ConA submaximal prästimulierten T-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Transfektanten in Abhängigkeit von ConA.

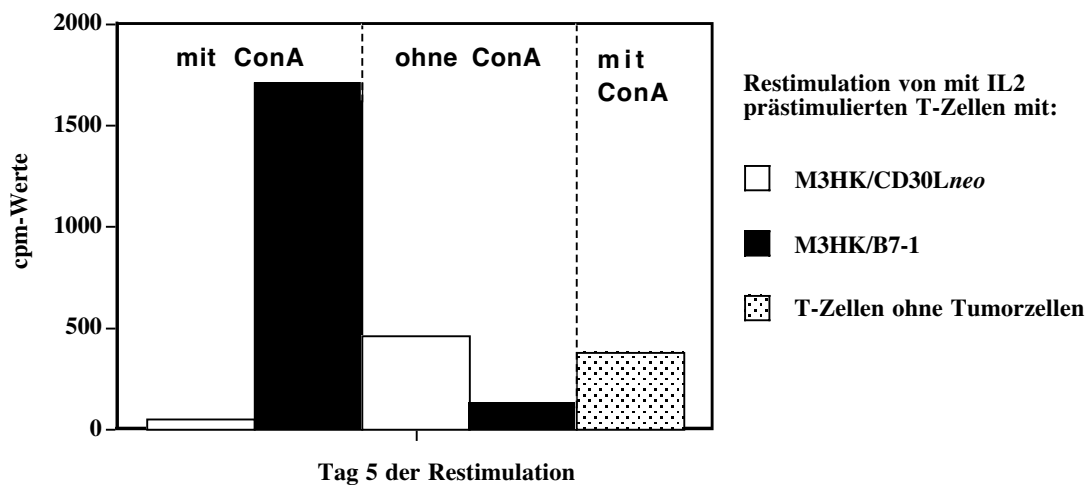


Abb. 36) Vergleich der Proliferationsraten von mit IL-2 prästimulierten T-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Transfektanten in Abhängigkeit von ConA.

V. Diskussion

Das maligne Melanom ist als der mit am stärksten immunogene, solide Tumor zur Modellerkrankung von Immuntherapien geworden (Hemmila und Chang 1999). In den meisten Fällen sind Tumorzellen nicht in der Lage, gegen sie gerichtete Immunantworten auszulösen. Ein Mechanismus von Tumoren, der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen, ist die geringe Expression kostimulatorischer Moleküle auf Tumorzellen, die zu einer spezifischen T-Zell-Anergie (Schwartz 1990) oder zur Apoptose von spezifischen, reaktiven T-Zellen führt (Chen, Linsley et al. 1993). Dagegen können mit kostimulatorischen Molekülen transfizierte Tumorzellen eine effektive Immunantwort auslösen (Chen, Ashe et al. 1992). Ligandierung des CD28 auf T-Zellen durch B7-1 liefert dabei das entscheidende, kostimulatorische Signal für die T-Zellaktivierung und kann die Induktion von Anergie verhindern. Daher kann die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Tumorzellen ein Weg zur Stimulation von einer gegen den Tumor gerichteten T-Zellantwort sein. Von B7-1 konnte dies bereits *in vivo* (Chen, Ashe et al. 1992; Townsend und Allison 1993) und *in vitro* (Döhning, Angman et al. 1994; Gückel, Lindauer et al. 1995) gezeigt werden. Es ist jedoch auch beschrieben, dass B7-1 alleine nicht ausreicht, sondern zusätzliche Moleküle für eine effektive Aktivierung nötig sind (Habicht, Lindauer et al. 1995).

Die Mitglieder der TNFR-Familie werden vor allem auf aktivierten Immunzellen exprimiert und sind über das gesamte Immunsystem verteilt. Die Interaktionen zwischen den Liganden und Rezeptoren spielen in vielen immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Beutler und van-Huffel 1994; Smith, Farrah et al. 1994). Eine gemeinsame Funktion dieser Interaktionen ist die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren (Smith, Farrah et al. 1994; Gravestein und Borst 1998; Kashii, Giorda et al. 1999; Rath und Aggarwal 1999). Auch für CD30 konnte die Fähigkeit, in Tumorzellen Apoptose auszulösen, bereits nachgewiesen werden (Wiley, Schooley et al. 1995; Lee, Park et al. 1996). CD30L wiederum wurde einerseits als kostimulatorisches Molekül für T-Zellen charakterisiert, ist aber auf der anderen Seite in der Lage, auf anaplastischen, großzelligen Lymphom-Zelllinien einen antiproliferativen Effekt auszuüben. Es besteht also Berechtigung zu der Annahme, dass bestimmte Mitglieder der TNF-Familie sowie Zellen, die diese Moleküle exprimieren, eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen Tumoren spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Rolle des CD30L bei der Induktion einer antitumoralen T-Zellantwort am Modell des malignen Melanoms untersucht.

1. Diskussion der Versuchsergebnisse und der methodischen Probleme

1.1. Charakterisierung der Zelllinie M3HK und der Transfektanten

Auch die Zelllinie M3HK exprimierte initial keines der kostimulatorischen Moleküle B7-1 oder B7-2 sowie der Mitglieder der TNF-Rezeptor und -Ligandfamilie CD40L, CD30 oder CD30L. Nach Transfektion der Melanomzellen mit CD30L_{neo}, CD30L_{hygro} und B7-1 sowie anschließender Selektion wurden diese Moleküle stabil und hoch exprimiert und konnten für weitere Versuche eingesetzt werden. Weitere Mechanismen von Tumorzellen, der Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen, bestehen in der Herabregulation von MHC-Klasse-I (HLA-I)- oder der Abwesenheit von MHC-Klasse-II (HLA-II)-Molekülen sowie des Apoptose-induzierenden FasL auf ihrer Oberfläche. Weder die nativen M3HK-Zellen noch die Transfektanten exprimierten FasL und je nach Wachstumsdichte der Tumorzellen wurden HLA-I zu 63-88% exprimiert, HLA-II dagegen nur zu 15-54%. Je dichter die Zellen gewachsen waren, desto geringer war die Expression dieser beiden Moleküle. Aber auch zwischen den einzelnen Transfektanten fanden sich Unterschiede in der Expression von HLA-II. Alle Einzeltransfektanten mit CD30L (sowohl M3HK/CD30L_{neo} als auch M3HK/CD30L_{hygro}) exprimierten HLA-II mit 12-19% deutlich niedriger als im Vergleich zu M3HK/B7-1 (26-65%), oder auch den Kontrollzellen M3HK/*hygro* und den nativen M3HK-Zellen (36-64%). Bei der Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30L_{hygro} dagegen konnte eine höhere Expression dieses Moleküls gefunden werden (36-74%) als bei sämtlichen Einzeltransfektanten, auch wenn diese Werte keine Signifikanz erreichten. Auch die Adhäsionsmoleküle CD58 und CD54 konnten auf den mit CD30L transfizierten M3HK-Zellen in geringerer Expression nachgewiesen werden als auf der Doppeltransfektante, den M3HK/B7-1 oder auch den unbehandelten M3HK-Zellen. Damit werden die Schwierigkeiten der Verwendung von Transfektanten für diese Experimente deutlich: Auch wenn CD30L-Transfektanten eine physiologische Art der Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen ermöglichen, können die Interaktionen anderer, auf den Zellen exprimierter Moleküle Hintergrundeffekte hervorrufen (Powell, Li et al. 1998). Weiterhin ist CD30L ein Molekül, welches in der Lage ist, Signale in zwei Richtungen zu vermitteln. Möglicherweise könnten intrazelluläre Signalwege eine Rolle bei der Herabregulation von HLA-II auf den M3HK-Zellen spielen. Eine weitere Limitation der Interpretation der Daten liegt an der Tatsache, dass lediglich eine einzige Melanom-Zelllinie untersucht wurde. Die Untersuchung verschiedener Zelllinien könnte zu anderen Ergebnissen führen, worin generell eine Schwierigkeit der Etablierung von Vakzinen zu sehen ist.

1.2. Expression von HLA-I und HLA-II

Zwar gibt es Veröffentlichungen, welche beschreiben, dass die vermehrte Expression von HLA-I nicht zu einer gesteigerten, systemischen Antitumorimmunität führt (Sumimoto,

Tani et al. 1997), dennoch sollten bei den vorliegenden Experimenten mögliche Unterschiede in der Aktivierung von T-Zellen aufgrund verschieden hoher HLA-I- und HLA-II-Expression auf den Melanomzellen ausgeschlossen werden. Die Melanomzellen wurden zur Aufregulation dieser beiden Moleküle zwei Tage lang mit IFN γ stimuliert (Mortarini, Belli et al. 1990; Lanza, Peirano et al. 1995; Gastl, Ebert et al. 1996), bevor sie anschließend mit Paraformaldehyd fixiert wurden. HLA-I war bei fast allen Transfektanten 24 h nach Beginn der Stimulation mit IFN γ auf über 95% aufreguliert. Nur bei der M3HK/CD30L*hygro* Transfektante konnte eine Herabregulation der bereits initial hohen Expression von HLA-I durch IFN γ beobachtet werden. Dagegen fand sich nur bei der Transfektante M3HK/CD30L*neo* eine stark verzögerte Aufregulation von HLA-II, eine beschleunigte Herabregulation von HLA-I sowie bei längerer Stimulation mit IFN γ ein schneller Verlust des transfizierten CD30L. Möglicherweise laufen auch hier intrazelluläre Signalprozesse ab, welche diese unterschiedlichen Expressionen von Oberflächenmarkern auf den verschiedenen CD30L-Transfektanten erklären könnten.

1.3. Aktivierung der T-Zellen

1.3.1. Aufregulation von CD30 auf T-Zellen

In den Vorversuchen wurde die Stimulationsfähigkeit von T-Zellen im Hinblick auf die Expression zweier bekannter T-Zell-Aktivierungsmarker (CD25 (= p55 IL-2 Rezeptor) und CD71) sowie die Induzierbarkeit von CD30 durch verschiedene Stimuli untersucht. Da für die T-Zellaktivierung ein kostimulatorisches Signal von B7-1 an seinen Rezeptor CD28 notwendig ist, kann eine Blockade der Interaktion von B7 und CD28 zu vermehrtem Tumorwachstum führen (Yang, Mizuno et al. 1997), so dass B7-1 transduzierte Tumorzellen bereits in verschiedenen Tumormodellen abgestoßen werden konnten (Chen, Ashe et al. 1992; Townsend, Su et al. 1994; Matulonis, Dosiou et al. 1995; Wu, Huang et al. 1995). Daher verwendeten wir für diese Versuche M3HK/B7-1-Zellen, um eine optimale Stimulation der T-Zellen zu erreichen und damit den Effekt der Stimulation durch M3HK/CD30L vergleichen zu können. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Kotransfektion mit CD30L zu einer noch besseren Stimulation führt.

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNFR-Familie (z.B. CD40, CD27), die sich auf den meisten T- und B-Zellen befinden, konnte in verschiedensten Studien gezeigt werden, dass sich der CD30 Rezeptor nicht auf unstimulierten, naiven T-Zellen nachweisen lässt, dass T-Zellen aber durchaus in der Lage sind, CD30 bei Aktivierung durch verschiedene, unspezifische Stimuli aufzuregulieren (Andreesen, Osterholz et al. 1984; Ellis, Simms et al. 1993; Gilfillan, Noel et al. 1998). CD30 findet sich dabei nur auf einer Subpopulation von aktivierten T-Zellen, nämlich den CD45RO⁺ "Memory" T-Zellen, von welchen 85% aus CD4⁺ T-Zellen bestehen (Ellis, Simms et al. 1993).

Auch in unseren Versuchen war die Expression von CD30 auf T-Zellen erst nach Stimulation mit M3HK/B7-1-Zellen in Anwesenheit von IL-2 nachweisbar. Entsprechend den Daten anderer Publikationen (Bowen, Lee et al. 1996; Gilfillan, Noel et al. 1998) war CD30 bereits 24-48 Stunden nach Beginn der Stimulation detektierbar, maximale Expressionen dagegen wurden allerdings erst zwischen dem 5. und 6. Tag des Versuchsansatzes, bzw. 48 bis 72 Stunden nach IL-2 Zugabe, erreicht. Zeitlich verlief die Expression parallel zu derjenigen der T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD71, allerdings begann der Expressionsanstieg von CD25 immer etwa einen Tag vor dem Anstieg von CD30. Auch PHA und ConA alleine konnten eine, wenn auch geringfügige Expression von CD30 auf der T-Zelloberfläche induzieren (3-5%). Im Gegensatz dazu war IL-2 alleine überhaupt nicht in der Lage, CD30 auf T-Zellen aufzuregulieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Zambello et al. (Zambello, Trentin et al. 2000) sowie Ellis et al. (Ellis, Simms et al. 1993) beschrieben. Letzterer konnte zeigen, dass CD30 auf ca. 15% der PBL's nach Stimulation mit PHA und ConA induzierbar ist, jedoch IL-2 oder Anti-CD3 als einzelne Stimuli nicht ausreichten. Nur bei deren Kombination konnte die Expression von CD30 induziert werden (Ellis, Simms et al. 1993). Das bedeutet, dass CD30 auch induziert werden kann, wenn keine akzessorischen, antigenpräsentierenden Zellen vorhanden sind, sondern nur genügend Stimuli vorhanden sind, welche eine komplette T-Zellaktivierung zu vermitteln vermögen. Ellis et al. konnten ebenfalls zeigen, dass Anti-IL-2-Antikörper die Expression von CD30 komplett verhindern und damit die Expression von CD30 zwar zum einen in einem von IL-2 abhängigen Modus geschieht, auf der anderen Seite aber IL-2 alleine offensichtlich kein ausreichendes Signal zur Expression gibt. Die CD30-Expression ist damit wahrscheinlich von IL-2-vermittelten Signalen abhängig, die stattfinden müssen, bevor CD30 exprimiert werden kann. Gilfillan et al. bestätigten, dass sich CD30 nur auf aktivierten T-Zellen befindet und fanden weiterhin, dass die Expression durch CD28 vermittelte Signale reguliert wird, da in CD28 defizienten Zellen keine Aufregulation von CD30 erfolgte und IL-2 ohne CD28 ebenfalls keine Aufregulation von CD30 induzierte (Gilfillan, Noel et al. 1998). Über CD28 vermittelte Signale wiederum führen zur Steigerung der Expression von IL-2 (Thompson, Lindsten et al. 1989; Seder, Germain et al. 1994). In unseren Experimenten stellte sich weiterhin heraus, dass IL-2 alleine, im Gegensatz zu ConA und PHA, auch nicht in der Lage ist, CD25 signifikant aufzuregulieren (2-3%). Zusammenfassend ergibt sich also, dass CD30 unbedingt eine Voraktivierung der T-Zellen braucht (z.B. mit CD28, IL-4, PHA, ConA, antiCD3), um exprimiert zu werden. Eine mögliche Kette von Ereignissen wäre also die initiale Bindung von B7-1 an CD28, woraus die Aufregulation von CD25 (p55 IL-2 Rezeptor) resultiert und dadurch erst die Bereitschaft der T-Zellen auf IL-2 zu reagieren und die Expression von CD30 zu steigern entsteht. Zu dieser Theorie passt auch die Beobachtung, dass CD30⁺ T-Zellen im

Vergleich zu anderen T-Zellen hohe Expressionen an p55 IL-2 Rezeptor (CD25) aufweisen (Ellis, Simms et al. 1993). Außerdem ist ConA zwar in der Lage, CD25 stark aufzuregulieren, CD30 aber nur in geringem Maße. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass nach Induktion von CD25 das weitere Signal von IL-2 fehlt, um CD30 aufzuregulieren. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass Ellis et al. zeigen konnten, dass durch Stimulation der T-Zellen mit ConA und IL-2 zusammen eine höhere Expression von CD30 zu erzielen war, als nach alleiniger Stimulation mit ConA (Ellis, Simms et al. 1993).

Außerdem zeigte sich in einer Reihe von Versuchen, dass die Fähigkeit CD30 auf der T-Zelle hochzuregulieren, bei den unterschiedlichen Spendern stark variierte. Bei einigen konnte die Expression dieses Moleküls auf bis zu 60% gesteigert werden, T-Zellen anderer Spender wiederum konnten CD30 nur geringfügig auf 10-20% aufregulieren, obwohl CD25 wie immer hoch exprimiert wurde. Dies könnte in den verschiedensten Faktoren, wie z.B. unterschiedlicher Vorstimulation der T-Zellen der einzelnen Spender, Erkrankungen oder auch einfach interindividuellen Schwankungen im Sinne von Normvarianten begründet liegen und ist konsistent mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen, in welchen die Fähigkeit der T-Zellen zur CD30-Expression zwischen verschiedenen Individuen beträchtlich variierte (5-38%) (Ellis, Simms et al. 1993). Eine geringe Expression von CD30 liegt damit also nicht generell in einer schlechten Aktivierbarkeit der T-Zellen begründet. Wie auch von Ellis et al. beschrieben, konnte CD30 in unseren Experimenten bei gleicher Kinetik niemals so hoch aufreguliert werden wie CD25 (Ellis, Simms et al. 1993).

Ein weiteres Molekül der TNF-Familie mit ebenfalls potentiell kostimulatorischen Eigenschaften, Ox40 (Ohshima, Yang et al. 1998; Kunitomi, Hori et al. 2000; Walker, Gulbranson-Judge et al. 2000), kann sowohl durch unspezifische Stimuli wie ConA, PHA und IL-2 besser als CD30 auf T-Zellen aufreguliert werden, als auch durch B7-1.

1.3.2. Veränderung der CD4⁺/CD8⁺ Ratio der T-Zellen

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass T-Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen (Stimulation mit M3HK/B7-1 und IL-2), ihre CD4⁺/CD8⁺-Ratio verändern. Diese Ratio betrug am Anfang des Experiments 2,3, mit Beginn der Zugabe von IL-2 begann sie sich stetig zu vermindern, bis sie am Tag 7 den Wert 0,95 erreicht hatte. Dies ist übereinstimmend mit den meisten Veröffentlichungen, die beschreiben, dass die durch B7-1 vermittelte Immunantwort vor allem über die zytolytische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen geschieht und damit diese Subpopulation expandiert wird (Chen, Ashe et al. 1992; Harding und Allison 1993; Townsend, Su et al. 1994; Wu, Huang et al. 1995; Bellone, Iezzi et al. 1997). Bei alleiniger Stimulation der T-Zellen mit IL-2, also

ohne das kostimulatorische Signal von B7-1, konnte dagegen keine Expansion der CD8⁺ Zellen verzeichnet werden. Es wird angenommen, dass Tumorzellen, die eine optimale Kostimulation bereitstellen, ohne weitere Hilfe von T-Zellen direkt CD8⁺ T-Zellen aktivieren (Harding und Allison 1993; Döhning, Angman et al. 1994). Dies wurde auch mit B7-1 transfizierten SkMel63-Melanomzellen gezeigt (Rudy, Gückel et al. 1997). Trotzdem kommt CD4⁺ T-Zellen durch die Sekretion von IL-2 möglicherweise eine Rolle in der Amplifizierung der CD8⁺ T-Zellantwort zu (Bellone, Iezzi et al. 1997). In verschiedenen Tiermodellen wurde die wichtige Rolle von CD4⁺ T-Zellen bei der Auslösung und Erhaltung einer Antitumorantwort beschrieben und damit die Beteiligung beider T-Zell-Subpopulationen an der antitumoralen Immunantwort gezeigt (Hung, Hayashi et al. 1998; Romerdahl und Kripke 1998). CD30 wird zwar vor allem auf dem Th2-Subtyp von CD4⁺ T-Zellen gefunden (Alzona, Jäck et al. 1994; Del Prete, De Carli et al. 1995; Romagnani, Del Prete et al. 1995), kann aber auch von CD8⁺ T-Zellen exprimiert werden (Agrawal, Reddish et al. 1996). In einem weiterführenden Experiment müsste nun bestimmt werden, auf welcher Subpopulation von T-Zellen CD30 in unseren Versuchsbedingungen exprimiert wird. Damit könnte man feststellen, ob der Anteil an CD30⁺ T-Zellen in gleichem Maße abnimmt wie auch der Anteil an CD4⁺ Zellen, was die optimale Stimulation der T-Zellen durch die CD30L tragenden Tumorzellen beeinträchtigen würde. Ob sich die Abnahme der CD4⁺ T-Zellen von 65% auf 40% allerdings stark auf das Aktivierungspotential der Melanomzellen auswirken würde, ist dabei nicht klar.

1.4. Induktion von CD30 auf T-Zellen durch die verschiedenen Transfektanten

B7-1, welches das am besten charakterisierte, kostimulatorische Molekül zur T-Zellaktivierung ist, hatte sich in den Vorversuchen als potenter Induktor von CD30 auf T-Zellen erwiesen. Stimulation der T-Zellen mit M3HK/CD30 $_{Neo}$ oder M3HK/CD30 $_{Hygro}$ beeinflusste die Expression von CD30 auf den T-Zellen dagegen kaum. Auch CD25, welches unter B7-1 Aktivierung immer stark exprimiert wurde und welches ein Indikator der T-Zellaktivierung ist, konnte nur in einem Versuch auf einen Maximalwert von 38% hochreguliert werden. Damit besteht Grund zur Annahme, dass der CD30L alleine nur geringe primäre Stimulationsfähigkeit für T-Zellen besitzt. In zwei aufeinanderfolgenden Experimenten mit T-Zellen verschiedener Spender konnte gezeigt werden, dass B7-1 eine höhere oder ebenso hohe Expression des Moleküls CD30 auf den T-Zellen zu induzieren vermag, wie die Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30 $_{Hygro}$. In keinem Fall war durch die Doppeltransfektante eine höhere CD30-Expression erzielbar als durch B7-1, was im Gegensatz steht zum Aktivierungsmarker CD25, welcher von der Doppeltransfektante besser induziert werden konnte. CD30L alleine ist also nicht in der Lage, die Expression von CD30 zu induzieren, hat aber trotzdem einen stimulierenden

Effekt auf T-Zellen, da es CD25 zu einem geringen Prozentsatz aufzuregulieren vermag. Dies war auch sichtbar an der Doppeltransfektante, die CD25 zu einem höheren Prozentsatz induzieren konnte, als B7-1 alleine. Auf die CD30-Expression hatte CD30L jedoch auch in Kombination mit B7-1 keinen verstärkenden, sondern möglicherweise sogar einen unter bestimmten Umständen inhibierenden Effekt.

1.5. Proliferationsassays

Verschiedenste Arbeiten beschreiben die Fähigkeit von CD30L, über Bindung an seinen Rezeptor CD30 die Proliferation von sowohl T- und B-Zellen als auch verschiedener Zelllinien zu vermitteln (Smith, Farrah et al. 1994; Alderson 1995; Hsu und Hsu 2000). In anderen Zelllinien dagegen konnte durch CD30L entweder kein proliferationsinduzierender Effekt beobachtet werden oder es erfolgte sogar die Induktion von Apoptose (Amakawa, Hakem et al. 1996; Lee, Park et al. 1996; Gilfillan, Noel et al. 1998). Diese Dichotomie ist von anderen Mitgliedern der TNFR-Familie bereits bekannt und kann möglicherweise durch den zellulären Kontext, in welchem ein Signal weitergeleitet wird, erklärt werden. Auch B7-1 ist in der Lage, bei Expression auf murinen Tumorzellvarianten die Immunogenität eines Tumors zu steigern (Chen, Ashe et al. 1992; Townsend und Allison 1993; Rudy, Gückel et al. 1997) und T-Zellen zu aktivieren (Fraser, Irving et al. 1991; Townsend und Allison 1993; Lanier, O'Fallon et al. 1995). Dabei scheint die T-Zellaktivierung unabhängig von der Expressionsdichte dieses Moleküls auf den Tumorzellen zu sein (Rudy, Gückel et al. 1997).

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen wiederum, dass die alleinige Stimulation von T-Zellen mit CD30L keine signifikante Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den untransfizierten (M3HK) oder den Kontroll-M3HK-Zellen (M3HK/*neo*) ergab. Das kostimulatorische Signal von CD30L reichte auf den B7-1 negativen Tumorzellen zwar aus, um, wie oben beschrieben, die Expression von geringen Mengen CD25 auf T-Zellen zu induzieren, nicht jedoch die Proliferation der T-Zellen anzuregen oder CD30 signifikant aufzuregulieren und über diesen Rezeptor proliferationsfördernde Signale zu vermitteln. Es wäre möglich, dass durch die Kostimulation mit CD30L entweder bereits in geringem Maße exprimierte CD30 Rezeptoren angesprochen werden oder äußerst geringe Mengen an CD30 induziert werden und durch das darüber vermittelte Signal CD25 aufreguliert wird, weitere T-Zellaktivierungseffekte jedoch nicht möglich sind. Eine weitere Erklärung wäre, dass das durch CD30L vermittelte Signal zur Abspaltung des induzierten CD30 führt (Hansen, Kisselva et al. 1995), dieser dadurch mittels FACS-Analyse nicht mehr nachweisbar ist und damit auch keine Proliferationssignale mehr an die Zelle weitergeleitet werden können. Interessant wäre es daher, im Überstand mittels Elisa den löslichen CD30 (sCD30) zu messen.

Obwohl die Doppeltransfektante geringere Mengen an CD30 auf T-Zellen zu induzieren vermag, war in sechs verschiedenen Proliferationsassays mit T-Zellen verschiedener Spender die Tendenz erkennbar, dass mit der Doppeltransfektante M3HK/B7-1+CD30L_{neo} höhere Proliferationsraten zu erzielen sind, als mit der Einzeltransfektante M3HK/B7-1. Auch wenn die Proliferationsraten von mit M3HK/B7-1 stimulierten T-Zellen meist nur geringfügig unter denjenigen der Doppeltransfektante lagen, ist ein synergistischer Effekt von CD30L und B7-1 bei der T-Zellstimulation durchaus möglich. In drei anderen Assays war jedoch genau der umgekehrte Effekt zu sehen: Unter Stimulation mit M3HK/B7-1 waren höhere Proliferationsraten zu verzeichnen als unter Stimulation mit der Doppeltransfektante. Da in unseren Versuchsbedingungen nicht mit Zelllinien, sondern mit frisch isolierten T-Zellen immer anderer Spender und damit immer anderem zellulären Kontext gearbeitet wurde, kann dies auch durch die verschiedenen Spender-T-Zellen bedingt sein und wird auch durch die von Spender zu Spender stark variierenden, maximal erreichten Einbauraten von ³H-Thymidin in den Proliferationsassays verdeutlicht. In manchen Versuchen konnten bei Stimulation mit M3HK/B7-1 oder M3HK/B7-1+CD30L_{neo} cpm-Werte von 60000 bis 70000 erreicht werden, in anderen Experimenten wurden unter gleichen Versuchsbedingungen nur Werte von 8000 – 9000 cpm erreicht. Auch mögen die gewählten experimentellen Bedingungen nicht optimal gewählt sein. Es ist beschrieben, dass Antigendichte und die spezifische Mikroumgebung entscheidend für den letztendlich vermittelten Effekt der TNF-Rezeptoren und -Liganden sind (Smith, Farrah et al. 1994). Da diese Bedingungen in vitro nicht strikt reproduziert werden können, ist die Rolle dieser Moleküle nur schwer erfassbar. Möglichkeiten der Variation der experimentellen Bedingungen bestehen beispielsweise in der Verwendung eines einzigen, gut geeigneten T-Zellspenders oder der Verwendung von T-Zellklonen, einer Veränderung der Effektor-Target-Zell-Ratio, der Elimination von IL-2 oder auch dem unspezifischen Stimulus ConA aus dem Versuchsansatz. Dass die gegensätzlichen Effekte des CD30L nicht auf Mutationen im CD30 Gen zurückzuführen sind, konnte von Jung et al. bereits ausgeschlossen werden (Jung, Krueger et al. 1994). Konsistent in allen Assays war aber der Zeitpunkt der maximalen Proliferation, der, entsprechend dem Zeitpunkt der höchsten CD25- und CD30-Expression, immer zwischen dem 5. und 7. Tag des Experiments lag.

In den hier beschriebenen Versuchen werden die Probleme der Forschung auf dem Gebiet der Tumorimmunologie deutlich: In vitro Bedingungen können nur schwer die in vivo Bedingungen widerspiegeln, daher sind Aussagen bezüglich der Effekte im Patienten schwierig, insbesondere bei einem Molekül, welches zu einer Familie gehört, die so entgegengesetzte Endpunkte wie Zelltod oder Proliferation bewirken können.

1.6. Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen bei Restimulation mit verschiedenen Transfektanten

Da CD30L als primärer Stimulus keine Aufregulation von CD30 oder T-Zellproliferation zu induzieren vermochte, sollte seine Rolle bei der Vermittlung eines auf die primäre Stimulation mit B7-1 folgenden, zweiten Signals ermittelt werden. Gilfillan et al. konnten zeigen, dass das über CD30 vermittelte Signal als Kostimulus für präaktivierte T-Zellen wirkt und dazu beitragen kann, deren Proliferation zu steigern (Gilfillan, Noel et al. 1998). Problematisch ist dabei die Verfügbarkeit der T-Zellen. Aus einem buffy coat können kaum genug T-Zellen gewonnen werden, um einen Proliferationsassay durchzuführen, der die Stimulierbarkeit der T-Zellen anzeigt sowie die Durchführung eines nachfolgenden Restimulationsassays ermöglicht.

Am effektivsten von allen durchgeführten Kombinationen der Prä- und Restimulation erwies sich die Prä- und auch nachfolgende Restimulation mit M3HK/B7-1. Im Gegensatz zur Restimulation mit M3HK/CD30L_{neo} (bei welcher erst bei der 2. Restimulation eine geringfügige Aufregulation nur von CD25 und CD30 nicht aber von Ox40 erfolgte) konnte hierbei bereits bei der ersten Restimulation eine Aufregulation von CD30 beobachtet werden, die bereits hohe Expression von CD25 und Ox40 dagegen wurde in Anwesenheit von ConA und IL-2 kaum beeinflusst. Ohne IL-2 und ConA sank jedoch die Expression von sowohl CD30, Ox40 als auch CD25 rasch ab. Bei einer zweiten Restimulation mit B7-1, 4 Tage nach der ersten Restimulation, konnte die Expression von CD30 sogar um 20% mehr gesteigert werden als im Vergleich zur alleinigen Zugabe von neuem Medium mit IL-2, worunter jedoch auch eine weitere Aufregulation von CD30 um ca. 10% beobachtet werden konnte. Möglicherweise benötigt CD30 zur Aufregulation der Expression mehrere aufeinanderfolgende spezifische oder unspezifische Stimuli, was die Durchführung weiterer Experimente deutlich erschwert, da immer mehr T-Zellen absterben, je länger sie in Kultur gehalten werden. Bei Restimulation mit CD30L war erst bei der zweiten Restimulation – und auch da nur in geringem Maße – ein Anstieg der CD30 (7%) und CD25 (10%) Expression zu verzeichnen. Ox40 sank dabei sogar kontinuierlich ab.

Beim Vergleich der Prästimulation mit verschiedenen Transfektanten stellte sich heraus, dass bei Prästimulation mit CD30L eine nachfolgende Restimulation mit B7-1 die initial hohe Expression von CD25 und Ox40 nicht aufrechterhalten kann. Es ist jedoch nicht klar, ob diese hohe Expression durch die Primärstimulation mit CD30L oder erst durch die Restimulation mit B7-1 zustande kam, da in mehreren Experimenten nachgewiesen wurde, dass die Stimulation mit CD30L auch CD25 nur geringfügig aufregulieren kann. Auch die mit der Doppeltransfektante prästimulierten T-Zellen konnten bei Restimulation mit B7-1 keine höhere Expression von CD30 oder CD25 im Vergleich zur

Vorstimulation mit B7-1 aufbringen. Ganz im Gegenteil war die Expression dieser Moleküle sogar etwas geringer als bei Prästimulation mit B7-1.

Damit scheint CD30L weder bei der Prästimulation noch im Rahmen der Restimulation eine starke Aktivierung von T-Zellen zu ermöglichen.

1.7. Restimulationsassays

Bei den Restimulationsassays traten Probleme bei den Messungen auf, da die T-Zellen während der Assays schon zu Beginn abstarben. Beim Design dieses Assays gibt es verschiedenste Punkte, an welchen ein methodischer Fehler auftreten bzw. die Methodik noch optimiert werden kann: (1) Die T-Zellen können zum gewählten Zeitpunkt der Restimulation in der refraktären Phase sein. Daher müsste für jede Art der Prästimulation der optimale Zeitpunkt der Restimulation mit den verschiedenen Transfektanten ermittelt werden um zu sehen, wann die Zellen nicht restimulierbar sind oder wann sie zu empfindlich sind und auf ein erneutes Aktivierungssignal infolgedessen absterben. (2) Die Effektor-Targetzell-Ratio kann nicht optimal gewählt sein. (3) Der Einfluss von ConA und IL-2 im Versuchsansatz muss genauer definiert werden. (4) Auch wenn kürzlich die Resistenz von Antitumor-T-Zellen gegenüber Fas-induzierter Apoptose beschrieben wurde (Rivoltini, Radrizzani et al. 1998) besteht die Möglichkeit, dass FasL durch die Stimulation der Tumorzellen mit IFN γ aufreguliert wird und in den T-Zellen bei nachfolgenden Stimulationen Apoptose induziert (Hahne, Rimoldi et al. 1996; Strand, Hofmann et al. 1996). Beispielsweise wurde in M3HK/B7-1-Zellen auch der CD30-Rezeptor nach Stimulation mit IFN γ aufreguliert (Daten nicht gezeigt). Daher müsste weiterhin untersucht werden, ob CD30L ebenfalls durch IFN γ auf den Tumorzellen induzierbar ist oder ob er auf den T-Zellen nach Primärstimulation aufreguliert wird und damit mit unseren Versuchen interferierende Signalwege, wie z.B. Apoptose der T-Zellen, ausgelöst werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das auf T-Zellen exprimierte CD30-Molekül abgespalten wird (Hansen, Kisselva et al. 1995), folglich als sCD30 vorliegt und sich durch Blockade des CD30L störend auf die Aktivierung der T-Zellen auswirkt. Aus diesen Gründen müsste die Expression aller Oberflächenmoleküle nochmals nach Stimulation der M3HK-Transfektanten mit IFN γ gemessen werden.

Trotz allem konnte in verschiedenen Assays die Tendenz festgestellt werden, dass die Prästimulation mit M3HK/B7-1 und Restimulation durch M3HK/B7-1 zu besseren Proliferationsraten führt, als die Restimulation durch M3HK/CD30L $_{neo}$ oder auch der Doppeltransfektante. Allerdings konnten lediglich in einem Assay, welches noch mit bestrahlten Melanomzellen durchgeführt wurde, Proliferationsraten mit mehr als 1000 cpm-Werten nachgewiesen werden. Obwohl als Kontrolle immer auch die Proliferation von Melanomzellen ohne Zusatz von T-Zellen gemessen wurde, ist es jedoch nicht ganz

sicher, welcher Anteil davon nur von den T-Zellen stammt, da einzelne Melanomzellen die Bestrahlung überlebten, sich nach einigen Tagen wieder erholt hatten und proliferierten.

Die mit M3HK/CD30L_{neo} vorstimulierten T-Zellen erzielten bei Restimulation immer geringere Proliferationsraten, als mit M3HK/B7-1 vorstimulierte T-Zellen. Zusammen mit den anderen Ergebnissen der Rezeptoraufregulation sowie den Proliferationsassays lässt sich daraus schließen, dass CD30L bei der primären T-Zellaktivierung eher eine untergeordnete Rolle spielt. Mit B7-1 vorstimulierte T-Zellen ergaben bei Restimulation mit CD30L bei verschiedenen Spendern wiederum unterschiedliche Ergebnisse: Die Proliferationsraten waren zum Teil höher als mit B7-1 restimulierten T-Zellen, manchmal aber auch niedriger. Die Doppeltransfektante war weder in ihrer Rolle als Prästimulus noch als Restimulus in der Lage, verstärkte Proliferationsraten im Vergleich zu den Einzeltransfektanten hervorzurufen. Möglicherweise wirkt die Kombination aus CD30L und B7-1 nur bei einer initialen Stimulation, also bei den Proliferationsassays synergistisch und demnach T-zellaktivierend, bei einer Stimulation von bereits aktivierten T-Zellen dagegen inhibierend. In diesen Ergebnissen wird deutlich, wie diffizil das Netzwerk der Signalprozessierung bei der T-Zellaktivierung ist und wie schwer standardisierbar daher die Entwicklung einer solchen Vakzine ist. Die genauen Funktionen von CD30L und seinem Rezeptor müssen noch detaillierter charakterisiert werden, um genau zu verstehen, unter welchen Umständen dieses Rezeptor/Ligandenpaar welche Signalisierungswege vermittelt. Es ist auch bekannt, dass CD30 ebenfalls involviert ist in Signalwege, die in den Zelltod münden (Amakawa, Hakem et al. 1996). Unter welchen Umständen dies geschieht, ist noch nicht geklärt und könnte ein Schlüssel zu den vorliegenden unterschiedlichen Ergebnissen sein.

1.7.1. Restimulationsassays mit PHA-, ConA- und IL-2-präaktivierten T-Zellen

Da sich die Messung von Restimulationsassays als so schwierig gestaltete, wurde ein anderer Ansatz gewählt, in welchem T-Zellen entweder mit PHA, ConA oder IL-2 über 5 Tage hinweg vorstimuliert und anschließend unter Messung der Proliferationsrate mit M3HK/B7-1 oder M3HK/CD30L_{neo} restimuliert wurden. Diese Vorgehensweise ermöglichte es weiterhin, mit weniger T-Zellen für die Prästimulation auszukommen.

Es wurde deutlich, dass die mit diesem Versuchsansatz erzielten Proliferationsraten stark abhängig sind von der Stärke und Art des primären Stimulus. So erwies sich die suboptimale Prästimulation mit ConA als geeigneter für nachfolgende Restimulationen als die maximale Prästimulation mit PHA. Es konnten nach Prästimulation mit ConA in der Restimulation höhere Proliferationsraten erzielt werden als bei Prästimulation mit PHA, was möglicherweise daran liegt, dass die Stimulation mit PHA so stark ist, dass die T-Zellen am Tag 5 entweder immer noch in der refraktären Phase, oder nach maximaler

Stimulation weniger gut in der Lage sind zu proliferieren. Trotzdem zeigte sich in beiden Fällen, dass CD30L in präaktivierten T-Zellen proliferationsfördernde Eigenschaften aufweist. In Anwesenheit von ConA konnten jeweils sogar höhere Proliferationsraten erzielt werden als bei Restimulation mit B7-1. Wenn kein ConA zugegeben wurde, war dieser Effekt jedoch nicht mehr zu sehen, und die Restimulation mit B7-1 ergab deutlich höhere Proliferationsraten. Möglicherweise ist das Restimulationssignal von B7-1, wenn es zusammen mit ConA gegeben wird, wiederum zu stark und die Zellen werden apoptotisch.

Durch alleinige Prästimulation mit IL-2 ohne einen weiteren Stimulus konnten erwartungsgemäß nur sehr geringe Proliferationsraten erzielt werden. IL-2 ist nicht in der Lage, CD30 aufzuregulieren, darum ist die nachfolgende Stimulation mit CD30L weitgehend erfolglos, so dass die Proliferationsraten selbst unter ConA-Anwesenheit weit unter denjenigen von mit B7-1 restimulierten Zellen liegen. Ohne ConA-Zugabe werden nur äußerst geringe Proliferationsraten erzielt (200-500cpm), womit deren Aussagekraft als eher gering einzustufen ist.

Durch die vorliegenden Ergebnisse wird erneut die Schwierigkeit bei der Interpretation dieser Experimente deutlich. Der Effekt von CD30L auf T-Zellaktivierung und -proliferation ist stark abhängig vom Aktivierungszustand der eingesetzten T-Zellen und auch von den gewählten experimentellen Aktivierungsbedingungen. Dadurch ist es unter diesen Bedingungen schwierig vorherzusehen, ob und unter welchen Bedingungen CD30L sich als kostimulatorisches Molekül eignet. Es ist nachweisbar, dass er proliferations- und aktivierungssteigernde Aktivität besitzt, unter welchen Umständen dies allerdings geschieht und unter welchen Bedingungen dieser Ligand eher Apoptose induziert, ist ebensowenig bekannt wie die Bedingungen, unter welchen die Abspaltung des sCD30 von den T-Zellen erfolgt und damit die Stimulation mit CD30L wirkungslos bleibt. Diese Parameter müssen noch näher untersucht werden, damit dieses Molekül unter genau definierten Bedingungen optimal eingesetzt werden kann. Auch variieren die Bedingungen im Körper in Bezug auf Vorstimulation bzw. Aktivationsniveau der T-Zellen beispielsweise aufgrund von Infekten oder chronischen Erkrankungen, sodass der Effekt von CD30L nur schwer vorhersehbar ist. Genau dies wird auch anhand unserer gefundenen Daten deutlich, die von Spender zu Spender zum Teil gegensätzliche Effekte des CD30L ergeben.

2. Der Stand der Forschung hinsichtlich der Tumorummunologie

Neben den klassischen Formen der Tumorthherapie, der chirurgischen Entfernung oder auch der Chemo- und Radiotherapie, besitzen immunologische Strategien ein vielversprechendes zusätzliches therapeutisches Potential. Bereits 1893 berichtete

William Coley von seinen Tumorstimmungsversuchen mit Extrakten aus pyogenen Bakterien, die er verwendete, um antitumorale Immunantworten hervorzurufen (Coley 1893). 1909 beschrieb auch Paul Ehrlich die Möglichkeit, sich der Hilfe des Immunsystems zu bedienen, um Tumore zu eliminieren (Ehrlich 1909). Tumorzellen können ihnen eigene Antigene exprimieren, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Diese Antigene wiederum können als Zielstrukturen für spezifische T-Lymphozyten und damit der Auslösung einer spezifischen, gegen den Tumor gerichteten Immunantwort dienen. In den meisten Fällen jedoch sind Tumorzellen dazu nicht in der Lage. Ein Hauptgrund für ihre niedrige Immunogenität ist das Fehlen von auf der Zelloberfläche exprimierten Molekülen, die für die optimale Aktivierung von T-Lymphozyten notwendig sind. Ist jedoch eine Bindung des auf T-Zellen exprimierten CD28-Moleküls möglich, wird dadurch das entscheidende kostimulatorische Signal für die Aktivierung von T-Zellen generiert und die Induktion von Anergie verhindert (Fraser, Irving et al. 1991; Lindsten, June et al. 1994). Eine Therapie, deren Ziel es ist, die Aktivierung immunologischer Abwehrprozesse anzuregen, ist als adjuvante Therapie anzusehen, die idealerweise bei niedriger Tumorbilastung, z.B. nach Totalresektion anzuwenden ist. Ziel ist es, durch Vakzinierung eine Immunantwort zu induzieren, die einen systemischen, lang anhaltenden Schutz vor residualen Tumorzellen und Mikrometastasen bietet. Bei entsprechender Spezifität der gegen den Tumor gerichteten Reaktion sollte es außerdem nicht zu unerwünschten Nebenwirkungen im Sinne einer Autoimmunreaktion kommen.

Es gibt mittlerweile eine Reihe bekannter Tumorantigene, die für Vakzinierungen eingesetzt werden können. Applikationsformen sind Proteine, Peptide oder DNA, die auf verschiedene Weise in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg professioneller APC's eingeschleust und zusammen mit kostimulatorischen Molekülen präsentiert werden können. Nur diese Form der Präsentation gewährleistet eine optimale Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen), da die körpereigene Toleranz gegenüber den Tumorantigenen ausgeschaltet werden muss (Kobayashi, Picchio et al. 1992; Aruga, Shu et al. 1995). Die Präsentation von Proteinen und Peptiden erfolgt z.B. auf autologen, dendritischen Zellen (DC's), die *ex vivo* mit Peptiden beladen, bzw. dazu angeregt werden, Proteine oder größere Peptide aufzunehmen und zu prozessieren (Young und Inaba 1996). Der Vorteil in der Verwendung dendritischer Zellen besteht in deren hoher Expression von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen sowie interzellulären Adhäsionsmolekülen und B7 (Nestle, Alijagic et al. 1998). Bei der Verabreichung der Proteine oder Peptide mit geeigneten Adjuvantien wird die Präsentation der Antigene auf dendritischen Zellen *in vivo* angestrebt (Kovacsovic-Bankowski, Clark et al. 1993). Das Adjuvant ist dabei eine kritische Komponente der Vakzine, da es dafür verantwortlich ist, dass die antigenpräsentierenden Zellen an die Stelle der Vakzinierung wandern, an

welcher sie aktiviert werden, um dann das Antigen aufzunehmen und zu prozessieren. Ein großer Vorteil von auf Peptiden basierenden Vakzinen besteht darin, dass Sicherheitsbedenken, wie sie bei lebend- oder rekombinanten Vakzinen sowie DNA Vektoren bestehen, wegfallen. Es gibt jedoch einige Nachteile dieser Form der Vakzinierung. Die Zahl der bisher bekannten Tumorantigene ist limitiert und bisher noch weitgehend auf Melanome beschränkt. Es besteht bei der Vakzinierung mit nur einem oder wenigen Antigenen die Gefahr der Immunselektion, d.h. es werden nur die Tumorzellen, die das entsprechende Antigen tragen, abgetötet. Zellen, die im Lauf der Tumorgenese dieses Antigen verloren haben, werden dagegen nicht erkannt und können damit dem Immunsystem entkommen. Viele Mediatoren Vakzine-induzierter Immunantworten sind HLA-restringiert wie z.B. CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen. Ein Antigen wird diese protektiven Immunantworten also nur in Patienten eines bestimmten HLA-Phänotyps auslösen, was die Anzahl der Patienten, die von einer auf nur einem Antigen basierenden Vakzine profitieren könnten, stark reduziert (Bystryn 1998). Das Antigen muss außerdem in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust werden. Da es exogene Proteine sind, gelangen sie aber unter physiologischen Bedingungen vor allem in den MHC-Klasse-II-Präsentationsweg. Allerdings wurde in letzter Zeit häufiger von der Präsentation exogener Antigene im Zusammenhang mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf dendritischen Zellen berichtet (Mitchell, Nair et al. 1998). Verschiedene Applikationsformen und Antigenkonzentrationen können anstelle einer T-Zellantwort Toleranz induzieren (Toes, Blom et al. 1996). Dadurch kann ein Tumor, der das entsprechende Antigen exprimiert, nicht mehr abgestoßen werden. Kritische Elemente beim Design von Tumorstoffen sind damit die Wahl des Antigens oder gar mehrerer Antigene sowie die Optimierung der benötigten Antigenmenge, um die gewünschte Immunreaktion auszulösen.

Eine andere Möglichkeit zur Induktion spezifischer Immunreaktionen gegen Tumore ist die Verwendung immunogener Tumorzellvarianten für eine Vakzinierung. Hierbei werden die Tumorzellen selbst als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt (Ostrand-Rosenberg 1994). Die Immunogenität der Tumorzellen kann durch die Expression von MHC- (Ostrand-Rosenberg, Roby et al. 1991) oder kostimulatorischen Molekülen sowie durch Sekretion von Zytokinen wie z.B. GM-CSF erhöht werden. Dies verbessert ihre Fähigkeit, T-Lymphozyten antigenspezifisch zu stimulieren. Ein Beispiel stellt die B7-Familie der kostimulatorischen Moleküle dar, die in Tiermodellen und *in vitro* bereits Tumorabstoßungen und systemische Immunität gegen den Wildtyp-Tumor erzeugen konnte (Chen, Ashe et al. 1992; Townsend und Allison 1993; Döhning, Angman et al. 1994; Habicht, Lindauer et al. 1995). Auch die verschiedensten Zytokingene wurden bereits mit unterschiedlichem Effekt auf die Immunogenität in Tumorzellen eingebracht

(Golumbek, Lazenby et al. 1991; Dranoff, Jaffee et al. 1993; Greten und Jaffee 1999; Palmer, Moore et al. 1999). So konnte Kotransfektion von B7-1 zusammen mit GM-CSF in LLC-Zellen eine protektive Antitumorimmunität potenzieren (Sumimoto, Tani et al. 1997). Cayeux et al. konnten zeigen, dass kotransfizierte J558L-Zellen (murinen Ursprungs), die IL-4 und B7-1 exprimieren, bei der Induktion einer Antitumorantwort effektiver sind als Einzeltransfektanten (Cayeux, Beck et al. 1996). Ähnliche Effekte konnten auch in IL-7/B7.1 und IL-2- oder auch IL-12/B7-1 kotransfizierten Tumorzellen gezeigt werden (Cesano, O'Connor et al. 1991; Coughlin, Wysocka et al. 1995; Salviadori, Gansbacher et al. 1995).

Tumorzellen, die als Antigenreservoir in einer Vakzinierung dienen, haben verschiedene Vorteile. Sie beinhalten viele Tumorantigene, die alle zur Induktion einer Immunantwort herangezogen werden können. Damit kann eine Vielzahl von T-Zellklonen unterschiedlicher Spezifität aktiviert und die Gefahr einer Immunselektion umgangen werden. Darüberhinaus handelt es sich bei den Tumorantigenen um intrazelluläre Proteine der Tumorzellen, die in jedem Fall MHC-Klasse-I-restringiert präsentiert werden.

Naheliegender ist die Verwendung autologer Tumorzellen als zelluläre Vakzine. Sie enthalten Tumorantigene, welche für die Elimination des Tumors und der aus ihm hervorgegangenen Metastasen relevant sind. Die Herstellung einer individuellen Vakzine für jeden Patienten ist jedoch, wie es auch in der Diskussion des experimentellen Teils dieser Arbeit deutlich wird, sehr aufwendig. Es muss eine große Anzahl Tumorzellen gewonnen werden, was die dafür in Frage kommende Anzahl an Patienten stark limitiert, da nur diejenigen mit einer großen Tumorlast für diese Therapie und dafür nötige Studien in Frage kommen. Selbst dann ist das Material oft limitiert, da viele Tumore *in vitro* nicht oder nur schlecht wachsen. Damit reicht die Vakzine oft nicht für wiederholte Immunisierungen aus, sodass die Induktion eines länger andauernden Schutzes eventuell nicht gewährleistet ist. Es werden also Gentransfermethoden hoher Effizienz benötigt. Eine genaue Untersuchung der immunstimulatorischen Eigenschaften einer solchen Vakzine ist in der Regel aus den zuvor beschriebenen Gründen nicht möglich. Da jeder Patient eine individuelle Vakzine mit potentiell unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften erhält, ist auch die Auswertung klinischer Studien erschwert. Ein weiterer erschwerender Faktor dieser Art von Vakzine ist der kritische Zeitraum zwischen der Tumorzellgewinnung und der erfolgreichen Herstellung der Vakzine. Dieser ist bei aggressiv wachsenden Tumoren wie zum Beispiel dem malignen Melanom sehr groß, so dass das Tumorwachstum über einen längeren Zeitraum ungehindert weiter fortschreiten kann.

Eine Alternative stellt die Verwendung allogener Tumorzellen dar. Hierzu werden Zelllinien ausgewählt, die in mindestens einem HLA-Allel mit denen des Patienten übereinstimmen. So können Tumorantigene in Assoziation mit dem gemeinsamen HLA-Allel erkannt werden und damit spezifische T-Lymphozyten aktivieren. Tumorzellen mit häufigen HLA-Allelen erlauben eine Anwendung bei einem größeren Patientenkollektiv. Die meisten der bisher durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit allogenen Tumorzellen bei HLA-A2-teilidentischen Empfängern. HLA-A2 ist mit einer Häufigkeit von 30-40% das am weitesten verbreitete HLA-Allel. Die Beschränkung auf ein oder wenige HLA-Allele kann jedoch die Zahl der erkennbaren Antigene einschränken.

Die Möglichkeit durch allogene Tumorzellen tumorspezifische T-Lymphozyten zu generieren, wurde in *in vitro* Experimenten bereits gezeigt (Crowley, Slingluff et al. 1990). Vorteile der Verwendung allogener, HLA-teilidentischer Tumorzellen bestehen in ihrer Verfügbarkeit und damit der Möglichkeit, Transfektanten zu selektionieren und diese eingehend bezüglich ihrer biologischen Funktionen zu untersuchen. Darüber hinaus könnte ein größeres Patientenkollektiv auch im Rahmen einer klinischen Studie mit einer einheitlichen, gut definierten Zelllinie behandelt werden. Die auf einer HLA-teilidentischen Vakzine exprimierte Alloantigene ermöglichen die Aktivierung zusätzlicher T-Lymphozyten und begünstigen damit auch die Induktion einer tumorantigenspezifischen Reaktion (Plautz, Yang et al. 1993).

Weitere Möglichkeiten der Tumorstimmung bestehen in der Verwendung von Vakzinen mit rekombinanten viralen oder bakteriellen Vektoren, welche für Tumorantigene kodieren. So wurden z.B. bereits Untersuchungen mit auf Pocken- oder Vaccinia-Virus basierenden Vektoren durchgeführt (McCabe, Irvine et al. 1995; Restifo, Bacik et al. 1995; Wang, Bronte et al. 1995).

Als weitere Alternative kann bei Verwendung nackter DNA Vakzinen das immunisierende Antigen über einen längeren Zeitraum exprimiert werden, da DNA sich stabil in das Wirtsgenom integrieren oder lange Zeit in episomaler Form vorliegen kann (Wolff, Malone et al. 1990). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Injektion von nackter DNA sowohl die antikörpervermittelte als auch die zelluläre Immunantwort induzieren kann (Tang, DeVit et al. 1992; Condon, Watkins et al. 1996).

Initiale Studien haben gezeigt, dass genetisch modifizierte Tumorstimmungen als sehr sicher anzusehen sind. Die Nebenwirkungen bestehen im Wesentlichen in sich selbst limitierenden lokalen Entzündungsreaktionen der Haut an der Stelle der Vakzinierung (Golombek, Azhari et al. 1993; Arienti, Sule-Suso et al. 1996; Lotze, Zitvogel et al. 1996). Präventive Vakzinierung oder die Vakzinierung in frühen Krankheitsstadien können sehr effektiv sein, in späten Tumorstadien jedoch sind diese Erfolge oft nicht

mehr zu verzeichnen (Schreiber 1993). Dieses Phänomen der "Concomitant Immunity", in welcher eine späte Vakzinierung zwar zur Abstoßung einer zweiten, spät gegebenen Tumorzellcharge führt, der Originaltumor jedoch bestehen bleibt, also auf irgendeine Weise geschützt ist, stellt ein Problem bei der Entwicklung und Testung jeglicher Art von Vakzinen dar (Wick, Dubey et al. 1997). Weiterhin konnten in Patienten mit großer Tumormasse T-Zellsignalisierungsdefekte nachgewiesen werden (Mizoguchi, O'Shea et al. 1992), wodurch die Entwicklung und Durchführung von Immuntherapien zusätzlich erschwert wird.

3. Therapeutische Ansätze beim malignen Melanom

Das maligne Melanom ist immer noch einer der prognostisch ungünstigsten menschlichen Tumore bezüglich Epidemiologie und klinischem Verlauf. Inzidenz und Prävalenz steigen rasch an, wobei die mittlere Überlebensrate nur 6-8 Monate und die 5-Jahres-Überlebensrate weniger als 5% beträgt. Diese Kombination aus hoher Prävalenz und starker therapeutischer Resistenz hat zu großem Interesse an der Entwicklung von Behandlungs- und in den letzten Jahren insbesondere von Vakzinierungsstrategien gegen das maligne Melanom geführt:

Auf medikamentöser Basis erzielten vor allem Dacarbazin, Cisplatin und Fotemustin Ansprechraten von initial 18-35 %, die jedoch im Durchschnitt nicht länger als sechs Monate lang bestehen blieben (Khayat, Coeffic et al. 2000; Middleton, Grob et al. 1999). Die Kombination verschiedener Medikamente konnte die Ansprechraten in einem retrospektiven Vergleich bezüglich der Einzeltherapie mit Dacarbazin zwar steigern, jedoch fehlen prospektive, randomisierte Studien, die diese Beobachtungen belegen (Khayat, Coeffic et al. 2000).

Chemotherapie und Bestrahlung zeigten nur in Einzelfällen langanhaltende Remissionen und auch die vom FDA genehmigte hochdosierte Interferontherapie hat aufgrund der hohen Toxizität ihre Limitierungen (Kirkwood, Strawderman et al. 1996), auch wenn dadurch eine Verbesserung der Überlebensraten bei Behandlung nach Resektion erzielt werden kann.

Die Therapie mit IFN α und IL-2 als Einzel- oder Kombinationstherapien sind als Beispiele der sogenannten "Immuntherapien" anzusehen. Sie sind in der Lage, kurzzeitige Remissionen zu bewirken (Rosenberg, Lotze et al. 1987; Kirkwood 1991; Lindemann, Brossart et al. 1993). Neuere klinische Studien mit niedrig dosierter IFN α -Therapie für Patienten mit Melanom im Stadium II zeigten eine bessere Verträglichkeit und auch deutlich verlängerte 5-Jahres-Überlebensraten (Grob, Dreno et al. 1998; Pehamberger,

Soyer et al. 1998). IFN α bewirkt als adjuvante Therapie sowohl die Verzögerung eines Rezidivs als auch die Verlängerung der krankheitsfreien Zeitintervalle sowie eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten. Beim metastasiertem Melanom kann es bei Verabreichung zusammen mit Chemotherapie die Ansprechraten verbessern.

Im Rahmen dieser sogenannten "Chemoimmuntherapie", oder "Biochemotherapie", welche die Kombination von Zytostatika und IFN α oder IL-2 beinhaltet, können höhere Ansprechraten als bei alleiniger Chemo- oder Immuntherapie erzielt werden (Khayat, Coeffic et al. 2000).

Andere Therapieversuche mit IL-2-aktivierten, tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL's) oder bispezifischen Antikörpern mit Bindungsstellen für die Effektorzellen, mit Radionukliden oder Zytostatika konnten bisher keinen Durchbruch erzielen (Keilholz, Scheibenbogen et al. 1995). Die Therapie fortgeschrittener Stadien bleibt daher in den meisten Fällen palliativ (Garbe 1995).

3.1. Tumorstimmung beim malignen Melanom

Therapeutische Vakzinen, deren Ziel es ist, durch Verbesserung der patienteneigenen Immunantwort das Wiederauftreten von Tumoren zu verhindern, ist weiterhin ein starker Interessensfokus in der Behandlung des malignen Melanoms. Die damit verbundene niedrige Toxizität macht diese Therapie zu einer attraktiven Option der adjuvanten Tumorthherapie und bietet darüber hinaus das Potential einer synergistischen Interaktion mit IFN α , welches in der Verbesserung der Antigenpräsentation hilfreich ist. Die zwei hauptsächlichen Arme der Tumorstimmungen bestehen bisher in der Verwendung von Tumorzell-Lysaten und Peptidantigenen. Peptidantigene bedienen sich definierter melanomassoziiertes Tumor-Antigene um eine Immunantwort hervorzurufen. Es wurden bereits eine Reihe von Antigenen identifiziert, die sich als mögliche Zielstrukturen für Vakzinen eignen könnten (vgl. Einleitung, Tab. 2). In einer klinischen Studie der Phase I mit einer HLA-A1-restringierten MAGE-3 Peptidvakzine bei Patienten mit Melanom im Stadium 4 wurden in der Hälfte (6) der behandelten Patienten partielle Remissionen beobachtet (Marchand, Weynants et al. 1995). Vorläufige Ergebnisse einer klinischen Studie der Phase III, die einen Vergleich zieht zwischen der Vakzine mit dem Gangliosid GM2 und IFN α , scheinen vielversprechend zu sein. Ganglioside stellen dabei ein Beispiel von tumorassoziierten Antigenen dar, die auf verschiedenen Tumoren exprimiert werden und wesentliche Komponenten der Zelloberfläche von Melanomzellen sind. Die in der Vakzine vorhandenen Antigene müssen vom zu behandelnden Tumor exprimiert werden. Das Melanom ist ein Tumor mit starker Antigenheterogenität und das Spektrum an Tumorantigenen, welches von Melanomzellen in verschiedenen Individuen oder auch an verschiedenen Stellen desselben Tumors exprimiert wird, ist stark variabel.

Daher ist der Anteil an Patienten, die von einer einzelnen Peptidvakzine profitieren könnten, nicht zuletzt auch wegen der HLA-Restriktion der einzelnen Tumorantigene, sehr gering. Polyvalente Vakzinen aus einer Mischung von verschiedenen Melanom-Zelllinien mit häufig exprimierten Antigenen verschiedener HLA-Restriktionsmuster stellen einen Weg aus diesem Dilemma dar (Morton und Barth 1992). Auch der Zusatz von IL-2 zur Peptidvakzine war mit höheren Ansprechraten verbunden als eine reine Peptidvakzine (Rosenberg, Yang et al. 1998). Ein weiteres Problem besteht in der Unfähigkeit der meisten Melanomantigene, eine starke Anti-Melanom Immunantwort auszulösen. Es werden daher gute Adjuvantien benötigt, oder z.B. eine Modifizierung der physikalischen oder biochemischen Eigenschaften der Vakzine erforderlich (Bystryn 1998). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung peptidbeladener dendritischer Zellen (Nestle, Alijagic et al. 1998).

Auch Vakzinen mit autologen (Schreiber, Kampgen et al. 1999) oder allogenen (Hsueh, Nathanson et al. 1999) bestrahlten, ganzen Tumorzellen, die immunologisch verändert wurden oder Tumorzell-Lysaten (Morton und Barth 1992) bieten eine ganze Reihe von Antigenen, die das Problem der antigenen Heterogenität von Tumoren lösen könnten (Toes, Blom et al. 1996; Thomas, Greten et al. 1998). Bei dieser Strategie besteht jedoch das Problem, dass aktive Antigene nur in geringer Konzentration vorhanden sind, dagegen viel irrelevantes Material vorliegt und damit die Effektivität aufgrund kompetitiver Inhibierung der Anti-Tumorantworten sowie erhöhter Toxizität leiden könnte (Bystryn 1998). Im Gegensatz zu reinen Antigenvakzinen sind zusätzlich Schwierigkeiten bei der Produktion einer reproduzierbaren und gut charakterisierten Vakzineformel gegeben. Beide sind schwer zu standardisieren und zu analysieren, trotzdem handelt es sich bei beiden um effektive Vakzinierungsstrategien. Obwohl diese Vakzinen eine verstärkte Antitumorimmunität in manchen Patienten erzeugen und einige dieser Patienten länger überleben, konnte bisher jedoch kein klinischer Benefit im Rahmen einer kontrollierten, klinischen Studie der Phase III nachgewiesen werden (Sun, Paschen et al. 1999).

Es ist wichtig, die Natur der Antwort des Patienten auf die Vakzine zu kennen, um geeignete Vakzinen entwickeln zu können. Aus dem Blut von Melanompatienten konnten einerseits Anti-Melanom-Antikörper (Morton, Eilber et al. 1970), andererseits CTL's isoliert werden, die in der Lage waren, Tumorzellen *in vitro* zu zerstören (Topalian, Solomon et al. 1989). Durch Vakzinierungen könnte daher diese schützende Immunantwort potenziert werden. Es wurden z.B. bereits verschiedenste Untersuchungen bezüglich der humoralen Immunantwort von Patienten mit Melanom auf eine GM2 Gangliosid Vakzine durchgeführt, die in klinischen Studien der Phase I und II

vierversprechende Ergebnisse erbrachten (Livingston, Wong et al. 1994; Livingston 1998). *In vitro* Assays haben gezeigt, dass die Vakzine IgG und IgM Antikörper mit hoher Affinität und Spezifität für GM2-positive Tumorzellen generiert. Bei niedrigen Antikörpertitern konnten eine komplement- und antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität von GM2-positiven Zellen gefunden werden (Chapman, Morrissey et al. 2000). Eine randomisierte Studie, die diese Art von Therapie mit hochdosierter IFN α -Therapie vergleicht, wird gerade durchgeführt.

Ein weiterer Ansatzpunkt der Vakzinierung stellen mit Zytokinen transduzierte Tumorzellen dar. GM-CSF ist dabei das Zytokin, welches die stärkste Immunantwort auf eine zelluläre Tumorstoffimpfung auslöst. Jedoch konnte in murinen Modellen auch mit IFN γ , TNF α , IL-2, -4, -6 und -7 eine Steigerung der systemischen Immunität erzielt werden (Dranoff, Jaffee et al. 1993; Rosenberg, Yang et al. 1994). In einigen Melanostoffimpfungen wurden Melanome mit dem IL-2-Gen transduziert, wobei in einem Teil der Studien eine effektive, systemische Immunantwort induziert werden konnte (Maass, Schmidt et al. 1995; Zatloukal, Schneeberger et al. 1995).

Daneben wurde auch ein Vakzinierungseffekt mit B7-1 und B7-2 beim malignen Melanom gefunden (Townsend und Allison 1993; Yang, Darrow et al. 1997). Eine am National Cancer Institute durchgeführte Studie mit B7-transduzierten, allogenen Melanom-Zelllinien erzielte in Abhängigkeit vom HLA-Typ der Induktor-Zelllinie eine streng HLA-assoziierte Lyse von Melanomzellen von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden (Fenton, Sznol et al. 1995). Neben der Bedeutung der B7-Moleküle für die direkte Tumorzellabstoßung wurde in anderen Untersuchungen jedoch herausgearbeitet, dass in intrinsisch nicht-immunogenen Tumoren eine alleinige B7-Transduktion nicht zu einer systemischen Tumorstoffimmunität führt, sondern zusätzliche Signale nötig sind (Wu, Huang et al. 1995).

Melanostoffimpfungen bieten also eine gute Ergänzung der Standardtherapiemethoden wie Chemotherapie, Radiotherapie und auch der Interferontherapie. Sie befinden sich allerdings immer noch im Anfangsstadium und sind schwer zu analysieren und zu reproduzieren. Durch eine geeignete Kombination von immunmodulatorischen Zusätzen wie Antigenen, Zytokinen, kostimulatorischen Molekülen und Adjuvantien werden sie zu einem vielversprechenden Therapieansatz.

VI. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist einer der am stärksten immunogenen, soliden Tumoren, weswegen die Immuntherapie bei dieser Tumorart zu einem Standardtherapiekonzept geworden ist. B7-1 transduzierte Tumorzellen konnten bereits in verschiedenen Tumormodellen abgestossen werden. Für eine effektive Antitumorantwort der T-Zellen sind jedoch zusätzliche Aktivierungssignale nötig. Die Mitglieder der TNFR-Familie sind dafür aufgrund ihres Einflusses auf eine Vielfalt immunologischer Prozesse, davon nicht zuletzt die Aktivierung von T-Zellen, geeignete Kandidaten. CD30L wurde in dieser Arbeit im Vergleich mit B-1 als kostimulatorisches Molekül bei der Induktion einer T-Zellantwort gegen maligne Melanomzellen der Linie M3HK evaluiert.

Auf der Oberfläche naiver T-Zellen konnte der CD30 Rezeptor durch Stimulation mit B7-1-transfizierten Melanomzellen unter Zugabe von ConA und IL-2 je nach T-Zell-Spender in verschiedenem Maße induziert werden. CD30L-exprimierende M3HK-Zellen dagegen konnten als primärer Stimulus weder CD30 auf T-Zellen induzieren, noch die Proliferation von T-Zellen im Vergleich zur Stimulation mit anderen Transfektanten steigern. Ebenso wurde der Aktivierungsmarker CD25 durch Stimulation mit M3HK/CD30L deutlich schwächer exprimiert als unter Stimulation mit M3HK/B7-1. Auch die CD30L- und B7-1-exprimierende Doppeltransfektante erzielte keine höheren CD30-Expressionen auf T-Zellen im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit M3HK/B7-1-Zellen, jedoch höhere Expressionen von CD25. Ebenso waren in Abhängigkeit von den T-Zell-Spendern die auf diese Weise induzierten Proliferationsraten der T-Zellen in einigen Experimenten höher als die durch M3HK/B7-1 induzierten, in anderen jedoch auch geringer. Unter bestimmten, noch näher zu definierenden Umständen ist dem CD30L also alleine oder in verstärktem Maße als Kostimulus zu B7-1, ein geringes, primär aktivierendes Potential für T-Zellen zuzuschreiben.

Bei der Evaluation des CD30L als sekundärer Stimulus für T-Zellen zeigte sich, dass unabhängig von der gewählten Art der Prästimulation, die Restimulation mit M3HK/CD30L oder auch M3HK/B7-1 erst nach einer zweiten Restimulation zu einer erneuten Steigerung der Expression von CD30 und CD25 auf den T-Zellen führte. Mit der Doppeltransfektante vorstimulierte T-Zellen zeigten dabei im Vergleich zu mit M3HK/B7-1 prästimulierten T-Zellen niedrigere Expressionen dieser Moleküle. Es konnte also durch gemeinsame Prästimulation mit CD30L und B7-1 kein Hinweis auf eine verstärkte nachfolgende Aktivierung der T-Zellen im Rahmen einer Restimulation gefunden werden, sondern möglicherweise sogar ein inhibierender Effekt. Auch in den Restimulationsassays erreichten die mit M3HK/CD30L oder der Doppeltransfektante vorstimulierten T-Zellen bei Restimulation mit verschiedenen Transfektanten immer geringere Proliferationsraten als mit

M3HK/B7-1 vorstimulierte T-Zellen. Die durch unspezifische primäre Stimuli wie PHA, ConA oder IL-2 ausgelösten Proliferationsraten unter nachfolgender Restimulation mit verschiedenen Transfektanten deuten jedoch auf eine starke Abhängigkeit der T-Zellaktivierung von Stärke und Art des primären Stimulus hin. Dies zeigt die Möglichkeit auf, dass CD30L unter genau definierten Bedingungen ein sekundäres Signal zur T-Zellaktivierung liefern kann.

Aus den vorliegenden Daten wird deutlich, dass CD30L nur geringe primäre Stimulationsfähigkeit für T-Zellen besitzt. Seine Rolle bei der sekundären Aktivierung ist dagegen nicht eindeutig geklärt, da der genaue Effekt von CD30L auf T-Zellaktivierung stark abhängig vom Aktivierungszustand der eingesetzten T-Zellen sowie den gewählten experimentellen Bedingungen ist. Um dieses Molekül unter genau definierten Bedingungen optimal einsetzen zu können, müssen die Umstände, unter welchen der Ligand proliferations- und aktivierungssteigernde Aktivität besitzt, und unter welchen Umständen er dagegen Apoptose induziert noch näher untersucht werden.

VII. Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (1991). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, W.B. Saunders Company.

Agrawal, B., M. Reddish, et al. (1996). "CD30 expression on human CD8+ T cells isolated from peripheral blood lymphocytes on normal donors." J. Immunol. **157**: 3229-3234.

Alderson, M. R. (1995). "Regulation of immune responses by the ligands for CD27, CD30, and 4-1BB." Circ. Shock **44**: 73-76.

Alzona, M., H.-M. Jäck, et al. (1994). "CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN- γ and IL-5 and exhibit enhanced B cell helper activity." J. Immunol. **153**: 2861-2867.

Amakawa, R., A. Hakem, et al. (1996). "Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's Disease antigen CD30-deficient mice." Cell **84**: 551-562.

Andreesen, R., J. Osterholz, et al. (1984). "A Hodgkin's cell-specific antigen is expressed on a subset of auto- and alloactivated T (helper) lymphoblasts." Blood **63**(6): 1299-1302.

Arienti, F., J. Sule-Suso, et al. (1996). "Limited antitumor T cell response in melanoma patients vaccinated with interleukin-2 gene-transduced allogeneic melanoma cells." Hum. Gene Ther. **7**: 1955-1963.

Aruga, A., S. Y. Shu, et al. (1995). "Tumor-specific granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma secretion is associated with in vivo therapeutic efficacy of activated tumor-draining lymph node cells." Cancer Immunol. Immunother. **41**: 317-324.

Avril, M. F., P. Charpentier, et al. (1992). "Regression of primary melanoma with metastases." Cancer **69**(6): 1377-1381.

Baskar, S., L. Glimcher, et al. (1995). "Major histocompatibility complex class II + B7-1 + tumor rejection in tumor-bearing mice." J. Exp. Med **181**: 619-629.

Baskar, S., S. Ostrand.-Rosenberg, et al. (1993). "Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**(12): 5687-5690.

Bellone, M., G. Iezzi, et al. (1997). "Rejection of a nonimmunogenic melanoma by vaccination with natural melanoma peptides on engineered antigen-presenting cells." J. Immunol. **158**: 783-789.

Beutler, B. und C. van-Huffel (1994). "Unraveling function in the TNF ligand and receptor families." Science **264**(5159): 667-668.

Blessing, K. und K. M. McLaren (1992). "Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance." Histopathology **20**(4): 315-322.

Bowen, M. A., R. K. Lee, et al. (1996). "Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production." J. Immunol. **156**: 442-449.

Brown, G. R., K. Meek, et al. (1995). "CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced proliferation and cytolytic activity in CD8+ T lymphocytes." J. Immunol. **154**(8): 3686-3695.

Bystryn, J. (1995). "Clinical activity of a polyvalent melanoma antigen vaccine. Recent results." Cancer Res. **139**: 337-348.

Bystryn, J.-C. (1998). "Vaccines for melanoma. Design strategies and clinical results." Dermatol. Clin. **16**(2): 269-275.

Caligaris-Cappio, F., M. T. Bertero, et al. (1995). "Circulating levels of soluble CD30, a marker of cells producing Th2-type cytokines, are increased in patients with systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity." Clin. Exp. Rheumatol. **13**: 339-343.

Callard, R., R. Armitage, et al. (1993). "CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome." Immunol. Today **14**(11): 559-564.

Caproni, M., B. Bianchi, et al. (1997). "In vivo relevance of CD30 in atopic dermatitis." Allergy **52**(11): 1063-1070.

Cayeux, S., C. Beck, et al. (1996). "Coexpression of interleukin-4 and B7.1 in murine tumor cells leads to improved tumor rejection and vaccine effect compared to single gene transfectants and a classical adjuvant." Hum. Gene Ther. **7**: 525-529.

Cerutti, A., E. C. Kim, et al. (2001). "Dysregulation of CD30+ T cells by leukemia impairs isotype switching in normal B cells." Nat. Immunol. **2**(2): 150-156.

Cerutti, A., A. Schaffer, et al. (2000). "Engagement of CD153 (CD30 Ligand) by CD30+ T cells inhibits class switch DNA recombination and antibody production in human IgD+ IgM+ B cells." J. Immunol. **165**: 786-794.

Cesano, A., R. O'Connor, et al. (1991). "Homing and progression patterns of childhood acute lymphoblastic leukemias in severe combined immunodeficiency mice." Blood **77**: 2463-2474.

Chang, A. E., L. Hynds Karnell, et al. (1998). "The National Cancer Database report on cutaneous and non-cutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade." Cancer **83**: 1664-1678.

- Chapman, P. B., D. M. Morrissey, et al. (2000). "Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: a dose-response study." Clin. Cancer Res. **6**(3): 874-879.
- Chen, L., S. Ashe, et al. (1992). "Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4." Cell **71**(7): 1093-1102.
- Chen, L., P. S. Linsley, et al. (1993). "Costimulation of T cells for tumor immunity." Immunol. Today **14**: 483-486.
- Chen, L., P. McGowan, et al. (1994). "B7-1/CD80-transduced tumor cells elicit better systemic immunity than wild-type tumor cells admixed with corynebacterium parvum." Cancer Res. **54**: 5420-5423.
- Chiorini, J. A., C. M. Wendtner, et al. (1995). "High-efficiency transfer of the T cell costimulatory molecule B7-2 to lymphoid cells using high-titer recombinant adeno-associated virus vectors." Hum. Gene Ther. **6**: 1531-1541.
- Clark, E. A. und J. A. Ledbetter (1994). "How B and T cells talk to each other." Nature **367**: 425-428.
- Coley, W. B. (1893). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases." Am. J. Med. Sci. **105**: 487-511.
- Condon, C., S. C. Watkins, et al. (1996). "DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells." Nat. Med. **2**(10): 1122-1128.
- Couderc, B., L. Zitvogel, et al. (1998). "Enhancement of antitumor immunity by expression of CD70 (CD27 ligand) or CD154 (CD40 ligand) costimulatory molecules in tumor cells." Cancer Gene Ther. **5**(3): 163-175.
- Coughlin, C. M., M. Wsocka, et al. (1995). "B7.1 and interleukin 12 synergistically induce effective antitumor immunity." Cancer Res. **55**: 4980-4987.
- Crowley, N. J., C. J. Slingluff, et al. (1990). "Generation of human autologous melanoma-specific cytotoxic T-cells using HLA-A2-matched allogeneic melanomas." Cancer Res. **50**: 492-498.
- DeBenedette, M. A., N. R. Chu, et al. (1995). "Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP." J. Exp. Med. **181**(3): 985-992.
- DeBenedette, M. A., A. Shahinian, et al. (1997). "Costimulation of CD28-T Lymphocytes by 4-1BB ligand." J. Immunol. **158**: 551-559.
- Degli-Esposti, M. (1999). "To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors." J. Leukoc. Biol. **65**(5): 535-542.

Del Prete, G., M. De Carli, et al. (1995). "Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2-type cytokines." FASEB J. **9**: 81-86.

Del Prete, G., M. De Carli, et al. (1995). "CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells." J. Exp. Med. **182**: 1655-1661.

Del Prete, G., E. Maggi, et al. (1995). "CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link." Immunol. Today **16**(2): 76-80.

Döhring, C., L. Angman, et al. (1994). "T helper and accessory-cell-independent cytotoxic responses to human tumor cells transfected with B7 retroviral vector." Int. J. Cancer **57**(5): 754-759.

Dranoff, G., E. Jaffee, et al. (1993). "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3539-3543.

Durkop, H., U. Latza, et al. (1992). "Molecular cloning and expression of a new member of the Nerve Growth Factor Receptor Family which is characteristic for Hodgkin's disease." Cell **68**(3): 421-427.

Ehrlich, P. (1909). "Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung." Ned. Tijdsch. Geneesk. **5**: 273-.

Ellis, T. M., P. E. Simms, et al. (1993). "CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells." J. Immunol. **151**(5): 2380-2389.

Falini, B., S. Pileri, et al. (1995). "CD30 (Ki-1) molecule: A new cytokine receptor of the tumor necrosis factor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy." Blood **85**(1): 1-14.

Fenton, R. T., M. Sznol, et al. (1995). "A phase I trial of B7-transfected or parenteral lethally irradiated allogeneic melanoma cell lines to induce cell-mediated immunity against tumor-associated antigen presented by HLA-A2 or HLA-A1 in patients with stage IV melanoma." Hum. Gene Ther. **6**: 87-106.

Fraser, J. D., B. A. Irving, et al. (1991). "Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28." Science **251**: 313-316.

Freeman, G. J., V. A. Boussiotis, et al. (1995). "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 **2**: 523-532.

Freeman, G. J., G. S. Gray, et al. (1991). "Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7." J. Exp. Med. **174**(3): 625-631.

Freeman, G. J., J. G. Gribben, et al. (1993). "Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter receptor that costimulates human T cell proliferation." Science **262**: 909-911.

Frezzolini, A., M. Paradisi, et al. (1997). "Soluble CD30 in pediatric patients with atopic dermatitis." Allergy **52**(1): 106 -109.

Garbe, C. (1995). Malignes Melanom. Berlin, Springer-Verlag.

Gastl, G., T. Ebert, et al. (1996). "Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma." J. Urol. **155**(1): 361-367.

Gattei V., D. M., Gloghini A. et al. (1997). "CD30L is frequently expressed in human hematopoietic malignancies of myeloid and lymphoid origin." Blood **89**(6): 2048-2059.

Gerdes, J., R. Schwarting, et al. (1986). "High proliferative activity of Reed-Sternberg associated antigen Ki-1 positive cells in normal lymphoid tissue." J. Clin. Pathol. **39**(9): 993-997.

Gilfillan, M. C., P. J. Noel, et al. (1998). "Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines." J. Immunol. **160**: 2180-2187.

Godfrey, W. R., F. F. Fagnoni, et al. (1994). "Identification of a human OX40 ligand, a costimulator of CD4+ T cells with homology to tumor necrosis factor." J. Exp. Med. **180**(2): 757-762.

Golumbek, P. T., R. Azhari, et al. (1993). "Controlled release, biodegradable cytokine depots: A new approach in cancer vaccine design." Cancer Res. **53**: 5841-5844.

Golumbek, P. T., A. J. Lazenby, et al. (1991). "Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4." Science **254**: 713-716.

Goodwin, R., W. Din, et al. (1993). "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. **23**(10): 2631-2641.

Gravestain, L. A. und J. Borst (1998). "Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system." Semin. Immunol. **10**(6): 423-434.

Grell, M., G. Zimmermann, et al. (1999). "Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF." EMBO J. **18**(11): 3034-3043.

Greten, T. F. und E. M. Jaffee (1999). "Cancer vaccines." J. Clin. Oncol. **17**(3): 1047-1060.

Grob, J. J., B. Dreno, et al. (1998). "Randomised trial of interferon alpha-2a adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5mm without clinically detectable

node metastases. French Cooperative Group on Melanoma." Lancet **351**(9120): 1905-1910.

Gückel, B., M. Lindauer, et al. (1995). "CD80 transfected human breast and ovarian tumor cell lines: improved immunogenicity and induction of cytolytic CD8+ T lymphocytes." Cytokines Mol. Ther. **1**(3): 211-221.

Habicht, A., M. Lindauer, et al. (1995). "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 **31A**(13-14): 2396-2402.

Hahne, M., D. Rimoldi, et al. (1996). "Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." Science **274**: 1363-1366.

Haluska, F. G. und F. S. Hodi (1998). "Molecular genetics of familial cutaneous melanoma." J. Clin. Onc. **16**(2): 670-682.

Hansen, H. P., T. Kisselva, et al. (1995). "A zinc metalloproteinase is responsible for the release of CD30 on human tumor cell lines." Int. J. Cancer **63**: 750-756.

Harding, F. A. und J. P. Allison (1993). "CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help." J. Exp. Med. **177**(6): 1791-1796.

Hathcock, K. S., G. Laszlo, et al. (1993). "Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation." Science **262**: 905-907.

Hemmila, M. R. und A. E. Chang (1999). "Clinical implications of the new biology in the development of melanoma vaccines." J. Surg. Oncol. **70**(4): 263-274.

Heuer, J. G., C. Tucker-McClung, et al. (1996). "Retrovirus-mediated gene transfer of B7-1 and MHC class II converts a poorly immunogenic neuroblastoma into a highly immunogenic one." Hum. Gene Ther. **7**(17): 2059-2068.

Hintzen, R. Q., S. M. Lens, et al. (1995). "Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation." J. Immunol. **154**(6): 2612-2623.

Horie, R. und T. Watanabe (1998). "CD30: expression and function in health and disease." Semin. Immunol. **10**(6): 457-470.

Hsu, P. L. und S. M. Hsu (2000). "Autocrine growth regulation of CD30 ligand in CD30-expressing Reed-Sternberg cells: distinction between Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma." Lab. Invest. **80**(7): 1111-1119.

Hsueh, E. C., L. Nathanson, et al. (1999). "Active specific immunotherapy with polyvalent melanoma cell vaccine for patients with in-transit melanoma metastases." Cancer **85**: 2160-2169.

Hung, K., R. Hayashi, et al. (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." J. Exp. Med. **188**: 2357-2368.

Hurtado, J. C., Y. J. Kim, et al. (1997). "Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death." J. Immunol. **158**(6): 2600-2609.

Imura, A., T. Hori, et al. (1996). "The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells." J. Exp. Med. **183**(5): 2185-2195.

Jaeger, E., H. Bernhard, et al. (1996). "Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens." Int. J. Cancer **66**: 162-169.

Jumper, M. D., Y. Nishioka, et al. (1995). "Regulation of human B cell function by recombinant CD40 ligand and other TNF-related ligands." J. Immunol. **155**: 2369-2378.

June, C. H., J. A. Bluestone, et al. (1994). "The B7 and CD28 receptor families." Immunol. Today **15**: 321-331.

Jung, W., S. Krueger, et al. (1994). "Opposite Effects of the CD30 ligand are not due to CD30 mutations: results from cDNA cloning and sequence comparison of the CD30 antigen from different sources." Mol. Immunol. **31**(17): 1329-1334.

Karlhofer, F. M., R. K. Ribaldo, et al. (1992). "MHC class I alloantigen specificity of Ly-49 + IL2 activated natural killer cells." Nature **358**: 66-70.

Kashii, Y., R. Giorda, et al. (1999). "Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells." J. Immunol. **163**(10): 5358-5366.

Kawakami, Y., S. Eliyahu, et al. (1994). "Identification of the immunodominant peptides of MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes." J. Exp. Med. **180**(1): 347-352.

Keilholz, U., C. Scheibenbogen, et al. (1995). "Interleukin-2-based immunotherapy and chemoimmunotherapy in metastatic melanoma." Recent Results Cancer Res. **139**: 383-390.

Khayat, M. D., D. Coeffic, et al. (2000). "Overview of medical treatments of metastatic malignant melanoma." Med. Treat. Melan.: 414-427.

Kirkwood, J. M. (1991). "Studies of interferons in the therapy of melanoma." Semin. Oncol. **18**: 83-89.

Kirkwood, J. M., M. H. Strawderman, et al. (1996). "Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern cooperative oncology group trial EST 1684." J. Clin. Oncol. **14**(1): 7-17.

Kobayashi, R., G. Picchio, et al. (1992). "Transfer of human chronic lymphatic leukemia to mice with severe combined immune deficiency." Leuk. Res. **16**: 1013-1023.

Koh, H. K. (1991). "Cutaneous melanoma." N. Engl. J. Med. **325**: 171-182.

Kovacsovics-Bankowski, M., K. Clark, et al. (1993). "Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 4942-4964.

Kunitomi, A., T. Hori, et al. (2000). "Vascular endothelial cells provide T cells with costimulatory signals via the OX40/gp34 system." J. Leukoc. Biol. **68**(1): 111-118.

Lanier, L. L., S. O'Fallon, et al. (1995). "CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar co-stimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production and generation of CTL." J. Immunol. **154**: 97-105.

Lanza, L., L. Peirano, et al. (1995). "Interferons up-regulate with different potency HLA class I antigen expression in M14 human melanoma cell line. Possible interaction with glucocorticoid hormones." Cancer Immunol Immunother. **41**(1): 23-28.

Lee, S. Y., C. G. Park, et al. (1996). "T cell receptor-dependent cell death of T cell hybridomas mediated by CD30 cytoplasmic domain in association with tumor necrosis factor receptor-associated factors." J. Exp. Med. **183**(2): 669-674.

Legha, S. S., S. Ring, et al. (1989). "A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma." Cancer **64**(10): 2024-2029.

Lindemann, A., P. Brossart, et al. (1993). "Immunomodulatory effects of ultra-dose interleukin-2 in cancer patients: A phase Ib study." Cancer Immunol. Immunother. **37**(5): 307-315.

Lindsten, T., C. H. June, et al. (1994). "Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface mediated T cell activation pathway." Science **244**: 339-.

Livingston, P. O. (1998). "Ganglioside vaccines with emphasis on GM2." Sem. Oncol. **25**: 1036-1044.

Livingston, P. O., G. Y. Wong, et al. (1994). "Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside." J. Clin. Oncol. **12**: 1036-1044.

Lokich, J. (1997). "Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review." Am. J. Clin. Oncol. **20**(4): 416-418.

Lotze, M. T., L. Zitvogel, et al. (1996). "Cytokine gene therapy of cancer using interleukin-12: Murine and clinical trials." Ann. N.Y. Acad. Sci. **795**: 440-454.

Maass, G., W. Schmidt, et al. (1995). "Priming of tumor specific T cells in the draining lymph nodes after immunization with interleukin 2-secreting tumor cells: three consecutive stages may be required for successful tumor vaccination." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 5540-5544.

Maggi, E., F. Annunziato, et al. (1995). "Activation of HIV expression by CD30 triggering in CD4+ T cells from HIV-infected individuals." Immunity **3**: 251-255.

Marchand, M., P. Weynants, et al. (1995). "Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3." Int. J. Cancer **63**(6): 883-885.

Martinez, O. M., J. Villanueva, et al. (1998). "CD30 expression identifies a functional alloreactive human T-lymphocyte subset." Transplantation **65**: 1240-1247.

Matulonis, U. A., C. Dosiou, et al. (1995). "Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells." Blood **85**(9): 2507-2515.

McCabe, B. J., K. R. Irvine, et al. (1995). "Minimal determinant expressed by a recombinant vaccinia virus elicits therapeutic antitumor cytolytic T lymphocyte responses." Cancer Res. **55**(8): 1741-1757.

Mcgee, J. M., J. A. Price, et al. (1999). "Melanoma vaccines as a therapeutic option." South. Med. J. **92**(7): 698 - 704.

Melero, I., W. W. Shuford, et al. (1997). "Monoclonal antibodies against the 4-1BB T cell activation molecule eradicate established tumors." Nat. Med. **3**(6): 682-685.

Melief, C. J. und W. M. Kast (1992). "Lessons from T cell responses to virus induced tumours for cancer eradication in general." Cancer Surv. **13**(1): 81-99.

Middleton, M. R., J. J. Grob, et al. (2000). "A randomized, phase III study of temozolomide (TMZ) versus dacarbazine (DTIC) in the treatment of patients with advanced, metastatic melanoma." J. Clin. Oncol. **13**(1):158-166.

Miller, J. und R. N. Germain (1986). "Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain." J. Exp. Med. **164**: 1478-1489.

Mitchell, D. A., S. K. Nair, et al. (1998). "Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells." Eur. J. Immunol. **28**: 1923-1933.

Mizoguchi, H., J. J. O'Shea, et al. (1992). "Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice." Science **258**: 1795-1798.

Molin, D., M. Fischer, et al. (2001). "Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease." Br. J. Hematol. **114**(3): 616-623.

Mori, M., C. Manuelli, et al. (1999). "CD30-CD30 ligand interaction in primary cutaneous CD30(+) T-cell lymphomas: A clue to the pathophysiology of clinical regression." Blood **94**(9): 3077-3083.

Mortarini, R., F. Belli, et al. (1990). "Cytokine-mediated modulation of HLA-class II, ICAM-1, LFA-3 and tumor-associated antigen profile of melanoma cells. Comparison with anti-proliferative activity by rIL1-beta, rTNF-alpha, rIFN-gamma, rIL4 and their combinations." Int. J. Cancer **45**(2): 334-341.

Morton, D. L. und A. Barth (1992). "Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine." Ann. Surg. **216**: 463-482.

Morton, D. L., F. R. Eilber, et al. (1970). "Immunological factors which influence responses to immunotherapy in malignant melanoma." Surgery **68**(1): 158-164.

Nestle, F. O., S. Alijagic, et al. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat. Med. **4**(3): 328-332.

Nicod, L. P. und P. Isler (1997). "Alveolar macrophages in sarcoidosis coexpress high levels of CD86 (B7-2), CD40, and CD30L." Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. **17**(1): 91-96.

Ohshima, Y., L. P. Yang, et al. (1998). "OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4 producing effectors." Blood **92**(9): 3338-3345.

Ostrand-Rosenberg, S. (1994). "Tumor immunotherapy: the tumor cell as an antigen-presenting cell." Curr. Opin. Immunol. **6**: 722-727.

Ostrand-Rosenberg, S., C. Roby, et al. (1991). "Tumor-specific immunity can be enhanced by transfection of tumor cells with syngeneic MHC-class-II genes or allogeneic MHC-class-I genes." Int. J. Cancer **6**: 61-68.

Pallesen, G. (1990). "The diagnostic significance of the CD30 (Ki-1) antigen." Histopathology **16**(4): 409-413.

Pallesen, G. und S. J. Hamilton-Dutoit (1988). "Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal cell carcinoma." Am. J. Pathol. **133**(3): 446-450.

Palmer, K., L. Moore, et al. (1999). "Gene therapy with autologous, Interleukin 2-secreting tumor cells in patients with malignant melanoma." Hum. Gene Ther. **10**: 1261-1268.

Papac, R. J. (1998). "Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms." In Vivo **12**(6): 571-578.

Pardoll, D. M. (1993). "Cancer Vaccines." Immunol. Today **14**(6): 310-316.

Pehamberger, H., H. P. Soyer, et al. (1998). "Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group." J. Clin. Oncol. **16**(4): 1425-1429.

Pera, M. F., W. Bennett, et al. (1997). "Expression of CD30 and CD30 ligand in cultured cell lines from human germ-cell tumors." Lab. Invest. **76**(4): 497-504.

Pizzolo, G., F. Vinante, et al. (1990). "Serum levels of soluble CD30 molecule (Ki-1 antigen) in Hodgkin's disease: relationship with disease activity and clinical stage." Br. J. Haematol. **75**: 282-284.

Pizzolo, G., F. Vinante, et al. (1997). "High serum level of soluble CD30 in acute primary HIV-1 infection." Clin. Exp. Immunol. **108**(2): 251-253.

Plautz, G. E., Z. Y. Yang, et al. (1993). "Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 4645-4649.

Polski, J. M. und C. G. Janney (1999). "Ber-H2 (CD30) immunohistochemical staining in malignant melanoma." Mod. Pathol. **12**(9): 903-906.

Powell, I. F., T. Li, et al. (1998). "Construction and expression of a soluble form of human CD30L with functional activity." J. Leukoc. Biol. **63**(6): 752-757.

Prehn, R. T. und J. M. Main (1957). "Immunity to methylcholantrene-induced sarcomas." J. Natl. Cancer Inst. **18**(769-778).

Qin, Z. und T. Blankenstein (1995). "Tumor growth inhibition mediated by lymphotoxin: Evidence of B-lymphocyte involvement in the antitumor response." Cancer Res. **55**(21): 4747-4751.

Rath, P. C. und B. B. Aggarwal (1999). "TNF-induced signaling in apoptosis." J. Clin. Immunol. **19**(6): 350-364.

Reiser, H. und M. J. Stadecker (1996). "Costimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune disease." N. Engl. J. Med. **335**(18): 1369-1377.

Restifo, N. P., I. Bacik, et al. (1995). "Antigen processing *in vivo* and the elicitation of primary CTL responses." J. Immunol. **154**: 4414-4422.

Rivoltini, L., M. Radrizzani, et al. (1998). "Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing." J. Immunol. **161**: 1220-1230.

Romagnani, P., F. Annunziato, et al. (1998). "High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassal's corpuscles in the medulla of human thymus." Blood **91**(9): 3323-3332.

Romagnani, S., F. Annunziato, et al. (1996). "Role for CD30 in HIV expression." Immunol. Lett. **51**: 83-88.

Romagnani, S., G. Del Prete, et al. (1995). "CD30 and type 2 T helper (Th2) responses." J. Leukocyte Biol. **57**: 726-730.

Romerdahl, C. A. und M. L. Kripke (1998). "Role of helper T-lymphocytes in rejection of UV-induced murine skin cancers." Cancer Res. **48**: 2325-2328.

Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1987). "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." N. Engl. J. Med. **16**: 889-897.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." Nat. Med. **4**(3): 321-327.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (1994). "Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2." JAMA **271**(12): 907-913.

Rudy, W., B. Gückel, et al. (1997). "Differential function of CD80- and CD86-transfected human melanoma cells in the presence of IL-12 and IFN- γ ." International Immunology **9**(6): 853-860.

Russell, J. H. und R. Wang (1993). "Autoimmune gld mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells." Eur. J. Immunol. **23**: 2379-2382.

Salviadori, S., B. Gansbacher, et al. (1995). "B7.1 amplifies the response to interleukin-2-secreting tumor vaccines in vivo, but fails to induce a response by naive cells in vitro." Hum. Gene Ther. **6**: 1299-1306.

Samulski, R. J., L. S. Chang, et al. (1989). "Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression." J. Virol. **63**: 3822-3828.

Schreiber, H. (1993). Tumor Immunology. New York, Raven Press, Ltd.

Schreiber, S., E. Kampgen, et al. (1999). "Immunotherapy of metastatic malignant melanoma by a vaccine consisting of autologous interleukin 2-transfected cancer cells: outcome of a phase I study." Hum. Gene Ther. **10**(6): 983-993.

Schwab, U., H. Stein, et al. (1982). "Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells." Nature **299**: 65-67.

Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." Science **248**: 1349-1355.

Schwartz, R. H. (1992). "Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy." Cell **71**(7): 1065-1068.

- Seder, R. A., R. N. Germain, et al. (1994). "CD28-mediated costimulation of interleukin-2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon γ production." J. Exp. Med. **179**: 299-304.
- Shanebeck, K. D., C. R. Maliszewski, et al. (1995). "Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand." Eur. J. Immunol. **25**(8): 2147-2153.
- Shimozato, O., K. Takeda, et al. (1999). "Expression of CD30 ligand (CD153) on murine activated T cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. **256**(3): 519-526.
- Shirai, T., H. Yamaguchi, et al. (1985). "Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumor necrosis factor." Nature **313**(6005): 803-806.
- Shresta, S., J. W. Heusel, et al. (1995). "Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis." Immunol. Rev. **146**: 211-221.
- Smith, C. A., T. Farrah, et al. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death." Cell **76**: 959-962.
- Stein, H. und F. Dallenbach (1992). Diffuse large cell lymphomas of B and T-cell type. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Stein, H., J. Gerdes, et al. (1987). Phenotypic and genotypic markers in malignant lymphomas: cellular origin of Hodgkin and Sternberg-Reed cells and implications for the classification of T-cell and B-cell lymphomas. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Stein, H., D. Y. Mason, et al. (1985). "The expression of the Hodgkin's disease-associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue. Evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells." Blood **66**(4): 848-858.
- Strand, S., W. J. Hofmann, et al. (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (Apo-1/Fas) ligand-expressing tumor cells - a mechanism of immune evasion?" Nat. Med. **2**: 1361-1370.
- Stuber, E. und W. Strober (1996). "The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response." J. Exp. Med. **183**(3): 979-989.
- Sumimoto, H., K. Tani, et al. (1997). "GM-CSF and B7-1 (CD80) co-stimulatory signals co-operate in the induction of an effective anti-tumor immunity in syngeneic mice." Int. J. Cancer **73**: 556-561.
- Sun, Y., A. Paschen, et al. (1999). "Cell-based vaccination against melanoma - background, preliminary results, and perspective." J. Mol. Med. **77**: 593-608.
- Tang, D. C., M. DeVit, et al. (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature **356**: 152-154.

- Thomas, M. C., T. F. Greten, et al. (1998). "Enhanced tumor protection by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression at the site of an allogeneic vaccine." Hum. Gene Ther. **9**(6): 835-843.
- Thompson, C. B., T. Lindsten, et al. (1989). "CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell- derived lymphokines/cytokines." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 1333-1337.
- Toes, R. E., R. J. Blom, et al. (1996). "Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors." J. Immunol. **156**: 3911-3918.
- Toes, R. E., R. J. Blom, et al. (1996). "Protective antitumor immunity induced by immunization with completely allogeneic tumor cells." Cancer Res. **56**(16): 3782-3787.
- Topalian, S. L., D. Solomon, et al. (1989). "Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas." J. Immunol. **142**(10): 3714-3725.
- Townsend, S. E. und J. P. Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells." Science **259**: 368-370.
- Townsend, S. E., F. W. Su, et al. (1994). "Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7-transfected tumors." Cancer Res. **54**: 6477-6483.
- Trentin, L., R. Zambello, et al. (1997). "B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules." Cancer Res. **57**(21): 4940-4947.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv. Immunol. **47**: 187-376.
- von Wasielewski, R., S. Seth, et al. (2000). "Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factor." Blood **15**(4): 1207-1213.
- Walker, L. S., A. Gulbranson-Judge, et al. (2000). "Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40." Immunol. Today **21**(7): 333-337.
- Wang, M., V. Bronte, et al. (1995). "Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen." J. Immunol. **154**(9): 4685-4692.
- Weiss, J., R. A. Herbst, et al. (2000). "Malignant melanoma of the skin. Pathogenesis, clinical aspects and prognosis." Versicherungsmedizin **52**(1): 7-12.
- Wendtner, C. M., A. Nolte, et al. (1997). "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. **4**(7): 726-735.

- Wick, M., P. Dubey, et al. (1997). "Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy." J. Exp. Med. **186**(2): 229-238.
- Wiley, S. R., R. G. Goodwin, et al. (1996). "Reverse signaling via CD30 ligand." J. Immunol. **157**(8): 3635-3639.
- Wiley, S. R., K. Schooley, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-682.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle cells in vivo." Science **247**: 1465-1468.
- Wu, T. C., A. Y. C. Huang, et al. (1995). "A reassessment of the role of B7-1 expression in tumor rejection." J. Exp. Med. **182**(5): 1415-1421.
- Yang, F. C., K. Agematsu, et al. (1996). "CD27/CD70 interaction directly induces natural killer cell killing activity." Immunology **88**(2): 289-293.
- Yang, G., M. T. Mizuno, et al. (1997). "B7-negative versus B7-positive P815 tumor: differential requirements for priming of an antitumor immune response in lymph nodes." J. Immunol. **158**: 851-858.
- Yang, S., T. L. Darrow, et al. (1997). "Generation of primary tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from autologous and human lymphocyte antigen class I-matched allogeneic peripheral blood lymphocytes by gene-modified melanoma cells." Cancer Res. **57**(8): 1561-1568.
- Young, J. W. und K. Inaba (1996). "Dendritic cells as adjuvants for class I major histocompatibility complex-restricted antitumor immunity." J. Exp. Med. **183**: 7-11.
- Zambello, R., L. Trentin, et al. (2000). "Analysis of TNF-receptor and ligand superfamily molecules in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes." Blood **96**(2): 647-654.
- Zatloukal, K., A. Schneeberger, et al. (1995). "Elicitation of a systemic and protective anti-melanoma immune response by an IL-2-based vaccine." J. Immunol. **154**: 3406-3419.

Lebenslauf

Name: Marion Eckert

Geburtsdatum und -ort: 18.10.1968 in München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Adresse: Ganghoferstr. 80
81373 München
Tel.: 089 – 764832
e-mail: marion.eckert@ngi.de

Schulbildung:

1975 - 1979	Grundschule (Ährenfeld-) Gröbenzell
1979 - 1988	Gymnasium Puchheim, Abitur in den Leistungskursen Biologie und Französisch, sowie in den Grundkursen Geschichte und Deutsch

Studium:

1989 - 1995	Biologiestudium an der Ludwig - Maximilians Universität München
1991	Vordiplomsprüfung
1994	<i>Abschluss mit Diplomprüfungen</i> in den Fächern - Biochemie - Genetik - Humangenetik - Immunologie
1992 - 1994	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians Universität München
1994	<i>Physikum</i>
1995 - 2000	Fortsetzung des Medizinstudiums
1996	<i>1. Staatsexamen</i>
1999	<i>2. Staatsexamen</i>
2000	<i>3. Staatsexamen</i>
2000	USMLE Step 2 (2. Amerikanisches Staatsexamen)
2001	USMLE Step 1 (1. Amerikanisches Staatsexamen)

Diplomarbeit: 1994 - 1995

Diplomarbeit im "Scripps Research Institute", San Diego, USA, im Fach Immunologie zum Thema:
"Die Rolle der CD40 - CD40L Interaktion bei der EBV-assoziierten Lymphomentstehung im Modell der hu-PBL-SCID Maus"

<u>Doktorarbeit:</u>	seit 1996	Doktorarbeit bei PD Dr. med. Michael Hallek und Dr. Clemens Wendtner, Medizinische Klinik der LMU München zum Thema: "Zur Rolle des CD30L bei der Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen Melanomzellen".
<u>Praktische Berufserfahrungen:</u>		
<u>Famulaturen:</u>	Sept./Okt. 1996	Famulatur im St. John's Medical College in Bangalore, Indien (Gynäkologie, Dermatologie)
	Sept./Okt. 1997	Famulatur im Scripps Memorial Hospital in San Diego, Californien, USA (Chirurgie)
	April 1998	Famulatur im Children's Hospital San Diego (Hämatologie/Onkologie)
	Sept./Okt. 1998	Famulatur in einer Praxis für Allgemeinmedizin in München (Dr. med. Vonnegut)
<u>Praktisches Jahr:</u>		
	April 1999 - Juli 1999	Innere Medizin am Beth Israel Deaconness Medical Center und Mount Auburn Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA (Stipendium für das 6-monatige PJ Programm der Harvard-München-Alliance)
	Aug. 1999	Kinderchirurgie am Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA
	Sept. 1999	Chirurgische Intensivstation am Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA
	Okt./Nov. 1999	Kinderchirurgie am UCSD Medical Center, San Diego, USA
	Nov./Dez. 1999	Pädiatrische Urologie am Children's Hospital, UCSD, San Diego, USA
	Dez'99 - März 2000	Pädiatrie im von Hauner'schen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München; Fallvorstellung über das "Dubowitz Syndrom"
<u>Arzt im Praktikum:</u>	2000 - 2002	Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München Abteilung Hepatologie 6-monatige Rotation auf der Säuglingsstation 6-monatige Rotation in der Allgemein-Ambulanz
<u>Assistenzärztin seit:</u>	März 2002	Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München Abteilungen Gastroenterologie/Hepatologie/ Allgemein-Ambulanz

Zusätzliche Erfahrungen im medizinischen/wissenschaftlichen Arbeitsbereich:

1990	Übersetzerin für die Firma BioRad
1992 - 1996	Krankenpflegerische Tätigkeiten in: - Kinderklinik München Schwabing - Frauenklinik Dr. Krüsmann, Pasing - Krankenhaus München-Pasing
1992 - 1993	Wissenschaftliche Hilfskraft am Max-von Pettenkofer-Institut bei Prof. H. Wolf, München
1992	Vorbereitung und Betreuung des Biologie Kurses für Mediziner im Institut für Genetik und Mikrobiologie der LMU München
März 1996	Ausbildung zur "Massage technician" an der "School of Healing Arts" in San Diego, USA
1997 - 1998	Sprechstundenhilfe in der Allgemeinarztpraxis bei Dr. med. H. Vonnegut, München (1997-98)
2000 – 2001	Erstellung und Überarbeitung von Pflanzenmonographien innerhalb des Projekts Phytotherapie der Internetfirma „Netdoktor.de“
2001	Mitgestaltung des Seminars für Tutoren in Frauen-Chiemsee (Harvard-München Allianz)
2001/2002	Mit-Autorenschaft der Lernkarten „Pädiatrie Pur“ Beim Börm Bruckmeier Verlag

Ausserberufliche Tätigkeiten:

1983 - 1994	Nebentätigkeit als Flötenlehrerin für Kinder
1988 - 1989	Aufenthalt in San Jose, Californien, USA als Au-pair Mädchen
1989 - 1990	Übersetzertätigkeit im Reisebüro "Afrika Tours Individuell", München
1989 - 1993	Nebentätigkeit als Skilehrerin für Kinder

München, den 10.06.2002

Publikationen

Abstracts:

Gentransfer kostimulatorischer Moleküle mit Plasmid-Vektoren auf der Basis des rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (rAAV) beim kolorektalen Karzinom
*Hacker U.T., Röhnisch T., Wendtner C.M., **Eckert M.**, Buhmann R., Hallek M., Endres S.*
Z Gastroenterol 1997; 35: 787-788

The accessory molecule CD30L enhances B7-1 induced T cell responses against human melanoma cells
*C. M. Wendtner, C. Schweighofer, S. Anton, **M. Eckert**, D. Kofler, C. Bogedain, U. Möbius, W. Hiddemann, M. Hallek*
Blood; Vol.94, No 10, Supplement 1, Nov 15, 1999

Gene transfer of CD30 ligand (CD30L) sustains the CD80 mediated T cell response against human melanoma cells
*C. Schweighofer, **M. Eckert**, S. Anton, M. Hallek, C.-M. Wendtner*
Onkologie - International Journal for Cancer Research and Treatment 1999; 22 (suppl. 1): p 39

Poster:

Differentielle Effekte von CD80 und CD30L humaner Melanomzellen auf humane T-Zellen
*C.-M. Wendtner, **M. Eckert**, R. Buhmann, U. Möbius, M. Hallek*
DGHO Meeting Frankfurt, Okt. '98

Gene transfer of CD30 ligand (CD30L) sustains the CD80 mediated T cell response against human melanoma cells
*C. Schweighofer, **M. Eckert**, S. Anton, M. Hallek, C.-M. Wendtner*
DGHO Meeting Jena, Okt. '99

Gene transfer of CD30 ligand (CD30L) sustains the CD80 mediated T cell response against human melanoma cells
*C. Schweighofer, **M. Eckert**, S. Anton, M. Hallek, C.-M. Wendtner*
5th International Symposium: Biological Therapy of Cancer, Klinikum Grosshadern Okt. '99

Expression von CD95 (Fas/Apo-1) und Fas-Ligand in Lebergewebe bei Kindern mit chronischer HCV- und HBV-Infektion. Eine Untersuchung an 50 Patienten

M. Eckert, M. Kappler, D. Stachel, R. Meilbeck, Th. Lang

16. Jahrestagung der GPGE, Bozen, April 2001

Autoimmunhepatitis Typ II und mentale Retardierung in einer Patientin mit Hermansky Pudlak Syndrom

M. Eckert, B. Lorenz, M. Schaller, A. Gerecke, I. Baumann, M. Kappler, U.B.

Graubner, Th. Lang

17. Jahrestagung der GPGE, Potsdam, April 2002

Vorträge:

Expression of Fas and FasL in liver tissue of children with chronic hepatitis B and C

M. Eckert, M. Kappler, D. Stachel, R. Meilbeck, Th. Lang

34th Annual Meeting of ESPGHAN Genf, Mai 2001

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Michael Hallek für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit sowie die stete Bereitschaft und Hilfeleistung bei der Klärung von Fragen und Problemen.

Herrn PD Dr. med. Clemens Wendtner danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und für seine konstruktiven Bemühungen und Ratschläge, die deren Fertigstellung ermöglichten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Tim Röhnisch für die Einführung in die Methoden, die unermüdliche Unterstützung bei technischen Problemen und seine stete Bereitschaft zur Diskussion.

Bei Dr. med. Susanne Danhauser-Riedl bedanke ich mich sehr für ihre geduldige Einführung in die Methodik der FACS-Analysen.

Weiterhin möchte ich dem gesamten Team meinen Dank aussprechen für die großartige Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und darüberhinaus für die vielen Stunden gemeinsamen Arbeitens, Lernens und auch Vergnügens: Dr. rer. nat. Michael Schäffer, Kathi Häuselmann, Sascha Weidler, Dr. med. Uli Hacker, Carmen Schweighofer, Michaela Schneiderbauer und Christine Schuster.

Meinen Eltern hingegen danke ich von ganzem Herzen für Ihre unermüdliche, verständnisvolle Unterstützung, die sie mir über die vielen Jahre, die meine gesamte Ausbildung in Anspruch nahm, zukommen ließen!