

Untersuchungen zur antitumoralen
Wirkungsweise eines
bispesifischen MCSP-CD3 Antikörpers
in vitro und im humanisierten
Tumormausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Johannes Sam
Geboren am 11. Oktober 1982 in Erlenbach am Main

Januar 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
3	Zielsetzung.....	14
4	Material und Methode	15
4.1	Material.....	15
4.1.1	Tiere und Tierzubehör	15
4.1.2	Laborgeräte	15
4.1.3	Medien, Puffer und Zusätze	17
4.1.4	Angesetzte Lösungen.....	19
4.1.5	Zytokine, Enzyme und T-Zell-Stimulatoren.....	20
4.1.6	Primäre CD34-positive Nabelschnurblutzellen	20
4.1.7	Zelllinien	20
4.1.8	Antikörper.....	21
4.1.9	Gebrauchswaren	24
4.1.10	Gebrauchsfertige Kits.....	25
4.2	Methoden.....	26
4.2.1	Tierexperimentelle Methoden	26
4.2.2	Zellkulturtechniken	29
4.2.3	Durchflusszytometrie	33
4.2.4	Aufbau des therapeutischen bispezifischen Antikörpers	36
4.2.5	Histologie und Immunhistochemie.....	38
4.2.6	Westernblot	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Untersuchungen zur Wirkungsweise des bispezifischen Antikörpers	
<i>in vitro</i>		43
5.1.1	Der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper bindet auf MCSP-positiven humanen Melanomzellen	43
5.1.2	MCSP-CD3 bindet an humane T-Zellen.....	45

5.1.3	MCSP-CD3 induziert T-Zell-vermittelte Lyse humaner Melanomzellen durch T _{Helfer} und CTL	47
5.1.4	T-Zellaktivierung und Expression von Zytokinen	50
5.1.5	MCSP-CD3 induziert Degranulierung in CTL und T _{Helfer}	56
5.1.6	T _{Helfer} induzieren TNF- α -unabhängige Lyse der Melanomzellen	58
5.2	Charakterisierung des humanisierten Mausmodells	60
5.2.1	Nach Injektion humaner hämatopoetische Stammzellen kommt es zur Besiedelung des Knochenmarks in Rag2 ^{-/-} γ_c ^{-/-} Mäuse	60
5.2.2	Humane T-Zellen differenzieren im murinen Thymus	63
5.2.3	Entwicklung humaner regulatorischer T-Zellen im Thymus (tT _{reg}) humanisierter Mäuse	66
5.2.4	Nachweis humaner T- und B-Zellen in Blut und lymphatischen Organen ...	68
5.2.5	T-Zellen humanisierter Mäuse sind funktionell aktiv	70
5.2.6	MCSP-CD3 induziert konzentrationsabhängige Lyse humaner Melanomzellen in Anwesenheit von Milzzellen aus humanisierten Mäusen	74
5.3	Untersuchungen zur Wirkungsweise des bispezifischen Antikörpers <i>in vivo</i>	75
5.3.1	Untersuchungen zum Anwachsen der Melanomzelllinie Colo-38 in humanisierten Mäusen	75
5.3.2	Wirksamkeitsstudie in humanisierten Rag2 ^{-/-} γ_c ^{-/-} Mäusen	77
5.3.3	MCSP-CD3 erhöht die Anzahl humaner T-Zellen im Tumorgewebe	79
5.3.4	Der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper verfügt über eine geringe Gewebepenetration in Colo-38-Melanome	81
6	Diskussion	83
7	Abkürzungsverzeichnis	94
8	Referenzen	97

1 Zusammenfassung

Humanes MCSP ist ein gut charakterisiertes Tumorantigen, das auf der Mehrzahl aller malignen Melanome hoch exprimiert wird, und stellt somit eine gute Zielstruktur für immuntherapeutische Ansätze dar.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkmechanismen eines neuen bispezifischen Antikörpers, der gegen humanes MCSP und CD3 auf T-Zellen gerichtet ist, *in vitro* und im humanisierten Tumormausmodell *in vivo* untersucht. In humanen T-Zellkulturen induzierte der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper in Gegenwart MCSP-positiver Melanomzellen konzentrationsabhängige T-Zellaktivierung, Sekretion von Zytokinen und effiziente Tumorzelllyse durch CD4- und CD8-positive T-Zellen. Die induzierte Lyse war hierbei unabhängig von der T-Zellrezeptorspezifität sowie kostimulatorischen Molekülen und allein abhängig von der Expression des Tumorantigens sowie CD3 auf den T-Zellen. Wie hier diskutiert, liegt es nahe, dass die Freisetzung lytischer Moleküle (Perforin und Granzym-B) durch CD8- und auch CD4-positiver T-Zellen den Hauptmechanismus in der Lyse der Melanomzellen darstellt.

Um die Wirksamkeit *in vivo* testen zu können, wurde ein humanisiertes Tumormausmodell etabliert. Die Injektion humaner hämatopoetischer Stammzellen in neugeborene Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse führte zur Entwicklung funktioneller T-Zellen im murinen Thymus, welche lymphatische Organe besiedelten. *In vitro* induzierten die T-Zellen humanisierter Mäuse in Anwesenheit des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers ebenfalls konzentrationsabhängige Lyse der Melanomzellen. Wie hier gezeigt, induzierte die Injektion humaner Melanomzellen in humanisierte Mäuse keine messbare Abstoßungsreaktion. Unter Behandlung mit MCSP-CD3 wurde zwar eine erhöhte Anzahl humaner T-Zellen im Tumorgewebe nachgewiesen, jedoch verfügte die verwendete Melanomzelllinie über eine geringe basale T-Zellinfiltration, geringe Vaskularisierung und ein noduläres Wachstumsverhalten. Wie innerhalb dieser Arbeit diskutiert, kann durch die Kombination mit Therapien, die eine erhöhte T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe ermöglichen, die Wirksamkeit von bispezifischen Antikörpern möglicherweise gesteigert werden.

2 Einleitung

Im Laufe der menschlichen Evolution entwickelte sich ein hochkomplexes und effizientes Immunsystem, welches in der Lage ist, uns Menschen vor körperfremden Organismen wie z.B. Pilzen, Bakterien und Viren auf vielfältige Art und Weise zu schützen ^[1, 2]. Man unterscheidet angeborene und erworbene Immunantworten ^[2]. Das angeborene Immunsystem ist die evolutionär am frühesten anzusiedelnde Abwehr gegen eindringende Fremdkörper. Hierzu zählen mechanische Barrieren (z.B. Schleimhäute), Abwehrzellen (z.B. Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, natürliche Killerzellen und Mastzellen) und plasmatische Bestandteile (Komplementsystem) ^[3]. Der Hauptunterschied zur erworbenen Immunabwehr besteht darin, dass die Erkennung von Fremdmolekülen keimbahncodiert und somit genetisch festgelegt ist ^[4]. PAMPs (engl.: Pathogen Associated Molecular Patterns) sind hoch konservierte Strukturen die charakteristisch und zumeist essentiell für bestimmte Fremdorganismen sind. Es handelt sich um Komponenten bakterieller Zellwände, Peptiden oder auch Nukleinsäuren von pathogenen Organismen, welche durch sogenannte PRRs (engl.: Pattern Recognition Receptors) erkannt werden ^[5]. Man unterscheidet lösliche, intrazelluläre sowie auf der Oberfläche von Immunzellen exprimierte PRRs. Lösliche PRRs können nach Bindung an pathogene Strukturen das Komplementsystem aktivieren und so die Lyse von Erregern induzieren. Oberflächen-PRRs, wie z.B. Toll-like Rezeptoren, sind hauptsächlich auf phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen vorhanden. Nach erfolgreicher Bindung von fremden Strukturen kommt es zur Zellaktivierung und Erhöhung der Phagozytoseaktivität. Vor allem dendritische Zellen sind nach Aktivierung in der Lage in regionale Lymphknoten zu migrieren um dort eine Aktivierung von Zellen des erworbenen Immunsystems zu bewirken ^[5, 6]. Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen (engl.: Antigen Presenting Cells; kurz: APCs) und stellen eine Schlüsselfigur in der Vermittlung von Immunitäten und Toleranzen dar ^[7].

Das erworbene Immunsystem entwickelte sich erst nach der angeborenen Immunabwehr als evolutionäre Antwort auf neue oder veränderte Krankheitserreger. Es zeichnet sich dadurch aus, dass es spezifische Strukturen (Antigene) gezielt erkennt

und zelluläre und humorale Immunantworten induziert ^[2]. Die Erkennungen sind im Gegensatz zur angeborenen Immunität nicht keimbahncodiert und werden durch B- und T-Lymphozyten vermittelt. Die Entwicklung humaner T-Zellen ist ein komplexer Prozess, der innerhalb des Thymus durchlaufen wird. Vorläufer der T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark über die Blutbahn in den Thymus ein ^[8]. Sie besitzen noch keine T-Zell-spezifischen Oberflächenmarker wie CD3, CD4, CD8 oder T-Zellrezeptoren (kurz: TZR). Wie in Abbildung 1 veranschaulicht, durchlaufen diese Vorläuferzellen (Thymozyten) vom Cortex (Thymusrinde) über verschiedene Zwischenstufen von außen nach innen den Thymus bis in die Medulla (Thymusmark). Durch den Prozess der V(D)J-Rekombination werden in einem ersten Schritt aus zahlreichen Gensegmenten verschiedenste TZR generiert ^[9]. Zwei Lymphozyten spezifische Enzyme, Rekombinase 1 und 2, binden an konservierte DNA-Sequenzen und induzieren die Spaltung der DNA. Die geschnittenen Segmente werden zufällig ligiert, sodass eine vollständige TZR-Sequenz entsteht ^[10]. Durch die zufällige Ligation entsteht eine große Diversität die es erlaubt, Immunantworten gegen eine Vielzahl pathogener Strukturen zu generieren. Nach Entstehung der TZR werden deren Funktionalität und Reaktivität innerhalb des Thymus überprüft und fehlerhafte bzw. autoreaktive eliminiert. Können diese TZR körpereigene, peptidbeladene MHC-Moleküle (MHC-Klasse I und / oder MHC-Klasse II) auf den Epithelzellen im Cortex erkennen, erhalten sie ein positives Signal und überleben, während nicht- oder zu schwach-bindende Thymozyten in Apoptose (programmierter Zelltod) ^[11]. Dieser erste Selektionsschritt wird auch positive Thymusselektion genannt und stellt sicher, dass präsentierte Peptide nur auf körpereigenen MHC-Molekülen erkannt werden. Die Thymozyten sind zu diesem Zeitpunkt doppelpositiv für CD4 und CD8 ^[8]. Thymozyten deren TZR erfolgreich an peptidbeladene MHC-Klasse I-Moleküle bindet werden CD8 und die die an peptidbeladene MHC-Klasse II-Moleküle binden werden CD4 einfachpositiv (Abbildung 1) und treten in die Medulla ein ^[8]. In einem weiteren Schritt, der sogenannten negativen Selektion, gehen Thymozyten die körpereigene Antigene mit zu hoher Affinität erkennen und somit potentiell autoreaktiv sind, durch noch nicht vollständig aufgeklärte Vorgänge in Apoptose. Verantwortlich für diesen Schritt sind vor allem medulläre Epithelzellen und dendritischen Zellen ^[12, 13]. Medulläre Epithelzellen können mit Hilfe des sogenannten AIRE-Gens (Autoimmun-Regulator) organspezifische

Proteine synthetisieren und auf MHC-Molekülen in Form kleiner Peptide präsentieren^[14]. Nach erfolgreicher Thymusselektion werden die T-Zellen in die Blutbahn entlassen.

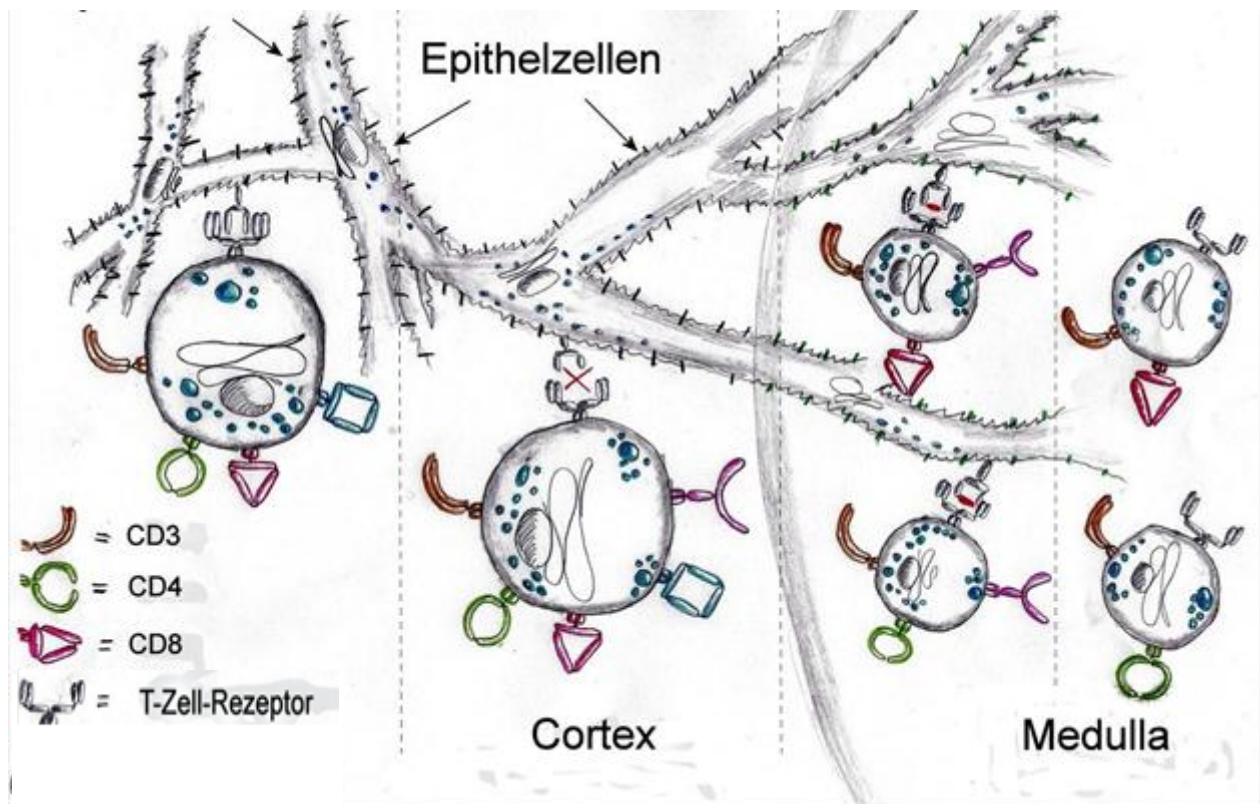


Abbildung 1: T-Zellentwicklung im Thymus

Aus dem Knochenmark wandern T-Zellvorläufer in den Thymus ein. Nach Generierung des TZR werden die T-Zellen positiv und negativ auf dem Thymusepithel selektiert, bevor sie ihre Funktion als Abwehrzellen übernehmen können^[13, 15].

Im Gegensatz zu T-Lymphozyten findet die Reifung der B-Zellen im Knochenmark statt. Auch sie generieren Rezeptoren mittels der erwähnten V(D)J-Rekombination die, zur Erhaltung der Selbsttoleranz, ebenfalls einer negativen Selektion unterzogen werden. B-Zellen deren Antigenrezeptoren eigene Proteinstrukturen mit zu hoher Affinität erkennen, können durch sekundäre Veränderungen der B-Zellrezeptorsequenzen ihre Affinitäten ändern und somit der Apoptose entfliehen. Dieser Vorgang wird auch „receptor editing“ genannt^[16]. Im Fall von T-Zell-abhängigen Antikörperantworten sind darüber hinaus Interaktionen mit entsprechenden T-Zellen von Nöten um eine

Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen zu erhalten (engl.: „linked recognition“) ^[17]. Potentiell autoreaktive B-Zellen werden somit indirekt durch die Toleranzmechanismen der T-Zellen im Thymus reguliert. Die Selektion der B-Zellen im Knochenmark sowie der T-Zellen im Thymus werden als zentrale Toleranzmechanismen zusammengefasst. Sie stellen sozusagen präventive Maßnahmen gegen die Entstehung autoreaktiver Immunzellen dar.

Einige potentiell autoreaktive Zellen können sich jedoch diesen zentralen Selektionsmechanismen entziehen und so in die Peripherie gelangen ^[18, 19]. Daher entwickelten sich weitere periphere Toleranzmechanismen, um die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren. Hierzu zählen das Phänomen der Ignoranz ^[20], der Anergie ^[21] und Hemmung durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) ^[22]. Letztere stellen eine spezielle Untereinheit der T-Zellen dar, die in der Lage sind, Überreaktionen des Immunsystems durch Sezernierung entzündungshemmender Moleküle wie IL-10 und TGF- β zu unterdrücken ^[23]. Hierzu ist ein direkter Zellkontakt notwendig ^[24, 25]. Es existieren Thymus-abstammige T_{reg} Zellen (tT_{reg}), deren Entwicklung im Thymus verankert ist ^[26, 27], sowie Peripherie-abstammige regulatorische T-Zellen (pT_{reg}) ^[27, 28], deren hemmende Funktion erst außerhalb des Thymus induziert wird. Die Ignoranz ist kein aktiver Prozess, sondern eher ein Nichtbeachten einer Antigenpräsentation durch naive (nicht aktivierte) T-Zellen, da zum einen keine zusätzlichen Gefahrensignale und kostimulatorische Signale präsentiert werden und zum andern die Menge an präsentierten Antigen zu niedrig ist ^[20]. Die Aktivierung von T-Zellen ist neben der Bindung von TZR an MHC-Peptid-Komplex auch von der Anwesenheit kostimulatorischer Molekülen auf APCs, vor allem dendritischen Zellen, abhängig. Empfängt die T-Zelle bei Erkennung eines Antigens keine kostimulatorischen Signale, wird ein anergischer Zustand und somit die Abschaltung einer Immunreaktion induziert. Dies wird zumeist durch dendritische Zellen vermittelt, die unter entzündungsarmen Bedingungen oder bei Präsentation körpereigener Peptide keine erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle aufweisen ^[29, 30].

Die Aktivierung naiver T-Zellen findet durch Interaktionen mit APCs statt. Körperfremde Erreger können von APCs erkannt, phagozytiert, prozessiert und in Form kleiner Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert werden ^[8]. Diese MHC-Peptid-Komplexe werden

mittels TZR erkannt, und es kommt, zusammen mit kostimulatorischen Stimuli und Entzündungssignalen, zur Aktivierung der T-Zellen. Die Aktivierung der CD4-positiven Helfer-T-Zellen (T_{Helfer}) wird über MHC-Klasse II und die der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (CTL) über MHC-Klasse I eingeleitet ^[8]. T_{Helfer} übernehmen die Koordination vieler immunologischer Vorgänge. Unter anderem sind sie ein wichtiger Bestandteil der humoralen Immunabwehr. Aktivierte T_{Helfer} können durch Interaktion mit MHC-Klasse II-Peptid-Komplexe auf naiven B-Zellen, diese aktivieren. Naive B-Zellen produzieren zunächst Immunglobulin M (IgM) (Primärantwort), bevor es durch diese T_{Helfer} -B-Zellinteraktion zum Antikörperklassenwechsel (Sekundärantwort), zur Differenzierung in IgG-, IgE- oder IgA-produzierenden (Immunglobulin G / E / A) Plasmazellen und zumeist Migration ins Knochenmark kommt ^[31]. Sezernierte Immunglobuline (Antikörper) sind Serumbestandteile des erworbenen Immunsystems und können durch ihre Bindung an körperfremde Strukturen, Zellen des angeborenen Immunsystems (natürliche Killerzellen, Mastzellen und Granulozyten) aktivieren. Diese Immunzellen können Antikörper durch sogenannte F_c -Rezeptoren erkennen und funktionell aktiv werden. CTL können nach spezifischer Aktivierung durch APCs infizierte oder entartete Zellen in den Zelltod treiben. Erkennt der TZR den MHC-Klasse I-Peptid-Komplex auf einer Körperzelle, kommt es in den aktivierten CTL zur Ausschüttung zytotoxischer Moleküle wie Granzym-B und Perforin und somit zur Lyse infizierter oder entarteter Zellen ^[32]. Die Induktion von T-Zellzytotoxizitäten gehört zu den sogenannten zelluläre Immunantworten. Jede einmal durchlebte T-Zell-abhängige Immunabwehr wird in Form eines immunologischen Gedächtnisses gespeichert. Erst durch die Entwicklung von Gedächtnis-T- und B-Zellen ist es möglich Immunitäten gegen bereits bezwungene Erreger zu generieren.

Das erworbene Immunsystem ist nicht nur gegen körperfremde Organismen aktiv, sondern ist auch imstande, entartete Körperzellen, welche durch genetische Mutationen neue oder veränderte Antigene präsentieren, zu bekämpfen. Krebszellen sind genetisch instabil und besitzen hohe Mutations- und Proliferationsraten. Durch die ständigen genetischen und phänotypischen Veränderungen kommt es zu einer Selektion und Vermehrung der am besten adaptierten Krebszellen, die sich durch verschiedenste

„Escape“-Mechanismen der Attacke des Immunsystems entziehen können. Hierzu zählen:

- Veränderte Expressionen von MHC-Klassen Molekülen ^[33, 34]
- Induktion von T-Zellanergie durch fehlende kostimulatorische Signale ^[35]
- Expression von T-Zellinhibierenden Rezeptoren wie PD-L1/2 ^[36] und FAS ^[37]
- Herunterregulierung von Tumorantigenen ^{[38][39]}
- Expression von entzündungshemmenden Zytokinen wie TGF- β ^[40, 41] und IL-10 ^[42]
- Mobilisierung, Aktivierung und Induktion regulatorischer T-Zellen ^[43, 44]
- Umprogrammieren von tumorinfiltrierenden Immunzellen, die zur Tumorprogression beitragen (z.B. Tumor-assoziierte Makrophagen ^[45, 46])
- Tumorwachstum in physikalisch-abgeschirmter Umgebung ^[47] (Wachstum in Knötchen oder Kapseln)

Die onkologische Forschung versucht seit langer Zeit Immuntherapien zu entwickeln, die imstande sind, in Gegenwart dieser Escape-Mechanismen Tumor-spezifische Immunantworten zu generieren. Hierzu zählen Antikörpertherapien gegen bestimmte Tumorantigene und Induktion von antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (engl.: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, kurz: ADCC) ^[48-50], Immunisierungen mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen ^[51-53], Zytokintherapien ^[54, 55] und der adoptive T-Zelltransfer ^[56, 57]. Eine noch relativ neue Art der Immuntherapie stellen bispezifische Antikörper dar. Diese Art von Antikörper besitzen zwei separate und voneinander unabhängige Antigenbindungsstellen. Mit der einen kommt es zur Bindung an ein spezifisches Tumorantigen, während die andere mit dem humanen CD3 auf T-Zellen interagiert. Diese duale Bindung an Tumor- und T-Zelle löst die Lyse der Tumorzellen aus ^[58, 59]. Die genauen zellulären Abläufe sind noch Gegenstand heutiger Forschung. Bekannt ist jedoch, dass diese induzierte Zytotoxizität unabhängig von Antigenpräsentationen sowie kostimulatorischen Signalen ist ^[60]. CD3 besteht aus einer gamma-, delta- und epsilon-Kette und bildet zusammen mit dem TZR den TZR-CD3-Komplex. Gegen CD3 gerichtete Antikörper können konzentrationsabhängig bzw. dichteabhängig zu einer Kreuzvernetzung des TZR und somit zur polyklonalen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führen ^[61]. Der Grund hierfür liegt im Aufbau

natürlicher IgG-Antikörper. Sie besitzen zwei Fab-Fragmente (antigenbindendes Fragment) und können somit zweimal das gleiche Antigen binden (bivalent), was im Fall CD3-spezifischer Antikörper zur Kreuzvernetzung und T-Zellaktivierung führt. Aus diesem Grund und zur Vermeidung einer unkontrollierbaren T-Zellaktivierung im Menschen, besitzen therapeutische bispezifische Antikörper nur eine Bindungsstelle für CD3. Eine T-Zellaktivierung soll somit erst durch die Vernetzung von Tumorantigen und CD3 induziert werden. Durch die duale Bindung an Tumorantigen und T-Zelle wird im Fall CD8-positiver T-Zellen die Entstehung einer zytolytischen Synapse beschrieben^[62]. Nach diesem Zell-Zell-Kontakt kommt es zur Lyse der Tumorzellen durch die Freisetzung zytolytischer Moleküle wie Granzym-B und Perforin^[62]. Die sogenannte BiTE-Technologie (engl.: Bispecific T-cell Engager) beruht auf zwei miteinander gekoppelten scFv-Fragmenten (engl.: single chain variable Fragment)^[63]. Die Wirksamkeit eines CD19-CD3-BiTE wurden bereits in klinischen Phasen bei Non-Hodgkin's Lymphompatienten nachgewiesen^[64, 65]. CD19 ist ein B-Lymphozytenantigen und ist charakteristisch für B-Zell-Lymphome. Weitere BiTE-Antikörper gegen verschiedene Tumorantigene wie EpCAM^[66], Her2/neu^[67], EGFR^[68] und MCSP^[69] sind Gegenstand präklinischer Entwicklungen. Die Serumhalbwertszeit solcher BiTE-Konstrukte liegt bei nur wenigen Stunden^[63], was eine kontrollierte Gabe des Medikaments ermöglicht. Andererseits ist es schwierig, einen effizienten Antikörpertiter über die Zeit hinweg aufrecht zu erhalten^[63]. Essentiell für jede Antikörper-basierte Krebstherapie ist die Bindung an das spezifische Antigen auf Tumorzellen. Die Antikörperpenetrationen in den Tumor spielen vor allem bei soliden Tumoren wie das humane maligne Melanom eine große Rolle, da sie, im Gegensatz zu hämatopoetischen Tumoren, eine abgegrenzte Tumormasse bilden. Der so entstehende Tumordruck kann die Antikörperpenetration und -Verteilung stark limitieren^[70]. Zudem kann die Wirkung von Antikörpern durch die sogenannte Bindungsbarriere (engl.: „binding site barrier“) beeinträchtigt werden^[71]. Hierbei wird vermutet, dass Antikörper mit hohen Antigenaffinitäten immer an ihr erstes Antigen binden, mit dem sie konfrontiert werden; je höher die Affinität zum Antigen und je höher die Antigendichte, desto größer die Barriere^[71].

Das maligne Melanom (auch „schwarzer Hautkrebs“) ist ein bösartiger Tumor der Melanozyten^[72]. Kaum eine andere Krebsart verzeichnet einen höheren Anstieg an

Neuerkrankungen pro Jahr. In Deutschland erkrankten im Jahr 2008 ca. 20.000 Menschen an diesem Hautkrebs^[73]. Er bildet schon in sehr frühen Entstehungsphasen hochaggressive Metastasen aus, die sich in Lymphknoten (Stadium III), Leber, Lunge und Gehirn (Stadium IV) ansiedeln können. Dank der Melanomforschung konnten in den letzten Jahrzehnten mehrere Melanom-assoziierte Tumorantigene nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderen die Tyrosinase^[74], gp100^[75], MelanA/MART-1^[76, 77] und MCSP^[78]. Tumorantigene können anhand ihres Expressionsmusters in Differenzierungs-, Tumor-Hoden- und Mutationsantigene eingeteilt werden^[79]. Differenzierungsantigene wie Tyrosinase, MelanA/MART-1, gp100 und MCSP sind spezifisch für das Gewebe aus dem Tumore entstehen. Sie sind nicht tumorspezifisch und können bei Metastasierung verloren gehen. Tumor-Hodenantigene wie z.B. MAGE finden sich neben Spermatozyten und Plazenta in erhöhtem Maße in Krebszellen^[80]. Mutationsantigene sind ebenfalls tumorspezifisch, bilden sich zumeist durch Punktmutationen in bestimmten Genen, können jedoch sehr individuell (patientenspezifisch) auftreten^[79]. Die Nachteile von Tumor-Hoden- sowie Mutationsantigene für Antikörper-basierte Therapien liegen darin, dass diese Antigene intrazellulär vorliegen und somit nicht frei zugänglich sind. Auch bekannte Differenzierungsantigene wie die erwähnte Tyrosinase und MelanA/MART-1 liegen im Inneren der Zellen. Ein weiteres Melanom-assoziiertes Tumorantigen stellt MCSP (engl.: Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4) dar. Es ist ein auf dem Großteil der malignen Melanome stark exprimiertes Tumorantigen, das im Gegensatz zu den bereits erwähnten Tumorantigenen transmembran und somit zugänglich für Antikörper vorliegt. MCSP ist ein ca. 250 kD großes transmembranes Proteoglycan dessen Signaltransduktion Wachstum, Motilität und Gewebeinvasion von Melanomzellen durch Erhöhung der Integrinfunktionen^[81], Aktivierung der „Focal Adhesion Kinase (FAK)^[82] und Metalloproteinase II stimuliert^[83]. Monoklonale Antikörper gegen humanes MCSP können die MCSP-Signaltransduktion *in vitro* teilweise inhibieren^[82], was durch die Inhibition der FAK gezeigt werden konnte. MCSP scheint von hoher Wichtigkeit für die Tumorigenität humaner Melanome zu sein und stellt aus den aufgeführten Gründen ein attraktives Zielantigen für die Entwicklung neuer Antikörper-basierenden Immuntherapien dar. Im Bereich der Immuntoxine konnte bereits gezeigt werden, dass die *in vitro* und *in vivo* Behandlung von MCSP-positiven

Melanomzellen mit TRAIL-konjugierten MCSP-Antikörper (engl.: Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) zur Apoptose der Tumorzellen führt ^[84].

In der präklinischen Entwicklung solcher immuntherapeutischen Ansätze muss die Wirksamkeit in *in vivo*-Studien nachgewiesen werden. Hierfür bedarf es Tiermodelle, die das komplexe Zusammenspiel von Tumor und Immunsystem abbilden können. Im Fall bispezifischer Antikörper muss das verwendete Mausmodell somit die Expression des humanen Tumorantigens sowie human CD3 sicherstellen. Die *in vivo*-Experimente bispezifischer Antikörper beruhen zumeist auf Transfermodellen in immundefizienten Mäusen (immunsupprimiert) oder syngenen Modellen in immunkompetenten Tieren ^[85]. Beide Ansätze besitzen Vor- und Nachteile. Der Transfer humaner PBMC (engl.: Peripheral Blood Derived Mononucleated Cells; kurz: PBMC) oder aufgereinigter T-Zellen in immundefiziente Mäuse erlaubt Wirksamkeitsuntersuchungen in Anwesenheit humaner Immunzellen. In solchen Modellen können humane Tumorzellen, welche das Tumorantigen exprimieren, verwendet werden. Ein weiterer großer Vorteil hierbei besteht darin, dass keine zusätzlichen Modifikationen der zu untersuchenden bispezifischen Antikörper nötig sind, da das System die Expression des humanen Tumorantigens sowie human CD3 widerspiegelt. In solchen Modellen kommt es jedoch zu teilweise starken Graft-versus-Host-Reaktionen (engl.: Graft-versus-host disease; kurz: GvHD) ^[86, 87], in denen die übertragenen Immunzellen des Menschen das Mausgewebe angreifen und somit die Durchführung dieser Experimente zeitlich begrenzen. Im Fall syngener Modelle in immunkompetenten Mäusen (besitzen vollständiges Immunsystem) kommt es zwar zu keiner GvHD, jedoch existieren in diesem Zusammenhang gleich mehrere Nachteile. In diesem System ist die verwendete Tumorzelllinie sowie die Immunzellen murinen Ursprungs, da das Einbringen humaner Tumorzellen in immunkompetenten Mäusen zu starken Abstoßungsreaktionen führt (Xenoreaktionen). Der größte Nachteil besteht jedoch darin, dass der zu untersuchende bispezifische Antikörper modifiziert bzw. durch einen sogenannten Surrogate-Antikörper ersetzt werden muss. D.h. der bispezifische Antikörper muss statt auf humanen auf murinen Antigenen binden (Tumorantigen, CD3). Darüber hinaus existieren zum Teil deutliche immunologische Unterschiede zwischen humanen und murinen Immunkomponenten die zu nicht-übertragbaren Ergebnissen führen können ^[88].

- Leukozytenverteilungen (30-50% humane Lymphozyten im Blut, 75-90% murine Lymphozyten im Blut) ^[89]
- Unterschiedliche Verteilungen und Expressionen von Toll-like Rezeptoren (z.B.: Toll-like Rezeptor 9) ^[90]
- Speziesspezifische F_c-Rezeptoren (F_cγRIIA und F_cγRIIC kommen ausschließlich im humane System vor) ^[91]
- Generierung unterschiedlicher Ig-Isotypen (Human: IgG4; Maus: IgG2a und IgG2b) ^[92]
- MHC-Klasse II wird nur auf aktivierten humanen T-Zellen exprimiert ^[93, 94]
- CD28-Expression (Kostimulation) auf allen murinen und nur auf 50-80% aller humanen T-Zellen ^[95]
- Unterschiedliche Chemokinexpressionen und Wirkungsweisen (z.B.: IL-8 existiert nur im humanen System) ^[96, 97]
- Unterschiede in Aminosäuresequenzen bestimmter Zielantigene mit zum Teil hoher Bedeutung in der Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze (z.B. TGN1412 ^[98])

Wie bereits erwähnt, hat die Entwicklung immundefizienter Mäuse, die durch Übertragung humaner Immunzellen oder Gewebe humanisiert werden können, dazu beigetragen humane immunologische Prozesse *in vivo* zu untersuchen. Zu dieser Entwicklung beigetragen haben Entdeckungen verschiedener spontaner Mutationen wie „Nude“ ^[99, 100] (Mutation im Foxn1 Gen) und „scid“ ^[101] (engl.: *severe combined immunodeficiency*). „Nude“ Mäuse besitzen keine funktionellen T-Zellen, wohingegen die „scid“ Mutanten aufgrund einer Mutation in Chromosom 16, was zu einer Inaktivierung einer Enzyms involviert in der DNA Reparatur führt, weder T- noch B-Zellen aufweisen. Ein großer Durchbruch in der Entwicklung immundefizienter Mäuse wurde durch die Kreuzung von CB17/*scid* und NOD (engl.: Non-Obese Diabetic) Mäusen erzielt ^[102]. Diese NOD/*scid* Mäuse verfügen zusätzlich über eine geringe Aktivität der angeborenen Immunität (reduzierte Phagozytoseaktivität und reduzierte NK-Zellfunktionen ^[102]). Neben den Entdeckungen genetischer Mutationen, die sich positiv auf die Akzeptanz humaner Zellen und Gewebe auswirken, wurden auch zielgerichtete Gen-Deletionen (Gen Knockout) für Faktoren mit essentieller Bedeutung in der T- und B-Zellentwicklung (z.B.: Rekombinase 1 und 2, Rag1 ^[103] und Rag2 ^[104])

etabliert. Rag1 und Rag2 sind an der Generierung von T- und B-Zellrezeptoren beteiligt. Deren Deletion führt zur Abwesenheit reifer T- und B-Zellen, da keine T- und B-Zellrezeptoren generiert und somit keine Differenzierung induziert werden kann. Die zielgerichtete Mutation in der γ -Kette der Interleukin-2 Rezeptorfamilie (IL-2R γ) stellt einen weiteren revolutionären Durchbruch im Feld immundefizienter Mäuse dar^[105, 106]. IL-2R γ ist eine essentielle Komponente der hochaffinen Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 und ist notwendig für die interleukinspezifischen Signaltransduktionen^[107-109]. Die Abwesenheit dieser Komponente führt zu einer Störung der T- und B-Zellreifung und inhibiert die NK-Zellentwicklung vollständig^[110, 111]. Durch Kreuzungen der Mausmutanten konnten verschiedene immundefiziente Mausstämmen generiert werden (Abbildung 2). Vor allem zwei dieser Stämme werden bei Transplantationen humaner Zellen oder Gewebe eingesetzt. Die Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}^[112] sowie die NOD/scidγ_c^{-/-} (NSG)^[106] Maus. Beide Mausstämmen besitzen einen ausgeprägten immundefizienten Phänotyp und eignen sich hervorragend für den Einsatz in der immunologischen und onkologischen Forschung. Es existieren noch weitere Abwandlungen dieser Mausstämmen, die zusätzliche Einführungen bestimmter humaner Gene (engl.: Knock-in) aufweisen (z.B. HLA-A2.1^[113], HLA-DR^[114], human SCF^[115], TPO^[116], M-CSF^[117]).

Unter Verwendung der hier beschriebenen immundefizienten Mausstämmen hat sich des Weiteren das Modell der voll-humanisierten Maus etabliert. Unter Einsatz humaner hämatopoetischer Stammzellen kann ein humanes Immunsystem in immundefizienten Mäusen generiert werden. Humane hämatopoetische Stammzellen (engl.: Hematopoetic Stem Cell; kurz: HSC) sind pluripotente Vorläuferzellen aus denen alle Blutzellen hervorgehen. Diese Progenitorzellen sind hauptsächlich im Knochenmark, der fötalen Leber^[118] und im Nabelschnurblut^[119] nachweisbar und können durch die Expression von CD34 und CD133, zwei HSC-assoziierten Antigenen, detektiert werden. Die Zellen können durch magnetische Zellseparation mittels anti-CD34 Antikörper angereichert werden^[120]. Die Injektion isolierter HSC in Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} oder NSG Mäuse führt zur Ausbildung eines stabilen humanen Immunsystems^[121, 122].

3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Wirkmechanismen eines neuen bispezifischen Antikörpers gegen humanes MCSP und CD3 untersucht werden. Neben den *in vitro* Evaluierungen wurde das antitumorale Potential in tumortragenden voll-humanisierten Mäusen getestet. Die humane T-Zellentwicklung im Mausthymus humanisierter Mäuse sowie die funktionelle Charakterisierung der humanen T-Zellen wurden in diesem Zusammenhang ebenfalls durchgeführt.

4 Material und Methode

4.1 Material

4.1.1 Tiere und Tierzubehör

C57BL/6 (Haplotyp: H2 ^b)	Charles River, Sulzfeld
Einstreu	Ssniff GmbH, Soest
Isofluran CP [®]	CP-Pharma, Burgdorf
Käfigdeckel	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Käfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Pelletierte Standarddiät Futter	ProvimiKliba AG, Kaiseraugust
Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} (Balb/c, Haplotyp: H2 ^d)	Charles River, Sulzfeld
Trinkflaschen	Tecniplast, Hohenpeißenberg

4.1.2 Laborgeräte

Autotechnikon	Sakura, Torrance, USA
Bestrahlungsanlage (GSR CI)	GSM GmbH, Leipzig
BioPlex [™] Suspension Array System	BIO-RAD, München
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Digitalkamera	PowerShot G2, CANON, Krefeld
Eindeckautomat (CV5030)	Leica Instruments GmbH, Nussloch
ELISA-Fotometer	Infinite M200, TECAN, Crailsheim
ELISA-Waschvorrichtung	EL406, BioTek [®] Instruments GmbH, Bad Friedrichshall

EasySep [®] -Magnet	STEMCELL Technologies [™] , Köln
Feuchtkammer	DAKO GmbH, Hamburg
Fluoreszenz-Scanner	Panacomic250, 3D Histotech Ltd., Budapest, Ungarn
Fotoentwickler	Curix60 AGFA HealthCare, Morsel, Belgien
GentleMACS [™] Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Gourmet-Dampfkocher FS20	Braun GmbH, Kronberg
Hämazytometer	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
iBlot [®] Westernblot System	Life Technologies [™] , Darmstadt
Isofluran-Verdampfer	Eickenmeyer Medizintechnik KG, Tuttlingen
Kamerasysteme für Mikroskop	DEC360FX, Leica Instruments GmbH, Nussloch
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
MACSQuant [®] Analyzer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MAESTRO [®] Imager	INTAS, Göttingen
Mikroskope	DM5000B, Leica Instruments GmbH, Nussloch Axiovert135, Carl ZEISS AG, Oberkochen
Magnetischer Zellseparator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Paraffin-Ausbettstation	Vogel GmbH, Gießen
Rasierer	Harotec GmbH, Berlin
Rotationsmikrotom	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Schieblehre	Mitutoyo Messgeräte GmbH, Neuss
Sektionsbesteck	B. Braun AG, Melsungen

Sterile Werkbank	BDK, Sonnenbühl
Westernblot Gelkammer / Netzteil	Life Technologies™, Darmstadt
Zellzählgerät (Vicell®)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugen	Megafuge 1.0R, Thermo Scientific, Schwerte Centrifuge 5415C, Eppendorf, Wesseling

4.1.3 Medien, Puffer und Zusätze

Histologie

10 x PBS	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
70 / 80 / 90 / 100 % Alkohol	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
Antikörper Verdünnungslösung	DAKO GmbH, Hamburg
DAB Lösung	DAKO GmbH, Hamburg
Eosin Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Formalin Lösung (4%)	VWR International GmbH, Ismaning
Hematoxylin Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Histogreen Lösung	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Histoplast Paraffin	Thermo Scientific, Schwerte
Kochpuffer (ph6, ph8-EDTA, ph9-EDTA)	DAKO GmbH, Hamburg
Permanent Red Lösung	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Permanentes Eindeckmedium (Eukitt®)	O-Kindler, Freiburg
Permanentes Eindeckmedium mit DAPI	Vector Laboratories, Lörrach
Serumfreier Proteinblock	DAKO GmbH, Hamburg
TBST	DAKO GmbH, Hamburg

Wasserstoffperoxid Lösung (30 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Wäßriges Eindeckmedium	DAKO GmbH, Hamburg
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

Zellkultur

1 x PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
FBS (fötale Rinderserum)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamine	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Lympholyte [®]	CEDARLANE [®] , Hornby, Canada
PenStrep (500 x)	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
RPMI-1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
STemline 2	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Durchflusszytometrie

Dapi / PI Lösungen	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
Erythrozyten Lyse-Puffer	BD Pharmingen, Heidelberg
Fix/Perm [™] Puffer	BD Pharmingen, Heidelberg
FoxP3 Fix/Perm [™] Puffer	BioLegend, Fell
Perm/Wash [™] Puffer	BD Pharmingen, Heidelberg

Westernblot

LDS sample buffer	Life Technologies™, Darmstadt
Lumi-Light Westernblot Substrate	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
NuPAGE® Antioxidant	Life Technologies™, Darmstadt
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer	Life Technologies™, Darmstadt
PMSF	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RIPA-Puffer	Cell Signaling, Beverly, USA

4.1.4 Angesetzte Lösungen**EDTA Lösung**

1 x PBS (Roche)
6 / 10% EDTA (MERCK)

10 x NET-Puffer

1,5 M NaCl (MERCK)
0,05 M EDTA
0,5 M Tris (pH 7,6) (BIO-RAD)
0,5% Triton X 100 (Sigma-Aldrich)
2,5% Gelatine (Sigma-Aldrich)

FACS-Puffer

1 x PBS
0,2% BSA (Roche)
0,09% NaN₃ (Sigma-Aldrich)

MACS-Puffer

1 x PBS
0,5% BSA
2 mM EDTA

4.1.5 Zytokine, Enzyme und T-Zell-Stimulatoren

Zytokine

Rekombinantes humanes IL-2	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
Rekombinantes humanes SCF	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Rekombinantes humanes TNF α	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
Rekombinantes humanes TPO	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze

Enzyme

Collagenase IV	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
DNase I	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg

T-Zell Stimulatoren

Ionomycin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
PMA	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Staphylococcus Enterotoxin A	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze

4.1.6 Primäre CD34-positive Nabelschnurblutzellen

CD34-positive Nabelschnurblutzellen	CellSystems Biotechnologie GmbH, Troisdorf
-------------------------------------	---

4.1.7 Zelllinien

Colo38 (humane Melanomzelllinie)	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
MDA-MB231 (humane Brustkrebszelllinie)	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg

4.1.8 Antikörper

Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Humane Antigene

anti-CD1a	<i>Klon: HI149 / Konjugat: Brilliant-Violet</i>	BioLegend
anti-CD3	<i>Klon: Sk7 / Konjugat: PE-Cy7, APC, FITC</i>	BioLegend
anti-CD4	<i>Klon: RPA-T4 / Konjugat: PerCPCy5.5, APC-Cy7</i>	BioLegend
anti-CD8	<i>Klon: Sk1 / Konjugat: AlexaFluor488, PE-Cy7</i>	BioLegend
anti-CD19	<i>Klon: HIB19 / Konjugat: APC, FITC</i>	BD Biosciences
anti-CD20	<i>Klon: 2H7 / Konjugat: PE, PE-Cy7</i>	BD Biosciences
anti-CD34	<i>Klon: AC136 / Konjugat: FITC</i>	Miltenyi Biotec
anti-CD45	<i>Klon: HI30 / Konjugat: PE, APC, FITC</i>	BioLegend
anti-CD69	<i>Klon: FN50 Konjugat: PE</i>	BioLegend
anti-CD107a	<i>Klon: 1D4B / Konjugat: FITC</i>	BD Biosciences
anti-CD133(1)	<i>Klon: AC133 / Konjugat: PE</i>	Miltenyi Biotec
anti-HLA-DR	<i>Klon: L243 / Konjugat: FITC, APC</i>	BD Biosciences
anti-IFN- γ	<i>Klon: 45.B3 / Konjugat: PerCPCy5.5</i>	BioLegend
anti-IL2	<i>Klon: MQ1-17H12 / Konjugat: PE-Cy7</i>	BioLegend
anti-IL4	<i>Klon: MP4-25D2 / Konjugat: PerCPCy5.5</i>	BioLegend
anti-MCSP	<i>Monoklonal / Konjugat: Cy5</i>	Hoffmann-La Roche
anti-Perforin	<i>Klon: dG9 / Konjugat: PerCPCy5.5</i>	BioLegend
anti-TNF α	<i>Klon: Mab11 / Konjugat: PE-Cy7</i>	BioLegend
anti-TZR- α/β	<i>Klon: IP26 / Konjugat: FITC, PE</i>	BioLegend

Murine Antigene

anti-CD45	<i>Klon: 30-F11 / Konjugat: FITC</i>	BD Biosciences
anti-MHC (I-A/I-E)	<i>Klon: M5/114.15.2 / Konjugat: PE</i>	Miltenyi Biotec

Sekundäre Antikörper / Lektin

anti-Murin-IgG	<i>Polyklonal / Konjugat: AlexaFluor488</i>	Life Technologies™
anti-Hase-IgG	<i>Polyklonal / Konjugat: AlexaFluor647</i>	Life Technologies™
Lektin (<i>Bandeireasimplicifolia agglutinin, BS-1</i>)	<i>/ Konjugat: Alexa750</i>	Hoffmann-La Roche

Antikörper für Zellstimulation

anti-human-CD3	<i>Klon: OKT-3</i>	BioLegend
anti-human-CD28	<i>Klon: CD28.2</i>	BioLegend

Blockierende Antikörper

anti-human-TNF α	<i>Klon: Mab11</i>	BioLegend
anti-HLA-DR	<i>Klon: L243</i>	BioLegend
anti-murin-MHC (I-A/I-E)	<i>Klon: M5/114.15.2</i>	BioLegend

Antikörper für Westernblot

anti-human-MCSP	<i>Polyklonal</i>	Bethyl Laboratories
anti-hase-HRP	<i>Polyklonal</i>	GE-Healthcare
anti-human-Tubulin	<i>Polyklonal</i>	Abcam®

Antikörper für IHC*Humane Antigene*

anti-CD1a	<i>Klon: EP3622</i>	Ventana Medical Systems
anti-CD3	<i>Klon: 2GV6</i>	Ventana Medical Systems
anti-CD4	<i>Klon: 4B12</i>	DAKO
anti-CD8	<i>Polyklonal</i>	Abcam [®]
anti-CD20	<i>Klon: L26</i>	Ventana Medical Systems
anti-CD45	<i>Klon: RP2/18</i>	Ventana Medical Systems
anti-CD68	<i>Klon: PG-M1</i>	DAKO
anti-FoxP3	<i>Klon: 236/E7</i>	Abcam [®]
anti-MelanA/MART-1	<i>Klon: A103</i>	Ventana Medical Systems
anti-MCSP	<i>Polyklonal</i>	Bethyl Laboratories

Murine Antigene

anti-CD34	MEC14.7	Hycult Biotech
-----------	---------	----------------

Sekundäre Antikörper

anti-Murin-IgG ImmPRESS [®]	Vector Laboratories
anti-Hase-IgG ImmPRESS [®]	Vector Laboratories
anti-Ratte-IgG ImmPRESS [®]	Vector Laboratories
Dual-Färbungsreagenz (anti-maus HRP + anti-hase AP)	BIOCARE Medical

Dual-Färbungsreagenz (anti-maus AP+ anti-hase HRP)	BIOCARE Medical
---	-----------------

Therapeutische Antikörper

Bispezifischer Antikörper anti-human-MCSP-CD3	Hoffmann-La Roche GmbH
Bispezifischer Antikörper anti-human-DP47-CD3	Hoffmann-La Roche GmbH
anti-human-MCSP IgG-Antikörper	Hoffmann-La Roche GmbH

4.1.9 Gebrauchswaren

1 ml Einwegspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
1,5/2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
10/100/1000 µl Filterspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
15/50/250 ml Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
5 ml Falcon™ Reaktionsgefäße	BD Biosciences, Heidelberg
5/10/25/50 ml Pipettenspitzen	BD Biosciences, Heidelberg
500 µl Gel-Monovette	Sarstedt AG & CO, Rommelsdorf
6/24/96-Well Zellkulturplatten	VWR International GmbH, Ismaning
C-Tubes™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Fettstift	DAKO, Hamburg
HiMark™ Protein standard	Life Technologies™, Darmstadt
Histologie Kassetten	Macherey-Nagel, Düren
iBlot® Transfer Stack (Nitrocellulose)	Life Technologies™, Darmstadt
Kompensationsbeads (anti-maus/ratte)	BD Biosciences, Heidelberg

LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Micro-Fine™ Insulinspritzen (30G, 29G)	BD Medical, Heidelberg
NuPAGE® Tris-Acetate Gele (3-8 %)	Life Technologies™, Darmstadt
Pasteurpipetten	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Röntgenfilme	CEA GmbH, Hamburg
Skalpelle	B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen
Superfrost plus Objektträger	VWR International GmbH, Ismaning
Sterilfilter (0,2 µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellsiebe (70/100 µm)	BD Biosciences, Heidelberg

4.1.10 Gebrauchsfertige Kits

BioPlexPro™ Assay	BIO-RAD, München
Human CD3 positiv Selektionskit (EasySep®)	STEMCELL Technologies™, Köln
Human CD4 negativ Selektionskit (EasySep®)	STEMCELL Technologies™, Köln
Human CD8 positiv Selektionskit (EasySep®)	STEMCELL Technologies™, Köln
Maus CD90.2 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CellTrace™ Violet	Life Technologies™, Darmstadt
LDH-release Assay	Hoffmann-La Roche GmbH, Penzberg
Proteinbestimmungs kit (BCA)	Thermo Scientific, Schwerte

4.2 Methoden

4.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Tierhaltung

Die Tierhaltung sowie alle tierexperimentellen Eingriffe wurden unter den Richtlinien des Roche Diagnostics Standorts in Penzberg und nach den gültigen Tierversuchsverordnungen des bayrischen Veterinärämtes durchgeführt. Die Tiere wurden artgerecht und Spezifiziert Pathogen Frei (SPF) mit einem 12-stündigen Hell-/Dunkelrhythmus gehalten. Die Käfige sowie Trinkflaschen, Futter und Käfiggitter wurden wöchentlich gewechselt und alle Tiere täglich auf Auffälligkeiten hin überprüft.

Humanisierung neugeborener $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse mit CD34-positiven Nabelschnurblutzellen

Die Verpaarung der 6-8 Wochen alten $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurde von Charles River in Sulzfeld durchgeführt und nach Feststellung der Trächtigkeit (ca. Tag 12-14) direkt an den Roche Diagnostics Standort in Penzberg geliefert. Am Tag der Geburt wurden die neugeborenen Mäuse mit 1,5 Gy bestrahlt und nach 24 Stunden mit 2×10^5 CD34-positiven Nabelschnurblutzellen in 50 μ l 1xPBS intrahepatisch inokuliert. Die CD34-positiven isolierten Zellen wurden von CellSystems bezogen und vor ihrer Injektion über Nacht in Stemline2 Medium, versetzt mit jeweils 10 ng/ml SCF (engl.: Stem Cell Factor) und TPO (Thrombopoietin), kultiviert.

Entnahme von Blut und Gewebe

Der Ort der Blutentnahme richtete sich nach der Menge des benötigten Blutes. Geringe Volumina (bis ca. 50 μ l) wurden ohne Narkose durch Punktion der lateralen Schwanzvene gewonnen. Größere Mengen hingegen (bis zu 10 % des gesamten Blutvolumens) mussten retrobulbär, also „Hinter dem Augapfel“, unter Narkose mit Isofluran, entnommen werden. Das Blut wurde zur Serumgewinnung in ein mit Gel

gefülltes Gefäß (Gel-Monovette) überführt und für 10 min. bei 800 x g zentrifugiert. Die Zentrifugalkraft bewirkt, dass der zelluläre Anteil des Blutes (Blutkuchen) das Gel durchdringt und das Serum mit allen löslichen Bestandteilen oberhalb der Trennschicht abgenommen werden kann. Für die Gewinnung von Lymphozyten wurde das entnommene Blut direkt mit einer 6%igen EDTA-Lösung im Verhältnis 1/50 gemischt. Die Blutgerinnung ist Calcium-abhängig. Die Zugabe des Komplexbildners EDTA verhindert die Blutgerinnung durch die Komplexierung der Calciumionen. Für die Blutanalysen im Durchflusszytometer wurde zusätzlich eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurde der Erythrozyten-Lysepuffer in einem Verhältnis von 1/10 mit deionisiertem Wasser gemischt. Das Blut wurde mit 2 ml des angesetzten Lysepuffers für 5 min. inkubiert und bei 300 x g für 5 min. zentrifugiert. Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Milzen, Thymi, Knochen und Lymphknoten wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in sterilem Medium gelagert. Für histologische Untersuchungen wurden die Organe direkt in eine 4%ige Formalinlösung überführt.

Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Mausgewebe

Die lymphatischen Organe wie Milz, Thymus und Lymphknoten wurden entnommen und in einen EDTA-haltigen MACS-Puffers überführt. Die weichen Gewebe wurden mittels Stößel durch ein 100 µm Zellsieb verrieben. Die Einzelzellsuspensionen wurden für 5 min. bei 300 x g zentrifugiert und durch ein weiteres Zellsieb (70 µm) von Zellaggregaten befreit. In manchen Experimenten wurde das Knochenmark der Mäuse analysiert. Die Femores (Oberschenkelknochen) wurden hierzu entfernt und von Muskultur, Fett und Sehnen befreit. Die Enden des Femurs wurden gekappt und der Knochen mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit MACS-Puffer ausgespült. Das gewonnene Knochenmark wurde bei 300 x g für 5 min. zentrifugiert. Die Pellets der Einzelzellsuspensionen aus Milz und Knochenmark wurden für weitere Analysen von Erythrozyten befreit (siehe Entnahme von Blut).

Tumorzelltransplantation und Therapie

Humanisierte und unbehandelte Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden im Alter von 12 Wochen an der rechten Flanke rasiert. Die Tumorzellen (10 x 10⁶ Zellen) wurden unter Isofluran-Narkose subkutan in einem Volumen von 100 µl in 1xPBS injiziert. Das Tumorwachstum sowie das Körpergewicht der Mäuse wurden wöchentlich mit einem Parallelschieber und einer Laborwaage gemessen. Nach 4 Wochen Tumorprogression erreichten die Melanome in der Regel ein Volumen von 100 mm³. Nach Einteilung in verschiedene Therapiegruppen erhielten die Tiere die Wirkstoffe über intraperitonealer (in den Bauchraum; kurz: i.p.) Applikation in einem Volumen von 200 µl. Die Mäuse wurden während der Therapie täglich auf Auffälligkeiten hin überprüft und Tumolvolumen und Körpergewicht wöchentlich dokumentiert. Formel zur Berechnung von ellipsoiden Tumolvolumina:

$$Tv = \left(\frac{B^2}{2}\right) \times L \quad (Tv = \text{Tumolvolumen}, B = \text{Breite}, L = \text{Länge})$$

Die statistische Auswertung, die Beurteilung ob das Tumolvolumen zweier Behandlungsgruppen im Mittel eine statistische Signifikanz aufwies, wurde anhand des gepaarten t-Tests mit zweiseitiger Verteilung berechnet. Um eine Signifikanz zu ermitteln, musste der P-Wert (Ergebnis des t-Tests) kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit (α) sein. Diese wurde mit 5 bzw. 0,5 % angenommen.

***In vivo*-Bildgebung und Detektion der Tumervaskularisierung**

Für eine erfolgreiche Therapie ist es unerlässlich, dass therapeutische Antikörper ihre Zielantigene *in vivo* erkennen und binden können. Für diese Untersuchung wurde ein anti-human-MCSP IgG-Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt (durchgeführt von der Abteilung für Antikörperproduktion der Roche Diagnostics GmbH). Der Farbstoff liegt im Nahinfrarotbereich und ist daher geeignet für *in vivo* bildgebende Verfahren. Die Photonen im Nahinfrarotspektrum werden minimal durch das Gewebe (Haut, Fell, Blut, und Drüsen) absorbiert. Dies erlaubt ein tiefes Eindringen der langwelligen Strahlen in das Mausgewebe und eine minimale Autofluoreszenz des Gewebes. Der gekoppelte Antikörper (20 µg/Maus) wurde durch eine intravenöse (in die

Vene; kurz: i.v.) Injektion den Mäusen verabreicht und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Messung am narkotisierten Tier durchgeführt. Der fluoreszierende Antikörper wird durch das Anregungsmodul angeregt und emittiert langwelliges Licht, das von einer CCD-Kamera aufgenommen werden kann ^[125]. Das emittierte Licht entspricht der Lokalisation des Antikörpers d.h., bindet der Antikörper sein Antigen am Tumor, so kommt es zu einer Konzentrierung des Fluoreszenzsignals im Tumor. Nach der nicht-invasiven Analyse erhielten die Mäuse zusätzlich 100 µg Alexa750-konjugiertes Lektin (ebenfalls von der Abteilung für Antikörperproduktion der Roche Diagnostics GmbH) durch i.v. Applikation. Lektine sind bekannt dafür, dass sie spezifisch an Kohlenhydratstrukturen binden und somit auch an die extrazellulären Zuckerstrukturen von Endothelzellen ^[126]. Nach der i.v. Inokulation und einer Verweilzeit von 5-10 min. wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Tumore zur weiteren Verarbeitung in eine 4%ige Formalinlösung gegeben. Durch Einhalten der Inkubationszeit erreicht man eine komplette Sättigung der Endothelzellen mit Fluoreszenz-konjugiertem Lektin. Diese Endothelzellen, welche die Blutgefäße auskleiden, konnten in nächsten Schritten mit einem Fluoreszenzscanner nachgewiesen werden.

4.2.2 Zellkulturtechniken

Um Kontaminationen vorzubeugen, wurden alle Zellkulturarbeiten an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Medien sowie Puffer, Lösungen und Zusätze wurden entweder steril bezogen oder vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 µm). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Das Standardmedium für Lymphozytenkulturen bestand aus RPMI-1640 versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (fötales Kälberserum), 2 mM L-Glutamine, 50 µM Mercaptoethanol und 100 U/ml PenStrep. Die Zellzahlbestimmung für primäre Zellen sowie humane PBMC oder murine Milzzellen wurden mit einem Hämazytometer bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde hierzu mit einer Trypanblaulösung gemischt. Dieser Vitalfarbstoff färbt tote Zellen, während lebende Zellen nicht angefärbt werden. Durch Auszählung von zwei Großquadraten wurde die Zellzahl ermittelt:

$$\bar{n} \times VD_f \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

$VD_f = \text{Verdünnungsfaktor}$ $\bar{n} = \text{Mittelwert der Zellzahl aller Quadrate}$

Für die Zellzahlbestimmungen der humanen Tumorzellen wurde ein automatisiertes Zellzählgerät verwendet, welches exakt nach dem gleichen Prinzip arbeitet, jedoch bis zu 100 Quadrate auszählt.

Gewinnung humaner PBMC aus Vollblut

Das Ausgangsmaterial für die Gewinnung humaner PBMC war heparinisiertes Vollblut (ca. 150-200 ml) von freiwilligen gesunden Spendern aus der Roche Ambulanz in Penzberg, das 1:1 mit 1xPBS gemischt wurde. Das Gemisch wurde auf 15 ml Gradientenmedium (Lympholyte[®]) geschichtet und bei Raumtemperatur bei 800 x g für 20 min. ohne Bremse zentrifugiert. Durch die konstante Zentrifugalkraft und einer mittleren Dichte des Gradientenmediums von $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$ (bei 22 °C) kommt es zu einer Trennung der PBMC und den plasmatischen Bestandteilen sowie der Erythrozyten und Granulozyten. An der Grenzschicht zwischen Gradientenmedium und Plasma, der sogenannten „Interphase“, befanden sich die PBMC, die mit einer Pipette abgenommen wurden. Durch 3maliges Waschen in PBS/EDTA wurden Reste des Gradientenmediums sowie Thrombozyten entfernt.

Isolierung humaner T-Zellpopulationen aus humanen PBMC

Die Isolierung von CD4-positiven T-Zellen (negative Isolierung) sowie CD8-positiven T-Zellen (positive Isolierung) erfolgte mittels magnetbasierter Zellseparationen. Zur Isolierung der CD4-positiven T-Zellen wurden humane PBMC auf 50×10^6 Zellen/ml in MACS-Puffer eingestellt und für 10 min. mit einem definierten Antikörpercocktail bei RT inkubiert. Bei den Antikörpern handelte es sich um bispezifische Antikörper, die einerseits eine Dextranbindungsstelle besitzen und andererseits gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b, CD123, TZR- γ/δ oder Glycophorin A gerichtet sind. Nach Zugabe von dextranbeschichteten magnetischen Partikeln und einer weiteren Inkubation von 10 min. bei RT konnten die ungewollten Zellen mit einem

Magneten depletiert werden. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße für 5 min. dem starken Magnetfeld eines EasySep[®]-Magneten ausgesetzt. Während dieser Inkubation wurden die ungewollten Zellen an die Gefäßwand gezogen, und die CD4-positiven T-Zellen konnten durch Auskippen des Reaktionsgefäßes gewonnen werden. Die Isolierung der CD8-positiven T-Zellen verlief nach dem gleichen Prinzip. Der einzige Unterschied bestand darin, dass der Antikörpermix nur aus einem bispezifischen Antikörper gegen CD8 bestand. Somit wurden die Zellen positiv selektiert und im Magnetfeld an die Gefäßwand gezogen. Die ungewollten Zellen konnten durch Auskippen des Gefäßes entfernt werden. Nach den Anreicherungen wurden die Zellen auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt und zur Überprüfung der Reinheit im Durchflusszytometer analysiert.

Messung von Zytotoxizitäten humaner T-Zellen

Die Bestimmung zytotoxischer Effekte erfolgte mittels des Lactatdehydrogenase (LDH)-Assays. Dieses stabile zytoplasmatische Enzym ist Teil der Milchsäuregärung und kommt praktisch in allen Zellen vor. T-Zellen besitzen die Fähigkeit, andere Zellen in den Zelltod zu treiben. Kommt es zu einer T-Zell-vermittelten Beschädigung der Zellmembran, kann das Enzym das Zytoplasma verlassen und im Kulturüberstand durch einen enzymatischen Farbumschlag nachgewiesen werden. Einen Tag vor Beginn des Experiments wurden 5×10^4 Colo-38 Zellen/well (Zielzellen) in 96-well-Platten ausgesät. Humane PBMC, aufgereinigte CD4-positive oder CD8-positive T-Zellen oder Milzzellen von humanisierten Mäusen dienten als „Effektor“-Zellpopulationen. Die Effektoren wurden in angegebenen Verhältnissen zu den Melanomzellen gegeben. Die therapeutischen Wirkstoffe sowie die Kontrollkonstrukte wurden in absteigenden Konzentrationen ebenfalls hinzu pipettiert. In manchen Ansätzen wurde ein anti-human-TNF- α Antikörper mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Kulturüberstände abgenommen und in eine neue 96-well-Platte überführt. Durch Zugabe einer Reaktionsmischung und einer erneuten Inkubation von 30 min. konnte der Farbschlag am ELISA-Fotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden. In allen Experimenten wurden Kontrollen zur maximalen und spontanen LDH-Freilassung inkludiert. Die maximale Freisetzung

von LDH wurde durch Zugabe von Triton erzielt. Der Prozentsatz an toten Zellen errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \left(\frac{\text{gemessenes LDH} - \text{spontanes LDH}}{\text{maximales LDH} - \text{spontanes LDH}} \right) \times 100$$

Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand

Nach Aktivierung von T-Zellen kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen, welche wichtige Aufgaben in Entzündungsreaktionen übernehmen und ein Maß für die Art und Intensivität der Aktivierung darstellen. Die Zytokine können nach T-Zellaktivierung in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Der Aufbau der Experimente zur Zytokinbestimmung war identisch mit den Untersuchungen der Zytotoxizität. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Messung der Zytokine mit einem Bio-Plex-Pro-Assay-kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Diese Technologie beruht auf Fluoreszenz-markierte Beads, die unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten aufweisen und spezifische Antikörper gegen ein bestimmtes Zytokin auf der Oberfläche tragen. Dieser Aufbau erlaubt eine Bestimmung mehrerer Zytokine in nur einem Zellkulturüberstand, da jedes Bead nur einem Zytokin zuzuordnen ist. Die Überstände wurden mit den Beads inkubiert und später mit einem sekundären Antikörper, gekoppelt mit einer zweiten Fluoreszenz, detektiert. Die Messung und Auswertung des Experiments erfolgte mittels des BioPlex™ Suspension-Array-Systems.

Kultivierung der humanen Melanomzelllinie

Die humane Melanomzelllinie Colo-38 wurde in Standardmedium RPMI-1640 (+10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamine) kultiviert. Für den Einsatz im Tierversuch wurden die Zellen in einem exponentiell wachsenden Stadium mit Trypsin/EDTA geerntet, gewaschen, mittels 100 µm Zellsiebe von Zellaggregaten befreit und auf 1×10^8 Zellen/ml in 1xPBS eingestellt.

4.2.3 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem MACSQuant[®] Durchflusszytometer durchgeführt. Das verwendete Gerät war mit einem violetten (405 nm), einem blauen (488 nm) und einem roten (635 nm) Laser ausgestattet. Bei der Durchflusszytometrie können einzelne Antigene auf Zellen mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper nachgewiesen und quantifiziert werden. Das Analysegerät fokussiert die zu untersuchende Einzelzellsuspension in einem sogenannten Hüllstrom. Auf diese Art und Weise passieren die Zellen einzeln und nacheinander die Messküvette. In der Messküvette werden die Zellen von den Lasern angeregt und können anhand des sogenannten Vorwärtsstreulichts (engl.: Forward Scatter; kurz: FSC), welches proportional zum Volumen einer Zelle ist und des Seitwärtsstreulicht (engl.: Side Scatter; kurz: SSC), das ein Maß für die Brechung des Lichtes darstellt und Auskunft über Granularitäten gibt, unterschieden werden. Nach Markierung mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper kann dann auch die Einteilung nach bestimmten Merkmalen erfolgen. Alle Färbungen und Analysen wurden in FACS-Puffer durchgeführt.

Nachweis extrazellulärer Antigene

Die Färbungen für Oberflächenmoleküle wurden mit 10^5 Zellen in 100 μ l FACS-Puffer bei 4°C für 20 min. durchgeführt. Bei Mehrfachfärbungen wurden alle direkt-markierten Antikörper zusammen mit den Zellen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen auf 1 ml mit FACS-Puffer aufgefüllt für 5 min. bei 300 x g zentrifugiert und nach wiederholtem Waschen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert.

Durchflusszytometrische Analyse von T-Zellproliferationen

CellTrace[™] Violet ist ein Vitalfarbstoff. Der Farbstoff diffundiert ins Zytoplasma von Zellen, wo er von intrazellulären Esterasen gespalten wird. Dies führt zur Entstehung einer fluoreszierenden Komponente, welche kovalent an intrazelluläre Amine bindet. Das Resultat ist ein stabiles Fluoreszenzsignal, dessen Intensität sich mit jeder

Zellteilung halbiert. Dieses Charakteristikum erlaubt die Untersuchung von Proliferationsraten. Humane PBMC oder Milzzellen humanisierter Mäuse wurden auf 1×10^6 Zellen/ml in 1xPBS eingestellt und für 20 min. bei 37°C mit dem CellTrace™ Violet Farbstoff (10µM) inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Zugabe FCS-haltigem RPMI-1640 Medium gestoppt und nach 2 Waschvorgängen in Lymphozytenmedium resuspendiert. Isolierte vorgefärbte humane PBMC oder Milzzellen humanisierter Mäuse wurden in 96-well-Platten mit je 2-3 x 10^5 Zellen/well ausgesät. Als T-Zellstimulatoren wurden 10 µg/ml Staphylococcus Enterotoxin A (StaphA), PMA/Ionomycin (5 und 200 ng/ml) oder anti-CD3 und/oder anti-CD28 Antikörper (0,5 und 1 µg/ml) zugegeben und für 6 Tage inkubiert. Die Immunzellaktivierung durch PMA und Ionomycin stellt eine polyklonale Aktivierung dar, die MHC-Klassen unabhängig ist. StaphA ist ein bakterielles T-Zellsuperantigen und bindet die variable Region der β-Kette des T-Zellrezeptors und an MHC-Klasse II ^[127, 128]. Diese indirekte Kreuzvernetzung des T-Zellrezeptors resultiert in T-Zellaktivierung und Proliferation. Es existieren nur ca. 50 verschiedene β-Ketten des T-Zellrezeptors, daher können T-Zellsuperantigene eine große Menge an T-Zellen stimulieren. Die T-Zellstimulierung mit anti-CD3-Antikörpern führt zu einer direkten Kreuzvernetzung des T-Zellrezeptors und zu einer polyklonalen T-Zellaktivierung und zur Proliferation der humanen T-Zellen. Die Stimulierung durch anti-CD28 induziert zusätzlich zum T-Zellrezeptor ein effizientes kostimulatorisches Signal.

Intrazellulärer Nachweis von Zytokinen

Wie bereits beschrieben, kommt es nach T-Zellaktivierung zur Expression verschiedener Zytokine. Diese konnten nicht nur im Zellkulturüberstand, sondern auch im zytoplasmatischen Kompartiment der aktivierten T-Zellen selbst nachgewiesen werden. Der Aufbau der Experimente orientierte sich ebenfalls am Aufbau zur Zytotoxizitätsuntersuchungen. Die Tumorzellen wurden zusammen mit den Effektoren, den bispezifischen Antikörpern und einem Proteintransporter-inhibitor (Monensin) für eine Zeit von 16 Stunden inkubiert. Nach T-Zellaktivierung werden die Zytokine exprimiert und ausgeschüttet. Die Zytokine können intrazellulär nur nachgewiesen werden, wenn der Export in den Zellkulturüberstand gestoppt wird. Monensin inhibiert diesen Transport und es kommt zu einer Konzentrierung der Zytokine im Golgi-Apparat,

indem sie nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen nachgewiesen werden können. Vor der Fixierung wurden die Zellen in einem ersten Schritt mit Antikörper gegen extrazelluläre Antigene gefärbt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für 5 min. bei 300 x g zentrifugiert, das Pellet in Fix/Perm[®]-Puffer resuspendiert und für 20 min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden danach mit Perm/Wash[®]-Puffer gewaschen. Die Antikörper gegen intrazelluläre Zytokine wurden in Perm/Wash[®]-Puffer für weitere 30 min. bei RT mit den Zellen inkubiert und nach einem finalen Waschen am MACSQuant[®] analysiert.

Nachweis der Degranulierung von humanen T-Zellen

Der Prozess der Degranulierung bezeichnet die Freisetzung von zytotoxischen Molekülen wie Perforin und Granzym-B von sekretorischen Granula. Nach Aktivierung von T-Zellen kann es zu einer solchen Freisetzung kommen. Zur Überprüfung, ob der therapeutische Antikörper eine solche Degranulierung induziert, wurden die T-Zellen zusammen mit den Tumorzellen und Antikörpern für 16 Stunden inkubiert. Der Aufbau orientierte sich an dem Nachweis von intrazellulären Zytokinen. Nach Zugabe von Monensin wurde zusätzlich 1 µg/ml eines fluoreszierenden anti-human-CD107a Antikörper zugegeben und für weitere 4 Stunden inkubiert. CD107a, auch LAMP1 genannt, ist ein auf den beschriebenen Vesikeln exprimiertes Oberflächenmolekül. Kommt es zu einer T-Zellaktivierung und somit zu einer Degranulierung, werden die Vesikel an die Zelloberfläche transportiert wo sie ihre zytotoxischen Moleküle freilassen können. Berühren diese Vesikel die Membranoberfläche wird auch CD107a nach außen freigelegt und der anti-human-CD107a Antikörper kann sein Zielantigen binden. Die Vesikel wandern in das Zytoplasma zurück und ziehen den gebundenen Antikörper mit sich. Je mehr Fluoreszenz-konjugierter Antikörper in der Zelle desto stärkere Degranulierung wurde induziert. Über die Intensität des Fluoreszenzsignals können in der Durchflusszytometrie Rückschlüsse auf die Degranulierung/Aktivierung der T-Zellen getroffen werden. Die Zellen wurden vor der Analyse noch gegen T-Zell-spezifische Antigene gefärbt und anschließend analysiert.

Gemischte Lymphozytenreaktion (engl.: Mixed Lymphocyte Reaction; kurz: MLR)

Die Reaktivitäten humaner T-Zellen aus humanisierten Mäusen gegen fremde MHC-Moleküle humaner PBMC und Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden in gemischten Lymphozytenreaktionen untersucht. Um eine Eigenproliferation der Stimulatorzellen (humane PBMC und Milzzellen aus C57BL/6) zu verhindern, wurden die humanen bzw. murinen T-Zellen depletiert und die Einzelzellsuspension zusätzlich mit 30 Gy bestrahlt. Die Depletion der T-Zellen aus humanen PBMC erfolgte analog zur Isolation der CD8-positiven T-Zellen, wobei statt anti-human-CD8, anti-human-CD3 Antikörper eingesetzt und die CD3-negativen Zellen geerntet wurden. Die Depletion muriner T-Zellen aus Milzzellen wurde mittels anti-CD90.2-Microbeads durchgeführt. Nach Inkubation der Einzelzellsuspension mit den anti-CD90.2 Microbeads wurden diese gewaschen und zur Separation auf eine LS-Säule im magnetischen Feld aufgetragen. Die CD90.2-positiven murinen T-Zellen wurden so in der Säule zurückgehalten und die T-Zell-depletierten Milzzellen im Durchlauf gewonnen. Milzzellen humanisierter Mäuse dienten als Effektorpopulation, wurden mit CellTrace Violet gefärbt und in einem Verhältnis von 2:1 mit den Stimulatoren inkubiert. Als Kontrollen dienten hierbei Milzzellen unbehandelter Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse als Stimulatorzellen. An Tag 3 wurden die Zellkulturüberstände zur Zytokinbestimmung abgenommen, 10 U/ml humanes IL-2 in Lymphozytenmedium zugegeben und für weitere 3 Tage inkubiert. An Tag 6 wurden die Zellkulturüberstände erneut abgenommen und die T-Zellproliferationen im Durchflusszytometer bestimmt. In einigen Ansätzen wurden 1 µg/ml anti-HLA-DR- bzw. anti-murin-MHC-Klasse II-Antikörper oder die entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper zugegeben. Neben den morphologischen Aufnahmen wurden die Zellkulturüberstände auf humanes IFN-γ mittels Bio-Plex-System (siehe Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand) untersucht.

4.2.4 Aufbau des therapeutischen bispezifischen Antikörpers

Die Entwicklung und Produktion des eingesetzten bispezifischen Antikörpers wurde durch die Hofmann La Roche GmbH in Schlieren, Schweiz, durchgeführt. Das Therapeutikum bestand aus einem voll-humanisiertem anti-human-MCSP IgG-Antikörper konjugiert mit einem anti-human-CD3 IgG-Fab-Fragment (Abbildung 3).

In den Fc-Teil des Antikörpers wurde zusätzlich eine LALA-Mutation ^[129] eingefügt, die die Bindung an Fc_γ-Rezeptoren und somit Fc-Teil-vermittelte Immunantworten durch Makrophagen oder NK-Zellen verhindert. Durch die Doppelspezifität kommt es zu einer Bindung des Tumorantigens sowie zu einer Bindung an CD3-Moleküle auf humanen T-Zellen. Als Kontrollkonstrukte wurden einerseits ein nicht auf Tumorzellen-bindender anti-DP47 IgG-Antikörper (Klon: DP47) mit dem anti-human-CD3 IgG-Fab-Fragment konjugiert sowie ein anti-human-MCSP IgG-Antikörper ohne anti-CD3-Domäne verwendet. Der monospezifische anti-human-MCSP IgG-Antikörper entspricht dem humanisierten anti-human-MCSP IgG-Antikörper des bispezifischen Formats jedoch ohne LALA-Mutation.

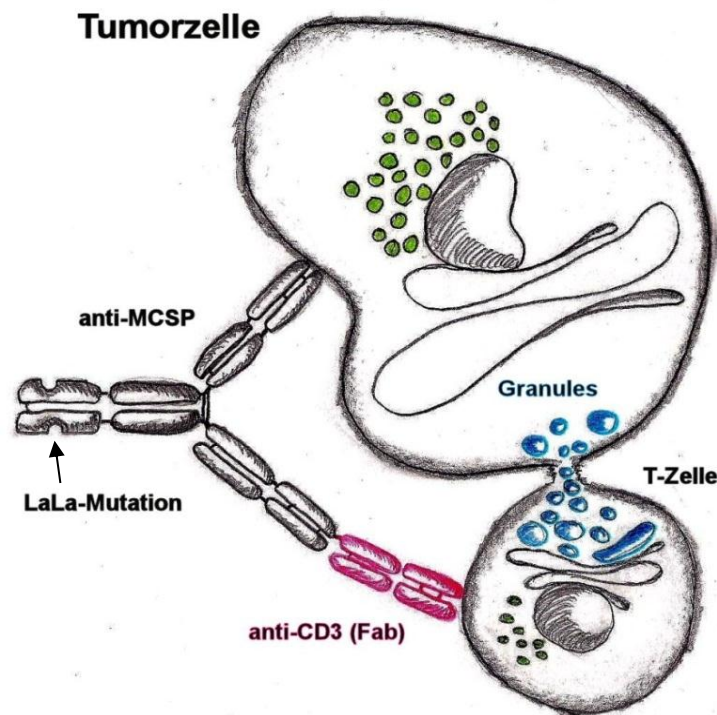


Abbildung 3: Aufbau des bispezifischen Antikörpers

Der voll-humanisierte anti-human-MCSP IgG-Antikörper wurde mit einem anti-human-CD3 Fab-Fragment konjugiert. Die LaLa-Mutation verhindert die Bindung an Fc_γ-Rezeptoren ^[130]. Diese Konstruktion stellt den Kontakt zwischen Tumorzellen und T-Zellen her, und es kommt zur Lyse der Tumorzellen.

4.2.5 Histologie und Immunhistochemie

Die entnommenen Organe wurden in einer 4%igen Formalinlösung für 16-24 Stunden bei RT fixiert. Zur histologischen Untersuchung des Knochenmarks wurden die Knochen nach der Fixierung in eine 10%ige EDTA-Lösung für 7 Tage inkubiert. Die Lösung wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht. EDTA ist ein Komplexbildner und bindet Calciumionen. Diese Kationen sind Hauptbestandteile der Mineralstruktur von Knochen. Durch die Inkubation mit EDTA-haltigem Puffer kommt es zu einer Entkalkung des Knochens, was das darauffolgende Schneiden am Mikrotom erleichtert. Bevor die Organe in Paraffin eingebettet werden konnten, musste das Gewebe entwässert werden. Im sogenannten Autotechnikon durchliefen die Organe ein automatisiertes Programm:

<i>3 x Ethanol 70 %</i>	<i>1,5 Stunden</i>	<i>RT</i>
<i>2 x Ethanol 95 %</i>	<i>1,5 Stunden</i>	<i>RT</i>
<i>2 x Ethanol 100 %</i>	<i>1,5 Stunden</i>	<i>RT</i>
<i>2 x Xylol 100 %</i>	<i>1,5 Stunden</i>	<i>RT</i>
<i>4 x Paraffin</i>	<i>1 Stunde</i>	<i>60°C</i>

Am darauffolgenden Tag wurden die Organe in einer Ausbettstation mit 60°C warmem Paraffin ausgebettet und zum Aushärten für 30 min. auf eine Kühlplatte gestellt. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 1-2 µm dicke Schnitte hergestellt und auf einen Objektträger aufgezogen. Um ein Anheften des Gewebes an den Objektträger zu gewährleisten, wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C getrocknet. Für alle histologischen und immunhistologischen Färbungen war es notwendig, die Schnitte zuvor von Paraffin zu befreien und zu hydratisieren:

<i>3 x Xylol 100 %</i>	<i>5 min.</i>	<i>RT</i>
<i>2 x Ethanol 100 %</i>	<i>2 min.</i>	<i>RT</i>
<i>1 x Ethanol 90 %</i>	<i>2 min.</i>	<i>RT</i>
<i>1 x Ethanol 80 %</i>	<i>2 min.</i>	<i>RT</i>
<i>2 x Ethanol 70 %</i>	<i>2 min.</i>	<i>RT</i>
<i>1 x deionisiertes Wasser</i>	<i>20 Sekunden</i>	<i>RT</i>

Alle Organe wurden für die histopathologische Untersuchung mit Hematoxylin & Eosin (H&E) gefärbt:

<i>1 x Hematoxylin</i>	<i>1 min.</i>	<i>RT</i>
<i>1 x Leitungswasser</i>	<i>1-20 min.</i>	<i>RT</i>
<i>1 x deionisiertes Wasser</i>	<i>spülen</i>	<i>RT</i>
<i>1 x Eosin (1 %)</i>	<i>1 min.</i>	<i>RT</i>

Nach der Färbung mit Eosin wurden die Schnitte zum dehydrieren durch die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol gezogen und mit einem Eindeckautomaten permanent eingedeckt.

Chromogen-basierte immunhistochemische Färbungen

In der Immunhistochemie können bestimmte Antigene oder Strukturen in einem Gewebeschnitt mittels Antikörper detektiert und durch einen enzymatischen Farbumschlag sichtbar gemacht werden. Die zu untersuchenden Gewebe wurden in Formalin fixiert. Die Mehrzahl der zu detektierenden Antigene wird während dieser Vorbehandlung miteinander quervernetzt. Diese Quervernetzungen müssen durch einen Demaskierungsprozess rückgängig gemacht werden, um das zu detektierende Antigen für den Färbeprozess freizulegen. Dies kann entweder durch Hitze induzierte Demaskierung oder durch einen enzymatischen Verdau erreicht werden. In den hier durchgeführten Färbungen kam ausschließlich die durch Hitze induzierte Demaskierung zum Einsatz. Nach dem Entparaffinierungsprozess wurden die Schnitte für 20 min. bei 97°C in einem Dampfkocher erhitzt. Der zur Demaskierung verwendete Kochpuffer richtete sich nach den zu detektierenden Antigenen (Tabelle 1). Die Schnitte wurden zum Abkühlen für 20 min. bei RT zur Seite gestellt, zweimal in 1xPBS gewaschen und die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation für 10 min. in 0,3%iger H₂O₂-Lösung (in 1xPBS) inhibiert. Danach wurden die Schnitte in TBST gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit einem serumfreien Proteinblock für 10 min. inhibiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in angegebenen Konzentrationen (Tabelle 1) für eine Stunde bei RT inkubiert. Das Gewebe wurde 3mal in TBST gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärsystem (Tabelle 1) für 30 min. bei RT inkubiert. Die sekundären Systeme waren entweder mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert. Nach wiederholtem Waschen in TBST wurde das Substrat aufgetragen und die

enzymatische Farbentwicklung unter dem Mikroskop verfolgt. Die Reaktion wurde durch extensives Spülen in deionisiertem Wasser gestoppt. Nach der Gegenfärbung mit Hematoxylin für 10-20 Sekunden und einem 10-minütigem bläuen in Leitungswasser wurden die Gewebsschnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe gezogen und permanent eingedeckt. Bei Doppelfärbungen wurden die 2 primären Antikörper gemischt und zusammen aufgetragen. Auch die sekundären Antikörper, bestehend aus Polymer-Systemen mit AP und HRP gekoppelt, wurden zusammen inkubiert. Bei Dreifachfärbungen musste nach den ersten beiden Farbumschlägen eine Denaturierung der zuvor verwendeten primären und sekundären Antikörper in einem SDS-haltigem Puffer für 5 min. durchgeführt werden. Danach begann eine erneute Inkubation mit dem dritten primären und dem dazugehörigem Sekundärsystem.

Table 1: Antikörper/Kochpuffer und Sekundärsysteme

Färbung	HIER	Verdünnung	Sekundärsystem	Chromogen
CD45	pH 6	1/1	ms-ImmPRESS	DAB
CD1a	pH 9	1/1	rb-ImmPRESS	DAB
CD34	pH 6	1/10	rat-ImmPRESS	DAB
Melan-A/Mart-1	pH 6	1/1	ms-ImmPRESS	DAB
MCSP	pH 6	1/200	rb-ImmPRESS	DAB
CD4, CD8	pH 9	1/100, 1/500	ms-HRP, rb-AP	DAB, PermRed
Melan-A/Mart-1, CD3	pH 6	1/1, 1/1	ms-AP, rb-HRP	DAB, PermRed
CD3, FoxP3	pH 6	1/1, 1/200	Fluoreszenz	
CD3, CD20, CD68	pH 6	1/1, 1/1, 1/100	ms-HRP, rb-AP, ms-HRP	DAB, PermRed, Histogreen

Fluoreszenz-basierte immunhistochemische Färbungen

Die Vorbehandlungen sowie der Demaskierungsprozess wurden exakt wie auf Chromogen-basierten Färbeverfahren durchgeführt. Nach der einstündigen Inkubation mit den gemischten primären Antikörpern wurden die Schnitte 3mal in 1xPBS gewaschen. Die beiden Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper anti-Murin-AlexaFluor488 sowie anti-Hase-AlexaFluor647 wurden ebenfalls gemischt und für 30 min. mit den Schnitten bei RT inkubiert. Die Gewebe wurden erneut in 1xPBS gewaschen und direkt eingedeckt. Das Eindeckmedium enthielt DAPI zur Darstellung der Nuklei. Die Schnitte konnten danach mit einem Fluoreszenzscanner digitalisiert werden.

4.2.6 Westernblot

Zum Nachweis von humanem MCSP auf verschiedenen Tumorzelllinien wurden 10×10^6 Tumorzellen geerntet. Der Lysepuffer (RIPA) wurde aufgetaut, 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt und versetzt mit dem Proteinaseinhibitor PMSF (1 mM). Die Zellpellets wurden in 200 μ l des frisch angesetzten Lysepuffers resuspendiert und für 10 min. auf Eis inkubiert. Die Suspensionen wurden zum Klären bei 10,000 x g für 30 min. bei RT zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels des BCA-Assays nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. 20 μ g der Gesamtproteinmenge wurden für den Nachweis nach folgendem Protokoll eingesetzt:

<i>Protein Probe</i>	<i>x μL</i>
<i>LDS Sample Buffer (4X)</i>	<i>2.5 μL</i>
<i>Reducing Agent (10X)</i>	<i>1 μL</i>
<i>auf 10 μL mit deionisiertem Wasser aufgefüllt</i>	

Das Gemisch wurde für 10 min. bei 70°C inkubiert und auf ein Tris-Acetate Gel (3 – 8 %) geladen. Die Westernblot-Kammern wurden mit Tris-Acetate SDS-Puffer gefüllt. In die inneren Kammern wurde zusätzlich Antioxidans zugegeben. Die Proteinauftrennung erfolgte für eine Stunde bei einer Spannung von 100 Volt. Die Gele wurden danach mittels iBlot[®] System auf Nitrocellulose-Membrane übertragen. Nach einem

Blockvorgang von 10 min. in NET-Puffer wurde der primäre anti-human-MCSP-Antikörper (0,1 µg/ml) über Nacht bei RT inkubiert. Nach weiteren Waschsritten in NET-Puffer wurden die Membrane mit dem sekundären anti-Hase-HRP-Antikörper (1/10000) für eine Stunde bei RT behandelt. Nach dem finalen Waschen und einer kurzen Inkubation in Lumi-Light Substrat konnte die resultierende Chemielumineszenz mittels Röntgenfilme und eines Fotoentwicklers sichtbar gemacht werden.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Wirkungsweise des bispezifischen Antikörpers *in vitro*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkungsweise des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers in *in vitro*-Experimenten untersucht. Neben den Analysen zu Bindungseigenschaften und T-Zell-vermittelten Zytotoxizität wurden die Effekte auf humane T-Zellen analysiert.

5.1.1 Der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper bindet auf MCSP-positiven humanen Melanomzellen

MCSP wird auf einem Großteil humaner Melanome exprimiert ^[131]. Im Normalgewebe kann MCSP in geringeren Mengen in Melanozyten, Basalzellen, Neuronen und Gliazellen sowie in der Epidermis nachgewiesen werden ^[131]. Zum Nachweis humaner MCSP-Expression in unterschiedlichen Tumorzelllinien, wurden die Tumorzelllysate im Westernblot analysiert. Die humane Melanomzelllinie Colo-38 zeigte im Vergleich zu anderen Tumorzelllinien die aus Brust-, Darm-, Lunge- oder Prostatagewebe stammen, eine hohe Expression des Moleküls (Abbildung 4A). Daraufhin wurden die Bindungseigenschaften der bispezifischen MCSP-CD3 und DP47-CD3 Antikörper sowie des monospezifischen anti-MCSP Antikörpers auf verschiedenen Tumorzelllinien durchflusszytometrisch untersucht. Die Bindung des MCSP-CD3 sowie des anti-MCSP Antikörpers wurden nur auf der humanen Melanomzelllinie Colo-38 nachgewiesen. Auf den humanen Brustkrebszellen, auf denen im Westernblot keine MCSP-Expression gefunden wurde, konnte auch keine Bindung des MCSP-CD3 und des anti-MCSP Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 4B). Für den bispezifischen DP47-CD3 Antikörper wurde ebenfalls keine Bindung auf den Colo-38-Zellen nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass nur die anti-MCSP Domäne auf den MCSP-positiven Melanomzellen bindet.

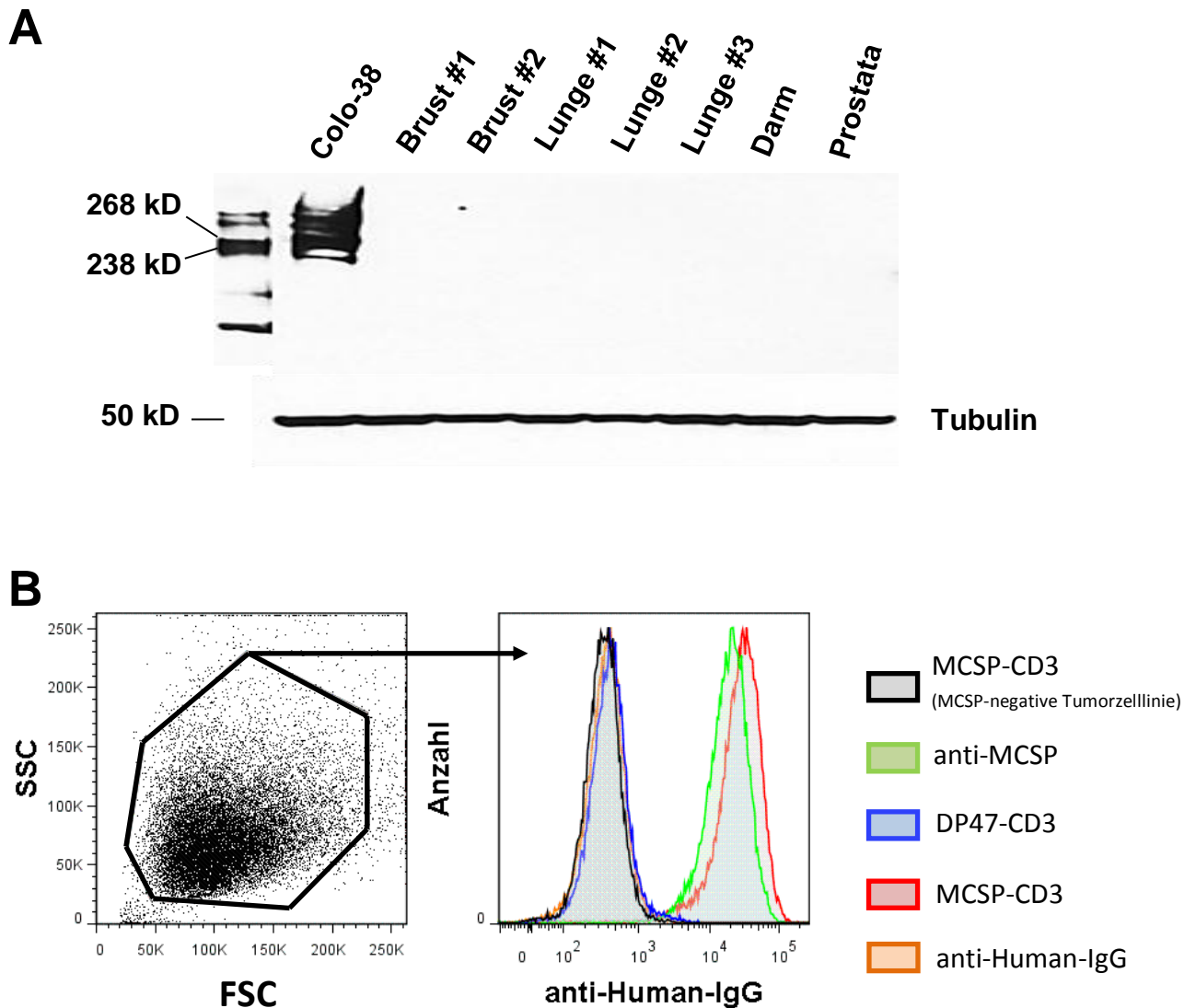


Abbildung 4: MCSP-Expression und Bindungseigenschaften des bispezifischen Antikörpers an humane Tumorzellen

(A) Zellysate (20 µg) verschiedener Tumorzelllinien wurden auf einem Tris-Acetate-Gel aufgetrennt, auf ein Nitrocellulosemembran transferiert und mit anti-MCSP mAk gefärbt. Die Detektion des Proteins wurde mit einer Belichtungszeit von 5 sek. durchgeführt. Die erwartete Bande für MCSP lag bei einer Größe von ca. 250 kD. Die größere Bande lässt auf unterschiedlich glykosylierte Formen schließen ^[132]. Als Mengenkontrolle diente der Nachweis des Haushaltsgens Tubulin (ca. 50 kD).

(B) Die Tumorzelllinie Colo-38 und eine MCSP-negative Brustkrebszelllinie (schwarz) wurden mit den humanisierten bispezifischen DP47-CD3 (blau), MCSP-CD3 (rot und schwarz) oder dem monospezifischen anti-MCSP mAk (grün) inkubiert, gewaschen, mit Fluoreszenz-konjugiertem anti-human-IgG mAk gefärbt und durchflusszytometrisch im MACSQuantTM analysiert. Zur Kontrolle wurden die Colo-38 Zellen nur mit dem anti-human-IgG mAk (orange) gefärbt.

5.1.2 MCSP-CD3 bindet an humane T-Zellen

Neben der spezifischen Bindung des MCSP-CD3 Antikörpers an humane MCSP-positive Melanomzellen, wurde im Folgenden die Affinität zu humanen T-Zellen untersucht. Hierzu wurden aufgereinigte PBMC zusammen mit den bispezifischen MCSP-CD3, DP47-CD3 oder dem monospezifischen anti-MCSP Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Zur Identifizierung der T-Zellen wurden die PBMC zusätzlich mit einem T-Zell-spezifischen mAk gegen den TZR gefärbt (TZR- α/β). Der monospezifische anti-MCSP Antikörper, der keine anti-CD3 Domäne besitzt, zeigte keine Bindung an humane T-Zellen (Abbildung 5). Die Bindung des bispezifischen MCSP-CD3 sowie des DP47-CD3 Antikörpers wurde an CD4- und CD8-positiven T-Zellen, jedoch nicht auf anderen Blutzellen nachgewiesen (Abbildung 5).

Zusammen mit den Erkenntnissen aus 5.1.1, weist somit nur der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper eine duale Bindung an humane MCSP-positive Melanomzellen (Colo-38) und humane CD3-positive T-Zellen auf. Der bispezifische DP47-CD3 bindet zwar ebenfalls an T-Zellen, jedoch nicht an CD3-negative Melanomzellen. Für den monospezifischen anti-MCSP Antikörper konnte hingegen eine Bindung an MCSP-positiven Colo-38-Zellen jedoch nicht an humanen T-Zellen nachgewiesen werden. In den weiteren Experimenten zur Zytotoxizität, Zytokinfreisetzung und Degranulierung wurden daher der DP47-CD3 sowie der anti-MCSP Antikörper als Kontrollantikörper verwendet.

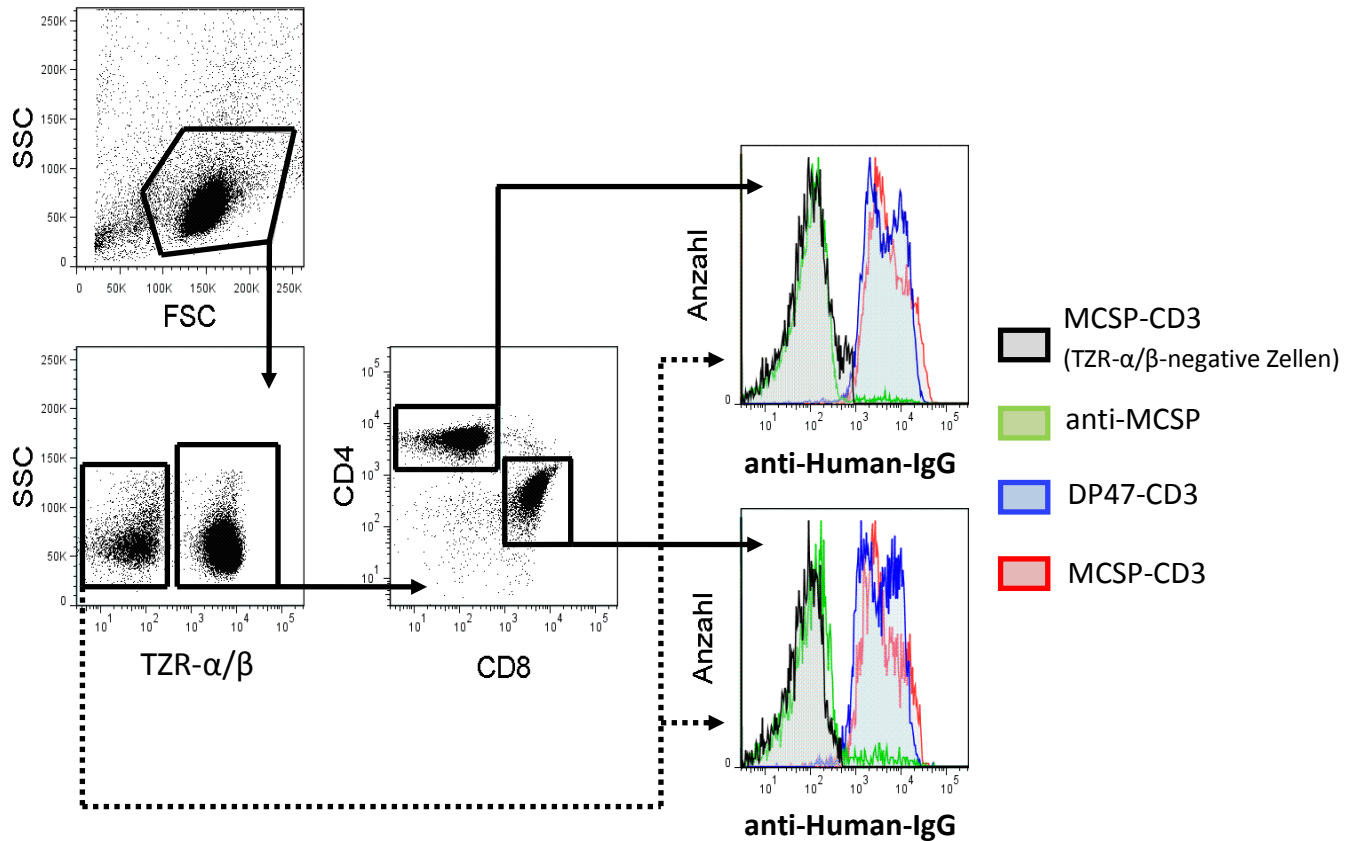


Abbildung 5: Bindungseigenschaften des bispezifischen Antikörpers an humane T-Zellen

Frisch isolierte PBMC wurden zusammen mit dem humanisierten bispezifischen MCSP-CD3 (schwarz und rot) bzw. DP47-CD3 (blau) Antikörper sowie dem monospezifischen anti-MCSP Antikörper (grün) inkubiert, gewaschen und mit Fluoreszenz-konjugiertem anti-human-IgG mAk gefärbt. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die PBMC zusätzlich mit Fluorochrom-konjugierten anti-Human-TZR- α/β , anti-Human-CD4 und anti-Human-CD8 mAk gefärbt. Die TZR- α/β -positive Zellpopulation wurde als CD4- oder CD8-positive T-Zellen dargestellt und die Bindung der therapeutischen Antikörper im Histogramm ausgewertet.

5.1.3 MCSP-CD3 induziert T-Zell-vermittelte Lyse humaner Melanomzellen durch T_{Helfer} und CTL

Nach den Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers, wurde das zytotoxische Potential zur T-Zell-abhängigen Lyse von Melanomzellen analysiert. Hierzu wurden CD4-positive T-Helferzellen (T_{Helfer}) und CD8-positive zytotoxische T-Zellen (CTL) isoliert (Reinheit siehe Abbildung 6) und zusammen mit Colo-38-Zellen und dem bispezifischen Antikörper kultiviert. PBMC, isolierte T_{Helfer} und CTL wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit Colo-38-Zellen und absteigenden Konzentrationen des MCSP-CD3 Antikörpers inkubiert. Als Kontrollen dienten DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper und MCSP-negative Tumorzellen. Die Zelllyse wurde über die LDH-Freisetzung im Kulturüberstand ermittelt. Der Prozentsatz an induzierter Tumorumlyse wurde anhand der maximalen Lyse durch Zugabe von Triton berechnet (siehe 4.2.2). Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden und einer Konzentration des bispezifischen Antikörpers von 50 bzw. 500 ng/ml konnte in allen Ansätzen eine Tumorumlyse von 60-90 % nachgewiesen werden (Abbildung 7A). Erst ab einer Konzentration von 5 ng/ml verringerte sich die induzierte Lyse der Melanomzellen, besonders in Anwesenheit von T_{Helfer} . Bei Konzentrationen von 0,5 ng/ml und weniger konnte innerhalb dieses Zeitraumes keine Lyse mehr nachgewiesen werden. Der monospezifische anti-MCSP Antikörper induzierte in Gegenwart humaner PBMC als Effektorzellpopulation eine erhöhte Lyse der Melanomzellen. Dieser Effekt wurde jedoch nicht in T_{Helfer} - oder CTL-Kokulturen nachgewiesen, was auf einen T-Zell-unabhängigen Effekt hindeutete. Der bispezifische Kontrollantikörper DP47-CD3 war nicht zytotoxisch (Abbildung 7A). In den Kokulturen mit MCSP-negativen Tumorzellen und einer Konzentration des MCSP-CD3 Antikörpers von 500 ng/ml konnte nur eine sehr geringe Lyse beobachtet werden (Abbildung 7A). Die Zerstörung der Melanomzellen konnte auch makroskopisch durch die Bildung von Zellklumpen visualisiert werden. Zerstörte Tumorzellen verloren ihre Adhärenz und verkleben miteinander (rote Pfeile in Abbildung 7B).

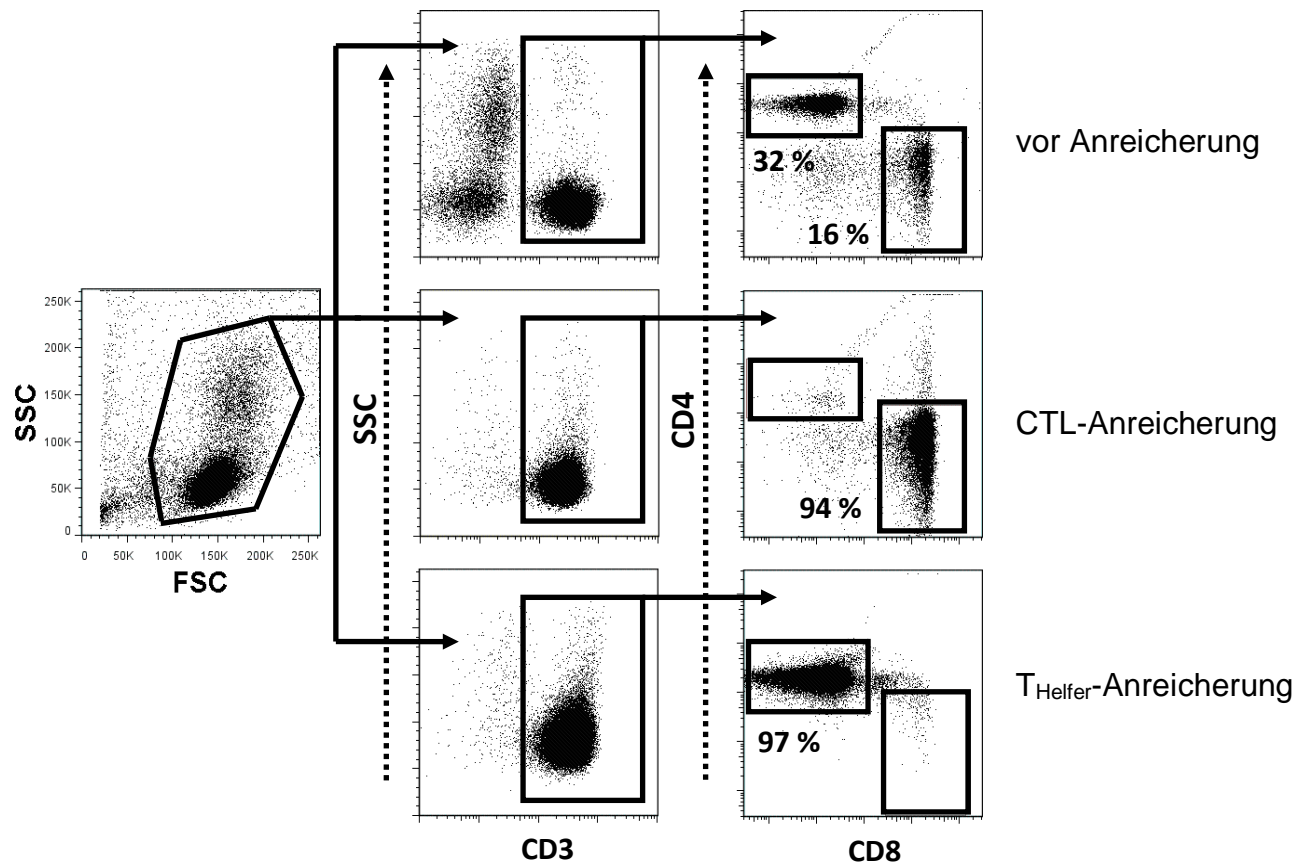


Abbildung 6: Anreicherung von T_{Helfer} und CTL aus humanen PBMC

CD4-positive T_{Helfer} sowie CD8-positive CTL wurden aus frisch isolierten PBMC mittels magnetbasierter Zellseparation angereichert. Die angereicherten Zellen wurden mit Fluorochrom-konjugierten anti-CD3/CD4/CD8 mAk gefärbt und zur Überprüfung der Reinheit am Durchflusszytometer analysiert.

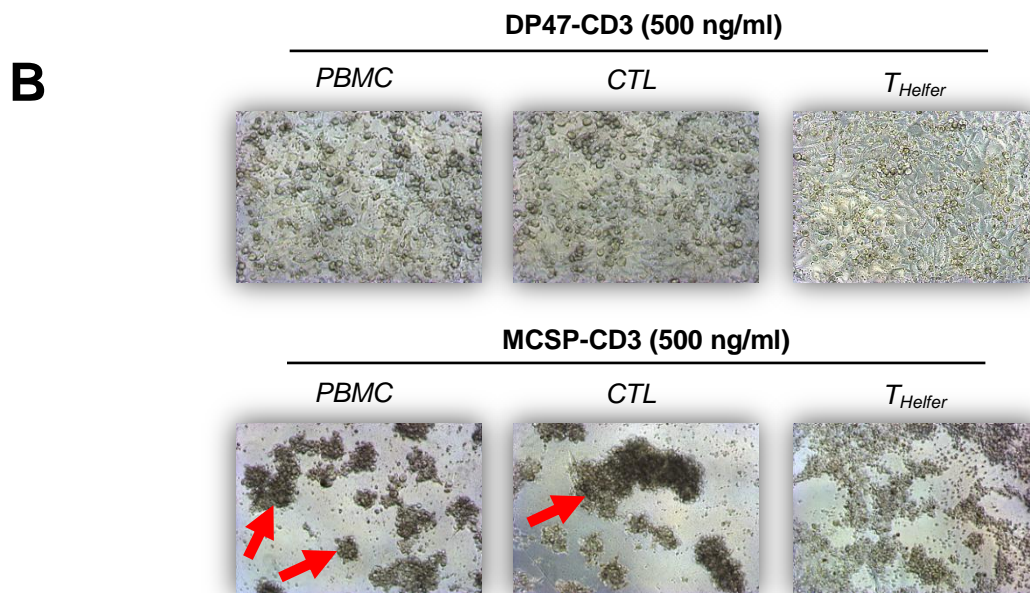
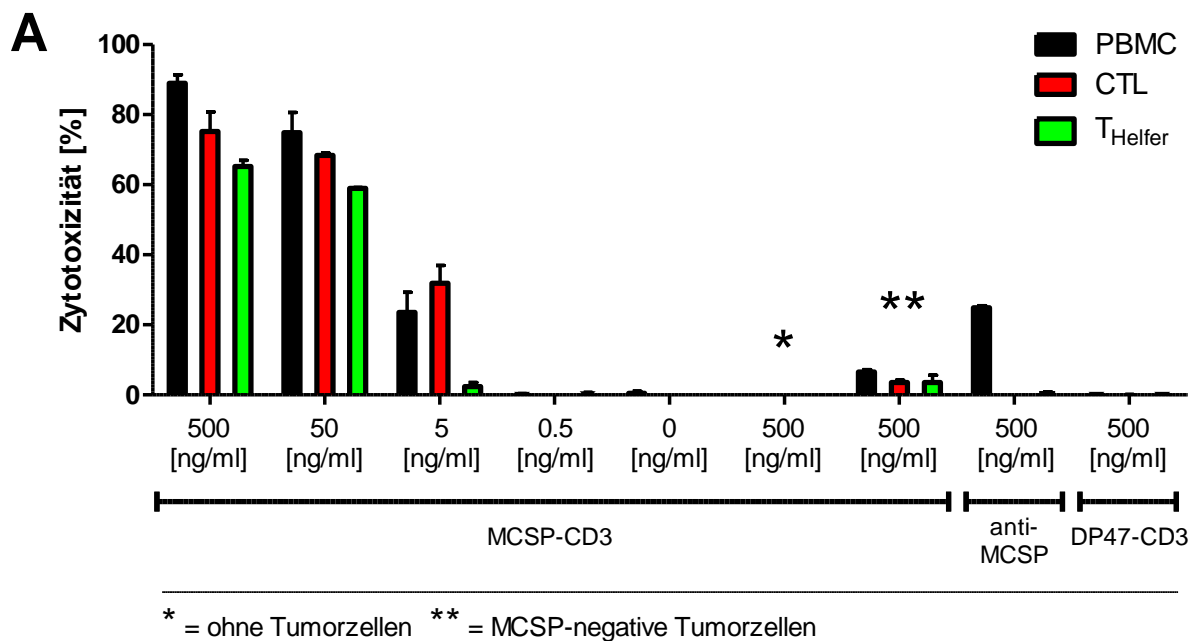


Abbildung 7: Zytotoxizitätsprüfung mit humanen T-Zellen

(A) Experiment zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde mit dem LDH-Freisetzungssassay durchgeführt. Colo38-Zellen wurden mit isolierten PBMC, angereicherten T_{Helfer} oder CTL in einem 1:1-Verhältnis mit absteigender Konzentration des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers inkubiert. Als Kontrollen dienten der DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper sowie MCSP-negative Tumorzellen. Der Zellkulturüberstand wurden nach 48 Stunden abgenommen und die darin enthaltene LDH-Konzentration mittels Farbumschlag im ELISA-Fotometer bestimmt. Der Prozentsatz der induzierten Lyse wurde anhand der maximalen Lyse durch Zugabe von Triton errechnet.

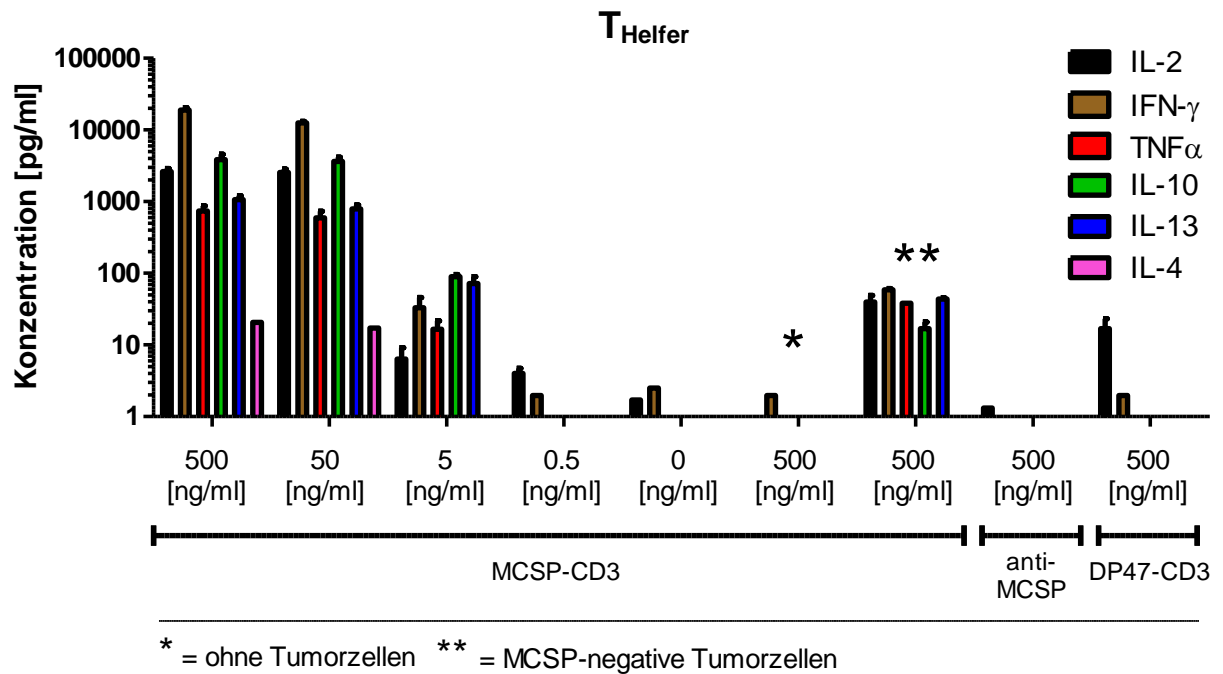
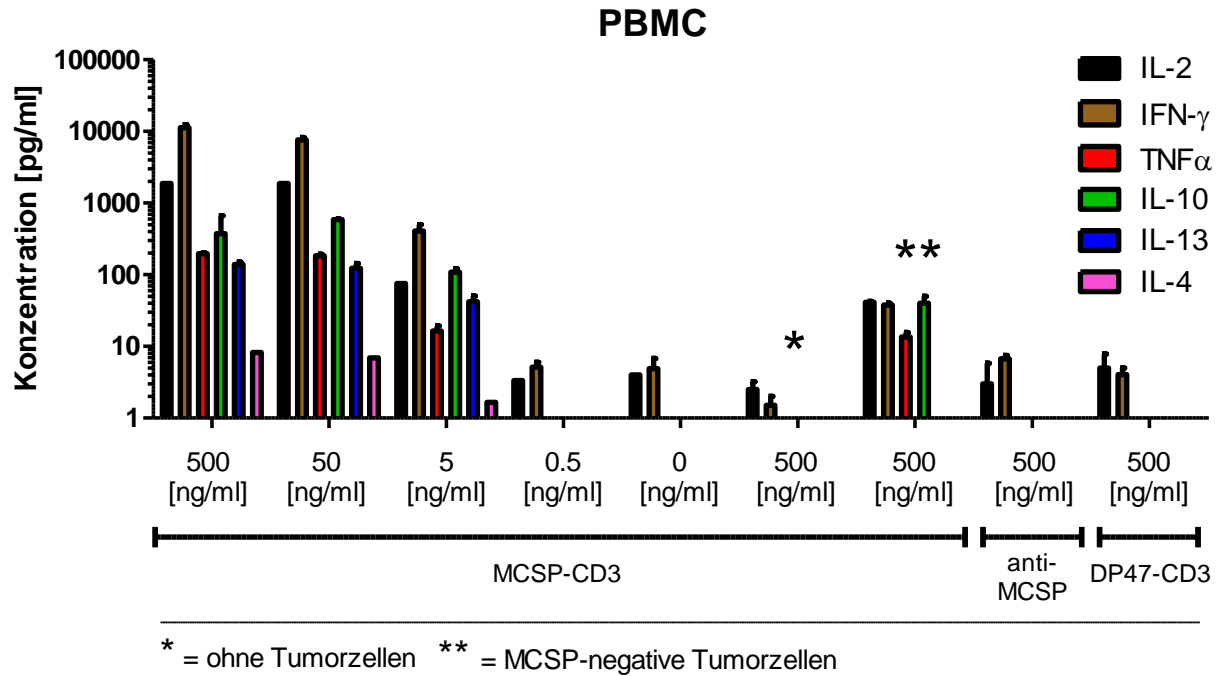
(B) Aufnahme der Colo-38-T-Zellkulturen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Bildung von Zellklumpen (rote Pfeile) konnte makroskopisch nachgewiesen werden.

5.1.4 T-Zellaktivierung und Expression von Zytokinen

Der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper löste eine T-Zell-abhängige Lyse MCSP-positiver Melanomzellen aus (Abbildung 7). Parallel zur Zytotoxizität erfolgte die Bestimmung freigesetzter Zytokine im Kulturüberstand. PBMC, isolierte T_{Helfer} und CTL wurden mit Colo-38-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 für 48 Stunden mit dem bispezifischen MCSP-CD3 Antikörper inkubiert und anschließend die Zytokine im Überstand bestimmt. Als Kontrollen dienten der bispezifische DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper und MCSP-negative Tumorzellen. Das BioPlex-System erlaubt den simultanen Nachweis mehrerer Zytokine in nur einer Probe. Es wurden folgende Zytokine bestimmt: TNF- α (Tumornekrosefaktor-alpha), IFN- γ (Interferon-gamma), IL-2 (Interleukin-2), IL-4 (Interleukin-4), IL-10 (Interleukin-10) und IL-13 (Interleukin-13). Die gemessenen Zytokine sind in Abbildung 8 als Zytokinprofile für T_{Helfer}, CTL und PBMC dargestellt. Die Menge von Zytokinen korrelierte mit der eingesetzten Antikörperkonzentration. IL-2 und IFN- γ besitzen starke immunstimulatorische Eigenschaften und können sowohl von T_{Helfer} als auch von CTL gebildet werden^[133]. Nach der Stimulation mit dem bispezifischen MCSP-CD3 Antikörper wurden größere Mengen an IFN- γ in CTL- im Vergleich zu T_{Helfer}-Kokulturen jedoch vergleichbare Mengen IL-2 nachgewiesen. TNF- α fördert unter anderem die Phagozytoseaktivität von Makrophagen, kann jedoch auch bei hohen Konzentrationen den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren^[134, 135]. IL-10 und IL-13 werden immunhemmende Wirkungen zugeschrieben^[133, 136]. TNF- α , IL-10 und IL-13 wurden nach Stimulierung mit MCSP-CD3 vor allem in T_{Helfer}-Kokulturen und nur in geringeren Mengen in CTL-Kokulturen nachgewiesen. IL-4 konnte nur in sehr geringen Konzentrationen und vor allem im Kulturüberstand der T_{Helfer}-Kokulturen nach Stimulation mit MCSP-CD3 nachgewiesen werden. Es kam zu keiner Zeit, auch bei hohen Konzentrationen des therapeutischen MCSP-CD3 Antikörpers, zu Zytokinfreisetzung in Abwesenheit von Tumorzellen (Abbildung 8). Auch in Gegenwart des DP47-CD3 oder anti-MCSP Antikörpers konnten in den Colo-38-T-Zellkulturen keine messbaren Zytokinkonzentrationen ermittelt werden. In den Kokulturen mit MCSP-negativen Tumorzellen und 500 ng/ml des MCSP-CD3 Antikörpers konnten im Vergleich zu den Kontrollantikörpern leicht erhöhte Zytokinkonzentrationen

nachgewiesen werden. Insgesamt verhielt sich jedoch der Nachweis der Zytokine im Zellkulturüberstand proportional zur ermittelten Zytotoxizität.

Die Analyse von Zytokinen in Kulturüberständen kann keinen Aufschluss zur Frequenz aktivierter T-Zellen geben. Daher wurde die Zytokinproduktion in einem Folgeversuch auch intrazellulär analysiert. In Gegenwart des Proteintransporter-inhibitors Monensin wurden die Kokulturen nach 16 Stunden Inkubation fixiert, gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 9 zeigt eine exemplarische Analyse einer T_{Helfer}-Kokultur. Die Mehrzahl aller T-Zellen exprimierte nach Stimulierung mit MCSP-CD3 den frühen T-Zellaktivierungsmarker CD69 ^[137]. Die Synthese von IFN- γ , TNF- α , IL-2 und in geringen Mengen auch IL-4, konnte in den CD69-positiven T-Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 2). IFN- γ wurde in bis zu 10 % aller CTL und bis zu 4 % in T_{Helfer} nach Stimulation mit MCSP-CD3 nachgewiesen. MCSP-CD3 induzierte in fast 50 %, ca. das dreifache verglichen mit CTL-Kulturen, aller T_{Helfer} eine TNF- α -Produktion, wohingegen die Menge an IL-2-positiven T-Zellen vergleichbar war. Auch IL-4 wurde vermehrt in T_{Helfer} detektiert (Tabelle 2).



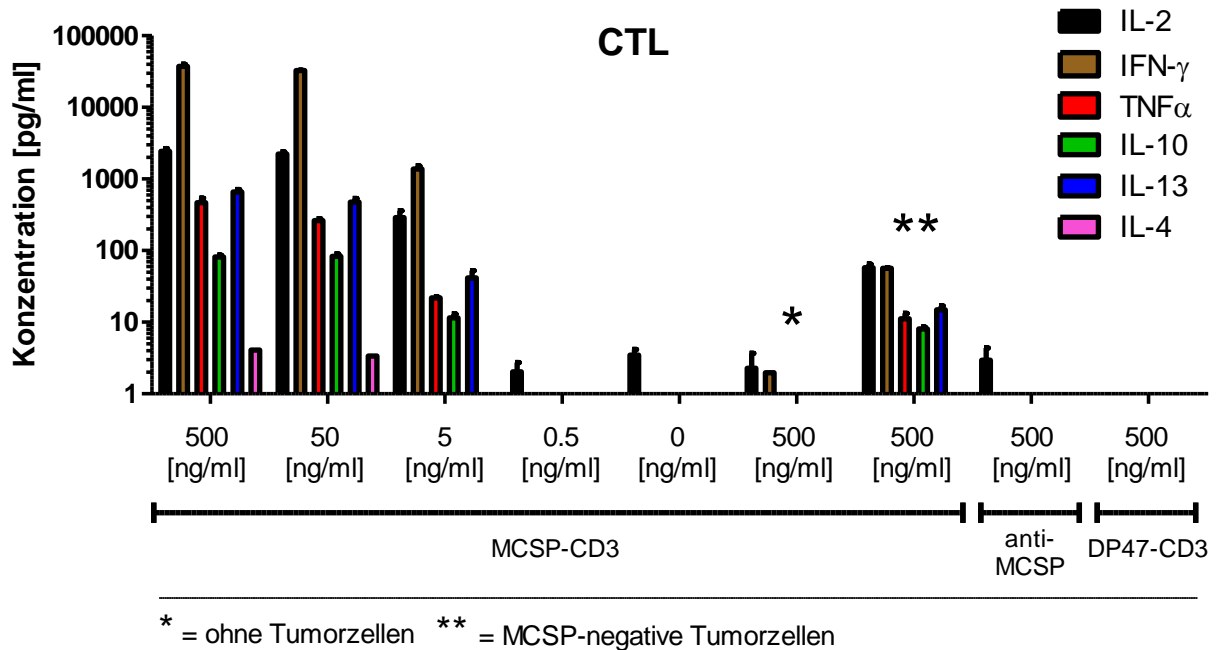


Abbildung 8: Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand

Die Melanomzelllinie Colo-38 wurde 1:1 mit PBMC, isolierten T_{Helfer} oder CTL und absteigenden Konzentrationen des MCSP-CD3 Antikörpers für 48 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper sowie eine MCSP-negative Tumorzelllinie. Als weitere Kontrolle wurden die Effektorzellen in Anwesenheit des MCSP-CD3 Antikörpers, jedoch ohne Tumorzellen stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und die Konzentrationen an humanem TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-4 und IL-13 mittels Bio-Plex System ermittelt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der ZytokinKonzentrationen wurden aus Triplikaten errechnet und auf einer logarithmischen Skala aufgetragen.

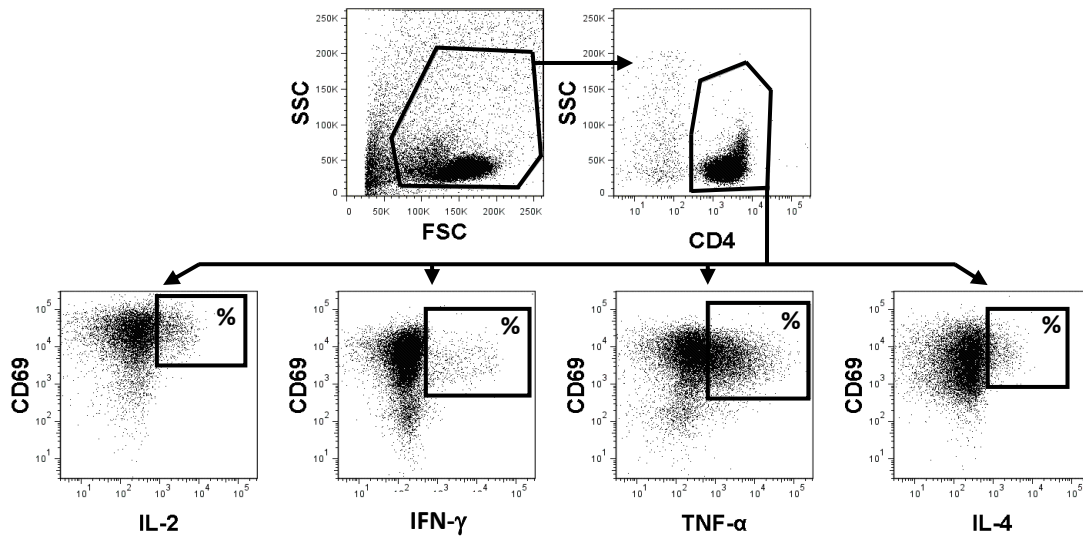


Abbildung 9: Intrazellulärer Nachweis von Zytokinen

Die MCSP-positiven Tumorzellen wurden 1:1 mit aufgereinigten T_{Helfer} oder CTL und absteigenden Konzentrationen des MCSP-CD3 Antikörpers für 16 Stunden in Anwesenheit von Monensin inkubiert. Als Kontrollen dienten DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper sowie eine MCSP-negative Tumorzelllinie. Danach wurden die Kokulturen mit Fluoreszenz-markierten mAk anti-CD69 und anti-CD4 (T_{Helfer} -Kulturen) oder anti-CD8 (CTL-Kulturen) gefärbt. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Fluorochrom-konjugierten anti-IFN- γ , -TNF- α , -IL-2 oder -IL-4 mAk gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Hier dargestellt ist eine exemplarische Analyse einer durchflusszytometrischen Zytokinbestimmung in einer Kokultur von T_{Helfer} und Colo-38-Zellen in Gegenwart von 50 ng/ml MCSP-CD3. Die Frequenzen aktivierter zytokinproduzierender T-Zellen in den unterschiedlichen Ansätzen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Frequenzen zytokinproduzierender T-Zellen in Prozent

		CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /IL-2 ⁺	CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /IFN- γ ⁺	CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /TNF- α ⁺	CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /IL-4 ⁺
MCSP-CD3 [ng/ml]	500	5.0 \pm 0.2	9.8 \pm 0.7	14.7 \pm 3.4	1.8 \pm 0.7
	50	3.9 \pm 0.4	6.0 \pm 0.2	10.4 \pm 2.3	1.4 \pm 0.3
	5	1.3 \pm 0.3	2.3 \pm 0.4	4.7 \pm 1.9	0.3 \pm 0.2
	0.5	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
	0	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
	500*	0.2 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
	500**	0.4 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1
anti-MCSP [ng/ml]	500	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
DP47-CD3 [ng/ml]	500	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1

* = ohne Tumorzellen ** = MCSP⁺ Tumorzellen

		CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /IL-2 ⁺	CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /IFN- γ ⁺	CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /TNF- α ⁺	CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /IL-4 ⁺
MCSP-CD3 [ng/ml]	500	5.9 \pm 0.5	3.6 \pm 0.3	41.5 \pm 2.5	5.3 \pm 1.9
	50	5.3 \pm 0.3	3.9 \pm 0.5	34.7 \pm 4.3	1.9 \pm 0.6
	5	2.9 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2	27.7 \pm 2.3	0.7 \pm 0.3
	0.5	0.8 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	6.7 \pm 0.9	0.3 \pm 0.2
	0	0.3 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2
	500*	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
	500**	0.4 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	8.8 \pm 0.9	0.4 \pm 0.1
anti-MCSP [ng/ml]	500	0.3 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
DP47-CD3 [ng/ml]	500	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1

* = ohne Tumorzellen ** = MCSP⁺ Tumorzellen

5.1.5 MCSP-CD3 induziert Degranulierung in CTL und T_{Helfer}

Der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper induziert eine T-Zellaktivierung, Zytokinfreisetzung und Lyse von MCSP-positiven Melanomzellen. Die Exozytose von zytolytischen Granula zählt zu den Hauptmechanismen der CTL-vermittelten Zytotoxizität ^[138]. Im Folgenden wurden die stimulierten T-Zellen hinsichtlich ihrer Degranulierung sowie Freisetzung zytotoxischer Moleküle untersucht. Isolierte T_{Helfer} und CTL wurden mit den Colo-38-Zellen und dem bispezifischen MCSP-CD3 Antikörper für 16 Stunden inkubiert. Vier Stunden vor der Analyse wurde der Proteintransporterinhibitor Monensin und ein Fluoreszenz-konjugierter anti-CD107a Antikörper zugegeben. Als Kontrollen dienten der DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper sowie MCSP-negative Tumorzellen. Abbildung 10 zeigt eine exemplarische Analyse zur Degranulierung und Perforinexpression in CTL-Kokulturen. Der MCSP-CD3 Antikörper induzierte eine konzentrationsabhängige Degranulierung von CTL und T_{Helfer}. Die Anzahl an CD107a-positiven T-Zellen war in beiden T-Zellpopulationen vergleichbar. Nur bei niedrigen Konzentrationen des MCSP-CD3 Antikörpers kam es zu einer höheren Degranulierung in den CTL (Tabelle 3). In den CTL-Kokulturen kam es außerdem zu einer Perforinsynthese in bis zu 30 % der Zellen, während in T_{Helfer} nur bis zu 5 % detektiert wurden (Tabelle 3). In den Kulturen mit den Kontrollantikörpern konnten weder Degranulierung noch Perforinexpressionen nachgewiesen werden. In der Kontrolle mit MCSP-negativen Tumorzellen kam es jedoch zu einer erhöhten Degranulierung und Perforinsynthese im Vergleich zu den Kontrollantikörpern.

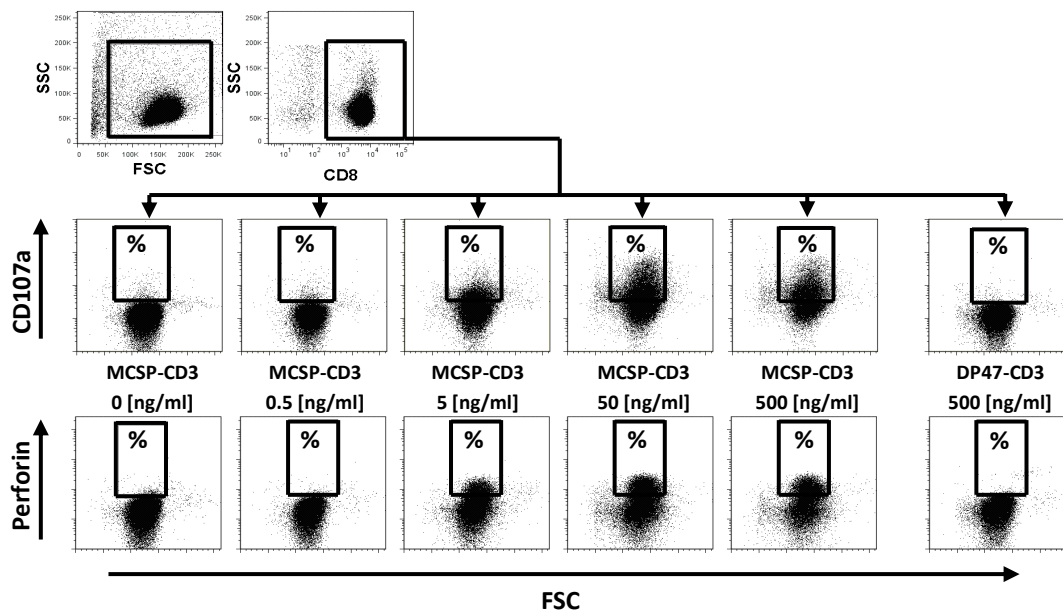


Abbildung 10: Degranulierung und Perforinfreisetzung

Die MCSP-positiven Colo-38-Zellen wurden 1:1 mit aufgereinigten T_{Helfer} oder CTL und absteigenden Konzentrationen des MCSP-CD3 Antikörpers für 16 Stunden inkubiert. 4 Stunden vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde Monensin und ein Fluoreszenz-markierter anti-CD107a mAk zugegeben. Als Kontrollen dienten DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper sowie eine MCSP-negative Tumorzelllinie. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und mit Fluoreszenz-konjugierten mAk anti-CD4 (T_{Helfer} -Kulturen) oder anti-CD8 (CTL-Kulturen) gefärbt. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Fluorochrom-konjugiertem anti-Perforin mAk gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Hier dargestellt ist eine exemplarische Analyse einer durchflusszytometrischen Analyse zur Degranulierung und Perforinexpression in einer Kokultur von CTL und Colo-38-Zellen in Gegenwart von 50 ng/ml MCSP-CD3. Die Frequenzen degranulierender / Perforin-positiver T-Zellen in den unterschiedlichen Ansätzen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Frequenzen degranulierender / Perforin-positiver T-Zellen in Prozent

		CD8 ⁺ /CD107a ⁺	CD8 ⁺ /Perforin ⁺	CD4 ⁺ /CD107a ⁺	CD4 ⁺ /Perforin ⁺
MCSP-CD3 [ng/ml]	500	49.8 ± 1.2	29.9 ± 3.4	48.3 ± 4.9	2.8 ± 0.9
	50	50.2 ± 1.6	29.3 ± 2.7	46.2 ± 3.2	3.7 ± 1.4
	5	23.9 ± 2.3	15.2 ± 2.1	3.0 ± 1.9	1.2 ± 0.3
	0.5	2.4 ± 0.9	0.6 ± 0.7	1.1 ± 0.3	0.4 ± 0.1
	0	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
	500*	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.5
anti-MCSP [ng/ml]	500**	16.3 ± 2.7	11.2 ± 1.3	3.3 ± 0.6	1.3 ± 0.3
	500	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
DP47-CD3 [ng/ml]	500	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1

* = ohne Tumorzellen ** = MCSP⁺ Tumorzellen

5.1.6 T_{Helfer} induzieren TNF- α -unabhängige Lyse der Melanomzellen

Die induzierte Lyse der Melanomzellen durch CTL war abhängig von der eingesetzten Konzentration des bispezifischen MCSP-CD3 Antiköpers. In diesem Zusammenhang wurden hohe IFN- γ und IL-2-Konzentrationen im Kulturüberstand sowie eine erhöhte Degranulierung und Perforinfreisetzung nachgewiesen (Tabelle 2 und 3). Im Gegensatz hierzu korrelierte die induzierte Tumorzelllyse durch T_{Helfer} zwar mit einer ebenso erhöhten Degranulierung, jedoch konnten nur bis zu 5 % Perforin-positive Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 3). Im Überstand von MCSP-CD3-behandelten T_{Helfer}-Kokulturen waren sehr hohe Mengen an TNF- α nachweisbar (Abbildung 8). Auch die durchflusszytometrische Analyse wies in bis zu 50 % aller T_{Helfer} intrazelluläres TNF- α nach (Tabelle 2). TNF- α kann unter bestimmten Umständen zytotoxisch wirken oder Apoptose induzieren. Vor allem Tumorzellen, die viele TNF-Rezeptoren exprimieren, können anfällig für TNF- α -vermittelte Apoptose sein [135]. Die hohe TNF- α -Sekretion durch T_{Helfer} stellt somit eine mögliche Erklärung für die Lyse der Melanomzellen dar. Aus diesem Grund wurden isolierte T_{Helfer} bzw. PBMC in einem Verhältnis von 1:1 mit Colo-38-Zellen und absteigender Konzentration des MCSP-CD3 Antiköpers für 48 Stunden inkubiert. In einigen Ansätzen wurde zusätzlich 2 μ g/ml

eines neutralisierenden Antikörpers gegen humanes TNF- α zugegeben und die Zytotoxizität mittels LDH-Freisetzung bestimmt. Die gemessene Lyse der Melanomzellen in Anwesenheit des blockierenden Antikörpers in PBMC- oder T_{Helfer}-Kokulturen zeigte keine statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollkulturen ohne blockierenden Antikörper (Abbildung 11). Die Lyse der Melanomzellen durch T_{Helfer} konnte somit nicht auf die Expression von TNF- α zurückgeführt werden und lässt darauf schließen, dass die observierte Lyse der Tumorzellen anderen Mechanismen zugrunde liegt.

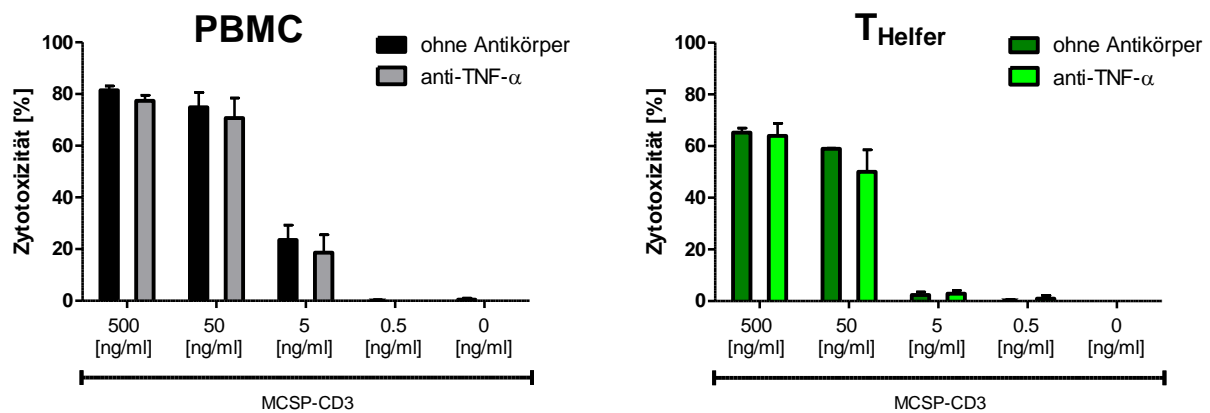


Abbildung 11: Einfluss von TNF- α auf die induzierte Lyse der Melanomzellen

Die Untersuchung der Zytotoxizität wurde mit dem LDH-Freisetzungssassay durchgeführt. Colo38-Zellen wurden mit PBMC (schwarz) oder isolierten T_{Helfer} (grün) in einem Verhältnis von 1:1 mit absteigender Konzentration des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers inkubiert. Zusätzlich wurde 2 μ g/ml eines neutralisierenden Antikörpers gegen TNF- α zugegeben. Der Zellkulturüberstand wurde nach 48 Stunden abgenommen und die darin enthaltene LDH-Konzentration mittels Farbumschlag im ELISA-Fotometer bestimmt. Der Prozentsatz der induzierten Lyse wurde anhand der maximalen Lyse durch Zugabe von Triton errechnet.

5.2 Charakterisierung des humanisierten Mausmodells

Der zweite Teil der Arbeit bestand darin, das Modell der voll-humanisierten Maus zu untersuchen. Durch die intrahepatische Inokulation hämatopoetischer Stammzellen in $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse sollte die Entwicklung eines humanen Immunsystems erreicht werden. Im Hinblick auf T-Zell-rekrutierende bispezifische Antikörper lag der Fokus auf der Entwicklung humaner T-Zellen im murinen Thymus sowie auf deren phänotypischen und funktionellen Charakterisierung. Die im Folgenden dargestellten immunhistologischen und durchflusszytometrischen Analysen der Thymi, Lymphknoten, Milzen und des Knochenmarks stehen repräsentativ für jeweils mindestens drei humanisierte Mäuse.

5.2.1 Nach Injektion humaner hämatopoetische Stammzellen kommt es zur Besiedelung des Knochenmarks in $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse

Neugeborene $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurden am Tag ihrer Geburt mit 1,5 Gy sublethal bestrahlt. Die Bestrahlung führte zur Abtötung lymphoider Zellen, zur Räumung der Stammzellnischen im Knochenmark und verbesserte somit die Einwanderung und das Anwachsen der humanen Blutstammzellen (HSC) im murinen Knochenmark ^[139]. Am darauffolgenden Tag wurden den vorbehandelten Tieren 2×10^5 CD34-positive HSC aus Nabelschnurblut intrahepatisch injiziert. Die humanen HSC koexprimierten zu diesem Zeitpunkt die HSC-assoziierten Antigene CD34 und CD133 (Abbildung 12).

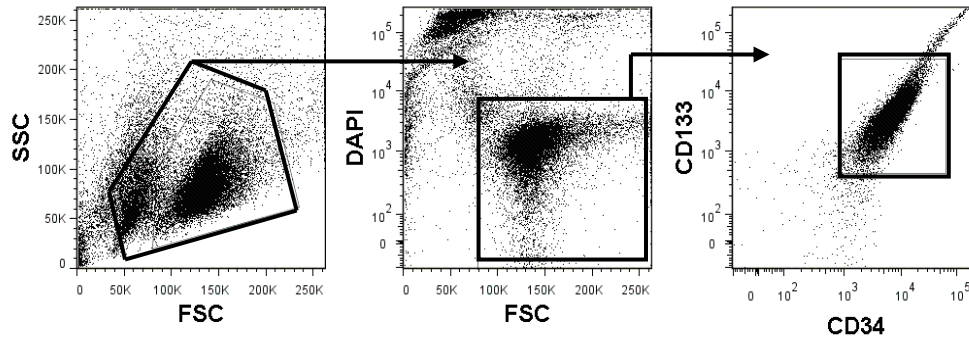


Abbildung 12: Phänotypisierung der hämatopoetischen Stammzellen

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der verwendeten Nabelschnurblutzellen nach Färbung mit Fluorochrom-markierten mAk anti-CD34 und anti-CD133. Zur Exklusion von toten Zellen wurde die Zellsuspension zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt und nur DAPI-negative Zellen analysiert.

In Woche 1 und Woche 10 nach Stammzellinjektion wurden humanisierte Mäuse getötet und das Knochenmark mittels Durchflusszytometrie und Immunhistologie untersucht. Bereits an Tag 7 nach Stammzellinjektion konnte eine Besiedelung des Knochenmarks mit CD45-positiven humanen Leukozyten immunhistochemisch detektiert werden (Abbildung 13A). In Woche 10 wurde das Knochenmark durch Ausspülen der Femurs isoliert und die Erythrozyten lysiert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab einen Prozentsatz humaner Leukozyten von 20 – 60 % (Abbildung 13B). Innerhalb der humanen Population konnten CD34/CD133-positive HSC nachgewiesen werden (Abbildung 13B). Auch immunhistochemisch konnten humane Leukozyten im gesamten Knochenmark der Tiere lokalisiert werden (Abbildung 13A).

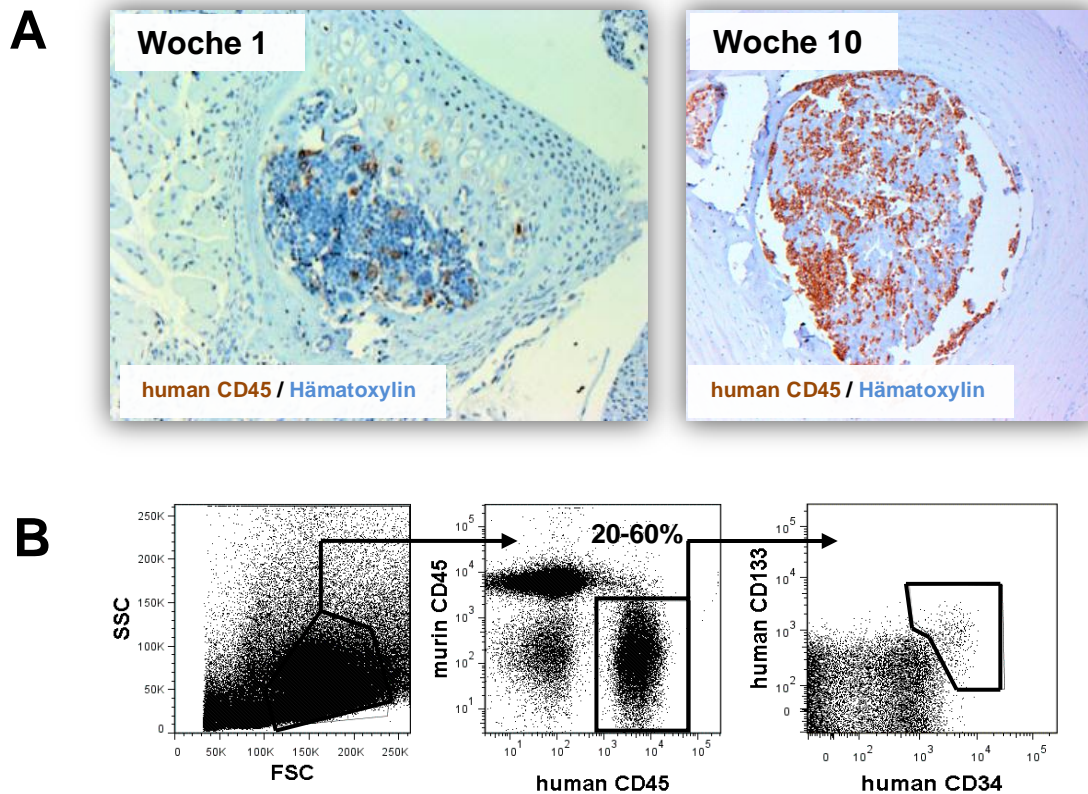


Abbildung 13: Analyse des Knochenmarks humanisierter Mäuse

(A) Humanisierte $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurden in Woche 1 und Woche 10 nach Stammzellinjektion getötet. Die Femura wurden entnommen und zur immunhistologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet. Ca. $2\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte wurden mit anti-CD45 mAk gefärbt (braun). Zur Visualisierung der Kerne wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt.

(B) 10 Wochen nach Stammzelltransfer wurde das Knochenmark humanisierter Tiere durch ausspülen der Femura gewonnen, Erythrozyten lysiert, die Zellsuspension mit anti-murin-CD45 mAk und anti-human-CD45/CD34/CD133 gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden zuerst aufgrund ihrer speziesspezifischen CD45-Expression in murine und humane Immunzellen aufgeteilt. Innerhalb der humanen CD45-positiven Zellpopulation wurden CD34/CD133-positive Vorläuferzellen detektiert.

5.2.2 Humane T-Zellen differenzieren im murinen Thymus

Die Entwicklung humaner T-Zellen ist ein komplexer Prozess. Die Bildung der Vorläuferzellen findet im Knochenmark statt, die Reifung der T-Zellen im Thymus. Ohne diesen Reifungsprozess können keine funktionellen T-Zellen entstehen. Die humane T-Zellreifung im murinen Thymus ist eine essentielle Voraussetzung für die Etablierung eines humanisierten Mausmodells zur *in vivo*-Analyse humaner T-Zellantworten. Deshalb wurde zunächst die Funktionalität der peripheren T-Zellen in den Tieren untersucht.

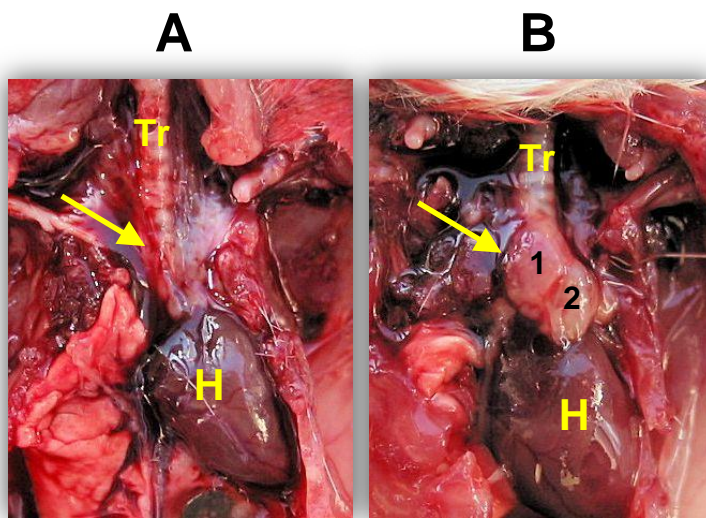


Abbildung 14: Aufnahme des Thymus unbehandelter und humanisierter Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} Mäuse

Dargestellt ist die Aufnahme eines unbehandelten (A) und eines humanisierten (B) Tieres in Woche 10 nach Injektion der hämatopoetischen Stammzellen. Der Thymus (gelber Pfeil) entwickelt sich in zwei Hauptlappen (1 und 2) oberhalb des Herzens „H“ in der Nähe der Trachea „Tr“.

10 Wochen nach der Injektion humaner hämatopoetischer Stammzellen wurden die Mäuse getötet und die Thymi durch Öffnung des Brustkorbs freigelegt. Unbehandelte Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} Mäuse dienten als Kontrolle und wurden auf gleiche Weise präpariert. Während in unbehandelten Mäusen lediglich Thymusanlagen detektiert wurden, konnten die Thymi humanisierter Mäuse oberhalb des Herzens auf der Luftröhre lokalisiert (Abbildung 14) und entnommen werden. Nach Verarbeitung zu Einzelzellsuspensionen bzw. nach der histologischen Aufarbeitung erfolgten nähere Analysen zur zellulären Verteilung und T-Zelldifferenzierung. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden neben murinen Immunzellen, 80 - 90 % humane CD45-positive Leukozyten nachgewiesen (Abbildung 15A).

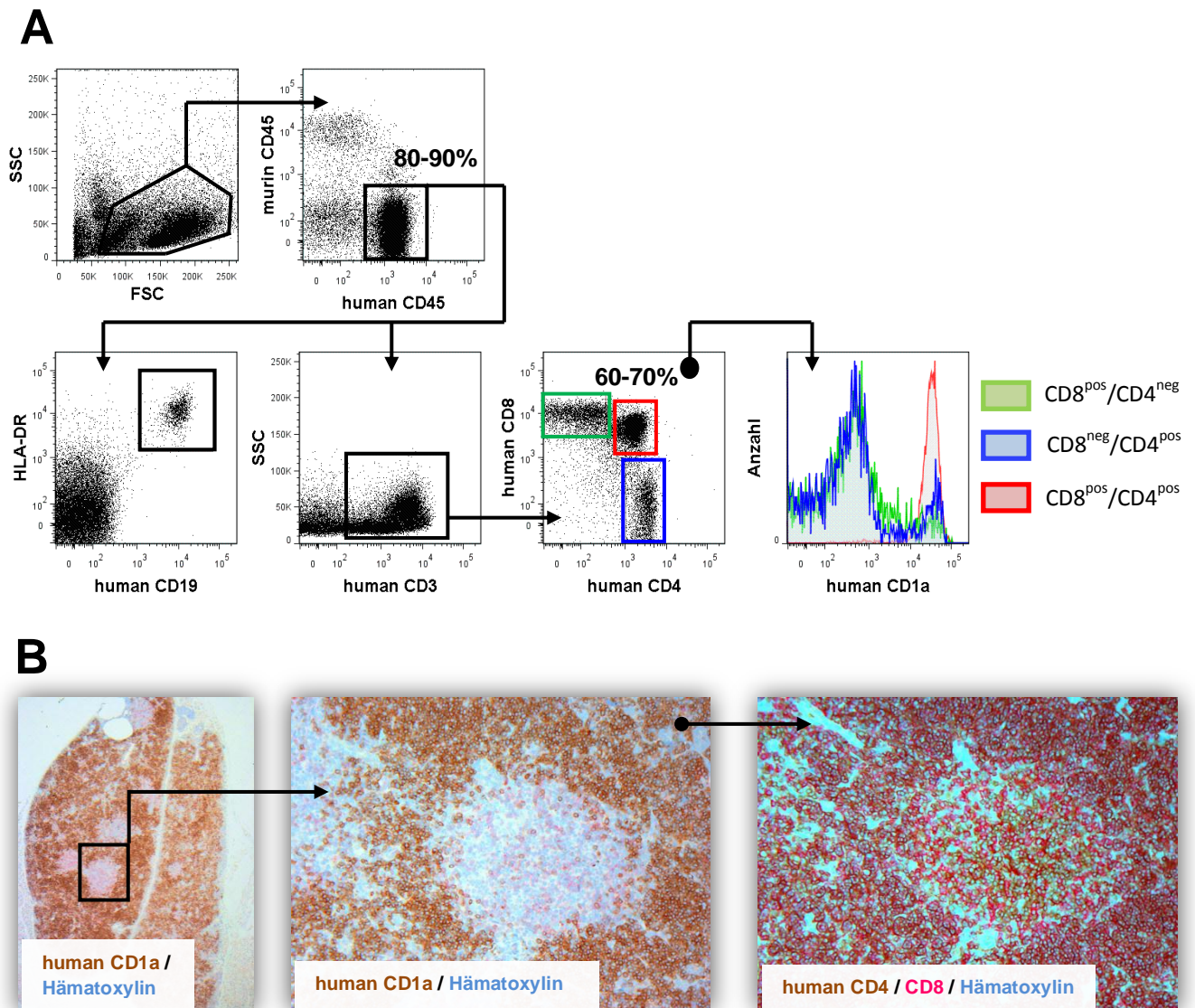


Abbildung 15: Durchflusszytometrische und immunhistochemische Analyse des Thymus

Humanisierte Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden in Woche 10 nach Stammzellinjektion getötet. Thymi wurden entnommen, histologisch aufgearbeitet oder zur Analyse am Durchflusszytometer zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet.

(A) Die Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-konjugierten anti-murin-CD45 und anti-human-CD45/CD3/CD19/HLA-DR/CD1a mAk gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden zuerst aufgrund ihrer speziesspezifischen CD45-Expression in murine und humane Immunzellen aufgeteilt. Innerhalb der humanen CD45-positiven Zellpopulation wurden CD19/HLA-DR-positive B-Zellen sowie CD3-positive T-Zellen detektiert. Die CD3-positiven T-Zellen wurden anhand ihrer CD4/CD8-Expression in drei Populationen unterteilt und die CD1a-Expression der einzelnen Populationen im Histogramm dargestellt.

(B) Ca. 2 μm dicke Paraffinschnitte der Thymi wurden mit mAk anti-CD1a oder anti-CD4/CD8 gefärbt. Zur Visualisierung der Kerne wurden die Schnitte mit H&E gefärbt

Innerhalb der humanen Leukozytenpopulation dominierten neben CD19/HLA-DR-positiver B-Zellen, CD3-positiver Thymozyten (Abbildung 15A). Humane Thymozyten konnten anhand ihrer CD4/CD8-Expression in zwei Hauptdifferenzierungsstadien eingeteilt werden. CD4/CD8-doppelpositive Thymozyten im Cortex, die durch ihre CD1a-Expression von CD4- oder CD8-einfachpositiven medullären Thymozyten unterschieden werden konnten ^[140]. Eine erfolgreiche Differenzierung von doppelpositiven in einfachpositive Thymozyten spricht für die Generierung eines funktionellen TZR und ist essentiell für die Entwicklung reifer T-Zellen.

Auf den CD4/CD8-doppelpositiven Thymozyten wurde außerdem, im Gegensatz zu einfachpositiven Zellen, die Cortex-assoziierte Expression von CD1a nachgewiesen (rote Population in Abbildung 15A). Diese Zellpopulation machte den Großteil aller humanen CD3-positiven Thymozyten mit bis zu 70 % aus. Neben den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die Thymi auch immunhistochemisch analysiert. Abbildung 15B zeigt eine exemplarische Färbung für CD1a. Im seriellen Gewebeschnitt konnte gezeigt werden, dass die CD1a-negative Thymozyten entweder CD4 oder CD8 exprimierten. CD1a-positive Zellen hingegen wiesen eine Doppelexpression für CD4 und CD8 auf, was durch eine Farbüberlagerung gezeigt werden konnte (Abbildung 15B).

5.2.3 Entwicklung humaner regulatorischer T-Zellen im Thymus (tT_{reg}) humanisierter Mäuse

Neben CD4- und CD8-positiven T-Zellen werden im Thymus auch spezielle Suppressorzellen gebildet, die zur Erhaltung peripherer Toleranz beitragen. Diese Thymus-abstammigen regulatorischen T-Zellen (tT_{reg}) sind CD4 positiv, exprimieren konstitutiv die alpha-Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und den Transkriptionsfaktor FoxP3^[141]. Regulatorische T-Zellen verhindern die Entstehung von Autoimmunität durch Suppression potentiell autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie^[141, 142]. Bei Krebserkrankungen ist eine erhöhte Frequenz und/oder Aktivität von T_{reg} jedoch mit einer ineffizienten Immunantwort assoziiert^[143, 144]. Da T_{reg} für die Homeostase von T-Zell-vermittelten Immunantworten notwendig sind, ist die Untersuchung der T_{reg}-Entstehung essentiell für die Entwicklung von aussagekräftigen humanisierten Mausmodellen.

Zum Nachweis von tT_{reg} in humanisierten Mäusen wurden die Tiere 10 Wochen nach dem Stammzelltransfer getötet, Thymi histologisch aufgearbeitet und immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 16 zeigt eine exemplarische T_{reg}-Analyse im Thymus der Tiere. Zur Darstellung der Medulla wurden die Thymi in einem ersten Schnitt mit mAk gegen human CD4 und CD8 gefärbt (Abbildung 16A, 16B). In der Medulla befanden sich CD4- oder CD8-positive T-Zellen, die, wie in Abbildung 16 dargestellt, klar von Cortex-ständigen T-Zellen, die eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale aufwiesen, abgegrenzt werden konnten. In einem weiteren, seriellen Schnitt wurde das Gewebe zur Detektion von tT_{reg} mit mAk CD3 und FoxP3 gefärbt. FoxP3-positive T-Zellen konnten auf diese Weise in der Medulla humanisierter Mäuse nachgewiesen werden.

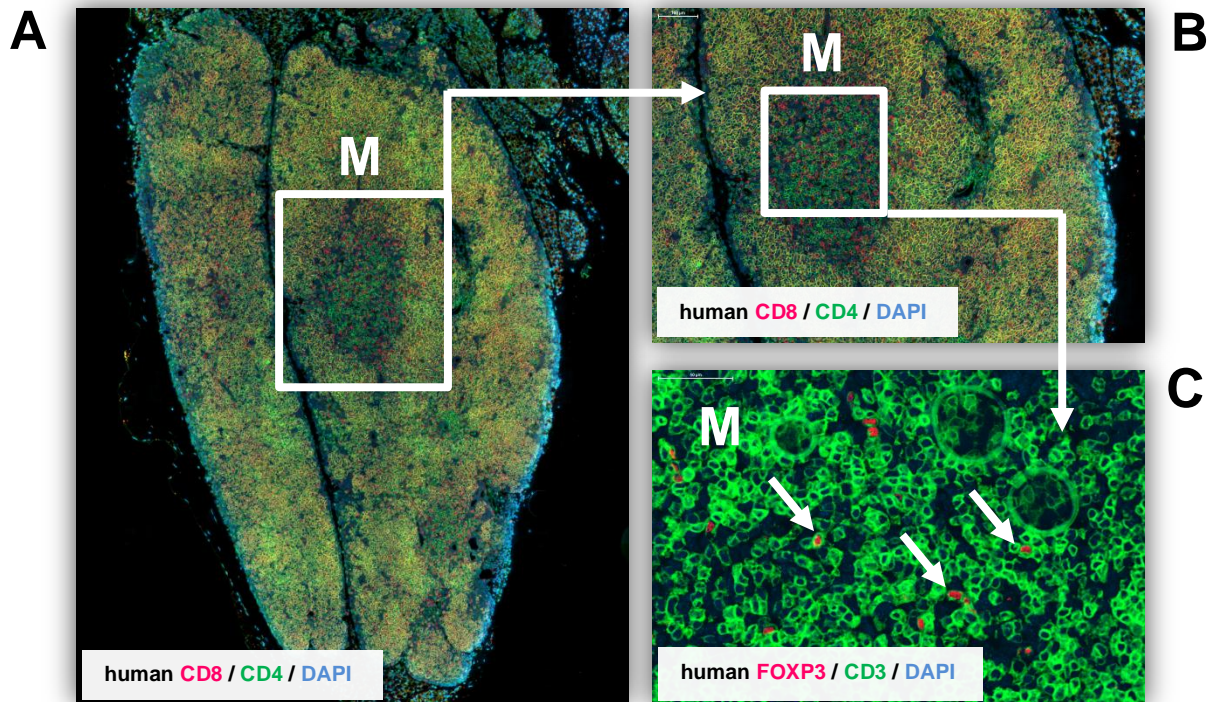


Abbildung 16: Nachweis Thymus-abstammiger regulatorischer T-Zellen im murinen Thymus

Humanisierte $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurden in Woche 10 nach Stammzellinjektion getötet und Thymi histologisch aufgearbeitet.

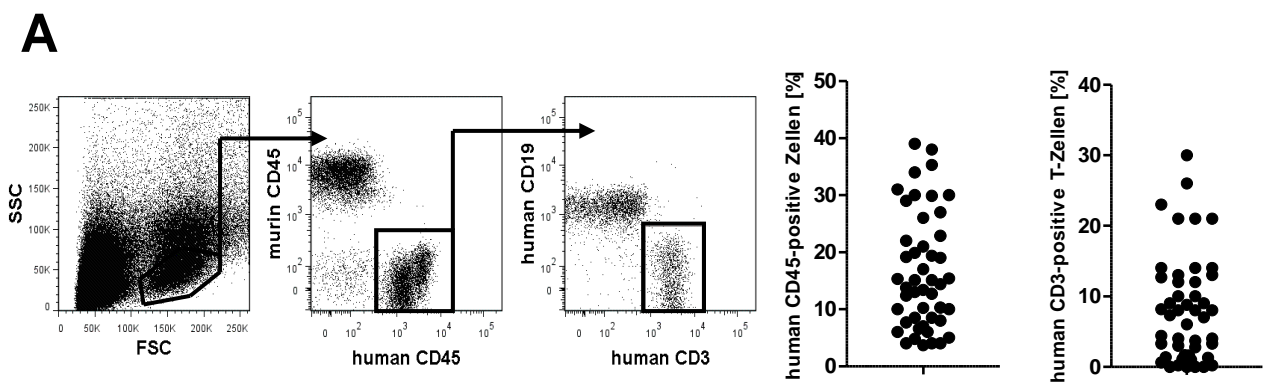
(A-B) Ca. 2 μm dicke Paraffinschnitte wurden zur Visualisierung der Medulla mit anti-human-CD4 (grün) und anti-human-CD8 (rot) mAk in Kombination mit Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Medulla (M) wurde als CD4- und CD8-einfachpositiver Bereich detektiert.

(C) Im seriellen Paraffinschnitt wurde mit anti-human-CD3 (grün) und anti-human-FoxP3 (rot) mAk in Kombination mit Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. FoxP3-positive Zellen wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

Zur Visualisierung der Kerne wurden alle Schnitte mit Dapi gegengefärbt.

5.2.4 Nachweis humaner T- und B-Zellen in Blut und lymphatischen Organen

Im nächsten Schritt wurde die Besiedelung lymphatischer Organe mit humanen Immunzellen analysiert. Hierzu wurden 50 Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} Mäuse aus unterschiedlichen Würfen mit CD34-positiven HSC humanisiert. 10 Wochen später wurde das Blut der Tiere durchflusszytometrisch untersucht. Wie in Abbildung 17A dargestellt, variierte die Frequenz humaner Immunzellen in den einzelnen Tieren deutlich. In allen Mäusen konnten humane CD45-positive Immunzellen nachgewiesen werden, jedoch variierte die Frequenz zwischen 5 und 40 % der Blutzellen. Es dominierten humane CD3-positiv T-Zellen und CD19-positiv B-Zellen. Myeloide Zellen waren im Blut nur schwach nachweisbar. Parallel zur Blutanalyse wurden Milzen und axiale Lymphknoten entnommen, histologisch aufgearbeitet und mit humanspezifischen mAk gefärbt. In den Abbildungen 17B und 17C ist eine repräsentative immunhistochemische Analyse humaner Immunzellen in Milz und Lymphknoten dargestellt. CD45-positiv humane Immunzellen wurden sowohl in der Milz als auch im Lymphknoten nachgewiesen. CD3-positiv T-Zellen, CD20-positiv B-Zellen und CD68-positiv Makrophagen konnten durch immunhistochemische Dreifachfärbungen detektiert werden. Die Anordnung der humanen T- und B-Zellen in der Milz ähnelte der Struktur von Lymphfollikeln. Humane Makrophagen wurden nur vereinzelt über die gesamte Milz hinweg verstreut nachgewiesen (Abbildung 17B). In den Lymphknoten konnten ebenfalls T-Zell und B-Zellareale nachgewiesen werden (Abbildung 17C), jedoch keine CD68-positiv Makrophagen.



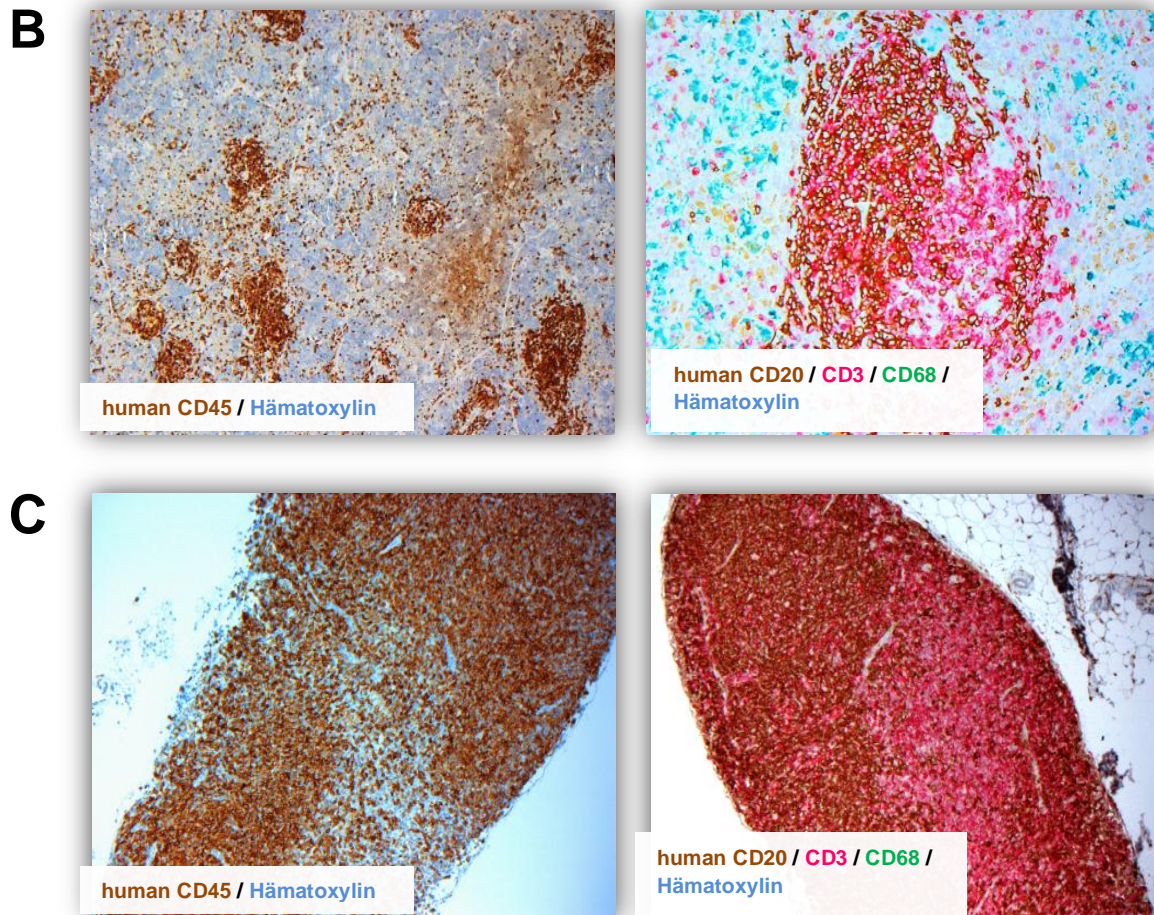


Abbildung 17: Nachweis humaner Immunzellen in Blut, Milz und Lymphknoten humanisierter Mäuse

(A) 10 Wochen nach Stammzellinjektion wurde durch Punktion der lateralen Schwanzvene Blut entnommen. Das gewonnene Blut wurde einer Erythrozytenlyse unterzogen, mit Fluorochrom-konjugierten anti-murin-CD45 und anti-human-CD45/CD3/CD19 mAk gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden zuerst aufgrund ihrer speziesspezifischen CD45-Expression in murine und humane Immunzellen aufgeteilt. Innerhalb der humanen CD45-positiven Population wurden CD3-positive T-Zellen und CD19-positive B-Zellen detektiert. Dargestellt sind eine exemplarische Blutanalyse am Durchflusszytometer und die Auswertung der humanen Immunzellpopulationen in Prozent.

(B und C) Histologische Färbung von Milz (A) und axialem Lymphknoten (B). Ca. 2 μ m dicke Paraffinschnitte wurden mit anti-human-CD45 oder anti-human-CD3/CD20/CD68 mAk gefärbt. Zur Visualisierung der Kerne wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt.

5.2.5 T-Zellen humanisierter Mäuse sind funktionell aktiv

Neben dem histologischen und durchflusszytometrischen Nachweis peripherer T-Zellen, wurde im Folgenden deren Funktionalität nach TZR-vermittelter Aktivierung untersucht. Hierzu wurde Mäusen 10 Wochen nach Stammzelltransfer die Milz entnommen und diese zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Die Milzzellen wurden mit CellTrace Violet gefärbt und für 6 Tage mit PMA/Ionomycin (Abbildung 18A), StaphA (Abbildung 18B), anti-CD3 mAk (Abbildung 18C) oder einer Kombination aus anti-CD3 und anti-CD28 mAk (Abbildung 18D) stimuliert. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin ist, im Gegensatz zu den anderen Stimuli, TZR-unabhängig ^[145]. Wie in Abbildung 18 dargestellt, konnte durch alle Stimuli T-Zellproliferation induziert werden. Nach anti-CD3/CD28-Stimulation produzierten die T-Zellen zudem IFN- γ (Abbildung 19A). Diese Experimente zeigen, dass die humanen T-Zellen in der Peripherie von humanisierten Mäusen grundsätzlich zur Proliferation und Zytokinbildung befähigt sind.

In weiteren Versuchen wurde die Stimulationsfähigkeit der T-Zellen in gemischten Lymphozytenkulturen (kurz: MLR) untersucht. In diesen Assays müssen autoreaktive T-Lymphozyten fremde MHC-Peptidkomplexe auf antigenpräsentierenden Zellen erkennen, um funktionell aktiviert zu werden. CellTrace Violet-gefärbte Milzzellen humanisierter Tiere wurden hierfür mit T-Zell-depletierten, bestrahlten humanen PBMC stimuliert. T-Zell-depletierte, bestrahlte Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen und Milzzellen unbehandelter Rag2^{-/-} γ ^{-/-} Mäuse dienten als Kontrollen. An Tag 3 wurden 10 U/ml humanes IL-2 zugegeben, um die induzierte Proliferation der humanen T-Zellen zu fördern. Die Stimulation mit T-Zell-depletierten humanen PBMC zeigte im Mikroskop deutliche Cluster aktivierter Zellen (rote Pfeile in Abbildung 19B). Zudem wurde humanes IFN- γ produziert (Abbildung 19A). Die Zugabe von blockierendem anti-MHC-Klasse II mAk konnte diese Reaktion beinahe vollständig inhibieren. In Kokulturen mit T-Zell-depletierten Milzzellen aus C57BL/6 bzw. Milzzellen unbehandelter Rag2^{-/-} γ ^{-/-} Mäuse, kam es weder zu einer IFN- γ -Freisetzung (Abbildung 19A), noch zur Ausbildung von Zellclustern (Abbildung 19B). Somit konnte postuliert werden, dass die alloreaktiven humanen T-Zellen MHC-abhängig aktiviert werden. Die zusätzliche Kostimulation mit anti-CD28 mAk verstärkte die Aktivierung und Zytokinproduktion der T-Zellen.

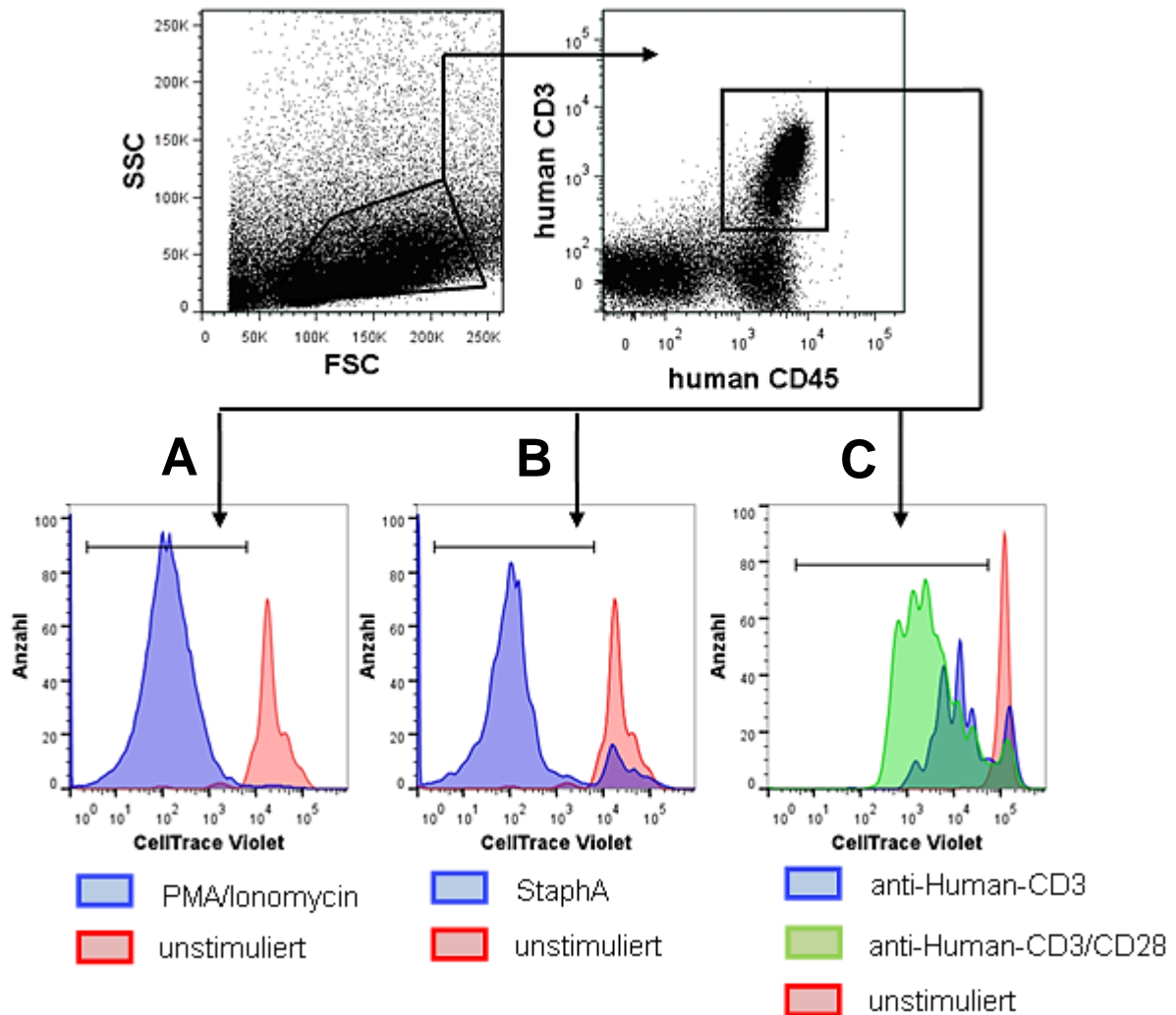


Abbildung 18: Untersuchung zur T-Zellproliferation in Milzzellen humanisierter Mäuse

Humanisierte $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurden in Woche 10 nach Stammzellinjektion getötet. Milzen wurden entnommen, zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet, mit CellTrace Violet gefärbt und für 6 Tage mit PMA/Ionomycin (A), StaphA (B) oder anti-human-CD3 bzw. einer Kombination aus anti-CD3 und anti-CD28 mAk (C) stimuliert. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Milzzellen mit Fluorochrom-konjugierten anti-human-CD45 und anti-human-CD3 mAk gefärbt. Die T-Zellproliferationen wurden im Histogramm dargestellt.

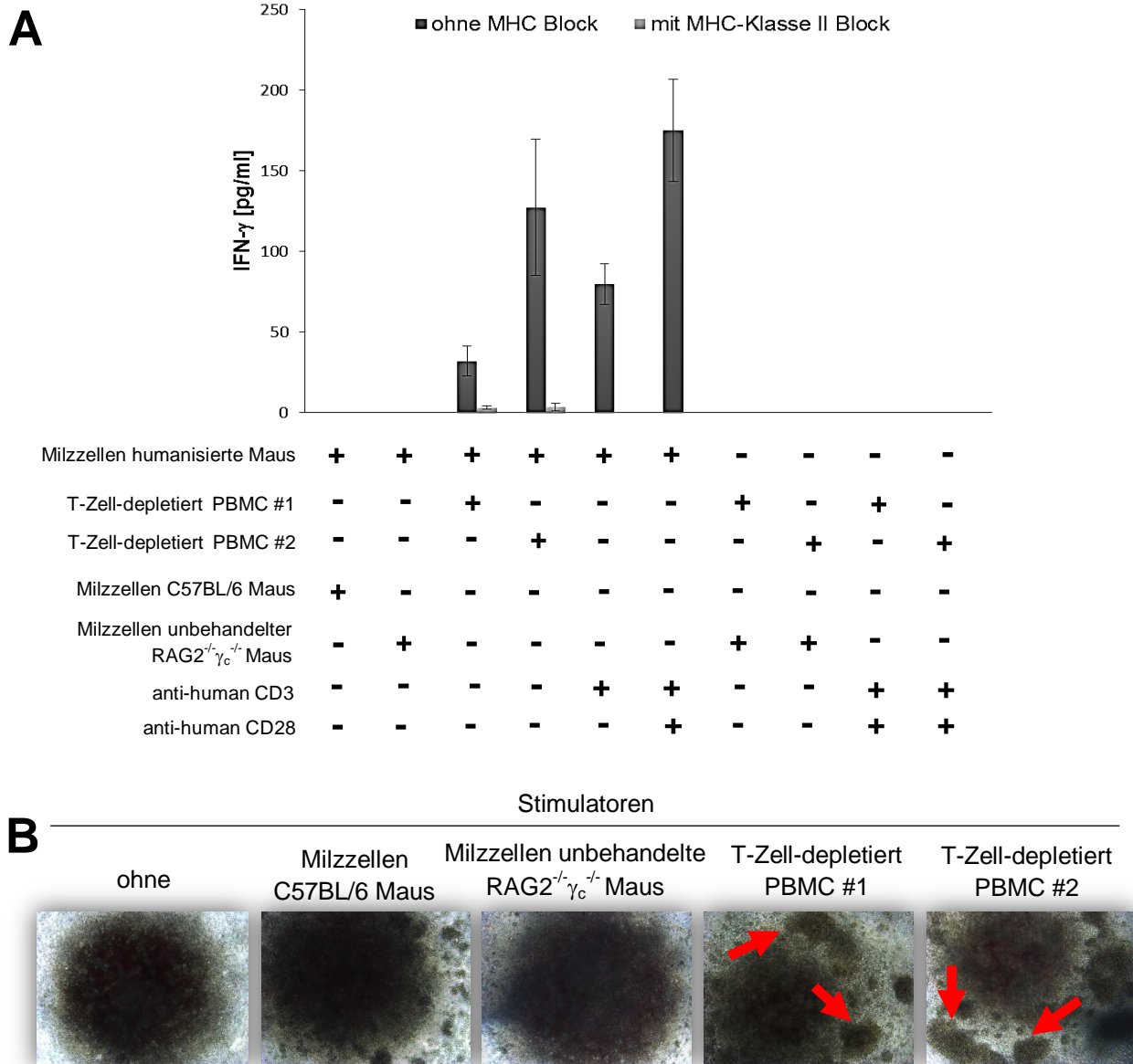


Abbildung 19: IFN- γ -Detektion und Formation von Zellclustern in der MLR

Humanisierte Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} Mäuse wurden in Woche 10 nach Stammzellinjektion getötet. Milzen wurden entnommen, zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und mit CellTrace Violet gefärbt. Milzzellen humanisierter Mäuse wurden in einem Verhältnis von 2:1 mit T-Zell-depletierten, bestrahlten humanen PBMC (Spender #1/#2), T-Zell-depletierten, bestrahlten Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen, Milzzellen unbehandelter Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} Mäuse oder mit anti-CD3 mAk bzw. einer Kombination aus anti-CD3 und anti-CD28 mAk für 6 Tage stimuliert. An Tag 3 der Lymphozytenkultur wurden 10 U/ml humanes IL-2 zugegeben. In manchen Ansätzen wurde ein blockierender anti-MHC-Klasse II mAk zugegeben.

(A) Zellkulturüberstände wurden zur Bestimmung von humanem IFN- γ an Tag 6 abgenommen und mittels BioPlex-System analysiert.

(B) MLR and Tag 6. Zellcluster aktivierter Zellen wurden mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine deutliche Proliferation CD4- und CD8-positiver T-Zellen in der MLR mit T-Zell-depletierten humanen PBMC (Abbildung 20, blaue Population). Diese konnte durch Zugabe von anti-MHC-Klasse II mAk reduziert bzw. vollständig inhibiert werden (Abbildung 20, blaue Population). Im Gegensatz dazu konnte keine Proliferation in Kokulturen mit T-Zell-depletierten Milzzellen aus CB57BL/6 oder Milzzellen unbehandelter $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung 20, blaue Population).

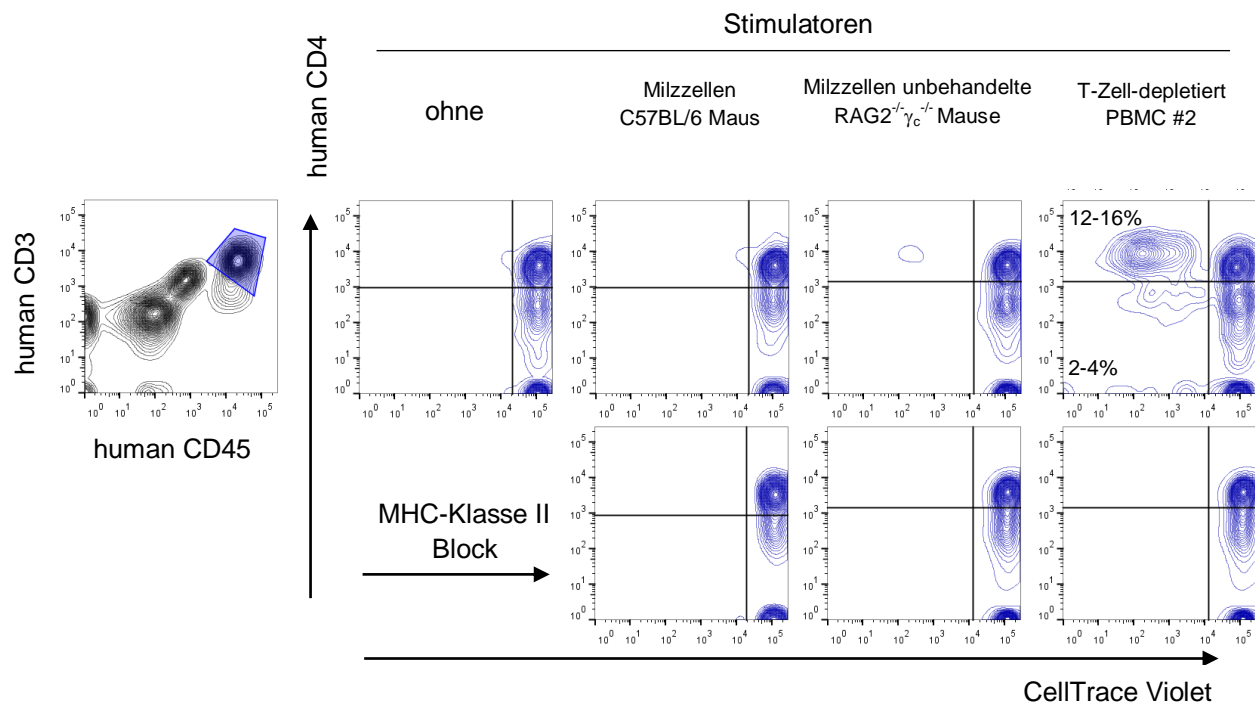


Abbildung 20: Analyse der T-Zellproliferationen in der MLR

Humanisierte $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurden in Woche 10 nach Stammzellinjektion getötet. Milzen wurden entnommen, zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und mit CellTrace Violet gefärbt. Milzzellen humanisierter Mäuse wurden in einem Verhältnis von 2:1 mit T-Zell-depletierten, bestrahlten humanen PBMC, T-Zell-depletierten, bestrahlten Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen oder Milzzellen unbehandelter $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse für 6 Tag stimuliert. An Tag 3 der MLR wurden 10 U/ml humanes IL-2 zugegeben. In manchen Ansätzen wurden blockierende anti-MHC-Klasse II mAk zugegeben. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Kulturen mit Fluorophor-konjugierten anti-human-CD45/CD3/CD4 mAk gefärbt und am MACSQuant analysiert.

5.2.6 MCSP-CD3 induziert konzentrationsabhängige Lyse humaner

Melanomzellen in Anwesenheit von Milzzellen aus humanisierten Mäusen

Nach erfolgreicher Etablierung der Humanisierung konnten die Tiere als Modell zur Analyse des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers *in vivo* verwendet werden. In einem ersten Schritt wurde das Potential von Milzzellen aus humanisierten Mäusen zur antikörperabhängigen Lyse von Tumorzellen *in vitro* untersucht. Die Milzzellen wurden hierfür in einem Verhältnis von 5:1 mit Colo-38-Zellen und absteigender MCSP-CD3-Konzentration für 48 Stunden inkubiert. Als Kontrollen dienten DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper, MCSP-negative Tumorzellen und Milzzellen unbehandelter Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} Mäuse. Wie in Abbildung 21 dargestellt, induzierten nur die Milzzellen humanisierter Mäuse eine Lyse der Melanomzellen. In den Kontrollansätzen wurden keine nennenswerte Zytotoxizität detektiert.

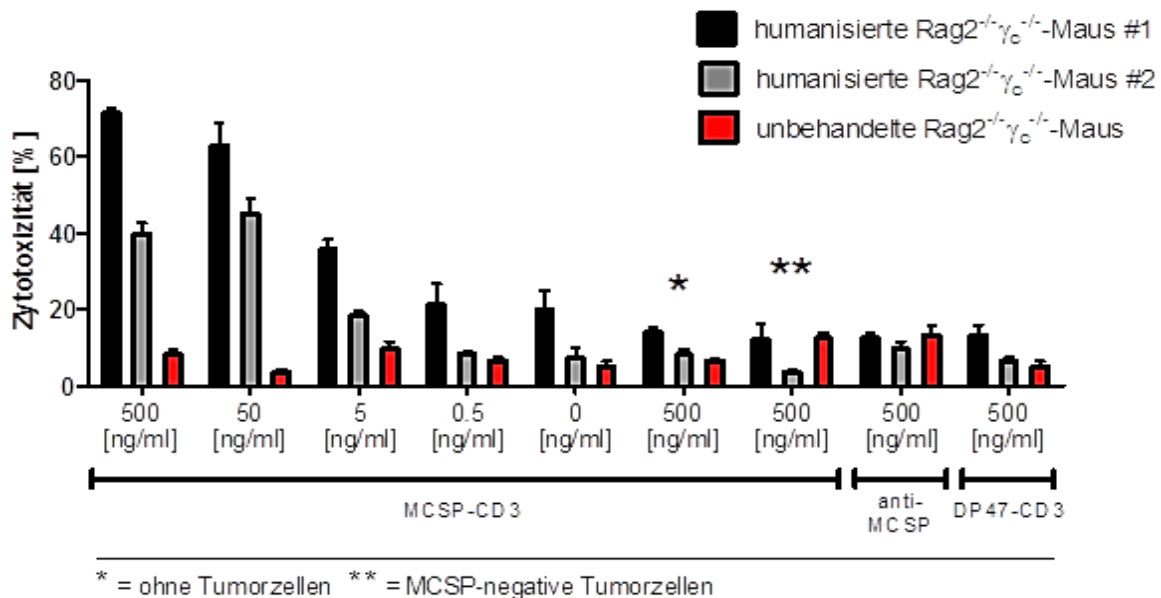


Abbildung 21: Zytotoxizitätsprüfung mit Milzzellen humanisierter Mäuse

Unbehandelte und humanisierte Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} Mäuse aus Woche 10 nach Stammzellinjektion wurden getötet, Milzen entnommen, zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und in einem Verhältnis von 5:1 mit Colo38-Zellen und absteigender Konzentration des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers für 48 Stunden inkubiert. Als Kontrollen dienten der DP47-CD3, der monospezifische anti-MCSP Antikörper sowie MCSP-negative Tumorzellen. Der Zellkulturüberstand wurden nach 48 Stunden abgenommen und die darin enthaltene LDH-Konzentration mittels Farbumschlag im ELISA-Fotometer bestimmt. Der Prozentsatz der induzierten Lyse wurde anhand der maximalen Lyse durch Zugabe von Triton errechnet.

5.3 Untersuchungen zur Wirkungsweise des bispezifischen Antikörpers *in vivo*

Nachdem das Mausmodell erfolgreich etabliert werden konnte, war es möglich, den humanisierten Tieren Tumore zu setzen und das therapeutische Potential des bispezifischen Antikörpers in diesem präklinischen Modells *in vivo* zu testen.

5.3.1 Untersuchungen zum Anwachsen der Melanomzelllinie Colo-38 in humanisierten Mäusen

Zwölf Wochen nach erfolgreicher Humanisierung von Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen wurden 10⁷ Colo-38-Zellen subkutan implantiert (Abbildung 22). Parallel hierzu wurden 10⁷ Colo-38-Zellen in unbehandelte Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse injiziert. Die Tumorgroße wurde wöchentlich bestimmt und für gewöhnlich wurde 4 Wochen nach Injektion eine mittlere Tumorgroße von 100 mm³ erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden Tumore entnommen, histologisch aufgearbeitet und Morphologie, Angiogenese und die Expression von melanomassoziierten Antigenen untersucht. In Abbildung 22 ist eine exemplarische Untersuchung von MCSP, MelanA/MART-1 (melanomassoziiertes Protein), murin CD34 (Blutgefäßmarker) und eine H&E-Färbung dargestellt. Die subkutan wachsende Colo-38-Zelllinie exprimierte auch *in vivo* das Zielantigen MCSP und das melanomassoziierte Protein MelanA/MART-1. Die Tumore wiesen ein noduläres Wachstumsverhalten auf, wobei vitale Tumorzellen in der Nähe CD34-positiver Blutgefäße lagen. Tote Tumorzellen wurden anhand der HE-Färbung detektiert (Abbildung 22, HE-Färbung). Insgesamt war auffällig, dass Colo38-Tumore nur im geringen Maße von Blutgefäßen durchzogen waren, was auf eine geringe Tumorangiogenese hindeutete (CD34-Färbung in Abbildung 22).

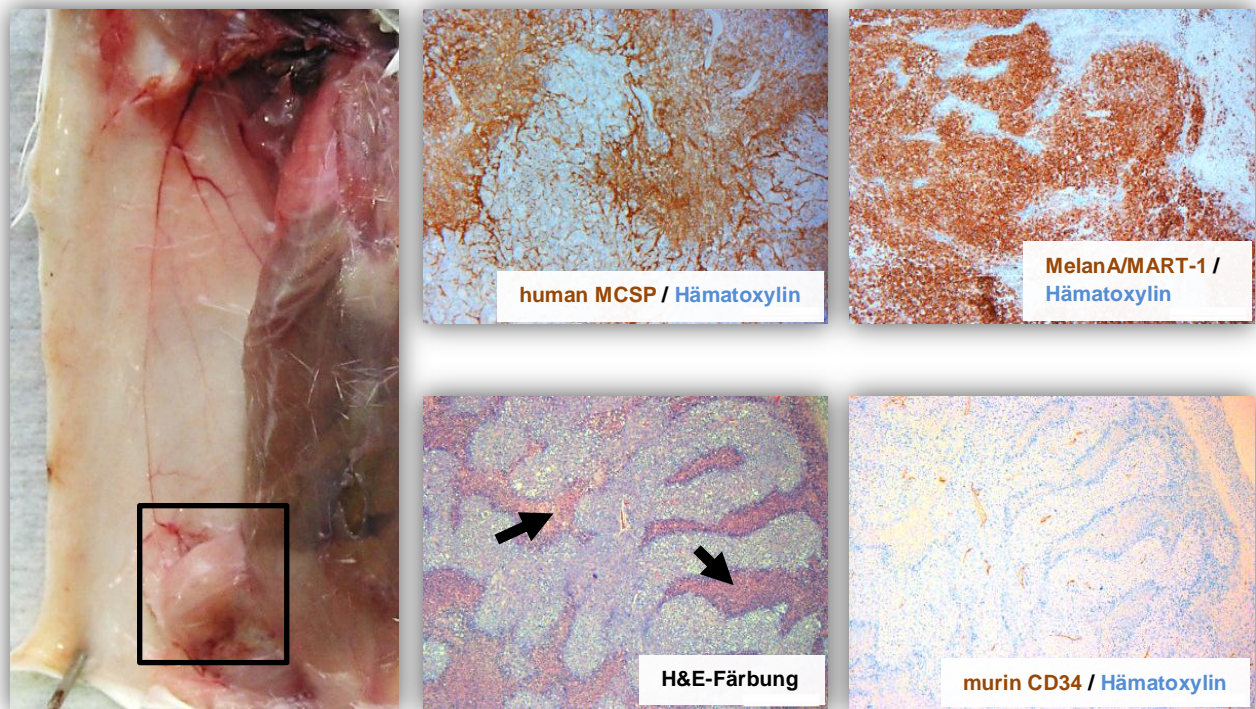


Abbildung 22: Histologische Untersuchung der Colo-38 Melanome in humanisierten Mäusen

Humanisierte $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurden in Woche 12 nach Stammzellinjektion mit 10^7 Colo-38-Zellen subkutan injiziert. Bei einem Tumolvolumen von ca. 100 mm^3 (ca. 4 Wochen nach Tumorzellinjektion) wurden einige Tiere getötet, subkutane Tumore (schwarzer Pfeil) entnommen und histologisch aufgearbeitet. Ca. $2 \mu\text{m}$ dicke Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (H&E-Färbung), mit anti-MCSP mAk, anti-MelanA/MART-1 und anti-murin-CD34 mAk gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden zur Visualisierung der Kerne ebenfalls mit Hämatoxylin gegengefärbt. Areale toter Tumorzellen (stark violette Areale in H&E-Färbung) wurden mit Pfeilen gekennzeichnet.

5.3.2 Wirksamkeitsstudie in humanisierten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen

Zur Analyse des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers *in vivo* wurden unbehandelten und humanisierten Mäusen 10⁷ Colo-38-Zellen subkutan injiziert. Die Antikörpertherapie wurde bei einem mittleren Tumolvolumen von 100 mm³ gestartet (Tag 28 nach Tumorinjektion). Unbehandelten (Abbildung 23A) und humanisierten (Abbildung 23B) tumortragenden Mäusen (fünf Tiere pro Behandlungsgruppe) wurde entweder der bispezifische MCSP-CD3 oder DP47-CD3 Antikörper intraperitoneal injiziert. Pufferlösung ohne Wirksubstanz diente als Kontrolle. Die beiden Therapiegruppen erhielten anfangs zweimal wöchentlich eine Dosis der bispezifischen Antikörper von 200 µg/kg. An Tag 48 nach Tumorzellinjektion wurde die Dosis von 200 auf 1000 µg/kg erhöht. Die Behandlung mit dem bispezifischen MCSP-CD3 Antikörper in unbehandelten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen wies keinen Unterschied im Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe oder der Behandlung mit DP47-CD3 auf (Abbildung 23A). Im Gegensatz hierzu konnte unter Behandlung mit MCSP-CD3 in humanisierten Mäusen reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrolle und zur Behandlung mit DP47-CD3 (Abbildung 23B) beobachtet werden. Bis Tag 45 nach Tumorinjektion zeigte die Behandlung mit 200 µg/kg MCSP-CD3 Antikörper eine signifikante Inhibition (P-Wert < 0,05) des Tumorwachstums. Diese Signifikanz konnte ab Tag 48 nicht mehr nachgewiesen werden und die Dosis der bispezifischen Antikörper wurde daraufhin erhöht. Die Konzentrationserhöhung hatte jedoch keinen Einfluss auf das Tumorwachstum und es konnten bis zum Studienende an Tag 60 (P-Wert > 0,1) keine signifikanten Unterschiede im Tumolvolumen detektiert werden.

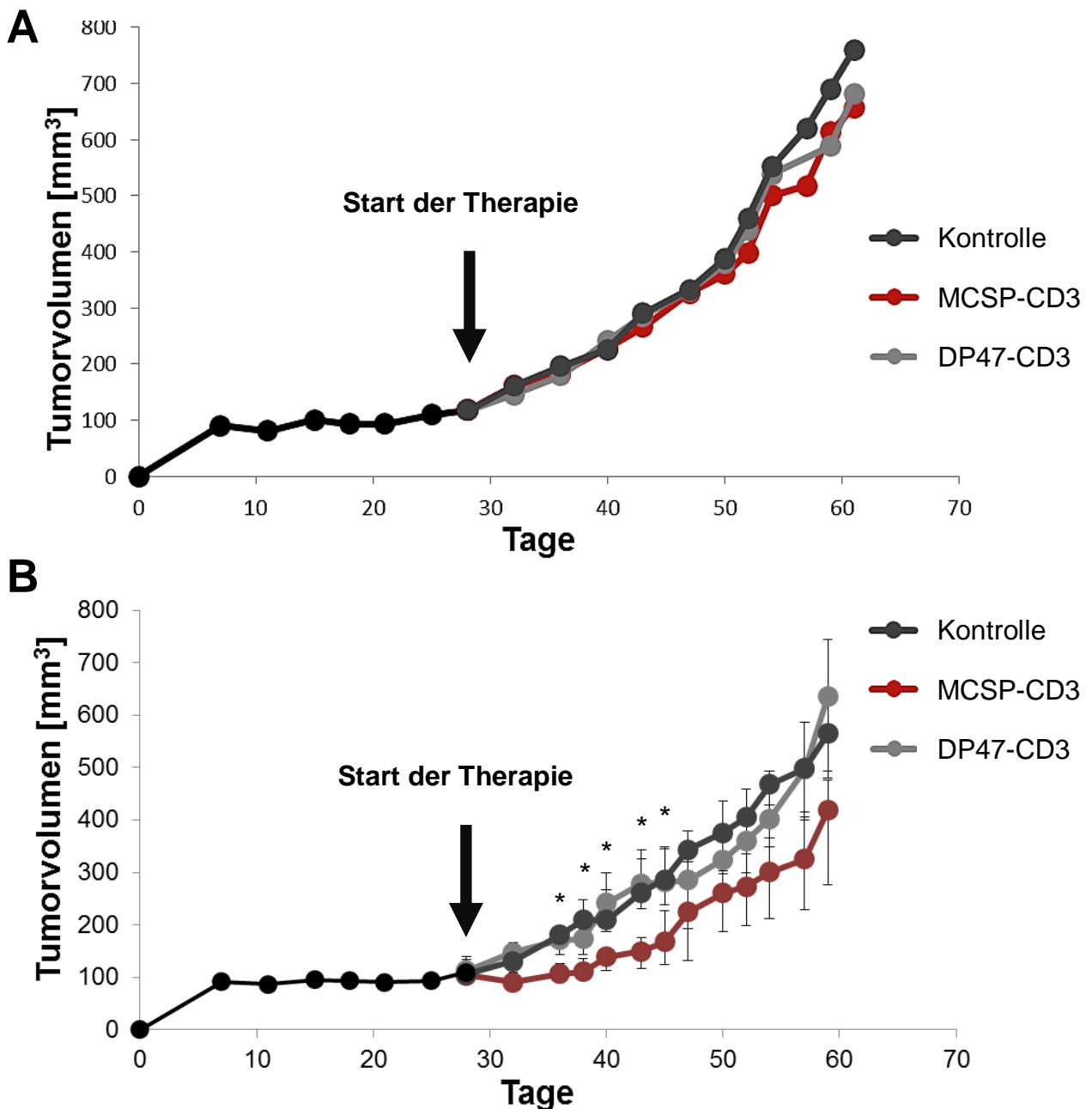


Abbildung 23: Verlauf des Tumorstadiums unter Behandlung

Unbehandelten Rag2^{-/-}γC^{-/-} (A) und humanisierten Mäusen (B) wurden 10⁷ Colo-38-Zellen subkutan injiziert. Das Tumorstadium wurde zweimal wöchentlich mit einem Parallelschieber gemessen. Bei einem Tumorstadium von ca. 100 mm³ (Tag 28 nach Tumorzellinjektion) wurden die Mäuse durch i.p. Injektion zweimal wöchentlich mit 200 μg/kg der bispezifischen Antikörper oder Antikörperpuffer (Kontrolle) therapiert (fünf Tiere pro Gruppe). Die Dosis wurde am Tag 48 von 200 auf 1000 μg/kg erhöht. Die statistische Auswertung wurde anhand des gepaarten t-Tests mit zweiseitiger Verteilung berechnet (* P-Wert < 0.05).

5.3.3 MCSP-CD3 erhöht die Anzahl humaner T-Zellen im Tumorgewebe

Sechzig Tage nach Inokulation der Tumore wurden die Melanome entnommen und für Untersuchungen zur T-Zellinfiltration histologisch aufgearbeitet. Die Gewebeschnitte wurden zuerst mit anti-CD3 mAk gefärbt. Abbildung 24A zeigt eine repräsentative T-Zellfärbung im Tumorgewebe der unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Die humanisierten Tiere, die mit MCSP-CD3 therapiert wurden, wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine erhöhte Anzahl humaner CD3-positiver T-Zellen auf, jedoch war die Frequenz an T-Zellen allgemein gering. In Tumoren die mit DP47-CD3 oder Antikörperpuffer (Kontrolle) therapiert wurden, konnten nur sehr vereinzelt humane T-Zellen detektiert werden. Die Färbung für Melan-A/MART-1 zeigte, dass die Tumore ein noduläres Wachstumsverhalten aufwiesen (als „N“ gekennzeichnete Areale im Tumor in Abbildung 24B). Unter Behandlung mit MCSP-CD3 konnten die humanen T-Zellen nur außerhalb dieser Nodules nachgewiesen werden und nicht innerhalb dieser Tumorstrukturen (Abbildung 24B).

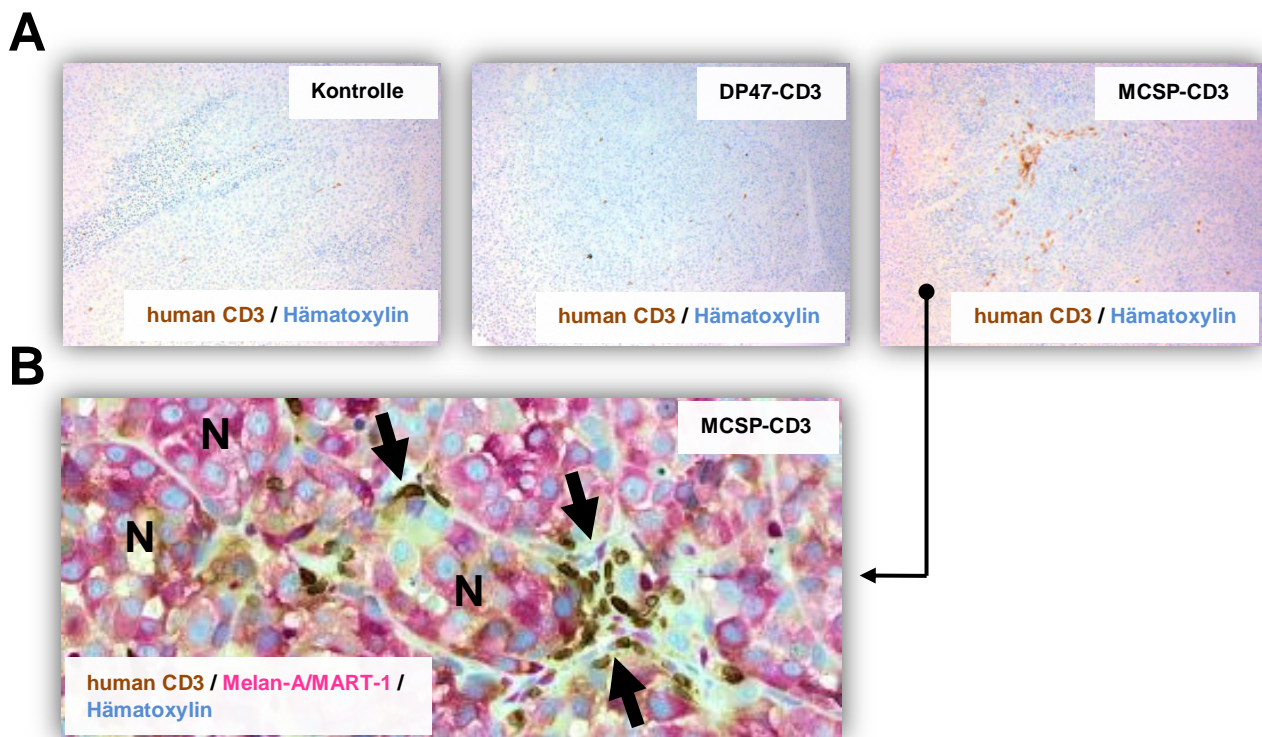


Abbildung 24: T-Zellinfiltration im Primärtumor unter Behandlung

An Tag 60 nach subkutaner Tumorzellinjektion in humanisierten und therapierten $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ Mäusen wurden die Mäuse getötet, die humanen Melanome explantiert und histologisch aufgearbeitet.

(A) Ca. 2 μ m dicke Gewebeschnitte der verschiedenen Behandlungsgruppen wurden mit anti-CD3 mAk gefärbt.

(B) Ca. 2 μ m dicke Gewebeschnitte der MCSP-CD3 therapierten Mäuse, wurden mit anti-CD3/Melan-A/MART-1 mAk doppelgefärbt. CD3-positive humane T-Zellen wurden mit schwarzen Pfeilen und Tumornodules mit einem „N“ gekennzeichnet.

Alle Gewebeschnitte wurden zur Visualisierung der Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt.

5.3.4 Der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper verfügt über eine geringe Gewebepenetration in Colo-38-Melanome

In den mit MCSP-CD3 behandelten humanisierten Mäusen wurde eine, im Vergleich zu den Kontrolltieren, erhöhte Infiltration humaner T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 26). Die T-Zellen konnten allerdings nur außerhalb der Tumornodules detektiert werden. Eine Erklärung hierfür könnte das Penetrationsverhalten des therapeutischen Antikörpers sein. Aus diesem Grund wurden unbehandelte Colo38-tragende Mäuse mit 20 µg des Fluoreszenz-konjugiertem anti-MCSP Antikörper i.v. injiziert. Einen Tag später konnte in der Nahinfrarotspektroskopie eine Konzentrierung des Fluoreszenzsignals im Tumor detektiert werden (Abbildung 25A). Da diese Analyse keinen Aufschluss darüber gibt, wo der therapeutische Antikörper am Tumor bindet, erhielten die Mäuse zur Färbung der Blutgefäße eine i.v. Injektion mit Fluoreszenz-konjugiertem Lektin, bevor die Tumore entnommen und histologisch aufgearbeitet wurden. Abbildung 25B zeigt die Verteilung des anti-MCSP Antikörpers (grün) im Tumorgewebe. Neben den äußeren Bereichen des Tumors wurde das Signal vorwiegend im Bereich der Lektin-bindenden Blutgefäße (rot) detektiert. Insgesamt jedoch, wiesen nur wenige Melanomzellen eine positive Bindung auf, was auf eine schlechte Antikörperpenetration hinwies. Das Zielantigen wurde somit unter *in vivo*-Bedingungen nur auf einem Bruchteil der Melanomzellen durch den therapeutischen Antikörper gebunden.

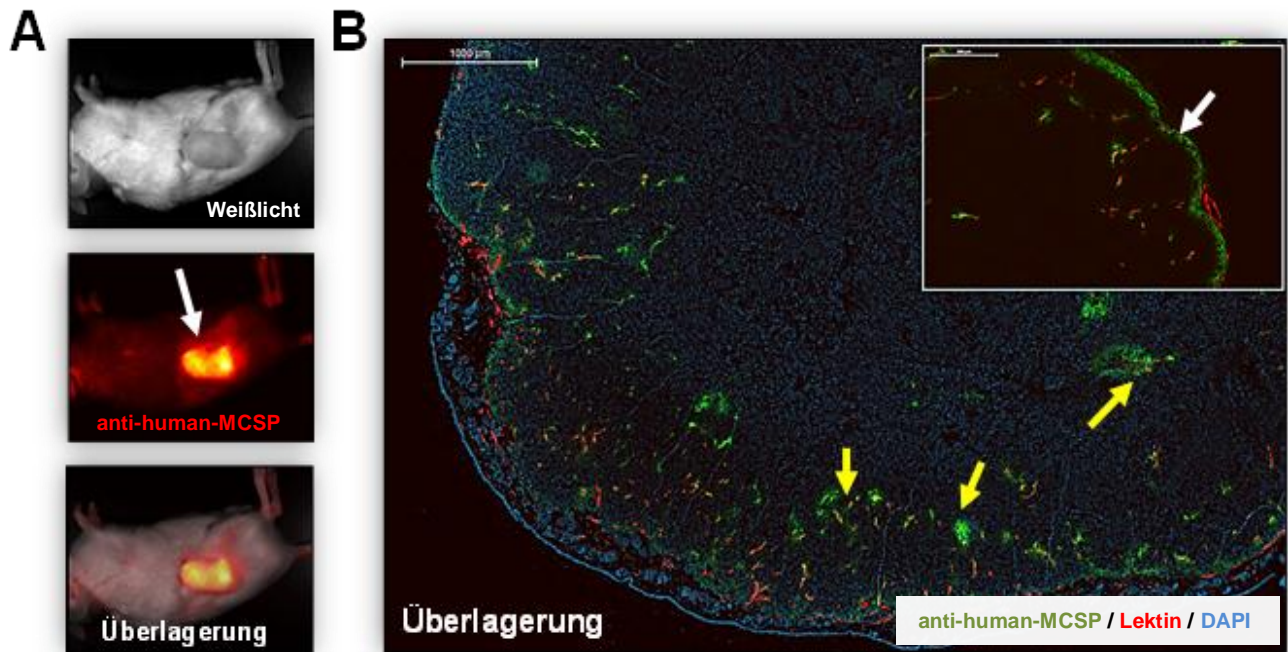


Abbildung 25: Tumorpenetration des anti-MCSP Antikörpers

Unbehandelte $Rag2^{-/-} \gamma_c^{-/-}$ Mäuse wurden 6 Wochen nach der s.c. Injektion der Colo-38-Zellen mit $20 \mu\text{g}$ des Fluoreszenz-markiertem anti-MCSP mAk i.v. injiziert und die Verteilung des Antikörpers in der Nahinfrarotspektroskopie analysiert.

(A) Exemplarisches Ergebnis der Nahinfrarotspektroskopie 24 Stunden nach Antikörperinjektion.

(B) Nach der Nahinfrarotspektroskopie wurden die Mäuse, zur Darstellung der Blutgefäße, zusätzlich mit Fluoreszenz-konjugiertem Lektin i.v. injiziert, nach einer 10-minütigen Verweilzeit getötet, die Tumore entnommen und histologisch aufgearbeitet. Ca. $2 \mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte wurden mit DAPI gefärbt und im Fluoreszenzscanner analysiert. Pfeile zeigen auf die Kolokalisation des anti-MCSP mAk und des Lektinsignals.

6 Diskussion

Die onkologische Forschung entwickelte unterschiedliche T-Zell-basierende Immuntherapien für die Behandlung humaner Melanome. Adoptive T-Zelltherapie ^[146], T-Zell-Gentherapie ^[147] und weitere Ansätze führten bereits zu partiellen oder gar vollständigen Tumorregressionen. Obwohl diese Befunde das Potential von T-Zelltherapien unterstreichen, ist der Transfer autologer tumorantigenspezifischer T-Zellen mit Limitationen verbunden. Die Mehrzahl der bekannten Tumorantigene leiten sich aus Selbstantigenen ab. T-Zellen mit hoher Affinität werden bereits während der Selektion im Thymus eliminiert, um potentielle Autoimmunität zu verhindern. Daher binden natürlich vorkommende TZR meist nur mit schwacher Affinität an ihr Tumorantigen ^[148]. Durch das Einbringen künstlicher Antigenrezeptoren in T-Zellen, sogenannter chimärer Antigenrezeptoren (engl.: Chimeric Antigen Receptors; kurz: CAR), läßt sich zwar die Affinität der T-Zellen zum Tumorantigen steigern und somit das Problem der T-Zellselektion im Thymus umgehen, jedoch ist es hierfür notwendig, patienteneigene T-Zellen zu isolieren und vor ihrer Re-Infusion genetisch zu manipulieren. Problematisch ist auch die zu geringe Überlebensdauer der manipulierten T-Zellen *in vivo*. In einigen klinischen Studien wurde eine positive Korrelation zwischen Tumorregression und Überlebensdauer der transferierten T-Zellen nachgewiesen ^[149, 150]. Eine Alternative zu diesen zellbasierenden Therapieansätzen stellen bispezifische Antikörper dar. Wie innerhalb dieser Arbeit gezeigt wurde, können bispezifische Antikörper in Anwesenheit eines Tumorantigens und CD3-positiver T-Zellen effiziente Tumorzelllyse induzieren. Diese Beobachtung stimmt mit mehreren Arbeiten überein, die bispezifischen Antikörpern ohne zusätzlicher Manipulation der T-Zellen ebenfalls hohe Wirksamkeiten zuschreiben ^[60, 69, 151, 152].

Im Fokus dieser Arbeit standen Untersuchungen zur Wirksamkeit des bispezifischen Antikörpers MCSP-CD3 *in vitro* und im humanisierten Mausmodell *in vivo*. So wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper in Kokulturen mit humanen PBMC, CTL oder T_{Helfer} dosisabhängige Lyse der humanen MCSP-positiven Colo-38-Zellen induzierte. Die Lyse der Melanomzellen ging einher mit T-Zellaktivierung, Sekretion von Zytokinen (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-13), erhöhter Degranulierung sowie vor allem bei CTL-Kokulturen mit einer gesteigerten

Perforinsynthese. Diese Ergebnisse waren zumindest für die Kokulturen mit T_{Helfer} überraschend, da ihnen eher geringeres zytotoxisches Potential zugeschrieben wird. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass T_{Helfer} MHC-Klasse II-restringierte zytotoxische Eigenschaften erlangen und infizierte/transformierte Zellen eliminieren können. So zeigten Jellison et al. sowie Brien et al., dass mit MHC-Klasse II-spezifischen viralen Peptiden beladene murine Milzzellen durch virus-spezifische T_{Helfer} eliminiert werden können ^[153, 154]. Arbeiten von Peggs et al. und Maris et al. belegten das Potential zytotoxischer T_{Helfer} , indem sie zeigen konnten, dass Tyrosinase-1-spezifische (Melanom-assoziiertes Tumorantigen) T_{Helfer} nach adoptiven Transfer in tumortragende Mäuse zu einer vollständigen, MHC-Klasse II-abhängigen Eliminierung muriner Melanome führten ^[155, 156]. Die in dieser Arbeit gezeigte zytotoxische Eigenschaft von T_{Helfer} ging einher mit gesteigerter Zytokinsekretion. Je nach Zytokinmilieu differenzieren naive T_{Helfer} nach TZR-spezifischer Stimulation zu unterschiedlichen T_{H} -Subtypen aus (u.a. T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} ,...). Diese zeichnen sich durch die Sekretion bestimmter Zytokinkombinationen aus. Die Sekretion von $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 sowie $\text{TNF-}\alpha$ ist charakteristisch für aktivierte T_{h1} , wohingegen IL-10, IL-13 und IL-4 für einen T_{h2} -Phänotyp sprechen ^[157]. In der Literatur werden zytotoxische T_{Helfer} zumeist als T_{h1} beschrieben ^[158-160]. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden in den T_{Helfer} -Kokulturen sowohl T_{h1} - als auch T_{h2} -assoziierte Zytokine im Kulturüberstand nachgewiesen. Das Zytokinprofil kann somit nicht klassifiziert werden. Im Gegensatz zu den Veröffentlichungen, wurde hier jedoch mit CD4-angereicherten T-Zellen gearbeitet. Dies entspricht einer heterogenen Population aus unterschiedlichen T_{H} -Subtypen, die nach Aktivierung über CD3 unterschiedliche Zytokinprofile aufweisen ^[157, 161]. Es ist somit nicht verwunderlich, dass nach der Stimulation mit MCSP-CD3 ein „Mischprofil“ entstand, da es wie hier gezeigt zur Aktivierung aller T-Zellen kam (CD69-Expression).

Parallel zur MCSP-CD3-induzierten Lyse der Melanomzellen in T_{Helfer} -Kokulturen konnte eine erhöhte Degranulierung der T-Zellen nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich kontroverse Ergebnisse in Bezug auf Degranulierung in T_{Helfer} . Arbeiten von Radoja et al. zeigten, dass polyklonale T_{Helfer} nach Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern zur TZR-vermittelten Degranulierung fähig sind ^[138]. Wolint et al. hingegen konnten bei LCMV-spezifischen (engl: Lymphocytic Choriomeningitis Virus; kurz: LCMV) T_{Helfer} nach

Antigenerkennung zwar Zytotoxizität, jedoch keine Degranulierung nachweisen ^[162]. Diese Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen erklärt werden (antigenspezifische vs. polyklonale T-Zellrezeptorstimulation).

Die lytische Funktion CD8-positiver CTL wird in der Regel durch die Exozytose zytolytischer Moleküle wie Perforin und Granzym-B verursacht ^[138, 163]. Wie hier gezeigt wurde, kam es in den CTL-Kokulturen nach Stimulation mit MCSP-CD3 zur Degranulierung in bis zu 50 % sowie zu einer Perforinexpression in bis zu 30 % aller CTL. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bispezifische Antikörper eine Granzym-B/Perforin-abhängige Tumorzellyse durch CTL induzieren können. Der Mechanismus, der der Tumorzellyse durch T_{Helfer} zugrunde liegt, bleibt hingegen offen. Jedoch konnte M. Amann im Rahmen ihrer Dissertation nach bispezifischer Antikörper-induzierten Tumorzellyse eine Granzym-B-Sekretion durch humane T_{Helfer} nachweisen ^[164]. Zusammen mit Perforin induziert Granzym-B Apoptose. Innerhalb dieser Arbeit wurden nach Stimulation mit MCSP-CD3 nur bis zu 5 % Perforin-positiv T_{Helfer} in den Kokulturen nachgewiesen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Nachweis von Perforin nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden erfolgte und wie in Abbildung 26 gezeigt die induzierte Lyse der Melanomzellen nach 24 Stunden nur maximal 20 % betrug. In CTL-Kokulturen wurde zu diesem Zeitpunkt bereits bis zu 60 % Lyse induziert, was mit der Frequenz von 30 % Perforin-positiven CTL korrelierte. Nach 48 Stunden Inkubationszeit war der Unterschied in der induzierten Lyse zwischen den untersuchten T-Zelltypen jedoch merklich geringer. Es liegt also nahe, dass die induzierte Lyse der Melanomzellen durch T_{Helfer} unter anderem, wenn auch mit einer längeren Reaktionszeit, ebenfalls durch Degranulierung von Perforin/Granzym-B induziert wurde. Dass T_{Helfer} im Gegensatz zu CTL längere Zeit für die Synthese zytolytischer Moleküle benötigen, ist leicht vorstellbar, da sie nicht wie CTL oder NK-Zellen zu den professionellen „Killerzellen“ zählen. So zeigten Boom et al., dass die mRNA-Menge von Granzym-B und Perforin in unstimulierten CTL im Vergleich zu T_{Helfer} um ein Vielfaches höher liegt ^[165]. Dass T_{Helfer} in Gegenwart von MCSP-CD3 Granzym-B/Perforin-abhängige Lyse induzieren können, wird des Weiteren durch Arbeiten von Abken et al. unterstützt. Sie zeigten, dass die Lyse humaner CEA-positiver (engl.: Carcinoembryonic Antigen; kurz: CEA) Kolonkarzinomzellen durch manipulierte T_{Helfer} welche CEA-Antigenrezeptoren exprimierten, Perforin/Granzym-B-abhängig war

^[166]. Die Lyse konnte hierbei nicht durch blockierende Antikörper gegen FASL sowie TNF- α inhibiert werden. Neutralisierende Antikörper gegen TNF- α konnten auch in der vorliegenden Arbeit die Lyse der Melanomzellen durch T_{Helfer} nicht inhibieren.

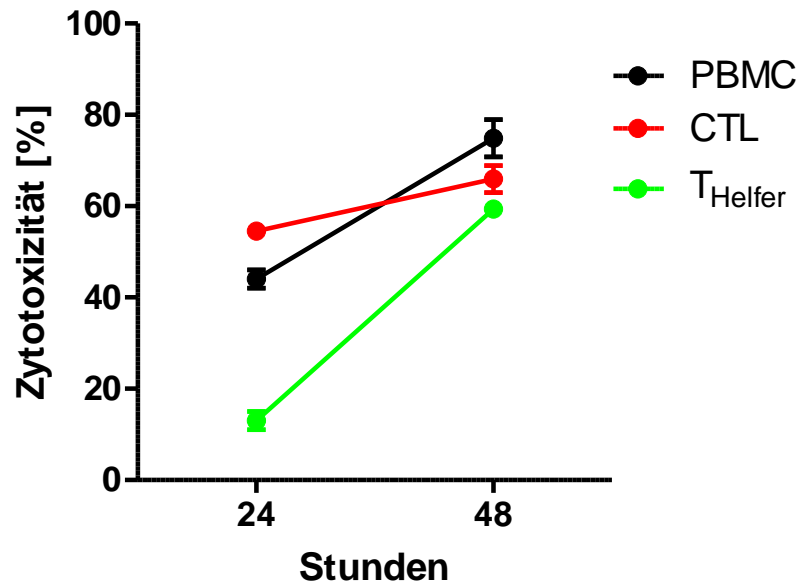


Abbildung 26: Kinetik zur Zytotoxizität

Kinetik der induzierten Lyse der Colo38-Zellen durch MCSP-CD3 mAk (50 ng/ml) in PBMC-, CTL- und T_{Helfer}-Kokulturen.

Die hier beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf *in vitro*-Experimente mit aufgereinigten T_{Helfer}. Es ist daher unklar, ob T_{Helfer} auch in Anwesenheit von CTL Zytotoxizitäten induzieren können. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass T_{Helfer}-vermittelte Zytotoxizitäten durch CTL „überwacht“ werden. Walden et al. zeigten, dass die Abwesenheit von CTL in β 2-microglobulin-defizienten Mäusen zu einer erhöhten lytischen Aktivität von T_{Helfer} führte ^[167]. Engelhard et al. zeigten darüber hinaus, dass die Induktion von Zytotoxizität durch polyklonale T_{Helfer} effizienter ist, wenn vor deren Aktivierung CTL depletiert wurden ^[168]. Die verantwortlichen Mediatoren dieser Effekte sind bis dato nicht identifiziert worden. Ob CTL auch die MCSP-CD3-induzierte lytische Aktivität von T_{Helfer} inhibieren können, konnte innerhalb dieser Arbeit nicht geklärt werden. Hierzu wären jedoch weitere Untersuchungen von großem Interesse, da die T_{Helfer}-Zytotoxizität bei der altersbedingten Reduktion der CTL-Population eine wichtige Rolle übernehmen könnte ^[169].

Die hier gezeigten Daten sind des Weiteren von Interesse, als dass sie erstmals zeigen, dass humane T-Zellen in humanisierten Mäusen ebenfalls in der Lage sind, durch bispezifische Antikörper Tumorzellen zu lysieren. Nach Injektion humaner hämatopoetischer Stammzellen kam es zur Entwicklung humaner T-Zellen im murinen Thymus. CD1a/CD4/CD8-dreifachpositive Thymozyten wurden im Cortex und CD4- oder CD8-positive Thymozyten in der Medulla detektiert. Dieser Befund lässt auf eine erfolgreiche Selektion und somit auf die Generierung funktioneller T-Zellen schließen. Daten von Spits et al. zeigen, dass die Differenzierung von CD4/CD8-doppelpositiver Thymozyten in CD4- bzw. CD8-einfachpositive Thymozyten nach erfolgreicher Bindung des TZR an MHC-Moleküle des Thymusstromas erfolgt und dass erst die Runterregulierung von CD1a zur Entwicklung funktioneller humaner T-Zellen führt. Sie zeigten, dass CD1a-negative, aber nicht CD1a-positive CD4- bzw. CD8-einfachpositive Thymozyten nicht mit PHA (Phythämagglutinin) oder IL-2 expandiert werden konnten^[170]. Es ist umstritten, ob die MHC-Moleküle muriner Epithelzellen oder der transplantierten humanen Zellen verantwortlich für die Thymusselektion sind. Die Thymi humanisierter Mäuse wiesen zwar humane MHC-Klasse II-positive B-Zellen auf, doch inwieweit diese an der Selektion der Thymozyten beteiligt sind ist ungeklärt. Studien in NSG I-A β ^{-/-} (Knock-out für murine MHC-Klasse II-Moleküle) Mäusen zeigten nach Injektion hämatopoetischer Stammzellen eine verzögerte T-Zellentwicklung. Nur eine geringe Anzahl an CD4-positiver T-Zellen konnte sich ohne murine MHC-Klasse II-Moleküle entwickeln^[121]. Insgesamt wird also angenommen, dass murine MHC-Moleküle auf dem Mausepithel die dominante Rolle in der Thymusselektion humaner T-Zellen in RAG2^{-/-} γ _c^{-/-} Mäusen spielen. In der vorliegenden Arbeit konnten darüber hinaus humane Thymus-abstämmige regulatorische T-Zellen (tT_{reg}) nachgewiesen werden. Sie sind ein wichtiger Bestandteil peripherer Toleranzmechanismen und können einerseits die Entstehung von Autoimmunerkrankungen unterdrücken und andererseits zur Tumorprogression durch Hemmung tumorantigen-spezifischer T-Zellen beitragen. Das Modell der humanisierten Maus besitzt somit das Potential, Einflüsse humaner regulatorischer T-Zellen auf Tumorwachstum und Behandlung zu untersuchen. Jedoch muss die Funktion dieser Zellen in aufbauenden Experimenten zunächst belegt werden.

Weitere funktionelle *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass humane T-Zellen aus humanisierten Mäusen nach polyklonaler TZR-abhängiger und -unabhängiger Stimulation proliferierten und IFN- γ produzierten. Experimente mit gemischten Lymphozytenkulturen wiesen darüber hinaus auf antigenspezifische T-Zellproliferationen hin. Von großem Interesse war hierbei die Beobachtung, dass es nur in Kokulturen mit humanen PBMC, nicht aber in Kokulturen mit Milzzellen aus CB57BL/6 Mäusen zu nachweisbarer T-Zellproliferation und IFN- γ -Sekretion kam. Wie bereits erwähnt, ist es sehr wahrscheinlich, dass humane T-Zellen vor allem auf murine MHC-Moleküle im Thymus selektiert werden. Die TZR erkennen somit murine MHC-Moleküle, spezifisch für RAG2^{-/-} γ_c ^{-/-}, nicht als fremd. Eine Reaktion gegen MHC-Moleküle aus CB57BL/6 Mäusen wäre dennoch zu erwarten, da sie sich in ihren MHC-Haplotypen unterscheiden (H2^b: RAG2^{-/-} γ_c ^{-/-}; H2^d: CB57BL/6). Schlom et al. konnten zeigen, dass die Kokultivierung muriner T-Zellen des Haplotyps H2^d durch allogene Stimulation mittels dendritischer Zellen (H2^b) zur T-Zellproliferation führt ^[171]. Für eine vollständige T-Zellaktivierung sind jedoch neben der Antigenerkennung über den TZR auch Interaktionen (Kostimulation, inflammatorisches Milieu) mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen von Nöten. Wie in dieser Arbeit angedeutet und auch in vielen weiteren Veröffentlichungen gezeigt wurde, ist die Entwicklung humaner myeloider Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten) in humanisierten Mäusen nur schwach ausgeprägt ^[117, 172]. Es kann also vermutet werden, dass die fehlende Reaktion gegen CB57BL/6 Milzzellen auf die geringe Anzahl humaner dendritischer Zellen und Makrophagen zurückzuführen ist und dass murine antigenpräsentierende Zellen, zumindest im hier untersuchten Zeitfenster, keine bzw. nur schwache Aktivierung der humanen T-Zellen induzieren. Es ist anzunehmen, dass murine kostimulatorische Rezeptoren nicht oder mit einer geringeren Affinität an humane CD28-Moleküle binden. Diese Annahme wird durch Arbeiten von Manz et al. unterstützt, die zeigten, dass T-Zellen humanisierter RAG2^{-/-} γ_c ^{-/-} Mäuse in Kokulturen mit murinen dendritischen Zellen aus CB57BL/6 Mäusen im Vergleich zu Kokulturen mit allogenen humanen dendritischen Zellen nur schwach proliferierten. Sie begründeten diese Ergebnisse mit einer suboptimalen xenogenen Zellinteraktion ^[112].

In diesem Kontext ist auch das hier entwickelte humanisierte Melanommodell von Interesse. Die subkutane Injektion humaner Colo38-Zellen in humanisierte Mäuse führte zu keiner messbaren Abstoßungsreaktion, welche aufgrund von Alloantigenen zu erwarteten gewesen wäre. Es wurden keine Unterschiede in der Wachstumskinetik der Melanomzellen in humanisierten und Wildtyp Mäusen detektiert. Jedoch war in diesem Zusammenhang auffällig, dass die basale Tumordinfiltration (ohne Therapie) humaner T-Zellen in humanisierten Mäusen sehr gering war. In der Literatur wird angenommen, dass die Aktivierung tumorreaktiver T-Zellen zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen führt, welche Interaktionen mit dem Tumorendothel und Infiltration in das Tumorgewebe ermöglichen. Dieser Infiltrations-Phänotyp (engl.: homing phenotype) wird vor allem durch Interaktionen mit dendritischen Zellen induziert ^[173-176]. Zusammen mit den Erkenntnissen aus den gemischten Lymphozytenkulturen kann somit hypothetisiert werden, dass das System der voll-humanisierten Maus keine oder nur schwache Aktivierung tumorreaktiver T-Zellen und somit Expression von Adhäsionsmolekülen ermöglicht, da wie bereits beschrieben, die Anzahl humaner dendritischer Zellen nur sehr gering und die Interaktion mit murinen dendritischen Zellen suboptimal ist.

Unter Behandlung mit MCSP-CD3 wurde anfänglich ein verzögertes Wachstum der implantierten Melanomzellen in humanisierten Mäusen nachgewiesen. Die histologische Untersuchung der explantierten Melanome zeigte zwar eine erhöhte Anzahl an humanen T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, jedoch war die Frequenz an humanen T-Zellen auch hier gering. Dieser Befund lässt sich zum einen wiederum durch die geringe basale T-Zellinfiltration erklären, jedoch kann auch das noduläre Wachstumsverhalten der Zelllinie und, wie hier gezeigt, die geringe Vaskularisierung der Melanome als Gründe vermutet werden. Smolkin et al. zeigten, dass die Infiltration CD8- und CD4-positiver T-Zellen mit dem Überleben von Melanompatienten korreliert ^[177]. Eine höhere Infiltration wirkte sich hierbei positiv auf den Krankheitsverlauf aus. Es ist leicht vorstellbar, dass eine höhere basale Infiltration humaner T-Zellen sich auch positiv auf die Therapie mit bispezifischen Antikörper auswirkt, da die Tumorzelllyse abhängig vom Verhältnis von T-Zelle zu Tumorzelle ist ^[69]. Therapien die eine Erhöhung der T-Zellinfiltration im Tumorgewebe ermöglichen, sind daher als mögliche Kombinationspartner in Betracht zu ziehen. Scolyer et al. konnten in Biopsien von

Melanompatienten nach Therapie mit BRAF-Inhibitoren eine erhöhte Lymphozyteninfiltration (vor allem von CD8-positiven T-Zellen) nachweisen ^[178]. Des Weiteren zeigten Bellone et al., dass die spezifische Aktivierung von Tumorendothelzellen mit TNF- α nicht nur zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und erhöhten Lymphozyteninfiltration führt, sondern auch die Tumorpenetration von Krebsmedikamenten erhöht ^[179]. Dieser Therapieansatz könnte sich ebenfalls positiv auf die Tumorpenetration des MCSP-CD3 Antikörpers auswirken. Wie innerhalb dieser Arbeit gezeigt wurde, ist das Penetrationsverhalten des bispezifischen Antikörpers suboptimal. Der therapeutische anti-MCSP Antikörper wurde nach Injektion in tumortragenden Mäusen nur im Tumorrandbereich und auf Tumorzellen um den Blutgefäßen detektiert. Auf der Mehrzahl der Melanomzellen konnte keine Bindung des Antikörpers nachgewiesen werden, obwohl das Zielantigen MCSP immunhistochemisch detektiert wurde (Abbildung 27).

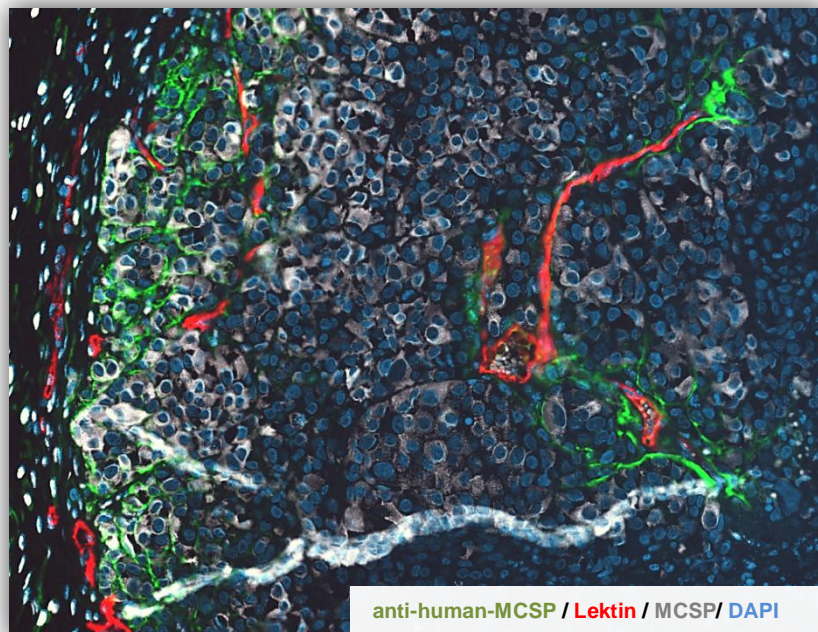


Abbildung 27: Geringe Tumorpenetration des therapeutischen MCSP Antikörpers in Colo-38 Melanome

Vergrößerte Darstellung der explantierten Melanome nach Injektion des Fluoreszenz-konjugierten therapeutischen MCSP Antikörpers (grün) und Lektin (rot) aus Abschnitt 5.3.4. Die Schnitte wurden nachträglich mit einem kommerziellen anti-MCSP mAk gefärbt (grau) um MCSP-positive Melanomzellen zu detektieren.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, verfügen Tumore über verschiedene Escape-Mechanismen die die Effizienz des bispezifischen Antikörpers *in vivo* womöglich beeinflussen können. Eine Runterregulierung von MCSP kann die vermittelte Tumorzelllyse inhibieren, da die Expression des Tumorantigens für die Lyse der Melanomzellen essentiell ist. Jedoch wurde auch am Studienende das Zielantigen MCSP immunhistochemisch nachgewiesen. Es ist bis dato nicht gezeigt worden, ob andere tolerogene Mechanismen wie die Supprimierung der Effektorzellen durch T_{reg} oder die Expression von T-Zellinhibierenden Rezeptoren wie PDL-1/PDL-2 oder CTLA-4 die Aktivität bispezifischer Antikörper regulieren können. Inwieweit diese peripheren Toleranzmechanismen die vermittelte Lyse beeinflussen und ob durch eine gezielte Eliminierung von T_{reg} bzw. eine Blockierung T-Zellinhibierender Rezeptoren durch monoklonale Antikörper die Zytotoxizität gesteigert werden kann, ist von großem Interesse und muss in aufbauenden Experimenten untersucht werden. Die in dieser Arbeit diskutierten möglichen Gründe für die mangelnde Effektivität des bispezifischen MCSP-CD3 Antikörpers im humanisierten Mausmodell sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Gründe für die mangelnde Effektivität von MCSP-CD3 im humanisierten Mausmodell

Colo-38 Melanom	Humanisiertes Maussystem	Tolerogene Mechanismen
<ul style="list-style-type: none"> • noduläres Wachstum → <i>mechanische Barriere</i> • geringe Vaskularisierung → <i>schlechtes Penetrationsverhalten des Antikörpers</i> • geringe basale T-Zellinfiltration → <i>suboptimales Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • suboptimale xenogene Interaktionen → <i>geringe basale T-Zellinfiltration</i> • individuelle Humanisierung → <i>variierende T-Zellfrequenzen</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Tumordinfiltration von T_{reg} → <i>Supprimierung der Effektorzellen</i> • Expression T-Zellinhibierender Rezeptoren auf Tumor oder T-Zellen → <i>Inhibition der Tumorzelllyse</i>

Die vorliegenden Daten zeigen, dass bispezifische Antikörper in der Lage sind, nicht nur das zytotoxische Potential von CTL, sondern auch von T_{Helfer} auszuschöpfen. Die Lyse der Tumorzellen ist hierbei unabhängig von der TZR-Spezifität (polyklonale Aktivierung) und kostimulatorischen Signalen (isolierte T-Zellen) und ist allein abhängig von der Expression des Tumorantigens sowie CD3. Die Kultivierung humaner T-Zellen mit MCSP-CD3 in Abwesenheit humaner MCSP-positiver Tumorzellen induzierte weder eine T-Zellaktivierung, Degranulierung noch Zytokinsekretion, da der bispezifische Antikörper nur eine monovalente Bindungsstelle für CD3 besitzt und es somit zu keiner Kreuzvernetzung kommt. Diese Erkenntnis ist im Hinblick auf unspezifische T-Zellaktivierungen und somit möglichen Nebenwirkungen von hoher Bedeutung. Der bispezifische MCSP-CD3 Antikörper erhöhte zwar die Anzahl humaner T-Zellen im Tumor, jedoch ist unklar, ob es hier zu einer direkten T-Zellrekrutierung aus der Peripherie oder einer T-Zellaktivierung und Proliferation innerhalb des Tumors kam. Die suboptimale Penetration des Antikörpers *in vivo* und die geringe basale Infiltration humaner T-Zellen wirkten sich jedoch negativ auf die Therapie aus. Es ist denkbar, dass durch die Kombination mit Therapien, welche eine erhöhte Lymphozyteninfiltration in das Tumorgewebe induzieren, die Wirksamkeit des bispezifischen Antikörpers gesteigert werden kann.

Das Modell der voll-humanisierten Maus stellt in Bezug auf Wirksamkeitsuntersuchungen bispezifischer Antikörper ein sinnvolles System dar. Zum einen wurden im Vergleich zu den erwähnten Transfermodellen keine Anzeichen an GvHD nachgewiesen, zum anderen konnte gezeigt werden, dass T-Zellen humanisierter Mäuse funktionell sind und, wie in den *in vitro*-Untersuchungen gezeigt, MCSP-CD3-vermittelte Tumorzelllyse induzieren können. Ein Nachteil des Modells liegt in der teilweise heterogenen Humanisierung. Die Injektion hämatopoetischer Stammzellen führt zu einer individuellen Humanisierung die sich von Maus zu Maus unterscheiden kann. Die Generierung aussagekräftiger präklinischer Daten kann hierdurch komplexer werden. Ein weiterer Nachteil kann in der geringen Entwicklung humaner dendritischer Zellen und Makrophagen vermutet werden. Wie hier beschrieben liegt es nahe, dass die geringe basale Infiltration humaner T-Zellen in Zusammenhang mit der geringen Anzahl humaner dendritischer Zellen und somit fehlender human-spezifischer T-Zellstimulation steht. Darüber hinaus verfügte die verwendete

Tumorzelllinie über eine geringe Vaskularisierung, was sich ebenfalls negativ auf die Tumordinfiltration auswirkte. Letzteres könnte durch Verwendung einer anderen Melanomzelllinie, die eine bessere Tumolvaskularisierung besitzt, optimiert werden. Eine bessere Entwicklung humaner myeloider Zellen könnte sich auch positiv auf die basale T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe auswirken. Flavell et al. zeigten, dass die Generierung transgener Mäuse, welche humane Zytokine wie SCF ^[117], IL-3 und GM-CSF ^[172] exprimieren zu einer gesteigerten Entwicklung humaner myeloider Zellen führt. Auch das Einbringen humaner MHC-Moleküle könnte zur Verbesserung des humanisierten Maussystems beitragen. Casares et al. zeigten, dass das Einbringen humaner MHC-Klasse II-Moleküle zu einer erhöhten Humanisierung und zur Entwicklung human MHC-spezifischer T-Zellen führte ^[180].

7 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Toxizität; „Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity“
AIRE	„Autoimmune Regulator“
AP	Alkalische Phosphatase; „Alkaline Phosphatase“
APC (<i>Fluo</i>)	Allophycocyanin
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
BiTE	„Bi-specific T-cell Engager“
CD	„Cluster of Differentiation“
DAB	„3,3'-Diaminobenzidine“
DNA	„Deoxyribonucleic acid“; Desoxyribonukleinsäure
CTL	CD8-positive T-Zellen
CTLA-4	„Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	„Epidermal Growth Factor Receptor“
EpCAM	„Epithelial Cell Adhesion Molecule“
FACS	„Fluorescence-activated cell scanner“; Durchflusszytometer
FBS	Fötales Rinderserum; „Fetal Bovine Serum“
FITC	Fluoreszein 5-isothiozyanat
FoxP3	„Forkhead Box Protein 3“
FSC	„Forwards Scatter“
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	„Granulocytes-macrophages colony stimulating factor“
GvHD	„Graft versus Host Disease“; Graft-versus-Host Reaktion
GZB	Granzym-B
HCL	Salzsäure
HLA	„Human Leukocyte Antigen“
HRP	Meerrettichperoxidase; „Horseradish Peroxidase“

HSC	Hämatopoetische Stammzelle; „Hematopoetic Stem Cell“
i.h.	Intrahepatisch
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAMP1	„Lysosomal-associated membrane protein 1“
LDH	L-Lactatdehydrogenase
mAk	monoklonaler Antikörper
M-CSF	„Macrophage Colony-Stimulating Factor“
MCSP	„Melanoma-Associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; „Major histocompatibility complex“
min	Minuten
mRNA	„messenger-RNA“
NOD	„None-Obese Diabetic“
NSG	NOD/ <i>scid</i> _{γc} ^{-/-} Mäuse
PAMP	„Pathogen Associated Molecular Patterns“
PBMC	Periphere Mononukleare Blutzellen; „Peripheral Blood Mononuclear Cells“
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PD-1	„Programmed cell Death protein 1“
PD-L	„Programmed cell Death Ligand“
PE	Phycoerytrin
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PMA	„Phorbol 12- Myristate 13-Acetate“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	„Pattern Recognition Receptor“

RAG	„Recombination Activating Gene“
RIPA	„Radioimmunoprecipitation Assay Buffer“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SCF	„Stem cell factor“
Scid	„Severe combined immunodeficiency“
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“
SPF	Spezifisch Pathogen Frei; „Specific Pathogen Free“
SSC	„Sidewards Scatter“
StaphA	„Staphylococcal enterotoxin B“
TBST	„Tris Buffered Saline“ mit Tween
TGF	„Transforming Growth Factor“
T _{Helfer}	CD4-positive T-Zellen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPO	Thrombopoetin
TRAIL	„TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand“
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
U	Unit (international Einheit)
V(D)J	„Variable, Diverse, Joining Gene segments“

8 Referenzen

1. Khlystova ZS: [Development of the immune system in human ontogenesis]. *Arkh Patol* 1991, 53(11):11-17.
2. Travis J: Origins. On the origin of the immune system. *Science* 2009, 324(5927):580-582.
3. Martinelli C, Reichhart JM: Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions. *J Endotoxin Res* 2005, 11(4):243-248.
4. Takeda K: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2005, 11(1):51-55.
5. Areschoug T, Gordon S: Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiol* 2008, 15:45-60.
6. Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010, 11(5):373-384.
7. Shortman K, Heath WR: Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001, 2(11):988-989.
8. Janeway CA (ed.): *Immunologie*: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
9. Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M: V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* 1989, 3(7):1053-1061.
10. Jung D, Alt FW: Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 2004, 116(2):299-311.
11. Hedrick SM: Positive selection in the thymus: an enigma wrapped in a mystery. *J Immunol* 2012, 188(5):2043-2045.
12. Kishimoto H, Sprent J: The thymus and negative selection. *Immunol Res* 2000, 21(2-3):315-323.
13. Surh CD, Sprent J: T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994, 372(6501):100-103.
14. Gardner JM, Fletcher AL, Anderson MS, Turley SJ: AIRE in the thymus and beyond. *Curr Opin Immunol* 2009, 21(6):582-589.
15. Parkin J, Cohen B: An overview of the immune system. *Lancet* 2001, 357(9270):1777-1789.
16. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA: B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2011, 1217:96-121.
17. Parker DC: T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993, 11:331-360.

18. Sakai A, Tanaka S, Miyashita A, Butt KM, Kountz SL: Escape of autoreactive lymphocytes from the thymus. *Transplant Proc* 1979, 11(1):1089-1091.
19. Carl JW, Jr., Liu JQ, Joshi PS, El-Omrani HY, Yin L, Zheng X, Whitacre CC, Liu Y, Bai XF: Autoreactive T cells escape clonal deletion in the thymus by a CD24-dependent pathway. *J Immunol* 2008, 181(1):320-328.
20. Perales MA, Blachere NE, Engelhorn ME, Ferrone CR, Gold JS, Gregor PD, Noffz G, Wolchok JD, Houghton AN: Strategies to overcome immune ignorance and tolerance. *Semin Cancer Biol* 2002, 12(1):63-71.
21. Quill H: Anergy as a mechanism of peripheral T cell tolerance. *J Immunol* 1996, 156(4):1325-1327.
22. Wan YY: Regulatory T cells: immune suppression and beyond. *Cell Mol Immunol* 2010, 7(3):204-210.
23. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG: The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002, 129(4):263-276.
24. Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA: Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 2009, 182(10):6121-6128.
25. Nakamura K, Kitani A, Strober W: Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001, 194(5):629-644.
26. Sakaguchi S: The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest* 2003, 112(9):1310-1312.
27. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG *et al*: Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 2013, 14(4):307-308.
28. Yuan XL, Chen L, Zhang TT, Ma YH, Zhou YL, Zhao Y, Wang WW, Dong P, Yu L, Zhang YY *et al*: Gastric cancer cells induce human CD4+Foxp3+ regulatory T cells through the production of TGF-beta1. *World J Gastroenterol* 2011, 17(15):2019-2027.
29. Zheng Z, Narita M, Takahashi M, Liu A, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y: Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, 27(2):93-103.
30. Quaratino S, Duddy LP, Londei M: Fully competent dendritic cells as inducers of T cell anergy in autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(20):10911-10916.

31. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM: Plasma cell development and survival. *Immunol Rev* 2010, 237(1):140-159.
32. Trapani JA, Smyth MJ: Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002, 2(10):735-747.
33. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F: MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003, 195(3):346-355.
34. Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F: The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53(10):904-910.
35. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H: Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(3):1178-1183.
36. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A: Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54(4):307-314.
37. Walker PR, Saas P, Dietrich PY: Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997, 158(10):4521-4524.
38. Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze MT: Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest* 1996, 98(7):1633-1641.
39. Kim U, Baumler A, Carruthers C, Bielat K: Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975, 72(3):1012-1016.
40. Pasche B: Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 2001, 186(2):153-168.
41. Gorelik L, Flavell RA: Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001, 7(10):1118-1122.
42. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, Zhang QJ, Masucci MG, Kiessling R: Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 1994, 180(6):2371-2376.
43. Facciabene A, Motz GT, Coukos G: T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 2012, 72(9):2162-2171.
44. Wang RF: Regulatory T cells and innate immune regulation in tumor immunity. *Springer Semin Immunopathol* 2006, 28(1):17-23.

45. Chen C, Qu QX, Shen Y, Mu CY, Zhu YB, Zhang XG, Huang JA: Induced expression of B7-H4 on the surface of lung cancer cell by the tumor-associated macrophages: a potential mechanism of immune escape. *Cancer Lett* 2012, 317(1):99-105.
46. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A: The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008, 222:155-161.
47. Schlager SI: Ability of tumor cells to resist humoral vs. cell-mediated immune attack is controlled by different membrane physical properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1982, 106(1):58-64.
48. Schlaeth M, Berger S, Derer S, Klausz K, Lohse S, Dechant M, Lazar GA, Schneider-Merck T, Peipp M, Valerius T: Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells. *Cancer Sci* 2010, 101(5):1080-1088.
49. Kute T, Stehle Jr JR, Ornelles D, Walker N, Delbono O, Vaughn JP: Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC against Her2 positive breast cancer cells. *Oncoimmunology* 2012, 1(6):810-821.
50. Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M: Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng* 2001, 74(4):288-294.
51. Park JN, Suh C, Yang J, Park JS, Park KU, Min YJ, Kim HJ, Kim YH, Kim SH: Active immunization using dendritic cells mixed with tumor cells inhibits the growth of lymphomas. *J Korean Med Sci* 2003, 18(3):372-380.
52. Steinman RM, Dhodapkar M: Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* 2001, 94(4):459-473.
53. Yannelli JR, Sturgill J, Foody T, Hirschowitz E: The large scale generation of dendritic cells for the immunization of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2005, 47(3):337-350.
54. Villikka K, Pyrhonen S: Cytokine therapy of malignant melanoma. *Ann Med* 1996, 28(3):227-233.
55. Kalaaji AN, Lu J, Markovic SN, Celis E, Pittelkow MR: Combination cytokine therapy inhibits tumor growth by generation of tumor-specific T-cell responses in a murine melanoma model. *Cytokine* 2010, 49(3):287-293.
56. Itzhaki O, Levy D, Zikich D, Treves AJ, Markel G, Schachter J, Besser MJ: Adoptive T-cell transfer in melanoma. *Immunotherapy* 2013, 5(1):79-90.
57. Tey SK, Bollard CM, Heslop HE: Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2006, 84(3):281-289.

58. Wimberger P, Xiang W, Mayr D, Diebold J, Dreier T, Baeuerle PA, Kimmig R: Efficient tumor cell lysis by autologous, tumor-resident T lymphocytes in primary ovarian cancer samples by an EP-CAM-/CD3-bispecific antibody. *Int J Cancer* 2003, 105(2):241-248.
59. Osada T, Hsu D, Hammond S, Hobeika A, Devi G, Clay TM, Lyerly HK, Morse MA: Metastatic colorectal cancer cells from patients previously treated with chemotherapy are sensitive to T-cell killing mediated by CEA/CD3-bispecific T-cell-engaging BiTE antibody. *Br J Cancer* 2010, 102(1):124-133.
60. Cioffi M, Dorado J, Baeuerle PA, Heeschen C: EpCAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2012, 18(2):465-474.
61. Landegren U, Andersson J, Wigzell H: Mechanism of T lymphocyte activation by OKT3 antibodies. A general model for T cell induction. *Eur J Immunol* 1984, 14(4):325-328.
62. Jenkins MR, Griffiths GM: The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Curr Opin Immunol* 2010, 22(3):308-313.
63. Baeuerle PA, Reinhardt C: Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res* 2009, 69(12):4941-4944.
64. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, Gokbuget N, Neumann S, Goebeler M, Viardot A *et al*: Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 2012, 119(26):6226-6233.
65. Advani AS: Blinatumomab: a novel agent to treat minimal residual disease in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2011, 9(10):776-777.
66. Amann M, D'Argouges S, Lorenczewski G, Brischwein K, Kischel R, Lutterbuese R, Mangold S, Rau D, Volkland J, Pflanz S *et al*: Antitumor activity of an EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody during long-term treatment of mice in the absence of T-cell anergy and sustained cytokine release. *J Immunother* 2009, 32(5):452-464.
67. Sen M, Wankowski DM, Garlie NK, Siebenlist RE, Van Epps D, LeFever AV, Lum LG: Use of anti-CD3 x anti-HER2/neu bispecific antibody for redirecting cytotoxicity of activated T cells toward HER2/neu+ tumors. *J Hematother Stem Cell Res* 2001, 10(2):247-260.
68. Reusch U, Sundaram M, Davol PA, Olson SD, Davis JB, Demel K, Nissim J, Rathore R, Liu PY, Lum LG: Anti-CD3 x anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to EGFR-positive cancers in vitro and in an animal model. *Clin Cancer Res* 2006, 12(1):183-190.

69. Torisu-Itakura H, Schoellhammer HF, Sim MS, Irie RF, Hausmann S, Raum T, Baeuerle PA, Morton DL: Redirected lysis of human melanoma cells by a MCSP/CD3-bispecific BiTE antibody that engages patient-derived T cells. *J Immunother* 2011, 34(8):597-605.
70. Flessner MF, Choi J, Credit K, Deverkadra R, Henderson K: Resistance of tumor interstitial pressure to the penetration of intraperitoneally delivered antibodies into metastatic ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 2005, 11(8):3117-3125.
71. Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W, Weinstein JN: Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Res* 1992, 52(19):5144-5153.
72. Desmond RA, Soong SJ: Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 2003, 83(1):1-29.
73. Robert-Koch-Institut: Malignes Melanom der Haut. webpage.
74. Gradilone A, Cigna E, Agliano AM, Frati L: Tyrosinase expression as a molecular marker for investigating the presence of circulating tumor cells in melanoma patients. *Curr Cancer Drug Targets* 2010, 10(5):529-538.
75. Kobayashi H, Lu J, Celis E: Identification of helper T-cell epitopes that encompass or lie proximal to cytotoxic T-cell epitopes in the gp100 melanoma tumor antigen. *Cancer Res* 2001, 61(20):7577-7584.
76. Ghosh S, Rosenthal R, Zajac P, Weber WP, Oertli D, Heberer M, Martin I, Spagnoli GC, Reschner A: Culture of melanoma cells in 3-dimensional architectures results in impaired immunorecognition by cytotoxic T lymphocytes specific for Melan-A/MART-1 tumor-associated antigen. *Ann Surg* 2005, 242(6):851-857, discussion 858.
77. Kurnick JT, Ramirez-Montagut T, Boyle LA, Andrews DM, Pandolfi F, Durda PJ, Butera D, Dunn IS, Benson EM, Gobin SJ *et al*: A novel autocrine pathway of tumor escape from immune recognition: melanoma cell lines produce a soluble protein that diminishes expression of the gene encoding the melanocyte lineage melan-A/MART-1 antigen through down-modulation of its promoter. *J Immunol* 2001, 167(3):1204-1211.
78. Westekemper H, Karimi S, Susskind D, Anastassiou G, Freistuhler M, Meller D, Zeschnigk M, Steuhl KP, Bornfeld N, Schmid KW *et al*: Expression of MCSP and PRAME in conjunctival melanoma. *Br J Ophthalmol* 2010, 94(10):1322-1327.
79. Srinivasan R, Wolchok JD: Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *J Transl Med* 2004, 2(1):12.

80. de Carvalho F, Vettore AL, Colleoni GW: Cancer/Testis Antigen MAGE-C1/CT7: new target for multiple myeloma therapy. *Clin Dev Immunol* 2012, 2012:257695.
81. Eisenmann KM, McCarthy JB, Simpson MA, Keely PJ, Guan JL, Tachibana K, Lim L, Manser E, Furcht LT, Iida J: Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat Cell Biol* 1999, 1(8):507-513.
82. Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB: Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 2004, 165(6):881-891.
83. Iida J, Wilhelmson KL, Ng J, Lee P, Morrison C, Tam E, Overall CM, McCarthy JB: Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A). *Biochem J* 2007, 403(3):553-563.
84. de Bruyn M, Rybczynska AA, Wei Y, Schwenkert M, Fey GH, Dierckx RA, van Waarde A, Helfrich W, Bremer E: Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)-targeted delivery of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth in vitro and in vivo. *Mol Cancer* 2010, 9:301.
85. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Lutterbuese P, Schlereth B, Schaller E, Mangold S, Rau D, Meier P, Kiener PA *et al*: Potent control of tumor growth by CEA/CD3-bispecific single-chain antibody constructs that are not competitively inhibited by soluble CEA. *J Immunother* 2009, 32(4):341-352.
86. Fast LD, Semple JW, DiLeone G, Kim M, Freedman J, Chapman J, Purmal A: Inhibition of xenogeneic GVHD by PEN110 treatment of donor human PBMNCs. *Transfusion* 2004, 44(2):282-285.
87. Cao T, Soto A, Zhou W, Wang W, Eck S, Walker M, Harriman G, Li L: Ex vivo expanded human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells prevent lethal xenogenic graft versus host disease (GVHD). *Cell Immunol* 2009, 258(1):65-71.
88. Mestas J, Hughes CC: Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004, 172(5):2731-2738.
89. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET: Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* 2003, 3(1):3.
90. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A: Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003, 198(3):513-520.
91. Daeron M: Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:203-234.

92. Martin RM, Lew AM: Is IgG2a a good Th1 marker in mice? *Immunol Today* 1998, 19(1):49.
93. Taams LS, van Eden W, Wauben MH: Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. *Eur J Immunol* 1999, 29(5):1543-1550.
94. Denton MD, Geehan CS, Alexander SI, Sayegh MH, Briscoe DM: Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. *J Exp Med* 1999, 190(4):555-566.
95. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA: CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996, 14:233-258.
96. Olson TS, Ley K: Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002, 283(1):R7-28.
97. Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000, 12(2):121-127.
98. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltzis N: Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006, 355(10):1018-1028.
99. Beau J, Levi F, Motta R: The influence of the athymic mutation nude on the components of the circadian rhythm of activity in mice. *Chronobiol Int* 1990, 7(5-6):371-376.
100. Wortis HH: Pleiotropic effects of the nude mutation. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975, 11(1):528-532.
101. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ: A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983, 301(5900):527-530.
102. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL *et al*: Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 1995, 154(1):180-191.
103. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE: RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992, 68(5):869-877.
104. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM *et al*: RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992, 68(5):855-867.
105. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K *et al*: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002, 100(9):3175-3182.

106. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J *et al*: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005, 174(10):6477-6489.
107. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ: Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993, 262(5141):1877-1880.
108. Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE *et al*: Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 1993, 262(5141):1880-1883.
109. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, Nakamura M, Takeshita T: The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 1996, 14:179-205.
110. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, Drago J, Noguchi M, Grinberg A, Bloom ET *et al*: Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 1995, 2(3):223-238.
111. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K: Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(2):377-381.
112. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG: Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004, 304(5667):104-107.
113. Strowig T, Gurer C, Ploss A, Liu YF, Arrey F, Sashihara J, Koo G, Rice CM, Young JW, Chadburn A *et al*: Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J Exp Med* 2009, 206(6):1423-1434.
114. Covassin L, Laning J, Abdi R, Langevin DL, Phillips NE, Shultz LD, Brehm MA: Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2rgamma(null) H2-Ab1 (tm1Gru) Tg (human leucocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 2011, 166(2):269-280.
115. Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H *et al*: Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 2012, 119(12):2768-2777.

116. Rongvaux A, Willinger T, Takizawa H, Rathinam C, Auerbach W, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Eynon EE, Stevens S *et al*: Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(6):2378-2383.
117. Rathinam C, Poueymirou WT, Rojas J, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Rongvaux A, Eynon EE, Manz MG, Flavell RA: Efficient differentiation and function of human macrophages in humanized CSF-1 mice. *Blood* 2011, 118(11):3119-3128.
118. Thomas DB, Cork MJ, Riches AC: The regulation of the haematopoietic stem cell compartment in foetal liver. *Prog Clin Biol Res* 1981, 59B:277-285.
119. Smith AR, Wagner JE: Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2009, 147(2):246-261.
120. Perdomo-Arciniegas AM, Vernet JP: Optimised cord blood sample selection for smallscale CD34+ cell immunomagnetic isolation. *Mol Med Report* 2012, 5(3):749-752.
121. Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, Katano I, Ito R, Ito M, Minegishi M, Minegishi N *et al*: The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol* 2009, 21(7):843-858.
122. Strowig T, Rongvaux A, Rathinam C, Takizawa H, Borsotti C, Philbrick W, Eynon EE, Manz MG, Flavell RA: Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2-/-gamma(c)-/- mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(32):13218-13223.
123. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL: Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 2007, 7(2):118-130.
124. Chicha L, Tussiwand R, Traggiai E, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG: Human adaptive immune system Rag2-/-gamma(c)-/- mice. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1044:236-243.
125. Yang Y, Zhang Y, Hong H, Liu G, Leigh BR, Cai W: In vivo near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression during tumor angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011, 38(11):2066-2076.
126. Nguyen C, Bascaramurty S, Kuzio B, Gregorash L, Kupriyanov V, Jilkina O: Near-infrared fluorescence imaging of mouse myocardial microvascular endothelium using Cy5.5-lectin conjugate. *J Biophotonics* 2012, 5(10):754-767.
127. Churchill HR, Andersen PS, Parke EA, Mariuzza RA, Kranz DM: Mapping the energy of superantigen Staphylococcus enterotoxin C3 recognition of an alpha/beta T cell receptor using alanine scanning mutagenesis. *J Exp Med* 2000, 191(5):835-846.

128. Sjogren HO: T cell activation by superantigens--dependence on MHC class II molecules. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991, 174:39-51.
129. M. Baehner SJ, M. Kubbies, E. Moessner, T. Schlothauer: ANTIBODY Fc VARIANTS. In., vol. US20120251531 A1; 2012.
130. Hessel AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CE, Beurskens FJ, Bakker JM, Lanigan CM, Landucci G, Forthal DN, Parren PW *et al*: Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 2007, 449(7158):101-104.
131. Campoli MR, Chang CC, Kageshita T, Wang X, McCarthy JB, Ferrone S: Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance. *Crit Rev Immunol* 2004, 24(4):267-296.
132. Morgenstern DA, Asher RA, Naidu M, Carlstedt T, Levine JM, Fawcett JW: Expression and glycanation of the NG2 proteoglycan in developing, adult, and damaged peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci* 2003, 24(3):787-802.
133. Katsikis PD, Cohen SB, Londei M, Feldmann M: Are CD4+ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int Immunol* 1995, 7(8):1287-1294.
134. Estevam FR, Augusto SF, Rodrigues SA, Pinheiro MR, Monteiro AF: Apoptosis and production of TNF-alpha by tumor-associated inflammatory cells in histological grade III breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54(7):671-676.
135. Chopra DP, Menard RE, Januszewski J, Mattingly RR: TNF-alpha-mediated apoptosis in normal human prostate epithelial cells and tumor cell lines. *Cancer Lett* 2004, 203(2):145-154.
136. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G: Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1995, 181(2):537-546.
137. Testi R, Phillips JH, Lanier LL: T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 1989, 143(4):1123-1128.
138. Shen DT, Ma JS, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S: Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. *J Leukoc Biol* 2006, 80(4):827-837.

139. Nielsen JS, McNagny KM: Influence of host irradiation on long-term engraftment by CD34-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* 2007, 110(3):1076-1077.
140. Hale LP: Histologic and molecular assessment of human thymus. *Ann Diagn Pathol* 2004, 8(1):50-60.
141. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T: Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001, 182:18-32.
142. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN: Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 2007, 82(6):1365-1374.
143. James E, Yeh A, King C, Korangy F, Bailey I, Boulanger DS, Van den Eynde BJ, Murray N, Elliott TJ: Differential suppression of tumor-specific CD8+ T cells by regulatory T cells. *J Immunol* 2010, 185(9):5048-5055.
144. Wang RF: Immune suppression by tumor-specific CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006, 16(1):73-79.
145. Takahama Y, Nakauchi H: Phorbol ester and calcium ionophore can replace TCR signals that induce positive selection of CD4 T cells. *J Immunol* 1996, 157(4):1508-1513.
146. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR *et al*: Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011, 17(13):4550-4557.
147. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP *et al*: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006, 314(5796):126-129.
148. Aleksic M, Liddy N, Molloy PE, Pumphrey N, Vuidepot A, Chang KM, Jakobsen BK: Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies. *Eur J Immunol* 2012, 42(12):3174-3179.
149. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, White DE, Wunderlich JR, Canevari S, Rogers-Freezer L *et al*: A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12(20 Pt 1):6106-6115.

150. Robbins PF, Dudley ME, Wunderlich J, El-Gamil M, Li YF, Zhou J, Huang J, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA: Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* 2004, 173(12):7125-7130.
151. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bogeholz J, Kohnke T, Lichtenegger FS, Schneider S, Metzeler KH, Fiegl M *et al*: CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood* 2013.
152. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, Friedrich M, Thomas O, Lorenczewski G, Rau D *et al*: T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(28):12605-12610.
153. Brien JD, Uhrlaub JL, Nikolich-Zugich J: West Nile virus-specific CD4 T cells exhibit direct antiviral cytokine secretion and cytotoxicity and are sufficient for antiviral protection. *J Immunol* 2008, 181(12):8568-8575.
154. Jellison ER, Kim SK, Welsh RM: Cutting edge: MHC class II-restricted killing in vivo during viral infection. *J Immunol* 2005, 174(2):614-618.
155. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA *et al*: Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 2010, 207(3):637-650.
156. Xie Y, Akpınarli A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, Kwon EK, Muranski P, Restifo NP, Antony PA: Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med* 2010, 207(3):651-667.
157. Jung U, Foley JE, Erdmann AA, Eckhaus MA, Fowler DH: CD3/CD28-costimulated T1 and T2 subsets: differential in vivo allosensitization generates distinct GVT and GVHD effects. *Blood* 2003, 102(9):3439-3446.
158. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ *et al*: Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 2002, 168(11):5954-5958.
159. Casazza JP, Betts MR, Price DA, Precopio ML, Ruff LE, Brenchley JM, Hill BJ, Roederer M, Douek DC, Koup RA: Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med* 2006, 203(13):2865-2877.
160. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL: Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* 1999, 73(5):3623-3629.

161. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG: Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001, 193(11):1295-1302.
162. Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A: Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells. *J Exp Med* 2004, 199(7):925-936.
163. Geisberg M, Terry LA, Flomenberg N, Dupont B: Cytotoxic and proliferative allospecific T-cell clones contain perforin and mediate anti-CD3-induced cytotoxicity. *Hum Immunol* 1992, 35(4):239-245.
164. Amann M: ANTI-TUMOR ACTIVITY, PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF EPCAM/CD3-BISPECIFIC SINGLE-CHAIN ANTIBODIES. *phD thesis*. Munich: LMU; 2009.
165. Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH: CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J Immunol* 2001, 167(5):2734-2742.
166. Hombach A, Kohler H, Rappl G, Abken H: Human CD4+ T cells lyse target cells via granzyme/perforin upon circumvention of MHC class II restriction by an antibody-like immunoreceptor. *J Immunol* 2006, 177(8):5668-5675.
167. Marusic-Galesic S, Udaka K, Walden P: Increased number of cytotoxic T cells within CD4+8- T cells in beta 2-microglobulin, major histocompatibility complex class I-deficient mice. *Eur J Immunol* 1993, 23(12):3115-3119.
168. Williams NS, Engelhard VH: Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol* 1996, 156(1):153-159.
169. Lazuardi L, Jenewein B, Wolf AM, Pfister G, Tzankov A, Grubeck-Loebenstien B: Age-related loss of naive T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. *Immunology* 2005, 114(1):37-43.
170. Res P, Blom B, Hori T, Weijer K, Spits H: Downregulation of CD1 marks acquisition of functional maturation of human thymocytes and defines a control point in late stages of human T cell development. *J Exp Med* 1997, 185(1):141-151.
171. Hodge JW, Rad AN, Grosenbach DW, Sabzevari H, Yafal AG, Gritz L, Schlom J: Enhanced activation of T cells by dendritic cells engineered to hyperexpress a triad of costimulatory molecules. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92(15):1228-1239.

172. Willinger T, Rongvaux A, Takizawa H, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Auerbach W, Eynon EE, Stevens S, Manz MG *et al*: Human IL-3/GM-CSF knock-in mice support human alveolar macrophage development and human immune responses in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(6):2390-2395.
173. Calzascia T, Masson F, Di Bernardino-Besson W, Contassot E, Wilmotte R, Aurrand-Lions M, Ruegg C, Dietrich PY, Walker PR: Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 2005, 22(2):175-184.
174. Campbell DJ, Butcher EC: Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med* 2002, 195(1):135-141.
175. Dudda JC, Lembo A, Bachtanian E, Huehn J, Siewert C, Hamann A, Kremmer E, Forster R, Martin SF: Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur J Immunol* 2005, 35(4):1056-1065.
176. Berger TG, Haendle I, Schrama D, Luftl M, Bauer N, Pedersen LO, Schuler-Thurner B, Hohenberger W, Straten Pt P, Schuler G *et al*: Circulation and homing of melanoma-reactive T cells to both cutaneous and visceral metastases after vaccination with monocyte-derived dendritic cells. *Int J Cancer* 2004, 111(2):229-237.
177. Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL, Jr.: Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res* 2012, 72(5):1070-1080.
178. Wilmott JS, Long GV, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, Kefford RF, Hersey P, Scolyer RA: Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012, 18(5):1386-1394.
179. Calcinotto A, Grioni M, Jachetti E, Curnis F, Mondino A, Parmiani G, Corti A, Bellone M: Targeting TNF-alpha to neoangiogenic vessels enhances lymphocyte infiltration in tumors and increases the therapeutic potential of immunotherapy. *J Immunol* 2012, 188(6):2687-2694.
180. Danner R, Chaudhari SN, Rosenberger J, Surls J, Richie TL, Brumeanu TD, Casares S: Expression of HLA class II molecules in humanized NOD.Rag1KO.IL2RgcKO mice is critical for development and function of human T and B cells. *PLoS One* 2011, 6(5):e19826.