

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach Therapie
mit einem trifunktionalen bispezifischen Antikörper**

Nina Eißler

aus
Altena/NRW

2012

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. med. Ralph Mocikat am Institut für Molekulare Immunologie im Helmholtz-Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt - betreut und von Frau Prof. Dr. Angelika M. Vollmar von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

.....

(Nina Eißler)

Dissertation eingereicht am 20. März 2012

1. Gutachterin	Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar
2. Gutachter	Herr Prof. Dr. med. R. Mocikat
Mündliche Prüfung am	9. Mai 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abkürzungen	3
I	Einleitung	5
3	Das Immunsystem	5
3.1	Das angeborene Immunsystem	5
3.2	Das adaptive Immunsystem	6
4	Tumorimmunologie	9
4.1	Immunüberwachung und Immun-Editing	9
4.2	Tumorimmuntherapie	9
4.3	Trifunktionale bispezifische Antikörper	10
5	Aufgabenstellung	12
II	Material und Methoden	14
6	Materialien	14
6.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
6.2	Reagenzien und Chemikalien	15
6.3	Kits	16
6.4	Medien und Puffer	16
6.5	Antikörper und Multimere	17
6.5.1	Therapeutische Antikörper	17
6.5.2	Depletionsantikörper	18
6.5.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	19
6.5.4	Multimere	19
6.5.5	Panning-Antikörper	19
6.6	Primer	20
6.7	Peptide	20
6.8	Software	20
7	Methoden	20
7.1	Zelllinien, Dendritische Zellen, T-Zellen	20
7.2	Tierversuche	22
7.3	T-Zell-Stimulationen	23
7.4	<i>In-vitro</i> -Kokulturen	23
7.5	Quantifizierung von Zytokinen	24
7.6	Durchflusszytometrie	24
7.7	Zytotoxizität	25

7.8	Molekularbiologische Methoden	25
7.8.1	RNS-Extraktion	25
7.8.2	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	25
III	Ergebnisse	26
8	Der bsAk Surek in der Tumorthherapie	26
8.1	Therapie des B78-D14-Melanoms mit dem bsAk Surek	26
8.2	CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen sind für die Therapie essenziell	27
9	Effekt von Surek auf Effektorzellen <i>in vivo</i>	28
9.1	Aktivierung von T-Zellen	28
9.2	Aktivierung von CD11c ⁺ -Zellen und Induktion einer gemischten Th1/Th2-Antwort	29
10	Untersuchung der Tumorreaktivität und Antigenspezifität von T-Zellen, induziert durch Behandlung mit Surek	31
10.1	Durch Surek induzierte T-Zellen sind tumorspezifisch	32
10.2	Durch Surek induzierte T-Zellen erkennen spezifische Tumor-assoziierte Antigene	34
10.3	Funktion der durch Surek induzierten T-Zellen	37
10.3.1	<i>In vitro</i> restimulierte T-Zellen zeigen peptidspezifische Zytotoxizität	37
10.3.2	<i>In vitro</i> restimulierte T-Zellen können <i>in vivo</i> nach adoptivem Transfer B16F0-Melanomzellen abstoßen	37
11	<i>In-vitro</i>-Modell zur Untersuchung der Rolle von DZ in der bsAk-vermittelten Aktivierung von T-Zellen und Lyse von Tumorzellen	40
11.1	DZ verstärken die Surek-induzierte Aktivierung von T-Zellen und fördern die Proliferation von CD8 ⁺ -T-Zellen	40
11.2	Gemischte Th1/Th2-Antwort <i>in vitro</i>	41
11.3	Surek-induzierte Lyse von Tumorzellen ist von der Interaktion zwischen T-Zellen und DZ abhängig	42
12	Optimierung der Therapie durch Kombination des bsAk Surek mit DZ	44
IV	Diskussion	46
12.1	Untersuchung der Immunantwort nach Behandlung mit Surek <i>in vivo</i> . . .	46
12.2	Die Rolle der DZ bei der Surek-induzierten Immunantwort	50
12.3	Kombination von Surek und DZ verbessert die Therapie	51
12.4	Ausblick	52
V	Anhang	63

13 Veröffentlichungen	63
13.1 Fachpublikationen	63
13.2 Poster, Kongressbeiträge	63
14 Danksagung	64

1 Zusammenfassung

Die Induktion einer lang anhaltenden, systemischen T-Zell-Immunität ist ein wichtiges Ziel der Tumorimmuntherapie. Bispezifische Antikörper (bsAk), die keinen intakten Fc-Teil besitzen, bringen T-Zellen in unmittelbare Nähe von Tumorzellen und können dadurch die Lyse der Tumorzellen induzieren. Dieser Vorgang wird allerdings nicht von der Entstehung eines T-Zell-Gedächtnisses begleitet. Im Gegensatz dazu rekrutieren trifunktionale bsAk, die einen intakten Fc-Teil besitzen, nicht nur T-Zellen, sondern auch akzessorische Immunzellen über die Bindung an aktivierende $Fc\gamma$ -Rezeptoren ($Fc\gamma R$). In der vorliegenden Doktorarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass bei der Behandlung mit trifunktionalen bsAk ein Vakzinierungseffekt stattfindet, der in der Entstehung einer polyvalenten T-Zell-Antwort resultiert. Dies wird durch die effiziente Aktivierung akzessorischer Immunzellen ermöglicht, wodurch zusätzlich benötigte Signale für eine vollständige T-Zell-Aktivierung geliefert werden und außerdem die Präsentation von Tumorantigenen gegenüber T-Zellen sichergestellt wird. Es konnte gezeigt werden, dass die effektive Behandlung mit einem trifunktionalen bsAk, der an CD3 auf T-Zellen und an das Gangliosid GD2 auf einer murinen Melanomzelllinie bindet, sowohl von $CD4^+$ -, als auch von $CD8^+$ -T-Zellen abhängig war. Mäuse, die eine Therapie mit einem trifunktionalen bsAk überlebt hatten, konnten ein erneutes Reinokulum von Tumorzellen abstoßen, hatten also ein immunologisches Gedächtnis entwickelt. Aus den behandelten Mäusen konnten Tumor-spezifische T-Zellen isoliert werden, womit der formelle Nachweis eines T-Zell-Gedächtnisses, induziert durch den trifunktionalen bsAk, erbracht war.

Der trifunktionale bsAk aktivierte $CD11c^+$ -Zellen *in vivo* und war in der Induktion einer systemischen Immunantwort dem korrespondierenden $F(ab')_2$ -Fragment überlegen. Durch Restimulation von Milz- und Lymphknoten-Zellen *in vitro* konnten T-Zell-Linien generiert werden, die als spezifische Reaktion gegen Melanomzelllinien $IFN-\gamma$ produzierten. Die T-Zellen, die durch Behandlung mit dem trifunktionalen bsAk entstanden waren erkannten Tumor-spezifische Peptide, die von Melanom-assoziierten Antigenen abgeleitet waren. Der trifunktionale bsAk induzierte also eine polyvalente T-Zell-Antwort. *In vitro* restimulierte, Tumor-spezifische T-Zellen waren außerdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* funktionell. Durch Behandlung mit dem korrespondierenden $F(ab')_2$ -Fragment konnten keine Tumor-spezifischen T-Zellen induziert werden. Somit konnten durch die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit zum ersten Mal die Existenz Tumor-spezifischer T-Zellen nach Behandlung mit einem trifunktionalen bsAk nachgewiesen und Antigen-Spezifitäten dieser T-Zellen definiert werden.

In einem *In-vitro*-Kokulturmodell konnte zudem gezeigt werden, dass eine effektive, durch

den bsAk ausgelöste T-Zell-Aktivierung und eine Elimination von Tumorzellen nur in Gegenwart von Dendritischen Zellen (DZ) zustande kam. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte eine Möglichkeit zur Verbesserung der Therapie mit bsAk durch Kombination von bsAk mit *in vitro* generierten DZ aufgezeigt werden, die der alleinigen Therapie mit bsAk deutlich überlegen war.

2 Abkürzungen

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BrdU	Bromdesoxyuridin
bsAk	bispezifischer Antikörper
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	komplementäre (complementary) DNS
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte (zytotoxische T-Zelle)
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc-Teil	Teil der konstanten Kette des Antikörpers
Fc γ R	Fc γ -Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
gp	Glykoprotein
Gy	Gray
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
I.U.	International Unit (Internationale Einheit)
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
MAGE	Melanoma Antigen Gene
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbolmyristataacetat
PRR	Pattern-Recognition Receptor
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tc	zytotoxische (cytotoxic) T-Zelle
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
Trp2	Tyrosinase-related protein 2
TZR	T-Zell-Rezeptor

Teil I

Einleitung

3 Das Immunsystem

Unser Körper ist permanent Organismen ausgesetzt, die geschluckt oder eingeatmet werden oder unsere Haut und Schleimhäute durchdringen und die, wenn sie pathogen sind und unsere Abwehrbarrieren durchbrochen haben, Krankheiten auslösen können. Im Laufe der Evolution hat sich in höheren Lebewesen ein effizientes Immunsystem entwickelt, das in der Lage ist, *Selbst* von *Fremd* zu unterscheiden und uns damit vor Krankheitserregern zu schützen. Es besteht aus einem komplexen Netzwerk von zellulären Systemen und humoralen Faktoren. Eine grundlegende Einteilung unterscheidet das angeborene Immunsystem, das phylogenetisch älter ist, und das adaptive Immunsystem, das sich durch antigenspezifische Immunantworten von T- und B-Zellen auszeichnet (Parkin und Cohen, 2001; Vollmar und Dingermann, 2005; Murphy u. a., 2008).

3.1 Das angeborene Immunsystem

Teil des angeborenen Immunsystems sind zum einen die physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Barrieren der Haut und Schleimhäute mit ihren schützenden Oberflächenepithelien. Zum anderen wird die angeborene Immunantwort durch eine Reihe von löslichen Faktoren - dem Komplementsystem, Zytokinen und Akutphase Proteinen - und zellulären Effektoren - den neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen (DZ) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) - vermittelt (Parkin und Cohen, 2001; Murphy u. a., 2008). Charakteristisch für die angeborene Immunantwort ist eine schnelle Beseitigung von eingedrungenen, körperfremden Mikroorganismen ohne vorherigen Kontakt.

In frühen Stadien einer Infektion oder Gewebeverletzung sezernieren aktivierte Makrophagen eine Reihe von löslichen Botenstoffen, die Zytokine und Chemokine. Dadurch werden als erste Zellpopulation neutrophile Granulozyten an den Ort der Infektion gelockt, um Pathogene direkt zu eliminieren. Später werden auch Monozyten und unreife DZ mobilisiert. Schädliche Mikroorganismen oder ihre Produkte, wie zum Beispiel das von gramnegativen Bakterien produzierte LPS, werden vom angeborenen Immunsystem bei diesen ersten Schritten der Immunantwort über keimbahnkodierte Rezeptoren, die Mustererkennungsrezeptoren (Pattern-Recognition Receptors, PRR), erkannt. Nach Ak-

tivierung der Signalkaskaden wird eine Immunantwort unter Beteiligung verschiedener Immuneffektorzellen induziert.

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen stellen eine besondere Population unter den Leukozyten dar. Sie verbinden angeborene und erworbene Immunität miteinander, da sie die Fähigkeit haben, beide zu aktivieren und zu kontrollieren (Granucci u. a., 2008).

DZ sind in hoher Frequenz in Geweben zu finden, die eine Kontaktfläche zur Außenwelt darstellen, zum Beispiel in der Lunge, dem Darm und in der Haut. Dort können sie Zellen des angeborenen Immunsystems, beispielsweise NK-Zellen, aktivieren, wenn es zu Kontakt mit einem Pathogen kommt.

Eine besondere Rolle spielen DZ in der Induktion der adaptiven Immunantwort. Unter den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) stellen DZ die potentesten T-Zellaktivatoren dar. Unreife DZ, die eine besonders gute Fähigkeit zur Phagozytose haben, präsentieren körpereigene Antigene gegenüber T-Zellen, was zur Anergie der T-Zellen führt. Werden DZ aktiviert, zum Beispiel im Rahmen einer Entzündung, durch virale oder bakterielle Produkte oder durch proinflammatorische Zytokine, durchlaufen sie einen Reifungsprozess. Sie exprimieren vermehrt kostimulatorische B7-Moleküle (CD80 und CD86), Adhäsions- und MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche, produzieren Zytokine und werden zu effizienten Aktivatoren von T-Zellen (Palucka u. a., 2010; Nencioni und Brossart, 2004).

Die Rolle der DZ im Rahmen der T-Zellaktivierung wird im Folgenden noch genauer erläutert.

3.2 Das adaptive Immunsystem

Wie schon bei der Beschreibung des angeborenen Immunsystems angemerkt, tragen Zytokinmilieu und kostimulatorische Moleküle der angeborenen Immunantwort zur Induktion einer adaptiven Immunreaktion bei. Charakteristisch für das adaptive Immunsystem ist die spezifische Erkennung von Antigenen durch Immunglobuline (in membranständiger Form sind das die B-Zellrezeptoren), und von T-Zellrezeptoren (TZR).

Die zielgerichtete Antwort des adaptiven Immunsystems nach der Erkennung eines Antigens läuft in zwei Stufen ab. Erst kommt es zum Priming, zur Aktivierung und zur Differenzierung der T- oder B-Zelle, die das Antigen spezifisch erkannt hat. Dieser Schritt spielt sich in spezialisierten lymphoiden Geweben ab. Danach läuft die Effektorantwort ab, entweder durch aktivierte T-Zellen, die den Lymphknoten verlassen und in das Gebiet der

Erkrankung wandern, wo sie ihre Effektorfunktionen ausüben, oder durch die Sekretion von Antikörpern durch aktivierte, antigenspezifische B-Zellen (Parkin und Cohen, 2001).

B- und T-Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Während B-Zellen für die Dauer ihrer Entwicklung im Knochenmark bleiben, wandern T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt als Thymozyten in den Thymus, wo ihre weitere Entwicklung stattfindet. In der frühen Entwicklung der T- und B-Zellen, bevor es zu Antigenkontakt kommt, entsteht ein riesiges Repertoire an T-Zellrezeptoren und Immunglobulin-Spezifitäten. Dieses ist ausreichend, um die Zahl der Pathogene, mit denen die Zellen im Laufe eines Lebens in Kontakt kommen, abdecken zu können (Parkin und Cohen, 2001).

T-Zellen

Der TZR bindet an lineare Peptide, die der T-Zelle im Zusammenhang mit einem Selbst-MHC-Molekül von professionellen APZ, zum Beispiel DZ, präsentiert werden. Naive, antigenspezifische T-Zellen durchqueren kontinuierlich die lymphatischen Gewebe. Sie tragen Rezeptoren, die Adhäsionsmoleküle binden, und können dadurch in Lymphknoten eindringen, bei deren Durchquerung sie vorübergehend an eine Vielzahl von APZ binden. APZ wandern nach Aktivierung beispielsweise an einem Entzündungsherd in LK und Milz ein, nachdem sie Antigen aufgenommen und prozessiert haben, das sie dann als Peptide präsentieren. Trifft eine T-Zelle auf eine APZ, die das Antigen trägt, an das der TZR der T-Zelle bindet, dann erfolgt ihre Aktivierung im Laufe von 2-3 Tagen (Murphy u. a., 2008; Abbas und Lichtman, 2005).

Die Aktivierung einer naiven T-Zelle bedarf mehrerer Signale. Das erste Signal wird durch die Bindung des MHC-Peptid-Komplexes an den TZR geliefert. Dabei binden die unterschiedlichen MHC-Klassen an unterschiedliche Korezeptoren auf den T-Zellen. Über MHC-I werden vor allem intrazelluläre Peptide präsentiert. MHC-I interagiert mit dem Korezeptor CD8 auf T-Zellen. CD8-T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T-Lymphocytes, CTL) bezeichnet, da sie direkt zytotoxisch gegen fremde oder infizierte Zellen wirken können, wenn sie diese über MHC-I-Peptid-Komplexe auf deren Oberfläche erkennen.

Extrazelluläre Peptide werden von APZ über MHC-II präsentiert, das an CD4 auf T-Zellen bindet. CD4-T-Zellen werden auch T-Helferzellen genannt, da sie vor allem regulatorisch auf andere Zellen wirken. Weitere notwendige Signale zur Aktivierung der naiven T-Zellen werden durch kostimulatorische Moleküle, zum Beispiel durch die B7-Moleküle (CD80, CD86) auf aktivierten DZ, bereitgestellt, die an CD28 auf T-Zellen binden (Abb. 1).

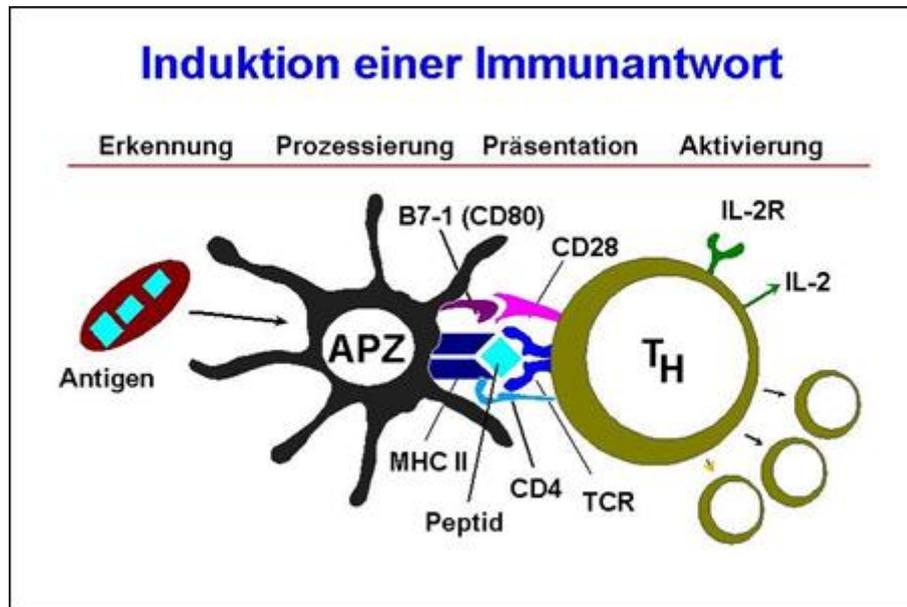


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Induktion einer Immunantwort (Pleyer und Ritter, 2003). Nach Erkennung eines Antigens erfolgt die Aktivierung von T-Zellen über die Interaktion zwischen TZR und MHC (Signal 1) und kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86, die an CD28 binden, Signal 2). Die aktivierten T-Zellen sezernieren wiederum Zytokine und locken damit Makrophagen, B-Zellen, CTLs und NK-Zellen an und aktivieren diese.

Nach Aktivierung der naiven T-Zelle wird zuerst deren Teilung (klonale Proliferation) angeregt, damit sich die Zahl der antigenspezifischen T-Zellen erhöht, die dann Effektorfunktionen ausüben können. Die Effektorfunktionen der verschiedenen T-Zellen unterscheiden sich deutlich voneinander. $CD4^+$ -T-Zellen können nach Aktivierung durch die Sekretion ihrer Zytokine in zwei Gruppen eingeteilt werden: die Th1- und die Th2-Zellen. Th1-Zellen werden durch $IFN-\gamma$ und IL-12 aktiviert und produzieren IL-2, $IFN-\gamma$ und TNF. Sie aktivieren Makrophagen und $CD8^+$ -CTL und führen damit zu einer zellulären Immunantwort.

Induziert durch IL-4 entwickeln sich $CD4^+$ -T-Zellen dagegen zu Th2-Zellen, die B-Zellen effektiv aktivieren können und so zu einer humoralen Immunantwort beitragen. Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und $TGF-\beta$. Die Produktion von Zytokinen wie IL-3 und GM-CSF erfolgt durch beide Populationen.

Die Zytokine der verschiedenen Subpopulationen beeinflussen sich auch gegenseitig. $IFN-\gamma$ inhibiert die Entwicklung von Th2-Zellen, IL-10 und $TGF-\beta$ können die Aktivierung von Th1-Zellen verhindern. Bei einem wiederholten Antigenkontakt erfolgt eine wesentlich schnellere und effektivere T-Zellantwort durch die Expansion von Gedächtniszellen. Das Überleben solcher Gedächtniszellen ist das Resultat einer aktiven Immunisie-

ung und bietet Schutz gegen Erreger, die wiedererkannt werden. Ebenso entwickeln sich auch B-Gedächtniszellen, die bei wiederholtem Erregerkontakt schnell spezifische Antikörper produzieren (Parkin und Cohen, 2001; Murphy u. a., 2008; Abbas und Lichtman, 2005).

4 Tumorimmunologie

4.1 Immunüberwachung und Immun-Editing

Die Erkenntnis, dass das Immunsystem eine große Rolle in der Entwicklung von Krebserkrankungen spielt, ist das Ergebnis jahrzehntelanger Forschungen. Bereits um 1900 stellte Paul Ehrlich die Hypothese auf, dass Krebserkrankungen in langlebenden Organismen sehr verbreitet wären, wenn das Immunsystem nicht einen protektiven Einfluss gegen sie ausüben würde (Ehrlich, 1909).

Nach dem heutigen Stand der Forschung spielt das Immunsystem eine doppelte Rolle in der Entstehung von Tumoren. Einerseits zerstört es entartete Zellen, andererseits selektiert es Tumorzellen, die in einem immunkompetenten Organismus überleben können. Der Beitrag des Immunsystems in der Tumorentwicklung wird in der Theorie des Immun-Editing beschrieben, die die Tumorentstehung in drei Phasen aufgliedert (Stutman, 1974; Dunn u. a., 2002; Schreiber u. a., 2011):

Die erste Phase ist die Eliminationsphase, in der entstehende Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden (Schreiber u. a., 2011).

In der darauf folgenden Gleichgewichtsphase, dem Äquilibrium, wird der Tumor vom Immunsystem in Schach gehalten. Da die Tumorzellen allerdings Mutationen und einer Selektion durch das Immunsystem unterliegen, werden sie in der dritten Phase, der Evasion, vom Immunsystem nicht mehr erkannt. Einer der am besten untersuchten Evasionsmechanismen ist der Verlust von Tumorantigenen auf der Tumorzelloberfläche, ein Mechanismus, der das Ausbleiben einer antigenspezifischen Immunantwort zur Folge hat (Schreiber u. a., 2011).

4.2 Tumorimmuntherapie

Die klassischen Säulen der Krebstherapie sind Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Ein großes Problem dieser Therapien ist das Weiterbestehen minimaler Resterkrankungen, die in vielen Patienten zum Rezidiv führen. Um diese Problematik zu umgehen, werden neuere Therapieformen angewandt und erforscht, wie die Immuntherapien, die

eine Immunantwort gegen Krebserkrankung induzieren oder verstärken sollen (Sharma u. a., 2011).

Obwohl sich in den letzten Jahrzehnten das Wissen über die Interaktionen zwischen Tumoren und dem Immunsystem beträchtlich vermehrt hat, gibt es immer noch viele Hindernisse zur Erreichung von erfolgreichen und weitläufig eingesetzten Immuntherapien. Ein Problem stellt beispielsweise die Evaluation einer effektiven Immuntherapie in klinischen Studien dar. Bei Patienten mit großer Tumorlast wird die Immuntherapie für weniger effizient erachtet, da man von einem Zusammenhang zwischen der Größe des Tumors und der Suppression des Immunsystems ausgeht. In Studien mit Patienten in fortgeschrittenen Stadien wirkt sich dieser Zusammenhang negativ auf den Erfolg der Therapie aus (Lesterhuis u. a., 2011; Sharma u. a., 2011).

Trotzdem gibt es inzwischen eine Reihe von vielversprechenden Immuntherapien, die entweder schon zugelassen sind oder in klinischen Studien getestet werden. Dazu gehören (Lesterhuis u. a., 2011):

- virale und zelluläre Vakzine,
- Zytokine, wie IL-2 und IFN- α ,
- adoptiver Transfer von tumorspezifischen T-Zellen,
- zielgerichtete Agenzien, wie zum Beispiel Antikörper. Diese sind meist gegen über-exprimierte Antigene auf Tumorzellen gerichtet. Ein prominenter Vertreter ist hier beispielsweise der monoklonale anti-CD20-Antikörper Rituximab (McLaughlin u. a., 1998). Antikörper können aber auch Zielantigene auf Immunzellen binden, wie der kürzlich von der FDA zugelassene Antikörper Ipilimumab (Minchom u. a., 2011), der an das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) bindet und damit eine Inhibition von T-Zellen verhindert.

4.3 Trifunktionale bispezifische Antikörper

Die Behandlung von Krebserkrankungen mit Antikörpern ist sehr vielversprechend, was sich schon daran zeigt, dass in den letzten 20 Jahren mehr als 30 Antikörper und Immunglobulinderivate für eine große Zahl von Indikationen zugelassen wurden (Beck u. a., 2008). Da viele Patienten oft nur partiell auf die Antikörpertherapie ansprechen, werden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Funktion der Antikörper zu verbessern, wie beispielsweise die Optimierung der Antikörperstrukturen (Chames und Baty, 2009; Beck u. a., 2008).

Eine Gruppe von sehr aussichtsreichen Kandidaten für die Tumorimmuntherapie sind bispezifische Antikörper (bsAk) (Peipp und Valerius, 2002; Chames und Baty, 2009). Diese Konstrukte enthalten zwei Bindungsarme, von denen einer gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen (TAA), der andere gegen ein Oberflächenmolekül einer immunologischen Effektorzelle gerichtet ist (Fanger und Guyre, 1991). Durch diesen Aufbau sind bsAk in der Lage, Immunzellen gegen den Tumor zu dirigieren und die spezifische Abtötung von Tumorzellen zu induzieren. Herkömmliche bsAk können nur einen Typ von Effektorzellen binden, beispielsweise T-Zellen (Fanger und Guyre, 1991), NK-Zellen (Weiner u. a., 1995) oder $Fc\gamma$ -Rezeptor positive Zellen (Valerius u. a., 1997).

Trifunktionale bispezifische Antikörper sind intakte bsAk, die aus einer speziellen Isotyp-Kombination mit Hilfe der Quadromtechnologie hergestellt werden (Lindhofer u. a., 1995; Zeidler u. a., 1999; Ruf und Lindhofer, 2001). Dabei werden ein Maus-IgG2a-Hybridom mit einer Spezifität für ein TAA und ein Ratte-IgG2b-Hybridom mit einer Spezifität für CD3 miteinander fusioniert. Die entstehenden Quadrome liefern einen hohen Ertrag des gewünschten bsAk-Konstrukts, da es zu einer präferenziellen Spezies-restringierten Paarung von schweren und leichten Ketten kommt (Lindhofer u. a., 1995). Falsch gepaarte Produkte lassen sich mit Hilfe einer Ein-Schritt-Reinigung über Protein-A-beladene Säulen und eines pH-Gradienten entfernen (Lindhofer u. a., 1995).

Um T-Zellen effektiv zu aktivieren, sind mehrere Signale notwendig (Boussiotis u. a., 1994; Linsley und Ledbetter, 1993). Trifunktionale bsAk liefern das erste Signal über die Bindung an CD3. Die Besonderheit dieser Antikörper ist die zusätzliche Bindung an aktivierende ($Fc\gamma RI$, IIa und III), aber nicht inhibierende ($Fc\gamma RIIb$) $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf akzessorischen Immunzellen (Lindhofer u. a., 2011). Die aktivierten APZ liefern durch Zytokinsekretion und Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen die fehlenden Signale zur T-Zellaktivierung. Dieser Prozess geschieht in unmittelbarer Nähe der Tumorzellen, an die der bsAk über seinen zweiten Arm bindet. Es entsteht dadurch ein Komplex aus Tumorzellen und Immunzellen, der sogenannte *Tri-Zell-Komplex*, und durch die Aktivierung der unterschiedlichen Immunzellen kommt es zur Abtötung von disseminierten Tumorzellen (Zeidler u. a., 1999, 2000).

Höchstwahrscheinlich phagozytieren und prozessieren aktivierte APZ außerdem Antigene, die von abgetöteten Tumorzellen stammen, und präsentieren immunogene Peptide gegenüber T-Zellen. So kommt es vermutlich neben der Vernichtung der Tumorzellen auch noch zur Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses (Zeidler u. a., 2000; Ruf und Lindhofer, 2001) (Abb. 2). Der formelle Nachweis für die Entstehung eines spezifischen Gedächtnisses wurde bisher allerdings noch nicht erbracht.

Eine Reihe von trifunktionalen bsAk ist derzeit in der Entwicklung und wird in kli-

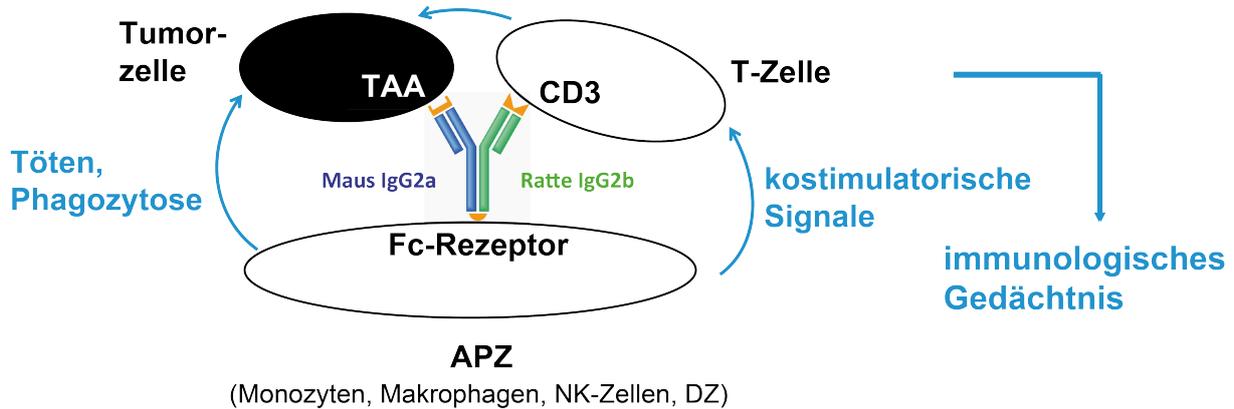


Abbildung 2: Der bsAk rekrutiert T-Zellen und APZ simultan in direkter Nähe zur Tumorzelle. Dadurch kommt es zur effektiven Aktivierung naiver T-Zellen, zum Abtöten von Tumorzellen und zur Induktion eines immunologischen Gedächtnisses.

nischen Studien getestet. Diese Antikörper binden beispielsweise an die TAA Her2/neu (Jäger u. a., 2009) und CD20 (Buhmann u. a., 2009). Der erste für die Behandlung zugelassene bsAk weltweit, Catumaxomab, bindet an das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM), das beispielsweise auf Ovarial-, Colon-, Prostata- und Lungenkarzinomen meist überexprimiert ist. Catumaxomab wird derzeit für die Behandlung von malignem Ascites eingesetzt (Linke u. a., 2010).

Weitere potenzielle Tumorantigene stellen Ganglioside dar. Diese sind auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, wie dem Gliom, dem Neuroblastom oder dem Melanom, häufig überexprimiert. Verschiedene Studien demonstrieren die Eignung einiger dieser zellwandverankerten Sphingolipide als Zielantigene in der Tumorthherapie (Navid u. a., 2010; Ragupathi u. a., 2003). Auch für den Einsatz von trifunktionalen bsAk sind Ganglioside interessante Zielantigene. Die Fähigkeit eines solchen bsAk, naive T-Zellen *in vitro* zu aktivieren und gegen Gangliosid-exprimierende Tumorzellen zu dirigieren, wurde bereits demonstriert (Ruf u. a., 2004).

5 Aufgabenstellung

Die Fähigkeit verschiedener bsAk zur Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Immunzellen und zur Redirektion von T-Zellen gegen Tumorzellen konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden (Ruf u. a., 2004; Zeidler u. a., 1999). Außerdem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass intakte bsAk im Gegensatz zu Fragmenten, die den Fc-Teil entbehren, in der Lage sind, ein immunologisches Gedächtnis zu induzieren, da mit bsAk behandelte Mäuse in der Lage waren, eine wiederholte Tumorkultivierung zu überleben

(Ruf und Lindhofer, 2001).

Der formelle Beweis für die Entstehung eines spezifischen T-Zellgedächtnisses durch die Therapie mit bsAk wurde allerdings noch nicht erbracht. Ebenso sind auch die Spezifitäten, die von potenziellen bsAk-induzierten T-Zellen erkannt werden, bislang unbekannt.

Um die Vakzinierungseffekte trifunktionaler bsAk *in vivo* zu untersuchen, wurde der Surrogat-Antikörper Surek entwickelt. Surek bindet an CD3 auf murinen T-Zellen und an das Gangliosid GD2 auf Tumorzellen. B78-D14, eine murine Tumorzelllinie mit C57BL/6-Hintergrund, die vom B16-Melanom abgeleitet ist, exprimiert dieses Gangliosid konstitutiv (Haraguchi u. a., 1994) und wurde deshalb in dieser Arbeit als transplantierbarer Tumor in einem Mausmodell verwendet.

Zuerst wurde die Kapazität des bsAk Surek in der Therapie von Mäusen analysiert, um seine Funktionalität zu beweisen und damit die Grundvoraussetzung für die folgenden Untersuchungen zu schaffen. Die Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach Therapie mit dem bispezifischen Antikörper Surek wurde dann mit Hilfe eines Immunisierungsmodells und *In-vitro*-Restimulationen von T-Zellen, die aus immunisierten Mäusen isoliert wurden, untersucht.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Welche Effektorzellpopulationen sind für eine effiziente Therapie mit Surek notwendig?
- Zeigt sich nach Gabe von Surek *in vivo* eine Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Immunzellen?
- Welche Art von T-Zellantwort (Th1 oder Th2) wird durch Surek induziert?
- Lassen sich tumorspezifische T-Zellen nach Immunisierung nachweisen?
- Wenn es eine tumorspezifische T-Zellantwort nach Immunisierung gibt, ist es dann möglich, peptidspezifische T-Zellen nachzuweisen, die typische, auf dem Melanom überexprimierte Antigene erkennen?
- Sind diese T-Zellen funktionell?
- Welche Rolle spielen dendritische Zellen, die potentesten APZ des Immunsystems, bei der Wirkweise des bsAk Surek?
- Lässt sich die Therapie mit Surek durch gleichzeitige Gabe syngener DZ verbessern?

Teil II

Material und Methoden

6 Materialien

6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Betrachtungsanlage HWM-D-200 (Strahlungsquelle: $^{137}\text{Caesium}$), GammaCell40, Ottawa, Kanada

Brutschrank Hera cell 240, Heraeus Instruments, Hanau

Durchflusszytometer LSR-II, Becton Dickinson, Heidelberg

Einmalpipetten 5/10/25 ml, Greiner bio-one, Frickenhausen

Einmalzählkammer C-Chip, Peqlab, Erlangen

ELISA-Lesegerät Sunrise, Tecan, Crailsheim

FACS-Röhrchen, klein, Greiner bio-one, Frickenhausen

Heizblock DRI-Block DB2A, Techne, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Kryoröhrchen, Nunc, Wiesbaden

Lichtmikroskop Leica DMIL, Leica Microsystems, Heidelberg

Light-CyclerTM (Gerät und Kapillaren), Roche, Mannheim

LumaPlateTM-96, Perkin Elmer, Rodgau

Luminex Bio-PlexTM Systems, Bio-Rad, München

Mehrlochplatten, Becton Dickinson, Heidelberg

Milli-Q[®]-Reinwasserherstellungssystem, Millipore, Schwalbach

Nanodrop Spectrometer, Peqlab, Erlangen

Pipetten Eppendorf/Gilson, Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg

Pipettenspitzen Gilson/Greiner, Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg

Plattenzentrifuge Labofuge 400, Heraeus Instruments, Hanau

Reaktionsgefäße 1,5/2 ml, Eppendorf, Hamburg

Röhrchen 15/20 ml, Becton Dickinson, Heidelberg

Sterilbank, BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Stickstofftank, Air liquid, Düsseldorf

Szintillationsmessgerät TOPCount, Canberra Packard, Dreieich

Wasserbad, Memmert, Schwabach

Zellsiebe, Becton Dickinson, Heidelberg

Zentrifuge, biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau

Zentrifuge, Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Hanau

6.2 Reagenzien und Chemikalien

Ammoniumchlorid, Merck, Darmstadt

Brefeldin A, eBioscience, Frankfurt

1-Brom-3-Chlor-Propan, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chrom-51 (185 mBq), Hartmann Analytic, Braunschweig

CountBrightTM Absolute Counting Beads for flow cytometry, Invitrogen, Karlsruhe

DMSO, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

EDTA, Merck, Darmstadt

Formaldehyd 37 %, Carl Roth, Karlsruhe

FKS, Invitrogen, Karlsruhe

Geneticin, Invitrogen, Karlsruhe

Hygromycin, Invitrogen, Karlsruhe

Ionomycin (Calcium-Salz), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

IC Fixation Buffer, eBioscience, Frankfurt

Kaliumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt

Lipopolysaccharid (LPS), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Live/Dead[®] Fixable Blue-Lösung, Invitrogen, Karlsruhe

Natriumazid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natriumcarbonat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

10x Permeabilization Buffer, eBioscience, Frankfurt

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Proleukin[®] S (IL-2, human), Novartis, Nürnberg

PBS, Invitrogen, Karlsruhe

Propidiumiodid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Salzsäure, 1 M, Merck, Darmstadt

TRIReagentTM, Biozol, Eching

Trypanblau, Invitrogen, Karlsruhe

Tween 20, ICN, Eschwege

6.3 Kits

BrdU-Proliferationsassay:

BD PharmingenTM BrdU Flow Kit, FITC, Becton Dickinson, Heidelberg

ELISA:

BD OptEIATM Mouse IFN- γ ELISA set, Becton Dickinson, Heidelberg

Luminex:

Bio-PlexTM Mouse Cytokine Th1/Th2 Assay, BioRad, München

PCR:

First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV); Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I, Roche, Mannheim

6.4 Medien und Puffer

Basismedium:

RPMI 1640 ohne L-Glutamin

5 % FKS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin-G-Natrium und 100 μ g/ml Dihydrostreptomycinsulfat

2 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

5 ml nichtessenzielle Aminosäuren (100x)

50 μ M 2-Mercaptoethanol

alle Bestandteile von Invitrogen, Karlsruhe

Selektionsmedium:

RPMI 1640 ohne L-Glutamin

8 % FKS (hitzeinaktiviert)

0,4 mg/ml Geneticin

0,5 mg/ml Hygromycin

2 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

5 ml nichtessenzielle Aminosäuren (100x)

T-Zell-Medium:

Basismedium mit 10 % FKS

DZ-Medium:

Basismedium mit 20 % FKS

Einfriermedium:

90 % FKS

10 % DMSO

Carbonatpuffer (pH 9,5):

0,1 M Natriumcarbonat in Millipore-Wasser

FACS-Puffer:

PBS mit

2 % FKS

2 mM EDTA

1 % Natriumazid

Lysepuffer (pH 7,4):

8,25 g NH_4Cl

1,00 g K_2HCO_3

37 mg Na-EDTA

H_2O ad 100 ml

6.5 Antikörper und Multimere

6.5.1 Therapeutische Antikörper

Surek:

bispezifischer Antikörper, hergestellt durch Quadromtechnologie (Ruf u. a., 2004; Lindhofer u. a., 1995)

- Klon: TRBs05W19-1-1
- Spezifität: anti-human-GD2, anti-Maus-CD3
- Isotyp: Ratte-IgG2b x Maus-IgG2a

17A2:

parentaler Antikörper von Surek

- Klon: 17A2-43
- Spezifität: anti-Maus-CD3
- Isotyp: Ratte-IgG2b

Me361:

parentaler Antikörper von Surek

- Klon: Me361-3
- Spezifität: anti-human-GD2
- Isotyp: Maus-IgG2a

F(ab)₂-Surek:

bispezifisches Antikörper-Fragment ohne Fc-Teil, gewonnen durch Verdau von Surek mit Pepsin (Ruf und Lindhofer, 2001)

- Klon: TRBs05W19-1-1
- Spezifität: anti-human-GD2, anti-Maus-CD3
- Isotyp: Ratte-IgG2b x Maus-IgG2a

Alle therapeutischen Antikörper wurden von Trion Research, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

6.5.2 Depletionsantikörper

RmCD4 (Reinecke u. a., 1994)

- Spezifität: anti-Maus-CD4
- Isotyp: Ratte-IgG2b

RmCD8 (Reinecke u. a., 1994)

- Spezifität: anti-Maus-CD8
- Isotyp: Ratte-IgG2b

TM- β 1 (Adam u. a., 2005)

- Spezifität: anti-IL2R β
- Isotyp: Ratte-IgG2b

6.5.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Analysen wurden folgende, direkt markierte Antikörper verwendet:

Tabelle 1: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD3	145-2C11	Hamster IgG1, κ	BD
TZR α/β	17A2	Ratte IgG2b	eBioscience
CD8	53-6.7	Ratte IgG2a	BD
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a, κ	BD
CD11c	HL3	Hamster IgG1	BD
CD11b	M1/70	Ratte IgG2b, κ	BioLegend
CD19	6D5	Ratte IgG2a	Serotec
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	BD
CD69	H1.2F3	Hamster IgG1	BD
CD62L	Mel-14	Ratte IgG2a, κ	BD
CD86	PO3	Ratte IgG2b, κ	eBioscience
CD83	Michel-19	Ratte IgG1, κ	BioLegend
CD80	16-10A1	Hamster IgG2, κ	BD
CD40	Mrz 23	Ratte IgG2a	BioLegend
MHC-II	2G9	Ratte IgG2a	BD
IFN- γ	XMG-1.2	Ratte IgG1a, κ	BioLegend
IL-12	C15.6	Ratte IgG1	BD
Ratte IgG (H+L)	-	Ratte F(ab) ₂	Jackson

6.5.4 Multimere

Trp2-spezifisches Pro5[®] MHC-I-Pentamer, Fluorochrom: Phycoerythrin (PE), Proimmune, Oxford, Vereinigtes Königreich

MAGE-A5-spezifisches MHC-I-Dextramer, Fluorochrom: PE, Immudex, Kopenhagen, Dänemark

6.5.5 Panning-Antikörper

Für das T-Zellpanning wurden folgende Antikörper von Elisabeth Kremmer, Helmholtz-Zentrum, München, zur Verfügung gestellt:

- anti-Maus-B220, Klon TIB146
- anti-Maus-IgM, Klon HB88

- anti-Maus- κ , Klon HB58

6.6 Primer

Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried, bezogen.

Tabelle 2: Primer

Epitop	Sequenz vorwärts	Sequenz rückwärts
MAGE-A5	agggacattgtggactcagc	aatcacagcagggaggacac
MAGE-AX	gaggcctctgagtgcttgaa	acctggggtagaagggaaa
p53	agagaccgccgtacagaaga	ctgtagcatgggcatecttt
gp100	gcaccaactgtttgttct	gtgctaccatgtggcatttg
Trp2	agcagacggaacactggact	gcatctgtggaagggttgtt

6.7 Peptide

Peptidsequenzen von Tumor-assoziierten Antigenen s. Ergebnisteil Tab. 3.

HY-Peptid: FNSNRANSS, (Scott u. a., 2000).

Alle Peptide wurden bei der Firma PSL, Heidelberg, gekauft.

6.8 Software

Zur Erfassung und Auswertung durchflusszytometrischer Daten wurde die BD FACSDiva, Becton Dickinson, und die FlowJo analysis software, TreeStar Inc., Ashland, USA verwendet. ELISA-Messungen wurden mit der SW MAGELLAN V6.4. Software, Tecan Deutschland, Crailsheim, durchgeführt.

7 Methoden

7.1 Zelllinien, Dendritische Zellen, T-Zellen

Verwendet wurden Zelllinien auf C57BL/6-Hintergrund und primäre Zellen aus C57BL/6-Mäusen.

Die Zelllinie B16F0 (LGC Standards GmbH, Wesel) (Fidler, 1975; Nicolson u. a., 1978) wurde in Basismedium kultiviert.

Die vom B16F0-Melanom abgeleitete Zelllinie B78-D14 (Haraguchi u. a., 1994; Schrama u. a., 2004) entstand durch Transfektion mit Genen, die für die β -1, 4-N-Acetylgalactosaminyltransferase und die α -Sialyltransferase kodieren und die Expression der

Disialoganglioside GD2 und GD3 induzieren. B78-D14-Zellen wurden in Selektionsmedium kultiviert. Diese Zelllinie wurde von Trion Research, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

DZ wurden aus Vorläuferzellen aus Knochenmark generiert. Hierfür wurden Femora und Tibiae der Mäuse freigelegt und das Knochenmark nach Entfernen der Epiphysen mithilfe von Kanülen mit PBS aus den Diaphysen gespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde nach Lyse der Erythrozyten mit Lysepuffer zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Basismedium mit 20 % FKS unter Zugabe von 100 ng/ml GM-CSF in 6-Loch-Platten ausplattiert (Strehl u. a., 1999). Mediumwechsel fand alle 2 Tage statt. An Tag 7 wurden die DZ durch Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS für 16 h gereift. DZ wurden mittels FACS-Analyse auf die Expression folgender Marker untersucht: CD11c, CD11b, MHC-II, CD83, CD86, CD80 und CD40 (siehe Abb. 3).

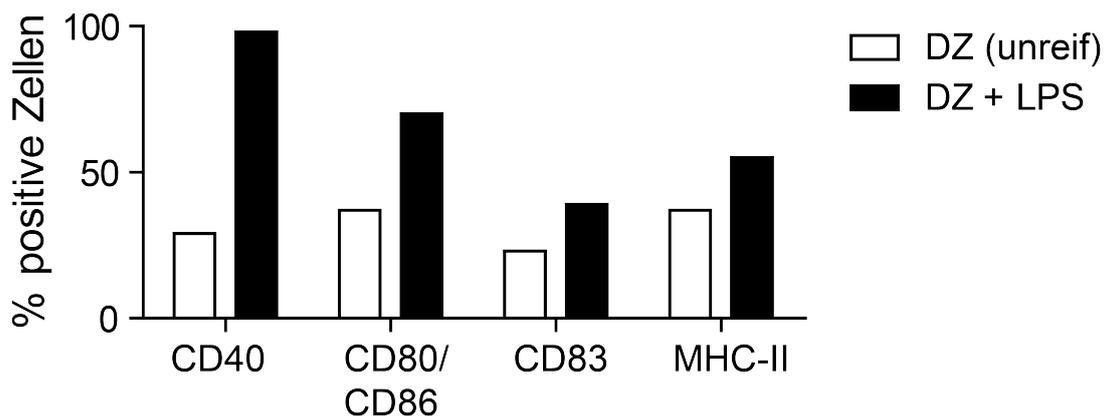


Abbildung 3: Charakterisierung von DZ generiert aus KM an Tag 8, mit und ohne Reifung durch LPS für 16 h. Eingegrenzt auf CD11c⁺-Zellen.

T-Zellen für Kokulturen wurden mittels anti-B220-, anti-IgM- und anti- κ -Panning von Milzzellsuspensionen angereichert. Hierzu wurden je 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der Panning-Antikörper in 4 ml sterilem Carbonatpuffer (0,1 M, pH 9,5) auf Petrischalen ausplattiert und über Nacht bei 0° C inkubiert. Petrischalen wurden anschließend mit PBS gewaschen. 4×10^7 Milzzellen in 4 ml Basismedium wurden auf die Schalen gegeben und für 1 h bei 4° C inkubiert. Zellsuspensionen wurden anschließend mittels FACS-Färbungen mit Antikörpern gegen CD19, CD3, CD11b und NK1.1. analysiert. So erhaltene T-Zellsuspensionen hatten eine Reinheit von > 80 %.

7.2 Tierversuche

Tiere wurden unter spezifisch Pathogen-freien Verhältnissen in der Tierhaltung des Hämatologikums, Großhadern, gehalten. C57BL/6-Mäuse wurden von Taconic (Ry, Dänemark) bezogen. Alle Tierversuche waren von der *Regierung von Oberbayern* genehmigt.

Alle Injektionen sowohl in Therapieversuchen als auch bei Immunisierungen erfolgten intraperitoneal (i.p.).

Um die letale Dosis an B78-D14-Zellen zu ermitteln wurden Mäuse mit verschiedenen Dosen B78-D14-Zellen inokuliert (s. Abb. 4A). Für Therapieversuche wurden an Tag 0 10^5 B78-D14-Zellen injiziert. Die Therapie erfolgte mit $10 \mu\text{g}$ Surek an Tag 2 und 10 oder mit $50 \mu\text{g}$ Surek an Tag 2, 7 und 11.

Um den Beitrag der CD8^+ - und CD4^+ -T-Zellen und der NK-Zellen zum Therapieerfolg zu ermitteln wurden die jeweiligen Zellpopulationen mit je $0,5 \text{ mg}$ der Depletionsantikörper RmCD8, RmCD4 oder TM- $\beta 1$ an Tag -4, und mit je $0,1 \text{ mg}$ der Depletionsantikörper an den Tagen 1 und 14 depletiert. An Tag 0 wurden 10^5 B78-D14-Zellen injiziert. Die Therapie erfolgte mit $10 \mu\text{g}$ Surek an Tag 2 und 10.

Für die kombinierte Therapie mit DZ und Surek wurden Mäuse mit einem Gemisch aus 5×10^5 DZ und $10 \mu\text{g}$ Surek an Tag 2 und 10 behandelt. Kontrollgruppen erhielten entweder nur $10 \mu\text{g}$ Surek oder nur 5×10^5 DZ. Tumorkontrollgruppen erhielten keine Therapie.

Um die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses zu überprüfen, wurden alle überlebenden Mäuse der Therapieversuche zwischen Tag 100 und 200 mit 3×10^3 B16F0-Zellen reinokuliert.

Für die Untersuchung der Aktivierung von T-Zellen und DZ *in vivo* und für Proliferationsassays wurden Mäuse mit 10^5 bestrahlten B78-D14-Zellen (100 Gy) und $10 \mu\text{g}$ Surek i.p. inokuliert. Kontrollmäuse erhielten B78-D14-Zellen alleine oder PBS. 48 h später wurden Milzen und LK für FACS-Analysen entnommen. Alternativ wurden Mäusen $1,5 \text{ mg}$ BrdU i.p. injiziert und Milzen und LK 3 h später für FACS-Analysen entnommen.

Für Immunisierungen wurden Mäuse mit 10^5 bestrahlten B78-D14-Zellen und $10 \mu\text{g}$ Surek oder äquimolaren Mengen F(ab)_2 -Surek oder einem Gemisch der parentalen Antikörper 17A2 und Me361 an Tag 0 und 14 inokuliert. An Tag 21 wurden Milzen, LK und Seren entnommen. Außerdem wurden immunisierte Mäuse an Tag 21 mit 3×10^3 B16F0-Zellen reinokuliert, um die durch die Immunisierung entstandene Tumormunität zu überprüfen.

Um das Tumor-protective Potenzial von T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden 10^6 T-Zellen von *In-vitro*-T-Zell-Stimulationen (siehe unten) zusammen mit 3×10^3 B16F0-Zellen injiziert. Zusätzlich erhielten die Mäuse ab dem Tag des T-Zelltransfers 24×10^3 I.U. humanes IL-2 (Proleukin S) für 5 Tage.

7.3 T-Zell-Stimulationen

Für *In-vitro*-Restimulationen von T-Zellen wurden 5×10^6 Milz- und LK-Zellen von immunisierten Mäusen mit 5×10^5 bestrahlten B78-D14-Zellen (100 Gy) in T-Zell-Medium in 24-Loch-Platten kokultiviert. Nach 48 h wurden 30 U/ml IL-2 zugegeben. In einem Intervall von 7 Tagen wurden T-Zellen restimuliert. Dazu wurden alle Zellen geerntet, Überstände für Zytokinanalysen gesammelt und anschließend 10^6 T-Zellen mit 10^6 bestrahlten syngenen Milzzellen (30 Gy) als APZ und $0,5 \times 10^6$ bestrahlten B78-D14-Zellen weiterstimuliert. Zugabe von IL-2 erfolgte wiederum 48 h nach der Restimulation.

Alternativ wurden Zellen immunisierter Mäuse mit 5×10^6 Peptid-beladenen Milzzellen aus naiven Mäusen für 7 Tage ohne Zugabe von IL-2 restimuliert. Die Beladung mit Peptiden erfolgte durch Inkubation von $2,4 \times 10^6$ Milzzellen/ml T-Zellmedium mit $10 \mu\text{l}$ Peptid ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) für 2 h im Brutschrank. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und mit 30 Gy bestrahlt.

24-h-Ablesetests wurden entweder direkt nach der Organentnahme oder an Tag 7 einer Restimulationsrunde durchgeführt. Dazu wurden 2×10^5 bestrahlte syngene Milzzellen und 5×10^4 bestrahlte B78-D14 oder B16F0-Zellen mit 10^5 Responder-Zellen für 24 h kokultiert. Um Peptidspezifitäten zu bestimmen, wurden 10^5 bestrahlte syngene Milzzellen wie oben mit Peptiden beladen und mit 10^5 *in vitro* restimulierten T-Zellen für 24 h kokultiert. Anschließend wurden die Überstände für Zytokinbestimmungen gesammelt.

7.4 *In-vitro*-Kokulturen

Für *In-vitro*-Kokulturversuche wurden aus Knochenmark generierte DZ syngener Mäuse nach Reifung mit LPS an Tag 8 verwendet (siehe oben). Um die T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion zu analysieren, wurden 10^6 DZ, 10^6 angereicherte T-Zellen und 5×10^5 bestrahlte B78-D14-Zellen (50 Gy) in 1 ml DZ-Medium mit oder ohne $20 \mu\text{g/ml}$ Surek in 24-Loch-Platten kokultiviert. T-Zellen wurden durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen CD69, CD62L, CD4, CD8 und TZR $\alpha\beta$ untersucht.

Um die durch Surek induzierte Lyse von B78-D14-Zellen in *In-vitro*-Kulturen zu analysieren, kokultivierten wir 10^6 DZ, 10^6 angereicherte T-Zellen und 1×10^5 B78-D14-Zellen (nicht bestrahlt) in 1 ml DZ-Medium mit oder ohne 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Surek in 24-Loch-Platten. Kontrollgruppen enthielten T-Zellen mit oder ohne Surek. Die Lyse der Tumorzellen wurde mittels FACS-Analysen untersucht. Dabei wurden tote Zellen mit Propidium-Iodid-Färbung ausgeschlossen. Tumorzellen wurden außerdem mit dem parentalen Antikörper von Surek, Me361, der an GD2 bindet und einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Ratte anti-Maus-IgG F(ab)₂-Fragment detektiert.

Zur genauen Bestimmung der Zellzahlen in diesem Versuch wurden Magnetpartikel nach Anweisung des Herstellers (Counting Beads, Invitrogen) verwendet. 23×10^3 Partikel wurden in jedes Loch der verwendeten 24-Loch-Platten gegeben, die durchflusszytometrisch ermittelte Zellzahl lebender Tumorzellen wurde über die Menge der wiedergefundenen Partikel auf Absolutzahlen pro Loch umgerechnet.

7.5 Quantifizierung von Zytokinen

IFN- γ -Konzentrationen in Überständen wurden mittels ELISA-Kits nach Anweisungen des Herstellers (BD) bestimmt. Weitere Zytokine in Kulturüberständen und Seren von Mäusen wurden mit Hilfe des Bio-PlexTM-Systems (Biorad) analysiert.

7.6 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet.

Für Lebend-Tot-Färbungen wurde die Live/Dead[®] Fixable Blue-Lösung (Invitrogen) oder Propidiumiodid verwendet. Nach Oberflächenfärbungen wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert.

Für intrazelluläre Färbungen von IFN- γ und IL-12 wurden die zu untersuchenden Zellen erst für 4 h mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A (alle 1:1000 verdünnt) in T-Zellmedium im Brutschrank inkubiert. Nach Oberflächenfärbung wurden die Zellen fixiert (IC Fixation Buffer) und anschließend permeabilisiert (Permeabilization Buffer), um intrazelluläre Zytokine mit Antikörpern anzufärben.

Durchflusszytometrische Messungen wurden am BD LSR II Flow Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

7.7 Zytotoxizität

Die Funktion von T-Zellen aus *In-vitro*-Restimulationen mit Peptid-beladenen DZ wurde in einem Chrom[51]-Freisetzungsversuch getestet. Mit Trp2- oder HY-Peptid beladene DZ aus KM syngener Mäuse (Generierung und Beladung der DZ siehe oben) wurden als Zielzellen verwendet. Diese wurden mit ^{51}Cr beladen und mit T-Zellen für 4 h koinkubiert. Effektor-zu-Zielzell-Verhältnisse lagen zwischen 100:1 bis 12,5:1. Nach der Inkubation wurden Überstände auf LUMA-Platten übertragen und nach Trocknen die Menge freigesetzten ^{51}Cr in einem γ -Szintillationszähler bestimmt.

7.8 Molekularbiologische Methoden

7.8.1 RNS-Extraktion

Die Extraktion von RNS erfolgte mit Hilfe von TRIReagentTM. Bis zu 10^6 Zellen wurden in 200 μl TRIReagent aufgenommen und lysiert. Die Auftrennung erfolgte mittels Brom-Chlor-Propan. Anschließend wurde die RNS mit Isopropanol gefällt, mit 75-%igem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Um die RNS vollständig zu lösen, wurde sie 15 min im Heizblock erwärmt. Die Messung der Konzentration erfolgte mit dem Nanodrop-Spektralphotometer. Erhaltene RNS wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

7.8.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

1 μg RNS wurde mit Hilfe eines oligo(dT)₁₅-Primers und einer Reversen Transkriptase (First Strand cDNA Synthesis Kit, siehe oben) in cDNS transkribiert. Die Expression von TAA wurde mit dem LightCycler[®] 2.0 System unter Verwendung der oben aufgeführten Primer in einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real time RT-PCR*) ermittelt. Dazu wurde der Farbstoff SYBR-Green verwendet, der Fluoreszenzlicht nur dann emittiert, wenn er an doppelsträngige DNS gebunden vorliegt. Als Kontrolle wurden alle Werte auf das Haushaltsgen HPRT bezogen.

Teil III

Ergebnisse

8 Der bsAk Surek in der Tumorthherapie

8.1 Therapie des B78-D14-Melanoms mit dem bsAk Surek

Um die funktionelle Kapazität des bsAk Surek in der Tumorabstoßung *in vivo* zu überprüfen, wurden Therapieversuche mit verschiedenen Dosen bsAk durchgeführt. Als Applikationsroute wurde, wie auch in den späteren Immunisierungsprotokollen, die intraperitoneale (i.p.) Gabe sowohl von Tumorzellen als auch von Surek gewählt. Endpunkt der Therapieversuche war ein Erkranken der Mäuse an deutlich erkennbaren Tumoren im Bauchraum.

In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe eines Titrationsversuches die minimale letale Dosis der B78-D14-Zellen ermittelt, also die Zellzahl, bei der 100 % der Mäuse an Tumoren erkranken. Diese wurde auf 10^5 Zellen pro Maus festgelegt (Abb. 4A).

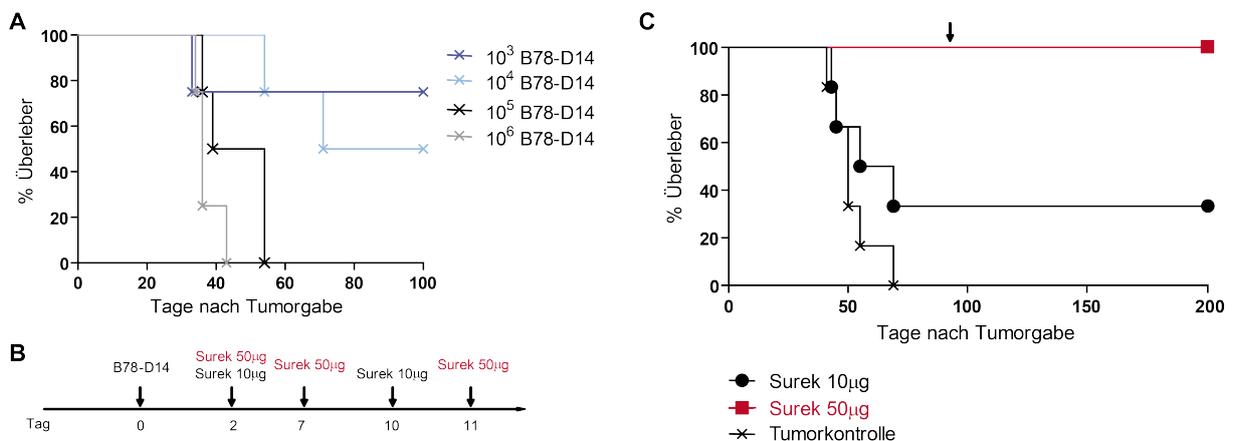


Abbildung 4: Therapieversuche mit Surek. Alle Applikationen erfolgten i.p. (A) Titration der minimalen letalen Dosis an B78-D14-Zellen. Gruppen bestanden aus je 4 C57BL/6-Mäusen. (B) Therapieschema: 2-3malige Gabe von 10 oder 50 µg Surek nach Inokulation mit 10^5 B78-D14-Zellen. (C) Therapie mit Surek wie im Schema (B). Überlebende der Therapie wurden an Tag 100 mit einer letalen Dosis von 3×10^3 B16F0-Zellen reinokuliert (angedeutet durch den Pfeil). Gruppen bestanden aus je 5 C57BL/6-Mäusen. Die Tumorkontrollgruppe erhielt keine Therapie.

Bei zweimaliger Gabe von 10 µg Surek überlebten 30 % der therapierten Mäuse, bei dreimaliger Gabe von 50 µg Surek konnten 100 % der Mäuse erfolgreich behandelt werden (Abb. 4C).

Alle Langzeitüberleber der Therapie erhielten an Tag 100 eine Reinokulation mit der parentalen Zelllinie B16F0 (Abb. 4C), die das Zielantigen des bsAk GD2 nicht exprimiert. Alle Mäuse konnten diesen Tumor abstoßen, was darauf schließen lässt, dass die Therapie mit Surek ein immunologisches Gedächtnis induziert, das nicht abhängig vom Zielantigen des bsAk ist.

8.2 CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen sind für die Therapie essenziell

Da der bsAk Surek über CD3 sowohl an CD4⁺- als auch an CD8⁺-T-Zellen binden kann, sollte mit Hilfe von Depletionsversuchen geprüft werden, welche Rolle die beiden Subpopulationen bei der Therapie mit Surek spielen. Die jeweiligen T-Zellpopulationen wurden dazu mit Depletionsantikörpern vor und während der Therapie eliminiert (Therapie- und Depletionschema s. Abb. 5A).

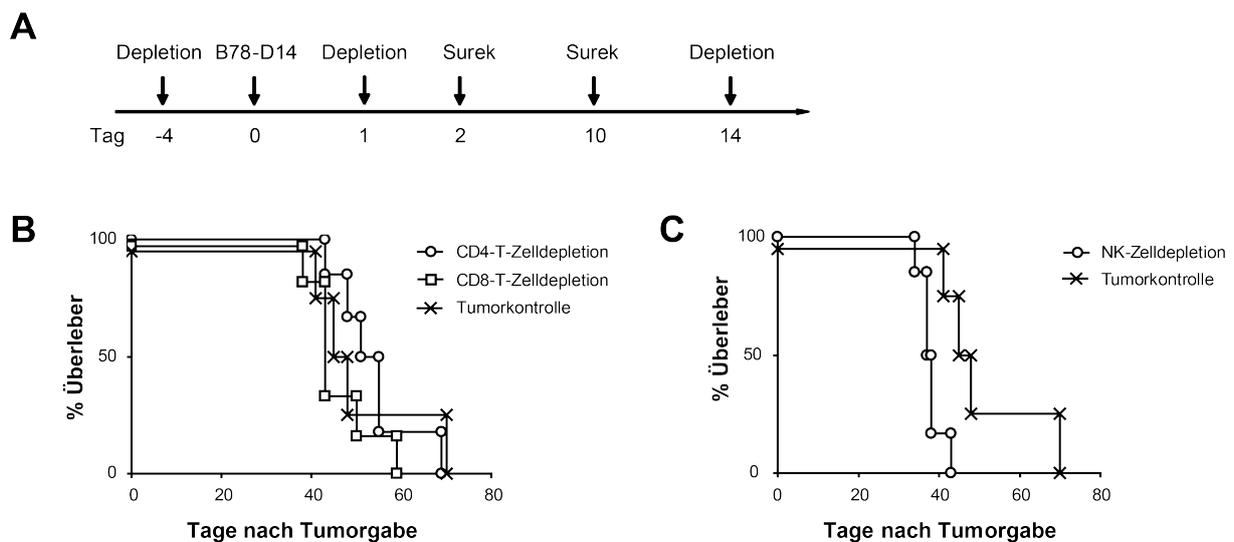


Abbildung 5: CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen sind für die Therapie mit Surek essenziell. (A) Therapieschema. Eingesetzt wurden 10⁵ B78-D14-Zellen und 10 µg Surek. (B) Depletion von CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen. (C) Depletion von NK-Zellen. Alle Gruppen umfassten je 5 Mäuse.

Wie Abbildung 5B zeigt, konnten Mäuse nicht mehr erfolgreich therapiert werden, wenn eine der beiden T-Zellpopulationen depletiert war. Sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen sind also für eine erfolgreiche Therapie mit Surek unabdingbar.

Über den intakten Fc-Teil des Antikörpers können neben verschiedenen APZ auch NK-Zellen gebunden und aktiviert werden (Zeidler u. a., 1999, 2000). Da diese Zellen eine wichtige Effektorzellpopulation der angeborenen Immunantwort darstellen, wurde auch

der Einfluss der NK-Zellen auf die Therapie mit Surek durch Depletionsversuche untersucht. Auch diese Zellpopulation ist für das Gelingen der Therapie mit Surek erforderlich, da ohne NK-Zellen 100 % der therapierten Mäuse an Tumoren erkrankten (Abb. 5C).

9 Effekt von Surek auf Effektorzellen *in vivo*

Zur Charakterisierung der durch Surek ausgelösten Immunantwort wurde zunächst das Aktivierungsmuster verschiedener Immunzellen nach einer ersten Immunisierung mit Surek analysiert. Dazu wurden bestrahlte B78-D14-Zellen zusammen mit Surek injiziert und anschließend Aktivierungszustand, Proliferation und Zytokinproduktion verschiedener Zelltypen untersucht.

9.1 Aktivierung von T-Zellen

48 h nach Applikation von Surek und B78-D14-Zellen wurden T-Zellen in Milzen und LK untersucht. Deutlich erhöhte Werte von intrazellulärem IFN- γ konnten vor allem in CD8⁺-T-Zellen detektiert werden (Abb. 6A). Auch die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 war auf CD8⁺-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich erhöht, während das Zelladhäsionsmolekül CD62L auf diesen Zellen herunterreguliert war (Abb. 6B). Die Herunterregulierung von CD62L ist ein typisches Zeichen für die Entwicklung von Effektor-T-Zellen, die die lymphatischen Organe verlassen, um in der Peripherie ihre Funktionen auszuüben (Murphy u. a., 2008). CD62L kann deshalb auch als Aktivierungszeichen gedeutet werden. CD4⁺-T-Zellen zeigten keine erhöhte Zytokinproduktion, im Übrigen aber die gleichen Veränderungen der Aktivierungsmarker, wenn auch deutlich schwächer ausgeprägt als bei den CD8⁺-T-Zellen (nicht gezeigt).

Gleichzeitig war das CD4/CD8-Verhältnis deutlich zu CD8-Zellen hin verschoben (Abb. 6C). Um zu überprüfen, ob dies durch eine vermehrte Proliferation von CD8⁺-Zellen, induziert durch den bsAk, zustande kam, analysierten wir die BrdU-Inkorporation in beiden T-Zellpopulationen. Proliferierende Zellen bauen BrdU in ihre DNA ein, welches dann mit Hilfe eines spezifischen, fluoreszenzmarkierten anti-BrdU-Antikörpers in durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen werden kann. 48 h nach Gabe von Tumorzellen und Surek zeigte sich eine starke Proliferation von CD8⁺-T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 6D). CD4⁺-T-Zellen proliferierten ebenfalls, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß.

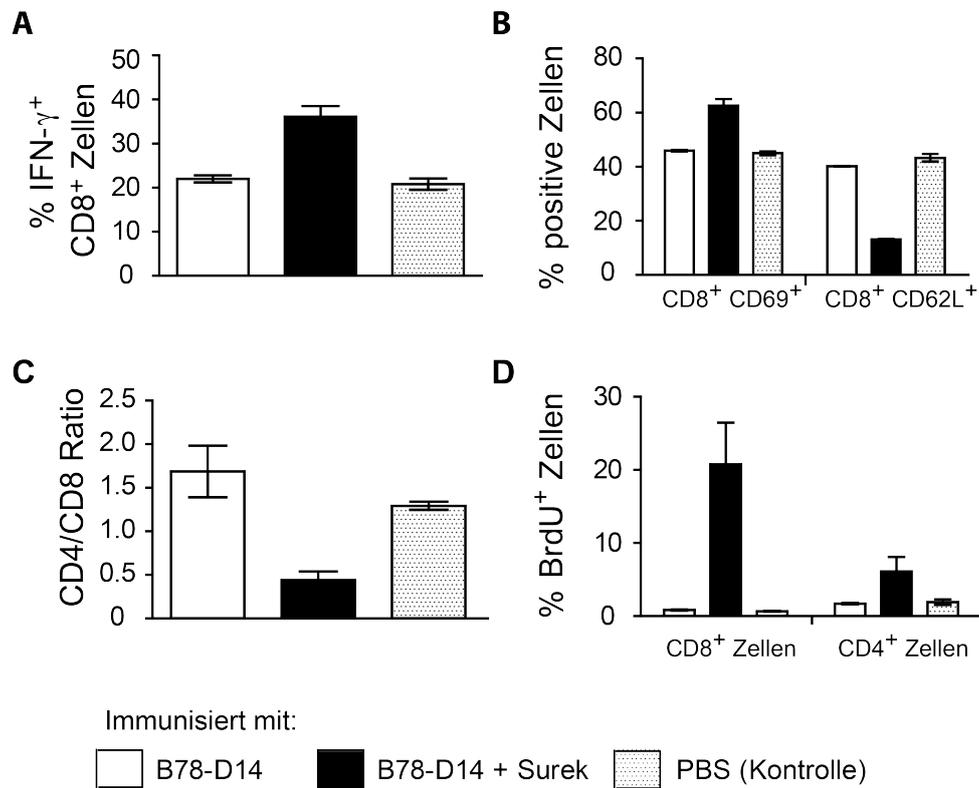


Abbildung 6: Aktivierung und Proliferation von CD8⁺-T-Zellen nach Applikation von Surek *in vivo*. Milzen wurden 48 h nach Applikation von Surek und B78-D14-Zellen aus je 4 Mäusen entnommen. Kontrollgruppen erhielten B78-D14-Zellen alleine oder PBS. T-Zellen wurden mithilfe durchflusszytometrischer Analysen untersucht. (A) Intrazelluläre Färbung des IFN- γ -Gehalts in CD8⁺-T-Zellen. (B) Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD62L auf CD8⁺-T-Zellen. (C) CD4/CD8-Verhältnis. (D) Proliferation von CD4- und CD8-Zellen detektiert mittels BrdU-Inkorporation.

9.2 Aktivierung von CD11c⁺-Zellen und Induktion einer gemischten Th1/Th2-Antwort

Da Surek nicht nur an T-Zellen bindet, sondern über den Fc-Teil auch an aktivierende Fc γ -Rezeptoren auf akzessorischen Immunzellen, wurde der Aktivierungsstatus von DZ nach Gabe von Surek und B78-D14-Zellen untersucht. 48 h nach Behandlung mit Surek zeigten CD11c⁺-Zellen eine erhöhte Expression der Oberflächenmoleküle CD86, CD80 und CD83 im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die entweder nur mit B78-D14-Zellen oder mit PBS behandelt worden waren (Abb. 7A).

Mature DZ liefern nicht nur zusätzliche Aktivierungssignale für T-Zellen, sondern bestimmen auch das Th1/Th2-Gleichgewicht. Die erhöhte IFN- γ -Produktion von T-Zellen nach Surek-Gabe deutete auf eine Th1/Tc1-Antwort hin. Um zu untersuchen, inwie-

weit DZ zur Ausrichtung der Immunantwort beitragen, wurde die Zytokinexpression von CD11c-positiven Zellen 48 h nach Surek-Applikation durch intrazelluläre FACS-Färbung von Milzzellen analysiert. Es zeigte sich, dass DZ nach Surek-Gabe mehr IL-12 produzieren als die Kontrollgruppe, also ein Zytokin, das eine Th1/Tc1-Antwort induziert (Abb. 7B).

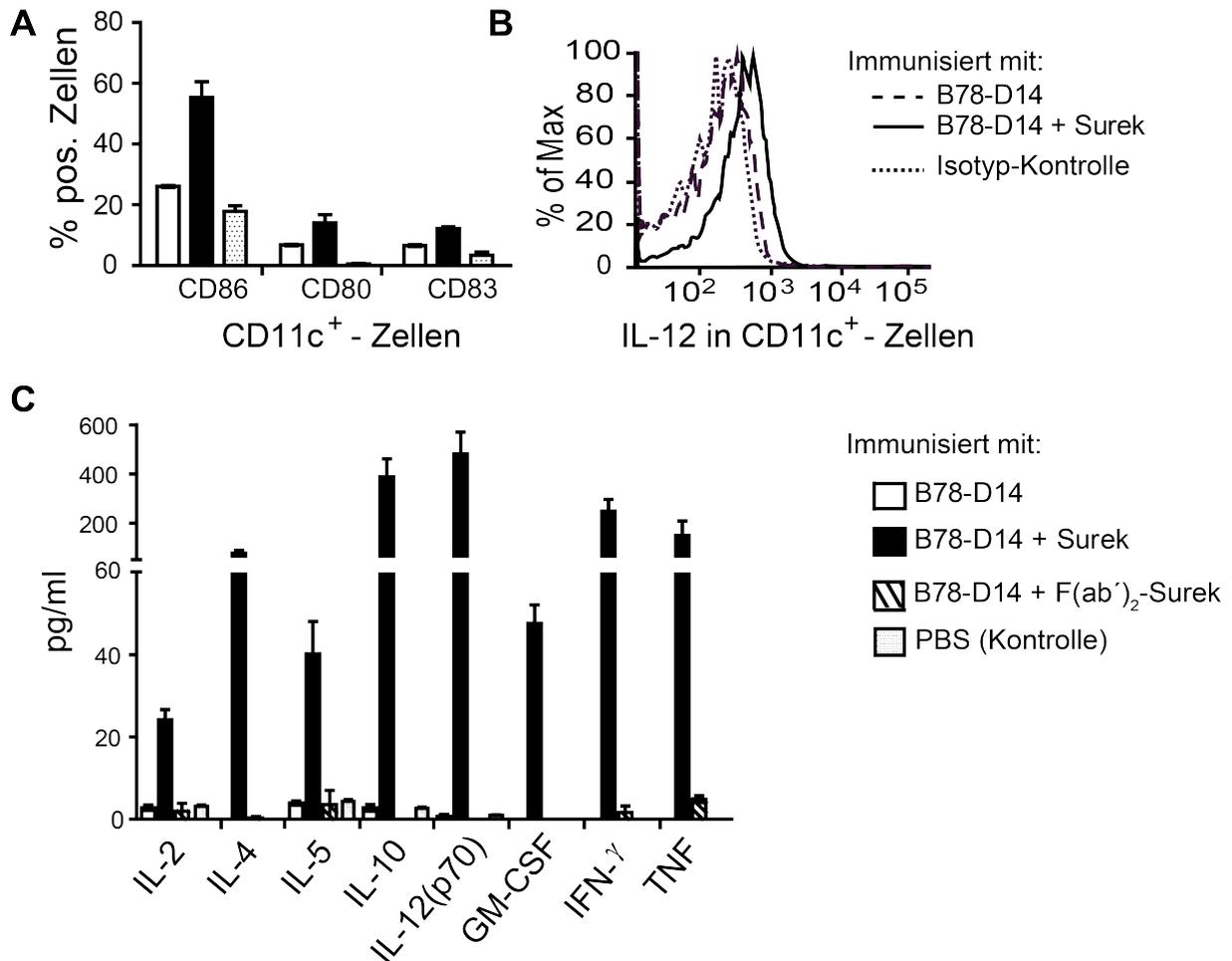


Abbildung 7: Aktivierung von CD11c⁺-Zellen und Entstehung eines gemischten Th1/Th2-Profiles durch Surek. Durchflusszytometrische Bestimmung (A) der Aktivierungsmarker CD86, CD80 und CD83 und (B) des IL-12-Gehalts von CD11c⁺-Zellen aus Milzen, 48 h nach Applikation von Surek und B78-D14-Zellen. (C) Zytokinprofil in Seren 1 Woche nach Immunisierung mit Surek und B78-D14 detektiert mittels BioplexTM-Analyse. Immunisierung von Kontrollgruppen wie in der Legende angezeigt.

Um die Th1/Th2-Ausrichtung der Immunantwort nach Behandlung mit Surek noch genauer zu charakterisieren, wurden Serumwerte einer Reihe von Th1- und Th2-Zytokinen bestimmt. Dazu wurden Seren immunisierter Mäuse entweder 24 h nach der ersten Im-

munisierung oder 1 Woche nach einer zweiten Immunisierung entnommen und mit Hilfe einer Multiplex-Analyse untersucht. Für beide Zeitpunkte ergab sich ein vergleichbares Zytokinprofil einer gemischten Th1/Th2-Antwort. Es fanden sich sowohl erhöhte Werte der Th1-Zytokine IL-12, IFN- γ , IL-2, GM-CSF und TNF, als auch der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 (Abb. 7C).

Um die Bedeutung des Fc-Teils bei der Induktion der Immunantwort zu bestimmen, wurde eine Gruppe von Mäusen mit einem F(ab')₂-Fragment des bsAk Surek behandelt. Im Gegensatz zur Behandlung mit dem intakten bsAk Surek wurden nach Gabe des F(ab')₂-Fragments keine erhöhten Zytokinwerte in den Seren der immunisierten Mäuse gefunden (Abb. 7C). Dieses Ergebnis verdeutlicht die Notwendigkeit des Fc-Teils bei der effizienten systemischen Aktivierung des Immunsystems.

10 Untersuchung der Tumorreaktivität und Antigen-spezifität von T-Zellen, induziert durch Behandlung mit Surek

Für die Entwicklung eines langanhaltenden T-Zell-Gedächtnisses ist eine Aktivierung von DZ notwendig, welche Tumorbruchstücke phagozytieren, prozessieren und vom Tumor stammende Peptide gegenüber T-Zellen präsentieren. Durch die Behandlung mit Surek entwickelt sich ein immunologisches Gedächtnis (Abb. 4C), was auf das Vorhandensein tumorspezifischer T-Zellen nach der Therapie hinweist. Um die Reaktivität solcher T-Zellen gegenüber dem Tumor zu testen und ihre Antigen-spezifitäten zu identifizieren, wurden Mäuse zweimal mit Surek und bestrahlten B78-D14-Zellen immunisiert (Abb. 8A). Diese immunisierten Mäuse waren in der Lage, ein Inokulum mit B16F0-Zellen abzustoßen, hatten also genau wie die therapierten Mäuse ein immunologisches Gedächtnis entwickelt (Abb. 8B).

Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurden Milz und LK entnommen und *in vitro* mit B78-D14-Zellen restimuliert. Jede Restimulationsrunde dauerte 1 Woche. Da nach einigen Tagen *in vitro* hauptsächlich T-Zellen überlebten, wird im weiteren Text auch von T-Zell-Stimulationen die Rede sein. Kontrollgruppen wurden entweder nur mit bestrahlten B78-D14-Zellen oder nur mit PBS immunisiert, in einigen Versuchen wurden auch Immunisierungen mit einem Gemisch der parentalen Antikörper oder mit dem F(ab')₂-Fragment des bsAk durchgeführt.

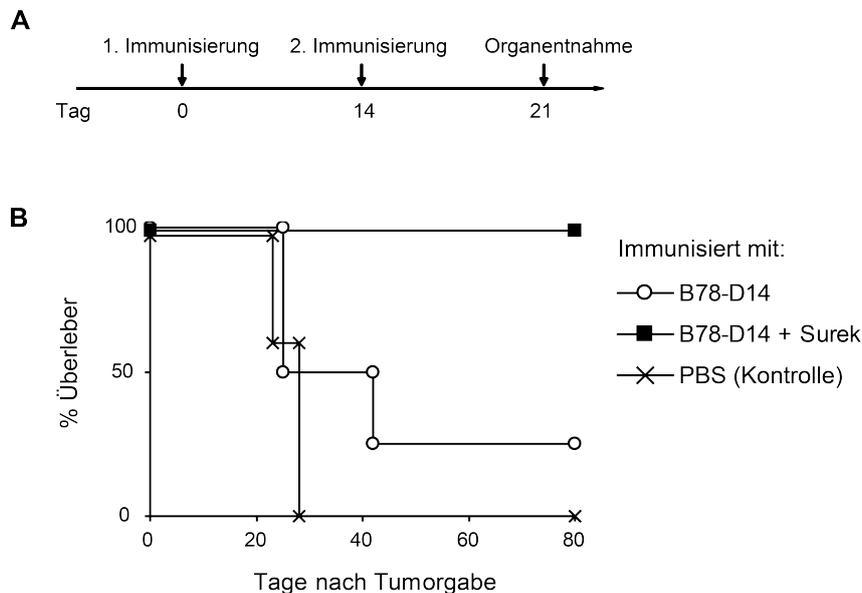


Abbildung 8: Immunisierung mit Surek führt zur Induktion eines immunologischen Gedächtnisses. (A) Immunisierungsschema. (B) Immunisierte Mäuse wurden mit B16F0-Zellen inokuliert. Die Tumorkontrolle bestand aus PBS-immunisierten Mäusen.

10.1 Durch Surek induzierte T-Zellen sind tumorspezifisch

Die Überstände der *In-vitro*-T-Zell-Stimulationen wurden auf ihren IFN- γ -Gehalt im ELISA getestet. Überstände von T-Zellen aus Mäusen, die mit Surek und B78-D14-Zellen immunisiert worden waren, enthielten deutlich erhöhte Konzentrationen an IFN- γ als die Kontrollgruppen (Abb. 9A). Durch intrazelluläre FACS-Färbungen konnte gezeigt werden, dass das IFN- γ , das in diesen Überständen zu finden war, hauptsächlich von CD8⁺-T-Zellen produziert wurde (Abb. 9B).

Zudem wurden am Ende einer 7-tägigen Restimulationsrunde T-Zellen geerntet und auf ihre Reaktivität gegenüber verschiedenen Zellen in einem 24-h-Ablesesystem getestet. Dazu wurden T-Zellen mit Tumorzellen oder syngenen Milzzellen für 24 h kokultiviert und anschließend die IFN- γ -Konzentration in den Überständen bestimmt. Es zeigte sich, dass IFN- γ nur in Anwesenheit der Tumorzellen vermehrt produziert wurde, nicht aber in Gegenwart syngener Milzzellen (Abb. 9C). Dies deutet auf eine tumorspezifische Reaktivität der T-Zellen hin.

In früheren Arbeiten von Ruf et al. konnte gezeigt werden, dass ein F(ab')₂-Fragment eines bsAk sowie die Kombination der parentalen Antikörper dieses bsAk Tumorzellen lysieren konnten (Ruf und Lindhofer, 2001), wenn auch nicht so effektiv wie der trifunktionale bsAk. Ob sie aber auch in der Lage waren, ein immunologisches Gedächtnis zu induzieren, wurde nicht geklärt.

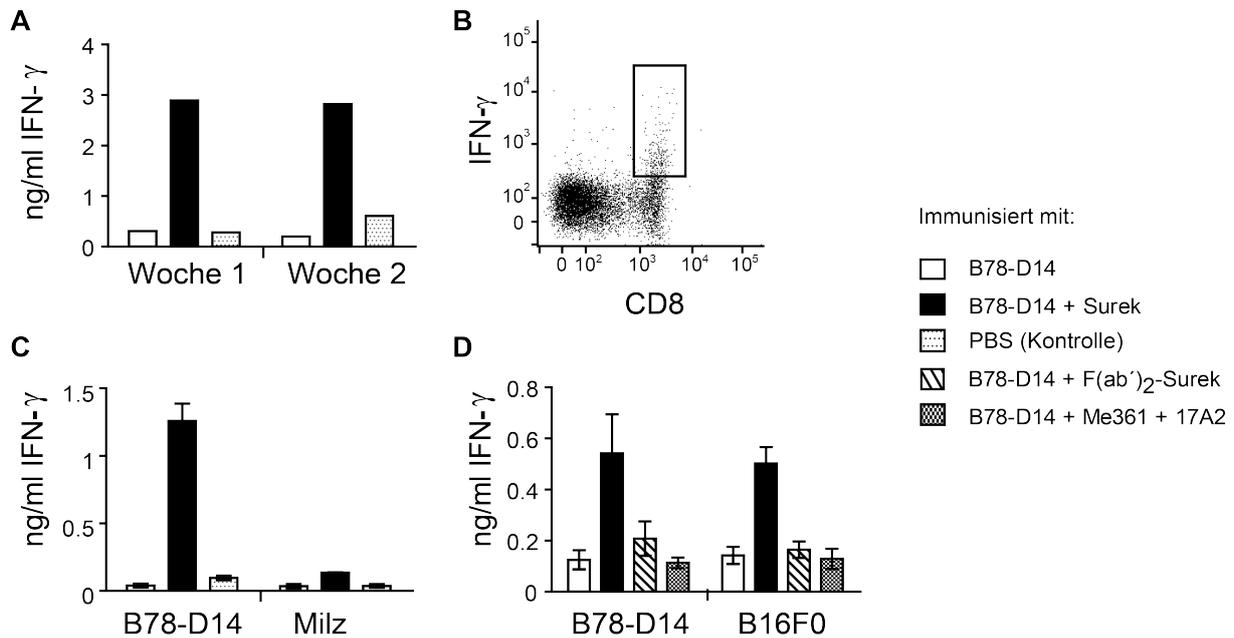


Abbildung 9: Surek induziert tumorspezifische T-Zellen. Milz- und Lymphknotenzellen von immunisierten Mäusen wurden *in vitro* mit B78-D14-Zellen in Intervallen von 1 Woche restimuliert, wie in Materialien und Methoden beschrieben. (A) INF- γ -Konzentrationen in Kulturüberständen der Restimulation nach einer und zwei Restimulationsrunden. (B) Die intrazelluläre FACS-Färbung zeigt, dass das INF- γ hauptsächlich von CD8⁺-T-Zellen stammt. Das Rechteck umschließt die INF- γ -produzierenden CD8⁺-T-Zellen. (C) T-Zellen wurden nach 2 Restimulationsrunden in einem 24-h-Ablesetest auf ihre INF- γ -Sekretion in Gegenwart von B78-D14-Zellen oder syngenen Milzzellen getestet. (D) Vergleich der Tumorreaktivität von T-Zellen, die *in vivo* entweder durch Surek, durch das F(ab')₂-Fragment oder durch eine Mischung der parentalen Antikörper induziert wurden. Die Reaktivität wurde am Ende der 1. Restimulationsrunde in einem 24-h-Ablesetest gegen B78-D14 und B16F0 getestet.

Daher wurden Mäuse mit dem F(ab')₂-Fragment des bsAk Surek bzw. mit einem Gemisch der parentalen Antikörper (17A2 und Me361) nach dem gleichen Immunisierungsschema wie oben (Abb. 8A) immunisiert. Anschließend wurde die Reaktivität von *in vitro* restimulierten T-Zellen aller Gruppen gegenüber dem B78-D14- und dem B16F0-Melanom verglichen. Die INF- γ -Produktion war sowohl in T-Zellen aus Mäusen, die mit F(ab')₂-Fragment immunisiert worden waren, als auch nach Immunisierung mit den parentalen Antikörpern deutlich reduziert im Vergleich zu Zellen, die aus Surek-immunisierten Mäusen gewonnen worden waren (Abb. 9D).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass der trifunktionale bsAk Surek in der Lage ist, tumorspezifische T-Zellen zu induzieren, und dass der intakte bsAk dem F(ab')₂-

Fragment in dieser Beziehung deutlich überlegen ist, da nach Immunisierung mit diesem Fragment keine tumorreaktiven T-Zellen nachgewiesen werden konnten.

10.2 Durch Surek induzierte T-Zellen erkennen spezifische Tumorassoziierte Antigene

T-Zellen, die aus mit Surek immunisierten Mäusen isoliert und *in vitro* restimuliert wurden, zeigen eine vergleichbare Reaktivität gegenüber B78-D14- und untransfizierten B16F0-Zellen (Abb. 9D). Deshalb sollte untersucht werden, welche Antigene von diesen tumorspezifischen T-Zellen erkannt werden. Eine Reihe von Antigenen sind in der Literatur beschrieben, die häufig auf malignem Melanom überexprimiert sind und eine Rolle für die Tumorabstoßung spielen könnten. In einem ersten Schritt zum Nachweis von Tumorantigenen, die möglicherweise durch Surek-induzierte T-Zellen erkannt werden, wurde die Expression einer Reihe von gut beschriebenen, immunogenen Tumorantigenen auf den beiden Melanomzelllinien B78-D14 und B16F0 mittels RT-PCR verifiziert. MAGE, p53, gp100 und Trp2 wurden auf beiden Zelllinien exprimiert (Abb. 10). Geeignete Peptide dieser Antigene, die für weitere Versuche ausgewählt wurden, sind in Tab. 3 aufgelistet (Eggert u. a., 2004; Mansour u. a., 2007; Bloom u. a., 1997; Overwijk u. a., 1998).

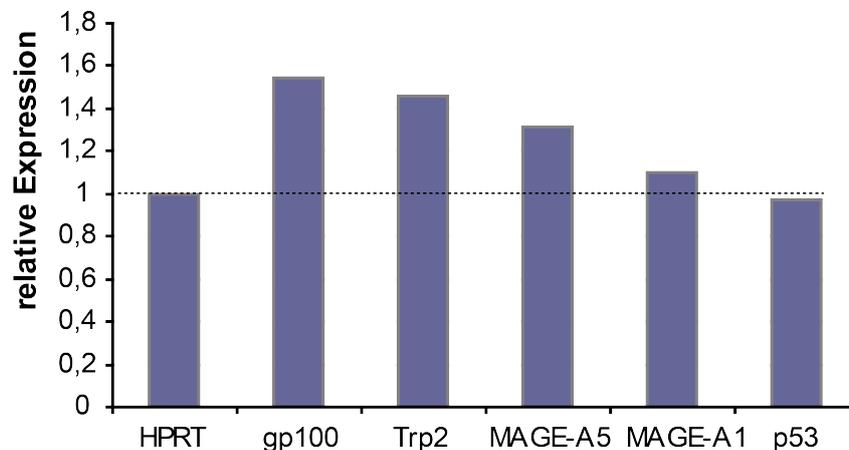


Abbildung 10: Expression von Tumorantigenen auf B78-D14-Zellen, detektiert mittels RT-PCR, normiert auf HPRT.

Um festzustellen, ob diese TAA Zielstrukturen für T-Zellen darstellen, die durch Behandlung mit Surek entstanden sind, wurden Milzzellen von Mäusen, die mit Surek und B78-D14-Zellen immunisiert waren, *in vitro* mit bestrahlten B78-D14-Zellen restimuliert. Anschließend wurde ihre Reaktivität in einem 24-h-Ablesesystem gegen Milzzellen getestet, die mit den ausgewählten Peptiden beladen waren. Als Auslesesystem wurde wie-

Tabelle 3: Peptidsequenzen der untersuchten Tumorantigene.

Antigen	Peptid	Quelle
gp100 _{25–33}	EGSRNQDWL	Overwijk et al., 1998
MAGE-A _{5–12}	HNTQYCNL	Eggert et al., 2004
MAGE-AX _{169–176}	LGITYDGM	Eggert et al., 2004
p53 _{232–240}	KYMCNSSCM	Mansour et al., 2007
Trp _{2180–188}	SVYDFVWL	Mansour et al., 2007

der die IFN- γ -Konzentration in den Überständen gewählt und mittels ELISA vermessen. Zwei Peptide der MAGE-A Familie, nämlich MAGE-A_{5–12} und MAGE-AX_{169–176}, sowie p53_{232–230}, gp100_{25–33} und Trp_{2180–188} wurden erkannt (Abb. 11). T-Zellen aus den Gruppen der Mäuse, die mit B78-D14 oder PBS immunisiert waren, zeigten nahezu keine Reaktivität gegenüber den peptidbeladenen Zellen.

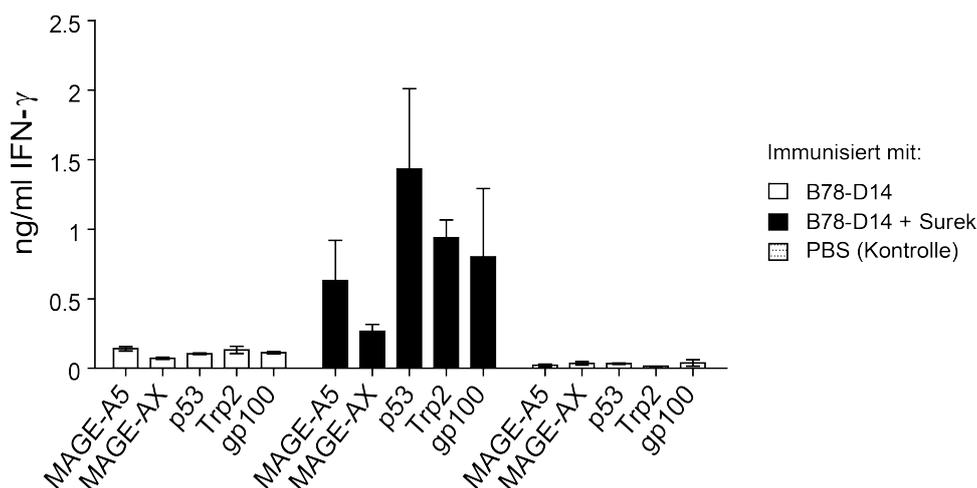


Abbildung 11: Surek induziert Peptid-spezifische T-Zellen. Milz- und LK-Zellen immunisierter Mäuse wurden mit B78-D14 restimuliert. Nach 1 Woche wurde ihre Reaktivität gegenüber Peptid-beladenen APZ in einem 24-h-Ablesetest untersucht.

Um die Frequenz der peptidspezifischen CD8⁺-T-Zellen am Beispiel von zwei Epitopen zu bestimmen, wurden peptidspezifische MHC-I-Multimere für FACS-Analysen eingesetzt. Das erste war gegen Trp2-spezifische, das zweite gegen MAGE-A5-spezifische CD8⁺-T-Zellen gerichtet.

Nach einer Woche Restimulation von Zellen immunisierter Mäuse mit B78-D14-Melanom konnten ca. 8 % Trp2-spezifische CD8⁺-T-Zellen detektiert werden (Abb. 12A und B). Die Gruppe nach Immunisierung mit B78-D14-Zellen enthielt im Vergleich hierzu nur 1-2 % Trp2-spezifische Zellen, die Kontrollgruppe zeigte nur Hintergrundwerte.

Zusätzlich wurde eine abgeänderte Methode zur Restimulation von tumorspezifischen

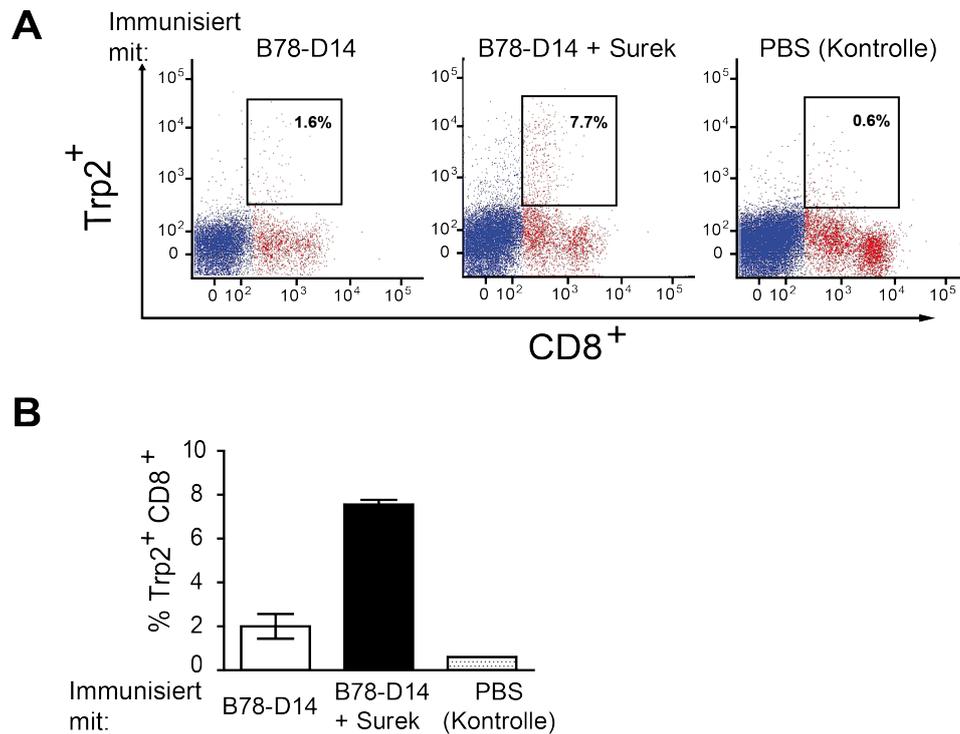


Abbildung 12: Frequenz Trp2-spezifischer CD8⁺-T-Zellen immunisierter Mäuse nach einer Woche Restimulation mit B78-D14-Zellen. (A) Exemplarische Darstellung der Multimer-Färbung Trp2-spezifischer T-Zellen. (B) Durchschnittliche Frequenz Trp2-spezifischer CD8⁺-T-Zellen ermittelt aus 3 Versuchen.

T-Zellen aus immunisierten Mäusen getestet. Um gezielt die bei der Immunisierung entstandenen peptidspezifischen T-Zellen zu restimulieren, wurden Spendermilzen mit den oben aufgelisteten Peptiden beladen und diese an Stelle der B78-D14-Zellen als Stimulatorzellen genutzt. Nach einer Woche *in vitro* verhielt sich die IFN- γ -Konzentration in den Überständen der verschiedenen Gruppen wie bei der Restimulation mit B78-D14: Deutlich erhöhte IFN- γ -Werte wurden in der Gruppe aus Surek-immunisierten Mäusen gefunden (Abb. 13A). Auch diese restimulierten Zellen wurden mittels FACS-Analyse auf ihre Peptidspezifitäten untersucht. Es fanden sich nicht nur vermehrt Trp2-spezifische CD8⁺-T-Zellen in der T-Zell-Kultur von Surek-immunisierten Mäusen, sondern auch deutlich mehr MAGE-A5-spezifische Zellen als in der Kontrollgruppe (Abb. 13B und C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der trifunktionale bsAk Surek tumorreaktive T-Zellen induziert. Diese können spezifische, vom Zieltumor des bsAk abgeleitete TAA erkennen. Zur Generierung solcher T-Zellen scheint die Induktion durch Surek *in vivo* essenziell zu sein, da die Zugabe von Surek zu *In-vitro*-Kulturen von Milz- und Lymphknotenzellen aus naiven Mäusen nicht zur Induktion von tumorspezifischen T-Zellen führte (nicht gezeigt).

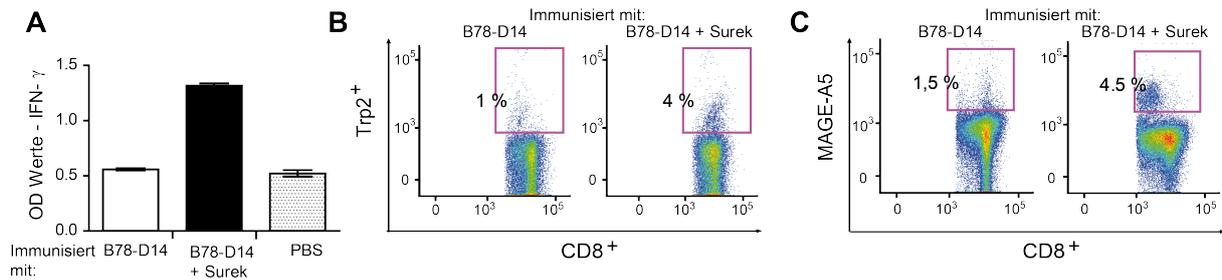


Abbildung 13: Spezifische T-Zellen aus Surek-immunisierten Mäusen lassen sich mit Peptid-beladenen APZ restimulieren. (A) IFN- γ -Konzentration in Überständen der Restimulation nach 1 Woche. (B, C) Frequenz Trp2- und MAGE-A5-spezifischer CD8⁺-T-Zellen nach einer Woche Restimulation.

10.3 Funktion der durch Surek induzierten T-Zellen

10.3.1 *In vitro* restimulierte T-Zellen zeigen peptidspezifische Zytotoxizität

Nachdem tumorreaktive, peptidspezifische T-Zellen nach Immunisierung mit Surek und Restimulation *in vitro* detektiert werden konnten, stellte sich die Frage, ob diese Zellen auch funktionell sind.

Da Trp2- und MAGE-A5-spezifische T-Zellen mithilfe von FACS-Färbungen erfolgreich nachgewiesen werden konnten (Abb. 13B und C), wurden diese Spezifitäten gewählt, um die Zytotoxizität der peptidspezifischen T-Zellen *in vitro* zu untersuchen. Nur T-Zellen aus Mäusen, die mit B78-D14 und Surek immunisiert worden waren, zeigten nach Restimulation mit Peptid-beladenen Spendermilzen deutliche Zytotoxizität gegenüber Trp2- oder MAGE-A5-Peptid beladenen syngenen DZ (Abb. 14A und B). T-Zellen aus Kontrollgruppen waren nicht in der Lage, diese Zielzellen zu lysieren. Die zytotoxischen T-Zellen lysierten außerdem nur die DZ, die mit den Tumorantigen-spezifischen Peptiden beladen waren, mit einem irrelevanten HY-Peptid (Scott u. a., 2000) beladene (Abb. 14C) oder unbeladene DZ (Abb. 14D) wurden nicht getötet.

Die durch Behandlung mit Surek *in vivo* induzierten T-Zellen sind also nicht nur tumorreaktiv und peptidspezifisch sondern zeigen nach Restimulation *in vitro* auch die Fähigkeit zur Peptid-spezifischen Lyse.

10.3.2 *In vitro* restimulierte T-Zellen können *in vivo* nach adoptivem Transfer B16F0-Melanomzellen abstoßen

Da gezeigt werden konnte, dass Surek-induzierte T-Zellen *in vitro* funktionell sind, sollte die Funktion dieser T-Zellen auch *in vivo* nach adoptivem Transfer untersucht werden.

Daher wurden Milz- und Lymphknotenzellen aus Surek-immunisierten Mäusen iso-

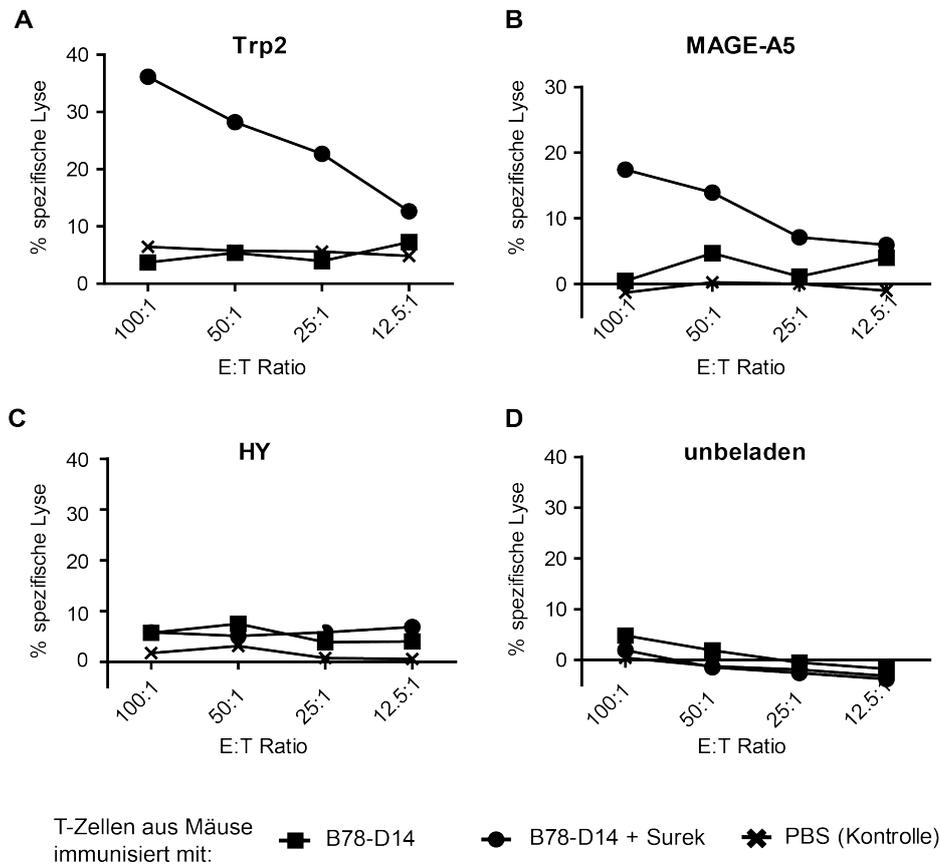


Abbildung 14: *In-vitro*-Zytotoxizität von Surek-induzierten T-Zellen. Milz- und LK-Zellen immunisierter Mäuse wurden für 7 Tage mit APZ restimuliert, die mit den Peptiden beladen waren, die als Zielstrukturen für die durch Surek induzierte Immunität ermittelt worden waren (Abb. 3). Reife DZ wurden mit den in der Legende angegebenen Peptiden beladen und als Zielzellen in einem 4 h ^{51}Cr -Freisetzungsversuch verwendet (A-D). Als Kontrollen wurden mit einem irrelevanten HY-Peptid beladene (C) oder unbeladene DZ verwendet (D)

liert, mit B78-D14-Zellen restimuliert wie vorher beschrieben und zusammen mit einer letalen Dosis Tumorzellen in naive Mäuse transferiert. Da B78-D14-Zellen wenig MHC-I exprimieren, wurden für diese Versuche B16F0-Zellen verwendet, die eine höhere MHC-I-Expression zeigen (Abb. 15)

Eine Inokulation mit diesen Melanomzellen konnte von den Surek-induzierten, *in vitro* restimulierten T-Zellen nach adoptivem Transfer erfolgreich abgestoßen werden (Abb. 16). Ca. 70 % der Mäuse überlebten den Transferversuch, während alle Mäuse, die mit T-Zellen aus der Kontrollgruppe - immunisiert nur mit B78-D14 - behandelt wurden, dem Tumor erlagen.

Die Abstoßung des B16F0-Melanoms zeigt, wie auch schon die Reaktivität der T-

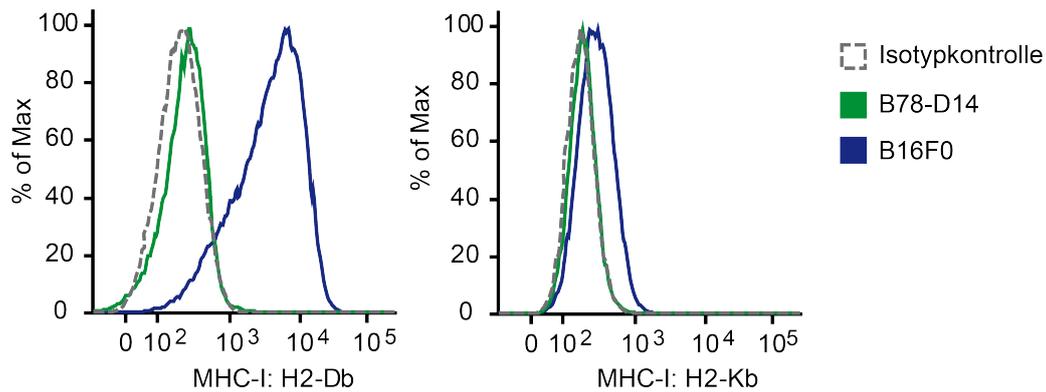


Abbildung 15: FACS-Analyse der MHC-I-Expression auf B78-D14- und B16F0-Zellen

Zellen gegenüber B16-Zellen (Abb. 9D) und den seligierten Peptiden (Abb. 11) *in vitro*, dass die durch Surek induzierte T-Zell-Immunität nicht vom Zielantigen des bsAk, GD2, abhängig ist, sondern dass es sich um eine polyvalente Immunantwort handelt.

Interessanterweise führte der adoptive T-Zell-Transfer zu einer langanhaltenden Immunität, da auch eine Reinokulation mit B16F0-Zellen von den überlebenden Tieren nach T-Zell-Transfer abgestoßen wurde.

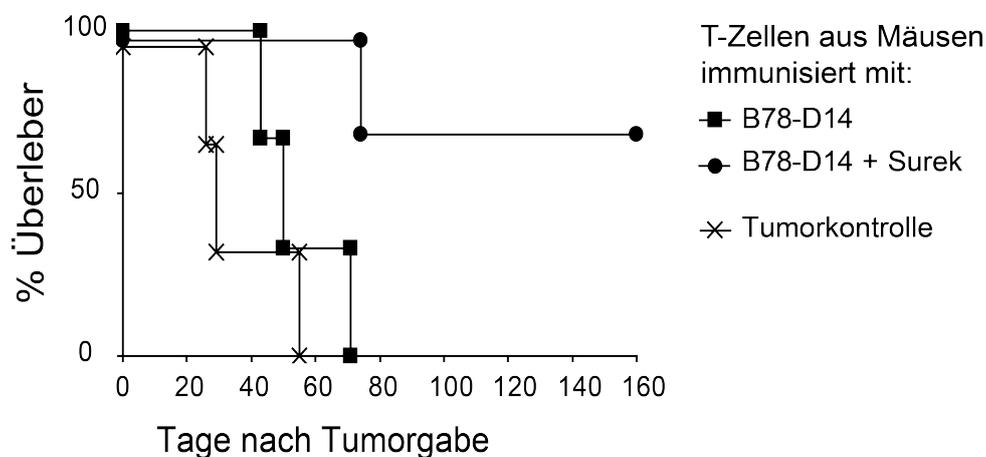


Abbildung 16: Surek-induzierte T-Zellen sind *in vivo* funktionell. Milz- und LK-Zellen von Surek-immunisierten Mäusen wurden 3 Wochen mit B78-D14-Zellen restimuliert. 1×10^6 dieser restimulierten Zellen wurden zusammen mit einer letalen Dosis B16F0 adoptiv in naive Mäuse transferiert. Die Kontrollgruppe erhielt einen adoptiven Transfer von T-Zellen aus Mäusen, die nur mit B78-D14 immunisiert worden waren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die durch Immunisierung mit B78-D14 und Surek induzierten TAA-spezifischen T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* funktionell sind.

11 *In-vitro*-Modell zur Untersuchung der Rolle von DZ in der bsAk-vermittelten Aktivierung von T-Zellen und Lyse von Tumorzellen

In vivo konnte gezeigt werden, dass der trifunktionale bsAk Surek sowohl T-Zellen (Abb. 6) als auch DZ (Ab. 7A, B) aktiviert und dass die Behandlung mit Surek zur Entwicklung eines T-Zell-Gedächtnisses führt (Abb. 4). Spezifische Tumor-protective T-Zellen erkennen dabei eine Reihe von TAA, durch Vakzinierung mit Surek entsteht also eine polyvalente Immunantwort. Im Gegensatz dazu konnte nach Behandlung mit dem korrespondierenden F(ab')₂-Fragment keine Tumor-spezifische T-Zell-Antwort nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass akzessorische Immunzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Surek-induzierten T-Zell-Gedächtnisses *in vivo* spielen. Um die Rolle der verschiedenen Effektorsysteme zu charakterisieren und die Surek-vermittelte Tumorzell-Lyse zu untersuchen, wurde das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellen in einem *In-vitro*-System analysiert.

Dazu wurden DZ, die aus Knochenmark syngener Mäuse *in vitro* generiert und mit LPS gereift wurden, mit B78-D14-Tumorzellen und T-Zellen mit und ohne Surek kokultiviert. Anschließend wurden der Aktivierungszustand und die Proliferation der T-Zellen, die Zytokinproduktion und das Überleben der Tumorzellen in diesen Kokulturen analysiert.

11.1 DZ verstärken die Surek-induzierte Aktivierung von T-Zellen und fördern die Proliferation von CD8⁺-T-Zellen

In vivo führt die Gabe des bsAk Surek zur Aktivierung und Proliferation insbesondere von CD8⁺-T-Zellen (s. Abb. 6). Um den Einfluss der DZ auf die T-Zellaktivierung besser charakterisieren zu können, wurden angereicherte T-Zellen aus den Milzen naiver Mäuse zusammen mit DZ und bestrahlten B78-D14-Zellen unter Zugabe von Surek kokultiviert und der Aktivierungszustand und die Zahl der T-Zellen über einen Zeitraum von 9 Tagen untersucht. Eine Kontrollgruppe enthielt keinen bsAk, weitere bestanden aus T-Zellen und Tumorzellen ohne DZ mit und ohne Surek.

Bereits nach 24 h konnte mittels FACS-Analyse gezeigt werden, dass sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen nach Zugabe von Surek den frühen Aktivierungsmarker CD69 vermehrt exprimierten (Abb. 17A). In Kokulturen mit DZ und Surek war die Expression im Vergleich zu Kokulturen ohne DZ deutlich gesteigert. Die Anwesenheit von DZ schien

die Immunantwort außerdem zu beschleunigen, da in der Gruppe, die DZ und Surek enthielt, auch der spätere Aktivierungsmarker CD62L auf beiden T-Zellpopulationen stark herunterreguliert war (Abb. 17B). In allen anderen Gruppen war das nicht zu sehen. Kontrollgruppen, die den bsAk nicht enthielten, zeigten weder eine Hochregulierung von CD69, noch Herunterregulierung von CD62L (Abb. 17A und B).

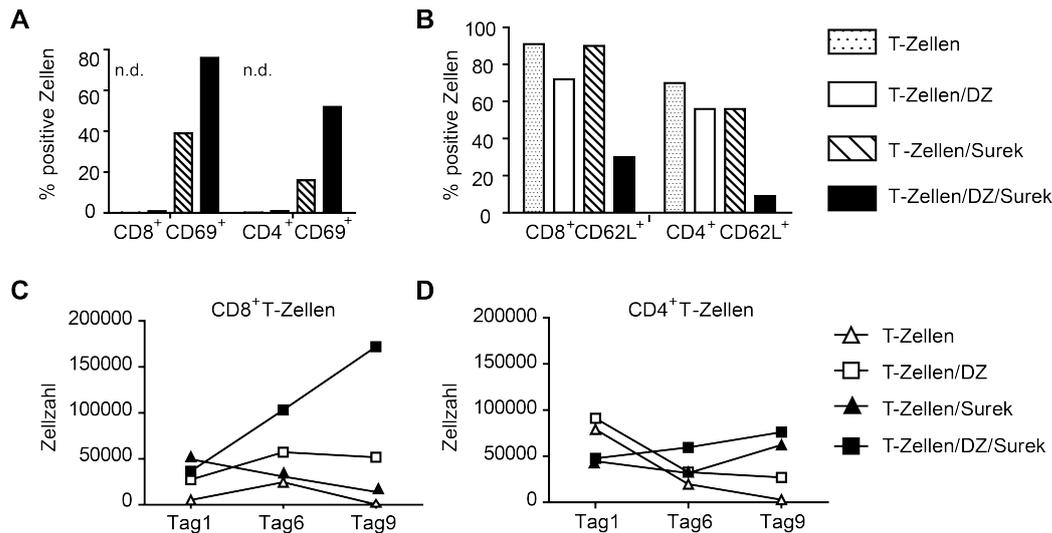


Abbildung 17: Verstärkender Einfluss von DZ auf Surek-induzierte T-Zellaktivierung und Proliferation. T-Zellen wurden aus Milzen naiver Mäuse angereichert (siehe Materialien und Methoden). Alle Gruppen enthielten 5×10^5 B78-D14-Zellen. Je 1×10^6 T-Zellen und DZ wurden für 9 Tage kokultiviert mit oder ohne Zugabe von $20 \mu\text{g/ml}$ Surek. Expression von CD69 (A) und CD62L (B) auf CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen an Tag 1 der Kokultur ermittelt mit FACS-Analyse. (C, D) Zellzahlen von CD8⁺- und CD4⁺-Zellen im Verlauf der Kokultur. Kontrollgruppen enthielten T-Zellen, DZ und Surek wie in der Legende angegeben.

Interessanterweise nahm in Kokulturen mit DZ und Surek die Zahl der CD8⁺-T-Zellen in der Zeitspanne von 9 Tagen im Vergleich zum Beginn der Versuche deutlich zu (Abb. 17C). Die Zahl der CD4⁺-T-Zellen hingegen blieb relativ konstant (Abb. 17D).

Nach diesen ersten Versuchen erschien die Kombination aus T-Zellen, DZ und Surek geeignet, um die Situation *in vivo* wiederzugeben.

11.2 Gemischte Th1/Th2-Antwort *in vitro*

Nach Immunisierung mit Surek fand sich *in vivo* ein für Th1-Antworten typisches Zytokinprofil. DZ exprimierten vermehrt IL-12 (Abb. 7B), T-Zellen produzierten deutlich mehr IFN- γ als in Kontrollgruppen (Abb. 6). Auch Th2-Zytokine wurden produziert (Abb. 7C), was auf die Notwendigkeit von Th2-Zellen zur Induktion einer Th1-Antwort zurückzuführen

ren ist (siehe Diskussion). Daher sollte untersucht werden, ob die Zugabe von Surek zu *In-vitro*-Kulturen, die T-Zellen und DZ enthielten, ein ähnliches Zytokinprofil induziert, wie es *in vivo* beobachtet werden konnte.

Dazu wurden die Überstände der Kokulturen über einen Zeitraum von 6 Tagen analysiert. Bereits nach einem Tag war eine deutlich erhöhte Konzentration an IL-12 nur in der Kokultur zu finden, die T-Zellen, DZ, B78-D14-Zellen und Surek enthielt (Abb. 18A). In dieser Gruppe wurden außerdem große Mengen der Th1-Zytokine IL-2, IFN- γ und GM-CSF sowie geringere, aber im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Werte der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 (Abb. 18A und B) gefunden.

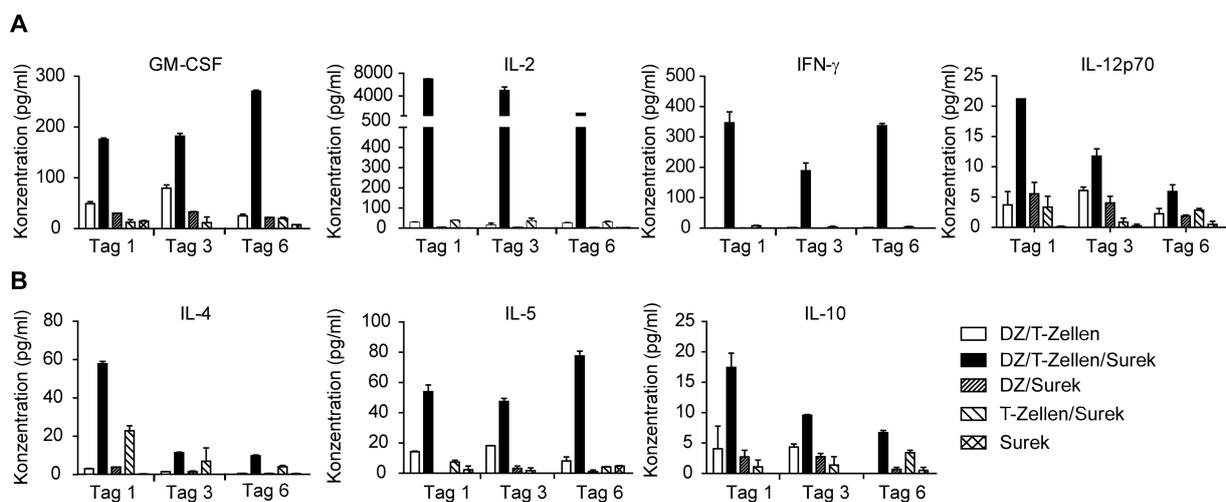


Abbildung 18: Gemischtes Th1/Th2-Zytokinprofil in Überständen der Kokultur von T-Zellen, DZ und Surek. Nach Kokultur von B78-D14-Zellen mit T-Zellen und DZ mit und ohne Surek wurden Zytokinkonzentrationen mittels BioplexTM-Analyse ermittelt. (A) Th1-Zytokine, (B) Th2-Zytokine. Alle Gruppen enthielten B78-D14-Zellen, Kontrollgruppen enthielten die in der Legende angegebenen Zellen mit und ohne Surek.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine durch den bsAk Surek ausgelöste starke T-Zell-Aktivierung, die mit der Zytokinproduktion einhergeht, unabdingbar mit der Anwesenheit von DZ verbunden ist.

11.3 Surek-induzierte Lyse von Tumorzellen ist von der Interaktion zwischen T-Zellen und DZ abhängig

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Zusammenspiel von T-Zellen und DZ in Anwesenheit des bsAk Surek zur starken Aktivierung von T-Zellen und zur Freisetzung von Zytokinen führt, sollte die Frage geklärt werden, ob T-Zellen in diesem System auch zur Tumorzell-Lyse redirigiert werden.

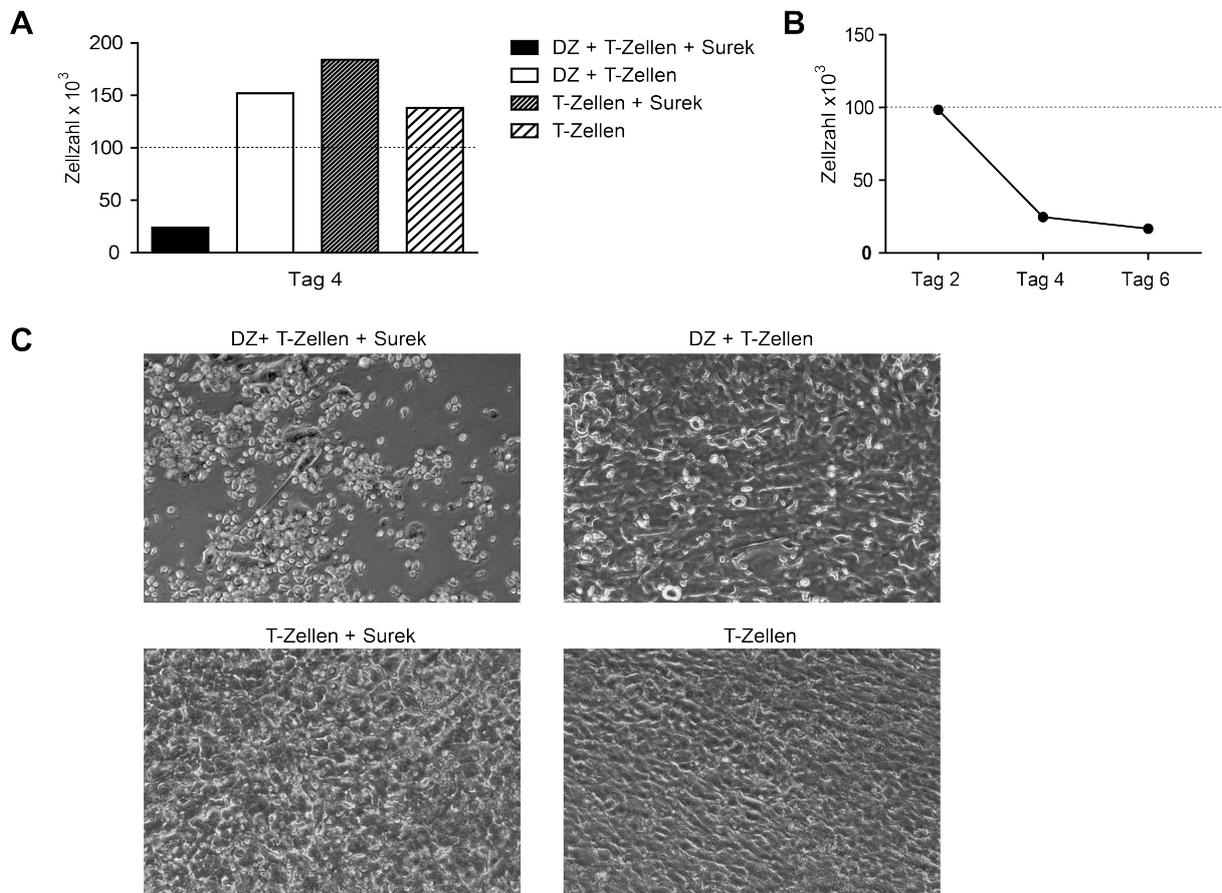


Abbildung 19: Surek-induzierte Redirektion von T-Zellen gegen Tumorzellen nur in Anwesenheit von DZ. Alle Gruppen enthielten 10^5 B78-D14-Zellen. (A) Zahl der lebenden B78-D14-Zellen in den Kokulturen an Tag 4, Gruppen enthielten die in der Legende beschriebenen Zellen mit oder ohne bsAk Surek. (B) Zahl lebender B78-D14-Zellen in der Kokultur von T-Zellen, DZ und Surek im Verlauf. (D) Mikroskopische Aufnahmen der Kokulturen an Tag 6.

Um die Surek-induzierte Lyse von Tumorzellen zu untersuchen, wurden T-Zellen, DZ und B78-D14-Zellen unter Zugabe von Surek kokultiviert und der Zelltod mit durchflusszytometrischen Analysen an Tag 2, 4 und 6 analysiert.

Ab Tag 4 der Kokulturen war in der Gruppe, die DZ, T-Zellen und Surek enthielt, eine deutliche Abnahme an lebenden Tumorzellen zu sehen (Abb. 19A und B). Mikroskopische Aufnahmen zeigten in allen Kontrollgruppen einen dichten Rasen adhärent wachsender Tumorzellen. Nur in Anwesenheit von T-Zellen und DZ mit Surek war dieser Zellrasen aufgelöst. Dies weist in Übereinstimmung mit den Daten der FACS-Färbungen auf eine Lyse der Tumorzellen in dieser Gruppe hin (Abb. 19C).

Mit diesen Daten war der formelle Beweis erbracht, dass der bsAk Surek unter Beteiligung von DZ in der Lage ist, naive T-Zellen gegen den Tumor zu dirigieren und

Tumorzell-Lyse zu induzieren. Entscheidend ist, dass die Zugabe von Surek zu T-Zellen in Abwesenheit von DZ nicht zur Tumorzell-Lyse führte (Abb. 19A und C). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung, die der Aktivierung von APZ durch Fc-Teil-Fc γ R-Interaktion zukommt.

12 Optimierung der Therapie durch Kombination des bsAk Surek mit DZ

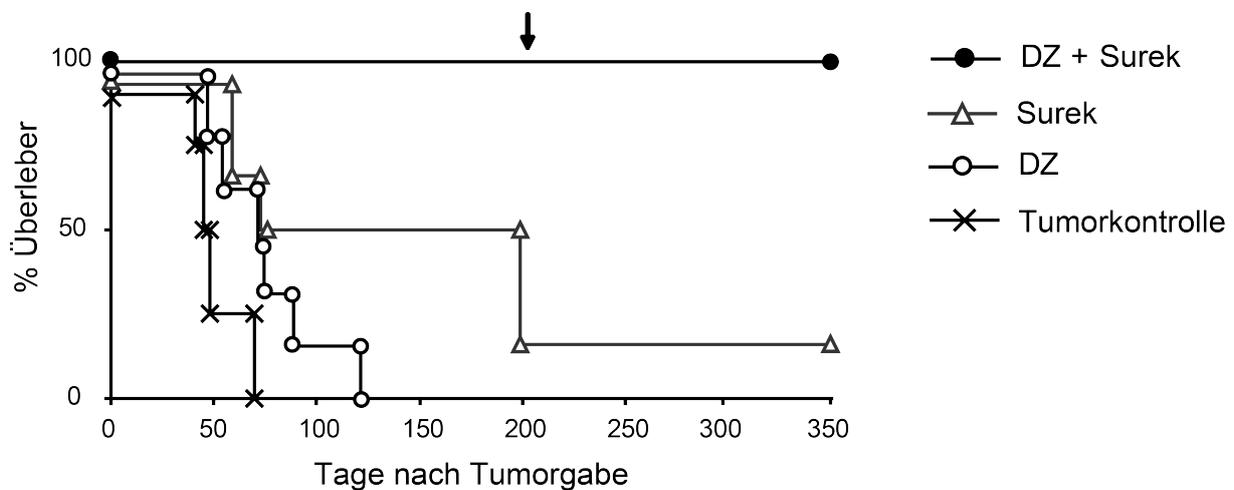


Abbildung 20: Kombinierte Therapie aus Surek und DZ verbessert den Therapieerfolg. Alle Mäuse wurden mit einer letalen Dosis B78-D14 i.p. inokuliert (Tag 0). An Tag 2 und 10 wurden sie entweder mit 10 μ g Surek oder einem Gemisch aus 10 μ g Surek und 5×10^5 DZ therapiert. Eine Kontrollgruppe erhielt nur DZ, die Tumorkontrollgruppe erhielt keine Therapie.

Die Erkenntnisse aus den *In-Vitro*-Kulturen legen nahe, dass die Kombination von syngenem DZ mit dem bsAk Surek die Antitumor-Therapie verbessern könnte.

Daher wurde die Effektivität einer kombinierten Therapie aus Surek und DZ im Vergleich zur herkömmlichen mit Surek alleine untersucht.

Nach Inokulation mit B78-D14-Zellen wurden Mäuse zweimal entweder mit Surek alleine oder mit einer Mischung aus DZ und Surek analog zum Therapieschema in Abb. 4B behandelt. Eine Kontrollgruppe erhielt nur DZ als Therapie. Die Kombination aus Surek und DZ verbesserte die Effektivität der Therapie signifikant (Abb. 20) mit 100 % Langzeitüberlebern. Alle Tiere, die die Therapie überlebt hatten, waren auch in diesem Falle in der Lage, ein Reinokulum von B16F0-Zellen erfolgreich abzustoßen.

Die Kombination aus DZ und Surek scheint also der alleinigen bsAk-Therapie deutlich

überlegen zu sein und bietet somit möglicherweise neue Optionen für die Optimierung der Tumorthherapie mit bsAk im Menschen.

Teil IV

Diskussion

Das Potenzial trifunktionaler bsAk als immunologische Agenzien konnte nicht nur *in vitro* (Zeidler u. a., 1999) und in murinen Tumormodellen (Lindhofer u. a., 1996) demonstriert werden, auch in der Immuntherapie von Krebspatienten wurden bsAk bereits erfolgreich eingesetzt (Heiss u. a., 2005, 2010).

Während bispezifische $F(ab')_2$ -Fragmente nur eine Art von Effektorzellen, z.B. T-Zellen, gegen maligne Zellen dirigieren, rekrutieren trifunktionale bsAk zusätzlich akzessorische Zellen über ihren intakten Fc-Teil. So kommt es zu einer simultanen Aktivierung verschiedener Effektorzellen in einem sogenannten *Tri – Zell – Komplex* (Zeidler u. a., 1999), und vor allem disseminierte Tumorzellen können effektiv getötet werden (Ruf und Lindhofer, 2001). Wichtig für die Konstruktion trifunktionaler bsAk ist die Verwendung der Isotyp-Kombination Maus-IgG2a und Ratte-IgG2b, da diese bsAk-Konstrukte nur mit aktivierenden ($Fc\gamma RI$, IIa und III), nicht aber mit inhibierenden ($Fc\gamma RI Ib$) $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf APZ und NK-Zellen interagieren (Lindhofer u. a., 2011).

Durch die Verwendung der Isotyp-Kombination Maus-IgG2a und Ratte-IgG2b können außerdem große Mengen des gewünschten bsAk-Produktes kostengünstig hergestellt werden. Durch die Fusion entsprechender Maus- und Ratte-Hybridome entstehen Quadromzellen, deren Produkte zum Großteil bereits dem gewünschten bsAk entsprechen, da es zu einer Spezies-restringierten Paarung von schweren und leichten Ketten kommt (Lindhofer u. a., 1995). Nebenprodukte lassen sich durch eine einfache Ein-Schritt-Reinigung über Protein A-beladene Säulen und anschließende Chromatographie beseitigen (Lindhofer u. a., 1995). Die Quadromtechnologie unter Verwendung dieser speziellen Isotyp-Kombination ermöglicht also die Herstellung homogener bsAk in klinischem Maßstab, während sich bei anderen Ansätzen die aufwändige Produktion der gewünschten bsAk-Produkte oft limitierend auf ihre Anwendbarkeit auswirkt (Chames und Baty, 2009; Peipp und Valerius, 2002).

12.1 Untersuchung der Immunantwort nach Behandlung mit Surek *in vivo*

Die Präsentation von Tumorantigenen durch APZ, die durch trifunktionale bsAk aktiviert werden, induziert eine lang-anhaltende T-Zell-Antwort. In der vorliegenden Dok-

torarbeit wurde diese Immunantwort charakterisiert. Dazu wurde das transplantierbare B78-D14-Melanom (Haraguchi u. a., 1994) verwendet, eine vom B16-Melanom abgeleitete murine Melanom-Zelllinie, und der Surrogat-Antikörper Surek. Dieser bindet an GD2, ein Gangliosid, das auf vielen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, wie dem humanen kleinzelligen Lungenkarzinom, dem Gliom oder dem Melanom häufig überexprimiert ist (Chang u. a., 1992; Heiner u. a., 1987; Lipinski u. a., 1987; Wu u. a., 1986; Tsuchida u. a., 1987). Dass Ganglioside potenzielle Zielstrukturen in der Tumorthherapie darstellen, wurde *in vitro* und in Mausmodellen bereits gezeigt (Cheresh u. a., 1985; Mueller u. a., 1990). Besonders Immunglobulin-IL-2-Fusionsproteine (Becker u. a., 1996; Hank u. a., 1996) und bsAk (Ruf u. a., 2004), die gegen GD2 gerichtet sind, waren effektiv bei der Aktivierung einer Immunantwort gegen Gangliosid-exprimierende Tumorzellen.

Das B78-D14-Melanom und der Surrogat-Antikörper Surek scheinen also geeignet, um die Therapie verschiedener humaner Krebserkrankungen im Mausmodell zu etablieren und die durch bsAk-induzierte Immunantwort zu untersuchen.

Die Behandlung mit Surek führte offensichtlich zu Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses (Abb. 4C), da Langzeitüberleber einer Therapie ein erneutes Inokulum von Tumorzellen abstoßen konnten. *In vivo* induzierte Surek die Proliferation von T-Zellen, die einen aktivierten Phänotyp zeigten und vermehrt IFN- γ produzierten (Abb. 6). Obwohl durch Depletionsversuche (Abb. 5) in dem vorliegenden Modell, wie auch in anderen Tumormodellen (Ruf und Lindhofer, 2001), gezeigt werden konnte, dass die erfolgreiche Tumorabstoßung gleichermaßen von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen abhängig ist, zeigten CD8⁺-T-Zellen eine höhere Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche sowie vermehrte IFN- γ -Produktion und stärkere Proliferation als CD4⁺-T-Zellen. Auch nach Restimulation von T-Zellen *in vitro* wurde IFN- γ vornehmlich von CD8⁺-Zellen produziert (Abb. 9B). Die Bedeutung dieses Unterschieds zwischen den beiden T-Zell-Populationen ist noch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

DZ zeigten wie erwartet eine vermehrte Produktion von IL-12 und eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern nach Behandlung mit Surek (Abb. 7A, B). Dies bekräftigt die Annahme, dass DZ durch die Bildung des *Tri – Zell – Komplexes* aktiviert werden und in der Lage sind, eine T-Zell-Antwort gegen den Tumor zu induzieren.

Neben der Aktivierung von T-Zellen und DZ konnte auch eine vermehrte Zytokinproduktion in Seren von Mäusen, die mit Surek behandelt worden waren, nachgewiesen werden. Es ist allgemein akzeptiert, dass eine effektive Antitumor-Immunantwort eher einer Th1/Tc1- als einer Th2/Tc2-Antwort bedarf (Egeter u. a., 2000; Lüking u. a., 2008).

Die IFN- γ -Werte in T-Zellen nach Behandlung mit Surek sowie die vermehrte Produktion von IL-12 durch DZ, deuten eine Ausrichtung hin zu einer Th1-Antwort an. Auch in Seren von Mäusen waren die Konzentrationen dieser Th1-Zytokine nach Surek-Gabe deutlich erhöht (Abb. 7C). Dass außerdem Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-10 (Abb. 7C) in diesen Seren gefunden wurden, steht dazu nicht im Widerspruch, da eine effiziente Th1-Antwort immer auch Th2-Zytokine benötigt (Lüking u. a., 2008; Schüler u. a., 1999). So misslingt eine Th1-abhängige Antitumor-Vakzinierung, wenn Mäuse IL-4 defizient sind (Lüking u. a., 2008). Schüler et al. konnten zeigen, dass in der Induktionsphase einer Antitumor-Effektorantwort die Anwesenheit von IL-4 unabdingbar ist. Eine weitere Erklärung für die erhöhten Werte der Th2-Zytokine geben Studien, die berichten, dass Th1-Zellen im Zuge der Selbst-Limitierung zur Expression von Th2-Zytokinen übergehen können (O'Garra und Vieira, 2007).

Um die durch einen bsAk induzierte T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden Mäuse mit dem bsAk Surek und B78-D14-Zellen immunisiert und T-Zellen anschließend isoliert. Dadurch konnte in der vorliegenden Doktorarbeit der Immunisierungseffekt eines trifunktionalen bsAk zum ersten Mal eindeutig nachgewiesen werden. Nach Restimulation *in vitro* konnten T-Zellen identifiziert werden, die das B78-D14- und das parentale B16F0-Melanom, nicht aber syngene Milzzellen erkannten (Abb. 9). Tumor-spezifische T-Zellen wurden nur in den Kulturen gefunden, die von Mäusen stammten, die mit Surek und B78-D14-Zellen immunisiert worden waren, nicht aber in den Kontrollgruppen, in denen Mäuse nur B78-D14-Zellen oder PBS erhalten hatten. T-Zellen dieser Kontrollgruppen hatten im Gegensatz zu T-Zellen aus Tieren, die mit Surek immunisiert worden waren, auch kein therapeutisches Potenzial (Abb. 16). Auch die Zugabe von Surek zu *In-vitro*-Kulturen konnte die Behandlung mit Surek *in vivo* nicht kompensieren. Diese Ergebnisse stimmen mit einem anderen Tumormodell überein, in dem gezeigt wurde, dass die Induktion *in vivo* Voraussetzung für das Entstehen von T-Zellen mit einer verlängerten Überlebenszeit und einem Tumor-protaktiven Potenzial war (Lüking u. a., 2008). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Bildung eines einzigartigen Zytokinmilieus bei der Vakzinierung *in vivo* sein (Lüking u. a., 2008).

Die Reaktivität der isolierten, Surek-induzierten T-Zellen gegen B16F0-Zellen weist darauf hin, dass das Gangliosid GD2, das von Surek erkannt wird, keine ausschlaggebende Rolle als Zielstruktur für die induzierte zelluläre Immunantwort spielt. Um spezifische Antigene, die von Surek-induzierten T-Zellen erkannt werden, zu definieren, wurde eine Reihe von Tumor-assoziierten Antigenen ausgewählt. Tatsächlich konnte Reaktivität

der T-Zellen gegen Peptide, die von gp100, p53, Trp2 und der MAGE-A-Familie stammen, nachgewiesen werden. Außerdem konnten Trp2- und MAGE-A5-spezifische CD8⁺-T-Zellen durch FACS-Färbungen mit entsprechenden MHC-I-Multimeren identifiziert werden (Abb. 11, 12, 13). Die Behandlung mit dem bsAk Surek führt also zur Entstehung einer polyvalenten Immunantwort. Dass eine polyvalente Antitumor-Immunantwort einer monoklonalen Antwort überlegen ist wurde in verschiedenen Studien demonstriert (Lüking u. a., 2008; Kronenberger u. a., 2002, 2008). Somit bietet der Immunisierungseffekt des trifunktionalen bsAk den Vorteil, dass eine Tumor-Immunevasion, beispielsweise durch Selektion von Tumorzellen, die das erkannte Antigen verloren haben, weniger wahrscheinlich ist. Möglicherweise sind bsAk in diesem Kontext monoklonalen Antikörpern überlegen. Einige Studien zeigten nämlich, dass nach der Behandlung mit dem humanen anti-CD20-Antikörper Rituximab sowohl in Patienten (Hilchey u. a., 2009) als auch in einem Mausmodell (Abès u. a., 2010) zwar eine T-Zell-Antwort entsteht, im Mausmodell wurde aber gezeigt, dass die zelluläre Immunität von der Expression des Antigens CD20 auf Tumorzellen abhängig war (Abès u. a., 2010). Die T-Zell-Antwort scheint in diesem Fall also monovalent und damit anfälliger für Tumorevasionsmechanismen zu sein.

Die Fähigkeit Surek-induzierter T-Zellen zur Lyse konnte durch Zytotoxizitätstests *in vitro* (Abb. 14) und adoptiven Transfer von T-Zellen in naive Mäuse *in vivo* (Abb. 16) demonstriert werden. Der adoptive T-Zell-Transfer stellt dabei das strengste Testsystem zur Bestimmung der Antitumor-Effektorfunktion von T-Zellen dar. Die parentale Tumorzelllinie B16F0, die die Zielstruktur des bsAk GD2 nicht exprimiert, ansonsten aber ein ähnliches Antigenmuster exprimieren sollte wie die transfizierte Zelllinie B78-D14, wurde nach adoptivem T-Zell-Transfer abgestoßen (Abb. 16). Dieser Versuch verdeutlicht noch einmal, dass GD2 keine kritische Rolle in der durch Surek induzierten Antitumor-Immunität spielt, sondern dass die Behandlung mit Surek eine polyvalente Immunantwort hervorruft.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt werden, dass der intakte trifunktionale bsAk Surek dem korrespondierenden F(ab')₂-Fragment und den parentalen Antikörpern überlegen ist. Die Immunisierung mit dem F(ab')₂-Fragment und den parentalen Antikörpern führte nach Restimulation *in vitro* im Gegensatz zur Immunisierung mit Surek nicht zu einer nachweisbaren T-Zell-Antwort gegen die Zelllinien B78-D14 und B16F0 (Abb. 9D). In Übereinstimmung mit der fehlenden T-Zell-Antwort waren auch die Zytokinwerte in Seren von Mäusen nach Immunisierung mit dem F(ab')₂-Fragment nicht erhöht (Abb. 7C).

Die dargestellten Ergebnisse beweisen die Induktion einer T-Zell-Antwort durch den trifunktionalen bsAk Surek und definieren Spezifitäten dieser T-Zellen. Auch für die klinische Anwendung von bsAk könnten diese Erkenntnisse relevant sein, da die Therapie mit bsAk wahrscheinlich neben der direkten Zerstörung von Tumorzellen auch zu einer lang anhaltenden Antitumor-Antwort führen kann. Damit bieten sich neue therapeutische Optionen in der Behandlung von Krebserkrankungen.

12.2 Die Rolle der DZ bei der Surek-induzierten Immunantwort

Nachdem der Nachweis Tumor-spezifischer, funktionaler T-Zellen nach Immunisierung mit Surek erbracht war, sollte die Fragestellung untersucht werden, in welchem Maß verschiedene Effektorzellen an der Surek-vermittelten Tumorzell-Lyse beteiligt sind. Außerdem sollte in der *In-vitro*-Kultur gezeigt werden, dass die Redirektion naiver Effektorzellen durch Surek tatsächlich zur Lyse von Tumorzellen führt.

Durch Kokultur von T-Zellen mit syngenen, aus Knochenmark generierten DZ und B78-D14-Zellen in der Gegenwart von Surek wurden T-Zellen effektiv aktiviert (Abb. 17A, B). In Ansätzen, in denen keine DZ enthalten waren, war die T-Zell-Aktivierung weniger stark ausgeprägt, T-Zellen zeigten eine geringere Expression von CD69 und keine Herunterregulierung von CD62L (Abb. 17A, B). Die Zugabe von DZ zu den Kokulturen förderte außerdem die Proliferation von CD8⁺-, nicht aber von CD4⁺-T-Zellen (Abb. 17C, D). Ob und warum die aktivierten DZ Signale liefern, die nur die Proliferation und das Überleben von CD8⁺-Zellen unterstützen, ist bisher noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Wie auch schon nach Antikörper-Gabe *in vivo*, wurde die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen auch in den Kokulturen durch die Zytokinmuster, die in den Überständen gefunden wurden (Abb. 18), reflektiert. Erhöhte Zytokinproduktion wurde nur in den Kokulturen gefunden, die T-Zellen, DZ, Tumorzellen und Surek enthielten. Hohe Konzentrationen an IL-2, IFN- γ , GM-CSF und IL-12 und niedrigere, aber im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Werte der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 wurden detektiert.

Die Effizienz der T-Zell-Aktivierung durch Surek in Gegenwart von DZ konnte durch die Induktion der Tumorzell-Lyse noch verdeutlicht werden. In Kontrollgruppen, die DZ oder T-Zellen alleine mit oder ohne Surek enthielten, konnte keine Elimination der B78-D14-Zellen beobachtet werden. Nur die Kombination von T-Zellen und DZ unter Zugabe von Surek führte zur Redirektion gegen die Tumorzellen und deren Lyse (Abb. 19).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aktivierung von T-Zellen, die Eliminierung von Tumorzellen und das Zytokinmuster, das in den Überständen *in vitro* gefunden wurde, genau den Beobachtungen entsprachen, die nach Surek-Gabe *in vivo* gemacht wurden. Die *in vivo* gefundene T-Zell-Antwort ging mit der Aktivierung von CD11c⁺-Zellen und einem gemischten Th1/Th2-Zytokinprofil in den Seren immunisierter Mäuse einher. Die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses von Tumor-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen fand nur statt, wenn der bsAk Surek mit intaktem Fc-Teil zur Immunisierung verwendet wurde. Die Ergebnisse der Kokulturversuche stimmten mit der Annahme überein, dass trifunktionale bsAk effizient wirken, indem sie Effektorzellen und Zielzellen zu einem *Tri – Zell – Komplex* zusammenführen (Zeidler u. a., 1999). Damit wird der Vorteil der intakten bsAk hervorgehoben, die in der Lage sind zusätzlich zu T-Zellen auch akzessorische Immunzellen zu aktivieren. Aktivierte APZ liefern dann die neben der Bindung der bsAk an CD3 zusätzlich benötigten Aktivierungssignale (Linsley und Ledbetter, 1993; Boussiotis u. a., 1994) an T-Zellen.

12.3 Kombination von Surek und DZ verbessert die Therapie

Die Abhängigkeit der durch Surek ausgelösten Effekte von CD11c⁺-Zellen lässt vermuten, dass der Antitumor-Effekt des bsAk *in vivo* durch eine kombinierte Therapie aus bsAk und DZ verstärkt werden könnte. Wird der trifunktionale bsAk gemeinsam mit *in vitro* generierten DZ appliziert, müssen endogene DZ *in vivo* nicht erst rekrutiert werden. Für eine große Anzahl an Antitumor-Vakzinierungsprotokollen werden *in vitro* generierte DZ verwendet, die beispielsweise mit Peptiden oder Proteinen beladen sind oder mit für TAA kodierenden Genkonstrukten transfiziert werden (Engleman, 2003; Melief, 2008; Valone u. a., 2001). Verschiedene Studien zeigten, dass die Therapie mit DZ sicher und gut verträglich ist. Außerdem scheinen für die Anwendung in der Klinik nützliche Anforderungen an exogene DZ leicht erfüllbar zu sein. So kann z.B. die Induktion einer hohen IL-12-Produktion durch die Anwendung geeigneter Differenzierungsprotokolle erreicht werden (Zobywalski u. a., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Surek mit *in vitro* generierten DZ der Monotherapie mit Surek tatsächlich deutlich überlegen ist (Abb. 20). In Kombination mit DZ war die zweimalige Gabe von 10 μg Surek ausreichend, um 100 % der Mäuse erfolgreich zu therapieren. Als Monotherapie muss für den gleichen Therapieerfolg die 7.5-fache Menge Surek verabreicht werden. Die kombinierte Therapie zieht einen Vorteil aus den bereits *in vitro* aktivierten DZ, die die Aktivierung von T-Zellen durch den bsAk unterstützen. Außerdem stellt dieser Ansatz auch eine Ver-

besserung zur konventionellen Therapie mit DZ dar, da die DZ bei der Verabreichung bereits mit bsAk beschichtet sind und somit die Redirektion der DZ zu den Zielzellen sichergestellt wird.

12.4 Ausblick

Trifunktionale bsAk zeigen nicht nur großes Potenzial in Mausmodellen, sondern werden auch in der Klinik bereits erfolgreich eingesetzt. BsAk mit Spezifitäten, die gegen die Tumorantigene Her2/neu und CD20 gerichtet sind, werden momentan in klinischen Studien getestet (Lindhofer u. a., 2011; Jäger u. a., 2009; Kiewe u. a., 2006; Stanglmaier u. a., 2008). Der gegen CD3 und EpCAM gerichtete bsAk Catumaxomab ist außerdem der erste zur Behandlung von Krebspatienten zugelassene bsAk weltweit (Burges u. a., 2007; Linke u. a., 2010).

Deshalb liegt es nahe, die in der vorliegenden Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Entstehung eines T-Zell-Gedächtnisses nach Behandlung mit bsAk auf das humane System zu übertragen. Vor allem die Charakterisierung der durch bsAk ausgelösten T-Zellantwort und der Spezifitäten, gegen die eine solche Antwort gerichtet ist, ist hierbei von großem Interesse. Durch die Isolierung Tumor-spezifischer T-Zellen aus Blutproben von Patienten, die mit bsAk behandelt wurden, könnten Antigen-spezifitäten der T-Zellen bestimmt und damit möglicherweise neue Antigene definiert werden, die eine Rolle in der Tumorabstoßung spielen.

Es ist bekannt, dass DZ nicht nur eine adaptive Immunantwort induzieren, sondern auch NK-Zellen effektiv aktivieren können (Reschner u. a., 2008). Die Interaktion zwischen reifen DZ und NK-Zellen führt zur Proliferation und IFN- γ -Produktion von NK-Zellen und fördert ihre zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen (Fernandez u. a., 1999). Diese Interaktion spielt außerdem eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort gegen Tumoren zu einem Zeitpunkt, bevor sich eine adaptive Immunantwort entwickelt hat. Die Effektivität und Polarisierung der T-Zellantwort wird zudem durch die gegenseitige Aktivierung der beiden Zelltypen beeinflusst (Reschner u. a., 2008).

Wie Abb. 5C zeigt, ist eine Therapie mit Surek nicht mehr erfolgreich, wenn vor und während der Therapie NK-Zellen depletiert werden. Außerdem wurde in der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt, dass DZ bei der Surek-induzierten Redirektion von T-Zellen gegen Tumorzellen benötigt werden. Der genaue Tötungsmechanismus, den der bsAk auslöst, konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden. Deshalb könnte die Untersuchung der

NK-Zellen und der DZ-NK-Zell-Interaktionen neue Erkenntnisse über die Wirkweise des bsAk liefern und möglicherweise auch zur Aufklärung des durch Surek ausgelösten Tötungsmechanismus beitragen.

Da trifunktionale bsAk über CD3 an alle T-Zellen binden, sollte auch die Frage untersucht werden, ob regulatorische T-Zellen (Treg) durch diese Konstrukte aktiviert und redirigiert werden. Erhöhte Zahlen an Treg konnten in Krebspatienten gefunden werden und korrelieren mit einer schlechten Prognose (Bates u. a., 2006; Ling u. a., 2007; Szczepanski u. a., 2009). Deshalb ist es wichtig zu wissen, welchen Einfluss die Behandlung mit trifunktionalen bsAk auf Treg hat und ob sich eine Aktivierung von Treg durch bsAk möglicherweise negativ auf den Therapieerfolg auswirkt. Im Gegensatz dazu führen das Fehlen oder Defekte von Treg zu schweren Autoimmunerkrankungen (Buckner, 2010). In diesem Zusammenhang wäre eine Aktivierung und Proliferation dieser Zellpopulation durch bsAk hilfreich. So könnten Treg beispielsweise *in vitro* mithilfe von bsAk expandiert und anschließend als Therapie in Patienten transferiert werden.

Das genaue Verständnis der Wirkweise trifunktionaler bsAk ist also essenziell, um Chancen und Risiken der Therapie mit diesen hochpotenten Agenzien abschätzen zu können und diese möglicherweise auch zu verbessern. Als ersten Schritt dazu lieferte die kombinierte Therapie von Surek und DZ im Mausmodell (Abb. 20) bereits einen vielversprechenden Ansatz für eine Optimierung der Therapie mit bsAk.

Literatur

- [Abbas und Lichtman 2005] ABBAS, A.K. ; LICHTMAN, A.H.: *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia, PA : Saunders, 2005
- [Abès u. a. 2010] ABÈS, R. ; GÉLIZÉ, E. ; FRIDMAN, W. H. ; TEILLAUD, J. L.: Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. In: *Blood* 116 (2010), Nr. 6, S. 926–34
- [Adam u. a. 2005] ADAM, C. ; KING, S. ; ALLGEIER, T. ; BRAUMÜLLER, H. ; LÜKING, C. ; MYSLIWETZ, J. ; KRIEGESKORTE, A. ; BUSCH, D. H. ; RÖCKEN, M. ; MOCIKAT, R.: DC-NK cell cross talk as a novel CD4⁺ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. In: *Blood* 106 (2005), Nr. 1, S. 338–44
- [Bates u. a. 2006] BATES, G. J. ; FOX, S. B. ; HAN, C. ; LEEK, R. D. ; GARCIA, J. F. ; HARRIS, A. L. ; BANHAM, A. H.: Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. In: *J Clin Oncol* 24 (2006), Nr. 34, S. 5373–80
- [Beck u. a. 2008] BECK, A. ; WURCH, T. ; CORVAIA, N.: Therapeutic antibodies and derivatives: from the bench to the clinic. In: *Curr Pharm Biotechnol* 9 (2008), Nr. 6, S. 421–2
- [Becker u. a. 1996] BECKER, J. C. ; PANCOOK, J. D. ; GILLIES, S. D. ; FURUKAWA, K. ; REISFELD, R. A.: T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy. In: *J Exp Med* 183 (1996), Nr. 5, S. 2361–6
- [Bloom u. a. 1997] BLOOM, M. B. ; PERRY-LALLEY, D. ; ROBBINS, P. F. ; LI, Y. ; GAMIL, M. el ; ROSENBERG, S. A. ; YANG, J. C.: Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. In: *J Exp Med* 185 (1997), Nr. 3, S. 453–9
- [Boussiotis u. a. 1994] BOUSSIOTIS, V. A. ; BARBER, D. L. ; NAKARAI, T. ; FREEMAN, G. J. ; GRIBBEN, J. G. ; BERNSTEIN, G. M. ; D'ANDREA, A. D. ; RITZ, J. ; NADLER, L. M.: Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. In: *Science* 266 (1994), Nr. 5187, S. 1039–42
- [Buckner 2010] BUCKNER, J. H.: Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. In: *Nat Rev Immunol* 10 (2010), Nr. 12, S. 849–59

- [Buhmann u. a. 2009] BUHMANN, R. ; SIMOES, B. ; STANGLMAIER, M. ; YANG, T. ; FALTIN, M. ; BUND, D. ; LINDHOFER, H. ; KOLB, H. J.: Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion. In: *Bone Marrow Transplant* 43 (2009), Nr. 5, S. 383–97
- [Burges u. a. 2007] BURGES, A. ; WIMBERGER, P. ; KUMPER, C. ; GORBOUNOVA, V. ; SOMMER, H. ; SCHMALFELDT, B. ; PFISTERER, J. ; LICHINITSER, M. ; MAKHSON, A. ; MOISEYENKO, V. ; LAHR, A. ; SCHULZE, E. ; JÄGER, M. ; STRÖHLEIN, M. A. ; HEISS, M. M. ; GOTTWALD, T. ; LINDHOFER, H. ; KIMMIG, R.: Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study. In: *Clin Cancer Res* 13 (2007), Nr. 13, S. 3899–905
- [Chames und Baty 2009] CHAMES, P. ; BATY, D.: Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? In: *MAbs* 1 (2009), Nr. 6, S. 539–47
- [Chang u. a. 1992] CHANG, H. R. ; CORDON-CARDO, C. ; HOUGHTON, A. N. ; CHEUNG, N. K. ; BRENNAN, M. F.: Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. In: *Cancer* 70 (1992), Nr. 3, S. 633–8
- [Cheresh u. a. 1985] CHERESH, D. A. ; HONSIK, C. J. ; STAFFILENO, L. K. ; JUNG, G. ; REISFELD, R. A.: Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985), Nr. 15, S. 5155–9
- [Dunn u. a. 2002] DUNN, G. P. ; BRUCE, A. T. ; IKEDA, H. ; OLD, L. J. ; SCHREIBER, R. D.: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. In: *Nat Immunol* 3 (2002), Nr. 11, S. 991–8
- [Egeter u. a. 2000] EGETER, O. ; MOCIKAT, R. ; GHORESCHI, K. ; DIECKMANN, A. ; RÖCKEN, M.: Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. In: *Cancer Res* 60 (2000), Nr. 6, S. 1515–20
- [Eggert u. a. 2004] EGGERT, A. O. ; ANDERSEN, M. H. ; VOIGT, H. ; SCHRAMA, D. ; KAMPGEN, E. ; STRATEN, P. T. ; BECKER, J. C.: Characterization of mouse MAGE-derived H-2Kb-restricted CTL epitopes. In: *Eur J Immunol* 34 (2004), Nr. 11, S. 3285–90

- [Ehrlich 1909] EHRlich, P.: Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. In: *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde* 5 (1909), S. 273–290
- [Engleman 2003] ENGLEMAN, E. G.: Dendritic cell-based cancer immunotherapy. In: *Semin Oncol* 30 (2003), Nr. 3 Suppl 8, S. 23–9
- [Fanger und Guyre 1991] FANGER, M. W. ; GUYRE, P. M.: Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity. In: *Trends Biotechnol* 9 (1991), Nr. 11, S. 375–80
- [Fernandez u. a. 1999] FERNANDEZ, N. C. ; LOZIER, A. ; FLAMENT, C. ; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. ; BELLET, D. ; SUTER, M. ; PERRICAUDET, M. ; TURSZA, T. ; MARASKOVSKY, E. ; ZITVOGEL, L.: Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. In: *Nat Med* 5 (1999), Nr. 4, S. 405–11
- [Fidler 1975] FIDLER, I. J.: Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. In: *Cancer Res* 35 (1975), Nr. 1, S. 218–24
- [Granucci u. a. 2008] GRANUCCI, F. ; ZANONI, I. ; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.: Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. In: *Cell Mol Life Sci* 65 (2008), Nr. 11, S. 1683–97
- [Hank u. a. 1996] HANK, J. A. ; SURFUS, J. E. ; GAN, J. ; JAEGER, P. ; GILLIES, S. D. ; REISFELD, R. A. ; SONDEL, P. M.: Activation of human effector cells by a tumor reactive recombinant anti-ganglioside GD2 interleukin-2 fusion protein (ch14.18-IL2). In: *Clin Cancer Res* 2 (1996), Nr. 12, S. 1951–9
- [Haraguchi u. a. 1994] HARAGUCHI, M. ; YAMASHIRO, S. ; YAMAMOTO, A. ; FURUKAWA, K. ; TAKAMIYA, K. ; LLOYD, K. O. ; SHIKU, H.: Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), Nr. 22, S. 10455–9
- [Heiner u. a. 1987] HEINER, J. P. ; MIRALDI, F. ; KALLICK, S. ; MAKLEY, J. ; NEELY, J. ; SMITH-MENSAH, W. H. ; CHEUNG, N. K.: Localization of GD2-specific monoclonal antibody 3F8 in human osteosarcoma. In: *Cancer Res* 47 (1987), Nr. 20, S. 5377–81
- [Heiss u. a. 2010] HEISS, M. M. ; MURAWA, P. ; KORALEWSKI, P. ; KUTARSKA, E. ; KOLESNIK, O. O. ; IVANCHENKO, V. V. ; DUDNICHENKO, A. S. ; ALEKNAVICIENE, B. ; RAZBADAUSKAS, A. ; GORE, M. ; GANEA-MOTAN, E. ; CIULEANU, T. ; WIMBERGER, P. ; SCHMITTEL, A. ; SCHMALFELDT, B. ; BURGESS, A. ; BOKEMEYER, C. ; LINDHOFER, H. ; LAHR, A. ; PARSONS, S. L.: The trifunctional antibody catumaxomab for

- the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. In: *Int J Cancer* 127 (2010), Nr. 9, S. 2209–21
- [Heiss u.a. 2005] HEISS, M. M. ; STRÖHLEIN, M. A. ; JÄGER, M. ; KIMMIG, R. ; BURGESS, A. ; SCHOBERTH, A. ; JAUCH, K. W. ; SCHILDBERG, F. W. ; LINDHOFER, H.: Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. In: *Int J Cancer* 117 (2005), Nr. 3, S. 435–43
- [Hilchey u.a. 2009] HILCHEY, S. P. ; HYRIEN, O. ; MOSMANN, T. R. ; LIVINGSTONE, A. M. ; FRIEDBERG, J. W. ; YOUNG, F. ; FISHER, R. I. ; KELLEHER, Jr. ; BANKERT, R. B. ; BERNSTEIN, S. H.: Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a vaccinal effect of Rituximab. In: *Blood* 113 (2009), Nr. 16, S. 3809–12
- [Jäger u.a. 2009] JÄGER, M. ; SCHOBERTH, A. ; RUF, P. ; HESS, J. ; LINDHOFER, H.: The trifunctional antibody ertumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2. In: *Cancer Res* 69 (2009), Nr. 10, S. 4270–6
- [Kiewe u.a. 2006] KIEWE, P. ; HASMÜLLER, S. ; KAHLERT, S. ; HEINRIGS, M. ; RACK, B. ; MARME, A. ; KORFEL, A. ; JÄGER, M. ; LINDHOFER, H. ; SOMMER, H. ; THIEL, E. ; UNTCH, M.: Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. In: *Clin Cancer Res* 12 (2006), Nr. 10, S. 3085–91
- [Kronenberger u.a. 2002] KRONENBERGER, K. ; DIECKMANN, A. ; SELMAYR, M. ; STREHL, J. ; WAHL, U. ; LINDHOFER, H. ; KRAAL, G. ; MOCIKAT, R.: Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells. In: *Blood* 99 (2002), Nr. 4, S. 1327–31
- [Kronenberger u.a. 2008] KRONENBERGER, K. ; NÖSSNER, E. ; FRANKENBERGER, B. ; WAHL, U. ; DREYLING, M. ; HALLEK, M. ; MOCIKAT, R.: A polyvalent cellular vaccine induces T-cell responses against specific self-antigens overexpressed in chronic lymphocytic B-cell leukemia. In: *J Immunother* 31 (2008), Nr. 8, S. 723–30
- [Lesterhuis u.a. 2011] LESTERHUIS, W. J. ; HAANEN, J. B. ; PUNT, C. J.: Cancer immunotherapy—revisited. In: *Nat Rev Drug Discov* 10 (2011), Nr. 8, S. 591–600
- [Lindhofer u.a. 2011] LINDHOFER, H. ; HESS, J. ; RUF, P.: *Triomab*[®] antibodies for cancer therapy. S. 373. In: KONTERMANN, RE. (Hrsg.): *Bispecific antibodies*. Berlin : Springer, 2011

- [Lindhofer u. a. 1996] LINDHOFER, H. ; MENZEL, H. ; GÜNTHER, W. ; HÜLTNER, L. ; THIERFELDER, S.: Bispecific antibodies target operationally tumor-specific antigens in two leukemia relapse models. In: *Blood* 88 (1996), Nr. 12, S. 4651–8
- [Lindhofer u. a. 1995] LINDHOFER, H. ; MOCIKAT, R. ; STEIPE, B. ; THIERFELDER, S.: Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. In: *J Immunol* 155 (1995), Nr. 1, S. 219–25
- [Ling u. a. 2007] LING, K. L. ; PRATAP, S. E. ; BATES, G. J. ; SINGH, B. ; MORTENSEN, N. J. ; GEORGE, B. D. ; WARREN, B. F. ; PIRIS, J. ; RONCADOR, G. ; FOX, S. B. ; BANHAM, A. H. ; CERUNDOLO, V.: Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. In: *Cancer Immun* 7 (2007), S. 7
- [Linke u. a. 2010] LINKE, R. ; KLEIN, A. ; SEIMETZ, D.: Catumaxomab: clinical development and future directions. In: *MAbs* 2 (2010), Nr. 2, S. 129–36
- [Linsley und Ledbetter 1993] LINSLEY, P. S. ; LEDBETTER, J. A.: The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. In: *Annu Rev Immunol* 11 (1993), S. 191–212
- [Lipinski u. a. 1987] LIPINSKI, M. ; BRAHAM, K. ; PHILIP, I. ; WIELS, J. ; PHILIP, T. ; GORIDIS, C. ; LENOIR, G. M. ; TURSZ, T.: Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines. In: *Cancer Res* 47 (1987), Nr. 1, S. 183–7
- [Lüking u. a. 2008] LÜKING, C. ; KRONENBERGER, K. ; FRANKENBERGER, B. ; NÖSSNER, E. ; RÖCKEN, M. ; MOCIKAT, R.: Antitumor effector functions of T cells are dependent on in vivo priming and restricted T-cell receptor expression. In: *Int J Cancer* 122 (2008), Nr. 10, S. 2280–5
- [Mansour u. a. 2007] MANSOUR, M. ; POHAJDAK, B. ; KAST, W. M. ; FUENTES-ORTEGA, A. ; KORETS-SMITH, E. ; WEIR, G. M. ; BROWN, R. G. ; DAFTARIAN, P.: Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax. In: *J Transl Med* 5 (2007), Nr. 1, S. 20
- [McLaughlin u. a. 1998] MCLAUGHLIN, P. ; GRILLO-LOPEZ, A. J. ; LINK, B. K. ; LEVY, R. ; CZUCZMAN, M. S. ; WILLIAMS, M. E. ; HEYMAN, M. R. ; BENICE-BRUCKLER, I. ; WHITE, C. A. ; CABANILLAS, F. ; JAIN, V. ; HO, A. D. ; LISTER, J. ; WEY, K. ; SHEN, D. ; DALLAIRE, B. K.: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for

- relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. In: *J Clin Oncol* 16 (1998), Nr. 8, S. 2825–33
- [Melief 2008] MELIEF, C. J.: Cancer immunotherapy by dendritic cells. In: *Immunity* 29 (2008), Nr. 3, S. 372–83
- [Minchom u. a. 2011] MINCHOM, A. ; YOUNG, K. ; LARKIN, J.: Ipilimumab: showing survival benefit in metastatic melanoma. In: *Future Oncol* 7 (2011), Nr. 11, S. 1255–64
- [Mueller u. a. 1990] MUELLER, B. M. ; ROMERDAHL, C. A. ; GILLIES, S. D. ; REISFELD, R. A.: Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. In: *J Immunol* 144 (1990), Nr. 4, S. 1382–6
- [Murphy u. a. 2008] MURPHY, K. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M.: *Janeway Immunologie*. New York : Garland Science, 2008
- [Navid u. a. 2010] NAVID, F. ; SANTANA, V. M. ; BARFIELD, R. C.: Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. In: *Curr Cancer Drug Targets* 10 (2010), Nr. 2, S. 200–9
- [Nencioni und Brossart 2004] NENCIONI, A. ; BROSSART, P.: Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status. In: *Stem Cells* 22 (2004), Nr. 4, S. 501–13
- [Nicolson u. a. 1978] NICOLSON, G. L. ; BRUNSON, K. W. ; FIDLER, I. J.: Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. In: *Cancer Res* 38 (1978), Nr. 11 Pt 2, S. 4105–11
- [O’Garra und Vieira 2007] O’GARRA, A. ; VIEIRA, P.: T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. In: *Nat Rev Immunol* 7 (2007), Nr. 6, S. 425–8
- [Overwijk u. a. 1998] OVERWIJK, W. W. ; TSUNG, A. ; IRVINE, K. R. ; PARKHURST, M. R. ; GOLETZ, T. J. ; TSUNG, K. ; CARROLL, M. W. ; LIU, C. ; MOSS, B. ; ROSENBERG, S. A. ; RESTIFO, N. P.: gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of self-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. In: *J Exp Med* 188 (1998), Nr. 2, S. 277–86
- [Palucka u. a. 2010] PALUCKA, K. ; UENO, H. ; ROBERTS, L. ; FAY, J. ; BANCHEREAU, J.: Dendritic cells: are they clinically relevant? In: *Cancer J* 16 (2010), Nr. 4, S. 318–24
- [Parkin und Cohen 2001] PARKIN, J. ; COHEN, B.: An overview of the immune system. In: *Lancet* 357 (2001), Nr. 9270, S. 1777–89

- [Peipp und Valerius 2002] PEIPP, M. ; VALERIUS, T.: Bispecific antibodies targeting cancer cells. In: *Biochem Soc Trans* 30 (2002), Nr. 4, S. 507–11
- [Pleyer und Ritter 2003] PLEYER, U. ; RITTER, T.: Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye. In: *Prog Retin Eye Res* 22 (2003), Nr. 3, S. 277–93
- [Ragupathi u. a. 2003] RAGUPATHI, G. ; LIVINGSTON, P. O. ; HOOD, C. ; GATHURU, J. ; KROWN, S. E. ; CHAPMAN, P. B. ; WOLCHOK, J. D. ; WILLIAMS, L. J. ; OLDFIELD, R. C. ; HWU, W. J.: Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. In: *Clin Cancer Res* 9 (2003), Nr. 14, S. 5214–20
- [Reinecke u. a. 1994] REINECKE, K. ; MYSLIWIECZ, J. ; THIERFELDER, S.: Single as well as pairs of synergistic anti-CD4+CD8 antibodies prevent graft-versus-host disease in fully mismatched mice. In: *Transplantation* 57 (1994), Nr. 3, S. 458–61
- [Reschner u. a. 2008] RESCHNER, A. ; HUBERT, P. ; DELVENNE, P. ; BONIVER, J. ; JACOBS, N.: Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. In: *Clin Exp Immunol* 152 (2008), Nr. 2, S. 219–26
- [Ruf u. a. 2004] RUF, P. ; JÄGER, M. ; ELLWART, J. ; WOSCH, S. ; KUSTERER, E. ; LINDHOFER, H.: Two new trifunctional antibodies for the therapy of human malignant melanoma. In: *Int J Cancer* 108 (2004), Nr. 5, S. 725–32
- [Ruf und Lindhofer 2001] RUF, P. ; LINDHOFER, H.: Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. In: *Blood* 98 (2001), Nr. 8, S. 2526–34
- [Schüler u. a. 1999] SCHÜLER, T. ; QIN, Z. ; IBE, S. ; NOBEN-TRAUTH, N. ; BLANKENSTEIN, T.: T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice. In: *J Exp Med* 189 (1999), Nr. 5, S. 803–10
- [Schrama u. a. 2004] SCHRAMA, D. ; XIANG, R. ; EGGERT, A. O. ; ANDERSEN, M. H. ; PEDERSEN LS, L. O. ; KAMPGEN, E. ; SCHUMACHER, T. N. ; REISFELD, R. R. ; BECKER, J. C.: Shift from systemic to site-specific memory by tumor-targeted IL-2. In: *J Immunol* 172 (2004), Nr. 10, S. 5843–50

- [Schreiber u. a. 2011] SCHREIBER, R. D. ; OLD, L. J. ; SMYTH, M. J.: Cancer immunoe-
diting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. In: *Science*
331 (2011), Nr. 6024, S. 1565–70
- [Scott u. a. 2000] SCOTT, D. ; ADDEY, C. ; ELLIS, P. ; JAMES, E. ; MITCHELL, M. J. ;
SAUT, N. ; JURCEVIC, S. ; SIMPSON, E.: Dendritic cells permit identification of genes
encoding MHC class II-restricted epitopes of transplantation antigens. In: *Immunity*
12 (2000), Nr. 6, S. 711–20
- [Sharma u. a. 2011] SHARMA, P. ; WAGNER, K. ; WOLCHOK, J. D. ; ALLISON, J. P.:
Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next
steps. In: *Nat Rev Cancer* 11 (2011), Nr. 11, S. 805–12
- [Stanglmaier u. a. 2008] STANGLMAIER, M. ; FALTIN, M. ; RUF, P. ; BODENHAUSEN,
A. ; SCHRÖDER, P. ; LINDHOFER, H.: Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific
antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells
even with very low CD20 expression levels. In: *Int J Cancer* 123 (2008), Nr. 5, S. 1181–9
- [Strehl u. a. 1999] STREHL, J. ; SELMAYR, M. ; KREMER, J. P. ; HÜLTNER, L. ; LINDHO-
FER, H. ; MOCIKAT, R.: Gene therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified
trioma cells. In: *Int J Cancer* 83 (1999), Nr. 1, S. 113–20
- [Stutman 1974] STUTMAN, O.: Tumor development after 3-methylcholanthrene in im-
munologically deficient athymic-nude mice. In: *Science* 183 (1974), Nr. 124, S. 534–6
- [Szczepanski u. a. 2009] SZCZEPANSKI, M. J. ; SZAJNIK, M. ; CZYSTOWSKA, M. ; MAN-
DAPATHIL, M. ; STRAUSS, L. ; WELSH, A. ; FOON, K. A. ; WHITESIDE, T. L. ; BOY-
IADZIS, M.: Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with
acute myelogenous leukemia. In: *Clin Cancer Res* 15 (2009), Nr. 10, S. 3325–32
- [Tsuchida u. a. 1987] TSUCHIDA, T. ; SAXTON, R. E. ; MORTON, D. L. ; IRIE, R. F.:
Gangliosides of human melanoma. In: *J Natl Cancer Inst* 78 (1987), Nr. 1, S. 45–54
- [Valerius u. a. 1997] VALERIUS, T. ; STOCKMEYER, B. ; SPRIEL, A. B. van ; GRAZIANO,
R. F. ; HERIK-OUDIJK, I. E. van den ; REPP, R. ; DEO, Y. M. ; LUND, J. ; KALDEN,
J. R. ; GRAMATZKI, M. ; WINKEL, J. G. van de: Fc α RI (CD89) as a novel trigger
molecule for bispecific antibody therapy. In: *Blood* 90 (1997), Nr. 11, S. 4485–92
- [Valone u. a. 2001] VALONE, F. H. ; SMALL, E. ; MACKENZIE, M. ; BURCH, P. ; LACY,
M. ; PESHWA, M. V. ; LAUS, R.: Dendritic cell-based treatment of cancer: closing in
on a cellular therapy. In: *Cancer J* 7 Suppl 2 (2001), S. S53–61

- [Vollmar und Dingermann 2005] VOLLMAR, A. ; DINGERMANN, T.: *Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe*. Stuttgart : Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, 2005
- [Weiner u. a. 1995] WEINER, L. M. ; CLARK, J. I. ; RING, D. B. ; ALPAUGH, R. K.: Clinical development of 2B1, a bispecific murine monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc γ RIII. In: *J Hematother* 4 (1995), Nr. 5, S. 453–6
- [Wu u. a. 1986] WU, Z. L. ; SCHWARTZ, E. ; SEEGER, R. ; LADISCH, S.: Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. In: *Cancer Res* 46 (1986), Nr. 1, S. 440–3
- [Zeidler u. a. 2000] ZEIDLER, R. ; MYSLIWIECZ, J. ; CSANADY, M. ; WALZ, A. ; ZIEGLER, I. ; SCHMITT, B. ; WOLLENBERG, B. ; LINDHOFER, H.: The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. In: *Br J Cancer* 83 (2000), Nr. 2, S. 261–6
- [Zeidler u. a. 1999] ZEIDLER, R. ; REISBACH, G. ; WOLLENBERG, B. ; LANG, S. ; CHAUBAL, S. ; SCHMITT, B. ; LINDHOFER, H.: Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. In: *J Immunol* 163 (1999), Nr. 3, S. 1246–52
- [Zobywalski u. a. 2007] ZOBYWALSKI, A. ; JAVOROVIC, M. ; FRANKENBERGER, B. ; POHLA, H. ; KREMMER, E. ; BIGALKE, I. ; SCHENDEL, D. J.: Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. In: *J Transl Med* 5 (2007), S. 18

Teil V

Anhang

13 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in

13.1 Fachpublikationen

Nina Eißler, Peter Ruf, Josef Mysliwietz, Horst Lindhofer and Ralph Mocikat. **Trifunctional bispecific antibodies induce tumor-specific T cells and elicit a vaccination effect.** Cancer Research, online ahead of print, July 2012.

Nina Eißler, Peter Ruf, Josef Mysliwietz, Horst Lindhofer and Ralph Mocikat. **The potential of trifunctional bispecific antibodies is dependent on dendritic cells: Rationale for a new approach of tumor immunotherapy.** Zur Veröffentlichung eingereicht.

Peter Ruf, Beatrix Förster, Nina Eißler, Ralph Mocikat, Jürgen Hess, Susanne Wosch, Ivonne Suckstorff, Christine Zehetmeier and Horst Lindhofer. **Ganglioside GD2-specific trifunctional surrogate antibody Surek demonstrates therapeutic activity against melanoma.** Zur Veröffentlichung eingereicht.

13.2 Poster, Kongressbeiträge

Nina Eißler, Peter Ruf, Horst Lindhofer and Ralph Mocikat. **Characterization of the immune response after therapy with a trifunctional bispecific antibody.** Tumor Immunology meets Oncology VII (TIMO VII), Halle, 14. - 16.04.2011

Nina Eißler, Peter Ruf, Horst Lindhofer and Ralph Mocikat. **Characterization of the immune response after therapy with a trifunctional bispecific antibody.** Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) und der Italienischen Gesellschaft für Immunologie, Klinische Immunologie und Allergologie (SII-CA), Riccione, Italien, 28.09. - 01.10.2011

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Mentor Prof. Dr. med. Ralph Mocikat, der die erfolgreiche Durchführung und Anfertigung meiner Doktorarbeit mit seinem Rat und seiner Erfahrung ermöglicht hat. Auch bei Dr. Horst Lindhofer und Dr. Peter Ruf möchte ich mich für die Vergabe des Projekts, die Bereitstellung des bispezifischen Antikörpers und für die Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit besonders herzlich bedanken.

Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar danke ich sehr für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Vertretung vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München.

Dr. Josef Mysliwietz danke ich für Beratung und Unterstützung bei vielen Experimenten und für die begeisterte Zusammenarbeit bei den Versuchen zur Charakterisierung der Rolle der DZ nach Aktivierung mit bsAk.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. D. J. Schendel für die Aufnahme am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrums München.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des IMI für das tolle Arbeitsklima und die gute Atmosphäre im Institut bedanken, die die drei Jahre meiner Doktorarbeit zu einer besonderen Zeit gemacht haben. Hier möchte ich mich vor allem auch bei meinen „Geschwistern“ aus der AG Mocikat Albert, Christoph, Hannes, Jakob, Lena, Lorenz, Marcella, Mäggi, Nadine und Tanja für die tolle Zusammenarbeit und die gute Zeit, die wir miteinander hatten, bedanken.

Meiner Mutter, meinen Geschwistern und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung und Ermunterungen während aller Hochs und Tiefs der Doktorarbeitszeit.