

**„Entwicklung eines pharmakologischen Modells  
zur Prüfung immuntherapeutischer Antikörper mit  
dreidimensionalen Tumorzellkulturen *in vitro*“**

D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Tobias Leidig  
geb. in Wissen/Sieg

Mainz, Juli 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

## Inhaltverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Krebserkrankungen .....	1
1.1.1	Entstehung von Tumorzellen .....	1
1.1.2	Metastasierung .....	3
1.2	Das Immunsystem .....	5
1.2.1	Aufbau & Funktion .....	5
1.2.2	Die Zellen des Immunsystems.....	6
1.2.3	„Immun-Escape“ von Tumorzellen.....	10
1.3	Immuntherapien .....	12
1.3.1	Tumorantigene.....	13
1.3.2	Therapieansätze .....	14
1.3.3	Trifunktionale bispezifische Antikörper .....	15
1.4	3D-Zellkultur .....	17
2	Zielsetzungen .....	21
3	Materialien und Methoden .....	23
3.1	Untersuchungsobjekte .....	23
3.1.1	Zelllinien.....	23
3.1.2	Immunzellen .....	24
3.2	Standardtechniken der Zellkultur .....	25
3.2.1	Monolayer-Kultur von Zelllinien .....	25
3.2.2	Kryo-Konservierung von Zelllinien .....	26
3.2.3	Automatische Quantifizierung von Einzelzellsuspensionen.....	26
3.2.4	Mykoplasmentests .....	27
3.3	Suspensions-Kulturen .....	29
3.3.1	Sphäroide .....	29
3.3.2	Co-Kultur mit PBMC .....	31
3.4	Therapeutika .....	32
3.4.1	catumaxomab, ertumaxomab und 26116 .....	32
3.4.2	Cisplatin .....	32
3.4.3	Versuchsschemata .....	32
3.5	Präparationen von Zellen .....	34
3.5.1	Zellsuspensionen.....	34
3.5.2	Adhärente Zellen [FlexiPERM] .....	34

3.5.3 Sphäroide .....	35
3.6 Analysen .....	37
3.6.1 Wachstumskinetik von Monolayer-Zellen .....	37
3.6.2 Bestimmung der Sphäroidgröße.....	37
3.6.2.1 Mikroskopische Messung der Sphäroidgröße .....	37
3.6.2.2 Software-basierte Bestimmung der Sphäroidgröße .....	38
3.6.3 Kolonienbildungstest.....	39
3.6.4 Analyse der Zellvitalität.....	40
3.6.5 Immunhistochemische Färbungen (IHC).....	41
3.6.5.1 Enzym-gekoppelte Markierung.....	41
3.6.5.2 Fluorochrom-gekoppelte Markierung .....	42
3.6.6 Lokalisierung & Quantifizierung von IHC in Gefrierschnitten.....	43
3.6.7 Durchflusszytometrie .....	44
3.6.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	45
3.6.9 Zytokinbestimmungen.....	51
3.6.10 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	52
3.7 Statistik.....	53
4 Ergebnisse.....	54
4.1 Merkmale und Eignung verschiedener Tumorzelllinien .....	54
4.1.1 Antigen-Expressionen.....	54
4.1.1.1 EpCAM .....	54
4.1.1.2 Her2/neu.....	56
4.1.1.3 Analyse des Her2/neu Amplifikationsgrades.....	59
4.1.2 Tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Zelllinien.....	61
4.2 Sphäroidkultivierung.....	62
4.2.1 Vorbereitende Monolayer-Kultivierung .....	62
4.2.2 Messmethoden zur Größenbestimmung der Sphäroide.....	64
4.2.3 Einflüsse auf das Größenwachstum der Sphäroide .....	65
4.2.4 Untersuchungen auf Mykoplasmen-Kontaminationen .....	67
4.3 Co-Kultivierung von Sphäroiden mit PBMC .....	68
4.3.1 Immunhistochemische Färbungen von PBMC .....	69
4.3.2 Quantitative Zusammensetzung der PBMC .....	70
4.4 Wirkung der Therapie auf Sphäroide .....	72
4.4.1 catumaxomab .....	72

## Inhaltsverzeichnis

---

4.4.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen.....	74
4.4.1.2 Untersuchungen zur Wirkweise von catumaxomab .....	76
4.4.1.3 Einfluss von catumaxomab auf die Zytokinausschüttung.....	85
4.4.2 Cisplatin .....	92
4.4.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen.....	92
4.4.2.2 Einfluss von Cisplatin auf die Zytokinausschüttung .....	96
4.4.3 Test auf Synergie zwischen catumaxomab und Cisplatin .....	97
4.4.3.1 Wirkungen der Wirkstoff-Kombination auf die Sphäroide.....	97
4.4.3.2 Einfluss der Kombinationstherapie auf die Zytokinausschüttung .....	99
4.4.4 ertumaxomab.....	101
4.4.4.1 Dosis-Wirkungsbestimmungen.....	103
4.4.4.2 Einfluss von ertumaxomab auf FaDu-Sphäroide.....	105
4.4.4.3 Einfluss von ertumaxomab auf HT-29-Sphäroide .....	107
5 Diskussion .....	110
5.1 Merkmale und Eignung verschiedener Tumorzelllinien .....	110
5.2 Sphäroide in Co-Kultur mit PBMC.....	111
5.3 Wirkung von catumaxomab auf FaDu-Sphäroide .....	114
5.4 Kombinierte Behandlung mit catumaxomab und Cisplatin.....	118
5.5 Wirkung von ertumaxomab auf Tumorsphäroide .....	120
5.6 Versuchskonzept zur Testung immuntherapeutischer Antikörper an Tumorzell- Sphäroiden in Spinner-Flaschen-Kulturen.....	123
6 Zusammenfassung .....	125
7 Summary .....	127
8 Anhang .....	129
8.1 Geräte .....	129
8.2 Puffer und Lösungen.....	130
8.3 Nährmedien.....	133
8.4 Antikörper.....	135
8.5 Marker & Kits.....	136
8.6 Chemikalien .....	136
8.7 Software .....	137
8.8 Abkürzungsverzeichnis .....	138
9 Literaturverzeichnis .....	141

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entstehung einer Metastase. ....	4
Abb. 2: Die drei Phasen des „Immune-Escape“. ....	11
Abb. 3: Das Prinzip des Tri-Zell-Komplexes. ....	16
Abb. 4: Vergleich des Mikromilieus von Tumoren und Sphäroiden. ....	19
Abb. 5: Zelltrennung nach Dichtezentrifugation. ....	24
Abb. 6: Miniaturisierte Spinner-Flasche. ....	29
Abb. 7: Schema des Aufbaus für das Zytospin-Verfahren. ....	34
Abb. 8: Mikroskopische Größenbestimmung von Sphäroiden. ....	38
Abb. 9: Software-basierte Auswertung der Sphäroidgrößen. ....	38
Abb. 10: Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Zellen in einem Sphäroidschnitt. ....	44
Abb. 11: EpCAM-Färbungen der Zelllinien FaDu und HCT-116. ....	55
Abb. 12: Her2/neu-Färbung eines FaDu-Sphäroids. ....	56
Abb. 13: Her2/neu-Fluoreszenz-Färbungen von Monolayer-Zellen. ....	57
Abb. 14: Her2/neu-Fluoreszenz-Färbung am Gefrierschnitt eines SAS-Sphäroids. ....	58
Abb. 15: Her2/neu-Fluoreszenz-Färbungen an SAS- und WiDr-Sphäroiden. ....	59
Abb. 16: Her2/neu-Amplifikationsanalyse mit FisH. ....	60
Abb. 17: Wachstumskurven von FaDu- und WiDr-Monolayer-Zellen. ....	62
Abb. 18: Wachstumskurven von BT474-Zellen. ....	63
Abb. 19: Vergleich der klassischen und der Software-gestützten Größenbestimmungsmethode. ....	65
Abb. 20: Durchmesser unbehandelter SAS-Sphäroide in der Spinner-Flaschen-Kultivierung. ....	66
Abb. 21: Mykoplasmen-Nachweis mittels PCR-Amplifikation. ....	67
Abb. 22: Mykoplasmen-Nachweis mittels DAPI-Färbung. ....	68
Abb. 23: CD45-Färbung eines PBMC-Zytospins. ....	69
Abb. 24: CD2-, CD3- und CD14-Färbung eines PBMC-Zytospins. ....	70
Abb. 25: Mengenanteile der durchflusszytometrisch bestimmten PBMC-Zellpopulationen. ....	71
Abb. 26: Wirkung von catumaxomab auf FaDu-Sphäroide. ....	73
Abb. 27: Wirkung von catumaxomab und 26Il6 auf die Größe von FaDu-Sphäroiden. ....	74
Abb. 28: Größenwachstum von FaDu-Sphäroiden unter Behandlung mit catumaxomab. ....	75
Abb. 29: Dosis-Wirkungskurve für catumaxomab bei FaDu-Sphäroiden nach sieben Tagen Behandlung. ....	76
Abb. 30: CD45 <sup>+</sup> -Zellen in mit catumaxomab behandelten FaDu-Sphäroiden. ....	77
Abb. 31: Färbung von CD2, CD3 und CD14 an Gefrierschnitten von FaDu-Sphäroiden. ....	78
Abb. 32: DNA-Gel einer Interferon- $\gamma$ -RT-PCR. ....	80
Abb. 33: DNA-Gele einer IL-2-, CD25- und CD64-RT-PCR. ....	80
Abb. 34: Ki-67-Färbung an unbehandelten FaDu-Sphäroiden. ....	82
Abb. 35: Ki-67 Färbung an behandelten FaDu-Sphäroiden. ....	82
Abb. 36: Apoptose-Detektion in FaDu-Sphäroiden. ....	83
Abb. 37: Dosisabhängige Verteilung apoptotischer Zellen in FaDu-Sphäroiden. ....	85
Abb. 38: Zytokin-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	86
Abb. 39: IL-2-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	87
Abb. 40: IL-4-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	88
Abb. 41: IL-6-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	88
Abb. 42: IL-10-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	89
Abb. 43: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	90
Abb. 44: Interferon- $\gamma$ -Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	91
Abb. 45: Größenwachstum von FaDu-Sphäroiden unter Behandlung mit Cisplatin. ....	92
Abb. 46: Dosis-Wirkungskurve für Cisplatin bei FaDu-Sphäroiden nach sieben Tagen Behandlung. ....	93
Abb. 47: Vitalitätstests an mit Cisplatin behandelten FaDu-Monolayer-Zellen und -Sphäroiden. ....	94
Abb. 48: Kolonienbildungstest von mit Cisplatin-behandelten FaDu-Sphäroiden nach 11 Tagen Behandlung. ....	95
Abb. 49: Zytokin-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen. ....	96
Abb. 50: Größen von FaDu-Sphäroiden unter kombinierter Behandlung mit catumaxomab und Cisplatin. ....	98

## Abbildungsverzeichnis

---

<i>Abb. 51: Kolonienbildungstest der Synergieversuche nach sechs Tagen Behandlung.</i> .....	99
<i>Abb. 52: Zytokin-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.</i> .....	100
<i>Abb. 53: Größenvergleich von FaDu-Sphäroiden nach Behandlung mit catumaxomab und ertumaxomab.</i> .....	102
<i>Abb. 54: Größenvergleich von HT29-Sphäroiden nach Behandlung mit catumaxomab, ertumaxomab und 26II6.</i> .....	103
<i>Abb. 55: Einfluss der ertumaxomab-Behandlung auf Sphäroidgrößen der Zelllinien FaDu, WiDr und HCT-116.</i> .....	104
<i>Abb. 56: Kolonienbildungstest mit ertumaxomab-behandelter FaDu-Sphäroide nach sieben Tagen.</i> .....	106
<i>Abb. 57: CD45-Fluoreszenz-Färbung am Gefrierschnitt eines FaDu-Sphäroids.</i> .....	107
<i>Abb. 58: Spinner-Flaschen mit behandelten HT-29 Sphäroiden.</i> .....	107
<i>Abb. 59: Immunhistochemische Färbungen von Zellen aus dem Medienüberstand behandelter HT-29-Sphäroide.</i> .....	108
<i>Abb. 60: Versuchskonzept.</i> .....	124

## Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Zelllinien.....</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 2: Pipettierschema für die Mykoplasmen-PCR.....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 3: Thermocycler-Programm für Mykoplasmentest .....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 4: Aufstellung der Therapieschemata.....</i>	<i>33</i>
<i>Tab. 5: Durchmesser der Ringmaske zur Quantifizierung gefärbter Zellen. ....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 6: Zusammenstellung der Antikörperkombinationen für die Durchflusszytometrie. ....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 7: Probenzusammensetzung eines Reaktionsmixes für die reverse Transkription.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 8: Probenzusammensetzung eines Mastermixes für die reverse Transkription.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 9: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes zur Amplifikation von PBMC-mRNA.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 10: Informationen über die Primer-Paare zur Amplifikation von IFN-<math>\gamma</math>-, IL-2-, CD25- und CD64-mRNA. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 11: Thermocycler-Programm für IFN-<math>\gamma</math>-, IL-2-, CD25- und CD64-PCR.....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 12: Mit CBA gemessene Zytokine und ihre Funktionen. ....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 13: Merkmalsliste der getesteten Zelllinien. ....</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 14: Densitometrische Analyse mehrerer CD64-, CD25- und IL-2-RT-PCR. ....</i>	<i>81</i>
<i>Tab. 15: Quantifizierung histochemisch markierter Zellen. ....</i>	<i>84</i>
<i>Tab. 16: Zytokin-Konzentrationen im Vergleich.....</i>	<i>101</i>



## Anmerkungen

In die vorliegende Arbeit wurden Daten integriert, die im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit „Wirkung des trifunktionalen Antikörpers catumaxomab auf humane Tumorzellen in Sphäroid-Kulturen und Manipulation der Tumorglykolyse durch siRNA“ von Franziska Hirschhäuser, sowie im Rahmen der Betreuung der Doktorarbeit von cand. med. Björn Rodday mit dem Arbeitstitel „Untersuchung zur Aktivierung von Immunzellen durch den trifunktionalen Antikörper catumaxomab in einer Ko-Kultur aus humanen MCTS und PBMC (Entwicklung einer halbautomatischen Wachstumsanalyse von dreidimensionalen Zellkulturen)“ gewonnen wurden.

Einige der in dieser Arbeit enthaltenen Abbildungen wurden auf internationalen Kongressen vorgestellt.

Einige in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden in einem wissenschaftlichen Artikel veröffentlicht:

**Hirschhaeuser F, Leidig T, Rodday B, Lindemann C, Mueller-Klieser WF. 2009.** Test System for Trifunctional Antibodies in 3D MCTS Culture. *Journal of Biomolecular Screening*. August 2009.

Die Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden durch Fresenius Biotech GmbH, Gräfelfing und TRION Pharma GmbH, München gefördert.

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen

Unter dem Sammelbegriff Krebs werden in der Medizin viele verschiedene Krankheitsbilder, bei denen maligne Tumoren vorliegen, zusammengefasst.

Tumoren sind Neoplasien, die durch unkontrollierte Zellvermehrung entstehen. Es wird zwischen benignen und malignen Tumoren unterschieden. Maligne Tumoren entstehen aus einzelnen entarteten Zellen, die im Verlauf der Tumorprogression aggressiver werden und in vom Entstehungsort entfernten Körperregionen Metastasen bilden können, was in der Regel zum Tod führt. Die Einteilung der Tumoren erfolgt üblicherweise nach histologischen und morphologischen Gesichtspunkten. Etwa 90 % aller malignen Tumoren sind Karzinome, das bedeutet, sie entstehen aus epithelialen Geweben. Sarkome, Lymphome, Leukämien und Myelome bilden die restlichen 10 % aller Krebsarten.

### 1.1.1 Entstehung von Tumorzellen

Körperzellen unterliegen normalerweise einer streng regulierten Wachstumskontrolle. Protoonkogene fördern das Zellwachstum, während Tumorsuppressor-Gene das Zellwachstum unterdrücken. Mutationen in diesen Genen können zum Verlust der Wachstumskontrolle und so zur Tumorbildung führen.

In der G1-Phase des Zellzyklus findet die Regulation von Zell-Proliferation und -Differenzierung statt. Bei malignen Zellen wird die zelluläre Differenzierung in einem frühen Stadium blockiert, und Gene mit proliferierender Signalwirkung werden aktiviert. So führt etwa die Expression mutierter Protoonkogene zur Induktion wachstumsstimulierender Proteine wie Cyclin D oder cyclinabhängiger Kinasen. Dies und der Funktionsverlust von Wachstumsinhibitoren wie den Tumorsuppressorgenen p53 und pRB hat unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen zur Folge (Fadare & Zheng, 2009; Kim & Zhao, 2005).

Neben diesen endogenen Faktoren regulieren auch Zell-Zell-Kontakte, vermittelt über Zellmembranrezeptoren, innerhalb eines Gewebes das Zellwachstum. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu Proliferationshemmung, was als Kontaktinhibition bezeichnet wird. Viele maligne Zellen besitzen aufgrund von Mutationen weniger oder mutierte Rezeptoren. Außerdem sind Zelladhäsionsmoleküle, wie beispielsweise Cadherine oder Integrine, auf der Oberfläche für die geordnete Zelldiffe-

renzierung und den Zusammenhalt des Gewebes verantwortlich. Störungen wie eine reduzierte Bildung von E-Cadherin, der Verlust von  $\alpha$ -Catenin, Überexpression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) oder Ausfall des Tumor-Suppressors DCC (Deleted in Colon Cancer) führen zum Verlust des zellulären Zusammenhalts solider Gewebe. Diese Störungen tragen ebenfalls zur ungeordneten und ungehemmten Tumorzellproliferation bei und führen darüber hinaus zu erhöhter Tumorinvasivität und –progression (Johnson, 1999; Lyons & Jones, 2007; Takayama et al., 2006).

Tumorgewebe ist für sein schnelles Wachstum auf ausreichende Versorgung mit Nährstoffen angewiesen. Dafür stimulieren Tumorzellen das Wachstum von Blutgefäßen, sie überexprimieren mitogene Angiogenesefaktoren wie das endotheliale VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Zusätzlich produzieren sie Wachstumsmediatoren wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), IL-6 (Interleukin-6) und IL-1 $\beta$ , die wiederum die Bildung von VEGF induzieren.

Tumorzellen sind weiterhin in der Lage sich vor dem programmierten Zelltod (= Apoptose) zu schützen. Apoptose ist unter anderem für die spezifische Eliminierung beschädigter Zellen verantwortlich. Es gibt viele Faktoren, die eine Zelle zur Apoptose leiten können, zum Beispiel wirken DNA-Schäden oder externe Faktoren wie TNF als Auslöser. Apoptotische Signalwege können auch durch NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen) ausgelöst werden. NK-Zellen können auf ihrer Oberfläche CD95-Ligand (Cluster of Differentiation) bilden, der an CD95-Rezeptoren auf der Oberfläche der zu eliminierenden Zielzellen bindet und dadurch apoptotische Signalwege aktiviert. Desweiteren gilt ein Verlust der Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder Hormone als Apoptose-auslösend. Die Überexpression antiapoptotischer Faktoren wie Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Unterdrückung der CD95-Rezeptorproduktion oder Mutationen in Apoptose regulierenden Genen sind Möglichkeiten, die sich Tumorzellen zu Nutze machen, um die Apoptose zu umgehen (de Bruin & Medema, 2008; Eberle et al., 2007; Kang & Reynolds, 2009).

Ein wichtiges Merkmal von Tumorzellen ist die potentielle Unsterblichkeit. Die Teilungsfähigkeit gesunder Zellen ist beschränkt. Bei jeder DNA-Replikation gehen Teile der Telomere, die aus repetitiven Basensequenzen bestehen, verloren und die Telomerase kann diese nach jeder Zellteilung nur unvollständig wieder herstellen. Zum Zelltod führt schließlich, nach vollständigem Verlust der Telomere, der Verlust kodierender Genregionen. Tumorzellen sind jedoch in der Lage vermehrt Telomera-

se zu bilden, wodurch eine deutlich erhöhte Anzahl Zellteilungen ermöglicht ist (Belion & Nicot, 2008; Boukamp & Mirancea, 2006; Cheung & Deng, 2008).

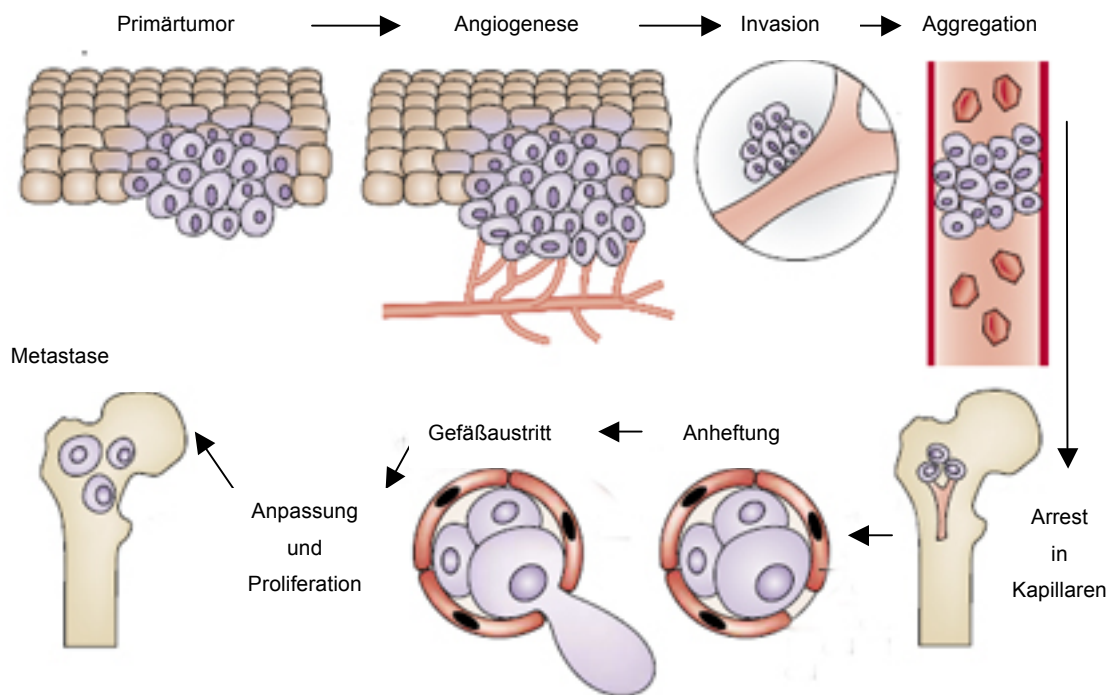
Aufgrund der genannten Eigenschaften - Induktion von Wachstumsfaktoren, Verlust der Funktion von Wachstumsinhibitoren, Verlust der Kontaktinhibition, Stimulation der Angiogenese, Resistenz gegen Apoptose und Gewinn potentieller Unsterblichkeit - werden Tumoren maligne; darüber hinaus trägt dazu die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung bei (Hanahan & Weinberg, 2000).

### **1.1.2 Metastasierung**

Die Streuung neoplastischer Zellen vom Ort des Primärtumors in ein anderes Organ und das dortige An- und Weiterwachsen nennt man Metastasierung. Von mehreren tausend gestreuten, beziehungsweise disseminierten Tumorzellen metastasieren oft nur wenige (Cottier, 1987). Der Metastasierung zu Grunde liegen das Einwachsen des Primärtumors in Blut- oder Lymphgefäße sowie die Ablösung einzelner Tumorzellen. Darauf folgen die Streuung und das Anheften der Tumorzellen an der Gefäßwand, sowie die Infiltration in neues Gewebe, wo sie sich ansiedeln und so an entfernten Stellen im Körper zu Metastasen auswachsen (Abbildung 1). Diese beeinträchtigen oft weitere Organsysteme und führen meist unweigerlich zum Tod. Die Mehrzahl der Krebspatienten stirbt nicht am Primärtumor selbst, sondern an den Folgen der Metastasenbildung (Mundy, 2002).

Für die Metastasierung müssen die Tumorzellen Kontrollmechanismen umgehen, welche normale Zellen an ihrem Platz im Gewebeverband halten. MMP (Matrix-Metalloproteinasen), wie beispielsweise Kollagenasen, dienen Zellen bei der Fortbewegung im Gewebe und sind wichtig für die Embryonalentwicklung, für Wundheilungs- und Entzündungsprozesse. Eine MMP-Überexpression hilft malignen Tumorzellen bei der Loslösung aus dem Gewebeverband. Zur Stimulation der Migration durch die extrazelluläre Matrix benötigen die Tumorzellen darüber hinaus auch autokrine und parakrine Faktoren. Viele Tumorzellen sind zum Beispiel in der Lage IL-6, AMF (Autocrin Motility Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), IGF (Insulin like Growth Factor) und FGF (Fibroblast Growth Factor) zu exprimieren. Alle diese Faktoren können die Migrationsfähigkeit steigern. Unterstützt wird der Migrations-Prozess durch die Überexpression von Angiogenesefaktoren wie VEGF, die eine strukturelle Lockerung des zu durchwandernden Endothels bewirken. Für die Invasion in andere Gewebe nutzen disseminierte Tumorzellen die gleichen molekularen Mechanismen wie etwa zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen. Beispiele hierfür sind die Expressio-

nen von Chemokinen, Proteoglykanen, Matrix-Metalloproteasen und Wachstumsfaktoren, sowie Integrinen und Selektinen.



**Abb. 1: Entstehung einer Metastase.**

Am Beispiel einer Knochenmetastase ist die Metastasierung verbildlicht. An Stelle eines Knochens kann auch jedes andere Organ betroffen sein. Die elementaren Schritte sind Ablösen vom Ursprungsgewebe, Angiogenese, Einwandern in Gefäße, Aggregation in entfernten Kapillaren, Invasion in neue Gewebe und dortige Ansiedelung und Proliferation (Abbildung modifiziert nach Mundy, 2002).

Ein in neuerer Zeit zunehmend wichtiger Faktor zur Beurteilung von Metastasierung stellt die so genannte MRD (Minimal Residual Disease) dar. Damit ist ursprünglich der Anteil an Leukämiezellen gemeint, die sich nach einer Behandlung noch im Blutsystem befinden. Er wird aber genauso auf disseminierte Tumorzellen solider Tumoren bezogen, die sich nach einer Behandlung noch im Körper des Patienten befinden. Bei zunehmend besseren Resektionsmöglichkeiten wird die Mortalitätsrate immer häufiger durch die MRD beeinflusst (Izbicki et al., 2000; Izbicki et al., 1997; Pantel, 1999; Pantel, 1996). Dieser negative Einfluss auf die Überlebensrate wurde bei einigen soliden Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom (Lindemann et al., 1992), dem Bronchialkarzinom (Cote et al., 1995), dem Magenkarzinom (Jauch et al., 1996), dem Prostatakarzinom (Weckermann et al., 1999) und dem Mammakarzinom (Braun & Pantel, 2000; Diel et al., 1996) gezeigt. Zahlreiche Daten zur prognostischen Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose unterstützten dies (Braun et al., 2000; Cote et al., 1991; Diel et al., 1996; Landys et al., 1998; Mansi et al., 1999; Pantel et al., 1997). Disseminierte Tumorzellen konnten bei 20-30 % der Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten im

klinischen Stadium  $M_0$  (= keine Anzeichen für Fernmetastasen) im Knochenmark nachgewiesen werden (Izbicki, 2000). Das Schicksal disseminierter Tumorzellen während der Latenzzeit zwischen Primärdiagnose und Rezidiv ist bisher ungeklärt. Einzelzellanalysen lassen aber vermuten, dass die Mehrzahl der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark nicht proliferiert, sondern in einer Latenzphase verharrt (Pantel and Riethmuller, 1996). Dies könnte eine Ursache für die beschränkte Wirkung einer antiproliferierenden Chemotherapie solider Tumoren sein.

## **1.2 Das Immunsystem**

### **1.2.1 Aufbau & Funktion**

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen zur Bekämpfung pathogener Stoffe oder Organismen. Es ist in der Lage eingedrungene Mikroorganismen, körperfremde Moleküle und entartete körpereigene Zellen zu zerstören. Dabei spielen verschiedene Organe, Zelltypen und Moleküle eine Rolle. Die Erkennung und Unterscheidung pathogener und nicht-pathogener Strukturen ist eine wichtige Voraussetzung für ein wirksames Immunsystem.

Das Immunsystem verfügt über zwei Komponenten, die im Zusammenspiel effektiv gegen Erreger und/oder Tumorzellen arbeiten. Die Unterteilung erfolgt in eine angeborene (unspezifische) und eine adaptive (spezifische) Abwehr. Bei der unspezifischen Immunabwehr kommen neben Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DC) und NK-Zellen auch nicht-zelluläre lösliche Bestandteile zum Einsatz. Diese löslichen Bestandteile sind zum Beispiel die verschiedenen Plasmaproteine des Komplementsystems oder das in vielen Körperflüssigkeiten vorliegende Bakterizid Muramidase (Human-Lysozym). Die zellulären Bestandteile erkennen pathogene Strukturen, die aus genetisch festgelegten konservierten Struktur molekülen bestehen. Diese konservierten Moleküle sind essentiell für die Pathogenität und das Überleben eingedrungener Mikroorganismen und kommen auf körpereigenen Zellen nicht vor (Medzhinov & Janeway, 2000). Nach einem Kontakt mit diesen Strukturen können die Immunzellen die pathogenen Zellen direkt abtöten oder Mediatoren freisetzen, um die adaptive Immunabwehr zu aktivieren. Die angeborene Immunabwehr ist also für die frühe Detektion und unspezifische Bekämpfung von Pathogenen verantwortlich.

Die spezifische Immunabwehr entwickelt sich im Laufe des Lebens und wird deshalb auch adaptiv bezeichnet. Sie basiert auf der Bildung antigenspezifischer

Oberflächenrezeptoren auf B- und T-Lymphozyten durch somatische Rekombination. Das Immunsystem kann sich dadurch dem breiten Spektrum pathogener Strukturen anpassen. Neben der Antigenpezifität und der Rezeptordiversität sind die Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches vor einer erneuten Infektion schützen soll, weitere wichtige Eigenschaften des Immunsystems.

### 1.2.2 Die Zellen des Immunsystems

Granulozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems, sie dienen hauptsächlich zur Auffindung pathogener Zellen und deren Eliminierung durch die Abgabe von Enzymen. Neutrophile Granulozyten werden durch Zytokine, die vom Ort einer Infektion ausgesondert werden, aktiviert und dringen aus der Blutbahn ins Gewebe ein. Vor Ort sind sie zum Beispiel in der Lage pathogene Stoffe oder Organismen zu phagozytieren. Auch eosinophile Granulozyten sind zur Chemotaxis befähigt. Sie besitzen vor allem basische Proteine, zum Beispiel zur Bekämpfung von Parasiten.

Makrophagen können körperfremde Proteine oder Glycoproteine erkennen, wie sie beispielsweise auf der Oberfläche von Viren und Bakterien vorkommen. Mittels Phagozytose werden die Mikroorganismen aufgenommen und intrazellulär zerkleinert. Antigene der entstehenden Spaltprodukte werden anschließend an der Zelloberfläche der Makrophagen durch ein MHC-II-Molekül (Major-Histocompatibility-Complex-II) präsentiert. Es handelt sich jetzt um so genannte APC (Antigen Presenting Cells). Die APC wandern in die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten und Milz) ein, wo durch die Antigenpräsentation die Aktivierung von T- und B-Zellen bewirkt wird. Gleichzeitig rekrutieren die aktivierten Makrophagen weitere Immunzellen aus dem Blut durch die Abgabe von Chemokinen. Freigesetzte Zytokine sorgen darüber hinaus für eine lokale Entzündungsreaktion.

Außer dieser Aktivierung der spezifischen Immunabwehr dienen Makrophagen zur Beseitigung defekter körpereigener Zellen, zum Beispiel nach Apoptose oder Alterung. Makrophagen können außerdem eine wichtige Rolle bei Tumoren spielen. In viele Tumoren dringen Makrophagen ein, die dann als TAM (Tumor-associated Macrophages) bezeichnet werden. Diese können sowohl pro-, als auch anti-tumorale Wirkungen haben. Durch Abgabe von Zytokinen können sie zum Beispiel ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) auslösen, andererseits jedoch auch durch die Abgabe von Angiogenesefaktoren und MMP bei der Tumorprogression (Invasion und Metastasierung) eine wichtige Rolle spielen (Bingle et al. 2002; Pollard, 2004).

Dendritische Zellen (DC) spielen eine besondere Rolle bei der Interaktion zwischen den Komponenten der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr; sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen die Eigenschaft, Effektorsysteme der adaptiven Immunität zu aktivieren. Außerdem beeinflussen sie die Qualität der T-Zell-Antwort, indem sie in naiven T-Zellen unterschiedliche Effektorfunktionen induzieren und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) bewirken können (Moser, 2003). Im unreifen Stadium nehmen DC Antigene durch Phagozytose aktiv auf. Mit der Antigeninternalisierung verlieren sie ihre Fähigkeit zu phagozytieren und treten in einen Reifungs- und Migrationprozess ein. Die DC wandern während der Reifung in lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten ein, dort werden die prozessierten antigenen Peptide an MHC-II Moleküle gekoppelt und T-Lymphozyten präsentiert (Banchereau & Steinman, 1998). Darüber hinaus exprimieren reife DC Signale zur Kostimulation naiver T-Zellen und Adhäsionsmoleküle, über die sie mit T-Lymphozyten interagieren.

NK-Zellen sind Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr und müssen nicht aktiviert werden. Ihre Aktivität kann jedoch durch Zytokine, beispielsweise IL-12 oder IFN- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ ), die von Makrophagen sezerniert werden, erhöht werden. In diesem Fall können sie große Mengen IFN- $\gamma$  produzieren, welches für die Eindämmung unterschiedlicher Infektionen wichtig ist.

NK-Zellen bekämpfen pathogene Zellen mittels zytotoxischer Granula, welche an der Zelloberfläche der Pathogene freigesetzt werden und Apoptose induzieren. NK-Zellen erkennen ihre Zielzellen an der fehlenden oder geringen Ausprägung von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche, um diese dann selektiv zu lysieren (Long, 1999; Moretta et al., 1996). NK-Zellen können darüber hinaus von DC aktiviert werden und direkt virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen abtöten (Fernandez et al., 1999). Außerdem können pathogene Zellen durch die humorale Immunantwort mit Antikörpern markiert werden. Diese markierten Zellen werden von NK-Zellen erkannt, gebunden und durch Ausschütten der NK-Granula zerstört, der Prozess wird als ADCC bezeichnet.

Die Reaktivität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen wird durch hemmende und stimulierende Rezeptoren gesteuert (Biassoni et al., 2001; Lanier, 2000, 2001). Ein Beispiel für hemmende Rezeptoren sind KIR (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors). KIR binden an MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche fremder Zellen



und hemmen die zytotoxische Funktion der NK-Zellen. Ein gut charakterisierter stimulierender Rezeptor auf NK-Zellen ist CD314, dieser kommt auch auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen und  $CD8^+$ -T-Zellen vor (Jamieson et al., 2002). Die MHC-ähnlichen Proteine MIC-A und MIC-B (Human MHC-Class-I Chain-Related A & B) sind im Menschen als CD314-Liganden identifiziert worden (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001), die in adulten Zellen normalerweise nicht exprimiert werden. In Mäusen konnte beobachtet werden, dass Tumorzellen, die häufig CD314-Liganden überexprimieren (Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001), durch die hohe Ausprägung der Liganden eine NK-Zell-abhängige Zellyse erfuhren (Cerwenka et al., 2000; Diefenbach et al., 2000). Darüber hinaus wurde eine  $CD8^+$ -T-Zellaktivierung durch die Interaktion zwischen dem Rezeptor CD314 und dessen Liganden gezeigt (Diefenbach et al., 2001).

B-Zellen gehören zum erworbenen Immunsystem und dienen der Bildung von Antikörpern. B-Lymphozyten können, nach einer Antigenbindung, durch Lymphokine aktiviert werden, die von aktivierten T-Helferzellen ausgeschüttet werden. Die derart aktivierten B-Zellen können sich daraufhin zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen entwickeln. Die Antikörper-Produktion von neutralisierenden Antikörpern (IgM, IgE, IgA (Immunglobuline M, E & A)) der B-Zellen wird als humorale Immunantwort bezeichnet. B-Zellen sind im Gegensatz zu T-Zellen auch in der Lage, freie Antigene zu erkennen und sie einer Immunreaktion zuzuführen. Bei der Überwachung und Bekämpfung maligne entarteter Zellen spielen B-Lymphozyten und ihre Antikörperproduktion eine untergeordnete Rolle.

T-Zellen gehören zur erworbenen Immunabwehr und bewirken die spezifische zelluläre Immunantwort. T-Zellen können mit ihrem TCR (T-Cell Receptor) nur dann Antigene erkennen, wenn sie über passende MHC-Moleküle an der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. MHC-I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während MHC-II-Moleküle fast ausschließlich auf APC (B-Zellen, Makrophagen, DC etc.) und aktivierten T-Zellen vertreten sind.

MHC-I-Moleküle präsentieren prozessierte zytosolische Peptide wie zum Beispiel virale oder tumorassoziierte Zellproteine gegenüber  $CD8^+$ -T-Zellen. Diese auch CTL genannten Zellen (Cytotoxic T-Lymphocyte) lysieren dann die entsprechende Zelle bei Präsentation eines fremden Antigens (Norment et al., 1988). Eine effektive Immunantwort gegen Tumoren basiert im Wesentlichen auf CTL (Song et al., 2000; Winter et al., 2003). Die Differenzierung naiver  $CD8^+$ -T-Zellen zu CTL erfolgt erst nach indirekter Stimulation durch  $CD4^+$ -T-Helferzellen (Bennett et al., 1998).

Auf MHC-II-Molekülen werden entweder von APC aufgenommene extrazelluläre Peptide oder Proteinbestandteile sich intrazellulär vermehrender Organismen präsentiert. Dort werden sie von  $CD4^+$ -T-Helferzellen erkannt, die wichtige immunregulatorische Funktionen besitzen. Diese T-Helferzellen werden entsprechend der von ihnen sezernierten Zytokine meistens in zwei Untergruppen -  $T_H1$  und  $T_H2$ -Zellen - aufgeteilt.

$T_H1$ -Zellen sezernieren hauptsächlich  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , IL-2 und IL-12 und induzieren die zellvermittelte Immunantwort durch Makrophagenaktivierung, die Proliferation von CTL und die Produktion opsonierender Antikörper durch B-Zellen.  $T_H1$ -Zellen stimulieren über IL-2 und  $IFN-\gamma$  die autologe Proliferation und Differenzierung in bewaffnete T-Killerzellen (Abbas et al., 1996). Es konnte in Versuchen mit Mäusen gezeigt werden, dass  $CD4^+$ -Zellen, die zu  $T_H1$ -Zellen differenzieren, wesentlich zur Tumorprotektion beitragen und sogar unabhängig von  $CD8^+$ -Zellen eine Antitumorantwort induzieren können (Egeter et al., 2000).  $T_H2$ -Zellen aktivieren durch Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 die Proliferation von B-Zellen und eosinophilen Granulozyten und induzieren so die humorale Immunantwort.

Eine weitere wichtige T-Zell-Subpopulation bilden die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Unter diesem Begriff werden verschiedene T-Zelltypen zusammengefasst, die regulatorisch auf Vorgänge des Immunsystems einwirken. Es werden  $CD4^+CD25^+$ ,  $CD4^+CD25^-$ , Tr1-, Tr2-, NK-,  $CD8^+$ - und  $CD8^+CD28^-T_{reg}$  unterschieden (Beissert et al., 2006), deren Hauptaufgabe darin besteht, Autoimmunreaktionen zu supprimieren. So führte die Eliminierung von  $CD4^+CD25^+T_{reg}$  in Mäusen zur Entwicklung autoimmunologischer Organreaktionen (Sakaguchi et al., 1995). Diese Zellen machen etwa 10% aller  $CD4^+$ -T-Zellen aus und sie unterscheiden sich von anderen T-Zellen vor allem durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Forkhead Box Protein 3), der für die Umwandlung in  $T_{reg}$  essentiell ist (Fontenot et al., 2003). Pathophysiologisch spielen sie vermutlich eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Tumorerkrankungen. Eine Depletion dieser Zellen im Tiermodell führte zu langsamerem Tumorstadium (Onizuka et al., 1999). Die genaue Wirkweise auf Tumoren ist jedoch bislang noch unverstanden.

Das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunabwehr für eine Tumor-bekämpfende (CTL)-Antwort wird folgendermaßen beschrieben: Tumorzellen mit geringer MHC-I Expression bewirken eine schnelle NK-Zellaktivierung. Diese ak-

tiven NK-Zellen produzieren IFN- $\gamma$  und stimulieren so DC zu Synthese von IL-12, diese DC-Aktivierung führt dann zur Entstehung von CTL und einem immunologischen Gedächtnis (Mocikat et al., 2003).

### 1.2.3 „Immun-Escape“ von Tumorzellen

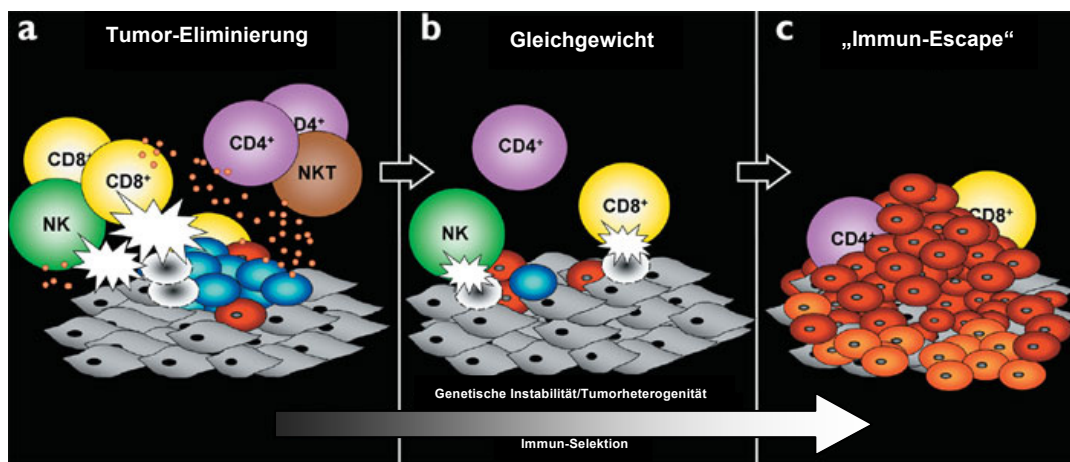
Die durch das Immunsystem bedingte Abstoßung von Transplantaten führte zu der Annahme, dass sich Tumorzell-Aggregate ausbilden können, die durch das Immunsystem erkannt und ohne klinische Symptome vernichtet werden (Burnet, 1957). Es wurde sogar vermutet, dass die Tumorerkennung die primäre Funktion der zellulären Immunabwehr sei (Thomas, 1959). Diese Gedanken führten zur Ausbildung der Theorie der „Immunosurveillance“ (dt. Immunüberwachung): Genetische Variationen in Zellen können zur Ausbildung maligner Zellen führen. Es besteht die biologische Notwendigkeit, diese Zellen zu erkennen und zu bekämpfen und diese Aufgabe wird von der Immunabwehr übernommen (Burnet, 1970).

Der Nachweis tumorspezifischer Antigene (Klein et al., 1996) lieferte eine wichtige Basis zur Bekräftigung der Immunüberwachungs-Theorie. Nachdem zunächst die technischen Möglichkeiten zum vollständigen Beweis der Theorie fehlten, lieferten in der Mitte der 1990er Jahre mehrere Untersuchungen Ergebnisse, die dazu führten, dass die Theorie der Immunüberwachung nun als bewiesen gilt (Schenkel et al., 1997):

Mäusen, denen IFN- $\gamma$  oder IFN- $\gamma$ -Rezeptoren fehlten, zeigten nach Gabe des chemischen Karzinogens MCA (Methylcholanthren) eine 10 bis 20fach höhere Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines Tumors (Kaplan et al., 1998). Weitere Untersuchungen bestätigten die Wichtigkeit von IFN- $\gamma$  zur Tumorbekämpfung (Smyth et al., 2001). Das Fehlen des Apoptose-Proteins Perforin führte bei Mäusen zur Entwicklung von deutlich mehr Tumoren nach MCA-Gabe als bei gleich behandelten Wildtyp-Mäusen. Dieser Effekt war noch stärker, wenn p53 nur schwach exprimiert wurde (Smyth et al., 2000). Einen ähnlichen Effekt bewirkte die Gabe dieses Karzinogens bei Mäusen, denen NKT-, T- und B-Zellen fehlten (Shankaran et al., 2001). Neben diesen aus Tierversuchen erlangten Resultaten konnte *in vitro* gezeigt werden, dass isolierte CTL aus Patienten mit Malignomen autologe und MHC-identische Tumorzellen eliminierten (Mukherji et al., 1990). Die statistische Auswertungen von Patientendaten immunsupprimierter oder –defizienter Personen lieferte ein Vielzahl von Ergebnissen, welche die Theorie der Immunüberwachung bestätigten. Dabei überwo-

gen bei diesen Patienten virusinduzierte Malignome (Birkeland et al., 1995; Penn, 2000; Weiss, 1999). Darüber hinaus wurde bei vielen Studien eine positive Korrelation zwischen TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes), in der Regel CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, in soliden Tumoren und dem Überleben der Patienten beobachtet (Naito et al., 1998, Uppaluri et al., 2008).

Das Immunsystem spielt also eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung maligner Erkrankungen. Trotz der Immunüberwachung können jedoch solide Tumoren entstehen.



**Abb. 2: Die drei Phasen des „Immun-Escape“.**

Die drei Phasen des „Immun-Escape“ sind schematisch dargestellt. Nach der ersten „Eliminierungs-Phase“, in der angeborene und erworbene Immunabwehr neoplastische maligne Zellen erkennen und bekämpfen kommt eine zweite Phase, in der sich einzelne Tumorzellen derartig verändern, dass sie vom Immunsystem nicht mehr erkannt werden. Aus einzelnen dieser Zellen entstehen in der dritten Phase Zellen, die einen neuen Tumor ausbilden. Dieser kann vom Immunsystem nicht mehr hinreichend bekämpft werden. (Abbildung modifiziert nach Dunn et al., 2002)

Ein Modell, welches die Entwicklung resistenter Tumoren zu erklären versucht, beschreibt drei Phasen (Dunn et al., 2002):

1. In der „Eliminierungs-Phase“ attackiert das Immunsystem den entstehenden Tumor (Abbildung 2a). Die Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere NK-Zellen, Makrophagen und DC werden in das Gewebe dirigiert (Smyth et al., 2001). NK- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen und zerstören neoplastische Zellen (Street et al., 2004). Außerdem produzieren sie IFN- $\gamma$ , das die Proliferation maligner Zellen hemmen (Bromberg et al., 1996), in den Tumorzellen Apoptose auslösen (Kumar et al., 1997) und APC stimulieren kann. Weitere Zytokine, die die Neoangiogenese im Tumorgewebe blockieren, werden produziert (Coughlin et al., 1998; Qin & Blankenstein, 2000). APC lösen über die Produktion von IL-12 eine antigenspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort aus und verbinden angeborene und erworbene Immunantwort (Mocikat et al., 2003). Tumorspezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe und zerstören verbliebene Tumorzellen (Shankaran et al., 2001).

2. In der nächsten Phase entgehen einige genetisch instabile und schnell mutierende Tumorzellen dem Immunsystem. Es werden gering immunogene Tumorzellen selektioniert, die vor einem Angriff durch das Immunsystem geschützt sind. Aus diesem Grund wird von einer „Gleichgewichtsphase“ gesprochen (Abbildung 2b).

Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, dem Immunsystem zu entkommen. Einige Zellen können ihre MHC-Moleküle herunter regulieren oder die Expression zur Aktivierung naiver T-Zellen notwendiger Kofaktoren vermindern. Viele Tumoren produzieren darüber hinaus immunsuppressive Zytokine, um Entzündungsreaktionen zu hemmen. Zum Beispiel unterdrückt TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) die zellvermittelte Immunantwort, und IL-10 oder VEGF blockieren die Aktivierung und Differenzierung von DC (Gabrilovich et al., 1996). Weiterhin können Tumorzellen die Produktion proinflammatorischer Zytokine behindern und die Expression von Faktoren induzieren, welche die DC-Reifung stören (Wang et al., 2004); außerdem können sich maligne Zellen der Erkennung durch NK- und T-Zellen entziehen. Dies geschieht zum Beispiel durch Freisetzung von löslichem MIC-A, wodurch eine verringerte Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen bewirkt wird (Groh et al., 2002). Auf Grund ihrer genetischen Instabilität können Tumorzellen auch ihre Antigene verlieren, so dass sie von den spezifischen Immunzellen nicht mehr erkannt werden. Ferner können maligne Zellen tumorspezifische T-Zellen in einen anergischen Zustand zurückführen (Staveley-O'Carroll et al., 1998) oder in Lymphozyten Apoptose auslösen, indem sie Apoptose-induzierende Oberflächenmoleküle exprimieren (Walker et al., 1998).

3. In der letzten Phase expandieren die überlebenden Tumorzellen unkontrolliert, da das Immunsystem nicht mehr in der Lage ist, eine effektive, endogene Immunantwort gegen den Krebs aufrecht zu erhalten. Der Tumor hat einen „Immun-Escape“ vollzogen (Abbildung 2c).

### **1.3 Immuntherapien**

Die neueren Nachweise der wichtigen Rolle des Immunsystems bei der Erkennung und Bekämpfung maligner Tumorzellen führten in den letzten Jahren zur Entwicklung einer Reihe von Therapien mit immunologischem Hintergrund. Das Ziel von Immuntherapien gegen Tumorerkrankungen ist es, Tumorzellen für das Immunsystem als fremd erkennbar zu machen oder bereits vorhandene Immunreaktionen zu unterstützen und zu verstärken. Viele dieser Immuntherapien konnten in Tiermo-

dellen und beim Menschen objektive Antitumorreaktionen erzielen (Dudley et al., 2002; Fisher et al., 2000; Heiss et al., 2005; Kaufmann et al., 2004; Rosenberg et al., 1998; Ruf & Lindhofer 2001).

### 1.3.1 Tumorantigene

Das Erkennen von Tumorzellen durch Zellen der Immunabwehr ist die Voraussetzung für eine immunologische Abwehr. Dies geschieht durch so genannte Tumorantigene. Auch einige Immuntherapien benötigen Tumorantigene als Erkennungsmerkmale der Tumorzellen. Tumorantigene können in folgende Gruppen aufgeteilt werden (Pardoll, 1998):

1. Tumorspezifische Antigene, die ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden: diese entstehen häufig durch Genmutationen. Eine Mutation im Gen der CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4) bei Melanomzellen bewirkt zum Beispiel die Bildung eines, für den Tumorsuppressor p16INK4a insensitiven, Tumorantigens und dadurch Verlust der Kontaktinhibition (Wölfel et al., 1995).

2. Embryonale Antigene, die außer in männlichen Keimzellen und der Plazenta in adulten Zellen nicht exprimiert werden. Ein typisches Beispiel sind die Gene der MAGE-Familie (Melanoma Antigen), die in verschiedenen Tumoren exprimiert werden (Van Pel et al., 1995). Ein weiteres Beispiel ist EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), welches auf der Oberfläche der meisten Karzinome vorliegt (Litvinov et al., 1996). EpCAM kann aufgrund seiner Lage (basolateral, durch tight junctiones isoliert) in den meisten gesunden Epithelzellen nicht gebunden werden, tritt jedoch in Plattenepithelkarzinomen auf der gesamten Zelloberfläche auf (Balzar et al., 1999).

3. Gewebsspezifische Antigene, die im Ursprungsgewebe des Tumors exprimiert werden. Diese Tumorzellen können durch ungewöhnlich hohe Vorkommen von MHC-Antigen-Komplexen durch CTL erkannt werden, wie dies zum Beispiel bei Tyrosinase-Genmutationen in Melanomen gezeigt wurde (Topalian et al., 1994).

4. Antigene, die auf Grund von Onkogen-Funktionen überexprimiert vorliegen. Dazu gehört der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), welcher vor allem in Mamma- und Ovarialkarzinomen relevant ist (Slamon et al., 1989).

5. Antigene, die Produkte von Tumorsuppressor-Genmutationen sind. Viele p53-Mutationen kodieren beispielsweise ein Protein, welches signifikant stärker in Tumoren als in normalem Gewebe exprimiert wird. In Mausmodellen konnte der

Transfer von p53-spezifischen CTL vor p53-überexprimierenden Tumoren schützen (Vierboom et al., 1997).

6. Virale Proteine, die von Virus-assoziierten Tumoren exprimiert werden. Zervikalkarzinome konnten beispielsweise mit HPV-Infektionen (Humane Papillomviren) in unmittelbare Verbindung gebracht werden (Bosch et al., 2002).

### 1.3.2 Therapieansätze

Ein Therapieansatz gegen maligne Erkrankungen versucht, NK-Zellen mit hohen Dosen IL-2 *in vivo* zu expandieren und zu stimulieren. Nach einer solchen IL-2-Therapie wurden bei einigen Patienten komplette Remissionen erreicht (Rosenberg et al., 1993). Nachteilig wirkten sich jedoch die starken unerwünschten Nebenwirkungen, vor allem das von NK-Zellen produzierte, toxisch wirkende TNF, aus.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz sind humorale Therapien. Wie zuvor beschrieben produzieren aktivierte B-Zellen Antikörper, die an Oberflächenproteine auf Tumorzellen binden können und NK-Zellen oder Makrophagen binden an diese antikörpermarkierten Zellen, um ADCC hervorzurufen. Durch Gabe künstlicher Antikörper sollen - bei humoralen Therapien - die Tumorzell-Markierungen verstärkt werden. Ein Beispiel stellt die Therapie maligner B-Zell-Lymphome mit Rituximab, einem Antikörper gegen CD20, dar. Kombiniert mit einer Chemotherapie verbesserte Rituximab die Remissionsrate bei Patienten mit B-CLL (chronische B-Lymphozyten-Leukämie) durch einen ADCC-abhängigen Mechanismus (Clynes et al., 2000). Ein weiteres Beispiel für den klinischen Einsatz von Antikörpern gegen Krebserkrankungen ist die Therapie ausgewählter Mammakarzinome mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Tyrosinkinase-Rezeptor HER2/neu (Pegram et al., 1999).

Die Immunogenität von Tumorzellen oder Tumorproteinen ist häufig zu schwach, um eine adaptive Immunantwort zu induzieren. Einige Verfahren konzentrieren sich deshalb darauf, die Immunogenität der Tumoren zu erhöhen, indem die Signale für die T-Zell-Aktivierung verstärkt werden. HSP (Heat Shock Proteins) binden an Rezeptoren auf APC, so dass ein Tumor-spezifisches Begleitpeptid in den Antigenprozessierungsweg eingehen kann und durch MHC-I-Moleküle präsentiert wird. So wurde beispielsweise durch die Vakzinierung mit einem Antigen-HSP70-Fusionsprotein eine potente antigenspezifische CD8<sup>+</sup>T-Zell-Antwort induziert (Castellino et al., 2000).

Ein Ansatz zur Verbesserung der CTL-Aktivierung, beruht auf der Blockierung negativer Faktoren, die die Induktion einer T-Zell-Antwort hemmen. CTLA-4 (Cytoto-

xic I-Lymphocyte Antigen-4) greift zum Beispiel negativ regulierend in die T-Zell-Aktivierung ein. Die kombinierte Gabe von GM-CSF-transfizierten (Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor) Tumorzellen mit einem blockierenden Antikörper gegen CTLA-4 führte zur Abstoßung etablierter Tumoren (Hurwitz et al., 1998; van Elsas et al., 1999).

Ein weiterer Ansatz zielt darauf, die APC-Funktionen zu verstärken oder zu modulieren. DC sind die wirksamsten antigenpräsentierenden Zellen, da sie die Fähigkeit besitzen, antigenspezifische CTL zu aktivieren (Banchereau & Steinman, 1998). Dafür werden zum Beispiel DC isoliert und *ex vivo* mit Tumorantigenen (Paglia et al., 1996) oder Tumorzellanteilen (Fields et al., 1998) beladen, um nach Reinfusion tumorspezifische T-Effektorzellen zu stimulieren.

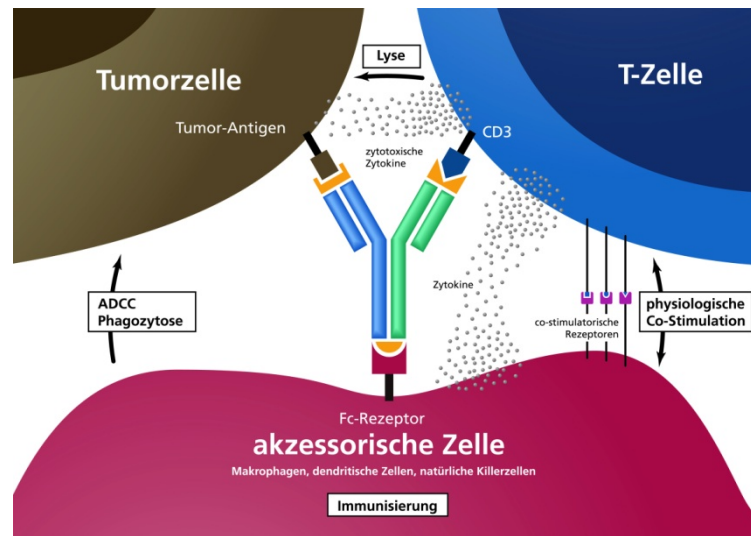
### **1.3.3 Trifunktionale bispezifische Antikörper**

Die Wirksamkeit der Immuntherapien kann durch den Einsatz bispezifischer Antikörper verbessert werden. Dies sind Antikörper-Präparate, die zwei verschiedene Antigen-Bindungsstellen, jedoch keinen intakten Fc-Teil besitzen (Kipriyanov & Le Gall, 2004). In der Regel ist eine Bindungsstelle spezifisch für tumorspezifische Oberflächenmoleküle und die zweite Bindungsstelle für Antigene auf Immunzellen. Dadurch werden Immun- und Tumorzelle in einen engen räumlichen Kontakt gebracht, der eine wirksame Tumorbekämpfung ermöglichen soll. So können zum Beispiel T-Zellen aktiviert und eine T-Zell-vermittelte Tumorzellzerstörung ausgelöst werden (Perez et al., 1985).

Eine Vielzahl bispezifischer Antikörper-Präparate befindet sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Entwicklung (Fischer & Leger, 2007) oder ist im Falle von catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) unter dem Handelsnamen Removab<sup>®</sup> bereits zugelassen. Dazu gehören auch Antikörper, die über die beiden Antigen-Bindungsstellen hinaus auch intakte Fc-Teile besitzen. Sie können mit einer Bindungsstelle an T-Zellen binden, mit der anderen an Tumorzellen und mit dem Fc-Teil an Fc $\gamma$ RI-, Fc $\gamma$ RIIa- und Fc $\gamma$ RIII-positive akzessorische Zellen (Sebastian et al., 2009; Zeidler et al., 2000). Zu den akzessorischen Zellen gehören DC, Makrophagen und NK-Zellen, die wiederum alle zu APC werden können. Auf Grund der dritten Bindungskapazität wird von trifunktionalen Antikörpern gesprochen. Durch das Zusam-



Beispiel der verschiedenen Immunzelltypen wird eine effektive Tumorzellzerstörung erreicht, die keine Präaktivierung oder zusätzliche Co-Stimulation voraussetzt.



**Abb. 3: Das Prinzip des Tri-Zell-Komplexes.**

Die trifunktionalen Antikörper sind in der Lage, T-Zellen und akzessorische Zellen an Tumorzellen zu dirigieren und dort zu aktivieren. Die nachfolgende wechselseitige Co-Stimulation der Immunzellen wird durch Co-Rezeptoren und Zytokine vermittelt. Daraufhin schütten T-Zellen zytotoxische Zytokine aus, akzessorische Zellen lösen ADCC aus oder phagozytieren die Tumorzellen. (Quelle: [www.fresenius.de](http://www.fresenius.de))

Die Wirkung der trifunktionalen bispezifischen Antikörper wird im Prinzip des Tri-Zell-Komplexes beschrieben (Kiewe et al., 2006; Abbildung 3): Die gleichzeitige Bindung an T-Zellen und Fc $\gamma$ RI-, Fc $\gamma$ RIIa- und Fc $\gamma$ RIII-positive akzessorische Zellen bewirkt eine nachfolgende Co-Stimulation der Immunzellen durch Co-Rezeptoren wie CD40/CD40Ligand und frei gesetzte Zytokine wie IL-2. Dies bewirkt die T-Zell-Proliferation und –Differenzierung. Anschließend schütten diese T-Zellen zytotoxische Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  aus oder lysieren Tumorzellen durch die Abgabe von Perforin und/oder GranzymB. Zusätzlich können die akzessorischen Zellen ADCC auslösen oder die Tumorzellen phagozytieren.

Im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie könnten mit trifunktionalen bispezifischen Antikörpern Tumorzellen eliminiert werden, die sich in der G<sub>0</sub>-Ruhephase befinden und somit einen entscheidenden Beitrag zur Behandlung von MRD leisten. Therapiestrategien, die auch gegen nicht-proliferierende Tumorzellen wirksam sind, scheinen insbesondere im adjuvanten Therapieansatz vielversprechend. Das Einsatzgebiet der Antikörper liegt also zunächst bei Indikationen in denen Tumorzellen nach Operation des Primärtumors als minimale residuelle Tumorzellen oder als kleine Tumorzellkonglomerate (maligner Aszites, maligner Pleuraerguss) vorliegen. Bei solchen Krankheitsbildern konnten schon erfolgreich klinische Studien durchgeführt werden (Burges et al., 2007). Darüber hinaus laufen klinische

Studien mit Ovarialkarzinomen, Magenkarzinomen, Mammakarzinomen und B-Zell-Tumoren ([www.fresenius.de](http://www.fresenius.de)). Im April 2009 erfolgte die Zulassung von catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) unter dem Handelsnamen Removab<sup>®</sup> für die Indikation maligner Aszites durch die europäische Oberbehörde EMA (European Medicines Agency).

### 1.4 3D-Zellkultur

Bevor ein neues Arzneimittel von den Arzneimittelbehörden zur Vermarktung zugelassen wird, müssen die Arzneimittelkandidaten in vorgeschriebenen präklinischen und klinischen Studien auf ihre Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit getestet werden. Die präklinischen Studien unterteilen sich in Wirkstoffsuche und anschließende Prüfung in Zellkultur- und Tiermodellen.

Momentan erreichen nur 8 % aller Arzneimittelkandidaten klinische Phase I-Studien (US Department of Human and Health Services, 2004). Von präklinischen Zellkultur-Versuchen, die bessere zellspezifische Ergebnisse liefern als die momentanen Ansätze, wird eine Erhöhung dieser Rate erwartet (Butcher et al., 2004). Die möglichst originalgetreue Rekonstitution des Zielgewebes ist dafür unabdingbar (Bhadriraju & Chen, 2002; Kunz-Schughart et al., 2004).

Zur präklinischen *in vitro*-Testung werden in der Regel Monolayer-Kulturen oder Einzelzellsuspensionen eingesetzt. Diese Methoden haben den Nachteil nur limitiert die *in vivo* Situation widerzuspiegeln und führen oft zu falschen Voraussagen bezüglich der klinischen Wirksamkeit (Friedrich et al., 2007). So verlieren Monolayer-Zellen oft ihre gewebsspezifischen Eigenschaften. Bei der Kultur von Hepatozyten konnte zum Beispiel beobachtet werden, dass metabolische Enzyme, die für Toxizitäts-Assays in der pharmakologischen Testung benötigt werden, schon nach kurzer Zeit nicht mehr synthetisiert werden (Gomez-Lechon et al., 1998). Dies konnte durch Einsatz der Zellen in verschiedene 3D-Matrizes zumindest über einen längeren Zeitraum verhindert werden (Berthiaume et al., 1996; Powers et al., 2002; Semino et al., 2003). Die extrazelluläre Matrix beeinflusst darüber hinaus die Chromatinstruktur und damit die Genexpression. Es konnte bewiesen werden, dass Zellen in 3D-Kultur andere Genexpressionsmuster besaßen als in 2D-Kultur (Bissell et al., 1982), und Gene, die in 3D-Kulturen von Melanomzellen hochreguliert waren, stimmten mit den hochregulierten Genen der soliden Melanome überein (Ghosh et al., 2005).

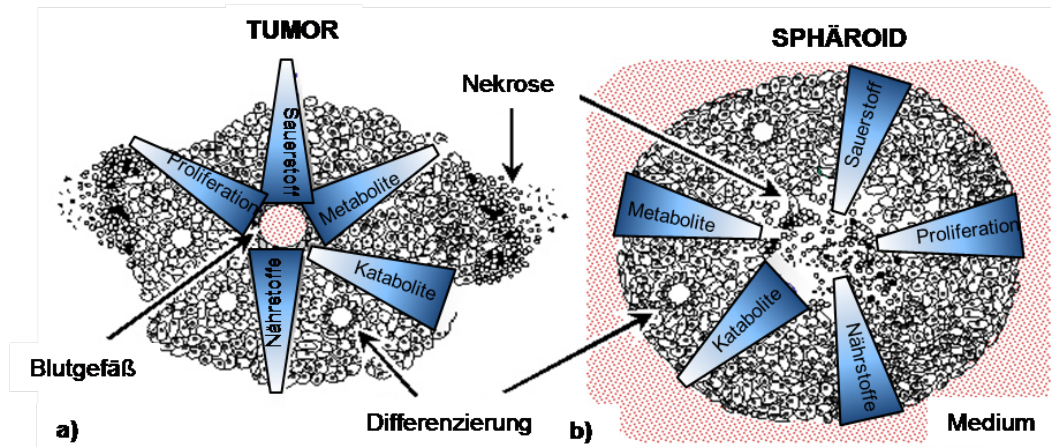
Unterschiedliche Methoden führen zu 3D-Zellsystemen und werden immer häufiger in präklinischen Untersuchungen eingesetzt. So wurden Multilayer-Zellen, welche auf Membranen wuchsen, für Untersuchungen zu Wirkstoff-Transport und Aufnahme, sowie Therapieresistenz und Zellinvasion verwendet (Hicks et al., 1997; Padron et al., 2000). Außerdem zeigten sich in künstliche Matrix eingewachsene Zellen und Zellaggregate nützlich bei der Untersuchung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Kleinman et al., 2003), ebenso wie bei Untersuchungen zu Proliferation, Migration, Invasion und Apoptose (Bissel et al., 2002; Lee et al., 2007). Bei MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney) konnte in dreidimensionalen Zellkulturen, eingebettet in Kollagenmatrix oder Matrigel, sogar eine Differenzierung beobachtet werden, die zur Entwicklung rudimentärer Nieren-Suborgane führte (O'Brien et al., 2002; Mostov et al., 2003). Diese Differenzierung konnte durch hormonelle Stimulation mit HGF partiell modifiziert werden, so dass sich tubuläre Strukturen ausbildeten (Montesano et al., 1991; Pollack et al., 2004).

Das klassische 3D-Zellkultur-Modell in der onkologischen Forschung sind MCTS (Multicellular Tumor Spheroids) - oder Tumorsphäroide - (Friedrich et al., 2007; Lin & Chang, 2008). Sie wurden zunächst für radiobiologische Versuche eingesetzt (Sutherland et al., 1970).

Tumorsphäroide vieler Zellarten können leicht mit der „Hanging-Drop“ Methode (Kelm et al., 2003; Timmins et al., 2005), der „Liquid-Overlay“ Technik (Carlsson & Yuhas, 1984) oder „Rotating-Wall“-Gefäßen (Castaneda et al., 2000) hergestellt werden. Darüber hinaus werden Spinner-Flaschen eingesetzt. Diese bilden einen attraktiven und robusten Ansatz, eine große Menge ähnlich großer Sphäroide zu erhalten, die unter optimierter und gut kontrollierbarer Nährstoffzufuhr kultiviert werden können (Friedrich et al., 2007). Sphäroid-Kulturen bieten die Möglichkeit unterschiedlicher Co-Kulturen. Wie zum Beispiel die kombinierte Kultur von MCTS mit Einzellsuspensionen (Gottfried et al., 2006).

Tumorsphäroide sind das System der Wahl für Therapie-orientierte biochemische Studien (Mueller-Klieser, 1997; Sutherland, 1988; Sutherland et al., 1971) und sie sind gut für Untersuchungen mit hohen Durchsatzraten verwendbar (Ivascu et al., 2006; Zhang et al., 2005). Sie könnten also leicht in die schon bestehenden Routineabläufe der pharmakologischen Testung eingefügt werden (Kunz-Schughart et al., 2004; Mueller-Klieser, 2000).

Die Zellen innerhalb eines Sphäroids bilden mehrere Zonen aus (Abbildung 4). Die äußersten, dem umgebenden Medium nahe liegenden Zellen proliferieren stark und haben die Fähigkeit zur Differenzierung, sie bilden die „proliferierende Zone“. Weiter innen liegende Zellen bilden die so genannte „ruhende Zone“, sie proliferieren nicht. Proliferierende und ruhende Zone bilden die „lebende Randschicht“. Einige Zellen im Inneren der ruhenden Zone werden apoptotisch wodurch im innersten des Sphäroids eine sekundäre „Zentralnekrose“ entsteht.



**Abb. 4: Vergleich des Mikromilieus von Tumoren und Sphäroiden.**

Ausgehend von der Nährstoffquelle - bei Tumoren Blutgefäße und bei Sphäroiden das umgebende Medium - bilden sich Gradienten aus. Sauerstoffsättigung, Nährstoffe, Metabolite und Proliferation nehmen zur Mitte des Tumors, beziehungsweise des Sphäroids ab und katabole Stoffwechselprodukte sammeln sich an. Dadurch bilden sich Bereiche, in denen sekundär Nekrosen entstehen. In gut versorgten Gebieten kann es zu Differenzierungen kommen. (Abbildung modifiziert nach Kunz-Schughart et al., 2004)

Dieser konzentrische Aufbau der MCTS ist mit der Situation in Mikrometastasen oder intervaskulären Arealen in Tumoren vergleichbar (Kunz-Schughart, 1999; Mueller-Klieser, 1987; Sutherland, 1988). Die Zentralnekrose entsteht zelllinienspezifisch ab einer Größe von 500-600 µm und ist von der vitalen Randschicht (100-300 µm) umgeben. Die Entstehung der Nekrose wird unter anderem durch die limitierte Verfügbarkeit lebenswichtiger Agenzien (Nährstoffe und O<sub>2</sub>), Ansammlung von Abbauprodukten und Entstehung niedriger pH-Werte bedingt (Acker et al., 1987; Carlsson & Acker, 1988). Untersuchungen von Glukose- Laktat-, und ATP-Level sowie der mitochondrialen Aktivität innerhalb von Sphäroiden zeigten die Anpassungen des Metabolismus an den Umgebungsstress (Freyer et al., 1991; Freyer et al., 1990; Walenta et al., 1990). Dies und die Fähigkeit, eigene extrazelluläre Matrices ausbilden zu können, beeinflussen nicht nur die Verteilung und Funktion von zum Beispiel Hormonen sondern auch das Eindringverhalten und die Wirkung von Medikamenten (Friedrich et al. 2007).

Die genannten Studien über drei Dekaden haben gezeigt, dass 3D-Zellkultursysteme die Lücke zwischen Zellkulturen und physiologischen Geweben schließen können (Pampaloni et al., 2007). Die zunehmend guten Möglichkeiten, Arzneimittelwirkungen durch den Einsatz dreidimensionaler Zellkulturen zu prognostizieren, könnten darüber hinaus einen großen Beitrag zur Reduzierung von Tierversuchen in der pharmazeutischen Industrie leisten (Marx & Sandig, 2006).

## 2 Zielsetzungen

Für die präklinische Testung immuntherapeutischer Antikörper wird eine Co-Kultur von Tumorzellen mit PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) zunehmend unentbehrlich. Bisher wurden solche Tests – auch mit Sphäroiden - in statischen Systemen durchgeführt. Für eine wirklichkeitsnähere Nachbildung der *in vivo*-Simulation mit disseminierten Tumorzellen oder mit malignem Aszites ist die Bewegung der Testbestandteile aber unabdingbar. Ein gutes System dafür bieten die bereits erwähnten Spinner-Flaschen, in denen die im Kulturmedium befindlichen Zellen und Sphäroide ständig frei zirkulieren können. Ein weiterer Vorteil dieser Art der Sphäroid-Kultivierung ist, dass sie sowohl über wenige Tage, als auch über mehrere Wochen ablaufen kann.

Spinner-Flaschen haben in der Regel Füllvolumina von 100 ml und mehr. *In vivo* liegen PBMC-Konzentration von etwa  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml im peripheren Blut vor. Um diese Situation widerzuspiegeln, müssten in solche Spinner-Flaschen insgesamt  $1 \cdot 10^8$  PBMC gegeben werden. Bei einer Präparation von PBMC erhält man etwa  $3 - 4 \cdot 10^8$  PBMC, diese Menge würde für maximal vier Versuchsansätze reichen. Neuere „miniaturisierte“ Spinner-Flaschen besitzen ein Füllvolumen von 20 ml, wodurch deutlich mehr Versuchsansätze parallel durchgeführt werden können. Die Etablierung einer stabilen und reproduzierbaren Co-Kultur von PBMC mit Tumorsphäroiden - wenn möglich in miniaturisierten Spinner-Flaschen - war daher die erste Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit.

Nach erfolgreicher Etablierung der stabilen Co-Kultur von Tumorsphäroiden mit PBMC in miniaturisierten Spinner-Flaschen sollten mit diesem Testsystem die trifunktionalen bispezifischen Antikörper catumaxomab und ertumaxomab hinsichtlich ihrer Wirkweise untersucht werden. Der Antikörper catumaxomab hat eine Bindungsspezifität für humanes EpCAM, welches häufig in Karzinomzellen überexprimiert wird, und eine zweite Bindungsspezifität für humanes CD3, das auf allen T-Zellen vorliegt (Ruf et al., 2007; Shen & Zhu, 2008). Der andere Antikörper - ertumaxomab - ist spezifisch für Her2/neu und für humanes CD3 (Kiewe & Thiel, 2008). Beide Antikörper befinden sich zurzeit in klinischen Studien und catumaxomab hat seit April 2009 eine Zulassung in der Indikation maligner Aszites erhalten. Für diesen

Projektteil mussten zunächst Zelllinien gefunden werden, die zum einen in der Lage sind Sphäroide zu bilden, und zum anderen EpCAM oder Her2/neu überexprimieren.

Die Aktivierung der Immunabwehr – vor allem von T-Zellen und Fc $\gamma$ RI-, Fc $\gamma$ RIIa- und Fc $\gamma$ RIII-positiven akzessorischen Zellen – sind die postulierten Effekte der trifunktionalen bispezifischen Antikörper (Kiewe et al., 2006). Zu den Folgen dieser Aktivierung gehören eine erhöhte Infiltration Tumor-spezifischer Abwehrzellen, die Ausschüttung von Zytokinen und die Induktion von Apoptose. Um diese postulierten Effekte zu untersuchen sollten verschiedene Analyse-Verfahren getestet werden, um die für das 3D-Testsystem geeigneten Methoden zu finden. Das Ziel war die Erstellung eines leicht durchführbaren und reproduzierbaren Standard-Protokolls zur präklinischen Testung diverser Immuntherapeutika. Dabei sollte insbesondere Wert darauf gelegt werden, infiltrierende PBMC zu detektieren und die Art der gegebenenfalls aktivierten Immunantwort – humoral oder zellulär – zu identifizieren sowie wenn möglich den entstehenden Tri-Zell-Komplex zu bestätigen.

Die konventionelle Tumorbehandlung beinhaltet die Gabe von Chemotherapeutika. Oft werden dafür Zytostatika verwendet, die den unerwünschten Nebeneffekt haben, auch gesunde proliferierende Zellen anzugreifen. Dies könnte prinzipiell auch die Wirksamkeit der Antikörper-Therapie beeinflussen. Aus diesem Grund sollten auch vergleichende Kombinations-Versuche mit einem gängigen Zytostatikum durchgeführt werden. Im Fall von catumaxomab sollte hierfür das bei vielen Karzinomen eingesetzte Zytostatikum Cisplatin zur Anwendung kommen.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Untersuchungsobjekte

##### 3.1.1 Zelllinien

Mehrere Zelllinien kamen zum Einsatz. Die jeweiligen Ursprungsgewebe und Entitäten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab. 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Zelllinien.**

Neben dem Ursprungsgewebe ist angegeben, um welche Tumorart es sich handelt und ob die jeweilige Zelllinie aus einem Primärtumor oder einer Metastase gewonnen wurde.

Name	Ursprung	Art	gewonnen aus
786-O	Niere	Karzinom	Primärtumor
A-549	Lunge	Karzinom	Primärtumor
BT-474	Brust	Karzinom	Primärtumor
Cal-33	Kopf/Hals	Plattenepithelkarzinom	Primärtumor
CCF-RC-1	Niere	Karzinom	Primärtumor
Col-205	Darm	Adenokarzinom	Metastase (Aszites)
Du145	Vorsteherdüse	Karzinom	solide Hirnmetastase
FaDu	Kopf/Hals (Pharynx)	Plattenepithelkarzinom	Primärtumor
HCT-8	Darm	Adenokarzinom	Primärtumor
HCT-15	Darm	Adenokarzinom	Primärtumor
HCT-116	Darm	Karzinom	Primärtumor
HSC-4	Kopf/Hals	Plattenepithelkarzinom	Primärtumor
HT-29	Darm	Adenokarzinom	Primärtumor
IGROV-1	Eierstock	Karzinom	Primärtumor
MCF-7	Brust	Adenokarzinom	Metastase (Pleuraerguss)
MDA-MB-231	Brust	Adenokarzinom	Metastase (Pleuraerguss)
MDA-MB-453	Brust	Karzinom	Metastase (Pleuraerguss)
OC-316	Eierstock	Karzinom	Primärtumor
SAS	Kopf/Hals	Plattenepithelkarzinom	Primärtumor
SK-BR-3	Brust	Adenokarzinom	Metastase (Pleuraerguss)
SK-OV-3	Eierstock	Adenokarzinom	Metastase (Aszites)
T-47-D	Brust	Adenokarzinom	Metastase (Pleuraerguss)
U87	Gehirn	Glioblastom	Primärtumor
UT-SCC-5	Kopf/Hals	Plattenepithelkarzinom	Primärtumor
UT-SCC-14	Kopf/Hals	Plattenepithelkarzinom	Primärtumor
WiDr	Darm	Adenokarzinom	Primärtumor

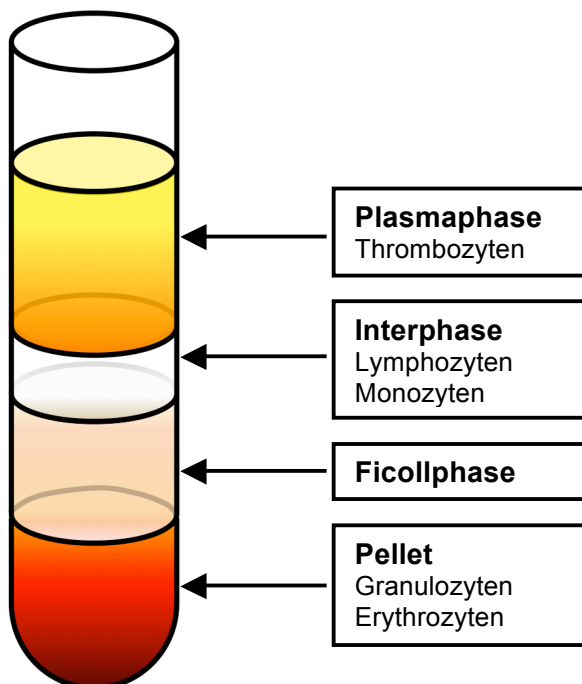
Die Kultivierung der Zellen fand stets unter gleichen Bedingungen (37 °C, 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>) in Brutschränken in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre statt. Nur bei wenigen Zelllinien variierte die CO<sub>2</sub>-Konzentration auf Grund der in den entspre-



chenden Medien vorliegenden Puffer. Die genauen Rezepturen der verschiedenen Nährmedien und weitere Informationen zu den Zelllinien finden sich im Anhang. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden zum Schutz vor Kontamination unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 3.1.2 Immunzellen

Für die Immunabwehr des Körpers sind die PBMC essentiell. Auch die Wirkung der Immuntherapeutika läuft über eine Aktivierung dieser Zellen. Zur Gewinnung der PBMC wurden BC (Buffy Coats) von der Blutspendezentrale Mainz zur Verfügung gestellt. BC sind Nebenprodukte bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten und Frischplasma aus Vollblutspenden, in denen sich vornehmlich Leukozyten und Thrombozyten befinden. PBMC besitzen eine spezifische Dichte von  $\sim 1,07$  g/ml und konnten mit Hilfe einer Dichtezentrifugation separiert werden (Abbildung 5). Dazu wurde eine gebrauchsfertige Lösung (LSM1077, PAA, Pasching) mit einer Dichte von 1,077 g/ml benutzt, die mit dem Polysaccharid Ficoll und Natriumdiatrizoat hergestellt wurde.



**Abb. 5: Zelltrennung nach Dichtezentrifugation.**

Die leichten Thrombozyten (1,05 g/ml) bleiben in der Plasmaphase, die PBMC reichern sich in der weiß und neblig erscheinenden Interphase zwischen Plasma und Ficoll an. Granulozyten (1,08 g/ml) und Erythrozyten (1,10 g/ml) diffundieren durch die Ficollschicht und bilden ein Pellet. (Abbildung modifiziert nach Produktbeilage LSM1077)

Der Inhalt eines BC wurde dazu 1:4 mit sterilem 1x PBS vermischt und anschließend - in einem 50 ml-Reaktionsröhrchen - jeweils 25 ml dieser Mischung vorsichtig auf 25 ml vorgelegtes LSM1077 pipettiert, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. Nach Zentrifugation ( $\approx 400 \times g$ , 25 min, 10 °C), die ohne Bremse abge-

stoppt werden musste, konnte die entstandene Interphase (Abbildung 5) in neue 50 ml-Reaktionsröhrchen überführt werden. Um restliches Ficoll abzuwaschen folgten zwei Waschschrirte mit sterilem 1x PBS ( $\approx 300 \times g$ , 15 min, 10 °C), wobei das jeweils entstandene Pellet die PBMC enthielt. Nach dem letzten Waschrirrt konnten die PBMC quantifiziert werden. Für die Zählung der PBMC wurde die klassische Auszählung mit einer Neubauer-Zählkammer angewendet. Dazu mussten 100  $\mu$ l der PBMC Suspension für fünf Minuten mit 600  $\mu$ l 1%iger Essigsäure vermischt werden, um eventuell noch vorhandene Erythrozyten zu eliminieren, die das Ergebnis verfälscht hätten. Die Auszählung erfolgte mikroskopisch in den vier Eckquadraten im Phasenkontrastverfahren und die Zellzahl berechnete sich nach der Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Eckquadrate}} \cdot 7 \cdot 10.000 = \text{Zellzahl/ml}$$

Der Faktor 10.000 diente der Umrechnung des ausgezählten Volumens in ml, 7 war der durch die Essigsäureinkubation bedingte Verdünnungsfaktor.

Die PBMC wurden mit der jeweils benötigten Konzentration noch am gleichen Tag für weitere Versuche und Analysen verwendet.

## 3.2 Standardtechniken der Zellkultur

### 3.2.1 Monolayer-Kultur von Zelllinien

Zur Kultivierung einer Tumorzelllinie wurde ein kryo-konserviertes Zell-Aliquot (siehe 3.2.2) aufgetaut. Das im Einfriermedium enthaltene Frostschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) kann von den Zellen verstoffwechselt werden und wirkt dann zytotoxisch. Aus diesem Grund durften die Zellen im stoffwechselaktiven Zustand nur möglichst kurz mit dem Einfriermedium in Kontakt bleiben. Um das DMSO zu entfernen wurde die Zellsuspension, nach Auftauen unter Schwenken im Wasserbad (37 °C), zügig mit 10 ml Nährmedium versetzt und anschließend sofort zentrifugiert (5 min, 4 °C, 700  $\times g$ ). Das Zellpellet wurde dann mit Nährmedium resuspendiert und, je nach gewünschter Zelldichte, auf neue Kulturgefäße aufgeteilt. Tägliches Wechseln des Mediums in den nächsten drei Tagen entfernte noch vorhandenes DMSO und Zellen, die den Einfrier- und Auftau-Prozess nicht überlebt hatten.

Anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Bewuchsfläche ausgesät. An den beiden darauf folgenden Tagen wurden Medienwechsel vollzogen mit anschließender Beurteilung der Zellkonstitution unter dem Mikroskop. Danach erfolgten in regelmäßigen Abständen weitere Medienwechsel. Bei kurz bevorstehender Konfluenz wurden die Zellen mit EDTA-haltigem Puffer (Hank's ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)

gewaschen und enzymatisch mit Trypsin-EDTA-Lösung (PAA) abgelöst. Anschließend erfolgte eine Aufteilung in neue Kulturflaschen mit verminderter Konzentration, so dass sich die Zellen nach Möglichkeit immer im Zustand des exponentiellen Wachstums befanden. Diese Prozedur wird im Folgenden als Passage betitelt. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche fanden mit Zellen statt, die sich zwischen Passage 5 (P5) und 25 (P25) befanden.

### **3.2.2 Kryo-Konservierung von Zelllinien**

Da die Zellen spätestens nach der 25. Passage verworfen wurden, mussten von früheren Passagen (P0 o. P1) der gleichen Charge mehrere Aliquots angefertigt und in flüssigem Stickstoff gelagert werden („Kryo-Stock“). Die Zellen wurden hierzu aus ihren Kulturgefäßen abgelöst und gegebenenfalls in einem Gefäß vereinigt. Anschließend erfolgte eine Zellzählung. Nach Abzentrifugieren (5 min, 10 °C, 700 x g) wurde das Zellpellet in vorbereitetem und auf 4 °C temperiertem Einfriermedium (entsprechendes Medium mit 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspension pro Kryo-Röhrchen – falls möglich mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Z/ml - wurden in einer Einfrierbox (VWR) für mind. 1 ½ h bei -70 °C gelagert. In dieser Box wurde die Zellsuspension langsam (1 °C/min) abgekühlt, um eine Zerstörung zu vermeiden. Abschließend kamen die Kryo-Röhrchen in einen Lagerungsbehälter mit flüssigem N<sub>2</sub>, wo sie über einige Jahre aufbewahrt werden können.

### **3.2.3 Automatische Quantifizierung von Einzelzellsuspensionen**

Für die meisten durchgeführten Versuche war es erforderlich, die genaue Zellzahl der verschiedenen Zellpopulationen zu ermitteln. Die Zahl der Tumorzellen wurde mit Hilfe eines CASY<sup>®</sup> Modell TT (Schärfe System) bestimmt. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml isotonischer Lösung (Casyton, Schärfe System) gegeben. Eine definierte Menge dieser Mischung wurde durch eine Kapillare gesaugt. Die Zellen verdrängten eine ihrer Größe entsprechende Menge Casyton, dessen Widerstand sich von dem der Zellen unterscheidet. Diese Widerstandsänderung führt aufgrund des Ohm'schen Gesetzes zu einer Spannungsänderung. Anhand der Dauer der Spannungsänderung kann das Gerät die Größe der Zellen berechnen. Die Häufigkeit der Ereignisse wurde in einem Summenhistogramm in Abhängigkeit von der Zellgröße dargestellt. Durch grundlegende Messungen wurden für jede Zelllinie individuelle Grenzen definiert, die ihrer Größe in Casyton entsprachen. Eine Auswertung fand nur innerhalb dieser Grenzen statt. Die Ergebnisse der Messung waren die in

den Grenzen liegenden Messereignisse (als Summenhistogramm), die daraus berechnete Zellzahl in der Ursprungssuspension (Z/ml), der mittlere Zelldurchmesser ( $\mu\text{m}$ ), das mittlere Zellvolumen (pl) sowie diese Parameter am Maximum des Summenhistogramms.

### 3.2.4 Mykoplasmentests

In Kultur gehaltene Zellen können durch Bakterien, Pilze oder andere Mikroorganismen kontaminiert werden. Häufig gefährden Mykoplasmen die Zellkulturen. Diese sind besonders gefährlich, da sie so klein sind, dass man sie im Lichtmikroskop nicht erkennt. Aus diesem Grund wurden regelmäßig Tests auf Mykoplasmenkontamination durchgeführt.

#### Mykoplasmandetektion mittels PCR

Der hier angewendete Test (Venor<sup>®</sup>GeM, Minerva Biolabs) funktioniert über den Nachweis von Nukleinsäure-Amplifikaten mit Hilfe der PCR (Polymerase-Chain-Reaction). Die verwendeten Primer vervielfältigen einen hoch konservierten, etwa 270 Basenpaare großen Abschnitt der 16 S rRNA des Mykoplasmen-genoms. Diese Amplifikate können direkt im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Vor dem Test wurden die Zellen mehrere Tage in Antibiotika-freiem Medium gehalten, da sonst die Anzahl der Mykoplasmen unter die Nachweisgrenze von  $2 \cdot 10^3$  /ml gedrückt werden konnte. Aus einem Kulturgefäß mit 80 – 90 % konfluentem Bewuchs wurde 1 ml Medienüberstand abgenommen. Davon wurden nach Abzentrifugieren für 30 s bei  $16.000 \times g$ , 100  $\mu\text{l}$  in ein steriles PCR-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min im Thermocycler bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde 1  $\mu\text{l}$  des Überstandes abgenommen und als Template in die PCR eingesetzt.

**Tab. 2: Pipettierschema für die Mykoplasmen-PCR.**  
Die Tabelle gibt die eingesetzten Mengen der benötigten Lösungen für eine Mykoplasmen-PCR wieder.

	Negativkontrolle	Probe	Positivkontrolle
<b>A.dest</b>	18,9 $\mu\text{l}$	17,9 $\mu\text{l}$	17,9 $\mu\text{l}$
<b>10x PCR-Puffer</b>	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
<b>Primer/Nukleotide-Mix</b>	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
<b>Interne Kontrolle</b>	1,0 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$
<b>Taq Polymerase</b>	0,1 $\mu\text{l}$	0,1 $\mu\text{l}$	0,1 $\mu\text{l}$
<b>Positivkontrolle</b>	-	-	1,0 $\mu\text{l}$
<b>Template</b>	-	1,0 $\mu\text{l}$	-

Nach Zusammenstellung der jeweiligen Ansätze erfolgte die PCR im Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm:

**Tab. 3: Thermocycler-Programm für Mykoplasmentest**

Die Tabelle gibt die jeweiligen Temperaturen und Zeitdauern der einzelnen PCR-Schritte an.

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	2 min
2.	55 °C	2 min
3.	72 °C	2 min
4.	94 °C	30 s
5.	55 °C	1 min
6.	72 °C	1 min
7.	72 °C	4 min
8.	4 °C	Pause

Die Schritte 4 bis 6 wurden 34mal wiederholt

Im Anschluss an die PCR erfolgte ein Amplifikat-Nachweis mittels Gelelektrophorese (siehe 3.6.8).

### **Mykoplasmandetektion mittels Bildgebung**

Mykoplasmen leben vorwiegend extrazellulär auf den Zelloberflächen, deshalb ist eine spezifische DNA-Färbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) ebenfalls zum Nachweis von Mykoplasmen geeignet. DAPI bindet an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA und wird in der Fluoreszenzmikroskopie häufig als Kernfarbstoff verwendet.

Die zu untersuchenden Zellen wuchsen für diesen Nachweis unter Verwendung der FlexiPERM-Technik (siehe 3.5.2) über Nacht auf Objektträgern an. Danach wurden sie fünf Minuten in Methanol (70 %) oder wässriger Formaldehydlösung (4 %) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend konnten die Objekte mit einem DAPI-enthaltendem Eindeckmittel (FragEL™ mounting Medium (Calbiochem), siehe 3.6.5.2) eingedeckt und nach 24 h lichtmikroskopisch analysiert werden. Die Mykoplasmen erschienen in den Färbungen als kleine Punkte entfernt von den deutlich größeren Zellkernen der Tumorzellen.

### 3.3 Suspensions-Kulturen

#### 3.3.1 Sphäroide

##### Spinner-Flaschen

Zur Kultivierung von Sphäroiden wurden Spinner-Flaschen verwendet. Dabei handelt es sich um Glas- oder Kunststoffflaschen mit eingebauten Rührern (Abbildung 6).



**Abb. 6: Miniaturisierte Spinner-Flasche.**

Die Abbildung zeigt eine Spinner-Flasche mit einem funktionellen Füllvolumen von 20 ml. Zentral hängt ein Rührer (R) in der Flasche, eine seitliche Öffnung war leicht aufgedreht (Ö), um die Begasung der Suspensions-Kultur zu gewährleisten. Über diese Öffnung erfolgten auch Medienwechsel und Proben-Entnahmen. Die zweite Öffnung blieb zur Reduktion der Kontaminationsgefahr immer verschlossen.

Diese Rührer hängen in der Regel an Glasstäben, die mit den entsprechenden Flaschenverschlüssen verbunden sind, zentral waagrecht über dem Flaschenboden. Zwei weitere Öffnungen der Spinner-Flaschen an den Seiten ermöglichen Begasung und Nährstoffzugabe. Diese Öffnungen sind mit Schraubverschlüssen luftdicht verschließbar. Für die Sphäroid-Kultur befanden sich die Spinner-Flaschen im Brutschrank auf regulierbaren induktiven Magnetrührplatten mit bis zu 15 Stellplätzen. Die Rührgeschwindigkeit variierte je nach Flaschen- und Sphäroidgröße zwischen 100 U/min und 140 U/min. Bei den Versuchen kamen Spinner-Flaschen in drei Größen zur Anwendung. Große und mittlere Spinner-Flaschen mit den Gesamtvolumina 1 l beziehungsweise 300 ml wurden überwiegend zur Anzucht der Sphäroide verwendet, während kleine, miniaturisierte Spinner-Flaschen mit einem Gesamtvolumen von 100 ml für alle weiterführenden Versuche, mit Ausnahme der PCR-

Untersuchungen, benutzt wurden. Die jeweils eingesetzten Volumina Nährmedium betragen 300 ml in großen, 100 ml in mittleren und 20 ml in miniaturisierten Spinner-Flaschen.

### **Silikonisierung der Spinner-Flaschen**

Bei den Spinner-Flaschen handelte es sich um wieder verwendbare Glasflaschen, die nach jeder Benutzung intensiv gereinigt und autoklaviert wurden. Gelegentlich mussten die Spinner-Flaschen silikonisiert werden. Dies war erforderlich, da ansonsten Sphäroide trotz des Rührens in den Winkeln und an der Grenze zwischen Nährmedium und Umgebungsluft an der Wand der Spinner-Flaschen haften bleiben konnten. Hierzu wurde etwa 1/5 der Spinner-Flasche mit in Isopropanol verdünntem Silikon (Serva) gefüllt und geschwenkt, bis die Innenfläche der Spinner-Flasche mindestens bis über die Hälfte gut benetzt war. Die Spinner-Flaschen wurden nun für etwa 2 h in einen auf 100 °C temperierten Heizschrank gestellt und danach langsam abgekühlt. Im Anschluss an diesen Vorgang mussten die Spinner-Flaschen dreimal für je 30 min in A.dest gelegt werden, um eventuell vorhandene Silikonreste abzuwaschen, da Silikon zytotoxisch sein kann. Danach wurden die Spinner-Flaschen gespült, erneut dreimal je 30 min in A.dest gelegt, an der Luft getrocknet, zusammengebaut, autoklaviert und bei 80 °C über Nacht im Heizschrank getrocknet.

### **Sphäroid-Initiierung und Kultur**

Die Herstellung, beziehungsweise Initiierung von Sphäroiden fand in 96-Kammer-Platten statt. Damit die Zellen nicht an den Böden der Kammern anwuchsen, mussten diese mit 1,5%igem sterilem Agarosegel beschichtet werden (50 µl/Kammer). Abhängig von der verwendeten Zelllinie kamen anschließend unterschiedliche Zellmengen zur Verwendung, entweder  $5 \cdot 10^3$  oder  $1 \cdot 10^4$  Zellen/Kammer. Nach zelllinienspezifischer Zeit (zwischen zwei und zehn Tagen) bildete sich im Folgenden in der Regel in jeder Vertiefung jeweils ein Sphäroid. Alle Sphäroide wurden dann, je nach Anzahl, in einer großen oder einer mittleren Spinner-Flasche zu einer Suspensions-Kultur vereinigt. Nach weiterem Wachstum für sieben bis zehn Tage erreichten die Sphäroide zelllinienabhängig mittlere Größen von 0,5 mm bis 1 mm im Durchmesser und befanden sich weiterhin im Wachstum. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Sphäroide gleichmäßig auf kleine Spinner-Flaschen aufgeteilt und ein Versuch begonnen werden. In jede kleine Spinner-Flasche wurden 200 Sphäroide in ein Gesamtvolumen von 20 ml gegeben.

### **Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Sphäroiden**

Einige Analyseverfahren erforderten, dass die Sphäroide wieder zu Einzelzellsuspensionen aufgeschlossen wurden. Hierfür wurden zwei Verfahren angewendet: für Kolonienbildungstests, Vitalitätstests, Zytospins und FlexiPERMs wurden je 10 Sphäroide in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und zunächst mit Hank's Puffer umspült. Nachdem dieser abgesaugt war, wurden die Sphäroide in 100 µl Trypsin-EDTA inkubiert. Unter ständigem Auf- und Ab-Pipettieren wurden die Sphäroidzellen nun enzymatisch und mechanisch vereinzelt.

Bei Methoden mit immunhistochemischen Markierungen konnte kein Trypsin verwendet werden, da dieses Enzym die Oberflächenantigene der Lymphozyten so angreift, dass viele Antikörper nicht mehr binden können. Daher wurden je 10 Sphäroide in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und zunächst dreimal mit 1x PBS gewaschen. Danach konnten mit Hilfe einer 3 mM EDTA-Lösung durch häufiges Auf- und Ab-Pipettieren die Sphäroide durch Scherkräfte aufgeschlossen und die Zellen vereinzelt werden.

### **3.3.2 Co-Kultur mit PBMC**

Für die standardisierte Co-Kultur der Sphäroide mit PBMC wurden bei allen Versuchen  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml in die jeweiligen Spinner-Flaschen gegeben. Die PBMC wurden dafür immer am gleichen Tag aus Buffy Coats isoliert, um garantieren zu können, dass sie frisch waren. Alle Ansätze für einen Versuchsdurchlauf kamen dabei aus demselben BC, damit innerhalb eines Versuches ausschließlich Zellen aus derselben PBMC-Population vorlagen. Während der gesamten Versuchszeit, die bis zu 14 Tage dauerte, wurden die PBMC nicht erneuert.



## **3.4 Therapeutika**

### **3.4.1 catumaxomab, ertumaxomab und 26II6**

Die Antikörper catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2neu x anti-CD3) wurden unter GMP-Bedingungen von TRION Pharma, München hergestellt (Zeidler et al., 1999; Lindhofer et al., 1995), 26II6 (parentaler AK, monospezifisch, anti-CD3) wird im Labormaßstab bei TRION Research hergestellt und von der Firma Fresenius Biotech GmbH (Gräfelfing) als Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 µg/ml zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Klinische Einzeldosen der Triomab<sup>®</sup>-Antikörper liegen im Bereich von 5 - 200 µg (Borges et al., 2007). Daran orientiert wurde für catumaxomab zunächst ein Konzentrationsbereich von 0 - 10 ng/ml festgelegt, in dem Dosis-Wirkungsversuche vorgenommen wurden. Die eingesetzten Konzentrationen von 26II6 und ertumaxomab wurden anhand der mit catumaxomab erlangten Ergebnisse festgesetzt.

### **3.4.2 Cisplatin**

Cisplatin ist ein sehr verbreitetes Zytostatikum, dessen Wirkung auf einer Hemmung der DNA-Replikation beruht. Cisplatin verknüpft – dauerhaft - die beiden DNA-Stränge, die dadurch nicht mehr repliziert werden können. Daraufhin leiten die Zellen Apoptose ein. Wie andere Zytostatika wirkt Cisplatin daher in gewissem Grad auch auf gesunde, proliferierende Körperzellen. Hauptanwendungsgebiete für Cisplatin sind Hoden-, Ovarial-, Bronchial-, Harnblasen- und Zervikalkarzinome und Plattenepithelkarzinome der Kopf- Hals-Region. Cisplatin wurde über die Apotheke der Universitätsmedizin bezogen und bei Raumtemperatur gelagert. Die in die Spinner-Kulturen eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an in der Klinik eingesetzten Konzentrationen, die 5mal täglich 15 – 20 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche oder einmalig 50 – 75 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche betragen. Dies entspricht einem Spektrum von 1,8 bis 8,1 µg/ml Extrazellulärvolumen. Es wurden Cisplatin-Konzentrationen im Bereich 0,05 – 10,0 µg/ml verwendet.

### **3.4.3 Versuchsschemata**

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Versuchskonzepte verfolgt. In Vorversuchen wurde untersucht, ob das jeweilige Therapeutikum in der gewählten Dosis wirkt. 26II6-Kontrollversuche wurden durchgeführt, um zu überprüfen

wie der Kontrollantikörper 26II6, der lediglich Bindungsstellen für CD3 hat, auf die ausgewählten Sphäroide wirkt. Dazu wurden in vier parallelen Ansätzen Kontrollsphäroide mit und ohne PBMC sowie Sphäroide mit gleichen Konzentrationen 26II6 und catumaxomab beziehungsweise ertumaxomab untersucht. Dosis-Wirkungsversuche mit Konzentrationsreihen der Wirkstoffe dienten dazu, eventuell vorliegende Dosis-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen und mittlere Wirkdosen zu bestimmen. In einem Synergie-Versuch wurde untersucht, ob catumaxomab und Cisplatin in Kombination synergistisch wirken. Zur Gewinnung von PBMC-spezifischer mRNA wurden PCR-Versuche durchgeführt. Dazu wurden Kontrollsphäroide mit und ohne PBMC sowie ein Ansatz mit PBMC und catumaxomab verwendet. Tabelle 4 gibt die Versuchsschemata zusammengefasst wieder.

**Tab. 4: Aufstellung der Therapieschemata.**

Die Tabelle gibt die jeweils verwendeten Konzentrationen beziehungsweise Konzentrationsbereiche der Therapeutika und die in den Versuchen eingesetzten Zelllinien wieder. In allen Versuchsansätzen befanden sich  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml. Daneben wurden Kontrollansätze mit unbehandelten Sphäroiden mitgeführt.

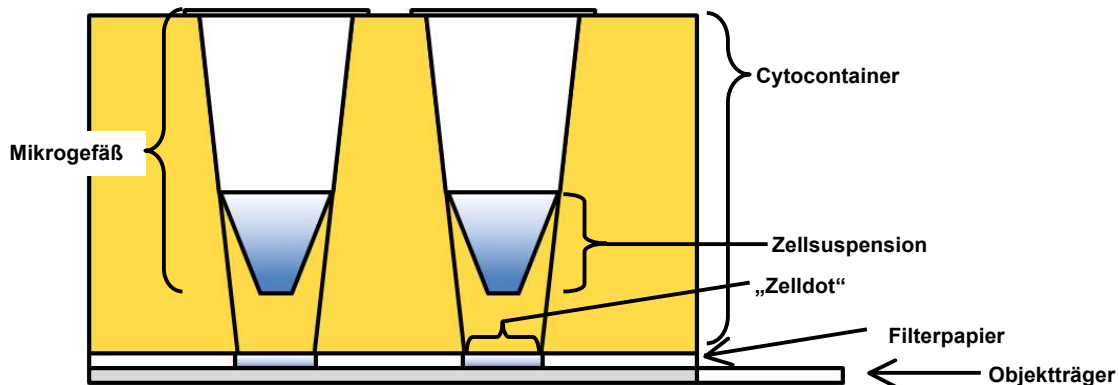
<b>Versuchsbezeichnung:</b>	<b>Therapeutikum:</b>	<b>Konzentrationen:</b>	<b>Zelllinien:</b>
<b>catumaxomab-Vorversuch</b>	catumaxomab	0 und 10 ng/ml	FaDu
<b>ertumaxomab-Vorversuch</b>	catumaxomab & ertumaxomab	2 ng/ml 2 ng/ml	FaDu
<b>26II6-Kontrollversuche</b>	catumaxomab & 26II6	2,5 ng/ml	FaDu
	ertumaxomab & 26II6	2 ng/ml	HT-29
<b>Dosis-Wirkungsversuche</b>	catumaxomab	0 - 10 ng/ml	FaDu
	ertumaxomab	0 - 10 ng/ml	FaDu, HCT-116, WiDr
	Cisplatin	0 – 10 µg/ml	FaDu
<b>Synergie-Versuch</b>	catumaxomab & Cisplatin	0,5 ng/ml 0,5 µg/ml	FaDu
<b>PCR-Versuche</b>	catumaxomab	2,5 ng/ml	FaDu

## 3.5 Präparationen von Zellen

### 3.5.1 Zellsuspensionen

Mit Hilfe des Zytospin-Verfahrens wurden Einzelzellen aus Medienüberständen, aus PBMC-Suspensionen sowie aus Suspensionen vereinzelter Sphäroidzellen durch Zentrifugation auf Objektträger übertragen.

In ein spezielles Gestell („Cytocontainer“, Abbildung 7) wurden Mikrogefäße mit Löchern gestellt, in welche die Zellsuspensionen (100-250 µl) unterschiedlicher Konzentrationen pipettiert wurden. Durch Zentrifugation (3 min, RT,  $\approx 700 \times g$ ) wurden die Zellen aus den Mikrogefäßen auf unter dem Gestell befindliche Objektträger gebracht. Diese Objektträger waren speziell beschichtet, so dass die Zellen haften blieben (SuperFrost Plus<sup>®</sup>, VWR). Die Zentrifugation war schwach genug, so dass die Zellen bei dieser Prozedur intakt blieben. Überschüssiges Medium oder Puffer wurden mit einem beigefügten Filterpapier aufgesaugt. Abschließend wurden die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und danach gelagert oder direkt immunhistochemisch gefärbt.



**Abb. 7: Schema des Aufbaus für das Zytospin-Verfahren.**

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau für einen Zytospin. Die in die Mikrogefäße gefüllte Zellsuspension wird durch die Zentrifugation auf den Objektträger geschleudert und es entstehen zwei „Zelldots“.

### 3.5.2 Adhärenente Zellen [FlexiPERM]

Die Eigenschaft adhärenente Zellen, an Oberflächen anhaften zu können, wurde bei der Zellpräparation mit so genannten flexiPERMs (Greiner Bio-One) genutzt. Dies sind Silikon-Aufsätze für Objektträger mit zwei bis zwölf Kammern.

Die flexiPERMs wurden steril auf Objektträgern angebracht und Zellsuspensionen mit einer Konzentration von  $2 \cdot 10^5$  Z/ml in die einzelnen Kammern gegeben. Anschließend wurden die Konstruktionen im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O gesättigt). Nach der Zeit, welche die Zellen benötigten, um fest an den Objekt-

träger anzuhaften (in der Regel 24 h), wurden die flexiPERMs entfernt. An das Abwaschen überschüssigen Mediums durch Eintauchen in 4 °C kaltes 1x PBS schloss sich die Fixierung der Zellen an. Als Resultat erhielt man Objektträger mit mehreren voneinander getrennten „Zelldots“, die unterschiedlich gefärbt werden konnten. Außerdem bestand die Möglichkeit, in jede Kammer verschiedene (oder verschieden behandelte) Zellen zu geben, so dass die Bedingungen der anschließenden Färbung gleich waren und dadurch ein optimaler Vergleich gewährleistet war.

### **3.5.3 Sphäroide**

Während der Versuche wurden in regelmäßigen Abständen Sphäroide für immunhistochemische Färbungen aus den Spinner-Flaschen entnommen. Die Behandlung der Präparate unterschied sich dabei abhängig von der später eingeplanten Färbetechnik. Bei Färbungen mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern wurden die Sphäroide einer Kryo-Konservierung unterzogen und nach Anfertigen von Kryo-Schnitten im Rahmen der Färbung mit Aceton fixiert. Bei der Immunfluoreszenz-Färbung erwies sich eine der Lagerung voraus gehende Formaldehyd-Fixierung als besser geeignet.

#### **Kryo-Konservierung**

Die Kryo-Konservierung fand mit Hilfe flüssigen Stickstoffs statt. Dazu wurden die Sphäroide in einer Vertiefung einer 6-Kammer-Platte in wenig frisches Nährmedium überführt. Durch Schräghalten des Gefäßes sammelte sich das Medium an einer Seite der Kammer und die Sphäroide blieben am Boden haften. Mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Skalpell wurden nun vorsichtig über die Sphäroide gestrichen, so dass sie an der Klinge haften blieben. Nach kurzer Zeit waren die Sphäroide gefroren und konnten bis zur weiteren Verwendung in Kryo-Röhrchen (Nalgenne, Nunc) bei -70 °C gelagert werden.

#### **Formaldehyd-Fixierung**

Für die Formaldehyd-Fixierung wurden die Sphäroide direkt nach der Entnahme aus den Spinner-Flaschen in eine 4%ige Formaldehydlösung in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) überführt und für 30-60 min auf einem Schüttler bei möglichst geringerer Stärke inkubiert. Danach wurde das Fixans vorsichtig abgesaugt. Alle weiteren Schritte geschahen ebenfalls auf dem Schüttler bei geringster Stärke bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für je 10 min wurde eine 10%ige Saccharoselö-

sung (in 1x PBS) zugegeben. Nachdem alle Sphäroide auf den Boden der Kammern abgesunken waren (etwa nach 30-60 min) wurde die Lösung aufeinander folgend durch 20%ige und 30%ige Saccharoselösung ersetzt. Wenn die Sphäroide auch hier abgesunken waren, konnten sie entweder ins Kryotom überführt und geschnitten oder bis zur weiteren Verwendung in der 30%igen Saccharose bei -20 °C eingefroren werden. Die Inkubation in den aufsteigenden Saccharose-Lösungen diente der Stabilisierung der Sphäroidstruktur und dem Entwässern der Sphäroide zum Gefrierschutz.

### **Anfertigung von Kryoschnitten**

Die kryo-konservierten Sphäroide wurden zum Schneiden in ein Kryotom (Slee) überführt, wobei besonders darauf zu achten war, dass die Objekte nicht auftauten. Im Kryotom wurden dann die Sphäroide bei -22 °C in Eindeckmedium überführt (TissueTek<sup>®</sup>, Roth). Es wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost Plus<sup>®</sup> Objektträgern (VWR) aufgenommen. Die Methode ermöglichte es, Serienschnitte eines ganzen Sphäroids anzufertigen, um anschließend den Medianchnitt und die ihn umgebenden Schnitte auszuwählen. Dies war erforderlich, damit eine spätere quantitative Auswertung angefärbter Zellen möglich wurde. Die Schnitte wurden über Nacht an der Luft getrocknet und danach gelagert oder direkt immunhistochemisch gefärbt.

Die Formaldehyd-fixierten Sphäroide mussten, um sie im Kryotom schneiden zu können, vorher eine Weile mit Einbettmedium inkubiert werden, damit dieses die Saccharose ersetzen und eine bessere Verbindung mit dem Sphäroid eingehen konnte. Dazu wurde außerhalb des Kryotoms ein Tropfen Einbettmedium auf einen Objektträger gegeben, auf den vorsichtig ein Sphäroid überführt wurde. Nach ca. 5 min wurde das Sphäroid mit etwas Einbettmedium auf den Objektblock gegeben. Nach dem Durchfrieren konnten Gefrierschnitte von 5 µm oder 10 µm angefertigt werden. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht luftgetrocknet, bevor sich die Färbung oder Lagerung anschloss.

## **3.6 Analysen**

### **3.6.1 Wachstumskinetik von Monolayer-Zellen**

Um die durchschnittliche Verdopplungszeit der Zellen zu bestimmen und abschätzen zu können, nach wie vielen Tagen der Kultivierung sich die Zellen in einer bestimmten Wachstumsphase befinden, wurden Wachstumskurven erstellt.

Dabei wurden Zellen mit einer Dichte von  $1 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$  in mehrere 24-Kammer-Zellkultur-Mikroplatten ausgesät. An jedem Tag wurden die Zellen zur Bestimmung der Zellzahl aus vier Reaktionskammern abgelöst. Nach halblogarithmischer Auftragung der gemessenen Zellzahlen als Funktion der Kultivierungsdauer konnte mittels linearer Regressionsanalyse in der exponentiellen Wachstumsphase eine Regressionsgerade bestimmt werden. Mit der Gleichung dieser Geraden ließ sich die Zellverdopplungszeit während des exponentiellen Wachstums berechnen.

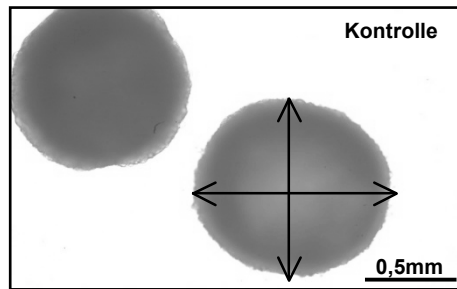
### **3.6.2 Bestimmung der Sphäroidgröße**

Schon makroskopisch waren oft Unterschiede im Sphäroiddurchmesser verschiedener Versuchsansätze erkennbar. Deshalb ist die Dokumentation der Größenänderung in Abhängigkeit von der Zeit in Form von Größenwachstumskurven ein klassisches Mittel, die Wirkung einer Behandlung auf Sphäroide zu untersuchen. Alle Versuchsansätze waren so gewählt, dass unbehandelte Kontrollsphäroide beim Start der Versuche unter den gegebenen Bedingungen die Fähigkeit hatten, weiter an Größe zu gewinnen. Dazu wurde zunächst das normale Wachstumsverhalten der Sphäroide der unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Zudem wurden die Sphäroide erst bei Versuchsbeginn aus einer Spinner-Flasche entnommen, so dass die Ausgangsgröße gleich war. Für die Messung der Sphäroidgrößen wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: die klassische mikroskopische Methode und eine neu entwickelte Software-basierte Methode.

#### **3.6.2.1 Mikroskopische Messung der Sphäroidgröße**

Bei der klassischen Methode wurden jeden zweiten Tag 10 Sphäroide aus den Spinner-Flaschen entnommen. Bei jedem dieser Sphäroide erfolgte durch mikroskopische Analyse die Bestimmung zweier senkrecht aufeinander stehender Durchmesser (Abbildung 8). Das geometrische Mittel aus diesen Messgrößen bildete den mittleren Durchmesser des einzelnen Sphäroids. Hieraus wurde durch arithmetische Mit-

telung der mittlere Sphäroiddurchmesser ( $\pm$  SD) der entnommenen Population abgeleitet.

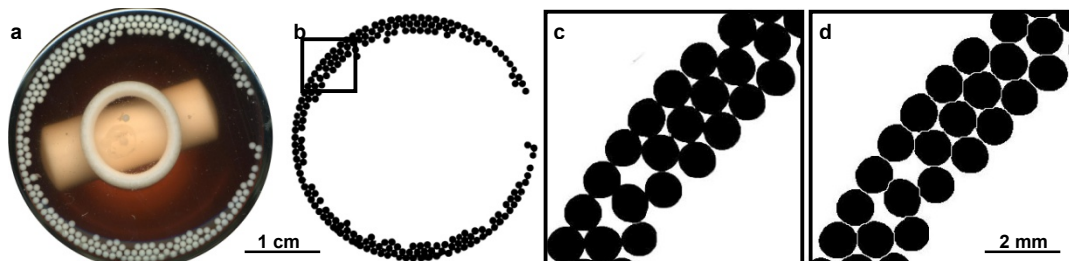


**Abb. 8: Mikroskopische Größenbestimmung von Sphäroiden.**

Photographische Aufnahmen unbehandelter FaDu-Sphäroide. Die Aufnahmen wurden in einem Durchlichtmikroskop erstellt. In die Abbildung sind beispielhaft zwei Messachsen zur Größenbestimmung eingefügt.

### 3.6.2.2 Software-basierte Bestimmung der Sphäroidgröße

Im Laufe der Arbeit ist es gelungen, die regelmäßigen Eingriffe in die Sphäroidkulturen zur Größenbestimmung zu umgehen. Wir nutzten aus, dass die verwendeten miniaturisierten Spinner-Flaschen flache, ebene Glasböden besitzen, auf denen die Sphäroide nach einem Rührstopp in einer „monosphäroidalen“ Schicht sedimentieren. Dies erlaubte ein Einscannen der Sphäroide auf einem Flachbett-Scanner in einer hinreichend guten Auflösung (Abbildung 9a). Die entstandenen digitalen Bilder wurden im weiteren Verlauf mit den Programmen Photoshop (Adobe), ImageJ (Open Source) und Excel bearbeitet und ausgewertet (Abbildung 9b-d). Im Bildbearbeitungsprogramm Photoshop wurde das gescannte Bild in ein schwarz/weiß-Bild umgewandelt, wobei schwarze Flächen entstanden, die der Fläche der Sphäroide im Original entsprachen. In ImageJ wurden eventuell zusammenhängende Sphäroide durch einziehen einer weißen Linie getrennt und die Flächenanteile der einzelnen Punkte berechnet. Diese Daten wurden in Excel übertragen, wo eine abschließende Auswertung statt fand.



**Abb. 9: Software-basierte Auswertung der Sphäroidgrößen.**

Gezeigt ist die durch Bildbearbeitung bewirkte Umwandlung eines eingescannten Bildes. Das eingescannte Original (a) wurde in Photoshop zu einem schwarz/weiß Bild (b) verändert. Mit ImageJ wurden daraufhin die einzelnen Sphäroide voneinander getrennt. (c) zeigt eine Vergrößerung aus (b), und (d) entspricht diesem Ausschnitt nach der Bearbeitung in ImageJ.

Die gemessenen Pixelwerte der Flächen wurden in die Durchmesser der einzelnen Sphäroide umgerechnet und diese Werte dann gemittelt.

### 3.6.3 Kolonienbildungstest

Eine international gebräuchliche und standardisierte Methode, die Wirkung einer Tumorthherapie zu prüfen, ist der so genannte Klonogenitätstest oder Kolonienbildungstest. Dieser Test gibt das Überleben einzelner Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Behandlungsintensität wieder. Aus einer Menge behandelter Zellen wird eine stark verdünnte neue Monolayer-Kultur ausgesät. Nach der Zeit, welche die Zellen theoretisch benötigen, um sich sechsmal teilen zu können, wird das Wachstum beendet, und die gebildeten Kolonien werden angefärbt und ausgezählt. Als überlebende Kolonie zählt dabei eine Zellpopulation von 50 Zellen und größer. Das Überleben wird nun relativ zu unbehandelten Kontrollzellen beurteilt.

Auch bei der hier untersuchten Behandlung mit immuntherapeutischen Antikörpern bot sich diese Methode zur Überprüfung der „Nachhaltigkeit“ der Therapie an. Hierbei wurde die  $ED_{50}$ , die „Effekt Dosis“, bei der 50 % der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle sterben, bestimmt.

Der Kolonienbildungstest ist eine sehr genaue Methode, die Aussagen über drei Zehner-Potenzen zulässt. Voraussetzung dafür ist, dass aus unbehandelten Zellen mindestens 1000 Kolonien gebildet werden. Bilden behandelte Zellen nur eine Kolonie, beträgt das relative Überleben 1 ‰. Da auch *in vitro* nicht alle Zellen einer Population an der Proliferation beteiligt sind, mussten zunächst für jede Zelllinie die Generationszeit und die Kolonienbildungseffizienz bestimmt. Danach richtete sich die spätere Aussaatdichte und Wachstumszeit.

Die Einstellung der gewünschten Zellkonzentration erfolgte mit Hilfe automatischer Zellzählung (CASY TT) und entsprechender Verdünnung aus Zellkonzentraten. In jede Kammer einer 6-Kammer-Platte wurde die entsprechende Menge Zellen (in der Regel 500 o. 1000) in einem Endvolumen von 2,5 ml ausgesät. Die Inkubationszeit betrug zelllinienspezifisch zwischen 5 und 10 Tagen. Nach dieser Zeit wurde das Medium mit Hilfe einer Absaugpumpe entfernt, und in jede Kammer wurden 2 ml 0,01%iges Methylenblau pipettiert. Das Färbemittel wurde nach 30-minütiger Inkubation abgesaugt und die Platten anschließend offen zum Trocknen an der Luft gelagert. Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach dem Einscannen der trockenen Platten mit Hilfe eines Computer-gestützten Auswerte-Verfahrens, das sich an dem zuvor beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Sphäroidgrößen orientierte. Dafür wurden vorher mikroskopisch die zelllinienspezifischen durchschnittlichen Größen der Kolonien (in Pixel) bestimmt. In Photoshop wurden die gescannten Bilder in



schwarz/weiß-Bilder umgewandelt, wobei schwarze Flächen entstanden, die den Flächen der Kolonien im Original entsprachen. ImageJ berechnete die Flächenanteile der einzelnen Kolonien. Diese Daten wurden in Excel übertragen, wo eine abschließende Auswertung stattfand. Als Resultat ergab sich eine Auftragung des relativen Überlebens (%) in Abhängigkeit der verwendeten Behandlungsintensität.

### **3.6.4 Analyse der Zellvitalität**

Ein weiteres Mittel, um die Wirkung (und die  $ED_{50}$ ) einer Behandlung auf Zellkulturen zu bestimmen, ist die Messung der Zellvitalität. Als Maß für die Vitalität wird dabei in der Regel die Aktivität bestimmter Enzyme beurteilt. Hier wurde der so genannte XTT-Assay, ein photometrischer Test, verwendet. Bei diesem Assay wird das wasserlösliche, farblose 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid von mitochondrialen Dehydrogenasen der Atmungskette, unter Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton, zum wasserunlöslichen roten Farbstoff 1,3,5-Triphenylformazan reduziert. Dieser Farbumschlag wird photometrisch gemessen und es gilt: je stärker die Absorption, desto stärker die Umwandlung in Formazan, desto vitaler die Zellen. Die Vitalität der behandelten Zellen wird in Relation zu unbehandelten Kontrollen gesetzt. Für die Bestimmung der Zellvitalität wurde ein gebrauchsfertiges Kit (TOX2, Sigma-Aldrich) eingesetzt. Hierfür wurden in Dreifach-Ansätzen Zellsuspensionen in eine 96-Kammer-Platte gegeben. Dabei musste die Menge so kalkuliert werden, dass nach 24 h Anhaftungs- und Wachstumszeit nicht mehr als  $2 \cdot 10^5$  Z/Kammer vorlagen und, dass die Zellmenge jedes Versuchsansatzes zum Zeitpunkt der Messung in jeder Kammer gleich war. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 100  $\mu$ l 1x PBS ersetzt, da das im Medium enthaltene Phenolrot die Messung stören könnte. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l XTT-Lösung (Sigma) erfolgte eine 2-4 stündige Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 %  $CO_2$ ,  $H_2O$  gesättigt). Die Messung der Extinktionen bei 450 nm (E1) und 690 nm (E2) wurde in einem Microplate-Reader (BioRad) durchgeführt, und die Werte wurden abschließend mit Excel ausgewertet. Die Messung der Extinktion bei 690 nm geschah auf Hinweis des Kit-Herstellers aufgrund der Benutzung von 96-Kammer-Platten. Für die Auswertung wurde E2 von E1 abgezogen und die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze gemittelt. Die Mittelwerte der behandelten Zellen wurden dann in Relation zu den Mittelwerten unbehandelter Kontrollzellen gesetzt und als Resultat ergab sich die relative Zellvitalität (%) in Abhängigkeit der Behandlung.

### **3.6.5 Immunhistochemische Färbungen (IHC)**

In der vorliegenden Arbeit kamen grundsätzlich zwei unterschiedliche immunhistochemische Methoden zur Anwendung: Zum einen indirekte Färbungen mit Enzym-gekoppelten Sekundär-Antikörpern und zum anderen mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörpern. Die verschiedenen Färbemethoden bedurften unterschiedlicher vorhergehender Fixierung der zu färbenden Objekte. Abhängig von der Lokalisation des Antigens (membranständig oder intrazellulär) erfolgte eine weitere Differenzierung der Färbeprotokolle.

#### **3.6.5.1 Enzym-gekoppelte Markierung**

Die Fixierung der luftgetrockneten Gefrierschnitte erfolgte für 5 min in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet (PapPen, Roth). Es schloss sich das Rehydrieren in 1x PBS an. Einer Blockierung unspezifischer Bindungsstellen über 1 h mit 3%iger BSA-Lösung in PBS folgten drei Waschschrte für je 2 min mit PBS. Nun wurden jeweils 10 bis 20  $\mu\text{l}$  Primärantikörperlösung auf die Schnitte gegeben und diese in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert. Die Primärantikörperlösungen (mouse-anti-human) waren mit PBS im Verhältnis von 1:500 verdünnt. Danach wurde erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden endogene Peroxidasen geblockt, indem für 10 min eine 3%ige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in 1x PBS auf die Schnitte gegeben wurde. Bei Blasenbildung wurde dieser Schritt wiederholt, bis keine erkennbare Reaktion mehr zu beobachten war. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und die gebrauchsfertige Sekundärantikörperlösung (EnVision  $\alpha$ -mouse, DAKO) für 30 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Erneutes dreimaliges Waschen schloss sich an. Das an die Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Peroxidase setzte im folgenden Schritt Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Farbstoff um. Nach der Farbreaktion, die bis zu 30 min andauern konnte, erfolgten drei Waschschrte und abschließend eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Dazu wurden die Objektträger kurz in A.dest getaucht und danach für mindestens 4 min in Mayers saurem Hämalaun inkubiert. Anschließend wurden die Objekte unter leicht fließendem Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70 %, 80 %, 96 % und 100 % Isopropanol entwässert, dann dreimal für 5 min in Xylol fixiert und mit einem kommerziellen Einschlussmittel (Roti<sup>®</sup>-Histokitt, Roth) eingedeckt. Die Lagerung der Objekte bis zur lichtmikroskopischen Auswertung erfolgte bei Raumtemperatur. Bei allen Färbungen wurden parallel geeignete Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt.

Vor der Färbung intrazellulärer Antigene musste eine Permeabilisierung der Biomembranen erfolgen. Dies diente dazu, den verwendeten Antikörpern zu ermöglichen in die Zellen und deren Kompartimente einzudringen. Permeabilisierungspuffer war ein Gemisch von 0,1 % Natrium-Citrat und 0,5 % Triton-X-100 in A.dest. Bei den meisten Färbungen reichte eine einmalige Permeabilisierung vor der 1. Antikörper-Inkubation aus, im Falle der Ki-67 Färbungen wurde mehrmals permeabilisiert. Vor den Antikörper-Inkubationen und vor der Zugabe von DAB wurde dabei eine Inkubation für 1 min mit Permeabilisierungspuffer durchgeführt.

### **3.6.5.2 Fluorochrom-gekoppelte Markierung**

Die Färbungen begannen mit der Umrandung der Gefrierschnitte mit einem Fettstift (PapPen). Dieser musste erst gut trocknen, um danach die Objekte in 1x PBS zweimal für je 10 min zu rehydrieren. Eine 60minütige Präinkubation mit Präinkubationslösung bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer schloss sich an. Die Präinkubation diente dazu, zu verhindern, dass die 1. Antikörper unspezifische Bindungen mit Proteinen im Gewebe eingingen und dass der 2. Antikörper, der aus der Ziege stammte, unspezifisch band. Natriumazid in der Antikörperinkubationslösung verhinderte das Wachstum von Bakterien und Pilzen. Nach Entfernen der Lösung wurden die 1. Antikörper, in Antikörperinkubationslösung 1:500 verdünnt, auf das Objekt pipettiert. Die Inkubation dauerte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer über Nacht. Am nächsten Morgen erfolgte dreimaliges Waschen mit 1x PBS für je 10 min. Währenddessen wurde der Sekundärantikörper (goat- $\alpha$ -mouse, FITC-gekoppelt) in Antikörperinkubationslösung 1:50 verdünnt. Nach den Waschschritten wurde der Sekundärantikörper auf die Sphäroidschnitte gegeben. Diese Inkubation dauerte 60 min bei Raumtemperatur in einer dunklen feuchten Kammer. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS folgte, bevor die Objekte mit Fluoreszein FragEL (Fragment End Labeling) mounting Medium eingedeckt wurden. In diesem Medium befand sich DAPI, welches zur Kerngegenfärbung genutzt wurde. Die Deckgläschen wurden mit Nagellack versiegelt und die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Bevor die Färbungen betrachtet werden konnten mussten sie 24 h ruhen, um sich zu stabilisieren. Bei allen Färbungen wurden parallel geeignete Kontrollen durchgeführt.

### **Apoptosedetektion**

Zur Apoptosedetektion wurde das FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit der Firma Calbiochem® verwendet. Bei der Apoptose wird die DNA in viele kleine Fragmente zerteilt, wodurch entsprechend viele freie 3'OH-Enden entstehen. Daran bindet das im Kit vorhandene Enzym terminale De-oxynukleotidyl-Transferase (TdT) Fluoreszein-markierte Nukleotide. Des Weiteren befand sich in dem Kit ein Eindeckmittel (FragEL™ mounting Medium), welches als Kernfarbstoff DAPI enthielt.

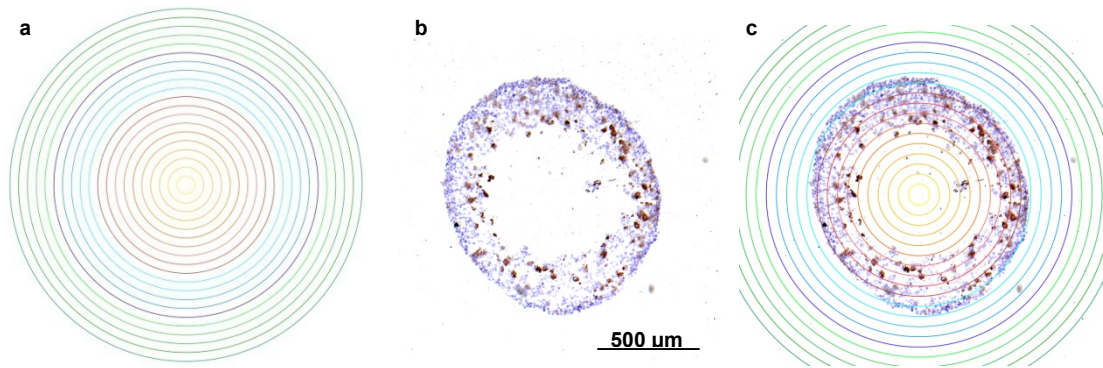
Die Kryo-Schnitte wurden für 5 min mit kaltem Aceton (-20 °C) fixiert und mit Fettstift umrandet. Anschließend erfolgte für 10 min eine Permeabilisierung mit 30 µl Proteinase K (20 µg/ml). Danach wurde dreimal mit 1x TBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde Äquilibriumspuffer (im Kit enthalten; 1:5 mit A.dest verdünnt) auf die Objekte gegeben und nach 30 min bei Raumtemperatur vorsichtig mit der Pipette abgezogen. Danach wurden 30 µl TdT Reaktionsmix (1:20 TdT Enzym und TdT Labeling Reaktionsmix) auf jedes Objekt pipettiert. Bei Negativkontrollen wurde stattdessen A.dest verwendet. Die Inkubation erfolgte für 60-90 min bei 37 °C im Brutschrank. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Objekte mit Fluoreszein FragEL mounting Medium eingedeckt. Die Deckgläschen wurden mit Nagellack versiegelt und die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Als Positivkontrolle diente ein Gefrierschnitt, der vor der Färbung mit einer Lösung aus 1 µg/ml DNase I und 1 mM MgSO<sub>4</sub> in TBS für 20 min inkubiert worden war. Das Enzym bewirkt eine Zersetzung der DNA.

### **3.6.6 Lokalisierung & Quantifizierung von IHC in Gefrierschnitten**

Systematische immunhistochemische Färbungen von infiltrierenden Leukozyten (CD45), des Proliferationsmarkers Ki-67 und apoptotischer Zellen an Gefrierschnitten behandelte FaDu-Sphäroide führten zu der Annahme, dass konzentrationsabhängige Beziehungen bestehen könnten.

Zur Quantifizierung der gefärbten Zellen wurde im Bildbearbeitungsprogramm Photoshop eine Maske aus konzentrischen Ringen mit definierten Durchmessern erstellt, die über die gefärbten Sphäroidschnitte gelegt wurde (Abbildung 10). Dies erleichterte die Auszählung der Zellen am Bildschirm. Die konzentrischen Ringe wurden mit definierten Durchmessern versehen, die abhängig von der für die Fotografie verwendeten Vergrößerung unterschiedlichen Maßstäben entsprachen. Dieser

Zusammenhang ist für die ersten zehn Ringe vom Zentrum nach außen in Tabelle 5 dargestellt.



**Abb. 10: Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Zellen in einem Sphäroidschnitt.**

Mit Hilfe einer in Photoshop erstellten und genormten Maske (links) konnte durch Überlagerung mit Photographien genormter Größe die Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Zellen vereinfacht werden. Rechts im Bild ist die Überlagerung der beiden Bilder am Beispiel eines FaDu-Sphäroidschnitts zu sehen, in dem CD45-positive Zellen gefärbt worden waren.

**Tab. 5: Durchmesser der Ringmaske zur Quantifizierung gefärbter Zellen.**

Mit Hilfe einer in Photoshop erstellten und genormten Maske konnte durch Überlagerung mit Photographien genormter Größe die Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Zellen vereinfacht werden. Die Tabelle zeigt die entsprechenden Parameter für die ersten zehn Ringe der Maske von innen gesehen. Wiedergegeben sind die Pixelgröße des Ringdurchmessers in Photoshop und die entsprechende Umrechnung ( $\mu\text{m}$ ) in Abhängigkeit des zur Photographie verwendeten Objektivs des Lichtmikroskops (1. Spalte).

	Ring-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Pixel	91,2	182,4	273,6	364,8	456	547,2	638,4	729,6	820,8	912
<b>40x</b>	$\mu\text{m}$	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125
<b>10x</b>	$\mu\text{m}$	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
<b>5x</b>	$\mu\text{m}$	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
<b>2,5x</b>	$\mu\text{m}$	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000

Die Überlagerung der immunhistochemisch gefärbten Objekte erleichterte das Auszählen der positiv gefärbten Zellen, da systematisch Ring für Ring ausgezählt werden konnte. Darüber hinaus ermöglichte diese Methode auch eine qualitative und quantitative Auswertung der Lage, beziehungsweise Eindringtiefe der positiv gefärbten Zellen.

### 3.6.7 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie oder ist eine Methode zur Unterscheidung von Zellpopulationen. Dabei werden Zellen nach Durchfluss durch einen Laser zunächst auf Grund ihres Vorwärts-Streulichts (FSC = Forward Scatter) als Maß für das Zellvolumen und ihres Seitwärts-Streulichts (SSC = Sidewards Scatter) als Maß für die Zellgranularität unterschieden. Weiterführend können die Zellen mit fluoreszierenden Stoffen markiert und sortiert werden.

Mit Durchflusszytometrie wurden die Subpopulationen der Leukozyten nach Isolation aus dem Buffy Coat differenziert. Des Weiteren sollte die Methode verwendet werden, um nach Behandlung mit den immuntherapeutischen Antikörpern catumaxomab und ertumaxomab in die Sphäroide eingewanderte Leukozyten zu detektieren und nach Möglichkeit zu differenzieren.

Zur Markierung der Zellen wurden Fluoreszein- oder Phycoerythrin-markierte Antikörper gegen Leukozyten-spezifische Antigene verwendet. Nach Isolation aus einem Buffy Coat wurden die PBMC mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt und mit 1x PBS auf eine Endkonzentration von  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml eingestellt. 10 µl der jeweils verwendeten Antikörperkombinationen und isotypischen Negativkontrollen wurden in FACS-Röhrchen vorgelegt und 100 µl der PBMC-Suspension hinzu gegeben. Bei Verwendung einzelner Antikörper kamen jeweils 10 µl zum Einsatz. Nach gutem Durchmischen folgte eine Inkubation über 15 min bei 4 °C. Zum Abfangen ungebundener Antikörper folgte die Zugabe von 1 ml PBS-BSA. Danach wurde die Suspension für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Nach Resuspendieren der Pellets mit PBS-BSA waren die Proben messbereit.

Die Differenzierung der Lymphozyten wurde mit den in Tabelle 6 angegebenen Antikörperkombinationen durchgeführt, wobei entsprechende Isotypkontrollen für die jeweils verwendeten Antikörpertypen zum Einsatz kamen.

**Tab. 6: Zusammenstellung der Antikörperkombinationen für die Durchflusszytometrie.**

Die Tabelle gibt die verwendeten Antikörperkombinationen für die Durchflusszytometrie und die damit erlangte Zelldifferenzierung wieder.

1. AK	2. AK	Detektion von:
CD45	CD14	Lymphozyten, Monozyten und Ausschluss von Tumorzellen
CD4	CD3	T-Helfer-Zellen
CD8	CD3	Zytotoxische T-Zellen
CD16+56	CD3	T-Zell-assoziierte Killerzellen und NK-Zellen
CD19	CD3	B-Zellen

### 3.6.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction) werden DNA-Abschnitte *in vitro* experimentell vervielfältigt. Um nur bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren werden zwei spezifische künstliche Oligonukleotide, die den entsprechenden Abschnitt gegenläufig flankieren, der PCR als Primer zugesetzt. Ein Reaktionszyklus der PCR-Reaktion setzt sich aus drei Teilschritten zusammen:

Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge mittels Aufheizen auf 95 °C denaturiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Primer an den jeweiligen komplementären Teil der einzelsträngigen DNA bei ca. 55 °C, abhängig von der Primergröße. Dieser Schritt wird auch Annealing genannt. Im nächsten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf 72 °C angehoben, um die DNA-Neusynthese mit Hilfe einer Thermo-resistenten DNA-Polymerase, meist aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), zu starten. Durch eine erneute Erhöhung der Temperatur auf 94 °C wird die Synthese abgebrochen und die komplementären Stränge lösen sich wieder voneinander. Jetzt beginnt ein neuer Zyklus. Nach durchschnittlich 30-40 Zyklen liegen ausreichend Kopien des gewünschten DNA-Abschnittes für eine Nachweisreaktion vor ( $2^{30} \approx 10^9$  Kopien).

Die PCR wurde in Form der RT-PCR für zwei unterschiedliche Analysen eingesetzt. Bei der RT-PCR wird zunächst mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase mRNA, die aus Proben extrahiert wird, in „complementary“ DNA umgeschrieben (= cDNA), welche dann in der PCR als Template dient. Die RT-PCR wurde als Standardmethode für den Test auf Mykoplasmen verwendet, da sie sensitiver ist, als die zuvor beschriebene Methode mit der DAPI-Färbung (siehe 3.2.4). Darüber hinaus sollte mit Hilfe der RT-PCR ein näherer Aufschluss über die das Sphäroid infiltrierenden Leukozyten gemacht werden. Da die PCR eine hoch sensitive Methode ist, bestand die Hoffnung, auch aus nur wenigen Zellen, die sich in dem Sphäroid befinden und die mit immunhistochemischen Methoden eventuell nicht detektiert werden können, genug mRNA für einen Nachweis extrahieren zu können. Für die Etablierung der Methode wurde ein Versuchskonzept verwendet, bei dem zunächst FaDu-Sphäroide mit 2,5 ng/ml catumaxomab für sieben Tage behandelt wurden. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, dass bei dieser Kombination die Sphäroide noch relativ groß waren (ca. 80 % der Ausgangsgröße) und trotzdem schon von relativ vielen Leukozyten (ca. 20 % der Gesamtzellen) infiltriert waren. Dadurch sollte die Menge relevanter mRNA möglichst hoch sein.

### **RNA-Extraktion aus Sphäroiden**

Die RNA-Extraktion aus den Sphäroiden erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen (RNeasy Mini Kit). Nachdem die Sphäroide aus den Spinner-Flaschen entnommen und zehnmal mit 1x PBS gewaschen worden waren, wurden sie zunächst bei -70 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 600 µl eines zuvor mit  $\beta$ -

Mercaptoethanol 1:100 versetzten Lysepuffers zugegeben. Das Lysat ruhte dann zunächst für 10 min bei Raumtemperatur, bevor es zum Homogenisieren mehrmals durch eine 23 G-Kanüle gezogen wurde. Anschließend wurde das Homogenat auf eine QIAshredder-Säule überführt, die man 15 s bei  $\approx 18.000 \times g$  zentrifugierte. Nach Versetzen des Filtrats mit 600  $\mu\text{l}$  70 %igem Ethanol und mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde die Probe auf eine Silica-Membran (mini-Säule) gebracht und 15 s bei  $\approx 18.000 \times g$  zentrifugiert. Bei diesem Schritt band die RNA spezifisch an die Membran. Das Eluat wurde verworfen und es folgte ein Waschschriff des Pellets mit 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer und eine erneute Zentrifugation für 15 s bei  $\approx 18.000 \times g$ . Für einen DNA-Verdau wurde im Folgenden unter Verwendung des Qiagen-Kits (RNase-Free DNase Set) 10  $\mu\text{l}$  DNase I mit 70  $\mu\text{l}$  RDD Puffer vermischt und auf die Membran gegeben. Nach 15minütiger Inkubation folgte ein erneuter Waschschriff mit 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer. Danach wurde die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation von 15 s bei  $\approx 18.000 \times g$ , der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Die Mini-Säule wurde daraufhin in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und für 1 min bei  $\approx 18.000 \times g$  zentrifugiert. Anschließend konnten die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt aufbewahrt werden.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die optischen Eigenschaften der Nukleinsäuren genutzt. Diese haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und da bei 260 nm die optische Dichte (OD) von 1 einer RNA-Konzentration von 40 ng/ $\mu\text{l}$  RNA entspricht, konnten die jeweiligen Konzentrationen berechnet werden:

$$\text{OD}_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA (ng/\mu l)}$$

Die Reinheit der RNA wird durch das Verhältnis  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  bestimmt. Dieses sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die RNA-Konzentrationsbestimmungen wurden am NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) automatisiert mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  unverdünnter Proben gemessen.

### **RNA-Formaldehyd-Gel**

Um sicherzugehen, dass die RNA intakt und nicht durch RNasen partiell abgebaut vorlag, wurden die RNA-Lösungen auf einem 1%igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Formaldehyd reagiert kovalent mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin und verhindert so die Aus-



bildung von Sekundärstrukturen, die zu einem veränderten Wanderungsverhalten im Gel führen können. Zwei diskrete Banden für die 28S- und 18S-rRNA in einem Intensitätsverhältnis von ca. 2:1 wiesen auf eine intakte RNA hin. Die Banden wurden durch den der Probe zugesetzten Interkalator Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Für die Herstellung eines 1%igen Gels wurden 0,5 g Agarose in 36 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und 5 ml 10x MOPS-Puffer aufgenommen. Daraufhin folgte ein Aufkochen in der Mikrowelle. Nachdem die Lösung auf 60 °C abgekühlt war, wurden 9 ml Formaldehyd hinzu gegeben und die Mischung anschließend in eine Plastikgelkammer gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Pro Geltasche wurden 2,5 µg RNA in 35 µl Gesamtvolumen aufgetragen. Das entsprechende RNA-Volumen wurde dafür zunächst gegebenenfalls mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 7 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 15 µl Formamid, 5 µl Formaldehyd und 3 µl 10x MOPS-Puffer hinzu pipettiert. Es folgte eine Denaturierung für 15 min bei 65 °C im Thermocycler (Biometra, Göttingen), um Sekundärstrukturen aufzulösen. Um die Primärstruktur der RNA zu erhalten, mussten die Proben anschließend umgehend auf Eis gestellt werden. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (0,05 µg/ml) und anschließender Inkubation auf Eis für 2 min wurden 3 µl 10x RNA Ladepuffer hinzu gefügt. Die Auftrennung folgte für ca. 90 min bei 60 V. Bei intakter RNA schloss sich die reverse Transkription (RT) an.

### Reverse Transkription

Die RT wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl - unter Verwendung des REVERSE-IT™ 1ST STRAND SYNTHESIS KIT von ABgene - im Thermocycler durchgeführt. Zunächst wurde dafür ein Reaktionsmix angesetzt, der anschließend für 5 min bei 70 °C im Thermocycler denaturiert und dann auf Eis bereit gestellt wurde (Tabelle 7).

**Tab. 7: Probenzusammensetzung eines Reaktionsmixes für die reverse Transkription.**

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung des für die RT verwendeten Reaktionsansatzes wieder. Die RNA-Suspension wurde vorher auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt, sodass insgesamt immer 200 ng in die RT eingingen. Die oligo dT-Lösung stammte aus dem REVERSE-IT™ 1ST STRAND SYNTHESIS KIT der Firma ABgene.

Reagenz	Probenansatz	Negativkontrollen
RNA	2 µl	2 µl
oligo dT	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	9 µl	9 µl

Anschließend wurden in jeden Ansatz 8 µl eines zuvor zusammengestellten Master-Mixes (Tabelle 8) pipettiert und gut durchmischt.

**Tab. 8: Probenzusammensetzung eines Mastermixes für die reverse Transkription.**

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung des für die RT verwendeten Mastermix wieder. Alle verwendeten Lösungen stammten aus dem REVERSE-IT™ 1ST STRAND SYNTHESIS KIT der Firma ABgene.

Reagenz	Probenansatz	Negativkontrollen
5x Puffer	4 µl	4 µl
dNTP-Mix	2 µl	2 µl
reverse-iTTM RTase Blend	1 µl	-
DTT	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	-	1 µl

Danach wurde das Gemisch für 50 min bei 47 °C inkubiert und anschließend für 10 min auf 75 °C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Nach Abzentrifugation konnte die cDNA bei -20 °C gelagert werden.

Von jeder Probe wurde eine Negativkontrolle angesetzt, von der nach der RT zur Kontrolle ein semiquantitativer PCR-Ansatz angesetzt wurde. Mittels eines Gels wurde anschließend getestet, ob sich Amplifikate gebildet hatten, die von genomischer DNA oder Kontaminationen hätten herrühren können. Die Untersuchung erfolgte, um sicherzugehen, dass die Lyse der DNA durch die DNase während der RNA-Extraktion vollständig erfolgt war.

### Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR wurden in Reaktionsvolumina von 25 µl durchgeführt. Das Pipettierschema der Ansätze ist in Tabelle 9 wiedergegeben. Die cDNA-Konzentrationen wurden vor dem Einsatz mit dem NanoDrop bestimmt und in jeden Ansatz wurden 2 µg cDNA eingesetzt. Musste dafür mehr als 1 µl cDNA-Suspension eingesetzt werden, so wurde das entsprechende Volumen H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> angepasst.

**Tab. 9: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes zur Amplifikation von PBMC-mRNA.**

Die Tabelle gibt die jeweils benötigten Mengen der für einen PCR-Ansatz benötigten Substanzen an. Es wurden immer 2 µg cDNA eingesetzt. Musste dafür mehr als 1 µl cDNA-Suspension eingesetzt werden, so wurde das entsprechende Volumen H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> weniger eingesetzt. Es wurde immer eine Negativ-Kontrolle mitgeführt.

PCR Ansatz	Probe	Negativ-Kontrolle
10x PCR-Puffer	2,5 µl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	2,5 µl
sense-Primer	1 µl	1 µl
antisense-Primer	1 µl	1 µl
dNTP-Lösung	0,5 µl	0,5 µl
Taq Polymerase	0,25 µl	0,25 µl
cDNA	1,0 µl	-
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	16,25 µL	17,25 µl

Zunächst wurden die Proben im Thermocycler zur Denaturierung auf 94 °C erhitzt. Anschließend folgte das Annealing mit für jedes Primer-Paar optimierten Temperaturen. Danach erfolgte die Elongation bei 72 °C. Diese drei Zyklen wiederholten sich 40-mal, bevor die Proben bei 4 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt wurden.

Tabelle 10 listet die Basensequenzen, Positionen in der mRNA, Transkriptlängen und optimalen Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer-Paare für IFN- $\gamma$ -, IL-2-, CD25- und CD64-PCR auf. Das verwendete Thermocycler-Programm gibt Tabelle 11 wieder.

**Tab. 10: Informationen über die Primer-Paare zur Amplifikation von IFN- $\gamma$ -, IL-2-, CD25- und CD64-mRNA.**

Die jeweiligen Basensequenzen der verwendeten Primer-Paare (sense- und antisense-Primer), deren Position in der mRNA, sowie die Transkriptlänge in Basenpaaren (bp) und die jeweils optimale Annealing-Temperatur sind in der Tabelle aufgelistet.

Ziel-mRNA		Primersequenzen	Positionen	Transkriptlängen	Annealing-Temperaturen
IFN- $\gamma$	sense-	AGATGTAGCGGATAATGGAAC	255 - 275		
	antisense-	CTTGAATAACATAGCCTTGC	869 - 849	615 bp	60 °C
IL-2	sense-	ATGTACAGGATGCAACTCTGTCTT	295 - 319		
	antisense-	GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC	752 - 728	458 bp	59 °C
CD25	sense-	GGGATACAGGGCTCTACAC	621 - 639		
	antisense-	AGCACCTTTGATTCACTTGG	1062 - 1042	442 bp	59 °C
CD64	sense-	TGTTCCAAGAGGAAACCGTAACC	110 - 132		
	antisense-	TTAAAGGCTTTGCCATTTTCGATAGT	446 - 422	337 bp	61 °C

**Tab. 11: Thermocycler-Programm für IFN- $\gamma$ -, IL-2-, CD25- und CD64-PCR**

Die Tabelle gibt die jeweiligen Temperaturen und Zeitdauern der einzelnen PCR-Schritte an.

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	3 min
2.	94 °C	30 s
3.	siehe Tab .10	30 s
4.	72 °C	1 min
5.	72 °C	7 min
6.	4 °C	Pause

Die Schritte 2 bis 4 wurden 40-mal wiederholt

### Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Für ein 1 %iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 0,5x TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Wenn die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden 2,5  $\mu$ l Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5  $\mu$ g/ml) hinzu gegeben. Das Gel wurde

in eine Plastikgelkammer gegossen und nach Erstarren des Gels wurde dieses in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit 0,5x TBE-Laufpuffer bedeckt.

In die Geltaschen wurden 5 µl des PCR-Produkts beziehungsweise 5 µl eines Größenstandards (puc19/Mspl) und anschließend 1 µl 6x Ladepuffer pipettiert. Die Elektrophorese lief für ca. 30 min bei maximal 160 V. Unter UV-Licht konnte anschließend überprüft werden, ob sich Banden zeigten.

### 3.6.9 Zytokinbestimmungen

Als Hauptwirkung der therapeutischen Antikörper catumaxomab und ertumaxomab gilt die Aktivierung und Rekrutierung von T- und akzessorischen Zellen. Dies kann durch ein erhöhtes Vorkommen diverser Zytokine gezeigt werden. Mittels Zytokine Bead Array (CBA) wurden die Konzentrationen sechs verschiedener Zytokine bestimmt. CBA ist eine durchflusszytometrische Methode. Ein Zytokin-Detektionsgemisch mit sechs verschiedenen Latexpartikeln, an denen die jeweiligen Zytokin-spezifischen Primärantikörper gekoppelt waren, wurden mit den Proben und Phycoerythrin (PE)-konjugierten Sekundärantikörpern versetzt, welche gegen die jeweiligen Zytokine gerichtet waren. Nach Inkubation und Waschschritten konnte die Bestimmung an einem Durchflusszytometer erfolgen. Die Konzentrationen der einzelnen Zytokine wurden anhand von Standardgeraden ermittelt. Für die Standardgeraden wurden jeweils 9 Standardkonzentrationen (20, 40, 80, 156, 312, 625, 1250, 2500 und 5000 pg/ml) und eine Negativkontrolle verwendet. Dadurch lagen die Nachweisgrenzen zwischen 20 pg/ml und 5000 pg/ml.

**Tab. 12: Mit CBA gemessene Zytokine und ihre Funktionen.**

In der Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit mit CBA gemessenen Zytokine aufgelistet. Desweiteren sind diejenigen Zellen angegeben, die diese Zytokine vorrangig sezernieren, sowie die jeweiligen Zytokinfunktionen.

Zytokin:	Produktionszellen:	Funktionen:
IL-2	T <sub>H</sub> 1-Zellen	T-Zellproliferation
IL-4	T <sub>H</sub> 2-Zellen	aktiviert B-Zellen und bewirkt T <sub>H</sub> 1 Suppression
IL-6	T <sub>H</sub> 2-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	Initiierung von T- und B-Zellwachstum und Differenzierung
IL-10	T <sub>H</sub> 2-Zellen, Makrophagen	Suppressor von Makrophagenfunktionen
IFN-γ	T <sub>H</sub> 1-Zellen, NK-Zellen	Makrophagenaktivierung, erhöhte Expression von MHC und Antigenen, Ig-Klassenwechsel und T <sub>H</sub> 2 Suppression
TNF-α	Makrophagen, NK- und T <sub>H</sub> 1-Zellen	lokale Entzündungsreaktionen, Makrophagenaktivierung, Auslösung von Apoptose

Die Messung der in das Medium abgegebenen Mengen der Zytokine sollte Aufschluss darüber geben, ob T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen im Laufe der Versuchszeit aktiviert wurden. Dazu erfolgte während eines Versuchsdurchlaufs jeden zweiten Tag die Entnahme von 500 µl Medienüberstand aus den Spinnerflaschen. Eine anschließende Zentrifugation bei 15.000 x g ließ störende Zellen sedimentieren, der Überstand wurde in neue Gefäße überführt und bei -70 °C eingefroren. Die Proben wurden vom Kooperationspartner EUFETS GmbH mit dem Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) gemessen.

### **3.6.10 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung**

Der Einsatz des Immuntherapeutikums ertumaxomab ist von einer Überexpression des Oberflächenantigens Her2/neu abhängig. Es gibt eine Klassifizierung in vier Expressionsstärken, von 0 = keine Expression bis 3+ = besonders hohe Expression mit vorliegender Amplifikation. Durch eine Immunfluoreszenz-Färbung kann eine einfache Her2/neu-Expression detektiert werden, die Amplifikation jedoch muss durch eine weitere, sensitivere Methode bestätigt werden. Zu diesem Zweck wird FisH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) eingesetzt. FisH ist eine Methode zum Nachweis einzelner RNA- oder DNA-Abschnitte in Geweben, Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen. Dabei werden Fluorochrom-markierte, künstliche Sonden aus Nukleinsäuren verwendet, die komplementär zu dem gewählten Zielabschnitt sind.

Für FisH-Untersuchungen wurden Proben Her2/neu positiv-gefärbter Zelllinien aus den Kulturgefäßen gelöst und die Zellkonzentration bestimmt. Danach wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, zentrifugiert (5 min, RT,  $\approx 700 \times g$ ) und anschließend das Pellet mit 5 ml 1x PBS resuspendiert. Jeweils 250 µl dieser Zellsuspension wurden in die Mikrogefäße des Cytocontainers (Abbildung 7) gegeben. Nach der Zentrifugation (3 min, RT,  $\approx 700 \times g$ ) wurden die Objektträger vorsichtig aus den Cytocontainern entnommen, beschriftet und über Nacht an der Luft getrocknet. Die Objektträger wurden bei -20 °C gelagert und anschließend mit Trockenis verpackt zur weiteren Untersuchung zu TRION Pharma nach München verschickt. Dort wurde die Methode freundlicherweise durchgeführt. Markiert wurden jeweils Her2/neu-Genabschnitte, sowie zur Kontrolle das Zentromer von Chromosom 17.

### 3.7 Statistik

Für die Darstellung von Zelldichten, Sphäroidgrößen, Zellvitalität und Kolonienbildung wurden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der gemessenen Daten bestimmt und verwendet. Bei einigen Abbildungen sind die ermittelten SD aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Die Analyse der Wachstumsgeschwindigkeiten der Zelllinien erfolgte über lineare Regressionen der exponentiellen Wachstumsphasen in halb-logarithmischer Darstellung (nicht gezeigt). Mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichungen wurden die Verdopplungszeiten berechnet.

Für die Darstellungen der durchflusszytometrischen Ergebnisse der PBMC-Subpopulationen nach Isolation aus Buffy Coats wurden die Daten mit Box-and-Whisker-Darstellung zusammengefasst. Die Boxen zeigen MW  $\pm$  SD sowie den Median, die Whisker zeigen den jeweils maximal und minimal gemessenen Wert. Die Berechnung der Box-and-Whisker-Blots erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm Origin (OriginLab Corporation).

Bei den Analysen von Dosis-Wirkungsversuchen wurden deskriptive Regressionsanalysen mit Excel berechnet. Es kamen nicht-lineare Regressionen - in Form exponentieller und logarithmischer Kurvenfits - zur Anwendung. Die jeweils erhaltenen Gleichungen und Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) sind in den Abbildungen wiedergegeben. Das Signifikanz-Niveau ( $p$ ) des exponentiellen Fits wurde mit Excel durch einen T-Test ermittelt. Bei den logarithmischen Fits wurden Spearman-Rangkorrelationen nach folgender, vereinfachter Formel durchgeführt:

$$r_s = 1 - \frac{\sum_i d_i^2}{n * (n^2 - 1)}$$

Hierbei ist  $d_i$  die jeweilige Differenz der Ränge und  $n$  die Anzahl der verglichenen Ränge.  $R_s$  ist Spearmans Rangkorrelationskoeffizient.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Merkmale und Eignung verschiedener Tumorzelllinien**

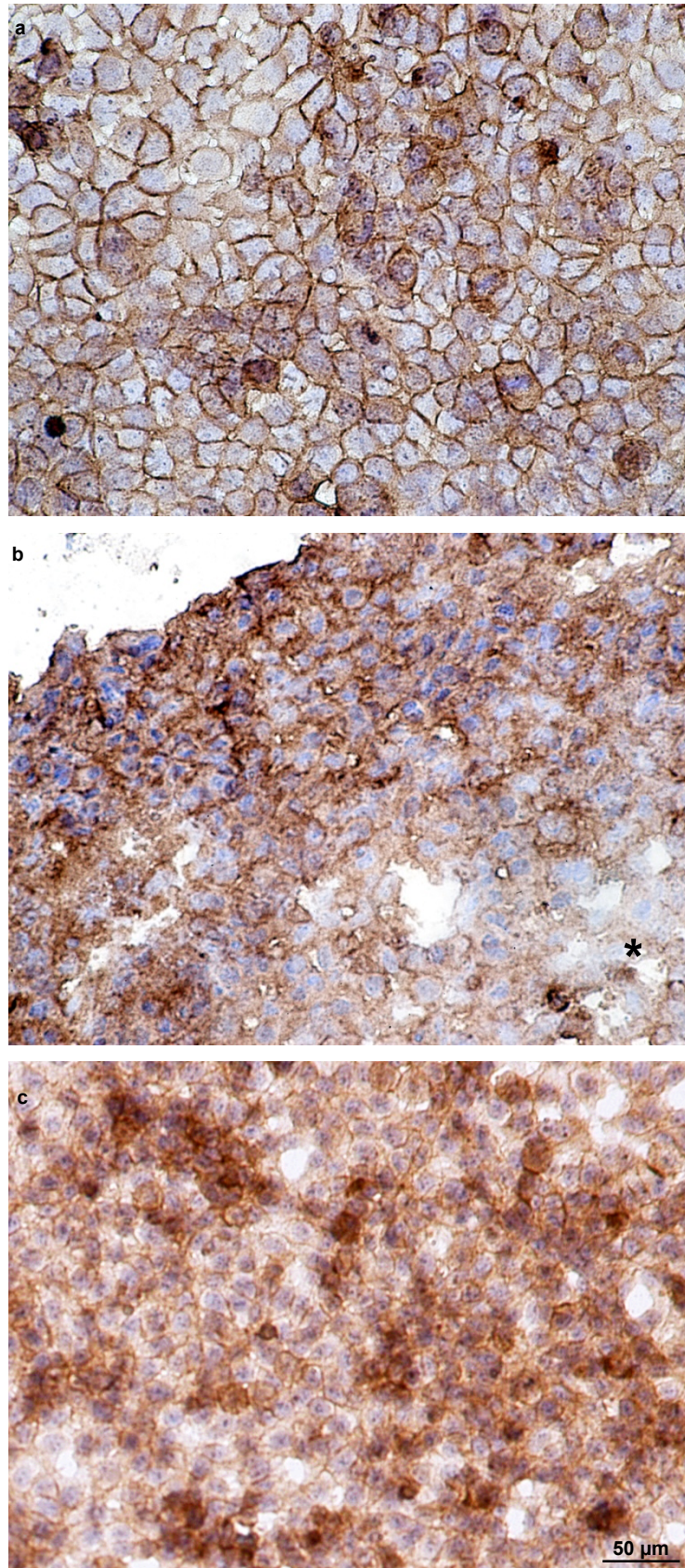
In der vorliegenden Arbeit wurden 27 Zelllinien auf ihre Eignung für die Versuchsreihen getestet. Die Verwendung der Zelllinien war von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Zellen mussten in der Lage sein, Sphäroide auszubilden, die stabil genug für eine Kultur in Spinner-Flaschen waren, und die gleichzeitig die für die Therapie relevanten Antigene EpCAM oder Her2/neu exprimierten. Hierfür wurden einige Zelllinien, deren Expressionsniveau der Antigene bekannt war, auf Sphäroidbildung getestet. Nachdem diese Zelllinien aus verschiedenen Gründen für die Versuche ausgeschlossen werden mussten, wurden Zelllinien, von denen die Fähigkeit bekannt war Sphäroide bilden zu können, auf ihre EpCAM- beziehungsweise Her2/neu-Expression getestet. Außerdem wurden Zelllinien, die im Labor für andere Untersuchungen kultiviert wurden, routinemäßig auf Sphäroidbildung und Antigen-Expression untersucht.

#### **4.1.1 Antigen-Expressionen**

Die Untersuchung auf Expression der Antigene EpCAM oder Her2/neu wurde für die Zelllinien FaDu, HCT-116, HT-29, SAS und WiDr mit immunhistochemischen Methoden durchgeführt. Die Zelllinie BT-474, deren Her2/neu-Expression bekannt war, diente dabei als Positivkontrolle. Andere Zelllinien wurden nicht untersucht, weil sie zuvor auf Grund fehlender oder zu instabiler Sphäroidausbildung als ungeeignet aussortiert worden waren, oder die Antigenexpression bereits bekannt war. Es wurden sowohl Monolayer-Präparate als auch Gefrierschnitte von Sphäroiden gefärbt, da das Expressionsniveau in beiden Kultivierungsformen voneinander abweichen kann.

##### **4.1.1.1 EpCAM**

Der Nachweis einer EpCAM-Expression der Zelllinien FaDu und HCT-116 erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern an Präparaten von Einzelzellsuspensionen, sowie an Sphäroid-Gefrierschnitten. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse dieser Färbungen.



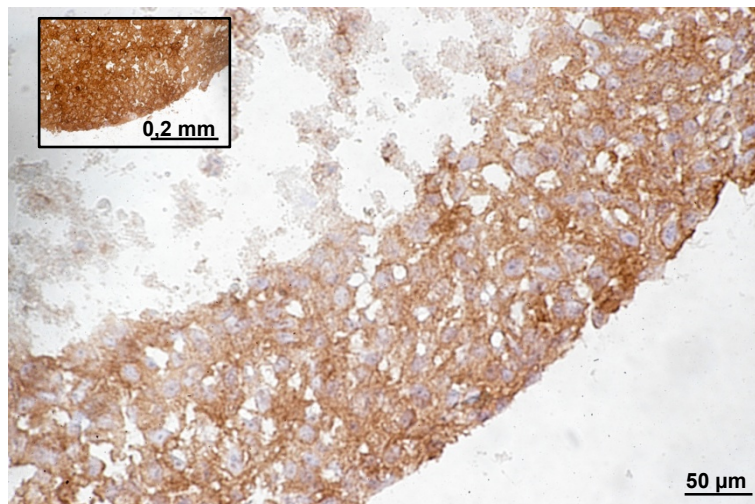
**Abb. 11: EpCAM-Färbungen der Zelllinien FaDu und HCT-116.**  
FaDu-Monolayer-Zellen eines FlexiPERMs (a), eines FaDu-Sphäroid-Gefrierschnitts (b) und HCT-116-Monolayer-Zellen eines FlexiPERMs (c) konnten immunhistochemisch positiv mit einem Antikörper gegen EpCAM markiert werden (braune Färbung). Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalaun.



Da EpCAM ein Oberflächenmolekül ist, ist die EpCAM-Expression durch die braune Färbung der Zellmembranen zu erkennen. Dies ist sowohl bei den in den Abbildungen 11a und 11c gezeigten FaDu und HCT-116 Monolayer-Zellen, als auch bei dem in Abbildung 11b gezeigten Gefrierschnitt eines FaDu Sphäroids sichtbar. Die Färbung des FaDu-Sphäroids scheint, verglichen mit dem Präparat der FaDu-Monolayer-Zellen, etwas inhomogener, da sich die Zellen des Sphäroids im äußeren Bereich der vitalen Randschicht teilen und dadurch die Zelldichte größer ist. Nach Innen hin bildet sich eine Nekrose aus, die sich durch teilweises Auflösen der Zellmembranen kennzeichnet. Daher ist dort (\*) auch die Kerngegenfärbung mit Häma-laun nicht so intensiv wie in der vitalen Randschicht. Die Färbung der HCT-116 Monolayer erscheint ebenfalls inhomogen, da die Zellen so dicht wuchsen, dass sie bereits an einigen Stellen mehrere Schichten bildeten. Übereinanderliegende Zellen erscheinen im Bild dunkler.

### 4.1.1.2 Her2/neu

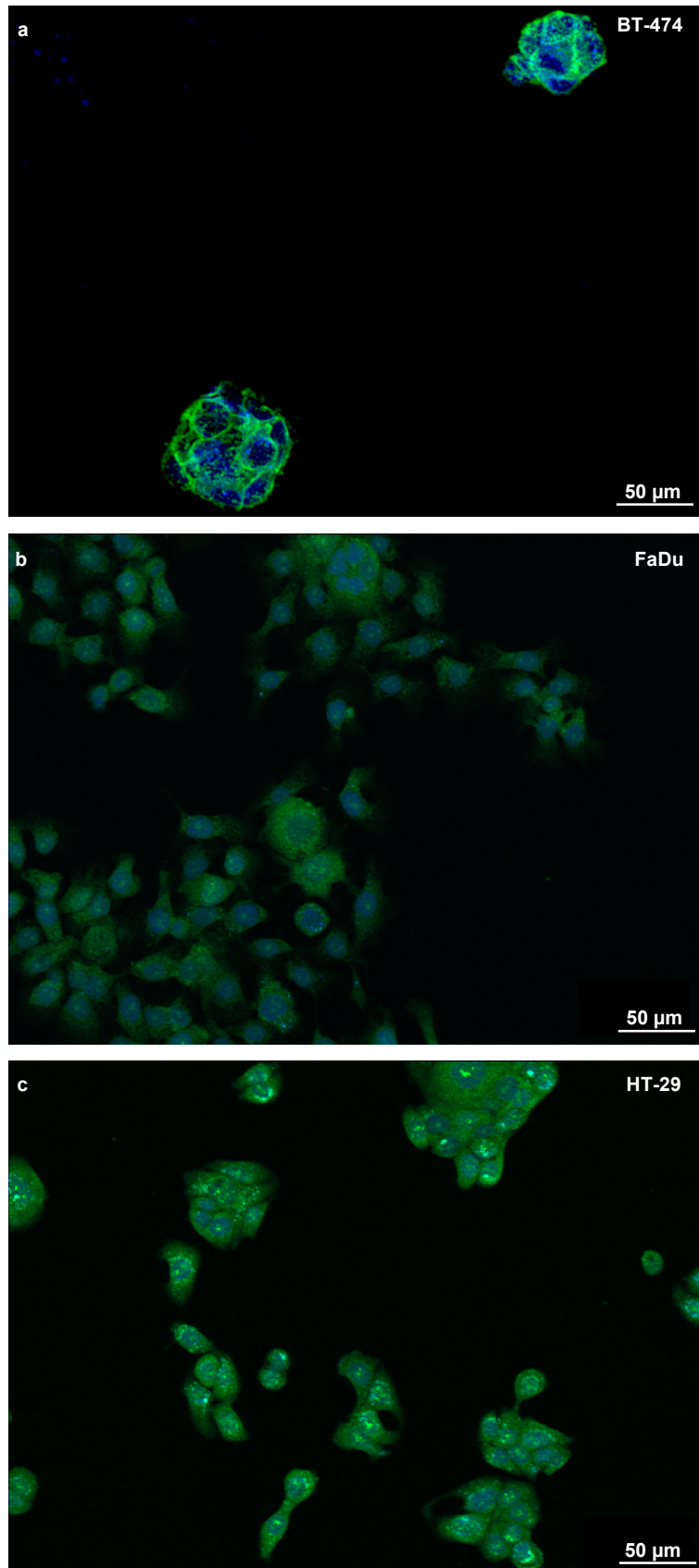
Die Färbung von Her2/neu wurde ebenfalls mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern, sowie zusätzlich mit Fluoreszein-gekoppelten Antikörpern durchgeführt (Abbildungen 12 und 13).



**Abb. 12: Her2/neu-Färbung eines FaDu-Sphäroids.**

Der Gefrierschnitt (10 µm) eines FaDu-Sphäroids wurde immunhistochemisch positiv mit einem Antikörper gegen Her2/neu markiert (braune Färbung). Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalan. Zum Vergleich ist in der kleinen Abbildung die EpCAM-Färbung eines Parallelschnittes nach gleichem Protokoll gezeigt. Diese Färbung zeigt eine wesentlich stärkere Expression von EpCAM im Vergleich zu Her2/neu.

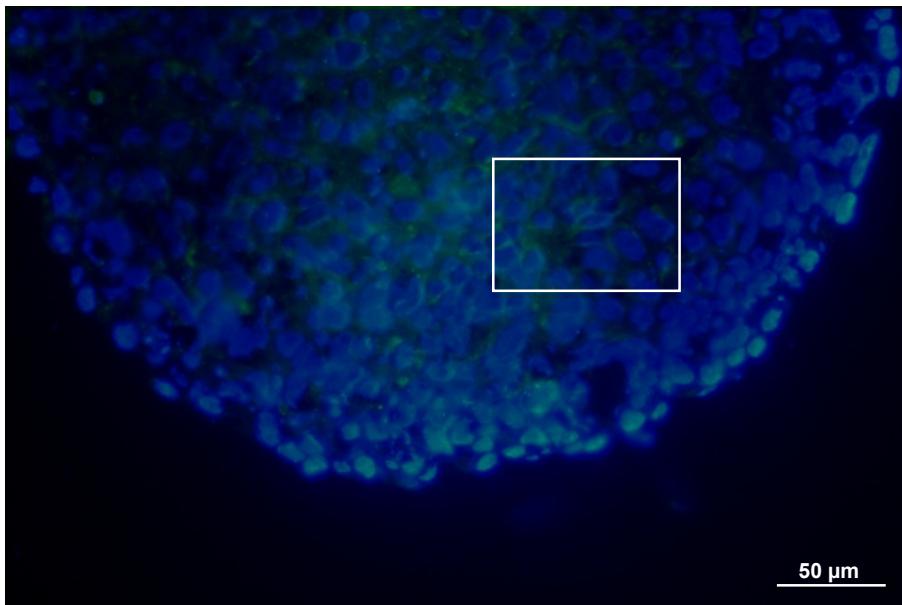
Eine Her2/neu Expression der FaDu Sphäroidzellen ist an der braunen Färbung erkennbar. Im Vergleich mit einer unter gleichen Bedingungen durchgeführten EpCAM-Färbung (im Bild links oben) eines Parallelschnittes ist die Färbung deutlich schwächer.



**Abb. 13: Her2/neu-Fluoreszenz-Färbungen von Monolayer-Zellen.** BT-474-Monolayer-Zellen (a), FaDu-Monolayer-Zellen (b) und HT-29-Monolayer-Zellen (c) wurden mit Fluoreszeinkoppelten Antikörpern gegen Her2/neu positiv markiert (grüne Färbung). Die Zellen wurden mit Hilfe eines FlexiPERMs auf einem Objektträger kultiviert. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit DAPI.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung kam die Zelllinie BT-474 als Positivkontrolle zum Einsatz (Abbildung 13a). Neben der deutlichen Her2/neu Färbung (grün), ist die typische Wuchsform der BT-474 Monolayer Zellen zu erkennen. Die Zellen bilden keinen dichten, flachen Zellrasen sondern wachsen spontan in einzelnen sphärischen Zell-Clustern. Eine positive Markierung von Her2/neu konnte an den Zelllinien FaDu und HT-29 gezeigt werden (Abbildung 13b & 13c), allerdings hatten die Färbungen eine schwächere Intensität als bei BT-474.

Im Vergleich der beiden Färbungen ist die Fluoreszenzfärbung sensitiver und verspricht Ergebnisse mit besserer optischer Auflösung. Die Immunfluoreszenz Färbung von Her2/neu gelang auch an Gefrierschnitten von Sphäroiden der Zelllinien SAS und WiDr. In Abbildung 14 ist die Her2/neu Färbung eines SAS-Sphäroids wiedergegeben.

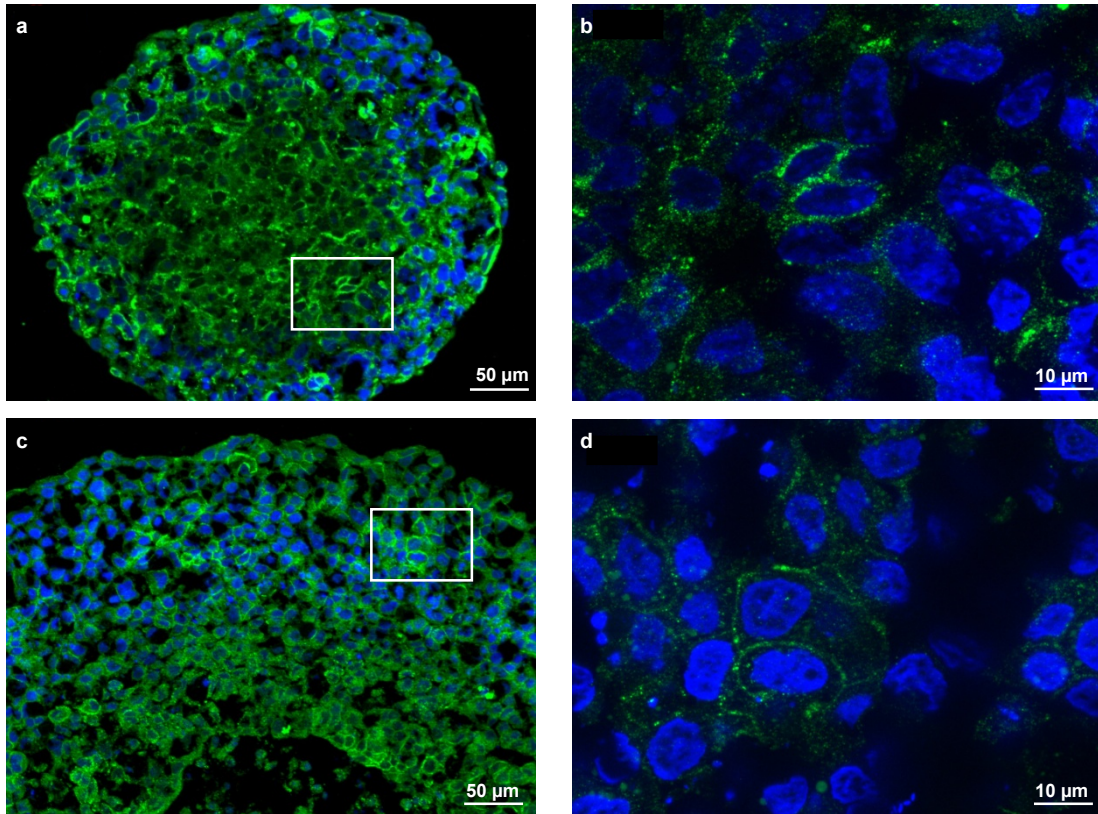


**Abb. 14: Her2/neu-Fluoreszenz-Färbung am Gefrierschnitt eines SAS-Sphäroids.**

Ein Gefrierschnitt eines SAS-Sphäroids wurde mit einem Fluoreszein-gekoppelten Antikörper gegen Her2/neu gefärbt (grün). Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit DAPI. Beide Farbkanäle wurden an einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und anschließend überlagert. In die Abbildung eingefügt ist der Ausschnitt, der in der folgenden Abbildung vergrößert dargestellt ist.

Die im Mikroskop deutlich sichtbare positive Markierung der Zellen kommt in dieser Darstellung nicht hervor. Die Abbildung ist durch Überlagerung zweier Aufnahmen (grün und blau) mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop (Adobe) entstanden. Der in die Abbildung eingefügte Kasten zeigt denselben Ausschnitt, der auch in Abbildung 15a eingezeichnet und 15b vergrößert dargestellt ist, diese Abbildung wurde von demselben Objekt an einem moderneren Fluoreszenzmikroskop mit Apotomfunktion (Zeiss, Oberkochen) erstellt. Diese Methode macht es möglich, Streulicht wegzurechnen und einzelne optische Schnittebenen eines Präparates auf-

zunehmen. Erst mit dieser Art von Mikroskopie konnte die membranständige Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht werden. Auch die Aufnahme des WiDr-Sphäroids in Abbildung 15c & d wurde mit diesem modernen Fluoreszenzmikroskop gemacht.



**Abb. 15: Her2/neu-Fluoreszenz-Färbungen an SAS- und WiDr-Sphäroiden.**

Gefrierschnitte (10 µm) eines SAS-Sphäroids (a) und eines WiDr-Sphäroids (c) wurden mit einem Fluoreszeinkoppelten Antikörper gegen Her2/neu positiv gefärbt. Die grüne Färbung zeigt das membranständige Her2/neu, die blaue die Kerngegenfärbung mit DAPI. (b) und (d) zeigen die jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen aus (a) und (c). Diese Aufnahmen entstanden an einem Fluoreszenz-Mikroskop mit Apotom-Funktion.

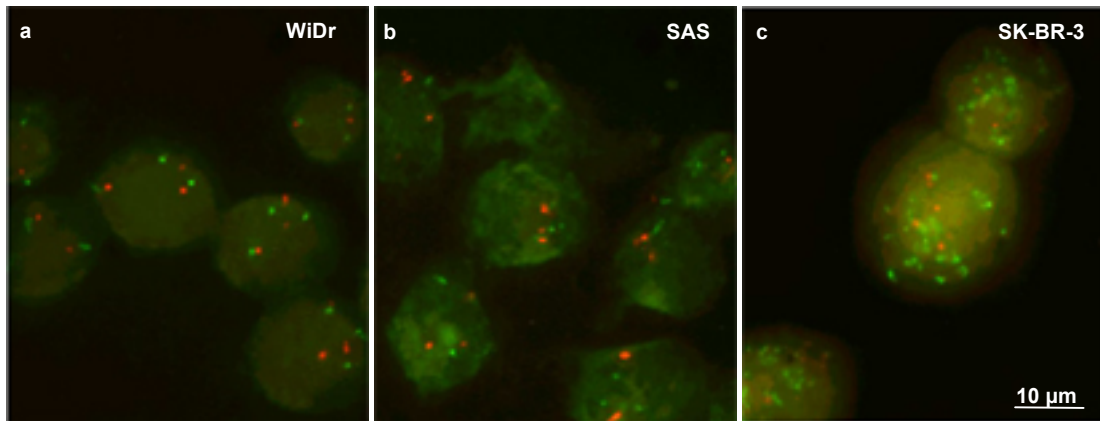
Die Her2/neu Expression der SAS-Sphäroidzellen tritt hier deutlicher hervor. Während die Übersichtsdarstellung (a) noch keine spezifische Färbung zeigt, wird in der Vergrößerung (b) deutlicher, dass die Färbung an den Zellmembranen liegt. Gleiches gilt für die Färbung eines WiDr-Sphäroids (c, d).

### 4.1.1.3 Analyse des Her2/neu Amplifikationsgrades

Das momentan auf dem Markt befindliche Antikörper-Präparat Herceptin® darf nur Patienten mit deutlicher Her2/neu-Überexpression verabreicht werden, aus diesem Grund ist die Kenntnis über das Her2/neu -Expressionsniveau der Tumorzellen wichtig. Die Einteilung der Her2/neu-Expression eines Tumors erfolgt in Stufen von 0 bis dreifach positiv. Eine Unterscheidung zwischen zwei- und dreifach positiv muss dabei mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung getroffen werden, da die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Bilder dafür nicht exakt genug ist.

Nach positiver Her2/neu-Immunfluoreszenzfärbung wurden deshalb Proben der entsprechenden Zelllinien von dem Kooperationspartner TRION Research einer standardisierten FisH-Analyse unterzogen.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse einer FisH-Analyse bezüglich der Amplifikation des Her2/neu Gens der Zelllinien WiDr, SAS und SK-BR-3. WiDr- und SAS-Zellen zeigen keine Amplifikation des Her2/neu-Gens, da die Zentromeranzahl von Chromosom 17 (rot) gleich der Her2/neu-Gen-Kopien-Anzahl (grün) ist. Als Kontrolle dienten in der Auswertung SK-BR-3-Zellen, deren Her2/neu-Überexpression bekannt ist (Lu et al., 2001). Dort ist die Her2/neu-Amplifikation auf Grund der deutlich höheren Anzahl der Gen-Kopien verglichen mit der Anzahl markierter Zentromere von Chromosom 17 eindeutig ersichtlich.



**Abb. 16: Her2/neu-Amplifikationsanalyse mit FisH.**

Zytospine der Zelllinien WiDr (a), SAS (b) und SK-BR-3 (c) wurden mit der FisH-Methode auf Her2/neu-Amplifikation untersucht. In rot ist das Zentromer von Chromosom 17 markiert, in grün die Her2/neu-Gen-Kopien. Nur die SK-BR-3-Zellen zeigen eine Genamplifikation, dort wurden deutlich mehr Gen-Kopien als Zentromere von Chromosom 17 markiert.

Die Zelllinien SAS und WiDr exprimieren zwar Her2/neu, deutlich sichtbar gemacht durch die Fluoreszenzfärbungen, aber bei beiden Zelllinien liegt keine Gen-Amplifikation vor. Für eine Therapie mit Herceptin® kämen sie nicht in Frage, würde eine Behandlung mit ertumaxomab zu Erfolg führen spräche dies für eine höhere Sensitivität dieses Antikörpers.

### 4.1.2 Tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Zelllinien

In Tabelle 13 sind alle getesteten Zelllinien aufgeführt. Dabei wird die Antigen-Expression, falls bekannt, angegeben, außerdem die Fähigkeit, Sphäroide bilden zu können, und gegebenenfalls Argumente gegen einen Einsatz für die Versuche.

**Tab. 13: Merkmalsliste der getesteten Zelllinien.**

Die im Laufe der Arbeit getesteten Zelllinien sind alphabetisch aufgeführt. Die bekannte beziehungsweise in dieser Arbeit getestete EpCAM- oder Her2/neu-Expressionen, sowie die Fähigkeiten, Sphäroide bilden zu können (- = bilden keine Sphäroide; (+) = bilden Sphäroide, wurden jedoch nicht verwendet; + = bilden Sphäroide und wurden verwendet) sind angegeben. In der letzten Spalte sind die Gründe genannt, weshalb eine Zelllinie nicht für Versuche eingesetzt wurde. (n.b. = nicht bekannt; Fett = von diesen Linien sind in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse gezeigt)

Zelllinie	Antigen-Expression	Sphäroidbildung	Wenn (+), warum
786-O	n.b.	(+)	Sphäroide zu klein und instabil
A-549	n.b.	-	
<b>BT-474</b>	Her2/neu	(+)	Sphäroide lösen sich bei AK-Zugabe sofort auf
Cal-33	n.b.	(+)	Sphäroide zu klein und unregelmäßig
CCF-RC-1	n.b.	-	
Col-205	Her2/neu	(+)	Sphäroide zu klein und unregelmäßig
Du145	Her2/neu	(+)	Sphäroide zu klein und wachsen nicht
<b>FaDu</b>	EpCAM / Her2/neu	+	
HCT-8	Her2/neu	(+)	Sphäroide zu unregelmäßig
HCT-15	Her2/neu	(+)	Sphäroide zu klein und unregelmäßig
<b>HCT-116</b>	EpCAM	+/(+)	Versuche mit catumaxomab abgeschlossen
HSC-4	n.b.	(+)	Sphäroide klein und wachsen nicht
<b>HT-29</b>	Her2/neu	+	
IGROV-1	n.b.	-	
MCF-7	Her2/neu	(+)	sehr unregelmäßig
MDA-MB-231	Her2/neu	-	
MDA-MB-453	Her2/neu	-	
OC-316	n.b.	-	
<b>SAS</b>	Her2/neu	+	
<b>SK-BR-3</b>	Her2/neu	(+)	Sphäroide unregelmäßig, klein und instabil
SK-OV-3	Her2/neu	-	
T-47-D	Her2/neu	(+)	Sphäroide unregelmäßig, empfindlich
U87	n.b.	-	
UT-SCC-5	n.b.	(+)	Sphäroide zu klein und unregelmäßig
UT-SCC-14	n.b.	-	
<b>WiDr</b>	Her2/neu	+	

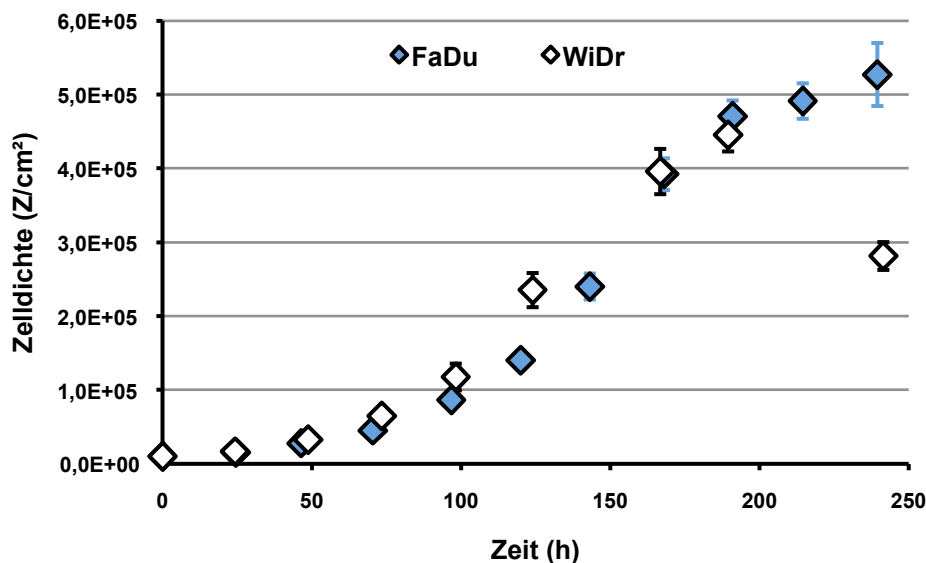
Die Zelllinie FaDu erwies sich als geeignet für die Versuche mit catumaxomab und konnte für umfangreiche Versuche eingesetzt werden. Die Suche nach einer Her2/neu exprimierenden Zelllinie die gleichzeitig Sphäroide bilden konnte welche stabil genug waren, um die Suspensions-Kultur in der Spinner-Flasche zu überstehen, verlief weniger erfolgreich. Entweder konnten die Zelllinien keine Sphäroide bil-

den oder diese lösten sich durch die Rotation in der Spinner-Flasche auf. Einige Zelllinien bildeten zwar stabile Sphäroide, die sich jedoch kurz nach Zugabe der Antikörper und der PBMC vollkommen auflösten (z.B. BT-474 und HT-29).

## 4.2 Sphäroidkultivierung

### 4.2.1 Vorbereitende Monolayer-Kultivierung

Für die Sphäroidinitierung sollten sich die Zellen immer in der exponentiellen Phase des Wachstums befinden, da sie in dieser Phase am stärksten proliferieren. Aus diesem Grund war es wichtig, das Wachstumsverhalten der Monolayer-Zellen und somit die exponentielle Wachstumsphase zu kennen. Für alle verwendeten Zelllinien wurden deshalb zunächst Wachstumskurven erstellt, daraus konnten die Wachstumsgeschwindigkeiten der Zelllinien während der exponentiellen Wachstumsphasen errechnet werden. Es konnten zwei unterschiedliche Wachstumsverhalten beobachtet werden: Eine Gruppe von Zelllinien wuchs initial langsam, um nach einigen Tagen in die exponentielle Phase überzugehen. Nach einigen weiteren Tagen entstand ein Plateau, welches über eine längere Zeit stabil blieb. Bei einer anderen Gruppe zeigte sich eine solche Plateau-Phase nicht, stattdessen reduzierte sich die Zelldichte sofort nach Erreichen eines Maximums, die Zellen starben. Am Beispiel der Zelllinien FaDu und WiDr sind diese Wachstumsverhalten in Abbildung 17 gegenübergestellt.

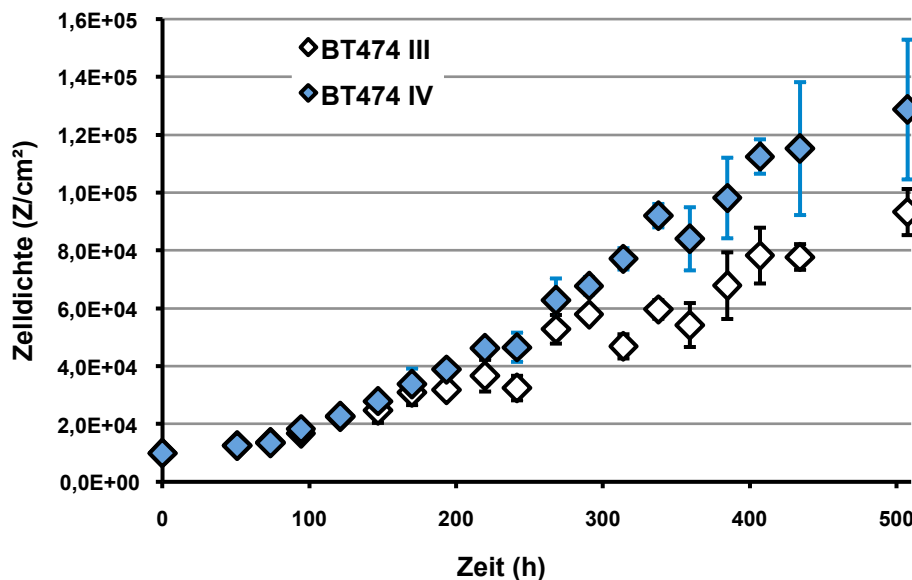


**Abb. 17: Wachstumskurven von FaDu- und WiDr-Monolayer-Zellen.**

Dargestellt sind die Zelldichten ( $Z/\text{cm}^2$ ) von FaDu- (blau) und WiDr-Zellen (weiß) im Verlauf der Zeit (h). MW und SD von Vierfach-Bestimmungen sind angegeben. Die Zellen wurden mit  $1 \cdot 10^4 Z/\text{cm}^2$  ausgesät.

Die aus den Daten berechneten Verdopplungszeiten während der exponentiellen Phasen betragen 30,72 h für die Zelllinie FaDu und 26,9 h für die Zelllinie WiDr. Die Verdopplungszeiten der Zelllinien SAS, HT-29 und HCT-116 lagen ebenfalls in diesem Bereich (ohne Abbildung).

Eine Ausnahme von diesen Wachstumsverhalten bildete die Zelllinie BT-474, die nur äußerst langsam wuchs und keinen dichten Zellrasen ausbildete (siehe Abbildung 13a). Aus diesem Grund wurde durch Wechsel der Nährmedienzusammensetzung versucht, die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zelllinie zu erhöhen. Abbildung 18 zeigt die Wachstumskurve der Zelllinie BT-474 und das Resultat eines Serumwechsels auf das Wachstum.



**Abb. 18: Wachstumskurven von BT474-Zellen.**

Dargestellt ist die Zelldichte ( $Z/\text{cm}^2$ ) von BT474-Zellen im Verlauf der Zeit (h). MW und SD von Vierfach-Bestimmungen sind angegeben. Die Zellen wurden mit  $1 \cdot 10^4$   $Z/\text{cm}^2$  ausgesät. Für die beiden Versuche wurden die Nährmedien mit Seren verschiedener Firmen versetzt. (blaue Rauten = Serum der Firma PAN, weiße Rauten = Serum der Firma PAA)

Beide BT-474 Kurvenverläufe sehen annähernd gleich aus. Die berechneten Verdopplungszeiten ergaben jedoch einen Unterschied von ca. 11 h. Im Versuch BT474 III (mit Serum der Firma PAA) lag eine Verdopplungszeit von 88,55 h vor, und im Versuch BT474 IV (mit Serum der Firma PAN) konnte diese Zeit auf 77,5 h gesenkt werden.

Verglichen mit dem Wachstumsverhalten der Zelllinien FaDu und WiDr fällt auf, dass auch nach doppelt so langer Kultivierung (20 Tage) von BT474-Zellen nur etwa 30 % der maximalen Zelldichte der beiden anderen Zelllinien (max.  $1,3 \cdot 10^5$  statt  $5,3 \cdot 10^5$   $Z/\text{cm}^2$ ) erreicht wurde. Die durchschnittlichen Zelldurchmesser lagen für BT-



474-Zellen bei 21  $\mu\text{m}$ , für WiDr-Zellen bei 17  $\mu\text{m}$  und für FaDu-Zellen bei 18  $\mu\text{m}$ . Die Bewuchsfläche war also nicht der limitierende Faktor.

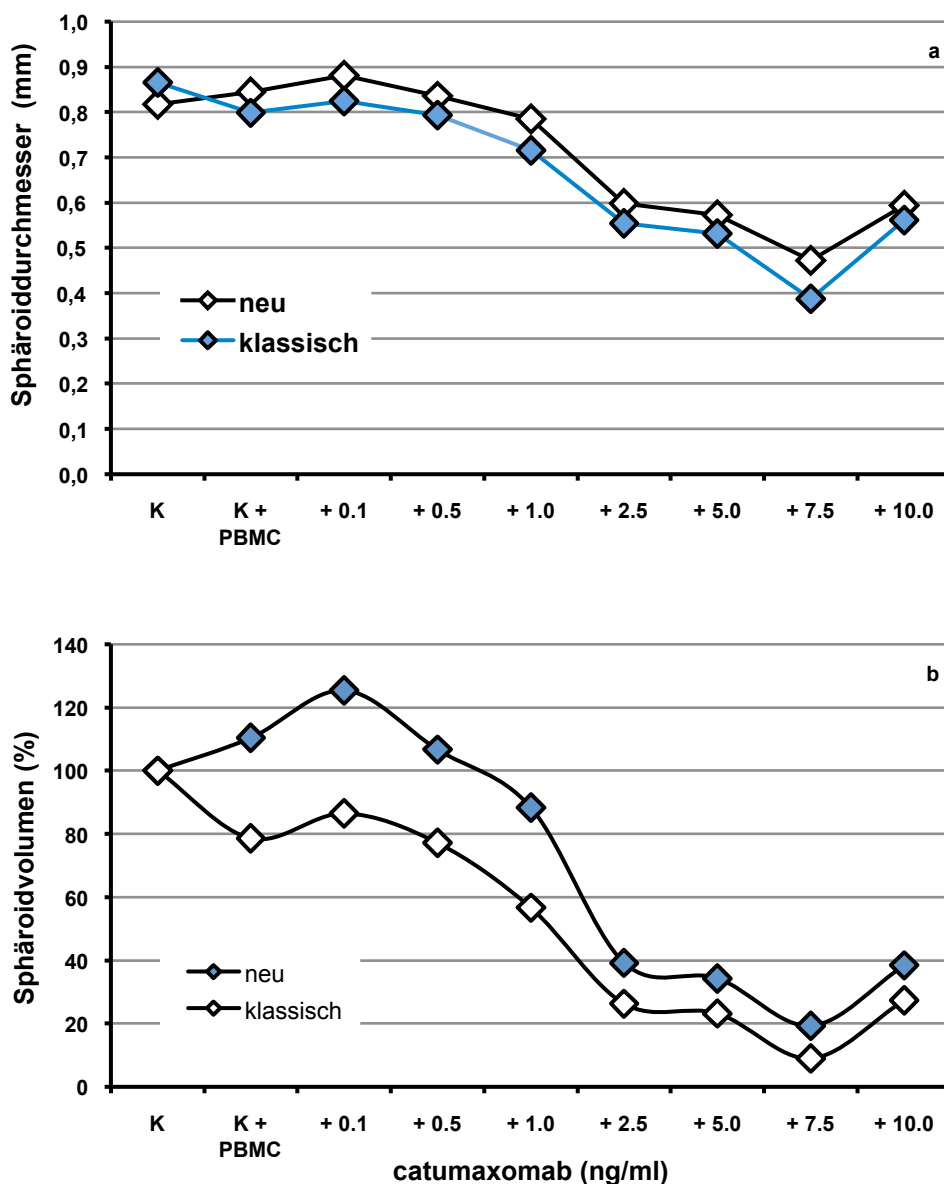
Wie eingangs erwähnt, sollten sich die Zellen für die Sphäroidinizierung immer in der exponentiellen Phase des Wachstums befinden. Für die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien bedeutete das: FaDu- und WiDr-Zellen wurden sieben Tage nach Aussaat mit 0,5 oder  $1 \cdot 10^4$  Z/cm<sup>2</sup> zur Sphäroidinizierung eingesetzt, gleiches galt für SAS-, HT-29- und HCT-116-Zellen. BT-474-Zellen dagegen mussten mit deutlich höherer Dichte ( $3 \cdot 10^4$  Z/cm<sup>2</sup>) ausgesät werden worauf das Ernten der Zellen erst nach drei Wochen in Kultur erfolgte. Darüber hinaus wurden für Versuche mit dieser Zelllinie mehr Kulturgefäße verwendet als bei den anderen Zelllinien. Dahingegen dauerte die Zeit, welche die Zellen benötigten, um sich zu stabilen Sphäroiden zusammenzulagern bei BT-474-Zellen 24 h und bei den anderen Zelllinien 8-10 d. Die Sphäroide wuchsen in der Regel nach Initiation bis zu 40 Tage gleichmäßig.

### **4.2.2 Messmethoden zur Größenbestimmung der Sphäroide**

Ein wichtiges Kriterium, um den Effekt einer Behandlung auf die Sphäroide zu analysieren, war die Bestimmung der Größe der Sphäroide. Die Bestimmung der Sphäroidgrößen erfolgte mit zwei unterschiedlichen Verfahren, die im Material- & Methodenteil näher erläutert werden (siehe 3.6.2): die klassische Größenbestimmung sowie eine neue Software-gestützte Messung. Bei der Entwicklung der neuen Methode musste darauf geachtet werden, dass durch die Bearbeitung am PC die Objekte nicht in ihrer Größe verändert wurden. Dazu wurden Vergleichsmessungen mit beiden Methoden durchgeführt.

In Abbildung 19 exemplarisch dargestellt sind blau: Ergebnisse der klassischen mikroskopischen Größenbestimmung und weiß: Resultate mit der neuen Software-basierten Auswertung. Als erster Anhaltspunkt für einen Vergleich dienten die mittleren Durchmesser. In dem gezeigten Beispiel (Abbildung 19 a) unterscheiden sich diese bei fast allen Ansätzen um etwa 50  $\mu\text{m}$ . Da alle Darstellungen von Sphäroidgrößen mit relativen Sphäroidvolumina erfolgen sind in Abbildung 19 b die entsprechenden berechneten relativen Sphäroidvolumina dargestellt. Die zunächst gleichmäßigen Differenzen der Durchmesser wirken sich prozentual sehr unterschiedlich auf die Volumina aus. Abbildung 19 verdeutlicht die Wichtigkeit, die neue Methode zu perfektionieren, da auch nur geringe Abweichungen bei der Durchmesser-Bestimmung zu deutlich falschen Sphäroidvolumina führen können.

## Ergebnisse



**Abb. 19: Vergleich der klassischen und der Software-gestützten Größenbestimmungsmethode.**

Die Resultate der beiden angewandten Größenbestimmungen sind am Beispiel von FaDu-Sphäroiden, die mit ertumaxomab behandelt wurden, gezeigt. Dargestellt sind die mittleren Sphäroiddurchmesser (mm) in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis ertumaxomab (ng/ml) nach sieben Tagen Behandlung (a) und die entsprechenden Volumina (%) (b). Die gezeigten Punkte repräsentieren Mittelwerte aus jeweils > 10 Messungen.

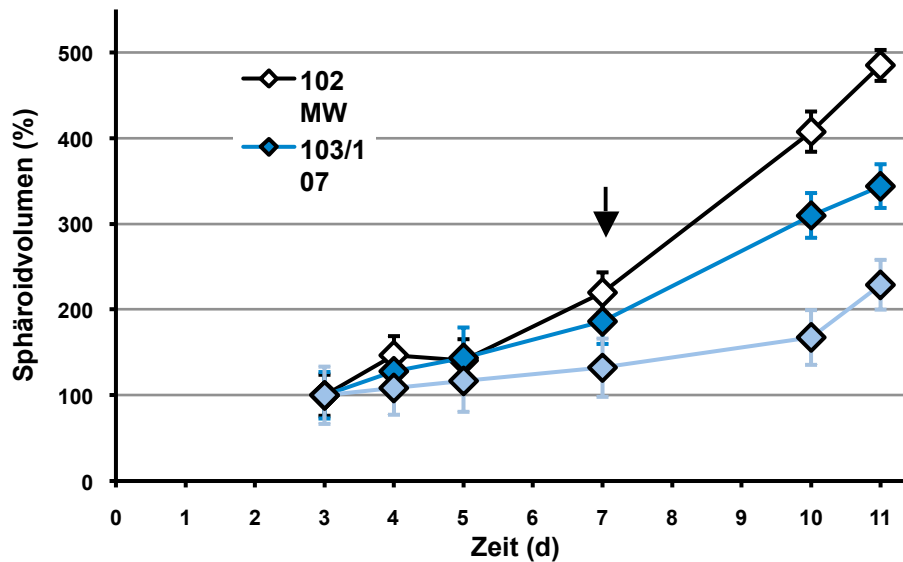
Durch wiederholte Vergleiche der beiden Methoden und anschließende Fehlersuche und -elimination wurden solche Differenzen vermieden. Die neue Methode wurde erfolgreich etabliert und im Folgenden präferiert eingesetzt.

### 4.2.3 Einflüsse auf das Größenwachstum der Sphäroide

Für Versuche, die über einen längeren Zeitraum erfolgen sollten, war es wichtig, das Wachstumsverhalten der Sphäroide in den Spinner-Flaschen unter verschiedenen Bedingungen zu kennen. Abbildung 20 gibt die Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens von Medienwechseln und der Menge der eingesetzten Sphäroide wieder.

## Ergebnisse

Dafür wurden SAS-Sphäroide über 11 Tage beobachtet. Die Ansätze unterschieden sich entweder in der Sphäroidmenge oder darin, dass ein Medienwechsel vollzogen wurde oder nicht.



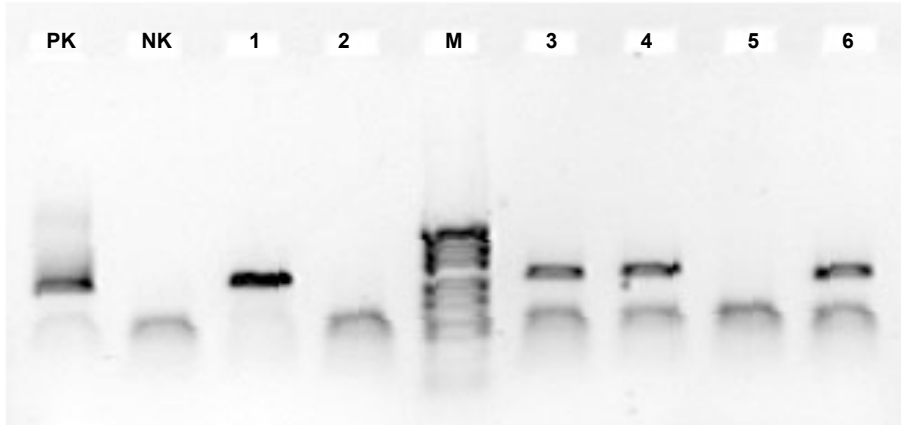
**Abb. 20: Durchmesser unbehandelter SAS-Sphäroide in der Spinner-Flaschen-Kultivierung.**

SAS-Sphäroide wurden in unterschiedlicher Menge (102 (weiß), 103, 107 (dunkelblau, gemittelt) und 223 Stück (hellblau)) mit 20 ml Medium in miniaturisierte Spinner-Flaschen gegeben und zu den angegebenen Zeitpunkten (d) wurde das mittlere relative Volumen (%)  $\pm$ SD (%) bestimmt. Bei dem Ansatz 102 MW wurde nach 7 Tagen einmalig ein Medienwechsel (MW) vollzogen (Pfeil).

Die Abbildung zeigt das Wachstum unbehandelter SAS-Sphäroide im Verlauf der Zeit nach dem Umsetzen in die Spinner-Flaschen. Liegen mehr Sphäroide in der Spinner-Flasche vor, so wachsen diese deutlich langsamer (223), ein Medienwechsel nach sieben Tagen (102 MW) erhöht dagegen die Wachstumsgeschwindigkeit, dies ist daran zu erkennen, dass sich ab diesem Zeitpunkt die beiden Kurven 102 MW und 103/107, in denen vergleichbar viele Sphäroide waren, trennen.

#### 4.2.4 Untersuchungen auf Mykoplasmen-Kontaminationen

Eine Kontamination mit Mykoplasmen ist in der Zellkultur unerwünscht. Aus diesem Grund wurden regelmäßig Tests auf Mykoplasmen-Kontamination durchgeführt. Dafür kamen zwei Methoden zur Anwendung. Ein Nachweis geschah über die PCR-Amplifikation der Mykoplasmen-DNA (Abbildung 21).

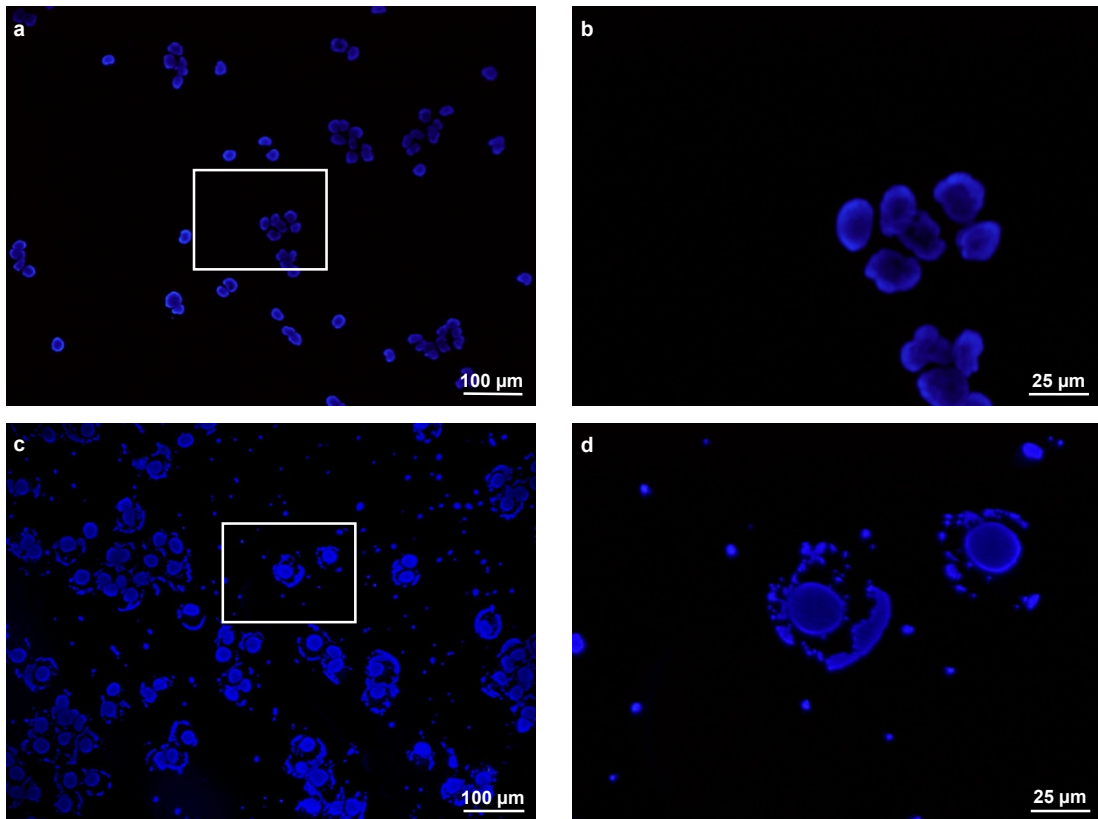


**Abb. 21: Mykoplasmen-Nachweis mittels PCR-Amplifikation.**

Gezeigt ist das Gel einer Mykoplasmen-PCR. Aufgetragen sind eine Positivkontrolle (PK), eine Negativkontrolle (NK), ein Marker (M), sowie sechs Zellkulturproben: (1) FaDu-Zellen, (2) MCF-7-Zellen, (3) WiDr-Zellen, (4) DU145-Zellen, (5) eine weitere Charge WiDr-Zellen und (6) WiDr-Zellen der Charge aus (3), die mit MykoKill (PAA) behandelt wurden. In den Proben 1, 3, 4 und 6 lag eine Kontamination mit Mykoplasmen vor.

Die Abbildung zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Mykoplasmen PCR sechs verschiedener Proben. Positiv- und Negativkontrolle (PK beziehungsweise NK) zeigen, dass die PCR funktioniert hat und die entsprechenden Banden in Zellkulturproben auf eine Mykoplasmen-Kontamination zurück zu führen sind. Die Zellproben 1, 3, 4 und 6 waren mit Mykoplasmen kontaminiert. Nur die Zellproben 2 und 5 waren frei von Kontamination. Die Behandlung mit einem für die Bekämpfung von Mykoplasmen gedachten Reagenz (MykoKill, PAA) führte nicht zur Elimination der Mykoplasmen (Abbildung 21, Probe 6). Daher wurden alle kontaminierten Proben eliminiert, und sämtliche mit diesen Zellchargen durchgeführten Versuche konnten nicht verwendet werden.

Als weiterer Nachweis einer Mykoplasmen-Kontamination diente eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung, die auf einer Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI basierte. DAPI bindet an DNA und RNA und damit fallen bei Mykoplasmen-Kontaminationen neben den großen Zellkernen der Kulturzellen kleine positive Färbungen außerhalb der Zellen auf (Abbildung 22c & 22d). Diese sind kleiner als die Zellkerne der Kulturzellen und umgeben diese in einem gewissen Abstand.



**Abb. 22: Mykoplasmen-Nachweis mittels DAPI-Färbung.**

Zwei unterschiedliche Chargen der Zelllinie IGROV-1 (a, c) wurden mit der Zytospin-Methode auf Objektträger gebracht und anschließend mit DAPI gefärbt. Die Zellcharge in (c) zeigt im Gegensatz zur Zellcharge (a) eine deutliche Mykoplasmen-Kontamination. (b) und (d) zeigen die jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen von (a) und (c).

Auch hier wurden alle kontaminierten Proben eliminiert und sämtliche mit diesen Zellen durchgeführten Versuche wurden nicht verwendet. Durch die konsequente Vernichtung sämtlicher kontaminierter Zellchargen konnten die Kontaminationen eliminiert werden.

### 4.3 Co-Kultivierung von Sphäroiden mit PBMC

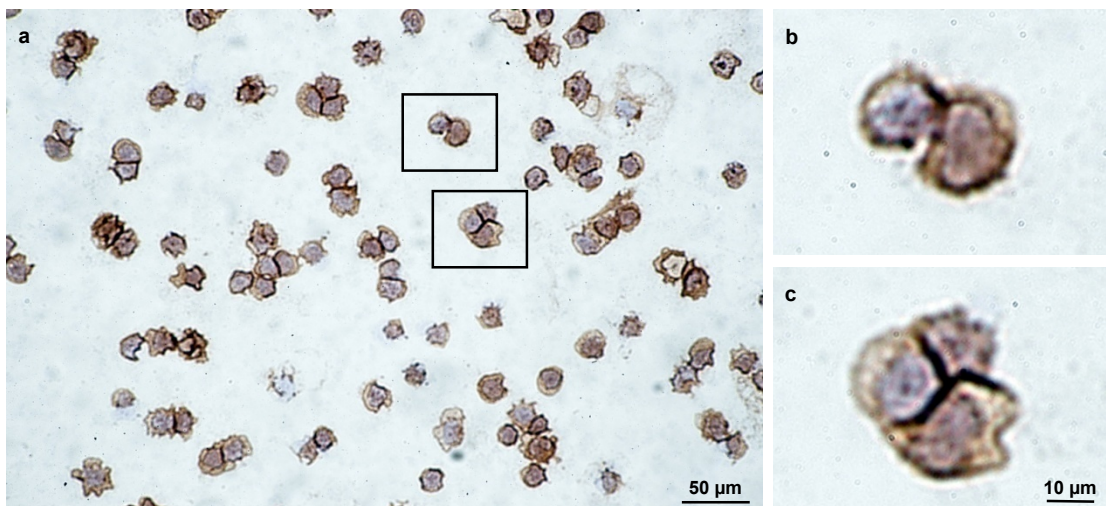
Eine wichtige Problemstellung in der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Co-Kultur aus Sphäroiden mit PBMC in (miniaturisierten) Spinner-Flaschen, um die Wirkweise der Triomab<sup>®</sup>-Antikörper möglichst nah an der Situation *in vivo* zu untersuchen. Die Aktivierung verschiedener Immunzellen ist eine postulierte Hauptfunktion der Triomab<sup>®</sup>-Antikörper. Dazu gehören Makrophagen, DC und T-Zellen, die *in vivo* die Eigenschaft haben in Tumoren einzudringen, um diese von innen zu bekämpfen. Um zu überprüfen, inwieweit dies auch bei den in Suspension kultivierten Sphäroiden der Fall war, wurden unterschiedliche immunhistochemische Färbungen an behandelten Co-kultivierten Sphäroiden durchgeführt. Aus Buffy Coats isolierte PBMC wurden dabei zunächst für die Etablierung der Färbungen verwendet.

Des Weiteren wurden regelmäßig Untersuchungen am Durchflusszytometer durchgeführt. Dabei wurde die Zusammensetzung der PBMC nach Isolation aus Buffy Coats untersucht.

### 4.3.1 Immunhistochemische Färbungen von PBMC

Als Marker für Leukozyten allgemein wurde das Antigen CD45 gefärbt. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase und wird von allen Leukozyten auf ihrer Oberfläche exprimiert und deshalb auch „common leukocyte antigen“ genannt. Die Spezifität der Färbung wurde durch geeignete Kontrollen (nicht gezeigt) erwiesen.

In Abbildung 23 sind beispielhaft die durch Lymphozytenseparation aus einem Buffy Coat gewonnenen Zellen immunhistochemisch mit einem Peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper für CD45 gefärbt. Da alle Zellen eine positive Markierung zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine reine Leukozyten-Präparation handelt.

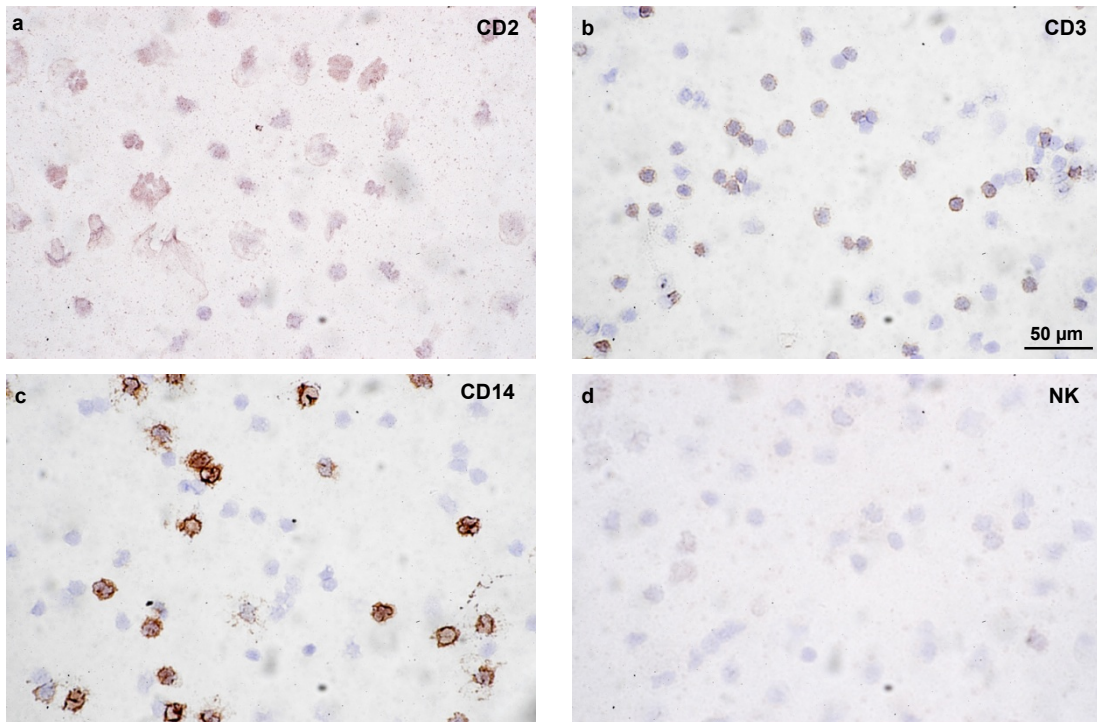


**Abb. 23: CD45-Färbung eines PBMC-Zytospins.**

Nach Separation aus einem Buffy Coat wurden PBMC mit der Zytospin-Methode auf einen Objektträger gebracht und anschließend mit einem Antikörper gegen CD45 markiert (braune Färbung). Alle Zellen weisen eine positive Markierung auf. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalaun. (b) und (c) zeigen die jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen aus (a).

Zur weiteren Differenzierung der CD45-positiven Zellen wurden die Antigene CD2 und CD3 für T-Zellen und CD14 für Monozyten ausgewählt (Abbildung 24). Die CD2, CD3 und CD14 Färbungen der aus Buffy Coat isolierten PBMC ließen sich erfolgreich etablieren (Abbildung 24). Die Intensität der CD2-Färbung war allerdings, wie in Abbildung 24a zu erkennen, schwach und von unspezifischen Artefakten begleitet. Auch die CD3-Färbung war relativ schwach (24b), im Mikroskop aber eindeutig zu erkennen. Die CD14-Färbung war deutlich (24c). Durch geeignete Negativkon-

trollen (nur Sekundär-Antikörper und Kerngegenfärbung) konnte die Spezifität der Färbungen nachgewiesen werden (24d).



**Abb. 24: CD2-, CD3- und CD14-Färbung eines PBMC-Zytospins.**

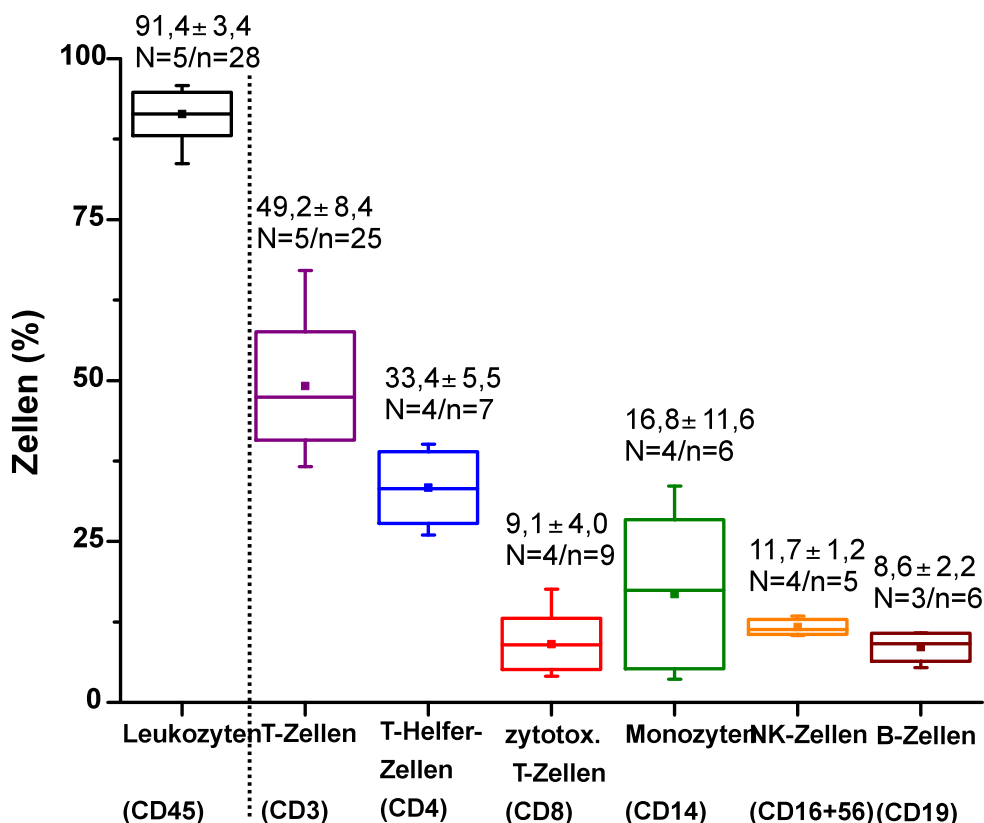
Nach Separation aus einem Buffy Coat wurden PBMC mit der Zytospin-Methode auf einen Objektträger gebracht und anschließend mit Antikörpern gegen CD2 (a), CD3 (b) und CD14 (c) markiert (braune Färbung). In (d) ist die Negativkontrolle ohne Primärantikörper dargestellt. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalaun.

Für die Untersuchungen der in die Sphäroide eingedrungenen PBMC wurden vorrangig CD45, CD14 und CD3 Färbungen durchgeführt. Färbungen der Antigene CD1a für DC, CD16+56 für NK-Zellen und CD8 für zytotoxische T-Zellen konnten in Gefrierschnitten von Sphäroiden aus technischen Gründen bisher noch nicht erfolgreich etabliert werden.

### 4.3.2 Quantitative Zusammensetzung der PBMC

Die Zusammensetzung der in die Versuche eingesetzten PBMC sollte der *in vivo* Situation etwa entsprechen. Der Anteil weiterer Blutzellen (vor allem Granulozyten) sollte niedrig (unter 8 – 10 %) gehalten werden, weil sie zum einen nur eine relativ kurze Lebenszeit (2-3 Tage) haben und zum anderen nicht durch die Triomab<sup>®</sup>-Antikörper angesprochen werden. Zu viele Granulozyten würden die Konzentrationen der relevanten PBMC verringern. Dies wurde in regelmäßigen Abständen mit der Durchflusszytometrie überprüft. Dazu wurden Proben der isolierten PBMC mit den in Tabelle 6 (siehe 3.6.7) gezeigten Antikörperkombinationen getestet, mit denen eine Aufschlüsselung der PBMC-Subpopulationen in T-Zellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>), Monozy-

ten, NK-Zellen und B-Zellen möglich war. Bei jeder Probe wurde zunächst CD45 einzeln untersucht, um vor den weiteren Messungen beurteilen zu können, ob die PBMC-Ausbeute aus der Separation aus dem Buffy Coat für einen Versuchseinsatz hoch genug war. Eine Menge von etwa 90 % aller aus den Buffy Coats isolierten und im Durchflusszytometer - mit FSC und SSC - detektierten Zellen wurde als Schwelle definiert. Abbildung 25 gibt die gemittelten Resultate mehrerer durchflusszytometrischer Untersuchungen wieder.



**Abb. 25: Mengenanteile der durchflusszytometrisch bestimmten PBMC-Zellpopulationen.**

Die relativen Mengenanteile (%) detektierter Zellpopulationen der in die Messungen eingesetzten Zellen sind dargestellt. Die Werte von bis zu fünf unabhängigen Versuchen (N) wurden gemittelt und als Box and Whisker-Blot (Max/Min, MW ± SD, Median) aufgetragen. In die Darstellung integriert sind die jeweiligen Mittelwerte (%) ± SD (%); n entspricht der jeweiligen Summe, der für die Berechnung verwendeten Einzelmessungen. Die Quantifizierung CD45<sup>+</sup>-Zellen (Leukozyten) diente als Maß für die Güte der PBMC-Isolation, aus diesem Grund sind diese Ergebnisse durch die gestrichelte Linie von den Anderen differenziert. Der Leukozytenanteil aller aus den Buffy Coats isolierten und im Durchflusszytometer - mit FSC und SSC - detektierten Zellen lag durchschnittlich bei 91,4 ± 3,4 %.

Der Anteil Leukozyten (CD45<sup>+</sup>) aus der PBMC-Isolation lag, mit geringen Abweichungen, im Mittel bei 91,4 %, was für einen Versuchseinsatz reichte. Die Summe der markierten CD45-Zellsubpopulationen lag durchschnittlich bei 86,3 %, der Anteil der bei der PBMC-Isolation nicht eliminierten Granulozyten und Thrombozyten, die ebenfalls CD45 exprimieren können, betrug also etwa 5 %; die PBMC-Isolation war ausreichend.



Der Anteil NK-Zellen (CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) und B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>) war relativ konstant (11,7 ± 1,2 % beziehungsweise 8,6 ± 2,2 %). Dagegen variierten die T-Zellanteile (CD3<sup>+</sup>; 49,2 ± 8,4 %) und vor allem Monozyten (CD14<sup>+</sup>; 16,8 ± 11,6 %) stark. Innerhalb der T-Zell-Populationen schwankte der Anteil an zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) und an T<sub>H</sub>1 beziehungsweise T<sub>H</sub>2-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>) um etwa 4-5 %. CD4<sup>+</sup> T-Zellen bilden *in vivo* etwa 2/3 der peripheren T-Zellen. Dass hier die Resultate etwas höher liegen, kann dadurch erklärt werden, dass manche Monozyten ebenfalls CD4 exprimieren. Diese Zellpopulation wurde nicht durch eine CD4/CD14 Färbung ausgeschlossen.

### 4.4 Wirkung der Therapie auf Sphäroide

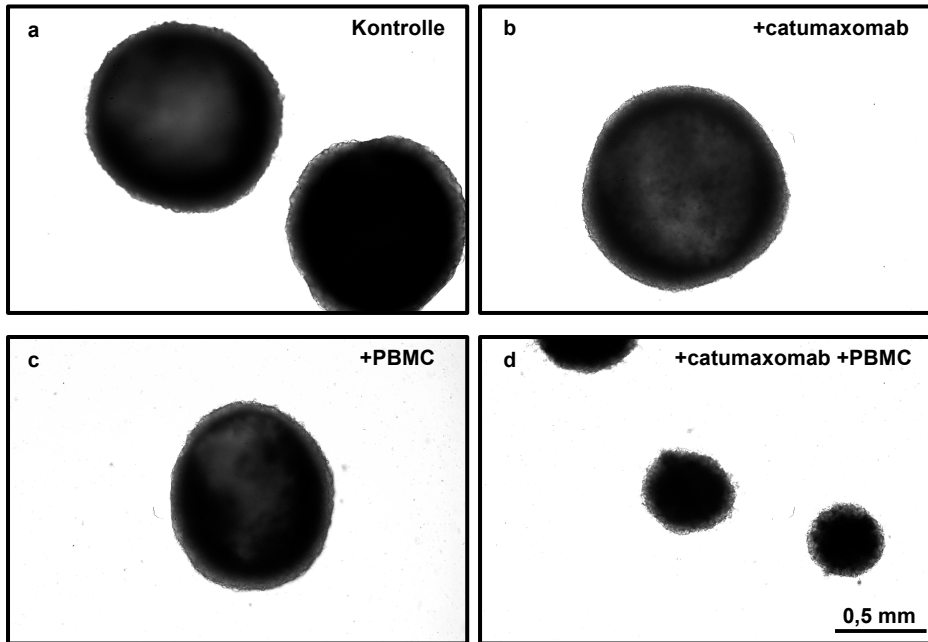
In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung der beiden trifunktionalen bispezifischen Antikörper catumaxomab und ertumaxomab auf Tumorsphäroide, in Co-Kultur mit PBMC in Spinner-Flaschen, getestet werden. Parallel wurde die Wirkung des Zytostatikums Cisplatin unter den gleichen Voraussetzung untersucht, sowie die kombinierte Therapie von catumaxomab und Cisplatin.

#### 4.4.1 catumaxomab

Der Wirkstoff catumaxomab wurde an Sphäroiden der Zelllinie FaDu getestet, da FaDu-Zellen EpCAM überexprimieren und sehr stabile Sphäroide bilden. Bei einem initialen Versuch zur Abschätzung der später zu verwendenden Dosen wurde eine catumaxomab-Konzentration von 10 ng/ml verwendet. Diese Dosis entsprach Konzentrationen, die zuvor bei *in vitro* Untersuchungen mit catumaxomab zu deutlichen Wirkungen führten (Ruf et al., 2007). Einen Effekt auf die Sphäroidgröße zeigte bei makroskopischer Betrachtung nur die kombinierte Therapie mit dem Antikörper und PBMC. Abbildung 26 zeigt mikroskopische Aufnahmen von Sphäroiden sechs Tage nach Wirkstoffzugabe.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die behandelten Sphäroide (26d) im Vergleich zu drei Kontrollansätzen (26a, -b, -c) sehr in ihrer Größe verringert sind. Nach der kombinierten Therapie sind zusätzlich zu den Sphäroiden kleine Fragmente zu sehen, die auf einen Zerfall der Sphäroide hindeuten.

## Ergebnisse

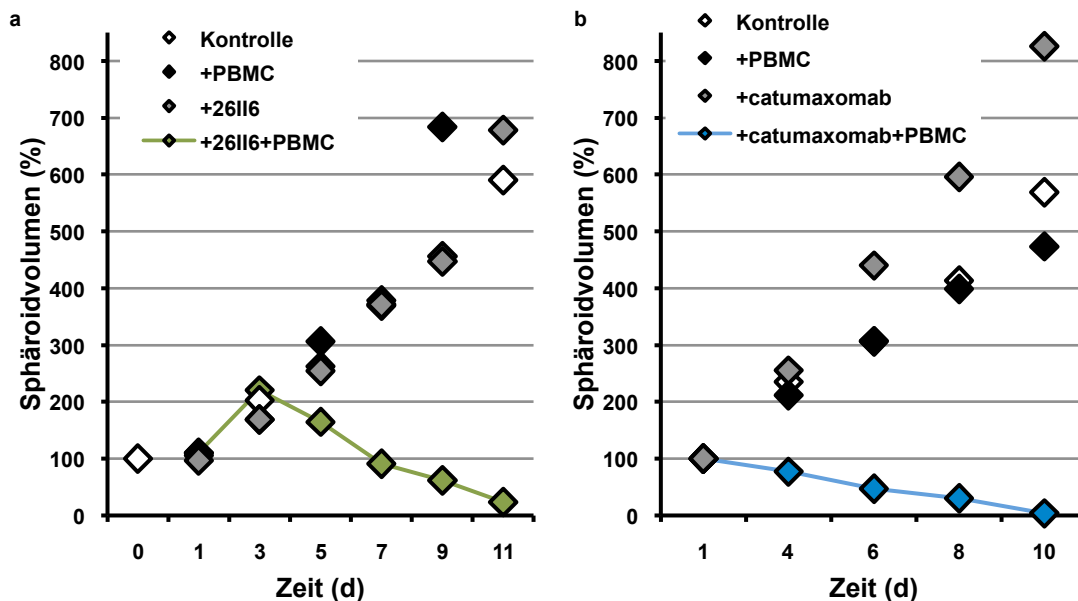


**Abb. 26: Wirkung von catumaxomab auf FaDu-Sphäroide.**

Photographische schwarz-weiß Aufnahmen unterschiedlich behandelter FaDu-Sphäroide. Die Aufnahmen wurden bei geringer Vergrößerung in einem Durchlichtmikroskop erstellt. Gezeigt sind unbehandelte Sphäroide (a), Sphäroide mit Zusatz von 10 ng/ml catumaxomab (b), Sphäroide mit Zusatz von  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml (c) und kombiniert behandelte Sphäroide sechs Tage nach Versuchsbeginn (d). Die Sphäroide in d zeigen im Vergleich eine deutliche Abnahme ihrer Größe.

Die Messung der Sphäroidgrößen der verschiedenen Ansätze ermöglichte eine Analyse in Abhängigkeit von der Versuchszeit. Die graphische Auftragung erfolgte dabei zunächst mit den absolut gemessenen Werten (mm). Die Spezifität des Wirkstoffs wurde zusätzlich mit einem Kontrollantikörper (26II6) getestet. 26II6 ist der für CD3 spezifische, parentale monoklonale IgG2b-Ratten-Antikörper, der für die Produktion von catumaxomab verwendet wird. Abbildung 27 stellt die Ergebnisse der beiden Versuche gegenüber.

Für beide Versuche wurde eine Antikörper-Konzentration von 10,0 ng/ml verwendet. Als Kontrollen für beide Ansätze dienten: Sphäroide in Medium (Kontrolle), Sphäroide mit  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml im Medium (+PBMC) und Sphäroide mit dem jeweiligen Antikörper im Medium (+26II6 beziehungsweise +catumaxomab). Bei beiden Darstellungen ist zu erkennen, dass die Sphäroide der Kontrollansätze während der Versuchszeit stetig wuchsen und die mit kombinierter Therapie behandelten Sphäroide an Größe verloren, wobei im Falle von 26II6 eine initiale Wachstumsphase voran ging. Die Wirkung von catumaxomab setzte deutlich früher ein und war effektiver.



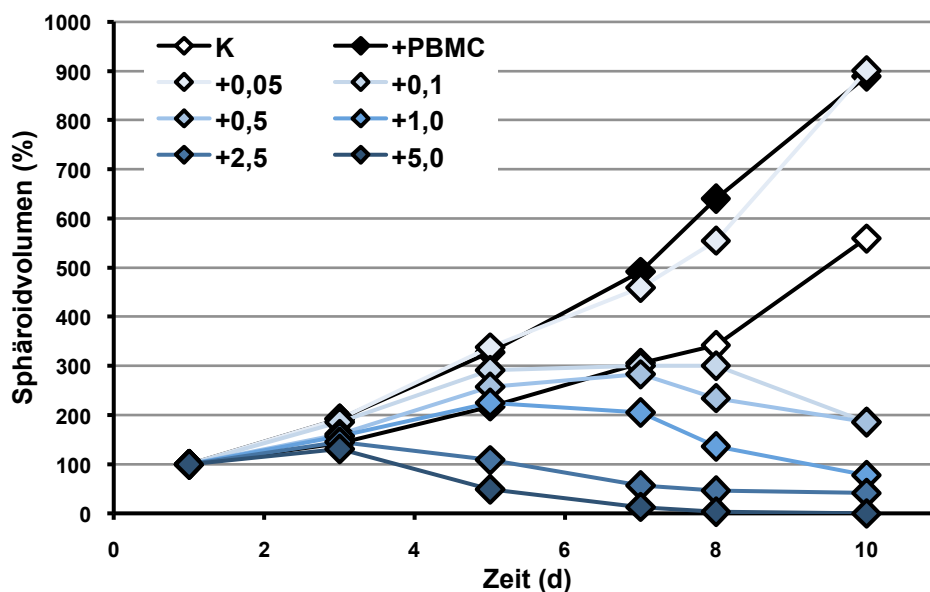
**Abb. 27: Wirkung von catumaxomab und 26II6 auf die Größe von FaDu-Sphäroiden.**

Die relativen Sphäroidvolumina (%) in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d) aus drei verschiedenen Kontrollansätzen und zweier Versuchsansätze sind gezeigt. Die Kontrollen sind: Sphäroide in Medium (Kontrolle), Sphäroide mit PBMC im Medium (+PBMC) und Sphäroide mit dem jeweiligen Antikörper im Medium (+26II6 beziehungsweise +catumaxomab). Die beiden Versuchsansätze unterscheiden sich durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörperpräparate: 26II6 in (a) und catumaxomab in (b). Die Antikörperkonzentration betrug jeweils 10 ng/ml. Die Punkte repräsentieren MW aus > 10 Messungen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die x-Achsen bis 850 % begrenzt, dadurch wird in a ein Wert für +PBMC von Tag 11 (1056 %) nicht dargestellt.

Ein näherer Vergleich der Versuchsergebnisse ließ sich durch die graphische Darstellung nicht ziehen. Ein Vergleich unabhängiger Versuche ist nur durch die rechnerische Auswertung relativierter Daten möglich, wobei die Ausgangsgrößen eines jeden Ansatzes auf 100 % gesetzt werden. So zeigt die rechnerische Auswertung derselben Daten tatsächlich eine unterschiedliche Wirkung beider Antikörper auf FaDu-Sphäroide: Während die Sphäroide nach 11 Tagen 26II6-Behandlung noch einen Durchmesser von 60 % der Ausgangsgröße aufwiesen, waren die mit catumaxomab behandelten Sphäroide schon nach 10 Tagen auf 33 % des Ausgangsdurchmessers reduziert. In Bezug auf das Sphäroidvolumen entspricht dies einer Reduktion auf 23,67 % beziehungsweise 3,85 % des Ausgangsvolumens. Der Kontrollantikörper 26II6 zeigte zwar eine deutliche Wirkung in Bezug auf Sphäroidgröße und –volumen, aber die Wirkung von catumaxomab war schneller und stärker.

#### 4.4.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen

Zur Untersuchung einer Dosis-Wirkungsbeziehung wurde ein Versuchsansatz mit catumaxomab-Konzentrationen zwischen 0 und 5,0 ng/ml über einen Bereich von zwei log-Stufen gewählt. Die Analyse erfolgte über die Bestimmung der relativierten Sphäroidgrößen (Abbildung 28).

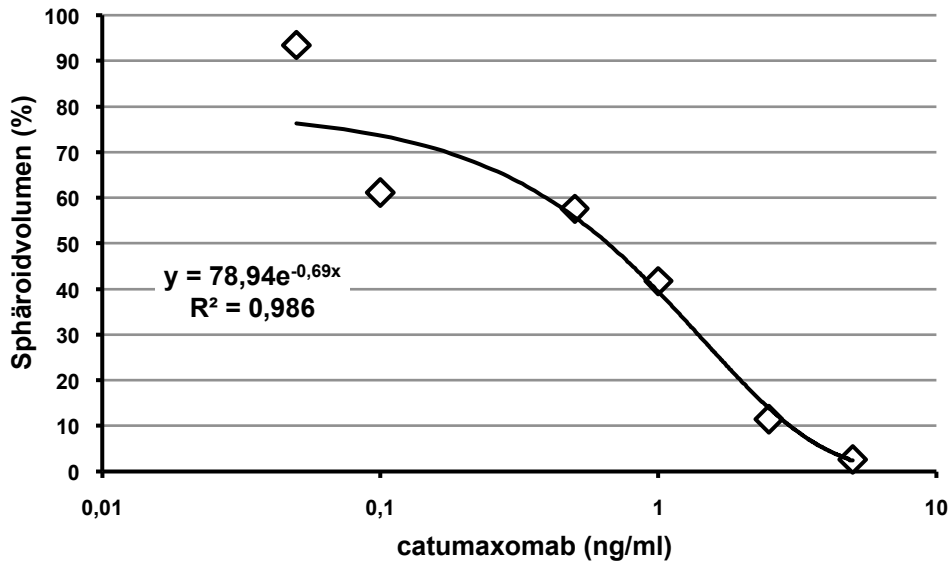


**Abb. 28: Größenwachstum von FaDu-Sphäroiden unter Behandlung mit catumaxomab.**

Die relativen Sphäroidvolumina (%) gegen die Versuchszeit (d) von unbehandelten FaDu-Sphäroiden (K) und sieben Versuchsansätzen aus mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-5,0 ng/ml) catumaxomab behandelten FaDu-Sphäroiden in Co-Kultur mit PBMC sind gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SD aus > 10 Messungen.

Die Graphik zeigt, dass unbehandelte und nur mit 0,05 ng/ml catumaxomab behandelte Sphäroide stetig wuchsen, während mit mittleren Dosen (0,1-1,0 ng/ml) therapierte Sphäroide nach einer kurzen Wachstumsphase von 5 Tagen an Größe verloren. Die mit 2,5 und 5,0 ng/ml behandelten Sphäroide verloren bereits ab dem dritten Versuchstag an Volumen und letztgenannte hatten sich nach 10 Tagen bereits vollständig aufgelöst. Die Auffächerung der Datenpunkte legte nahe, dass eine Dosis-Wirkungsbeziehung bestand. Aus diesem Grund wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt.

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurden die Ergebnisse von mit unterschiedlichen catumaxomab-Konzentrationen therapierten Ansätzen eines Versuchstages verwendet. Die Sphäroidvolumina (%) wurden - bezogen auf unbehandelte Sphäroide - in Abhängigkeit der verwendeten Antikörperkonzentration (ng/ml) in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen (Abbildung 29). Die dargestellten Ergebnisse stammen aus dem zuvor gezeigten Versuch (Abbildung 28) und repräsentieren die Sphäroiddurchmesser an Versuchstag 7. An diesem Tag hatten sich die Sphäroid-Größen deutlich aufgetrennt und von allen Ansätzen konnten Daten in die Berechnung eingehen.



**Abb. 29: Dosis-Wirkungskurve für catumaxomab bei FaDu-Sphäroiden nach sieben Tagen Behandlung.** Die Sphäroidvolumina (%) bezogen auf die Größe der Kontrollsphäroide mit PBMC in Co-Kultur in Abhängigkeit der eingesetzten catumaxomab-Konzentration (ng/ml) von FaDu-Sphäroiden nach sieben Tagen Behandlungsdauer ist in halb-logarithmischer Darstellung gezeigt. In den Graphen eingefügt ist das Resultat eines exponentiellen Fits.

In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass die Sphäroiddurchmesser dosisabhängig kleiner werden. Der exponentielle Fit zeigt eine Korrelation mit den Daten und ein T-Test der Ergebnisse hat ein Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  ergeben. Für spätere Versuchsansätze wurde mit Hilfe des Fits die  $ED_{50}$  bestimmt. Die  $ED_{50}$  ist in diesem Fall die Dosis catumaxomab, die bei FaDu-Sphäroiden nach 7 Tagen zu einer Volumenreduktion auf 50 % des Kontrollniveaus führte. Die  $ED_{50}$  lag an Tag 7 bei 0,66 ng/ml. Eine Analyse der Daten für den Tag 8 hat, mit vergleichbarer Korrelation und Signifikanz, eine  $ED_{50}$  von 0,27 ng/ml ergeben. Für weitere Versuche, bei denen nur eine Dosis des Wirkstoffs verwendet wurde, kamen dennoch in der Regel 2,5 ng/ml catumaxomab zum Einsatz, da sich bei den meisten Versuchen zunächst an den Sphäroiddurchmessern als Maßstab für die Therapiewirkung orientiert wurde. Die  $ED_{50}$  für diesen Parameter lag zwischen 1,91 ng/ml (Tag 8) und 2,91 ng/ml (Tag 7) catumaxomab.

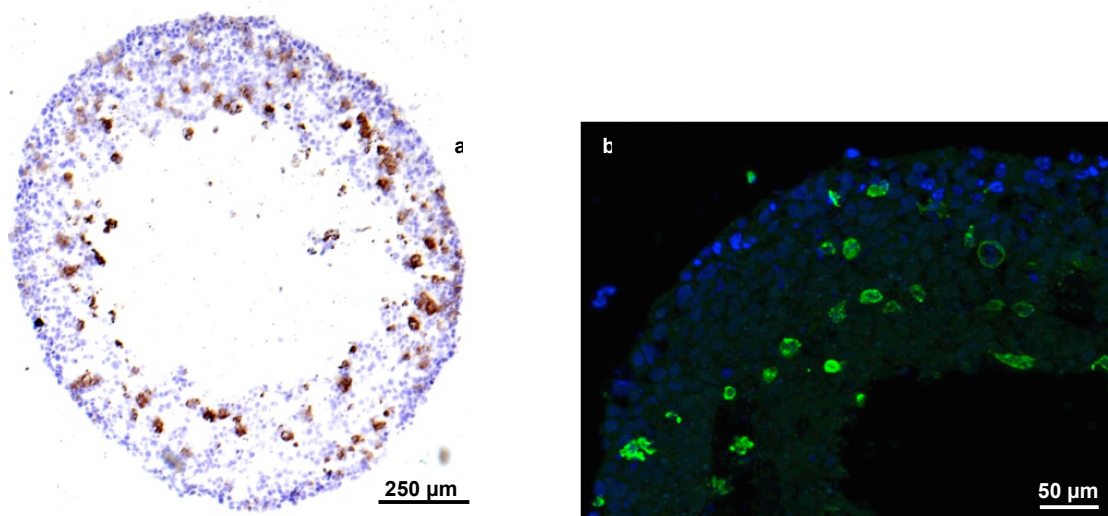
#### 4.4.1.2 Untersuchungen zur Wirkweise von catumaxomab

Zur postulierten Wirkweise von catumaxomab gehört die Aktivierung verschiedener Zellen der Immunabwehr. Dabei soll die Aktivierung von T-Zellen zur Ausschüttung verschiedener Zytokine und zur Auslösung von Apoptose führen und die Aktivierung akzessorischer Zellen ebenfalls zur Ausschüttung bestimmter Zytokine und zu ADCC und Phagozytose. Die erhöhte Leukozyten-Aktivität soll dabei auch zu vermehrter Infiltration der Tumoren führen. Um diese Wirkweisen zu überprüfen,

wurden verschiedene Methoden angewandt: Immunhistochemische Färbungen von Leukozyten-Oberflächen-Antigenen zur Detektion Sphäroide-infiltrierender PBMC, immunhistochemische Färbungen eines Proliferations-spezifischen intrazellulären Antigens, Apoptose-spezifische Fluoreszenz-Markierungen, PCR-Analysen Leukozyten-spezifischer Proteine zur Differenzierung in Sphäroide eindringender PBMC und die Bestimmung von in das Medium abgegebener Zytokine.

### 4.4.1.2.1 *Infiltration von Leukozyten in Sphäroide*

Um zu überprüfen, ob die Dosis-abhängige Größenabnahme der behandelten Sphäroide durch eine Infiltration von PBMC zurückzuführen ist, wurden CD45-Färbungen an Gefrierschnitten von behandelten und Kontrollsphäroiden durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob Leukozyten unter der Behandlung vermehrt in die Sphäroide eindringen, und ob gegebenenfalls eine Dosis-Wirkungsbeziehung herzustellen ist. Abbildung 30 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen zweier unabhängiger Versuche.



**Abb. 30: CD45<sup>+</sup>-Zellen in mit catumaxomab behandelten FaDu-Sphäroiden.**

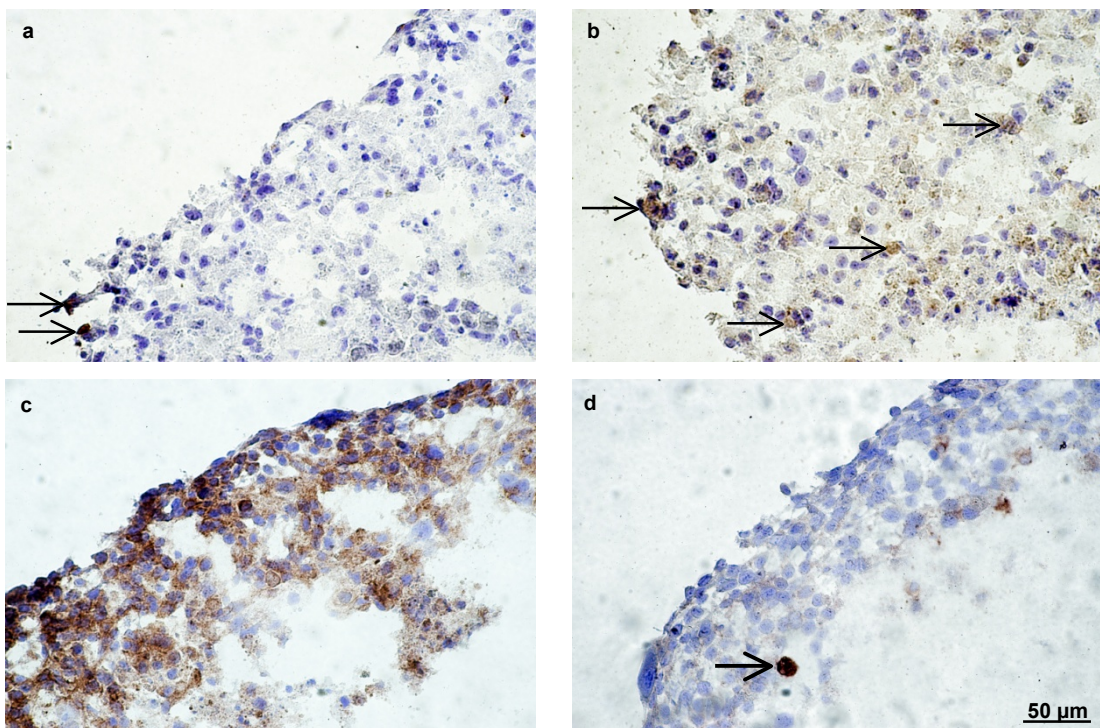
(a) Immunhistochemische Färbung von CD45 mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper eines FaDu-Sphäroid-Gefrierschnitts (braun). Die Sphäroide wurden für sieben Tage mit 0,5 ng/ml catumaxomab behandelt. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Es sind erkennbar CD45-positive Zellen in den Sphäroid eingedrungen.

(b) Immunhistochemische Färbung von CD45 mit einem Fluoreszein-gekoppelten Antikörper eines FaDu-Sphäroid-Gefrierschnitts (grün). Die Sphäroide wurden für fünf Tage mit 1,25 ng/ml catumaxomab behandelt. Die blaue Färbung zeigt hier die Kerngegenfärbung mit DAPI. Auch hier sind CD45-positive Zellen in den Sphäroid eingedrungen, in dieser Abbildung sind mehr Details zu erkennen.

Für Abbildung 30a wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. In dieser Übersichtsaufnahme zeigt die braune Färbung, dass Leukozyten das Sphäroid infiltriert haben, welches für sieben Tage mit 0,5 ng/ml catumaxomab behandelt worden war. Das Sphäroid hatte eine Zentralnekrose ausgebildet, in die keine Leukozyten eingedrungen waren. In Abbildung 30b ist eine Ausschnittsdarstel-

lung eines FaDu-Sphäroid-Gefrierschnittes zu sehen, welches über einen Zeitraum von fünf Tagen mit 1,25 ng/ml catumaxomab behandelt worden war. Die CD45 Färbung erfolgte hier mit einem Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörper. Auch hier sind positive CD45-Färbungen (grün) sichtbar, in blau ist die Kerngegenfärbung mit DAPI gezeigt. In allen untersuchten Fällen infiltrierten Leukozyten unter catumaxomab-Behandlung die Sphäroide. Eine Quantifizierung zur Abschätzung einer dosisabhängigen Infiltration erfolgte anhand CD45-gefärbter Schnitte (siehe Tab. 15: Quantifizierung histochemisch markierter Zellen.).

Im weiteren Verlauf wurde versucht, durch Färbungen der Antigene CD2, CD3 und CD14 die Subpopulationen der Leukozyten zu differenzieren. Es wurden speziell diese Antigene gewählt, da Tumoren *in vivo* meist von T-Zellen und Makrophagen infiltriert werden. Für diese Färbungen wurden Parallelschnitte von zuvor positiv für CD45 gefärbten Sphäroid-Gefrierschnitten verwendet (Abbildung 31).



**Abb. 31: Färbung von CD2, CD3 und CD14 an Gefrierschnitten von FaDu-Sphäroiden.**

Immunohistochemische Färbungen von CD2 (a), CD3 (c) und CD14 (b und d) mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern an FaDu-Sphäroid-Gefrierschnitten (braun). Die Sphäroide aus (a) und (b) wurden für vier Tage mit 10 ng/ml catumaxomab behandelt, die Sphäroide aus (c) und (d) waren Kontrollsphäroide, die für sechs Tage mit PBMC co-kultiviert worden waren. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Pfeile weisen auf positiv markierte Zellen.

Abbildung 31a zeigt exemplarisch CD2-positive Leukozyten in der äußeren Randschicht eines mit 10 ng/ml catumaxomab für vier Tage behandelten FaDu-Sphäroids (Pfeile). Bei der CD3-Färbung 31c sind unspezifische braune Färbungen zu sehen, die in ausnahmslos allen Versuchen nicht verhindert werden konnten. Die

Markierung des CD14-Antigens ist in 31b deutlich erkennbar (Pfeil). Bei diesem Sphäroid handelte es sich um einen Kontrollansatz, der lediglich PBMC enthielt. In kombiniert behandelte Sphäroide wanderten etwas mehr CD14<sup>+</sup>-Zellen ein (31d, Pfeile). Bei Kontrollsphäroiden waren keine CD2-Färbungen positiv.

Die Färbungen von CD2 und CD14 an Gefrierschnitten von Sphäroiden war erfolgreich aber relativ schwach, so wurde die positive CD14-Markierung in 31b nur durch nachträgliche Bildbearbeitung deutlich. Die genauere Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen war mit immunhistochemischen Methoden leider nicht möglich, da auch die in Frage kommenden Färbungen weiterer Antigene in Sphäroidgefrierschnitten (CD1a für dendritische Zellen, CD16+56 für NK-Zellen und CD8 für zytotoxische T-Zellen) aus technischen Gründen nicht etabliert werden konnten.

Als Alternative zur immunhistochemischen Detektion wurde versucht, durch PCR-Amplifikation spezifischer mRNA die verschiedenen Subklassen zu definieren. Da die PCR eine hoch sensitive Methode ist, bestand die Hoffnung, auch aus den nur wenigen Zellen, die in die Sphäroide eingedrungen waren, genug mRNA für einen Nachweis extrahieren zu können. Hierfür wurden FaDu Sphäroide für sieben Tage mit der mittleren Dosis von 2,5 ng/ml catumaxomab behandelt, da die Sphäroide in vorhergehenden Versuchen unter diesen Bedingungen noch ca. 80 % der Ausgangsgröße besaßen und trotzdem bereits von relativ vielen Leukozyten (ca. 20 %) infiltriert worden waren (siehe Tab. 15: Quantifizierung histochemisch markierter Zellen.). Die Sphäroide wurden in großen Mengen in mittleren Spinner-Flaschen kultiviert, um eine möglichst große mRNA-Ausbeute zu erzielen. Durch Verwendung spezifischer Primer sollten folgende mRNA nachgewiesen werden: IFN- $\gamma$ , IL-2, CD25 und CD64.

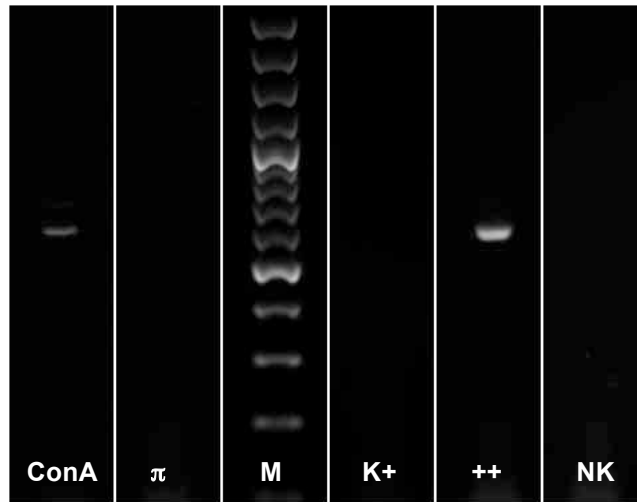
IFN- $\gamma$  wird von T- und NK-Zellen exprimiert und dient zur Aktivierung von Makrophagen. IL-2 wird von T-Zellen gebildet und dient der T-Zellproliferation. CD25 ist ein IL-2 Rezeptor und wird von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert. CD64 wird von Monozyten beziehungsweise Makrophagen gebildet, es ist ein hoch affiner Rezeptor für Immunglobuline G.

In die PCR wurden Proben von PBMC die mit Concanavalin A aktiviert waren (ConA), FaDu-Sphäroiden ( $\pi$ ), FaDu-Sphäroiden die für sieben Tage mit PBMC co-kultiviert waren (K<sup>+</sup>) und FaDu Sphäroiden die sieben Tage mit 2,5 ng/ml catumaxomab und PBMC behandelt wurden (++) eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle dienten die



## Ergebnisse

Proben des Ansatzes ConA, da eine Expression der gesuchten mRNA in PBMC nach ConA-Zugabe bekannt war. Abbildung 32 zeigt die RT-PCR für Interferon- $\gamma$ .



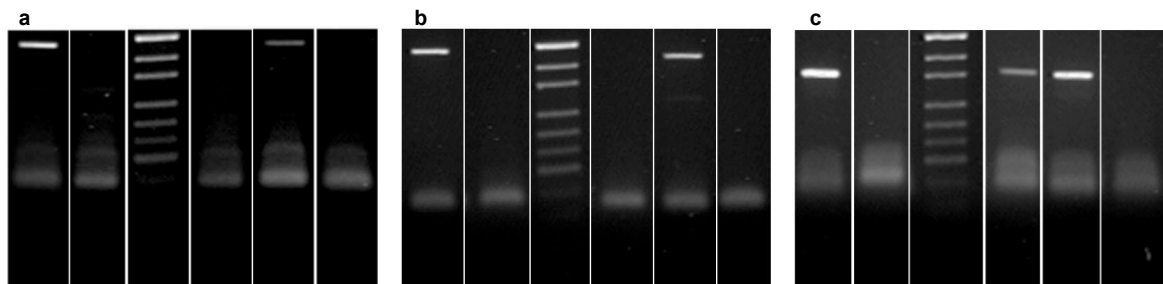
**Abb. 32: DNA-Gel einer Interferon- $\gamma$ -RT-PCR.**

Gezeigt ist das DNA-Gel einer Interferon- $\gamma$ -RT-PCR. Die PCR wurde mit RNA aus folgenden Proben durchgeführt: (ConA) PBMC aktiviert mit Concanavalin A; ( $\pi$ ) FaDu-Sphäroide; (K+) FaDu-Sphäroide in Co-Kultur mit PBMC und (++) FaDu-Sphäroide, die in Co-Kultur mit PBMC sieben Tage mit 2,5 ng/ml catumaxomab behandelt wurden. Interferon- $\gamma$ -mRNA konnte in den Proben (ConA) und (++) nachgewiesen werden. Die beiden Banden liegen bei etwa 620 Basenpaaren.

(M) Marker; (NK) Negativkontrolle

Nur aus den mit Concanavalin A aktivierten PBMC und aus den mit catumaxomab behandelten Sphäroiden konnte erfolgreich Interferon- $\gamma$  mRNA extrahiert werden. Die Behandlung hat eine Infiltration von Interferon- $\gamma$  mRNA exprimierenden PBMC bewirkt.

In parallelen Versuchen wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen PCR-Untersuchungen zum Nachweis von IL-2-, CD25- und CD64-mRNA durchgeführt (Abbildung 33).



**Abb. 33: DNA-Gele einer IL-2-, CD25- und CD64-RT-PCR**

Gezeigt sind die DNA-Gele einer IL-2- (a), CD25- (b) und CD64-RT-PCR (c). Die PCR wurden mit RNA aus folgenden Proben durchgeführt: (ConA) PBMC aktiviert mit Concanavalin A; ( $\pi$ ) FaDu-Sphäroide; (K+) FaDu-Sphäroide in Co-Kultur mit PBMC und (++) FaDu-Sphäroide, die in Co-Kultur mit PBMC sieben Tage mit 2,5 ng/ml catumaxomab behandelt wurden. IL-2- und CD25-mRNA konnte in den Proben (ConA) und (++) nachgewiesen werden, CD64-mRNA zusätzlich in Probe (K+). Die Banden für IL-2 liegen bei etwa 460 Basenpaaren, die Banden für CD25 bei etwa 440 Basenpaaren und die Banden für CD64 bei etwa 330 Basenpaaren. (modifiziert von B. Rodday)

(M) Marker; (NK) Negativkontrolle

Auch für IL-2 und CD25 konnte mRNA aus den Ansätzen der mit ConA aktivierten PBMC und der mit catumaxomab behandelten Sphäroiden gewonnen und amplifiziert werden (Abbildung 33a,b). Interessanterweise gelang die Extraktion von CD64-mRNA sowohl aus den mit ConA aktivierten PBMC und aus den mit catumaxomab behandelten Sphäroiden, als auch aus den Sphäroiden, denen nur PBMC zugegeben worden waren. Dies bedeutet, dass unter diesen Bedingungen Makrophagen in die Sphäroide eingedrungen waren. Um die Menge exprimierter CD64-mRNA der Ansätze ConA, K+ und ++ zu vergleichen, wurde eine genauere Auswertung durchgeführt. Durch densitometrische Analyse konnte ein relativer Vergleich der Bandenstärke und damit der mRNA-Menge erreicht werden. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der unabhängigen Versuche miteinander verglichen (Tab. 14: Densitometrische Analyse mehrerer CD64-, CD25- und IL-2-RT-PCR.).

**Tab. 14: Densitometrische Analyse mehrerer CD64-, CD25- und IL-2-RT-PCR.**

Gezeigt ist die Intensität der DNA-Banden (Pixel) bezogen auf eine genormte Fläche nach Abzug der Hintergrundintensitäten. Die Resultate fünf unabhängiger Versuche (Nr. 1-5) sind einem Ansatz mit Concanavalin A aktivierten PBMC (ConA) gegenüber gestellt. Die mit n. d. gekennzeichneten Versuchsansätze konnten nicht für eine RNA-Extraktion verwendet werden. Es wurde für jeden Ansatz die gleiche Menge cDNA eingesetzt.

Nr.	CD64		CD25		IL-2	
	K+	++	K+	++	K+	++
1	n. d.	3,11	0	18,72	0	65,56
2	8,14	21,00	0	61,99	0	82,37
3	12,44	42,63	0	20,01	0	6,26
4	43,81	78,89	0	11,37	0	17,92
5	n. d.	12,52	0	7,35	0	7,84
<b>ConA</b>	54,61		25,71		32,65	

Die densitometrische Auswertung der Banden ergab, dass in allen Versuchen aus den behandelten Sphäroiden deutlich mehr CD64-mRNA gewonnen wurde als aus den Sphäroiden, die lediglich mit PBMC in Co-Kultur ohne Wirkstoff kultiviert worden waren. Das bedeutet, dass unter catumaxomab-Therapie vermehrt Makrophagen in die Sphäroide eindringen.

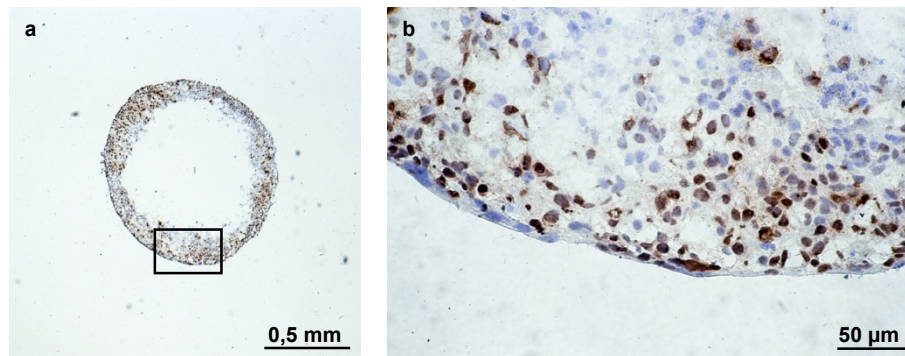
Mit der PCR-Methode konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Bedingungen die Sphäroide von Zellen infiltriert wurden, die IFN- $\gamma$ , IL-2, CD25 oder CD64 exprimieren. Daraus lässt sich schließen, dass T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen in die Sphäroide eingedrungen waren.

#### **4.4.1.2 Einfluss von catumaxomab auf die Proliferation**

Ein häufiger Angriffspunkt bei der Behandlung von Tumorzellen ist die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation, da durch Inhibition der Zellteilung das Tumorstadium eingestellt werden soll. Auch einige Leukozyten haben eine proliferationshem-

mende Kapazität, zum Beispiel durch Abgabe des Zytokins IFN- $\gamma$ . Eine Aktivierung entsprechender Leukozyten ist eine postulierte Wirkung von catumaxomab. Zur Überprüfung des Proliferationsverhaltens diente eine immunhistochemische Färbung gegen Ki-67. Die Färbungen von Ki-67 sollten Aufschluss darüber geben, ob die Behandlung mit catumaxomab das Proliferationsverhalten der Sphäroide beeinflusste.

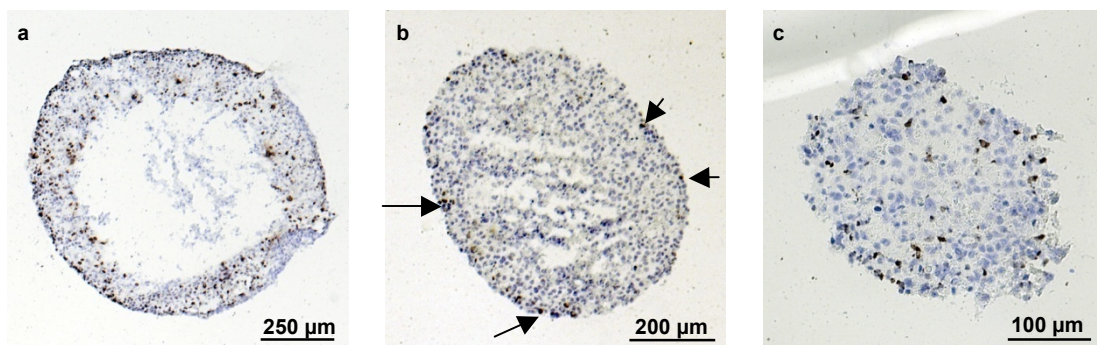
Abbildung 34 zeigt die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 am Beispiel eines unbehandelten FaDu-Sphäroids. Zusätzlich zur Ki-67-Färbung (braun) wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun (blau) durchgeführt. Die Ki-67-Färbungen waren jedoch so stark, dass sie die Hämalaun-Färbungen überlagerten. Die positiv gefärbten Zellen lagen wie erwartet vorwiegend im äußeren Bereich der vitalen Randschicht, also der proliferativen Zone, vor.



**Abb. 34: Ki-67-Färbung an unbehandelten FaDu-Sphäroiden.**

Immunhistochemische Färbungen von Ki-67 mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern am medianen Gefrierschnitt eines unbehandelten FaDu-Sphäroids (braun). Positiv markiert sind Zellen in der proliferativen Zone des Sphäroids. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalaun. (b) zeigt die Ausschnittsvergrößerung aus (a).

Bei mit catumaxomab behandelten FaDu-Sphäroiden konnten ebenfalls positive Ki-67-Färbungen nachgewiesen werden. Dabei variierte die Anzahl positiv gefärbter Zellen stark. Abbildung 35 zeigt Ki-67-Färbungen an Gefrierschnitten von Sphäroiden, die sieben Tage mit unterschiedlichen catumaxomab-Konzentrationen behandelt wurden.



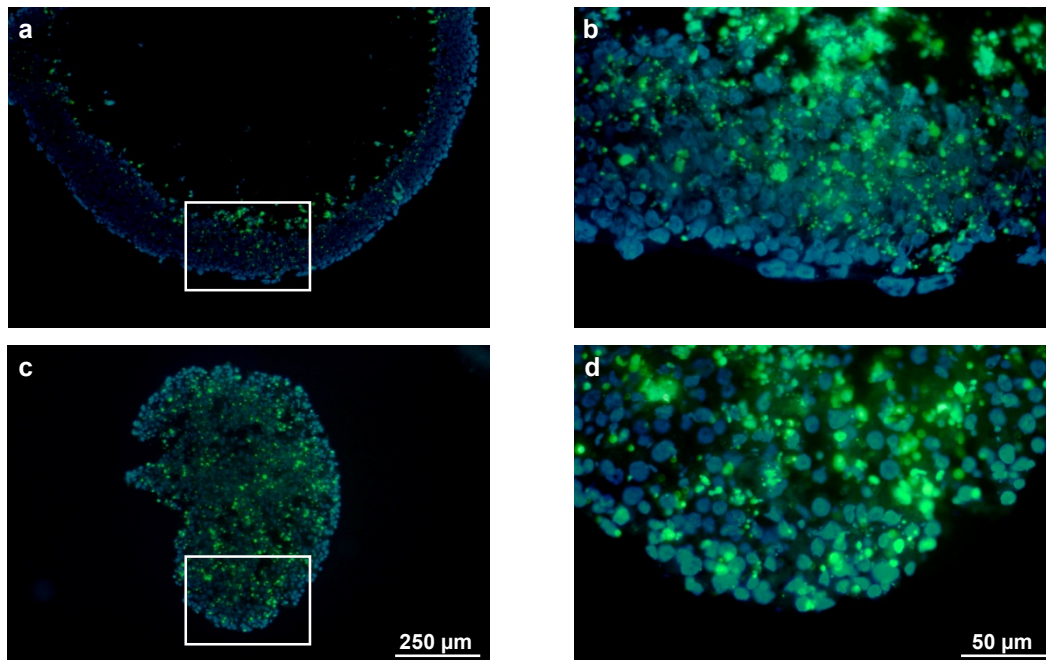
**Abb. 35: Ki-67 Färbung an behandelten FaDu-Sphäroiden.**

Immunhistochemische Färbungen von Ki-67 mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern an medianen Gefrierschnitten behandelte FaDu-Sphäroide (braun). Die Sphäroide wurden für sieben Tage mit (a) 0,1 ng/ml, (b) 2,5 ng/ml und (c) 5,0 ng/ml catumaxomab behandelt. Pfeile in (b) deuten auf Ki-67-positive Zellen. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit Hämalaun.

Eine geringe Dosis von 1,0 ng/ml (Abbildung 35a) hatte im Vergleich zu der Kontrolle keinen erkennbaren Einfluss auf die Anzahl der markierten Zellen. Allerdings ist zu erkennen, dass diese Zellen über die gesamte vitale Randschicht verteilt sind. Eine ähnliche Verteilung lag bei dem mit 5,0 ng/ml catumaxomab behandelten Sphäroid vor (Abbildung 35c). Lediglich das mit 2,5 ng/ml catumaxomab behandelte Sphäroid zeigte kaum Ki-67-positive Zellen (Abbildung 35b). Einige wenige Zellen lagen in der äußersten Schicht des Sphäroids (Pfeile). Eine Quantifizierung zur Abschätzung einer Dosis-abhängigen Änderung der Proliferation erfolgte anhand Ki-67-gefärbter Schnitte (siehe Tab. 15: Quantifizierung histochemisch markierter Zellen.).

### 4.4.1.2.3 Apoptose-Nachweis

Eine postulierte Wirkung von catumaxomab beinhaltet die vermehrte Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. Aus diesem Grund war es erforderlich eine Methode anzuwenden, mit der die Apoptose der Zellen detektiert und beurteilt werden konnte. Eine klassische Methode hierfür ist die Markierung der bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente mit Fluorochromen. Abbildung 36 zeigt repräsentative Beispiele von unbehandelten und behandelten FaDu-Sphäroiden, bei denen dieser Apoptose-Nachweis durchgeführt wurde.



**Abb. 36: Apoptose-Detektion in FaDu-Sphäroiden.**

Mit der FragEL-Methode wurden apoptotische Zellen (grün) detektiert. Gezeigt sind Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen eines gänzlich unbehandelten Kontrollsphäroids (a, b) und eines mit 10 ng/ml catumaxomab behandelten Sphäroids (c, d) acht Tage nach Versuchsbeginn. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit DAPI. Durch die Überlagerung beider Farbkanäle entsteht bei einer Kollokalisation ein türkiser Farbeindruck.

Die unbehandelten Sphäroide zeigten die erwartete Färbung: vor allem im Übergangsbereich von der ruhenden Zone der vitalen Randschicht zur Zentralnekrose sind apoptotische Zellen zu finden, während in der proliferativen Randschicht nach außen hin immer weniger positive Färbungen erkennbar sind (Abbildung 36a, b). Bei behandelten Sphäroiden waren zusätzlich auch in der gesamten Randschicht apoptotische Zellen zu finden (Abbildung 36c, d).

#### 4.4.1.2.4 Quantifizierung gefärbter Zellen

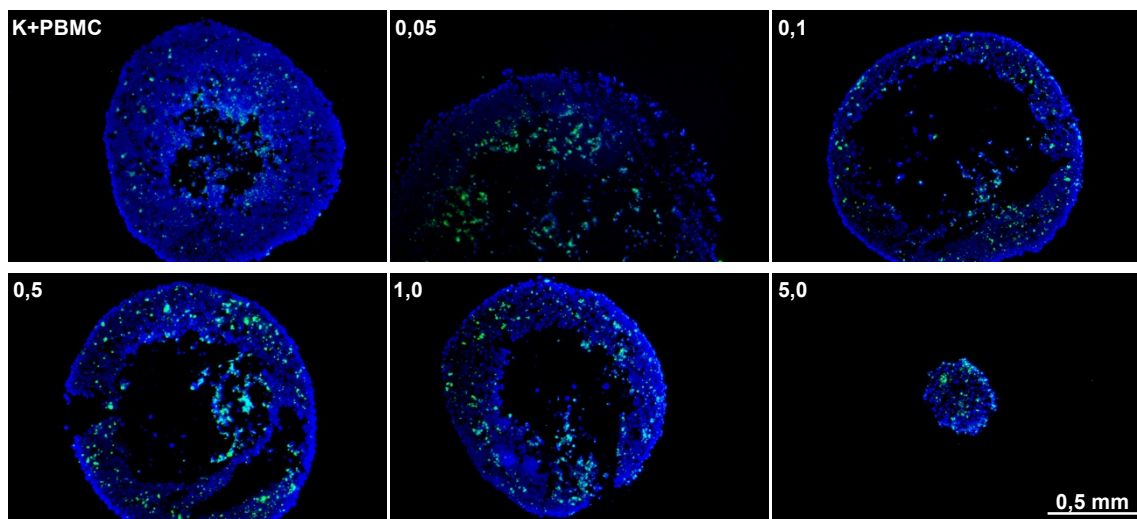
Die zuvor beschriebenen Färbungen der Sphäroide des Versuchs mit einer catumaxomab Konzentrationsreihe wurden weitergehend untersucht. Dabei wurde analysiert, ob für die Infiltration der Leukozyten (CD45), die Reduktion der Proliferation (Ki-67) und die Zunahme apoptotischer Zellen (FragEL™) catumaxomab-konzentrationsabhängige Beziehungen vorlagen (Tabelle 15).

**Tab. 15: Quantifizierung histochemisch markierter Zellen.**

Die relativen Mengen gefärbter Zellen (%) sind in Abhängigkeit von den eingesetzten catumaxomab-Konzentrationen dargestellt. Desweiteren sind die Mengen ungefärbter Zellen angegeben, also Tumorzellen, die weder proliferierten noch apoptotisch waren.

	Kontrolle	K+PBMC	0,05	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0
<b>ungefärbte Zellen</b>	82 %	75 %	91 %	57 %	74 %	68 %	25 %	25 %
<b>Leukozyten</b>	0 %	1 %	1 %	3 %	4 %	3 %	20 %	42 %
<b>proliferierende Zellen</b>	18 %	6 %	4 %	28 %	12 %	16 %	2 %	13 %
<b>apoptotische Zellen</b>	n.b.	18 %	4 %	12 %	10 %	13 %	n.b.	20%

Die Anwendung der Methode zeigte eine dosisabhängige Infiltration CD45-markierter Zellen in die FaDu-Sphäroide nach catumaxomab-Behandlung. Für Proliferation und Apoptose konnte kein solcher Zusammenhang gefunden werden. Allerdings änderte sich die Qualität der beiden Markierungen. Im Vergleich mit Kontrollsphäroiden wurde Ki-67 bei behandelten Sphäroiden entweder deutlich weniger oder nicht nur in den äußersten Zellschichten sondern über die gesamte Randschicht hinweg gefunden. Ähnlich verhielt es sich mit den apoptotischen Zellen, diese wurden bei Kontrollen überwiegend am Übergang von Randschicht zu Zentralnekrose und ausschließlich bei behandelten Sphäroiden über den gesamten Sphäroidquerschnitt verteilt detektiert. Abbildung 37 macht dies in einer Gegenüberstellung von sechs Objekten aus dem Konzentrationsreihen-Versuch deutlich.



**Abb. 37: Dosisabhängige Verteilung apoptotischer Zellen in FaDu-Sphäroiden.**

Mit der FragEL-Methode wurden apoptotische Zellen (grün) detektiert. Gezeigt sind Übersichtsaufnahmen von Sphäroiden der catumaxomab-Konzentrationsreihe sieben Tage nach Versuchsbeginn. Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit DAPI. Durch die Überlagerung beider Farbkanäle entsteht bei einer Kolokalisation ein türkisfarbener Eindruck.

### 4.4.1.3 Einfluss von catumaxomab auf die Zytokinausschüttung

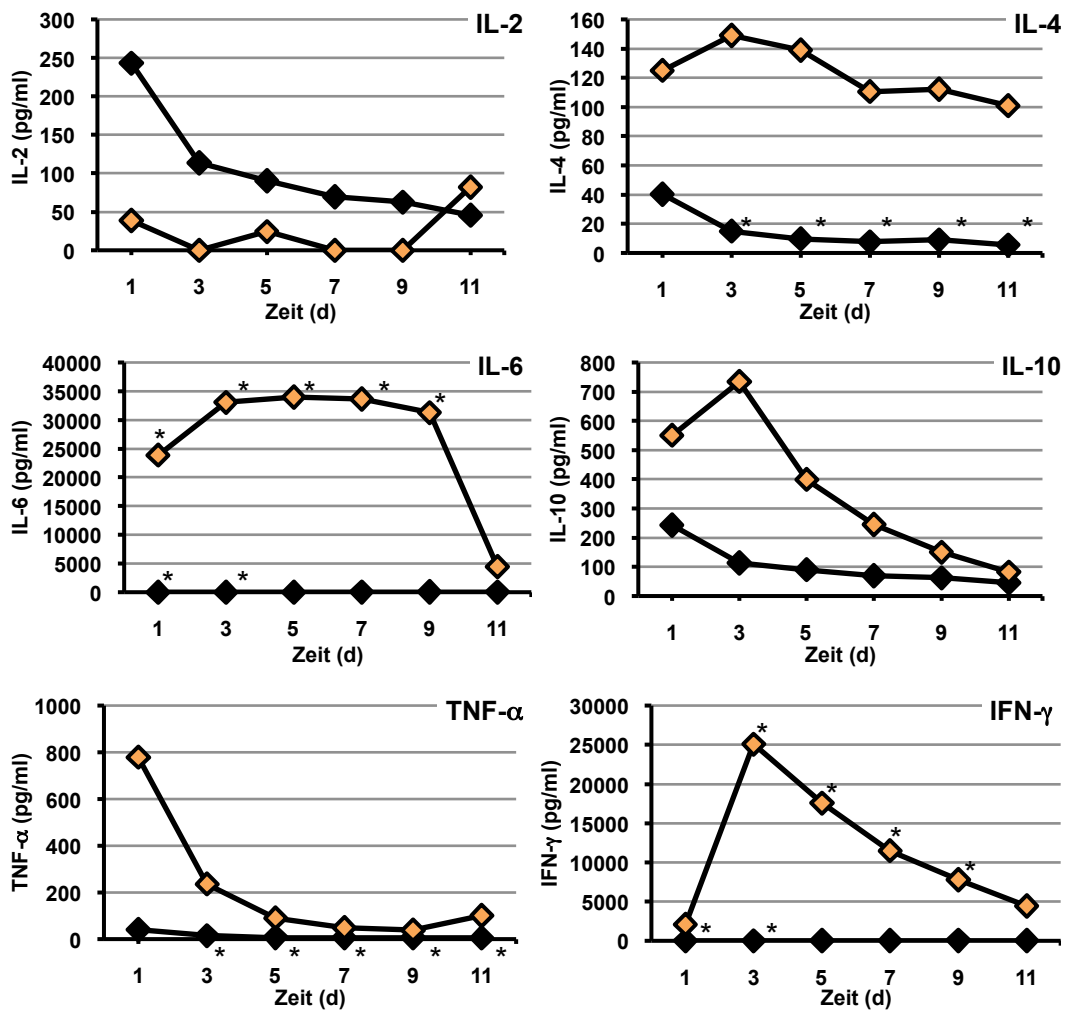
Um die postulierte Stimulierung der Immunzellen durch catumaxomab zur Zytokinfreisetzung zu überprüfen, wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  aus Medienüberständen bestimmt. Die Messung erfolgte durch die Firma EUFETS GmbH in Idar-Oberstein, mit der CBA-Methode. Es wurden jeden zweiten Tag Proben der Zellkultur-Überstände entnommen, um den Zeitverlauf der Zytokinkonzentrationen zu beobachten.

Für eine erste Einschätzung der Zytokinmengen wurden zunächst die Medienüberstände aus dem Versuch mit 2,5 ng/ml 26II6 untersucht (Abbildung 38), dort sind zur Vereinfachung die Ergebnisse der beiden Kontrollen nur mit Sphäroiden und mit Sphäroiden mit 26II6 nicht dargestellt, da diese immer unter der Nachweisgrenze (20 pg/ml) lagen. Auch die gezeigten Zytokinbestimmungen der Kontrollansätze mit PBMC ergaben in einigen Fällen Werte, die unter der Nachweisgrenze lagen und die dann durch Extrapolieren der Standardgerade berechnet wurden (+).

Die gemessenen IL-2-Konzentrationen der Kontrolle nur mit PBMC lagen höher, als die der mit 2,5 ng/ml 26II6 behandelten Sphäroide, wobei die Konzentration initial am höchsten war (250 pg/ml) und dann kontinuierlich abnahm. Bei den mit 26II6 behandelten Sphäroiden stieg die IL-2-Konzentration ab Tag 11 leicht an. Die IL4-Konzentrationen der behandelten Sphäroide lagen während der gesamten Versuchszeit auf einem stabilen Level bei etwa 120 pg/ml. Im Ansatz mit den Kontrollsphäroiden wurde initial eine Konzentration von 40 pg/ml gemessen, die im wei-

## Ergebnisse

teren Verlauf der Versuchszeit unter die Nachweisgrenze von 20 pg/ml abfiel. In den Medienproben der behandelten Sphäroide wurde sehr viel IL-6 detektiert. Die Werte lagen so hoch, dass nur durch Extrapolieren der Standardgeraden eine Berechnung der Mengen geschehen konnte (\*). Alle Werte, außer an Tag 11, lagen deutlich oberhalb der Nachweisgrenze von 5000 pg/ml. Im Kontrollansatz wurde hingegen nur sehr wenig IL-6 gefunden.



**Abb. 38: Zytokin-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**

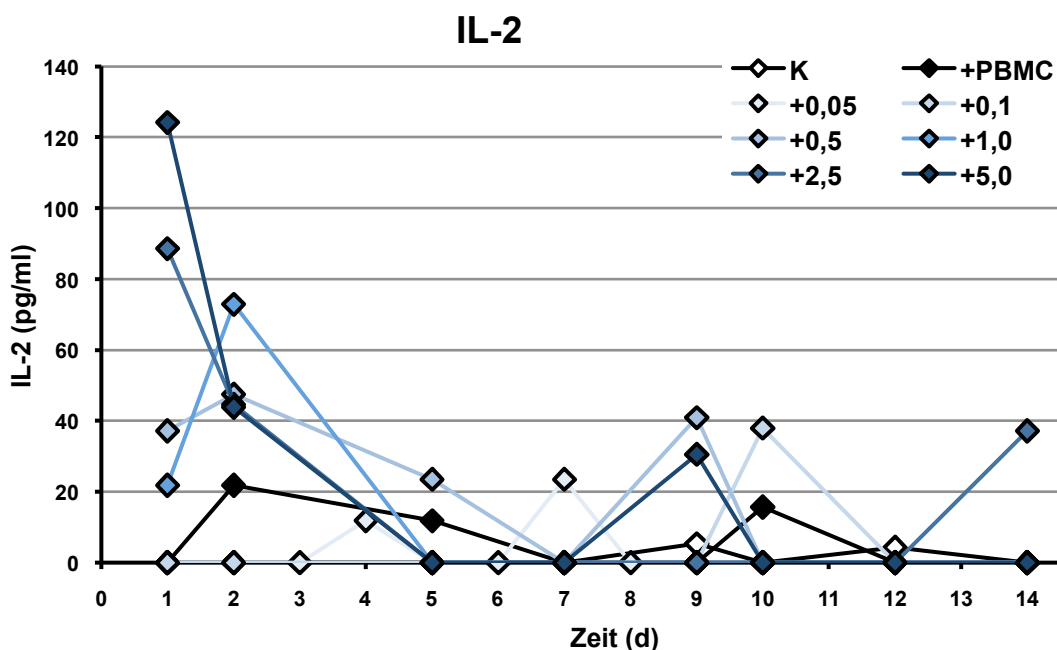
Die Ergebnisse von CBA-Messungen der Zytokin-Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen. Gezeigt sind die Kontrolle (unbehandelte Sphäroide; schwarz), und der Ansatz mit PBMC und 2,5 ng/ml 26II6 behandelter Sphäroide (rot) in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d). Die mit \* markierten Werte wurden durch Extrapolieren der Standardgeraden berechnet.

Ausgehend von einer initialen Konzentration von 550 pg/ml sinkt IL-10 nach einem Peak an Tag 3 im weiteren Verlauf des Versuchs auf Kontrollniveau ab. Ein ähnlicher Kurvenverlauf ist für TNF- $\alpha$  zu beobachten, die initiale Konzentration (780 pg/ml) sinkt im Versuchsverlauf ungefähr auf Kontrollniveau ab. Für IFN- $\gamma$  lagen die meisten Werte ebenfalls so hoch, dass sie nur durch Extrapolieren der Standardge-

raden berechnet werden konnten (\*). Der Verlauf der Kurve zeigt einen rapiden Anstieg auf einen Peak an Tag 3 mit anschließendem kontinuierlichem Absinken.

Da in dem Versuch mit 26Il6 bei zwei Zytokinen (IL-6 und IFN- $\gamma$ ) die gemessenen Werte über der Nachweisgrenze lagen, wurden bei den Zytokin-Messungen des Dosis-Wirkungsversuches die Proben vorher 1:10 verdünnt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse des Dosis-Wirkungsversuches mit catumaxomab.

Durch die vorhergehende Verdünnung fielen die IL-2-Konzentrationen unter die Nachweisgrenze von 20 pg/ml (Abbildung 39). Die gezeigten Werte wurden erst durch Einbeziehen des Verdünnungsfaktors errechnet.



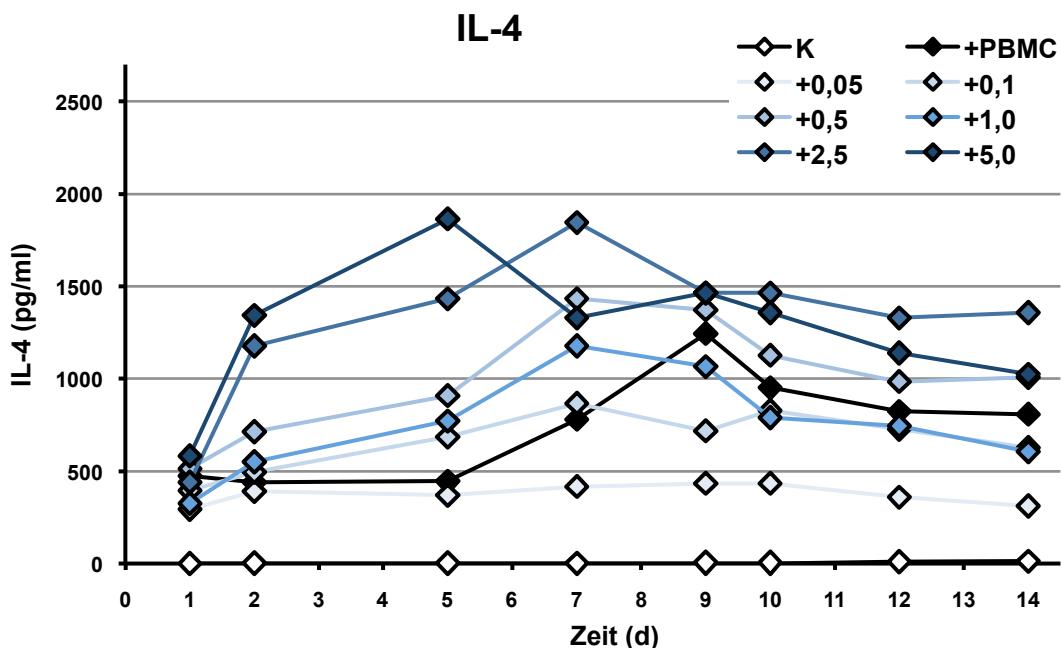
**Abb. 39: IL-2-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**

IL-2-Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen - bestimmt mit CBA-Messungen - sind in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d) dargestellt. Die Ergebnisse stammen von der Kontrolle (K), sowie von sieben Versuchsansätzen mit PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 5,0 ng/ml) catumaxomab.

IL-4 konnte in allen Ansätzen, in denen sich PBMC befanden, gemessen werden (Abbildung 40). Von einem Ausgangswert von etwa 500 pg/ml an Tag 1 stiegen die Konzentrationen maximal bis Tag 7 an. Bei den zwei Ansätzen mit den höchsten catumaxomab-Konzentrationen erfolgte ein sehr rascher Anstieg, bei niedrigeren Konzentrationen (0,1 - 1,0 ng/ml) ein etwas langsamerer. Auch die maximal gemessenen IL-4-Konzentrationen waren hier geringer. In dem Kontrollansatz mit PBMC wurde – wenn auch etwas verzögert - ebenfalls ein Konzentrationsanstieg beobachtet. Nur bei der Konzentration von 0,05 ng/ml blieb die gemessene IL-4-Konzentration auf Ausgangsniveau.



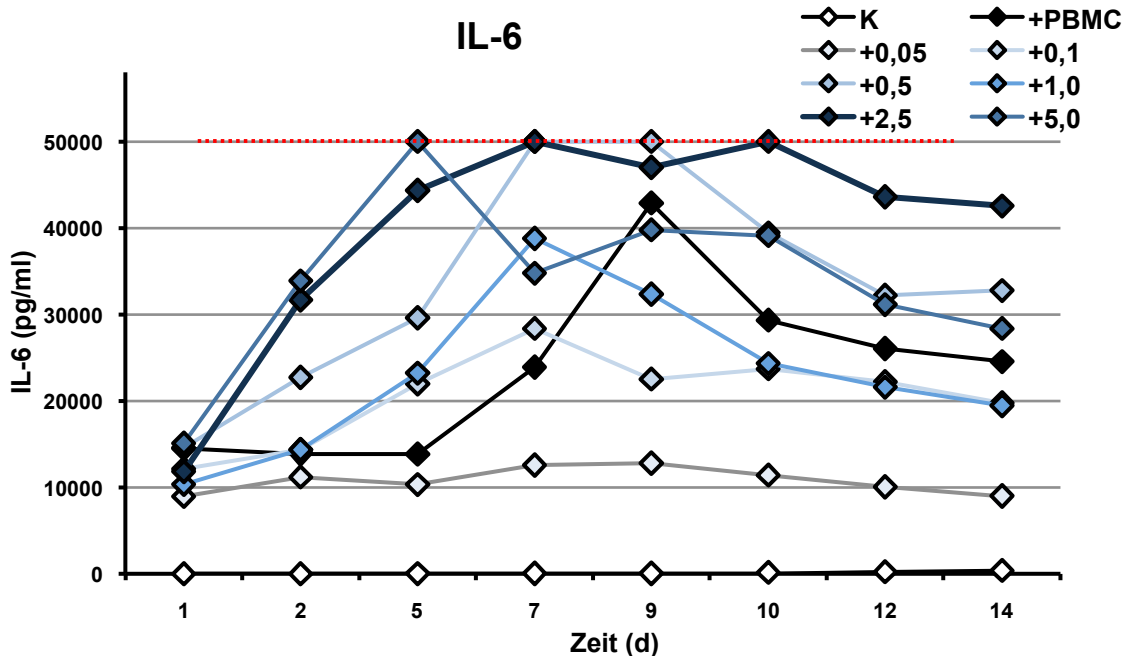
## Ergebnisse



**Abb. 40: IL-4-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**

IL-4-Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen - bestimmt mit CBA-Messungen - sind in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d) dargestellt. Die Ergebnisse stammen von der Kontrolle (K), sowie von sieben Versuchsansätzen mit PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 5,0 ng/ml) catumaxomab.

Einen vergleichbaren Kurvenverlauf mit den Ergebnissen der IL-4-Bestimmungen zeigten die Resultate der IL-6-Messungen (Abbildung 41).



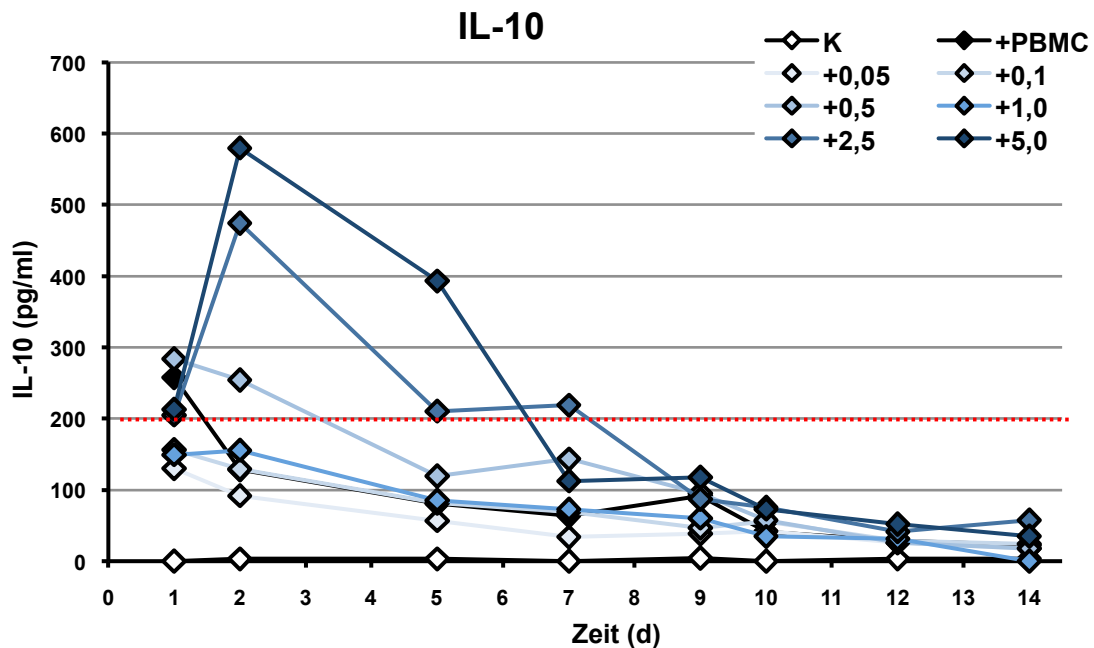
**Abb. 41: IL-6-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**

IL-6-Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen - bestimmt mit CBA-Messungen - sind in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d) dargestellt. Die Ergebnisse stammen von der Kontrolle (K), sowie von sieben Versuchsansätzen mit PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 5,0 ng/ml) catumaxomab. Datenpunkte, die auf der gestrichelten roten Linie liegen zeigen Messwerte über der Nachweisgrenze. Die Messwerte sind somit  $\geq 50.000$  pg/ml und ansonsten unbestimmt.

## Ergebnisse

Alle IL-6-Kurven begannen auf dem gleichen Niveau bevor die Kurven +5,0 und +2,5 steil - bis über die obere Nachweisgrenze - und die restlichen flach anstiegen. Wie bei IL-4 änderte sich die Konzentration an IL-6 bei +0,05 kaum. Interessanterweise stieg die IL-6-Konzentration der Kontrolle ohne PBMC im Laufe der Versuchszeit von 9 auf 489 pg/ml an.

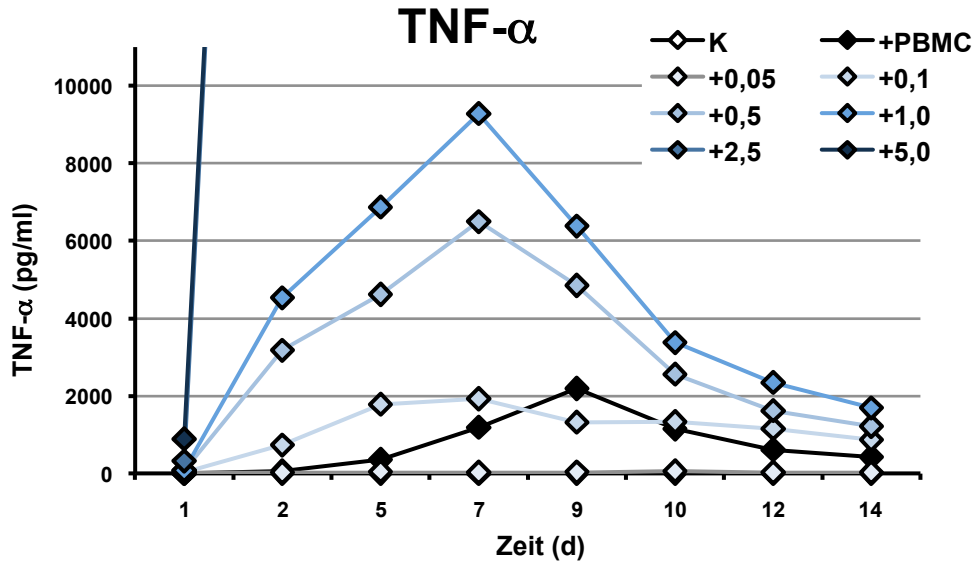
Im Dosis-Wirkungs-Versuch lagen nach einem Tag die IL-10 Konzentrationen etwa auf dem gleichen Niveau zwischen 130 und 280 pg/ml (Abbildung 42). Danach stiegen die Konzentrationen bei den beiden Versuchsansätzen mit 2,5 und 5,0 ng/ml catumaxomab an, um nach einem Maximum am zweiten Tag (474 beziehungsweise 580 pg/ml) wieder abzufallen. Bei allen anderen Proben fielen die Werte schon am zweiten Tag unter die Nachweisgrenze, die aufgrund der Verdünnung bei 200 pg/ml lag.



**Abb. 42: IL-10-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**

IL-10-Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen - bestimmt mit CBA-Messungen - sind in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d) dargestellt. Die Ergebnisse stammen von der Kontrolle (K), sowie von sieben Versuchsansätzen mit PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 5,0 ng/ml) catumaxomab. Datenpunkte, die auf oder unter der gestrichelten roten Linie liegen zeigen Messwerte unter der Nachweisgrenze. Die Messwerte sind somit  $\leq 200$  pg/ml und ansonsten unbestimmt, die gezeigten Werten entstanden durch Extrapolieren der Standardgeraden.

TNF- $\alpha$  wurde in den Proben der Ansätze +2,5 und +5,0 trotz Verdünnung in so großen Mengen detektiert, dass die Werte oberhalb der Nachweisgrenze lagen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die x-Achse in der Graphik bis 11.000 pg/ml begrenzt (Abbildung 43).



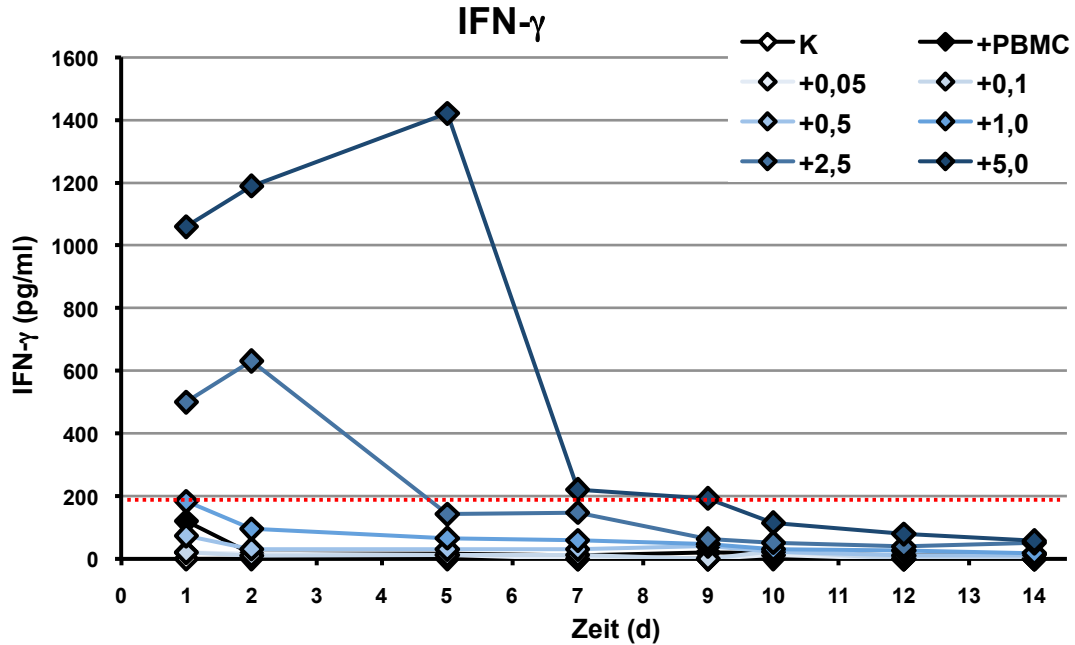
**Abb. 43: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**

TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen - bestimmt mit CBA-Messungen - sind in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d) dargestellt. Die Ergebnisse stammen von der Kontrolle (K), sowie von sieben Versuchsansätzen mit PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 5,0 ng/ml) catumaxomab. Datenpunkte, die auf der gestrichelten roten Linie liegen zeigen Messwerte über der Nachweisgrenze. Die Messwerte sind somit  $\geq 50.000$  pg/ml und ansonsten unbestimmt.

Bereits an Tag 1 lagen die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zwischen 18 und 893 pg/ml, wobei der geringste Wert bei 0,05 ng/ml gemessen wurde und der größte Wert bei 5,0 ng/ml catumaxomab. An den darauf folgenden Tagen stiegen die Werte dosisabhängig unterschiedlich stark an. Die gezeigten Kurven erreichten nach sieben Tagen ein Maximum, fielen danach wieder ab und erreichten nach 14 Tagen etwa das Ausgangsniveau. Nach 12 Tagen war die TNF- $\alpha$ -Konzentration bei 2,5 ng/ml catumaxomab wieder in den messbaren Bereich auf 47.000 pg/ml abgesunken, während bei 5,0 ng/ml catumaxomab auch am letzten Tag des Versuches die Nachweisobergrenze noch überschritten blieb. Auch in den Proben des Kontrollansatzes mit PBMC ohne catumaxomab wurde nach einer Woche vermehrt TNF- $\alpha$  gemessen, welches nach einem Maximum an Tag 9 wieder absank. Insgesamt konnte hier ein Anstieg auf den Level der Probe +0,1 beobachtet werden.

Bei IFN- $\gamma$  waren, im Vergleich zum Kontrollansatz mit PBMC ohne catumaxomab, nur in den beiden Ansätzen mit der höchsten Dosis von 2,5 und 5,0 ng/ml catumaxomab Unterschiede in der gemessenen Zytokinmenge zu erkennen (Abbildung 44). Schon nach einem Tag lagen hier erhöhte Level IFN- $\gamma$  vor (500 und 1.100 pg/ml), die noch etwas ansteigen und nach fünf beziehungsweise sieben Tagen wieder auf ein Niveau unterhalb der Nachweisgrenze absanken. Dabei lag der

erste gemessene Wert an Tag 1 bei 5,0 ng/ml catumaxomab-Zugabe doppelt so hoch wie der von +2,5, stieg auf ein insgesamt höheres Maximum (1.420 pg/ml) und sank erst später ab.



**Abb. 44: Interferon- $\gamma$ -Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**

IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen - bestimmt mit CBA-Messungen - sind in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d) dargestellt. Die Ergebnisse stammen von der Kontrolle (K), sowie von sieben Versuchsansätzen mit PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 5,0 ng/ml) catumaxomab. Datenpunkte, die auf oder unter der gestrichelten roten Linie liegen zeigen Messwerte unter der Nachweisgrenze. Die Messwerte sind somit  $\leq 200$  pg/ml und ansonsten unbestimmt, die gezeigten Werten entstanden durch Extrapolieren der Standardgeraden

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Messung der sechs Zytokine funktioniert hat. IL-2 lag allerdings fast immer unterhalb der Nachweisgrenze, hierfür wäre eine sensitivere Methode ratsam. IL-4 und IL-6 zeigten keine catumaxomab-abhängigen Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle nur mit PBMC. IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  dahingegen zeigten catumaxomab-Dosis-abhängigen Verhalten.

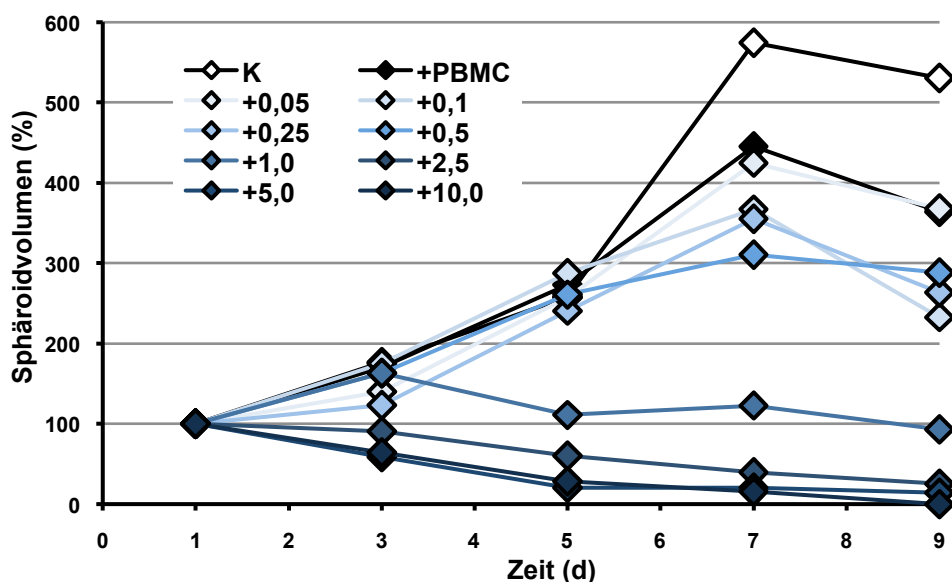
Im Vergleich mit dem Vorversuch mit 2,5 ng/ml 26II6 waren die Kurvenverläufe der gemessenen Zytokine, mit Ausnahme bei TNF- $\alpha$ , immer ähnlich. Bei IL-6 und IL-10 stimmten auch die ermittelten Konzentrationen überein. IFN- $\gamma$  wurde im Vorversuch deutlich höher gemessen, TNF- $\alpha$  und IL-4 niedriger.

## 4.4.2 Cisplatin

Cisplatin ist ein Zytostatikum, welches üblicherweise bei Plattenepithelkarzinomen eingesetzt wird. Um zu testen, ob eine kombinierte Behandlung mit catumaxomab und Cisplatin möglich ist und eine Therapieverbesserung erreicht werden kann, wurde zunächst die Wirkung von Cisplatin alleine an Sphäroiden der Zelllinie FaDu getestet. Allen Ansätzen waren  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml zugegeben. Mit Größenbestimmungen, Vitalitätstests und Kolonienbildungstests wurde untersucht, ob eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisbar ist und ob sich eine  $ED_{50}$  für Cisplatin berechnen lässt. Darüber hinaus wurden die Zytokine in den Medienüberständen gemessen, damit ein Vergleich der Wirkungen beider Therapeutika auf die PBMC möglich war.

### 4.4.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen

Wie für catumaxomab wurden zunächst FaDu-Sphäroide mit unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin behandelt und Größenbestimmungen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Im Bereich von 0  $\mu\text{g/ml}$  bis 10  $\mu\text{g/ml}$  wurden neun Konzentrationen getestet. Als Kontrolle dienten Sphäroide denen keine PBMC und kein Cisplatin zugegeben wurden.



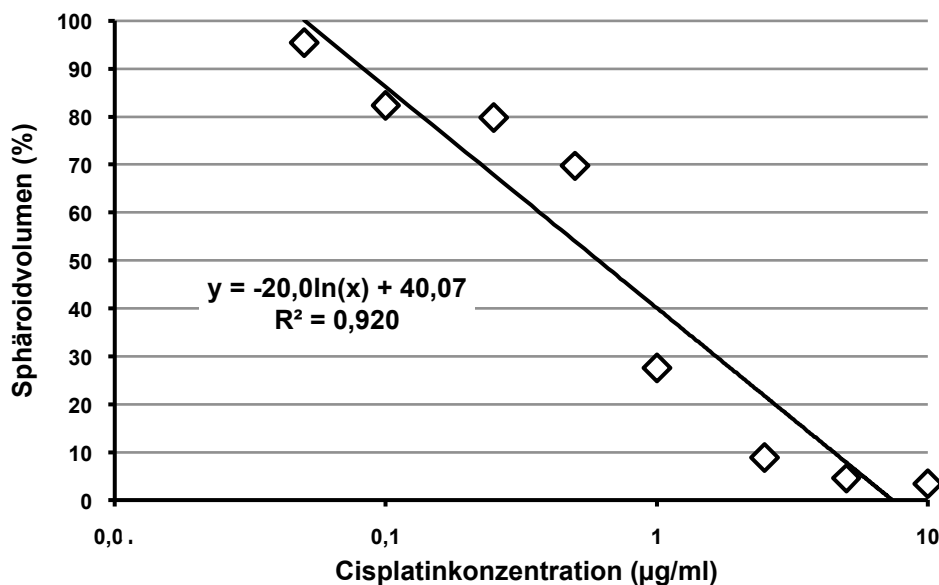
**Abb. 45: Größenwachstum von FaDu-Sphäroiden unter Behandlung mit Cisplatin.**

Die relativen Sphäroidvolumina (%) gegen die Versuchszeit (d) von unbehandelten FaDu-Sphäroiden (K) und neun Versuchsansätzen aus mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-10,0  $\mu\text{g/ml}$ ) Cisplatin behandelten FaDu-Sphäroiden in Co-Kultur mit PBMC sind gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SD aus  $> 10$  Messungen.

Abbildung 45 zeigt die relativen Sphäroiddurchmesser (%) gegen die Versuchszeit (d). Die Werte wurden wie bereits beschrieben auf die jeweilige Ausgangsgröße an Tag 1 normiert. Die Graphik zeigt, dass sich die Sphäroide am dritten Tag

bezüglich ihrer Größe auftrennten. Die mit der medianen Dosis von 0,5 µg/ml behandelten Sphäroide veränderten ihre Größe nicht. Höher dosierte Konzentrationen führten zu Verringerungen der Sphäroidgrößen und geringere Dosen hatten keine Wirkung, so dass die Sphäroide weiter wachsen konnten. Nach neun Tagen verloren auch diese Sphäroide an Größe. Da kein neues Medium zugeführt wurde ist dies vermutlich auf Nahrungsmangel zurückzuführen.

Die in Abbildung 45 dargestellten relativen Größen der Sphäroide wurden für eine Dosis-Wirkungskurve verwendet. Dazu wurden die Werte von Tag 7 eingesetzt (Abbildung 46).

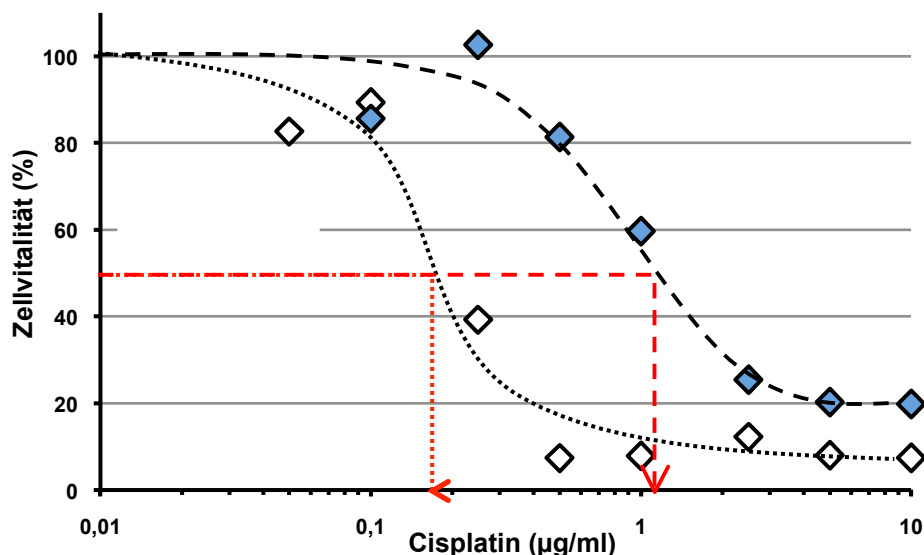


**Abb. 46: Dosis-Wirkungskurve für Cisplatin bei FaDu-Sphäroiden nach sieben Tagen Behandlung.** Die Sphäroidvolumina (%) bezogen auf die Größe der Kontrollsphäroide mit PBMC in Co-Kultur in Abhängigkeit der eingesetzten Cisplatinkonzentration (µg/ml) von FaDu Sphäroiden nach sieben Tagen Behandlungsdauer ist in halblogarithmischer Darstellung gezeigt. In den Graphen eingefügt ist das Resultat eines logarithmischen Fits.

In der Graphik ist zu erkennen, dass die Sphäroiddurchmesser dosisabhängig kleiner wurden, je höher die Dosis, desto kleiner die Sphäroide. Eine Spearman Rangkorrelation ergab den Wert  $r_s = 1,0$ . Unter Verwendung des in der Abbildung gezeigten logarithmischen Fits wurde die  $ED_{50}$  bestimmt. Dies ist in diesem Fall die Dosis Cisplatin, die bei FaDu-Sphäroiden nach 7 Tagen zu einer Volumenreduktion auf 50 % des Kontrollniveaus führte. Die errechnete  $ED_{50}$  liegt bei 0,61 µg/ml, für den Sphäroiddurchmesser liegt die  $ED_{50}$  bei 2,11 µg/ml Cisplatin.

Um die  $E_{50}$  mit weiteren Methoden zu bekräftigen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Zum einen kam ein Vitalitätstest zum Einsatz, zum anderen ein Kolonienbildungstest.

Bei dem Vitalitätstest mit der XTT-Methode wurde die Aktivität mitochondrialer Enzyme nach Cisplatin-Behandlung gemessen (Abbildung 47). Die Zellvitalität (%) bezogen auf die Kontrolle mit PBMC eines Versuchs mit Monolayer-Zellen (blau) und mit Zellen des Dosis-Wirkungsversuchs mit FaDu-Sphäroiden (weiß) ist gegen die eingesetzte Dosis Cisplatin in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen. Die Behandlung dauerte fünf Tage. Bei beiden Kurven ist ein sigmoidaler Verlauf ersichtlich.



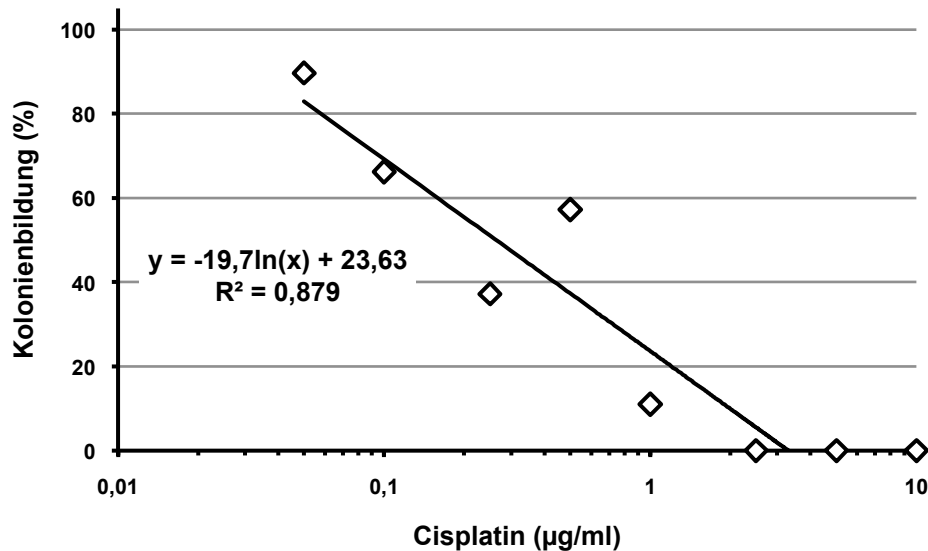
**Abb. 47: Vitalitätstests an mit Cisplatin behandelten FaDu-Monolayer-Zellen und -Sphäroiden.**

Die mit der XTT-Methode bestimmte Zellvitalität (%) in Relation zu unbehandelten Zellen ist in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis Cisplatin ( $\mu\text{g/ml}$ ) in halb-logarithmischer Auftragung gezeigt. Die Punkte repräsentieren Werte aus zwei Messungen. Die Resultate der Behandlung von Monolayer-Zellen (blau) sind mit denen von Sphäroidzellen (weiß) am Beispiel der Zelllinie FaDu dargestellt. In die Abbildung eingefügt sind rote Linien zur Abschätzung der  $ED_{50}$  für beide Zellkultursysteme (gepunktet für Sphäroide, gestrichelt für Monolayer-Zellen).

In die Abbildung eingefügt sind gestrichelte und gepunktete Linien, welche die Abschätzung der jeweiligen  $ED_{50}$  verdeutlichen sollen. Die  $ED_{50}$  ist in diesem Fall die Cisplatin-Konzentration die benötigt wurde, um die Vitalität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle 24 h nach Versuchsende auf 50 % zu reduzieren. Das Ergebnis der hier geschätzten  $ED_{50}$  lag bei ca.  $0,18 \mu\text{g/ml}$  für die Sphäroid-Zellen und für die Monolayer-Zellen bei ca.  $1,2 \mu\text{g/ml}$ . Die eingefügten Linien stammen nicht aus Berechnungen sondern sind manuell eingezeichnet, da mathematische Fits auf Grund zu geringer Datenmengen in diesen Fällen nicht durchgeführt wurden. Die Abbildung macht dennoch deutlich, dass FaDu-Monolayer-Zellen nicht so stark auf die Behandlung mit Cisplatin reagierten wie die FaDu-Sphäroid-Zellen.

Der Kolonienbildungstest gibt Aufschluss darüber, wie viele Zellen nach einer Behandlung überleben. Nur Zellen, die keinen nachhaltigen Schaden genommen haben, sind in der Lage, ihr Wachstum über einen längeren Zeitraum aufrecht zu

erhalten. Per Definitionem werden als überlebende Zellen solche gewertet, die sich sechsmal teilen und Kolonien von mindestens 50 Zellen bilden können. Hierzu wurden Sphäroide vereinzelt mit einer Dichte von 20 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und für acht Tage kultiviert, da die Verdopplungszeit der FaDu-Zellen etwa 31 h beträgt. Das Verhältnis der entstandenen Kolonien zu ausgesäten Zellen ergibt die Plattierungseffizienz (PE). Bei unbehandelten FaDu-Zellen betrug diese - unabhängig von der gewählten Aussaatdichte (20, 50 oder 100 Zellen/cm<sup>2</sup>) - immer um die 20 %. Für diesen Versuch wurden FaDu-Sphäroide, die 11 Tage mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen behandelt worden waren, verwendet. In Abbildung 48 sind die PE-Werte nochmals auf die Kontrolle mit PBMC ohne Cisplatin normiert worden und gegen die eingesetzte Dosis Cisplatin (µg/ml) in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen.



**Abb. 48: Kolonienbildungstest von mit Cisplatin-behandelten FaDu-Sphäroiden nach 11 Tagen Behandlung.** Die Kolonienbildung (%) in Relation zu unbehandelten Zellen ist in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis Cisplatin (µg/ml) in halb-logarithmischer Auftragung gezeigt. Die Punkte repräsentieren Werte aus zwei Messungen. In die Graphik eingefügt ist das Ergebnis eines logarithmischen Fits.

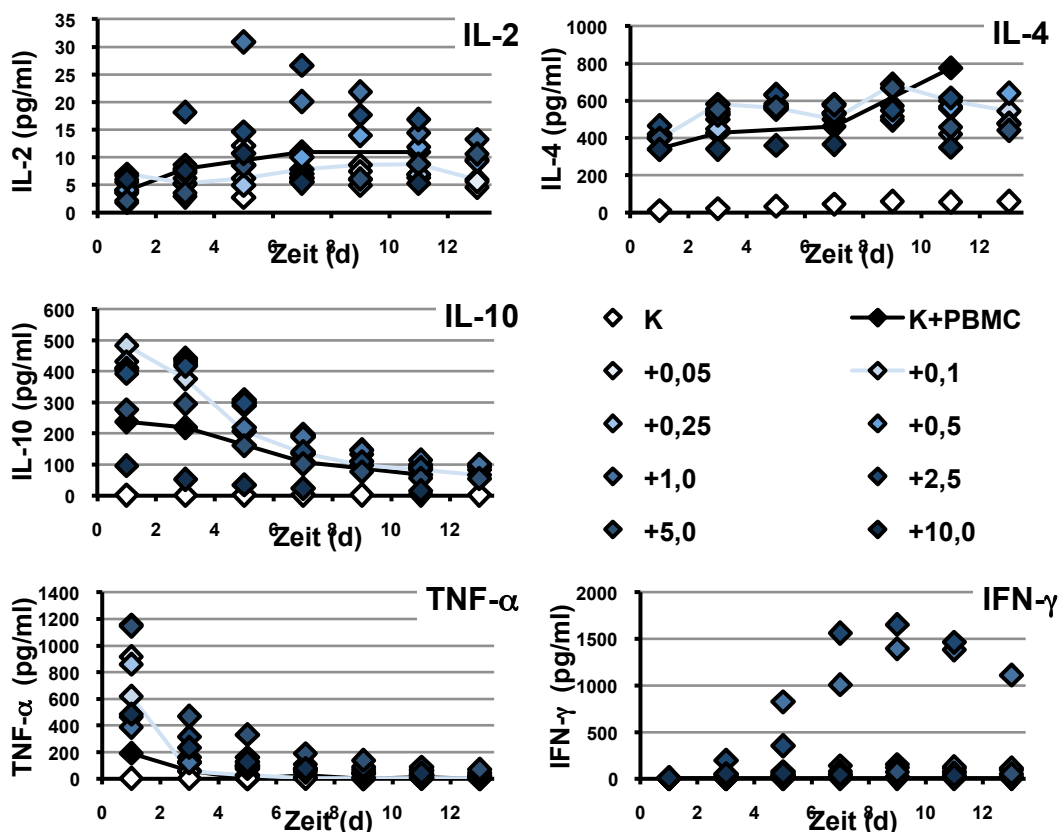
In der Abbildung ist zu erkennen, dass die Kolonienbildung, mit Ausnahme des Ansatzes mit 0,5 µg/ml Cisplatin, dosisabhängig abnimmt. Eine Spearman-Rangkorrelation ergab den Wert  $r_s > 0,994$ . Unter Verwendung des in der Abbildung gezeigten logarithmischen Fits wurde die ED<sub>50</sub> bestimmt. In diesem Fall ist das die Dosis Cisplatin, welche die Fähigkeit von FaDu-Sphäroidzellen zur Kolonienbildung nach 11 Tagen auf 50 % des Kontrollniveaus führte. Die ED<sub>50</sub> lag bei 0,26 µg/ml. Bei Konzentrationen von 2,5 µg/ml und mehr wurden überhaupt keine Kolonien mehr gebildet. Ein Vergleich der ermittelten Effektdosen führte dazu, bei folgenden Versu-



chen, bei denen jeweils nur eine Cisplatin-Konzentration eingesetzt wurde, eine Konzentration von 0,5 µg/ml zu verwenden.

#### 4.4.2.2 Einfluss von Cisplatin auf die Zytokinausschüttung

Die Versuche mit Cisplatin dienten dazu, einen Versuch mit kombinierter Behandlung mit catumaxomab und Cisplatin vorzubereiten. Damit ein Vergleich der Wirkungen beider Therapeutika auf die PBMC möglich war, wurden auch die Zytokine in den Medienüberständen gemessen (Abbildung 49).



**Abb. 49: Zytokin-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.**  
Die Ergebnisse von CBA-Messungen der Zytokin-Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen. Gezeigt sind die Kontrolle (K), sowie neun Versuchsansätze mit PBMC und unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen (0-10,0 µg/ml) in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d). Zum besseren Erkennen sind die jeweiligen Punkte der Ansatz K+PBMC (schwarz) und +0,1 (blau) mit Linien verbunden.

Mit wenigen Ausnahmen liegen die gemessenen Zytokinkonzentrationen im Bereich der Kontrolle nur mit PBMC. Dies ist der Fall bei IL-2, IL-4 und IL-10, wobei die IL-2-Konzentrationen bis auf wenige Ausnahmen alle unterhalb der Nachweisgrenze von 20 pg/ml lagen. Erhöhte Konzentrationen wurden für IFN-γ und TNF-α gemessen: Die IFN-γ-Konzentrationen der Ansätze +1,0 und +2,5 stiegen nach fünf Tagen stark an und fielen gegen Versuchsende wieder ab. Bei TNF-α lagen an Tag 1 erhöhte - aber nicht dosisabhängige - Konzentrationen vor, die an den folgenden Ta-

gen absanken. Für IL-6 gab es nur Ergebnisse der Kontrolle ohne PBMC-Zugabe (nicht gezeigt), interessanterweise stiegen diese von 85 pg/ml an Tag 1 auf 807 pg/ml an Tag 13 kontinuierlich an. Die Cisplatin-Behandlung hatte nur auf die Expression der Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  einen Einfluss. Allerdings hatte die für die kombinierte Therapie mit catumaxomab und Cisplatin gewählte Dosis von 0,5  $\mu$ g/ml Cisplatin keinen Effekt.

### **4.4.3 Test auf Synergie zwischen catumaxomab und Cisplatin**

Die zuvor beschriebenen Resultate der Cisplatin Dosis-Wirkungskurve dienten als Vorversuche für Tests auf die Synergie zwischen den beiden Wirkstoffen Cisplatin und catumaxomab. Hierfür wurde ein Versuchskonzept mit fünf verschiedenen Ansätzen konzipiert: 1. Eine Kontrolle nur mit Sphäroiden, 2. eine Kontrolle mit PBMC, 3. ein Ansatz mit 0,5 ng/ml catumaxomab, 4. ein Ansatz mit 0,5  $\mu$ g/ml Cisplatin und 5. ein Ansatz mit 0,5 ng/ml catumaxomab und 0,5  $\mu$ g/ml Cisplatin; den Ansätzen waren immer  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml zugegeben. Die Festlegung der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte aufgrund der Vorversuchsergebnisse: diese Konzentrationen zeigten Wirkungen, jedoch nicht zu starke. Eine positive Wirkung bei vorliegender Synergie beider Mittel wurde dementsprechend schwach aber deutlich erwartet.

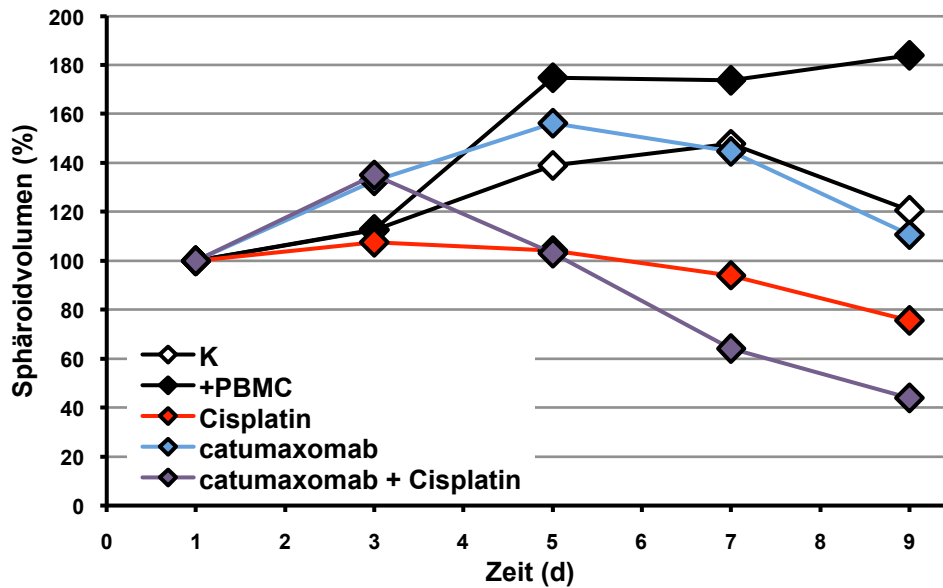
Als Maß für die Synergie-Wirkung dienten erneut Größenbestimmung der Sphäroide und Kolonienbildungstests. Des Weiteren wurden von der Kontrolle und dem kombiniert behandelten Ansatz Zytokinbestimmungen durchgeführt, um die Effekte auf die Aktivierung der PBMC zu untersuchen.

#### **4.4.3.1 Wirkungen der Wirkstoff-Kombination auf die Sphäroide**

Zunächst wurde der Einfluss der Wirkstoffe in den fünf Ansätzen auf die Größe der FaDu-Sphäroide betrachtet. In Abbildung 50 sind die Ergebnisse dieser Größenbestimmung, aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, dargestellt. Die Sphäroidvolumina wurden wie zuvor beschrieben auf die Ausgangsgröße normiert und gegen die Versuchszeit aufgetragen. Die Ergebnisse der ersten vier Versuchsansätze bewegten sich wie erwartet im Rahmen der zuvor schon gezeigten Ergebnisse. Die Kontrollsphäroide mit und ohne PBMC wuchsen stetig und die mit nur einem der beiden Wirkstoffe behandelten Sphäroide wuchsen zunächst ebenfalls, bevor sie nach fünf Tagen anfangen wieder kleiner zu werden. Nach neun Tagen hatten sie

## Ergebnisse

etwa wieder die Ausgangsgröße erreicht, dies stimmt mit den zuvor gezeigten Resultaten überein.



**Abb. 50: Größen von FaDu-Sphäroiden unter kombinierter Behandlung mit catumaxomab und Cisplatin.**

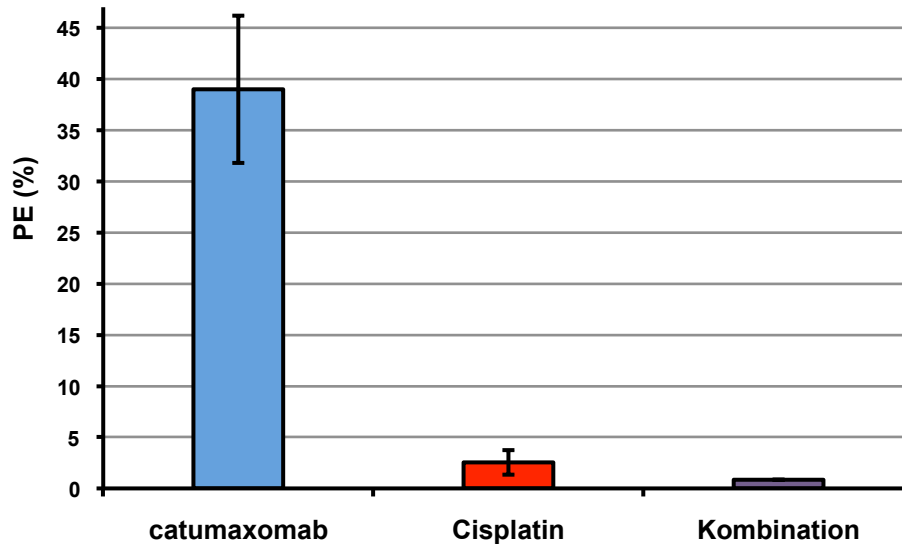
Die relativen Sphäroidvolumina (%) sind gegen die Versuchszeit (d) aufgetragen. Die Werte stammen von einem Kontrollansatz nur mit Sphäroiden (weiß), einer Kontrolle mit PBMC (schwarz) und drei Versuchsansätzen der Co-Kultur mit 0,5 ng/ml catumaxomab (blau), 0,5 µg/ml Cisplatin (rot) oder mit einer Kombination beider Therapeutika (violett). Die Daten stammen gemittelt aus zwei unabhängigen Versuchen.

Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass die mit catumaxomab und Cisplatin kombiniert behandelten Sphäroide am schnellsten und stärksten an Größe verloren. Nach neun Tagen hatten sie nur noch 44 % ihres Ausgangsvolumens. Hinsichtlich der Sphäroidgröße zeigen die beiden Therapeutika ein synergistisches Verhalten.

Zur genaueren Analyse der Überlebensfähigkeit der behandelten Zellen wurden nach sechs Behandlungstagen aus jedem der fünf Ansätze Sphäroide zum Kolonienbildungstest entnommen. Die Zellen wurden vereinzelt und mit 100 Z/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die entstandenen Kolonien wurden nach sechs Tagen ausgezählt und die Plattierungseffizienzen berechnet. In Abbildung 51 sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, und nochmals normiert auf die Kontrolle mit PBMC, dargestellt.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen reduzierte sich die Fähigkeit, Kolonien zu bilden bei der Kontrolle mit PBMC um etwa 12 %. Die Behandlung mit catumaxomab führte zu 65 % geringerem Überleben im Bezug zur Kontrolle mit PBMC und Cisplatin allein bewirkte bei diesem Versuch, dass nur noch 2,2 % der Zellen Kolonien bilden konnten. Aufgrund des Dosis-Wirkungs-Versuches (Abbildung 48)

war ein Wert von etwa 40 % erwartet worden. Die kombinierte Behandlung beider Therapeutika führte zu einem beinahe vollständigen Proliferationsstopp mit einem Restüberleben von 0,7 %.



**Abb. 51: Kolonienbildungstest der Synergieversuche nach sechs Tagen Behandlung.**

Die relativen Plattierungseffizienzen von drei Versuchsansätzen der Co-Kultur mit 0,5 ng/ml catumaxomab (blau), 0,5 µg/ml Cisplatin (rot) oder mit einer Kombination beider Therapeutika (violett) in Relation zur Kontrolle mit PBMC sind gezeigt. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt  $\pm$ SD. Die eingezeichneten Werte zeigen die jeweilige Kolonienbildung (%) relativ zur Kontrolle mit PBMC.

#### 4.4.3.2 Einfluss der Kombinationstherapie auf die Zytokinausschüttung

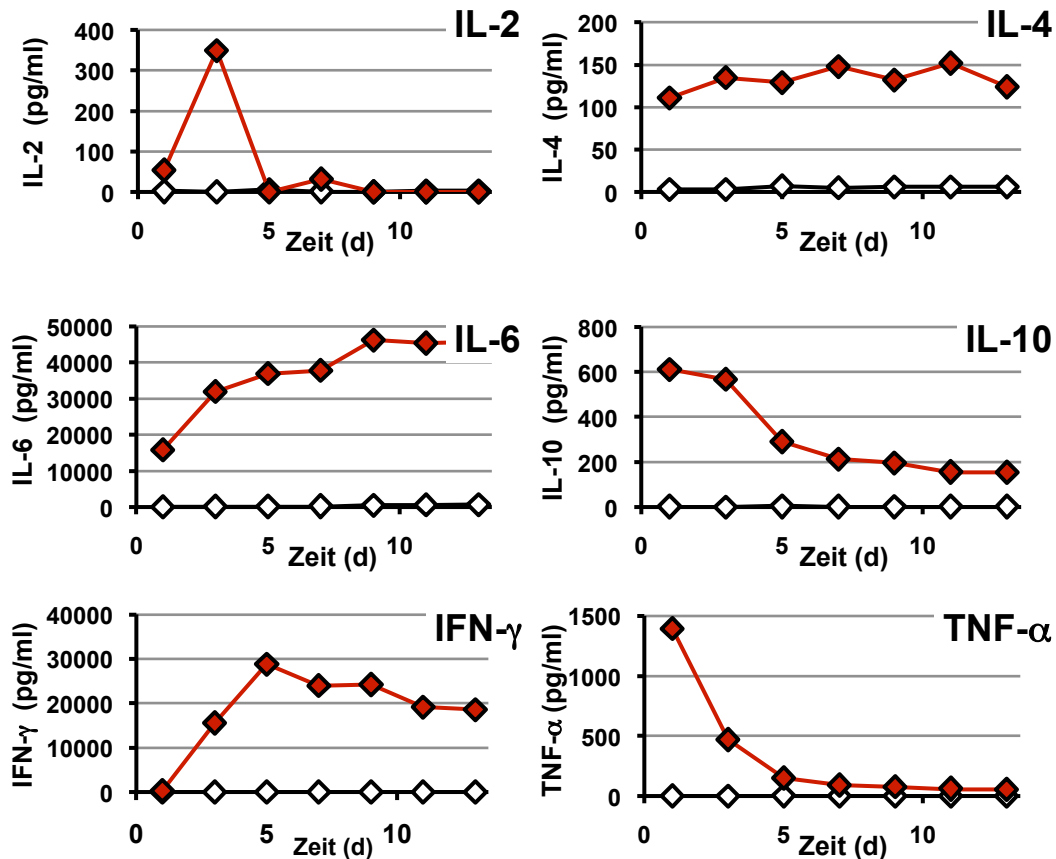
Um die Wirkung der kombinierten Therapie mit beiden Wirkstoffen auf die PBMC abschätzen zu können wurden aus Medienüberstand-Proben der mit catumaxomab und Cisplatin kombiniert behandelten Sphäroide und der unbehandelten Kontrollsphäroide Zytokinkonzentrationen bestimmt (Abbildung 52).

Für alle Zytokine außer IL-6 lagen die Kontrollwerte unter der Nachweisgrenze von 20 pg/ml. Bei IL-6 stiegen die Werte der Kontrolle ohne PBMC von 70 pg/ml an Tag 1 auf 625 pg/ml an Tag 13 an. Unter der kombinierten Wirkstoff-Behandlung zeigten alle Zytokine erhöhte Konzentrationen.

IL-2 stieg nach drei Tagen sehr rasch auf ein Maximum von 350 pg/ml an, um danach sofort wieder gegen Null abzufallen. Bei IL-4 wurde während der gesamten Versuchszeit ein erhöhter Level um die 100 bis 150 pg/ml gemessen. Die Konzentration von IL-6 stieg bis zum Tag 9 auf einen Wert von über 40.000 pg/ml an. Diese hohen Werte konnten nur durch Extrapolieren der Standardgerade berechnet werden. Die IL-10-Konzentration hatte an Tag 1 den höchsten Wert bei 611 pg/ml und sank danach bis zum Ende der Versuchszeit auf etwa 150 pg/ml ab. Auch bei Interferon- $\gamma$  musste die Standardgerade extrapoliert werden. Die gemessenen Konzentra-

## Ergebnisse

tionen stiegen in den ersten fünf Tagen steil auf über 28.000 pg/ml an. Anschließend nahm die Zytokinmenge langsam wieder ab, bis die Konzentration bei Versuchsende bei knapp unter 19.000 pg/ml lag. Ähnlich wie bei IL-10 war bei TNF- $\alpha$  die Konzentration an Tag 1 am höchsten ( $\approx 1.400$  pg/ml) und fiel im weiteren Versuchszeitraum auf etwa 50 pg/ml ab.



**Abb. 52: Zytokin-Konzentrationen in Überständen von FaDu-Sphäroidkulturen.** Die Ergebnisse von CBA-Messungen der Zytokin-Konzentrationen (pg/ml) in Medienüberständen von FaDu-Sphäroidkulturen. Gezeigt sind die Kontrolle (unbehandelte Sphäroide; weiß), und der Ansatz mit PBMC und 0,5  $\mu$ g/ml Cisplatin und 2,5 ng/ml catumaxomab behandelter Sphäroide (rot) in Abhängigkeit von der Versuchszeit (d).

Die Kurvenverläufe der sechs bestimmten Zytokine ähneln den zuvor gezeigten Messergebnissen (Abbildungen 39-44 und 49). Eine Ausnahme bildet der Kurvenverlauf bei IFN- $\gamma$ , der nur mit den Ergebnissen des Cisplatin Dosis-Wirkungsversuchs übereinstimmt. Die Zytokinkonzentrationen hingegen weichen im Vergleich zu den Dosis-Wirkungsversuchen ab. Für einen genaueren Vergleich der Daten sind in Tabelle 16 die jeweils maximal gemessenen Zytokinkonzentrationen (pg/ml) der Ansätze aus den Dosis-Wirkungsversuchen mit 2,5 ng/ml catumaxomab und mit 0,5  $\mu$ g/ml Cisplatin den Daten aus dem Versuch mit kombinierter Wirkstofftherapie gegenüber gestellt.

## Ergebnisse

**Tab. 16: Zytokin-Konzentrationen im Vergleich.**

Die Tabelle zeigt die maximalen gemessenen Zytokin-Konzentrationen (pg/ml) aus drei unterschiedlichen Versuchsansätzen: (catumaxomab) = Daten des Ansatzes mit 2,5 ng/ml catumaxomab aus dem Dosis-Wirkungsversuch mit catumaxomab; (Cisplatin) = Daten des Ansatzes mit 0,5 µg/ml Cisplatin aus dem Dosis-Wirkungsversuch mit Cisplatin und (Kombination) = Daten aus dem Versuch mit der kombinierten Wirkstoffbehandlung. Darüber hinaus sind die Versuchstage, an denen die jeweiligen Proben entnommen wurden, angegeben. n. b. = nicht bestimmt

	catumaxomab		Cisplatin		Kombination	
<b>IL-2</b>	89	d1	14	d9	349	d2
<b>IL-4</b>	1845	d7	640	d13	148	d7
<b>IL-6</b>	≥ 50000	d7	n. b.		46257	d9
<b>IL-10</b>	474	d2	442	d3	611	d1
<b>IFN-γ</b>	631	d2	127	d11	28758	d5
<b>TNF-α</b>	≥ 50000	d2-10	465	d1	1395	d1

IL-2, IL-10 und IFN-γ wurden unter kombinierter Wirkstofftherapie im Vergleich zu catumaxomab und Cisplatin alleine erhöht gemessen, IL-2 viermal, IL-10 eineinhalbmal und IFN-γ fast sechsundvierzigmal so hoch wie bei catumaxomab alleine. Die Erhöhung im Vergleich zu Cisplatin alleine war für IL-2 24fach, für IL-10 eineinhalbmal und für IFN-γ 226fach. IL-4 und TNF-α wurden unter kombinierter Wirkstofftherapie niedriger als bei den Versuchen mit catumaxomab alleine gemessen, IL-4 auch niedriger als bei Cisplatin alleine und TNF-α etwa dreifach so hoch wie bei Cisplatin alleine. Für IL-6 konnte keine Veränderung beobachtet werden.

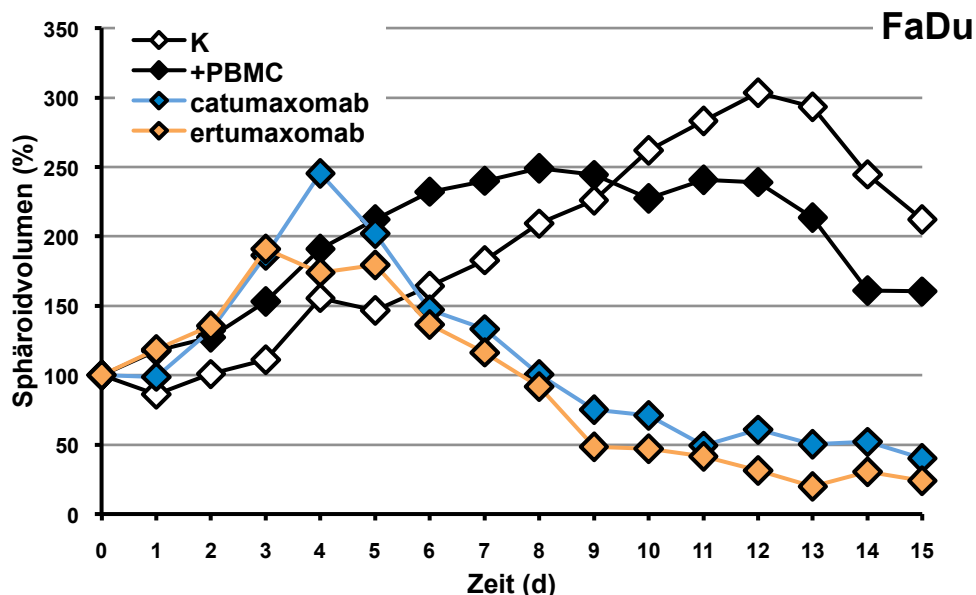
Die kombinierte Therapie mit catumaxomab und Cisplatin hatte einen positiven Effekt auf IL-2, IL-10 und IFN-γ.

### 4.4.4 ertumaxomab

Ein weiterer Wirkstoff, der an Sphäroiden in miniaturisierten Spinner-Flaschen getestet werden sollte, war ertumaxomab. Dieser trifunktionale bispezifische Antikörper hat Bindungsstellen für CD3 und Her2/neu. Aufgrund der positiven immunhistochemischen Färbungen von Her2/neu und der Fähigkeit zur Bildung stabiler Sphäroide, wurden für diesen Wirkstoff die Zelllinien FaDu, HT-29, SAS und WiDr ausgewählt. Als Kontrolle wurde ein Versuch mit HCT-116-Sphäroiden durchgeführt, von denen eine immunhistochemische Her2/neu Färbung negativ war.

Da der Wirkstoff catumaxomab bei der Zelllinie FaDu zu eindeutigen Ergebnissen führte und diese Zelllinie eine leichte Her2/neu-Expression aufweist, wurde zur Abschätzung der Effizienz/Wirkweise von ertumaxomab zunächst ein Versuch durchgeführt, bei dem parallel beide Antikörper zum Einsatz kamen. Es wurden hier-

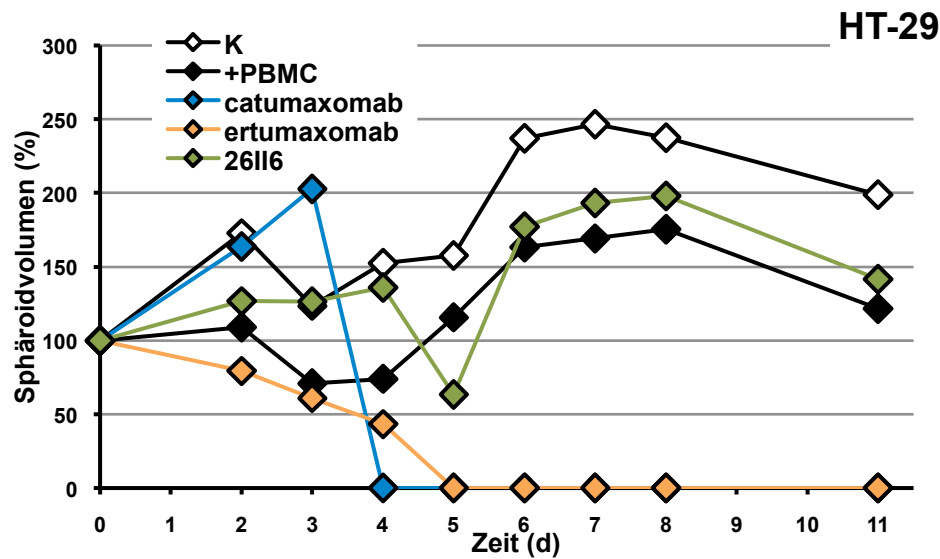
für Versuche mit unbehandelten Sphäroiden, nur mit PBMC Co-kultivierten Sphäroiden und mit jeweils 2 ng/ml Wirkstoff und PBMC über einen Zeitraum von 13 Tagen beobachtet (Abbildung 53). Es erfolgte eine tägliche Größenbestimmung der Sphäroide.



**Abb. 53: Größenvergleich von FaDu-Sphäroiden nach Behandlung mit catumaxomab und ertumaxomab.** Die relativen Sphäroidvolumina (%) gegen die Versuchszeit (d) von unbehandelten Sphäroiden (K), mit PBMC co-kultivierten Sphäroiden (schwarz), mit 2 ng/ml catumaxomab + PBMC (blau) und mit 2 ng/ml ertumaxomab + PBMC (orange) behandelten FaDu-Sphäroiden sind gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus > 10 Messungen.

Die FaDu-Sphäroide aller Ansätze wuchsen bis zum fünften Tag, anschließend begannen die behandelten Sphäroide an Größe zu verlieren. Die Wirkung von ertumaxomab war mit der von catumaxomab vergleichbar. Die Kontrollsphäroide wuchsen bis zum 12. Tag weiter, bevor sie aufgrund mangelnder Medienwechsel wieder an Größe verloren. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Versuch beendet. Die behandelten Sphäroide verloren bis zum 11. Tag etwa 50 bis 60 % ihres Ausgangsvolumens. Dies entspricht den zuvor gezeigten Ergebnissen aus der Konzentrationsreihe mit catumaxomab.

Die Zelllinie HT-29 hat eine höhere Her2/neu-Expression als die Zelllinie FaDu und zeigt zusätzlich eine starke EpCAM-Expression. Deshalb wurde ein Versuch mit dieser Zelllinie durchgeführt, bei dem wiederum zum Vergleich die beiden Präparate ertumaxomab und catumaxomab eingesetzt wurden. In einem parallelen Ansatz wurde der Kontrollantikörper 26II6 verwendet, dem die tumorspezifische Antigenbindungsstelle fehlt (Abbildung 54).



**Abb. 54: Größenvergleich von HT29-Sphäroiden nach Behandlung mit catumaxomab, ertumaxomab und 26II6.** Die relativen Sphäroidvolumina (%) gegen die Versuchszeit (d) von unbehandelten HT29-Sphäroiden (K), mit PBMC co-kultivierten Sphäroiden (+PBMC), mit 2 ng/ml 26II6 (26II6), mit 2 ng/ml catumaxomab + PBMC (catumaxomab) und mit 2 ng/ml ertumaxomab + PBMC (ertumaxomab) behandelten Sphäroiden sind gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert einen Mittelwert aus > 10 Messungen.

Während die Sphäroide der drei Kontrollen an Größe gewannen, lösten sich die behandelten Sphäroide sehr rasch zwischen Tag 4 und Tag 5 auf. Beide Wirkstoffe hatten auch bei dieser Zelllinie eine vergleichbare Wirkung. Der CD3-spezifische Kontrollantikörper 26II6 hatte keinen Einfluss auf das Sphäroidwachstum.

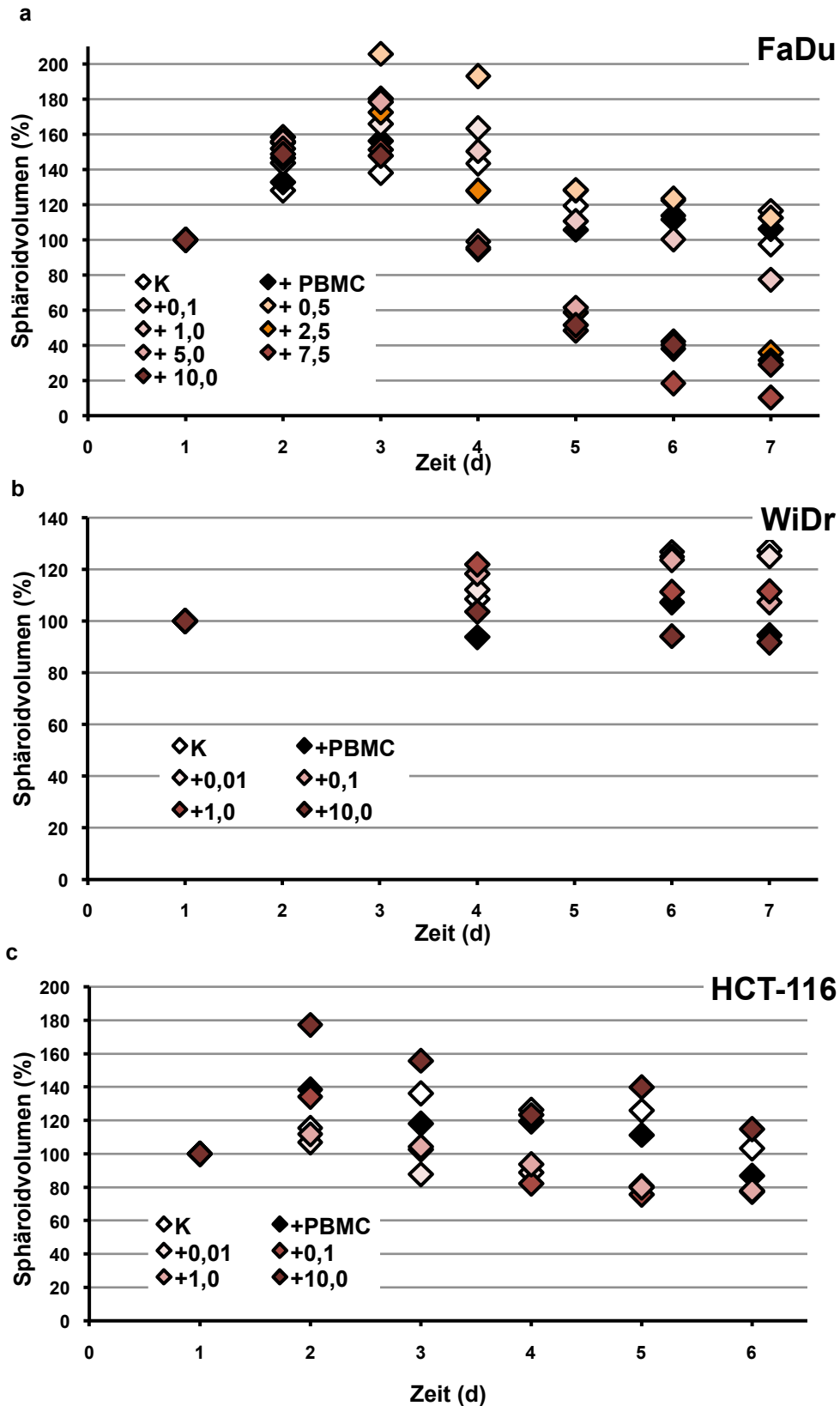
#### 4.4.4.1 Dosis-Wirkungsbestimmungen

Wie für catumaxomab und Cisplatin wurden auch mit ertumaxomab-Konzentrationsreihen Dosis-Wirkungsversuche durchgeführt. Diese Versuche wurden mit FaDu-Sphäroiden, sowie Sphäroiden der Zelllinien WiDr und HCT-116 durchgeführt. Die Messung der Sphäroid-Größen diente wiederum als erstes Maß für die Wirkung des Therapeutikums (Abbildung 55).

Entgegen der Erwartungen zeigten FaDu-Sphäroide ein anderes Verhalten als in den zuvor gezeigten analogen Darstellungen mit catumaxomab oder Cisplatin. Die Sphäroide teilten sich in zwei Gruppen: Eine, in der die Sphäroide nur unbedeutend kleiner wurden ( $\leq 1,0$  ng/ml) und eine, bei der die Größe deutlich abnahm ( $\geq 2,5$  ng/ml) (Abbildung 55a). Im Vergleich mit den bisher gezeigten Ergebnissen fällt auf, dass die Sphäroide der Kontrollansätze nicht wuchsen sondern kleiner wurden. Eine zu diesem Zeitpunkt noch nicht detektierte Kontamination mit Mykoplasmen könnte hierfür die Ursache gewesen sein.



## Ergebnisse



**Abb. 55: Einfluss der ertumaxomab-Behandlung auf Sphäroidgrößen der Zelllinien FaDu, WiDr und HCT-116.** Dargestellt sind die relativen Sphäroidvolumina (%) gegen die Versuchszeiten (d). In (a) sind die Resultate eines Versuchs mit unbehandelten FaDu-Sphäroiden (K) und sieben Versuchsansätzen mit FaDu-Sphäroiden, PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen ertumaxomab (0-10,0 ng/ml) gezeigt. (b) zeigt die Versuchsergebnisse von unbehandelten WiDr-Sphäroiden (K) und fünf Versuchsansätzen mit WiDr-Sphäroiden, PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen ertumaxomab (0-10,0 ng/ml). In (c) sind die Ergebnisse eines Versuchs mit unbehandelten HCT-116 Sphäroiden (K) und fünf Versuchsansätzen mit HCT-116-Sphäroiden, PBMC und unterschiedlichen Konzentrationen ertumaxomab (0-10,0 ng/ml) gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus > 10 Messungen.

Die WiDr-Sphäroide zeigten, trotz Her2/neu-Expression über den Versuchszeitraum von sieben Tagen kaum Größenänderungen (Abbildung 55b). Die Kontrollsphäroide wuchsen leicht (ca. 28 %), die am stärksten behandelten Sphäroide verloren etwas an Größe (ca. 8 %). Im Gesamten reichten die Daten nicht aus, um ein dosisabhängiges Verhalten zu erkennen.

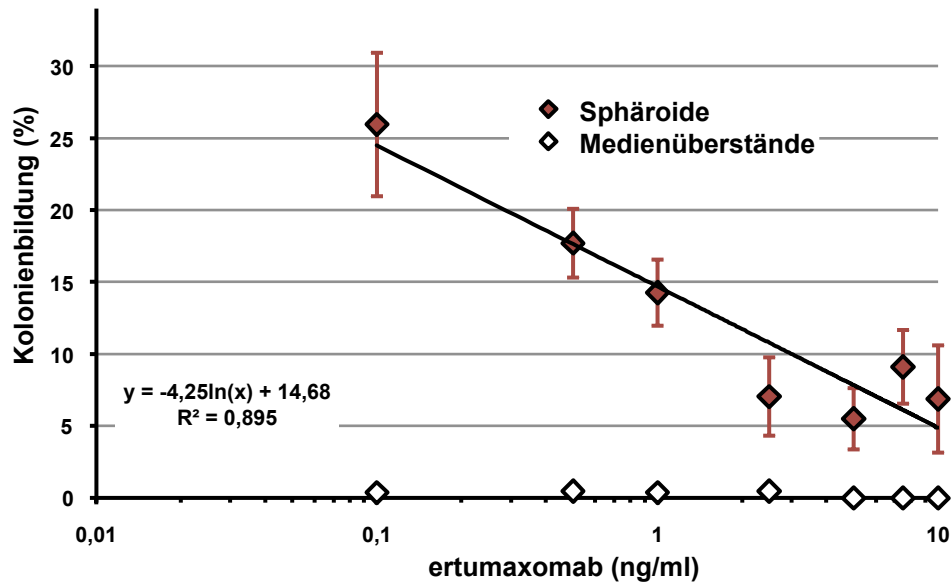
Die HCT-116-Sphäroide aller getesteten Ansätze veränderten ihre Größe während des gesamten Versuches nur in geringen Schwankungen (Abbildung 55c). Dies wurde zum einen aufgrund der fehlenden Her2/neu-Expression erwartet, überraschend war nur, dass die Sphäroide während der Versuchszeit nicht wuchsen.

Ein Versuch mit Sphäroiden der Zelllinie SAS und ertumaxomab konnte aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden. Weitere Versuche waren im vorgegebenen Zeitrahmen nicht mehr möglich.

#### **4.4.4.2 Einfluss von ertumaxomab auf FaDu-Sphäroide**

Mit Hilfe eines Kolonienbildungstests wurde der Einfluss von ertumaxomab auf das Überleben von FaDu-Sphäroidzellen nach Behandlung untersucht. Die Plattierungseffizienz der Zellen vereinzelter Sphäroide (%) wurde auf die mit 0 ng/ml und PBMC behandelten Sphäroide bezogen. Zusätzlich wurden für diesen Test Zellen aus dem Medienüberstand der jeweiligen Spinner-Flaschen eingesetzt. Da die Reduktion der Sphäroide mit einer zunehmenden Trübung des Mediums einherging, sollte ausgeschlossen werden, dass die Sphäroide zwar zerstört würden, die einzeln vorliegenden Zellen trotzdem noch lebensfähig sein könnten.

## Ergebnisse

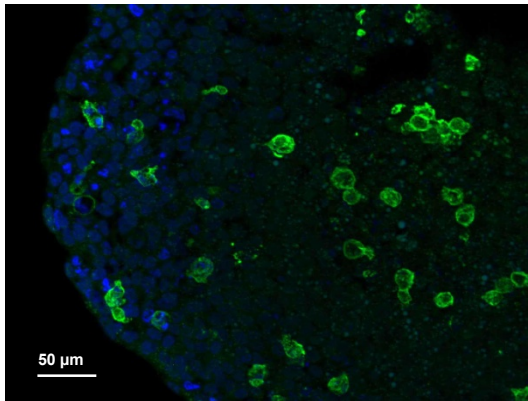


**Abb. 56: Kolonienbildungstest mit ertumaxomab-behandelter FaDu-Sphäroide nach sieben Tagen.** Die Bildung neuer Kolonien in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen (%) ist für Zellen aus FaDu-Sphäroiden (rot) und für Zellen aus dem Medium (weiß) in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis ertumaxomab (ng/ml) in halb-logarithmischer Darstellung gezeigt. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$ SD aus jeweils sechs Bestimmungen. In die Graphik eingefügt ist das Ergebnis eines logarithmischen Fits.

Abbildung 56 zeigt die Kolonienbildung in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis ertumaxomab (ng/ml) nach sieben Tagen in halblogarithmischer Darstellung. Die Ergebnisse stammen aus dem gleichen Versuch wie die Resultate, die in Abbildung 55a dargestellt wurden und bei denen keine dosisabhängige Größenreduktion der Sphäroide detektiert werden konnte. Der in die Graphik eingefügte Fit deutet eine dosisabhängige Korrelation an, die der Rangkorrelationskoeffizient von  $r_s \geq 0,980$  unterstützt. Da die kleinste verwendete Dosis von 0,1 ng/ml schon zu einer Reduktion des Überlebens auf 23 % führte und die  $ED_{50}$  unterhalb des eingesetzten ertumaxomab-Konzentrationsbereichs liegt, ist nur eine Abschätzung durch Extrapolieren des Fits möglich. Demnach läge die  $ED_{50}$  bei nur 0,00025 ng/ml. Bei den Zellen aus Medienüberständen konnte keine Kolonienbildung beobachtet werden. Lediglich bei der gänzlich unbehandelten Kontrolle wuchsen bei insgesamt 3.000 eingesäten Zellen 5 Kolonien.

Immunhistochemische Untersuchungen auf PBMC-Infiltration verliefen ebenfalls erfolgreich. In Abbildung 57 ist das Resultat einer CD45-Färbung eines Gefrierschnitts eines FaDu-Sphäroids dargestellt. Das Sphäroid war über einen Zeitraum von fünf Tagen mit 1,25 ng/ml ertumaxomab behandelt worden. Die CD45-Färbung erfolgte mit einem Fluoreszeinkoppelten Sekundärantikörper. Positive CD45-Färbungen (grün) sind deutlich zu erkennen, blau ist die Kerngegenfärbung mit DAPI

gezeigt. Die Leukozyten sind bis ins Innerste des Sphäroids in die Zentralnekrose vorgedrungen.

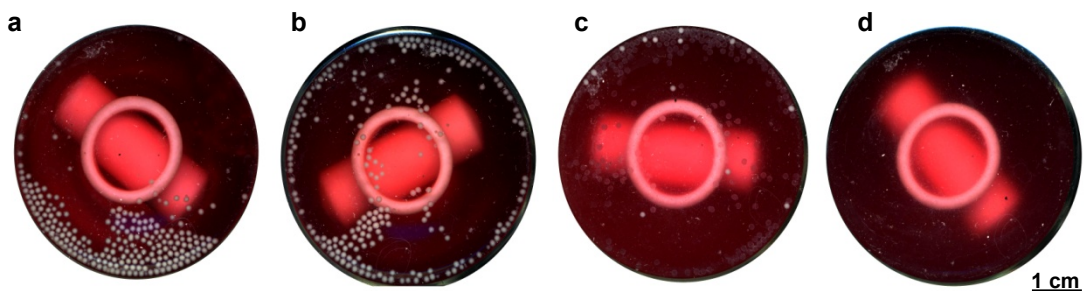


**Abb. 57: CD45-Fluoreszenz-Färbung am Gefrierschnitt eines FaDu-Sphäroids.**

Ein Gefrierschnitt eines FaDu-Sphäroids wurde mit einem Fluoreszein-gekoppelten Antikörper gegen CD45 gefärbt (grün). Die blaue Färbung zeigt die Kerngegenfärbung mit DAPI. Das Sphäroid wurde für fünf Tage mit 1,25 ng/ml ertumaxomab und  $1 \cdot 10^6$  PBMC/ml behandelt. CD45-positive Zellen sind bis in das Innerste des Sphäroids vorgedrungen.

#### 4.4.4.3 Einfluss von ertumaxomab auf HT-29-Sphäroide

Die Versuche an HT-29-Sphäroiden (hohe Her2/neu- und EpCAM-Expression) zeigten einen anderen Verlauf als die Untersuchungen am den anderen Zelllinien. Die Sphäroide behielten für einige Tage etwa die gleiche Größe und lösten sich nach einiger Zeit komplett auf. Dadurch entstanden in den Spinner-Flaschen trübe Zell-suspensionen. Abbildung 58 zeigt Bilder der Unterseite einer Spinner-Flasche eines Ansatzes mit HT-29-Sphäroiden, die mit 3,0 ng/ml ertumaxomab behandelt worden waren.

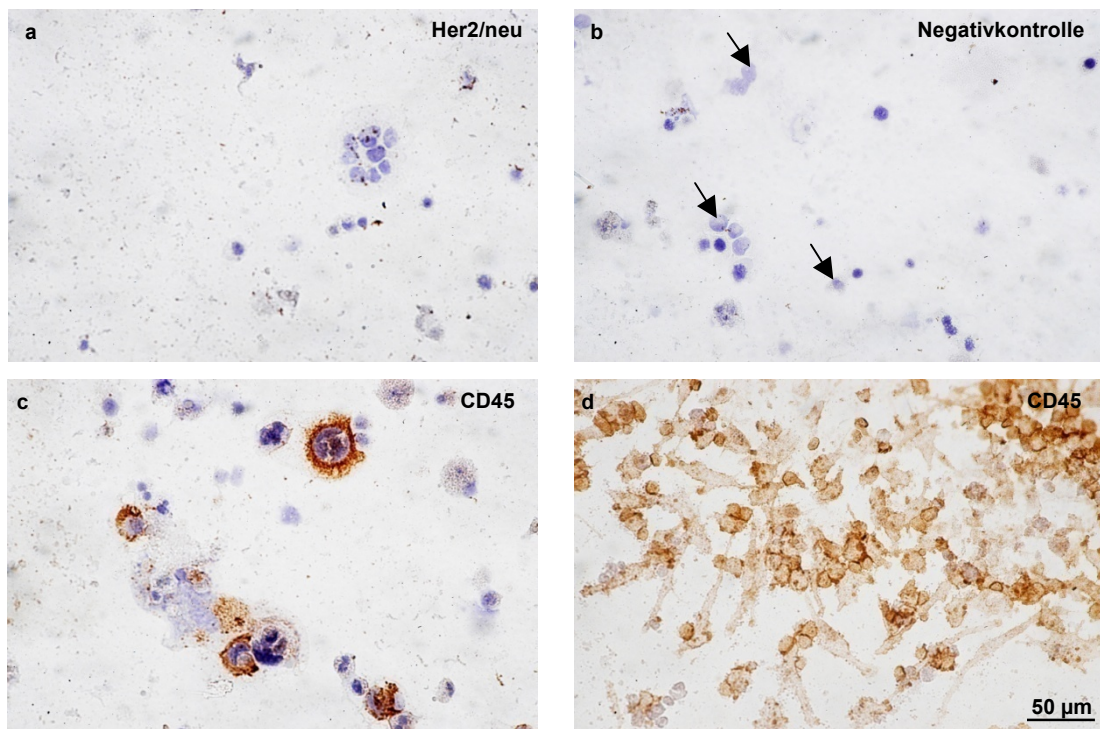


**Abb. 58: Spinner-Flaschen mit behandelten HT-29 Sphäroiden.**

Dieselbe Spinner-Flasche mit HT-29-Sphäroiden in Kultur mit 3,0 ng/ml ertumaxomab und PBMC wurde täglich auf einem Flachbett-Scanner eingescannt. Die Bilder zeigen die Resultate von Tag 1 (a), Tag 2 (b), Tag 3 (c) und Tag 4 (d). Nach vier Tagen hatten sich die Sphäroide vollständig aufgelöst.

Die Bilder zeigen den Status der Sphäroide über vier Tage. An Tag 4 hatten sich die Sphäroide vollständig aufgelöst. Abbildung 58 ist auch ein repräsentatives Beispiel für die Zelllinien BT-474 und T47D, die beide auch ein hohes Her2/neu Expressionsniveau besitzen. Diese Zelllinien wurden aus der systematischen Untersuchung der ertumaxomab-Wirkweise herausgenommen (siehe Tab. 13: Merkmalsliste der getesteten Zelllinien.).

Da die Auflösung der Sphäroide mit einer zunehmenden Trübung des Mediums einherging, sollte ausgeschlossen werden, dass die entstandene Zellsuspension aus lebensfähigen Tumorzellen bestanden. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen aus dem Medienüberstand von für fünf Tage mit 0,5 ng/ml ertumaxomab behandelten HT-29-Sphäroiden entnommen und Zytospins und FlexiPERMs hergestellt, die anschließend immunhistochemisch gefärbt wurden (Abbildung 59).



**Abb. 59: Immunhistochemische Färbungen von Zellen aus dem Medienüberstand behandelte HT-29-Sphäroide.**

Zellen aus dem Medienüberstand eines Versuchs mit HT-29-Sphäroiden, PBMC und 0,5 ng/ml ertumaxomab wurden nach fünf Tagen Versuchszeit entweder mittels Zytospin (a-c) oder FlexiPERM (d) auf Objektträger übertragen und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Her2/neu (a) und CD45 (c,d) gefärbt. (b) zeigt die Negativkontrolle ohne Primärantikörper; blau erscheint die Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Es konnten keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden, lediglich CD45-positive und absterbende Zellen.

Für die Färbungen der Zell-Präparate wurden die Antigene CD45 und Her2/neu gewählt. Damit sollte analysiert werden, welche Zellpopulationen in den Zellsuspensionen vorlagen beziehungsweise in welchen Verhältnissen Tumorzellen und Leukozyten vorhanden waren. Da die Zellen für die FlexiPERM-Methode noch einen weiteren Tag zur aktiven Anhaftung lebender Zellen an die Objektträger in Kultur waren, konnte gleichzeitig das Überleben beurteilt werden.

Abbildung 59 zeigt repräsentativ das Resultat der Färbungen an den Zell-Präparaten. Die Her2/neu Färbung verlief komplett negativ (Abbildung 59a), wohingegen bei den Zytospins einzelne Zellen CD45-positiv gefärbt wurden (Abbildung 59c). Ein deutlicheres Ergebnis der CD45-Färbung lag bei den FlexiPERMs vor (Abbildung 59d). Hier waren jedoch alle Zellen positiv für CD45 gefärbt und es konnten

keine negativ-gefärbten Zellen detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es in der Zellsuspension keine anderen lebenden Zellen außer Leukozyten mehr gab. Die geringe Zellzahl bei den Zytospin-Präparaten und die schwachen Kerngegenfärbungen (Pfeile in Abbildung 59b) verdeutlichen, dass in den Medienüberständen der mit ertumaxomab behandelten HT-29-Sphäroide nur noch wenige Zellen vorlagen, die sich zudem scheinbar in Auflösungsprozessen befanden.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte ein 3D-Zellsystem zur Testung onkologischer, immuntherapeutisch wirksamer Antikörper eingesetzt werden. Dazu wurden Tumorzell-Sphäroide - in Co-Kultur mit PBMC - in Spinner-Flaschen kultiviert. Als Testpräparate dienten die trifunktionalen bispezifischen Antikörper catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3). Testung und Findung geeigneter Methoden zur Untersuchung der Wirkweise der Antikörper gehörte ebenso zu den Aufgaben, wie die Miniaturisierung der Spinner-Kulturen zur Kostenreduktion bezüglich Verbrauchsmaterialien und Therapeutika.

### 5.1 Merkmale und Eignung verschiedener Tumorzelllinien

Für die Testung der trifunktionalen bispezifischen Antikörper catumaxomab und ertumaxomab mussten Zelllinien gefunden werden, welche die jeweiligen Antigene überexprimieren, für die die Antikörper Bindungsstellen besitzen (EpCAM im Fall von catumaxomab; Her2/neu im Fall von ertumaxomab). Der Nachweis von EpCAM und Her2/neu mit immunhistochemischen Methoden verlief sowohl mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern als auch mit Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgreich, wobei die Sensitivität und optische Darstellung der Fluoreszenzfärbungen besser war. Durch einen Vergleich zwischen Aufnahmen desselben Objektes, die an einem konventionellen und an einem modernen Fluoreszenzmikroskop angefertigt wurden, wurde jedoch deutlich, dass diese Vorteile nur durch moderne Technik ausgenutzt werden können. So lassen sich beispielsweise mit der hier verwendeten Apotom-Technik auch eventuell schwächere Expressionen und damit einhergehende schwächere Fluoreszenz-Intensitäten detektieren.

Als besonders geeignet erwies sich die Zelllinie FaDu, die EpCAM überexprimiert und besonders stabile Sphäroide bildet. Mit Hilfe dieser Zelllinie konnten alle Untersuchungen mit catumaxomab durchgeführt werden.

Eine Zelllinie zur Testung von ertumaxomab zu finden, die sowohl Her2/neu überexprimiert als auch stabile Sphäroide bildet, die für einen Einsatz in Spinner-Flaschen geeignet waren, gelang ebenfalls. Hierfür mussten jedoch sehr viele Zelllinien getestet werden, da sich die meisten als nicht stabil genug erwiesen, oder da die Zellen sich nach ertumaxomab-Zugabe innerhalb von nur wenigen Tagen auflösten. Verwendet wurden die Zelllinien HT-29 und BT-474, die beide eine starke

Her2/neu-Überexpression aufweisen. Außerdem wurde auch für ertumaxomab die Zelllinie FaDu verwendet, die Her2/neu im Gegensatz zu EpCAM nur schwach exprimiert, wie ein direkter Vergleich der IHC-Färbungen beider Antigene zeigte. SAS- und WiDr-Zellen zeigten ebenfalls positive Her2/neu-Färbungen, jedoch keine Genamplifikationen. Dies bedeutet, dass diese beiden Zelllinien Her2/neu ebenfalls nur schwach überexprimieren.

## **5.2 Sphäroide in Co-Kultur mit PBMC**

Zur Etablierung einer stabilen Co-Kultur von Tumorzell-Sphäroiden mit PBMC in Spinner-Flaschen wurden zunächst die Wachstumseigenschaften der in Frage kommenden Zelllinien und ihre Fähigkeit zur spontanen Sphäroidbildung untersucht.

### **Sphäroidbildung**

Bei der Analyse zeigte sich, dass etwa ein Sechstel der getesteten Zelllinien geeignete Sphäroide bilden können, wobei beide EpCAM-überexprimierenden Zelllinien dazu gehören. Die Zelllinie BT-474 bildet 24 h nach der Initiation schon sehr gleichmäßige Sphäroide aus. Der Nachteil bei dieser Zelllinie ist, dass sie in Monolayer-Kultur sehr langsam wächst und keine dichten Zellrasen bildet. Deshalb ist die Vorbereitung für Sphäroid-Versuche mit dieser Zelllinie sehr aufwändig. Die anderen Zelllinien bilden in der Monolayer-Kultur dichte Zellrasen und auch die Wachstumsgeschwindigkeiten sind schneller, so dass einwöchiges bis zehntägiges vorheriges Wachstum zur Vorbereitung ausreicht. Hier dauert die Sphäroid-Initiierung bis zu 10 Tage.

Die Sphäroide aller Zelllinien, die in Spinner-Flaschen Versuchen zum Einsatz kommen konnten, wachsen nach der Initiation und dem Umsetzen in die Spinner-Flaschen kontinuierlich an. Dieses Wachstum ist von der Sphäroidanzahl und der Häufigkeit von Medienwechseln abhängig. Aus diesem Grund muss bei Versuchen, in denen mehrere Spinner-Flaschen-Ansätze parallel durchgeführt werden sollen, darauf geachtet werden, dass in jede Flasche die gleiche Anzahl Sphäroide eingesetzt wird und in parallelen Ansätzen immer identische Medienwechsel durchgeführt werden.



### **Software-basierte Methode zur Größenbestimmung**

Ein Standardmaß für die Wirkung einer Behandlung auf Sphäroide ist die Beurteilung ihrer Größe. Es gelang im Rahmen der Arbeit eine neue Software-basierte Methode zur Größenbestimmung zu etablieren, die im Vergleich mit der klassischen Methode einige Vorteile aufweist:

1. Es ist kein Eingriff in die Spinner-Flaschen nötig, wodurch zum einen die Gefahr der Kontamination verringert wird und zum anderen das Medienvolumen konstant bleibt. Dies gilt insbesondere für die miniaturisierten Spinner-Flaschen, aus denen für die klassische Methode nur durch Entfernen des Magnetrührers Sphäroide entnommen werden können. Bei mittleren und großen Spinner-Flaschen kann dies auch leicht durch seitlich angebrachte Öffnungen geschehen.

2. Durch die erhöhte Probenanzahl [ $n \geq 100$  im Vergleich zu  $n \geq 10$ ] wird eine exaktere statistische Berechnung möglich.

3. Die Methode ist objektiver, da alle in der Spinner-Flasche vorhandenen Sphäroide in die Auswertung einbezogen werden. Bei der klassischen Methode besteht aus technischen Gründen die Gefahr lediglich Sphäroide eines selektierten Größenbereichs in die Auswertung einzubringen.

Bei der Bildbearbeitung muss darauf geachtet werden, dass die Sphäroidgrößen nicht verfälscht werden. Außerdem empfiehlt sich, die Bilder „blind“ auszuwerten. Dies gelingt am besten, wenn dem Auswerter nicht bekannt ist, von welchem Versuchstag und –Ansatz das Photo stammt.

Die klassische Methode hat aber auch einen Vorzug. Sie funktioniert deutlich schneller und kann sozusagen nebenbei erledigt werden. Der Zeitaufwand beträgt pro Flasche etwa 10 Minuten. Diese Methode ist indiziert, wenn die Größe der Sphäroide nicht im Fokus des Interesses liegt und wenn die Versuchszeit insgesamt nicht sehr lange ist, so dass nur wenige Male in die Flaschen eingegriffen werden muss. Dies ist beispielsweise der Fall bei PCR-Versuchen, bei denen nur zu Beginn und bei Versuchsende die Sphäroidgröße bestimmt wird.

### **PBMC**

Die Zusammensetzung der aus Buffy Coats isolierten PBMC wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Darüber hinaus wurden - zum späteren Einsatz in Sphäroid-Gefrierschnitten - an Einzelzellpräparaten immunhistochemische Markierungen verschiedener Leukozyten-spezifischer Antigene etabliert.

Die Isolation der PBMC aus Buffy Coats gelang immer sehr gut. Durch regelmäßige Analysen am Durchflusszytometer konnte nachgewiesen werden, dass mit der angewandten Methode zum einen der Anteil CD45-positiver Zellen, die keine PBMC sind, immer unter 5-6 % liegt, und zum anderen, dass die Ausbeute CD45-positiver Zellen insgesamt immer über 90 % liegt. Der Anteil an Monozyten schwankt stark, der Anteil an NK-Zellen und B-Zellen hingegen ist konstant niedrig und T-Zellen machen 50 % der Gesamtausbeute aus. Für die Testung von catumaxomab und ertumaxomab war ein so hoher T-Zell-Anteil wichtig, da die Antikörper an CD3 auf T-Zellen binden und diese aktivieren (Shen & Zhu, 2008).

Immunhistochemische Färbungen von CD45, CD2, CD3 und CD14 an PBMC-Einzelzell-Präparaten bestätigten die quantitative Verteilung der PBMC-Subpopulationen. Weitere Färbungen von CD1a, CD16+56, CD19, CD4 und CD8, die zur genaueren Differenzierung der einzelnen PBMC-Subpopulationen nötig wären, waren zu unspezifisch und wurden nicht etabliert.

### **Co-Kultur von PBMC und Sphäroiden in miniaturisierten Spinner-Flaschen**

Die meisten PBMC überleben in Kultur ohne Stimulation, zum Beispiel durch Concanavalin A, nur wenige Stunden bis Tage. Die klinische Behandlung mit trifunktionalen Antikörpern dauert bei mehrmaliger Wirkstoff-Gabe jedoch mehrere Wochen (Burges et al., 2007; Kiewe et al., 2006). Aus diesem Grund war es wichtig herauszufinden, ob die Co-Kultur von PBMC und Sphäroiden in miniaturisierten Spinner-Flaschen über einen längeren Zeitraum gelingt. Mit der in dieser Arbeit angewendeten Kultur konnte nach einer Woche noch deutliche PBMC-Aktivität gezeigt werden. Dazu gehörten der Nachweis spezifischer mRNA, positive immunhistochemische Färbungen lebender Zellen in den Sphäroiden sowie der Nachweis, dass aus den Medienüberständen entnommene PBMC noch an Objektträger adhären konnten.

Der Effekt von PBMC auf Tumorzell-Sphäroide ohne Antikörper-Zusatz wurde in Kontrollansätzen ermittelt. Dass CD14- und CD45-positive Zellen in mit PBMC co-kultivierte Sphäroide eindringen, konnte sowohl immunhistochemisch als auch mittels PCR-Nachweis von CD64-mRNA gezeigt werden. Es handelt sich hierbei vermutlich um Monozyten beziehungsweise Makrophagen, da CD14 und CD64 nur von diesen exprimiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Makrophagen die Tumorzellen als fremd erkannt haben und in die Tumorsphäroide eingedrungen sind. Dort wurden sie zu Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), um die Tumorzellen zu phagozytieren und als APC die humorale Immunantwort zu aktivieren oder durch Abgabe von

Chemokinen und Zytokinen die T-Zellen zu aktivieren. Zu diesen Zytokinen gehören auch IL-6 und TNF- $\alpha$ , die beide in Kontrollansätzen denen nur PBMC zugegeben worden waren nachgewiesen werden konnten. Auch IL-4 wurde in diesen Ansätzen detektiert. IL-4 wird hauptsächlich von T<sub>H</sub>2-Zellen sezerniert und aktiviert die humorale Immunantwort, IL-6 verstärkt diese Tendenz. Dadurch wird die Aktivierung der Makrophagen wiederum supprimiert. In diesen Kontrollansätzen wurden keine T-Zell-spezifischen mRNA gefunden. Dies spricht dafür, dass keine ausreichende T<sub>H</sub>1-Zell-Aktivierung erfolgte, die die zellvermittelte Immunantwort ausgelöst hätte.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse spiegeln die Rolle wieder, die TAM sowohl bei Tumorabwehr als auch bei Tumorprotektion spielen können (Bingle et al., 2002; Pollard, 2004). Dafür spricht auch die Tatsache, dass die nur mit PBMC co-kultivierten Sphäroide in keinem Fall deutlich geschädigt wurden, sondern sich bei allen Untersuchungsmethoden nur schwach von den Kontrollsphäroiden ohne PBMC-Co-Kultur unterschieden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Zugabe von PBMC zu den Sphäroiden nicht ausreicht, um diese zu eliminieren. Daher konnten bei allen Untersuchungen mit den Wirkstoffen catumaxomab und ertumaxomab die nur mit PBMC co-kultivierten Sphäroide als Referenz verwendet werden.

### **5.3 Wirkung von catumaxomab auf FaDu-Sphäroide**

Nach der Etablierung der Co-Kultur in miniaturisierten Spinner-Flaschen wurde die Wirkung von catumaxomab auf FaDu-Sphäroide untersucht. Die postulierte Wirkung dieses Antikörpers führt zur Aktivierung von T-Zellen und Fc $\gamma$ RI-, Fc $\gamma$ RIIa- und Fc $\gamma$ RIII-positiven akzessorischen Zellen und daraus folgender Induktion von ADCC und Apoptose (Kiewe et al., 2006, Zeidler et al., 2001). Außerdem wurde vermutet, dass aktivierte Lymphozyten (NK-Zellen, Makrophagen und DC) in die Sphäroide eindringen können, um diese von Innen zu bekämpfen. Um diese Wirkmechanismen zu überprüfen kamen verschiedene Methoden zum Einsatz: Größenbestimmung der Sphäroide, immunhistochemische Färbungen zur Proliferation, Apoptose und PBMC-Infiltration, darüber hinaus Zytokin-Bestimmungen aus dem Medienüberstand und PCR-Untersuchungen PBMC-relevanter mRNA.

### **Größen-Wachstum unter catumaxomab-Behandlung**

In allen durchgeführten Versuchen zeigte catumaxomab einen deutlichen Dosis-abhängigen Einfluss auf die Volumina der Sphäroide: je höher die Konzentration, desto stärker ist die Größenreduktion. Die Beurteilung einer ED<sub>50</sub> gelang mittels der Größenbestimmung, diese lag nach sieben Tagen bei etwa 0,7 ng/ml catumaxomab. In klinischen Studien führten, zum Beispiel bei malignem Aszites, vier aufeinander folgende ansteigende intraperitoneal verabreichte Einzeldosen zwischen 5 und 200 µg zur Eliminierung der Tumorzellen nach 10 Tagen (Burges et al., 2007). Dies entspricht, bei einem durchschnittlichen Flüssigkeitsvolumen von 1000 ml, Konzentrationen von 5 bis 200 ng/ml. Die hier eingesetzten Konzentrationen (0-10 ng/ml) liegen im gleichen Bereich. Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche sind also mit der *in vivo*-Situation gut vergleichbar.

### **Vergleich zwischen 26II6 und catumaxomab**

Versuche mit dem parentalen Kontroll-Antikörper 26II6, der durch Bindung an CD3 die T-Zellen aktiviert und als Fremdreiz einen Stimulus für das Immunsystem darstellt, zeigten Reduktion der Sphäroidgröße. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der T-Zell-Aktivierung auf die Tumorbekämpfung. Der Antikörper catumaxomab wirkt aber deutlich schneller und effektiver; durch die zusätzliche Bindung an EpCAM und dem daraus folgenden spezifischen Effekt, PBMC in räumliche Nähe zu den Tumorzellen zu bringen, wird die Sphäroidgröße offensichtlich stärker reduziert. 26II6 bewirkt die Freisetzung der Zytokine IL-2, IL-6 und IL-10 vergleichbar mit catumaxomab, IL-4 und TNF- $\alpha$  werden deutlich schwächer, IFN- $\gamma$  deutlich höher freigesetzt als nach catumaxomab Behandlung. Die Ergebnisse sind aber nur bedingt vergleichbar: 26II6 aktiviert T-Zellen - bei gleicher Konzentration der Antikörper - vermutlich stärker, da es nicht an die Tumorzellen bindet und deshalb frei in Suspension befindlich nur an PBMC (T-Zellen) binden kann. Der bispezifische Antikörper catumaxomab hingegen wird vermutlich schnell gebunden - sowohl von T-Zellen als auch von Tumorzellen - und befindet sich dann nach kurzer Zeit nicht mehr in Suspension. Um diese Vermutung zu bestätigen wären weitere Versuche nötig, bei denen in regelmäßigen Abständen Medium aus den Spinner-Flaschen entnommen wird, um die Konzentrationen der beiden Antikörper in Lösung zu bestimmen.

### **Proliferation**

Durch die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 konnte in unbehandelten Sphäroiden die klassische räumliche Einteilung der Sphäroide in proliferierende und ruhende vitale Randschicht, sowie die Zentralnekrose, bestätigt werden. Im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden konnten in mit catumaxomab behandelten Sphäroiden weniger proliferierende Zellen detektiert werden. Diese lagen außerdem nicht mehr nur im äußeren Bereich der Sphäroide, sondern im gesamten Sphäroidquerschnitt verteilt. Es lag aber keine Dosis-abhängige Änderung vor. Obwohl Ki-67 im Allgemeinen als tumorspezifischer Marker verwendet wird, muss in diesem Fall bedacht werden, dass der Proliferationsmarker in jeder eukaryotischen Zelle, die sich nicht in der G0-Phase befindet, exprimiert wird (Scholzen & Gerdes, 2000). Die im Inneren der Sphäroide detektierten Ki-67-positiven Zellen könnten also eingedrungene proliferierende PBMC (aktiviert durch ausgeschüttetes IL-2) darstellen. Dies kann beispielsweise durch eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung (Ki-67/CD45) überprüft werden. Sollte sich dieser Verdacht bestätigen, ist Ki-67 für weitere Untersuchungen zur Proliferation nicht geeignet. Die Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen in der vitalen Randschicht kann zum Beispiel darin begründet liegen, dass die Zellen der Sphäroide von außen nach innen eliminiert werden, oder dass durch ausgeschüttete Zytokine – zum Beispiel  $\text{IFN}\gamma$  - die Tumorzell-Proliferation gestoppt wird.

### **Apoptose**

Bei einer starken Wirkung des Antikörpers sollte in den Tumorzellen nicht nur die Proliferation reduziert sein, sondern auch Apoptose in Abwesenheit von Immunzellen eingeleitet werden. Die Detektion apoptotischer Zellen gelang mit der Immunfluoreszenz-Methode FragEL™. Bei unbehandelten Sphäroiden lagen, die klassische Aufteilung bestätigend, überwiegend am Übergang von vitaler Randschicht zu Zentralnekrose apoptotische Zellen vor. Unter catumaxomab-Behandlung konnte hingegen interessanterweise beobachtet werden, dass zunehmend über den gesamten Sphäroidquerschnitt apoptotische Zellen detektiert wurden. Hierbei handelt es sich vermutlich um Tumorzellen, die erfolgreich von eingedrungenen PBMC durch Induktion von Apoptose bekämpft wurden. Um dies zu bestätigen wären Mehrfachfärbungen zur parallelen Markierung von Tumorzellen, CD45-positiven Zellen und apoptotischen Zellen ein geeignetes Mittel. Die Markierung der PBMC könnte mit dieser Methode auch differenzierter erfolgen (T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen).

Eine genauere Analyse bezüglich einer Dosis-Abhängigkeit von catumaxomab in Bezug auf Apoptose konnte nur schwer durchgeführt werden, da die Aufnahmen mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop angefertigt wurden, wodurch die Bilder oft sehr stark von Streulicht überlagert waren. Durch Analyse an einem modernen Fluoreszenzmikroskop mit moderner Software wäre sicherlich eine Auswertung bezüglich der Dosis-Abhängigkeit erleichtert.

### **PBMC unter catumaxomab-Behandlung**

Mit immunhistochemischen Färbungen konnte nachgewiesen werden, dass unter catumaxomab-Behandlung vermehrt CD45-positive und CD14-positive Zellen in die Sphäroide eindringen. Die Infiltration mit CD45-positiven Zellen ist Dosis-abhängig, die Infiltration von CD14-positiven Zellen stärker als in Kontrollansätzen, ohne catumaxomab. Allerdings wurden im Verhältnis zu den CD45-positiven Markierungen wenige Zellen CD14-markiert. CD14 ist ein Marker für Makrophagen, welche *in vivo* häufig die Aufgabe haben, den Tumor zu infiltrieren und zu bekämpfen. Da catumaxomab - durch die Bindung an Fc $\gamma$ RI - auch Makrophagen aktivieren kann, wurde ein höherer Anteil in das Sphäroid eingedrungener Makrophagen erwartet. Bei den detektierten CD45-positiven und CD14-negativen Zellen handelte es sich vermutlich um T-, NK- oder dendritische Zellen, da sich andere Zellpopulationen mit Befähigung zur Tumor-Infiltration nicht in den Spinner-Flaschen befanden. Eine weitere immunhistochemische Aufschlüsselung der PBMC-Subpopulationen, die zur Lösung dieser Fragestellung dienlich gewesen wäre, gelang an Sphäroidschnitten nicht. Es kann jedoch vermutet werden, dass es sich bei den CD45-positiven und CD14-negativen Zellen überwiegend um T-Zellen handelte. Dafür sprechen vor allem die Ergebnisse der RT-PCR und der Zytokinbestimmungen.

Mit der RT-PCR-Methode sollten PBMC-spezifische mRNA nachgewiesen werden, welche die Aktivität und das Vorliegen der jeweiligen PBMC in den Sphäroiden zeigen sollten. Voraussetzung dafür war - neben dem Eindringen der jeweiligen PBMC in die Sphäroide - dass die verwendeten Sphäroide vor der RNA-Extraktion von eventuell außen aufliegenden PBMC gereinigt wurden. Dies konnte durch mehrmaliges Waschen in PBS erreicht werden. Mit dieser Methode gelang der Nachweis von IFN- $\gamma$ -, IL-2-, CD25- und CD64-mRNA aus mit catumaxomab behandelten Sphäroiden. CD25 ist ein IL-2-Rezeptor, der auf T-Zellen exprimiert wird und IFN- $\gamma$  und IL-2 werden vorrangig von T<sub>H</sub>1-Zellen exprimiert (Abbas et al., 1997). Dies spricht dafür, dass catumaxomab die zelluläre Immunantwort aktiviert. CD64-mRNA

wurde auch aus Kontroll-Sphäroiden gewonnen, die nur mit PBMC ohne catumaxomab kultiviert worden waren, aber aus parallel mit catumaxomab behandelten Sphäroiden wurde in allen Fällen deutlich mehr CD64-mRNA extrahiert, wie semiquantitative PCR-Experimente zeigten. Dies spricht dafür, dass die in den Buffy Coats vorliegenden Makrophagen die Tumorzellen erkennen, in die Sphäroide eindringen, und catumaxomab diesen Effekt deutlich aktivierend verstärkt.

Auch die Ergebnisse der Zytokinbestimmung unterstreichen die Annahme, dass catumaxomab die zelluläre Immunantwort aktiviert. Während in Kontrollansätzen mit PBMC überwiegend T<sub>H</sub>2-Zell-spezifische Zytokine erhöht waren, wurden unter catumaxomab-Behandlung auch T<sub>H</sub>1-Zell-spezifische Zytokine (IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) sezerniert, vor allem ab Konzentrationen von 2,5 ng/ml catumaxomab und höher. Diese Ergebnisse machen erneut deutlich, dass die PBMC alleine nicht in der Lage sind, die Tumorsphäroide effizient zu bekämpfen. Erst der Einsatz von catumaxomab bewirkt eine zelluläre Immunantwort und nachhaltige Eliminierung der Tumorzellen. Dies bestätigt klinische Studien an unterschiedlichen Tumor-Entitäten (Borges et al., 2007; Lordick et al., 2008; Riechelmann et al., 2007; Sebastian et al., 2007). Ob eine nachhaltige Vakzinierung erfolgt, wie dies im Mausmodell schon gezeigt worden ist (Morecki et al., 2008; Ruf & Lindhofer, 2001), konnte mit den verwendeten Methoden nicht ermittelt werden. Allerdings könnte eine systematische Untersuchung der zu Versuchsende vorliegenden PBMC – im Hinblick auf Gedächtniszellen – darüber eventuell Aufschluss geben. Eine Vakzinierung wäre wünschenswert, da dadurch das Auftreten von Rezidiven nahezu ausgeschlossen werden kann. Andere Untersuchungen tendieren dazu, Immunzellen *ex vivo* mit Immuntherapeutika zu opsonieren beziehungsweise zu stimulieren und dann in den Patienten zu reinfundieren (Riechelmann et al., 2007; Schmitt et al., 2004). Davon verspricht man sich eine bessere Kontrolle der Zytokin-Ausschüttung und eine spezifischere Bindung der Therapeutika an die PBMC. Dies könnte in Spinner-Flaschen leicht umgesetzt werden und darüber hinaus könnten hier zeitliche Abfolgen variiert werden.

### **5.4 Kombinierte Behandlung mit catumaxomab und Cisplatin**

Bei der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Halsregion wird das Zytostatikum Cisplatin in der Standard-Chemotherapie eingesetzt. Bei *ex vivo*-Versuchen mit Zellen aus 104 verschiedenen Tumorproben konnte bereits gezeigt werden, dass die Wirkung von catumaxomab und Cisplatin im Hinblick auf die Tö-

tung von Tumorzellen nach 24 und 48 Stunden vergleichbar ist (Gronau et al., 2005). In dieser Arbeit wurde daher in Versuchen mit kombinierter Gabe von Cisplatin und catumaxomab untersucht, ob der Einfluss von Cisplatin auf die PBMC die Wirkung von catumaxomab beeinträchtigt oder ob beide Therapeutika synergistisch wirken. Dafür wurde zunächst die Wirkung von Cisplatin auf mit PBMC co-kultivierte FaDu-Sphäroide überprüft.

### **Wirkung von Cisplatin auf FaDu-Sphäroide**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cisplatin in klinisch relevanten Dosen dosis-abhängig auf das Volumen der FaDu-Sphäroide, ihre Vitalität und ihre Überlebensfähigkeit wirkt. Allerdings zeigten die drei Parameter unterschiedlich starke Dosis-Abhängigkeiten ( $ED_{50}$  im Vergleich: 0,6; 0,18 und 0,26  $\mu\text{g/ml}$ ). Dies bedeutet, dass die Sphäroide zu einem Zeitpunkt, an dem sie noch keinen starken Größenverlust aufweisen, schon sehr stark in ihrer Vitalität und ihrer Überlebensfähigkeit eingeschränkt sind. Daraus lässt sich folgern, dass die Anwendung verschiedener Methoden wichtig für die richtige Beurteilung der Wirkung eines Therapeutikums ist. Auf den Zytokinstatus hat Cisplatin einen nur sehr schwachen Einfluss. Lediglich  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-2 zeigen geringe Erhöhungen bei hohen Cisplatin-Dosen. Dies kann durch Ergebnisse früherer Studien erklärt werden: nach unterschiedlichen Chemotherapien konnten Anstiege verschiedener Zytokine beobachtet werden (Baiocchi et al., 1993; Darst et al., 2004). Vor allem pro-inflammatorische Zytokine wurden nach Phagozytose abgetöteter Tumorzellen erhöht gemessen (Kawagishi et al. 2001).

### **Wirkung der kombinierten Behandlung auf FaDu-Sphäroide**

Der kombinierte Einsatz von 0,5 ng/ml catumaxomab und 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin führt, verglichen mit den jeweiligen Einzeldosen, zu deutlich verstärkter Reduktion der Sphäroidgrößen (Kombination: 44 % des Ausgangsvolumens, Einzelbehandlung: 76 % bei Cisplatin beziehungsweise 111 % bei catumaxomab des Ausgangsvolumens nach neun Tagen). Die kombiniert behandelten Zellen zeigen darüber hinaus eine stark verminderte Überlebensfähigkeit von lediglich 0,7 %. Allerdings fiel auch die Überlebensfähigkeit der nur mit Cisplatin behandelten Sphäroide, entgegen der Voruntersuchungen, in diesem Versuch auf 2,2 %. Dennoch reichen die Versuchsergebnisse aus, um ausschließen zu können, dass Cisplatin einen negativen Effekt auf die catumaxomab-Wirkung hat. Bezogen auf die Sphäroid-Größen wirkt die Kombination sogar überadditiv, was auf einen synergistischen Effekt hindeutet.



Die Messungen der Zytokinkonzentrationen zeigten dieselbe Tendenz wie in den Dosis-Wirkungsversuchen. Eine genaue Auftrennung in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -spezifische Zytokine ließ sich nicht vornehmen. Dies kann an der eingesetzten Konzentration von catumaxomab (0,5 ng/ml) liegen, da zuvor nur deutliche Unterschiede ab Konzentrationen von 2,5 ng/ml erkennbar waren. Verglichen mit den entsprechenden Konzentrationen der Dosis-Wirkungskurven wurden übereinstimmend mit der Einzelbehandlung die  $T_H1$ -spezifischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  erhöht im Vergleich zu den Kontrollansätzen gemessen. Allerdings konnte auch eine deutlich erhöhte IL-10-Konzentration bestimmt werden. IL-10 ist  $T_H2$ -spezifisch und hat als eine Hauptfunktion die Inaktivierung von Makrophagen. Dieser negative Einfluss spiegelte sich jedoch nicht bei der Wirkung auf die Sphäroide wider. Dies spricht dafür, dass die positiven Einflüsse von catumaxomab auf die zelluläre Immunantwort diesen negativen Effekt kompensieren.

Auch die Zytokin-Messungen deuten darauf hin, dass die beiden Therapeutika kombiniert eingesetzt werden können. Erste *In vivo*-Versuche mit Kombination von hoch dosierter Chemotherapie und anschließender Gabe von trifunktionalen Antikörpern gleicher Spezifität wie catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) beziehungsweise ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3) bei Patientinnen mit metastasierenden Mammakarzinomen bestätigen die Möglichkeit kombinierter Behandlungen (Stemmler et al., 2005).

### **5.5 Wirkung von ertumaxomab auf Tumorsphäroide**

Für die Untersuchung des trifunktionalen bispezifischen Antikörpers ertumaxomab wurden mehrere Zelllinien eingesetzt: Die Her2/neu hoch exprimierenden Zelllinien BT-474 und HT-29, die Her2/neu schwach überexprimierenden Zelllinien FaDu, WiDr und SAS und als Kontrolle die Her2/neu-negative Zelllinie HCT-116. Direkte Vergleiche zwischen catumaxomab und ertumaxomab an Sphäroiden der Zelllinien FaDu und HT-29 zeigten jeweils vergleichbare Wirkungen der beiden Antikörper-Präparate bezüglich der Reduzierung der Sphäroidgrößen. Im Gegensatz zu FaDu-Sphäroiden lösten sich HT-29-Sphäroide ohne vorherige Schrumpfung direkt auf, der Kontrollantikörper 26116, der ausschließlich zur T-Zell-Aktivierung dient, bewirkte bei dieser Zelllinie keine Sphäroidgrößen-Reduktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Dass ertumaxomab bei FaDu-Sphäroiden einen vergleichbaren

Effekt hatte wie catumaxomab überraschte, da die Her2/neu-Expression dieser Zelllinie deutlich niedriger ist als ihre EpCAM-Expression. Bei HT-29 ist es umgekehrt. Diese Zelllinie hat eine deutlich höhere Her2/neu- als EpCAM-Expression. Dies spricht für eine sehr hohe Sensitivität der beiden Antikörper: Auch bei nur geringer Expression der Tumor-assoziierten Antigene werden Tumorzellen erkannt und effizient abgetötet.

Die Wichtigkeit der Bindung an die Tumorzellen wurde durch den angesprochenen Vergleich zwischen catumaxomab und 26116 an der Zelllinie HT-29 gezeigt, da hier die alleinige T-Zell-Aktivierung zu keinem Effekt führte. Die Ursache für die hohe Sensitivität liegt vermutlich in der kombinierten Wirkweise der humoralen und der Zell-spezifischen Immunabwehr, wie dies auch schon in ersten klinischen Phasen gezeigt werden konnte (Kiewe & Thiel, 2008). Die alleinige Beobachtung der Sphäroidgrößen reicht aber nicht aus, um eine endgültige vergleichende Aussage über die Wirkung der Präparate machen zu können. Zumindest Untersuchungen zur Vitalität beziehungsweise dem Überleben der Tumorzellen müssten zur Abklärung durchgeführt werden.

Bei Dosis-Wirkungsversuchen wurden die Zelllinien FaDu, WiDr und HCT-116 eingesetzt. Dabei konnte keine Dosis-abhängige Wirkung bezüglich der Sphäroidgrößen beobachtet werden. Bei WiDr- und HCT-116-Sphäroiden zeigten sich über einen Zeitraum von einer Woche keine eindeutigen Größenveränderungen im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Da die Zelllinie HCT-116 kein Her2/neu exprimiert, wurde dies erwartet. Bei WiDr-Sphäroiden schien erst nach sieben Tagen eine leichte Auftrennung bezüglich der Größe zu beginnen. Mit dieser Zelllinie müsste daher ein Versuch über einen deutlich längeren Zeitraum erfolgen. Bei der Zelllinie FaDu trennten sich die Sphäroide in zwei Gruppen, wobei Sphäroide, die mit mehr als 2,5 ng/ml ertumaxomab behandelt worden waren, deutlich stärker an Größe verloren als niedriger behandelte Sphäroide. Die Ergebnisse bestätigen teilweise die zuvor diskutierte Sensitivität von ertumaxomab, da die Konzentration keinen Dosis-abhängigen Unterschied bezüglich der Größenreduktion der FaDu-Sphäroide hervorrief. Allerdings scheint es eine Konzentrationsschwelle zu geben, die überschritten werden muss ( $\approx 2,5$  ng/ml), um überhaupt eine Größenreduktion zu bewirken.

Im Gegensatz zur Beobachtung der Größenreduktion ergab ein Kolonienbildungstest mit FaDu-Sphäroidzellen eines Dosis-Wirkungsversuches einen Dosis-

abhängigen Zusammenhang bezüglich der Überlebensfähigkeit der Zellen. Dies zeigt erneut, dass für aussagekräftige Ergebnisse notwendigerweise nicht nur die Sphäroidgröße sondern zumindest auch die Kolonienbildung oder Vitalität der behandelten Zellen mit untersucht werden sollte.

Fluoreszenz-Markierungen von CD45 an Gefrierschnitten von mit ertumaxomab behandelten FaDu-Sphäroiden zeigten eine starke Infiltration CD45-positiver Zellen. Dabei infiltrierten deutlich mehr Zellen, die auch tiefer ins Innere der Sphäroide eindringen, als bei gleich behandelten Sphäroiden eines Parallelansatzes mit catumaxomab. Im Hinblick auf die Aktivierung der PBMC scheint ertumaxomab zumindest vergleichbar, wenn nicht sogar stärker zu wirken. Die durchgeführten Versuche reichen aber bislang nicht aus, um eine eindeutige Aussage machen zu können. Hierfür werden weitere Versuche, vor allem auch im Hinblick auf den Zytokinstatus, notwendig sein.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass ertumaxomab die Tumorzellen von BT-474- und HT-29-Sphäroiden bei Dosen von 2 – 3 ng/ml effizient abtötet.

Es lässt sich zusammenfassen, dass ertumaxomab abhängig von dem Her2/neu-Expressions-Status unterschiedlich auf die Zelllinien wirkt. Je höher die Her2/neu-Expression, desto schneller und drastischer ist die Wirkung. Allerdings ist auch bei schwach exprimierenden Zelllinien wie FaDu eine deutliche Hemmung der Überlebensfähigkeit zu verzeichnen. Der Einsatz von ertumaxomab bei niedrig Her2/neu exprimierenden Tumoren könnte also möglich sein. Dies ist wichtig, da Herceptin® nur für Tumoren zugelassen ist, die eine starke Her2/neu-Überexpression und Gen-Amplifikation aufweisen. Um dies zu bestätigen, müssen weitere Versuche zu Wirkmechanismus und Dosis-Abhängigkeit - analog der mit catumaxomab durchgeführten Untersuchungen - erfolgen. Dabei sollte darauf geachtet werden, im Gegensatz zu catumaxomab mit mehreren Zelllinien zu arbeiten, die unterschiedliche Her2/neu-Level aufweisen.

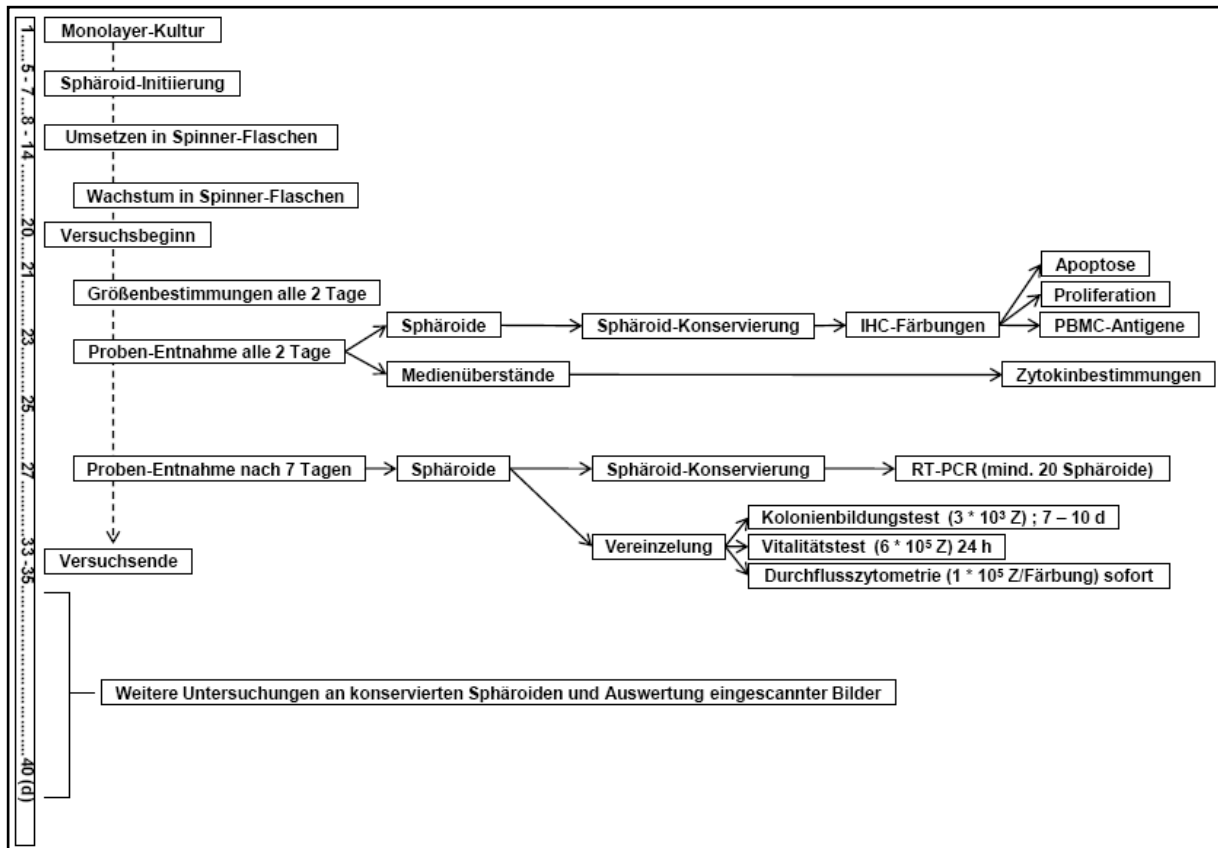
Bei den Untersuchungen mit ertumaxomab hat sich überraschenderweise als größte Schwierigkeit herausgestellt, eine für den Einsatz in Spinner-Flaschen geeignete Zelllinie zu finden. Alternativ wäre es mit molekularbiologischen Methoden vielleicht möglich, eine Spinner-Flaschen-geeignete Zelllinie, die kein Her2/neu exprimiert - zum Beispiel durch Transfektion - dahingehend zu verändern, dass sie Her2/neu exprimiert. Im Idealfall könnten sogar unterschiedliche Her2/neu-Expressions-Level innerhalb einer Zell-Linie erreicht werden.

## **5.6 Versuchskonzept zur Testung immuntherapeutischer Antikörper an Tumorzell-Sphäroiden in Spinner-Flaschen-Kulturen**

Ein Ziel dieser Arbeit war - neben der Untersuchung zur Wirkweise der trifunktionalen bispezifischen Antikörper catumaxomab und ertumaxomab – ein Versuchskonzept für die standardisierte Testung immuntherapeutischer Präparate an 3D-Zellkulturen in Spinner-Flaschen zu erstellen. Dies gelang durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden und Analyseverfahren.

Abbildung 60 gibt das Versuchskonzept für einen Versuch wieder, der im Idealfall nach etwa 40 Tagen abgeschlossen sein kann. Allerdings muss beachtet werden, dass es aus technischen Gründen nicht realisierbar ist, alle angegebenen Methoden an einer Charge Sphäroide anzuwenden. Für RT-PCR-Experimente und die Durchflusszytometrie werden zum Beispiel sehr viele Sphäroide benötigt ( $\approx 50$  für Durchflusszytometrie und  $\geq 20$  für RT-PCR), so dass Sphäroide, bei denen diese Methoden zur Anwendung kommen sollen, hierfür gesondert kultiviert werden müssen. Alle anderen Analyseverfahren können jedoch parallel durchgeführt werden.

Bei der Durchführung des gezeigten Konzepts gilt es noch einige Punkte zu beachten. Die Entnahme von Medienüberständen für Zytokinbestimmungen hat zur Folge, dass zum einen regelmäßig in die Systeme eingegriffen wird und zum anderen, dass sich die Volumina in den Flaschen verändern. Um dies zu verhindern müssten frische Medien zugesetzt werden, wodurch sich wiederum die PBMC-Konzentrationen verändern würden. Dies kann verhindert werden, wenn bei einem Medienwechsel auch gleichzeitig die entsprechende Menge PBMC addiert würde. Dazu müssen jedoch die PBMC desselben Spenders verwendet werden. Dies ist bei anonymen Spenden nur dann möglich, wenn ein Teil der in den Versuch eingesetzten PBMC parallel für solche Medienwechsel einzeln kultiviert wird. Dafür ist aber, wie bereits erwähnt, eine Aktivierung, zum Beispiel mit Concanavalin A, nötig. Somit wären die Versuchsvoraussetzungen dahingehend verändert, dass voraktivierte PBMC in den Versuch eingesetzt würden.



**Abb. 60: Versuchskonzept**

Die Graphik zeigt den zeitlichen Ablauf eines idealen Versuchs begonnen mit der Aussaat von Monolayer-Zellen bis hin zu abschließenden Analysemethoden. Senkrecht an der linken Seite sind die entsprechenden Zeitpunkte (d) der jeweiligen Eingriffe und Analyseverfahren dargestellt. Die entnommenen Proben werden in der Regel konserviert und im Anschluss an den Versuch analysiert. Ausnahme bilden die Proben von Tag 7, bei denen Sphäroide vereinzelt und direkt in Versuche eingesetzt werden. Dabei sind die jeweils benötigten Zellzahlen (Z) angegeben und dazu die benötigte Zeitdauer für die einzelnen Methoden.

Aus den genannten Gründen haben für solche Untersuchungen Kultur-Modelle Vorteile, die keine großen Sphäroid-Mengen beanspruchen, wie zum Beispiel Sphäroid-Kulturen in 96-Kammer-Platten (Friedrich et al., 2007). Dabei wird pro Kammer ein einzelnes Sphäroid mit PBMC und Immuntherapeutikum untersucht und es reichen geringe PBMC-Mengen, die von freiwilligen Spendern im Abstand weniger Tage immer wieder entnommen werden können.

Mit dem hier dargestellten Versuchskonzept sollte es in Zukunft möglich sein, onkologische, immuntherapeutisch wirksame Antikörper-Präparate in Therapieorientierten pharmakologischen Studien mit hoher Durchflussrate zu untersuchen. Durch die großen Vorteile der 3D-Zellkultur im Vergleich zu Monolayer-Kulturen sollten die Sphäroide in Zukunft zunehmend eine wichtige Rolle in der präklinischen Forschung spielen (Hirschhaeuser et al., 2009).

## 6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat die Tumorbehandlung mit immunologischen Präparaten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der allgemeine Ablauf der Testung eines Arzneimittelkandidaten sieht vor, zunächst in Zellkulturversuchen und Tierversuchen die Wirkweise und Sicherheit, sowie voraussichtliche Abbauege und mögliche Gefahren so beurteilen zu können, dass sie für einen Einsatz im Menschen in Frage kommen. Zur präklinischen in vitro-Testung werden dabei in der Regel Monolayer-Zellkulturen oder Einzelzellsuspensionen eingesetzt. Der Einsatz von dreidimensionalen (3D)-Zellkultur-Modellen, welche den Aufbau von Mikrometastasen oder inter-vaskulären Arealen in Tumoren exakter widerspiegeln, führt zu wesentlich besseren Voraussagen bezüglich der klinischen Wirksamkeit neuer Präparate. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung und Anwendung eines neuen 3D-Zellkultur-basierten Systems zur Testung trifunktionaler bispezifischer Antikörper für die Tumorbehandlung, welches sich auch auf andere vergleichbare Präparate übertragen lässt.

In meiner Arbeit konnte ich mehrere humane Tumorzelllinien definieren, mit denen es gelang, stabile Co-Kulturen von Multi Cellular Tumour Spheroids (MCTS) mit Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) in miniaturisierten Spinner-Flaschen zu etablieren. Spinner-Flaschen, in denen die im Kulturmedium befindlichen Immunzellen, Tumorsphäroide und Therapeutika ständig frei zirkulieren, sind besonders für eine wirklichkeitsnähere Nachbildung der in vivo-Simulation mit disseminierten Tumorzellen oder mit malignem Aszites geeignet. Diese Art der Kultivierung erlaubte Beobachtungszeiten von 20 Tagen und länger für eine große Bandbreite an Analysemethoden. Zu den mit dem erstellten Protokoll standardmäßig durchführbaren Analysemethoden zählen unter anderem immunhistochemische Färbungen an Sphäroid-Gefrierschnitten, Vitalitätstest, Untersuchung der Plattierungs-Effizienz, Bestimmung der Sphäroidvolumina, Zytokinbestimmungen aus dem Medienüberstand mit Cytokine Bead Arrays, PCR-Analysen immunzellspezifischer Antigene, sowie durchflusszytometrische Analysen einzelner Zellpopulationen. Diese Kombination an Analysemethoden erlaubt einen sehr detaillierten Einblick in die Wirkweise und Effizienz neuer Immuntherapeutika aus verschiedensten Blickwinkeln und stellt ein reproduzierbares Testsystem zur präklinischen Testung von Immuntherapeutika dar, das zukünftig als Bindeglied zwischen Monolayer-Zellkulturen und klinischen Prüfungen einen festen Platz einnehmen könnte.

Mit dem beschriebenen 3D-Zellkultur-System wurden in der vorliegenden Arbeit die trifunktionalen bispezifischen Antikörper catumaxomab (bereits unter dem Handelsnamen Removab® für die Behandlung von maligner Ascites zugelassen) und ertumaxomab (derzeit in klinischen Prüfungen getestet) hinsichtlich ihrer Wirkweise untersucht. Beide Antikörper besitzen im Gegensatz zu herkömmlichen monoklonalen Antikörpern zwei verschiedene Bindungsarme, von denen einer gegen CD3 auf T-Zellen, der zweite gegen EpCAM respektive Her2/neu - beides weit verbreitete Tumorantigene - gerichtet ist. An ihrem Fc-Teil besitzen sie eine dritte Bindungskapazität, über welche sie an Fc $\gamma$  RI, -IIa und -III positive akzessorische Zellen binden. Diese Kombination ermöglicht theoretisch die Ausbildung eines Tri-Zell-Komplexes aus T-Zelle, Tumorzelle und akzessorischer Zelle. Dies stellt eine wirkungsvolle Therapieoption unter Ausnutzung der körpereigenen, immunologischen Abwehr dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Antikörper eine Reduktion der Volumina von Sphäroiden mit den entsprechenden Tumorantigenen in gleichem Maße bewirkten und die Plattierungseffizienz durch ertumaxomab dosisabhängig reduziert wurde. Mit dem erstellten Testsystem konnte der Wirkmechanismus von catumaxomab auf Sphäroide der Zelllinie FaDu (Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom) detaillierter gezeigt werden: catumaxomab wirkte dosisabhängig auf die Reduktion der Sphäroidvolumina und die zunehmende Infiltration von CD45+ Zellen, die als T-, NK- und/oder dendritische Zellen identifiziert wurden. Des Weiteren rief die catumaxomab-Gabe eine verstärkte Ausschüttung der Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  hervor. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass catumaxomab die zelluläre Immunantwort aktiviert.

Die konventionelle Standard-Tumorbehandlung beinhaltet die Gabe von Chemotherapeutika. Oft werden dafür Zytostatika verwendet, die den unerwünschten Nebeneffekt haben, ebenfalls gesunde proliferierende Zellen anzugreifen. Dies kann prinzipiell auch die Wirksamkeit der Antikörper-Therapie beeinflussen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zusätzlich vergleichende Kombinations-Versuche mit catumaxomab und einem gängigen Zytostatikum - Cisplatin - durchgeführt. Mit Untersuchungen der Sphäroidvolumina, Vitalitätstests und Plattierungseffizienz konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von catumaxomab bei gleichzeitiger Anwendung beider Therapeutika aufrecht erhalten bleibt und diese sogar additiv verstärkt wird. Eine Kombinationstherapie im Menschen ist daher denkbar.

## 7 Summary

Over the last years, immunological therapeutics have gained more and more significance in tumor treatment. Testing of potential new drug candidates routinely involves cell culture and animal experiments to analyze the drug's efficacy and safety, as well as possible degradation pathways and dangers for the patients. In general, preclinical *in vitro* studies make use of monolayer cell culture systems or single cell suspensions. The employment/application of three-dimensional (3D) cell culture models which mirror micrometastases or intervascular areas in tumors more accurately lead to a much better prognosis with regard to clinical efficacy. The aim of this study was to develop and employ a new 3D cell culture-based system for the trial of trifunctional bispecific antibodies in tumor treatment, which then can also be applied to similar drugs.

In my thesis, I was able to define several human tumor cell lines with which it was possible to establish stable co-cultures of Multi Cellular Tumour Spheroids (MCTS) combined with Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) in miniaturized spinner flasks. In these spinner flasks, immune cells, tumor spheroids, and therapeutics can constantly circulate freely, which is well suited to realistically mimic the *in vivo* situation of disseminated tumor cells or malign ascites. This way of cultivation allows for a monitoring period of 20 days and more with a great bandwidth of analytical methods. Among others, these multiple observation techniques include immunohistochemical stainings of spheroid cryosections, cell viability assays, plating efficiency experiments, volume growth analysis, cytokine measurements from media supernatants with Cytokine Bead Arrays, PCR analyses from immune cell specific antigens, as well as flow cytometric analyses of single cell populations. This combination allows for a very detailed insight into the efficacy and underlying mode of actions of new immunotherapeutics from different perspectives, and it represents a precise and reproducible test system under standardized conditions for preclinical studies, which in the future might serve as a powerful link between monolayer cell cultures and clinical studies.

Using this novel approach, the trifunctional bispecific antibodies catumaxomab (already approved as a treatment for malign ascites under the name Removab<sup>®</sup>) and ertumaxomab (currently tested in clinical trials) were analyzed with respect to their efficacy and mode of action. In contrast to conventional monoclonal antibodies, both



catumaxomab and ertumaxomab possess two different binding sites: one against CD3 on T-cells, the other against EpCAM or Her2/neu, respectively, - both are widespread tumor antigens. Their Fc-part comprises a third binding capacity, through which they can bind to Fc $\gamma$  RI, -IIa, and -III positive accessory cells. In theory, this combination enables the formation of a tri-cell-complex consisting of a T-cell, a tumor cell and an accessory cell. Thus, trifunctional bispecific antibodies represent an effective treatment option by using the body's own immunological defenses.

Within the scope of this thesis, I was able to show that both antibodies to the same degree cause a reduction in volume of spheroids expressing the corresponding antigens, and the plating efficiency under ertumaxomab treatment was reduced in a dose dependent manner. Furthermore, catumaxomab's mode of action on spheroids of the tumor cell line FaDu (head and neck squamous cell carcinoma) could be analyzed in more detail: catumaxomab caused a volume reduction of the spheroids in a dose-dependent manner, and an increasing infiltration of CD45+ cells, which could be further identified as T-, NK- and/or dendritic cells. Moreover, treatment with catumaxomab initiated the increased release of IL-2, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ . These results indicate the activation of the cellular immune response by catumaxomab.

Conventional tumor treatment involves the administration of chemotherapeutics. In general, this includes the usage of cytostatics, which often have the unwanted side effect of also affecting healthy proliferating cells. In principal, this can influence the effectiveness of a given immunological treatment. Therefore, comparative studies with catumaxomab and a common cytostatic – Cisplatin – were performed in this thesis. By evaluating the reduction in spheroid volume, cell viability assays, and plating efficiency experiments, it could be demonstrated that the efficacy of catumaxomab under simultaneous treatment with both therapeutics was maintained and even enhanced. Thus, an adjunction with immunological therapeutics and cytostatics in human patients seems to be feasible.

## 8 Anhang

### 8.1 Geräte

Gerät	Firma	Firmensitz
Absauganlage	Neuberger	Freiburg
Agarosegelelektrophoresekammer	Pharmacia Biotech	Wien, Österreich
Autoklav	Systemc GmbH	Wettenberg
Brutschränke	Heraeus Instruments GmbH Flow Laboratories Thermo Scientific	Hanau Meckenheim Karlsruhe
Casy® 1TT	Schärfe System GmbH	Reutlingen
Einfrierbehälter	Nunc	Wiesbaden
Einwegmaterialien	Nalgene Nunc Greiner BioOne Carl Roth GmbH & Co VWR International GmbH	Roskilde, Dänemark Wiesbaden Frickenhausen Karlsruhe Darmstadt
Feinwaage	Sartorius AG	Göttingen
Glasmaterialien	Schott-Glas	Mainz
Gummischaber	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe
Heizplatte	IKA-Labortechnik	Staufen i. Br.
Induktionsrührplatte für Spinner-Flaschen	Thermo Scientific	Karlsruhe
Kamera Nikon D100	Nikon	Düsseldorf
Kryotom	Slee	Mainz
Magnetrührer	IKA-Labortechnik	Staufen i. Br.
Microplate Reader UV-3550	BioRad Laboratories GmbH	München
Mikroskope Axiophot Axio Imager Z1 Biozero BZ-8000 Olympus IM	Zeiss Zeiss Keyence GmbH Olympus Europa GmbH	Oberkochen Oberkochen Neu-Isenburg Hamburg
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel	Braunschweig
PapPen	Dako	Hamburg
pH-Meter	Schott-Geräte GmbH	Hofheim a. Ts.
Pipettierhilfen	Brand GmbH & Co KG Eppendorf AG Gilson International Hirschmann	Wertheim Hamburg Bad Camberg Eberstadt
Rüttler	IKA-Labortechnik	Staufen i.Br.
Scanner	Epson	Meerbusch
Spannungsgerät	BioRad	München
Spinner-Flaschen	Wheaton	Millwille, NJ, USA
Sterilbänke	Flow Laboratories Clean Air	Meckenheim Minneapolis, MN, USA
Sterilfilter 0,1 µm Porengröße 0,45 µm Porengröße	PALL Hartenstein	Dreieich Würzburg
Thermoblock	Stuart Scientific Co. Lt.	GB
Thermocycler	Biometra GmbH	Göttingen

## Anhang

Vortexer	Bender & Hobein	Bruchsal
Waage	Sartorius AG	Göttingen
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik)	Burgwedel
Zentrifugen Biofuge 15, Rotor 3042 & Megafuge 1,0R, Rotor 2252 Zentrifuge 3200	Heraeus Instruments Heraeus Instruments Eppendorf	Hanau Hanau Hamburg

## 8.2 Puffer und Lösungen

Hanks-Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ :

Substanz	Einwaage	Konzentration
NaCl	8,0 g	136,9 mM
KCl	0,4 g	5,36 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,04 g	0,28 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,06 g	0,44 mM
HEPES	3,57 g	14,98 mM

- In A. dest. lösen und auf pH 7,2 einstellen
- Autoklavieren
- Vor Gebrauch komplettieren mit:

Pro 1 l:

+ 1 g Glucose (5,55 mM)

+ 9,5 g EDTA (32,5 mM)

Durchführung: Etwas autoklavierten Puffer steril abnehmen, die Chemikalien darin lösen und dann mit Hilfe einer 20 ml Spritze und einem sterilen Filtervorsatz in den restlichen Puffer steril filtrieren.

PBS 10x (pH 7,3 - 7,4):

Substanz	Einwaage	Konzentration
NaCl	80,0 g	1,37 M
KCl	2,0 g	26,8 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	11,5 g	81,0 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,0 g	14,7 mM

Mit A. dest. auf 1 l auffüllen

TBS 10x (pH 7,6 ± 0,2):

Substanz	Einwaage	Konzentration
Tris-Puffer	61,0 g	502,47 mM
in 500 ml A. dest. lösen		
NaCl	175,3 g	3,0 M

Mit A. dest. auf 1 l auffüllen

## Anhang

---

TBE 5x:

Substanz	Einwaage	Konzentration
Tris-Base	54,0 g	450 mM
Borsäure	27,5 g	450 mM
+20 ml 0,5 M EDTA-Lösung ( pH 8,0)		

Mit A. dest. auf 1 l auffüllen

PB 0,1 M mit 50 mM Glutamat (pH 7,0):

Substanz	Einwaage	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	275,8 mg	40,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	419,5 mg	59,1 mM
Na-Glutamat	423,0 mg	50 mM

Mit A. dest. auf 50 ml auffüllen

PB 0,3 M (pH 7,0):

Substanz	Einwaage	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	661 mg	202,9 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g	97,1 mM

Mit A. dest. auf 50 ml auffüllen

TE-Puffer 10x (pH 7,5):

Substanz	Einwaage	Konzentration
Tris-Puffer	605,7 mg	100 mM
EDTA	186,1 mg	10 mM

Mit A. dest. auf 50 ml auffüllen

MOPS-Puffer 10x (pH 7,0):

Substanz	Einwaage	Konzentration
MOPS (free acid)	41,854 g	200 mM
Na-Acetat (3x H <sub>2</sub> O)	6,804 g	50 mM
EDTA	3,7224 g	12 mM

Mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 1 l auffüllen

DNA-Gelladepuffer 6x:

Substanz	Einwaage	Konzentration
Saccharose	4 g	1,17 M
EDTA	1 ml	100 mM
SDS (10 % m/v)	1 ml	34,67 mM
OrangeG	1 Spatelspitze	--

Mit A. dest. auf 10 ml auffüllen

Oder DNA-Ladepuffer (6x) Promega Mannheim, Deutschland

## Anhang

---

### Präinkubationslösung:

Substanz	Einwaage	Konzentration
NGS	2 ml	10 %
BSA	0,2 g	1 %
Triton X-100 (5 %ig)	2 ml	3,2 mM

Mit PBS auf 20 ml auffüllen

### Antikörper-Inkubationslösung:

Substanz	Einwaage	Konzentration
NGS	600 µl	3 %
BSA	0,2 g	1 %
Triton X-100 (5 %ig)	2 ml	3,2 mM

Mit PBS auf 20 ml auffüllen

### Permeabilisierungspuffer 1:

Substanz	Einwaage	Konzentration
Na-Zitrat	10 mg	0,04 mM
Triton X-100 (5 %ig)	1 ml	3,2 mM

Mit A. dest auf 10 ml auffüllen

### PBS-BSA (Durchflusszytometrie):

Substanz	Einwaage	Konzentration
BSA	0,5 g	1 %
NaN <sub>3</sub>	5 mg	77 µM

Mit 1x PBS auf 50 ml auffüllen

### 8.3 Nährmedien

Die verwendeten Zelllinien benötigten unterschiedliche Nährmedien mit verschiedenen Zusätzen. Die folgenden Tabellen geben die Zusammenstellung der Medien wieder. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Stammlösungen. Die Lösungen zum Einfrieren („Einfriermedien“) enthielten 90 % des jeweiligen Nährmediums und 10 % DMSO. Zu allen Zellkulturen wurde, zum Schutz vor Bakterienkontaminationen, 1 % (v/v) Penicillin G / Streptomycin Sulfat (100x) Antibiotika-Kombination zugegeben.

<b>786-O</b> RPMI 1640 + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin 10 mM Hepes	<b>MCF-7</b> MEM with Earle's + 10 % FCS gold + 1 % NEA + 0,01 mg/ml Rinder-Insulin 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat
<b>A549</b> DMEM 1 mM Na-Pyruvat ∅ mM Hepes ∅ % FCS gold 1 % NEA	<b>MDA-MB-231</b> Leibovitz L15 (mit 2 mM L-Glutamin) + 10 % FCS gold  keine CO <sub>2</sub> -Begasung
<b>BT-474</b> DMEM von PAN (mit 1 g/l Glukose und 2 mM L-Glutamin) + 10 % FCS von PAN  DMEM + 10 % NCTC 135 Medium + 10 % FCS gold ∅ mM Hepes 1 mM Oxalacetatsäure + 0,01 mg/ml Rinder-Insulin	<b>MDA-MB-435</b> Leibovitz L15 (mit 2 mM L-Glutamin) + 10 % FCS gold  keine CO <sub>2</sub> -Begasung
<b>Cal-33</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin	<b>OC316</b> RPMI1640 + 10 % FCS gold ∅ mM Hepes 1 mM Na-Pyruvat 2 mM L-Glutamin
<b>CCF-RC-1</b> RPMI1640 + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin 25 mM Hepes	<b>PCI-13</b> DMEM/F-12 + 10% FCS gold 2mM L-Glutamin

## Anhang

<p><b>Colo205</b> RPMI1640 + 10 % FCS gold 4 mM L-Glutamin</p>	<p><b>SAS</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES</p>
<p><b>Du145</b> MEM with Earle's + 10 % FCS gold + 1 % NEA 1 mM Na-Pyruvat</p>	<p><b>SK-BR-3</b> McCoy's 5a (mit 1,5 mM L-Glutamin) + 15 % FCS gold alternativ + 10 % CCS</p>
<p><b>EMT-6</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES</p>	<p><b>SK-OV-3</b> McCoy's 5a (mit 1,5 mM L-Glutamin) + 15 % FCS gold alternativ + 10 % CCS</p>
<p><b>FaDu</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES</p>	<p><b>SQ20B</b> DMEM/HAM'S-F12 + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin</p>
<p><b>HCT-8</b> RPMI1640 + 10 % FCS gold 1 mM Na-Pyruvat 2 mM L-Glutamin</p> <p>Anderes Rezept (laut AACR): RPMI1640 + 10 % Pferdeserum 1 mM Na-Pyruvat</p>	<p><b>T47D</b> RPMI1640 + 10 % FCS gold + 0,2 IU/ml Insulin zusätzlich zur routinemäßigen Antibiotika-Zugabe außerdem Neomycin (10 µg/ml)</p>
<p><b>HCT-15</b> RPMI1640 + 10 % FCS gold 1 mM Na-Pyruvat 2 mM L-Glutamin</p>	<p><b>U87</b> DMEM + 10 % FCS gold 1 mM Natrium-Pyruvat</p>
<p><b>HCT-116</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES</p>	<p><b>UT-SCC-5</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES</p>
<p><b>HSC-4</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES</p>	<p><b>UT-SCC-14</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES</p>

## Anhang

<b>HT-29</b> DMEM von PAN (mit 1 g/l Glukose und 2 mM L-Glutamin) + 10 % FCS von PAN	<b>WiDr</b> MEM with Earle's + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA
<b>IGROV-1</b> RPMI1640 + 10 % FCS gold + 1 % Hapes 1 M + 1 % Na-Pyruvat 100 mM + 1 % L-Glutamin 200 mM	<b>XF354</b> DMEM + 10 % FCS gold 2 mM L-Glutamin + 1 % NEA 1mM Na-Pyruvat 10 mM HEPES

### Zutaten:

Substanz		Artikel-Nr.	Firma	Firmensitz
CCS		SH3008703	ThermoScientific	Karlsruhe
DMEM	high glucose	E15-810	PAA	Cölbe
DMEM		P04-01550	PAN biotech	Aidenbach
DMEM/F-12		E15-024	PAA	Cölbe
DMEM/F-12	mit L-Glutamin	E15-813	PAA	Cölbe
FCS		P03-3300	PAN biotech	Aidenbach
FCS gold	EU-Qualität	A15-649	PAA	Cölbe
HEPES		9105.4	Roth	Karlsruhe
L-Glutamin	200 mM	M 11-004	PAA	Cölbe
Leibovitz L-15	mit L-Glutamin	E15-821	PAA	Cölbe
LSM1077		J15-004	PAA	Cölbe
McCoy's 5a		P04-05500	PAN biotech	Aidenbach
MEM Earle's		E15-024	PAA	Cölbe
MEM Earle's	mit L-Glutamin	E15-825	PAA	Cölbe
Na-Pyruvat		A4859.0050	AppliChem	Darmstadt
Na-Pyruvat	100 mM	L0473	Biochrom	Berlin
NEA	100fach	K0293	Biochrom	Berlin
NEA	100fach	M11-003	PAA	Cölbe
Neomycin	10 mg/ml	N1142	SIGMA	Taufkirchen
Pen/Strep	100fach	P11-010	PAA	Cölbe
Pferdeserum		B11-021	PAA	Cölbe
RPMI1640		E15-039	PAA	Cölbe
Trypsin	1fach	T4424	SIGMA	Taufkirchen
Trypsin/EDTA	1fach	L11-004	PAA	Cölbe

## 8.4 Antikörper

### Primärantikörper:

Antigen	Konjugation	Artikel-Nr.	Firma	Firmensitz
CD1a	unkonjugiert	300101	Biozol	Eching
CD2	unkonjugiert	DLN-06226	Dianova	Hamburg
CD3	unkonjugiert	DLN-09811	Dianova	Hamburg
CD3	FITC	3221 DC	Dianova	Hamburg
CD3	R-PE	345765	BD	Heidelberg
CD4	FITC	555346	BD	Heidelberg
CD8	unkonjugiert	DLN-13682	Dianova	Hamburg



## Anhang

CD8	FITC	PN IM 0451	Coulter- Immunotech	Marseille, Frankreich
CD14	unkonjugiert	DLN-09771	Dianova	Hamburg
CD14	FITC	345784	BD	Heidelberg
CD16+56	unkonjugiert	DLN-06562	Dianova	Hamburg
CD16+56	FITC	4080 DC	Dianova	Hamburg
CD19	FITC	3047 DC	Dianova	Hamburg
CD45	unkonjugiert	DLN-09796	Dianova	Hamburg
CD45	R-PE	3092 DC	Dianova	Hamburg
CD64	unkonjugiert	305001	Biozol	Eching
EpCAM (HO-3)	unkonjugiert		TRION	München
Ki-67	unkonjugiert	M7248	Dako	Hamburg

### Sekundärantikörper:

Spezies	Konjugation	Artikel-Nr.	Firma	Firmensitz
Ziege anti-Maus	HRP	K4000	Dako	Hamburg
Ziege anti-Maus	AlexaFluor 488™	A11001	Molecular Probes	Carlsbad, CA, USA

## 8.5 Marker & Kits

Produkt	Artikel-Nr.	Firma	Firmensitz
PeqGold IV	27-2110	PeqLap	Erlangen
pUC19/Mspl	T149.1	Roth	Karlsruhe

Produkt	Artikel-Nr.	Firma	Firmensitz
FragEL Apoptose Kit	QIA39-1EA	Calbiochem	Darmstadt
MycoTest Venor®GeM	11-1025	Minerva Biolabs	Berlin
Reverse-iT. 1 <sup>st</sup> Strand Synthesis Kit	AB-0789/a	ABgene	Epsom, GB
Rnase-Free Dnase Set	79254	Qiagen	Hilden
Rneasy®Mini Kit	74104	Qiagen	Hilden
XTT-Assay	TOX-2	Sigma-Aldrich	Schnelldorf

## 8.6 Chemikalien

Chemikalie	Artikel-Nr.	Firma	Firmensitz
Aceton	9372.2	Roth	Karlsruhe
Agarose NEEO; Ultra-Qualität	2267.2	Roth	Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	A1108.0100	AppliChem	Darmstadt
Borsäure; p. a.	6943.1	Roth	Karlsruhe
BSA	A6003	SIGMA	Taufkirchen
CASY®Clean	43008	Schärfe System	Reutlingen
CASY®ton	43001	Schärfe System	Reutlingen
CO <sub>2</sub>		Westfalen AG	Münster
DAB	K3467	Dako	Hamburg
DMSO	D5879	SIGMA	Taufkirchen
DTT	43815	SIGMA	Taufkirchen
EDTA; 25 mM	E6511	SIGMA	Taufkirchen

## Anhang

Essigsäure; 100 %	3738.2	Roth	Karlsruhe
Ethanol; 100 %	K928.3	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	2218.1	Roth	Karlsruhe
Glukose; wasserfrei	8337.1000	Merck	Darmstadt
Glycerol	7530.1	Roth	Karlsruhe
HCl; 1 M	H9892	SIGMA	Taufkirchen
HCl; reinst	944 K1312611 4	Merck	Darmstadt
HEPES-Lösung; 1 M	L1613	Biochrom	Berlin
HEPES; Na-Salz	H 3784-100G	SIGMA	Taufkirchen
KCl ; p. a.	TA 195836 640	Merck	Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; p. a.	A 402973 339	Merck	Darmstadt
Mayers saures Hämalun	T865.1	Roth	Karlsruhe
Methanol	T909.1	Roth	Karlsruhe
Methylenblau	MB1	SIGMA	Taufkirchen
Mg-Acetat ; 100 mM	5819	Merck	Darmstadt
MOPS	M-9381	SIGMA	Taufkirchen
N <sub>2</sub>		Westfalen AG	Münster
Na-Zitrat	HN13.1	Roth	Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; p. a.	S-5136	SIGMA	Taufkirchen
NaCl; > 99,5 %	71380	FLUKA	Basel, Schweiz
Nagellack		Rossmann	Mainz
NaN <sub>3</sub>	A1430,0050	AppliChem	Darmstadt
NaOH; > 99 %	6771.2	Roth	Karlsruhe
NGS	005-000-001	dianova	Hamburg
Orange G; für Elektrophorese	14277	Merck	Darmstadt
Roti <sup>®</sup> -Histokitt	6638.1	Roth	Karlsruhe
Saccharose; grade II	S-8501	SIGMA	Taufkirchen
SDS ; > 98,5 %	L4509-250G	SIGMA	Taufkirchen
Silikon	2367.3	Serva	Heidelberg
Tissue-Tek <sup>®</sup>	TTEK	Hartenstein	Würzburg
Tris-Base; > 99,9 %	4855.2	Roth	Karlsruhe
Tris-HCl; > 99 %	H512a	Promega	Mannheim
Triton-X-100	T8787	SIGMA	Taufkirchen

## 8.7 Software

Programm	Firma	Firmensitz
Photoshop CS	Adobe Systems	München
Excel	Microsoft	München
ImageJ	National Institute of Health	Bethesda, MD, USA
MicroplateManager 4.0	BioRad	München
Nikon Capture Control	Nikon	Düsseldorf
OriginLab 7G	OriginLab	Northampton, MA, USA
AxioVision 4.6	Zeiss	Göttingen

## 8.8 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
A.dest	Aqua destillata
ADCC	Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
AK	Antikörper
AMF	Autocrin Motility Factor
APC	Antigen presenting Cells
ATP	Adenosintriphosphat
B-CLL	chronische B-Lymphozyten-Leukämie
BC	Buffy Coat
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CBA	Cytokine Bead Array
CCS	Cosmic Calf Serum
CD	Cluster of differentiation
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
cDNA	copy DNA
Con A	Concanavalin A
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DC	dendritische Zellen
DCC	Deleted in Colon Cancer
DEPC	Diethylidicarbonat
di	Rangdifferenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	DNA verdauendes Enzym
dNTP	Nukleotidmischung
DTT	Dithiothreitol
ED50	Effekt Dosis 50 %
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
Fab-Teil	antigen binding Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal calf serum
Fc-Teil	constant Fragment
Fc $\gamma$ RI, -RIIa, RIII	Fc-Domäne bindender Rezeptor -I,- Ila, -III
FGF	Fibroblast Growth Factor
FisH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
FragEL	Fragment End Labeling
FSC	Forward Scatter
GMP	Good Manufacturing Practice
H2O/DEPC	DEPC Wasser
HAMA	Human Anti Mouse Antibodies
HARA	Human Anti Rat Antibodies

## Anhang

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPV	Humane Papillomviren
HSP	Heat Shock Protein
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule-1
IFN- $\alpha$ , - $\gamma$	Interferon- $\alpha$ , - $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin like Growth Factor
IHC	Immunhistochemische Färbungen
IL	Interleukin
Ki-67	Proliferationsmarker
KIR	Killer Cell Immunoglobine-like Receptors
MAGE	Melanoma Antigen
MCA	Methylcholanthren
MCTS	Multicellular Tumor Spheroids
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MHC-I, -II	Major-Histocompatibility-Complex-I, -II
MIC-A, -B	Human MHC-Class-I Chain-Related-A, -B
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRD	Minimal Residual Disease
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
n. d.	nicht durchgeführt
NGS	Normal goat serum
NK	Negativkontrolle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2D	Rezeptor auf NK-Zellen
OD	optische Dichte
oligo dT	Primer mit Thymidin
p53	p53
PB	Phosphatpuffer
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PE	Plating Efficiency
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin Antibiotika-Gemisch
PK	Positivkontrolle
pRB	Retinoblastom-Protein
puc19/Mspl	Name eines Größenstandards (PCR)
RDD	Puffer eines Kits zur RNA-Extraktion
RNasen	RNA verdauende Enzyme
RPE	Puffer eines Kits zur RNA-Extraktion
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RW1	Puffer eines Kits zur RNA-Extraktion
SD	Standardabweichung
SDS	sodiumdodecylsulfate

## Anhang

SSC	Sidewards Scatter
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
Taq	Thermus aquaticus
TB	Trispuffer
TBE	Trispuffer mit Borsäure und EDTA
TBS	trisgepufferte Salzlösung
TCR	T-Cell Receptor
TdT	terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TH1, H2	T-Helferzelle 1, -2
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tr1,-2	Arten von regulatorischen T-Zellen
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- ((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid

## 9 Literaturverzeichnis

**Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996.** Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. Oktober 1996, Bd. 383, 6603, S. 787-793.

**Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. 1987.** Comparative pO<sub>2</sub> measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *British Journal of Cancer*. 1987, Bd. 56, S. 325-327.

**Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. 1999.** The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *Journal of Molecular Medicine*. Oktober 1999, Bd. 77, 10, S. 699-712.

**Banchereau J, Steinman RM. 1998.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. März 1998, Bd. 392, 6673, S. 245-252.

**Baiocchi G, Scambia G, Benedetti P, Menichella G, Testa U, Pierelli L, Martucci R, Foddai ML, Bizzi B, Mancuso S, Peschle C. 1993.** Autologous Stem Cell Transplantation: Sequential Production of Hematopoietic Cytokines Underlying Granulocyte Recovery. *Cancer Research*. März 1993, Bd. 53, S. 1297-1303.

**Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. 1999.** Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. Juli 1999, Bd. 285, 5428, S. 727-729.

**Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. 2006.** Regulatory T cells. *The Journal of Investigative Dermatology*. Januar 2006, Bd. 126, 1, S. 15-24.

**Bellon M, Nicot C. 2008.** Regulation of Telomerase and Telomeres: Human Tumor Viruses Take Control. *Journal of the National Cancer Institute*. Januar 2008, Bd. 100, 2, S. 98-108.

**Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. 1998.** Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. Juni 1998, Bd. 393, 6684, S. 478-480.

**Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML. 1996.** Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. November 1996, Bd. 10, 13, S. 1471-1484.

**Bhadriraju K, Chen CS. 2002.** Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discovery Today*. Juni 2002, Bd. 7, 11.

**Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. 2001.** Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunological Reviews*. Juni 2001, Bd. 181, S. 203-214.

**Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. 2002.** The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of Pathology*. März 2002, Bd. 196, 3, S. 254-265.

**Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohmé I, Forsberg B, Eklund B, Fjeldborg O, Friedberg M, Frödin L. 1995.** Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *International Journal of Cancer*. Januar 1995, Bd. 60, 2, S. 183-189.

**Bissel MJ, Hall HG, Parry G. 1982.** How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology*. November 1982, Bd. 99, 1, S. 31-68.

**Bissel MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. 2002.** The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*. Dezember 2002, Bd. 70, 9-10, S. 537-546.

**Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. 2002.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. April 2002, Bd. 55, 4, S. 244-265.

**Boukamp P, Mirancea N. 2006.** Telomeres rather than telomerase a key target for anti-cancer therapy?. *Experimental Dermatology*. September 2006, Bd. 16, S. 71-79.

**Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. 2000.** Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. Februar 2000, Bd. 342, 8, S. 525-533.

**Braun S, Pantel K. 2000.** Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. Oktober 2000, Bd. 125, 41, S. 1237-1239.

**Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. 1996.** Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both

interferon alpha and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Juli 1996, Bd. 93, 15, S. 7673-7678.

**Burges A, Wimberger P, Kümper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B, Pfisterer J, Lichinitser M, Makhson A, Moiseyenko V, Lahr A, Schulze E, Jäger M, Ströhlein MA, Heiss MM, Gottwald T, Lindhofer H, Kimmig R. 2007.** 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. *Clinical Cancer Research*. Juli 2007, Bd. 13, 13, S. 3899-3905.

**Burnet M. 1957.** Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *British Medical Journal*. April 1957, Bd. 1, 5023, S. 841-847.

**Burnet FM. 1970.** The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*. 1970, Bd. 13, S. 1-27.

**Butcher EC, Berg EL, Kunkel EJ. 2004.** Systems biology in drug discovery. *Nature Biotechnology*. Oktober 2004, Bd. 22, 10, S. 1253-1259.

**Carlsson J, Yuhas JM. 1984.** Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results in Cancer Research*. 1984, Bd. 95, S. 1-23.

**Carlsson J, Acker H. 1988.** Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *International Journal of Cancer*. November 1988, Bd. 42, 5, S. 715-720.

**Castañeda F, Kinne RK. 2000.** Short exposure to millimolar concentrations of ethanol induces apoptotic cell death in multicellular HepG2 spheroids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Juni 2000, Bd. 126, 6, S. 305-310.

**Castellino F, Boucher PE, Eichelberg K, Mayhew M, Rothman JE, Houghton AN, Germain RN. 2000.** Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *Journal of Experimental Medicine*. Juni 2000, Bd. 191, 11, S. 1957-1964.

**Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. 2000.** Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity*. Juni 2000, Bd. 12, 6, S. 721-727.

**Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. 2001.** Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC



class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. September 2001, Bd. 98, 20, S. 11521-11526.

**Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. 2000.** Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*. April 2000, Bd. 6, 4, S. 443-446.

**Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. 2001.** ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. Februar 2001, Bd. 14, 2, S. 123-133.

**Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. 1991.** Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *Journal of Clinical Oncology*. Oktober 1991, Bd. 9, 10, S. 1749-1756.

**Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, Shi SR, Harvey J, Chen SC, Sherrod AE, Groshen S, Taylor CR. 1995.** Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Annals of Surgery*. Oktober 1995, Bd. 222, 4, S. 415-423.

**Cottier H. 1987.** Metastasierung. [Buchverf.] Sack H Scherer E. *Strahlentherapie-Radiologische Onkologie*. 3. 1987, S. 337-339.

**Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G, Lee WM. 1998.** Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*. Juli 1998, Bd. 9, 1, S. 25-34.

**Cheung AL, Deng W. 2008.** Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Frontiers in Bioscience*. Januar 2008, Bd 1, 13, S. 2075-2090.

**Darst M, Al-Hassani M, Li T, Yi Q, Travers JM, Lewis DA, Travers JB. 2004.** Augmentation of Chemotherapy-Induced Cytokine Production by Expression of the Platelet-Activating Factor Receptor in a Human Epithelial Carcinoma Cell Line. *The Journal of Immunology*. Mai 2004, Bd. 172, 10, S. 6330-6335.

**De Bruin EC, Medema JP. 2008.** Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews*. Dezember 2008, Bd 34, 8, S. 737-749.

**Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. 2000.** Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature Immunology*. August 2000, Bd. 1, 2, S. 119-126.

**Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. 2001.** Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. September 2001, Bd. 413, 6852, S. 165-171.

**Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. 1996.** Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *Journal of the National Cancer Institute*. November 1996, Bd. 88, 22, S. 1652-1658.

**Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. 2002.** Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. Oktober 2002, Bd. 298, 5594, S. 850-4.

**Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002.** Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. November 2002, Bd. 3, 11, S. 991-998.

**Eberle J, Fecker LF, Forschner T, Ulrich C, R wert-Huber J, Stockfleth E. 2007.** Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *British Journal of Dermatology*. Mai 2007, Bd. 156, s3, S. 18-24.

**Egeter O, Mocikat R, Ghoreschi K, Dieckmann A, R cken M. 2000.** Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Research*. März 2000, Bd. 16, 6, S. 1515-1520.

**Fadare O, Zheng W. 2009.** Insights into Endometrial Serous Carcinogenesis and Progression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. Januar 2009, Bd. 2, 5, S. 411-432.

**Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. 1999.** Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature Medicine*. April 1999, Bd. 5, 4, S. 405-411.

**Fields RC, Shimizu K, Mulé JJ. 1998.** Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. August 1998, Bd. 95, 16, S. 9482-9487.

**Fischer N, Léger O. 2007.** Bispecific Antibodies: Molecules That Enable Novel Therapeutic Strategie. *Pathobiology*. 2007, Bd. 7, 14, S. 3-14.

**Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. 2000.** Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *The Cancer Journal from Scientific American*. Februar 2000, Bd. 6, 1, S. S55-57.

**Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. 2003.** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*. April 2003, Bd. 4, 4, S. 330-336.

**Freyer JP, Fink NH, Schor PL, Coulter JR, Neeman M, Sillerud LO. 1990.** A system for viably maintaining a stirred suspension of multicellular spheroids during NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*. Oktober 1990, Bd. 3, 5, S. 195-205.

**Freyer JP, Schor PL, Jarrett KA, Neeman M, Sillerud LO. 1991.** Cellular energetics measured by phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy are not correlated with chronic nutrient deficiency in multicellular tumor spheroids. *Cancer Research*. August 1991, Bd. 51, 15, S. 3831-3837.

**Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart L. 2007.** Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology*. November/Dezember 2007, Bd. 83, 11-12, S. 849-871.

**Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. 1996.** Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine*. Oktober 1996, Bd. 2, 10, S. 1096-1103.

**Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, Reschner A. 2005.** Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology*. März 2005, Bd. 204, 2, S. 522-531.

**Gomez-Lechon MJ, Jover R, Donato T, Ponsoda X, Rodriguez C, Stenzel KG, Klocke R, Paul D, Guillén I, Bort R, Castell JV. 1998.** Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *Journal of Cellular Physiology*. Dezember 1998, Bd. 177, 4, S. 553-562.

**Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Kreutz M. 2006.** Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions. *Cell Cycle*. April 2006, Bd. 5, 7, S. 691-695.

**Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. 2002.** Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. Oktober 2002, Bd. 419, 6908, S. 734-738.

**Gronau S, Schmitt M, Thess B, Reinhardt P, Wiesneth M, Schmitt A, Riechelmann H. 2005.** Trifunctional Bispecific Antibody-induced Tumor Cell Lysis of Squamous Cell Carcinomas of the upper Aerodigestive Tract. *Head & Neck*. April 2005, Bd. 27, S. 376-382.

**Hanahan D, Weinberg RA. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell*. Januar 2000, Bd. 100, 1, S. 57-70.

**Heiss MM, Ströhlein MA, Jäger M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H. 2005.** Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *International Journal of Cancer*. November 2005, Bd. 117, 3, S. 435-443.

**Hicks KO, Ohms SJ, van Zijl PL, Denny WA, Hunter PJ, Wilson WR. 1997.** An experimental and mathematical model for the extravascular transport of a DNA intercalator in tumours. *British Journal of Cancer*. Oktober 1997, Bd. 76, 7, S. 894-903.

**Hirschhaeuser F, Leidig T, Rodday B, Lindemann C, Mueller-Klieser WF. 2009.** Test System for Trifunctional Antibodies in 3D MCTS Culture. *Journal of Biomolecular Screening*. August 2009, [Epub ahead of print].

**Hurwitz AA, Yu TF, Leach DR, Allison JP. 1998.** CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. August 1998, Bd. 95, 17, S. 10067-10071.

**Ivascu A, Kubbies M. 2006.** Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*. Dezember 2006, Bd. 11, 8, S. 922-932.

**Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K. 1997.** Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with

completely resected esophageal cancer. *The New England Journal of Medicine*. Oktober 1997, Bd. 337, 17, S. 1188-1194.

**Izbicki, J., Hosch S., Hossfeld, D., Pantel, K. 2000.** Minimale residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren. *Deutsches Ärzteblatt*. Juni 2000, Bd. 97, Heft 22, S. A-1526-1532.

**Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. 2002.** The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. Juli 2002, Bd. 17, 1, S. 19-29.

**Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ, Riethmueller G, Schildberg FW. 1995.** Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *Journal of Clinical Oncology*. Juni 1995, Bd. 14, 6, S. 1810-1817.

**Johnson JP. 1999.** Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*. September 1999, Bd. 18, 3, S. 345-357.

**Kang MH, Reynolds CP. 2009.** Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*. Februar 2009. Bd. 15, 4, S. 1126-1132.

**Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. 1998.** Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Juni 1998, Bd. 95, 13, S. 7556-7561.

**Kaufman HL, Wang W, Manola J, DiPaola RS, Ko YJ, Sweeney C, Whiteside TL, Schlom J, Wilding G, Weiner LM. 2004.** Phase II randomized study of vaccine treatment of advanced prostate cancer (E7897): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. Juni 2004, Bd. 22, 11, S. 2122-2132.

**Kawagishi C, Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y. 2001.** Cytokine production by macrophages in association with phagocytosis of etoposide-treated P388 cells in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Dezember 2001, Bd. 1541, 3, S. 221-230.

**Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. 2003.** Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a

wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*. Juli 2003, Bd. 83, 2, S. 173-180.

**Kiewe P, Hasmüller S, Kahlert S, Heinrigs M, Rack B, Marmé A, Korfel A, Jäger M, Lindhofer H, Sommer H, Thiel E, Untch M. 2006.** Phase I Trial of the Trifunctional Anti-HER2 x Anti-CD3 Antibody Ertumaxomab in Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. Mai 2006, Bd. 12, 10, S. 3085-3091.

**Kiewe P, Thiel E. 2008.** Ertumaxomab: a trifunctional antibody for breast cancer treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. Oktober 2008, Bd. 17, 10, S. 1553-1558.

**Kim YT, Zhao M. 2005.** Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. *Yonsai Medical Journal*. Juli 2005, Bd. 46, 5, S. 597-613.

**Kipriyanov SM, Le Gall F. 2004.** Recent advances in the generation of bispecific antibodies for tumor immunotherapy. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. März 2004, Bd. 7, 2, S. 233-242.

**Klein G. 1966.** Tumor antigens. *Annual Review of Microbiology*. 1966, Bd. 20, S. 223-252.

**Kleinman H, Philp D, Hoffman MP. 2003.** Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology*. Oktober 2003, Bd. 14, 5, S. 526-532.

**Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. 1997.** Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*. November 1997, Bd. 278, 5343, S. 1630-1632.

**Kunz-Schughart LA. 1999.** Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biology International*. 1999, Bd. 23, 3, S. 157-161.

**Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. 2004.** The use of 3D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening*. März 2004, Bd. 9, 4, S. 273-285.

**Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E. 1998.** Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*. Mai 1998, Bd. 49, 1, S. 27-33.

**Lanier LL. 2000.** Turning on natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*. April 2000, Bd. 191, 8, S. 1259-1262.

**Lanier LL. 2001.** On guard--activating NK cell receptors. *Nature Immunology*. Januar 2001, Bd. 2, 1, S. 23-27.

**Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissel MJ. 2007.** Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature Methods*. April 2007, Bd. 4, 4, S. 359-365.

**Lin RZ, Chang HY. 2008.** Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*. Oktober 2008, Bd. 3, 9-10, S. 1172-1184.

**Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G. 1992.** Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet*. September 1992, Bd. 340, 8821, S. 685-689.

**Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, Thierfelder S. 1995.** Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *Journal of Immunology*. Juli 1995, Bd. 155, 1, S. 219-225.

**Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO. 1996.** Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *American Journal of Pathology*. März 1996, Bd. 148, 3, S. 865-875.

**Long EO. 1999.** Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual Review of Immunology*. 1999, Bd. 17, S. 875-904.

**Lordick F, Ott K, Weitz J, Jäger M. 2008.** The evolving role of catumaxomab in gastric cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*. September 2008, Bd. 8, 9, S. 1407-1415.

**Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. 2001.** Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *Journal of the National Cancer Institute*. Dezember 2001, Bd. 93, 24, S. 1852-1857.

**Lyons AJ, Jones J. 2007.** Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2007, Bd. 36, S. 671-679.

**Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. 1999.** Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet*. Juli 1999, Bd. 345, 9174, S. 197-202.

**Marx U, Sandig V. 2006.** *Drug Testing in vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology*. 2006. ISBN: 978-3-527-31488-1.

**Medzhitov R, Janeway C Jr. 2000.** The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology*. Oktober 2000, Bd. 8, 10, S. 452-456.

**Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmüller G, Koszinowski U, Röcken M. 2003.** Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*. Oktober 2003, Bd. 19, 4, S. 561-569.

**Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. 1991.** Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell*. November 1991, Bd. 67, 5, S. 901-908.

**Morecki S, Lindhofer H, Yacovlev E, Gelfand Y, Ruf P, Slavin S. 2008.** Induction of long-lasting antitumor immunity by concomitant cell therapy with allogeneic lymphocytes and trifunctional bispecific antibody. *Experimental Hematology*. März 2008, Bd. 36, S. 997-1003.

**Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. 1996.** Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annual Review of Immunology*. 1996, Bd. 14, S. 619-648.

**Moser M. 2003.** Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? . *Immunity*. Juli 2003, Bd. 19, 1, S. 5-8.

**Mostov K, Su T, ter Beest M. 2003.** Polarized epithelial membrane traffic:conservation and plasticity. *Nature Cell Biology*. April 2003, Bd. 5, 4, S. 287-293.

**Mueller-Klieser W. 1987.** Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1987, Bd. 113, 2, S. 101-122.

**Mueller-Klieser W. 1997.** Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology*. Oktober 1997, Bd. 273, 4, S. C1109-C1123.

**Mueller-Klieser W. 2000.** Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. November/Dezember 2000, Bd. 36, 2-3, S. 123-139.



**Mukherji B, Chakraborty NG, Sivanandham M. 1990.** T-cell clones that react against autologous human tumors. *Immunological Reviews*. August 1990, Bd. 116, S. 33-62.

**Mundy GR. 2002.** Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Cancer*. August 2002, Bd. 2, 8, S. 584-593.

**Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. 1998.** CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Research*. August 1998, Bd. 58, 16, S. 3491-3494.

**Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR. 1988.** Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*. November 1988, Bd. 336, 6194, S. 79-81.

**O'Brien LE, Zegers MMP, Mostov KE. 2002.** Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Juli 2002, Bd. 3, 7, S. 531-537.

**Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. 1999.** Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Research*. Juli 1999, Bd. 59, 13, S. 3128-3133.

**Padron JM, van der Wilt CL, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus HH, Pizao PE, Giaccone G, Peters GJ. 2000.** The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. November/Dezember 2000, Bd. 36, 2-3, S. 141-157.

**Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. 1996.** Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. Januar 1996, Bd. 183, 1, S. 317-322.

**Pampaloni F, Reynard EG, Stelzer EHK. 2007.** The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Oktober 2007, Bd. 8, 10, S. 839-845.

**Pantel K, Riethmuller G. 1996.** Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1996, Bd. 213, 3, S. 1-18.

**Pantel K. 1996.** Detection of minimal disease in patients with solid tumors. *Journal of Hematotherapy*. August 1996, Bd. 5, 4, S. 359-367.

**Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G. 1997.** Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Der Chirurg*. Dezember 1997, Bd. 68, 12, S. 1241-1250.

**Pantel K. 1999.** Minimal residual disease. Introductory overview. *Cancer Metastasis Reviews*. 1999, Bd. 18, 1, S. 1-2.

**Pardoll DM. 1998.** Cancer vaccines. *Nature Medicine*. Mai 1998, Bd. 4, 5, S. 525-531.

**Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinar F, Slamon D. 1999.** Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene*. April 1999, Bd. 18, 13, S. 2241-2251.

**Penn I. 2000.** Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Safety*. August 2000, Bd. 23, 2, S. 101-113.

**Perez P, Hoffman RW, Shaw S, Bluestone JA, Segal DM. 1985.** Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature*. Juli 1985, Bd. 316, 6026, S. 354-356.

**Pollack AL, Apodaca G, Mostov K. 2004.** Hepatocyte growth factor induces MDCK cell morphogenesis without causing loss of tight junction functional integrity. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. März 2004, Bd. 286, 3, S. C482-C494.

**Pollard JW. 2004.** Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*. Januar 2004, Bd. 4, 1, S. 71-78.

**Powers MJ, Janigian DM, Wack KE, Baker CS, Beer Stolz D, Griffith LG. 2002.** Functional behavior of primary rat liver cells in a three-dimensional perfused microarray bioreactor. *Tissue Engineering*. Juli 2002, Bd. 8, 3, S. 499-513.

**Qin Z, Blankenstein T. 2000.** CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. Juni 2000, Bd. 12, 6, S. 677-686.

**Riechelmann H, Wiesneth M, Schauwecker P, Reinhardt P, Gronau S, Schmitt A, Schroen C, Atz J, Schmitt M. 2007.** Adoptive therapy of head and neck squamous cell carcinoma with antibody coated immune cells: a pilot clinical trial. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Februar 2007, Bd. 56, S. 1397-1406.

**Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ, Aebbersold P, Leitman S, Linehan WM, Seipp CA. 1993.** Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. April 1993, Bd. 85, 8, S. 622-632.

**Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. 1998.** Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Medicine*. März 1998, Bd. 4, 3, S. 321-327.

**Ruf P, Lindhofer H. 2001.** Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood*. Oktober 2001, Bd. 98, 8, S. 2526-2534.

**Ruf P, Gires O, Jäger M, Fellingner K, Atz J, Lindhofer H. 2007.** Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *British Journal of Cancer*. Juli 2007, Bd. 97, S. 315 – 321.

**Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995.** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*. August 1995, Bd. 155, 3, S. 1151-1164.

**Schendel DJ, Oberneder R, Falk CS, Jantzer P, Kressenstein S, Maget B, Hofstetter A, Riethmüller G, Nössner E. 1997.** Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine*. Juni 1997, Bd. 75, 6, S. 400-413.

**Schmitt M, Schmitt A, Reinhardt P, Thess B, Manfras B, Lindhofer H, Riechelmann H, Wiesneth M, Gronau S. 2004.** Opsonization with a trifunctional bispecific (alphaCD3 x alphaEpCAM) antibody results in efficient lysis in vitro and in vivo of EpCAM positive tumor cells by cytotoxic lymphocytes. *International Journal of Oncology*. Oktober 2004, Bd. 25, 4, S. 841-848.

**Scholzen T, Gerdes J. 2000.** The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology*. März 2000, Bd. 182, 3, S. 311-322.

**Sebastian M, Passlick B, Friccius-Quecke H, Jäger M, Lindhofer H, Kannies F, Wiewrodt R, Thiel E, Buhl R, Schmittel A. 2007.** Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study. *Cancer Immunology, Immunotherapy* April 2007, Bd. 56, S. 1637-1644.

**Sebastian M, Kuemmel A, Schmidt M, Schmittel A. 2009.** Catumaxomab: A bispecific trifunctional antibody. *Drugs Today (Barc)*. August 2009, Bd. 45(8), S. 589-97.

**Semino CE, Merok JS, Crane GG, Panagiotakos G, Zhang S. 2003.** Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation*. Juni 2003, Bd. 71, 4-5, S. 262-270.

**Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001.** IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. April 2001, Bd. 410, 6832, S. 1107-1111.

**Shen J, Zhu Z. 2008.** Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. Juni 2008, Bd. 10, 3, S. 273-284.

**Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. 1989.** Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. Mai 1989, Bd. 244, 4905, S. 707-712.

**Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. 2000.** Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of Experimental Medicine*. Februar 2000, Bd. 191, 4, S. 661-668.

**Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. 2001.** A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*. April 2001, Bd. 2, 4, S. 293-299.

**Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. 2000.** Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene Therapy*. März 2000, Bd. 7, 6, S. 481-492.

**Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. 1998.** Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Februar 1998, Bd. 95, 3, S. 1178-1183.

**Stemmler HJ, Salat C, Lindhofer H, Menzel H, Untch M, Kahlert S, Konecny G, Sauer H, Ledderose G, Heinemann V, Kolb HJ. 2005.** Combined treatment of metastatic breast cancer (MBC) by high-dose chemotherapy (HDCT) and bispecific antibodies: a pilot study. *Anticancer Research*. Juli-August 2005, Bd. 25, 4, S. 3047-3054.

**Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, Diefenbach A, Yagita H, Godfrey DI, Smyth MJ. 2004.** Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. März 2004, Bd. 199, 6, S. 879-884.

**Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. 1970.** A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*. 1970, Bd. 18, 5, S. 491-495.

**Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. 1971.** Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. Januar 1971, Bd. 46, 1, S. 113-120.

**Sutherland RM. 1988.** Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. April 1988, Bd. 240, 4849, S. 177-184.

**Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. 2006.** Colorectal Cancer: genetics of development and metastasis. *Journal of Gastroenterology*. März 2006, Bd. 41, 3, S. 185-192.

**Thomas L. 1959.** [Hrsg.] Lawrence HS. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive states*. New-York : Hoeber-Harper, 1959, S. 529–532.

**Timmins NE, Harding FJ, Smart C, Brown MA, Nielsen LK. 2005.** Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. *Cell and Tissue Research*. April 2005, Bd. 320, 1, S. 207-210.

**Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, Markus NR, Robbins PF, Kawakami Y, Rosenberg SA. 1994.** Human CD4+ T cells specifically recognize a shared

melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. September 1994, Bd. 91, 20, S. 9461-9465.

**Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS Jr. 2008.** Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immunity*. Dezember 2008, Bd. 8, S. 16.

**US Department of Health & Human Services. 2004.** US Food and Drug Administration. [Online] 16. März 2004. [Zitat vom: 13. Februar 2009.] <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/whitepaper.html>.

**van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. 1999.** Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied. *The Journal of Experimental Medicine*. August 1999, Bd. 190, 3, S. 355-366.

**van Pel A, van der Bruggen P, Coulie PG, Brichard VG, Lethé B, van den Eynde B, Uyttenhove C, Renauld JC, Boon T. 1995.** Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunological Reviews*. Juni 1995, Bd. 145, S. 229-250.

**Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, van der Voort EI, van Hall T, van den Broek L, Fleuren GJ, Kenemans P, Kast WM, Melief CJ. 1997.** Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. August 1997, Bd. 186, 5, S. 695-704.

**Walenta S, Dötsch J, Mueller-Klieser W. 1990.** ATP concentrations in multicellular tumor spheroids assessed by single photon imaging and quantitative bioluminescence. *European Journal of Cell Biology*. August 1990, Bd. 52, 2, S. 389-393.

**Walker PR, Saas P, Dietrich PY. 1998.** Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Current Opinion in Immunology*. Oktober 1998, Bd. 10, 5, S. 564-572.

**Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton WW, Jove R, Pardoll D, Yu H. 2004.** Regulation of the innate and adaptive immune responses by STAT-3 signaling in tumor cells. *Nature Medicine*. Januar 2004, Bd. 10, 1, S. 48-54.

**Weckermann D, Müller P, Wawroschek F, Krawczak G, Riethmüller G, Schlimok G. 1999.** Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors. *Journal of Clinical Oncology*. November 1999, Bd. 17, 11, S. 3438-3443.

**Weiss RA. 1999.** Viruses, cancer and AIDS. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Dezember 1999, Bd. 26, 3-4, S. 227-232.

**Winter H, Hu HM, Poehlein CH, Huntzicker E, Osterholzer JJ, Bashy J, Lashley D, Lowe B, Yamada J, Alvord G, Urba WJ, Fox BA. 2003.** Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies. *Immunology*. März 2003, Bd. 108, 3, S. 409-419.

**Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde KH, Beach D. 1995.** A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*. September 1995, Bd. 269, 5228, S. 1281-1284.

**Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B, Lindhofer H. 1999.** Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *Journal of Immunology*. August 1999, Bd. 163, 3, S. 1246-1252.

**Zeidler R, Mysliwietz J, Csánady M, Walz A, Ziegler I, Schmitt B, Wollenberg B, Lindhofer H. 2000.** 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. *British Journal of Cancer*. Juli 2000, Bd. 83, 2, S. 261-266.

**Zeidler R, Mayer A, Gires O, Schmitt B, Mack B, Lindhofer H, Wollenberg B, Walz A. 2001.** TNFalpha contributes to the antitumor activity of a bispecific, trifunctional antibody. *Anticancer Research*. September-Oktober 2001, Bd. 21, 5, S. 3499-3503.

**Zhang X, Wang W, Yu W, Xie Y, Zhang X, Zhang Y, Ma X. 2005.** Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnology Progress*. Juli/August 2005, Bd. 21, 4, S. 1289-1296.