

Wirkmechanismen der trifunktionalen Antikörper catumaxomab und ertumaxomab in humanen Tumorsphäroid-Kokulturen

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 Mainz

Franziska Hirschhäuser
geb. am 04.09.1982 in Schlema

Mainz, 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2008 bis Februar 2010 am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Müller-Klieser angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Krebserkrankung..... | 1 |
| 1.2 Tumoren und Immunsystem..... | 4 |
| 1.2.1 Tumoren sind heterozelluläre Aggregate..... | 4 |
| 1.2.2 Die Entzündungsreaktion | 5 |
| 1.2.3 Rekrutierung von Leukozyten durch Tumoren | 6 |
| 1.2.4 Der Einfluss von Makrophagen und Lymphozyten auf die Tumorprogression..... | 6 |
| 1.2.5 Die Rolle von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies | 7 |
| 1.2.6 Immunosurveillance | 8 |
| 1.3 Immunologische anti-tumorale Therapiestrategien..... | 10 |
| 1.3.1 Zytokintherapien..... | 10 |
| 1.3.2 Adoptive zelluläre Immuntherapien | 10 |
| 1.3.3 Vakzinierung | 11 |
| 1.3.4 Antikörpertherapien | 11 |
| 1.4 Multizelluläre Tumorsphäroide | 15 |
| 1.4.1 Merkmale von MCTS..... | 15 |
| 1.4.2 Anwendung von MCTS | 16 |
| 1.4.3 Kokulturen aus MCTS und Abwehrzellen | 17 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit..... | 19 |
| 2 Materialien und Methoden | 21 |
| 2.1 Zellkultivierung..... | 21 |
| 2.1.1 Zelllinien, Medien und Zusätze | 21 |
| 2.1.2 Standardtechniken in der Zellkultur | 21 |
| 2.1.2.1 Monolayerkultivierung und Passagieren | 21 |
| 2.1.2.2 Bestimmung der Zellzahl | 22 |
| 2.1.2.3 Mykoplasmentest (MykoAlert) | 22 |
| 2.1.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen | 23 |
| 2.1.2.5 Anfertigen von Zytospins | 23 |
| 2.1.3 Sphäroidkultivierung..... | 24 |
| 2.1.3.1 Sphäroidinitalisierung und –kultivierung in den Spinnerflaschen | 24 |
| 2.1.3.2 Handhabung und Silikonisierung der Spinnerflaschen..... | 24 |
| 2.1.3.3 Isolierung und Kultivierung von PBMC aus dem Buffy Coat..... | 25 |
| 2.1.3.4 Markierung der PBMC mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 | 25 |
| 2.2 Untersuchungen an Sphäroid-Kokulturen als Endpunkte der Antikörpertherapie | 26 |
| 2.2.1 Behandlung von MCTS mit PBMC, trifunktionalen AK und Immun-..... | 26 |
| suppressiva | 26 |
| 2.2.2 Analyse des Sphäroidwachstums..... | 27 |
| 2.2.3 Klonogenitätstest..... | 28 |
| 2.2.4 Zellvitalitätstests (XTT und APH)..... | 29 |
| 2.2.5 Elisa zur Zytokinbestimmung aus dem Zellkulturüberstand | 30 |
| 2.2.6 Histologische Analysen | 31 |
| 2.2.6.1 Auswertung der Sphäroidschnitte mit Photoshop und Image J..... | 34 |
| 2.2.6.2 Analyse der PKH-26 markierten PBMC | 34 |
| 2.2.7 Molekularbiologische Analysen | 35 |
| 2.2.7.1 RNA Extraktion und cDNA Synthese | 35 |
| 2.2.7.2 Semiquantitative PCR | 37 |
| 2.2.7.3 Real Time-RT-PCR mit Sybr Green..... | 38 |
| 2.3 Metabolische Analysen | 40 |
| 2.3.1 Relative Quantifizierung von Enzymen und Transportern des..... | 40 |
| Glukosestoffwechsels mittels In-cell Western | 40 |
| 2.3.2 Laktatbestimmung aus dem Kulturüberstand..... | 40 |
| 2.3.3 Messung der Sauerstoffsverbrauchs- und Azidifizierungsrate mit dem..... | 41 |
| Seahorse XF Analyzer | 41 |
| 2.4 Statistik | 41 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|--|----|
| 3 | Ergebnisse | 43 |
| 3.1 | Methodische Vorversuche..... | 43 |
| 3.1.1 | Vergleich der TAA-Expression bei FaDu- und FaDu E593-Sphäroiden | 43 |
| 3.1.2 | Optimierung der Scan-Methode zur Erfassung des Volumenwachstums..... | 43 |
| 3.1.3 | Vergleich der Scan-Methode mit dem Erfassen der Sphäroidgrößen über das Okularmikrometer | 44 |
| 3.1.4 | Abhängigkeit der Antikörperwirkung von den PBMC | 46 |
| 3.2 | Sphäroidversuche zur Untersuchung der Wirkung von trifunktionalen AK..... | 47 |
| 3.2.1 | Vergleich der Wirkung von catumaxomab und ertumaxomab auf FaDu-..... Sphäroide..... | 47 |
| 3.2.2 | Einfluss der Bindungspartner der AK auf deren Wirkung | 48 |
| 3.2.3 | Einfluss der Reihenfolge der Gabe von PBMC, Überstand und trifunktion- alen AK zur Sphäroidkultur auf die anti-tumorale Wirkung | 49 |
| 3.2.4 | Mehrfachdosierungen und Dosisescalation mit trifunktionalen AK..... | 51 |
| 3.2.4.1 | Mehrfachdosierung mit ertumaxomab bei FaDu-Kokulturen | 51 |
| 3.2.4.2 | Mehrfachdosierung mit ertumaxomab bei E593-Kokulturen..... | 51 |
| 3.2.4.3 | Dosisescalation mit ertumaxomab bei FaDu-Sphäroid-Kokulturen | 53 |
| 3.2.4.4 | Mehrfachdosierung von ertumaxomab und PBMC bei E593-Kokulturen.... | 54 |
| 3.2.5 | Analyse der T-Zellaktivierung unter Wirkung von trifunktionalen AK..... | 55 |
| 3.2.5.1 | T-Zellaktivierung bei FaDu-Kokulturen mit catumaxomab..... | 55 |
| 3.2.5.2 | T-Zellaktivierung bei E593-Kokulturen mit ertumaxomab..... | 57 |
| 3.2.6 | Sphäroidversuche mit den Kontrollantikörpern | 58 |
| 3.2.6.1 | Wirkung der parentalen AK 26/II/6 und HO-3..... | 58 |
| 3.2.6.2 | Wirkung des F(ab') ₂ Fragments von catumaxomab und BiLu | 61 |
| 3.2.6.3 | FaDu-Sphäroide kokultiviert mit PKH-26 markierten PBMC..... | 64 |
| 3.2.7 | Einfluss von Immunsuppressiva auf die Wirkung von trifunktionalen AK | 69 |
| 3.2.7.1 | FaDu-Kokulturen behandelt mit catumaxomab und Dexamethason..... | 70 |
| 3.2.7.2 | FaDu-Kokulturen unter Behandlung mit ertumaxomab und Prednisolon.... | 70 |
| 3.2.7.3 | E593-Kokulturen unter Behandlung mit ertumaxomab und Prednisolon ... | 71 |
| 3.2.8 | Einfluss von catumaxomab auf die metabolische Aktivität | 71 |
| 4 | Diskussion | 73 |
| 4.1 | Beurteilung des 3D-Modells als Testsystem für Immuntherapeutika | 73 |
| 4.1.1 | Sphäroidkultivierung..... | 73 |
| 4.1.2 | Endpunkte zur Wirkstoffbeurteilung | 74 |
| 4.2 | Bindungsspezifitäten von catumaxomab und ertumaxomab..... | 78 |
| 4.2.1 | EpCAM Bindung..... | 78 |
| 4.2.2 | Bindung an Her2/neu | 79 |
| 4.2.3 | CD3-Bindung..... | 80 |
| 4.2.4 | Bindung an die Fc-Rezeptoren..... | 80 |
| 4.3 | Wirkung von catumaxomab und ertumaxomab in der Kokultur..... | 81 |
| 4.3.1 | Wirkung auf das Überleben der Tumorzellen bzw. -sphäroide..... | 81 |
| 4.3.2 | Einfluss der PBMC auf die Wirkung der trifunktionalen AK..... | 82 |
| 4.3.3 | Bedeutung der Infiltration von T-Zellen..... | 85 |
| 4.3.4 | Der trifunktionale "mode of action" von catumaxomab und ertumaxomab | 87 |
| 4.3.5 | Kombination mit Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva | 90 |
| 4.3.6 | Metabolische Aktivierung durch catumaxomab..... | 92 |
| 5 | Zusammenfassung | 93 |
| 6 | Anhang..... | 95 |
| 6.1 | Chemikalien und Reagenzien | 95 |
| 6.1.1 | Chemikalien | 95 |
| 6.1.2 | Medien und Zusätze..... | 96 |
| 6.1.3 | Kits..... | 96 |
| 6.2 | Geräte..... | 96 |
| 6.3 | Verbrauchsmaterial..... | 97 |
| 6.4 | Software..... | 98 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 99 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--|
| A | Ampere |
| ACT | adoptive cell therapy |
| ADCC | antibody dependent cellular cytotoxicity |
| ADEPT | antibody directed enzyme prodrug therapy |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AK | Antikörper |
| APC | antigen presenting cell |
| APH | acid phosphatase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | bovine serum albumin |
| bsAb | bispecific antibody |
| CASY | cell counter and analyser system |
| CCL | CC chemokine ligand |
| CD | cluster of differentiation |
| CDC | complement dependent cytotoxicity |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| COX | Cyclooxygenase |
| CSF | colony stimulating factor |
| CTL | cytotoxic T lymphocyte |
| CXCL | CXC chemokine ligand |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid |
| Db | diabody |
| DC | dendritic cell |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| dpi | dots per inch |
| ECM | extracellular matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetic acid |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EpCAM | epithelial cell adhesion molecule |
| F(ab') ₂ | fragment antigen binding |
| Fc | fragment crystallizable |

| | |
|---------------|--|
| FCS | fetal calf serum |
| FGF | fibroblast growth factor |
| HAMA | human anti-mouse antibody |
| HARA | human anti-rat antibody |
| Hepes | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HKG | house keeping gene |
| HLA | human leukocyte antigen |
| HMGB1 | high motility group box 1 protein |
| HNSCC | head and neck squamous cell carcinoma |
| HRP | horseradish peroxidase |
| HSP | heat shock protein |
| ICAM | intracellular adhesion molecule |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL | Interleukin |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| LMP | Low molecular mass polypeptide |
| LSM | leukocyte separating medium |
| M | molar (mol/l) |
| M ϕ | Makrophage |
| MA | Medienaustausch |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MCP-1 | monocyte chemotactic protein-1 |
| MCTS | multicellular tumor spheroid |
| MDSC | myeloid-derived suppressor cells |
| MHC | major histocompatibility complex |
| MMP | matrix metalloproteinase |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MW | Mittelwert |
| NEA | non essential amino acids |
| NF κ B | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells |
| NK | natural killer (cell) |
| NKT | natural killer T (cell) |
| NSCLC | non small cell lung cancer |
| NOS | nitric oxide synthase |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------|--|
| NTP | nucleoside 5'-triphosphate |
| OD | optische Dichte |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cell |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PGE | prostaglandin E |
| pH | potentia hydrogenii |
| PNPP | p-nitrophenyl phosphate |
| PI3K | phosphoinositide 3-kinase |
| qPCR | quantitative polymerase chain reaction |
| RNA | ribonucleic acid |
| RNS | reactive nitrogen species |
| ROS | reactive oxygen species |
| RT | Raumtemperatur |
| SEREX | serological identification of antigens by recombinant expression cloning |
| TAA | tumor associated antigen |
| TAM | tumor associated macrophage |
| TAP1 | transporter associated with antigen processing 1 |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA |
| Tc | cytotoxic T (cell) |
| TERT | telomerase reverse transcriptase |
| TGF | transforming growth factor |
| Th | helper T (cell) |
| TIL | tumor-infiltrating lymphocyte |
| TLR | toll-like receptor |
| TMB | tetramethylbenzidine |
| TNF | tumor necrosis factor |
| Trail | TNF-related apoptosis inducing ligand |
| V | Volt |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| W | Watt |
| XTT | tetrazolium salt |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Die sechs Kennzeichen von Krebszellen..... | 4 |
| Abbildung 2: | Tumoren sind heterogene Aggregate..... | 5 |
| Abbildung 3: | Die drei Phasen des "Tumor-Immunoediting"..... | 8 |
| Abbildung 4: | Tumorprogression vs. Tumorabstoßung..... | 10 |
| Abbildung 5: | Postulierter Trizellkomplex..... | 14 |
| Abbildung 6: | Gradienten innerhalb eines Sphäroidschnitts, sichtbar gemacht mittels verschiedener Analysetechniken..... | 16 |
| Abbildung 7: | Methoden der Sphäroidgenerierung..... | 17 |
| Abbildung 8: | Für die Versuche verwendete Antikörper..... | 27 |
| Abbildung 9: | Quantifizierung der PKH-26 markierten PBMC mit der Neubauerkammer..... | 35 |
| Abbildung 10: | Immunhistologische Färbung von EpCAM und Her2/neu an Sphäroid- schnitten..... | 43 |
| Abbildung 11: | Die Optimierung der Scan-Methode..... | 44 |
| Abbildung 12: | Vergleich der beiden Methoden zur Sphäroidgrößenbestimmung..... | 45 |
| Abbildung 13: | Abhängigkeit der Antikörperwirkung von den PBMC..... | 46 |
| Abbildung 14: | Gegenüberstellung der Wirkung von catu- und ertumaxomab bei FaDu- Kokulturen..... | 48 |
| Abbildung 15: | Einfluss der Bindungspartner der AK auf deren Wirkung..... | 49 |
| Abbildung 16: | Einfluss der Abfolge der Gabe von PBMC, Überstand und trifunktionalen AK zur Sphäroidkultur auf die anti-tumorale Wirkung an Tag 7..... | 50 |
| Abbildung 17: | Immunhistologische Färbung von CD2, CD45, proliferativen (Ki67 ⁺) und apoptotischen (Fragel ⁺) Zellen der E593-Sphäroide kokultiviert mit PBMC unter Einfachgabe von ertumaxomab an Tag 6..... | 52 |
| Abbildung 18: | Quantitative Analyse (% an Gesamtzellzahl) der immunhistologischen Färbung der E593-Sphäroide kokultiviert mit PBMC unter Einfachgabe von ertumaxomab an Tag 6..... | 53 |
| Abbildung 19: | Effekte einer Mehrfachdosierung mit ertumaxomab und PBMC auf E593- Kokulturen..... | 54 |
| Abbildung 20: | T-Zellaktivierung bei FaDu-Kokulturen mit catumaxomab..... | 56 |
| Abbildung 21: | T- Zellaktivierung bei E593-Kokulturen mit ertumaxomab..... | 57 |
| Abbildung 22: | Volumenwachstumskurve von FaDu-Kokulturen inkubiert mit catumaxomab, 26/II/6 und HO-3..... | 58 |
| Abbildung 23: | Zytokinsekretion von FaDu-Kokulturen und PBMC-Monokulturen nach Inkubation mit den parentalen AK 26/II/6 und HO-3 im Vergleich zu catumaxomab an Tag 1, 3, 5 und 7..... | 59 |
| Abbildung 24: | Immunhistologische Färbung von CD2, CD8 und CD45 an Sphäroiden nach Behandlung mit catumaxomab oder dessen parentalen AK (Tag 5)..... | 60 |
| Abbildung 25: | Immunhistologische Färbung von CD14 an einem Kryoschnitt eines FaDu- Sphäroids, der mit 5,0 ng/ml HO-3 behandelt wurde (Tag 5)..... | 61 |
| Abbildung 26: | Volumenwachstum der Sphäroide bei Inkubation von FaDu-Kokulturen mit catumaxomab, BiLu und dem F(ab') ₂ Fragment..... | 61 |
| Abbildung 27: | Das Zytokinprofil in den Kokulturen bei Gabe von BiLu, catumaxomab und dessen F(ab') ₂ Fragments..... | 62 |
| Abbildung 28: | Immunhistologischer Nachweis der Proliferation (Ki67) und der infiltrierten Abwehrzellen an FaDu-Sphäroidschnitten von Tag 5 behandelt mit catumaxomab, BiLu und dem F(ab') ₂ Fragment..... | 63 |
| Abbildung 29: | CD14 Färbung an FaDu-Sphäroiden, die mit BiLu behandelt wurden..... | 63 |
| Abbildung 30: | Quantitative Auswertung (% an Gesamtzellzahl) der immunhistologischen Färbung von Tag 5..... | 64 |
| Abbildung 31: | Anzahl der markierten PBMC im Kokulturüberstand..... | 64 |
| Abbildung 32: | Vitalitätstests an intakten Sphäroiden mittels APH (A) und XTT (B)..... | 65 |
| Abbildung 33: | Volumenwachstumskurve der Sphäroide, die mit PKH-26 markierten PBMC, catumaxomab, BiLu und um 35 % verringerte Konzentrationen F(ab') ₂ behandelt wurden..... | 65 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 34: Anzahl der PKH-26 markierten PBMC im Kokulturüberstand behandelt mit..... catumaxomab, BiLu und F(ab') ₂ | 66 |
| Abbildung 35: Fluoreszenzaufnahmen von Kryoschnitten aus FaDu-Sphäroidkulturen, die mit PKH-26 markierten PBMC, catumaxomab, BiLu und dem F(ab') ₂ Fragment behandelt wurden..... | 67 |
| Abbildung 36: Immunhistologische Färbung von CD4, CD8, CD14, CD45 in FaDu- Kokulturen behandelt mit 10,0 ng/ml catumaxomab, 10,0 ng/ml BiLu und..... 6,5 ng/ml F(ab') ₂ | 68 |
| Abbildung 37: Quantitative Analyse der histologischen Färbung | 68 |
| Abbildung 38: Relative mRNA Expression von CD2, CD4, CD8, CD14 und CD45 in FaDu-.... Kokulturen behandelt mit catumaxomab, BiLu und F(ab') ₂ bezogen auf die..... Kontrolle..... | 69 |
| Abbildung 39: Basale Sauerstoffverbrauchs- (OCR) und Azidifizierungsrate (ECAR) unter..... Inkubation mit catumaxomab und anderen Vergleichssubstanzen normiert auf die Probe mit Sphäroiden in Kokultur mit PBMC..... | 72 |
| Abbildung 40: Versuchsaufbau eines Experiments zur Untersuchen der Wirkung von..... therapeutischen AK auf Sphäroid-Kokulturen. | 77 |
| Abbildung 41: Expression der Fcγ-Rezeptoren. | 80 |
| Abbildung 42: Modell der PBMC und AK-Bindung bei verschiedenen Konzentrations-..... bereichen. | 84 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabelle 1: | Tumorsphäroide in Kokultur mit Abwehrzellen in Suspension und deren Anwendung in der Erforschung therapeutischer Strategien..... | 18 |
| Tabelle 2: | Lösungen für die Zellvitalitätstests..... | 30 |
| Tabelle 3: | Elisa Kits für die Zytokinmessung..... | 30 |
| Tabelle 4: | Lösungen für die Bestimmung von Zytokinen mittels Elisa..... | 31 |
| Tabelle 5: | Für die histologischen Färbungen verwendete Antikörper..... | 33 |
| Tabelle 6: | TBS-Puffer..... | 33 |
| Tabelle 7: | Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Analysen..... | 37 |
| Tabelle 8: | IL-2 Primersequenzen..... | 38 |
| Tabelle 9: | TBE-Puffer..... | 38 |
| Tabelle 10: | Verwendete Primer für die qPCR (QuantiTect Primer Assays)..... | 39 |
| Tabelle 11: | TE-Puffer..... | 40 |
| Tabelle 12: | Mastermix für die qPCR mit SYBR Green..... | 40 |
| Tabelle 13: | Programmablauf der qPCR mit abi Lightcycler..... | 40 |
| Tabelle 14: | Volumenreduktion (% an Kontrolle) bei Mehrfachdosierung von ertumaxomab bei FaDu-Sphäroid-Kokulturen..... | 51 |
| Tabelle 15: | Volumenreduktion (% an Kontrolle) bei Mehrfachdosierung von ertumaxomab bei E593-Sphäroid-Kokulturen..... | 51 |
| Tabelle 16: | Volumenreduktion (% an Kontrolle) an Tag 6 bei FaDu-Sphäroiden, hervorgerufen durch Dreifachgabe oder Dosisverdopplung aller 2 Tage..... | 53 |
| Tabelle 17: | Wirkung der Kombination von Dexamethason mit catumaxomab auf FaDu-Kokulturen..... | 70 |
| Tabelle 18: | Wirkung der Kombination von Prednisolon mit ertumaxomab auf FaDu-Kokulturen..... | 70 |
| Tabelle 19: | Wirkung der Kombination von Prednisolon mit ertumaxomab auf FaDu-Kokulturen..... | 71 |
| Tabelle 20: | Zusammensetzung der buffy coats..... | 82 |
| Tabelle 21: | Zusammenfassung der Wirkung der verschiedenen AK..... | 90 |

1. Einleitung

1.1 Krebserkrankung

Unter dem Begriff der Krebserkrankung werden verschiedene Krankheitsbilder, bei denen maligne Neoplasien vorliegen, zusammengefasst. Im Jahr 2008 waren die Krebserkrankungen in Deutschland, nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, mit 28,8 % bei den Männern und 22,2 % bei Frauen die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2010). Die Zahl der Neuerkrankungen betrug im Jahr 2006 etwa 430000. Im gleichen Jahr verstarben rund 211000 Patienten an Krebs (Robert Koch-Institut, 2010). Das bedeutet, der Erfolg der Krebsbehandlung ist nach wie vor unbefriedigend.

Zu den klassischen Säulen der Krebstherapie zählen die Operation, die Bestrahlung sowie die medikamentöse Therapie (Chemo- und Hormontherapie). Darüberhinaus kommen neue Behandlungsformen zum Einsatz, die auf molekularbiologischen und immunologischen Ansätzen basieren. Auf diese Weise sollen Tumoren (lat. Geschwulst, Schwellung) gezielter und individueller angegriffen und zerstört werden.

Der Ausgangspunkt jeder Krebserkrankung sind entartete körpereigene Zellen, die sich anhand verschiedener Merkmale von gesunden Körperzellen unterscheiden.

Nach Hanahan und Weinberg sind Tumorzellen durch folgende sechs Merkmale gekennzeichnet (Hanahan und Weinberg 2001, Abbildung 1):

1. Unabhängigkeit von Wachstumssignalen

Normale Körperzellen benötigen mitogene Wachstumssignale, um vom ruhendem in den aktiven, proliferierenden Status über zu gehen. Diese Signale werden über Transmembranrezeptoren an die Zelle übermittelt. Zu diesen Signalmolekülen gehören Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixkomponenten und Zell-Zell-Adhäsions-/ Interaktionsmoleküle. Gesteuert über Onkogene, verschaffen sie den Tumorzellen Autonomie durch veränderte extrazelluläre Wachstumssignale, transzelluläre Übersetzer dieser Signal oder intrazellulärer Schleifen, über die diese Signale wirken. Sie sind darüber hinaus zur autokrinen Stimulation befähigt. Dies wird als positiver feedback loop (Fedi et al. 1997) bezeichnet. Eine weitere Strategie ist die Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Oberfläche, wie zum Beispiel Her2/neu (EGFR2 – epidermal growth factor receptor 2) bei Brusttumorzellen.

2. Unempfindlichkeit gegenüber anti-proliferativen Faktoren

Wachstumshemmende Signale sind notwendig um die Gewebshomöostase aufrecht zu erhalten. Dazu gehören lösliche Wachstumsinhibitoren und in der extrazellulären Matrix oder der Oberfläche von Zellen immobilisierte Inhibitoren. Sie wirken entweder durch

Verschiebung der Zellen aus der proliferativen Phase in die G_0 -Phase oder indem sie in einen Status permanenter Proliferationslosigkeit überführt werden, der oft mit einer Ausdifferenzierung der Zelle einhergeht. Mechanistisch ist dies gekoppelt an den Übergang der G_1 - in die S-Phase des Zellzyklus. Dieser ist verknüpft mit dem Retinoblastoma Protein (pRb) und seinen Derivaten p107 und p130. Eine Hypophosphorylierung von pRb blockt die Proliferation (Weinberg 1995). Eine Störung der pRb Signalkette führt zur Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors und entkoppelt die Zellproliferation. Das Signalmolekül TGF- β (transforming growth factor β) verhindert die Phosphorylierung von pRb, was dieses inaktiviert. In Tumorzellen können TGF- β Rezeptoren vermindert sein oder mutierte disfunktionale Rezeptoren exprimiert sein. TGF- β gilt als eines der potentesten Immunsuppressiva in dem es die Menge des präsentierten Antigens durch dendritische Zellen (DC) reguliert, die Aktivität von IFN- γ inhibiert, die Proliferation von T-Zellen reduziert, die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen supprimiert und die Proliferation von regulatorischen T-Zellen (Tregs) stimuliert (Gorelik und Flavell 2002).

3. Umgehen der Apoptose

Für das Gleichgewicht einer Zellpopulation ist nicht nur die Proliferation sondern auch der programmierte Zelltod (Apoptose) von entscheidender Bedeutung. Bei der Apoptose läuft innerhalb von 30-120 min eine Serie von aufeinanderfolgenden Schritten ab: Die Zellmembran wird zerstört, die Chromosomen werden degradiert, der Zellkern wird fragmentiert und schließlich werden die apoptotischen Bläschen innerhalb von etwa 24 Stunden von benachbarten Zellen aufgenommen (Wyllie et al. 1980). Die Apoptosemaschinerie ist dabei abhängig von Sensoren, die intra- und extrazelluläre Faktoren überprüfen, und von Effektoren, die als Oberflächenrezeptoren Überlebens- und Todesfaktoren binden. Solche Liganden- und Rezeptorenpaare sind IGF-1/IGF-2 und ihr Rezeptor IF-1R oder IL-3 und IL-3R für Überlebenssignale (Lotem, Sachs 1996; Butt et al. 1999) sowie FAS-Ligand und Fas-Rezeptor, TNF- α und der dazugehörige TNF-R1 (Ashkenazi und Dixit 1999), bzw. CD95 und CD95-Ligand für Todessignale (extrinsischer Weg). Eine zweite Möglichkeit, die Apoptose zu induzieren, ist der intrinsische Weg. Dabei wird nach pro-apoptischen Signalen Cytochrom C von den Mitochondrien freigesetzt. Des Weiteren wird dieser Prozess durch Mitglieder der Bcl-2 Familie reguliert, die wiederum von p53 kontrolliert werden. Das freigesetzte Cytochrom C bindet dann an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins. Damit kann Apaf-1 die Caspase 9 binden und somit die autolytische Aktivierung induzieren. In Tumorzellen entsteht Resistenz gegenüber der Apoptose durch verschiedene Mechanismen. Hauptakteur dabei ist p53, durch dessen Mutation oder Verlust unter anderem das anti-apoptische Bcl-2 überexprimiert wird. Eine andere Möglichkeit besteht in der gesteigerten

Expression von Überlebensfaktoren, wie IGF-1/2 oder IL-3. Darüber hinaus können Tumorzellen mutierte Fas-Rezeptoren aufweisen, die nach Fas-Ligand-Bindung kein Todessignal weiterleiten.

4. Unbegrenztes Teilungspotential

Alle Typen von Säugerzellen tragen in sich ein autonomes Programm, das ihre Fähigkeit, sich zu multiplizieren limitiert (Hayflick 1997). Ein entscheidender Faktor dafür sind die Telomere. Sie bestehen aus tausenden Wiederholungen eines 6 bp kurzen Sequenzabschnitts am 3' Ende der chromosomalen DNA. Bei jeder Replikation gehen 50-100 bp telomerer DNA verloren, bis dieses kontinuierliche Schrumpfen der chromosomalen Enden zu chromosomalen end-to-end Fusionen und damit zum Tod der Zelle führt. Maligne Zellen umgehen diesen Ablauf, indem sie Telomeraseenzyme überexprimieren, die die Hexamernukleotide an die Enden der telomeren DNA wieder hinzufügen (Bryan, Cech 1999). Die Überexpression wird durch das Tumorantigen und zugleich katalytische Untereinheit der Telomerase TERT (telomerase reverse transcriptase) hervorgerufen. Des Weiteren können eine Mutation oder der Verlust von p53 und eine Cyclin B1 Überexpression zur Tumorzellimmortalisierung führen.

5. Gesteigerte Angiogenese

Um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten, muss sich in einem Umkreis von 100 µm zur Zelle ein kapillares, funktionell intaktes Blutgefäß befinden. Das System der Vaskularisierung ist streng kontrolliert, ebenso wie die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese). Angiogenese-initiiierende Faktoren sind unter anderen VEGF (vascular endothelial growth factor) oder die sauren bzw. basischen FGF-1/2 (fibroblast growth factors). Tumorzellen überexprimieren diese Faktoren, bzw. regulieren inhibierende Faktoren wie Thrombospondin oder Interferon-β herunter (Hanahan und Folkman 1996). Darüber hinaus kann die Steigerung der Angiogenese mittels Überexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der daraus resultierenden Überproduktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) erfolgen. Insgesamt wird der Vorgang der Angiogenesesteigerung häufig als „angiogenic switch“ aus dem Status angiogener Ruhe bezeichnet.

6. Gewebeinvasion und Metastasierung:

Früher oder später während der Tumorigenese lösen sich Zellen aus dem Gewebsverband, gelangen über die Blutbahn an entfernte Orte und entwickeln Metastasen. Bei diesem Prozess spielen Zelladhäsionsmoleküle (cellular adhesion molecules- CAMs) und Integrine,

die die Verbindung der Zellen mit der extrazellulären Matrix herstellen, eine wichtige Rolle. Ein Zell-Zellinteraktionsmolekül epithelialer Zellen ist das E-Cadherin, das in Verbindung mit β -Catenin wachstumshemmende Signale hervorruft. In Karzinomen ist diese supprimierende Wirkung von E-Cadherin aufgehoben. In die Gewebsinfiltration sind proteolytische Enzyme wie Cathepsin involviert, was durch gesteigertes Vorkommen von HSP70 (heat-shock protein 70) in der Lysosom- und Plasmamembran verstärkt gebildet wird. Die lokale Invasion wird außerdem durch die MMPs (matrix metalloproteinases) vermittelt, die von Tumor- und Stromazellen sezerniert werden. MMPs sind auch an der Immunosurveillance beteiligt, z.B. durch MMP-vermittelte Spaltung von CD25, Aktivierung von TGF- β und Shedding von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) und ICAM-2 von Tumorzellen.

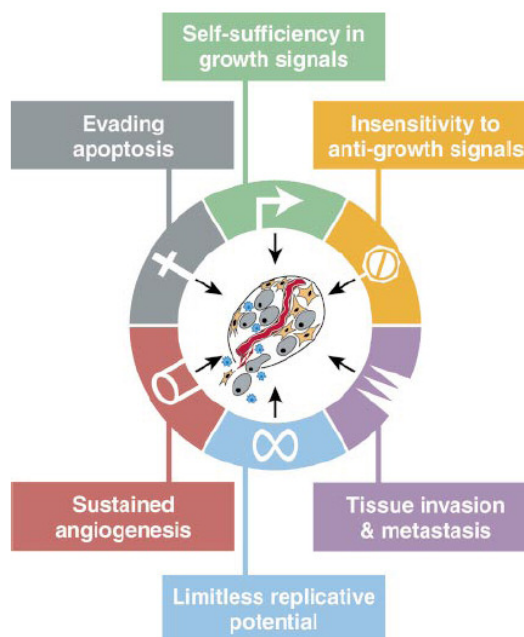


Abbildung 1: Die sechs Kennzeichen von Krebszellen (Hanahan und Weinberg 2000). Eine Tumorzelle ist gekennzeichnet durch Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber anti-proliferativen Faktoren, Umgehen der Apoptose, unbegrenztes Teilungspotential, gesteigerte Angiogenese sowie Gewebeeinvasion und Metastasierung.

1.2 Tumoren und Immunsystem

1.2.1 Tumoren sind heterozelluläre Aggregate

Lange Zeit galten Tumoren als eine Neoplasie aus transformierten Zellen mit überproliferativen, unsterblichen und invasiven Eigenschaften. Aber es häuften sich später die Hinweise darauf, dass die Erkrankung aus einem komplexen Wechselspiel aus Tumorzellen und der Tumorzellumgebung (microenvironment) mit den sich darin befindenden Stromazellen hervorgeht (Abbildung 2). Der erste, der diesen Zusammenhang beschrieb, war 1863 Rudolf Virchow, der das Vorhandensein von Leukozyten in Tumoren beobachtete (Balkwill und Mantovani 2001). Paul Ehrlich propagiert um die Jahrhundertwende, dass das Immunsystem die Entstehung von Krebs kontrolliert und in den meisten Fällen verhindert

(Ehrlich 1909). Er formulierte auch erste therapeutische Ideen. Er glaubte Antikörper als „magic bullets“ könnten Toxine in Tumoren transportieren und sie vernichten. Seine Idee wurde später von Burnet und Thomas aufgegriffen und erweitert. Sie postulierten, dass höher entwickelte Organismen Mechanismen ähnlich derer bei Abstoßung transplanteder Organe besitzen müssen, die sie vor Neoplasien schützen (Burnet 1957; Thomas 1959). Viele Tumoren sind stark von Immunzellen infiltriert, jedoch variieren Umfang und zelluläre Zusammensetzung sehr stark (Le Bitoux und Stamenkovic 2008).

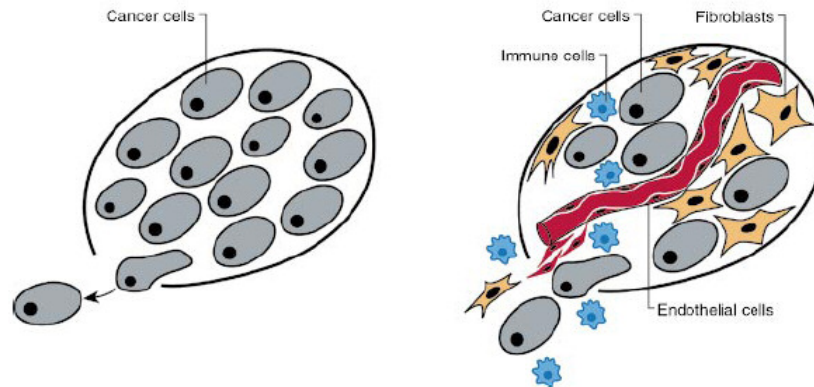


Abbildung 2: Tumoren sind heterogene Aggregate (Hanahan und Weinberg 2000). Entgegen früherer Vorstellungen, dass Tumoren eine reine Ansammlung von Tumorzellen sind (links), hat sich bewahrheitet, dass Tumoren neben Tumorzellen auch von Immunzellen, Endothelzellen und Fibroblasten durchsetzt sind (rechts).

Bereits vor mehr als 20 Jahren erkannte Dvorak den Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und der Entzündung. Er prägte die Phrase von Tumoren als „Wunde, die niemals heilt“ (Dvorak 1986).

1.2.2 Die Entzündungsreaktion

Die Reaktion des Immunsystems auf neoplastische Zellen ähnelt der einer Entzündungsreaktion. Eine Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch ein koordiniertes Anlocken von löslichen Mediatoren und Zellen, die den Auslöser der Entzündung eliminieren und das geschädigte Gewebe reparieren sollen. Mastzellen und gewebsansässige Makrophagen sind die Effektoren der primären Antwort. Dies wird durch die Vernetzung der Fc-Rezeptoren und durch C3a und C5a Fragmente des Komplementsystems vermittelt. Mastzellen setzen Histamine frei, die zu einer arteriolen Vasodilatation, einer venolen Vasokonstriktion und einer gesteigerten Permeabilität führen. Makrophagen können über Zytokinfreisetzung (IL-1, TNF- α , IL-6) Endothelzellen aktivieren, was in einer Expression von E- und P-Selektin und ICAM-1 auf deren Oberfläche mündet. Die Liganden der Selektine werden auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert (Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten) (Hidalgo et al. 2007). Da diese Wechselwirkung niederaffin ist, führt sie zu dem sogenannten „Rollen“ der Leukozyten entlang der endothelialen Oberfläche. Durch die hochaffine Bindung von LFA-1 der Neutrophilen an ICAM-1 der Endothelzellen kommt es schließlich zu einem Arrest der

Abwehrzellen am Endothel. Auf diesen folgt die Extravasation und Migration zur Entzündungsstelle. An die Primärantwort der Neutrophilen schließt sich die Einwanderung diverser Lymphozyten-Subtypen an. Darunter befinden sich Monozyten, die im Gewebe final zu Makrophagen ausdifferenzieren. Die Einwanderung der Lymphozyten wird begleitet durch die Ausschüttung einer Reihe von Zyto- und Chemokinen, wie IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ , CCL-2, CCL-20, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-5 und vielen weiteren. Darüber hinaus werden Wachstumsfaktoren und Lipidmediatoren, wie VEGF, PDGF (platelet derived growth factor) oder TGF- β ausgeschüttet, die die Angiogenese stimulieren und Fibroblasten dazu aktivieren, ECM-(extracellular matrix) Komponenten sowie proteolytische Enzyme (Cathepsine und MMPs) zu synthetisieren und zu sezernieren. Dies ist der Zeitpunkt, an dem sich das Geschehen von der Entzündungsabwehr hin zur Gewebsreparatur verschiebt. Das Granulationsgewebe wird durch ein provisorisches Gewebe ersetzt, das hauptsächlich aus Kollagen III und schließlich auch aus finalem Kollagen I besteht.

1.2.3 Rekrutierung von Leukozyten durch Tumoren

Die Immunantwort auf ein Tumorwachstum wird vorrangig durch zwei Mechanismen induziert.

Der erste Mechanismus wird durch einen quantitativ signifikanten Zelltod mittels Apoptose oder Nekrose initiiert. Die Tumorzellen setzen dabei verschiedene Entzündungsmediatoren frei. Ein aktuell viel diskutiertes Protein ist HMGB1 (high mobility group box 1). Es wird in Zusammenhang mit immunogener Apoptose gebracht (Apetoh et al. 2007) und gilt als potenter Stimulator von Makrophagen (Chen et al. 2007).

Der zweite Mechanismus beruht auf der Sekretion von Zyto- und Chemokinen aus aktivierten Immunzellen, die ruhende Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen aktivieren und Mono- sowie Leukozyten rekrutieren. Ein Schlüsselmolekül dabei ist NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells), das die Rolle eines endogenen Tumorpromotors einnimmt (Maeda und Omata 2008). NF- κ B ist Pathogen- oder Gewebsverletzungssensoren nachgeschaltet, wie dem Toll-like-Rezeptor (TLR)-MyD88, dem IL-1-Rezeptor und dem TNF- α -Rezeptor mit entsprechenden Signalwegen (Naugler und Karin 2008). In gesunden wie entarteten Zellen bewirkt NF- κ B die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, Adhäsionsrezeptoren, angiogenetischen Faktoren, der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und von Enzymen wie COX-2, die in die Synthese von Arachidonsäure Metaboliten involviert sind. NF- κ B gilt wegen seiner Fähigkeit, die Expression von Bcl-2 zu induzieren auch als Überlebensfaktor.

1.2.4 Der Einfluss von Makrophagen und Lymphozyten auf die Tumorprogression

Den Hauptanteil der den Tumor-infiltrierenden Leukozyten (TIL) stellen Makrophagen und T-Zellen. Rekrutierung von Monozyten in Tumoren führt zur Ausdifferenzierung zu

sogenannten TAMs (tumor associated macrophages). Das von den Tumorzellen ausgeschüttete Chemokin CCL-2 oder auch MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) ist, neben anderen Molekülen, wie VEGF, PDGF, TGF- β und M-CSF (macrophage colony stimulating factor), das Hauptchemoattraktant für TAMs.

Die Zytokine sind darüber hinaus in der Lage Makrophagen hinsichtlich des M1 oder M2 Phänotyps (Mills et al. 2000) zu polarisieren. Der M1-Typ wird durch IFN- γ induziert, fungiert als antigenpräsentierende Zellen für CD8⁺ T-Zellen und ruft eine Th1-Immunantwort hervor, während der M2-Typ durch IL-4, IL-10, IL-13 und/oder TGF- β aktiviert wird und eine Th2-Antwort bewirkt (Mantovani et al. 2004; Allavena et al. 2008). Der Phänotyp von TAM entspricht dem von M2-Makrophagen mit tumorbegünstigenden Eigenschaften, wie Suppression der Th1-Antwort, Produktion von Wachstums-, Überlebens- und Angiogenesefaktoren.

Bei den T-Lymphozyten lässt sich ebenso eine Einteilung bezüglich der Begünstigung von Tumorprogression bzw. -regression vornehmen. So sind CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen oder CTL: cytotoxic T lymphocytes) in der Lage Tumorzellen direkt oder über eine Antikörper-vermittelte Reaktion zu töten. CD4⁺ Th1-Zellen, aktiviert durch IL-12 und IFN- γ , unterstützen CD8⁺ T-Zellen bei der Tumorzellyse, während Tregs die zytolytische Aktivität der Tc-Zellen aufheben können (Mantovani et al. 2008). CD4⁺ Th2-Zellen verschieben das Gleichgewicht in Richtung humoraler Immunität und CD4⁺ Th17-Zellen vermindern die Infiltration CD8⁺ Zellen (Langowski et al. 2006).

1.2.5 Die Rolle von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Bei physiologischen Prozessen, wie aerobem Metabolismus und Entzündungsantworten, wird ROS (reaktive Sauerstoffspezies) im Körper gebildet. ROS spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Prozessen der Translation bis zur Proliferation. Unter einer Entzündungsreaktion können Zellen wie Neutrophile große Mengen davon produzieren und effektiv unter anderem Mikroorganismen auf diese Weise abtöten. Sie werden aber auch in großem Umfang von anderen Immunzellen in der Tumorumgebung freigesetzt und können somit die Karzinogenese verstärken. Denn ROS und RNS (reaktive Stickstoffspezies) führen zu DNA Schäden, die Fehler bei der Replikation hervorrufen und damit eine genomische Instabilität bewirken, die die Tumorinitiation begünstigt. ROS kann weiterhin DNA Reparaturenzyme inaktivieren und induziert die Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die das Tumorwachstum fördern (Jaiswal et al. 2000; Marnett 2000). Zusätzlich ist RNS in der Lage die Zugänglichkeit der DNA für Promotoren durch gesteigerte DNA-Methylierung oder Histondeacetylierung zu modulieren (Kröncke 2003). Durch NF- κ B werden Signalwege reguliert, die von Hypoxie und/oder Reoxygenierung gesteuert werden (Lluis et al. 2007).

1.2.6 Immunosurveillance

Als siebtes Kennzeichen maligner Entartung wurde 2004 von Schreiber und Kollegen das Umgehen der „Immunosurveillance“ (Tumorüberwachung) propagiert (Dunn et al. 2004). Dieser Prozess nennt sich auch Tumoreditierung. Dabei entziehen sich die Tumorzellen durch Mutation und anschließender Immunselektion der Erkennung durch die Abwehrzellen. Die Tumoreditierung gliedert sich in drei Phasen (Abbildung 3):

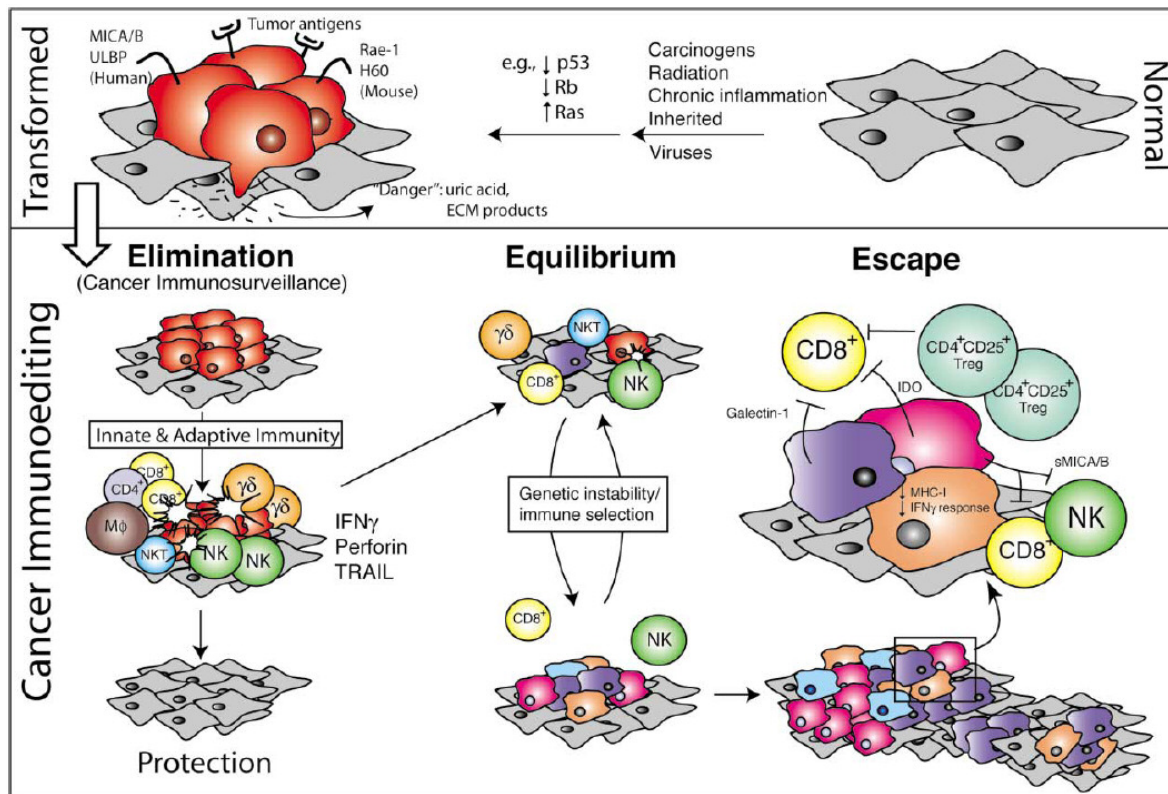


Abbildung 3: Die drei Phasen des "Tumor-Immunoediting" (Dunn et al. 2004). Zunächst gelingt dem Immunsystem die Kontrolle über den Tumor (Eliminierung). Durch genetische Instabilität verändern sich die Tumorzellen so, dass sich einige der Kontrolle des Immunsystems entziehen und sich Proliferation und Lyse der Tumorzellen die Waage halten (Äquilibrium). Schließlich jedoch entwickelt der Tumor eine immunologische Resistenz und entzieht sich der Erkennung (Escape).

1. Eliminierung (elimination)

In der ersten Phase, die auch als Tumorüberwachung (surveillance) bezeichnet wird, werden Zytokine wie IFN- γ oder andere Moleküle, wie Perforin und Trail (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ausgeschüttet. Diese führen dazu, dass die Abwehrzellen die Tumorzellen erkennen und beseitigen. An diesem Prozess sind sowohl angeborene als auch erworbene Anteile des Immunsystems beteiligt.

2. Gleichgewicht (equilibrium)

Die zweite Phase, die Editierung, folgt noch immer vor der klinischen Erstdiagnose der Erkrankung. Während dieser Phase halten sich die Vernichtung und die Proliferation der Tumorzellen die Waage. Doch mehr und mehr Zellen können durch ihre genetische

Instabilität (Cahill et al. 1999), die Veränderungen der Nukleotid-Exzisionsreparatur sowie der Mikrosatellit DNA und chromosomale Instabilität beinhaltet (Lengauer et al. 1998), immunresistente Varianten hervorbringen. Dabei können Tumorzellen mehrere tausend Mutationen in sich tragen (Loeb et al. 2003).

3. Immunologische Resistenz (immune escape)

Wenn sich aufgrund der genetischen Veränderung die Tumorzellen dem Immunsystem mehrheitlich entziehen, ist dies der Beginn der dritten Phase. Dabei gibt es viele verschiedene Möglichkeiten, wie die Tumor- den Abwehrzellen entgehen:

Bei vielen verschiedenen Tumorentitäten sind die HLA-I Proteine herunterreguliert (Algarra et al. 2000; Marincola et al. 2000), somit werden weniger TAA (Tumor-assoziierte Antigene) präsentiert und entsprechend weniger Tumorzellen von den Abwehrzellen erkannt. Andere in diesen Signalweg involvierte Moleküle sind TAP1 (transporter associated with antigen processing) und die Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 und LMP7 (low molecular mass polypeptide), die in einigen Tumorzellen defizient sind (Seliger et al. 2000).

Die Immunzellen können auch durch Überexpression immunsupprimierender Zytokine wie TGF- β oder IL-10 gehemmt werden (Khong und Restifo 2002). Eine ähnliche Wirkung hat die Ausprägung abnormaler Funktionen von Komponenten des IFN- γ Signalweges (Kaplan et al. 1998). Insbesondere die T-Zellantwort kann durch Repressoren wie Galectin-1 (Rubinstein et al. 2004) und Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) supprimiert sein (Uyttenhove et al. 2003; Munn, Mellor 2007). IDO ist ein Enzym, das in den Tryptophankatabolismus involviert ist. Tryptophan spielt eine wichtige Rolle als essentielle Aminosäure für die T-Zell-Proliferation und -Differenzierung. Die regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) stellen einen besonderen T-Zell-Subtyp dar. Primär sind sie für die Vermeidung von Autoimmunerkrankungen durch Regulation der Selbsttoleranz zuständig, können aber gleichzeitig die Immunantwort gegenüber Tumorzellen unterdrücken. Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) führen zur Abstoßung, wenn sie eine Variante (V α 14J α 18V β) des T-Zellrezeptors (TCR) exprimieren (Typ I), NKT Typ II-Zellen ohne die invariante Kette fördern das Tumorstadium (Terabe et al. 2005), ebenso wie IL-13 produzierende NKT-Zellen (Terabe et al. 2000). MDSC (myeloid-derived suppressor cells, CD34⁺CD33⁺CD13⁺CD11b⁺CD15⁻) supprimieren sowohl angeborene als auch adaptive anti-tumorale Immunität durch Blockade von CD4, CD8, NK- und NKT-Zellen, ebenso wie die DC Reifung (Serafini et al. 2006). B-Zellen können eine chronische Entzündung verstärken und locken damit Zellen an, die die *de novo* Karzinogenese fördern (de Visser et al. 2005). Abbildung 4 fasst noch einmal anschaulich zusammen welche Zelltypen in der Tumorumgebung zu einer Tumorprogression bzw. -abstoßung führen können.

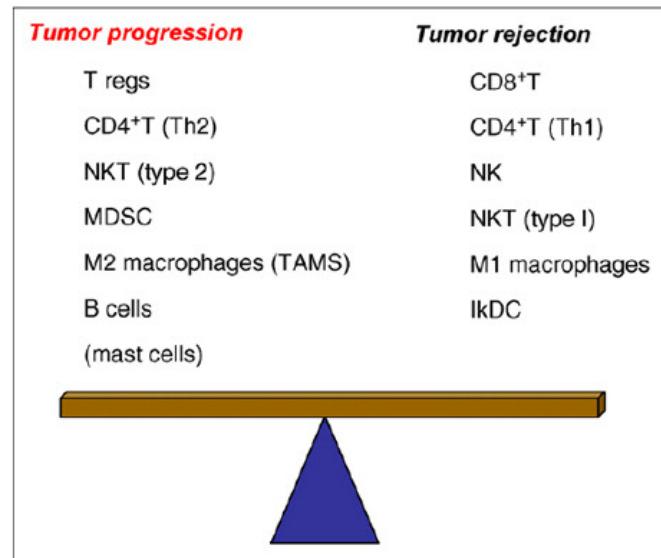


Abbildung 4: Tumorprogression vs. Tumorabstoßung (Ostrand-Rosenberg 2008). Förderlich für die Abwehr von Tumoren sind CD8 positive Zellen, CD4 positive Zellen des Th1-Typs, NK- und NKT-(Typ 1) Zellen, M1-Makrophagen und ikDC (interferon-producing killer dendritic cell).

1.3 Immunologische anti-tumorale Therapiestrategien

Immunologische Therapien setzen bei Mechanismen an, die der Tumor nutzt, um sich dem Immunsystem zu entziehen, oder die er benötigt, um weiter zu proliferieren. Das heißt, es werden therapeutische Methoden angewandt, um die Tumorzellen für das Immunsystem wieder sichtbar zu machen, inaktivierte Immunzellen zu reaktivieren oder den Tumor von der Nährstoffzufuhr abzuschneiden. Eine weitere Option besteht darin, die Mechanismen der immunologischen Abwehr auszunutzen, um konventionelle Therapien wie Chemo- oder Radiotherapie effektiver einzusetzen.

1.3.1 Zytokintherapien

IFN α -2b war das erste Zytokin, das bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom anti-tumorale Aktivität zeigte. Es wurde 1995 als erste Immuntherapie für die adjuvante Behandlung von Stadium IIB/III Melanomen zugelassen (Kirkwood et al. 2001). IL-2 war das zweite exogen applizierte Zytokin, das bei der Behandlung von Melanomen Wirkung zeigte (Atkins et al. 1999). Weitere Zytokine mit anti-tumoraler Wirkung, wie IL-7 (Rosenberg et al.), IL-12 (Colombo und Trinchieri 2002), IL-15 (Klebanoff et al. 2004) und IL-21 (Perez et al. 2006) werden präklinisch oder bereits klinisch getestet.

1.3.2 Adoptive zelluläre Immuntherapien

Ende der 80er Jahre wurde vom Erfolg adoptiven Transfers autologer tumorspezifischer T-Zellen berichtet. Dabei werden tumorinfiltrierende Lymphozyten aus Tumorbiopsien *ex vivo* expandiert und anschließend zusammen mit einem hochdosierten Bolus IL-2 adoptiv zurück in den Patienten transferiert (Rosenberg et al. 1988). Adoptive zelluläre Immuntherapie (ACT) kann sowohl T-, NK- und NKT-Zelltransfer umfassen. Jedoch erlitten die meisten

Patienten nach einer Tumorregression oder einem kompletten Ansprechen auf die Therapie (complete response) einen Rückfall.

1.3.3 Vakzinierung

Tumorimpfstoffe beinhalten einzelne Zielzellen-spezifische Antigene oder auch eine Mischung verschiedener Antigene. Die therapeutische Vakzinierung beinhaltet den Einsatz von TAA-kodierenden, rekombinanten, viralen Vektoren (Pol und Michel 2006), rekombinanten Proteinen mit entsprechenden Adjuvanzen, Antigen-beladene DC (Gilboa 2007), TAA-kodierende DNA und synthetische Peptide.

Außer bei Melanomen, wo bei einem Teil der Patienten eine klinische Antwort zu beobachten war, sind die Therapieerfolge in anderen Indikationen eher enttäuschend (Bijker et al. 2007).

1.3.4 Antikörpertherapien

Die Entwicklung der Hybridoma Technologie durch Köhler und Milstein ebnete den Weg für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern (Köhler und Milstein 1975). Zunächst war die Therapie durch die kurze Halbwertszeit der Moleküle, sowie der Immunogenität der Mausproteine und damit verbunden der Produktion neutralisierender anti-Maus Antikörper (HAMA human anti-mouse antibodies) erschwert. Diese Schwierigkeiten wurden durch die Verwendung von chimären Molekülen oder humanisierten Antikörpern umgangen.

SEREX zur Entdeckung Tumor-assoziiertes Antigens (TAA)

Damit die Antikörper an die Zielzellen binden können, müssen zunächst Antigene gefunden werden, die in den Tumorzellen überexprimiert werden. Das erste Tumorantigen MZ2-E wurde 1991 auf Melanomzelllinien entdeckt (van der Bruggen et al. 1991). Eine erfolgreiche Methode für die Ermittlung von Tumorantigenen ist SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) (Sahin et al. 1995). Dazu werden von Tumorproben cDNA Expressionsbibliotheken erstellt, diese in Lambda-Phagen Vektoren eingebracht und rekombinant in E.coli exprimiert. Die resultierenden Proteine werden auf Nitrocellulosemembranen aufgebracht und mit autologem Patientenserum inkubiert. Antigene gegen die der Patient bereits Antikörper produziert hat, können auf diese Weise identifiziert werden.

Durch SEREX wurden bisher etwa 2000 TAA entdeckt. Die Methode wird inzwischen neben der Tumorimmunologie auch für andere Therapiegebiete, wie Rheumatologie, Gastroenterologie und Kardiologie eingesetzt.

Tumor-assoziierte Antigene umfassen:

(A) Differenzierungsantigene sind spezifisch für das Ursprungsgewebe aus dem der Tumor hervorgeht. Beispiele dafür sind Melan-A/MART-1, Tyrosinase und gp-100.

(B) Mutierte Antigene werden häufig durch Punktmutationen hervorgerufen. Diese sind so individuell, wie jeder einzelne Patient. Daher kommt genau diese Mutante nur in einem Patienten vor, es sei denn die Mutation ist der auslösende Faktor der Karzinogenese, wie z.B. das Proto-Onkogen Ras.

(C) Überexprimierte/-amplifizierte Antigene sind auf der Oberfläche von Tumorzellen zu finden, beispielsweise Her2/neu auf Brusttumorzellen oder EpCAM auf Tumorzellen diverser Entitäten.

(D) Tumor-Hoden (Cancer-Testis, CT) Antigene spielen im gesunden Organismus nur bei der embryonalen Entwicklung eine Rolle. Bei Tumorerkrankungen wird die Transkription dieser stillgelegten Gene reaktiviert. Beispiele für CT-Antigene sind MAGE (melanoma antigen) und NY-ESO-1, welches vorrangig von Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinomen exprimiert wird.

(E) Virale Antigene sind Onkoproteine auf der Oberflächenstruktur von krebserregenden Viren, wie EBV (Eppstein-Barr-Virus) und HPV (human papilloma virus).

1. Monoklonale therapeutische Antikörper

Neben natürlichen immunologischen Mechanismen, wie ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) und CDC (complement-dependent cytotoxicity) können therapeutische monoklonale Antikörper (AK) auch weitere Mechanismen induzieren (Zafir-Lavie et al. 2007). So können sie als Rezeptorantagonisten wirken und auf diese Weise das Zellwachstum inhibieren oder Apoptose induzieren indem sie die Signaltransduktion verändern. Es gibt auch verschiedene Antikörperkonjugate, die therapeutisch zum Einsatz kommen. So werden Medikamentenvorstufen (prodrugs) an Antikörper gekoppelt und erst nach Bindung an die Zielstruktur wird der Wirkstoff aktiviert (ADEPT: antibody directed enzyme prodrug therapy). Weitere Konjugate können Radioisotope, Zytokine oder Immunotoxine sein. Der AK muss auch nicht immer gegen Antigene von Tumorzellen gerichtet sein. So kommen auch AK zur Anwendung, die die Blutgefäßbildung inhibieren.

Seit 1986 wurden mehr als 30 monoklonale AK zur Therapie (USA und/oder EU) zugelassen (Piggee 2008).

Darunter befinden sich:

- rituximab (Rituxan, 1997, anti-CD20, Lymphome)
- infliximab (Remicade, 1998, anti-TNF- α , rheumatoide Erkrankungen)
- trastuzumab (Herceptin, 1998, anti-Her2/neu, Mammakarzinom)
- alemtuzumab (Campath, 2001, anti-CD52, chronische lymphatische Leukämie)
- adalimumab (Humira, 2002, anti-TNF- α , rheumatoide Erkrankungen)
- bevacizumab (Avastin, 2004, anti-VEGF, diverse Tumorentitäten)
- cetuximab (Erbix, 2004, anti-EGFR, diverse Tumorentitäten)

2. Bispezifische Antikörper (bsAb)

Bispezifische AK besitzen die Fähigkeit, gleichzeitig zwei verschiedene Antigene zu binden. Sie sind Derivate von IgG AK, die durch chemisches Vernetzen, Rekombination oder die Quadromatechnologie hergestellt werden (Fischer und Léger 2007).

Chemisches Vernetzen (cross linking): Dabei werden die F(ab') Fragmente durch enzymatischen Verdau der parentalen IgG AK gewonnen. Dann werden die Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten gespalten und über die so freigelegten Thiolgruppen können zufällige Dimere mit anderen F(ab') Fragmenten entstehen. Hauptschwierigkeit bei dem Verfahren ist die anschließende Trennung in Homo- und Heterodimere (Glennie et al. 1987).

Rekombination: Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich verschiedene bsAb-Fragmente generieren. Dazu gehören Einzelkettenfragmente (single chain Fv- scFv), die durch einen zusätzlichen Linker zu bivalenten Tandem-scFv verknüpft werden. Ist der Linker stark verkürzt nennt man den bsAb „Diabody“ (Db) (Holliger et al. 1993). Werden wiederum zwei dieser Moleküle verknüpft erhält man Tandem-Diabodies (taDb) (Kipriyanov 2003). Basierend auf diesen Grundtypen gibt es weitere bsAbs, die zusätzlich einen Fc (Fragment crystallizable)-Teil besitzen: Db-Fc, taDb-Fc und taDb-CH3 und weitere Kombinationen.

Quadromatechnologie: Durch die Fusion zweier Hybridome oder eines Hybridoms mit einem B-Lymphozyten entstehen Quadromas (Suresh et al. 1986). Diese Chimäre exprimieren zwei schwere und zwei leichte Ketten, die sich zufällig zu zehn möglichen Kombinationen zusammenfinden. Anschließend erfolgt ein Reinigungsschritt, der meist über die Methode der Säulenchromatographie umgesetzt wird.

Es gibt drei therapeutische Strategien, die mit bsAbs verfolgt werden können: (a) Simultane Inhibition von zwei Signalwegen durch Blockade von Rezeptoren oder Liganden. (b) Simultane Bindung von zwei verschiedenen Zelltypen, wie Tumor- und Abwehrzellen, oder durch Bindung von Tumorzelle und Zytokin oder Radionukleotid. (c) Des Weiteren kann durch die beiden Bindungsarme die Spezifität der Anheftung und damit die Signalstärke erhöht werden, wenn die Zielzelle beide Antigene exprimieren muss.

3. Trifunktionale Antikörper

Catumaxomab (Handelsname Removab®) und ertumaxomab sind bispezifische, trifunktionale AK, die mit Hilfe der Quadromatechnologie generiert werden (Lindhofer et al. 1995). Die AK heften sich mit einer Bindungsstelle an CD3 von T-Zellen und mit der zweiten Bindungsstelle an EpCAM (catumaxomab) oder Her2/neu (ertumaxomab) auf Tumorzellen. Im Unterschied zu bispezifischen AK, können sie über ihren aus Maus IgG2a und Ratte IgG2b kombinierten Fc-Teil akzessorische Abwehrzellen binden, die positiv für den Fcγ Rezeptor Typ I, IIa und III sind. Dazu gehören Makrophagen, NK- und dendritische Zellen.

Entsprechend der Nomenklatur für monoklonale AK (Piggee 2008) leiten sich die Bezeichnungen der AK wie folgt ab:

- ca/er - Vorsilben leiten sich in diesem Fall von den Zielmolekülen ab (EpCAM, Her2)
- tu(m) - verschiedene Tumorentitäten betreffend (miscellaneous tumor)
- axo - Ratte/Maus Hybridmolekül
- mab - monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)

Aufgrund ihrer Struktur wird ein sogenannter Trizellkomplex (Abbildung 5) postuliert, der mit einer simultanen Aktivierung verschiedener Zelltypen an der Tumorzelle einhergeht und die effektive Zerstörung der Tumorzellen durch Perforin-vermittelte Lyse, Apoptose, Zytokin-freisetzung und AK-vermittelter Phagozytose zur Folge hat (Zeidler et al. 1999; Zeidler et al. 2000; Riesenberg et al. 2001).

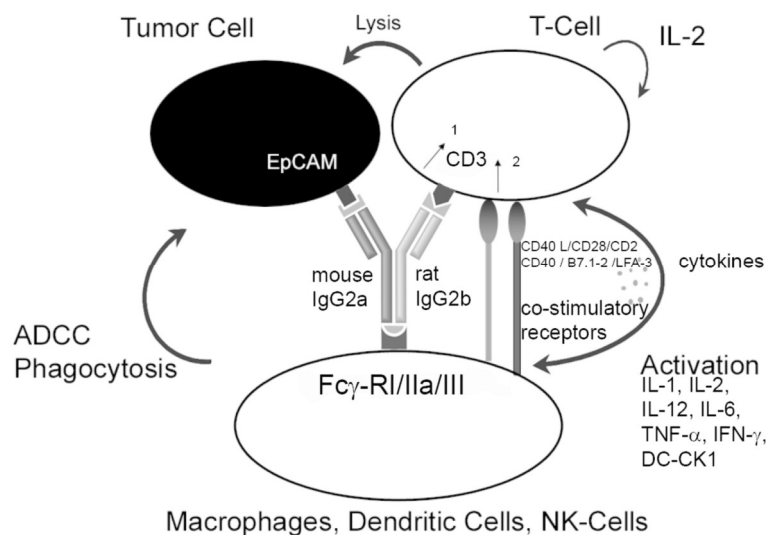


Abbildung 5: Postulierter Trizellkomplex. Modifiziert nach Ruf und Lindhofer (2001). Ein trifunktionaler AK besitzt drei wichtige Funktionen: (1) Die Bindung an Tumor- und T-Zell-Oberfläche zur Ausbildung einer künstlichen immunologischen Synapse. (2) Die Rekrutierung von akzessorischen Zellen, die durch Phagozytose oder ADCC zur Lyse der Tumorzelle führen. (3) Die Vermittlung des Kontakts zwischen T-Zelle und akzessorischen Zellen, wodurch kostimulatorische Signale zu einer verstärkten Aktivierung beider Zellen und somit zu einer gesteigerten anti-tumoralen Aktivität führen.

Catumaxomab wurde bereits in verschiedenen klinischen Studien eingesetzt (Seimetz et al. 2010). Darunter befanden sich Studien an EpCAM positiven Tumorentitäten, bei denen es zur Ausbildung eines malignen Aszites kommt (Heiss et al. 2010), wie bei Peritonealkarzinomatose (Heiss et al. 2005; Ströhlein et al. 2009) oder Ovarialkarzinomen (Burges et al. 2007). Einen Überblick über die Studien mit catumaxomab bei gastrointestinalen Krebserkrankungen bietet Lordick et al. (2008). Darüber hinaus gab es auch Studien an Mammakarzinomen (Stemmler et al. 2005), nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC: non small cell lung cancer) (Sebastian et al. 2007), und Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma) mit opsonierten peripheren Blutlymphozyten (Riechelmann et al. 2007). In den Studien von Burges und Sebastian et al. wurde bei einigen Patienten

eine unterschiedlich stark ausgeprägte Bildung von HAMA/HARA als Folge der Behandlung mit den therapeutischen AK detektiert. Das Vorhandensein von HAMA bei Therapie mit catumaxomab korrelierte jedoch positiv mit dem Gesamtüberleben der Patienten, was man sich durch ein insgesamt aktiveres Immunsystem erklärt (Ott et al. 2010).

Aufgrund der positiven Ergebnisse erhielt catumaxomab (Removab) im April 2009 durch die Europäische Kommission die Zulassung zur *i.p.* Gabe bei malignem Aszites bei Patienten mit EpCAM-positiven Karzinomen für die keine Standardtherapie zur Verfügung steht oder nicht mehr anwendbar ist.

Nach vielversprechenden präklinischen Daten (zusammengefasst in Kiewe und Thiel 2008) befindet sich ertumaxomab in der klinischen Entwicklung (Phase 2). Die erste klinische Studie mit ertumaxomab wurde an Patienten mit malignem Aszites durchgeführt (Heiss et al. 2005). Dabei erhielten 3 Patientinnen, eine mit Brust- und zwei mit Eierstockkrebs, ertumaxomab in Kombination mit catumaxomab bzw. die Patientin mit Brustkrebs nur ertumaxomab. In allen Fällen waren die Anzahl der Her2/neu positiven Zellen und das Aszitesvolumen reduziert. Daran schloss sich eine Phase I Studie mit 17 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs an, wobei 3 Patientinnen auf die Therapie ansprachen (Kiewe et al. 2006).

Ein Teil der präklinischen Studien wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen durchgeführt. Dabei kamen multizelluläre Tumorsphäroide als pharmakologische Testmodelle zum Einsatz. Diese dreidimensionalen (3D) Tumorzellkulturen sollen daher im Folgenden näher charakterisiert werden.

1.4 Multizelluläre Tumorsphäroide

Vor mehr als 60 Jahren erfolgten erstmals grundlegende Untersuchungen an dreidimensional wachsenden Zellkultursystemen (Holtfreter 1944; Moscona 1952), die rund 25 Jahre später in die systematische Krebsforschung eingeführt wurden (Sutherland et al. 1970). Zunächst fanden multizelluläre Tumorsphäroide (MCTS) Anwendung in der Radiotherapie gefolgt von Photodynamischer Therapie, Hyperthermie, Chemotherapie und zielgerichtete Therapieformen, wie Zell- oder AK-vermittelte Immuntherapie (Olive und Durand 1994; Mueller-Klieser 1997; Desoize et al. 1998; Santini et al. 1999; Desoize, Jardillier 2000; Dubessy et al. 2000; Mueller-Klieser 2000).

1.4.1 Merkmale von MCTS

Das kugelförmige 3D-Modell bietet gegenüber herkömmlichen 2D-Kulturen viele entscheidende Vorteile. So behalten die Tumorzellen im 3D-Verband ihre histomorphologischen, funktionellen und mikromilieubezogenen Eigenschaften. Im Bezug auf das Mikromilieu entstehen in Sphäroiden Gradienten von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten (Abbildung 6). Durch dieses Verteilungsmuster entsteht im Zentrum

des Sphäroids ab einer Größe von ca. 500 µm eine sekundäre Nekrose. Diese ist umgeben von vitalen, nicht-proliferierenden Zellen, wohingegen in der Außenzone der Sphäroide proliferierende Zellen lokalisiert sind. Aufgrund der Kugelgeometrie bestimmt die radiale Koordinate der konzentrisch angeordneten Zellschichten die biologischen Eigenschaften der betreffenden Krebszellen. Somit spiegelt ein Sphäroid eine avaskuläre Mikrometastase oder eine intervaskuläre Mikroregion in einem soliden Tumor wider.

Weiterhin haben Genexpressionsanalysen ergeben, dass viele Gene, die mit Proliferation, Überleben, Differenzierung und Therapieresistenz assoziiert sind, in 3D-Kulturen anders exprimiert werden als in 2D-Kulturen. Dies konnte für eine Vielzahl von Tumorentitäten gezeigt werden, wie etwa für Ovarialkarzinome (Cody et al. 2008), Leberkarzinome (Chang und Hughes-Fulford 2009) und Colonkarzinome (Gaedtker et al. 2007). Auch insbesondere die Enzyme des zellulären Energiestoffwechsels sind in ihrer Expressionsstärke verändert (Rodríguez-Enríquez et al. 2008). Die Zell-Zell und die Zell-Matrix Interaktionen in dreidimensionalen Kulturen spielen ebenso bei Radio- und Chemotherapieresistenz eine Rolle (Shield et al. 2009).

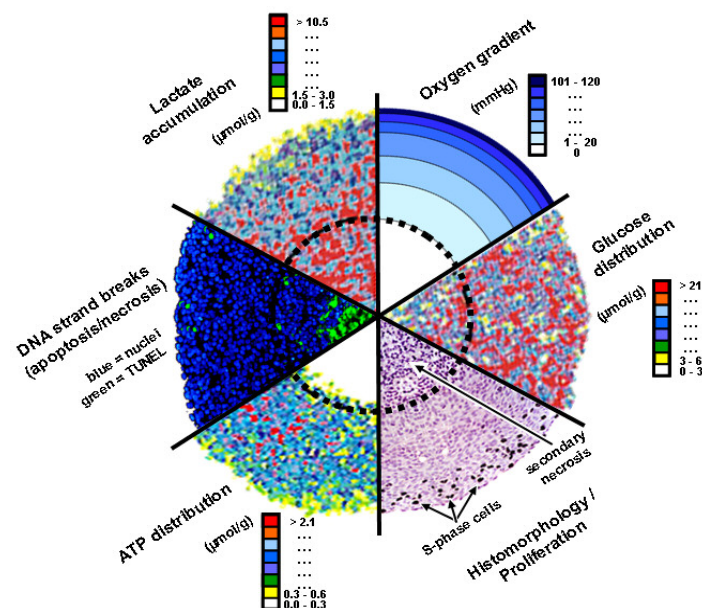


Abbildung 6: Gradienten innerhalb eines Sphäroidschnitts, sichtbar gemacht mittels verschiedener Analysetechniken. Autoradiographie, Tunnel Assay, Biolumineszenz-Bildgebung, Sauerstoffmikroelektrodenmessung machen den konzentrischen Aufbau der Sphäroide hinsichtlich Vitalität, Proliferation und im Bezug auf das Mikromilieu deutlich (Hirschhaeuser et al 2010a).

1.4.2 Anwendung von MCTS

Durch den gezielten Einsatz von MCTS kann die Selektion von vielversprechenden Wirkstoffen oder die Erprobung innovativer Therapien vor Tierversuchen oder klinischen Studien entscheidend verbessert werden. Dafür gibt es verschiedene Bemühungen, das Sphäroidmodell als Hochdurchsatz-Modell zu etablieren (Kunz-Schughart et al. 2004; Friedrich et al. 2007a; Friedrich et al. 2009). Standard Kultivierungsmethoden umfassen die

Methode des hängenden Tropfens (Kelm et al. 2003), der Kultivierung in Spinnerflaschen (Hirschhaeuser et al. 2009) oder der Suspensionskultur auf nicht-adhäsiver Oberfläche (Yuhas et al. 1977). Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten die Kultivierungsoberfläche zu beschichten, z.B. mit Agarose (Konur et al. 1998), mit poly-HEMA (poly-hydroxyethyl methacrylate) (Ivascu und Kubbies 2006), mit PEG (poly-ethylene glycol) (Zhang et al. 1998) und mit PDMS (poly-dimethylsiloxane) (Nakazawa et al. 2009). Letzteres wird in einer neuen Methode der Gruppe von Prof. Kunz-Schughart verwendet, um auf einem 40 nm dünnen Film aus HT-29 Kolonkarzinomzellen in automatisierter Massenproduktion Sphäroide zu generieren (Abbildung 7, rechts). Sogenannte „Mikrofluidics“ sind ein weiteres mikrotechnologisches Format um das Sphäroidwachstum zu kontrollieren. Diese Technik geht über das einfache Kultivieren der Sphäroide hinaus. Sie ermöglicht durch flüssiges Kompartiment die Simulation der *in vivo* Vaskularisierung (Hsiao et al. 2009).

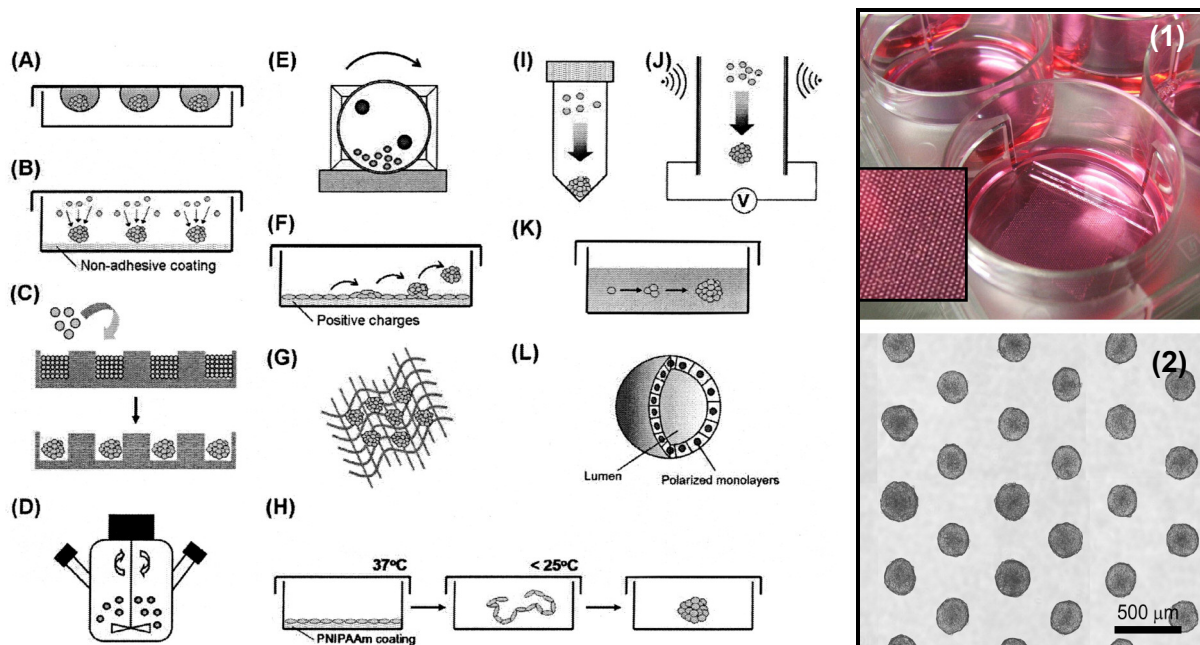


Abbildung 7: Methoden der Sphäroidgenerierung. Links: (A) Hängender Tropfen. (B) Einzelzellkultur auf nicht-adhäsiver Oberfläche. (C) Mikromuldenteknik. (D) Spinnerflaschenkultur. (E) Rotierendes Zellkultursystem. (F) Hepatozyten-Selbstassemblierung in Petrischalen mit positiver Ladung. (G) Poröse 3D Netzmaterialien. (H) PNIPAAm basierte Zelllagen. (I) Pelletkulturen. (J) Elektrische, magnetische oder akustische Felder zur Verstärkung der Zellaggregation. (K) Monoklonales Wachstum von Tumorsphäroiden. (L) Polarisierte epitheliale Zysten. (Lin et al. 2008). Rechts: (1) HT-29 Sphäroide kultiviert auf einem dünnen, perforierten PDMS Film in 6-well Platten. (2) Mikroskopische Aufnahme der 150 µm großen HT-29 Sphäroide (Hirschhaeuser et al. 2010a).

1.4.3 Kokulturen aus MCTS und Abwehrzellen

Neben den charakteristischen Eigenschaften, wie Gradientenbildung, Zelldifferenzierung und Expressionsprofilen, die die *in vivo* Situation einer Mikrometastase oder avaskulären Tumorbereiches schon sehr nah imitieren, kann die Kokultur von Tumorsphäroiden mit Stromazellen darüber hinaus auch die *in vivo*-Mikroumgebung simulieren. Dazu werden Sphäroide mit Fibroblasten (Krueger et al. 2005), Endothelzellen (Ghosh et al. 2007) oder

verschiedenen Immunzellen kokultiviert (Tabelle 1). Zu den Abwehrzelltypen gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, T-Zellen oder NK-Zellen, die vorrangig als Suspensionkultur zu etablierten Sphäroiden gegeben werden, um Migrations-, Aktivierungs- oder Reifungsprozesse zu analysieren. In Kombination mit therapeutischen Wirkstoffen können diese Kokulturen genutzt werden um zelluläre Toxizitäten oder therapeutische Effekte zu untersuchen. Durch die Dreidimensionalität der Kultur lassen sich entsprechend im Vergleich zu 2D-Standardzellkulturen andere Endpunkte analysieren. Neben dem Sphäroidvolumen als Analogon zum Tumolvolumen zählt dazu die Analyse der Abwehrzellinfiltration, die je nach Typ der eingewanderten Zellen pro- oder anti-tumorale Effekte hervorruft.

Tabelle 1: Tumorsphäroide in Kokultur mit Abwehrzellen in Suspension und deren Anwendung in der Erforschung therapeutischer Strategien (Hirschhaeuser et al. 2010a).

| Zelltypen | Anwendung/Therapie | Referenz |
|---|--|-----------------------------|
| benigne/maligne Blasenkrebs Zelllinie +Monozyten/ Makrophagen | Einfluss von Zytokinen auf die Monozyt- zu Makrophagen-differenzierung | (Konur et al. 1998) |
| benigne/maligne Blasenkrebs Zelllinie+BCG/ Lymphokine-aktivierte Killerzellen (LAK) | Immunzellinfiltration | (Durek et al. 1999) |
| Blasen- und Nierenkarzinom Zelllinie +CTL/LAK | Zahl der T-Zellen für adoptive Therapie ermitteln | (Kawai et al. 2001) |
| Brustkrebs Zelllinie +Makrophagen | VEGF Expression und <i>de novo</i> Gefäßbildung | (Bingle et al. 2006) |
| Urothel-, Prostatakarzinom, Melanom Zelllinien +Monozyten | Differenzierung von Monozyten zu DC | (Gottfried et al. 2006) |
| Melanom Zelllinie +CTL | TAA Erkennung durch CTL | (Feder-Mengus et al. 2007) |
| diverse Entitäten + CTL | Zytotoxizität von CTL | (Fischer et al. 2007) |
| benigne/maligne pankreatische Endothelzellen + T Zellen/Tregs | T-Zell/ Treg Infiltrationsanalyse | (Nummer et al. 2007) |
| Brustkrebs Zelllinie +Monozyten | Monozyten als Vehikel für Gentherapie | (Muthana et al. 2008) |
| HNSCC Zelllinie +PBMC (peripheral blood mononuclear cells) | Bispezifischer, trifunktionaler, AK catumaxomab | (Hirschhaeuser et al. 2009) |
| HNSCC Zelllinie +PBMC | Therapeutischer AK EMD 72000 | (Hoffmann et al. 2009) |

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkmechanismen der bispezifischen, trifunktionalen Antikörper catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3) im dreidimensionalen Testsystem aus humanen Tumorsphäroiden in Kokultur mit peripheren Blutmonozyten (PBMC) zu untersuchen.

Dazu sollten Experimente zur Abfolge der Zugabe von PBMC und Antikörpern zur Sphäroidkultur, die Simulation einer Mehrfachdosierung sowie einer Dosiseskaltation mit den therapeutischen Antikörpern durchgeführt werden.

Die Interaktion von catumaxomab und ertumaxomab mit den T-Zellen über die CD3-Bindungsstelle und somit deren Aktivierung sollte anhand der Expression der IL-2 mRNA und der Freisetzung des IL-2 Zytokins analysiert werden. Weiterhin war die Rolle der Tumorantigen-Bindung und der Bindung an die akzessorischen Abwehrzellen über den Fc- γ Rezeptor Typ I/IIa und III mithilfe der monospezifischen, parentalen Antikörper oder des F(ab')₂ Fragments zu untersuchen.

Da ein Teil der Antikörperwirkung durch die Freisetzung verschiedener Zytokine vermittelt wird und dies in der Klinik zu unerwünschten, Zytokin-assoziierten Nebenwirkungen führen kann, war es ein weiteres Ziel, *in vitro* eine kombinierte Gabe der Antikörper mit immun-supprimierenden Präparaten zu testen.

Als aussagekräftigster Endpunkt der antitumoralen Wirkung sollte das Volumenwachstum beziehungsweise die Reduktion des Sphäroidvolumens dienen. Weitere Endpunkte sollten die Vitalität und Klonogenität der Tumorzellen, die immunhistologische und molekularbiologische Analyse der Infiltration von Abwehrzellen in die Sphäroide sowie die Freisetzung von verschiedenen Zytokinen sein.

Ergänzend dazu sollte die Rolle der metabolischen Aktivierung der Abwehrzellen als Folge der Gabe von catumaxomab im Vergleich mit anderen Agenzien untersucht werden. Ziel dieser Untersuchungen war es, neue Verständnisse über den Wirkmechanismus von catumaxomab zu gewinnen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellkultivierung

2.1.1 Zelllinien, Medien und Zusätze

Die Tumorzelllinie FaDu wurde von Prof. Baumann, TU Dresden, zur Verfügung gestellt. Sie wurde 1968 aus einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region etabliert (Rangan 1972). Sie ist stark EpCAM-positiv.

Aus der stabilen Transfektion der FaDu Zelllinie mit dem Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu entstand die Sublinie FaDu E593. Die Transfektion wurde unter der Leitung von Dr. Lindemann von der Eufets GmbH, Idar-Oberstein, durchgeführt, der uns die Transfektanten für die vorliegenden Versuche überließ.

Medien und Zusätze

Das Grundmedium ist DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM L-Glutamin. Während der Versuche wurden DMEM-Medien verschiedener Hersteller getestet, wobei sie unerwartet unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten als Sphäroide zeigten. So erwies sich DMEM von PAA als am besten geeignet. Das Medium wurde versetzt mit 10 % FCS, 10 mM nicht essentielle Aminosäuren, 2,5 µg/ml Amphotericin B und 100 U/ml Penicillin/ sowie 100 µg/ml Streptomycin, die außer FCS als 100fache Konzentrate bezogen und entsprechend 1%ig zugesetzt wurden. Ebenso wurden 100x-Konzentrate von Natriumpyruvat und Hepes selbst hergestellt, indem sie in Aqua dest. angesetzt und anschließend autoklaviert wurden. Die Endkonzentration im Medium betrug 1 mM Natriumpyruvat und 10 mM Hepes.

Um den Selektionsdruck in den FaDu E593 aufrecht zu erhalten, wurden zusätzlich 5 mg/ml Geneticin (G418) zugegeben. Die Stammlösung betrug 100 mg/ml G418 in PBS. Sie wurde zur Sterilisierung über einen 0,2 µm Filter gegeben, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.2 Standardtechniken in der Zellkultur

2.1.2.1 Monolayerkultivierung und Passagieren

Die Standardkultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen verschiedener Größe von Greiner bio-one. Je nach Wachstumsfläche der Flaschen wurde das Volumen des Nährmediums entsprechend angepasst. Für Flaschen der Größe von 25 cm² wurden 5 ml, von 75cm² 10 ml und für 175 cm² 20 ml Kulturmedium verwendet. Sämtliche Reagenzien wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden einmal pro Woche aus der Kulturflasche abgelöst und ein Teil der Zellen in eine neue Flasche passagiert. Dazu wurden das Nährmedium abgekippt und die Zellen mit

EDTA/PBS (2 mM) gespült. Anschließend erfolgte die Ablösung der Tumorzellen mit 0,5 mg/ml Trypsin mit 0,22 mg/ml EDTA in PBS für 3-5 min bei 37°C. Das Volumen orientierte sich ebenfalls an der Flaschengröße: 1 ml für 25 cm², 2 ml für 75 cm² und 4 ml für 175 cm². Die Reaktion wurde mit dem vierfachen Volumen Nährmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Um Reste des Trypsins abzutrennen, erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 300 x g für 6 min bei RT. Nach Verwerfen des Überstands schloss sich die Resuspendierung des Pellets in 1 ml Medium und für die Erhaltungskultur die Überführung von 1/40stel der Zellsuspension oder ein Volumen mit einer definierten Zellzahl in eine neue Flasche mit vorgelegtem Nährmedium an. Alle zwei Tage wurde das verbrauchte Medium nach Abkippen durch frisches ersetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre.

2.1.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung; zum einen die Auszählung mit der Neubauerkammer und zum anderen die Zellanalyse mittels CASY (cell counter and analyser system).

Die routinemäßige optische Zählung in der Neubauerkammer wurde meist ergänzt durch eine Trypanblaufärbung, um tote Zellen von der Zählung auszuschließen.

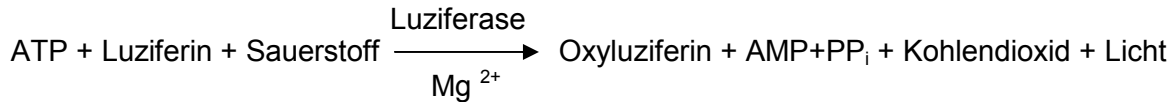
Das Messprinzip der automatisierten Zellzählung mit dem CASY beruht auf der Pulsflächenanalyse. Es werden 100 µl Zellsuspension in 10 ml einer isotonen Elektrolytlösung (Casyton) gegeben und durch eine dünne Kapillare des Geräts gesogen. An dieser liegt eine Spannung an, deren Widerstand sich jedes Mal beim Durchtritt einer Zelle erhöht. So misst das Gerät innerhalb definierter Grenzen Anzahl, Volumen und Durchmesser der Zellen. Für FaDu und FaDu E593 lagen diese Grenzen zwischen 10 und 30 µm, für PBMC zwischen 6 und 15 µm.

2.1.2.3 Mykoplasmentest (MykoAlert)

Die häufigsten Kontaminationen in der Zellkultur sind Bakterien und Pilze. Ein Befall lässt sich weitestgehend durch den Einsatz von Antibiotika und antifungalen Substanzen verhindern. Kontaminationen mit Mykoplasmen haben zwei nachteilige Eigenschaften; es gibt keinen zuverlässigen Schutz und die Kontamination bleibt häufig länger unbemerkt, weil aufgrund der geringen Größe der Organismen typische Anzeichen einer Kontamination, wie Trübung des Mediums oder massives Zellsterben, ausbleiben.

Daher ist es notwendig die Zellen regelmäßig auf Mykoplasmen zu überprüfen. Dazu wurde eine neuere Methode basierend auf einer Lumineszenzmessung angewendet. Der Nachweis erfolgt über mykoplasmathe Enzyme, freigesetzt nach Lyse der Mykoplasmen aus Medienüberständen von nahezu konfluenten Zellkulturen. Diese Enzyme reagierten mit dem

Testsubstrat unter Umwandlung von ADP (Adenosindiphosphat) zu ATP (Adenosin-triphosphat). Durch Messung des ATP Gehalts vor und nach Zugabe des Substrates ließ sich ein Quotient ermitteln, der Aufschluss über eine mögliche Kontamination gab. Der ATP Gehalt wurde dabei über folgende Reaktion erfasst:



Ein Quotient kleiner 1 steht für eine mykoplasmenfreie Kultur, ein Quotient größer als 1 deutete auf eine Kontamination hin.

2.1.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Von den verwendeten Zelllinien wurden tiefgefrorene Zellbanken angelegt, um bei Bedarf auf die gleiche Ausgangspopulation zurück greifen zu können. Dazu wurden mykoplasmenfreie Zellen aus den Kulturflaschen abgelöst, woran sich die Bestimmung der Zellzahl anschloss.

Das Standardkulturmedium wurde mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt und vorgekühlt. Mit diesem Medium wurde die Zellzahl so eingestellt, dass eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml vorlag. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde in ein Einfrierröhrchen überführt, zunächst in einem Einfrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert und am darauffolgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden sie kurz im Wasserbad inkubiert und anschließend in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegten 9 ml Nährmedium überführt. Nach der Zentrifugation bei $300 \times g$, dem Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets mit 1 ml Medium wurden die Zellen in eine 25 cm^2 Kulturflasche mit 4 ml Medium transferiert.

2.1.2.5 Anfertigen von Zytospins

Mit Hilfe von Zentrifugalkräften können Zellen als sogenannte Zytospins auf einen klar definierten Bereich eines Objektträgers aufgebracht werden. Hierzu wurde die Zellzahl mit der Neubauerkammer bestimmt und auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit PBS eingestellt. Von dieser Suspension wurden je $200 \mu\text{l}$ in ein Mikrogefäß ($750 \mu\text{l}$ Volumen, Durchtrittspore $0,5 \text{ mm}$) gegeben und zwei dieser Gefäße in einen Zytocontainer mit gerader Bohrung gestellt. Zwischen den Super Frost plus Objektträger und dem Zytocontainer wurde ein gelochtes Filterpapier geklemmt, sodass die Gummiringe des Containers auf dem Filterblättchen auflagen. Überschüssige Restflüssigkeit wurde über dieses Blättchen entfernt. Dann wurden die Zellen in der vorgekühlten Zentrifuge bei $170 \times g$, 5 min, bei 4°C auf den Objektträger sedimentiert. Nach zweistündigem Lufttrocknen konnten die Zytospins entweder für 5 min in Aceton bei -20°C fixiert und anschließend gefärbt oder unfixiert bei -20°C gelagert werden.

2.1.3 Sphäroidkultivierung

2.1.3.1 Sphäroidinitiiierung und –kultivierung in den Spinnerflaschen

Vor der Sphäroidinitiiierung wurden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Initiationszeitpunkt bei weniger als 100 % Konfluenz lagen. Als weiterer vorbereitender Schritt erfolgte die Beschichtung von 96 well-Platten mit 50 µl heißer, steriler 1,5%iger Agarose in PBS mittels Multistep-Pipette. Während die Agarose unter der Sterilbank aushärtete, wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen abgelöst, und die Zellkonzentration wurde auf $3,3 \cdot 10^4$ oder $6,6 \cdot 10^4$ /ml eingestellt. Bei 150 µl/well entsprach dies 5000 oder 10000 Zellen/well aus denen sich ein Sphäroid in jedem well formte. Nach vier oder sieben Tagen wurden die Sphäroide mit einer wattegestopften Pasteurpipette und einer elektrischen Pipettierhilfe (AccuJet pro) in eine 1 l Spinnerflasche mit 300 ml Nährmedium überführt und darin für weitere vier oder sieben Tage bei 130 UpM auf dem Magnetrührer kultiviert. Einen Tag vor Versuchsbeginn folgte die Aufteilung der Gesamtpopulation in die 20 ml Spinnerflaschen. Dazu wurden die Sphäroide zuerst in eine Petrischale überführt. Anschließend wurden auf einem schwarzen Untergrund je 200 Sphäroide mit Pasteurpipette und Pipettierhilfe abgezählt und diese in die Spinnerflasche gegeben. An das Absaugen des Mediums schlossen sich die Zugabe von 20 ml frischen Nährmediums und die Kultivierung bei 160 UpM auf dem Magnetrührer im Inkubator an.

2.1.3.2 Handhabung und Silikonisierung der Spinnerflaschen

Spinnerflaschen bestehen meist aus Glas und zeichnen sich durch ihre typische Form mit drei Öffnungen aus. Die obere mittlere Öffnung wird mit einem Schraubgewinde oder Stopfen verschlossen, an dem ein Stab befestigt ist, an dessen Ende sich ein Rührwerk mit Magnet befindet. Die beiden seitlichen Öffnungen dienen dem Gasaustausch oder der Entnahme beziehungsweise Zugabe von Sphäroiden oder Substanzen.

Die Durchführung der Versuche erfolgte in 20 ml Spinnerflaschen (Wheaton). Für die Anwendung der Scan-Methode zur Erfassung der Sphäroidgrößen erwies es sich als vorteilhaft, die weißen Rührwerke durch schwarze, aus PEEK (Polyetheretherketon) gefertigte Rührwerke und die weißen Magneten durch blaue Magnete (VWR) zu ersetzen. Die Anfertigung dieser Bauteile erfolgte durch die Mitarbeiter der Instituts-Werkstatt.

Um ein Anhaften der Sphäroide in den Spinnerflaschen zu verhindern, war es erforderlich die Flaschen zu silikonisieren. Hierzu wurde ein Silikon–Isopropanol Gemisch bis auf Höhe des üblichen Medienfüllstandes in die Flaschen überführt, geschwenkt und wieder aus den Spinnerflaschen entfernt. Anschließend trocknete das Silikon bei 100°C für 100 min im Trockenschrank. Daran schloss sich eine dreimalige Inkubation für 30 min in Aqua dest. an. Darüber hinaus wurden die Flaschen vor jeder Verwendung in der Spülmaschine gespült und autoklaviert wie nachfolgend beschrieben.

Nach Beendigung eines Versuchs wurden Reste von Sphäroiden oder Medium mit 70%igem Isopropanol aus den Flaschen gespült, mit etwas RBS neutral versetzt (1 cm Boden bedeckt) und mit Leitungswasser aufgefüllt sowie für mindestens 2 h oder über Nacht inkubiert. Dann wurde die Spüllösung entfernt, woran sich die Reinigung der Flaschen in der Spülmaschine anschloss. Nach jedem Spülgang erfolgte ebenfalls ein Bad in Aqua dest., mindestens für 2 h oder besser über Nacht, um eventuelle Spülmittelreste zu entfernen. Bei den kleinen Spinnerflaschen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, zusammengehörige Glasflaschen und Rührwerke zu kennzeichnen, da kleine Unterschiede in der Höhe des Rührwerks sich auf das Rührverhalten auswirken können. Die getrockneten zusammengebauten Spinnerflaschen wurden dann bei 120°C für 20 min, mit leicht aufgedrehten Seitenkappen autoklaviert und anschließend über Nacht bei 80-100°C im Wärmeschrank getrocknet.

2.1.3.3 Isolierung und Kultivierung von PBMC aus dem Buffy Coat

Die Buffy Coats von gesunden Spendern wurden über die Blutbank der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen. Während der experimentellen Zeit der vorliegenden Arbeit änderte sich die Prozedur der Bereitstellung der Blutpräparate. So war es zu Beginn möglich, die Buffy Coats am selben Tag der Entnahme zu erhalten, während sie später erst am darauffolgenden Morgen freigegeben wurden. Es konnte kein qualitativer Unterschied zwischen den frischen und den über Nacht bei 4°C gekühlten Buffy Coats festgestellt werden. Für die Isolation der mononukleären Zellen war es erforderlich das Leukozytenkonzentrat 1:4 mit sterilem PBS zu verdünnen. Je 25 ml dieser Suspension wurden langsam auf 25 ml vorgelegtes Leukozytenseparationsmedium (LSM1077) pipettiert. Die anschließende Zentrifugation bei 1200 x g und ausgeschalteter Bremse diente der Auftrennung in –von oben nach unten- Plasmaphase, Interphase, Ficollphase und Pellet.

Die Leukozyten befanden sich in dem weißen Ring der Interphase, welcher vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Zum Waschen der Zellen in PBS schloss sich zweimaliges Zentrifugieren zuerst bei 300 x g und dann bei 200 x g an. Das Zellpellet wurde dann mit 1 ml Nährmedium resuspendiert und die Zellsuspension schließlich auf 10 ml aufgefüllt. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerkammer. Dazu wurde die Zellsuspension 1:10 mit 1%iger Essigsäure verdünnt, womit gleichzeitig eventuell vorhandene Erythrozyten zur Lyse gebracht wurden.

2.1.3.4 Markierung der PBMC mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH-26

Die isolierten PBMC wurden mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^8$ in 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und entsprechend dem Herstellerprotokoll, jedoch mit 5facher Menge der Reagenzien, mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 gefärbt. So erfolgte zuerst ein Waschschriff mit serumfreiem DMEM (400 x g, 5 min). Während der Zentrifugation wurde $2 \cdot 10^{-5}$ M Farbstoff (20 µl)

mit 5 ml Diluent C verdünnt. Der Medienüberstand war möglichst komplett abzunehmen und dann das Pellet in ebenfalls 5 ml Diluent C zu resuspendieren. Daran schlossen sich die Zugabe der Färbelösung und das Mischen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren an. Während der Inkubationszeit von 5 min wurde das Röhrchen mehrfach invertiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml FCS gestoppt. Nach 1 min wurden 20 ml Komplettmedium zugegeben und die Zellen gewaschen (400 x g, 10 min). Das Waschen mit Komplettmedium wiederholte sich dreimalig. Die Zellverluste durch die Zentrifugation und das Entfernen des Überstandes beliefen auf etwa ein Drittel der Ausgangszellzahl. Der Erfolg der Färbung konnte durch optische Kontrolle in der Neubauerkammer mit einem Fluoreszenzmikroskop (Keyence) beurteilt werden.

2.2 Untersuchungen an Sphäroid-Kokulturen als Endpunkte der Antikörpertherapie

2.2.1 Behandlung von MCTS mit PBMC, trifunktionalen AK und Immunsuppressiva

PBMC

Um die Verhältnisse *in vivo* nachzuahmen kam für alle Versuche eine PBMC Konzentration von $1 \cdot 10^6$ /ml zum Einsatz. Dem liegt zugrunde, dass ein gesunder Erwachsener etwa $4 \cdot 10^6$ bis $9 \cdot 10^6$ /ml Leukozyten pro ml Blut besitzt, von denen wiederum Lymphozyten und Monozyten etwa 28-40 % ausmachen. Für eine kleine Spinnerflasche mit einem Gesamtvolumen von 20 ml Kultur entsprach dies $2 \cdot 10^7$ PBMC/Flasche, die, außer bei den Versuchen zur Abfolge der Zusätze, immer direkt am Versuchszeitpunkt 0 in das Nährmedium pipettiert wurden.

Antikörper

Für die Versuche kamen die bispezifischen, trifunktionalen AK catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3) zu Einsatz, die durch die Quadroma-Technologie (Lindhofer et al. 1995) aus den parentalen AK 26/II/6 (Ratte IgG2b, anti-human CD3) und HO-3 (Maus IgG2a, anti-human EpCAM) bzw. 2502A (Maus IgG2a, anti-Her2/neu) generiert wurden. Als Kontrollantikörper dienten BiLu (anti-human EpCAM x anti-murin CD3, Maus IgG2a x Ratte IgG2b) und das F(ab')₂ Fragment von catumaxomab. Der parentale EpCAM-bindende Teil von catumaxomab (HO-3) und EpCAM-bindende Surrogatantikörper BiLu (C215) erkennen beide das gleiche Epitop von EpCAM (Ruf et al. 2007). Die AK wurden von Fresenius Biotech GmbH, München, und TRION Research GmbH, Martinsried, zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht der verwendeten AK ist in Abbildung 8 dargestellt.

Immunsuppressiva

In Anlehnung an die klinisch relevanten immunsupprimierenden Wirkstoffe für die verschiedenen Tumorentitäten wurden Dexamethason (Merck) in Kombination mit catumaxomab sowie Prednisolon (Sigma-Aldrich) mit ertumaxomab verwendet.

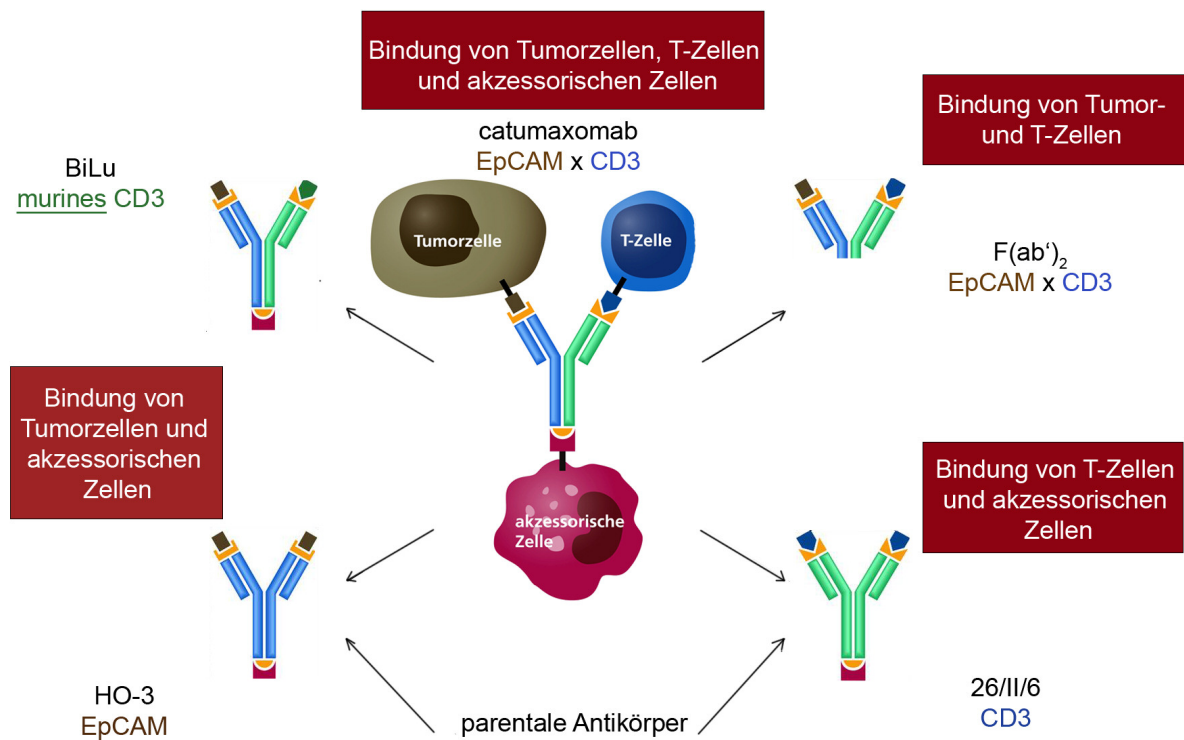


Abbildung 8: Für die Versuche verwendete Antikörper. Zusätzlich wurden Versuche mit dem trifunktionalen Antikörper ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3) durchgeführt.

2.2.2 Analyse des Sphäroidwachstums

Messen der Sphäroidgröße mittels Mikroskop und Okularmikrometer

Für die Analyse der Sphäroiddurchmesser wurden zehn Sphäroide pro Ansatz aus den Spinnerflaschen entnommen und in eine kleine Petrischale oder Mehrwellplatte überführt. Deren Größe konnten dann mit einem Lichtmikroskop, ausgestattet mit einem Okularmikrometer, anhand von zwei orthogonalen Durchmessern erfasst werden. Die Skaleneinteilung wurde durch Ablesen einer geeichten Strichplatte (Objektmikrometer) im Mikroskop kalibriert. Die abgelesenen Skalenwerte wurden in einer Excel-Datei eingetragen und anschließend anhand der Kalibrierung in absolute Längswerte (Durchmesser in μm) umgerechnet. Aus dem Durchmesser konnte unter Annahme perfekter Kugelgeometrie entsprechend der Formel $V = 1/6 \pi d^3$ das Volumen der Sphäroide berechnet werden.

Halbautomatisches Messen der Sphäroidgröße mit der Scanmethode

Diese Methode etablierte Björn Rodday im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit (Rodday 2010). Die Größenanalyse der Sphäroide erfolgte direkt in den Spinnerflaschen. Dazu wurden die Flaschen aus dem Brutschrank entnommen und auf einen handelsüblichen Flachbettscanner (Epson Perfection 2400) gestellt. Nach kurzer Zeit sedimentierten die Sphäroide auf den Boden der Flasche. Der Flaschenboden wurde im Auflichtmodus bei

1200 dpi, 35x35 mm eingescannt, das entstandene Bild in Photoshop CS3 importiert und als Photoshop-Datei (.psd) gespeichert. Um störendes Umgebungslicht und Lichtreflexe zu minimieren wurde eine von der Instituts-Werkstatt maßgefertigte Kunststoffmaske verwendet. Die Einstellungen für das Scannen waren immer konstant. Die am Scanner eingestellte Tonwertkorrektur betrug: 25/1.0/75 (Tiefen/Mitteltöne/Lichter).

In Photoshop erfolgte mittels einer automatisch ablaufenden Aktion neben anderen Schritten die Umwandlung des RGB-Bildes in ein Graustufenbild, sowie am Ende eine manuelle Tonwertkorrektur, die innerhalb eines Versuchs konstant gehalten wurde (200/1/250; Tiefen/Mitteltöne/Lichter). Zuletzt konnten manuell Schatten und Spiegelungen mit dem Pinselwerkzeug entfernt werden. So erhielt man zum Schluss ein Bild (jpeg), welches schwarze kugelförmige Sphäroide auf weißem Hintergrund zeigte. Dieses Bild wurde mit der open source Software ImageJ analysiert. Das Programm verfügt über eine „watershed“ Funktion anhand derer angrenzende schwarze Flächen voneinander getrennt werden können. Liegen also zwei oder mehr Sphäroide beieinander, kann das Programm feine weiße Linien an den Grenzflächen ziehen und somit getrennte Flächen schaffen. Die Größen dieser Flächen werden in Pixel ausgelesen und in eine Excel-Datei kopiert. In dieser Datei erfolgt die Umrechnung der Kreisfläche in Durchmesser (mm) und Volumen (mm³) anhand der Scannereinstellung. Bei einer Auflösung von 1200 dpi entsprechen 47,24 Pixel einem Millimeter.

2.2.3 Klonogenitätstest

Dieser Test dient dem Nachweis der Koloniebildungsfähigkeit einzelner Zellen. Dazu mussten die Sphäroide zunächst zu einer Einzelzellsuspension disaggregiert werden. Zu diesem Zweck wurden pro Ansatz zwischen 5 und 15 MCTS in Reaktionsgefäße mit 1 ml 10 mM EDTA in PBS überführt. An die 15-30minütige Inkubation schloss sich eine Zentrifugation bei 300 x g für 6 min an. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 150 µl Dispase/Collagenase (1 mg/ml in D-PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺, 0,22 µm sterilfiltriert) dazugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert und dabei die Sphäroide in der Lösung hin und wieder aufgeschüttelt. Zur Verstärkung der enzymatischen Vereinzelnung folgte dann ein mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 100 µl Pipettenspitze. Nach Zugabe von 850 µl Nährmedium wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang diente der Entfernung eventuell verbliebener größerer Zellaggregate. Um das Enzym aus der Suspension zu entfernen, erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 300 x g für 6 min. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit dem Casy bestimmt. Dann folgte die Aussaat für den Klonogenitätstest von 1000 und 2000 Zellen in 4 ml Nährmedium in 21 cm² Petrischalen in Dreifachbestimmung. Die Inkubation der Schalen im Brutschrank dauerte zehn Tage. Dies entsprach der Zeit für mindestens sechs Zellteilungen, sodass aus einer

Zelle eine Kolonie von 64 Zellen entstehen kann. Als Kolonie gezählt werden Zellansammlungen von mehr als 50 Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Es folgte anschließend die Zugabe von 2,5 ml 0,03 % Methylenblau für 30 min zum Anfärben der Zellen. Auch die Färbelösung wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Nach einmaligem Spülen mit A. dest. folgte die Trocknung der Petrischalen. Für die Auswertung standen der klassische Weg des Auszählens mit dem Lichtmikroskop oder die Scanmethode, ähnlich wie bei den Spinnerflaschen, zur Verfügung. Der Hauptunterschied dabei ist die Verwendung einer anderen Kunststoffmaske und einer Art Stempel der von oben in die Petrischalen gedrückt wurde, um einen weißen Hintergrund zu schaffen. Die Maske erlaubte das Scannen von allen sechs Schalen eines Ansatzes gleichzeitig, wobei die Photoshop-Aktion das große Bild wieder in sechs Einzelbilder zerlegte. Als Kolonie wurde eine Fläche aus 180 Pixeln gewertet.

Um die Ergebnisse der Meßreihen direkt miteinander vergleichen zu können, wurde meist auf die Kontrolle normiert und so das relative klonogene Überleben eines Ansatzes angegeben.

2.2.4 Zellvitalitätstests (XTT und APH)

XTT-Test

Die Zellvitalitätstests erfolgten im 96 well-Format. Pro Ansatz erfolgte die Aussaat von $4 \cdot 10^4$ Zellen pro well in 200 μ l DMEM (ohne Phenolrot und Zusätze) und die Inkubation der Platte über Nacht im Brutschrank. Am darauffolgenden Morgen wurden pro well 40 μ l XTT Reagenz (gelöst in PBS) mit dem Dispenser zugesetzt, und die Platte wurde für 4 h im Brutschrank inkubiert. Die mitochondrialen Dehydrogenasen vitaler Zellen reduzieren den Tetrazoliumring des XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide) wobei ein orangefarbiges Formazanderivat entsteht. Die Extinktion der Probe konnte anschließend bei 450 nm photometrisch gemessen werden kann. Zusätzlich wurde als Referenzwellenlänge 620 nm gewählt.

Dieser Vitalitätstest eignete sich auch für ganze Sphäroide. Dafür wurden die Sphäroide zunächst so wie beim nachfolgenden APH-Test beschrieben vor Zugabe des XTT Reagenz behandelt.

APH-Test

Dieser Test nutzt statt der Dehydrogenasen die Aktivität der sauren Phosphatasen (APH: acid phosphatases) für eine Farbreaktion aus, wobei als Substrat PNPP (p-nitrophenyl phosphate) dient. Der Test wurde von Friedrich et al. (Friedrich et al. 2007b) als schnelles Testverfahren für die Toxizität von Substanzen gegenüber Sphäroiden etabliert.

Eine Positivkontrolle konnte optional 2 h vor Durchführung des Assays durch Zugabe von 10 % Triton X-100 zum Standardmedium generiert werden. Für die übrigen Ansätze wurden in je vier Wells einer F-Boden 96 well-Platte 100 µl PBS mit einer Mehrkanalpipette vorgelegt. Dann erfolgte die Überführung von jeweils einem Sphäroid mit 100 µl Medium in ein well. Anschließend wurde die Platte 400 x g für 10 min zentrifugiert. Nach Beendigung des Vorgangs wurden mit der Mehrkanalpipette 160 µl Überstand entfernt und 160 µl PBS zugegeben. Daran schloss sich erneut eine Zentrifugation an. Nach diesem Schritt wurden 100 µl Überstand verworfen und 100 µl Substratlösung dazugegeben. Die Hydrolyse des PNPP zu p-Nitrophenol erfolgte im Brutschrank bei 37 °C für 90 min. Danach wurden pro well 10 µl 1 N NaOH zugegeben und die Extinktion der Lösung bei 405 nm im Multiplate Reader gemessen. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Lösungen für die Zellvitalitätstests

Assaypuffer: (Stammlösung)

3 M Natriumacetat in A. dest pH 5,2

Assaypuffer: (Arbeitskonzentration, 4 Wochen haltbar bei 4°C)

0,1 M Natriumacetat

0,1 % (vol/vol) Triton X-100 in A. dest

Substratlösung: (direkt vor Benutzung ansetzen)

2 mg/ml PNPP in Assaypuffer pH 4,8

2.2.5 Elisa zur Zytokinbestimmung aus dem Zellkulturüberstand

Die Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels kommerzieller Elisa-Kits (Tabelle 3).

Tabelle 3: Elisa Kits für die Zytokinmessung

| Zytokin | Firma | Vertrieb über |
|---------------|-------------|---------------------|
| IL-2 | Biolegend | Biozol, Eching |
| IL-6 | Biolegend | Biozol, Eching |
| IFN- γ | Biolegend | Biozol, Eching |
| TNF- α | Biolegend | Biozol, Eching |
| MCP-1 | eBioscience | NatuTech, Frankfurt |

Vom Prinzip waren alle Kits gleich aufgebaut; ein Antikörper wird in der Testplatte fixiert, dann wird der Überstand zugegeben, das Zytokin bindet an den Antikörper, ein zweiter Antikörper bindet an das Zytokin, über einen Biotin-Avidin-Komplex bindet daran das Enzym HRP (horseradish peroxidase), welches nach Zugabe des Substrates TMB (tetramethylbenzidine) zu einem blauen Farbumschlag führt. Die Kits von Biolegend unterschieden sich von dem MCP-1 Kit vor allem durch das Fehlen von Puffern und Lösungen, die selbst angesetzt werden mussten (Tabelle 4).

Zunächst wurde die entsprechende Anzahl von wells in MaxiSorb 96 well-Platten am Vortag mit 100 µl Capture Antikörper (1:200 für Biolegend Kits, 1:250 für MCP-1 Kit verdünnt in Coating Buffer) befüllt und über Nacht mit Alufolie abgedeckt im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen und auf Papier abgeklopft. Dann erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 1 h auf dem Orbitalschwenker mit 200 µl Assay Diluent pro well. Während der Inkubationszeit wurden die Standards vorbereitet und die Proben entsprechend mit Assay Diluent verdünnt. Die Angaben über die Verdünnung der Standards auf 500 pg/ml (IL-2, IL-6, TNF-α) oder 1000 pg/ml (IFN-γ, MCP-1) ist chargenspezifisch und dem Kit beiliegenden Zertifikat zu entnehmen. Nach viermaligen Waschen und Abklopfen der Platte wurden die Kalibrierlösungen (Standards) und Proben in Dreifachbestimmung mit 100 µl pro well in die Platten pipettiert und für 2 h auf dem Orbitalschwenker inkubiert. Erneut schloss sich ein viermaliger Waschschrift an, bevor für 1 h 100 µl pro well des Detektionsantikörpers (1:200 für Biolegend Kits, 1:250 für MCP-1 Kit verdünnt in Assay Diluent) in die Platten gegeben wurde. Danach erfolgte erneut der viermalige Waschschrift. Daran schloss sich eine 30minütige Inkubation mit Avidin-HRP (1:1000 für Biolegend Kits, 1:250 für MCP-1 Kit verdünnt in Assay Diluent) an. Um überschüssige HRP-Moleküle zu entfernen, musste die Platte bei jedem der vier Waschschriffe für eine Minute (Biolegend Kits) oder bei jedem der sieben Waschschriffe für zwei Minuten (MCP-1 Kit) eingetaucht werden. Dann erfolgten die Zugabe von 100 µl frisch aus 1+1 Reagenz A und B gemischtes TMB und die Inkubation für 15 min im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl (Biolegend Kits) oder 50 µl (MCP-1 Kit) 2 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Multiplate Reader gemessen.

Tabelle 4: Lösungen für die Bestimmung von Zytokinen mittels Elisa

Coating Buffer:

| | | |
|--|------------------|--------|
| 8,40 g NaHCO ₃ | | |
| 3,56 g Na ₂ CO ₃ | in 1,0 l A. dest | pH 9,5 |

Assay Diluent:

| | | |
|------------------------|--|--------|
| 450 ml 1x PBS (steril) | | pH 7,4 |
| 50 ml FCS (steril) | | |

Waschpuffer:

| |
|-----------------|
| 1 l 1x PBS |
| 500 µl Tween 20 |

2.2.6 Histologische Analysen

Für die immunhistologischen Färbungen an Sphäroiden mussten diese zunächst mit flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Dazu wurden die Sphäroide in Mehrwellplatten überführt, aus denen dann das Medium mit einer gläsernen Pasteurpipette abgesaugt wurde.

In einem mit Alufolie ausgeschlagenen Gefäß erfolgte die Vorkühlung der Kryoröhrchen und eines Skalpells in flüssigem Stickstoff. Mit diesem Skalpell wurden die Sphäroide nur leicht berührt und froren sofort an der Spitze fest. So konnten sie in die Kryoröhrchen überführt werden, die dann bei -80 °C gelagert wurden. Um Sphäroide im Kryotom zu schneiden mussten sie in TissueTek eingebettet werden. Dies geschah in einem umgebauten Kryotom bei -20 °C. Auf ein Deckgläschen wurden mehrere TissueTek-Tropfen verteilt. Mit einer Federpinzette wurde zunächst in einen der Tropfen getaucht, dann ein Sphäroid berührt, dadurch aufgenommen und schließlich in den Tropfen überführt. Waren alle Tropfen mit je einem Sphäroid belegt, wurde das Deckgläschen auf einen kleinen Messingblock gelegt um das Durchfrieren zu beschleunigen. Die gefrorenen Tropfen wurden dann zurück in die Kryoröhrchen transferiert um sie erneut bei -80 °C zu lagern oder direkt zum Schneiden zu verwenden.

Das Erstellen von Kryoschnitten erforderte zuerst das Auflockern eines Sphäroid-TissueTek-Tropfens auf einen Probenhalter des Mikrotoms. Anschließend wurden 10 µm dicke Schnitte von den Sphäroiden hergestellt und jeweils fünf auf einen SuperFrost plus Objektträger aufgenommen. Dabei erfolgte eine Nummerierung der Objektträger, damit sich nachvollziehen ließ, ob es sich um Rand- oder Medianschnitte handelte. Zur Übersicht der Qualität der Objekte erfolgte die Anfertigung eines Schnittprotokolls. Die Objektträger wurden dann über Nacht luftgetrocknet und anschließend bei -20 °C eingefroren oder direkt für eine Färbung eingesetzt.

Vor einer Färbung erfolgte die Acetonfixierung der Schnitte für 5 min bei -20°C und eine anschließende Lufttrocknung, die den Schnitten das letzte verbliebene Wasser entzog. Auf den trockenen Objektträgern wurden die einzelnen Sphäroide mit einem Fettstift (PapPen) voneinander abgegrenzt. Bei allen Schritten wurden je 15 µl Lösung pro Sphäroidschnitt eingesetzt und alle Inkubationsschritte in der feuchten Kammer durchgeführt. Danach erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 3 % BSA in PBS. Nach kurzem Waschen in PBS, schloss sich die ebenfalls einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper an. Wieder erfolgte ein Waschschriff in PBS. Danach wurden endogene Peroxidasen mit 3 % H₂O₂ in PBS mit einer 10minütigen Inkubation abgesättigt. Nach einem PBS Waschschriff erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für 30 min. Dann wurde erneut in PBS gewaschen und anschließend das Substrat DAB⁺ (Diaminobenzidin) für 10 min zugesetzt. Nach Beendigung der immunhistologischen Färbung schloss sich die Kerngegenfärbung mit Hämalaun an. Dazu wurden die Objektträger zunächst in A. dest gewaschen und dann für 3 min in Hämalaun inkubiert. Danach erfolgte das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 5 min. Anschließend wurden die Objektträger nochmals in A. dest. gewaschen und danach je 10mal in Küvetten einer aufsteigenden Isopropanolreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) getaucht.

Daran schloss sich eine Inkubation von jeweils 5 min in 100 % Isopropanol und drei Küvetten mit Xylol an. Abschließend wurden die Objekte dann mit Roti-Histokitt II eingedeckt und über Nacht im Abzug luftgetrocknet. Details zu den eingesetzten Antikörpern sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Für die histologischen Färbungen verwendete Antikörper

| <u>PrimärAK</u> | | | | | |
|--------------------------------------|------------|----------------------|-------------|-----------|------------------|
| Antigen | Klon | Verdünnung in PBS | Bestellnr. | Firma | Vertrieb über |
| CD2 | RPA-2.10 | 1:500 | 300201 | BioLegend | Biozol, Eching |
| CD4 | OKT4 | 1:500 | 317401 | BioLegend | Biozol, Eching |
| CD8 | HIT8a | 1:1000 | 300901 | BioLegend | Biozol, Eching |
| CD14 | HCD14 | 1:500 | 325601 | BioLegend | Biozol, Eching |
| CD45 | HI30 | 1:500 | 304001 | BioLegend | Biozol, Eching |
| CD64 | 10.1 | 1:50 | 305001 | BioLegend | Biozol, Eching |
| Ki67 | MIB-1 | 1:50 | M 7240 | Dako | Dako, Hamburg |
| <u>SekundärAK</u> | | | | | |
| donkey anti mouse (HRP gekoppelt) | polyklonal | 1:100 | 715-035-150 | Dianova | Dianova, Hamburg |

Zur Beurteilung der Apoptosen wurde eine FragEL-Färbung durchgeführt. Dabei bindet das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) an freie 3'OH-Enden und ergänzt Fluorescein-markierte Nukleotide, die durch Fluoreszenzanregung im Objektschnitt sichtbar gemacht werden können.

Die Objekte wurden 15 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit PapPen umrandet. Für die Permeabilisierung wurde jedes Objekt für 10 min mit 30 µl Proteinase K (20 µg/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen für 2 min mit TBS (Tabelle 6). Für eine Positivkontrolle wurde ein Objekt mit DNase I (aus M&N NucleoSpin RNA II Kit, Verdünnung 1:750) in TBS mit 1 mM MgSO₄ für 20 min bei RT inkubiert und erneut in TBS gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation der Objekte mit Äquilibriumspuffer (1:5 in Aqua dest. verdünnt) für 30 min bei RT an. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Puffer mit der Pipette abgesaugt und direkt danach wurden 30 µl TdT Reaktionsmix (1:20 TdT Enzym und TdT Labeling Reaktionsmix) auf die Objekte gegeben. Anschließend wurden sie für 60-90 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein nur mit Aqua dest. bedecktes Objekt. Es folgte dreimaliges Waschen in TBS. Daran schlossen sich das Eindecken der Objekte mit Fluorescein FragEL Mounting Medium, sowie die Versiegelung der Ränder des Deckgläschens mit Nagellack an. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Tabelle 6: TBS-Puffer

10xTBS-Puffer

| | |
|---------------|-------------------------|
| 61g Tris-Base | |
| 175,3 g NaCl | ad 1 l H ₂ O |
| | pH 7,6 |

2.2.6.1 Auswertung der Sphäroidschnitte mit Photoshop und Image J

Von den immunhistologischen Färbungen wurden mit dem Zeiss Axiotron Mikroskop Photographien mit einer Größe von 3000 x 2208 Pixel (105,83 cm x 77,89 cm) mit 72 dpi erstellt und als TIFF-Datei gespeichert. Mit einer eigens geschriebenen Photoshopaktion wurden die Bilder auf eine Größe von 3000 x 1995 Pixel (25,4 cm x 16,89 cm) mit 300 dpi umgewandelt. Im weiteren Ablauf der Photoshopaktion erschien ein Auswahlquadrat, welches zentral auf das Sphäroid gezogen wurde. Es hat eine Größe von 1417 x 1417 Pixel (12 cm x 12 cm) mit 300 dpi. Daraufhin erschien ein Auswahlkreis, mit dem das Sphäroid markiert wurde. Durch Invertieren konnte der gesamte Hintergrund mit einer einheitlichen Farbe gefüllt werden. Die so vorbereiteten Bilder im RGB-Modus konnten weiter mit ImageJ analysiert werden. Dafür wurde von Prof. Schömer von der Informatik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und seiner Bachelorstudentin Daniela Tovar ein ImageJ PlugIn "Infiltration Depth" geschrieben (Tovar 2009). Dieses erkennt getrennt die blauen und die braunen Zellen mit den jeweiligen Flächen sowie die Position der Zellen innerhalb des Sphäroidschnitts. Daraus lässt sich der Anteil der positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl eines Schnittes bestimmen oder ein Infiltrationsprofil erstellen (Ehlert 2009).

2.2.6.2 Analyse der PKH-26 markierten PBMC

Analyse der PBMC im Kokulturüberstand

Um die PBMC-Anzahl im Kokulturüberstand zu bestimmen wurden täglich 30 µl Probe entnommen. Für die Analyse standen zwei Methoden zur Auswahl; die Zählung mit der Neubauerkammer und die Zellzahlbestimmung mit dem CASY. Bei beiden Methoden bestand das Problem darin, nach einer längeren Kulturdauer Abwehrzellen, Tumorzellen und Zelldebris nicht mehr voneinander unterscheiden zu können. Daher wurden die Abwehrzellen vor Versuchsbeginn mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der sich in die Zellmembran einlagert und entsprechend bei Zellteilungen auch an die Tochterzellen weitergegeben wird.

Die Anzahl der so markierten PBMC wurde dann mit der Neubauerkammer bestimmt. Dazu wurden je ein Durchlichtbild und an identischer Stelle ein Fluoreszenzbild von acht Quadraten der Kammer mit dem Zeiss Axiotron bei 10x Vergrößerung aufgenommen. Das Gleiche wurde für die anderen acht Quadrate wiederholt. Anschließend erfolgten die Zusammensetzung der beiden Durchlichtbilder mit je acht Quadraten und die Überlagerung mit den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen in Photoshop CS3 (Abbildung 9).

Alternativ wurde mit dem Keyence-Mikroskop in der 5x Vergrößerung die gesamte Zählkammer mit 16 Quadraten fotografiert. Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls in Photoshop CS3. Dieses Programm verfügt über ein Zählungswerkzeug, bei dem durch Anklicken Objekte markiert und auf diese Weise gezählt werden können.

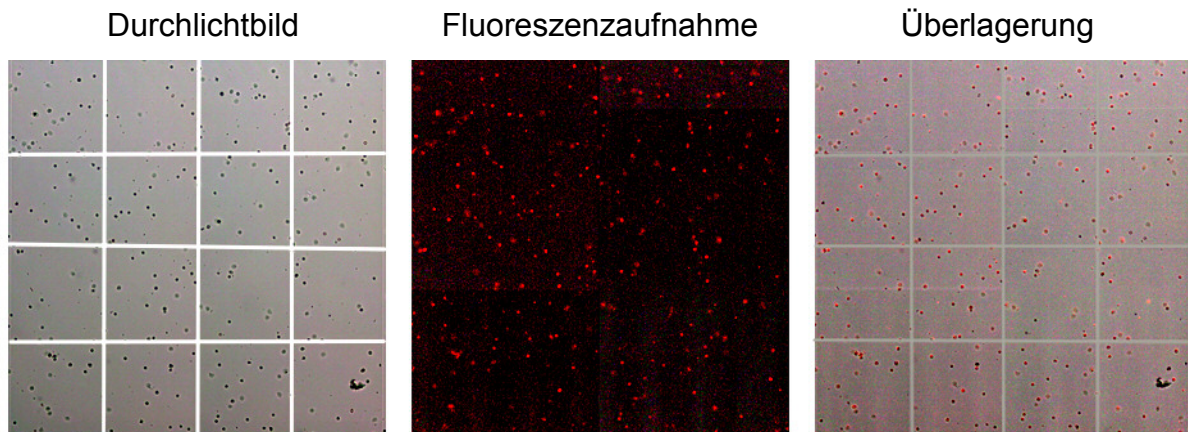


Abbildung 9: Quantifizierung der PKH-26 markierten PBMC mit der Neubauerkammer. Der Kokulturüberstand wurde in die Neubauerkammer gegeben und ein Durchlichtbild aufgenommen. Danach wurden die rot-fluoreszierenden Abwehrzellen fotografiert. Nach der Überlagerung beider Bilder in Photoshop CS3 wurden alle die Zellen gezählt, die auch die rote Fluoreszenz trugen.

Analyse der markierten PBMC in Sphäroidschnitten

Von den Sphäroiden wurden Kryoschnitte angefertigt. Dabei wurde unnötige Lichteinstrahlung zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffs vermieden. Nachdem die Schnitte 1 h getrocknet waren, wurden sie direkt mit einem Eindeckmittel (Dianova), welches DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) beinhaltet, bedeckt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Versiegelung des Deckgläschens mit Nagellack. Von den Objekten wurden anschließend mit dem Mikroskop (Keyence) über die sogenannte Stack-Analyse Bilder angefertigt.

2.2.7 Molekularbiologische Analysen

2.2.7.1 RNA Extraktion und cDNA Synthese

RNA Extraktion, Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA

Für die Isolation von RNA aus Sphäroiden der Kokulturansätze, mussten die Sphäroide zunächst fünfmal mit PBS gewaschen werden, um eventuell anhaftende PBMC zu entfernen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (400 x g, 8 min) wurde das PBS restlos entfernt und das Sphäroidpellet bei -80 °C eingefroren. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 700 µl Lysepuffer mit β-Mercaptoethanol (1:100) des NucleoSpin RNA II Kits (Macherey & Nagel) und durch fünfmaliges Aufziehen mit einer 0,9 mm Nadel. Anschließend wurde das Zelllysat durch eine NucleoSpin Filtereinheit bei 11000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde durch Zugabe des gleichen Volumenteils 70%igem Ethanol gefällt. Danach erfolgte die Bindung des Präzipitats an die NucleoSpin RNA-Säule durch Zentrifugation bei 11000 x g für 30 s. Zum Waschen der Säule wurden dann 350 µl MDB Puffer zugegeben und bei 11000 x g für 1 min zentrifugiert. Da bei dieser Form der Extraktion zum Teil auch DNA an die Säule binden kann, wurde ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Dazu

wurden 10 μl rDNase I mit 90 μl Reaktionspuffer für die rDNase gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nun schlossen sich mehrere Waschschrte an: (i) zuerst mit 200 μl RA2 und zentrifugieren für 30 s bei 11000 x g, (ii) dann mit 600 μl RA3 und zentrifugieren für 30 s bei 11000 x g und (iii) schließlich 250 μl RA3 und zentrifugieren für 2 min bei 11000 x g. Dann wurde die Säule auf ein neues nucleasefreies 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, für die Elution wurden 50 μl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, mit abschließendem Zentrifugieren für 1 min bei 11000 x g. Die RNA musste sofort danach auf Eis gestellt und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt photometrisch am Nanodrop-Gerät. Dazu wurden 1,5 μl Probe auf den Probenkopf pipettiert und aus der Extinktion bei 260 nm die Konzentration sowie aus dem Verhältnis von 260 und 280 nm die Reinheit der Lösung bestimmt. 1 OD (optische Dichte) bei 260 nm entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$ und ein Quotient aus 260 und 280 nm von 1,8 bis 2,0 steht für reine RNA.

Als weitere Qualitätskontrolle wurden die Proben auf ein MOPS-Gel aufgetragen. Vorbereitend sollten Gelkammer, Gießschale und Kämmen für 1 h in 0,1 M NaOH einlegt und dann mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ abgespült werden. Zum Gießen des Gels wurden 0,5 g Agarose abgewogen und mit in 36 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ und 5 ml 10x MOPS bis zur Schlierenfreiheit in der Mikrowelle aufgekocht. Danach erfolgte unter dem Abzug die Zugabe von 9 ml Formaldehyd, das Abkühlen der Lösung auf etwa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, sowie das Gießen und Aushärten des Gels.

Der nächste Schritt bestand im Ansetzen eines Proben-Mastermixes aus 15 μl Formamid, 5 μl Formaldehyd, 3 μl 10x MOPS und 6 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ pro Ansatz. Je 29 μl dieses Mastermixes wurden mit 1 μl RNA der jeweiligen Probe versetzt, für 15 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ im PCR (Polymerasekettenreaktion)-Cycler denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Daran schloss sich die Zugabe von 2 μl Ethidiumbromid (1:10 Verdünnung) und eine 2minütige Inkubation auf Eis an. Nach Zusatz von 3 μl 10x RNA-Ladepuffer folgte das Auftragen der gesamten Probe auf das Gel. Die Elektrophorese wurde dann bei 60 V, 400 mA, 100 W durchgeführt. Die Analyse der Banden erfolgte mit der UV-Einheit. Reine, intakte RNA zeigt zwei Banden; die 18 und die 28 S Bande, wobei die 28 S Bande über der 18 S Bande liegt und etwa doppelt so stark ist. Details der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Analysen

0,1% DEPC-Wasser: (über Nacht auf einer Magnetrührplatte rühren, dann autoklavieren)

1 ml DEPC in 1 l A. dest

10x MOPS-Puffer: (dunkel bei 4 °C lagern und bei Gelbfärbung verwerfen)

0,2 M MOPS säurefrei
0,05 M Natriumacetat
0,01 M EDTA ad 500 ml H₂O_{DEPC} pH 7,0

10x RNA-Gelladepuffer: (bei -20°C lagern)

50 % (v/v) Glycerin
1 mM EDTA
0,4 % (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml H₂O_{DEPC}

cDNA Synthese

Zunächst wurde berechnet, welches Volumen 1 bzw. 2 µg RNA entspricht. Dann wurde dieses mit 1 µl oligo(dT) oder Hexamer-Primern des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) sowie dem Differenzvolumen zu 12 µl mit H₂O_{DEPC} gemischt. Dieser Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 70 °C im PCR Cycler denaturiert, das Kondensat kurz abzentrifugiert und dann auf Eis gestellt. Danach erfolgte der Ansatz des Mastermixes aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, 2 µl dNTP Mix und 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor pro Ansatz. Davon wurden jeweils 8 µl in jeden Reaktionsansatz gegeben und sorgfältig gemischt, wobei Blasenbildung vermieden werden sollte. Schließlich fand die reverse Transkription im PCR Cycler mit folgendem Programm statt:

37 °C 5 min
42 °C 60 min
70 °C 10 min
4 °C Pause

Danach wurde das Kondensat kurz abzentrifugiert und die cDNA bei -20 °C gelagert.

2.2.7.2 Semiquantitative PCR

Für den Nachweis von IL-2 auf mRNA-Ebene wurde die Methode der semiquantitativen PCR angewendet. Dazu wurde zunächst folgender Mastermix angesetzt:

| Reagenz | Volumen (µl) |
|--|---------------------|
| MgCl ₂ (Fermentas) | 2,5 |
| 10x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas) | 2,5 |
| Taq Polymerase (#EP0402, 5 u/µl, Fermentas) | 0,25 |
| dNTP-Mix (PeqLab) | 0,5 |
| Primer sense (100 pmol/µl) | 1,0 |
| Primer anti-sense (100 pmol/µl) | 1,0 |
| A.dest | 16,75 |

Pro Ansatz wurden dann 24,5 µl Mix in 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und 0,5 µl cDNA (50 ng) zugegeben. Anschließend erfolgte die PCR entsprechend folgendem Programm:

| Schritt | Dauer | Temperatur | |
|---------------------|--------|------------|-------------|
| Start-Denaturierung | 2 min | 94 °C | } 40 Zyklen |
| Denaturierung | 30 s | 94 °C | |
| Annealing | 30 s | 59 °C | |
| Extension | 1 min | 72 °C | |
| End-Elongation | 10 min | 72 °C | |

Während das Programm lief, wurde ein 1,2%iges Agarosegel für eine kleine Gelkammer hergestellt. Dazu wurden 0,6 g Agarose abgewogen und mit 50 ml 0,5x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, bis die Lösung schlierenfrei war. Nach Abkühlen der Agarose auf 65-70 °C wurde das Gel gegossen und nach dem Erstarren in die Gelkammer gesetzt, die mit 0,5x TBE Puffer befüllt wurde. Von den PCR-Proben wurden 5 µl mit 1 µl Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurde der 100 kB Ladder von Fermentas verwendet. Dann schloss sich der Start der Elektrophorese bei 120 V an. Das Gel wurde nach dem Lauf für etwa 3-5 min in das Ethidiumbromid-Bad (300 ml H₂O +200 µl EtBr) gelegt und schließlich nach dem Färben in der UV-Kammer fotografiert. Die Banden konnten danach densitometrisch mit ImageJ ausgewertet werden. Die primer-Sequenzen sind in Tabelle 8, die Pufferzusammensetzung ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 8: IL-2 Primersequenzen

IL-2 Primer

| | |
|----------------|---|
| Sequenz | NM_000586.2 |
| IL-2 sense | 3'-295-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-319-5' |
| IL-2 antisense | 3'-752-GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC-728-5' |
| Produktgröße | 458 bp |

Tabelle 9: TBE-Puffer

TBE-Puffer (5x):

| | | | |
|---------|------------|----------------|----------|
| 54,0 g | Tris-Base | | |
| 27,5 g | Borsäure | | |
| 20,0 ml | 0,5 M EDTA | ad 1 l A. dest | (pH 8,0) |

2.2.7.3 Real Time-RT-PCR mit Sybr Green

Die quantitative oder real time-PCR mit Sybr Green verläuft ähnlich einer klassischen PCR, nur wird die Menge an Sybr Green detektiert, die in doppelsträngigen Bereichen interkaliert. Dabei entspricht die Menge der PCR-Produkts der Stärke des Fluoreszenzsignals. Als Maß dient der sog. CT-Wert. Er gibt die Zykluszahl an, in der das Signal den Schwellenwert (CT: threshold cycle) erstmals überschreitet. Für die Auswertung fand die $\Delta\Delta$ CT-Methode Anwendung. Dazu wurde vom CT-Wert des Ziel- und Haushaltsgens der CT-Wert des Kalibrators abgezogen. Von dem so berechneten Δ CT-Wert des Zielgens wurde der Δ CT-

Wert des Haushaltsgens abgezogen, wodurch sich der $\Delta\Delta CT$ -Wert ergab. Dieser wurde mit negativem Vorzeichen in die Formel $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ eingesetzt, wodurch man eine Aussage über die relative Expression der Ziel-mRNA erhält.

Haushaltsgen:

Für die Anwendung der Methode ist die Analyse eines Haushaltsgens (HKG, house keeping gene) erforderlich. Im besonderen Fall der Kokultur muss dieses HKG von beiden Zelltypen gleich stark exprimiert werden. Um ein solches HKG zu finden, wurde eine TaqMan Express Human Endogenous Control Plate mit 32 HKG verwendet. Anhand von Hexamer-geprägten cDNAs von drei Proben ([1] E593-Sphäroide, [2] PBMC und [3] E593+PBMC+ertumaxomab) wurde PUM1 als HKG mit einem CT-Wert von $23,7 \pm 0,7$ identifiziert. Dieses wurde mit oligo(d)T geprägter cDNA mit Sybr Green bestätigt.

Validierung:

Für die Validierung wurden 0,1, 1, 10 und 100 ng einer Probe in die qPCR mit den spezifischen Primern für die Zielgene sowie dem Haushaltsgen eingesetzt. Die Differenz aus den jeweiligen CT-Werten wurde dann grafisch gegen die logarithmischen Template-Mengen aufgetragen. Betrug die Steigung der Geraden Werte zwischen -0,1 und 0,1 wies dies darauf hin, dass die PCR für beide Gene gleich effizient abläuft.

Die verwendeten Primer wurden als Lyophilisate bezogen (Tabelle 10) und vor Verwendung in TE-Puffer (Tabelle 11) rekonstituiert, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Der Mastermix wurde entsprechend zusammenpipettiert (Tabelle 12), und $24,0\text{ }\mu\text{l}$ wurden in spezielle qPCR Platten (abi) vorgelegt mit anschließender Zugabe von $1\text{ }\mu\text{l}$ (50 ng) cDNA. Vor Start des Programms erfolgte eine kurze Zentrifugation (quick run) um das gesamte Volumen am Boden der wells zu sammeln.

QuantiFast ist so konzipiert, dass alle Primer unabhängig ihrer errechneten Annealingtemperatur bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ an ihre komplementäre Sequenz binden. Das Programm am abi7300 lief nach Angaben von Qiagen ab (Tabelle 13).

Tabelle 10: Verwendete Primer für die qPCR (QuantiTect Primer Assays)

| Primer | Bestellnummer | Firma |
|---------------|----------------------|----------------|
| IL-2 | QT00015435 | Qiagen, Hilden |
| CD4 | QT00005264 | Qiagen, Hilden |
| CD8 | QT00014826 | Qiagen, Hilden |
| CD2 | QT00099106 | Qiagen, Hilden |
| CD14 | QT00208817 | Qiagen, Hilden |
| CD45 | QT01869931 | Qiagen, Hilden |
| HMBG1 | QT01002190 | Qiagen, Hilden |
| PUM1 | QT00029421 | Qiagen, Hilden |

Tabelle 11: TE-Puffer

TE-Puffer

| | | |
|----------|------------|--------|
| 10 ml | 10 mM Tris | pH 8,0 |
| 20 µl pH | EDTA | pH 8,0 |

Tabelle 12: Mastermix für die qPCR mit SYBR Green

| Reagenz | Volumen | Kit | |
|-------------------------------|---------|----------------|--------|
| QuantiFast | 12,5 µl | 204054 | Qiagen |
| 10x Primer | 2,5 µl | s. Tabelle 10 | Qiagen |
| H ₂ O (RNase frei) | 9,0 µl | QuantiFast Kit | Qiagen |

Tabelle 13: Programmablauf der qPCR mit abi Lightcycler

| Schritt | Dauer | Temperatur | |
|-----------------------|-------|------------|-------------|
| Start-Denaturierung | 5 min | 95 °C | } 40 Zyklen |
| Denaturierung | 10 s | 95 °C | |
| Annealing + Extension | 30 s | 60 °C | |

2.3 Metabolische Analysen

Diese Analysen wurden vorrangig innerhalb eines Teilprojekts von WeiXiao Sha im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt (Sha 2010) und sind im Folgenden nur kurz umschrieben.

2.3.1 Relative Quantifizierung von Enzymen und Transportern des Glukosestoffwechsels mittels In-cell Western

Das Prinzip eines In-cell Westerns basiert auf dem einer immunhistologischen Färbung mit Fixierung, Blocken, Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper. Jedoch erfolgten die Analysen an Zellen, die in 96 well-Platten fixiert wurden. Am Ende der Färbeprozedur setzt das Enzym HRP, das an den Sekundärantikörper gebunden ist, das Substrat TMB zu einem blauen Farbstoff um. Dabei ist die Intensität der Farblösung proportional zur Menge des analysierten Proteins. Der Vergleich verschiedener Proben erfolgte über eine Normalisierung der Werte hinsichtlich der Tubulinexpression.

2.3.2 Laktatbestimmung aus dem Kulturüberstand

Für die Laktatbestimmung wurde ein Kit der Firma R-Biopharm (#10139084035) verwendet. Die Laktatstandards (0-10 mM) und die zu messenden Proben wurden in die Reaktionskammern einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluss wurden mit dem Dispenser 110 µl einer Reaktionslösung hinzugegeben und die Extinktion bei 340 nm (E1) gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe der LDH-Lösung und die Messung von E2 bei 340 nm nach 30 minütiger Inkubation. Aus ΔE konnte dann nach Lambert-Beer die Konzentration von NADH und damit indirekt die Konzentration von Laktat bestimmt werden.

2.3.3 Messung der Sauerstoffsverbrauchs- und Azidifizierungsrate mit dem Seahorse XF Analyzer

Das grundlegende Messprinzip des XF Analyzer basiert auf der charakteristischen Fluoreszenzlöschung durch Wasserstoffprotonen und Sauerstoffmolekülen (Quencher). Jede Messkammer der speziellen 24 well Platten besitzt zwei separate Fluorophore, deren Fluoreszenzsignal selektiv durch einen der Quencher gelöscht wird. Der Anstieg der Protonenkonzentration in der Messkammer als Indikator für die glykolytische Aktivität der Zellen wird hauptsächlich von der Dissoziation des Glykolyseproduktes Milchsäure zu Laktat und H^+ verursacht. Die zeitliche Veränderung der Protonenkonzentration wird als extrazelluläre Azidifizierungsrate (ECAR) bezeichnet. Der Sauerstoffverbrauch als Messgröße für die oxidative Phosphorylierung (OxPhos) wird über das Fluoreszenzquenching durch Sauerstoff registriert. Steigt beispielsweise der Sauerstoffverbrauch der Zellen an, erfolgt ein verringertes Quenching. Die Verringerung des Sauerstoffgehaltes in Abhängigkeit von der Zeit wird als Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) definiert.

2.4 Statistik

Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen (SD) oder die Standardabweichung des Mittelwertes ($SEM = MW/\sqrt{n}$), wie jeweils in den Abbildungs-/Tabellenlegenden angegeben. Für die Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde ein zweiseitiger T-Test mit Excel durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Vorversuche

3.1.1 Vergleich der TAA-Expression bei FaDu- und FaDu E593-Sphäroiden

Die Versuche mit catumaxomab wurden vorrangig an FaDu-Sphäroiden durchgeführt. Diese Zelllinie erwies sich durch ihre starke EpCAM Expression (Abbildung 10) und die kompakte Sphäroidbildung als sehr gut geeignet. Für die ertumaxomab Versuchsreihen wurde intensiv nach einer Her2/neu positiven Brustkrebszelllinie gesucht. Diese Linie sollte zum einen runde, über mehrere Tage stetig wachsende Zellaggregate ausbilden, zum anderen nicht zytokinsensitiv sein. Dies bedeutet, dass nicht allein durch Gegenwart von PBMC Effekte hervorgerufen werden, sondern die Veränderungen bei den Sphäroiden durch Zugabe des therapeutischen AK auch seiner Wirkung zuordnen zu können.

Diese gewünschte Zelllinie konnte nicht ermittelt werden und so wurde als Alternativstrategie die bewährte FaDu-Linie genetisch manipuliert (= FaDu E593), sodass sie Her2/neu überexprimiert (Abbildung 10).

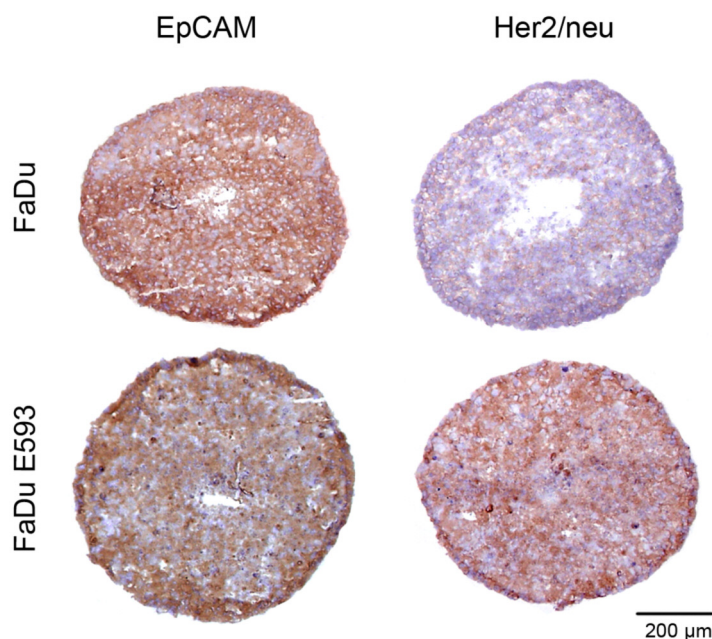


Abbildung 10: Immunhistologische Färbung von EpCAM und Her2/neu an Sphäroidschnitten. FaDu und FaDu E593-Sphäroidschnitte DAB+ gefärbt mit HO-3 (anti-EpCAM) und 2502A (anti-Her2/neu) und Hämalaun als Kerngegenfärbung. Beide Zelllinien sind stark EpCAM positiv, während Her2/neu sich nur vereinzelt bei FaDu, jedoch stark bei den transfizierten FaDu-Zellen nachweisen ließ.

3.1.2 Optimierung der Scan-Methode zur Erfassung des Volumenwachstums

Für die Erfassung der therapeutischen Wirksamkeit der bispezifischen, trifunktionalen AK catumaxomab und ertumaxomab ist das Volumenwachstum ein aussagekräftiger Parameter,

vergleichbar der Tumorgroße oder dem Tumolvolumen *in vivo*. Um die Größe der Sphäroide zu analysieren, kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Die traditionelle Methode ist die Vermessung der MCTS in zwei senkrecht aufeinander stehenden Achsen mittels eines Okularmikrometers über das Lichtmikroskop. Die Methodik ist sehr zeitaufwendig und benutzerabhängig. Daher wurde von Björn Rodday im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit (Rodday 2010) eine Scan-basierte Methode etabliert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch technische Details ergänzt. So war es mit den originalen Rührwerken und Magneten notwendig, die Sphäroide vor dem Scannen an den Rand des Flaschenbodens zu bringen (Abbildung 11 A). Denn die Schwierigkeit war, dass Sphäroide und Rührer eine ähnliche helle Farbe haben und bei der Umwandlung zum Graustufenbild der komplette Rührer auch schwarz gefärbt wurde und sich dort befindende Sphäroide für die Auswertung verloren gingen. Das Problem konnte durch Verwendung von aus schwarzem PEEK gefertigten Rührwerken mit blauen Magnetrührern gelöst werden (Abbildung 11 B).

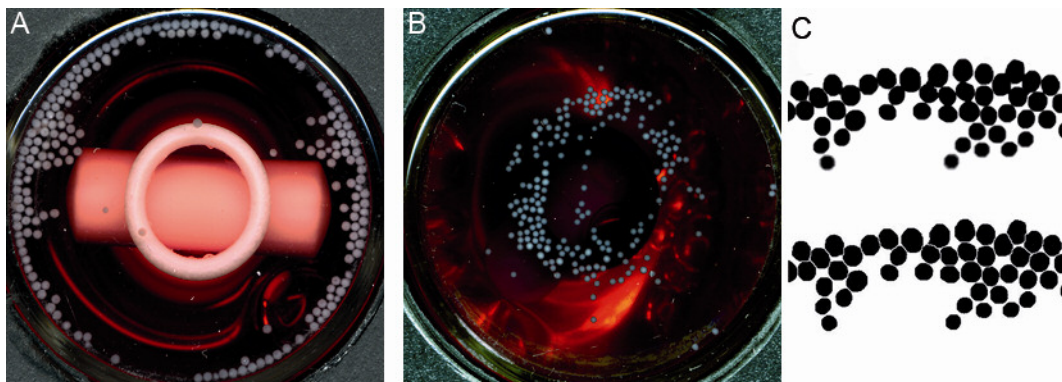


Abbildung 11: Die Optimierung der Scan-Methode. Die Verbesserung der Methode erfolgte durch die Verwendung dunkel gefärbter Magnete und Magnetrührer. Somit konnten die Sphäroide beim Scannen statt nur am Flaschenbodenrand (A) auch in der Mitte des Bodens (B) liegen. Nach dem Scannen erfolgt die Umwandlung zum schwarz-weiß Bild und die Trennung zusammen liegender Sphäroide durch den „watershed“ Algorithmus des ImageJ Programms (C).

3.1.3 Vergleich der Scan-Methode mit dem Erfassen der Sphäroidgrößen über das Okularmikrometer

Für die Sphäroidversuche mit den beiden Zelllinien FaDu und der mit Her2/neu transfizierten Zelllinie FaDu E593 kamen initiale Zellzahlen von 5000 oder 10000 Zellen zum Einsatz. So wurde im folgenden Versuch der Durchmesser der Sphäroide beider Linien mit drei verschiedenen Startzellzahlen über eine Woche mittels beider Methoden vergleichend bestimmt (Abbildung 12). Der Versuch hat gezeigt, dass die FaDu-Zelllinie im Vergleich zu E593 bei gleichen Ausgangszellzahlen im Mittel auf den Durchmesser bezogen 18 % größere Sphäroide ausbildet. Darüber hinaus sind die Sphäroide bei initialer Zellzahl von 10000 bei FaDu 20 % und bei E593 rund 12 % größer als bei 5000 Ausgangszellen. Wurde die Sphäroidgröße mit dem Okularmikrometer bestimmt, waren die ermittelten Durchmesser im Mittel etwa 9 % größer als bei der Scan-Methode. Insgesamt betrug die Abweichung

ERGEBNISSE

beider Messmethoden zwischen 15 % und 4 % und korrelierte invers mit zunehmender Sphäroidgröße. In Bezug auf das Sphäroidvolumen war die Abweichung rechnerisch bedingt rund 3fach größer, da das Volumen über die Formel $V_{\text{Kugel}} = 1/6\pi d^3$ bestimmt wurde.

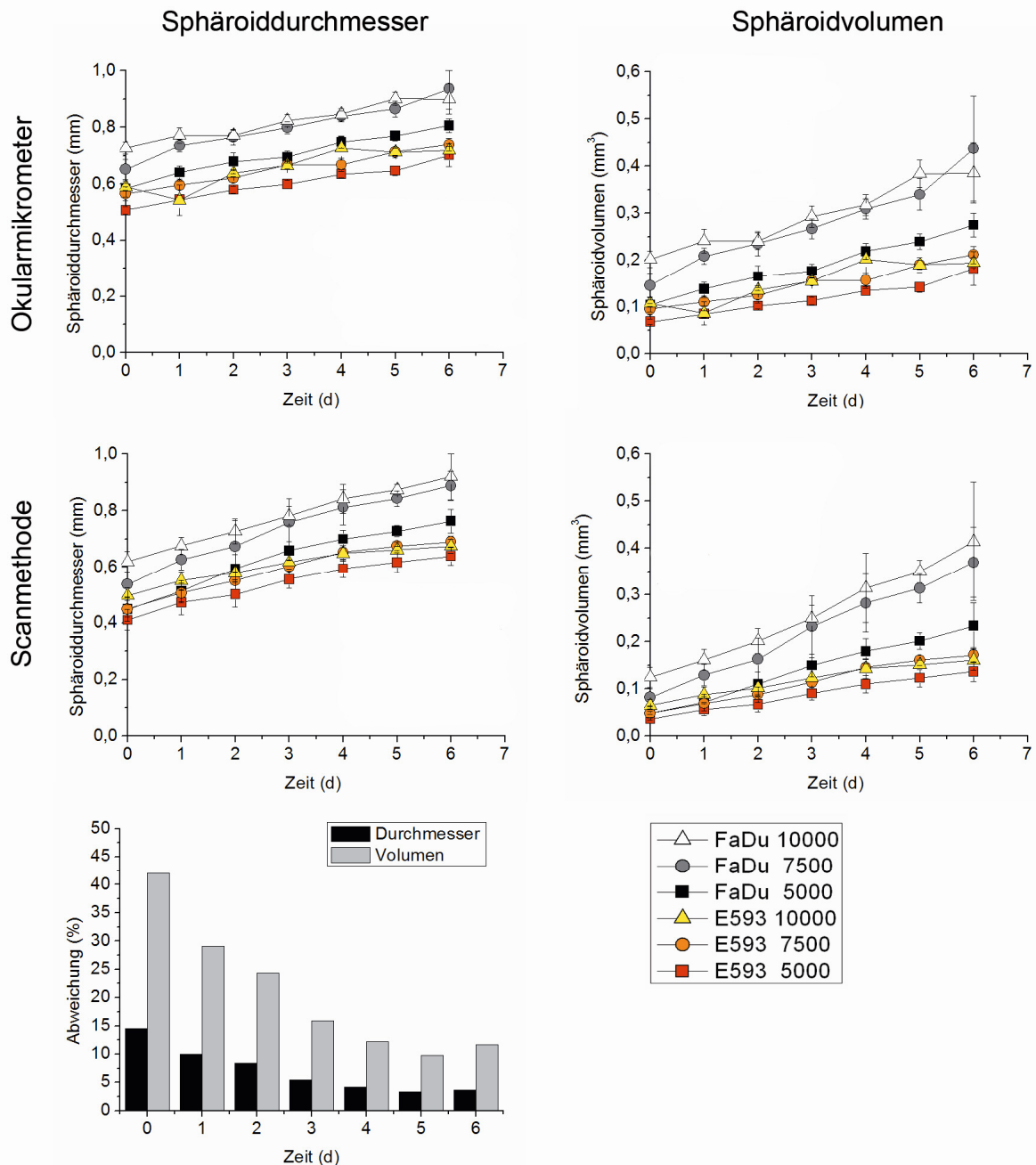


Abbildung 12: Vergleich der beiden Methoden zur Sphäroidgrößenbestimmung bei den beiden Zelllinien mit drei verschiedenen Ausgangszellzahlen. Dabei war zunächst zu beobachten, dass FaDu trotz gleicher Startzellzahl nach acht Tagen (=Versuchsstart, d0) im Mittel auf den Durchmesser bezogen 18 % größere Sphäroide ausgebildet hat. Die Abweichung in den Ergebnissen aus beiden Methoden nahm mit steigender Sphäroidgröße von etwa 15 % nach sieben Tagen bezogen auf den Sphäroiddurchmesser auf 4 % ab (Mittelwerte \pm SD; Okularmikrometer n=10 Sphäroide mit je zwei senkrecht aufeinander stehenden Achsen gemessen; Scan n=200 Sphäroide, N=2 Spinnerflaschen).

3.1.4 Abhängigkeit der Antikörperwirkung von den PBMC

Für die Kokulturen war es notwendig, für jeden Versuch die PBMC aus einem anderen frischen buffy coat zu isolieren. So war die Frage, in wieweit die Wirkung der trifunktionalen AK vom PBMC-Spender abhängt. Daher wurde ein identisches Experiment mit drei verschiedenen Abwehrzellspendern durchgeführt (Abbildung 13 A). Dazu wurden FaDu-Sphäroide verwendet, die mit 10000 Zellen initiiert, für sieben Tage in der 96 well-Platte und über weitere sieben Tage in der Spinnerflasche kultiviert wurden. Es zeigte sich ein Variationskoeffizient der drei PBMC-Kurven von weniger als 11 % und in Kombination mit catumaxomab von weniger als 20 %. An Tag 9 betrug der Unterschied zwischen FaDu und FaDu+PBMC rund 35 %. Darüber hinaus zeigt die Abbildung, dass reine AK-Gabe ohne PBMC die Sphäroide nicht beeinflusst. Die beiden Kontrollkurven liegen dicht beieinander und folgen einem Gompertz Fit (Kunz-Schughart et al. 1996), der das Tumorwachstum *in vivo* (Winsor 1932) beschreibt.

Nach einer dreitägigen Latenzzeit war der Beginn der Tumorsphäroidlyse durch catumaxomab deutlich erkennbar. Diese Beobachtung zieht sich durch alle Versuche mit den trifunktionalen AK. Für Versuche, die mit PBMC des identischen Spenders durchgeführt werden sollten, war es unabdingbar, die PBMC bis zu ihrer Verwendung einzufrieren. Daher musste geprüft werden, ob zwischenzeitlich eingefrorene PBMC in Kombination mit den therapeutischen AK die gleichen Effekte zeigen, wie frisch isolierte PBMC. Untersucht wurde dies an E593-Sphäroiden, die mit 5000 Zellen für vier Tage in der 96 well-Platte initiiert und anschließend vier Tage in der Spinnerflasche kultiviert wurden. In Abbildung 13 B ist das Sphäroidvolumen zweier Ansätze mit frischen und aufgetauten PBMC und 5,0 ng/ml ertumaxomab relativ zum jeweiligen Kontrollansatz mit PBMC dargestellt.

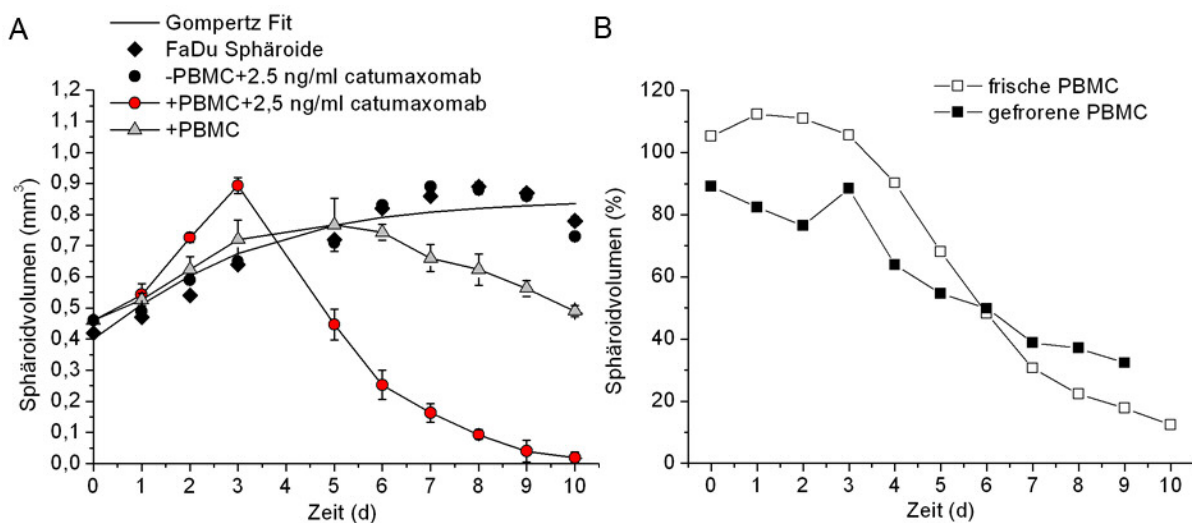


Abbildung 13: Abhängigkeit der Antikörperwirkung von den PBMC. Das Volumenwachstum von FaDu-Sphäroiden und Sphäroiden+2,5 ng/ml catumaxomab folgt einem Gompertz Fit (A, n=200 Sphäroide, MW±SEM). Die Wirkung von 2,5 ng/ml catumaxomab in der Kokultur mit Abwehrzellen und FaDu-Sphäroiden ist nahezu unabhängig vom PBMC-Spender (A, n=200 Sphäroide, N=3 Spender, MW±SD). Nach dem Auftauen haben eingefrorene PBMC in Kokultur mit E593-Sphäroiden bei Gabe von 5,0 ng/ml ertumaxomab ein ähnliches therapeutisches Potenzial gezeigt (B, n=200 Sphäroide).

Beim Ansatz mit frischen PBMC waren die Sphäroide innerhalb der ersten vier Tage weniger durch die AK-Gabe beeinflusst als beim Ansatz mit aufgetauten. Ab Tag 5 jedoch nahm das Volumen der MCTS, die mit frischen PBMC und trifunktionalen AK inkubiert wurden, schneller ab. Insgesamt lag die Abweichung bei rund 17 %. Jedoch wurden bei beiden Ansätzen die Tumorsphäroide durch ertumaxomab zur Lyse gebracht. Demnach war die Einfrieremethode mit DMSO auch für PBMC geeignet, ohne dass sie ihre spezifischen Funktionen verlieren.

3.2 Sphäroidversuche zur Untersuchung der Wirkung von trifunktionalen AK

3.2.1 Vergleich der Wirkung von catumaxomab und ertumaxomab auf FaDu-Sphäroide

An FaDu-Sphäroiden wurde vergleichend die Wirkung von je vier Konzentrationen catumaxomab und ertumaxomab im Bezug auf das Sphäroidvolumen, die Zytokinsekretion, sowie das klonogene Überleben und die Vitalität disaggregierter Sphäroidzellen untersucht. Catumaxomab und ertumaxomab riefen bei den Sphäroiden in Kokultur mit PBMC eine konzentrationsabhängige Reduktion des MCTS-Volumens hervor. Da FaDu-Zellen nur wenig Her2/neu exprimieren (vgl. Abbildung 10) war der Effekt bei ertumaxomab entsprechend geringer (Abbildung 14 A). Der Unterschied in der Wirkung zwischen catu- und ertumaxomab lag etwa bei Faktor vier, was im nachfolgenden Versuch erneut gezeigt wird. Auch bei der Zytokinmessung wurde besonders bei 2,5 und 5,0 ng/ml catumaxomab im Vergleich zu ertumaxomab deutlich mehr IL-2, IL-10, TNF- α , sowie IL-6 und IFN- γ (Abbildung 14 B) an Tag 3 detektiert. Dabei waren die Werte bei 2,5 ng/ml mit Ausnahme von IL-10 höher, als bei 5,0 ng/ml. Dies könnte daran liegen, dass auch bei der Wachstumskurve 2,5 ng/ml eine stärkere Volumenreduktion hervorruft.

Auch im Bezug auf das klonogene Überleben und die Vitalität der Sphäroidzellen zeigte sich die deutlich stärkere Wirkung von catumaxomab. Besonders die Koloniebildungsfähigkeit wurde durch catumaxomab stark reduziert. Bereits die niedrige Konzentration von 0,625 ng/ml reduzierte die Anzahl der Kolonien um 87 % im Vergleich zu den Kontrollen, während die gleiche Konzentration die Vitalität um 49 % reduziert. Bei ertumaxomab wurden mit der niedrigsten Konzentration bei beiden Endpunkten nur schwache Effekte von 4 % beim klonogenen Überleben bzw. 19 % bei der Vitalität hervorgerufen. Deutliche Effekte traten erst ab 2,5 ng/ml ertumaxomab auf, waren aber stets schwächer als die Effekte von catumaxomab bei den gleichen Konzentrationen.

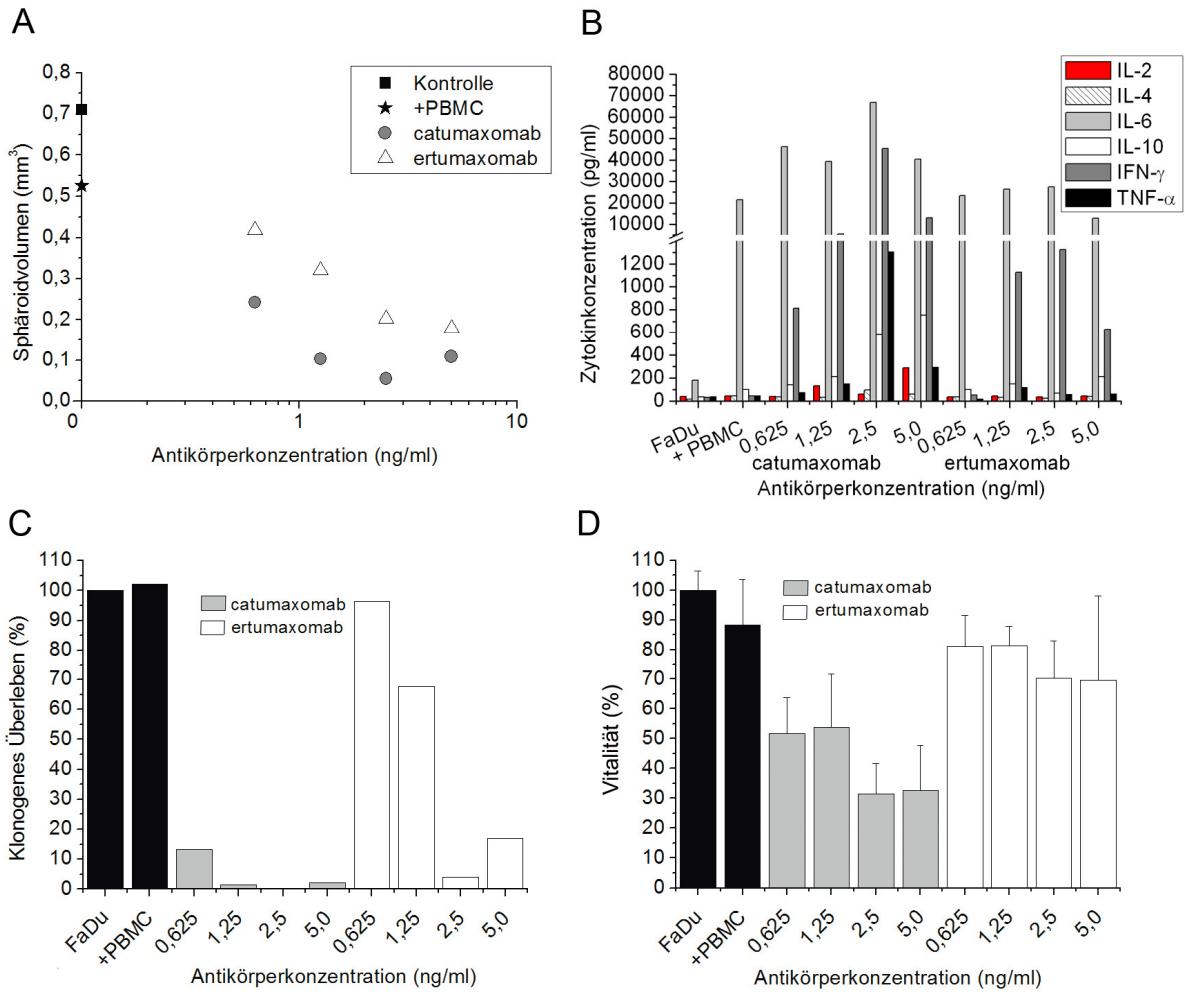


Abbildung 14: Gegenüberstellung der Wirkung von catu- und ertumaxomab bei FaDu-Kokulturen. Catumaxomab wirkte im Vergleich zu ertumaxomab in Bezug auf die Reduktion des Volumenwachstum an Tag 7 (A, n=200 Sphäroide, MW), die Zytokinsekretion an Tag 3 (B), das klonogene Überleben (C) und die Vitalität (D, MW+SD) an Tag 5 von FaDu-Sphäroid Kokulturen stärker.

3.2.2 Einfluss der Bindungspartner der AK auf deren Wirkung

Da sich gezeigt hatte, dass die Wirkung von catumaxomab etwa viermal stärker ist als die von ertumaxomab, wurden für diesen Versuch die Konzentrationen von 2,5 ng/ml und 10 ng/ml gewählt. Ziel dieses Versuchs bestand darin, den Einfluss der verschiedenen Bindungspartner der AK zu untersuchen. So wurden folgende Ansätze miteinander verglichen:

- I.) FaDu-Sphäroide
- II.) FaDu-Sphäroide + PBMC
- III.) FaDu-Sphäroide + trifunktionale AK
- IV.) PBMC + trifunktionale AK
- V.) FaDu Sphäroide + PBMC + trifunktionale AK

In Bezug auf das klonogene Überleben (Abbildung 15 A) und die Vitalität (Abbildung 15 B) waren nur dann Effekte zu beobachten, wenn der komplette Ansatz aus Tumorzellen, PBMC und trifunktionalen AK vorlag. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Kolonienanzahl um rund 50 % und der Vitalität um rund 90 % im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Zytokinsekretion ließ sich beobachten, dass mehrheitlich in den Ansätzen höhere Zytokinkonzentrationen freigesetzt wurden, bei denen alle drei Bindungspartner vorlagen (rote und schwarze Balken in Abbildung 15 C im Vergleich zu karierten Balken). Besonders deutlich wurde dies bei den inflammatorischen Zytokinen IL-6 und IFN- γ .

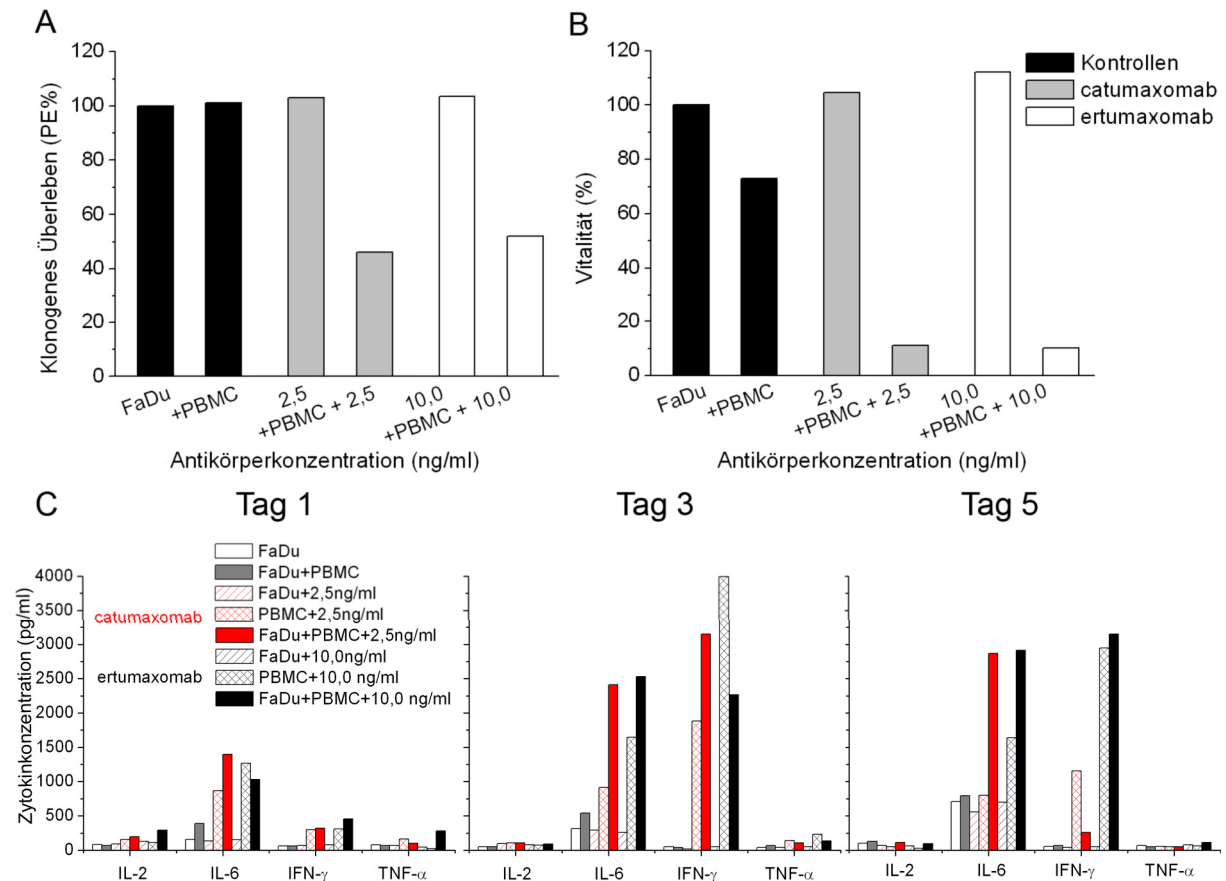


Abbildung 15: Einfluss der Bindungspartner der AK auf deren Wirkung. Nur wenn Tumorzellen (FaDu), Abwehrzellen und die therapeutischen AK vorlagen, wurde die volle anti-tumorale Wirkung beim klonogenen Überleben (A), der Zellvitalität (B) und der Zytokinsekretion (C) erzielt.

3.2.3 Einfluss der Reihenfolge der Gabe von PBMC, Überstand und trifunktionalen AK zur Sphäroidkultur auf die anti-tumorale Wirkung

Der folgende Versuch stellt eine Erweiterung des Versuchs unter Kapitel 3.2.2 dar, indem zusätzlich zu den Partnern auch die Reihenfolge der Gabe innerhalb von 24 h variiert wurde. Die hierfür verwendeten PBMC eines Spenders wurden zunächst alle portionsweise eingefroren und ein Aliquot an Tag 0 bzw. 24 h später an Tag 1 aufgetaut, gewaschen und in die Spinnerflaschen gegeben.

ERGEBNISSE

Der Versuch umfasste folgende Ansätze:

| | Zeitpunkt 0 | 24 h später |
|--------|---|---|
| I.) | FaDu- oder E593-Sphäroide + PBMC | - |
| II.) | Sphäroide + PBMC + trifunktionale AK (10 ng/ml catu- oder 5 ng/ml ertumaxomab) | - |
| III.) | Sphäroide + trifunktionale AK | - |
| IV.) | Sphäroide + trifunktionale AK | PBMC |
| V.) | Sphäroide + PBMC | trifunktionale AK |
| VI.) | Sphäroide | mit trifunktionalen AK aktivierte PBMC mit Überstand |
| VII.) | Sphäroide | mit trifunktionalen AK aktivierte PBMC ohne Überstand |
| VIII.) | Sphäroide | Überstand mit trifunktionalen AK voraktivierter PBMC |
| IX.) | Sphäroide | Überstand aus Ansatz mit Sphäroiden + PBMC + trifunktionale AK |

Dargestellt in Abbildung 16 sind die Ergebnisse des relativen Sphäroidvolumens bezüglich der unbehandelten Kontrolle aus drei Versuchen; zwei mit E593 und 5,0 ng/ml ertumaxomab und einer mit FaDu und 10,0 ng/ml catumaxomab.

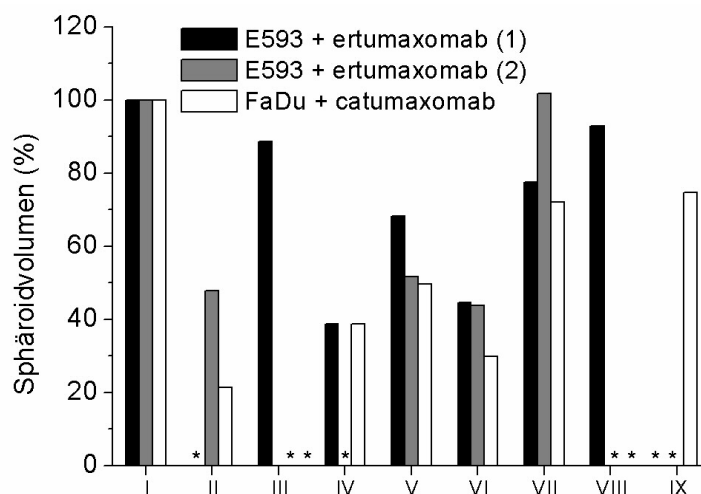


Abbildung 16: Einfluss der Abfolge der Gabe von PBMC, Überstand und trifunktionalen AK zur Sphäroidkultur auf die anti-tumorale Wirkung an Tag 7. Es zeigte sich, dass die Sphäroidlyse am stärksten ist, wenn alle Partner gleichzeitig zugegeben werden (II), gefolgt von Ansätzen bei denen Sphäroide bzw. PBMC mit trifunktionalen AK vorinkubiert wurden (IV, VI). Durch Zugabe von aktivierten PBMC ohne den Überstand, der die Zytokine enthält (VII) bzw. durch Zugabe nur des Überstandes von AK-aktivierten Kulturen (VIII, IX) wurde das Sphäroidvolumen nur geringfügig reduziert (* Daten nicht erhoben).

Am effektivsten im Bezug auf Volumenreduktion waren:

- II.) Sphäroide + PBMC + trifunktionale AK simultan
- VI.) Sphäroide + (24 h mit trifunktionalen AK voraktivierte PBMC+Überstand)
- IV.) (Sphäroide + trifunktionale AK) + PBMC nach 24 h
- V.) (Sphäroide + PBMC) + trifunktionale AK nach 24 h

Keinen oder nur einen geringen Effekt zeigten:

III.) Sphäroide + trifunktionale AK

VII.) Sphäroide + voraktivierte PBMC ohne Überstand

VIII + IX.) Sphäroide + voraktivierter Überstand aus Mono- bzw. Kokultur

3.2.4 Mehrfachdosierungen und Dosiseskulation mit trifunktionalen AK

3.2.4.1 Mehrfachdosierung mit ertumaxomab bei FaDu-Kokulturen

Um die therapeutische Situation in der Klinik noch besser nachzuahmen, wurden Mehrfachdosierungsexperimente durchgeführt. Dazu erfolgte alle drei Tage die erneute Gabe der anfänglichen AK-Konzentration zu den Kokulturen in den Spinnerflaschen. An Tag 6 konnte bei FaDu-Sphäroiden und ertumaxomab nach zweimaliger Gabe an Tag 0 und 3 und somit der doppelten AK-Konzentration eine bis zu 25 % stärkere Reduktion des Sphäroidvolumens beobachtet werden, als bei Einfachgabe an Tag 0 (Tabelle 14). Jedoch waren an Tag 9 und damit nach dreimaliger Gabe alle mit AK inkubierten Sphäroidansätze vollständig lysiert (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 14: Volumenreduktion (% an Kontrolle) bei Mehrfachdosierung von ertumaxomab bei FaDu-Sphäroid-Kokulturen (Tag 6). Nach zweimaliger AK-Gabe, lassen sich stärkere Effekte im Bezug auf die Volumenreduktion der Sphäroide im Vergleich zur Einfachgabe feststellen.

| | Kontrolle | +PBMC +ertumaxomab (ng/ml) | | | | | |
|----------------|-----------|----------------------------|------|------|------|------|------|
| d0 | +PBMC | 5,0 | 5,0 | 10,0 | 10,0 | 20,0 | 20,0 |
| d3 | | - | 5,0 | - | 10,0 | - | 20,0 |
| Σ | | 5,0 | 10,0 | 10,0 | 20,0 | 20,0 | 40,0 |
| d6 Volumen (%) | 100 | 46 | 25 | 41 | 17 | 18 | 14 |

3.2.4.2 Mehrfachdosierung mit ertumaxomab bei E593-Kokulturen

Wie unter Kapitel 3.2.4.1 bei FaDu-Sphäroiden beschrieben, wurde auch mit E593-Sphäroiden die Wirkung der Mehrfachdosierung mit ertumaxomab analysiert. Da E593 stärker Her2/neu exprimiert, wurden die Konzentrationen des AK entsprechend niedriger gewählt. Wie auch beim Versuch mit FaDu zeigte sich in der Volumenreduktion eine Konzentrationsabhängigkeit von ertumaxomab bei Einfachdosierung. Jedoch konnte wiederholt nur bei 0,5 ng/ml ertumaxomab eine etwa 11 % stärkere Volumenabnahme bei Zweifachgabe im Vergleich zur Einfachgabe an Tag 6 detektiert werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Volumenreduktion (% an Kontrolle) bei Mehrfachdosierung von ertumaxomab bei E593-Sphäroid-Kokulturen. Nach zweimaliger ertumaxomab-Gabe im Abstand von drei Tagen zeigten die Ansätze mit 0,25 und 0,5 ng/ml ertumaxomab um 6 bzw 11 % kleinere Sphäroide als bei Einfachgabe an Tag 6. Bei einer Startkonzentration von 1,0 ng/ml wiesen die Sphäroide mit einfacher Dosierung das kleinere Volumen auf.

| | Kontrolle | +PBMC+ertumaxomab (ng/ml) | | | | | | |
|----------------|-----------|---------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| d0 | +PBMC | 0,25 | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 5,0 |
| d3 | | - | 0,25 | - | 0,5 | - | 1,0 | - |
| Σ | | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 5,0 |
| d6 Volumen (%) | 100 | 96 | 90 | 81 | 69 | 51 | 80 | 48 |

Zusätzlich wurde die Infiltration von PBMC sowie die Anteile an proliferierenden und apoptotischen Zellen bei Einfachfachgabe durch immunhistologische Färbungen (Abbildung 17) und deren quantitativen Auswertung (Abbildung 18) untersucht. Der Anteil proliferierender Zellen nahm unter steigenden ertumaxomab Konzentrationen kontinuierlich ab und sank bei 5,0 ng/ml auf etwa 25 %. Im Gegensatz dazu stieg der Anteil der apoptotischen Zellen innerhalb der Konzentrationsreihe an. Die Kontrolle zeigte jedoch starke Färbeartefakte im Zentrum des Sphäroidschnittes. Der Anteil positiv gefärbter infiltrierter Abwehrzellen vergrößerte sich mit Ausnahme des Ansatzes mit 1,0 ng/ml ertumaxomab in Korrelation mit der AK-Dosis. Durch die Färbung des CD2-Antigens konnten diese Abwehrzellen als T-Zellen identifiziert werden.

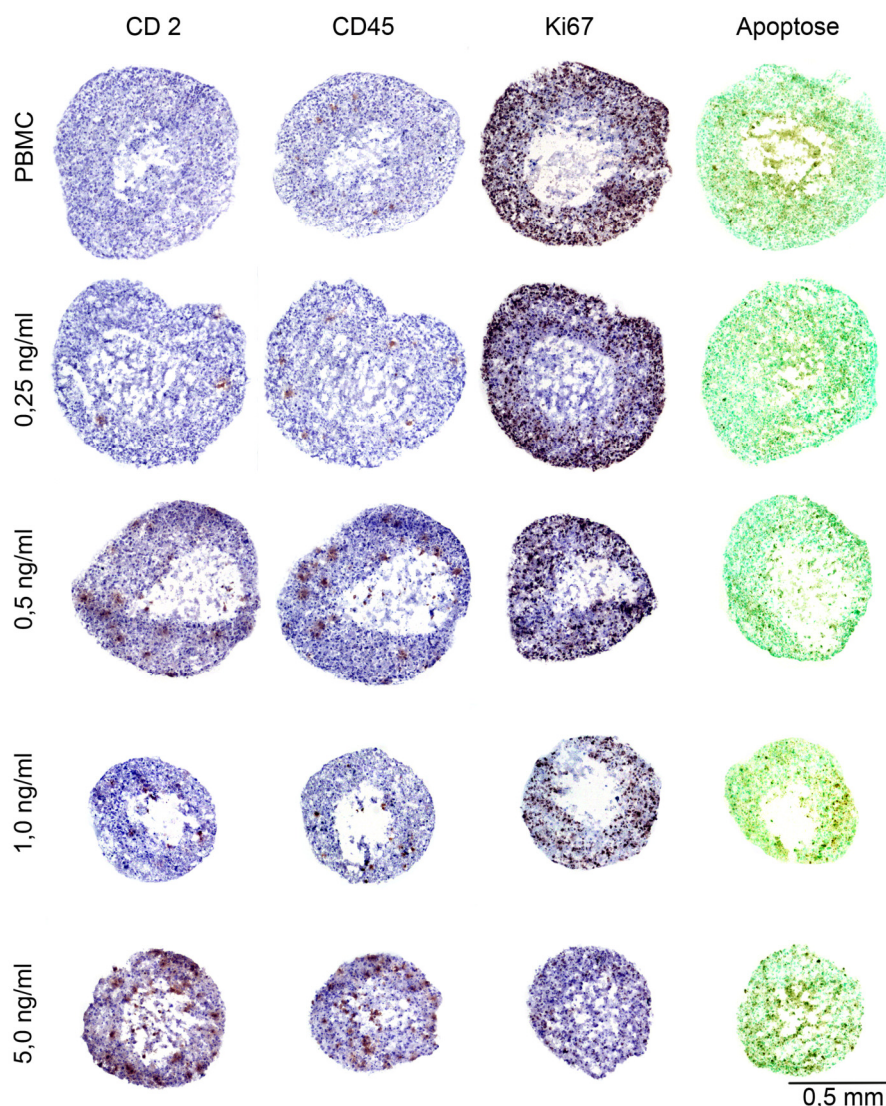


Abbildung 17: Immunhistologische Färbung von CD2, CD45, proliferativen (Ki67⁺) und apoptotischen (Fragel⁺) Zellen der E593-Sphäroide kokultiviert mit PBMC unter Einfachgabe von ertumaxomab an Tag 6. Mit steigender AK-Konzentration nahm der Anteil infiltrierender Abwehrzellen (CD45⁺) zu. Diese Zellpopulation war mehrheitlich als CD2⁺ T-Zellen identifizierbar. Der Anteil proliferierender Zellen nahm mit zunehmender ertumaxomab-Konzentration ab. Die Apoptose hat in Bereichen der Zentralnekrose besonders bei der Kontrolle zu starken Färbeartefakten geführt. Jedoch ließ sich innerhalb der Konzentrationsreihe ertumaxomab eine Zunahme der apoptotischen Zellen verzeichnen.

Die Färbungen von CD2, CD45 und Ki67 wurden ergänzend für die quantitative Infiltrationsanalyse genutzt (Abbildung 18). In der Kontrolle befanden sich 75 % der Gesamtzellen im proliferativen Status. Dieser Anteil sank bei der höchsten Konzentration ertumaxomab von 5,0 ng/ml auf 25 %, während der Anteil der eingewanderten Abwehrzellen bis auf 45 % anstieg.

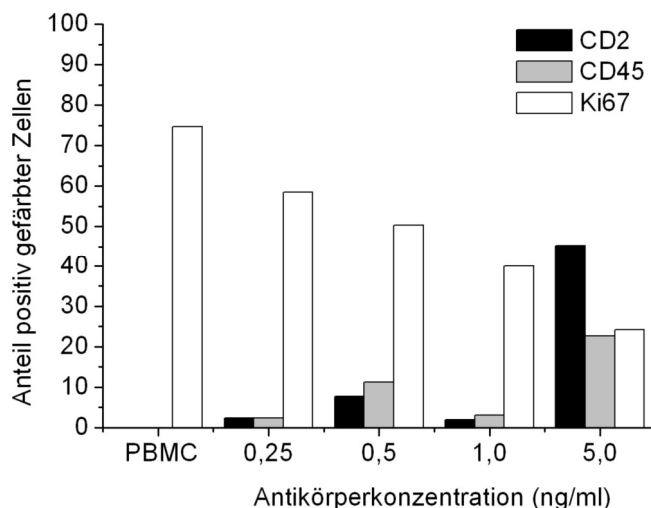


Abbildung 18: Quantitative Analyse (% an Gesamtzellzahl) der immunhistologischen Färbung der E593-Sphäroide kokultiviert mit PBMC unter Einfachgabe von ertumaxomab an Tag 6. Für die Proliferation konnte eine klare negative Korrelation zur AK-Konzentration gezeigt werden. Mit Ausnahme von 1,0 ng/ml ertumaxomab verhält es sich invers dazu mit der Abwehrzellinfiltration.

3.2.4.3 Dosiseskulation mit ertumaxomab bei FaDu-Sphäroid-Kokulturen

Vergleichend zur Mehrfachdosierung mit ertumaxomab wurde die initiale Dosis in FaDu-Kokulturen auch mehrfach gegeben und in parallelen Ansätzen zusätzlich eskaliert. Hierbei erfolgte die dreimalige Gabe von 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml und 5,0 ng/ml im Abstand von zwei Tagen, bzw. jeweils die Verdopplung der ersten Konzentration aller zwei Tage. Bei 1,25 ng/ml ertumaxomab gab es einen Unterschied von 14 % zwischen Dreifachgabe und Dosissteigerung im Bezug auf die Kontrolle (Tabelle 16). Bei 2,5 ng/ml waren die Unterschiede kleiner als 5 %, obwohl in der Summe mehr als doppelt so viel AK der Kultur zugesetzt wurde.

Tabelle 16: Volumenreduktion (% an Kontrolle) an Tag 6 bei FaDu-Sphäroiden, hervorgerufen durch Dreifachgabe oder Dosisverdopplung aller 2 Tage. Nur bei dreimaliger Gabe von 1,25 ng/ml ertumaxomab zeigten sich Unterschiede im Bezug auf das Sphäroidvolumen bei erneuter Gabe oder Konzentrationssteigerung.

| Gabe | | Kontrolle | | +PBMC+ertumaxomab (ng/ml) | | | | | |
|------|----------------|-----------|-----|---------------------------|------|-----|------|------|------|
| | | | | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 5,0 | 5,0 |
| Gabe | d0 | +PBMC | | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 5,0 | 5,0 |
| | d2 | | | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 5,0 | 5,0 | 10,0 |
| | d4 | | | 1,25 | 5,0 | 2,5 | 10,0 | 5,0 | 20,0 |
| | Σ | | | 3,75 | 8,75 | 7,5 | 17,5 | 15,0 | 35,0 |
| | d6 Volumen (%) | | 100 | 34 | 20 | 13 | 8 | 8 | 8 |

3.2.4.4 Mehrfachdosierung von ertumaxomab und PBMC bei E593-Kokulturen

Da bei den Versuchen zur Mehrfachgabe oder Dosisescalation mit trifunktionalen AK nur kleine oder keine Effekte zu beobachten waren, wurde im folgenden Versuch zusätzlich alle drei Tage das Medium ausgetauscht (MA) und erneut $2 \cdot 10^7$ PBMC und trifunktionale AK zugegeben (Abbildung 19).

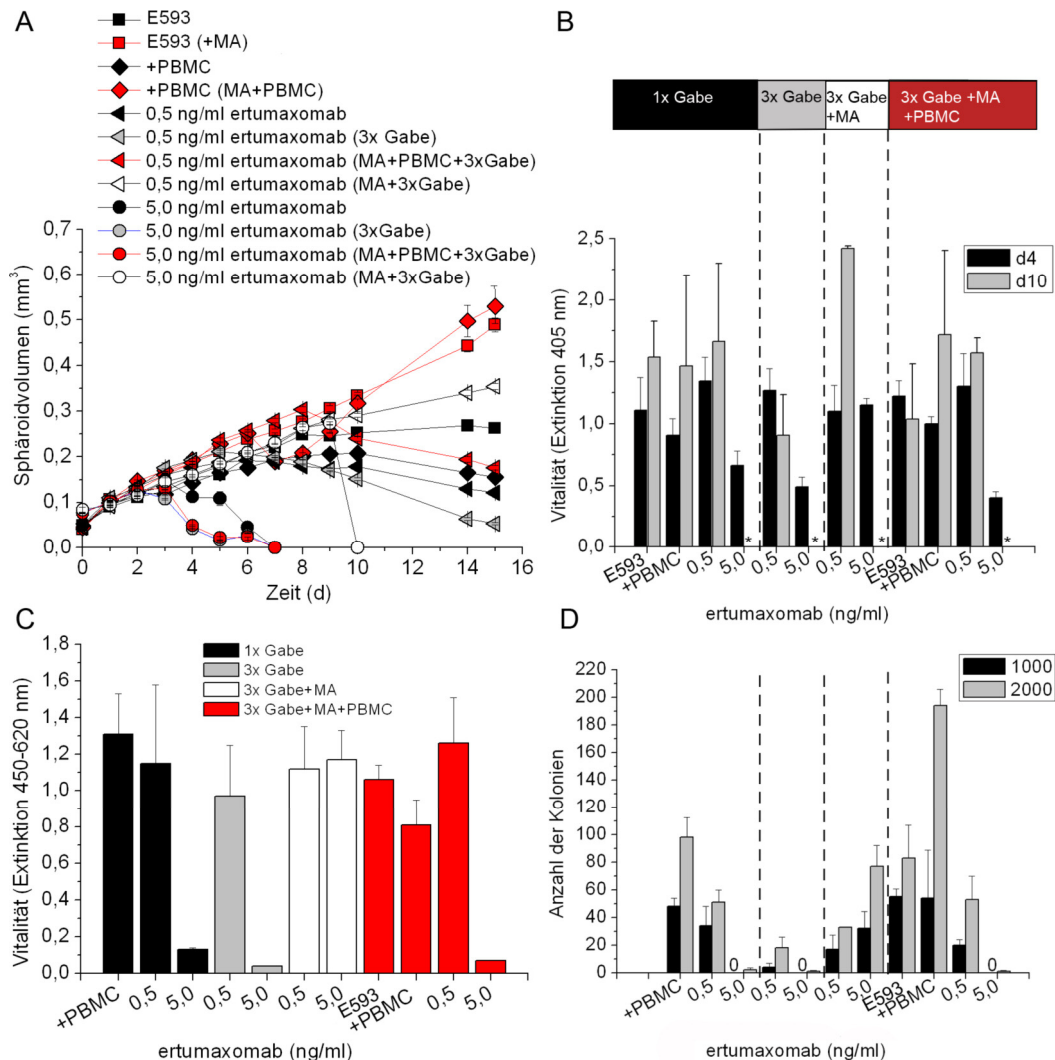


Abbildung 19: Effekte einer Mehrfachdosierung mit ertumaxomab und PBMC auf E593-Kokulturen. Eine erneute Gabe von PBMC ging mit einem Medien austausch (MA) einher (rot) und bewirkte bezüglich des Sphäroidvolumens bei 0,5 ng/ml ertumaxomab keine stärkere Volumenreduktion (A). Dies ließ sich auch anhand der Vitalitätstests; mit ganzen Sphäroiden an Tag 4 und 10 (B) und mit Sphäroid-Einzelzellen an Tag 4 (C) beobachten. Auch bei der Analyse der Koloniebildungsfähigkeit der Sphäroidzellen konnte keine stärkere Reduktion durch Zugabe frischer PBMC festgestellt werden (D) (A - n=200 Sphäroide, MW±SEM, B - n=4 Sphäroide, MW±SD, C - n= 4 wells MW±SD, D - n= 3 Petrischalen MW±SD, *Sphäroide bereits lysiert).

Die PBMC waren zuvor aus dem identischen buffy coat eingefroren worden. Die Ergebnisse dieses Versuchs wurden anhand einer Volumenwachstumskurve (Abbildung 19 A), einem Vitalitätstest mit ganzen Sphäroiden (Abbildung 19 B), sowie ebenfalls einem Vitalitätstest und Test auf Koloniebildungsfähigkeit mit Zellen aus disaggregierten Sphäroiden (Abbildung 19 C und D) dokumentiert. Im Bezug auf das Sphäroidvolumen konnte dabei beobachtet werden, dass die zusätzliche PBMC Gabe (rot) im Vergleich zur Dreifachgabe des AK ohne

PBMC (grau) keine verstärkte Reduktion hervorrief. Der damit verbundene Zusatz von frischem Kulturmedium wirkte bei 0,5 ng/ml sogar wachstumsfördernd. Wurde nach drei Tagen das Medium gewechselt, ohne erneut PBMC jedoch aber ertumaxomab zuzugeben (weiß), war der Effekt noch geringer als bei Einfachgabe (schwarz). Der APH-Vitalitätstest mit ganzen Sphäroiden von Tag 4 und 10 (B) gab diese Ergebnisse ebenso wider; die Dreifachgabe von AK, PBMC und Medium (rot) konnte die Zellvitalität nicht wesentlich stärker beeinträchtigen als die Einfach- oder Dreifachgabe des AK. Ähnliches galt für den Vitalitätstest mit Tumorzellen aus disaggregierten Sphäroiden (C) und das klonogene Überleben der Zellen (D).

3.2.5 Analyse der T-Zellaktivierung unter Wirkung von trifunktionalen AK

Bei den Sphäroid-infiltrierenden Zellen handelte es sich vorrangig um T-Zellen. Diese Zellen aktivieren sich über einen autologen Loop von IL-2. Da das Zytokin nach Tag 1 im Standardversuchsablauf meist nicht mehr nachweisbar war, wurden Versuche mit einem kürzeren Abstand zwischen den Probenentnahmen durchgeführt. Neben der IL-2-Konzentration im Überstand wurde auch die mRNA-Expression detektiert. Weiterhin sollte im Kokulturüberstand die Anzahl der Abwehrzellen bestimmt werden. Dies geschah mit Hilfe der Neubauerkammer oder der Messung im CASY.

3.2.5.1 T-Zellaktivierung bei FaDu-Kokulturen mit catumaxomab

Initiale Experimente mit Hilfe semiquantitativer PCR zum Nachweis der T-Zellaktivierung über IL-2 und der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) wurden von Björn Rodday in seiner Dissertation (Rodday 2010) durchgeführt. Er verglich die Expression von CD4, IL-2, CD25 und CD64 in FaDu-Sphäroid-Kokulturen von fünf verschiedenen Spendern mit und ohne 2,5 ng/ml catumaxomab. Dabei fand er heraus, dass bei jedem PBMC Spender die Transkriptmenge des untersuchten Moleküls durch catumaxomab gesteigert wurde. Jedoch variierte die relative Expression zwischen den einzelnen Spendern stark.

Da IL-2 als autokrin bindendes Zytokin eine Schlüsselrolle in der T-Zellaktivierung zukommt, hat er die zeitliche Expression des Zytokins in PBMC-Monokulturen und in Monolayer-Kokulturen, die durch 2,5 ng/ml catumaxomab stimuliert wurden, untersucht. Es zeigte sich, dass innerhalb weniger Stunden nach AK-Zugabe, die IL-2-Expression ihr Maximum erreichte und nach vier Tagen nur noch sehr geringe Mengen detektiert werden konnten. Dabei war die relative Expression in Kokultur-Ansätzen deutlich höher als in PBMC-Monokulturen. Auch bei diesen Analysen zeigte sich eine starke Abhängigkeit des Expressionsniveaus vom PBMC-Spender.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ähnlichen Ansatz FaDu-Sphäroide in Kokultur mit PBMC in separaten Spinnerflaschen für 12, 24, 48, 72 und 120 h mit 10,0 ng/ml catumaxomab kultiviert. Am Ende der Versuchszeit, nach fünf Tagen, waren die mit

10,0 ng/ml behandelten Sphäroide komplett lysiert (Abbildung 20 A), daher konnte von diesem Ansatz keine RNA mehr extrahiert und keine IL-2-Expressionsanalyse anhand von semiquantitativer oder quantitativer PCR durchgeführt werden. Für die vier anderen Zeitpunkte führten beide Methoden zu einem ähnlichen Expressionsprofil. Nach 12 bzw. 24 h war die Expression der IL-2-mRNA maximal (Abbildung 20 B). Ab diesem Zeitpunkt nahm die Menge stetig ab. Das Zytokin IL-2 erreichte nach 24 h eine maximale Konzentration von 300 pg/ml. Dies stimmte zeitlich mit der mRNA-Expression überein (Abbildung 20 D). Zur Analyse der Kopplung zwischen IL-2-Freisetzung und T-Zell-Proliferation wurden bei diesem Versuch die freien PBMC im Kulturüberstand mit dem CASY bestimmt. Die Grenzen wurden auf 6,0 – 15,0 μm festgesetzt. Wie bei allen Versuchen lag die Startanzahl der PBMC bei $1 \cdot 10^6/\text{ml}$ (Abbildung 20 C). Im Ansatz mit catumaxomab sank die Anzahl bereits nach 12 h auf etwa $6 \cdot 10^5/\text{ml}$ und nach 48 h auf 4,3 beziehungsweise $5,1 \cdot 10^5/\text{ml}$ um dann wieder bis auf 6,0 und $8,4 \cdot 10^5/\text{ml}$ anzusteigen. Das lag daran, dass von Sphäroiden abgelöste Tumorzellen oder Zelldebris mit der Zeit zunehmen und innerhalb der vorgegebenen Grenzen im CASY mitgemessen wurden. In den Ansätzen nur mit PBMC oder PBMC mit Tumorsphäroiden sankt die Anzahl kontinuierlich bis auf circa $4,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ nach 120 h.

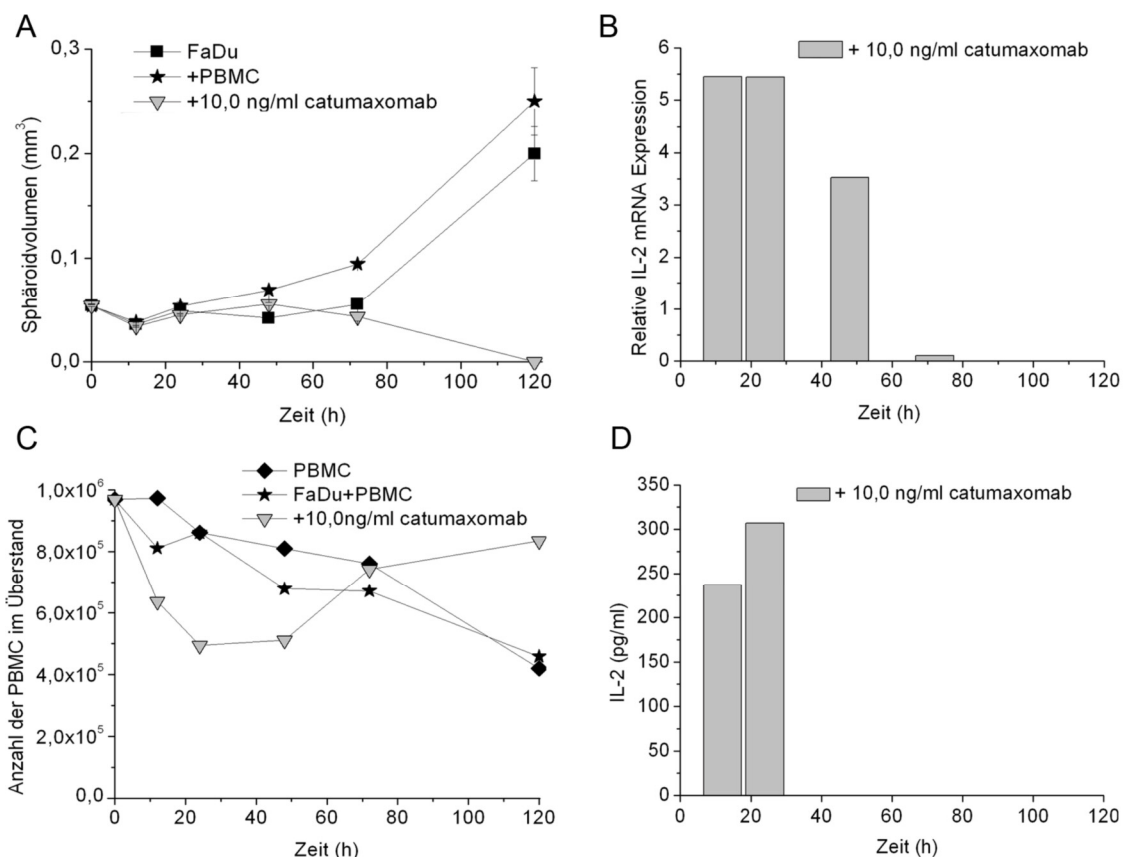


Abbildung 20: T-Zellaktivierung bei FaDu-Kokulturen mit catumaxomab. Innerhalb von 5 Tagen führte die Zugabe von 10,0 ng/ml zu einer kompletten Lyse der Sphäroide (A, MW \pm SEM, n=200 Sphäroide). Somit fehlte der 120 h Wert bei der IL-2 mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer und semiquantitativer PCR. Die Transkriptmenge war nach 12 h und 24 h maximal (B), was sich in der Analyse des IL-2 Proteins so wiederfand (D). Die Anzahl der PBMC im Kulturüberstand sank in den Kontrollen kontinuierlich bis auf unter die Hälfte der Ausgangszellzahl von $10^6/\text{ml}$ nach 120 h. In der Probe mit catumaxomab nahm die Anzahl schneller ab, stieg jedoch ab 48 h wieder stetig an (C).

3.2.5.2 T-Zellaktivierung bei E593-Kokulturen mit ertumaxomab

Ähnlich dem Versuch mit FaDu und catumaxomab, wurde die T-Zellaktivierung auch bei E593-Kokulturen mit ertumaxomab untersucht. Die Abwehrzellen wurden für 6, 12, 18, 24, 36, 60 und 84 h mit 5,0 ng/ml ertumaxomab und mit E593-Sphäroiden kultiviert. Anhand der Sphäroidwachstumskurve (Abbildung 21 A), ließ sich erkennen, dass nach 84 h das Volumen der mit ertumaxomab behandelten Sphäroide um 21 % reduziert wurde. Ein durch semiquantitative und quantitative PCR ermitteltes hohes Niveau an IL-2-mRNA war bereits nach 6 h erreicht (Abbildung 21 B). Danach sank die Transkriptmenge, erfährt aber einen zweiten Anstieg mit einem Maximum bei 60 h. Der Kulturüberstand wurde zum einen für die Auszählung der Abwehrzellen in der Neubauerkammer und zum anderen zur Zytokinbestimmung genutzt. Der Versuch startete mit 1×10^6 PBMC/ml (Abbildung 21 C). Diese Anzahl sank nach 84 h auf etwa 6×10^5 /ml, wobei mit steigender Versuchsdauer auch vermehrt Tumorzellen und Debris im Überstand zu finden waren und die rein optische Unterscheidung zunehmend schwer fiel. Die Grafik zur IL-2 Zytokinsekretion (Abbildung 21 D) zeigte innerhalb der ersten 24 h mit leichter zeitlicher Verzögerung in etwa den gleichen Verlauf, wie die IL-2 mRNA-Expression. Das absolute Maximum lag bei etwa 1000 pg/ml bei 36 h. Während die mRNA-Expression auch bei 60 h hohe Werte erreichte, konnte im Bereich des sezernierten IL-2 nur eine geringe Konzentration detektiert werden.

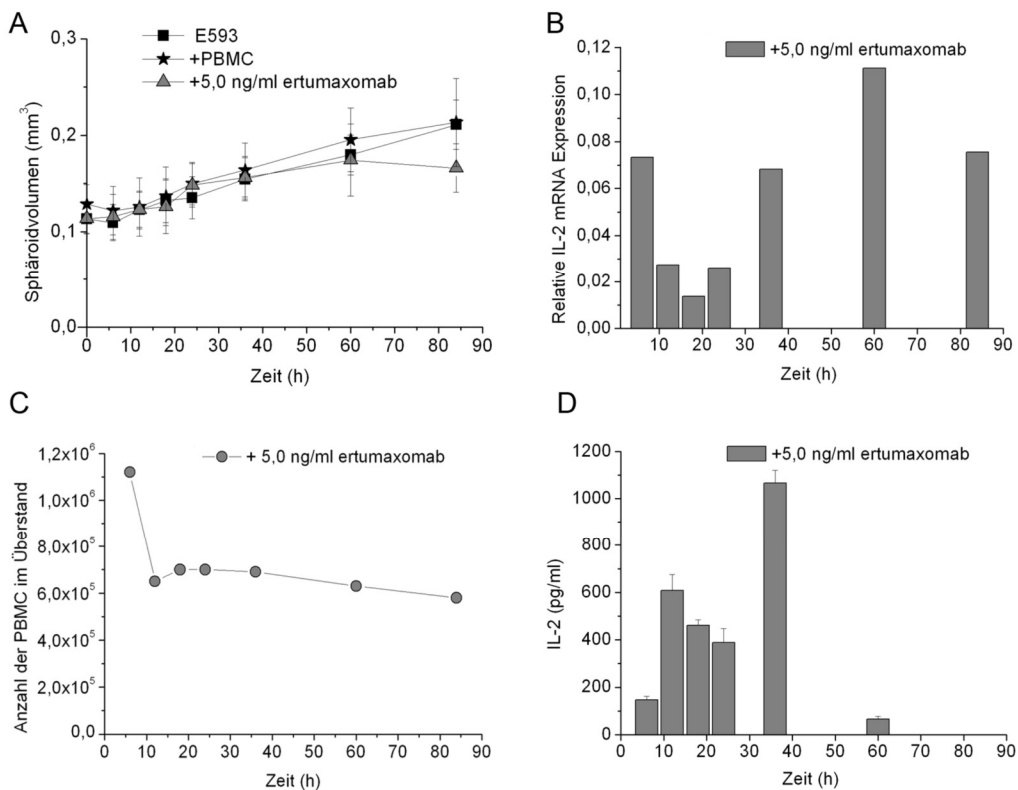


Abbildung 21: T-Zellaktivierung bei E593-Kokulturen mit ertumaxomab. Innerhalb der 84 h Versuchszeit wurde das Volumen der E593-Sphäroide durch 5,0 ng/ml ertumaxomab um rund 22 % reduziert (A, MW±SEM, n=200 Sphäroide). Bereits 6 h nach Versuchsbeginn wurden vergleichsweise hohe IL-2 Transkriptmengen detektiert (B) was nach 12 h in einem Anstieg der IL-2 Sekretion führte (D). Innerhalb der ersten 12 h sank die Anzahl der PBMC im Kulturüberstand auf $6,5 \cdot 10^5$ /ml und nahm weiter bis zu Versuchsende nach 84 h bis auf $5,8 \cdot 10^5$ /ml ab (C).

3.2.6 Sphäroidversuche mit den Kontrollantikörpern

Um den Einfluss der trifunktionalen Struktur von catumaxomab auf die Wirkung analysieren zu können, wurden Versuche mit den parentalen AK 26/II/6 (anti-CD3) und HO-3 (anti-EpCAM) sowie mit dem F(ab')₂ Fragment von catumaxomab und einem AK, der statt an humanes an murines CD3 bindet (BiLu), durchgeführt.

3.2.6.1 Wirkung der parentalen AK 26/II/6 und HO-3

Für den Versuch wurden FaDu-Sphäroide mit 10000 Zellen pro well über sieben Tage in der 96 well-Platte initiiert und für weitere sieben Tage in der Spinnerflasche kultiviert. Dann startete der Versuch mit Zugabe von 5,0 ng/ml catumaxomab und jeweils der gleichen Konzentration der parentalen AK 26/II/6 und HO-3, sowie einer Kombination beider AK mit jeweils der halben Konzentration. Zusätzlich wurden auch nur Tumorsphäroide mit den AK inkubiert. Diese Ansätze zeigten jedoch keine Effekte und sind daher nicht in der Grafik (Abbildung 22) abgebildet. Wie bei allen anderen Versuchen unterschieden sich die Sphäroidvolumen der verschiedenen Ansätze bis Tag 3 des Experimentes nicht. Ab dem vierten Tag nahm das Volumen in den Ansätzen mit catumaxomab und 26/II/6 ab, während die mit HO-3 inkubierten Sphäroide weiter wuchsen. Den stärksten Effekt bei der Volumenreduktion an Tag 6 zeigte catumaxomab mit 91 %, gefolgt von 5,0 ng/ml 26/II/6 mit 70 % und der Kombination von 2,5 ng/ml 26/II/6 und HO-3 mit 61 %. HO-3 allein zeigt nur eine Reduktion von 13 % in Vergleich zur Kontrolle.

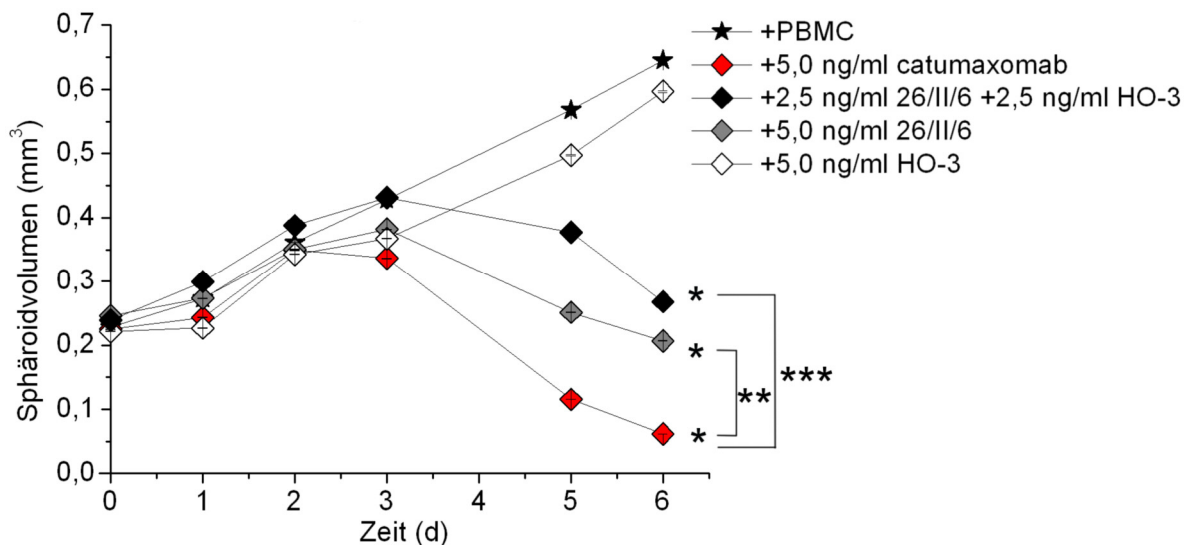


Abbildung 22: Volumenwachstumskurve von FaDu-Kokulturen inkubiert mit catumaxomab, 26/II/6 und HO-3. Der gegen EpCAM gerichtete AK HO-3 hatte nur einen geringen Effekt auf das Sphäroidvolumen. Die Kombination mit 26/II/6 (anti-CD3) oder reine 26/II/6 Gabe reduzieren das Wachstum ab Tag 4 der Kokultur um 61 % bzw. 70 %. Catumaxomab, der Hybridantikörper aus 26/II/6 und HO-3, reduzierte das Sphäroidvolumen mit 91 % am effektivsten. Die Ansätze nur mit Sphäroiden und AK verhielten sich wie die Kontrolle und sind daher nicht gezeigt (n=200 Sphäroide, MW±SEM, p<0,00001).

ERGEBNISSE

Bei diesem Versuch wurden an jedem zweiten Tag 200 µl Überstand für die Konzentrationsbestimmung der Zytokine IL-2, IL-6, IFN- γ und TNF- α abgenommen. Bis auf IL-6 wurden die Zytokine nur in Ansätzen mit PBMC und AK freigesetzt. IL-6 konnte bis 3800 pg/ml im Kontrollansatz mit Tumorzellen und PBMC detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Fünfmal höher und damit am stärksten war die Konzentration IL-6 beim Ansatz mit PBMC und 5,0 ng/ml 26/II/6 (Abbildung 23). Dieser Ansatz zeigte auch die höchsten Werte für TNF- α an Tag 1. Die Zytokine IL-2 und IFN- γ wurden bei kompletten Ansatz aus Tumorzellen, PBMC und catumaxomab an Tag 3 (grau) beziehungsweise Tag 5 (weiß) am stärksten sezerniert. Der durch 5,0 ng/ml 26/II/6 erzielte Level der Zytokine war außer bei IL-6 auf gleicher Höhe, wie beim Ansatz mit der Kombination aus beiden parentalen AK. Allgemein war zu beobachten, dass IL-2 und TNF- α in nahezu allen Ansätzen an Tag 1 am höchsten konzentriert waren. Die IL-6 und IFN- γ Konzentrationen nahmen hingegen bis Tag 3 oder Tag 5 zu.

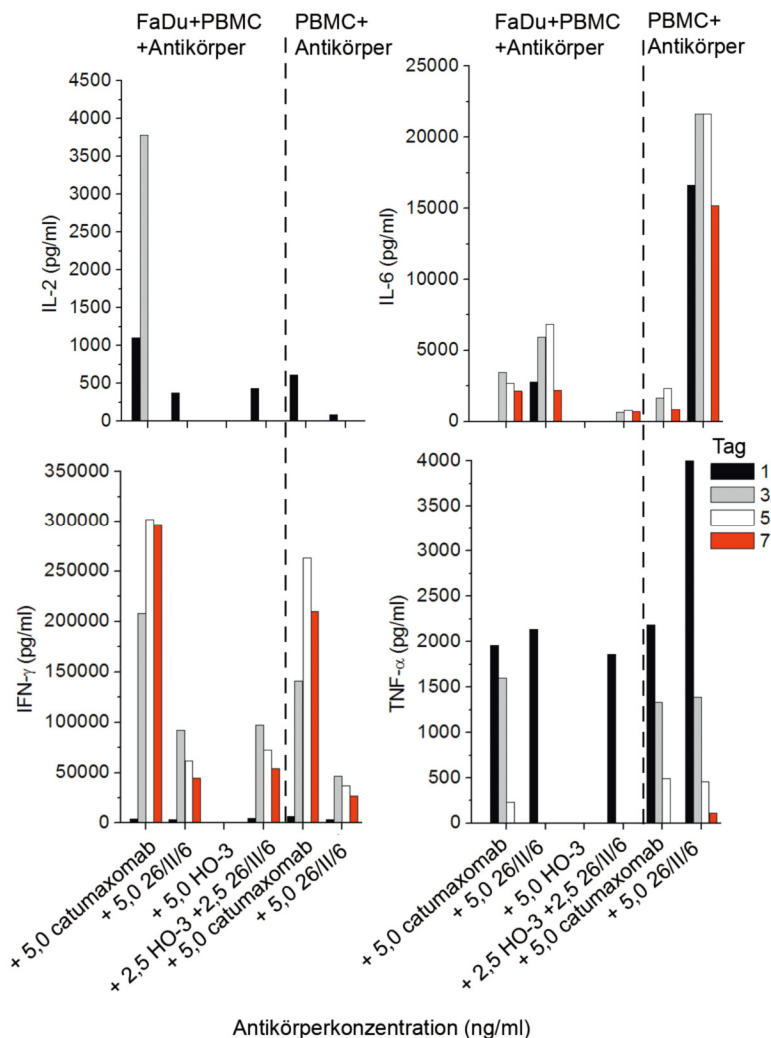


Abbildung 23: Zytokinsekretion von FaDu-Kokulturen und PBMC-Monokulturen nach Inkubation mit den parentalen AK 26/II/6 und HO-3 im Vergleich zu catumaxomab an Tag 1, 3, 5 und 7. Die Zytokine IL-2 und IFN- γ wurden in Ansätzen mit PBMC \pm Tumorzellen am stärksten bei Inkubation mit catumaxomab sekretiert. Die Freisetzung von IL-6 und TNF- α war bei Ansätzen nur mit PBMC und 5,0 ng/ml 26/II/6 maximal. Durch die Inkubation mit HO-3 wurde keine Zytokinsekretion induziert.

Die immunhistologische Analyse der Sphäroide von Tag 5 zeigte bei allen Ansätzen eine Infiltration von CD45⁺ Abwehrzellen (Abbildung 24). Diese war bei der Kontrolle sehr schwach, bei allen übrigen Ansätzen stark ausgeprägt. Im Fall der Inkubation mit 5,0 ng/ml catumaxomab oder dem anti-CD3 AK (26/II/6) bzw. der Kombination der beiden parentalen AK konnten die CD45⁺ Zellen in der Mehrheit als CD2⁺/CD8⁺ positive T-Zellen identifiziert werden. Bei den Sphäroidkulturen, denen der anti-EpCAM AK (HO-3) zugesetzt worden war, konnten keine T-Zellen positiv angefärbt werden.

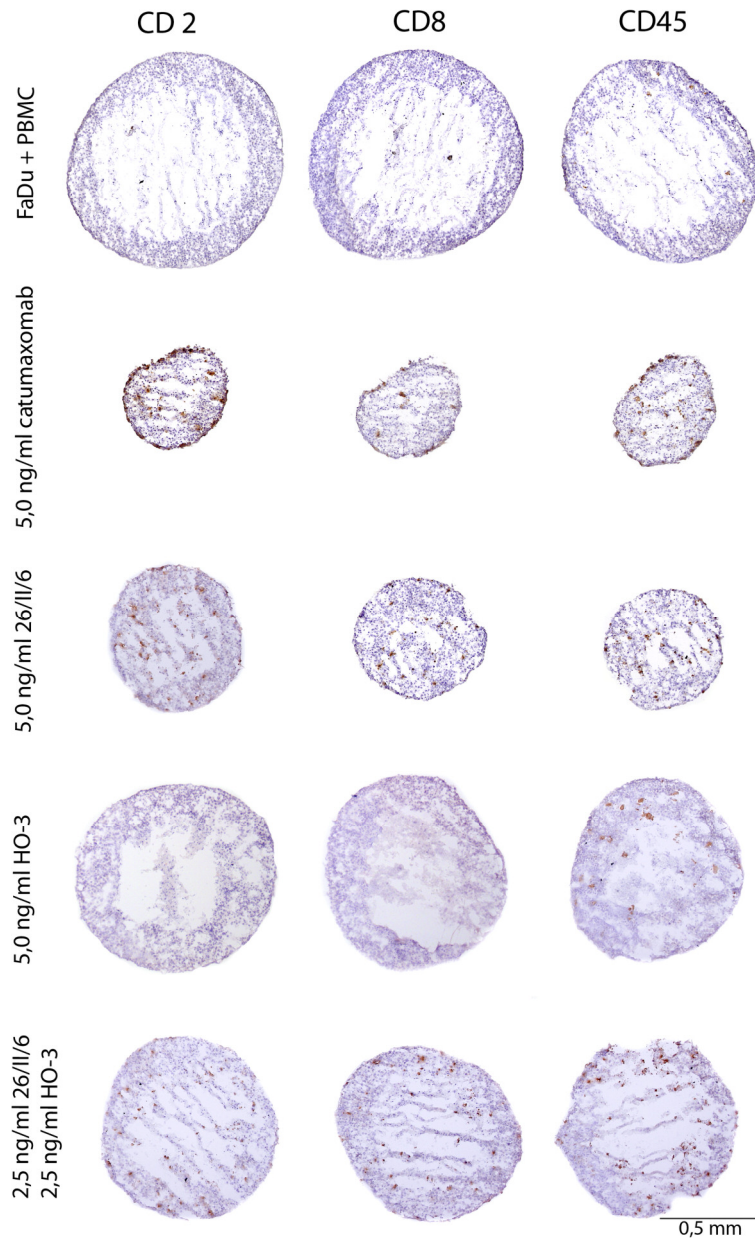


Abbildung 24: Immunhistologische Färbung von CD2, CD8 und CD45 an Sphäroiden nach Behandlung mit catumaxomab oder dessen parentalen AK (Tag 5). Die Behandlung mit catumaxomab und dem anti-CD3 AK (26/II/6) zeigte eine Infiltration von CD45⁺ Zellen, die vorrangig CD2⁺/CD8⁺ T-Zellen waren. Bei Inkubation mit dem anti-EpCAM AK (HO-3) war eine schwache Infiltration von CD45⁺ Zellen zu verzeichnen, die sich als CD2⁻/CD8⁻ erwiesen. In Sphäroiden, die eine Kombination beider parentaler AK erhalten hatten, konnten ebenfalls CD2⁺/CD8⁺ Abwehrzellen nachgewiesen werden.

Besonders in Sphäroiden, die mit dem anti-EpCAM AK inkubiert wurden, sollte mit einer Färbung mit anti-CD64 und anti-CD14 die Einwanderung von Makrophagen bzw. Monozyten überprüft werden. So wurden Schnitte der identischen Versuchsreihe wie unter Abbildung 24 für weitere Färbungen verwendet. Die Färbung von CD64 war in allen Ansätzen negativ. CD14 konnte in dem Ansatz mit 5,0 ng/ml HO-3 vereinzelt nachgewiesen werden (Abbildung 25). Diese Anzahl war jedoch geringer als die Anzahl der CD45⁺ markierten Zellen im gleichen Ansatz.

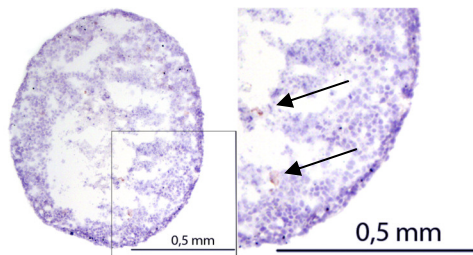


Abbildung 25: Immunhistologische Färbung von CD14 an einem Kryoschnitt eines FaDu-Sphäroids, der mit 5,0 ng/ml HO-3 behandelt wurde (Tag 5). Vereinzelt konnten CD14⁺ Zellen (Monozyten/Makrophagen) in den medianen Sphäroidschnitten identifiziert werden (Pfeile).

3.2.6.2 Wirkung des F(ab')₂ Fragments von catumaxomab und BiLu

In diesem Experiment sollte untersucht werden, welche Bedeutung der Fc-Teil und der CD3-bindende Arm von catumaxomab für dessen Wirkung haben.

Den Kokulturen wurden die beiden AK catumaxomab und BiLu (anti-EpCAM x anti-*murin* CD3) sowie das F(ab')₂ Fragment von catumaxomab in drei Konzentrationen von jeweils 1,0 ng/ml, 2,5 ng/ml und 10,0 ng/ml zugesetzt. Bei der Volumenwachstumskurve zeigte sich innerhalb eines jeden Moleküls eine klare Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung. Dabei reduzierte BiLu das Sphäroidvolumen maximal um 12 %, das F(ab')₂ Fragment zwischen 54 und 81 % und catumaxomab zwischen 90 und 100 % (Abbildung 26).

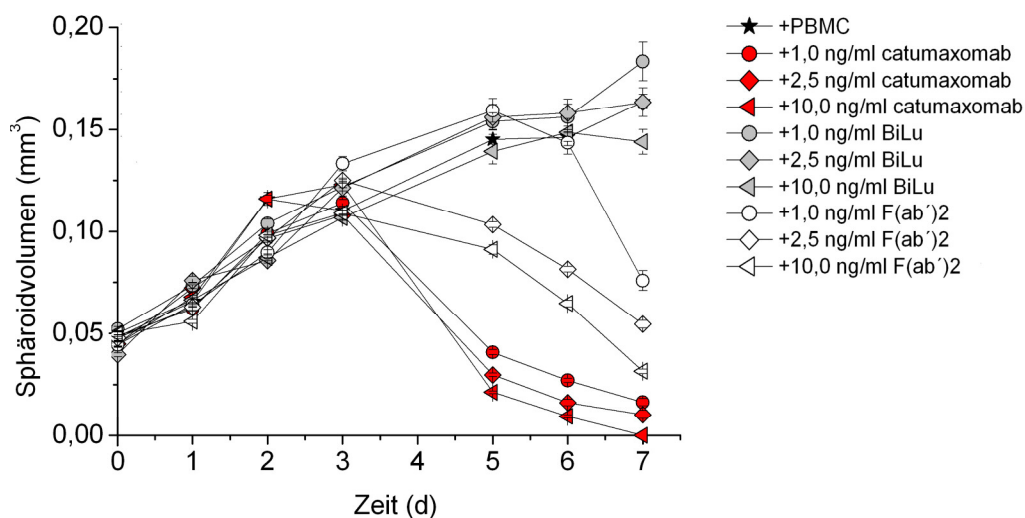


Abbildung 26: Volumenwachstum der Sphäroide bei Inkubation von FaDu-Kokulturen mit catumaxomab, BiLu und dem F(ab')₂ Fragment. Ab dem dritten Tag nach Versuchsstart wurde das Volumenwachstum durch catumaxomab und dessen F(ab')₂ Fragment konzentrationsabhängig gehemmt (n=200 Sphäroide, MW±SEM, p<0,0001).

ERGEBNISSE

Zusätzlich zu den Zytokinen aus den vorangegangenen Versuchen, wurde auch die Ausschüttung von MCP-1 (auch CCL-2) überprüft. Dies führte zu dem Ergebnis, dass in den Kontrollen oder bei Zugabe von AK in etwa die gleichen Konzentrationen von MCP-1 detektiert wurden, die mit Beginn von Tag 1 kontinuierlich bis auf $2 \cdot 10^5$ pg/ml anstiegen (Daten nicht gezeigt). IL-2, IL-6, IFN- γ und TNF- α hingegen wurden nicht in den Kontrollansätzen oder bei Gabe von BiLu gefunden (Abbildung 27). Catumaxomab induzierte eine konzentrations- und zeitabhängige Sekretion der vier Zytokine. Der Zusatz von F(ab')₂ führte nur zu geringen Zytokinkonzentrationen und bei IL-2, IL-6 und IFN- γ auch nur bei der höchsten F(ab')₂ Konzentration von 10,0 ng/ml. TNF- α wurde in geringen Konzentrationen an Tag 3 in Abhängigkeit von der Höhe der Konzentration von F(ab')₂ freigesetzt.

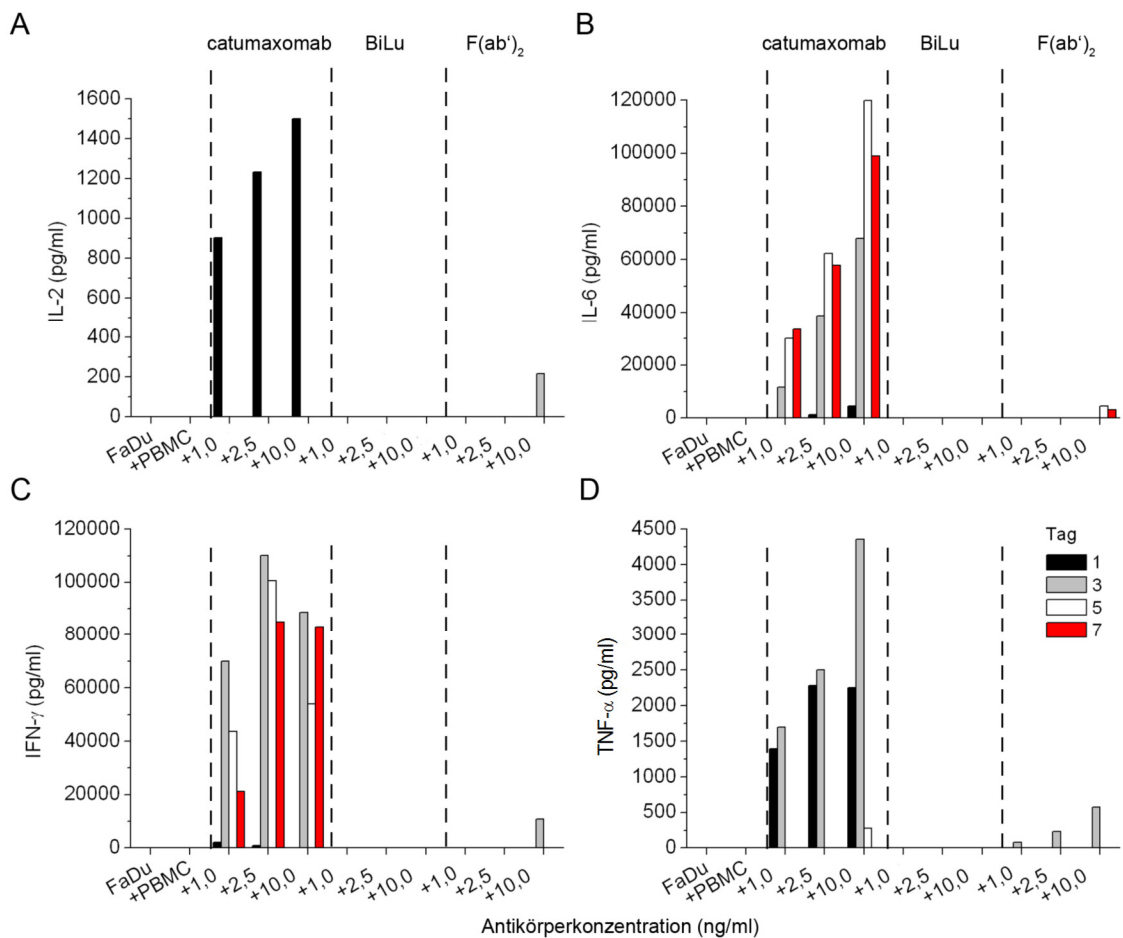


Abbildung 27: Das Zytokinprofil in den Kokulturen bei Gabe von BiLu, catumaxomab und dessen F(ab')₂ Fragments. Durch catumaxomab wurden IL-2, IL-6, IFN- γ und TNF- α konzentrations- und zeitabhängig freigesetzt. Das F(ab')₂ Fragment induzierte die IL-2, IL-6 und IFN- γ Sekretion nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10,0 ng/ml. Bei der TNF- α Freisetzung zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit von F(ab')₂. Die Kontrollen sowie die Ansätze mit BiLu wiesen keine Zytokine auf.

Von Sphäroiden am fünften Versuchstag wurden ebenfalls Kryoschnitte angefertigt. An diesen erfolgte eine immunhistologische Färbung von CD2, CD8, CD14, CD45 und Ki67. In Abbildung 28 gezeigt sind die Färbungen an der Kontrolle und den Ansätzen mit jeweils 2,5 ng/ml catumaxomab, BiLu und F(ab')₂. Durch Inkubation mit catumaxomab und dessen Fragment wurde die Einwanderung von CD2⁺/CD8⁺ Abwehrcellen induziert, sowie der Anteil

der proliferativen Zellen reduziert. In den Sphäroiden, die mit BiLu inkubiert wurden konnten ebenfalls $CD45^+$ Abwehrzellen nachgewiesen werden, die jedoch für CD2 und CD8 negativ waren. Eine CD14 Färbung wies auf die Einwanderung von Monozyten unter Inkubation mit BiLu hin (Abbildung 29).

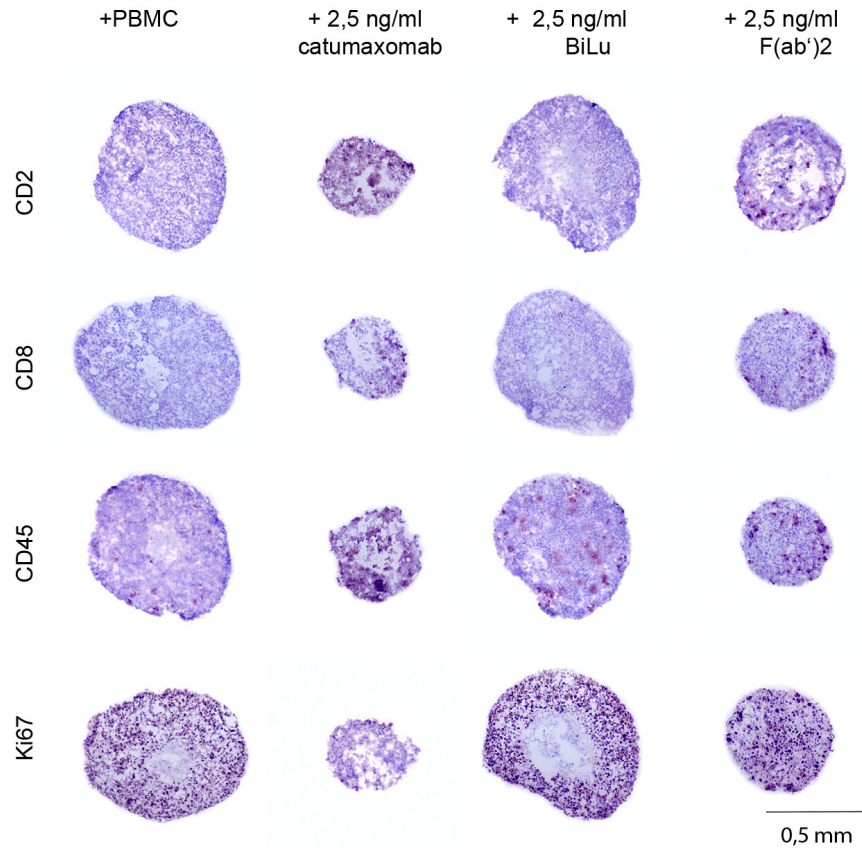


Abbildung 28: Immunhistologischer Nachweis der Proliferation (Ki67) und der infiltrierten Abwehrzellen an FaDu-Sphäroidschnitten von Tag 5 behandelt mit catumaxomab, BiLu und dem $F(ab')_2$ Fragment. Der Anteil proliferierender ($Ki67^+$) Zellen war bei Inkubation mit catumaxomab und dessen $F(ab')_2$ Fragment deutlich reduziert. Infiltration von $CD45^+$ Abwehrzellen konnte bei allen drei Molekülen nachgewiesen werden. Diese wurden bei catumaxomab und dem $F(ab')_2$ Fragment vorrangig als $CD2^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und damit als zytotoxische T-Zellen identifiziert.

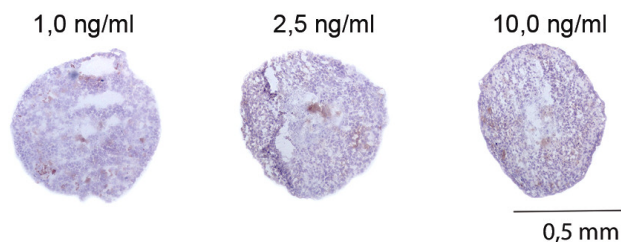


Abbildung 29: CD14 Färbung an FaDu-Sphäroiden, die mit BiLu behandelt wurden (Tag 5). Die Sphäroidschnitte aller drei eingesetzten BiLu Konzentrationen wiesen $CD14^+$ Zellen auf. Dabei war keine strikte Dosisabhängigkeit erkennbar.

Die quantitative Auswertung aller Färbungen des Versuchs ist in Abbildung 30 dargestellt. Durch catumaxomab wurde der Anteil der proliferierenden Zellen bereits bei Gabe von 1,0 ng/ml auf 10 % der Gesamtzellen reduziert. Bei einer Konzentration von 10,0 ng/ml wurden etwa 40 % der Zellen pro Medianschnitt am fünften Versuchstag als Abwehrzellen identifiziert. Durch BiLu wurde der proliferative Zellanteil bis auf maximal 50 % reduziert. Der

Anteil der Immunzellen betrug unter BiLu-Gabe maximal 25 %. Bei 1,0 ng/ml wurden innerhalb der Abwehrzellen die meisten CD14⁺ Zellen angefärbt. Catumaxomabs F(ab')₂ Fragment führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Ki67⁺ Zellen, dies entsprach bei der höchsten Konzentration eine Verminderung bis auf 20 %. Der Anteil der infiltrierten PBMC entsprach etwa dem bei BiLu, wobei jedoch mehr CD8⁺ Zellen angefärbt wurden.

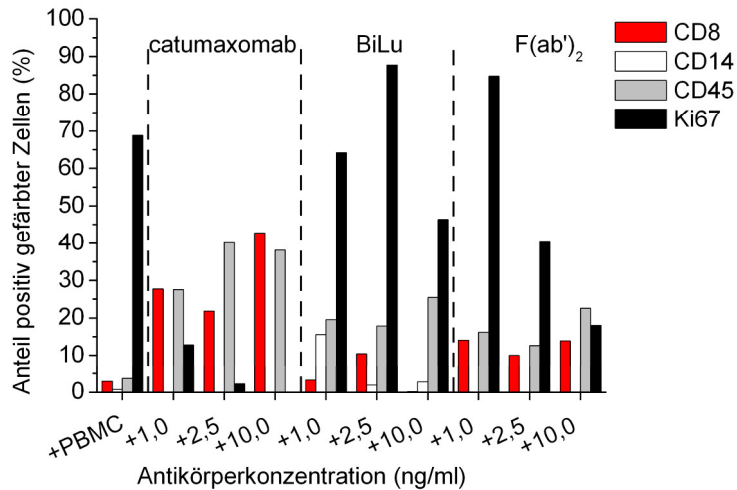


Abbildung 30: Quantitative Auswertung (% an Gesamtzellzahl) der immunhistologischen Färbung von Tag 5. Im Bezug auf die Reduktion des proliferativen Zellanteils und der Infiltration von CD8⁺ Immunzellen ließ sich folgende Beziehung herstellen: catumaxomab > F(ab')₂ > BiLu.

3.2.6.3 FaDu-Sphäroide kokultiviert mit PKH-26 markierten PBMC

Die Quantifizierung der PBMC im Kokulturüberstand zeigte, dass die Anzahl bereits an Tag 1 bei allen Ansätzen bereits um mindestens ein Drittel der Ausgangszellzahl von 1·10⁶/ml gesunken war (Abbildung 31). Bei der Inkubation mit 2,5 oder 10,0 ng/ml catumaxomab war die Anzahl bereits um zwei Drittel reduziert. Eine ähnlich starke Wirkung riefen 10,0 ng/ml des F(ab')₂ Fragments ab Tag 3 hervor. Die Inkubation mit BiLu führte konzentrationsunabhängig etwa zu einer Halbierung der PBMC Anzahl nach sieben Tagen, was dem Level der Kontrolle entsprach.

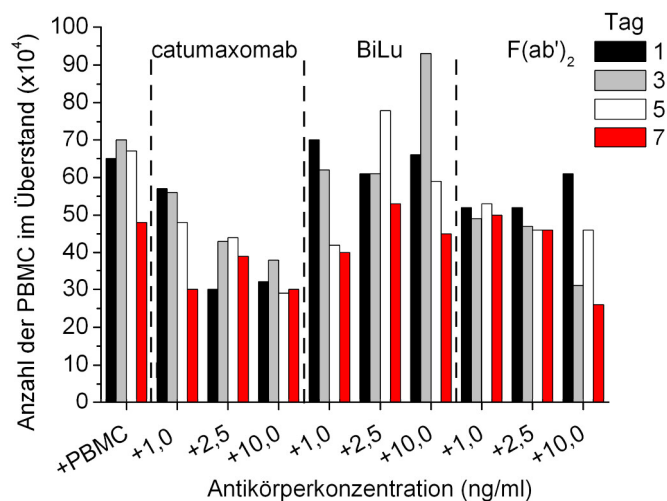


Abbildung 31: Anzahl der markierten PBMC im Kokulturüberstand. Bei der Reduktion der PBMC Anzahl im Überstand deutete sich bei catumaxomab eine Dosis- und Zeitabhängigkeit an.

ERGEBNISSE

Die Vitalitätstests (APH und XTT) von Tag 5 mit je vier intakten Sphäroiden pro Ansatz zeigten in der Abbildung 32 im Vergleich zueinander einen ähnlichen Verlauf. Die Vitalität wurde unter catumaxomab dosisabhängig, bei 10 ng/ml maximal um etwa 35 % reduziert. Im Mittel die zweitstärkste Wirkung hatte das F(ab')₂ Fragment. Die Reduktion der Vitalität durch BiLu war nicht konzentrationsabhängig und erzielte einen maximalen Wert von 18 %.

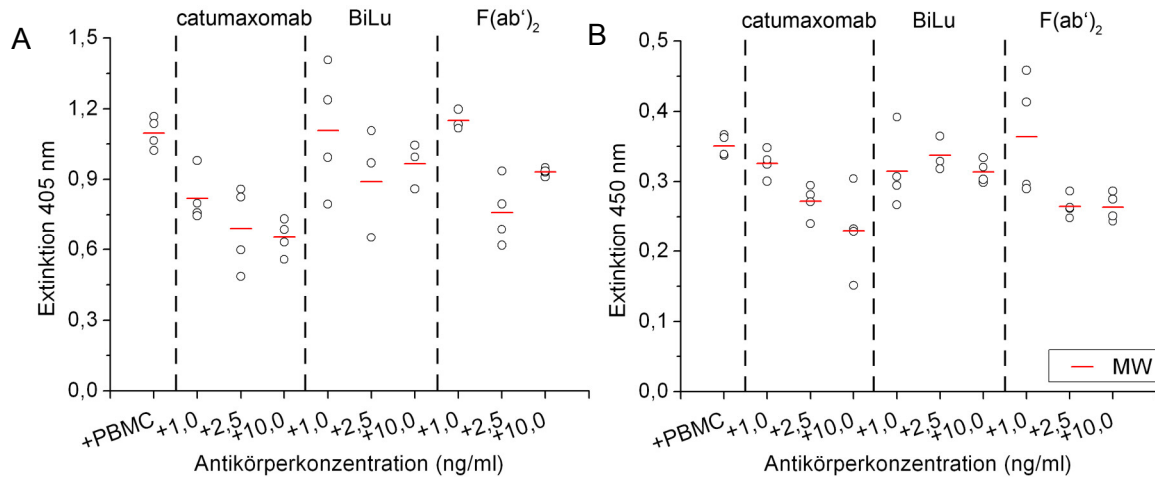


Abbildung 32: Vitalitätstests an intakten Sphäroiden mittels APH (A) und XTT (B) an Tag 5. Beide Tests zeigten bei catumaxomab behandelten Sphäroiden eine konzentrationsabhängige Reduktion der Vitalität um maximal 35 %. Durch Inkubation mit dem F(ab')₂ Fragment wurde die Vitalität bei den Konzentrationen 2,5 ng/ml und 10,0 ng/ml stärker reduziert als durch BiLu. Bei Letzterem war keine Konzentrationsabhängigkeit erkennbar und die Vitalitätswerte wurden nur um maximal 18 % reduziert.

Da das F(ab')₂ Fragment eine um etwa 30-40 % geringere Molekülgröße besitzt als der intakte AK und somit bei gleichen Konzentrationen keine äquimolaren Verhältnisse vorlagen, wurde ein Versuch mit um 35 % verringerten F(ab')₂ Konzentrationen durchgeführt. Die dazugehörige Volumenwachstumskurve ist unter Abbildung 33 gezeigt.

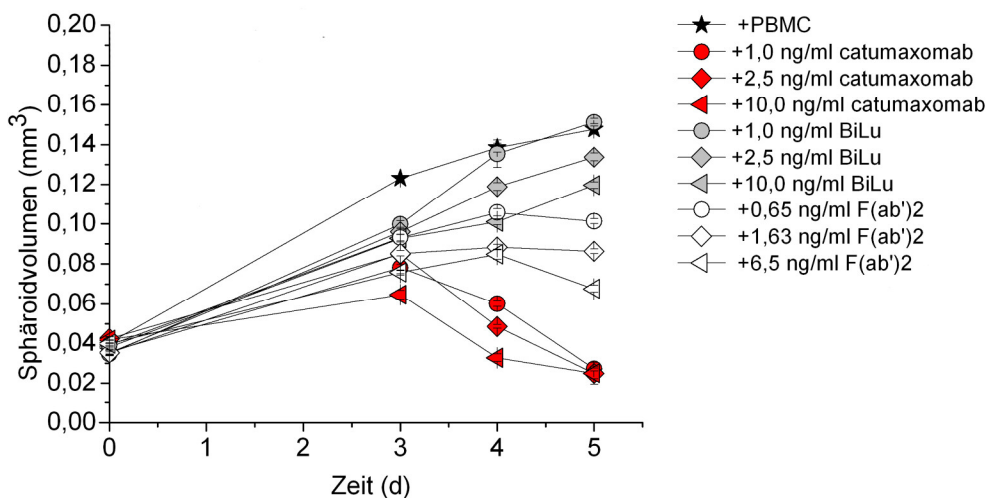


Abbildung 33: Volumenwachstumskurve der Sphäroide, die mit PKH-26 markierten PBMC, catumaxomab, BiLu und um 35 % verringerte Konzentrationen F(ab')₂ behandelt wurden. Für alle drei untersuchten Moleküle zeigte sich erneut eine Konzentrationsabhängigkeit der Volumenreduktion, die am stärksten durch catumaxomab hervorgerufen wurde.

Auch bei diesem Versuch wurden die freien PBMC im Kokulturüberstand quantitativ erfasst (Abbildung 34). Analog dem Versuch in Abbildung 31 war die Anzahl der PBMC im Überstand des Kontrollansatzes bereits an Tag 1 von $10^6/\text{ml}$ auf $7 \cdot 10^5/\text{ml}$ gesunken. Durch Zugabe von catumaxomab, dem $F(ab')_2$ -Fragment oder der höchsten Konzentration BiLu wurde die Anzahl an Tag 1 bis auf etwa $4 \cdot 10^5/\text{ml}$ reduziert. Dies setzte sich fort bis Tag 3. Danach stieg die PBMC-Anzahl in den meisten Ansätzen wieder an, blieb dabei jedoch unter dem Level von Tag 1.

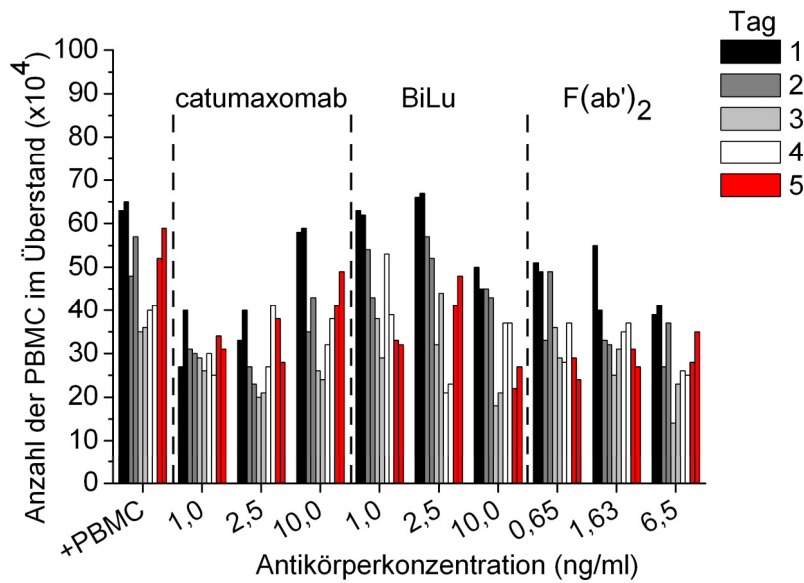


Abbildung 34: Anzahl der PKH-26 markierten PBMC im Kokulturüberstand behandelt mit catumaxomab, BiLu und $F(ab')_2$. Es wurden pro Versuchstag zwei Neubauer 16er Quadrate fotografiert und ausgezählt. Mit Ausnahme von 10,0 ng/ml waren in catumaxomab behandelten Kokulturen die Anzahl der PBMC 24 h nach Versuchsbeginn (Tag 1) bereits um 60 % vermindert. In den $F(ab')_2$ Proben belief sich die Reduktion auf etwa 50 %. Der Surrogatantikörper BiLu induzierte bei 1,0 und 2,5 ng/ml eine Verminderung der PBMC Anzahl im Bereich der Kontrolle und bei 10,0 ng/ml im Bereich der $F(ab')_2$ Proben. In den meisten Proben sank die Anzahl weiter bis Versuchstag 3, um dann bis auf die Anzahl von Tag 2 erneut anzusteigen.

Da die PBMC in den Kokulturen bei diesen Versuchen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 markiert waren konnten die infiltrierten Zellen ohne zusätzliche immunhistologische Färbung sichtbar gemacht werden. Die medianen Kryoschnitte wurden mit einem den Fluoreszenzfarbstoff DAPI enthaltenden Reagenz eingedeckt und schließlich mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In Abbildung 35 sind die Schnitte der Kontrollen denen der Schnitte, die mit den drei verschiedenen Molekülen catumaxomab, BiLu und $F(ab')_2$ behandelt wurden, gegenübergestellt. Innerhalb der Konzentrationsreihe eines Moleküls ließ sich eine gesteigerte Infiltration der Immunzellen detektieren. Die größte Infiltrationsdichte wies dabei catumaxomab auf. Zusätzlich ließ sich anhand der Schnitte auch deutlich der Größenunterschied der Sphäroide aus den einzelnen Gruppen erkennen. Während die BiLu behandelten Sphäroide die gleiche Größe wie die Kontrollen aufwiesen, waren die Sphäroide durch $F(ab')_2$ und catumaxomab Behandlung konzentrationsabhängig kleiner.

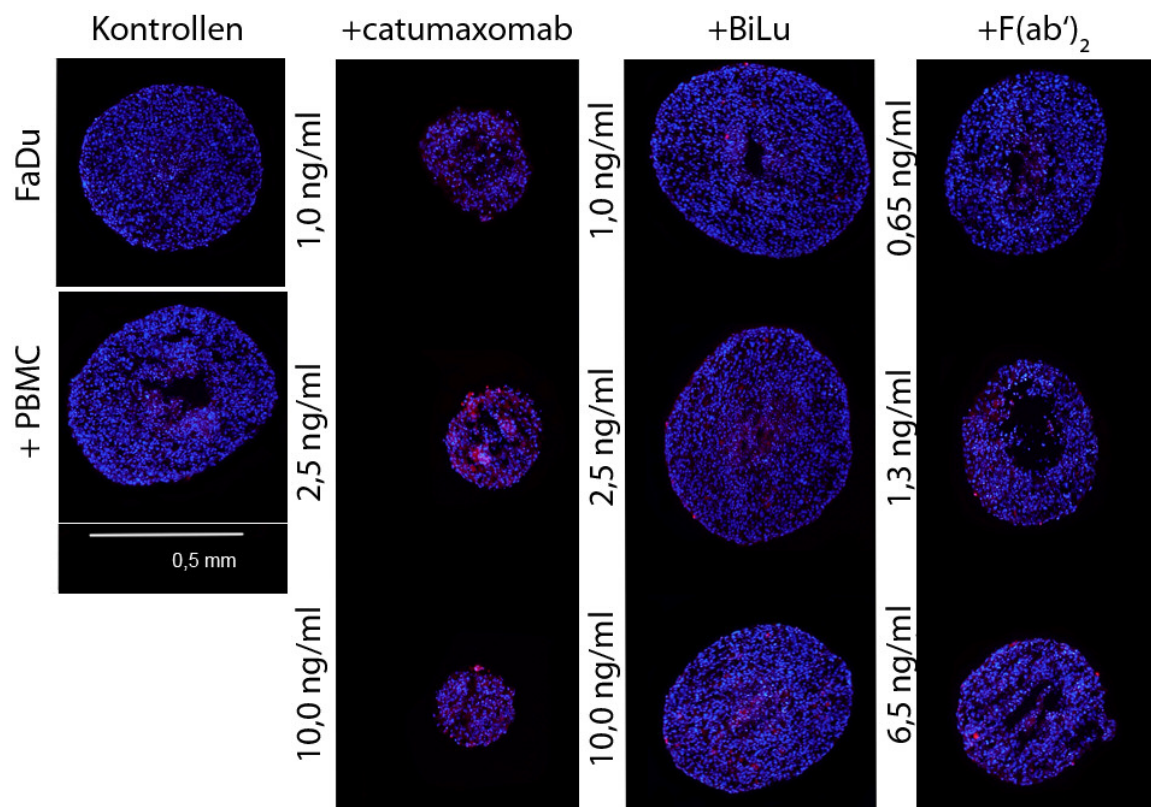


Abbildung 35: Fluoreszenzaufnahmen von Kryoschnitten aus FaDu-Sphäroidkulturen, die mit PKH-26 markierten PBMC, catumaxomab, BiLu und dem F(ab')₂ Fragment behandelt wurden. Durch die PKH-26 Markierungen konnten die eingewanderten PBMC in den Kryoschnitten nach Fluoreszenzanregung sichtbar gemacht werden. Es zeigten sich dabei eine Konzentrationsabhängigkeit der Infiltration und der Reduktion der Sphäroiddurchmesser bei catumaxomab und dessen F(ab')₂ Fragment.

Zum Vergleich beider Methoden wurde ergänzend zur Infiltrationsanalyse anhand der PKH-26 Markierung an den Schnitten eine immunhistologische Färbung durchgeführt. Zusätzlich sollte anhand derer eine Subtypisierung der eingewanderten Zellen vorgenommen werden. Die Schnitte wurden mit anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14 und anti-CD45 gefärbt. Die Kontrolle zeigte vereinzelt CD45⁺ Zellen, die zum Teil auch CD14⁺ waren (Abbildung 36). Von den behandelten Sphäroiden sind nur die, die mit der jeweils höchsten Konzentration inkubiert wurden, gezeigt. Die Gabe von allen drei Testmolekülen führte zu einer Detektion von CD45⁺ Zellen und spiegelt somit auch das Ergebnis von Abbildung 35 wider. Bei der Behandlung mit catumaxomab, wobei die meisten Leukozyten detektiert wurden, sowie auch bei seinem Fragment waren diese Zellen vorrangig auch CD8 positiv angefärbt. Im Fall der BiLu behandelten Proben konnten die eingewanderten Zellen erstrangig als CD14⁺ identifiziert werden.

Die histologischen Färbungen wurden zusätzlich quantitativ ausgewertet. Dabei zeigte sich erneut eine Konzentrationsabhängigkeit der Infiltration von CD45⁺ Zellen in die FaDu-Sphäroide. Catumaxomab zeigte bei 10,0 ng/ml sehr hohe CD45⁺ gefärbte Zellanteile von bis zu 80 % (Abbildung 37).

ERGEBNISSE

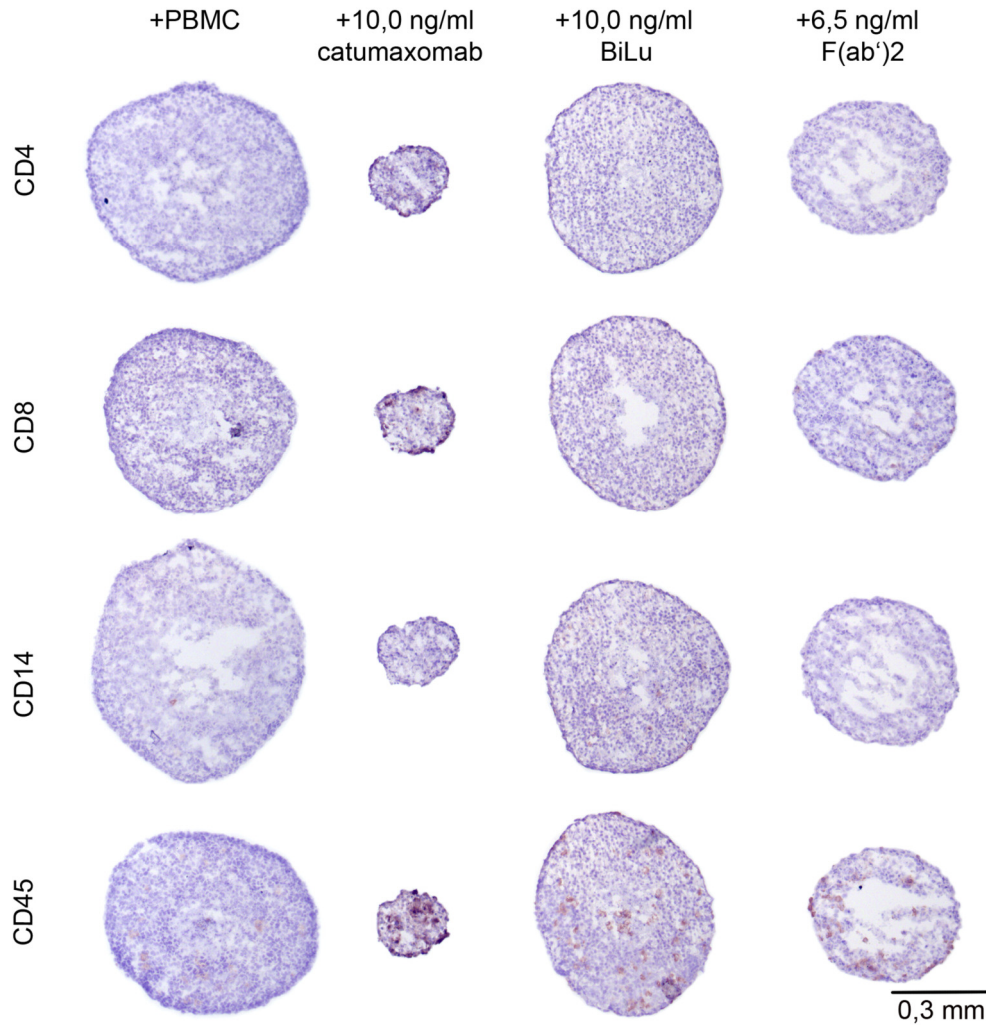


Abbildung 36: Immunhistologische Färbung von CD4, CD8, CD14, CD45 in FaDu-Kokulturen behandelt mit 10,0 ng/ml catumaxomab, 10,0 ng/ml BiLu und 6,5 ng/ml F(ab')₂. Alle Proben inklusive der Kontrolle wiesen eine positive Färbung von CD45⁺ Abwehrzellen auf, die bei catumaxomab am stärksten ausgeprägt war. Besonders im Fall von catumaxomab und vereinzelt bei dem F(ab')₂ Fragment waren die Zellen CD8⁺.

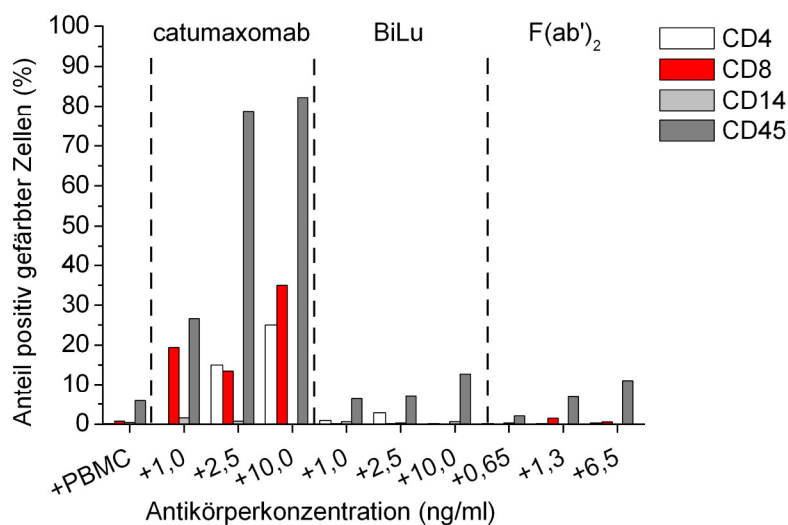


Abbildung 37: Quantitative Analyse (% an Gesamtzellzahl) der histologischen Färbung. Ausgewertet wurden CD4, CD8, CD14 und CD45 Färbungen bei FaDu-Kokulturen behandelt mit catumaxomab, BiLu und um 35 % verringerte F(ab')₂ Konzentrationen.

Neben den Analysen an Kryoschnitten wurde die Infiltration auch mit Methoden der Molekularbiologie analysiert. Dazu wurden von Kokultur-Sphäroiden aus dem Versuch, von dem in Abbildung 35 und Abbildung 36 die Schnitte gezeigt sind, die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde mit Hilfe der qPCR ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) hinsichtlich von Abwehrzellantigenen untersucht. Wie auch bei den histologischen Analysen zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit von den eingesetzten AK. Dabei war die Expression der gemessenen Marker (CD2, CD4, CD8, CD14, CD45) in den catumaxomab Proben um ein Vielfaches größer als in den anderen Proben.

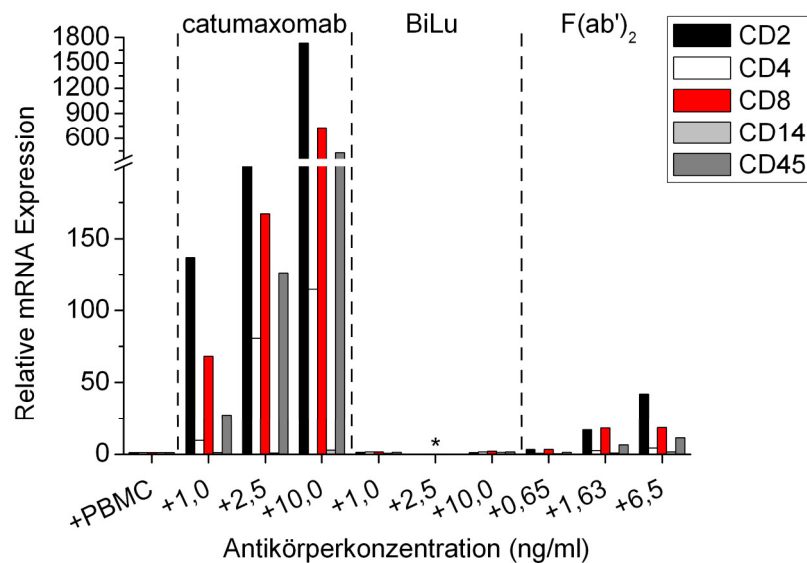


Abbildung 38: Relative mRNA Expression von CD2, CD4, CD8, CD14 und CD45 in FaDu-Kokulturen behandelt mit catumaxomab, BiLu und F(ab')₂ bezogen auf die Kontrolle. Bei allen Proben konnte auf mRNA Ebene eine strikte positive Korrelation zwischen eingesetzter AK-Konzentration und Expression der Abwehrzellantigene nachgewiesen werden. Die stärkste Expression wurde bei den catumaxomab behandelten Proben detektiert. Durch BiLu Gabe wurde die Expression im Vergleich zur Kontrolle maximal um den Faktor 2 gesteigert (* Daten für 2,5 ng/ml BiLu nicht auswertbar).

3.2.7 Einfluss von Immunsuppressiva auf die Wirkung von trifunktionalen AK

Häufig werden in der Klinik Immunsuppressiva bei der Krebstherapie eingesetzt, um die unerwünschten Nebenwirkungen als Folge einer Therapiemaßnahme zu unterdrücken. Dazu gehören auch überschießende Entzündungsreaktionen mit extrem gesteigerter Zytokinausschüttung („cytokine release syndrom“), die wiederum unter anderem zu Erkältungssymptomen, Fieber oder Erbrechen führen können. Um dem entgegen zu wirken, kommen bei verschiedenen Therapien Immunsuppressiva, am häufigsten Glucocorticoide, zum Einsatz.

Aus diesem Grund wurden von Markus Lehr im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit Versuche zur Kombination von trifunktionalen AK und Glucocorticoiden durchgeführt. Dabei untersuchte er die Wirkungen von Dexamethason bei catumaxomab und Prednisolon bei ertumaxomab Inkubation.

3.2.7.1 FaDu-Kokulturen behandelt mit catumaxomab und Dexamethason

Zunächst führte er einen Versuch mit FaDu-Sphäroiden durch, die er mit 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml und 10 µg/ml Dexamethason mit und ohne 2,5 ng/ml catumaxomab inkubierte (Tabelle 17). Catumaxomab allein reduzierte das Sphäroidvolumen an Tag 5 um 64 %. Bereits die Zugabe von 0,1 µg/ml Dexamethason hob einen Großteil der Wirkung auf. Die Volumenreduktion betrug lediglich noch etwa 30 %. Aber auch Dexamethason allein zeigte dosisabhängig volumenreduzierende Effekte von bis zu 45 %.

Tabelle 17: Wirkung der Kombination von Dexamethason mit catumaxomab auf FaDu-Kokulturen (Tag 5). Dexamethason allein wirkte konzentrationsabhängig zytotoxisch und hob in Kombination mit catumaxomab dessen Wirkung zum Teil auf.

| | Kontrolle | catumaxomab allein | Dexamethason allein | | | catumaxomab +Dexamethason | | |
|-------------|-----------|--------------------|---------------------|-----|------|---------------------------|-----------|------------|
| Ansatz | +PBMC | 2,5 ng/ml | 0,1 | 1,0 | 10,0 | 2,5 + 0,1 | 2,5 + 1,0 | 2,5 + 10,0 |
| | | | µg/ml | | | | | |
| Volumen (%) | 100 | 36 | 68 | 62 | 55 | 70 | 73 | 72 |

Bei Analyse der Kokulturüberstände hinsichtlich der Zytokinfreisetzung war an Tag 1 bei allen Ansätzen mit catumaxomab ein Expressionsprofil analog zu dem der anderen Versuche zu beobachten. Bei den Kombinationsansätzen waren dosisabhängig geringere Zytokinlevel detektiert worden. An Tag 5 waren nur noch beim Ansatz mit 2,5 ng/ml catumaxomab IL-6 (5217 pg/ml) und IFN-γ (2578 pg/ml) nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.2.7.2 FaDu-Kokulturen unter Behandlung mit ertumaxomab und Prednisolon

Darüber hinaus untersuchte Markus Lehr die Wirkung der Kombination von ertumaxomab mit Prednisolon an FaDu-Kokulturen. Dazu wurden die Kokulturen mit 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml und 1,2 µg/ml Prednisolon mit und ohne 10,0 ng/ml ertumaxomab inkubiert. Die Konzentration an ertumaxomab war höher gewählt, als die von catumaxomab (Kapitel 3.2.7.1), da die FaDu-Sphäroide im Vergleich zu EpCAM eine geringere Her2/neu Expression aufweisen. Prednisolon reduzierte die Wirkung von ertumaxomab um 13-17 %. Prednisolon allein zeigte zytotoxische Effekte und bewirkte eine etwa 50%ige Volumenreduktion (Tabelle 18).

Tabelle 18: Wirkung der Kombination von Prednisolon mit ertumaxomab auf FaDu-Kokulturen (Tag 5). Prednisolon allein zeigte zytotoxische Effekte, die im Bereich der Kombinationsbehandlung lagen.

| | Kontrolle | ertumaxomab allein | Prednisolon allein | | | ertumaxomab + Prednisolon | | |
|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----|-----|---------------------------|-----------|----------|
| Ansatz | +PBMC | 10,0 ng/ml | 0,1 | 0,3 | 1,2 | 10,0+0,1 | 10,0+ 0,3 | 10,0+1,2 |
| | | | µg/ml | | | | | |
| Volumen (%) | 100 | 37 | 51 | 41 | 44 | 37 | 54 | 50 |

Von diesen Sphäroiden wurden Schnitte angefertigt sowie Ki67 und CD45 immunhistologisch angefärbt. Je höher die Prednisolonkonzentration bei der Kombination oder Einzelapplikation war, umso geringer war der Anteil proliferierender Zellen und CD45⁺ Immunzellen (Daten nicht gezeigt).

3.2.7.3 E593-Kokulturen unter Behandlung mit ertumaxomab und Prednisolon

Analog zum vorhergehenden Versuch wurden E593-Zellen in den Kombinationsversuch mit Prednisolon und ertumaxomab eingesetzt. Nur die Konzentration ertumaxomab wurde aufgrund der höheren Antigenexpressionstärke mit 5,0 ng/ml niedriger gewählt. Wie auch in den Versuchen mit FaDu, hebt Prednisolon die Wirkung von ertumaxomab zum Teil auf. Während 5,0 ng/ml ertumaxomab das Sphäroidvolumen um 70 % reduzierte, waren es bei Kombination nur noch 33-39 %, wobei keine Dosisabhängigkeit erkennbar war. Der Effekt von Prednisolon allein war mit 11-17 % geringer, als bei den übrigen Versuchen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Wirkung der Kombination von Prednisolon mit ertumaxomab auf FaDu-Kokulturen (Tag5).

| Ansatz | Kontrolle +PBMC | ertumaxomab allein 5,0 ng/ml | Prednisolon allein | | | ertumaxomab + Prednisolon | | |
|-------------|--------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|---------------------------|----------|---------|
| | | | 0,1 µg/ml | 0,3 µg/ml | 1,2 µg/ml | 5,0+0,1 | 5,0+ 0,3 | 5,0+1,2 |
| Volumen (%) | 100 | 30 | 83 | 85 | 89 | 62 | 61 | 67 |

Die histologische Analyse der Sphäroidschnitte dieses Versuchs zeigte, dass Prednisolon allein auch keine Auswirkungen auf den Anteil der proliferierenden E593-Zellen hatte, jedoch die Komedikation mit steigender Prednisolonkonzentration zu weniger Abwehrzellinfiltration führte (Daten nicht gezeigt).

3.2.8 Einfluss von catumaxomab auf die metabolische Aktivität

WeiXiao Sha hat in seiner Diplomarbeit (Sha 2010) vergleichend in PBMC-Monokulturen, in FaDu-Monolayer-PBMC-Kokulturen und in Sphäroid-PBMC-Kokulturen metabolische und immunologische Analysen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Spinnerflaschen-Versuchen hat er mit Mikrotiterplatten gearbeitet, um so den Probendurchsatz erhöhen zu können. Als Vergleichssubstanzen kamen klassische Immunstimulantien wie Lipopolysaccharid (LPS, 1,0 µg/ml), Concanavalin A (ConA, 1,0 µg/ml), Phytohämagglutinin L (PHA-L, 5,0 µg/ml), BiLu (10,0 ng/ml) und das F(ab')₂ Fragment (10,0 ng/ml) von catumaxomab (10,0 ng/ml) zum Einsatz. Erste Experimente mit catumaxomab stimulierten PBMC-Kulturen zeigten im In-Cell Western eine gesteigerte Proteinexpression von Enzymen und Transportern, die in die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung involviert sind.

Durch catumaxomab-Stimulation von PBMC-Monokulturen konnte eine Erhöhung der Laktatkonzentration im Kulturüberstand um mindestens das Doppelte im Vergleich zu allen anderen Testsubstanzen und mehrheitlich die höchste Zytokinsekretion (IL-2, TNF- α , IFN- γ) an Tag 3 detektiert werden. Bei Kokultur der PBMC mit FaDu-Monolayern sowie auch FaDu-Sphäroiden war die Laktatkonzentration und die Zytokinfreisetzung in catumaxomab-behandelten Proben an Tag 3 systematisch höher. Zusätzlich wurden die verschiedenen Ansätze hinsichtlich ihrer Azidifizierungs- (ECAR) und Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) mit

dem Seahorse XF Analyzer untersucht. Im Bezug auf beide Parameter lieferte catumaxomab die höchsten Werte (Abbildung 39).

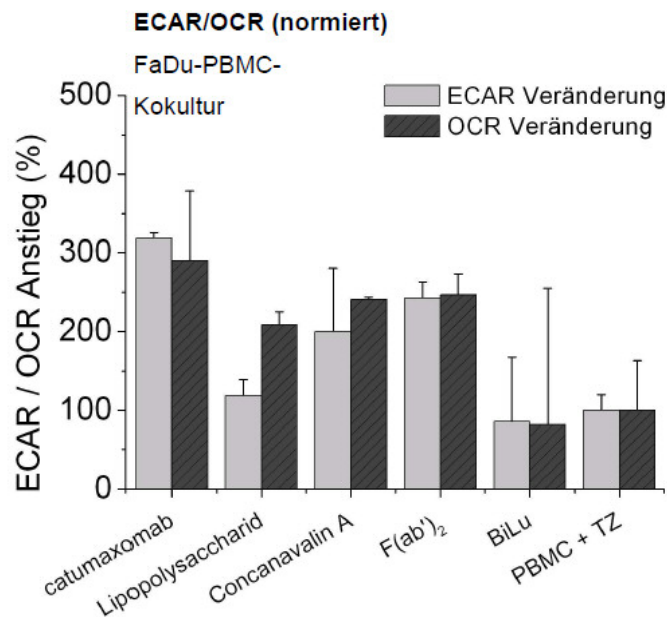


Abbildung 39: Basale Sauerstoffverbrauchs- (OCR) und Azidifizierungsrate (ECAR) unter Inkubation mit catumaxomab und anderen Vergleichssubstanzen normiert auf die Probe mit Sphäroiden in Kokultur mit PBMC. Catumaxomab, gefolgt vom F(ab')₂ Fragment und ConA, wies für beide Parameter die höchsten Anstiege auf.

Der unterschiedliche Einfluss der Testsubstanzen spiegelte sich auch im Hinblick auf die Abwehrzellinfiltration wider. Unter catumaxomab Inkubation infiltrierten anteilig an der Gesamtzellzahl pro Schnitt die meisten CD45⁺ Zellen in die FaDu-Sphäroide. Bei Analyse der Subtypen konnte der Großteil der Zellen als CD2⁺/CD8⁺ identifiziert werden. Weiterhin waren CD4⁺ und CD14⁺ Zellen nachweisbar.

4 Diskussion

Das Forschungsprojekt in Kooperation der AG Müller-Klieser mit Fresenius Biotech GmbH und TRION Pharma GmbH trägt den Titel „Entwicklung eines pharmakologischen Modells zur Prüfung immuntherapeutischer AK mit dreidimensionalen Tumorzellkulturen *in vitro*.“

Bei den therapeutischen AK handelt es sich um catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3). Sie besitzen zwei verschiedene variable Domänen. Beiden gleich ist die Bindungsstelle für CD3 auf T-Zellen sowie eine Bindungsstelle für ein Tumor-assoziiertes Antigen. Im Fall von catumaxomab handelt es sich dabei um EpCAM, im Fall von ertumaxomab um Her2/neu. Neben dieser Bivalenz besitzen die AK eine dritte Bindungsstelle für Fc γ RI/IIa/III positive, akzessorische Immunzellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen oder NK-Zellen. Diese einzigartige Kombination ermöglicht theoretisch die Ausbildung eines Tri-Zell-Komplexes bestehend aus Tumorzelle, T-Zelle und akzessorischer Zelle.

Aus dem Projekt sind eine Masterarbeit (Hirschhäuser, geb. Wawrsinek 2006), drei Diplomarbeiten (Charles 2007, Ehlert 2009, Sha 2010), zwei medizinische Doktorarbeiten (Rodday 2010, Lehr) sowie neben der vorliegenden, eine weitere naturwissenschaftliche Doktorarbeit (Leidig 2010) hervorgegangen.

Ziele des Projektes waren die Etablierung des Testmodells sowie die Erlangung weiterer Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von catumaxomab und ertumaxomab. Dazu sollten ergänzend zu Monolayersversuchen anderer Labore Experimente im dreidimensionalen Zellkulturmodell, welches die *in vivo* Situation besser imitiert, durchgeführt werden. Das verwendete Sphäroidmodell soll im Folgenden diskutiert werden. Darauf folgt die Erläuterung der Bedeutung der verschiedenen Bindungsspezifitäten von catumaxomab und ertumaxomab. Daran schließt sich die Diskussion der mit dem Sphäroid-Modell erzielten Ergebnisse an.

4.1 Beurteilung des 3D-Modells als Testsystem für Immuntherapeutika

4.1.1 Sphäroidkultivierung

Das Sphäroidmodell bietet gegenüber dem klassischen zweidimensionalen Zellkulturmodell viele Vorteile für die Beurteilung der Wirksamkeit der therapeutischen AK. In einer Spinnerflasche kultivierte Sphäroide ähneln stark den Tumorzellaggregaten in der Aszitesflüssigkeit bei malignem Aszites, der Hauptindikation von catumaxomab. Genau wie in der Bauchhöhle müssen sich AK, Abwehrzellen und Tumorzellen räumlich zusammenfinden, um eine Wirkung hervorzurufen. Dies ist in einem stationären System, wie der 96 well-Platte nicht der Fall.

Darüber hinaus eignen sich Sphäroide in Spinnerflaschen für Versuche mit einer Dauer von bis zu zwei Wochen. Pro Flasche wurden 200 Sphäroide eingesetzt. Diese hohe Anzahl führte zu statistisch gut abgesicherten Ergebnissen. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist der hohe Verbrauch an Materialien und Reagenzien für die Kultivierung der Zellen, die Initiierung der Sphäroide und die Antikörperexperimente. Der Verbrauch wurde durch die Verwendung von miniaturisierten Spinnerflaschen mit einem Lösungsvolumen von 20 ml (im Vergleich zu mittleren Spinnerflaschen mit 100 ml) reduziert und könnte durch die Verwendung von noch kleineren Spinnerflaschen weiter verbessert werden. Prototypen mit einem Mediumvolumen von 7,5 ml wurden bereits hergestellt und befinden sich in der Testphase. Durch die Verwendung der Mini-Flaschen könnte eine weitere Limitation vermindert werden. Es konnten nur maximal 15 Ansätze gleichzeitig kultiviert werden. Das lag zum einen an der maximalen Anzahl von Rührplätzen der Magnetinduktionsplatte und zum anderen an der maximalen Anzahl an PBMC, die pro buffy coat isoliert werden konnten. Insofern bieten Versuche mit Mikrotiterplatten den Vorteil, dass viele Substanzen gleichzeitig auf einer Platte getestet werden können und damit einem „high throughput screening (HTS)“ (Kunz-Schughart et al. 2004; Friedrich et al. 2009) näher kommen.

Zu Beginn der Arbeit hatten die Sphäroidversuche eine experimentelle Vorlaufzeit von 14 Tagen ab Sphäroidinitiierung. Diese wurde auf acht Tage reduziert. Dabei wurden die Sphäroide vier Tage in der 96 well-Platte und anschließend drei Tage in großen Spinnerflaschen inkubiert, bevor sie einen Tag vor Versuchstart auf die 20 ml Flaschen aufgeteilt wurden. Auf diese Weise waren die Sphäroide zum Versuchsstart kleiner als beim ursprünglichen Protokoll und konnten somit während der Versuche länger kontinuierlich wachsen. Entsprechend war es möglich neben der Reduktion des Sphäroidvolumens auch das verminderte Volumenwachstum als Reaktion auf den therapeutischen Eingriff zu dokumentieren.

Einen Tag vor Versuchsstart wurden die Sphäroide abgezählt und je 200 MCTS in kleine Spinnerflaschen überführt. Somit war die Möglichkeit gegeben, kontaminierte, schlecht drehende oder Flaschen mit bereits verklumpten Sphäroiden aus dem Versuch auszuschließen. Diesen Risiken bei der Kultivierung in Spinnerflaschen, wie Kontamination und technische Schwierigkeiten, steht ohne Zweifel eine Vielzahl experimenteller Vorteile gegenüber.

4.1.2 Endpunkte zur Wirkstoffbeurteilung

1. Sphäroidvolumenwachstum bzw. -reduktion

Es ließen sich im Bezug auf die Wirkung einer Testsubstanz verschiedene Endpunkte bestimmen. Der wichtigste unter ihnen ist die Sphäroidgröße, welche das Äquivalent zur Tumorgröße *in vivo* darstellt. In der Methodik der Analyse der Sphäroidgrößen wurden in

diesem Projekt erhebliche Fortschritte erzielt. So wurde innerhalb des Gesamtprojektes ein Verfahren entwickelt, bei dem mit Hilfe eines handelsüblichen Flachbettscanners die sedimentierten Sphäroide eingescannt und anschließend anhand der Bilder die Größen computergestützt berechnet werden konnten (Rodday 2010). Die Methode bietet mehrere Vorteile. Der größte ist, dass für die Messung nicht mehr in die Kultur eingegriffen werden muss. Dies vermeidet die Gefahr der Kontamination und den Verlust von Sphäroiden, Abwehrzellen, AK sowie Kulturmedium. Des Weiteren bleiben die Bilder für eine nachträgliche Analyse erhalten. Mit den in dieser Arbeit verwendeten schwarzen Magnetrührern und blauen Magneten konnte die Methode weiter verbessert werden, da nun nicht mehr darauf geachtet werden musste, dass keine Sphäroide beim Scannen unterhalb des Rührers liegen und so für die Auswertung verloren gehen. Wichtig für die Standardisierung ist die Verwendung gleicher Einstellungen beim Einscannen und der Tonwertkorrektur in Photoshop, da sonst allein durch den Scanvorgang oder die Auswertung verschiedene Messwerte entstehen können. Der zeitliche Aufwand im Vergleich zur Messung mit dem Okularmikrometer ist in etwa der gleiche, nur ist die Auswertung am Computer zeitlich flexibel. Um das Verfahren noch weiter zu verbessern, müsste die Verarbeitung der Bilder künftig automatisierter erfolgen. Optimal wäre zudem, wenn Magnetrührplatte und Scanner in einem Gerät kombiniert wären. So könnte an beliebig vielen Zeitpunkten das Rühren gestoppt werden, worauf die Sphäroide zu Boden sinken und über den Scanner erfasst werden könnten.

2. Nachweis von relevanten Markern über immunhistologische und molekularbiologische Methoden

Ein weiterer Endpunkt der anhand von intakten Sphäroiden bestimmt werden kann, ist der Nachweis von verschiedenen Markern mittels immunhistologischer Färbung oder PCR. Mit der histologischen Methode wurden der Proliferationsmarker Ki67, freie –OH Gruppen als Hinweis auf Apoptose, die tumorassoziierten Antigene (EpCAM, Her2/neu) und diverse Oberflächenmoleküle von Abwehrzellen angefärbt. Hauptvorteil der Färbung ist die Lokalisation der Zielstrukturen innerhalb des Schnittes. Der Nachteil besteht darin, dass die Methode inklusive Schneiden, Färben, Fotografieren sehr arbeits- und zeitaufwendig ist. Somit handelt es sich bei den Färbeergebnissen auch eher um exemplarische Darstellungen als um statistisch gesicherte Analysen. Dabei sind auch einige methodische Aspekte zu beachten. So muss der Schnitt möglichst median durch das Sphäroid verlaufen. Der Schnitt darf nicht gerissen sein oder so auf den Objektträger aufgenommen werden, dass die native runde Form verloren geht. Zudem müssen Färbungen für vergleichende Analysen immer nach dem selbem Protokoll durchgeführt werden.

Die Anzahl positiv gefärbter Zellen wurde mit Hilfe einer neuen computergestützten Methode erfasst. Dazu trennt ein ImageJ PlugIn die blauen und braunen Anteile eines Färbefotos und

bestimmt über die Anzahl, Lage und Größe der farbigen Flächen die Zahl der infiltrierten Zellen und ihre Einwanderungstiefe. Im Vergleich dazu wurde vorher mit einer Maske aus konzentrischen Ringen gearbeitet, die in Photoshop auf das digitale Bild gelegt wurde, worauf die Zellen manuell pro Ring ermittelt wurden (Hirschhaeuser et al. 2009). Dies ist natürlich eine sehr benutzerabhängige Methode. Die neue PlugIn-basierte Auswertung läuft immer nach dem gleichen Algorithmus ab, jedoch ist die Qualität der Färbung von entscheidender Bedeutung. Ist beispielsweise die Hämalaunfärbung zu schwach, muss eine Tonwertkorrektur vorgenommen werden. Dabei erhöht natürlich jeder manuelle Eingriff die Ungenauigkeit der Methode.

Eine alternative Methode zur Quantifizierung der Infiltration ist die Amplifikation der Zielantigene mittels PCR. Bei der PCR kommen wesentlich mehr Sphäroide zum Einsatz und somit ist das Ergebnis repräsentativer für die gesamte Sphäroidpopulation. Jedoch wird im Vergleich zur Histologie nur die mRNA und nicht das exprimierte Protein nachgewiesen. In der Arbeit fanden sowohl die semiquantitative als auch die quantitative PCR ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) Anwendung. Dabei haben beide Methoden Vor- und Nachteile. Die semiquantitative PCR wird gewöhnlich in Einfachbestimmung an einer Probe durchgeführt, liefert aber in Form des Agarosegels ein optisch sichtbares Ergebnis, das sich über Densitometrie auswerten lässt. Bei der qPCR laufen die Reaktionen in Dreifachbestimmung ab und es existiert durch Verwendung eines Haushaltsgens eine Kontrolle über die eingesetzte cDNA Menge. Die Methode ist sensitiver was Genauigkeit aber auch Fehleranfälligkeit betrifft. Zudem ist sie viel kostenintensiver.

3. Analyse des Kulturüberstandes

Weitere Endpunkte liefert die Analyse des Kulturüberstandes. Mittels ELISA können freigesetzte Zytokine nachgewiesen werden, woraus sich auf die Aktivität verschiedener Abwehrzellsubtypen schließen lässt. Auch die Anzahl der noch freien PBMC oder der AK-Moleküle kann man im Kokulturüberstand ermitteln. Die Probenentnahme bedeutet einen Eingriff in einen laufenden Versuch. Daher muss in Vorversuchen ermittelt werden an welchen Zeitpunkten Veränderungen erwartet werden. Zudem soll das Probenvolumen so gering wie möglich und zwingend in allen Ansätzen gleich gehalten werden.

Bei der Analyse des Kokulturüberstandes hinsichtlich der noch freien PBMC bestand die Schwierigkeit zwischen Abwehrzellen, Tumorzellen und Debris zu differenzieren. Die PKH26 Fluoreszenzmarkierung ist ein guter Ansatz, aber die fotografische Dokumentation und die manuelle Auszählung ist sehr zeitaufwendig und benutzerabhängig. Der Versuch der automatischen Auswertung mit dem Analysewerkzeug von Photoshop führt zu von der manuellen Analyse abweichenden Ergebnissen, da zusammen liegende Zellen nicht als mehrere Zellen erkannt werden. Eine Anpassung des watershed-Algorithmus in ImageJ und die rechnerisch Trennung der Flächen in Excel analog zur Auswertung der Infiltration wäre

eine Möglichkeit der Lösungsfindung. Jedoch wird die Analyse dadurch noch komplexer. Eine einfachere Lösung könnte ein Durchflusszytometer mit Zellzählfunktion bieten (z.B. Easyocyte, Guava, Millipore).

4. Durchflusszytometrie, Vitalitätsassays und Koloniebildungstest

Neben Assays mit ganzen Sphäroiden, konnten auch solche mit Tumorzellen aus disaggregierten Sphäroiden durchgeführt werden. Dazu gehören die Durchflusszytometrie, die Vitalitätsassays (XTT, APH) und der Koloniebildungstest. Letzterer konnte durch die Anwendung des Scanverfahrens für die Auswertung der Kolonieanzahl wesentlich vereinfacht werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien FaDu und FaDu E593 war es aufgrund ihrer Festigkeit eine methodische Herausforderung die Sphäroide zu einer Zellsuspension zu vereinzeln. Daher sind unter Umständen nicht alle beobachteten Effekte auf die AK zurückzuführen, sondern zum Teil sind sie methodisch bedingt. Nach einem Hinweis aus der Literatur (Friedrich et al. 2007b), wurden der beschriebene APH-Vitalitätsassay sowie der XTT-Test auch an ganzen Sphäroiden getestet und schließlich erfolgreich angewandt.

Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 40 zusammengefasst.

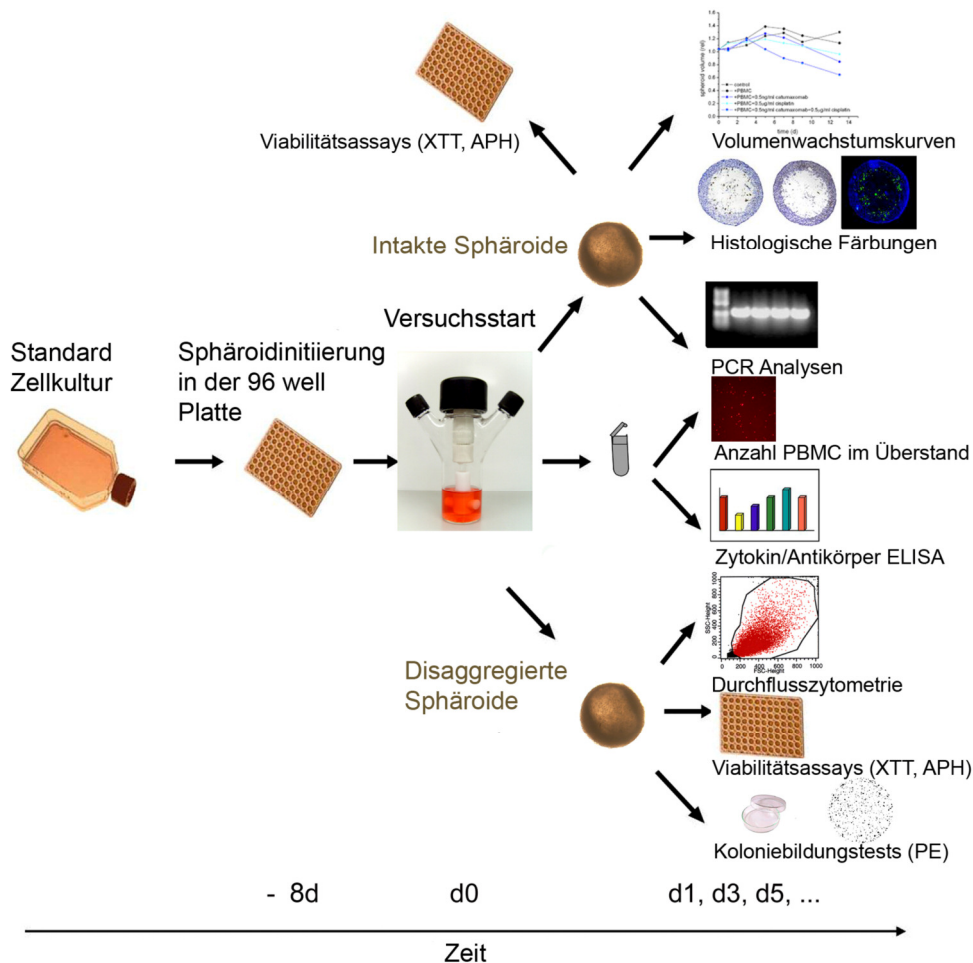


Abbildung 40: Versuchsaufbau eines Experiments zur Untersuchen der Wirkung von therapeutischen AK auf Sphäroid-Kokulturen.

4.2 Bindungsspezifitäten von catumaxomab und ertumaxomab

4.2.1 EpCAM Bindung

EpCAM (CD326) ist ein transmembranes Glykoprotein, das die Ca^{2+} -unabhängige homophile Zelladhäsion vermittelt (Litvinov et al. 1994). Es wird bei Karzinomen unterschiedlicher Entitäten exprimiert. Dazu gehören Colon, Rectum, Gaster, Ovar, Ösophagus, Lunge, Pankreas, Brust und der Kopf-Hals-Bereich (Went et al. 2008). Die Signalweiterleitung über EpCAM erfolgt durch dessen Spaltung mittels TACE (tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme) und PS2 (presenilin-2) in die Ektodomäne (EpEX) und die intrazelluläre Domäne (EpICD). EpICD wandert in den Kern und bindet im Komplex mit FHL-2, Lef und β -Catenin an die DNA (Münz et al. 2009). Somit besitzt EpCAM einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus und die Zellproliferation. Es ist in der Lage die Expression der Protoonkogene c-myc und die Cycline A und E schnell zu steigern (Münz et al. 2004). EpCAM verringert die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion und beeinflusst somit die Proliferation, Differenzierung und Gewebserhaltung (Litvinov et al. 1997). Daher resultiert die Blockade von EpCAM in einer Reduktion der Proliferation und des Metabolismus in Tumorzellen (Balzar et al. 1999). Aufgrund seiner Expression in vielen verschiedenen Tumorentitäten gilt EpCAM als geeignetes Tumorantigen für immunologische Therapien. Studien, die die Eignung von EpCAM als Zielantigen untersuchen sind in einem Übersichtsartikel von Chaudry und Kollegen zusammengefasst worden (Chaudry et al. 2007). Bezüglich der prognostischen Relevanz der EpCAM-Expression gibt es für verschiedene Indikationen unterschiedliche Korrelationen (Went et al. 2008). Im Bezug auf die klinische Situation sei ergänzt, dass EpCAM auch von gesundem Gewebe exprimiert wird. Jedoch erfolgt die Expression nur basolateral an den Epithelien, so dass der AK durch die abschirmende Wirkung der Tight Junctions die Bindungsstelle nicht erreicht (Ogura et al. 1998, Xie et al. 2005).

Einige weitere AK neben catumaxomab, die gegen EpCAM gerichtet sind, befinden sich in der klinischen Testung oder sind bereits zugelassen. Im Jahr 1995 kam edrecolomab (Mab17-1A, Panorex) als erster monoklonaler anti-EpCAM AK auf den Markt. Jedoch zeigte er in einer klinischen Studie an Patienten mit Colonkarzinomen keine bessere Wirkung als die Standardtherapie (Punt et al. 2002). Man vermutet, dass der AK aufgrund von humanen anti-Maus AK (HAMA) gebunden und aus der Zirkulation entfernt wurde. Daher versprach man sich eine bessere Wirkung von dem human rekombinanten AK adecatumumab (MT201). Der AK befindet sich in klinischen Studien bei Prostata- (Oberneder et al. 2006) und Brustkrebs (Prang et al. 2005).

Neben den klassischen AK wurde von Micromet ein BiTE (bispecific T cell engager) single-chain AK (MT110) entwickelt, der eine Bindungsstelle für EpCAM und eine für CD3 besitzt. Dessen Wirkmechanismus liegt in der Freisetzung von Apoptose-induzierenden Perforinen

und Granzymen durch zytotoxische T-Zellen begründet (Haas et al. 2009). Der AK befindet sich nach Angabe von Micromet in einer Phase I Studie bei Lungenkrebs und gastrointestinalen Tumoren.

4.2.2 Bindung an Her2/neu

Die Bindung eines extrazellulären Liganden induziert die Dimerisierung des Her2/neu Rezeptors und die Aktivierung einer intrazellulären Tyrosinkinase, die spezifische Zielproteine phosphoryliert und dadurch eine komplexe Signaltransduktionskette in Gang setzt. Dies betrifft den MAPK (mitogen-activated protein kinase) und den PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-Akt Signalweg und damit die DNA Transkription, die Proteinbiosynthese und letztendlich die proliferative Aktivität der Tumorzellen. Der prominenteste anti-Her2/neu AK ist der bei Brustkrebs zugelassene AK trastuzumab (Herceptin). Trastuzumab bindet direkt an die Domäne IV der extrazellulären Region von Her2/neu, blockiert dessen Aktivität und markiert die Tumorzellen für ADCC. Ein anderer Her2/neu-AK ist pertuzumab. Dieser bindet an Domäne II und verhindert die Dimerisierung des Moleküls (Baselga und Swain 2009). Er befindet sich momentan in der Phase II/III Studie bei Ovarialkarzinomen, Brust- und nicht-kleinzelligem Lungenkrebs und Tumoren, die wenig Her2/neu exprimieren (Gordon et al. 2006; Johnson und Jänne 2006).

Bei Her2/neu wurde in Normalgewebe nur eine sehr geringe Expression nachgewiesen (Fink-Retter et al. 2007). Antikörper vom Typ IgG sind mit etwa 150 kDa vergleichsweise große Moleküle und können normalerweise nicht durch intakte Blutgefäße ins Gewebe übertreten. In Tumoren allerdings sind die Gefäße eher durchlässig (Jain 1990) und somit können die Antikörper an entsprechender Stelle das Blutgefäßsystem verlassen sowie an ihre Zielstrukturen binden. Aufgrund dessen sind Antikörpertherapien eine erfolgreiche Strategie bei Mammakarzinomen sowie bei anderen Tumorentitäten.

Ein zunehmendes Problem der Therapie ist jedoch die Resistenz gegenüber diesem AK. Nur bei 20-50 % der Her2/neu überexprimierenden Mammakarzinome ist die Therapie wirksam (Dinh et al. 2007, Friedländer et al. 2008). Viele derer, die anfänglich auf Herceptin ansprechen, werden nach wenigen Monaten resistent. Vermutlich spielt bei der Resistenzbildung unter anderem MUC4, ein membranassoziertes Protein eine Rolle, das den AK sterisch hindert an Her2/neu zu binden (Price-Schiavi et al. 2002). Ein weiteres Problem ist das Auftreten von Kardiotoxizität in Kombination mit Anthrazyklinen als häufige Nebenwirkung. Entsprechende Daten für ertumaxomab stehen noch aus. Jedoch erhofft man sich durch die zusätzliche CD3 Bindungsspezifität, dass ertumaxomab in der Wirkung potenter ist und somit auch bei Patientinnen mit einem IHC-Expressionslevel von weniger als 2+ zur Anwendung kommen kann. *In vitro* wurde bereits eine anti-tumorale Wirkung von ertumaxomab ab einem Level von 1+ detektiert (Jäger et al. 2009).

4.2.3 CD3-Bindung

Für Antikörper, die CD3 binden sind vorrangig immunsupprimierende Wirkungen beschrieben. Der bekannteste CD3-AK ist OKT3 (Muromonab-CD3). Er bindet und deaktiviert CD3 auf T-Zellen, nachdem zuerst eine kurzzeitige Aktivierung der Zellen erfolgte. Es war der erste monoklonale AK, der 1986 von der FDA (Food and Drug Administration) zur Therapie zugelassen wurde. Der AK wird zur Immunsuppression, zum Beispiel nach Organtransplantationen eingesetzt. Weitere anti-CD3 AK finden Anwendung in der Therapie von Autoimmunkrankheiten. So befindet sich beispielsweise teplizumab (Kaufman und Herold 2009) in einer Phase III Studie bei Diabetes Melitus Typ I.

4.2.4 Bindung an die Fc-Rezeptoren

Rezeptoren für Immunglobuline spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort, da sie die spezifische Erkennung von Antigenen verschiedener Leukozyten vermitteln. In der Zirkulation existieren fünf Klassen von Immunglobulinen (Ig): IgG, IgE, IgA, IgM und IgD. Die sie bindenden Rezeptoren sind entsprechend: IgG - Fc γ R, IgE - Fc ϵ RI/II, IgA - Fc α / μ RI/II und IgM - Fc μ R. IgG stellt rund 75 % aller Immunglobuline im Körper. Es gibt drei Hauptgruppen von Fc γ -Rezeptoren. Fc γ RI (CD64) befindet sich hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen, Fc γ RII (CD32) wird primär von B-Zellen exprimiert und Fc γ RIII (CD16) von Makrophagen, NK Zellen, T-Zellen und Granulozyten (Abbildung 41).

Von den trifunktionalen AK ist bekannt, dass sie an die aktivierenden Fc γ -Rezeptoren Typ I, IIa und III auf Immunzellen binden (Sebastian et al. 2009).

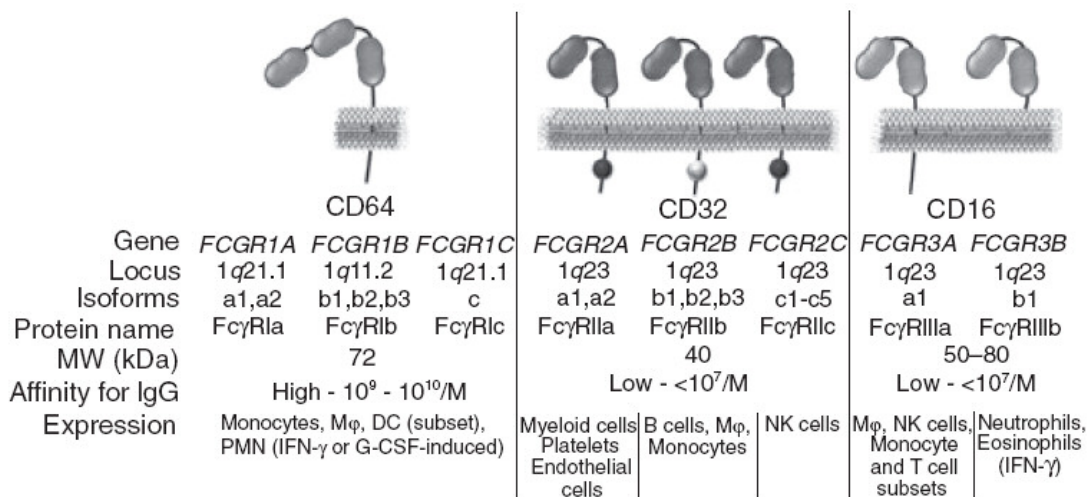


Abbildung 41: Expression der Fc γ -Rezeptoren. Die Fc γ -Rezeptoren vom Typ I (CD64) werden vorrangig von Monozyten/Makrophagen exprimiert. Rezeptoren vom Typ II tragen unterschiedliche Zelltypen auf ihrer Oberfläche. Die Bindung von IgG an Fc γ RIIIa auf myeloischen Zellen wirkt aktivierend, während Fc γ RIIIb von B-Zellen eine inhibierende Wirkung besitzt. Rezeptor Typ IIIa ist auf Makrophagen und NK-Zellen zu finden, ist aktivierend und bewirkt die Induktion von ADCC sowie eine Zytokinfreisetzung bei den Makrophagen (M ϕ) (Bournazos et al. 2009).

4.3 Wirkung von catumaxomab und ertumaxomab in der Kokultur

4.3.1 Wirkung auf das Überleben der Tumorzellen bzw. -sphäroide

Beide AK, catumaxomab und ertumaxomab, wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Tumorsphäroide in der Kokultur mit PBMC getestet. Der aussagekräftigste Parameter war dabei das Sphäroidvolumen. Bereits mit bloßem Auge ließen sich eindeutige Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Kulturen, sowie verschiedenen Konzentrationsbereichen erkennen. Mit Hilfe der Scanner-basierten Auswertung kann man für catumaxomab bei den Versuchen mit der stark EpCAM-positiven Zelllinie FaDu drei Konzentrationsbereiche unterscheiden:

- I.) <0,5 ng/ml stetiges Volumenwachstum
- II.) 0,625-1,25 ng/ml Hemmung des Sphäroidwachstums
- III.) 2,5-10,0 ng/ml Reduktion des Sphäroidvolumens bis zur kompletten Lyse

Für die ertumaxomab Wirkung auf stark Her2/neu exprimierende FaDu E593-Tumorzellen lässt sich die Einteilung wie folgt vornehmen:

- I.) <0,5 ng/ml stetiges Volumenwachstum
- II.) 0,5 ng/ml Hemmung des Sphäroidwachstums
- III.) 1,0-10,0 ng/ml Reduktion des Sphäroidvolumens bis zur kompletten Lyse

Diese Einteilung lässt sich auch auf die Ergebnisse zur Plattierungseffizienz und den Vitalitätsassays übertragen. Jedoch gibt es bei den absoluten Werten der Plattierungseffizienz oder der Vitalität der Tumorzellen größere Unterschiede. Die relative Wirkung im Vergleich zu den Kontrollen oder weiteren AK-Konzentrationen bleibt jedoch erhalten. Mögliche Gründe für die Abweichungen könnten methodisch bedingt sein. Im Vergleich beinhaltet die Größenbestimmung der Sphäroide wesentlich weniger experimentelle Schritte als zum Beispiel der Test auf Koloniebildungsfähigkeit.

Anhand histologischer Färbungen ließ sich beobachten, dass abhängig von der Inkubationsdauer und Höhe der eingesetzten Konzentration der trifunktionalen AK der Anteil der proliferativen Zellen innerhalb eines Sphäroidschnitts abnimmt. Während bei den unbehandelten MCTS eine lokal begrenzte äußere proliferative Randschicht existiert, gibt es bei AK-behandelten Sphäroiden nur noch vereinzelte Ki67⁺ markierte Zellen. Dabei handelt es sich eindeutig nur um Tumorzellen und nicht um eingewanderte PBMC. Reine Abwehrzellen waren bei Kontrollversuchen in der Ki67 Färbung negativ.

Eine Delokalisation konnte auch im Bezug auf die apoptotischen Zellen gezeigt werden. Während bei den Kontrollen rund um die Zentralnekrose Apoptosen auftraten, waren bei behandelten Sphäroiden die apoptotischen Zellen auch im Randbereich zu finden. Eine strenge Konzentrationsabhängigkeit von catumaxomab im Bezug auf die Apoptosen konnte dabei jedoch nicht nachgewiesen werden (Hirschhaeuser et al. 2010b). Zudem konnte bei

höheren AK-Konzentrationen neben der Abnahme des Durchmessers auch ein Schrumpfen der Zentralnekrose detektiert werden. Diese Beobachtungen sprechen für AK-bedingte strukturelle Veränderungen innerhalb der Sphäroide die zusammen mit dem Immunzellangriff zu einer MCTS-Volumenreduktion führen und nicht für ein Ablösen der äußeren Zellschichten durch Scherkräfte.

Im direkten Vergleich von catumaxomab und ertumaxomab in der FaDu-Kokultur zeigte sich, dass der Grad der Sphäroidlyse durch die trifunktionalen AK an den Grad der Expression des jeweiligen Tumorantigens gekoppelt ist. FaDu exprimiert Her2/neu im Vergleich zu EpCAM deutlich schwächer. So war die vierfach höhere Konzentration des Her2/neu-bindenden AK ertumaxomab nötig, um die gleiche volumenreduzierende Wirkung wie der EpCAM-bindende AK catumaxomab zu erzielen. Im Bezug auf das Tumorantigen konnte auch gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Tumorzellen eine mehrheitlich höhere Zytokinausschüttung nach AK-Gabe als in PBMC-Monokultur zur Folge hat. Die beste Kontrolle zum Nachweis der TAA-Beteiligung an dieser Beobachtung wäre die Verwendung einer TAA-negativen Linie im Kokulturmodell. Für Her2/neu konnte bereits in Monolayerversuchen gezeigt werden, dass ertumaxomab keine Wirkung bei einer Her2/neu negativen Melanom-Zelllinie hat (nicht publizierte Daten). EpCAM jedoch wurde in allen getesteten Linien nachgewiesen. Aufgrund seiner starken Verbreitung in vielen Tumorentitäten wird es auch als pan-Tumorantigen bezeichnet (Balzar et al. 1999). Die Lösung wäre eine gentechnisch manipulierte Zelllinie, die zum Beispiel anhand eines anti-sense Vektors die Exposition des Zelladhäsionsmoleküls auf der Oberfläche verhindert.

4.3.2 Einfluss der PBMC auf die Wirkung der trifunktionalen AK

Die zelluläre Zusammensetzung verschiedener buffy coats wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft (Tabelle 20). Die größten Standardabweichungen von 11,6 % und 8,4 % gab es dabei innerhalb der Anteile der Monozyten und der CD3 positiven Zellen an der Gesamtpopulation der PBMC. Die übrigen Subtypen variierten um weniger als 6 %.

Tabelle 20: Zusammensetzung der buffy coats (Leidig 2010).

| Leukozyten | T-Zellen | Th-Zellen | Tc-Zellen | Monozyten | NK-Zellen | B-Zellen |
|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|----------|
| CD45 | CD3 | CD4 | CD8 | CD14 | CD16/CD56 | CD19 |
| 91,4±3,4% | 49,2±8,4% | 33,4±5,5% | 9,1±4,0% | 16,8±11,6% | 11,7±1,2% | 8,6±2,2% |

Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der AK unabhängig vom PBMC Spender eintritt. Selbst mit kryokonservierten PBMC lässt sich durch AK-Gabe die gleiche Wirkung auf die Sphäroide erzielen. Die PBMC allein haben aufgrund der Allogenetität auch einen Einfluss auf das Volumen der Sphäroide. Ein anderer möglicher Grund für Größenunterschiede zwischen den Monokulturen aus Sphäroiden und den Kokulturansätzen aus

Sphäroiden mit PBMC könnte der gesteigerte Verbrauch von Nährstoffen durch die PBMC sein. Daher ist der Ansatz mit Sphäroiden und PBMC der bessere Referenzansatz.

Bei den Versuchen zur Abfolge von PBMC- und AK-Gabe, war das Volumen der Sphäroide in den Ansätzen, in denen alle Komponenten (Tumor-, Abwehrzellen, Zytokine und AK) gleichzeitig vorhanden waren, am stärksten reduziert. Innerhalb dieser kompletten Ansätze war die Wirkung am schwächsten, wenn Sphäroide und PBMC zusammen vorinkubiert wurden und der AK 24 h später hinzu kam. Möglicherweise sind durch die vorzeitige Wechselwirkung zwischen PBMC und den Tumorzellen über MHC-Moleküle nur noch wenige EpCAM oder Her2/neu Bindungsstellen für den AK frei zugänglich. Auf eine schnelle Wechselwirkung der PBMC mit den Tumorzellen weisen auch die Ergebnisse der Analyse der freien PBMC im Überstand hin. Die initiale Konzentration von 10^6 /ml wird innerhalb der ersten 24 h bereits um etwa ein Drittel reduziert. Unter Annahme einer durchschnittlichen Sphäroidgröße von $600 \mu\text{m}$ in den ersten Versuchstagen und perfekter Kugelgeometrie besitzen 200 Sphäroide eine Gesamtoberfläche von $1,6 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2$. Weiter angenommen die Leukozyten besitzen einen mittleren Durchmesser von $8,0 \mu\text{m}$ und weisen ebenfalls eine Kugelform auf, so beträgt die Kreisfläche pro Zelle $50,3 \mu\text{m}^2$. Bei Division der Sphäroid-Gesamtoberfläche durch diese Kreisfläche ergibt sich eine maximale Anzahl von $4,5 \cdot 10^6$ Abwehrzellen, die sich an die MCTS-Oberfläche anlagern könnten. Bezogen auf das Kulturvolumen von 20 ml ergibt sich eine Konzentration von $2,25 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Verglichen mit den durchgeführten Messungen entspricht dies in etwa der detektierten Reduktion der PBMC-Konzentration.

Ab Tag 3 wird verstärkt die Infiltration der Immunzellen in die Sphäroide verzeichnet. Der teilweise beobachtete Anstieg der PBMC-Konzentration im Überstand nach dem dritten Versuchstag erklärt sich möglicherweise durch das Ablösen der Zellen von der Oberfläche, in denen keine Mechanismen zur Infiltration induziert wurden.

Bei den Versuchen zu Mehrfachdosierung oder der Dosisescalation war die Rationale für die Abstände zwischen den AK-Gaben die Halbwertszeit von catumaxomab mit einer Dauer von 2,13 Tagen *in vivo* (Ruf et al. 2010). Auch bei einer exemplarischen Messung der AK-Konzentration in der Spinnerflaschen-Kokultur konnte eine Halbwertszeit von 2 Tagen ermittelt werden. Bei den verschiedenen Mehrfach-Applikationen konnte die Wirkung im Vergleich zur Einfachgabe nicht durchgehend gesteigert werden. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die PBMC nach einmaliger Aktivierung inert werden. Aber selbst der Austausch des Mediums und der PBMC mit erneuter Gabe von trifunktionalen AK konnte keine Verbesserung erzielen. Die letztendliche Wirkung hing in allen Fällen von der initialen AK-Konzentration ab. Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ein limitierender Faktor die Anzahl der EpCAM- bzw. Her2/neu Moleküle auf der Sphäroidoberfläche ist. Da damit die Anzahl der möglichen immunologischen Synapsen begrenzt ist.

Verstärkt wird die Abnahme der Bindungsstellen, wenn die Sphäroide durch die Behandlung kleiner werden (Abbildung 42). Möglicherweise werden tumorassoziierte Antigene nach dem ersten Kontakt mit AK und PBMC herunter reguliert und entziehen sich somit der Erkennung. Dies könnte ebenfalls zu dem beobachteten Effekt beitragen. Eine Möglichkeit dies nachzuweisen bestünde darin, die Sphäroide nach Disaggregation zu einer Einzelzellsuspension mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein beziehungsweise die Expressionsstärke der Tumorantigene zu überprüfen.

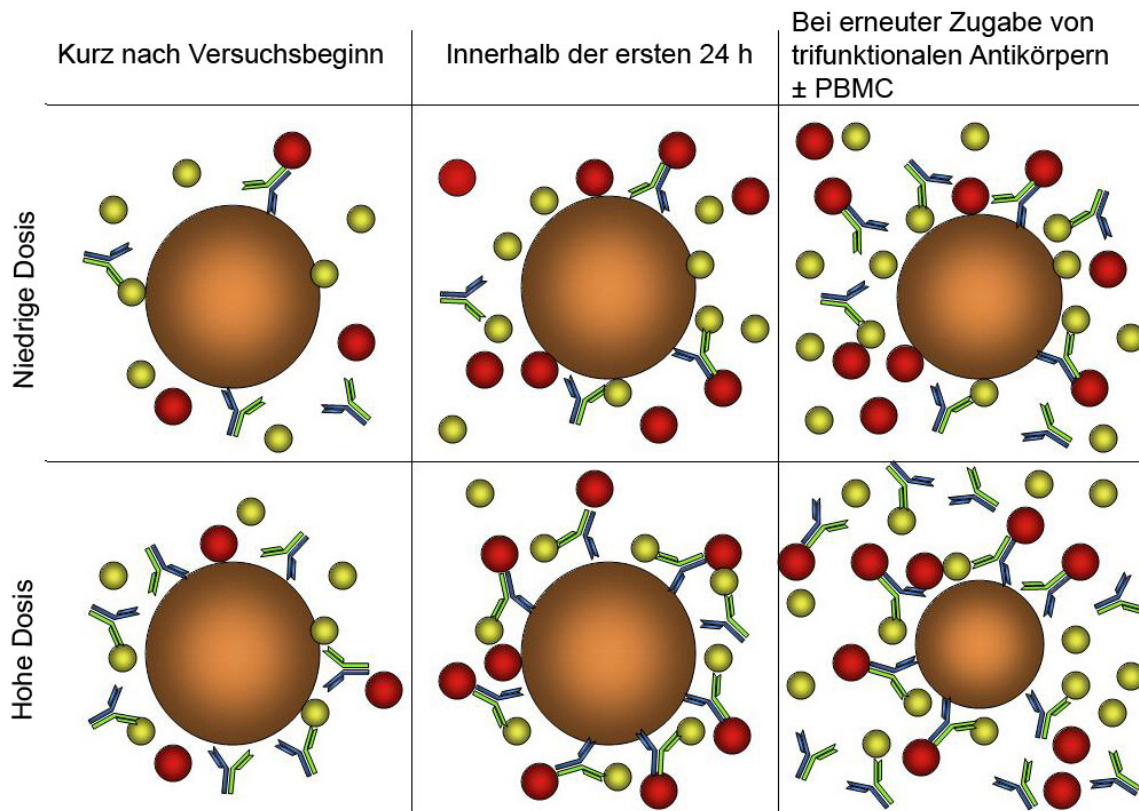


Abbildung 42: Modell der PBMC und AK-Bindung bei verschiedenen Konzentrationsbereichen. Kurz nach Zugabe von trifunktionalen AK und PBMC (Makrophagen = rot, T-Zellen = gelb) lagern sich diese an die Tumorsphäroide an. So könnten innerhalb der ersten 24 h die Bindungsstellen an der Oberfläche belegt sein. Bei hohen AK-Konzentrationen werden entsprechend mehr Trizell-Komplexe ausgebildet und die anti-tumorale Wirkung ist stärker als bei geringeren Konzentrationen. Erfolgt eine zweite AK-Gabe hoher Dosis binden die AK nicht mehr an der Tumorsphäroide, weil die Bindungsstellen an deren Oberfläche belegt sind oder möglicherweise die TAA herunterreguliert wurden.

Die PBMC sind die Produzenten der verschiedenen Zytokine, die nachweislich ein wichtiger Bestandteil der anti-tumoralen Wirkung der trifunktionalen AK sind. Dies konnte im Versuch zur Abfolge der Gabe von trifunktionalen AK und PBMC gezeigt werden. Wurde der Überstand der 24 h mit trifunktionalen AK aktivierten PBMC entfernt und nur die PBMC zur Sphäroidkultur gegeben, dann konnte nach sieben Tagen maximal eine Reduktion des Sphäroidvolumens von nur 20 % registriert werden. Dies widerspricht den Ergebnissen, die in einer klinischen Pilotstudie mit opsonisierten PBMC an HNSCC-Patienten durchgeführt wurde. Die PBMC wurden *ex vivo* mit catumaxomab beladen und die Zytokine, zur Vermeidung von Zytokin-assoziierten Nebenwirkungen, durch Waschen der Zellen entfernt.

Die Gabe dieser nachweislich aktivierten Zellen führte bei einem Patienten zu einer kompletten Remission (Riechelmann et al. 2007). Eine Erklärung könnte sein, dass *in vivo* - im Gegensatz zur *in vitro*-Zellkultur - nach Gabe der opsonierten, aktivierten PBMC weitere Zytokine durch die im Körper vorhandenen Immunzellen freigesetzt werden. Daten zu den Serumkonzentrationen der Zytokine wurden in der Studie nicht gezeigt.

Das Zytokinmuster, das bei den Kokultur-Versuchen detektiert wird, ist immer ähnlich. IL-2 und TNF- α weisen am ersten Messzeitpunkt, dies war gewöhnlich Tag 1, die höchsten Konzentrationen auf. IFN- γ erreicht sein Maximum an Tag 3 und fällt danach auf nicht mehr detektierbare Level ab. Die IL-6 Konzentration ist auch an Tag 3 maximal, fällt aber nur leicht ab und verläuft grafisch in Form eines Plateaus. Die absoluten Konzentrationen variieren bei unterschiedlichen Versuchen mit gleichen AK-Konzentrationen recht stark. Das Verhältnis zwischen den Zytokinkonzentrationen bleibt jedoch erhalten: IL-2 << TNF- α < IFN- γ < IL-6. Eine klinische Studie mit ertumaxomab an Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs zeigte ein vergleichbares Zytokinmuster im Serum. Wobei die Zytokinkonzentrationen innerhalb von 24 h nach ertumaxomab-Gabe wieder die Werte des Ausgangsniveaus erreichten (Kiewe et al. 2006).

Um die anti-tumorale Wirkung der verschiedenen Subpopulationen von PBMC näher zu untersuchen, könnten Versuche mit aufgereinigten Zelltypen durchgeführt werden. Die Auftrennung könnte über ein FACS- (fluorescence activated cell sorter) Gerät oder die Isolation über magnetgekoppelte AK erfolgen.

4.3.3 Bedeutung der Infiltration von T-Zellen

Die Infiltration von Immunzellen in Tumorgewebe stellt einen wichtigen prognostischen Faktor dar. Dabei ist nicht nur die Menge der infiltrierten Zellen entscheidend, sondern auch vor allem die Art der Zellen. In Tumorbiospien von Patienten werden häufig eingewanderte Makrophagen, T-Zellen und NK bzw. NKT-Zellen detektiert. Liegt eine hohe Dichte an tumorassoziierten Makrophagen vor, geht dies meist mit einer schlechten Prognose für die Patienten einher (Ding et al. 2009).

Jedoch konnte zwischen T-Zellinfiltration und Patientenüberleben eine positive Korrelation bei verschiedenen Tumorentitäten wie dem Ovarialkarzinom (Zhang et al. 2003), dem Gebärmutterhalskrebs (Piersma et al. 2007) oder dem Colonkarzinom (Waldner et al. 2006) verzeichnet werden. Die eingewanderten T-Zellen sind zum größten Teil CD8⁺ und werden daher häufig als CTL bezeichnet. Für NK-/NKT-Zellinfiltration ist bei verschiedenen Entitäten ebenfalls eine positive Korrelation zwischen Anzahl der eingewanderten Zellen und Überleben beschrieben worden (Zhu et al. 2009).

In unserem Testsystem konnte anhand verschiedener Methoden die Einwanderung von Leukozyten detektiert werden. Aufgrund der AK-Bindungsstellen war zu vermuten, dass vorrangig T-Zellen und Makrophagen an der Infiltration beteiligt sind.

Die klassischen Marker CD3 (T-Zellen) und CD68 (Makrophagen) erwiesen sich für die Analyse der Sphäroidschnitte jedoch als ungeeignet. Bei CD3 war die unspezifische Hintergrundfärbung zu stark ausgeprägt; zudem war das Molekül möglicherweise durch die therapeutischen AK gebunden und somit für eine IHC-Färbung blockiert. Das Oberflächenmolekül CD68 war nicht geeignet, weil es auch von den Tumorzellen exprimiert wird. Dies konnte mittels PCR und Immunhistologie in unserem Labor, sowie auch von einer anderen Gruppe (Gottfried et al. 2008), nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der PCR konnte zusätzlich zur histologischen Färbung, die Infiltration von T-Zellen über CD2 (Ehlert 2009), sowie T-Helfer-Zellen über CD4 und Makrophagen über CD64 nachgewiesen werden (Rodday 2010). So war es möglich Transkript und Protein zu vergleichen. Bis auf eine Ausnahme (mRNA von CD2), ließ sich eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Transkriptmenge bzw. positiv gefärbter Zellen unter ertumaxomab-Therapie nachweisen (Ehlert 2009). Anhand der histologischen Färbungen konnten CD2⁺ T-Zellen als am stärksten vertretene Abwehrzellsubtyp identifiziert werden. Es waren nahezu so viele Zellen CD2 wie CD45 positiv. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen Färbungen für CD4 und CD8 an Sphäroidschnitten zu etablieren und somit die T-Zellinfiltration näher zu analysieren. Beide T-Zell Subtypen wandern unter catumaxomab Wirkung in die Sphäroide ein, wobei zeitabhängig deutlich mehr zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) nachweisbar waren. Bei den T-Helfer-Zellen (CD4⁺) wäre in weiterführenden Untersuchungen zu prüfen, ob es sich möglicherweise um Tregs handelt. Auch im Bezug auf die CD8⁺-Zellen steht eine Überprüfung auf Vorhandensein von Effektormolekülen, wie Granzym B und Perforin aus.

Zusätzlich wurde die Methode der qPCR für die Subtypisierung verwendet. Voraussetzung war die Etablierung eines Haushaltsgens, das von Tumor- und Abwehrzellen gleichermaßen exprimiert wird. Nach einem Screening konnte PUM1 als ein solchen HKG identifiziert werden. Bei den Analysen an catumaxomab, BiLu und F(ab')₂ behandelten Proben konnten CD2, CD4, CD8, CD14 und CD45 nachgewiesen werden. Dabei war die Expression der Antigene bei catumaxomab im Vergleich zur Kontrolle um ein Vielfaches stärker als bei Behandlung mit den anderen beiden Molekülen. Die höchsten Expressionswerte wurden für CD2, CD45 und CD8 detektiert, was sich mit den histologischen Beobachtungen deckt.

Bei den verschiedenen Analysemethoden war das Signal für CD2 meist höher als für die Summe der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Dies spricht möglicherweise für das Vorhandensein von CD2⁺ NK-Zellen. Es ist jedoch nicht gelungen, NK-Zellen über die Oberflächenmoleküle CD158 und CD244 in histologischen Färbungen nachzuweisen. Diese Marker könnten in fortführenden Analysen mithilfe der PCR überprüft werden. Zusätzlich wäre die Etablierung einer Doppelfärbung von CD2 und einem NK-Zellmarker ein möglicher Ansatz.

Ein weiteres Indiz für die T-Zellaktivierung durch die trifunktionalen AK liefert die Analyse des Zytokins IL-2 auf Ebene der RNA sowie des Proteins. Bereits sechs Stunden nach AK-Gabe

konnten IL-2 mRNA und Zytokin nachgewiesen werden. Die Anzahl der freien PBMC im Kokulturüberstand stieg innerhalb der ersten 6 h auf $1,12 \cdot 10^6/\text{ml}$ an und fiel nach 12 h auf $6,5 \cdot 10^5/\text{ml}$. Mangels geeigneter Methoden für die Analyse der Subtypen konnte nicht nachgewiesen werden ob die T-Zellen entsprechend vermehrt proliferierten. Es könnte der Anteil der T-Zellen zunehmen, während andere Zelltypen in ihrer Anzahl reduziert werden. Da IL-2 eine Halbwertszeit von 6,9 min (Lotze et al. 1985) besitzt, könnten die zeitlichen Messpunkte nach Beginn des Experiments zu weit auseinander liegen und der Effekt auf die T-Zellen auch entsprechend kurzlebiger sein. Quantitative Analysen mit dem Durchflusszytometer, immunhistologische Färbungen der Subtypen an Zytospins des Kokulturüberstandes oder eine PCR der Subtypenantigene der Zellen im Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten könnten diese Frage in weiteren Experimenten beantworten. Zusammengefasst zeigen die Daten der Infiltrationsanalyse, dass unter Behandlung mit catumaxomab und ertumaxomab im Vergleich zu den Kontrollantikörper die meisten Immunzellen in die Sphäroide infiltrieren und der Hauptanteil der einwandernden Abwehrzellen zytotoxische T-Zellen sind. Die Analyse der Zytokinsekretion und der zugehörigen mRNA zeigte eine Aktivierung der T-Zellen an. Eine Infiltration von T-Zellen war essentiell für eine Sphäroid-Größenreduktion oder letztendliche Lyse der Sphäroide. Übertragen auf die klinische Anwendung der trifunktionalen AK spricht dies für eine gute Prognose der Patienten.

4.3.4 Der trifunktionale "mode of action" von catumaxomab und ertumaxomab

Im Kokulturmodell mit humanen PBMC und Tumorsphäroiden wurde mit verschiedenen experimentellen Ansätzen der "mode of action" der trifunktionalen AK analysiert. Nicht alle Experimente wurden für catumaxomab und ertumaxomab gleichermaßen durchgeführt, jedoch lieferten Ergebnisse aus verschiedenen Versuchsanordnungen Indizien für einen gleichen Wirkmechanismus beider AK.

Ein Ansatz aus Sphäroiden mit ertumaxomab ohne PBMC zeigte, dass die reine Bindung des AK an Her2/neu keine Reduktion des Sphäroidvolumens zur Folge hat. Ertumaxomab scheint daher nicht an die Bereiche von Her2/neu zu binden, die die Aktivität oder Dimerisierung des Rezeptors beeinflussen. Bei kompetitiven Bindungsanalysen mit dem anti-Her2/neu Antikörper 520C9 (ATCC HB-8696) konnte gezeigt werden, dass 520C9 nicht aber trastuzumab die Bindung von ertumaxomab verhindert. Daraus kann geschlossen werden, dass 520C9 und ertumaxomab ähnliche Epitope (Ektodomäne II und III) erkennen (Jäger et al. 2009). Es konnte keine direkte Beeinflussung der nachgeschalteten Signalkaskade durch ertumaxomab gezeigt werden (nicht publizierte Daten). Demnach unterscheiden sich die Wirkmechanismen von ertumaxomab und trastuzumab voneinander und eine aufeinanderfolgende oder simultane Applikation von beiden AK wäre denkbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem EpCAM-bindenden Parentalantikörper (HO-3) ebenso weder eine Volumenreduktion der Sphäroide, noch eine Zytokinfreisetzung detektiert. Zu einem analogen Ergebnis kamen Ruf und Kollegen, die die Wirkung von HO-3 mit der von catumaxomab verglichen und eine 1000fach gesteigerte Effektivität von catumaxomab im Bezug auf die Eliminierung von Tumorzellen fanden (Ruf et al. 2007).

Auch die Inkubation mit dem Surrogatantikörper BiLu, der an humanes EpCAM und murines CD3 bindet, rief keine MCTS-Größenabnahme oder Zytokinsekretion hervor. HO-3 und BiLu weisen die gleichen Bindungsstellen an EpCAM auf. Zwei dieser Bindungsstellen liegen in der EGF-like Domäne I und II und eine dritte mehr C-terminal (Ruf et al. 2007).

Ein dritter Beleg, dass die alleinige Bindung von EpCAM keine Wirkung erzielte, liefern die Ansätze in denen nur Sphäroide ohne PBMC zusammen mit catumaxomab inkubiert wurden. Bei diesen Ansätzen konnte keine MCTS-Größenreduktion oder Lyse beobachtet werden.

Die Analyse der infiltrierenden Immunzellen zeigte in Kokulturen mit HO-3 und BiLu-Behandlung eine CD45⁺ Population (Leukozyten) an. Die Schnitte dieser Ansätze blieben jedoch für Färbungen von T-Zellmarkern negativ. In beiden Fällen konnten aber vereinzelt CD14⁺ (Monozyten-Marker) Zellen nachgewiesen. Dies könnten Makrophagen sein, die durch CD64 nicht angefärbt wurden, weil das Antigen durch die Bindung des Fc-Teils der HO-3 und BiLu Moleküle möglicherweise blockiert war. Da sich keine Effekte der Behandlung mit BiLu oder HO-3 auf das Volumenwachstum der Sphäroide gezeigt haben, könnte es sich dabei um Tumor-begünstigende M2-Makrophagen handeln. Bei den Zellen, die CD45⁺ und CD14⁻ waren, könnte es sich um NK- oder dendritische Zellen handeln, die über die Fc-Bindung aktiviert wurden.

Die Gabe des CD3-bindenden parentalen AK (26/II/6) zeigte in den Experimenten eine konzentrations- und zeitabhängige Reduktion der Tumorsphäroidgröße, sowie eine Induktion der Infiltration von CD8⁺ T-Zellen. Diese Effekte waren jedoch schwächer ausgeprägt als bei catumaxomab-Behandlung. Die Zytokinsekretion war unter gleichen Konzentrationen 26/II/6 und catumaxomab in der Sphäroid-Kokultur für IL-2 und IFN- γ bei catumaxomab stärker, für TNF- α bei beiden gleich und für IL-6 bei 26/II/6 stärker. In der PBMC-Monokultur war die Sekretion von TNF- α und IL-6 beim parentalen AK höher, während IL-2 und IFN- γ bei catumaxomab-Gabe stärker ausgeschüttet wurden. Bei der Mehrfachgabe mit ertumaxomab und frischen PBMC zeigte die Zytokinanalyse nur für IL-6 eine Steigerung der Konzentration im Vergleich zur Einzelapplikation. Diese Ergebnisse bedeuten darauf hin, dass für die IL-6 Freisetzung vorrangig die Bindung des AK an CD3 und die Fc-Rezeptoren wichtig ist.

Die Unterschiede in der Wirkung zwischen den in der Klinik eingesetzten immunsupprimierenden CD3-Antikörpern und den trifunktionalen AK könnten mitunter in der Bindung an unterschiedliche Domänen von CD3 begründet sein. Weiterhin lassen sie sich möglicherweise dadurch erklären, dass catumaxomab, ertumaxomab oder 26/II/6 einen intakten Fc-

Teil besitzen, während die immunsuppressiven CD3-AK mit einem nicht bindendem Fc-Teil ausgestattet sind, um eben eine massive Zytokinausschüttung und T-Zellaktivierung zu vermeiden (Chatenoud und Bluestone 2007). Dies deutet auf die Notwendigkeit der Kostimulation der T-Zellen durch die akzessorischen $Fc\gamma R^+$ Zellen hin.

Die Interaktion zwischen den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen erfolgt über die kostimulatorischen Signale via CD40/CD40L und B7.1 (CD80)/CD28. Sie führt zur Stimulation der Zytokinproduktion, der klonalen Expansion und der Differenzierung in Effektorzellen. Dabei ist die Bindung von CD28 entscheidend für eine Th2-Antwort sowie die T-Zell Expansion. Die Bindung des CD40 Liganden besitzt eine Verstärkerfunktion und begünstigt eine Th1-Antwort (Howland et al. 2000). Das in den Experimenten beobachtete Zytokinprofil mit den hohen Werten für $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ spricht für eine auf Th1 basierenden Immunantwort. Das Th2 Zytokin IL-4 wurde in anfänglichen Versuchen ebenfalls detektiert, jedoch lagen die Werte nahe der Nachweisgrenze und zeigten keine strikte Korrelation mit der eingesetzten AK-Konzentration. Diese Ergebnisse sprechen für eine zelluläre Immunantwort infolge der AK-Gabe.

Welche Wirkung die Fc-Rezeptor Bindung auf die Wirkung von catumaxomab hat, wurde durch Inkubation mit dem $F(ab')_2$ Fragment untersucht. Die Analysen zeigten eine Abhängigkeit der anti-tumoralen Wirkung von der eingesetzten Konzentration und Dauer der Inkubation. Im Gegensatz dazu konnte bei anderen therapeutischen AK, wie dem Her2/neu bindenden trastuzumab nachgewiesen werden, dass dessen Fragment ineffektiv ist (Barok et al. 2007). Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Bispezifität für eine Wirkung.






Die vier untersuchten Zytokine wurden nur in den Ansätzen mit der höchsten $F(ab')_2$ Dosis von 10,0 ng/ml detektiert. Bei den beiden niedrigeren Konzentrationen von 1,0 und 2,5 ng/ml wurde auch $TNF-\alpha$ nachgewiesen. Unter $F(ab')_2$ -Gabe konnte zudem auch eine Leukozyten-einwanderung nachgewiesen werden. Diese Zellen waren mehrheitlich $CD2^+/CD8^+$. Die Wirkung war jedoch in allen Punkten im Vergleich zu catumaxomab schwächer. Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle der ADCC in Verbindung mit der anti-tumoralen Wirkung.

Die Experimente belegen, dass es tatsächlich die "Trifunktionalität" der AK ist, in dem sich die sehr potente anti-tumorale Wirkung begründet. Die parentalen AK einzeln oder in Kombination, das $F(ab')_2$ Fragment oder der BiLu Antikörper rufen keine oder nur schwächere Wirkung im Vergleich zu catumaxomab hervor (Tabelle 21).

Die Immuntherapie mit den trifunktionalen, bispezifischen AK catumaxomab und ertumaxomab hat sich in präklinischen als auch in klinischen Studien als vielversprechende Therapieform erwiesen. Hierbei wird das natürlicherweise vorhandene Immunsystem als Folge der AK-Bindung (re-)aktiviert und eine spezifische anti-tumorale Antwort induziert. Es handelt sich um ein sogenanntes "self-supporting system", da keine Kostimulation, wie durch

die zusätzliche Gabe von Zytokinen oder einer Voraktivierung des Abwehrsystems, notwendig ist. Besonders die Daten aus dem Mausmodell, die eine langfristige Immunisierung gegen TAA-positive Tumorzellen nach der AK-Therapie aufzeigen sind aussichtsreich (Ruf und Lindhofer 2001).

Tabelle 21: Zusammenfassung der Wirkung der verschiedenen AK.

| | AK | Sphäroidvolumen | Zytokine | Infiltration |
|--|------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|--|
|  | catumaxomab oder ertumaxomab | ↓↓↓ | ↑↑↑ | CD45 ⁺ ↑↑↑ CD2 ⁺ ↑↑↑ CD8 ⁺ ↑↑ |
|  | 26/II/6 | ↓↓ | ↑↑↑ (IL-6 und TNF- α) | CD45 ⁺ ↑↑ CD2 ⁺ ↑↑ CD8 ⁺ ↑ |
|  | HO-3 | analog zu Kontrollen | analog zu Kontrollen | CD45 ⁺ ↑ (CD14 ⁺) CD2 ⁺ - CD8 ⁺ - |
|  | BiLu | analog zu Kontrollen | analog zu Kontrollen | CD45 ⁺ ↑ (CD14 ⁺) CD2 ⁺ - CD8 ⁺ - |
|  | F(ab') ₂ | ↓↓ | ↑ | CD45 ⁺ ↑↑ CD2 ⁺ ↑↑ CD8 ⁺ ↑ |

Der Therapieerfolg kann möglicherweise durch Kombination mit anderen Wirkstoffen gesteigert werden. So könnten Zytokin-assoziierte Nebenwirkungen, die bei *i.v.* Applikation ein größeres Problem darstellen, als bei *i.p.* Gabe, mitunter durch Komedikation mit Immunsuppressiva reduziert werden. Andere Wirkstoffklassen für eine kombinierte Behandlung wären die Chemotherapeutika oder Glykolyseinhibitoren. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit beiden Stoffklassen sowie den metabolischen Analysen werden im Folgenden diskutiert.

4.3.5 Kombination mit Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva

Catumaxomab wurde zugelassen für die Behandlung von malignem Aszites, wenn die Standardtherapie nicht angewendet werden kann oder nicht die entsprechende Wirkung erzielt. So kann es in der klinischen Situation dazu kommen, dass die trifunktionalen Antikörper nach einer konventionellen Chemotherapie eingesetzt werden. Bereits in der vorangegangenen Masterarbeit wurde daher der Effekt von Cisplatin auf die Wirkung von catumaxomab im Sphäroidmodell untersucht. Dabei zeigte Cisplatin allein bei Konzentrationen von 1,0-10,0 $\mu\text{g/ml}$ eine dosisabhängige Volumenreduktion der Sphäroide (Wawrsinek 2006). Eine Kombination von Immun- und Chemotherapie scheint sich jedoch auszuschließen, da durch die Chemotherapeutika ein Einfluss auf Immunzellen zu erwarten ist, die für die Wirkung der trifunktionalen Antikörper notwendig sind.

Aber es ist auch in der Literatur beschrieben, dass Cisplatin immunstimulatorisch wirkt (Muenchen, Aggarwal 1998) und verschiedene Chemotherapeutika durchaus mit Immuntherapien kombinierbar sind (Zitvogel et al. 2008). Es wurden Daten von HNSCC Patienten veröffentlicht, bei denen die Induktion von Zytokinen und Killerzellaktivität nach Cisplatintherapie nachgewiesen werden konnte (Okamoto et al. 2000). Für den kombinierten Ansatz in den eigenen Versuchen wurden von Cisplatin und catumaxomab moderat wirksame Dosen gewählt. Während catumaxomab bei 0,5 ng/ml das Volumen um 28 % und Cisplatin bei 0,5 µg/ml um 37 % reduzierte, erreichte der kombinierte Ansatz 70 %, was einem überadditiven, synergistischen Effekt entspricht. Analysen zur Plattierungseffizienz zeigten eine Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit auf nahezu nicht mehr detektierbare Level (Hirschhaeuser et al. 2010b).

Auch mit dem Modell der Chorioallantoismembran von Hühnerembryonen, auf der Tumorproben mit autologem PBMC und catumaxomab mit und ohne Cisplatin kultiviert wurden, konnte eine gesteigerte Reduktion der Tumorzellen durch Kombination von catumaxomab mit Cisplatin gezeigt werden (Schmitt et al. 2004, Gronau et al. 2005).

In den klinischen Studien bei *i.v.* Gabe von catumaxomab (Sebastian et al. 2007) oder ertumaxomab (Kiewe et al. 2006) traten Zytokin-assoziierten Nebenwirkungen auf. Um diese zu reduzieren, wurden in der Studie mit catumaxomab zusätzlich Immunsuppressiva appliziert (Sebastian et al. 2007). Markus Lehr hat die Komedikation von catumaxomab und Dexamethason (Fortecortin) sowie ertumaxomab und Prednisolon (Decortin) im Kokulturmodell untersucht. Er beobachtete eine Wachstumshemmung der Sphäroide allein durch Gabe von Dexamethason oder Prednisolon. Zunächst wurde vermutet, dass das Ethanol in dem die Glucocorticoide gelöst wurden, die Wachstumshemmung hervorrief. Aber ein entsprechendes Kontrollexperiment widerlegte diese Annahme. An einer Lymphoblastenzelllinie konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung besitzen (Longui et al. 2005). Warum gleiche Konzentrationen der Glucocorticoide im Monolayerversuch nicht die gleichen anti-tumoralen Effekte wie in der Sphäroid-Kultur haben, bleibt jedoch unbeantwortet. Es ist jedoch zu vermuten, dass dabei Mechanismen zum Tragen kommen, die unter anderem durch die Zell-Zellkontakte in der dreidimensionalen Struktur entstehen.

Die Wirkung von catumaxomab wurde durch Dexamethason bereits bei 0,1 µg/ml stark beeinträchtigt. Die niedrigste klinische Dosis beträgt 4 mg, mit der, ausgehend von den Daten für 1 mg (Czock et al. 2005), extrapoliert eine maximale Plasmakonzentration von 0,042 µg/ml erreicht wird. In der klinischen Studie an Patienten mit NSCLC wurde catumaxomab mit einer Prämedikation von 10 oder 40 mg Dexamethason eingesetzt

(Sebastian et al. 2007), was ebenfalls extrapoliert nach Czock et al. 0,1 bzw. 0,42 µg/ml entspricht.

Prednisolon wurde in Anlehnung an die klinisch verwendete Dosis von 25 mg und des daraus resultierenden maximalen Plasmalevels von 0,323 µg/ml in Konzentrationen von 0,1 bis 1,2 µg/ml in den Versuchen mit ertumaxomab eingesetzt. Dabei wurde die anti-tumorale Wirkung des Antikörpers weniger stark beeinträchtigt und auch bei der höchsten Konzentration des Prednisolons nicht aufgehoben.

Die Beobachtung, dass Dexamethason stärker wirkt als Prednisolon, steht im Einklang mit den bekannten unterschiedlichen Wirkungsstärken beider Glucocorticoide. Diese bemisst sich an der Menge des täglich von der Nebennierenrinde produzierten Cortisols (20-30 mg). Die Äquivalenzdosis von Dexamethason beträgt 1,0 und die von Prednisolon 7,5 mg. Damit ergeben sich die Wirkungsstärken von 30 für Dexamethason und 4 für Prednisolon (Henzen 2003).

Die Effektivität der trifunktionalen Antikörper wurde durch die Glucocorticoide in bestimmten Konzentrationsbereichen beeinflusst. Bei der Kombination muss demnach darauf achten werden, Konzentrationsbereiche zu wählen, bei denen die anti-tumorale Wirkung der Antikörper nicht maßgeblich beeinflusst wird, die Zytokinausschüttung und damit die unerwünschten Nebenwirkungen aber bereits verringert werden.

4.3.6 Metabolische Aktivierung durch catumaxomab

Ziel der metabolischen Untersuchungen an catumaxomab-behandelten Kulturen war die Überprüfung der glykolytischen Aktivität der Abwehrzellen nach immunologischer Stimulation (Sha 2010). Es ist bekannt, dass T-Zellen nach Aktivierung die Energie, die sie für die schnelle klonale Expansion benötigen, vorrangig aus der Glykolyse beziehen (Fox et al. 2005). Zum Vergleich wurden BiLu, das F(ab')₂ Fragment und andere Immunstimulatoren, wie Concanavalin A, Lipopolysaccharid und Phytohämagglutinin L in Mikrotiterplattenversuchen eingesetzt. Im Bezug auf alle analysierten Endpunkte, wie Abwehrzellinfiltration, Zytokinausschüttung, Laktatproduktion, Azidifizierungsrate und Sauerstoffverbrauch, zeigten die catumaxomab Proben die höchsten Werte. Auch in Spinnerflaschenversuchen zeigten die Kokulturansätze, die mit catumaxomab inkubiert wurden den höchsten Laktatgehalt (Charles 2007). In beiden Fällen konnte jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden, ob das Antikörper-induzierte Laktat nur von den Abwehrzellen und im Besonderen von den T-Zellen freigesetzt wurde. Auch Tumorzellen produzieren unter aeroben Bedingungen hohe Mengen Laktat, was zu einer Inhibition der Immunzellfunktionen führen kann (Gottfried et al. 2006; Fischer et al. 2007). Somit wäre weiterhin zu untersuchen, ob durch den Einsatz von Glykolyseinhibitoren oder durch Manipulation des Stoffwechsels über andere Mechanismen eine Steigerung der Therapieeffizienz möglich ist.

5 Zusammenfassung

Das bessere Verständnis der Rolle des Immunsystems bei der Krebsentstehung ermöglichte in den vergangenen Jahren die Entwicklung neuer Therapieoptionen. Ein Ansatz ist die Verwendung anti-tumoraler, immunstimulierender Antikörper. Zwei dieser therapeutischen Antikörper sind catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) und ertumaxomab (anti-Her2/neu x anti-CD3), die wegen ihrer besonderen Eigenschaften als bispezifische, trifunktionale Antikörper bezeichnet werden. Die Bispezifität besteht in der Bindung eines Tumor-assoziierten Antigens (catumaxomab - EpCAM, ertumaxomab - Her2/neu) und des CD3 Moleküls auf der Oberfläche von T-Zellen. Darüber hinaus stellt die Interaktion des Fc-Teils mit Fc γ RI/IIa/III positiven akzessorischen Immunzellen die dritte Funktion der Antikörper dar. Diese einzigartige Kombination ermöglicht theoretisch die Ausbildung eines Tri-Zell-Komplexes aus den drei Zelltypen.

In klinischen Studien konnte bereits die Wirksamkeit beider Antikörper nachgewiesen werden. Der eigentliche "mode of action" der trifunktionalen Antikörper jedoch ist noch nicht ausreichend bekannt. Zum Schließen dieser Lücke wurde in der vorliegenden Arbeit ein 3D-Tumormodell eingesetzt, welches in unserer Arbeitsgruppe wohl etabliert ist. Diese so genannten multizellulären Tumorsphäroide (MCTS) wurden angewandt, um die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen, peripheren Blutmonozyten (PBMC) und trifunktionalen Antikörpern systematisch zu untersuchen. Es wurde die stark EpCAM- und schwach Her2/neu-positive FaDu-Zelllinie sowie die stabil mit humanem Her2/neu transfizierte FaDu E593-Linie verwendet. Als Endpunkte zur Beurteilung der Therapieeffizienz dienten das Volumenwachstum der Sphäroide, die Klonogenität und die Zellvitalität der Sphäroid-Zellen. Zur Beurteilung der PBMC-Penetration in die Sphäroide erfolgten diverse immunhistochemische Färbungen und molekularbiologische Nachweise (PCR) der Abwehrzellantigene. Entsprechend wurden in den Tumorzellen die Proliferationsrate über eine Ki67-Färbung sowie die Apoptoserate über eine FragEL-Markierung identifiziert. Die Aktivität der PBMC in den verschiedenen Versuchsansätzen wurde durch die Bestimmung ausgewählter Zytokine (ELISA) und der Zellzahl aus den Medienüberständen charakterisiert.

Die an den FaDu- und E593-Sphäroiden erzielten Ergebnisse zeigten, dass catumaxomab und ertumaxomab eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme des Volumenwachstums bzw. eine Volumenreduktion der Sphäroide bewirkten. Die Schrumpfung der Tumorsphäroide ging mit einer Reduktion des proliferativen und mit einer Steigerung des apoptotischen Tumorzellanteils einher. Die histologischen Befunde weisen darauf hin, dass die Volumenreduktion durch eine gesteigerte Anzahl infiltrierender Leukozyten bedingt ist. Auf verschiedenen Methoden basierende Analysen der Immunzellsubtypen zeigten eine dominierende Infiltration von T-Zellen in die Tumorsphäroide. Dabei konnte die Mehrzahl als zytotoxische T-Zellen identifiziert werden. Der Aktivitätsnachweis der T-Zellen wurde über

die Detektion der IL-2 mRNA und des sekretierten Zytokins erbracht. Einen zusätzlichen Hinweis auf eine zelluläre Immunantwort liefert das Zytokinmuster mit hohen Konzentrationen an IFN- γ . Experimente mit opsonierten, gewaschenen PBMC haben in diesem Modellsystem gezeigt, dass ein großer Teil der anti-tumoralen Wirkung von den Zytokinen ausgeht. Der direkte Vergleich beider Antikörper zeigte, dass der anti-tumorale Effekt abhängig von der Antigenexpression auf den Tumorzellen war. Die Analyse von Medienüberständen wies auf eine mehrheitlich höhere Zytokinausschüttung in Gegenwart des Tumorantigens hin. Sphäroid-Kokulturen, die mit dem parentalen anti-EpCAM Antikörper behandelt wurden, zeigten keine Volumenreduktion. Im Gegensatz dazu führte der parentale CD3-Antikörper, das CD3- und Tumorzell-bindende catumaxomab F(ab')₂ Fragment oder eine Kombination beider parentaler Antikörper zu einer anti-tumoralen Wirkung, die jedoch nicht so stark war wie die des trifunktionalen Antikörpers catumaxomab. Dabei stand der Wirkungsgrad im Bezug zur Anzahl der infiltrierten T-Zellen und der Höhe der detektierten Zytokinkonzentrationen. Demnach ist für catumaxomab gezeigt, dass für die Effektivität des Antikörpers die Trifunktionalität unabdingbar ist. Daraus leitet sich ab, dass die Aktivierung der Abwehrzellen durch kostimulatorische Signale notwendig ist und über die Tumorantigenbindung Mechanismen wie ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) zum Tragen kommen.

Antikörpertherapien bergen bei systemischer Anwendung (*i.v.*) die Gefahr, Zytokin-assoziierte Nebenwirkungen hervorzurufen. Die Experimente mit gleichzeitiger Gabe von trifunktionalen Antikörpern und Immunsuppressiva haben gezeigt, dass eine Kombination beider Agenzien möglich ist. Die Konzentrationen sind jedoch sorgfältig derart zu wählen, dass die Zytokinausschüttung und die damit verbundenen Nebenwirkungen reduziert sind, ohne dass die antitumorale Wirkung der Antikörper maßgeblich beeinflusst wird.

Ein weiteres Kennzeichen von Krebszellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen ist eine gesteigerte aerobe Glykolyse. Auch T-Zellen bedienen sich nach Aktivierung für die rasche Proliferation dieses Stoffwechselwegs. Unter Behandlung der Kokulturen mit catumaxomab konnte im Vergleich zu anderen immunstimulatorischen Agenzien die größte Steigerung der Laktatproduktion bzw. der Azidifizierungs- und Sauerstoffverbrauchsrate detektiert werden. In PBMC-Monokulturen wurden durch catumaxomab-Gabe Enzyme der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung stärker exprimiert. Diese Effekte weisen auf eine metabolische Aktivierung der PBMC durch catumaxomab hin. Das von den Tumorzellen abgegebene Laktat kann die Immunzellen jedoch inhibieren. Daher wäre die Kombination mit Glykolyseinhibitoren ein möglicher Ansatz, um die Therapieeffizienz weiter zu steigern. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Komedikation der trifunktionalen Antikörper mit Chemotherapeutika zu einer gesteigerter Wirkung führte. Insgesamt liegt die Zukunft der Immuntherapien wohl in der Kombination mit anderen Wirkstoffklassen, die anti-tumorale Effekte verstärken oder immunsupprimierende Mechanismen inhibieren.

6 Anhang

6.1 Chemikalien und Reagenzien

6.1.1 Chemikalien

| | | |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Aceton | Roth | Karlsruhe |
| Agarose | Roth | Karlsruhe |
| β -Mercaptoethanol | AppliChem | Pasching |
| Borsäure | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| Bromphenolblau | Riedel de Haën/ Sigma-Aldrich | Steinheim |
| BSA (Albumin Fraktion V) | Roth | Karlsruhe |
| Casy Clean | Schärfe | Reutlingen |
| Casyton | Schärfe | Reutlingen |
| Collagenase/Dispase | Roche | Mannheim |
| DEPC | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| DMSO | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| EDTA | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| Eosin | Merck | Darmstadt |
| Essigsäure | Roth | Karlsruhe |
| Ethanol | Roth | Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Roth | Karlsruhe |
| Formaldehyd 37%ig | Fluka/Sigma- Aldrich | Steinheim |
| Formamid | Fluka/Sigma- Aldrich | Steinheim |
| Glukose | Merck | Darmstadt |
| Glycerin | Roth | Karlsruhe |
| Hämalaun | Roth | Karlsruhe |
| Hepes | Roth | Karlsruhe |
| Isopropanol | Roth | Karlsruhe |
| Methylenblau | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| MOPS | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| Myco Alert | Lonza | Rockland ME USA |
| Natriumacetat | Roth | Karlsruhe |
| Natriumcarbonat | Roth | Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat | Roth | Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Merck | Darmstadt |
| Natriumpyruvat | AppliChem | Darmstadt |
| PBS | Biochrom AG | Berlin |
| PNPP | Pierce/ Thermo Scientific | Bonn |
| RBS neutral | Roth | Karlsruhe |
| Roti-Histokit II | Roth | Karlsruhe |
| Schwefelsäure | Roth | Karlsruhe |
| Silikon/Isopropanol | Serva | Heidelberg |
| TissueTek | Sakura | Torrance, CA, USA |
| Tris | Roth | Karlsruhe |
| Tris Base | Roth | Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich | Steinheim |
| Wasserstoffperoxid 30 % | AppliChem | Darmstadt |
| Xylol | Roth | Karlsruhe |

6.1.2 Medien und Zusätze

| | | |
|--------------------------------------|-----------|----------------------|
| Amphotericin B | PAA | Pasching, Österreich |
| DMEM 4,5 g/l Glukose, mit L-Glut | PAA | Pasching, Österreich |
| DMEM 4,5 g/l Glukose, ohne Phenolrot | PAA | Pasching, Österreich |
| D-PBS | PAA | Pasching, Österreich |
| FCS | PAA | Pasching, Österreich |
| Geneticin (G418) | PAA | Pasching, Österreich |
| Hepes | Roth | Karlsruhe |
| LSM 1077 | PAA | Pasching, Österreich |
| Natriumpyruvat | AppliChem | Darmstadt |
| nicht-essentielle Aminosäuren | PAA | Pasching, Österreich |
| Penicillin/Streptomycin | PAA | Pasching, Österreich |
| Trypsin/EDTA | PAA | Pasching, Österreich |

6.1.3 Kits

| | | |
|---|----------------|-----------------|
| DAB+ | Dako | Hamburg |
| FragEL Apotosis Assay | Calbiochem | Darmstadt |
| Immunoselect Antifading Mounting Medium | Dianova | Hamburg |
| MycoAlert® Detection 100 | Lonza | Köln |
| NucleoSpin RNA | MN | Düren |
| PapPen (ImmEdge Pen) | Vector/Linaris | Wertheim |
| PKH26 General Membran Labeling Kit | Sigma | Steinheim |
| QuantiFast™ SYBR® Green PCR | Qiagen | Hilden |
| RevertAid First Strand cDNA Synthesis | Fermentas | St. Leon Roth |
| TMB OptEIA | BD | Bedford, MA USA |
| Tox-2 XTT Assay | Sigma-Aldrich | Steinheim |

6.2 Geräte

| | | |
|--------------------------------|-------------------|---------------------|
| -80°C Truhe Here Freeze | Thermo Scientific | Bonn |
| AccuJet pro | Brand | Wertheim |
| Brutschrank | Heraeus | Hanau |
| CASY TT | Schärfe | Reutlingen |
| Dispenser Handystep Electronic | Brand | Wertheim |
| Einfrierbehälter (Mr. Frosty) | Qualilab/VWR | Darmstadt |
| Färbeschiffchen | VWR | Darmstadt |
| Federpinzette | VWR | Darmstadt |
| Feuchte Kammer | VWR | Darmstadt |
| Geldokumentationsanlage | Vilber Lourmat | Eberhardzell |
| Gelkammer | Biorad | München |
| Kanadabalsamglas | Roth | Karlsruhe |
| Kryotom | SLEE | Mainz |
| Küvetten (Choplin, Hellendahl) | VWR | Darmstadt |
| Magnetinduktionsplatte | VWR | Darmstadt |
| Mikroskop Axiotron | Zeiss | Oberkochen |
| Mikroskop BZ-8000 | Keyence | Neu-Isenburg |
| Mikroskop Olympus IM | Olympus | Hamburg |
| Mehrkanalpipette | Labnet | Woodbridge, NJ, USA |

| | | |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Multiplate Reader DTX 880 | Beckman Coulter | Krefeld |
| Nanodrop 1000 | Thermo Scientific | Wilmington, USA |
| Neubauerkammer | Hecht-Assistent | Sondheim |
| Objektmikrometer | Olympus | Hamburg |
| Okularmikrometer | Olympus | Hamburg |
| Orbitalschwenker Polymax 1040 | Heidolph | Schwabach |
| PCR Cycler | Biometra | Göttingen |
| pH Meter | Schott | Mainz |
| Realtime Gerät 7300 | ABI | Foster City, USA |
| Scanner Epson Perfection 2400 | Epson | Japan |
| Spinnerflaschen, 20 ml | Wheaton | Millville, NJ USA |
| Spinnerflaschen, 100 ml 300 ml | Schott | Mainz |
| Sterilwerkbank | Gelair | Meckenheim |
| Stickstoffanlage | Air Liquide | Düsseldorf |
| Thermocycler | Biometra | Göttingen |
| Tischzentrifuge | Eppendorf | Hamburg |
| Trockenschrank | Ehret | Emmendingen |
| Vakuumpumpe | Neuberger | Freiburg |
| Vortexer | Bender+Hohlbein | Zürich |
| Waage | Sartorius | Göttingen |
| Wasserbad | GFL | Hannover |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R | Heraeus | Hanau |
| Zytospinapparatur | Heraeus | Hanau |

6.3 Verbrauchsmaterial

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 96 well optical reaction plate | ABI | Forster City, USA |
| blaue Magneten | VWR | Darmstadt |
| Cellstrainer | BD | Heidelberg |
| Deckgläschen | Menzel-Gläser | Braunschweig |
| Dispenserspitzen | Brand | Wertheim |
| Einwegskalpelle | Braun | Melsungen |
| Einwegspritzen | Braun | Melsungen |
| Kanüle (0,9 mm) | Braun | Melsungen |
| Kombitips versch. Volumina | Eppendorf | Hamburg |
| Kryoröhrchen | Nalgene | Rochester, USA |
| Maxisorp 96 well | NUNC | Langenselbold |
| Magnete blau | VWR | Darmstadt |
| Mikrotiterplatten | Greiner bio-one | Frickenhausen |
| Objektträger SuperFrostPlus | Menzel-Gläser | Braunschweig |
| optical adhesive covers | ABI | Forster City, USA |
| Pasteurpipetten, gestopft | Roth | Karlsruhe |
| Parafilm®M | Roth | Karlsruhe |
| PCR Tubes | Molecular BioProducts | San Diego, USA |
| PEEK (Polyetheretherketon) | Murtfeldt | Dortmund |
| Petrischalen | Greiner | Frickenhausen |
| Pipettenspitzen (10 µl) | Roth | Karlsruhe |
| Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl) | Greiner | Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml - 2 ml) | Eppendorf | Hamburg |
| Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml) | Greiner | Frickenhausen |

| | | |
|---|---------|---------------|
| Serologische Pipetten | Greiner | Frickenhausen |
| Skalpell | Braun | Melsungen |
| Spitzen für Multipette | VWR | Darmstadt |
| Spritzen 1 ml | Braun | Melsungen |
| Sterilfilter 0,22 µm | Roth | Karlsruhe |
| Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²) | Greiner | Frickenhausen |

6.4 Software

| Programm | Version | Verwendung |
|------------------|---------|--|
| Adobe Photoshop | CS3 | Bildbearbeitung, Bildanalyse |
| ImageJ | 1.40 | Bildbearbeitung, Bildanalyse |
| Microsoft Office | 2003 | Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Statistik |
| Origin | 8G | Erstellung von Diagrammen |
| Citavi pro | 2.5.1.0 | Zitationen |

7 Literaturverzeichnis

- Algarra, I.**; Cabrera, T.; Garrido, F. (2000): The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum. Immunol.*, 61(1): 65–73.
- Allavena, P.**; Sica, A.; Solinas, G.; Porta, C.; Mantovani, A. (2008): The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 66(1): 1–9.
- Apetoh, L.**; Ghiringhelli, F.; Tesniere, A.; Obeid, M.; Ortiz, C.; Criollo, A.; Mignot, G.; Maiuri, M. C.; Ullrich, E.; Saulnier, P.; Yang, H.; Amigorena, S.; Ryffel, B.; Barrat, F. J.; Saftig, P.; Levi, F.; Lidereau, R.; Nogues, C.; Mira, J.-P.; Chompret, A.; Joulin, V.; Clavel-Chapelon, F.; Bourhis, J.; André, F.; Delaloge, S.; Tursz, T.; Kroemer, G.; Zitvogel, L. (2007): Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.*, 13(9): 1050–1059.
- Ashkenazi, A.** und Dixit, V. M. (1999): Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11(2): 255–260.
- Atkins, M. B.**; Lotze, M. T.; Dutcher, J. P.; Fisher, R. I.; Weiss, G.; Margolin, K.; Abrams, J.; Sznol, M.; Parkinson, D.; Hawkins, M.; Paradise, C.; Kunkel, L.; Rosenberg, S. A. (1999): High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.*, 17(7): 2105–2116.
- Balkwill, F.** und Mantovani, A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255): 539–545.
- Balzar, M.**; Winter, M. J.; Boer, C. J. de; Litvinov, S. V. (1999): The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J. Mol. Med.*, 77(10): 699–712.
- Barok, M.**; Isola, J.; Pályi-Krekk, Z.; Nagy, P.; Juhász, I.; Vereb, G.; Kauraniemi, P.; Kapanen, A.; Tanner, M.; Vereb, G.; Szöllösi, J. (2007): Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol. Cancer Ther.*, 6(7): 2065–2072.
- Baselga, J.** und Swain, S. M. (2009): Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer*, 9(7): 463–475.
- Bijker, M. S.**; Melief, C. J. M.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. (2007): Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*, 6(4): 591–603.
- Bingle, L.**; Lewis, C. E.; Corke, K. P.; Reed, M. W.; Brown, N. J. (2006): Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br. J. Cancer*, 94(1): 101–107.
- Bournazos, S.**; Woof, J. M.; Hart, S. P.; Dransfield, I. (2009): Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. *Clin. Exp. Immunol.*, 157(2): 244–254.
- Bryan, T. M.** und Cech, T. R. (1999): Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11(3): 318–324.
- Burges, A.**; Wimberger, P.; Kumper, C.; Gorbounova, V.; Sommer, H.; Schmalfeldt, B.; Pfisterer, J.; Lichinitser, M.; Makhson, A.; Moiseyenko, V.; Lahr, A.; Schulze, E.; Jager, M.; Strohle, M. A.; Heiss, M. M.; 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. *Clin. Cancer Res.*, 13(13): 3899–3905.
- Burnet, M.** (1957): Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J*, 1(5023): 841–847.

- Butt, A. J.;** Firth, S. M.; Baxter, R. C. (1999): The IGF axis and programmed cell death. *Immunol. Cell Biol.*, 77(3): 256–262.
- Cahill, D. P.;** Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Lengauer, C. (1999): Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.*, 9(12): M57-60.
- Chang, T. T. und Hughes-Fulford, M. (2009):** Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue engineering. Part A*, 15(3): 559–567.
- Chatenoud, L. und Bluestone, J. A. (2007):** CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 7(8): 622–632.
- Chaudry, M. A.;** Sales, K.; Ruf, P.; Lindhofer, H.; Winslet, M. C. (2007): EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. *Br. J. Cancer*, 96(7): 1013–1019.
- Chen, K.;** Huang, J.; Gong, W.; Iribarren, P.; Dunlop, N. M.; Wang, J. M. (2007): Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int. Immunopharmacol.*, 7(10): 1271–1285.
- Cody, N. A.;** Zietarska, M.; Filali-Mouhim, A.; Provencher, D. M.; Mes-Masson, A.-M.; Tonin, P. N. (2008): Influence of monolayer, spheroid, and tumor growth conditions on chromosome 3 gene expression in tumorigenic epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC medical genomics*, 1 :34.
- Colombo, M. P. und Trinchieri, G. (2002):** Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13(2): 155–168.
- Czock, D.;** Keller, F.; Rasche, F. M.; Häußler, U. (2005): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet*, 44(1): 61–98.
- Desoize, B.;** Gimonet, D.; Jardiller, J. C. (1998): Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res.*, 18(6A) 4147–4158.
- Desoize, B. und Jardillier, J. (2000):** Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 36(2-3) 193–207.
- Ding, T.;** Xu, J.; Wang, F.; Shi, M.; Zhang, Y.; Li, S.-P.; Zheng, L. (2009): High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. *Hum. Pathol.*, 40(3): 381–389.
- Dinh, P.;** Azambuja, E. de; Piccart-Gebhart, M. J. (2007): Trastuzumab for early breast cancer: current status and future directions. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 5(9): 707–717.
- Dubessy, C.;** Merlin, J. M.; Marchal, C.; Guillemin, F. (2000): Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 36(2-3) 179–192.
- Dunn, G. P.;** Old, L. J.; Schreiber, R. D. (2004): The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2): 137–148.
- Durek, C.;** Brandau, S.; Ulmer, A. J.; Flad, H. D.; Jocham, D.; Bohle, A. (1999): Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) and 3D tumors: an in vitro model for the study of adhesion and invasion. *J Urol.*, 162(2): 600–605.
- Dvorak, H. F. (1986):** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 315(26): 1650–1659.
- Ehlert, T.** Charakterisierung der Penetration von Abwehrzellen in Tumorsphäroide unter dem Einfluss therapeutischer AK [Diplomarbeit]. Mainz: Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität; 2009.
- Ehrlich, P. (1909):** Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.*, Nr. 5 273–290.

- Feder-Mengus, C.;** Ghosh, S.; Weber, W. P.; Wyler, S.; Zajac, P.; Terracciano, L.; Oertli, D.; Heberer, M.; Martin, I.; Spagnoli, G. C.; Reschner, A. (2007): Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br. J. Cancer*, 96(7): 1072–1082.
- Fedi, P.;** Tronick, S. R.; Aaronson, S. A. (1997): Growth factors. In: Holland, J. F.; Bast, R. C.; Morton, D. L.; Frei, E.; Kufe, D. W.; Weichselbaum, R. R. (Hg.): *Cancer Medicine*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins 41–64.
- Fink-Retter, A.;** Gschwantler-Kaulich, D.; Hudelist, G.; Mueller, R.; Kubista, E.; Czerwenka, K.; Singer, C. F. (2007): Differential spatial expression and activation pattern of EGFR and HER2 in human breast cancer. *Oncol. Rep.*, 18(2): 299–304.
- Fischer, K.;** Hoffmann, P.; Voelkl, S.; Meidenbauer, N.; Ammer, J.; Edinger, M.; Gottfried, E.; Schwarz, S.; Rothe, G.; Hoves, S.; Renner, K.; Timischl, B.; Mackensen, A.; Kunz-Schughart, L.; Andreesen, R.; Krause, S. W.; Kreutz, M. (2007): Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9): 3812–3819.
- Fischer, N. und Léger, O. (2007):** Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies. *Pathobiology*, 74(1): 3–14.
- Fox, C. J.;** Hammerman, P. S.; Thompson, C. B. (2005): Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.*, 5(11): 844–852.
- Friedländer, E.;** Barok, M.; Szöllosi, J.; Vereb, G. (2008): ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol. Lett.*, 116(2): 126–140.
- Friedrich, J.;** Ebner, R.; Kunz-Schughart, L. A.: Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.*, 83(11-12) 849–871.
- Friedrich, J.;** Eder, W.; Castaneda, J.; Doss, M.; Huber, E.; Ebner, R.; Kunz-Schughart, L. A. (2007): A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening*, 12(7): 925–937.
- Friedrich, J.;** Seidel, C.; Ebner, R.; Kunz-Schughart, L. A. (2009): Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*, 4(3): 309–324.
- Gaedtke, L.;** Thoenes, L.; Culmsee, C.; Mayer, B.; Wagner, E. (2007): Proteomic analysis reveals differences in protein expression in spheroid versus monolayer cultures of low-passage colon carcinoma cells. *J. Proteome Res.*, 6(11): 4111–4118.
- Ghosh, S.;** Joshi, M. B.; Ivanov, D.; Feder-Mengus, C.; Spagnoli, G. C.; Martin, I.; Erne, P.; Resink, T. J. (2007): Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell-tumor cell interactions: a role for T-cadherin in tumor angiogenesis. *FEBS Lett.*, 581(23): 4523–4528.
- Gilboa, E. (2007):** DC-based cancer vaccines. *J. Clin. Invest.*, 117(5): 1195–1203.
- Glennie, M. J.;** McBride, H. M.; Worth, A. T.; Stevenson, G. T. (1987): Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J. Immunol.*, 139(7): 2367–2375.
- Gordon, M. S.;** Matei, D.; Aghajanian, C.; Matulonis, U. A.; Brewer, M.; Fleming, G. F.; Hainsworth, J. D.; Garcia, A. A.; Pegram, M. D.; Schilder, R. J.; Cohn, D. E.; Roman, L.; Derynck, M. K.; Ng, K.; Lyons, B.; Allison, D. E.; Eberhard, D. A.; Pham, T. Q.; Dere, R. C.; Karlan, B. Y. (2006): Clinical activity of pertuzumab (rhuMAb 2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status. *J. Clin. Oncol.*, 24(26): 4324–4332.
- Gorelik, L. und Flavell, R. A. (2002):** Transforming growth factor-beta in T-cell biology, 2(1): 46–53.

- Gottfried, E.;** Kunz-Schughart, L. A.; Ebner, S.; Mueller-Klieser, W.; Hoves, S.; Andreesen, R.; Mackensen, A.; Kreutz, M. (2006): Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*, 107(5): 2013–2021.
- Gottfried, E.;** Kunz-Schughart, L. A.; Weber, A.; Rehli, M.; Peuker, A.; Müller, A.; Kastenberger, M.; Brockhoff, G.; Andreesen, R.; Kreutz, M. (2008): Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand. J. Immunol.*, 67(5): 453–463.
- Gronau, S. 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*, 27(5): 376–382.
- Haas, C.;** Krinner, E.; Brischwein, K.; Hoffmann, P.; Lutterbüse, R.; Schlereth, B.; Kufer, P.; Baeuerle, P. A. (2009): Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology*, 214(6): 441–453.
- Hanahan, D. und Folkman, J. (1996):** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3): 353–364.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000):** The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57–70.
- Hayflick, L. (1997):** Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry Mosc.*, 62(11): 1180–1190.
- Heiss, M. M.;** Strohle, M. A.; Jager, M.; Kimmig, R.; Burges, A.; Schoberth, A.; Jauch, K. W.; Schildberg, F. W.; Lindhofer, H. (2005): Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int.J.Cancer*, 117(3): 435–443.
- Heiss, M. M.;** Murawa, P.; Koralewski, P.; Kutarska, E.; Kolesnik, O. O.; Ivanchenko, V. V.; Dudnichenko, A. S.; Aleknaviciene, B.; Razbadauskas, A.; Gore, M.; Ganea-Motan, E.; Ciuleanu, T.; Wimberger, P.; Schmitt, A.; Schmalfeldt, B.; Burges, A.; Bokemeyer, C.; Lindhofer, H.; Lahr, A.; Parsons, S. L. (2010): The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int. J. Cancer*, 127(9): 2209–2221.
- Henzen, C. (2003):** Therapie mit Glukokortikoiden: Risiken und Nebenwirkungen. *Schweiz Med Forum*, 7(19): 442–446.
- Hidalgo, A.;** Peired, A. J.; Wild, M. K.; Vestweber, D.; Frenette, P. S. (2007): Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26(4): 477–489.
- Hirschhaeuser, F.;** Leidig, T.; Rodday, B.; Lindemann, C.; Mueller-Klieser, W. F. (2009): Test System for Trifunctional Antibodies in 3D MCTS Culture. *J Biomol.Scren.* 980–990.
- Hirschhaeuser, F.;** Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L. A. (2010a): Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*.
- Hirschhaeuser, F.;** Walenta, S.; Mueller-Klieser, W. (2010b): Efficacy of catumaxomab in tumor spheroid killing is mediated by its trifunctional mode of action. *Cancer Immunol. Immunother.*, 59(11): 1675–1684.
- Hoffmann, T. K.;** Schirlau, K.; Sonkoly, E.; Brandau, S.; Lang, S.; Pivarcsi, A.; Balz, V.; Muller, A.; Homey, B.; Boelke, E.; Reichert, T.; Friebe-Hoffmann, U.; Greve, J.; Schuler, P.; Scheckenbach, K.; Schipper, J.; Bas, M.; Whiteside, T. L.; Bier, H. (2009): A novel mechanism for anti-EGFR antibody action involves chemokine-mediated leukocyte infiltration. *Int J Cancer*, 124(11): 2589–2596.
- Holliger, P.;** Prospero, T.; Winter, G. (1993): "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(14): 6444–6448.
- Holtfreter, J. (1944):** A study of the mechanism of gastrulation. *J. Exp. Zool.*(95): 171–212.

- Howland, K. C.;** Ausubel, L. J.; London, C. A.; Abbas, A. K. (2000): The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J. Immunol.*, 164(9): 4465–4470.
- Hsiao, A. Y.;** Torisawa, Y. S.; Tung, Y. C.; Sud, S.; Taichman, R. S.; Pienta, K. J.; Takayama, S. (2009): Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials*, 30(16): 3020–3027.
- Ivascu, A. und Kubbies, M. (2006):** Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of biomolecular screening: the official journal of the Society for Biomolecular Screening*, 11(8): 922–932.
- Jäger, M.;** Schoberth, A.; Ruf, P.; Hess, J.; Lindhofer, H. (2009): The trifunctional antibody ertumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2. *Cancer Res.*, 69(10): 4270–4276.
- Jain, R. K. (1990):** Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev.*, 9(3): 253–266.
- Jaiswal, M.;** LaRusso, N. F.; Burgart, L. J.; Gores, G. J. (2000): Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.*, 60(1): 184–190.
- Johnson, B. E. und Jänne, P. A. (2006):** Rationale for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12(14 Pt 2) 4436s-4440s.
- Kaplan, D. H.;** Shankaran, V.; Dighe, A. S.; Stockert, E.; Aguet, M.; Old, L. J.; Schreiber, R. D. (1998): Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(13): 7556–7561.
- Kaufman, A. und Herold, K. C. (2009):** Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 25(4): 302–306.
- Kawai, K.;** Hayashi, H.; Ozaki, Y.; Saijo, K.; Liu, S. Q.; Akaza, H.; Ohno, T. (2001): Assessment of the number of local cytotoxic T lymphocytes required for degradation of micrometer-size tumor spheroids. *Cytotechnology*, 37(1): 31–40.
- Kelm, J. M.;** Timmins, N. E.; Brown, C. J.; Fussenegger, M.; Nielsen, L. K. (2003): Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.*, 83(2): 173–180.
- Khong, H. T. und Restifo, N. P. (2002):** Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat. Immunol.*, 3(11): 999–1005.
- Kiewe, P.;** Hasmuller, S.; Kahlert, S.; Heinrigs, M.; Rack, B.; Marme, 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. *Clin. Cancer Res.*, 12(10): 3085–3091.
- Kiewe, P. und Thiel, E. (2008):** Ertumaxomab: a trifunctional antibody for breast cancer treatment. *Expert opinion on investigational drugs*, 17(10): 1553–1558.
- Kipriyanov, S. M. (2003):** Generation and characterization of bispecific tandem diabodies for tumor therapy. *Methods Mol. Biol.*, 207 323–333.
- Kirkwood, J. M.;** Ibrahim, J.; Lawson, D. H.; Atkins, M. B.; Agarwala, S. S.; Collins, K.; Mascari, R.; Morrissey, D. M.; Chapman, P. B. (2001): High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: results of the Multicenter Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E2696. *J. Clin. Oncol.*, 19(5): 1430–1436.

- Klebanoff, C. A.;** Finkelstein, S. E.; Surman, D. R.; Lichtman, M. K.; Gattinoni, L.; Theoret, M. R.; Grewal, N.; Spiess, P. J.; Antony, P. A.; Palmer, D. C.; Tagaya, Y.; Rosenberg, S. A.; Waldmann, T. A.; Restifo, N. P. (2004): IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(7): 1969–1974.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975):** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517): 495–497.
- Konur, A.;** Kreutz, M.; Knuchel, R.; Krause, S. W.; Andreesen, R. (1998): Cytokine repertoire during maturation of monocytes to macrophages within spheroids of malignant and non-malignant urothelial cell lines. *Int J Cancer*, 78(5): 648–653.
- Kröncke, K.-D. (2003):** Nitrosative stress and transcription. *Biol. Chem.*, 384(10-11) 1365–1377.
- Krueger, S.;** Kalinski, T.; Wolf, H.; Kellner, U.; Roessner, A. (2005): Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture--regulation of cathepsin B expression and invasiveness. *Cancer Lett.*, 223(2): 313–322.
- Kunz-Schughart, L. A.;** Groebe, K.; Mueller-Klieser, W. (1996): Three-dimensional cell culture induces novel proliferative and metabolic alterations associated with oncogenic transformation. *Int. J. Cancer*, 66(4): 578–586.
- Kunz-Schughart, L. A.;** Freyer, J. P.; Hofstaedter, F.; Ebner, R. (2004): The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening*, 9(4): 273–285.
- Langowski, J. L.;** Zhang, X.; Wu, L.; Mattson, J. D.; Chen, T.; Smith, K.; Basham, B.; McClanahan, T.; Kastelein, R. A.; Oft, M. (2006): IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442(7101): 461–465.
- Le Bitoux, M.-A. und Stamenkovic, I. (2008):** Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochem. Cell Biol.*, 130(6): 1079–1090.
- Leidig, T.** Entwicklung eines pharmakologischen Modells zur Prüfung immuntherapeutischer AK mit dreidimensionalen Tumorzellkulturen in vitro [Dissertation]. Mainz: Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität; 2010.
- Lengauer, C.;** Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712): 643–649.
- Lin, R.-Z.;** Lin, R.-Z.; Chang, H.-Y. (2008): Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*, 3(9-10) 1172–1184.
- 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. *J. Immunol.*, 155(1): 219–225.
- Litvinov, S. V.;** Balzar, M.; Winter, M. J.; Bakker, H. A.; Briaire-de Bruijn, I. H.; Prins, F.; Fleuren, G. J.; Warnaar, S. O. (1997): Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J. Cell Biol.*, 139(5): 1337–1348.
- Litvinov, S. V.;** Velders, M. P.; Bakker, H. A.; Fleuren, G. J.; Warnaar, S. O. (1994): Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.*, 125(2): 437–446.
- Lluis, J. M.;** Buricchi, F.; Chiarugi, P.; Morales, A.; Fernandez-Checa, J. C. (2007): Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res.*, 67(15): 7368–7377.
- Loeb, L. A.;** Loeb, K. R.; Anderson, J. P. (2003): Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(3): 776–781.

- Longui, C. A.;** Santos, M. C.; Formiga, C. B.; Oliveira, D. V. A.; Rocha, M. N.; Faria, C. D. C.; Kochi, C.; Monte, O. (2005): Antiproliferative and apoptotic potencies of glucocorticoids: nonconcordance with their antiinflammatory and immunosuppressive properties. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 49(3): 378–383.
- Lordick, F.;** Ott, K.; Weitz, J.; Jäger, D. (2008): The evolving role of catumaxomab in gastric cancer. *Expert opinion on biological therapy*, 8(9): 1407–1415.
- Lotem, J. und Sachs, L. (1996):** Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia*, 10(6): 925–931.
- Lotze, M. T.;** Matory, Y. L.; Ettinghausen, S. E.; Rayner, A. A.; Sharrow, S. O.; Seipp, C. A.; Custer, M. C.; Rosenberg, S. A. (1985): In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J. Immunol.*, 135(4): 2865–2875.
- Maeda, S. und Omata, M. (2008):** Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.*, 99(5): 836–842.
- Mantovani, A.;** Romero, P.; Palucka, A. K.; Marincola, F. M. (2008): Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet*, 371(9614): 771–783.
- Mantovani, A.;** Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 25(12): 677–686.
- Marincola, F. M.;** Jaffee, E. M.; Hicklin, D. J.; Ferrone, S. (2000): Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.*, 74 181–273.
- Marnett, L. J. (2000):** Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3): 361–370.
- Mills, C. D.;** Kincaid, K.; Alt, J. M.; Heilman, M. J.; Hill, A. M. (2000): M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.*, 164(12): 6166–6173.
- Moscona, A. (1952):** Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.*(3): 535–539.
- Mueller-Klieser, W. (1997):** Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 1) C1109-23.
- Mueller-Klieser, W. (2000):** Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.*, 36(2-3) 123–139.
- Muenchen, H. J. und Aggarwal, S. K. (1998):** Immune system activation by cisplatin and its analog 'poly-plat': an in vitro and in vivo study. *Anticancer Drugs*, 9(1): 93–99.
- Munn, D. H. und Mellor, A. L. (2007):** Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.*, 117(5): 1147–1154.
- Münz, M.;** Baeuerle, P. A.; Gires, O. (2009): The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.*, 69(14): 5627–5629.
- Münz, M.;** Kieu, C.; Mack, B.; Schmitt, B.; Zeidler, R.; Gires, O. (2004): The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, 23(34): 5748–5758.
- Muthana, M.;** Scott, S. D.; Farrow, N.; Morrow, F.; Murdoch, C.; Grubb, S.; Brown, N.; Dobson, J.; Lewis, C. E. (2008): A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell-based gene therapies. *Gene Ther.*, 15(12): 902–910.
- Nakazawa, K.;** Izumi, Y.; Mori, R. (2009): Morphological and functional studies of rat hepatocytes on a hydrophobic or hydrophilic polydimethylsiloxane surface. *Acta biomaterialia*, 5(2): 613–620.

- Naugler, W. E.** und Karin, M. (2008): NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18(1): 19–26.
- Nummer, D.**; Suri-Payer, E.; Schmitz-Winnenthal, H.; Bonertz, A.; Galindo, L.; Antolovich, D.; Koch, M.; Buchler, M.; Weitz, J.; Schirmacher, V.; Beckhove, P. (2007): Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J Natl. Cancer Inst.*, 99(15): 1188–1199.
- Oberneder, R.**; Weckermann, D.; Ebner, B.; Quadt, C.; Kirchinger, P.; Raum, T.; Locher, M.; Prang, N.; Baeuerle, P. A.; Leo, E. (2006): A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 42(15): 2530–2538.
- Ogura, E.**; Senzaki, H.; Yoshizawa, K.; Hioki, K.; Tsubura, A. (1998): Immunohistochemical localization of epithelial glycoprotein EGP-2 and carcinoembryonic antigen in normal colonic mucosa and colorectal tumors. *Anticancer Res.*, 18(5B) 3669–3675.
- Okamoto, M.**; Ohe, G.; Oshikawa, T.; Nishikawa, H.; Furuichi, S.; Yoshida, H.; Sato, M. (2000): Induction of cytokines and killer cell activities by cisplatin and 5-fluorouracil in head and neck cancer patients. *Anticancer Drugs*, 11(3): 165–173.
- Olive, P. L.** und Durand, R. E. (1994): Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.*, 13(2): 121–138.
- Ostrand-Rosenberg, S.** (2008): Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18(1): 11–18.
- Ott, M. G.**; Lindhofer, H.; Linke, R. G.; Hennig, M.; Martinius, H.; Klein, A.; Seimetz, D. (2010): The trifunctional antibody catumaxomab: Correlation between immunological response and clinical outcome—New analysis of a pivotal phase II/III study. *J Clin Oncol*, 28(15_suppl) ASCO Annual Meeting Proceedings, 2010: 2551.
- Perez, S. A.**; Mahaira, L. G.; Sotiropoulou, P. A.; Gritzapis, A. D.; Iliopoulou, E. G.; Niarchos, D. K.; Cacoullos, N. T.; Kavalakis, Y. G.; Antsaklis, A. I.; Sotiriadou, N. N.; Baxevanis, C. N.; Papamichail, M. (2006): Effect of IL-21 on NK cells derived from different umbilical cord blood populations. *Int. Immunol.*, 18(1): 49–58.
- Piersma, S. J.**; Jordanova, E. S.; van Poelgeest, M. I. E.; Kwappenberg, K. M. C.; van der Hulst, J. M.; Drijfhout, J. W.; Melief, C. J. M.; Kenter, G. G.; Fleuren, G. J.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. (2007): High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.*, 67(1): 354–361.
- Piggee, C.** (2008): Therapeutic antibodies coming through the pipeline. *Anal. Chem.*, 80(7): 2305–2310.
- Pol, S.** und Michel, M.-L. (2006): Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B virus carriers. *Expert Rev Vaccines*, 5(5): 707–716.
- Prang, N.**; Preithner, S.; Brischwein, K.; Göster, P.; Wöppel, A.; Müller, J.; Steiger, C.; Peters, M.; Baeuerle, P. A.; da Silva, A. J. (2005): Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 92(2): 342–349.
- Price-Schiavi, S. A.**; Jepson, S.; Li, P.; Arango, M.; Rudland, P. S.; Yee, L.; Carraway, K. L. (2002): Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int. J. Cancer*, 99(6): 783–791.
- Punt, C. J. A.**; Nagy, A.; Douillard, J.-Y.; Figer, A.; Skovsgaard, T.; Monson, J.; Barone, C.; Fountzilas, G.; Riess, H.; Moylan, E.; Jones, D.; Dethling, J.; Colman, J.; Coward, L.; MacGregor, S. (2002): Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet*, 360(9334): 671–677.

- Rangan, S. R. (1972):** A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 29(1): 117–121.
- 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 Immunol. Immunother.*, 56(9): 1397–1406.
- Riesenberg, R.;** Buchner, A.; Pohla, H.; Lindhofer, H. (2001): Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J.Histochem.Cytochem.*, 49(7): 911–917.
- Robert Koch-Institut (Hrsg)** und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Berlin, 2010.
- Rodday, B.** Untersuchung der Aktivierung von Immunzellen durch den trifunktionalen Antikörper catumaxomab in einer Ko-Kultur aus humanen MCTS und PBMC sowie die Entwicklung einer halbautomatischen Wachstumsanalyse von dreidimensionalen Zellkulturen [Dissertation] Mainz: Fachbereich Medizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität; 2010.
- Rodríguez-Enríquez, S.;** Gallardo-Pérez, J. C.; Avilés-Salas, A.; Marín-Hernández, A.; Carreño-Fuentes, L.; Maldonado-Lagunas, V.; Moreno-Sánchez, R. (2008): Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J. Cell. Physiol.*, 216(1): 189–197.
- Rosenberg, S. A.;** Packard, B. S.; Aebersold, P. M.; Solomon, D.; Topalian, S. L.; Toy, S. T.; Simon, P.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Seipp, C. A. (1988): Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, 319(25): 1676–1680.
- Rosenberg, S. A.;** Sportès, C.; Ahmadzadeh, M.; Fry, T. J.; Ngo, L. T.; Schwarz, S. L.; Stetler-Stevenson, M.; Morton, K. E.; Mavroukakis, S. A.; Morre, M.; Buffet, R.; Mackall, C. L.; Gress, R. E.: IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J. Immunother.*, 29(3): 313–319.
- Rubinstein, N.;** Alvarez, M.; Zwirner, N. W.; Toscano, M. A.; Ilarregui, J. M.; Bravo, A.; Mordoh, J.; Fainboim, L.; Podhajcer, O. L.; Rabinovich, G. A. (2004): Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*, 5(3): 241–251.
- 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. *Br. J. Cancer*, 97(3): 315–321.
- Ruf, P.** und Lindhofer, H. (2001): Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood*, 98(8): 2526–2534.
- Ruf, P.;** Kluge, M.; Jäger, M.; Burges, A.; Volovat, C.; Heiss, M. M.; Hess, J.; Wimberger, P.; Brandt, B.; Lindhofer, H. (2010): Pharmacokinetics, immunogenicity and bioactivity of the therapeutic antibody catumaxomab intraperitoneally administered to cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*, 69(6): 617–625.
- Sahin, U.;** Türeci, O.; Schmitt, H.; Cochlovius, B.; Johannes, T.; Schmits, R.; Stenner, F.; Luo, G.; Schobert, I.; Pfreundschuh, M. (1995): Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(25): 11810–11813.
- Santini, M. T.;** Rainaldi, G.; Indovina, P. L. (1999): Multicellular tumour spheroids in radiation biology. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75(7): 787–799.

- 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 T lymphocytes. *Int. J. Oncol.*, 25(4): 841–848.
- Sebastian, M.;** Kuemmel, A.; Schmidt, M.; Schmittel, A. (2009): Catumaxomab: A bispecific trifunctional antibody. *Drugs Today*, 45(8): 589–597.
- Sebastian, M.;** Passlick, B.; Friccius-Quecke, H.; Jager, 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 Immunol.Immunother.*, 56(10): 1637–1644.
- Seimetz, D.;** Lindhofer, H.; Bokemeyer, C. (2010): Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.*, 36(6): 458–467.
- Seliger, B.;** Maeurer, M. J.; Ferrone, S. (2000): Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today*, 21(9): 455–464.
- Serafini, P.;** Borrello, I.; Bronte, V. (2006): Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin. Cancer Biol.*, 16(1): 53–65.
- Sha, W.** Einfluss von Vorstimulation humaner Abwehrzellen auf die Penetration in Tumorsphäroiden [Diplomarbeit] Mainz: Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaftender Johannes Gutenberg-Universität; 2010.
- Shield, K.;** Ackland, M. L.; Ahmed, N.; Rice, G. E. (2009): Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol. Oncol.*, 113(1): 143–148.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden: Todesursachen in Deutschland Fachserie 12, Reihe 4, 2009; <https://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=strukturvollanzeige.csp&ID=1026306> (Stand 21.10.2010)
- Stemmler, H. J.;** Salat, C.; Lindhofer, H.; Menzel, H.; Untch, M.; Kahlert, S. et al. (2005): Combined treatment of metastatic breast cancer (MBC) by high-dose chemotherapy (HDCT) and bispecific antibodies: a pilot study. *Anticancer Res.*, 25(4): 3047–3054.
- Ströhlein, M. A.;** Siegel, R.; Jäger, M.; Lindhofer, H.; Jauch, K.-W.; Heiss, M. M. (2009): Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 28 :18.
- Suresh, M. R.;** Cuello, A. C.; Milstein, C. (1986): Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Meth. Enzymol.*, 121 210–228.
- Sutherland, R. M.;** Inch, W. R.; McCredie, J. A.; Kruuv, J. (1970): A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 18(5): 491–495.
- Terabe, M.;** Matsui, S.; Noben-Trauth, N.; Chen, H.; Watson, C.; Donaldson, D. D.; Carbone, D. P.; Paul, W. E.; Berzofsky, J. A. (2000): NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.*, 1(6): 515–520.
- Terabe, M.;** Swann, J.; Ambrosino, E.; Sinha, P.; Takaku, S.; Hayakawa, Y.; Godfrey, D. I.; Ostrand-Rosenberg, S.; Smyth, M. J.; Berzofsky, J. A. (2005): A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J. Exp. Med.*, 202(12): 1627–1633.
- Thomas, L. (1959):** Discussion. In: Lawrence, H. S. (Hg.): *In Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. New York: Hoeber-Harper 529–532.
- Tovar, D.** Bestimmung der Eindringtiefe von Zelleninnerhalb von Zellsphäroiden [Bachelorarbeit]. Mainz: Fachbereich Informatik der Johannes Gutenberg-Universität; 2009.

- Uyttenhove, C.;** Pilotte, L.; Théate, I.; Stroobant, V.; Colau, D.; Parmentier, N.; Boon, T.; van den Eynde, B. J. (2003): Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.*, 9(10): 1269–1274.
- van der Bruggen, P.;** Traversari, C.; Chomez, P.; Lurquin, C.; Plaen, E. de; van den Eynde, B.; Knuth, A.; Boon, T. (1991): A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038): 1643–1647.
- Visser, K. E. de;** Korets, L. V.; Coussens, L. M. (2005): De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 7(5): 411–423.
- Waldner, M.;** Schimanski, C.-C.; Neurath, M.-F. (2006): Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World J. Gastroenterol.*, 12(45): 7233–7238.
- Wawrsinek, F.** Wirkung des trifunktionalen Antikörpers catumaxomab auf humane Tumorzellen in Sphäroid-Kulturen und Manipulation der Tumorglykolyse durch siRNA [Masterarbeit]. Mainz: Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität; 2006
- Weinberg, R. A. (1995):** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3): 323–330.
- Went, P.;** Dirnhofer, S.; Schoepf, D.; Moch, H.; Spizzo, G. (2008): Expression and Prognostic Significance of EpCAM. *J.Cancer Mol.*, 3(6) 169–174.
- Winsor, C. P. (1932):** The Gompertz Curve as a Growth Curve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 18(1): 1–8.
- Wyllie, A. H.;** Kerr, J. F.; Currie, A. R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68 251–306.
- Xie, X.;** Wang, C.-Y.; Cao, Y.-X.; Wang, W.; Zhuang, R.; Chen, L.-H.; Dang, N.-N.; Fang, L.; Jin, B.-Q. (2005): Expression pattern of epithelial cell adhesion molecule on normal and malignant colon tissues. *World J. Gastroenterol.*, 11(3): 344–347.
- Yuhas, J. M.;** Li, A. P.; Martinez, A. O.; Ladman, A. J. (1977): A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.*, 37(10): 3639–3643.
- Zafir-Lavie, I.;** Michaeli, Y.; Reiter, Y. (2007): Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene*, 26(25): 3714–3733.
- Zeidler, R.;** Mysliwietz, J.; Csanady, 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. *Br.J.Cancer*, 83(2): 261–266.
- 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. *J.Immunol.*, 163(3): 1246–1252.
- Zhang, L.;** Conejo-Garcia, J. R.; Katsaros, D.; Gimotty, P. A.; Massobrio, M.; Regnani, G.; Makrigiannakis, A.; Gray, H.; Schlienger, K.; Liebman, M. N.; Rubin, S. C.; Coukos, G. (2003): Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.*, 348(3): 203–213.
- Zhang, M.;** Desai, T.; Ferrari, M. (1998): Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces. *Biomaterials*, 19(10): 953–960.
- Zhu, L.-Y.;** Zhou, J.; Liu, Y.-Z.; Pan, W.-D. (2009): [Prognostic significance of natural killer cell infiltration in hepatocellular carcinoma]. *Ai Zheng*, 28(11): 1198–1202.
- Zitvogel, L.;** Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Kroemer, G. (2008): Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(1): 59–73.