

Der Effekt von murinem IL-12 und CD137L im Mausmodell bei der Behandlung des Multiplen Myeloms

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Young-Sik Kim
aus Adenau
2008

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. I. Schmidt-Wolf
2. Gutachter: Professor Dr. med. A. Hirner

Tag der Mündlichen Prüfung: 2008

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. med. T. Sauerbruch

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver
der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online
elektronisch publiziert

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	5
1.1 Das Multiple Myelom / Plasmozytom.....	6
1.2 Das CD137 / CD137L – System	8
1.2.1 Die Funktion von CD137L	9
1.2.2 CD137L in der Tumorthherapie	10
1.3 Interleukin-12	10
1.3.1 Die Funktion von IL-12	11
1.3.2 IL-12 in der Tumorthherapie	12
1.3.3 IL-12 Toxizität	13
1.4 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Vektorkonstruktion.....	15
2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	16
2.3 Gelelektrophorese	18
2.4 Restriktionsverdau	19
2.5 Ligation.....	19
2.6 Dephosphorylierung	20
2.7 Transformation	20
2.8 Herstellung chemokompetenter E. coli.....	21
2.9 Gelextraktion	21
2.10 Zellzählung	22
2.11 Kultur der MPC11-Zellen	22
2.12 Transfektion der MPC11-Zellen.....	23
2.13 ELISA	23
2.14 FACScan	24

2.15	Tierexperimente	24
2.15.1	Versuch 1 – einfache Applikation	26
2.15.2	Versuch 2 – Rechallenge	26
2.15.3	Versuch 3 – Simultanapplikation	27
2.15.4	Versuch 4 – zeitversetzte Applikation.....	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Vektorkonstruktion.....	29
3.1.1	Überprüfung des konstruierten Vektors	29
3.1.2	Expression von IL-12 und CD137L.....	30
3.2	Tierversuche.....	31
3.2.1	Einfache Applikation der modifizierten Tumorzellen	32
3.2.1.1	Tumorzellen	32
3.2.1.2	Gesamtüberleben.....	33
3.2.2	Applikation von Wildtyp- und modifizierten Tumorzellen	35
4.	Diskussion.....	38
5.	Zusammenfassung.....	48
6.	Abkürzungsverzeichnis	50
7.	Literaturverzeichnis	52
8.	Danksagung.....	61

1. Einleitung

Bei der Behandlung onkologischer Erkrankungen machen die in der Immunologie gewonnenen Erkenntnisse neue Therapieansätze möglich. Oft kann das Immunsystem Krebszellen nicht in ausreichendem Maße als verändert bzw. körperfremd erkennen. Im Krankheitsfall reicht diese Erkennung daher offensichtlich nicht aus, um die Tumorzellen an ihrem Wachstum zu hindern und zu vernichten. An diesem Punkt setzt die Immuntherapie an. Mit Hilfe neuer Kenntnisse im Bereich der Immun- und Gentechnik wird versucht, durch Aktivierung des Immunsystems eine gezielte Immunantwort gegen die Tumorzellen auszulösen und diese somit anzugreifen (*Bronte et al., 2006; Neeson und Paterson 2006*). Ein möglicher immuntherapeutischer Ansatz wäre, die malignen Zellen mit einem Alarmsignal auszustatten, um das schlummernde Immunsystem zu aktivieren und zu sensibilisieren. Dies könnte dadurch erreicht werden, indem man Gene in Krebszellen einführt, deren Expressierung eine gezielt stimulierende Wirkung auf das Immunsystem hat und dieses nachdrücklich auf die Tumorzellen aufmerksam macht (*Schuster et al. 2006*).

Die Immuntherapie spielt bei einer Vielzahl onkologischer Erkrankungen bereits eine wichtige Rolle (*Sangro et al. 2005; Schimanski et al. 2006*). Es gibt eine Vielzahl von immunstimulatorischen Zytokinen und Chemokinen, die in experimentellen Tumormodellen untersucht worden sind (*Doehn et al. 2004*). In dieser Arbeit untersuchten wir den immunstimulatorischen Effekt der beiden Zytokine IL-12 und CD137L bei der Behandlung des Multiplen Myeloms als ein Vertreter der hämatologisch-onkologischen Erkrankungen.

Wie bereits erwähnt, werden maligne Zellen nicht immer als körperfremd erkannt. Um eine vorhandene, jedoch nicht ausreichende Immunantwort zu verstärken, wurden bereits vielfältige Strategien angewandt :

1. die direkte Stimulation von Effektorzellen (*Manetti et al. 1993*),
2. die Hochregulation kostimulierender Faktoren (*Melero et al. 1998*) und
3. die Verstärkung der Antigen-Präsentation (*Bronte et al. 2006*).

CD137-Ligand (CD137L) wird auf aktivierten Antigen präsentierenden Zellen (APCs) wie B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Als Liganden werden Stoffe bezeichnet, die einen Rezeptor besetzen und rezeptorvermittelt eine Wirkung auf die Zielzelle ausüben. Eine Kostimulation durch andere bekannte Mechanismen ist nicht essentiell erforderlich (*Shedlock et al. 2003*). Antitumorale Effekte wurden in Kombination mit IL-12 (systemisch oder lokal angewendet) sogar verstärkt (*Zhang et al. 2004; Novelli und Casanova 2004*). Somit ist die direkte Stimulation von Effektorzellen (Punkt 1) in dieser Konstellation von besonderer Bedeutung.

Es gibt nur wenige Daten über den Effekt von CD137L in der Immuntherapie bei hämatologischen Malignitäten. Durch die IL-12- und CD137-CD137L Interaktionen ergeben sich viel versprechende Möglichkeiten, eine effektive antitumorale Immunantwort zu induzieren (*Rabu et al. 2005*).

1.1 Das Multiple Myelom / Plasmozytom

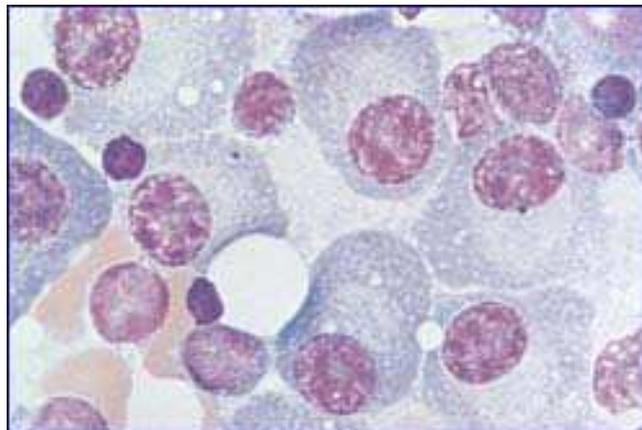


Abb. 1 - Plasmazytom

Das Plasmazytom oder Multiple Myelom (*Abb.1*) gehört zu den malignen Erkrankungen der B-Zell-Reihe und wird zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen gerechnet. Kennzeichnend ist eine Infiltration des blutbildenden Knochenmarks durch maligne *Plasmazellen* (*Dvorak 2006; Murakami und Handa 2006*).

Bei der überwiegenden Zahl der Fälle wird von den Plasmazellen ein monoklonales im Blut nachweisbares Immunglobulin produziert, dabei spricht man von einer monoklonalen Gammopathie (Abb. 2). Im engeren Sinne bezeichnet der Begriff Plasmozytom einen auf eine Lokalisation begrenzten, malignen Plasmazelltumor.

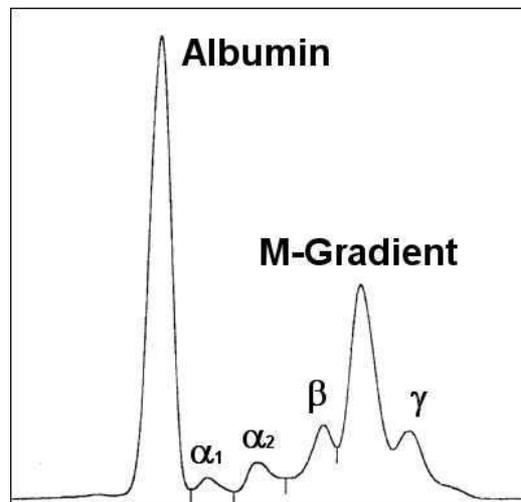


Abb. 2 – monoklonale Gammopathie beim Plasmozytom

Die Pathogenese des Multiplen Myeloms ist weitestgehend unbekannt. Es wurden der Einfluss radioaktiver Strahlung oder auch verschiedene genetische Translokationen diskutiert, deren Einfluss aber noch nicht vollständig geklärt ist. Auch wurden Mutationen in Onkogenen beobachtet (*Hideshima et al. 2005*). Die maligne Entartung der Plasmozytomzellen findet meist außerhalb des Knochenmarks in Keimzentren peripherer lymphatischer Organe statt. Die B-Zellen, die in diese Keimzentren eintreten, haben schon die ersten Differenzierungsschritte (V-D-J-Rearrangements und Isotyp-switch) hinter sich. In diesem Stadium treten die genetischen Veränderungen ein, die letztlich zur Entstehung des Plasmozytoms führen (*Hess 2006*).

Es werden bei den meisten Patienten Translokationen beobachtet, die bewirken können, dass ein Onkogen unter die Kontrolle eines regulatorischen Gens gelangt und somit stark aktiviert wird. Beim Plasmozytom ist dies am häufigsten (ca. 80%) das Immunglobulin-Enhancer-Gen auf Chromosom 14q31. Häufige Partner dieser Translokation sind Teile des Chromosoms 4, Chromosom 6, 20 und 16. Im weiteren Verlauf der Erkrankung treten noch andere genetische Veränderungen hinzu (*Dvorac*

2006). Die unterschiedlichen genetischen Veränderungen gehen mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen einher und definieren vielleicht eigene Krankheiten. Der Nachweis bestimmter genetischer Veränderungen in Plasmazytomzellen eines Patienten lässt in manchen Fällen Rückschlüsse auf die Prognose zu (*Murakami und Handa 2006; Stewart und Fonseca 2005*).

Nach der klonalen Vermehrung einer entarteten Plasmazelle kommt es zur Infiltration des Knochenmarks. Es folgen die Zerstörung des Knochens und die Verdrängung der normalen Hämatopoese. Hierbei werden Zytokine und Wachstumsfaktoren von Seiten der Tumorzellen produziert, die dazu führen, dass ein gesteigerter Knochenabbau stattfindet (*Dvorak 2006*). Dies führt zu dem klinischen Bild einer Osteoporose als auch zu den charakteristischen im Röntgenbild sichtbaren Knochenschäden. Die malignen Zellen bilden Antikörper oder Antikörperteile (die sogenannten Leichtketten), welche sich im Körper anreichern und für das klinische Bild und die Komplikationen der Erkrankung verantwortlich sind (*Gysel et al. 2006*).

Zur Therapie des Multiplen Myeloms wurden bereits sehr viele klinische Studien veröffentlicht. Besonders in den letzten Jahren gab es sehr viele Veränderungen in dem Behandlungskonzept dieser Erkrankung (*Stewart und Fonseca 2005; Kumar et al. 2006; Hideshima et al. 2005; Glasmacher et al. 2006; Terriou et al. 2006*).

1.2 Das CD137/CD137L- System

Der CD137-Rezeptor (4-1BB-Rezeptor) ist ein 30 kD Typ I Membran-Glykoprotein, das sich als 55 kD Homodimer an der Oberfläche von aktivierten CD4- und CD8- T-Lymphozyten, aktivierten NK-Zellen und eosinophilen Granulozyten befindet. Das Gen für humanes CD137 liegt auf Chromosom 1p36, in einem Cluster verwandter Gene, assoziiert mit Mutationen verschiedener maligner Erkrankungen (*Vinay und Kwon 1998*).

Die Expression des CD137-Rezeptors wurde erstmals auf T-Lymphozyten (CD₄/CD₈) beschrieben (*Goodwin et al. 1993*). Aktuelle Publikationen beschreiben die Expression auf dendritischen Zellen (DCs), folliculären DCs, Natural Killer Cells (NK), auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und auf Osteoblasten (*Palma et al.*

2004). Der Ligand für CD137 ist ein 34 kD Typ II Glykoprotein ist ein Mitglied der TNF-Familie, wie z.B. TNF, CD40L oder CD27L. Er wird vor allem auf der Oberfläche von APCs wie aktivierten Makrophagen, Monozyten, reifen dendritischen Zellen und aktivierten oder reifen B Zellen exprimiert (Goodwin *et al.* 1993). CD137L liegt in einem Cluster verwandter Gene der TNF-Rezeptor Genfamilie in der Region 19p13 (Gruss und Dower 1995). Diese Genfamilie spielt insbesondere für die Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose der Zellen eine wichtige Rolle (Shen und Pervaiz 2006).

1.2.1 Die Funktion von CD137L

Ein T-Lymphozyt braucht für die Induktion seines Wachstums und seiner Differenzierung zwei Faktoren: (1) Eine Wechselwirkung zwischen dem T-Zellrezeptor und einem MHC-präsentierten Peptid und (2) ein ko-stimulatorisches Signal. Beide Signalgeber sind mit einer Antigen präsentierenden Zelle verbunden. Zu den Kostimulatoren gehören u.a. die Mitglieder der TNF-Genfamilie (z.B. TNF, CD40L, CD137L), die Zytokine (z.B. IL-12) oder auch Mitglieder der B7-Familie (z.B. CD28), die sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken können (Pardoll 2002).

Für die Induktion von CD137 ist die Expression von CD28 auf der T-Zelle notwendig. CD137 kann eine aktivierungs-induzierte Apoptose verhindern (Hurtado *et al.* 1997) und eine erfolgreiche Immunantwort aufrechterhalten und verlängern, auch in Abwesenheit von CD28 (Kim *et al.* 1998). Die Interaktion von CD137L mit seinem Rezeptor stimuliert Proliferation von T-Lymphozyten und die Produktion von IFN, IL2 und IL4 durch CD₄ T-Zellen (DeBenedette *et al.* 1995). Während CD28 (Rezeptor für B7) eine wichtige Rolle für die Induktion einer Immunantwort spielt, ist CD137 wichtiger für den Fortbestand dieser Antwort (Kwon *et al.* 2000; Palma *et al.* 2004).

Von der Interaktion zwischen CD137 und CD137L profitieren zudem auch Antigen präsentierende Zellen, wie B-Lymphozyten oder Makrophagen. B-Zellen erfahren eine Kostimulation, die zur Proliferation führen kann. Makrophagen werden neben der verstärkten Expression von IL6, IL8, M-CSF und TNF α auch zur Proliferation angeregt (Vinay und Kwon 1998).

1.2.2 CD137L in der Tumorthherapie

CD137L wird auf humane Tumorzelllinien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Der reverse Signalweg aktiviert die IL8-Produktion der Tumorzellen (Salih 2000). Dieses Zytokin ist ein starkes Chemoattraktand für neutrophile Granulozyten, T-Zellen und basophile Granulozyten. Es verstärkt damit die Immunreaktion. Die Aktivierung von T-Lymphozyten durch ein Antigen über den T-Zellrezeptor führt zur Expression von CD137. Abhängig davon, wie stark CD137L auf der Tumorzelle exprimiert wird, werden T-Lymphozyten kostimuliert, was zur IFN- γ - und IL2-Ausschüttung durch die T-Zellen führt (Salih et al. 2001).

Es ist unklar, warum Tumorzellen CD137L exprimieren und auch ob es ihnen irgendeinen Vorteil bietet (Salih et al. 2000). Einige Tumore - vor allem Leukämien - schütten auch eine im Vergleich zu normalen Zellen erhöhte Menge einer sekretierten Form von CD137L (sCD137L) aus. Dadurch entzieht sich der Tumor der Kontrolle durch das Immunsystem, indem er u.a. die Kostimulation der Lymphozyten limitiert. Zudem werden apoptotische Signale zurück in die Tumorzelle reduziert (Salih et al. 2001).

Der Gentransfer von CD137L kann dazu genutzt werden, eine antitumorale Immunantwort zu erzielen. Bei einer Vielzahl solider Tumoren konnte CD137L bereits eine antitumorale Immunität induzieren (Melero et al. 2001). Dennoch gibt es derzeit nur wenige Daten in Bezug auf hämatologisch-onkologische Erkrankungen.

1.3 Interleukin-12

Die beiden Untereinheiten sind über Disulfidbindungen kovalent verbunden und bilden ein p70 Heterodimer (Trinchieri 1998a, Trinchieri 1998b). Die p40 Untereinheit bildet auch Homodimere, die die biologische Funktion des von IL-12-p70 Heterodimers spezifisch inhibieren (Mattner et al. 1993). Allerdings gilt das bei physiologischen Mengen wahrscheinlich nur in der Maus und nicht im Menschen (Ling et al. 1995). Obwohl die humanen und murinen p35 bzw. p40 Untereinheiten zu

etwa 65% identisch sind, zeigt humanes IL-12 keine Aktivität auf murinen Zellen (Schoenhaut et al. 1992).

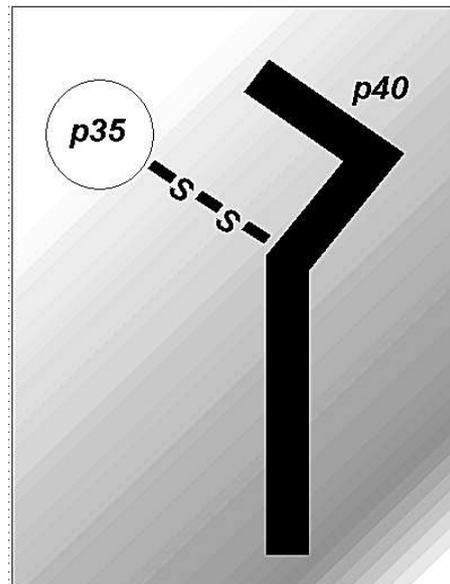


Abb. 3 – Molekularstruktur von IL-12 (schematische Darstellung)

Geringe Mengen der p35-Untereinheit werden von nahezu allen Zelllinien transkribiert, die p40-Untereinheit findet sich hingegen nur in Zellen, die auch biologisch aktives IL-12 produzieren. Der Hauptproduzent von aktivem IL-12 sind phagozytische Zellen (Trinchieri 1994).

1.3.1 Die Funktion von IL-12

IL-12 ist das hauptverantwortliche Zytokin für die Differenzierung von Th0 zu Th1-Zellen, wodurch eine Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort eingeleitet wird (Lee et al. 1998). Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) oder aufgereinigte Monozyten produzieren eine größere Menge IL-12 (p70 und p40), wenn sie von Bakterien oder bakteriellen Produkten wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert werden. Wenige Stunden nach einer Infektion durch intrazelluläre Parasiten oder Bakterien beginnt die Produktion (Lee et al. 1998).

IL-12 wirkt als proinflammatorisches Zytokin, das NK-Zellen und phagozytische Zellen aktiviert, wodurch letztere vermehrt bakteriozid werden (*D'Andrea et al. 1995*). Zudem wird die IL-12-Produktion in entzündetem Gewebe durch IFN verstärkt (*Kubin et al. 1994*). Diese Eigenschaft des IFN spielt eine wichtige Rolle, da IL-12 die IFN-Produktion von T- und NK-Zellen in großem Maße induziert (*Chan et al. 1991*). Somit entsteht eine positive Rückkopplung während einer Entzündung. Als Resultat werden NK-Zellen verstärkt zytotoxisch und Makrophagen verstärkt phagozytisch. Erst diese Aktivierung ermöglicht die Abwehr eines Eindringlings. Zudem ist IL-12 das hauptverantwortliche Zytokin für die Differenzierung von Th0- zu Th1-Zellen, die wiederum IFN produzieren (*Manetti et al. 1993*). Dadurch wird eine Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort eingeleitet.

1.3.2 IL-12 in der Tumorthherapie

IL-12 induziert eine Antitumorantwort des Immunsystems über mehrere Mechanismen. Seine Effizienz für die Tumorthherapie wurde in zahlreichen Tiermodellen belegt (*Gately et al. 1994; Colombo und Trinchieri 2002*). IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches über die Induktion einer TH1 Antwort und Anregung von CTLs immunregulatorisch wirkt. Somit stellt IL-12 eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität dar (*Gheradi et al. 2001*). Bei der Abwehr von Infektionen, speziell bei intrazellulären Parasiten spielt IL-12 eine wichtige Rolle, sowohl als proinflammatorisches Zytokin (Regulation der IFN-Produktion, Aktivierung phagozytischer Zellen, Induktion der Produktion von Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten und Verstärkung bakterizider Mechanismen) wie auch als immunregulatorisches Zytokin (Induktion von Th1-Zellen, CTLs und Produktion opsonierender Antikörper) (*Sher et al. 2003*).

Die Antitumoraktivität von IL-12 basiert auf Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität. IL-12 induziert die IFN- und TNF-Produktion von NK, NKT und T-Zellen, was einen zytotoxischen oder zytostatischen Effekt auf Tumorzellen hat (*Lee et al. 1998*). IL-12-aktivierte NK-Zellen verfügen über eine verstärkte zytotoxische Aktivität, die zum Tod der Tumorzelle führen und die Integrität des vaskulären Tumorendothels beeinträchtigen kann (*Lollini et al. 2005*). Unter

bestimmten experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass IL-12 eine bestehende Toleranz oder Anergie aufheben kann. Dies alleine schon macht es zu einem überaus interessanten Zytokin für die Tumorthherapie (*Trinchieri und Scott 1999*).

IL-12 hat bei systemischer oder lokaler Gabe des rekombinanten Proteins Anti-Tumoreffekte (*Lollini et al. 2005*). Allerdings finden diese sich bei nicht-toxischen Dosen nur bei sehr wenigen Patienten und sind zudem nicht von Dauer. Eine komplette und permanente Tumorregression konnte auf diesem Weg beim Menschen bislang nicht erreicht werden (*Gollob et al. 2001*). Die Zukunft der IL-12-Therapie liegt somit in anderen Applikationswegen als der direkten, systemischen Gabe des rekombinanten Proteins (*Portielje et al. 2003; Sangro et al. 2005*).

1.3.3 IL-12 Toxizität

Murines IL-12 (mIL-12) zeigt sich in unterschiedlichen Mausmodellen als effizientes Therapeutikum mit antimikrobieller, antimykotischer und antiparasitischer Aktivität (*Rodolfo und Colombo 1999; Portielje et al. 2003*). Präklinische Studien u.a. an Mäusen, Affen und anderen Tieren zeigten eine Reihe von Nebenwirkungen, die mit denen des Menschen übereinstimmten (*Burke 1999; Sangro et al. 2005*).

Die letale Dosis bei Mäusen hingegen liegt bei ca. 0,5 - 1,0 µg/Tag bei einem gesamten Blutvolumen von ca. 2 ml. Damit tolerieren Mäuse eine etwa hundertfach höhere IL-12-Konzentration im Blut als Menschen. In IL-12 behandelten Menschen und Mäusen steigen die IFN-Spiegel stark an, was auf NK- und T-Zellaktivierung zurückzuführen ist (*Burke 1999*).

Diese Toxizität wurde bei einer Phase-II-Studie zur Behandlung des Nierenkarzinoms bestätigt. Den Patienten wurde an bis zu 5 aufeinander folgenden Tagen intravenös 500 ng/kg/Tag rekombinantes, humanes IL-12 appliziert (ca. 6 ng IL-12/ml Blut bei einem Blutvolumen von 5,6l eines Menschen mit 70kg Gewicht). Zwei Patienten verstarben, 12 von insgesamt 17 Patienten mussten als Folge der Toxizität im Krankenhaus versorgt werden. Dieses Ausmaß an Nebenwirkungen ließ sich jedoch durch eine zeitversetzte Applikation vermeiden. Die Patienten bekamen

erst 2 Wochen nach der ersten IL-12-Dosis weiteres IL-12 verabreicht. Dann wurden auch Zyklen von 5 aufeinander folgenden Tagen toleriert. Diese erste Applikation hatte eine deutliche Verringerung der IL-12 induzierten IFN Produktion und damit der Toxizität zur Folge (*Leonard et al. 1997; Carson et al. 1999*).

Die häufigsten Nebenwirkungen der bisherigen Studien bei der Behandlung von onkologischen Erkrankungen mit IL-12 sind u.a. grippeähnliche Symptome, Leukopenie (Leukozyten $<4000/\mu\text{l}$ im peripheren Blut), Anstieg der Lebertransaminasen und gastrointestinale Beschwerden (*Ohe et al. 1998*).

1.4 Zielsetzung

Die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem erfolgt bei Krebspatienten nur in ungenügendem Maße. Durch verschiedene, zum Teil noch unverstandene Mechanismen wird die Reifung Antigen präsentierender Zellen gehemmt. Dies soll durch gezielte Aktivierung des Immunsystems unterbunden werden.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der beiden Zytokine CD137L und IL-12 auf das Immunsystem im Mausmodell beobachtet mit dem Ziel, neue Möglichkeiten der spezifischen Immuntherapie bei der Behandlung des Multiplen Myeloms zu finden.

Hier präsentieren wir Daten eines murinen Plasmozytommodells, in welchem der Effekt von CD137L und IL-12 als Mono- oder als Kombinationstherapie verglichen wurde. Dabei wurden das Wachstum der Plasmozytomzellen im Verlauf als auch das Gesamtüberleben der Tiere untersucht.

2. Material und Methoden

Nach Konstruktion der Vektoren und deren Einschleusung in die MPC11-Zellen mittels Elektroporation (Amaza) erfolgte die Selektion der positiven Klone durch das Antibiotikum Neomycin (G418). Die Höhe der Expression des in das Kulturmedium sekretierten IL-12 wurde mittels FACSscan überprüft, die des membrangebundenen CD137L mittels ELISA. Schließlich wurden die Tierversuche begonnen.

2.1 Vektorkonstruktion

Die cDNA des murinen CD137L und IL-12 wurde jeweils von Shu Hsia Chen (*Mount Sinai School of Medicine, New York, USA*) und Richard Mulligan (*Children's Hospital, Boston, USA*) erworben. Diese cDNA befand sich auf einem Trägervektor, der für unsere Versuche nicht von Bedeutung war.

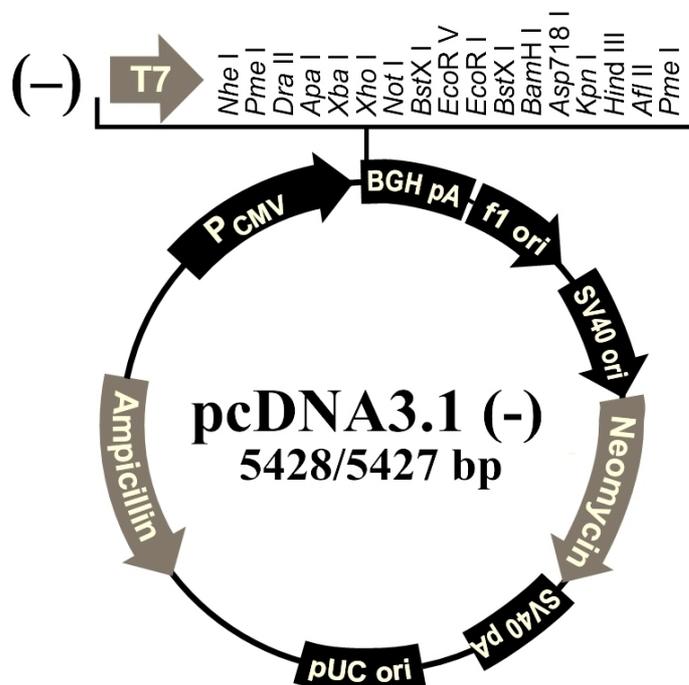


Abb. 4 – pcDNA3.1(-) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Wir konstruierten einen Vektor, in welchen die jeweilige cDNA integriert wurde. Mittels PCR wurde die jeweilige cDNA aus dem Trägervektor isoliert und eine Erkennungssequenz der beiden Enzyme NOT I und HIND III (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, *Deutschland*) jeweils an beide Enden des nun linearen CD137- und IL-12-Gens gekoppelt.

Diese cDNA wurde darauf in den Säugetierexpressionsvektor pcDNA3.1(-) (Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe, *Deutschland*; 5427 bp, *Abb.4*) kloniert. Es handelt sich dabei um einen Säugetierexpressionsvektor, welcher u.a. eine *multiple cloning site* (b895-1010; u.a. für die Restriktionsenzyme NOT1 und HIND3), einen CMV Promotor (b232-819), einen T7 Promotor (b863-882), ein Neomycin Resistenzgen (ORF; b2136-2930) und ein Ampicillin Resistenzgen (b4432-5428) enthält.

Das Ampicillin Resistenzgen wurde zur Selektion der positiven E.coli Klone nach der Vektorkonstruktion verwendet, das Neomycin Resistenzgen zur Selektion der positiven MPC11-Zellen. Die Zytokin-DNA wurde hinter den CMV Promotor kloniert. Die richtige Position und Lage der Zytokin-DNA wurde durch Sequenzieren (*GATC Biotech, München, Deutschland*) bestätigt.

2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zur Amplifikation von CD137L und IL2 und zum Erstellen Restriktionsenzym spezifischer Enden eingesetzt. Mit Hilfe der PCR kann ein kurzer, genau definierter Teil eines DNA-Strangs vervielfältigt werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um ein Gen, einen Teil eines Gens oder auch um nicht kodierende DNA-Sequenzen handelt (*Joyce 2002; Bojunga et al. 2002*).

Während einer PCR werden ca. 30 Zyklen durchlaufen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten :

- Denaturierung : Trennung der DNA-Doppelstränge bei 94°C
- Primerhybridisierung (Annealing) : Anlagerung der Primer an den DNA-Einzelstrang. Die Temperatur hängt von den Primern ab (typischerweise zwischen 50 und 65°C).
- Elongation : Auffüllen der fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden (dNTPs) bei ca. 72°C.

Ein typischer PCR-Ansatz sah bei einem Gesamtvolumen von 50µl folgendermaßen aus:

- 50 pmol Start-Primer (Oligodesoxynukleotid, 20bp)
- 50 pmol End-Primer (Oligodesoxynukleotid, 20bp)
- 600 µM dNTP (bestehend aus je 150µl dATP, dTTP, dCTP und dGTP)
- 5 µl des mitgelieferten PCR Buffers (pro ml : 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500mM KCl)
- 1 Unit Taq-DNA-Polymerase
- 0,5 ng DNA (Plasmid-DNA)
- H₂O ad 50 µl

Sämtliche Reagenzien für die Durchführung der PCR wurden bei der *Roche Diagnostics GmbH (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)* erworben. Als Primer kamen folgende Oligodesoxynukleotide zur Anwendung (unterstrichen sind die jeweiligen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Not I und Hind III), die bei der GATC Biotech AG (*GATC, München, Deutschland*) erworben wurden.

5´- CGT TCG GCG GCC GCT CCC GG -3´

5´- AGC CTC AAG CTT GTC GAC CG -3´

Dieser PCR-Ansatz wurde anschließend in einem Thermocycler (*R&D, Wiesbaden, Deutschland*) bei folgendem Protokoll weiterverarbeitet.

Schritt	Dauer	Prozeß	Temperatur
1	5 min	Denaturierung	94 °C
2	1 min / 30 sek.	Denaturierung	94 °C
3	1 min / 30 sek.	Annealing (Primer)	je nach Primer
4	1 min, je nach Insertlänge	Elongation	72 °C
5	zurück zu Schritt 2 → 29 Zyklen		
6	5 min	Endelongation	72 °C
7	Ende		

Das PCR-Produkt wurde anschließend einer Gelelektrophorese unterzogen und aufgereinigt.

2.3 Gelelektrophorese

Benötigte Medien für die Herstellung eines 1%igen Gels :

- 100ml 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)
- 1g Agarose (*Seakem GTG Agarose, Fa. BioRad, California, USA*)

Um die Größe (in kb) der DNA-Proben (Plasmide, PCR-Produkte) abschätzen zu können, wurde die DNA mit 6x DNA-Ladepuffer im Verhältnis 5:1 vermischt und in einem 1%igem Agarose-Gel (für DNA-Fragmente größer als 400 bp) aufgetrennt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1x TBE-Puffer verwendet, die angelegte Spannung betrug ca. 70 V, die Stromstärke wurde nicht beschränkt und die Laufzeit betrug ca. 30 Minuten.

Zur sichtbaren Markierung der DNA-Moleküle wurde das Gel nach der Auftrennung in ein Ethidiumbromidbad (*Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland*) mit einer Konzentration von 1 µg/ml für 10 Minuten gelegt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße (in kb) wurde DNA Marker X (*Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland*) zusätzlich auf das Gel aufgetragen.

2.4 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau stellt für jede Klonierung eine essentielle Technik dar. Mit seiner Hilfe gewinnt man das gewünschte DNA-Stück aus einem größeren Plasmid. Darüber hinaus kann DNA bzw. Plasmid bezüglich seiner richtigen Zusammensetzung (z.B. nach einer Ligation) restriktionsanalytisch überprüft werden. Restriktionsenzyme und deren Puffer wurden von den Firmen NEB (*New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland*) und Roche (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland*) verwendet. Ein typischer Ansatz sah bei einem Gesamtvolumen von 50 µl folgendermaßen aus:

- 2 µg DNA
- 2 Units Restriktionsenzym
- 5 µl 10x Restriktionsenzypuffer
- H₂O ad 50 µl.

Der Verdau erfolgte für 1-2 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur (37°C) und wurde dann gelelektrophoretisch analysiert.

2.5 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4 DNA-Ligase. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbartem 5'-Phosphatrest und der 3'-Hydroxylgruppe in doppelsträngiger DNA (oder RNA).

Ein typischer Ligationsansatz sah bei einem Gesamtvolumen von 30µl folgendermaßen aus :

- 1 µg DNA („sticky ends“)
- 3 µl 10x Ligationspuffer (660mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 10mM ATP)
- 3 Units T4-DNA-Ligase
- H₂O ad 30 µl.

Sämtliche Reagenzien für die Durchführung der Ligation wurden von *Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland* erworben. Es folgte eine Inkubation über Nacht (8h) bei 16°C.

2.6 Dephosphorylierung

Die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP, *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland*) katalysiert die Entfernung der 5'-Phosphatgruppe bei DNA (und RNA). Dadurch kann die Selbstligation von Vektoren mit kompatiblen Enden effizient vermindert werden.

Ein typischer Ansatz sah bei einem Gesamtvolumen von 30µl folgendermaßen aus :

- 1µg DNA
- 1 Unit Alkalische Phosphatase
- H₂O ad 30 µl.

Der Ansatz wurde für 1 h oder länger bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung der CIP durch die Gelextraktion.

2.7 Transformation (Hitzeschock)

Um die fertige Plasmid-DNA in chemokompetente *E. coli* einzuschleusen, wurde die Hitzeschock-Methode (*Hanahan 1983*) angewandt. Der Vorteil hierbei ist, dass das Plasmid nicht salzfrei vorliegen muss und der apparative Aufwand relativ gering ist. Benötigt werden :

Chemisch kompetente *E. coli* Bakterien (Stamm DH5α) wurden auf Eis aufgetaut. Zu 50-100µl dieser Bakterien wurden ca. 10-100ng des Ligationsproduktes (Plasmid) gegeben und 30 min. auf Eis inkubiert. Das Volumen der Plasmid-DNA-Lösung (enthält ein Ampicillin-Resistenzgen) lag unter 10% des Gesamtvolumens. Es erfolgte anschließend ein Erwärmen der Bakterien auf 42°C für ca. 45 sek. in einem

Wasserbad, daraufhin die unmittelbare Absenkung der Temperatur für 5 min. auf Eis. 750 µl Luria-Broth-Medium (LB-Medium; 1L : 1000ml deionisiertes Wasser, 10g Bactotrypton, 5g Bakterienhefenextrakt, 10g NaCl) wurden zugegeben, die Bakterienlösung 60 min bei 37°C (200 U/min) inkubiert und auf mit Ampicillin (50-100 µg/ml) versetzten Agarplatten ausgestrichen. Nach einer erneuten Inkubation bei 37°C über Nacht konnten die einzelnen Kolonien abgenommen und weiterkultiviert werden. Aufgrund des Antibiotikums wuchsen nur die Klone heran, die das Plasmid mit dem Resistenzgen des Antibiotikums enthielten.

2.8 Herstellung chemokompetenter E. coli (nach Inoue)

Zur Herstellung chemokompetenter E. coli wurden 500 µl einer stationären E. coli-Kultur (DH5α) in 50 ml LB-Medium gegeben und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD600 von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Nach 5 min. auf Eis (4°C) wurden die Bakterien bei 4°C und 5000g abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml eiskalter 100mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 20 min Inkubationszeit auf Eis erfolgte ein erneutes Abzentrifugieren (10 Minuten, 4°C, 5000g) und die anschließende Resuspension des Pellets in 2,5 ml 100mM CaCl₂ versetzt mit 20% Glycerin. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert (100µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.9 Gelextraktion

Nach erfolgtem Lauf der DNA durch ein Agarose-Gel, wurden zu isolierenden DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Isolation mit Hilfe des Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (*Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland*). Dieses Verfahren dient zur Aufreinigung der DNA und zur Entfernung sämtlicher verwendeter Pufferlösungen und hat sich durch einfache, schnelle Anwendung und hohe Ausbeuten bewährt. Es wurde nach Herstellerangaben durchgeführt

Bei der Gelextraktion werden die Wasserstoffbrückenbindungen der Agarose-Polymere durch Erwärmen und unter dem Einfluß chaotroper Salzen gelöst, wobei

die DNA aus der Lösung verdrängt wird. Dadurch wird die Bindung der DNA an eine vorgefertigte Säulenmatrix ermöglicht. Die Elution der DNA von dieser Matrix erfolgte durch Wasser.

2.10 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgt nach Trypanblau-Färbung lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer (Optik Labor). Die toten Zellen lassen sich aufgrund ihrer Anfärbung mit dem Farbstoff von den vitalen Zellen unterscheiden.

20µl Zellsuspension werden mit 180µl Trypanblau 0,5% (1:10) verdünnt und auf die Zählkammer gegeben. Im Anschluss werden die vitalen Zellen in den vier Quadranten (je 4mm², 0,1µl) der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellzahl berechnet sich anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl aller vier Quadranten}/4 \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die Arbeiten erfolgten alle bis auf die Zellzählung unter einer sterilen Werkbank (*Herasafe 12, Heraeus, Hanau und Anatair BSK, Bioflow, Meckenheim*).

2.11 Kultur der MPC11-Zellen

MPC11 ist eine murine Plasmazytom-Zelllinie, welche IgG2b exprimiert. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (*Gibco, Paisley, UK*) in Zellkulturflaschen (*Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland*) in einer 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert und wachsen größtenteils in Suspension, jedoch ebenfalls adhärent. Dem Kulturmedium wurde 5% Fetal Calf Serum (FCS), 2mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

2.12 Transfektion der MPC11-Zellen

Für die Transfektion (*Elektroporation*) wurde ein *Amaxa Nukleofektionssystem* verwendet. 5µg zirkuläre Plasmid-DNA wurde mit 10^6 MPC11 Zellen und 100µl Amaxa Nukleofektionslösung in eine Nukleofektions-Küvette gegeben. Daraufhin wurde die Elektroporation in dem Amaxa Nucleofector nach Herstellerangaben durchgeführt und die Zellen auf 96 Lochplatten (*Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland*) mit einer Dichte von 10^4 Zellen pro Loch bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 48 Stunden wurde mit der Selektion der positiven Klone begonnen. Dazu wurde G418 (Neomycin) in steigenden Konzentrationen zur Kulturlösung gegeben bis zu einer Höchstdosis von 0,8 mg/ml. Dabei wird die Adhäsion der vitalen Zellen auf Kunststoffoberflächen zur Selektion ausgenutzt, da durch das Wechsel der Kulturlösung die nicht vitalen MPC11-Zellen entfernt werden. Zudem muss auch nach Erreichen der Höchstdosis G418 weiterhin in der Lösung enthalten sein, um die Selektion zu erhalten. Zur Zellernte der teilweise adhärenen Zellen werden diese mechanisch mittels eines cell-scrapers (Zellschaber) abgelöst.

2.13 ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), kurz auch EIA genannt, ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert.

Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Zellkulturüberstand, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. An Antigen-spezifische Antikörper wird zuvor ein Enzym gekoppelt. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

Mit den Kulturüberständen der IL-12 produzierenden MPC11 Zellen (10^6 Zellen wurden in 1ml RPMI 1640 Medium über 24 Stunden kultiviert) wurde ein ELISA

durchgeführt, um die Menge des produzierten IL-12 zu messen, welches durch die nukleofektierten MPC11 Zellen exprimiert wurde. Dazu wurde ein IL-12-ELISA-Kit (*R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland*) gemäß Protokoll verwendet. Die Platten wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem ELISA Reader (*Rosys Anthos, Hombrechtikon, Schweiz*) gemessen.

2.14 FACScan

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) beschreibt das Verfahren der Durchflusszytometrie, welches in der Biologie und in der Medizin verwendet wird. Während dieses Vorganges werden die Oberflächeneigenschaften von Zellen gemessen. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der an die Zelle gekoppelten Antikörper-Farbstoff-Komplexe bei Passierung eines Laserstrahls (*Bauer und Bohm 1996*).

Der FACScan wurde durchgeführt, um den Grad der Expression des membranständigen CD137L zu messen. CD137L-PE Antikörper wurden bei eBIOscience Deutschland erworben. 5µl des Antikörpers wurden zu 5×10^5 CD137L Zellen in einem Gesamtvolumen von 500µl PBS Puffer/1% Rinderserumalbumin gegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 min. auf Eis. Nach Waschen der Zellen wurde die Messung auf einem Beckman Coulter Durchflusszytometer (Beckman Coulter GmbH Diagnostics, Krefeld, Germany) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit WinMDI (*The Scripps Research Institute, La Jolla, USA*).

2.15 Tierexperimente

Für die Tierversuche wurden die Mäuse der Mausinzuchtlinie BALB/c (6 Wochen alt, weiblich, 20g Körpergewicht/Tier; *Abb. 5*) verwendet. Die Tiere wurden bei *Charles River, Sulzfeld, Deutschland* erworben. Nach Genehmigung des Tierversuches durch die Bezirksregierung Köln wurden diese Tiere unter Aufsicht des zentralen Tierstalles der Medizinischen Einrichtungen in Bonn gehalten. Die Tiere befanden sich in

Gruppen zu 5-10 Tieren pro Käfig mit einem Tag-Nachtrhythmus von jeweils 12 Stunden bei frei zu wählender Trink- und Nahrungsmenge.



Abb.5 – BALB/c Maus

Alle Tierexperimente wurden in Einzelgruppen von 8 Tieren durchgeführt, die Beobachtungszeit betrug 60 Tage. Die Mäuse wurden durch eine subkutane Injektion in einem wechselnden Zeitrahmen nach unten aufgelisteten Schema immunisiert. Die Mäuse wurden während der subkutanen Injektion nicht narkotisiert.

In unseren Experimenten wurden Zellen der murinen Plasmozytomreihe MPC11 verwendet. Bei der subkutanen Applikation dieser Zellen (jeweils in die Flanken/Rücken der Tiere, so dass diese nicht durch den wachsenden Tumor behindert werden) bildeten die Tiere einen solitären Tumor aus, welcher in Länge und Breite vermessen werden konnte. Die letale Dosis dieser murinen Plasmozytomzellen (Wildtypzellen) betrug $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Maus bei subkutaner Applikation, wie es in der Kontrollgruppe angewandt wurde.

Zur Vorbereitung der Tumorzellen wurden diese in einer Neubauer-Zählkammer (*Optik Labor*) gezählt und nach Zentrifugation in PBE-Puffer (PBS + 1 % BSA + 2 mM EDTA; PBS : Phosphate Buffer Solution, BSA : Bovine Serum Albumin, EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid; *Fa. Laboratories, Linz, Österreich*) resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur subkutanen Injektion auf Eis gelagert.

2.15.1 Versuch 1 – einfache Applikation

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Maus in einem Volumen von 100 μ l jeweils in die linke Flanke subkutan appliziert (*Tabelle 1*). Die Kontrollgruppe erhielt mit $2,5 \times 10^5$ Wildtypzellen eine letale Dosierung.

Gruppe	Zellen pro Maus	Applikation
Kontrollgruppe	$2,5 \times 10^5$ Wildtyp (MPC11)	subkutan – linke Flanke
Gruppe 1	$2,5 \times 10^5$ MPC11-CD137L	subkutan – linke Flanke
Gruppe 2	$2,5 \times 10^5$ MPC11-IL-12	subkutan – linke Flanke
Kombination	$1,25 \times 10^5$ MPC11-CD137 + $1,25 \times 10^5$ MPC11-IL-12	subkutan – linke Flanke

Tabelle 1 : einfache Applikation; MPC11 : murine Plasmocytoma cells; Wildtyp : unveränderte MPC11-Zellen; MPC11-CD137L : CD137L exprimierende MPC11-Zellen; MPC11-IL-12 : IL-12 exprimierende MPC11-Zellen

2.15.2 Versuch 2 – Rechallenge

Den Tieren, die Versuch 1 überlebten, wurden an Tag 60 $2,5 \times 10^5$ Wildtyp-MPC11-Zellen bei einem Volumen von 100 μ l subkutan in die rechte, d.h. gegenüberliegende Flanke appliziert. Zudem wurde eine neue Kontrollgruppe gebildet (*Tabelle 2*).

Gruppe	Zellen pro Maus	Applikation
Kontrollgruppe	$2,5 \times 10^5$ Wildtyp (MPC11)	subkutan – rechte Flanke
Gruppe 1	$2,5 \times 10^5$ Wildtyp (MPC11)	subkutan – rechte Flanke
Gruppe 2	$2,5 \times 10^5$ Wildtyp (MPC11)	subkutan – rechte Flanke
Kombination	$2,5 \times 10^5$ Wildtyp (MPC11)	subkutan – rechte Flanke

Tabelle 2 : Rechallenge ab Tag 60; Wildtyp : unveränderte MPC11-Zellen

2.15.3 Versuch 3 – Simultanapplikation

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Wildtypzellen pro Maus in einem Volumen von 100 μ l jeweils in die linke Flanke subkutan appliziert und zeitgleich $2,5 \times 10^5$ modifizierte MPC11-Zellen (100 μ l) in die rechte Flanke. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich $2,5 \times 10^5$ Wildtypzellen (letale Dosis) pro Maus in die linke Flanke (*Tabelle 3*).

Gruppe	Zellen pro Maus		Applikation
Kontrollgruppe	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
Gruppe 1	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	MPC11-CD137L	subkutan – rechte Flanke
Gruppe 2	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	MPC11-IL-12	subkutan – rechte Flanke
Kombination	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
	Tag 0 : $1,25 \times 10^5$	MPC11-CD137 + $1,25 \times 10^5$ MPC11-IL-12	subkutan – rechte Flanke

Tabelle 3 : Simultanapplikation;

Wildtyp : unveränderte MPC11-Zellen; Wildtyp : unveränderte MPC11-Zellen; MPC11-CD137L : CD137L exprimierende MPC11-Zellen; MPC11-IL-12 : IL-12-exprimierende MPC11-Zellen

2.15.4 Versuch 4 – zeitversetzte Applikation

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Wildtypzellen pro Maus bei einem Volumen von 100 μ l jeweils in die linke Flanke subkutan appliziert und nach 14 Tagen (nach Ausbildung eines Tumorknotens mit einem Volumen $>500 \text{ mm}^3$ bzw. ab 10x10 mm) $2,5 \times 10^5$ modifizierte MPC11-Zellen (100 μ l) in die rechte Flanke. Die Kontrollgruppe erhielt $2,5 \times 10^5$ Wildtypzellen (letale Dosis) pro Maus in die linke Flanke (*Tabelle 4*).

Gruppe	Zellen pro Maus		Applikation
Kontrollgruppe	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
Gruppe 1	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
	Tag 14 : $2,5 \times 10^5$	MPC11-CD137L	subkutan – rechte Flanke
Gruppe 2	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
	Tag 14 : $2,5 \times 10^5$	MPC11-IL-12	subkutan – rechte Flanke
Kombination	Tag 0 : $2,5 \times 10^5$	Wildtyp	subkutan – linke Flanke
	Tag 14 : $1,25 \times 10^5$	MPC11-CD137 + $1,25 \times 10^5$ MPC11-IL-12	subkutan – rechte Flanke

Tabelle 4 : zeitversetzte Applikation;

Wildtyp : unveränderte MPC11-Zellen; Wildtyp : unveränderte MPC11-Zellen; MPC11-CD137L : CD137L exprimierende MPC11-Zellen; MPC11-IL-12 : IL-12-exprimierende MPC11-Zellen

Das Tumolvolumen wurde jeweils wie folgt berechnet : $\text{Volumen}(\text{mm}^3) = \text{Länge}(\text{mm}) \times \text{Breite}(\text{mm})^2 \times 0,52$. Die Tiere wurden ab einem Tumolvolumen von 2000 mm^3 getötet. Die statistischen Überlebenskurven wurden mit dem Programm GraphPad InStat, Version 3.00 mit Hilfe des Mann-Whitney Tests (nicht gepaart, keine Parametrie) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Vektorkonstruktion (pcDNA-CD137L und pcDNA-IL12)

Es wurden zwei Vektoren konstruiert, die jeweils die Expression der Zytokine IL-12 und CD137L in Tumorzellen ermöglichen. Nach der Konstruktion der Vektoren und Transfektion der MPC11-Tumorzellen wurden diese in vivo auf ihre immunstimulatorische Wirkung bei der Behandlung des Plasmozytoms untersucht.

3.1.1 Überprüfung des konstruierten Vektors

Nach Konstruktion der Vektoren wurden deren Zusammensetzung und Größe durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym XBA I (*Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland*) und nachfolgender Gelelektrophorese (*Abb. 6*) mit Hilfe des DNA Markers X (*Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland*) überprüft.

Vor dem Klonierungsprozess lagen folgende Längenverhältnisse vor :

- cDNA murines IL-12 - 1620 Basenpaare
- cDNA murines CD137L - 696 Basenpaare
- pcDNA3.1(-) - 5427 Basenpaare.

Über die Restriktionsschnittstellen Not I und Hind III wurde die jeweilige cDNA in den pcDNA3.1-Vektor kloniert. Nach dem Klonierungsprozess konnte man folgende Längenverhältnisse erwarten :

- pcDNA-CD137L - 6123 Basenpaare (696+5427)
- pcDNA-IL-12 - 7047 Basenpaare (1620+5427)

Wie in *Abb. 6* ersichtlich, stimmte nach Restriktionsverdau der beiden Vektoren pcDNA-CD137L und pcDNA-IL-12 mit dem Restriktionsenzym XBA I und

anschließender Gelelektrophorese die erwartete mit der tatsächlichen Länge der nun linearisierten Vektoren überein. Dabei schnitt XBA I einmalig innerhalb der *multiple cloning site* des pcDNA3.1-Vektors, nicht jedoch innerhalb der Zytokin-DNA, somit ergab sich nach Restriktionsverdau lediglich eine Bande mit der gesamten Länge des konstruierten Vektors.

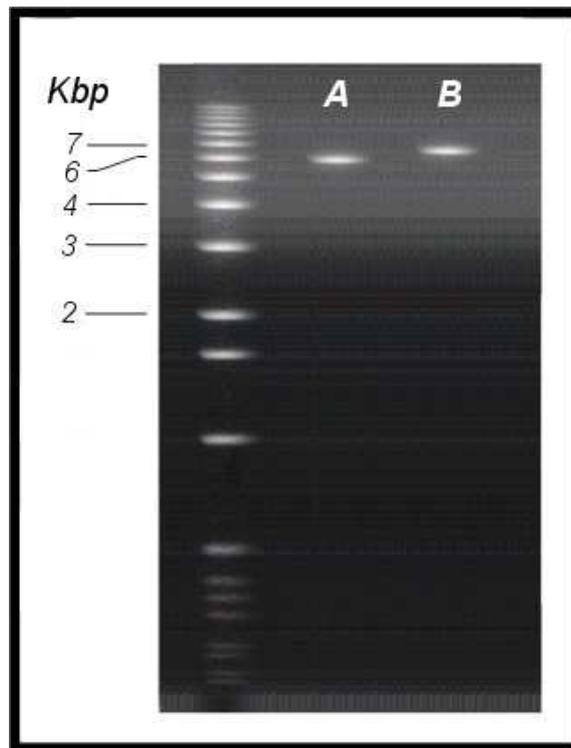


Abb. 6 : Gelelektrophorese der konstruierten Vektoren nach Restriktionsverdau mit XBA I; DNA Marker X
A : lineares pcDNA-CD137L nach XBA I-Verdau
B : lineares pcDNA-IL-12 nach XBA I-Verdau

3.1.2 Expression des membrangebundenen CD137L und des löslichen IL-12 in MPC11 Zellen nach der Elektroporation

Nach Transfektion der konstruierten Vektoren in MPC11-Zellen mit anschließender Selektion der positiven Klone mit G418 konnte bei 95% der MPC11-CD137L Zellen das membrangebundene CD137L mit Hilfe des FACSScans nachgewiesen werden (Abb. 7). Im Vergleich zu Wildtyp MPC11-Zellen (schwarzer Graph), exprimieren 81.9% der CD137L-MPC11 Zellen (graue Fläche) CD137L nach der Transfektion.

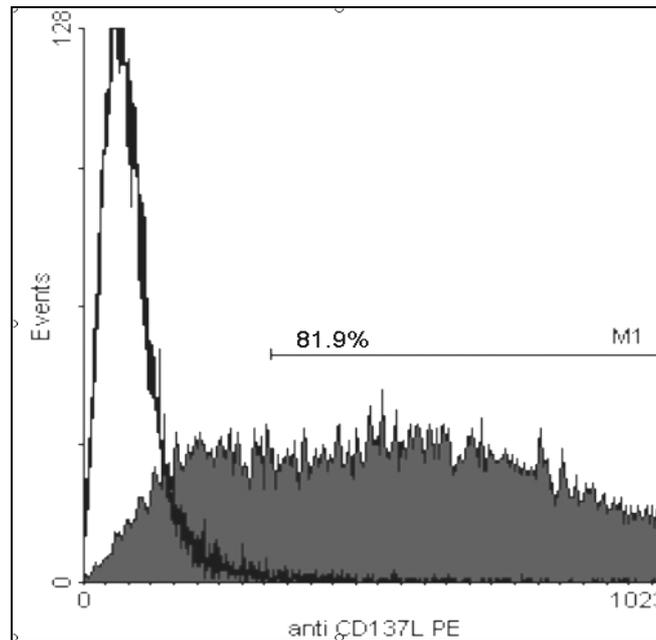


Abb. 7 – Nach Transfektion der CD137L cDNA wurde die membrangebundene Expression von CD137L mit Hilfe des FACScan bestimmt. Im Vergleich zu Wildtyp MPC11-Zellen (schwarzer Graph), exprimieren 81.9% der CD137L-MPC11 Zellen (graue Fläche) CD137L nach der Transfektion.

Mittels ELISA wurde die Expression des in das Kulturmedium sekretierte murine Interleukin-12 nachgewiesen. Diese Expression konnte bei einem hohen Anteil der MPC11-IL-12 Zellen festgestellt werden ($2\mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen /24h).

Die positiven Klone wurden gezüchtet, mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und in flüssigem Stickstoff bei -195°C zur Konservierung eingefroren.

3.2 Tierversuche

Die Einteilung der Versuchsgruppen und die Applikationsbedingungen wurden unter dem Abschnitt 3.13 *Tierexperimente* unter *Material und Methoden* bereits genau erläutert.

3.2.1 Einfache Applikation der modifizierten Tumorzellen

In den Versuchen 1 und 2 erfolgte die einfache und einmalige subkutane Applikation der verschiedenen Versuchsgruppen. Das Immunsystem der Tiere wurde entweder mit Wildtypzellen (Kontrollgruppe) oder mit modifizierten Tumorzellen konfrontiert und der Verlauf des Tumorwachstums protokolliert. Die Gabe der Wildtypumorzellen in der Kontrollgruppe führte stets zum Tod aller Tiere (Abb. 8). Nach Erreichen eines Tumorzellvolumens von 2000 mm³ wurden die Mäuse mittels CO²-Inhalation getötet.

3.2.1.1 Tumorzellvolumen

Versuch 1 – einfache Applikation (Abb. 8) :

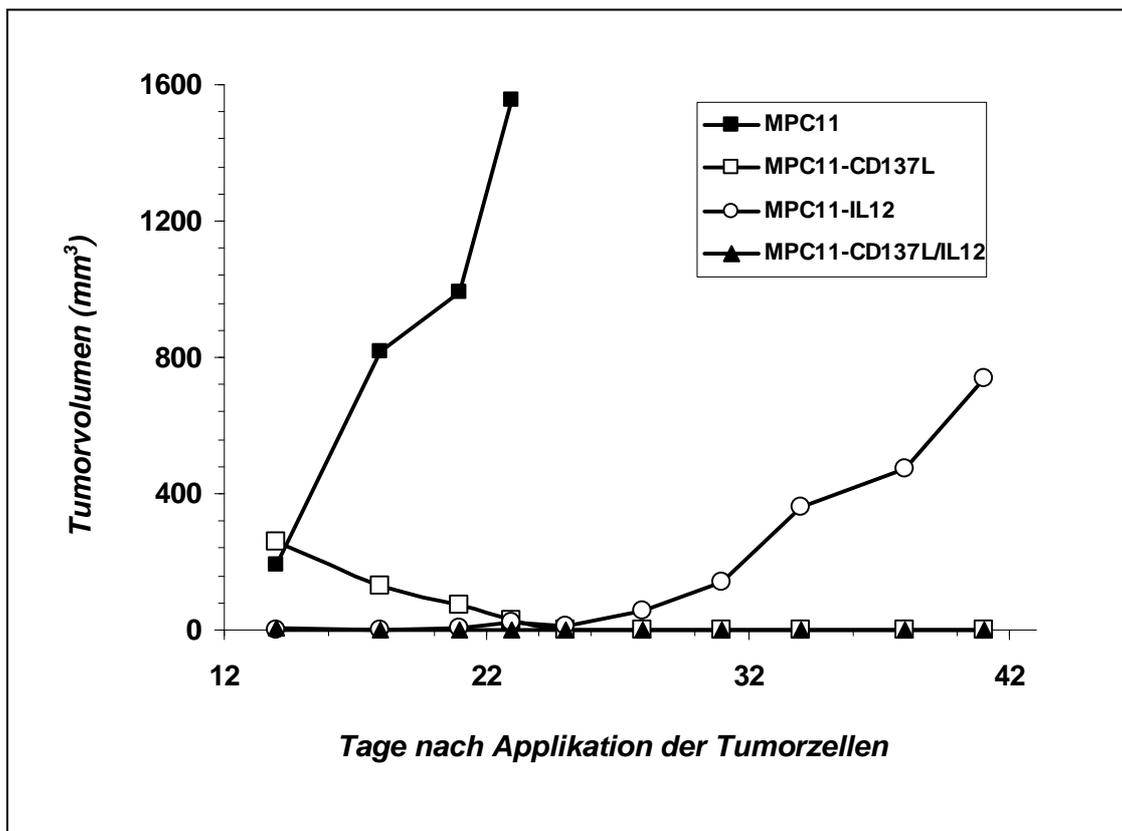


Abb. 8 – Versuch 1 : Tumorwachstum nach Applikation der modifizierten Tumorzellen. Das Tumorzellvolumen wurde nach folgender Formel berechnet : Länge x (Breite)² x 0.52.

Alle Tiere der Kontrollgruppe starben aufgrund progressiven Tumorwachstums. Nach Applikation der CD137L-MPC11-Zellen konnte bis Tag 12 bei 6 von 8 Tieren (75%) das Wachstum eines transienten Tumorknotens bis 300mm² festgestellt werden, der sich jedoch bis zum Tag 25 nach Tumorapplikation erstaunlicherweise wieder vollständig zurückbildete. Alle Tiere dieser Gruppe überlebten die Beobachtungszeit von 60 Tagen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,0001$).

In der IL-12-MPC11-Gruppe führte die Tumorapplikation zu einem progressiven Tumorwachstum von über 800mm² und schließlich zum Tod in 2 von 8 Tieren (25%) ($p < 0,0001$) innerhalb von 40 Tagen. Die Applikation von IL-12-MPC11- und CD137L-MPC11-Zellen in Kombination führte ähnlich der CD137L-Gruppe innerhalb von 12 Tagen zu einem transienten Tumorwachstum bis 300mm² in 1 von 8 Tieren (12,5%), jedoch überlebten alle behandelten Tiere die Beobachtungszeit von 60 Tagen ($p < 0,0001$).

Das Überleben der Tiere der unterschiedlichen Gruppen unterschied sich nicht signifikant voneinander, jedoch zeigte sich ein unterschiedlicher Verlauf des Tumorwachstums mit dem deutlichsten Progress in der IL-12-MPC11-Gruppe.

3.2.1.2 Gesamtüberleben

Versuch 1 – einfache Applikation (Abb. 9) :

Alle Tiere der Kontrollgruppe starben innerhalb von 30 Tagen. Alle Tiere der CD137L- und der Kombinationsgruppe (CD137L/IL-12) überlebten die Beobachtungszeit von 60 Tagen nach Applikation der modifizierten Tumorzellen, während 2 von 8 Tieren (25%) der IL-12-Gruppe bis Tag 40 starben.

Versuch 2 – Rechallenge (Abb. 9) :

Als nächstes wurden den Tieren, die die Behandlung mit den modifizierten Tumorzellen aus dem Versuch 1 überlebt hatten, eine letale Dosis

Wildtyp-tumorzellen appliziert, um zu überprüfen, ob eine effektive Restimmunität nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde eine neue Kontrollgruppe für den Rechallenge-Versuch ab Tag 60 gebildet.

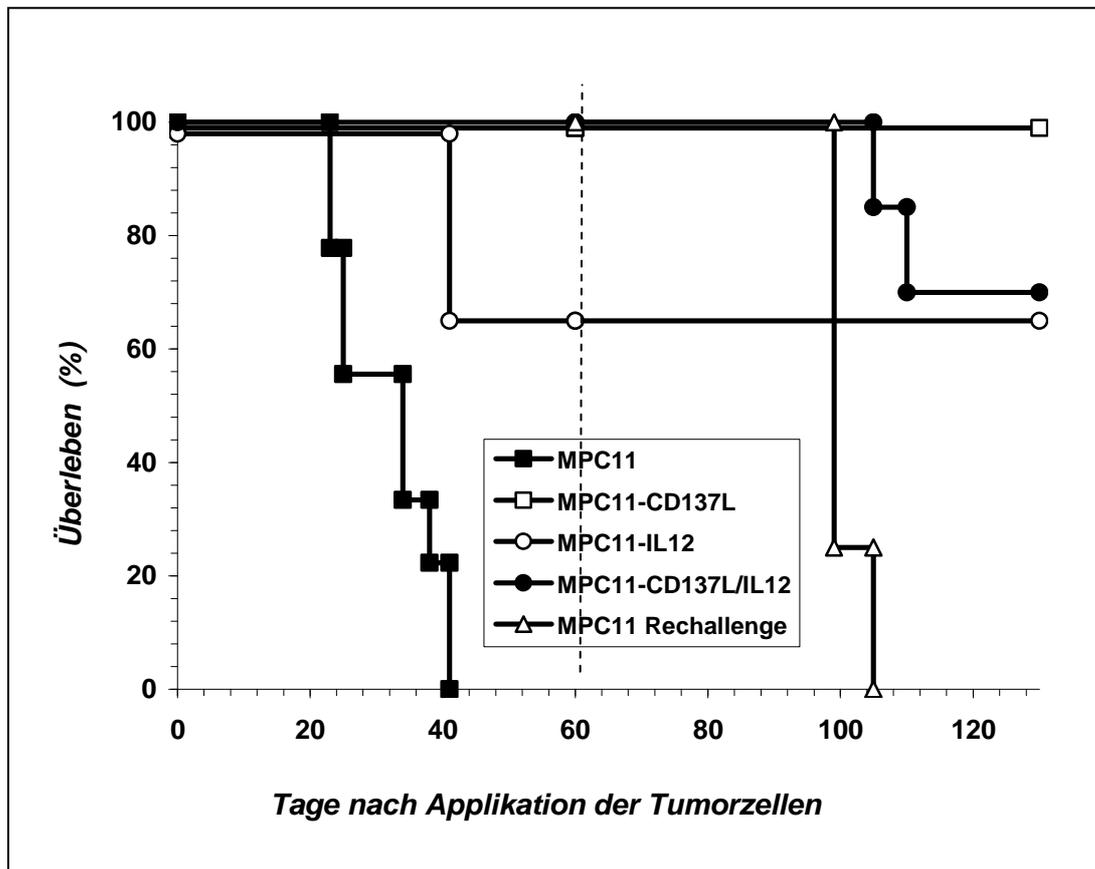


Abb. 9 – Versuch 1 + 2 : Gesamtüberleben nach Applikation der modifizierten Tumorzellen und Rechallenge; gestrichelte Linie : Beginn der Rechallenge an Tag 60; Kontrollgruppe der Rechallenge : Dreiecke

Alle Tiere (8/8, 100%) der Rechallenge-Kontrollgruppe starben innerhalb von 30 Tagen. In der Kombinationsgruppe jedoch wurde tödliches Tumorwachstum in 2 von 8 Tieren (25%) nach 50 Tagen beobachtet. Alle Tiere der der CD137L-Gruppe (8/8, 100%) und IL-12-Gruppe (6 von 6, 100%) überlebten die Beobachtungszeit von 60 Tagen nach erneuter Applikation der Wildtypzellen. Sie zeigten eine immer noch vorhandene Immunität aus dem 1. Versuch. Jedoch zeigt sich hier bereits das höhere Gesamtüberleben der CD137L-Gruppe im Gesamtverlauf, da bislang alle 8 Tiere überlebt hatten.

3.2.1.3 Applikation von Wildtyp- und modifizierten Tumorzellen

Im Gegensatz zu den ersten beiden Versuchen wurde das Immunsystem der Tiere in den nachfolgenden Versuchen vor eine schwierigere Aufgabe gestellt. Ziel dieser Versuche war es, das Gesamtüberleben unter folgenden Bedingungen zu vergleichen : die Wildtyp- und modifizierten Tumorzellen wurden gleichzeitig (Versuch 3) oder zeitversetzt (Versuch 4) appliziert. Bei der zeitversetzten Applikation wurde zunächst das Wachstum eines Wildtyp-Tumorknotens mit einer Größe von 10 x 10 mm (bzw. einem Volumen von 500mm³) abgewartet und anschließend die modifizierten Tumorzellen in die kontralaterale Flanke subkutan appliziert. Es erscheint ungleich schwieriger, einen bereits vorhandenen Wildtyp-Tumorknoten zur Regression zu bringen, als Wildtypzellen vom Beginn an am Wachstum zu hindern.

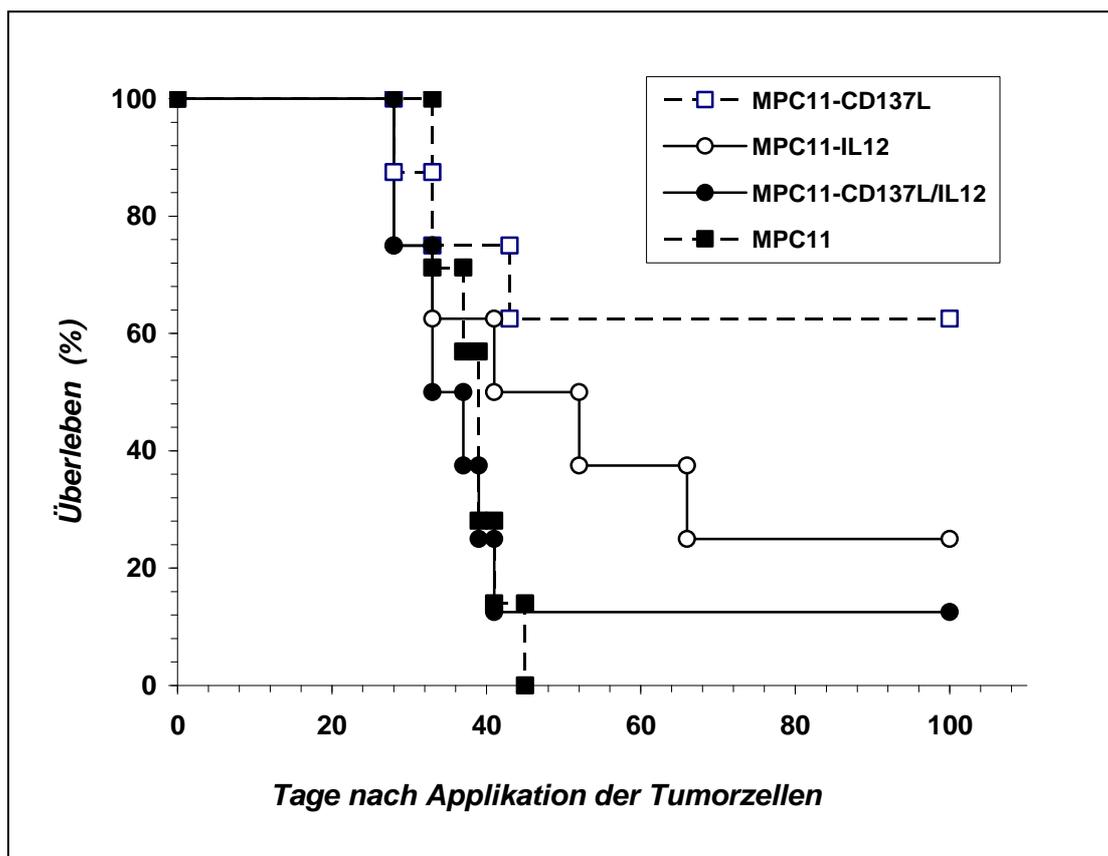


Abb. 10 – Versuch 3 : Gesamtüberleben nach simultaner Applikation der modifizierten Tumorzellen und Wildtyp-Tumorzellen auf kontralateralen Flanken

Versuch 3 – gleichzeitige Applikation (Abb. 10)

Bei den Tieren, die CD137L-MPC11 und Wildtyp-tumorzellen erhielten, waren 5 von 8 Tieren (37,5%) nach 60 Tagen am Leben, im Vergleich dazu waren es 2 von 8 Tieren (25%) in der IL-12-Gruppe. Ebenfalls 2 von 8 Tieren überlebten in der Kombinationsgruppe. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen.

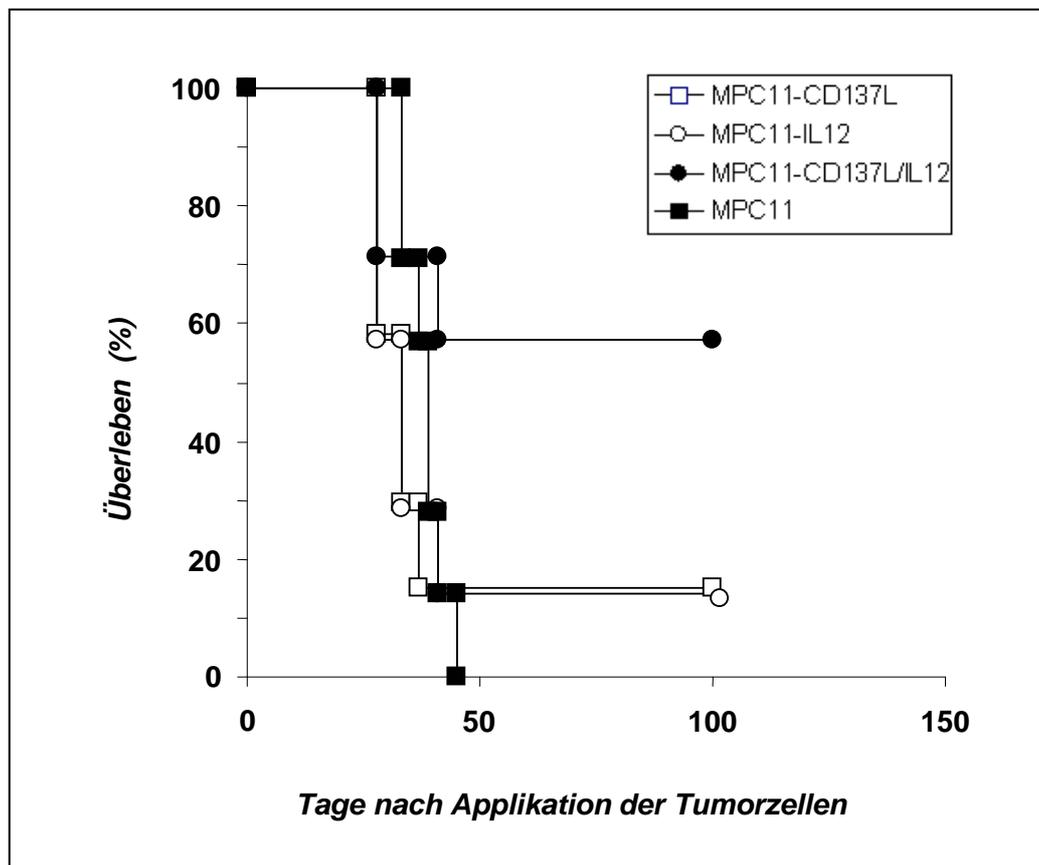
Versuch 4 : zeitversetzte Applikation („Therapie bestehender Wildtyp-tumorknoten mit modifizierten Tumorzellen“; Abb. 11)

Abb. 11 – Versuch 4 : Gesamtüberleben nach zeitversetzter Applikation der modifizierten Tumorzellen und Wildtyp-Tumorzellen auf kontralateralen Flanken

Die modifizierten Tumorzellen wurden in die kontralaterale Flanke der Tiere subkutan injiziert, nachdem sich bereits ein Tumorknoten (10x10 mm bzw. Tumolvolumen >500 mm³) durch Applikation einer tödlichen Dosis Wildtyptumorzellen gebildet hatte. In der CD137L- bzw. IL-12-Gruppe starben jeweils 6 von 7 Tieren (86%) innerhalb von 35 Tagen. In der Kombinationsgruppe (IL-12+CD137L) hingegen starben 3 von 7 (43%) Tiere ($p=0,0103$) im gleichen Zeitraum.

4. Diskussion

Schon seit Jahren ist man auf der Suche nach neuen Möglichkeiten einer wirksamen Therapie maligner Erkrankungen, bei denen die aktuell verfügbaren Therapiestrategien nicht zum gewünschten therapeutischen Ziel führen. Mit modernen Methoden im Bereich der Gentechnik versucht man, diesem Ziel etwas näher zu kommen. Dabei setzt man – insbesondere in der Onkologie – große Hoffnungen auf die Immun- und Gentherapie mit der Absicht, durch Aktivierung des Immunsystems und Induktion einer gezielten Immunantwort eine vollständige Heilung herbeizuführen (*Bronte et al., 2006; Neeson und Paterson 2006*).

Diese Arbeit befasst sich mit der immuntherapeutischen Behandlung des Multiplen Myeloms durch die Verwendung der beiden Zytokine IL-12 und CD137L im Mausmodell. Wir schleusten dabei die jeweilige cDNA in das Genom des murinen Plasmazytommodells MPC11 ein und konnten die Expression der Zytokine durch die Tumorzellen nachweisen. Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach subkutaner Applikation dieser modifizierten Tumorzellen eine effektive antitumorale Immunantwort ausgelöst und das Wachstum von MPC11-Zellen verhindert und nachhaltig unterbunden werden kann. Es konnte sogar eine vollständige Regression nach Ausbildung eines Tumorknotens beobachtet werden.

Die Immuntherapie spielt bei einer Vielzahl onkologischer Erkrankungen bereits eine wichtige Rolle (*Sangro et al. 2005; Schimanski et al. 2006*). Die Herstellung zellbasierter Tumorstoffe mittels Transfer von Plasmiden, die für immunstimulatorische Proteine kodieren, wurde bereits in vielen Tumormodellen als Therapiemöglichkeit verwendet (*Doehn et al. 2004*). Es gibt jedoch nur wenige Daten über den Effekt von CD137L und IL-12 bei der Immuntherapie hämatologischer Malignitäten. Durch die IL-12- und CD137-CD137L Interaktionen ergeben sich viel versprechende Möglichkeiten, eine effektive antitumorale Immunantwort zu induzieren (*Rabu et al. 2005; Schuster et.al. 2006*).

Immuntherapie und Tumorstimmung

Gerade bei malignen Erkrankungen, bei denen sich die konventionellen Behandlungsmethoden erschöpft haben, setzt man auf die Immun- bzw. Gentherapie. Dabei spielen sowohl die Modifikationen von Genen zur gezielten Stimulation des Immunsystems als auch die direkte Anwendung künstlich hergestellter Stoffe im Sinne einer Immunisierung eine große Rolle (*Doehn et al. 2004*). Unterschieden wird dabei zwischen der passiven Immunisierung und aktiven Immunisierung. Ersteres könnte durch die Applikation von Antikörpern gegen Tumoroberflächenantigene geschehen, letzteres durch das Anbieten von autologem Tumormaterial (*Sondak et al. 2006*). Da Tumorzellen oft nicht durch das Immunsystem erkannt werden zielt diese spezifische Immuntherapie bzw. Impfung auf eine verbesserte Immunogenität und somit auf das Erkennen von Tumorzellen als solche (*Melero et al. 1998; Bronte et al. 2006*). Seit Jahren werden verschiedene Arten von Vakzinen zur Behandlung unterschiedlicher Tumorerkrankungen erprobt, um durch das Prinzip der Impfung eine effektive antitumorale Reaktion des Immunsystems zu induzieren. Im Idealfall führt dies zum Verschwinden vorhandener Tumormanifestationen und durch die Bildung immunologischer Gedächtniszellen zu einem dauerhaften Schutz (*Sauer et al. 2005; Snyder et al. 2006*). Zunächst bestanden die ersten Impfstoffe aus autologem Tumormaterial, welches den Patienten nach entsprechender Aufarbeitung reappliziert wurde, dies auch unter Zugabe von Zytokinen (*Stevenson 2005*).

Bei einem Zytokin handelt es sich um ein körpereigenes glykolisiertes Protein, welches Proliferation und Differenzierung unterschiedlicher Körperzellen induziert bzw. reguliert und von Lymphozyten und Makrophagen produziert werden. Viele Zytokine spielen als Mediatoren eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen (*Galligan et al. 2006*). Insbesondere im Zusammenhang mit immunologischen bzw. rheumatischen Erkrankungen unterscheidet man proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine. Zu den proinflammatorischen Zytokinen zählt man u.a. TNF-alpha, zu den anti-inflammatorischen Zytokinen in erster Linie die Interleukine IL-10, IL-4 sowie IL-11 (*Schiller et al. 2006*). In unserer Arbeit

beschäftigten wir uns mit der Wirkung von IL-12 und CD137L auf das Immunsystem im murinen MPC11-Modell.

CD137-Ligand (CD137L) ist ein Mitglied der TNF-Familie und wird auf verschiedenen APCs wie B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert und kann nach Aktivierung auch auf T Lymphozyten induziert werden. Die Interaktion von 4-1BBL mit seinem Rezeptor stimuliert die T-Zell Proliferation (*DeBenedette et al. 1995*) und Produktion von IFN γ , IL2 und IL4 durch CD4 T-Zellen. Für IL2 und IL4 gilt das allerdings nur im murinen System. CD28 Expression auf der T-Zelle ist essentiell für die Induktion von CD137, das seine eigene Expression in positiver Rückkopplung stimuliert (*Shedlock et al. 2003*). CD137 kann aktivierungsinduzierten Zelltod verhindern und eine erfolgreiche Immunantwort verstärken und verlängern, auch in Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen wie z.B. CD28 (*Kim et al. 1998*). Wie für viele Mitglieder der TNF Familie beschrieben, transduziert auch CD137L Signale in die den Liganden exprimierende Zelle selbst (reverse signaling). Reverse signaling wurde bisher bei B-Lymphozyten und Makrophagen gefunden und führt zu einer Aktivierung und Proliferationsstimulation, jedoch auch zu einer erhöhten Apoptoserate, zumindest bei Monozyten, vergleichbar dem aktivierungsinduzierten Zelltod bei Lymphozyten (*Shen und Pervaiz 2006*). So lange die Proliferation die Apoptose überwiegt, wächst die Zellpopulation. Von der Interaktion zwischen CD137 und CD137L profitieren sowohl T-Lymphozyten als auch APCs (B-Zellen oder Makrophagen). B-Lymphozyten und Makrophagen erfahren eine Kostimulation, die zur Proliferation führen kann (*Vinay et al. 1998*). CD137L wird durch verschiedene humane Tumorzelllinien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Der reverse Signalweg aktiviert die IL8-Produktion der Tumorzellen (*Salih 2000*). Dieses Zytokin ist ein starkes Chemoattraktand für neutrophile Granulozyten, T-Zellen und basophile Granulozyten. Es verstärkt damit die Immunreaktion. Die Aktivierung von T-Lymphozyten durch ein Antigen über den T-Zellrezeptor führt zur Expression von CD137. Abhängig davon, wie stark CD137L auf der Tumorzelle exprimiert wird, werden T-Lymphozyten kostimuliert, was zur IFN γ - und IL2-Ausschüttung durch die T-Zellen führt (*Salih et al. 2001*).

Interleukin-12 ist das hauptverantwortliche Zytokin für die Differenzierung von Th0 zu Th1-Zellen, wodurch eine Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort eingeleitet wird (*Lee et al. 1998*). Es setzt sich zusammen aus den beiden Untereinheiten p40 und p35. Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) oder aufgereinigte Monozyten produzieren eine größere Menge IL-12, wenn sie von Bakterien oder bakteriellen Produkten wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert werden (*Mattner et al. 1993*). Wenige Stunden nach einer Infektion durch intrazelluläre Parasiten oder Bakterien beginnt die Produktion (*Lee et al. 1998*). IL12 wirkt als ein proinflammatorisches Zytokin, welches NK-Zellen und phagozytische Zellen mittels IFN-gamma aktiviert. INF-gamma verstärkt die IL12 Produktion von phagozytischen Zellen im entzündeten Gewebe (*Kubin et al. 1994*). Diese Eigenschaft von IFN γ ist von besonderer Bedeutung, da IL12 an der IFN-gamma-Produktion von T-Lymphozyten und NK-Zellen in großem Maße beteiligt ist (*Chan et al. 1991*). Somit entsteht eine positive Rückkopplung während einer Entzündung. Letztendlich werden NK-Zellen und Makrophagen in ihrer Funktion verstärkt. Erst diese Aktivierung ermöglicht die Abwehr eines Eindringlings. In Hinblick auf die Nebenwirkungen zeichnet sich IL-12 durch eine starke Toxizität, insbesondere bei systemischer Applikation aus (*Car et al. 1999*). Die häufigsten Nebenwirkungen der bisherigen Studien bei der Behandlung von onkologischen Erkrankungen mit IL-12 sind u.a. grippeähnliche Symptome, Leukopenie (Leukozyten $<4000/\mu\text{l}$ im peripheren Blut), Anstieg der Lebertransaminasen und gastrointestinale Beschwerden (*Ohe et al. 1998*). Bei intravenöser Applikation verstarben sogar einige Patienten (*Carson et al. 1999*).

Ein aktuellerer Ansatz der Vakzinetherapie ist die Verwendung von dendritischen Zellen. Dabei handelt es sich um Leukozyten, die eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung einer Immunantwort einnehmen zuständig sind für die Präsentation auffälliger Merkmale, die die Tumorzellen von anderen Geweben unterscheiden (*Misra et al. 2005*). Sie sind entscheidend beteiligt an der Aktivierung von Helfer T-Lymphozyten, an der Regulation der Zytokinmuster der aktivierten T-Lymphozyten (IFN- γ produzierende Th1-Zellen vs. IL-4 produzierende Th2-Zellen), an der Aktivierung und Entwicklung von zytotoxischen NK-Zellen, an der Produktion von Antikörpern, sowie an der Aktivierung von Makrophagen (via IFN- γ). Letztendlich sind sie die einzigen Zellen des Organismus, welche primäre Immunantworten

einleiten können und stehen somit am Beginn jeder primären Immunreaktion (*Aloysius et al. 2006*). Dendritische Zellen können z.B. aus dem Blut der Patienten gewonnen und anschließend im Labor mit Tumorzellantigenen beladen werden. Im Anschluss können sie nach ihrer Aufarbeitung ebenfalls reappliziert werden. Auf diese Art und Weise kann das Immunsystem nach erfolgreicher Impfung die fremden Tumorzellen erkennen und somit über aktivierte T-Lymphozyten zerstören (*Pinzon-Charry et al. 2006*). Ein Problem dieser Tumorzellimpfung könnte dahingehend auftreten, als dass das Immunsystem von Tumorpatienten – insbesondere bei hämatologischen Neoplasien – bereits geschädigt ist und seine Funktion trotz erfolgreicher Vakzinierung nicht vollständig ausüben kann. Dies könnte ebenfalls Bestandteil weiterer Versuchsreihen sein.

Als Beispiel einer passiven Impfung soll hier das Medikament Rituximab genannt werden, der aktuell bei der Behandlung von Non-Hodkin-Lymphomen angewandt wird. Bei Rituximab handelt es sich um einen sogenannten chimären humanisierten Mausantikörper, zusammengesetzt aus einem humanen und einem murinen Anteil. Es bindet an das auf nahezu allen B-Zellen vorhandene CD20 Antigen. Bei einer ganzen Anzahl verschiedener Krebserkrankungen des Blutesystems sind gerade diese B-Zellen von der Entartung betroffen. Durch eine spezifische Bindung des anti-CD20 Antikörpers werden diese gezielt erkannt und zerstört, jedoch ist der genaue Mechanismus bis heute nicht bekannt (*Maloney 2005*). Naturgemäß weckt dieses Medikament als Beispiel eines immuntherapeutischen Ansatzes viele Hoffnungen. Augenblicklich ist derzeit für das (therapierefraktäre/rezidierte) folliculäre Non-Hodgkin-Lymphom und das CD20-positive diffus großzellige Non-Hodgkin-Lymphom ein Nutzen wissenschaftlich nachgewiesen (*Cvetkovic et al. 2006*). Im Gegensatz zu reifen B-Lymphozyten des peripheren Blutes sind Plasmazellen in der Mehrzahl negativ für CD20, somit stellt das Multiple Myelom keine Indikation für den Einsatz von Rituximab dar.

Das Plasmazytom oder Multiple Myelom gehört zu den malignen Erkrankungen der B-Zell-Reihe und wird zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen gerechnet. Kennzeichnend ist eine Infiltration des blutbildenden Knochenmarks durch maligne Plasmazellen (*Dvorak 2006; Murakami und Handa 2006*). Das Multiple Myelom als Vertreter der hämatologisch-onkologischen Erkrankungen wird chemotherapeutisch

u.a. auch mit anschließender allogener Knochenmarktransplantation und strahlentherapeutisch behandelt. Die Immuntherapie bietet hierbei einen möglichen Ansatzpunkt, insbesondere bei progredienten Verläufen, bei denen die konservative Therapie versagt. Jedoch sind Plasmazellen – wie bereits oben erwähnt – im Gegensatz zur reifen B-Lymphozyten des peripheren Blutes in der Mehrzahl negativ für CD20, somit besitzt das Rituximab bei der Therapie des Multiplen Myeloms keinen Stellenwert (*Harrison und Cook 2005*).

CD137L verbessert das Gesamtüberleben

Bekanntermaßen entziehen sich Tumorzellen auf unterschiedliche Weise der Kontrolle durch das Immunsystem, so dass ein progredientes Tumorwachstum in vielen Fällen beobachtet werden kann. Die Immuntherapie hat die Aufgabe, eine gezielte Reaktion des Immunsystems gegen die Tumorzellen auszulösen bzw. eine bereits vorhandene jedoch nicht ausreichende Immunreaktion zu verstärken. Dies könnte durch die direkte Stimulation von Effektorzellen (*Manetti et al. 1993*), durch die Hochregulation kostimulierender Faktoren (*Melero et al. 1998*) oder durch die Verstärkung der Antigen-Präsentation (*Bronte et al. 2006*) erfolgen. Diese Verstärkung der Immunreaktion erfolgte in unseren Tierexperimenten durch die subkutane Applikation modifizierter Tumorzellen in Balb/c Mäuse mit vorübergehender, über einen längeren Zeitraum andauernden Expression immunstimulatorischer Zytokine. Mit diesen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass CD137L im Vergleich zu IL-12 in einem genmodifizierten Plasmazytommodell eine langwirksame antitumorale Antwort gegen Wildtyptumorzellen (MPC11) hervorruft. Die genaue Versuchsdurchführung wurde in Kap. 2.15 im Detail erläutert.

Im ersten Teil der tierexperimentellen Versuchsreihen erhielten die Balb/c Mäuse zunächst eine einmalige subkutane Applikation modifizierter Tumorzellen in ihre linke Flanke (*Versuch 1*). Im Vergleich zu IL-12 modifizierten MPC11-Tumorzellen, scheinen CD137L produzierende Tumorzellen eine wirksamere Aktivität in Hinblick auf eine antitumorale Immunantwort zu haben, da sich sowohl ein längeres Gesamtüberleben, als auch ein langsames Tumorwachstum im Vergleich sowohl

zur IL-12-Gruppe als auch zur Kombinationsgruppe (CD137L+IL-12) zeigte. Diese Wirkung konnte ebenfalls mit dem nachfolgenden Versuch bestätigt werden. Hier erhielten die Tiere, die die einmalige subkutane Tumorapplikation überlebt hatten, eine letale Dosis nicht modifizierter Wildtypzellen durch eine subkutane Applikation in die rechte Flankenseite (*Versuch 2*). Die vollständige Regression der anfänglich wachsenden Tumorknoten in der CD137L-Gruppe lässt sich auf eine potente durch CD137L induzierte antitumorale Immunantwort zurückführen.

Im zweiten Teil der tierexperimentellen Versuchreihen wurden den Tieren nicht modifizierte Wildtypzellen in die linke Flanke und modifizierte Tumorzellen in die entgegen gesetzte Flanke subkutan appliziert. Dies erfolgte entweder simultan (*Versuch 3*) oder zeitversetzt (*Versuch 4*), d.h. die Gabe der modifizierten Zellen erfolgte nach Ausbildung eines tastbaren Tumorknotens an Tag 14. Bei der simultanen Applikation (*Versuch 3*) scheint die antitumorale Aktivität der modifizierten Zellen noch ausreichend zu sein, um ein weiteres Wachstum der Wildtypzellen in einem bestimmten Umfang unterdrücken können. Jedoch scheint diese Immunantwort erst verzögert zu entstehen, da im Vergleich zum 2. Versuch („*Rechallenge*“) eine größere Anzahl Tiere an den Folgen des Tumorwachstums verstarben.

Die antitumorale Aktivität in der Kombinationsgruppe (CD137L + IL-12) ist der alleinigen CD137L- bzw. IL-12-Therapie überlegen, wenn bereits ausgebildete Tumorknoten behandelt wurden (*Versuch 4*). Es ist nachvollziehbar, dass in diesem Therapiemodell die größte Herausforderung in der Behandlung bereits vorliegender Tumorknoten lag. Auch die Wahl des geeigneten zeitlichen Abstands der Applikation der modifizierten Tumorzellen zur Applikation der Wildtypzellen und der Menge der zu applizierenden Tumorzellen lässt noch Raum für weitere Versuchreihen offen. Bei zu großen Abstand zwischen den beiden Zeitpunkten der Applikationen wäre das Wachstum des (Wildtyp-)Tumors zu weit fortgeschritten, als dass die parakrine Zytokinwirkung eine Remission bzw. Regression des Tumorwachstums bewirken könnte. Bei zu geringem zeitlichen Abstand ließe sich die parakrine Zytokinwirkung nicht ausreichend ausreizen. Dasselbe würde ebenfalls für die Menge der applizierten Tumorzellen gelten. In unseren Versuchen wurde jeweils immer eine konstante Anzahl Tumorzellen appliziert. Interessant wäre die Verwendung

unterschiedlicher Mengen bei gleicher Applikationsweise und die Frage des Zusammenhangs zwischen Zytokindosis und Tumorwachstum.

Ausblick

Zytokine wurden bereits in vielen anderen Tumormodellen bereits in unterschiedlichen Applikationsarten eingesetzt (*Sangro et al. 2005*), man unterscheidet hierbei zwischen der parakrinen und der systemischen Applikation (*Chada et al. 2003*). In unserem MPC11-Modell wurden die Zytokine lokal durch die subkutan injizierten Tumorzellen exprimiert und konnten zunächst auch nur parakrin mit einer Beeinflussung der benachbarten Gewebe wirken. Jedoch kann man davon ausgehen, daß durch die Neovaskularisation der sich ausbildenden Tumorknoten eine endokrine Situation entsteht, d.h. es käme im Verlauf zu einer systemischen Wirkung der exprimierten Zytokine. Dies wird insofern deutlich, als daß nach anschließender kontralateraler Applikation nicht modifizierter Wildtypzellen („*Rechallenge*“) des 1. Versuches in den IL-12- und CD137L Gruppen kein weiteres Tumorwachstum zu verzeichnen war.

Die Transformation der Tumorzellen mit einem im Labor konstruierten Vektor stellt in der Tat eine künstliche Situation dar, da jede daraus resultierende Zelle diesen Vektor trägt, das entsprechende Zytokin exprimiert und dies somit nicht unbedingt der Situation *in vivo* entspricht. Jedoch bietet diese Monoklonalität eine gute Möglichkeit der Beobachtung und Dokumentation des Tumorwachstums bzw. des Krankheitsverlaufes. Monoklonalität läßt sich insbesondere bei den meisten hämatologischen Erkrankungen finden, ein Beispiel wären die Leukämien (*Boehrer et al. 2006*). Auch hier lassen sich je nach Subtyp unterschiedliche monoklonale Vorläuferzellen mit entsprechender genetischer Zusammenstellung finden.

Eine andere Möglichkeiten der Vektorintegration in die Tumorzellen wäre die adenovirale Transfektion, jedoch kann auf diese Weise keine Selektion der positiven Klone gewährleistet werden. Unser Transfektionsmodell mit der Nukleofektion/Elektroporation und anschließender Selektion mittels Applikation eines

Antibiotikums führte zu einer hohen Selektionsausbeute, die den antitumoralen Effekt auf das Immunsystem verstärken kann. Zudem kann dieses Modell in der Klinik ebenfalls seine Anwendung finden, da bei den meisten hämatologischen Erkrankungen maligne Zellen entnommen, modifiziert und letztendlich in therapeutischer Absicht zurückgegeben werden können.

Die Verwendung unterschiedlicher löslicher Moleküle, wie IL-2 oder IL-12 oder Zellmembran gebundene Antigene wie CD80 oder CD137L resultieren in einer nachhaltigen Stimulation des Immunsystems. Der Vorteil mit Modellsystemen zu arbeiten besteht darin, dass eine unbegrenzte Anzahl von Tumorzellen zur Herstellung dieser zellbasierten Tumorstoffe zur Verfügung steht. Die Herausforderung jedoch bestünde darin, diese Tumorstoffe aus klinischem Material herzustellen

Es gibt aktuell nur wenige Studien, die die Wirkung des IL-12 in Kombination mit CD137L in unterschiedlichen Tumormodellen zeigen konnten (*Xu et al 2005; Martinet et al. 2000; Chu et al. 1997*). In allen bisher veröffentlichten Studien konnte eine effektivere antitumorale Immunantwort in der Kombinationsgruppe mit IL-12 und CD137L im Vergleich zu der alleinigen Gabe der Zytokine beobachtet werden. Zumindest traf dies in der langfristigen Beobachtung zu während bei kürzeren Beobachtungszeiträumen die Wirkung des CD137L häufig die effektivere war. Dies konnte bei unterschiedlichen Tumormodellen sowohl im Wachstum als auch im Gesamtüberleben gezeigt werden. Interessanterweise war diese Überlegenheit in unserer Arbeit lediglich in den Versuchen 3 und 4 zu beobachten. Bei der direkten Gabe der modifizierten Tumorzellen in den Versuchen 1 und 2 zeigte sich ein längeres Gesamtüberleben in der CD137L-Gruppe. Sicherlich stellt sich in Hinblick auf eine effektive antitumorale Immunantwort der Versuch 4 als der schwierigste Versuch mit der größten Herausforderung an die Therapie und das Immunsystem dar. Somit könnte die Kombinationsgruppe tatsächlich die effektivere Therapievariante darstellen. Weitere Studien konnten die antitumorale bzw. kostimulatorische Wirkung des CD137L sowohl bei unterschiedlichen onkologischen Erkrankungen nachweisen, u.a. solide Tumore (*Zhang et al. 2007; Zhou et al. 2007*)

und hämatologische Erkrankungen (Hentschel et al. 2006), als auch bei unterschiedlichen immunologischen Erkrankungen, u.a. der systemische Lupus erythematosus (Patschan et al. 2006) bzw. die Multiple Sklerose (Liu et al. 2006). In diesen Studien konnte die antitumorale Wirkung des CD137L auf eine Kostimulation im Rahmen der physiologischen Immunantwort zurückgeführt werden. Auch die Ergebnisse in unseren Versuchen lassen sich durch diesen Mechanismus erklären. Da auch bei der „Rechallenge“ trotz zeitlich verzögerter Applikation eine kompetente Immunantwort stattgefunden hat, kann man von einer systemischen antitumoralen Wirkung der Zytokine ausgehen, somit ließe sich dieses Modell sowohl auf solide Tumore als auch auf hämatologische oder immunologische Erkrankungen erweitern. Dies kann in Kombination mit anderen Zytokinen in weiteren Versuchen erfolgen.

Die Immuntherapie und die Gentechnologie geben uns eine potente Möglichkeit der gezielten und effektiven Tumorbehandlung. Die genauen Wirkmechanismen der einzelnen Komponenten müssen noch genauer identifiziert werden. Insbesondere spielt bei den Tierversuchen die Applikationsart, die genaue Dosierung und Dauer der Zytokinbehandlung eine wichtige Rolle. Weiterhin könnten weitere Zytokine ggf. auch in Kombination hinzugezogen werden mit dem Ziel, eine effektive und langwirksame antitumorale Immunantwort auslösen zu können. Dies wäre Gegenstand weiterer Arbeiten. Auf diese Weise käme man der gentherapeutischen Behandlung von soliden oder hämatologischen Tumoren einen Schritt näher.

5. Zusammenfassung

Das Plasmozytom gehört zu den malignen Erkrankungen der B-Zell-Reihe und wird zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen gerechnet. In einem murinen Plasmozytommodell erhielten wir Daten, die den Effekt von CD137L und IL-12 – sowohl als Mono- als auch als Kombinationstherapie – in Bezug auf Tumorwachstum und Gesamtüberleben zeigten. Für dieses Plasmozytommodell verwendeten wir die cDNA von CD137L und IL-12. Diese cDNA wurde in den Säugetierexpressionsvektor pcDNA3.1(-) kloniert. Mittels Elektroporation konnte dieser Konstruktvektor in die murine Plasmozytomlinie MPC11 eingeschleust werden. Es erfolgte eine subkutane Applikation dieser modifizierten MPC11-Zellen in Balb/c Mäusen (n=8). Den überlebenden Mäusen wurden anschließend eine letale Dosis Wildtypzellen verabreicht.

Nach subkutaner Applikation von IL-12 exprimierenden Tumorzellen starben 2 von 8 Mäusen (25%) nach 24 Tagen. Bei 6 von 8 Mäusen (75%), die CD137L exprimierende Tumorzellen erhielten, bildete sich ein solider Tumor, der jedoch in allen Tieren vollständig regredient war; alle Tiere überlebten die Beobachtungszeit von 60 Tagen. In der Kombinationsgruppe (IL-12 + CD137L) der Therapie entwickelte 1 von 8 Tieren (12,5%) einen Tumor. Hier konnte ebenfalls eine Regression beobachtet werden, alle Tiere überlebten ebenfalls die Beobachtungszeit. Daraufhin erfolgte die erneute Applikation („*Rechallenge*“) von Wildtyp-Tumorzellen in einer letalen Dosis bei den noch lebenden Tieren des ersten Versuches. Alle Mäuse der CD137L-Gruppe und alle verbleibenden Tiere der IL-12-Gruppe überlebten die Beobachtungszeit von 60 Tagen. Jedoch starben 2 von 8 (25%) Tiere in der Kombinationsgruppe (IL-12 und CD137L) nach der Wildtyp-Rechallenge innerhalb von 40 Tagen.

Wie auch bei einer Vielzahl solider Tumoren beobachtet wurde, konnten wir zeigen, dass CD137L eine effektive und lang anhaltende Antitumorimmunität im murinen Plasmozytommodell MPC11 hervorruft. Ein vorübergehendes Tumorwachstum mit anschließender Tumorregression wurde beobachtet; was sich auf eine verzögert eintretende, jedoch effektive lokale Tumorabstoßung zurückführen lässt. Die

Tatsache, dass sich die anfänglich wachsenden Tumorknoten vollständig zurückgebildet haben, kann auf die starke antitumorale Wirkung des CD137L zurückgeführt werden und bereitet den Weg für weitere Einsatzmöglichkeiten in der Krebstherapie. Dieser Unterschied zu IL-12 produzierenden Tumorzellen könnte zudem die weniger effektive IL-12-Monotherapie als auch die Kombinationstherapie mit IL-12/CD137L erklären.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A/C/G/TTP	Adenosin-/Cytidin-/Guanosin-/Thymidintriphosphat
APC	Antigen präsentierende Zelle
BALB	Bagg Albino
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CMV	Zytomegalievirus
CTL	zytotoxischer Lymphozyt
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
G418	Neomycin
h	Stunde (hour)
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
kbp	Kilo-Basenpaare (1000 Basenpaare)
kD	Kilodalton
LB	Luria-Broth
LPS	Lipopolysaccharid

M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
µg	Mikrogramm
min.	Minute
NK	Natural Killer Cell
NKT-Zellen	Natural Killer T-Zellen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPC	murines Plasmozytom
nm	Nanometer
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
sek.	Sekunde
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
U/min	Umdrehungen pro Minute

7. Literaturverzeichnis

- Aloysius MM, Takhar A, Robins A, Eremin O.
Dendritic cell biology, dysfunction and immunotherapy in gastrointestinal cancers.
Surgeon 2006; 4:195-210
- Bauer R, Bohm I.
Flow cytometry in dermatology.
Hautarzt 1996; 47:561-578
- Boehrer S, Nowak D, Hoelzer D, Mitrou PS, Chow KU.
Novel agents aiming at specific molecular targets increase chemosensitivity and overcome chemoresistance in hematopoietic malignancies.
Curr Pharm Des 2006; 12:111-128
- Bojunga J, Kusterer K, Schumm-Draeger PM, Usadel KH.
Polymerase chain reaction in the detection of tumor cells: new approaches in diagnosis and follow-up of patients with thyroid cancer.
Thyroid 2002; 12:1097-1107
- Bronte V, Cingarlini S, Marigo I, De Santo C, Gallina G, Dolcetti L, Ugel S, Peranzoni E, Mandruzzato S, Zanovello P.
Leukocyte infiltration in cancer creates an unfavorable environment for antitumor immune responses: a novel target for therapeutic intervention.
Immunol Invest 2006; 35:327-357
- Burke F.
Cytokines (IFNs, TNF-alpha, IL-2 and IL-12) and animal models of cancer.
Cytokines Cell Mol Ther 1999; 5:51-61
- Car BD, Eng VM, Lipman JM, Anderson TD .
The toxicology of interleukin-12: a review.
Toxicol Pathol 1999; 27:58-63
- Carson WE, Yu H, Dierksheide J, Pfeffer K, Bouchard P, Clark R, Durbin J, Baldwin AS, Peschon J, Johnson PR, Ku G, Baumann H, Caligiuri MA.
A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells.
J Immunol 1999; 162:4943-4951
- Chada S, Ramesh R, Mhashilkar AM.
Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer.
Curr Opin Mol Ther 2003; 5:463-474

- Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G.
Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers.
J Exp Med 1991; 173:869-879
- Chu NR, DeBenedette MA, Stiernholm BJ, Barber BH, Watts TH.
Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and CD28- T cells.
J Immunol 1997; 158:3081-3089
- Colombo MP, Trinchieri G.
Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy.
Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13:155-168
- Cvetkovic RS, Perry CM.
Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia.
Drugs 2006; 66:791-820
- 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; 181:537-546
- DeBenedette MA, Chu NR, Pollok KE, Hurtado J, Wade WF, Kwon BS, Watts TH.
Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP.
J Exp Med 1995; 81: 985-992
- Doehn C, Kausch I, Melz S, Behm A, Jocham D.
Cytokine and vaccine therapy of kidney cancer.
Expert Rev Anticancer Ther 2004; 4:1097-1111
- Dvorak C.
Common complaints, difficult diagnosis: multiple myeloma.
J Am Acad Nurse Pract 2006; 18:190-194
- Galligan CL, Murooka TT, Rahbar R, Baig E, Majchrzak-Kita B, Fish EN.
Interferons and viruses: signaling for supremacy.
Immunol Res 2006; 35:27-40
- Gately MK, Gubler U, Brunda MJ, Nadeau RR, Anderson TD, Lipman JM.
Interleukin-12: a cytokine with therapeutic potential in oncology and infectious diseases.
Ther Immunol 1994; 1:187-196

Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M.

Towards a new generation of vaccines: the cytokine IL-12 as an adjuvant to enhance cellular immune responses to pathogens during prime-booster vaccination regimens.

Histol Histopathol 2001; 16:655-667

Glasmacher A, Hahn C, Hoffmann F, Naumann R, Goldschmidt H, von Lilienfeld-Toal M, Orlopp K, Schmidt-Wolf I, Gorschluter M.

A systematic review of phase-II trials of thalidomide monotherapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma.

Br J Haematol 2006; 132:584-593

Gollob JA, Mier JW, Atkins MB.

Clinical use of systemic IL-12 therapy.

Cancer Chemother Biol Response Modif 2001; 19:353-369

Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA.

Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor.

Eur J Immunol 1993; 23:2631-2641

Gruss HJ, Dower SK.

Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas.

Blood 1995; 85:3378-3404

Gysel MV, Marien G, Verhoef G, Delforge M, Bossuyt X.

Free light chain testing in follow-up of multiple myeloma.

Clin Chem Lab Med 2006; 44:1044-1046

Hanahan D.

Studies on transformation of escherichia coli with plasmids.

J Mol Biol 1983; 166:557-580

Harrison SJ, Cook G.

Immunotherapy in multiple myeloma--possibility or probability?

Br J Haematol 2005; 130:344-362

Hess U.

The plasma cell myeloma-molecular pathogenesis and target therapies.

Ther Umsch 2006; 63:233-236

Hentschel N, Krusch M, Kiener PA, Kolb HJ, Salih HR, Schmetzer HM.

Serum levels of sCD137 (4-1BB) ligand are prognostic factors for progression in acute myeloid leukemia but not in non-Hodgkin's lymphoma.

Eur J Haematol 2006; 77:91-101

- Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Anderson KC.
Identification and validation of novel therapeutic targets for multiple myeloma.
J Clin Oncol 2005; 23:6345-6350
- Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS.
Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death.
J Immunol 1997; 158:2600-2609
- Joyce C.
Quantitative RT-PCR. A review of current methodologies.
Methods Mol Biol 2002; 193:83-92
- Ju SA, Lee SC, Kwon TH, Heo SK, Park SM, Paek HN, Suh JH, Cho HR, Kwon B, Kwon BS, Kim BS.
Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of tumour-infiltrating lymphocytes.
Immunol Cell Biol 2005; 83:344-351
- Kim YJ, Kim SH, Mantel P, Kwon BS.
Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses.
Eur J Immunol 1998; 28: 881-890
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G.
Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.
J Exp Med 1989; 170:827-845
- Kubin M, Chow JM, Trinchieri G.
Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells.
Blood 1994; 83:1847-1855
- Kumar L, Vikram P, Kochupillai V.
Recent advances in the management of multiple myeloma.
Natl Med J India 2006; 19:80-89
- Kwon B, Moon CH, Kang S, Seo SK, Kwon BS.
4-1BB: still in the midst of darkness.
Mol Cells 2000; 10:119-126
- Lee SM, Suen Y, Qian J, Knoppel E, Cairo MS.
The regulation and biological activity of interleukin 12.
Leuk Lymphoma 1998; 29:427-438

- Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL.
Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production.
Blood 1997; 90:2541-2548
- Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Pan YC, Hakimi J.
Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity.
J Immunol 1995; 154:116-127
- Liu GZ, Gomes AC, Putheti P, Karrenbauer V, Kostulas K, Press R, Hillert J, Hjelmström P, Gao XG.
Increased soluble 4-1BB ligand (4-1BBL) levels in peripheral blood of patients with multiple sclerosis
Scand J Immunol 2006; 64:412-419
- Lollini PL, De Giovanni C, Pannellini T, Cavallo F, Forni G, Nanni P.
Cancer immunoprevention.
Future Oncol 2005; 1:57-66
- Luczynski W, Krawczuk-Rybak M, Stasiak-Barmuta A, Murren C.
Experimental and selected clinical aspects of active immunotherapy in leukemia.
Postepy Hig Med Dosw 2006; 60:379-386
- Maloney DG.
Immunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma: monoclonal antibodies and vaccines.
J Clin Oncol 2005; 23:6421-6428
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Trinchieri G, Romagnani S.
Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.
J Exp Med 1993; 177:1199-1204
- Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, Chen SH.
Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model.
J Natl Cancer Inst 2000; 92:931-936
- Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E, Germann T.
The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer.
Eur J Immunol 1993; 23:2202-2208

- Melero I, Bach N, Hellstrom KE, Aruffo A, Mittler RS, Chen L.
Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 costimulatory pathway.
Eur J Immunol 1998; 28:1116-1121
- Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L, Prieto J.
IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies.
Trends Immunol 2001; 22:113-115
- Misra N, Bayary J, Dasgupta S, Ephrem A, Huyen JP, Delignat S, Hassan G, Caligiuri G, Nicoletti A, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV.
Intravenous immunoglobulin and dendritic cells.
Clin Rev Allergy Immunol 2005; 29:201-205
- Murakami H, Handa H.
New treatment strategy of multiple myeloma for cure.
Gan To Kagaku Ryoho 2006; 33:417-423
- Neeson P, Paterson Y.
Effects of the tumor microenvironment on the efficacy of tumor immunotherapy.
Immunol Invest 2006; 35:359-394
- Novelli F, Casanova JL.
The role of IL-12, IL-23 and IFN-gamma in immunity to viruses.
Cytokine Growth Factor Rev 2004; 15:367-377
- Ohe Y, Kasai T, Heike Y, Saijo N.
Clinical trial of IL-12 for cancer patients.
Gan To Kagaku Ryoho 1998; 25:177-184
- Palma C, Binaschi M, Bigioni M, Maggi CA, Goso C.
CD137, CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival.
Int J Cancer 2004; 108:390-398
- Pardoll DM.
Spinning molecular immunology into successful immunotherapy.
Nat Rev Immunol 2002; 2:227-238
- Patschan S, Dolf S, Kribben A, Dürig J, Patschan D, Wilde B, Specker C, Philipp T.
CD134 expression on CD4+ T cells is associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus
Clin Exp Immunol 2006; 145:235-242
- pcDNA3.1(-). (Abb. 4)
<http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.1-.pdf> (modifiziert)
Invitrogen GmbH. Emmy-Noether-Str. 10, 76131 Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland

- Pinzon-Charry A, Schmidt C, Lopez JA.
Dendritic cell immunotherapy for breast cancer.
Expert Opin Biol Ther 2006; 6:591-604
- Portielje JE, Gratama JW, van Ojik HH, Stoter G, Kruit WH.
IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination.
Cancer Immunol Immunother 2003; 52:133-144
- Rabu C, Quemener A, Jacques Y, Echasserieau K, Vusio P, Lang F.
Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL). Cross-linking is essential to its T cell co-stimulation activity.
J Biol Chem 2005; 280:41472-41481
- Rodolfo M, Colombo MP.
Interleukin-12 as an adjuvant for cancer immunotherapy.
Methods 1999; 19:114-120
- Salih HR, Kiener PA, Nussler V.
4-1BB-ligand--just another costimulating molecule?
Int J Clin Pharmacol Ther 2002; 40:348-353
- Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA, Kiener PA.
Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells.
J Immunol 2000; 165:2903-2910
- Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, Nussler V, Kiener PA.
Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies.
J Immunol 2001; 167:4059-4066
- Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J.
Gene therapy of cancer based on interleukin 12.
Curr Gene Ther 2005; 5:573-581
- Sauer G, Kurzeder C, Heilmann V, Kreienberg R, Deissler H.
Immunotherapy and cancer vaccines in the management of breast cancer.
Curr Pharm Des 2005; 11:3475-3483
- Schiller M, Metze D, Luger TA, Grabbe S, Gunzer M.
Immune response modifiers--mode of action.
Exp Dermatol 2006; 15:331-341
- Schimanski CC, Horner V, Kanzler S, Galle PR, Moehler M.
Immunotherapy of Colorectal Cancer - Overview and Perspectives.
Gastroenterol 2006; 44:673-681

Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, Gubler U.

Cloning and expression of murine IL-12.

J Immunol 1992; 148:3433-3440

Schuster M, Nechansky A, Kircheis R.

Cancer immunotherapy.

Biotechnol J 2006; 1:138-147

Sharma S, Dominguez AL, Lustgarten J.

Aging affect the anti-tumor potential of dendritic cell vaccination, but it can be overcome by co-stimulation with anti-OX40 or anti-4-1BB.

Exp Gerontol 2006; 41:78-84

Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, MacDonald AS, Ahmed R, Shen H.

Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during Listeria monocytogenes infection.

J Immunol 2003; 170:2053-2063

Shen HM, Pervaiz S.

TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution.

FASEB J 2006; 20:1589-1598

Sher A, Collazzo C, Scanga C, Jankovic D, Yap G, Aliberti J.

Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to Toxoplasma gondii.

Immunol Res 2003; 27:521-528

Snyder LA, Goletz TJ, Gunn GR, Shi FF, Harris MC, Cochlin K, McCauley C, McCarthy SG, Branigan PJ, Knight DM.

A MUC1/IL-18 DNA vaccine induces anti-tumor immunity and increased survival in MUC1 transgenic mice.

Vaccine 2006; 24:3340-3352

Sondak VK, Sabel MS, Mule JJ.

Allogeneic and autologous melanoma vaccines: where have we been and where are we going?

Clin Cancer Res 2006; 12:2337-2341

Stevenson FK.

Update on cancer vaccines.

Curr Opin Oncol 2005; 17:573-577

Stewart AK u. Fonseca R.

Prognostic and therapeutic significance of myeloma genetics and gene expression profiling.

J Clin Oncol 2005; 23:6339-6344

- Terriou L, Leleu X, Yakoub-Agha I.
Treatment of multiple myeloma.
Bull Cancer 2006; 93:101-106
- Trinchieri G.
Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes.
Blood 1994; 84:4008-4027
- Trinchieri G.
Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity.
Adv Immunol 1998a; 70:83-243
- Trinchieri G.
Immunobiology of interleukin-12.
Immunol Res 1998b; 17:269-278
- Trinchieri G, Scott P.
Interleukin-12: basic principles and clinical applications.
Curr Top Microbiol Immunol 1999; 238:57-78
- Vinay DS, Kwon BS.
Role of 4-1BB in immune responses.
Semin Immunol 1998; 10:481-489
- Vinay DS, Choi BK, Bae JS, Kim WY, Gebhardt BM, Kwon BS.
CD137-deficient mice have reduced NK/NKT cell numbers and function, are resistant to lipopolysaccharide-induced shock syndromes, and have lower IL-4 responses.
J Immunol 2004; 173:4218-4229
- Xu DP, Sauter BV, Huang TG, Meseck M, Woo SL, Chen SH.
The systemic administration of Ig-4-1BB ligand in combination with IL-12 gene transfer eradicates hepatic colon carcinoma.
Gene Ther. 2005; 12:1526-1533
- Zhang L, Wang Q, Wang X, Ding P, Song J, Ma C, Sun W.
Anti-CD137 monoclonal antibody promotes the direct anti-tumor effect mediated by peripheral blood-derived human dendritic cells in vitro.
Cell Mol Immunol 2004; 1:71-76

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Immun- und Genterapeutischen Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Schmidt-Wolf an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Allgemeine Innere Medizin (Direktor Prof. Dr. T. Sauerbruch) der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Schmidt-Wolf danke ich besonders für die Vergabe dieses Themas, für seine Unterstützung und für den ständigen wertvollen Rat während der gesamten Zeit.

Als nächstes geht mein Dank an meinen Betreuer Herrn Dr. med. Strehl für seine Bereitschaft, dieses Projekt zu betreuen. Von ihm habe ich die Techniken und die Eigenheiten der Experimente gelernt.

Als nächstes möchte ich den Mitarbeitern des Immun- und Genterapeutischen Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Schmidt-Wolf danken, darunter insbesondere Frau Dr. Elisabeth Sievers, Frau Dr. Susanne Frank, Frau Petra Alpmann und Frau Annette Brause für ihre Unterstützung und für den freundschaftlichen und kollegialen Umgang.