

Untersuchungen zur tumorimmunologischen Funktion von CD137

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftliche Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Daniela Max

geb. am 18.10.1977 in Staßfurt

Gutachter /in

1. Prof. R. Gary Sawers
2. PD Dr. Martin S. Staeger
3. PD Dr. Stephan Sudowe

Halle (Saale), 8. Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Merkmale von Tumoren.....	1
1.2 Das Immunsystem.....	2
1.2.1 Auslösung der T-Zell-Immunantwort durch T-Zell-Aktivierung und Kostimulation.....	3
1.2.2 Die TNF/TNFR-Superfamilie.....	4
1.3 Das CD137/CD137L System.....	6
1.3.1 Charakterisierung von CD137 und CD137L.....	6
1.3.2 Einfluss von CD137 auf die Immunantwort humaner T-Zellen	7
1.3.3 Wirksamkeit von Antikörpern gegen CD137 bei Transplantation, Tumoren und Autoimmunität.....	8
1.4 In dieser Arbeit verwendetes Tumormodell.....	10
1.4.1 Die Familie der Ewing-Tumore	10
1.5 Tumore und Immuntherapie	12
1.5.1 Tumorantigene	12
1.5.2 Tumor-Immun- <i>Escape</i> -Mechanismen.....	14
1.5.3 Hinweise auf natürliche Anti-Tumor-Reaktivitäten und deren Nutzung als gezielte Immunstimulationsstrategien	16
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Chemikalien, <i>Kits</i> und Enzyme	20
2.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien.....	23
2.1.5 Vektoren und PCR-Primer	24
2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen.....	25
2.1.7 Antikörper.....	27
2.1.8 Mikroarray-Datensätze	28
2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1 Isolation von RNA aus Kulturzellen.....	29
2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)	30
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.2.5 Quantitative PCR.....	31
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.7 Genexpressionsanalysen	32
2.3 Mikrobiologische Methoden	36
2.3.1 Vorarbeiten für Vermehrung des Vektors.....	36
2.3.2 Transformation und Vorkultur	37
2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Plasmid Präparation).....	37
2.4 Zellbiologische Methoden	39
2.4.1 Kulturbedingungen	39
2.4.2 Bestimmung der Zellzahl	39
2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen.....	39
2.4.4 Experimentelle Ansätze mit Zellkultureinsätzen.....	40
2.4.5 Kultivierung der T-Zellen für DNA-Mikroarray-Analyse	40

2.4.6	Transfektion von Kulturzellen mit <i>jetPEI™ Transfection Reagent</i>	41
2.4.7	Isolation von Lymphozyten über Dichtegradientenzentrifugation	41
2.5	Immunologische Methoden.....	41
2.5.1	FACS-Analyse (<i>fluorescence activated cell scanning</i>)	41
2.5.2	MACS (<i>magnetic cell sorting</i>)	42
2.5.3	Proliferationstest.....	42
2.5.4	<i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) zur Bestimmung löslicher Zytokine	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Untersuchungen zur Expression von CD137 und CD137L	44
3.1.1	Analyse der Expression von CD137L mittels Durchflusszytometrie	44
3.1.2	Untersuchung verschiedener Zelllinien und Zelltypen mittels Mikroarrayanalyse	46
3.1.3	Untersuchung der Expression von CD137 und CD137L auf Hodgkin-Lymphom-Zelllinien.....	48
3.2	Untersuchung eines möglichen Einflusses des CD137/CD137L-Systems auf die Expression der Indolamin-2,3-dioxygenase.....	50
3.2.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen zum möglichen Einfluss vom CD137/ CD137L-System auf die Expression vonIDO in Tumorzellen	51
3.2.2	Expressionsanalysen für IDO, IDO2 und KYNU in Tumorzelllinien verschiedenster Entitäten	56
3.2.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen zum möglichen Einfluss vom CD137/CD137L- System auf die Expression von IDO in Tumorzellen unter Zugabe von definierten IL2-Konzentrationen.....	63
3.2.4	Wirkung eines neutralisierenden INF γ -Antikörpers auf IDO-Expression nach Kokultur	68
3.2.5	Hemmung der Proliferation von PBMC durch IDO exprimierende Tumorzellen.....	69
3.3	Untersuchung des Einflusses des Antikörpers gegen CD137 auf T-Zellen mithilfe der DNA-Mikroarray-Analyse.....	71
3.3.1	Vorarbeiten und -untersuchungen für die DNA-Mikroarray-Analyse.....	71
3.3.2	DNA-Mikroarray-Analyse	73
3.3.3	Validierung der DNA-Mikroarray-Analyse	75
3.3.4	Einfluss von IL17F auf die Kokultivierung der Ewing-Tumor-Zelllinie SK-N- MC mit PBMC.....	78
3.3.5	Einfluss von IL17F auf die Expression von IDO in Tumorzellen	80
4	Diskussion	82
4.1	Expression von CD137 und CD137L	82
4.2	Einfluss des CD137/CD137L-Systems auf die Expression der Indolamin- 2,3-dioxygenase	85
4.3	Untersuchung des Einflusses des Antikörpers gegen CD137 auf T-Zellen mithilfe DNA-Mikroarray-Analyse	94
4.4	Ausblick.....	99
5	Zusammenfassung	101
6	Literaturverzeichnis	103
7	Anhang	129
7.1	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Genbezeichnungen	129
7.2	Heraufregulierte Gene nach Inkubation von T-Zellen mit CD137- spezifischen Antikörpern.....	132
7.3	Herabregulierte Gene nach Inkubation von T-Zellen mit CD137- spezifischen Antikörpern.....	134
Lebenslauf	138

Erklärung	139
Danksagung	140
Publikationsliste	141

Abkürzungsverzeichnis¹

α	anti-
AK	Antikörper
ALCL	anaplastisches großzelliges Lymphom (<i>anaplastic large cell lymphoma</i>)
APC	antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cell</i>)
As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Rest-Blut (<i>Buffy coat</i>)
BCR	B-Zell-Rezeptor
BM-MSC	mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
C-	Carboxy-
CBA	<i>cytometric bead assay</i>
CD	Differenzierungsantigen-Cluster (<i>cluster of differentiation</i>)
CD4+	CD4 positiv
CD8+	CD8 positiv
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CEA	karzinoembryonales Antigen (<i>cancinoembryonic antigen</i>)
CRD	Cystein-reiche Domänen
cRNA	komplementäre RNA (<i>complementary RNA</i>)
CTP	Cytidintriphosphat
CTA	<i>cancer/testis</i> -Antigen
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DCR	<i>decoy receptor</i>
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagl`s Medium</i>
DNA	Desoyribonukleinsäure

¹ Die Abkürzungen von Genen sind im Anhang 7.1 zusammengefasst.

dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
DR	<i>death receptor</i>
DPBS	phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
DTT	1,4 Dithiothreitol
EAE	Encephalomyelitis
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
EFT	Ewing-Tumorfamilie
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ESC	embryonale Stammzellen
ES-MSC	mesenchymale Stammzellen (aus ESC differenziert)
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward Scatter</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin-Sulfat
GEO	<i>Gene expression omnibus</i> (Internet-Datenbank)
GTP	Guanosintriphosphat
GvHR	Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (<i>graft-versus-host reaction</i>)
HCl	Salzsäure
HG	Human Genom
HL	Hodgkin-Lymphom
HLA	menschliches Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HUVEC	humane venöse Nabelschnurendothelzellen
HVS	<i>Herpesvirus saimiri</i>
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle (<i>intercellular adhesion molecules</i>)
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IgG	Immunglobulin G

IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILR	Interleukin-Rezeptor
IVT	<i>in-vitro</i> -Transkription
JNK	<i>c-JUN NH₂-terminal kinase</i>
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierten Killerzellen
LB	<i>Luria Broth Medium</i>
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LFA	<i>lymphocyte function-associated antigens</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphotoxin
MACS	Magnet-aktivierte Zellsortierung (<i>magnetic cell sorting</i>)
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK-Kinase
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MLTC	gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur
MLU	Martin-Luther-Universität
MOPS	3-Morpholinosulfonsäure
MPh	Makrophagen
MSC	mesenchymale Stammzelle
N-	Amino-
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NT	Neurotrophin
OD	optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (Internet-Datenbank)
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konz. (in wässriger Lösung)
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SAPK	Stress-aktivierte Protein-Kinase
SDS	Natriumdodecylphosphat
Ser	Serin
SLE	<i>systemic lupus erythematosus</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SSPE	Natriumchlorid/-phosphat/EDTA (<i>saline/sodium phosphate/EDTA</i>)
Strep	Streptomycin
TAE	TRIS-Azetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	TRIS-EDTA
THD	TNF-homologe Domäne
Thr	Threonin
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TLR	Toll-like-Rezeptoren (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TNFRSF	TNFR-Superfamilie
TRAF	TNFR assoziierter Faktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UCB-MSC	mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einleitung

1.1 Merkmale von Tumoren

Tumore zeichnen sich durch eine Dysfunktion ihrer Proliferation aus, bei der entscheidende Veränderungen in der Physiologie der Zelle kollektiv zu malignem Wachstum führen (Hanahan und Weinberg 2000). Die gesteigerte Proliferation wird hierbei durch das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen hervorgerufen. Die Selbstversorgung der Tumore mit Wachstumsfaktoren, die Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), das konstante replikative Potential der Tumorzellen, die verstärkte Angiogenese und die Fähigkeit der Tumorzellen zur Invasion und Metastasierung stellen die wesentlichen Mechanismen dar.

Normale Zellen sind für Aktivierung und Proliferation auf Wachstumsfaktoren ihrer Umgebung angewiesen. Durch die Fähigkeit der Tumorzellen sich selbstständig mit Wachstumsfaktoren zu versorgen, erhalten diese eine Unabhängigkeit gegenüber dem umliegenden normalen Gewebe. So wird bei Glioblastomen und Ewing-Tumoren unter anderem die Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren, z. B. IGF (*Insulin-like Growth Factors*) (Gammeltoft et al. 1988, Toretsky et al. 1997), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Plate et al. 1992, Zhou et al. 2007) und TGF β (*Transforming Growth Factor beta*) (Kjellmann et al. 2000) durch die Tumorzellen beobachtet.

Ein wichtiger Schutzmechanismus zur Aufrechterhaltung des normalen Zellgleichgewichtes in unserem Körper ist die Apoptose. Sie wird in Zellen induziert die geschädigt sind, nicht mehr benötigt werden oder für den Körper gefährlich werden können. Während der Apoptose kommt es zum Abbau der DNA, zur Degeneration und Kondensation des Zellkernes und anschließend zur Phagozytose der Zellreste. Somit stellt die Dysregulation der Apoptose für Tumorzellen einen weiteren Vorteil dar. Manche Tumore schützen sich durch die Überexpression antiapoptotischer Gene, z. B. durch die erhöhte Expression von BCL2 (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*) in follikulären B-Zell-Lymphomen (McDonnell et al. 1989). Bei anderen wird die Apoptose durch Mutationen in proapoptotischen Genen eingeschränkt, wie dies z. B. bei metastasierenden Melanomen für APAF-1

(*apoptotic peptidase activating factor 1*, einen wichtigen Bestandteil des Apoptosomen) beobachtet wurde (Soengas et al. 2001).

Bei normalen Zellen kommt es nach einigen Vermehrungszyklen zu einem Wachstumsstopp und der Seneszenz der Zelle. Tumorzellen hingegen haben häufig ein unlimitiertes replikatives Potential, welches durch die Überexpression eines Enzyms, der Telomerase, in fast 90% aller Tumore hervorgerufen wird (Kim et al. 1994). Die Telomerase bewirkt durch Synthese von DNA an den Enden der Chromosomen, dass diese nicht mit jeder Zellteilung verkürzt werden.

Damit für das normale Zellwachstum ständig genug Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung stehen, befinden sich alle Zellen eines Gewebes in unmittelbarer Nähe von kapillären Blutgefäßen. Um diese Nähe ermöglichen zu können, kommt es in einem sorgfältig regulierten Prozess zur stetigen Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese). Häufig können Tumorzellen durch die Überexpression von Induktoren (z. B. FGF (*Fibroblast Growth Factor*) und VEGF) und durch Herabregulation von Inhibitoren (z. B. Thrombospondin-1 und Interferon β) in diesen Prozess eingreifen (Hanahan und Folkman 1996).

Die Fähigkeiten der Tumorzellen zur Invasion von Geweben und zur Metastasierung sind zwei Prozesse, die bis jetzt genetisch und biochemisch nur unvollständig verstanden sind. Es ist bekannt dass verschiedene Faktoren, z. B. Zelladhäsionsmoleküle und Integrine an diesen Prozessen beteiligt sind. So wird das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM - *neural cell adhesion molecule*) in Wilmstumoren, Neuroblastomen und kleinzelligen Lungentumoren von einer stark in eine wenig adhäsive Form umgewandelt (Johnson 1991, Kaiser et al. 1996), hingegen bei invasiven pankreatischen und kolorektalen Tumoren wird NCAM nicht mehr exprimiert (Fogar et al. 1997).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem, die angeborene und adaptive Immunabwehr, unseres Körpers ist verantwortlich für die Abwehr fremder Pathogene, die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und die Zerstörung fehlerhafter körpereigener Zellen. Bei der angeborenen Immunabwehr werden durch Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen (DC) und Mastzellen unter anderem mit Hilfe von so genannten Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) Pathogen-assoziierte molekulare

Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) erkannt und im Anschluss erfolgreich bekämpft (auch mit Hilfe des Komplementsystems). Die adaptive Immunabwehr hingegen, wird hauptsächlich durch T-Zellen (zellvermittelte Immunität) und B-Zellen (humorale Immunität) vermittelt. Beide Zellarten zeichnen sich durch hoch diverse somatisch generierte antigenspezifische Rezeptoren, T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren (TCR und BCR), aus, mit deren Hilfe Pathogene erkannt und dann gezielt, nach Aktivierung und Proliferation der jeweiligen spezifischen Zelle, zerstört werden können. Im Weiteren soll der Fokus auf die T-Zell-Immunantwort gelegt werden.

1.2.1 Auslösung der T-Zell-Immunantwort durch T-Zell-Aktivierung und Kostimulation

Die Aktivierung einer T-Zelle ist ein mehrstufiger Prozess, welcher in Adhäsion, Antigenerkennung und Kostimulation unterteilt werden kann. Während der Adhäsion nehmen antigenpräsentierende Zellen (APC) und T-Zellen durch Adhäsionsmoleküle (z. B. *intercellular adhesion molecules* - ICAM, *lymphocyte function-associated antigens* - LFA) zueinander Kontakt auf (Davis 2002). Ob solche Interaktionen eher einen kostimulatorischen oder adhäsiven Charakter haben, ist noch nicht vollständig und eindeutig geklärt (Bachmann et al. 1999a). Das folgende erste Signal wird durch die Bindung eines Antigen-MHC (*major histocompatibility complex*)-Komplexes einer APC an den T-Zell-Rezeptor der T-Zelle vermittelt. Um eine vollständige Aktivierung der T-Zelle zu erreichen, muss nun das kostimulatorische Signal folgen. Für lange Zeit war das Differenzierungsantigen CD28 (*cluster of differentiation 28*) das bekannteste und am besten untersuchte kostimulatorische Molekül. Es bindet an die Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf APC. Dieses Signal führt dann zu einer starken Produktion von Interleukin 2 (IL2) und einem Überleben naiver T-Zellen (Lenschow et al. 1996, Sharpe und Freeman 2002).

Wenn das erste und zweite Signal gleichzeitig auf die T-Zelle wirken, wird diese aktiviert, es kommt zur Verstärkung des primären Signals oder zur Aktivierung anderer Signale, welche die Zellteilung, den Zelltod und die Sekretion von Zytokinen beeinflussen. Tritt das zweite Signal nicht auf, kommt es zu Anergie, Toleranz oder Tod der T-Zelle (Chen et al. 1993, Croft 2003a). Somit sind die

kostimulatorischen Rezeptoren, die für das zweite Signal verantwortlich sind, von großer Bedeutung. Sie werden in drei Hauptgruppen eingeteilt (Croft 2003b):

- (1) die Immunglobulin-Superfamilie mit z. B. CD28, LFA-2 (*lymphocyte-function antigen-2*) und ICOS (*inducible T-cell co-stimulator*) (Lenschow et al. 1996, Coyle und Gutierrez-Ramos 2001, Sharpe und Freeman 2002).
- (2) die Rezeptoren (R) der Zytokine: z. B. IL1R, IL2R, IL6R, IL7R und IL15R (Croft 2003a).
- (3) die Mitglieder der TNFR-Superfamilie (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie) mit z. B. CD27 (TNFRSF7), CD30 (TNFRSF8), OX40 (TNFRSF4, CD134), CD137 (TNFRSF9, 4-1BB) und HVEM (*herpesvirus entry mediator*) (Gravestain und Borst 1998, Croft 2003a, Sugamura et al. 2004).

Mit Hilfe der Interaktionen zwischen den einzelnen Partnern der TNF/TNFR-Superfamilie wird die T-Zell-Immunantwort über unterschiedlichste Wege, z. B. über die angeborene Immunabwehr (Kollias und Kontoyiannis 2002), die lymphoide Organisation (Pfeffer 2003, Gommerman und Browning 2003), die Aktivierung von APC (Josien et al. 2000, Bachmann et al. 1999b, Quezada et al. 2004) und über direkte Signale an T-Zellen (Croft 2003a) beeinflusst.

1.2.2 Die TNF/TNFR-Superfamilie

Zurzeit sind die in Tabelle 1 gezeigten Rezeptoren und die zugehörigen Liganden der TNF/TNFR-Superfamilie bekannt. Die Liganden der TNF Superfamilie sind TypII-Transmembran-Proteine (mit intrazellulärem N-Terminus und extrazellulärem C-Terminus). Um aktiv zu sein, bilden die Liganden meist Trimere, die membrangebunden und/oder löslich vorliegen. Im extrazellulären C-Terminus befinden sich charakteristische konservierte Sequenzen, TNF-homologe Domänen (THD), welche für die Rezeptorbindung verantwortlich sind (Bodmer et al. 2002). Die Rezeptoren der TNFR-Superfamilie sind meist TypI-Transmembran-Proteine (mit extrazellulärem N-Terminus und intrazellulärem C-Terminus). Der extrazelluläre N-Terminus enthält charakteristische Cystein-reiche Domänen (CRD), die normalerweise sechs Cystein-Reste enthalten. Die Anzahl dieser CRD variiert in den einzelnen Rezeptoren zwischen eins und fünf (Bodmer et al. 2002). Die Rezeptoren der TNFR-Superfamilie lassen sich in drei Gruppen einteilen: (1) Rezeptoren mit

Todesdomäne (*death domain*, DD) aktivieren die Caspasekaskade und führen somit zur Apoptose (z. B. APO-1 - *apoptosis antigen 1* und TRAILR1 - *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*). (2) Die Köder- oder *decoy*-Rezeptoren, besitzen keine Todesdomäne, können aber mit gleicher Affinität an die Liganden der Rezeptoren der ersten Gruppe binden (z. B. TRAILR4 - *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 4*). Sie sind aufgrund der fehlenden Todesdomäne nicht fähig Signale weiterzugeben, und wirken somit antiapoptotisch.

Tabelle 1 Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie. Gezeigt werden hier die einzelnen Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie mit offiziellem Namen, Synonymen, OMIM-Nummer (*Online Mendelian Inheritance in Man*) und den jeweiligen Liganden (angelehnt an Locksley et al. 2001).

Rezeptor	Name	Synonyme	OMIM-Nummer	Ligand
TNFRSF1A	TNFRSF1A	TNFR1, TNF-R	191190	TNF, LT α
TNFRSF1B	TNFRSF1B	TNFR2, TNF-R-II	191191	TNF, LT α
TNFRSF3	LT β R	TNFCR	600979	LT α
TNFRSF4	TNFRSF4	CD134, OX40	600315	OX40L
TNFRSF5	CD40	CDW40	109535	CD40L
TNFRSF6	APO-1	CD95, FAS	134637	APT1LG1
TNFRSF6B	TNFRSF6B	DCR3	603361	APT1LG1, LIGHT
TNFRSF7	CD27	S152	186711	CD27L
TNFRSF8	TNFRSF8	CD30, Ki-1	153243	CD30L
TNFRSF9	TNFRSF9	4-1BB, CD137, ILA	602250	CD137L
TNFRSF10A	TNFRSF10A	TRAILR1, DR4	603611	TRAIL
TNFRSF10B	TNFRSF10B	TRAILR2, DR5	603612	TRAIL
TNFRSF10C	TNFRSF10C	TRAILR3, DCR1	603613	TRAIL
TNFRSF10D	TNFRSF10D	TRAILR4, DCR2	603614	TRAIL
TNFRSF11A	TNFRSF11A	RANK	603499	RANKL
TNFRSF11B	TNFRSF11B	OPG	602643	TRAIL, RANKL
TNFRSF12A	TNFRSF12A	TWEAKR	605914	TWEAK
TNFRSF13B	TNFRSF13B	TACI, CD267	604907	APRIL, BAFF
TNFRSF13C	TNFRSF13C	BAFFR	606269	BAFF
TNFRSF14	TNFRSF14	HVEM, LIGHTR	602746	LIGHT, BTLA, LT α
TNFRSF16	NGFR	CD271	162010	NGF, BDNF, NT3, NT4
TNFRSF17	TNFRSF17	BCMA, BCM	109545	APRIL, BAFF
TNFRSF18	TNFRSF18	GITR	603905	GITRL
TNFRSF19	TNFRSF19	TAJ, TROY	606122	---
TNFRSF21	TNFRSF21	DR6	605732	---
TNFRSF25	TNFRSF25	DR3, APO-3	603366	---
TNFRSF27	EDA2R	---	300276	EDA
---	EDAR	---	604095	EDA

(3) Rezeptoren (z. B. CD27, CD30, CD154, CD134, CD137), die an TNFR-assoziierte Faktoren (TRAF) binden, enthalten Motive, die vier bis sechs Aminosäuren (As) lang sind und sie zur Bindung der TRAF befähigen (Locksley et al. 2001, Chung et al. 2002, Aggarwal 2003, Dempsey et al. 2003). Zurzeit sind sechs

TRAF-Proteine bekannt, wobei alle kostimulatorischen Rezeptoren zur Bindung von TRAF2 befähigt sind (Dempsey et al. 2003). TRAF2 kann den nukleären Faktor κ B (NF- κ B) aktivieren, einen Transkriptionsfaktor der Gene des Überlebens (z. B. *BCL2-like 1* - BCL2L1; *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator* - CFLAR) und zelluläre Inhibitoren der Apoptose (z. B. *cellular inhibitor of apoptosis 1* – c-IAP1 und *cellular inhibitor of apoptosis 2* – c-IAP2) induziert (Karin und Lin 2002). TRAF2 steht außerdem in Verbindung mit dem JNK/SAPK-Signalweg (*c-JUN NH₂-terminal kinase*/Stress-aktivierte Protein-Kinase), der zur Förderung der Zytokin-Produktion und Proliferation beiträgt (Aggarwal 2003, Croft 2003a, Dempsey et al. 2003). Weiterhin ist TRAF2 verbunden mit der p38 MAPK-Familie, die an Differenzierung, Proliferation, Reparatur von DNA und Zelltod beteiligt ist (Aggarwal 2003, Dempsey et al. 2003, Ono und Han 2000).

1.3 Das CD137/CD137L System

1.3.1 Charakterisierung von CD137 und CD137L

Der Rezeptor CD137 (TNFRSF9, 4-1BB) ist lokalisiert auf Chromosom 1q36, in der unmittelbaren Nähe verschiedener anderer Mitglieder der TNFR-Superfamilie, z. B. TNFR2, CD30, CD134 und APO-3 (Schwarz et al 1996). Das 27 kDa große Protein besteht aus 255 As. Hierbei stellen die As 1 bis 17 das putative Signalpeptid dar, darauf folgt eine extrazelluläre Domäne von 169 As, ein Transmembranbereich von 27 As und eine intrazelluläre Domäne von 42 As (Zhou et al. 1995). Der kostimulatorische Rezeptor wurde bekannt als Molekül, welches auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Kwon und Weissmann 1989). Der Rezeptor wurde schon für Mensch und Maus eingehend analysiert. Zwischen beiden besteht eine Übereinstimmung von 60% (Alderson et al 1994). Bekannt ist auch, dass CD137 *in vitro* 48 Stunden nach primärer T-Zell-Aktivierung sein Expressionsmaximum erreicht, und dann innerhalb von 4 bis 5 Tagen in der Expression wieder absinkt (Kwon und Weismann 1989, Vinay und Kwon 1998, Cannons et al. 2001). *In vivo* kann das Molekül schon eher auftreten, es geht hier häufig einher mit der Expression von CD69, einem frühen T-Zell-Aktivierungsmarker (12-36 Stunden nach Aktivierung) (Dawicki und Watts 2004). CD137 ist auf CD4-positiven (T-Helferzellen) und CD8-positiven (zytotoxische T-Zellen) T-Zellen zu finden.

Unter bestimmten Umständen wird CD137 schneller und in stärkerem Maße auf CD8+ T-Zellen exprimiert (Futagawa et al. 2002, Taraban et al. 2002, Wen et al. 2002). Weiterhin ist CD137 auf aktivierten natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen zu finden. Der natürliche Ligand CD137L (TNFSF9, 4-1BBL) ist auf Chromosom 19 in der Region 19q13.3 lokalisiert (Alderson et al. 1994). Das Protein hat eine Größe von 50 kDa, beinhaltet 254 As und weist zwischen Mensch und Maus eine Übereinstimmung von nur 36% auf (Goodwin et al. 1993, Alderson et al. 1994). Zur Expression des Liganden kommt es relativ früh nach Stimulation. So ist dieser schon nach 30 Minuten (Alderson et al. 1994) auf professionellen APC (z. B. aktivierten B-Zellen, aktivierten Makrophagen und aktivierten dendritischen Zellen) zu finden. Das Maximum der Expression kann für den Liganden schon nach einer Stunde erreicht werden. Durch die Aktivierung über CD137 kommt es in T-Zellen zu einer Produktion von Effektormolekülen, wie Perforin, Granzym B, IL2 (nur im Zusammenspiel mit einer gleichzeitigen Aktivierung des T-Zell-Rezeptors), IL4 und Interferon gamma (Bukczynski et al. 2003, Bukczynski et al. 2004). Die Stimulation von CD137 auf dendritischen Zellen hingegen führt zur Produktion von IL6 und IL12 (Futagawa et al. 2002, Wilcox et al. 2002a).

1.3.2 Einfluss von CD137 auf die Immunantwort humaner T-Zellen

In frühen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von CD137 durch den zugehörigen Liganden oder durch spezifische monoklonale Antikörper ein potentes kostimulatorisches Signal für T-Zellen darstellt (Goodwin et al. 1993, Alderson et al. 1994). Dies führt sowohl bei CD8+ (Gramaglia et al. 2000), als auch bei CD4+ (Shuford et al. 1997) T-Zellen zu einem verstärkten *in vivo* und *in vitro* Überleben der Zellen (Schwarz et al. 1996, Hurtado et al. 1997, Takahashi et al. 1999, Lederach et al. 2000). Der kostimulatorische Ligand CD137L aktiviert *in vitro* CD4+ und CD8+ T-Zellen (Chu et al. 1997, Gramaglia et al. 2000, Cannons et al. 2001, Cooper et al. 2002). Monoklonale Antikörper gegen CD137 hingegen haben einen stärkeren Einfluss auf CD8+ T-Zellen (Hurtado et al. 1997). Der kostimulatorische Effekt von CD137 auf CD8+ T-Zellen führt neben erhöhter Proliferation und gesteigertem Überleben zu einer erhöhten Zytokin-Produktion (Shuford et al. 1997, Vinay und Kwon 1999) und verstärkt deren

zytotoxische Funktion (Shuford et al. 1997, Melero et al. 1997). Bei Untersuchungen von CD137-*knockout* Mäusen und CD137L-*knockout* Mäusen zeigten sich Defekte in der CD8-Immunantwort, aber keine Defekte der CD4-Immunantwort auf vesikuläre Stomatitisviren, lymphozytäre Choriomeningitisviren oder Influenzaviren (DeBenedette et al. 1999b, Tan et al. 1999, Kwon et al. 2002).

Eine wichtige Frage bei der Aktivierung von T-Zellen durch CD137 ist die Abhängigkeit dieses Prozesses von CD28. Wenn das eingehende Signal des T-Zell-Rezeptors stark ist, induziert die Stimulation über CD137 die gleiche Menge an IL2, wie die CD28 vermittelte Kostimulation. Unter limitierter antigener Stimulation hingegen erreicht die CD137-Kostimulation nicht denselben Effekt wie die einer CD80/CD86-CD28 Interaktion (Saoulli et al. 1998). Das zeigt, dass CD28 und CD137 einen unterschiedlichen Einfluss in der Kostimulation von T-Zellen haben. CD28 ist verantwortlich für die Stimulation der klonalen Expansion von T-Zellen. CD137 spielt eine wichtige Rolle für das Überleben von T-Zellen und die Stärkung der Immunantwort (Cannons et al. 2001).

1.3.3 Wirksamkeit von Antikörpern gegen CD137 bei Transplantation, Tumoren und Autoimmunität

Für eine weit reichende Analyse der Kostimulation über CD137, wurden in unterschiedlichen Studien Antikörper gegen CD137 eingesetzt. Die Wirkung dieser Antikörper und somit die Funktion von CD137 in der Kostimulation von T-Zellen wurden an Mausmodellen für verschiedene Aspekte (Transplantation, Autoimmunität und Tumore) näher untersucht.

In Transplantations-Modellen konnte durch den Einsatz von Antikörpern gegen CD137 eine Inhibition verschiedener Formen der Allotransplantatreaktion gezeigt werden (Blazar et al. 2001). Dies deutet auf eine dominante Blockierung der CD8-T-Zell-Aktivierung hin (Wang et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Blockierung von CD137L die akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHR) inhibiert, die chronische GvHR hingegen gesteigert wird (Nozawa et al. 2001). Unterstützend dazu konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass ein Antikörper gegen CD137 die chronische GvHR inhibiert (Kim et al. 2005).

Die starke Expansion von CD8⁺ T-Zellen durch Antikörper gegen CD137 (Shuford et al. 1997, Melero et al. 1997), macht diese als therapeutisches Mittel besonders für die Tumorthherapie sehr interessant. In frühen Untersuchungen wurden CD137L transfizierte Tumorzellen als Vakzine eingesetzt. Durch die eingesetzten Zellen konnte die Proliferation von T-Zellen induziert, ihr Überleben gestärkt und ebenfalls die Effektorfunktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erhöht werden (Cannons et al. 2001). Der Einsatz CD137L transgener Tumorzellen im Mausmodell besitzt zwar eine therapeutische Effektivität (Melero et al. 1998), diese liegt aber deutlich unter der von Antikörpern gegen CD137. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass viele humane Tumore schon konstitutiv CD137L exprimieren (Salih et al. 2000) und dennoch *in vivo* keine Zerstörung der Tumorzellen erfolgt. So konnten in einem Mausmodell mit dem wenig immunogenen Sarkom Ag104 durch den Einsatz von agonistischen Antikörpern gegen CD137 tumortragende Mäuse geheilt werden (unter Einfluss von CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen), wohingegen der Einsatz von CD137L transgenen Ag104 keine Wirkung zeigte (Melero et al. 1997). Die so erzeugte therapeutische Effektivität übertraf die Wirkung von Antikörpern gegen das *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) und CD28. Für Lungenkarzinome (TC-1) und Melanome (B16-F10) wurde in Mausmodellen gezeigt, dass die Aktivierung von CD137 durch Antikörper nur eine Wirkung zeigt, wenn die Immunantwort gegen den Tumor schon begonnen hat (Wilcox et al. 2002b). Dies erklärt vermutlich auch, warum in manchen Tumormodellen keine therapeutischen Erfolge durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen CD137 erreicht werden konnten (Kim et al. 2001).

Im Gegensatz zu den bisher dargestellten stimulatorischen Effekten zeigt sich die Wirkung von aktivierenden CD137-Antikörpern auf verschiedene Autoimmunerkrankungen. Führt die Kostimulation durch CD137 auf der einen Seite zu einer gesteigerten Immunantwort auf Tumore oder virale Antigene, so inhibiert sie auf der anderen Seite die humorale Immunität und reduziert z. B. bei der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) die Inzidenz und Stärke der Erkrankung im Mausmodell (Sun et al. 2002). Für andere Autoimmunerkrankungen konnte diese Wirkung ebenfalls bestätigt werden, z. B. beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Sun et al. 2002, Föll et al. 2003), der Arthritis (Föll et al. 2004, Seo et al. 2004) und der Uveitis (Shao et al. 2005).

1.4 In dieser Arbeit verwendetes Tumormodell

In dieser Arbeit wurden verschiedene humane Tumorzelllinien für Untersuchungen genutzt. Im Folgenden soll das genutzte Tumormodell für die Familie der Ewing-Tumore näher erläutert werden.

1.4.1 Die Familie der Ewing-Tumore

Die Tumore der Ewing-Tumorfamilie (EFT) wurden erstmal in einer zusammenhängenden Fallserie, zu diesem Zeitpunkt als Endotheliome bezeichnet, von James Ewing beschrieben (Ewing 1921). Durch spätere zytogenetische Analysen konnte für EFT in den meisten Fällen eine Translokation zwischen Chromosom 11 und Chromosom 22 identifiziert werden (Turc-Carel *et al.* 1984). Diese Translokation liegt in ca. 85% der auftretenden Fälle vor. Nach molekularen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Translokation die Gene *Ewing sarcoma breakpoint region 1* (EWSR1 von Chromosom 22q12) und *Friend leukemia integration site 1* (FLI1 von Chromosom 11q24) betrifft (Delattre *et al.* 1992).

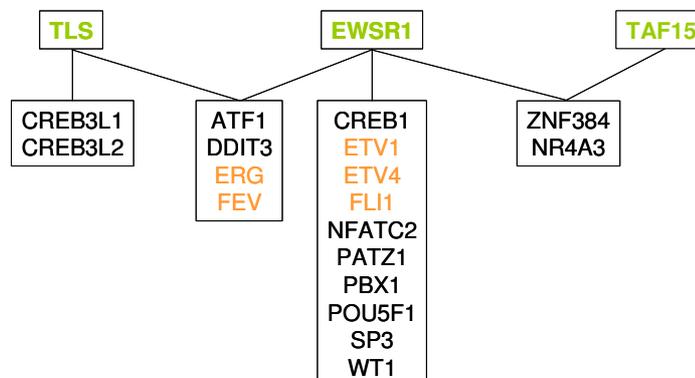


Abbildung 1 Mitglieder der TET-Familie und ihre Translokationspartner. Gezeigt sind die Mitglieder der TET-Familie (grün) und verschiedene Genfusions-Partner der ETS-Familie (gelb) und anderer Gene. ATF1, *activating transcription factor 1*; CREB1, *cAMP responsive element binding protein 1*; CREB3L1/2, *cAMP responsive element binding protein 3-like 1/2*; DDIT3, *DNA-damage-inducible transcript 3*; ERG, *ETS related gene*; ETV1/4, *ETS variant 1/4*; EWSR1, *Ewing sarcoma breakpoint region 1*; FEV, *fifth Ewing variant*; FLI1, *Friend leukemia integration 1*; NFATC2, *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2*; NR4A3, *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3*; PATZ1, *POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1*; POU5F1, *POU class 5 homeobox 1*; SP3, *specificity protein 3 transcription factor*; TAF15, *TATA box binding protein-associated factor, 68 kDa*; TLS, *translocated in liposarcoma*; WT1, *Wilms tumor 1*; ZNF384, *zinc finger protein 384*. Abbildung nach Staeger und Max 2009.

Neben EWSR1, Mitglied der so genannten TET-Familie RNA-bindender Proteine, (benannt nach den drei Mitgliedern TAF15 - *TATA box binding protein-associated*

factor, 68 kDa, EWSR1 und TLS - *translocated in liposarcoma*) und FLI1 (Mitglied der *E-twenty-six* (ETS)-Familie von Transkriptionsfaktoren) können auch noch andere Mitglieder der Proteinfamilien als Translokationspartner auftreten (z. B. TLS heute auch als *fusion involved in malignant liposarcoma* - FUS bezeichnet; *ETS-related gene* - ERG; *ETS translocation variant 1* - ETV1) (Abbildung 1). Das EWSR1-Gen kodiert für ein ubiquitär exprimiertes RNA-bindendes Protein und ist in Transkriptionsprozesse und RNA-Prozessierung involviert (May et al. 1993), FLI1 hingegen wird nur in hämatopoetischen Gewebe exprimiert (Ben-David et al. 1991). Das aus EWSR1 und FLI1 entstandene Fusionsprotein ist befähigt, als Transkriptionsfaktor an die gleichen Sequenzen wie FLI1 zu binden und somit in den Zellen eine Modulation der Genexpression zu bewirken (May et al. 1993). Es konnte durch Transfektion von Zelllinien mit EWSR1-FLI1 gezeigt werden, dass sein Auftreten allein nicht zum Phänotyp der EFT führt (Zwerner et al. 2003). Dies konnte auch durch DNA-Mikroarray-Analysen untermauert werden, bei denen native EFT-Zelllinien mit EWSR1-FLI1 transfizierten Zelllinien verglichen wurden. Durch diese Untersuchung wurde deutlich, dass nicht alle EFT-spezifischen Gene in EFT durch EWSR1-FLI1 reguliert werden (Staege et al. 2004b). Das Auftreten von EWSR1-FLI1 ist jedoch für die Proliferation der Tumorzellen unbedingt notwendig und stellt somit einen sehr guten Marker für Diagnose und neue therapeutischen Methoden dar (Lambert et al. 2000; Toub et al. 2006).

Histologisch gehören EFT zur Familie der kleinen blau- und rundzelligen Tumore, und umfassen eine Gruppe morphologisch ähnlicher Subtypen: Ewing-Sarkom des Knochens (87%), extraskelettaler Ewing-Tumor (8%), peripherer primitiver neuroektodermaler Tumor und Askin-Tumor der Thoraxwand (zusammen 5%). EFT stellen die zweithäufigsten Knochentumore mit bevorzugtem Auftreten bei Kindern und Jugendlichen dar (Jürgens et al. 2006), jedoch werden sie auch bei älteren Patienten beobachtet (Sezer et al. 1999; Cheung et al. 2001). Die Ursprungszelle der EFT konnte bis heute noch nicht identifiziert werden, durch Vergleiche von Genexpressionsmustern wurden Übereinstimmungen zu fetalen, neuronalen und endothelialen Geweben gefunden. Somit könnte der Ursprung in primitiven neuronalen Vorläuferzellen der Neuralleiste mit Kapazitäten zur mesenchymalen und endothelialen Differenzierung liegen (Staege et al. 2004b).

Trotz erheblicher Fortschritte in der Therapie, ist die Prognose für Patienten mit früher Metastasierung bzw. früh auftretendem Rezidiv immer noch ungünstig

(Burdach und Jürgens 2002; Burdach 2004, Bernstein et al. 2006). Wesentliches therapeutisches Konzept ist eine initiale Chemotherapie, dann eine Entfernung des Tumors mit Bestrahlung und weiterer anschließender Chemotherapie. Die vorhandenen Behandlungsoptionen bei EFT lassen sich wahrscheinlich aufgrund der erreichten Toxizität nicht wesentlich verstärken (Kushner und Meyers 2001). Erfahrungen mit allogener Stammzelltransplantation haben bislang keinen entscheidenden Durchbruch gezeigt (Burdach et al. 2000). Aus diesem Grund ist es notwendig neue potentielle Zielstrukturen für Diagnose und Therapie zu identifizieren, z. B. mithilfe der DNA-Mikroarrayanalytik. So wurden durch unsere Arbeitsgruppe einige EFT-spezifische Gene gefunden, die eine mögliche Option für neue Therapieentwicklungen darstellen (Föll et al 2008a; Max et al. 2009a).

1.5 Tumore und Immuntherapie

Tumorerkrankungen gehören mit zu einer der häufigsten Todesursachen in Industrieländern. Deshalb ist die Medizin seit langem bemüht, in Zusammenarbeit mit der Forschung neuere und bessere Therapieformen zu etablieren. Um dies zu ermöglichen, werden die konventionellen Therapieformen (operative Entfernung von Tumoren, Strahlen- und Chemotherapie) stetig weiterentwickelt und bestehende unterschiedliche Methoden kombiniert. Da bestehende Behandlungsmethoden häufig mit starken Nebenwirkungen und unzureichender Wirksamkeit einhergehen, ist es dringend erforderlich, alternative Konzepte mit hoher Effizienz und geringer Toxizität zu entwickeln. Eine dieser neuen Strategien ist die Immuntherapie, die sich durch ein breites Anwendungsspektrum, eine theoretisch hohe Spezifität und geringe Nebenwirkungen auszeichnet.

1.5.1 Tumorantigene

Durch die Identifikation von Tumorantigenen ist es seit einiger Zeit möglich, an gezielten Strategien zur Tumorthherapie zu arbeiten (Boon und van der Bruggen 1996). Durch die fortschreitende Weiterentwicklung der molekularen Immunologie, gelang es in den vergangenen Jahren für verschiedene Tumorarten Tumorantigene zu identifizieren. Tumorantigene können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, wobei die Expressionspezifität und Genese als die entschei-

denden Kriterien anzusehen sind. So gibt es Tumorantigene, die durch die Überexpression eines körpereigenen Proteins entstehen. Als Beispiele hierfür sind Cyclin D1 oder das Her2/neu-Antigen zu nennen (van den Eynde und van der Bruggen 1997, Disis und Cheever 1998). Her2/neu ist eine Rezeptortyrosinkinase, die bei 30% der Mamma- und Ovariakarzinome gebildet wird. Als weitere Gruppe sind Differenzierungsantigene zu nennen, die durch Tumorzellen und die korrespondierenden normalen Zellen gebildet werden. So wird z. B. die Tyrosinase (TYR) von Melanozyten und einigen Melanomen exprimiert (Van Pel et al. 1995). Tumorantigene mit posttranslationaler Modifikation bilden eine weitere Gruppe, wie z. B. das Mucin-1-Antigen (MUC1), das in Mamma- und Pankreaskarzinomen vorkommt. Im Normalgewebe ist dieses Antigen durch eine hohe Anzahl an Glykosylierungen gekennzeichnet. In den genannten Tumoren dagegen sind deutlich weniger oder keine Glykosylierungen nachweisbar (van den Eynde und van der Bruggen 1997). In der vierten Gruppe der Tumorantigene sind die viralen Antigene bzw. viralen Onkogene zusammengefasst. So sind die Proteine E6 und E7 des humanen Papillomavirus Typ 16 in Zervixkarzinomen exprimiert (Chen et al. 1991, Chen et al. 1992). Eine weitere Gruppe stellen die so genannten *cancer/testis*-Antigene (CTA) dar, die neben den Tumorzellen normalerweise nur in den Keimzellen des Hodens exprimiert werden. Zu solchen Genen gehören MAGEA1 (*melanoma antigen family A 1*), BAGE (*B melanoma antigen*) und GAGE1 (*G antigen 1*), die z. B. in Melanomen, Mamma- und Pankreaskarzinomen nachweisbar sind (Boon und van der Bruggen 1996). Unsere Arbeitsgruppe konnte die membranassoziierte Phospholipase A1 β (*Lipase member I*, LIPI) als ein CTA für EFT identifizieren (Föll et al. 2008a). In die nächste Gruppe der Tumorantigene werden Gene eingereiht, die durch Mutation entstanden sind. Diese Punktmutationen und Genumlagerungen können Ursache für die maligne Entartung des Gewebes sein. Die Expression dieser Gene ist ausschließlich auf den Tumor begrenzt, deshalb werden sie auch als tumorspezifische Gene bezeichnet. Als ein besonderes Beispiel ist hier das schon (in 1.4.1) erwähnte EFT-spezifische EWSR1-FLI1 zu nennen (Lessnick et al. 1995). Die Gene der letzten Gruppe werden auch als onkofetale Gene bezeichnet. Dies sind Gene, die sehr stark in Tumorzellen und in bestimmten fetalen (embryonalen) Zellen zu finden sind. In Normalgeweben hingegen sind sie äußerst schwach exprimiert.

Dazu gehören die Mitglieder der CEA-(*carcinoembryonic antigen*) Familie (Greiner et al. 2002).

1.5.2 Tumor-Immun-*Escape*-Mechanismen

Das adaptive und angeborene Immunsystem verfügt über weit reichende Möglichkeiten gegen die Entstehung eines Tumors vorzugehen, z. B. durch die Aktivität von NK-Zellen, NK-*like* T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen, spezifischen zytotoxischen T-Zellen und durch verschiedene Zytokine. Tumore entwickeln unterschiedliche Strategien, um durch das Immunsystem nicht erkannt zu werden. Diese Mechanismen sind sehr vielfältig, z. B. Verlust oder Herabregulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle; Herabregulierung, Mutation oder Verlust von Tumorantigenen; Veränderung der Signalkaskaden von Apoptose induzierenden Rezeptoren mit Todesdomäne; Produktion von immunsuppressiven Zytokinen und Expression von Indolamin-2,3-dioxygenase als immunsuppressives Molekül.

Der Verlust oder die Herabregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen ist ein weit verbreiteter Schutzmechanismus verschiedenster Tumore, um ein Erkennen durch CD8+ T-Zellen zu vermeiden. Die Veränderungen in der HLA (*human leukocyte antigen*)-Klasse-I-Expression können durch Mutationen in Genen, Veränderungen der Regulation und/oder Defekte in der HLA-Klasse-I-abhängigen Antigenprozessierung entstehen. Diese Veränderungen konnten in einer Serie von verschiedenen Zervixkarzinomproben mit Hilfe immunohistochemischer Techniken nachgewiesen werden (Koopman et al. 2000). Bei der Analyse unterschiedlicher Blasen Tumore wiesen 72% der Proben eine Veränderung in der HLA-Expression auf, die mit dem Grad der Differenzierung und dem Auftreten von Rezidiven einherging (Cabrera et al. 2003a). Der Verlust des Allels HLA-B44 war bei Untersuchungen mit Proben unterschiedlichster Tumorentitäten am häufigsten anzutreffen, was den Schluss zulässt, dass es eine wichtige Rolle im Tumor-*Escape* einnehmen könnte (Cabrera et al. 2003b).

Eine weitere Möglichkeit für Tumorzellen dem Angriff zytotoxischer T-Zellen (CTL) zu entkommen, ist die Herabregulierung, die Mutation oder der Verlust von Tumorantigenen (siehe 1.5.1). Es konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen des Tumorzellphänotypes heterogen in einem Tumor auftreten und zu einem

progressiven Krankheitsverlauf führen können (Khong und Restifo 2002). In einem weiteren experimentellen Ansatz in einem Mausmodell mit einer transgenen TCR-Spezifität für ein Tumorantigen in Kombination mit MHC-Klasse-I, konnte ein erneutes Wachstum der Tumore nach adoptiver T-Zell-Therapie festgestellt werden. Es wuchsen dabei nur solche Tumore, die Mutationen im Tumorantigen aufwiesen (Bai et al. 2003). Diese Art von Tumor-*Escape*-Mechanismus entsteht in verschiedenen Mausmodellen erst nach der erfolgreichen Immunotherapie.

Veränderung in den Signalkaskaden von Apoptose-induzierenden Rezeptoren mit Todesdomäne ermöglichen Tumoren Überleben und Proliferation. So exprimieren viele Tumore CFLAR (siehe 1.2.2), welches die Caspase 8 des APO-1/APT1LG1 (FAS/FASL)-Signalweges hemmt, wodurch die Apoptose durch die Tumorzellen umgangen werden kann (Salvesen und Dixit 1999, Irmeler et al. 1997). Bei Melanomen kann es durch unterschiedliche Mutationen zu einem Expressionsverlust aller TRAIL-Rezeptoren kommen, und somit die Induktion der Apoptose erfolgreich verhindert werden (Hersey und Zhang 2001).

Tumorzellen produzieren einige Zytokine und Chemokine, die einen immunsuppressiven Effekt auf Immunzellen ausüben können. In Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom konnten hohe Expressionswerte von IL4, IL10, TGF α und TGF β im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Li et al. 2003). Hohe Konzentrationen an IL10 konnten auch in Melanomen (Fortis et al. 1996) und Pankreaskarzinomen (Bellone et al. 1999, Mukherjee et al. 2001) nachgewiesen werden. Die Konzentration an TGF β ist höher bei Patienten mit metastasierendem Melanom als bei solchen mit einem lokalen Tumor (Krasagakis et al. 1998).

Die Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO - *indoleamine 2,3-dioxygenase*) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Tryptophanstoffwechsels. Es ist bekannt, dass manche Tumore IDO unter bestimmten Bedingungen exprimieren können. Niedrige Tryptophankonzentrationen in der näheren Umgebung des Tumors führen dort zu einem T-Zell-Arrest in der G1 Phase des Zellzyklus (Uyttenhove et al. 2003). Im humanen System existiert eine kleine Gruppe an APC, die ebenfalls IDO exprimieren und *in vitro* die Proliferation von T-Zellen hemmen (Munn et al. 2002).

1.5.3 Hinweise auf natürliche Anti-Tumor-Reaktivitäten und deren Nutzung als gezielte Immunstimulationsstrategien

Neben den Standardtherapieverfahren, Entfernung des Tumors mit anschließender Chemotherapie oder Bestrahlung, wird seit einiger Zeit auch die immunologische Tumorthherapie als eine mögliche Behandlungsstrategie näher untersucht. Dabei wird versucht Immundefizite in der Antigenpräsentation und T-Zell-Antwort zu beheben, immunsuppressive Mechanismen des Tumors zu zerstören und beides klinisch umsetzbar einzusetzen.

Als eine Methode wird die Immuntherapie mit monoklonalen oder bispezifischen Antikörpern genutzt. Die Antikörper können dabei gegen Tumorantigene oder kostimulatorische Signale gerichtet sein. Bei bispezifischen Antikörpern kann die eine Antigenbindungsstelle an ein Tumorantigen und die andere an eine Effektorzelle (z. B. an T-Zellen mit anti-CD3 oder anti-CD28, an NK-Zellen mit anti-CD16) binden. Zurzeit werden verschiedene Antikörper bei der Therapie unterschiedlicher Tumorentitäten mit positiven Ergebnissen eingesetzt, z. B. Trastuzumab (anti-HER2/neu), Cetuximab (anti-*epidermal growth factor receptor*) und Rituximab (anti-CD20) (Pegram et al. 1998, Bianco et al. 2005, Smith 2003).

Eine weitere Möglichkeit, ist das Übertragen genetischen Materials auf Tumorzellen, um so ihre Immunogenität zu steigern. Dabei werden Gene von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD137), Zytokine (GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, IL2) oder Tumorsuppressorgene (p53) auf die Tumorzellen übertragen. Der Gentransfer des CD80-Moleküls führte zur Aktivierung tumoraktivierter T- und NK-Zellen (Li et al. 1996). Durch die Übertragung von GM-CSF kam es zum Wachstum und zur Differenzierung myelomonozytärer Zellen, die somit als potente APC dienen konnten (Ragnhammar 1996; Bendandi und Longo 1999). Die Transfektion von IL2 induzierte eine ansteigende Proliferation und Differenzierung tumorreaktiver T- und NK-Zellen (Staege et al. 2004a).

Der Einsatz von DC als Tumor-Vakzine stellt eine weitere Strategie in der Tumorimmuntherapie dar. Dabei werden die DC entweder mit tumorspezifischen Peptiden oder Tumorlysat beladen. Eine weitere Möglichkeit ist die Transfektion der DC mit tumorspezifischer RNA, um sie somit Tumorantigene exprimieren zu lassen. Viele dieser Versuche führten zu einer Regression des Tumors (Nestle et

al. 1998, Rosenberg et al. 1998). Ein vollständiges Verschwinden des Tumors konnte mit dieser Methode aber selten erreicht werden (Lee et al. 1999, Panelli et al. 2000).

Die Nutzung antigenspezifischer T-Zellen ist eine weitere Strategie der zellulären Tumorthherapie. Hierbei wird die Fähigkeit der T-Zellen genutzt, nach einer Antigenerkennung zu Effektorzellen auszureifen und antigentragende Zellen zu zerstören. Auf diese Weise ist es möglich ein fortschreitendes Tumorstadium zu verhindern und sogar eine Tumorerstörung zu erreichen (Burdach et al. 2000).

Eine weitere Methode der zellulären Immuntherapie ist das Erzeugen von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen). Dazu werden periphere mononukleäre Zellen des Patienten entnommen und für einige Zeit mit IL2 inkubiert (Dudley et al. 2001). Die erzeugten LAK-Zellen werden dann dem Patienten mit einer gleichzeitigen Gabe von IL2 zurückgegeben. Die so generierte Zytotoxizität gegen den Tumor ist eine NK-Zell-abhängige Reaktion.

Eine stärkere Zytotoxizität weisen tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) auf. Mithilfe von IL2 aus Lymphozyten des Tumorgewebes generiert, sind sie befähigt den Tumor zu zerstören und zur Bildung von Gedächtniszellen beizutragen (Fleuren et al. 1995). Die Generierung ausreichender Zellmengen ist jedoch sehr schwierig, außerdem führen die eingesetzten IL2-Mengen zu starken zytotoxischen Nebenwirkungen.

Es werden seit einiger Zeit Zytokine als zusätzliche Mittel eingesetzt, da sie wichtige Faktoren für Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von Zellen sind, und auch regulierend in Stärke und Art der Immunantwort eingreifen. Als eines der für die T-Zell-Antwort nötigen Zytokine gilt IL2. Es wird normalerweise von aktivierten T-Zellen gebildet und führt zur Stimulation von NK-Zellen und CTL. IL2 wird zum therapeutischen Einsatz entweder allein oder in Kombination mit einem adoptiven Zelltransfer genutzt (Bronte et al. 1995, McLaughlin et al. 1996). Die bis jetzt erzielten Erfolge waren eher limitiert, da IL2 in hohen Dosen eingesetzt werden muss, und es so zu starken Nebenwirkungen kommt. Neben IL2 wird auch IL12 als ein weiteres Interleukin in der Immuntherapie eingesetzt (Brunda et al. 1993, Rao et al. 1996). Beim Einsatz von GM-CSF konnte eine Verstärkung der antigenspezifischen T-Zell-Antwort induziert werden (Disis et al. 1996). GM-CSF kann auch die Expansion und Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen

induzieren und somit die Tumorimmunität steigern (Ragnhammar et al. 1996, Burdach et al. 1991).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte mithilfe zellbiologischer und molekularbiologischer Methoden der Einfluss der kostimulatorischen Moleküle CD137 und CD137L während der T-Zell-Immunantwort näher analysiert werden.

Zur Charakterisierung des kostimulatorischen Einflusses von CD137 auf die Aktivierung von T-Zellen sollten mit Hilfe von DNA-Mikroarray-Analysen Genexpressionsprofile von T-Zellen nach CD137-Stimulation analysiert werden. Hierbei identifizierte differentiell exprimierte Gene sollten mit Mikroarray-unabhängigen Methoden weiter untersucht werden.

Ausgehend von der Beobachtung, dass in einem Tiermodell für die Immuntherapie des Ewing-Tumors in Anwesenheit CD137L-transgener Tumorzellen die von Interleukin-2 abhängige Expression des immunosuppressiven Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase unterdrückt wurde, sollte zugleich die Regulation und Funktion vonIDO in diesem Modell näher analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte verwendet.

DNA-Sequenziersystem	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Inkubatorschrank	Heraeus (Hanau)
Kryo-Einfrier-Kontainer	Nalgene (Rochester, NY, USA)
Lichtmikroskop (invers)	Carl Zeiss (Jena)
Mikroplatten-Leser	Bio-Rad Laboratories (München)
Neubauer-Zählkammer	LO Laboroptik (Friedrichsdorf)
pH-Elektrode	WTW (Weilheim)
Steril-Bank	Heraeus (Hanau)
Schüttelinkubator	Edmund Bühler (Tübingen)
Speed-Vac	Eppendorf (Hamburg)
Spektrometer	Beckman Instruments (Palo Alto, CA, USA)
Thermozykler	Eppendorf (Hamburg) Biometra (Göttingen)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Thermo-Rührer	IKA Labortechnik (Staufen)
UV-Transilluminator	Bio-Rad Laboratories (München)
Vortex	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waagen	Sartorius (Göttingen)
Zentrifugen	Heraeus (Hanau)
Zubehör Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories (München)

2.1.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Materialien verwendet.

Kryo-Einfrier-Röhrchen	Nalgene (Rochester, NY, USA)
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
	Brand (Wertheim)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
	Brand (Wertheim)
Ribonuklease-freie Gefäße	Eppendorf (Hamburg)
Zellkultureinsätze (Poren 0,02µm)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturflaschen/-platten	Nunc (Wiesbaden)
Zentrifugier-Röhrchen	Greiner (Nürtingen)
	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Phase Lock Gel Tubes	Eppendorf (Hamburg)

2.1.3 Chemikalien, *Kits* und Enzyme

2.1.3.1 Chemikalien und *Kits*

Alle verwendeten Chemikalien und *Kits* sind nachfolgend aufgelistet.

2 nd -Strand-Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Agar Agar	Serva (Heidelberg)
Agarose	PeQLab (Erlangen)
Antifoam	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumazetat	Ambion (Austin, TX, USA)
Aqua B. Braun	B. Braun Biotech (Melsungen)
Biotin-CTP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Biotin-UTP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Anti-Streptavidin-Antikörper	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Bovines Serumalbumin	Invitrogen (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
<i>CBA Hu Th1/Th2 Cytokine Kit II</i>	BD Bioscience (Heidelberg)
<i>Cell Line Nucleofector Kit V</i>	Amaxa biosystems (Köln)
<i>Cell Proliferation ELISA BrdU</i>	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Control Oligonucleotide B2</i>	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
DEPC-Wasser	Ambion (Austin, TX, USA)

DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>DNA Ladder 100bp</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Ligase (<i>E.coli</i>)	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Polymerase (<i>E.coli</i>)	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Probenpuffer (6x)	Fermentas (St. Leon-Rot)
DPBS	BioWhittaker™ Cambrex (Walkersville, USA)
MD,	
Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom AG (Berlin)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol (96%)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Eucaryotic Hybridization Controls</i>	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
fetales Kälberserum	Biochrom AG (Berlin)
Geneticin-Sulfat (G418)	PAA (Cölbe)
Glukose	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Serva (Heidelberg,)
Hering-Sperma-DNA	Promega (Mannheim)
Humanes Serum Albumin	Bayer (Wuppertal)
IFN γ	R&D Systems GmbH (Wiesbaden)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>jetPEI™ Transfection Reagent</i>	Qbiogene (Heidelberg)
Kaliumazetat	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	PAA (Cölbe)
Kalziumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>MEGAscript T7 Kit</i>	Ambion (Austin, USA)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumazetat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
MES	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Manganchlorid	Merck (Darmstadt)
MOPS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumazetat	Merck (Darmstadt)

Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Pancoll human	PAN-Biotech (Aidenbach)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Biochrom AG (Berlin)
Pepton	Merck (Darmstadt)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Phycoerythrin-Streptavidin</i>	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
<i>Proleukine</i>	Chiron (Amsterdam, Niederlande)
Rubidiumchlorid	Merck (Darmstadt)
RNaseZap [®]	Ambion (Austin, TX, USA)
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG (Berlin)
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Fermentas (St. Leon-Rot)
10mM dNTP Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
SDS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Simultest™ IMK Plus-Kit</i>	Becton Dickinson (Heidelberg)
SSPE (20x)	(Vervieres, Belgien)
<i>Superscript Choise System</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>SYBR[®]Green PCR Master Mix</i>	Qiagen (Hilden)
T7-(dT) ₂₄ -Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
TRIS/Azetat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TRIS-HCl	Roth (Karlsruhe)
TRIzol [®]	Invitrogen (Karlsruhe)
TriFast	PeQLab (Erlangen)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom AG (Berlin)
	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Tween20	Pierce Chemicals (Rockford, USA)

2.1.3.2 Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Die DNA-Polymerase (αTaq) für RT-PCR-Analysen stammte von Promega, die Reverse Transkriptase (Revert Aid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase) von Fermentas (St. Leon-Rot,

Deutschland). Die Ribonuklease wurde von Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) bezogen.

2.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien

Im Rahmen der folgenden Arbeit wurden folgende Bakterienstämme und Zelllinien eingesetzt.

2.1.4.1 Bakterienstämme

In allen mikrobiologischen Versuchen wurde mit *E.coli* XL1-Blue *Competent Cells* gearbeitet; bezogen von Stratagene (Heidelberg, Deutschland).

2.1.4.2 Zelllinien

Die Ewing-Tumor-Linien SK-N-MC (Biedler et al. 1973, Dunn et al. 1994, Staeger et al. 2004b), SK-ES1 (Bloom 1972) und TC-71 (Whang-Peng et al. 1986), die Neuroblastom-Linien SH-SY5Y (Biedler et al. 1973) und IMR-32 (Tumilowicz et al. 1970), die Hodgkin-Lymphom-Linien L-1236 (Wolf et al. 1996), L-540 (Diehl et al. 1981), HDLM-2 (Drexler et al. 1986) und KM-H2 (Kamesaki et al. 1986), die Burkitt-Lymphom-Linie Daudi (Klein et al. 1968, Nadkarin et al. 1969), die akute monozytische Leukämie-Linie THP1 (Tsuchiya et al. 1980), die chronische myeloide Leukämie-Linien K562 (Lozzio et al. 1973), die Fibrosarkom-Linie HT-1080 (Rasheed et al. 1974), die T-Zell-Leukämie-Linie Jurkat (Schneider et al. 1977) und die Zervixkarzinom-Linie HeLa (Scherer et al. 1953) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) bezogen. Die Ewing-Tumor-Linien A673 (Giard et al. 1973) und RD-ES (Sano et al. 1990, Staeger et al. 2003) wurden von der *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA) bezogen. Die Glioblastom-Linie U87-MG (Ponten und Macintyre 1968) wurde freundlicherweise von Herrn C. Kühnöl, Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität (MLU), zur Verfügung gestellt. Die akute myeloide Leukämie-Zelllinie HL-60 (Collins et al. 1977) wurden freundlicherweise von Herrn J.-U. Hartmann, Klinik für Innere Medizin IV der MLU, zur Verfügung gestellt. Die Schilddrüsenkarzinom-Linien HTh 74 (Heldin et al. 1991), 8505C (Ito et al. 1994), FTC-133 (Goretzki et al. 1989) und B-CPAP (Fabien et al. 1994) wurden freundlicherweise von Herrn T. Müller, Klinik für Innere Medizin IV der MLU, zur Verfügung gestellt. Die Ewing-Tumor-Linien STA-

ET8 (Zucman et al. 1993), TC-32 (Whang-Peng et al. 1986) und TTC-446 (Sorensen et al. 1994) wurden freundlicherweise von Herrn B. Schmiedel, Klinik für Kinder und Jugendmedizin der MLU, zur Verfügung gestellt. Die Melanome 518A2 (van Elsas et al. 1997) und 31IGR1 wurden freundlicherweise von Herrn J. Wohlrab, Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der MLU, zur Verfügung gestellt. Die Epstein-Barr-Virus-immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien LCL73, CSIII und A2+2310 wurden freundlicherweise von Herrn M. S. Staege, Klinik für Kinder und Jugendmedizin der MLU, zur Verfügung gestellt. Die transgenen Zelllinien SBVGA1 (Interleukin 2-transgen) und SBVGA3 (transfiziert mit Kontrollvektor) (Staege et al. 2003) wurden freundlicherweise von Herrn M. S. Staege, Klinik für Kinder und Jugendmedizin der MLU, zur Verfügung gestellt. Die für den Mausversuch genutzten CD137L-transgenen A673-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn J. Föll, Klinik für Kinder und Jugendmedizin der MLU, zur Verfügung gestellt. Die konditional Epstein-Barr-Virus-immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien EREB2-5 und P493-6 wurden freundlicherweise von Herrn G. Bornkamm und Herrn G. Laux, GSF München, zur Verfügung gestellt. Mesenchymale Stammzellen wurden freundlicherweise von Herrn L. Müller, Klinik für Innere Medizin IV der MLU, zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden mit Einwilligung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität von freiwilligen Spendern aus Rest-Blut (*Buffy coat*) isoliert. Die in dieser Arbeit untersuchten Tumore eines Xenotransplantationsmodell des Ewing-Tumors wurden freundlicherweise von Herrn C. Kühnöl, Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität (MLU), zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Vektoren und PCR-Primer

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Vektoren und PCR-Primer für die anschließenden Versuche verwendet.

2.1.5.1 Vektoren

pReceiver-M17a human CD137Ligand

GeneCopeia (Germantown, USA)

2.1.5.2 PCR-Primer

Die nachfolgende Übersicht enthält Angaben über Sequenz und Produktgröße der verwendeten Primer. Alle PCR-Primer wurden mit HPSF-Reinheit von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) oder Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2 Verwendete Primer-Kombinationen. Bei den Sequenzen erfolgte zunächst die Angabe des Vorwärts- und danach die des Rückwärtsprimers. In der Spalte Produkte sind die Produktgrößen in Basenpaaren (bp) angegeben.

Name	Sequenz (5' - 3'-Orientierung)	Produkte	PCR-Zyklen
β-Aktin	Vorwärtsprimer: ggcatcgtgatggactccg	613	22
	Rückwärtsprimer: gctggaaggtggacagcga		
CCL20	Vorwärtsprimer: ctctggctgctttgatgtc	204	30
	Rückwärtsprimer: tgcgcacacagacaactttt		
CTNND1	Vorwärtsprimer: cccaggatcacagtcacctt	581	30
	Rückwärtsprimer: cccataaggctctggatgaa		
IDO	Vorwärtsprimer: tcaaagcactgaaagacgctgc	400	27
	Rückwärtsprimer: cccctgacttatgagaacatgg		
IDO2	Vorwärtsprimer: attcctggaaattggaacc	486	40
	Rückwärtsprimer: gaaggccttatgggaaggag		
IL17F	Vorwärtsprimer: agcgcaacatgacagtgaag	345	30
	Rückwärtsprimer: ttcttgagcattgatgcag		
IL26	Vorwärtsprimer: tgagggtgggttgctgta	273	35
	Rückwärtsprimer: tgcagtgacaaaaacgctc		
KYNU	Vorwärtsprimer: gggaaattccttgcccttc	460	27
	Rückwärtsprimer: aaaaatgcaccccactgaac		
PBX1	Vorwärtsprimer: ggaagcaggacattggagac	400	35
	Rückwärtsprimer: caggcctgctctgatttctc		
EST (RAF1)	Vorwärtsprimer: cttcagccctgtccagtagc	385	27
	Rückwärtsprimer: gccaggtgtcctttgcat		
SLITRK3	Vorwärtsprimer: gtggttggtgatgtgcttg	360	40
	Rückwärtsprimer: ttgcatttggatgccagtaa		

2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Aqua dest. hergestellt. Puffer und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten, sowie für Zellkultur-Arbeiten wurden sterilfiltriert oder autoklaviert. Die Lagerung der Lösungen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

2.1.6.1 Lösungen für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

Ampicillin: 50mg/ml, Arbeitskonzentration 50µg/ml (4 °C).

5xFragmentierungspuffer: 200mM TRIS/Azetat eingestellt auf pH 8,1; 500mM Kaliumazetat, 150mM Magnesiumazetat, sterilfiltriert.

2xHybridisierungspuffer: 200mM MES, 2M MES-Natriumsalz, 40mM EDTA, 0,02% Tween20 (4 °C).

LB-Agarplatten: LB-Medium, 1,5% (w/v) Agar, Antibiotikum (4 °C).

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Natriumchlorid, eingestellt auf pH 7,0.

12xMES Lösung: 1,22M MES (2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure), 0,89M MES-Natriumsalz in Wasser eingestellt auf pH 6,5, sterilfiltriert (4 °C).

Präp-Lösung 1: 150mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl, eingestellt auf pH 8,0.

Präp-Lösung 2: 20,2M Natriumhydroxid, 1% SDS (möglichst frisch angesetzt).

Präp-Lösung 3: 33M Kaliumazetat, 11,5% (v/v) Eisessig (4 °C).

RF1-Puffer: 1,21% (w/v) Rubidiumchlorid, 0,99% (w/v) Manganchlorid, 0,29% (w/v) Kaliumazetat, 0,15% (w/v) Calciumchlorid, 15% Glycerin, eingestellt auf pH 5,8.

RF2-Puffer: 0,21% (w/v) MOPS, 0,12% (w/v) Rubidiumchlorid, 1,1% (w/v) Calciumchlorid, 15% Glycerin, eingestellt auf pH 6,8.

SOB-Medium: 4% (w/v) Trypton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 10mM Natriumchlorid, 2,5mM Kaliumchlorid, 10mM Magnesiumchlorid, 10mM Magnesiumsulfat, eingestellt auf pH 7,0.

2xStain Buffer: 200mM MES, 2M Natriumchlorid, 0,1% Tween20; sterilfiltriert, 0,01% Antifoam.

TAE-Puffer: 0,4M (w/v) Tris-HCl, 0,2M Essigsäure, 0,01M EDTA, eingestellt auf pH 8.

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl eingestellt auf pH 8,0, 1mM EDTA.

Waschpuffer A: 6xSSPE, 0,01% Tween20; sterilfiltriert.

Waschpuffer B: 100mM MES, 0,1M Natriumchlorid, 0,01% Tween20, sterilfiltriert.

2.1.6.2 Lösungen für Zellkultur-Arbeiten

RPMI-Komplettmedium RPMI 1640 + 10% FKS + 1% Pen/Strep.

DMEM-Komplettmedium DMEM + 10% FKS + 1% Pen/Strep.

Einfriermedium DMEM bzw. RPMI 1640 Komplettes Medium + 10% DMSO.

Geneticin-Sulfat (G418) 400mg/ml, Arbeitskonzentration 400µg/ml (4 °C).

IFN γ Arbeitskonzentration 500U/ml (-20 °C).

MACS-Puffer 0,5% BSA + 2mM EDTA + DPBS, pH 7,2.

Proleukine 18000U/ml; Arbeitskonzentration: 3000, 6000, 12000, 24000, 30000 und 48000U/ml (-20 °C).

2.1.7 Antikörper

Im Rahmen der folgenden Arbeit wurden Antikörper für FACS, MACS und weitere Stimulationen eingesetzt.

2.1.7.1 FACS-Antikörper

Die genutzten Antikörper wurden von der Firma BD Biosciences bezogen (Tabelle 3), sowie die Antikörperkombinationen des *Simultest™ IMK Plus-Kit* (Tabelle 4).

Tabelle 3 Verwendete Antikörper.

Name	Klon	Isotyp	Markierung
Isotyp-Kontrolle	G155-178	IgG _{2a,κ}	FITC
Isotyp-Kontrolle	MOPC-21	IgG _{1,κ}	FITC
Isotyp-Kontrolle	MOPC-21	IgG _{1,κ}	PE
CD3	HIT3a	IgG _{2a,κ}	FITC
CD14	MφP9	IgG _{2b,κ}	PE
CD137L	C65-458	IgG _{1,κ}	PE
CD45	HI30	IgG _{1,κ}	FITC
CD117	104D2	IgG _{1,κ}	PE

Tabelle 4 Verwendete Antikörperkombinationen.

Antikörperkombination	Name	Klon	Name	Klon
Isotyp-Kontrolle FITC/PE	IgG _{1,κ}	X40	IgG _{2a,κ}	X39
CD3 FITC / CD19 PE	CD3	SK7	CD19	4G7
CD3 FITC / CD16 + CD56 PE	CD3	SK7	CD16 + CD56	B73.1 + MY31

2.1.7.2 MACS-Antikörper

Für die magnetische Zellsortierung wurde der *Pan T Cell Isolation Kit II* (human) der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) eingesetzt. In ihm sind biotinylierte Antikörper gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, Glycophorin A und Anti-Biotin Magnetkügelchen enthalten. Die Isolation der hoch reinen T-Zellen erfolgte durch Depletion der magnetisch markierten Zellen.

2.1.7.3 Sonstige Antikörper

α-human CD137 (26G6) freundliche Gabe von J. Föll (MLU, Halle).

α-human CD3 (OKT3) Janssen-Cilag (Neuss).

Ratte IgG1, Isotyp R&D Systems GmbH (Wiesbaden).

α -human IFN γ	R&D Systems GmbH (Wiesbaden).
α -human CD137	Arbeitskonzentration 10 μ g/ml; entweder über Nacht bei 4 °C oder für 4h bei 37 °C in 6-Loch-Platten vorinkubiert.
Isotyp IgG1	Arbeitskonzentration 10 μ g/ml; entweder über Nacht bei 4 °C oder für 4h bei 37 °C in 6-Loch-Platten vorinkubiert.
α -human CD3	Arbeitskonzentration 20ng/ml; entweder über Nacht bei 4 °C oder für 4h bei 37 °C in 6-Loch-Platten vorinkubiert.
α -human IFN γ	Arbeitskonzentration 1 μ g/ml in Medium gegeben.

2.1.8 Mikroarray-Datensätze

Zusätzlich zu im eigenen Labor gewonnenen Datensätzen wurden folgende publizierte Datensätze aus der Mikroarray-Datenbank GEO (Barrett et al. 2006) analysiert:

Tabelle 5 In den Analysen verwendete Mikroarray-Datensätze.

GEO-Nummer	Proben (Anzahl)	Referenz
GSE1133	CD56 positive NK-Zellen (2)	(Su et al. 2004)
GSE1133	CD8 positive T-Zellen (2)	(Su et al. 2004)
GSE7138	CD14 positive Monozyten (2)	(Cho et al. 2007)
GSE1133	CD14 positive Monozyten (2)	(Su et al. 2004)
GSE1133	CD4 positive T-Zellen (2)	(Su et al. 2004)
GSE473	CD4 positive T-Zellen (10)	(Hansel et al. 2008)
GSE1133	CD33 positive myeloide Zellen (2)	(Su et al. 2004)
GSE6691	CD19 positive B-Zellen (8)	(Gutierrez et al. 2007)
GSE1133	CD19 positive B-Zellen (2)	(Su et al. 2004)
GSE1133	CD71 positive Zellen (2)	(Su et al. 2004)
GSE1133	CD105 positive Zellen (2)	(Su et al. 2004)
GSE6691	CD38 positive Plasmazellen (6)	(Gutierrez et al. 2007)
GSE7138	CD14 positive Makrophagen (4)	(Cho et al. 2007)
GSE6477	CD138 positive B-Zellen (12)	(Chng et al. 2007)
GSE2361	Sammlung normaler Gewebe (36)	(Ge et al. 2005)
GSE2248	embryonale Stammzellen (3)	(Barberi et al. 2005)
GSE3788	hämatopoetische Stammzellen (3)	(Perez-Iratxeta et al. 2005)
GSE2638	humane mikrovaskuläre Endothelzellen (3)	(Viemann et al. 2006)
GSE2638	humane venöse Nabelschnurendothelzellen (3)	(Viemann et al. 2006)
GSE6029	mesenchymale Stammzellen (9)	(Markov et al. 2007)
GSE2248	mesenchymale Stammzellen (aus ESC differenziert) (2)	(Barberi et al. 2005)
GSE1133	unterschiedliche Proben des Hodens (10)	(Su et al. 2004)
GSE9499	lymphoblastoide Zellen (15)	(Jin et al. 2008)
GSE8388	Hodgkin-Lymphomzelllinien (6)	(Ehlers et al. 2008)
GSE6184	Anaplastisch großzellige Lymphomzelllinien (9)	(Piva et al. 2006)
GSE7007	verschiedene Ewing-Tumor-Proben (38)	(Tirode et al. 2007)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von RNA aus Kulturzellen

Bei Arbeiten mit RNA wurden Arbeitsfläche und Pipetten mit RNaseZap[®] behandelt. Es kamen gestopfte und steril verpackte Pipettenspitzen zum Einsatz. Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Zellen geerntet und 10 Minuten bei 200g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1ml TRIzol[®]- oder Trifast-Reagenz resuspendiert und mit Hilfe einer Spritze homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden 10 Minuten bei 12000g, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 0,2ml Chloroform versetzt und 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die wässrige und die organische Phase durch Zentrifugation (12000g, 15 Minuten, 4°C) getrennt. Die obere wässrige Phase, RNA enthaltend, wurde abgenommen, mit 0,5ml Isopropanol versetzt, gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte RNA konnte dann pelletiert werden (12000g, 10 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde abschließend mit kaltem 80%igem Ethanol gewaschen (7500g, 5 Minuten, 4°C zentrifugieren) und getrocknet. Die RNA wurde in 30µl DEPC-Wasser (µl variierten je nach Pelletgröße) aufgenommen. Um die erhaltene RNA vollständig zu lösen wurde sie für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA bestimmt (2.2.2).

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei den Wellenlängen von 260 und 280nm (als Referenz diente hierbei Wasser). Ein OD₂₆₀-Wert von 1, bei einer Küvettentiefe von 10mm, entspricht einer Konzentration von 40µg/ml RNA oder 50µg/ml DNA. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ steht für die Reinheit der Nukleinsäuren (zwischen 1,5 und 2,0). Für die Isolation von RNA mit TRIzol[®] oder Trifast (2.1.3.1) wurde ein Wert zwischen 1,5 und 1,7 als akzeptabel angesehen.

2.2.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Für die Reverse Transkription (RT) wurden 2µg RNA (2.2.2) in 13µl DEPC Wasser gelöst. Zu dieser wurden 7µl Master-Mix hinzu gegeben und der Ansatz dann zur Synthese der cDNA für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde anschließend für 5 Minuten auf 90°C erhitzt.

Master-Mix:

5xFirst Strand Puffer	4µl
10mM dNTP Mix	1µl
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	1µl
Reverse Transkriptase	1µl

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Analyse der Genexpression eingesetzt. Standardmäßig wurden dazu 25µl Ansätze mit aTaq-Polymerase verwendet. Alle PCR wurden mit einer einmaligen Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C gestartet (Schritt 1). Die Schritte 2 bis 4 wurden je nach Primerkombination 22- bis 35-mal wiederholt. Hierbei entsprachen Schritt 2 (Denaturierung) 30 Sekunden bei 95°C, Schritt 3 (Primer-Anlagerung) 30 Sekunden bei 60°C und Schritt 4 (Elongation) 30 Sekunden bei 72°C. Im Anschluss an den letzten Zyklus wurde für 5 Minuten bei der Elongationstemperatur von 72°C inkubiert, bevor bis zur Weiterbearbeitung auf 4°C abgekühlt wurde.

Standard-PCR-Master-Mix:

10xPCR-Puffer	2,5µl
25mM Magnesiumchlorid	1,5µl
10mM dNTP Mix	0,5µl
Vorwärtsprimer (25µM)	0,25µl
Rückwärtsprimer (25µM)	0,25µl
Taq (5U/µl)	0,2µl
Wasser	ad 25µl

Im Falle von IDO2 wurde, um die Sensitivität der RT-PCR zu erhöhen, eine zweite PCR durchgeführt. Dabei wurden für die zweite, sich anschließende PCR, 2µl der

ersten als Template genutzt. Die oben genannten Bedingungen für die RT-PCR wurden beibehalten.

2.2.5 Quantitative PCR

Die quantitative RT-PCR wurde für die Genexpressionsanalyse zur Quantifizierung der gewonnenen cDNA eingesetzt. Durchgeführt wurde die Reaktion mit Hilfe des *SYBR[®]Green PCR Master Mix* und erfolgte nach Herstellerangaben. Die Reaktion erfolgte im Rotor Gene RG-3000 (Firma Corbett Research). Alle quantitativen RT-PCR wurden mit einer einmaligen Denaturierung für 15 Minuten bei 95°C gestartet. Die Schritte 2 bis 4 wurden 40-mal wiederholt. Hierbei entsprachen Schritt 2 (Denaturierung) 30 Sekunden bei 95°C, Schritt 3 (Annealing) 30 Sekunden bei 60°C und Schritt 4 (Elongation) 45 Sekunden bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurde für 5 Minuten bei der Elongationstemperatur von 72°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse von 65°C bis 95°C, wobei eine Erhöhung der Temperatur um 0,5°C je Schritt erfolgte.

Standard-Master-Mix für die quantitative PCR:

2xSYBR Green PCR MIX	10µl
Vorwärtsprimer (25µM)	1µl
Rückwärtsprimer (25µM)	1µl
Wasser	ad 20µl

Zur Berechnung wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach Livak und Schmittgen eingesetzt (Livak und Schmittgen 2001). Als Referenzgen wurde β -Aktin für jede Probe mitgeführt. Für jede Probe wurde der Ct-Wert ermittelt, der dem Zyklus der PCR entsprach, bei dem erstmals die Fluoreszenz über einen festgelegten Basiswert ansteigt. Zur Berechnung wurden nun der Ct-Wert für β -Aktin vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen (= ΔCt -Wert). Anschließend wurden von diesen ΔCt -Werten jeweils die ΔCt -Werte der Referenzprobe abgezogen (= $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert). Die Berechnung der relativen Expression fc (*fold change*) erfolgte dann gemäß der Formel $fc=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde im Normalfall mit einer Agarosekonzentration von 1,5% durchgeführt. Bei DNA-Fragmenten spezieller Größen variierte die Konzentration zwischen 1% und 2%, um eine optimale Auftrennung im gewünschten Größenbereich zu erreichen.

Zur Herstellung eines Gels wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer aufgekocht, kurz abgekühlt und mit Ethidiumbromid (0,7µg/ml Gel) versetzt. Die DNA-Proben wurden in 6xDNA-Probenpuffer aufgenommen und im Agarosegel mit 5V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.7 Genexpressionsanalysen

2.2.7.1 Präparation von Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte wie unter 2.2.1 Die RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung (2.2.2) einer weiteren Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Als Puffer für Lauf und Herstellung des Geles wurde RNase-freier 1xMOPS eingesetzt. Auf das Gel wurde je Ansatz 1µg RNA auf das Gel geladen.

2.2.7.2 Erst-Strang cDNA-Synthese

Die RNA wurde auf mit RNase-freiem Wasser 10µg/10µl eingestellt. Für die Primer-Hybridisierung wurde 1µl T7-(dT)₂₄-Primer zu jedem 10µl Ansatz gegeben, dieser für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, anschließend 5 Sekunden zentrifugiert und für 2 Minuten auf Eis gestellt. Für die Erst-Strang-Synthese, in der an die vorhandene RNA ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird, wurde das *Superscript Choice System* verwendet.

Ansatz:

RNA hybridisiert mit Primer	11µl
5x1st-Strand-Buffer	4µl
0,1M DTT	2µl
10mM dNTP	1µl

Dieser Ansatz wurde für 2 Minuten bei 37°C inkubiert und nach anschließender Zugabe von 2µl Superscript RT II wurde der Ansatz für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.7.3 Zweit-Strang-Synthese

In der Zweit-Strang-Synthese wird aus dem cDNA-Strang ein DNA-Doppelstrang gebildet, wobei der ursprüngliche RNA-Strang abgebaut wird.

Syntheseansatz:

5x2nd-Strand-Buffer	30µl
10mM dNTP	3µl
<i>E. coli</i> DNA-Ligase (10u/µl)	1µl
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (10u/µl)	4µl
RnaseH (2u/µl)	1µl
DEPC-Wasser	91µl
Ansatz der Erst-Strang-Synthese	20µl

Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 16°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 10µl 0,5M EDTA (auf Eis) gestoppt.

2.2.7.4 Phenol-Chloroform-Extraktion der cDNA

Über eine Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die doppelsträngige DNA aus dem Syntheseansatz aufgereinigt. Dazu wurden Phase Lock Gel Tubes (erleichtert Phasentrennung) für 1 Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der komplette Ansatz der Zweit-Strang-Synthese wurde in die so vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 160µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurde der Ansatz kurz geschüttelt und für 2 Minuten bei 12000g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gleiche Menge 5M Ammoniumazetat zugegeben. Nach Zugabe von 2,5 Volumenteilen kaltem 96% Ethanol wurde der Ansatz kurz gemischt und für 30 Minuten bei 12000g bei 16°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgte ein Waschschrift (2-mal) mit 500µl kaltem 80% Ethanol und eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000g und 16°C. Die DNA wurde getrocknet und in 3µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.2.7.5 *In-vitro*-Transkription

Bei der nun folgenden *in-vitro*-Transkription (IVT) wurde die doppelsträngige DNA wieder in RNA umgeschrieben. Die IVT wurde mit dem *MEGAscript T7 Kit* erzeugt.

Ansatz:

75mM ATP	2µl
75mM GTP	2µl
75mM CTP	1,5µl
75mM UTP	1,5µl
10mM Biotin-CTP	3,75µl
10mM Biotin-UTP	3,75µl
10 x Puffer-Mix	2µl
T7 Enzym	2µl

Zum Ansatz wurden 1,5µl der frisch hergestellten und gereinigten cDNA (2.2.7.4) gegeben und anschließend das Ganze für 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.7.6 *Aufreinigung der IVT-Produkte*

Zur Aufreinigung der erzeugten IVT-Produkte wurde das *RNeasy Mini Kit* verwendet. Das Volumen der Probe wurde mit DEPC-Wasser auf 100µl aufgefüllt und die Probe nach Vorschrift des Herstellers aufgearbeitet. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die präparierte RNA wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen (Konzentrationsbestimmung 2.2.2; Agarose-Gelelektrophorese 2.2.6).

2.2.7.7 *Fragmentierung der cRNA*

Durch die Fragmentierung der RNA werden Fragmente mit einer Größe von 35 bis 200bp gebildet. Diese ermöglichen eine bessere Hybridisierung auf den Mikroarrays als große Fragmente.

Fragmentierungsansatz:

16µg cRNA	in maximal 16µl
5xFragmentierungspuffers	4µl

Die Reaktion wurde für 35 Minuten bei 95°C inkubiert. Um Kondenswasser im Reaktionsgefäß zu sammeln, wurde die Probe für 10 Sekunden zentrifugiert und

bis zur anschließenden Hybridisierung auf Eis aufbewahrt. Die präparierte RNA wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen (Agarose-Gelelektrophorese 2.2.6).

2.2.7.8 Eigenschaften der verwendeten Mikroarrays

Der Affymetrix Genechip Human Genom U133 Plus 2.0 (HG U133Plus 2.0) detektiert mit seinen ca. 54.000 SONDENSÄTZEN über 47.000 bekannte Transkripte. Die Sequenzen, auf denen die Sonden beruhen, entstammen der *UniGene Database* (Build 133, 20.04.2001) und wurden zusätzlich mit Daten aus zwei weiteren, öffentlich zugänglichen Datenbanken ergänzt (*Washington University EST Trace Repository* und *University of California, Santa Cruz Golden Path Human Genome Database*).

2.2.7.9 Hybridisierung

Die Arrays wurden vor der Bearbeitung auf Raumtemperatur vorgewärmt, mit 200µl des 1×Hybridisierungspuffers befüllt und für 10 Minuten bei 45°C unter Rotation im Hybridisierungssofen präinkubiert. Die fragmentierte RNA wurde für 2 Minuten bei 65°C erhitzt.

Hybridisierungslösung:

15µg fragmentierte RNA (2.2.7.7)	20µl
20x <i>Eucaryotic Hybridization Controls</i>	15µl
3nM <i>Control Oligonucleotide B2</i>	5µl
10mg/ml Hering-Sperma-DNA	3µl
50mg/ml acetyliertes Bovines Serumalbumin	3µl
2×Hybridisierungspuffer	150µl
DEPC-Wasser	104µl

Die Hybridisierungslösung wurde für 5 Minuten bei 99°C und anschließend für 5 Minuten bei 45°C erhitzt. Vor der Inkubation auf den Arrays wurde die Hybridisierungslösung für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Nach Entnahme des Puffers wurden die Arrays mit 200µl der Hybridisierungslösung befüllt und im Hybridisierungssofen für 16 Stunden bei 45°C inkubiert.

2.2.7.10 Waschen und Färben der Mikroarrays

Nach der Inkubation wurde die Hybridisierungslösung entnommen und die Arrays mit 200µl Waschpuffer A befüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Antikörperlösung:

2xStain Buffer	300µl
50mg/ml acetyliertes Bovines Serumalbumin	24µl
10mg/ml <i>normal goat IgG</i>	6µl
0,5mg/ml biotinylierter Antikörper	3,6µl
DEPC-Wasser	266,4µl

SAPE-Lösung:

2xStain Buffer	600µl
50mg/ml acetyliertes Bovines Serumalbumin	48µl
1mg/ml Streptavidin-Phycoerythrin	12µl
DEPC-Wasser	540µl

In der *Fluidics*-Station des Systems wurden die hybridisierten Arrays mit Waschpuffer A und Waschpuffer B gewaschen. Dann mit der SAPE-Lösung und anschließend mit der Antikörperlösung inkubiert. Automatisch erfolgt ein weiteres Waschen mit den beiden Lösungen Waschpuffer A und Waschpuffer B (Waschprogramm EukGE-WS1).

2.2.7.11 Mikroarray-Scan

Die fertigen Arrays wurden bei 570nm (Anregungswellenlänge 488nm) mit einer Wiederholung gescannt. Die gemessenen Lichtintensitäten aus beiden Bildern wurden automatisch pro Pixel gemittelt und das endgültige Bild des Arrays gespeichert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Vorarbeiten für Vermehrung des Vektors

Um eine erfolgreiche Vermehrung des Vektors *pReceiver-M17a human CD137Ligand* durchführen zu können, waren folgende Vorarbeiten notwendig.

2.3.1.1 Herstellen Hitzeschock-kompetenter *E.coli* XL1-Blue

E.coli XL1-Blue wurden in einer Vorkultur über Nacht bei 37°C schüttelnd in SOB-Medium herangezogen. Es wurde am nächsten Morgen eine Messung der optischen Dichte (OD) bei 600nm durchgeführt und daraus resultierend die Zellen mit einer Anfangs-OD von 0,05 zu 100ml frischem SOB-Medium gegeben. Die Zellen wurden dann bis zu einer OD von 0,3 bis 0,5 wachsen gelassen und anschließend für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 2500g für 15 Minuten und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 33ml eiskaltem RF1 resuspendiert und das Ganze erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 2500g für 15 Minuten und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und alles in 8ml eiskaltem RF2 resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in 100µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden dann bis zur Nutzung bei -80°C gelagert.

2.3.2 Transformation und Vorkultur

Hitzeschock-kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 10ng Vektor erfolgte eine Inkubation der Zellen für 20-30 Minuten auf Eis. Dann wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden und eine Inkubation auf Eis für 5 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden 900µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Eine Selektion erfolgte durch Ausstreichen des Ansatzes auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten.

Zur Überprüfung der Klone wurden diese in einer Vorkultur über Nacht (5ml LB-Medium und entsprechende Menge Antibiotikum) herangezogen.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Plasmid Präparation)

Für beide Präparationsarten wurden die gleichen Lösungen verwendet.

2.3.3.1 Mini-Plasmid Präparation

Es wurden 2ml der Vorkultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und 3 Minuten bei 4000g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 100µl Präp-Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Präp-Lösung 2 wurde alles durch Invertieren vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200µl Präp-Lösung 3 zugegeben und der Ansatz für mindestens 5 Minuten auf Eis gelagert. Dies wurde dann für 10 Minuten bei 16000g und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 400µl Isopropanol versetzt. Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 16000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA mit 500µl 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 16000g und 4°C wurde der Überstand vollständig abgenommen. Die Plasmid-DNA wurde für 10 Minuten getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 50µl TE-Puffer für 30 Minuten bei 37°C gelöst. Dabei dienten 2µl Ribonuklease/ml TE dem RNA-Abbau.

2.3.3.2 Maxi-Plasmid Präparation

Die restlichen 3ml der Vorkultur wurden für die Maxi-Plasmid Präparation in 100ml frisches LB mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das Material wurde dann für 15 Minuten bei 2100g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in insgesamt 5ml Präp-Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10ml Präp-Lösung 2 wurde durch Invertieren vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 7,5ml Präp-Lösung 3 zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 2100g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Glastrichter und Kimberly-Clark-Tuch gefiltert und die Lösung mit 12ml Isopropanol versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 20 Minuten bei 2100g und 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Plasmid-DNA mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen und dazu für 10 Minuten bei 2100g und 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanoles wurde die Plasmid-DNA getrocknet und anschließend in etwa 2ml TE-Puffer aufgenommen. Die vollständige Lösung und der RNA-Abbau (mit Zusatz von 2µl Ribonuklease/ml TE) erfolgte für 30 Minuten bei 37°C.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 95% und 5% Kohlendioxidgehalt kultiviert. Adhärenente Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen und durch 1xTrypsin/EDTA-Lösung (Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur) gelöst. Adhärenente Zellen wurden im Verhältnis 1:8 bis 1:13 umgesetzt (je nach Konfluenz). Suspensionszellen wurden 1:3 bis 1:5 in frisches Medium umgesetzt. Das Umsetzen der Zellen in frisches Medium erfolgte alle 3 Tage.

2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Es wurden je 10µl der Zellsuspension verdünnt mit Trypanblau auf ein Zählkreuz unter das Deckgläschen pipettiert und 16 Kleinquadrante ausgezählt. Die Zellzahl ergab sich aus:

$$\text{Anzahl gezählter Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$$

2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen geerntet und für 10 Minuten bei 200g zentrifugiert. Mit einer Dichte von 10^7 Zellen/ml in vorgekühlten Einfriermedium (2.1.6.2) resuspendiert und bei -80°C eingefroren, dann dort gelagert oder zur dauerhaften Einlagerung auf flüssigen Stickstoff überführt.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen direkt in 10ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert und für 10 Minuten bei 200g zentrifugiert. Die Zellen wurden dann direkt in frisches Kulturmedium gegeben.

2.4.4 Experimentelle Ansätze mit Zellkultureinsätzen

In diesem experimentellen Ansatz wurden die Zellen zwar räumlich voneinander getrennt, um separat geerntet werden zu können, aber die benutzten Zellkultureinsätze mit einer Porengröße von 0,02µm ermöglichen eine Kultivierung unter gleichen Mediumbedingungen. Die Zellen wurden hier in 4ml Medium in einem Loch einer 6-Loch-Platte kultiviert. Eingesetzt wurden im Zellkultureinsatz A673-Zellen mit 5×10^5 Zellen. Im unteren Bereich wurden 5×10^5 Zellen der mit Kontrollvektor oder IL2 transfizierten A673-Zellen eingesetzt und dazu 2×10^6 HLA-passende PBMC. Die Zellen wurden entweder nur in Medium kultiviert oder in der Anwesenheit vom Antikörper gegen CD137. Dieser wurde entweder über Nacht bei 4°C mit einer Konzentration von 10µg/ml in DPBS an die 6-Loch-Platte gebunden, oder die Bindung des Antikörpers erfolgte für 4h bei 37°C. Danach wurde die 6-Loch-Platte einmal mit DPBS gespült und dann die Zellen ausgesät. Für die Titration von *Proleukine* (Ersatz für IL2) wurden in die einzelnen Ansätze eine Konzentration von 3000 U/ml bis zu 48000 U/ml *Proleukine* zugesetzt. Die Zellen wurden für 3 Tage kultiviert: Im Anschluß wurden die A673-Zellen geerntet und ihr RNA isoliert. Ebenfalls geerntet wurde der Zellkulturüberstand, für 10 Minuten bei 200g zentrifugiert um mögliche Zellreste zu entfernen und dann bei -20°C aufbewahrt, bis zur Analyse mit dem *CBA-Assay* (Material und Methoden 2.5.4).

2.4.5 Kultivierung der T-Zellen für DNA-Mikroarray-Analyse

Nach Isolation der PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation (Material und Methoden 2.4.7) aus frischem Blut wurden aus ihnen durch MACS-Aufreinigung (Material und Methoden 2.5.2) mit dem *Pan T Cell Isolation Kit II (human)* T-Zellen isoliert. Sie wurden anschließend unterschiedlich stimuliert. So wurden die Zellen in normalem RPMI-Komplettmedium, zusammen mit einem Antikörper gegen CD3 (20ng/ml über Nacht bei 4°C an Platte gebunden), mit einem Antikörper gegen CD3 (20ng/ml über Nacht bei 4°C an Platte gebunden) und einem Kontroll-Antikörper (10µg/ml über Nacht bei 4°C an Platte gebunden) oder mit einem Antikörper gegen CD3 (20ng/ml über Nacht bei 4°C an Platte gebunden) und dem Antikörper gegen CD137 (10µg/ml über Nacht bei 4°C an Platte gebunden)

kultiviert. Nach der Inkubation der Antikörper über Nacht, wurde die Lösung aus den Löchern entfernt und diese mit PBS gespült. Anschließend wurden die T-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) für 3 Tage unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen in der vorbereiteten 24-Loch-Platte kultiviert.

2.4.6 Transfektion von Kulturzellen mit *jetPEI™ Transfection Reagent*

Für die Transfektion wurden adhärente Zellen 24 Stunden vorher ausplattiert. Es wurden 300.000 Zellen mit 4µg DNA transfiziert. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.7 Isolation von Lymphozyten über Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden die Lymphozyten entweder aus peripherem Blut oder Rest-Blut-Schichten isoliert. Es wurde in den Leucosep[®]Röhrchen 15ml des Separationsmediums Pancoll vorgelegt, und dann bei 1000g für 30 Sekunden zentrifugiert, so dass sich dieses unter der Trennscheibe befand. Vorsichtig wurde nun das Probenmaterial in das Röhrchen gegeben. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1000g für 10 Minuten im Ausschwingrotor ohne Bremse. Die erhaltene Interphase aus Lymphozyten wurde dann mit einer Pasteurpipette abgenommen und anschließend mit DPBS gewaschen (2-mal) und wenn nötig mit Lysepuffer bearbeitet. Die Zellen wurden in 50ml DPBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Lymphozyten wurden entweder direkt frisch für Experimente eingesetzt, oder in Aliquots mit 3 bis 5×10^7 Zellen eingefroren.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 FACS-Analyse (*fluorescence activated cell scanning*)

Durch die FACS-Analyse ergibt sich die Möglichkeit Zellen in einem Ansatz auf unterschiedliche Eigenschaften zu untersuchen. So kann die Größe der Zellen (FSC), ihre Granularität (SSC) und weitere unterschiedliche individuelle Eigen-

schaften durch Anfärben mit markierten (z. B. FITC, PE) Antikörpern gezeigt werden. Um solche Untersuchungen durchführen zu können, wurden die Zellen in DPBS resuspendiert, anschließend für 10 Minuten bei 200g zentrifugiert und mit einer Zellzahl von 1×10^6 je Ansatz und 100µl genutzt. Nun konnte die Markierung der Zellen mit 10µl eines jeden Antikörpers erfolgen. Die Zellen wurden dann für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und dann mit 1ml DPBS für 10 Minuten bei 200g gewaschen. Um die Zellen im FACS messen zu können, wurden sie dann erneut in 1ml DPBS resuspendiert.

2.5.2 MACS (*magnetic cell sorting*)

Es wurde der *Pan T Cell Isolation Kit II (human)* der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) eingesetzt. In ihm sind biotinylierte Antikörper gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, Glycophorin A und Anti-Biotin Magnetkügelchen enthalten. Die Isolation der hoch reinen T-Zellen erfolgte durch Depletion der magnetisch markierten Zellen.

Dazu wurden die PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation (2.4.7) aus frischem Blut isoliert, die Zellzahl bestimmt und diese dann in MACS-Puffer resuspendiert. Die Isolation der T-Zellen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Trennung der Zellen wurde eine LS-Säule eingesetzt. Die erfolgreiche Separation und Reinheit der T-Zellen wurde durch eine FACS-Analyse (2.5.1) veranschaulicht.

2.5.3 Proliferationstest

Die Bestimmung der Proliferation erfolgte mit dem *Cell Proliferation ELISA BrdU* der Firma Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Hierbei wird die Neusynthese von DNA als direkter Ausdruck der proliferativen Aktivität bestimmt. Diese Methode wurde als Alternative zum Proliferationsassays mit [3H]Thymidin entwickelt. Wie dieser beruht auch der BrdU-Assay auf dem Einbau eines markierten Nukleotids, das über nachgeschaltete Reaktionen messbar gemacht wird. Der entstehende Farbstoff und die daraus folgende Absorption sind nach Abzug des Leerwertes proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen in der jeweiligen Kultur. Der Ablauf des *Cell Proliferation ELISA BrdU* erfolgte nach

Angaben des Herstellers. Nach Inkubation der Zellen (je nach experimentellem Ansatz) erfolgte die Zugabe des brommarkierten *Desoxyuridin* (*5-Bromo-2'-desoxyuridin*) für 2 Stunden bei 37°C. Um das Medium zu entfernen, wurde dann die 96-Lochplatte für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und das Medium vorsichtig abgesaugt. Nach Fixierung und Denaturierung der Zellen wurden diese mit einem Anti-BrdU-Antikörper für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die 96-Lochplatte 3-mal mit DPBS gewaschen und die Substratlösung zugegeben. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1M Schwefelsäure abgestoppt und im *ELISA*-Plattenleser bei 450nm (Referenzwellenlänge: 690nm) photometrisch bestimmt.

2.5.4 Cytometric Bead Array (CBA) zur Bestimmung löslicher Zytokine

Der *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* wurde eingesetzt zur quantitativen Messung von IL4, IL6, IL10, TNF α und IFN γ in Kulturüberständen. Mit Hilfe dieses Systems war es möglich mehrere Zytokine in einem einzigen Ansatz zu bestimmen. Die einzelnen Zytokine wurden durch fluoreszenzmarkierte Antikörper mittels FACS-Gerät analysiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurden Standardreihen (0 bis 5000pg/ml) für die jeweiligen Zytokine mitgeführt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die erhaltenen Daten wurden tabellarisch und graphisch aufgearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Expression von CD137 und CD137L

Da im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zum Einfluss des CD137/CD137L-Systems auf tumorimmunologische Prozesse insbesondere im Ewing-Tumor-Modell durchgeführt werden sollten, wurde zunächst die Expression des kostimulatorischen Liganden auf der EFT-Modellzelllinie A673 analysiert. Zugleich wurde die Expression von CD137 und CD137L in verschiedenen Zelllinien und Zelltypen untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit immunologischen und molekularbiologischen Methoden analysiert. Außerdem wurde eine Analyse von Mikroarray-Datensätzen des eigenen Labors und von Datensätzen aus der GEO-Datenbank durchgeführt.

3.1.1 Analyse der Expression von CD137L mittels Durchflusszytometrie

Da aus der Literatur zu erwarten war, dass die B-Zelllinie Daudi positiv für CD137L sei, wurde diese Zelllinie zur Testung der genutzten Antikörper verwendet und mithilfe der Durchflusszytometeranalyse auf die Expression von CD137L untersucht. (Abbildung 2).

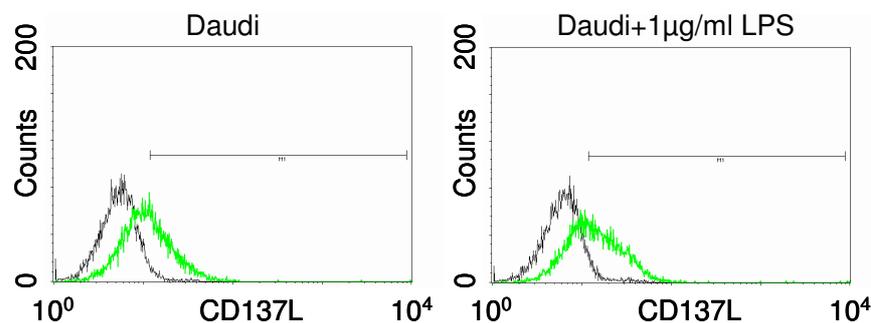


Abbildung 2 Extrazelluläre Durchflusszytometeranalyse zum Nachweis von CD137L für stimulierte und unstimulierte Daudi-Zellen. In den gezeigten Histogrammen ist der Isotyp als schwarze und CD137L als grüne Linie dargestellt. Die Stimulierung der Zellen mit 1 µg/ml LPS erfolgte für 24 Stunden. Der gezeigte Marker M1 entspricht bei Daudi Isotyp: 2,8% und für CD137L: 39%, bei Daudi+1 µg/ml LPS Isotyp: 5,4% und für CD137L: 49% der lebenden Zellen.

Die Daudi-Zellen exprimierten nach Abzug des Isotyps auf 36,2% der lebenden Zellen CD137L. Dieser Wert stieg durch die Stimulation mit 1µg/ml Lipopolysacchariden (LPS) für 24h nach Abzug des Isotyps auf 43,6% an.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit der Zelllinie HeLa (Zervixkarzinom) gemacht werden. Für diese Zelllinie fanden sich in der NCBI-Datenbank Sequenzeinträge (z.B. die Nukleotidsequenz CR624086), welche zeigten, dass in diesen Zellen mRNA für CD137L vorliegen sollte. Durch eine extrazelluläre Färbung konnte hier gezeigt werden (Abbildung 3), dass nach Abzug des Isotyps 13,5% der lebenden Zellen CD137L auf ihrer Oberfläche exprimierten. Bei der intrazellulären Färbung waren nach Abzug des Isotyps sogar 77,8% der lebenden Zellen positiv für CD137L.

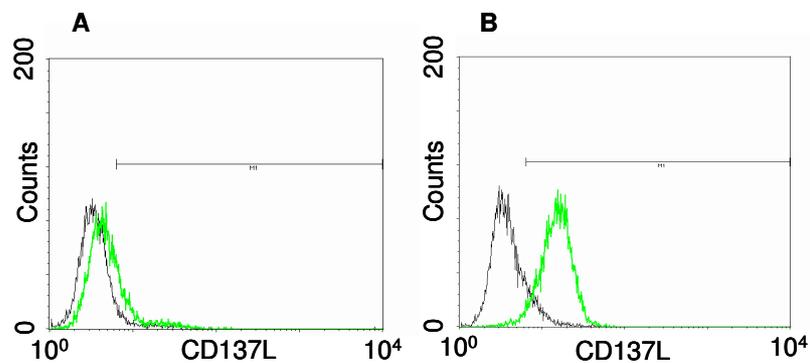


Abbildung 3 Durchflusszytometeranalyse von HeLa-Zellen zum Nachweis von CD137L. Die Zellen wurden extrazellulär (Bildteil A) und intrazellulär (Bildteil B) auf CD137L untersucht. In den gezeigten Histogrammen ist der Isotyp als schwarze und CD137L als grüne Linie dargestellt. Der gezeigte Marker M1 entspricht in Bildteil A für den Isotyp: 6,3% und für CD137L: 19,8% der lebenden Zellen. Im Bildteil B für den Isotyp: 12,3% und für CD137L: 90,1% der lebenden Zellen.

Da mit den durchgeführten Analysen die Funktionalität des eingesetzten Antikörpers für CD137L sichergestellt werden konnte, wurde untersucht, ob die für weitere Experimente eingeplante Ewing-Tumor-Zelllinie A673 eine Expression von CD137L aufwies. Es konnte eindeutig festgestellt werden, dass diese Zellen keine Expression von CD137L aufwiesen (Abbildung 4, Bildteil A). Anschließend wurden A673-Zellen mit der cDNA für CD137L transfiziert. Von den transfizierten Zellen waren nach einigen Wochen Kultivierung mit entsprechendem Selektionsmittel 46,6% (nach Abzug des Isotyps) der lebenden Zellen positiv für CD137L (Abbildung 4, Bildteil B). Insgesamt zeigten die transgenen A673-Zellen hierbei deutlich stärkere Signale für CD137L, als Daudi-Zellen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der verwendete Antikörper wirklich spezifisch für CD137L war. Da

hierdurch die Funktionstüchtigkeit des Antikörpers gegen CD137L bewiesen wurde, konnte geschlossen werden, dass die Abwesenheit von CD137L auf Wildtyp A673-Zellen nicht auf mangelnder Antikörper-Qualität beruhte. Somit konnte die Zelllinie A673 für alle weiteren Experimente als Zielzelle gewählt werden, da sie selbst nicht über das kostimulatorische Molekül CD137L Einfluss auf zugesetzte mononukleare periphere Blutzellen (PBMC) oder T-Zellen nehmen konnte.

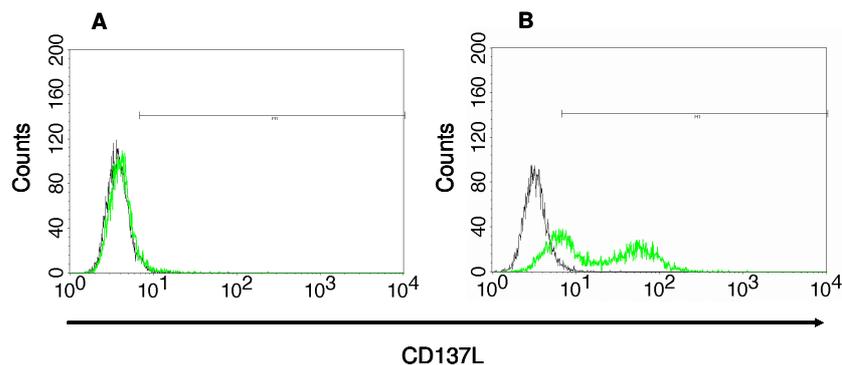


Abbildung 4 Extrazelluläre Durchflusszytometeranalyse zum Nachweis von CD137L auf A673-Zellen und CD137L transgenen A673-Zellen. In den gezeigten Histogrammen ist der Isotyp als schwarze und CD137L als grüne Linie dargestellt. Im Bildteil **A** sind die Wildtyp A673-Zellen dargestellt, dabei entspricht Marker M1 bei Isotyp: 2,9% und für CD137L: 4,5% der lebenden Zellen. Im Bildteil **B** sind die mit CD137L transgenen A673-Zellen gezeigt, der Marker M1 entspricht für Isotyp: 1,4% und für CD137L: 48% der lebenden Zellen.

3.1.2 Untersuchung verschiedener Zelllinien und Zelltypen mittels Mikroarrayanalyse

Um die Expression von CD137 und CD137L in verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, wurden weiterhin verschiedene Datensätze von eigenen Mikroarray-Analysen und Datensätze aus der GEO-Mikroarray-Datenbank analysiert. Eine Zusammenfassung der verwendeten Mikroarray-Datensätze findet sich in Material und Methoden (2.1.8). Mit den Datensätzen wurde eine Analyse mit dem Programm Genesis durchgeführt. Durch diese Analyse konnte die niedrige Expression von CD137L (blaue Farbtöne) in verschiedenen EFT-Zelllinien ebenfalls eindeutig bewiesen werden (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu stand die starke Expression (rote Farbtöne) des kostimulatorischen Liganden in lymphoblastoiden Zelllinien (LCL), mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisierte B-Zellen.

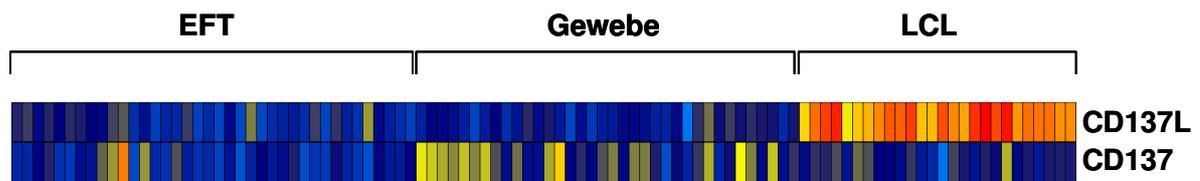


Abbildung 5 Expression von CD137 und CD137L in Ewing-Tumor-Zelllinien (EFT), Geweben und lymphoblastoiden Zelllinien (LCL). Visualisierung von Mikroarray-Signalintensitäten mit Hilfe des Programms Genesis (logarithmierte und medianzentrierte Rohdaten). Rote und gelbe Farbtöne entsprechen hohen, blaue Farbtöne niedrigen Signalintensitäten.

Eine hohe Expression des Rezeptors konnte in diesen Proben nicht beobachtet werden. Es wurden daher weitere (insbesondere hämatopoetische) Zelltypen in die Analyse eingeschlossen (Abbildung 6). So konnte eine starke Expression (rote bis gelbe Farbtöne) des Rezeptors CD137 in Makrophagen (MPh), in einigen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (HL) und einigen anaplastischen großzelligen Lymphomen (ALCL) gezeigt werden. Der Ligand hingegen war nur in verschiedenen LCL stark exprimiert.

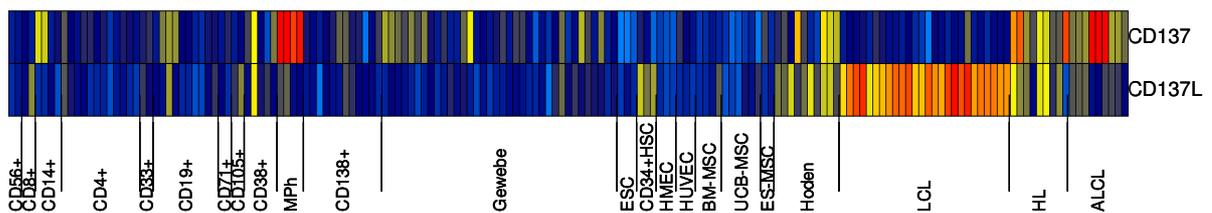


Abbildung 6 Darstellung der Expression von CD137 und CD137L in unterschiedlichen Zelltypen und -linien. Die Visualisierung der Signalintensitäten von CD137 und CD137L in unterschiedlichen Zelltypen und -linien (Datensätze aus der Geo-Datenbank und von Mikroarray-Analysen der eigenen Arbeitsgruppe) wurde mit dem Programm Genesis (logarithmierte und medianzentrierte Rohdaten) durchgeführt. Rote und gelbe Farbtöne entsprechen hohen, blaue Farbtöne niedrigen Signalintensitäten. Zelltypen und -arten: MPh = Makrophagen, ESC = embryonale Stammzellen, HSC = hämatopoetische Stammzellen, HMEC = humane mikrovaskuläre Endothelzellen, HUVEC = humane venöse Nabelschnurendothelzellen, BM-MSC = mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark, UCB-MSC = mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut, ES-MSC = mesenchymale Stammzellen (aus ESC differenziert), LCL = lymphoblastoiden Zellen, HL = Hodgkin-Lymphom-Linien, ALCL = anaplastische großzellige Lymphome-Linien.

Bei der Analyse fiel auf, dass für die meisten Zelltypen die Expression von CD137 und CD137L relativ einheitlich war. Im Gegensatz hierzu zeigten jedoch Hodgkin-Lymphom (HL)-Zellen ein heterogenes Verhalten. Es zeigte sich das CD137L in den Zelllinien L-1236 und KM-H2 stärker exprimiert war, CD137 hingegen bei den Linien L-540 und HDLM-2 (Abbildung 7).

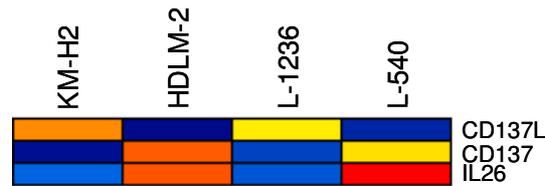


Abbildung 7 Mikroarray-Analyse von Hodgkin-Lymphom-Zelllinien für CD137, CD137L und IL26. Die Visualisierung wurde mit Hilfe des Programms Genesis durchgeführt (logarithmierte und medianzentrierte Rohdaten). Rote und gelbe Farbtöne entsprechen hohen, blaue Farbtöne niedrigen Signalintensitäten.

Es wurde daher die Expression dieser Gene in HL-Zellen Mikroarray-unabhängig weiter untersucht.

3.1.3 Untersuchung der Expression von CD137 und CD137L auf Hodgkin-Lymphom-Zelllinien²

Die Daten zur Expression von CD137 und CD137L konnten mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 8).

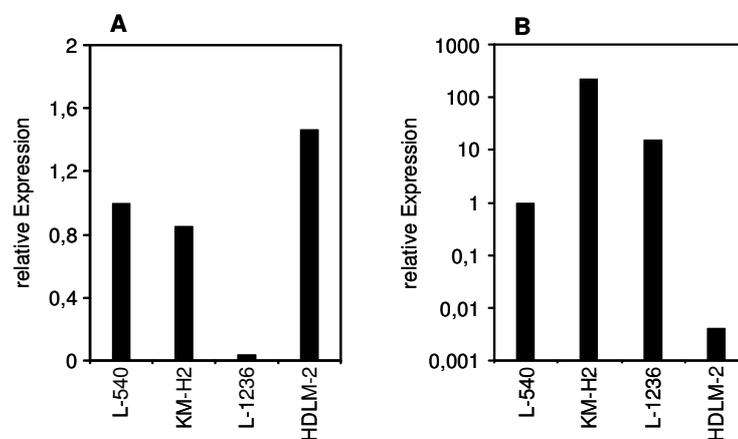


Abbildung 8 Relative Expression von CD137 (A) und CD137L (B) in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien. Untersucht wurde die cDNA mittels quantitativer RT-PCR mit Primern für β -Aktin, CD137 (A) und CD137L (B). Die Berechnungen für die quantitative PCR erfolgten nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Material und Methoden 2.2.5), wobei die Zelllinie L-540 als eins gesetzt wurde. Abbildung nach Föll et al. 2008b.

Dabei entsprachen die Zelllinien L-1236 und KM-H2 eher dem Phänotyp von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und B-Zellen, die eine höhere Expression von CD137L aufweisen. Die Zelllinien L-540 und HDLM-2 zeigten die höhere

² Die hier beschriebenen Daten wurden teilweise bereits veröffentlicht. Siehe Föll et al. 2008b.

Expression des Rezeptors CD137 und entsprechen somit eher einem T-Zell-Phänotyp. Die Ähnlichkeit von L-540- und HDLM-2-Zellen mit T-Zellen spiegelte sich auch in anderen differentiell exprimierten Genen in der Analyse wieder. Wie dies in Abbildung 7 für Interleukin 26 (IL26), welches sehr stark in L-540 und auch in HDLM-2 nachgewiesen werden konnte, gezeigt ist. Diese Daten konnten wiederum mithilfe von quantitativer und konventioneller RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 9). Für die Zelllinie KM-H2 wurde kein Signal in der konventionellen RT-PCR erhalten. Auch bei der quantitativen RT-PCR konnte nach 40 Zyklen kein Signal detektiert werden, die Expression lag hier also unterhalb der Detektionsgrenze. Die Expression von IL26 ging einher mit der Expression des kostimulatorischen Rezeptors CD137 in den beiden genannten Zelllinien.

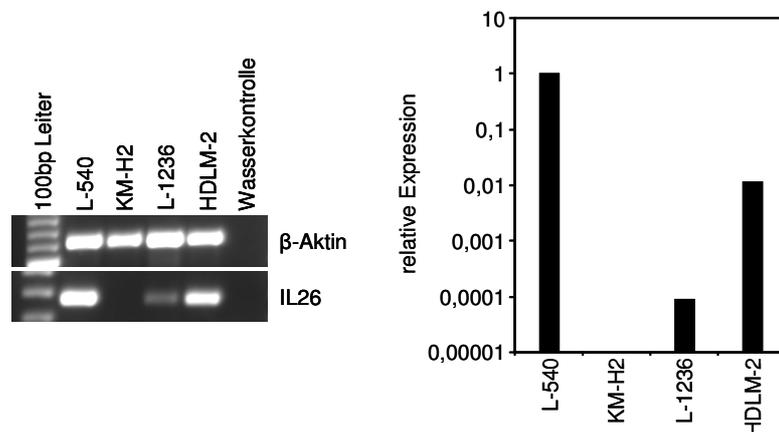


Abbildung 9 Darstellung der Expression von IL26 in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien. Untersucht wurde die c-DNA mittels quantitativer und konventioneller RT-PCR mit den Primern für β -Aktin und IL26. Die Berechnungen für die quantitative PCR erfolgten nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Material und Methoden 2.2.5), wobei die Zelllinie L-540 als eins gesetzt wurde. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle. Abbildung nach Föll et al. 2008b.

Zusammenfassend konnte somit festgestellt werden, dass CD137 auf Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit T-Zell-Phänotyp, und CD137L auf Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit APC- und B-Zell-Phänotyp zu finden war.

3.2 Untersuchung eines möglichen Einflusses des CD137/CD137L-Systems auf die Expression der Indolamin-2,3-dioxygenase

In vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte ein immuntherapeutisches Tiermodell für EFT etabliert werden. Die Tumore der EFT zeichnen sich durch eine geringe Immunogenität aus. Mit Hilfe von transgen exprimiertem Interleukin 2 (IL2) konnte die immunstimulatorische Aktivität der EFT erhöht werden (Staege et al. 2004a). Da trotz allem das Wachstum der Tumorzellen in diesem immuntherapeutischen Modell nicht vollständig unterdrückt werden konnte, wurde in nachfolgenden Untersuchungen geprüft, ob durch das kostimulatorische CD137/CD137L-System eine Verbesserung des immuntherapeutischen Effekts erzielt werden könnte (Kühnöl 2009). Hierzu wurden in NOD-SCID Mäusen Ewing-Tumor-Zellen (Zelllinie A673) implantiert, welche dann mit Hilfe von HLA-kompatiblen PBMC, IL2-transgenen und CD137L-transgenen Ewing-Tumor-Zellen therapiert werden sollten. Allen Mäusen wurden subkutan die Ewing-Tumor-Zelllinie A673 ($1,5 \times 10^6$ Zellen) und HLA-A1A2 positive PBMC (1×10^7 Zellen) transplantiert. Zur Therapie wurden verschiedene Ansätze erprobt:

- Gabe von bestrahlten CD137L-transgenen A673-Zellen ($1,5 \times 10^6$ Zellen) (=A+P+A4 in Abbildung 10)
- Gabe von bestrahlten IL2-transgenen A673-Zellen ($1,5 \times 10^6$ Zellen) (=A+P+A1 in Abbildung 10)
- Gabe von bestrahlten IL2-transgenen A673-Zellen und CD137L-transgenen A673-Zellen (je Zelltyp $1,5 \times 10^6$ Zellen) (=A+P+A4 in Abbildung 10)
- Gabe von bestrahlten mit Kontrollvektor transfizierten A673-Zellen ($1,5 \times 10^6$ Zellen) (=A+P+A3 in Abbildung 10).

Auch in diesen Experimenten entwickelten alle Mausgruppen Tumore, wenngleich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (Kühnöl 2009). Wie schon eingangs näher erläutert, sind Tumorzellen dazu befähigt Toleranz zu induzieren. Hierbei wird der Expression des Tryptophan katabolisierenden Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) eine wesentliche Bedeutung zugesprochen. Die in dem Maus-Versuch entstandenen Tumore wurden daher bezüglich der Expression dieses Enzyms

analysiert. Die entstandenen Tumore wurden aus den Tieren isoliert, es wurde aus den einzelnen Tumoren die RNA gewonnen und diese dann mit RT-PCR und quantitativer RT-PCR auf die Expression von IDO untersucht (Abbildung 10).

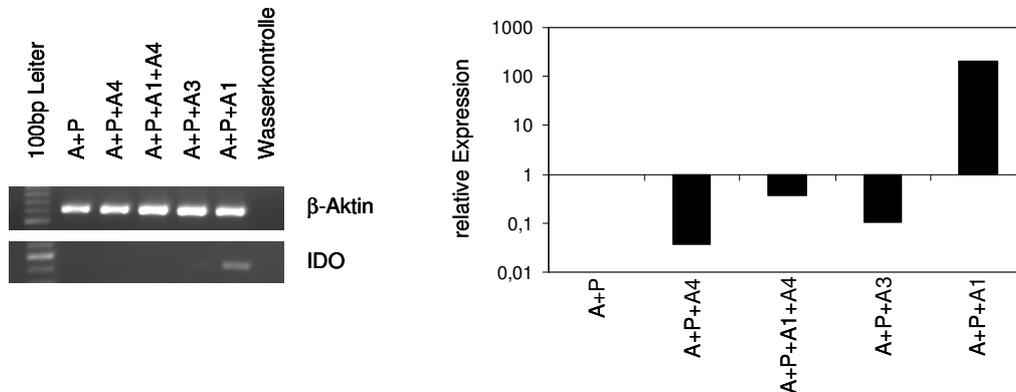


Abbildung 10 Untersuchung von Maustumoren aus *in vivo* Experimenten. Tumore wurden isoliert und RNA aufgereinigt. Untersucht wurde diese dann mittels RT-PCR und quantitativer RT-PCR mit den Primern für β -Aktin und IDO. Dabei entspricht A = A673-Zellen, P = PBMC, A1 = IL2-transgene A673-Zellen, A3 = A673-Zellen transfiziert mit Kontrollvektor, A4 = CD137L-transgene A673-Zellen. Die Berechnungen für die quantitative PCR erfolgten nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Material und Methoden 2.2.5.), wobei Expression im Tumor, welcher in alleiniger Anwesenheit von PBMC entstanden war, als eins gesetzt wurde. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass IDO dort exprimiert wurde, wo lebende Tumorzellen in Anwesenheit von PBMC und bestrahlten IL2-transgenen Tumorzellen gewachsen waren. Bei Anwesenheit von CD137L (durch CD137L-transgene A673) im Ansatz war keine Expression von IDO mehr detektierbar. Die quantitative PCR zeigte in diesem Falle einen 100fachen Unterschied zwischen beiden Ansätzen. Um dieses Phänomen weiter zu charakterisieren, wurden weitere Experimente *in vitro* durchgeführt.

3.2.1 *In vitro* Untersuchungen zum möglichen Einfluss vom CD137/CD137L-System auf die Expression von IDO in Tumorzellen

Um die Ergebnisse des Mausversuches *in vitro* zu verifizieren, wurden die Tumorzellen (A673) räumlich durch Zellkultureinsätze (Abbildung 11) von den anderen Zellen separiert, um besser geerntet werden zu können. Die Zellen wurden dann wie, unter Material und Methoden 2.4.4 beschrieben, kultiviert. Nach einer Kultivierung von drei Tagen wurden die Wildtyp-Tumorzellen aus dem Zellkultur-

einsatz geerntet, ihre RNA isoliert und diese mittels RT-PCR auf die Expression von IDO untersucht.

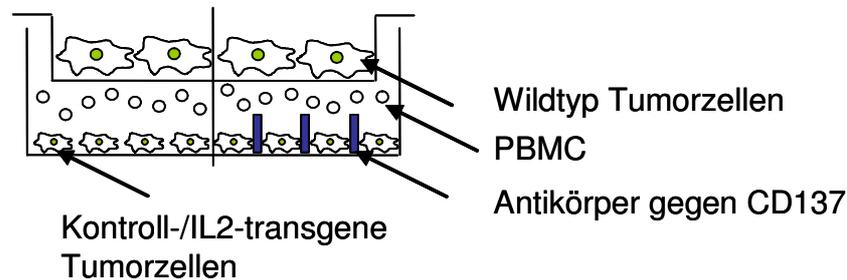


Abbildung 11 Modell der experimentellen Ansätze mit Zellkultureinsätzen für *in vitro* Kultivierung. Die Ansätze wurden mit An- oder Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137 durchgeführt. Zusätzlich wurden in der jeweiligen Vertiefung der 6-Loch-Platte PBMC, sowie Kontroll- oder IL2-transgene Tumorzellen kultiviert. Im Zellkultureinsatz wurden separiert Wildtyp Tumorzellen kultiviert. Modell nach Max et al. 2009b.³

Der Zellkulturüberstand wurde ebenfalls aufbewahrt und mit Hilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* auf IL2 und Interferon gamma (IFN γ) analysiert. Der Versuch wurde mehrfach mit unterschiedlichen HLA-kompatiblen PBMC durchgeführt. Als kostimulatorisches Signal für CD137 wurde ein Antikörper gegen CD137 eingesetzt.

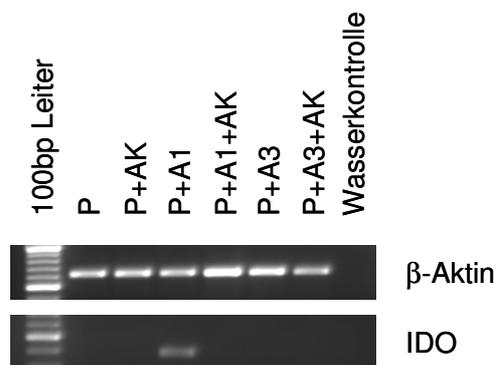


Abbildung 12 Wirkung von IL2-transgenen A673-Zellen und einem Antikörper gegen CD137 auf die Expression von IDO in der Tumorzelllinie A673 in einer *in-vitro*-Kokultur mit PBMC. Die Wildtyp-Tumorzellen des in Abbildung 11 geschilderten Experimentalansatzes wurden geerntet und ihre RNA isoliert. Untersucht wurde diese dann mittels konventioneller RT-PCR mit den Primern für β -Aktin und IDO. In allen Ansätzen wurden die A673-Zellen kokultiviert mit HLA-kompatiblen PBMC (= P). Bei 3 Ansätzen wurden die Vertiefungen der 6-Loch-Platte vorher mit 10 μ g/ml Antikörper gegen CD137 beladen (= AK). Weiterhin entsprechen A1 = IL2-transgenen A673-Zellen; A3 = A673-Zellen, transfiziert mit Kontrollvektor. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle. Dargestellt wurde ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

³ Die hier beschriebenen Daten wurden teilweise bereits veröffentlicht. Siehe Max et al. 2009b.

Bei der Untersuchung der IDO-Expression zeigte sich, dass das Ergebnis des Mausmodelles in Abbildung 12 bestätigt werden konnte. Die Expression von IDO wurde durch den Einfluss des Antikörpers gegen CD137 ebenfalls gehemmt (in Abbildung 12 Gelspur P+A1+AK), während es unter dem Einfluss von IL2 (erhalten durch IL2-transgene A673-Zellen) zu einer Expression von IDO kam (in Abbildung 12 Gelspur P+A1).

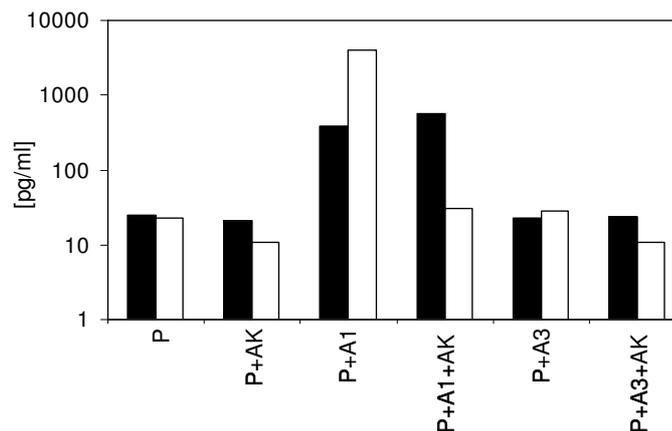


Abbildung 13 Wirkung von IL2-transgenen A673-Zellen und einem Antikörper gegen CD137 auf die Konzentration von IL2 und IFN γ im Zellkulturüberstand nach der *in-vitro*-Kokultur mit A673-Zellen und PBMC. Die Zellkulturüberstände des in Abbildung 11 geschilderten Experimentalansatzes wurden geerntet und mithilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* die Konzentration von IL2 (schwarze Balken) und IFN γ (weiße Balken) bestimmt. Hierbei entsprechen P = PBMC, A1 = IL2-transgene A673-Zellen; A3 = A673-Zellen, transfiziert mit Kontrollvektor, AK = Antikörper gegen CD137. Dargestellt wurde ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

Bei der CBA Zytokinassay-Analyse wurde deutlich, dass die Konzentration von IL2 in den Ansätzen ohne die IL2-transgenen A673-Zellen gering war (zwischen 20 und 25pg/ml) (Abbildung 13). In diesen Ansätzen kam es durch die PBMC auch nicht zu einer Bildung von IFN γ . Auch die Anwesenheit des Antikörpers gegen CD137 bewirkte keine Veränderung der beiden Zytokin-Konzentrationen. Hingegen war bei den Ansätzen mit IL2-transgenen A673-Zellen die Konzentration von IL2 deutlich erhöht (bei ca. 300 und 550pg/ml). Die Konzentration von IFN γ , die bei Anwesenheit von IL2 auf 3000pg/ml anstieg, wurde deutlich durch den Antikörper beeinflusst. Dieser senkte die Konzentration von IFN γ auf ca. 30pg/ml. Somit konnte deutlich gezeigt werden, dass die Expression von IDO in diesem Experiment mit einer hohen IFN γ -Konzentration einherging.

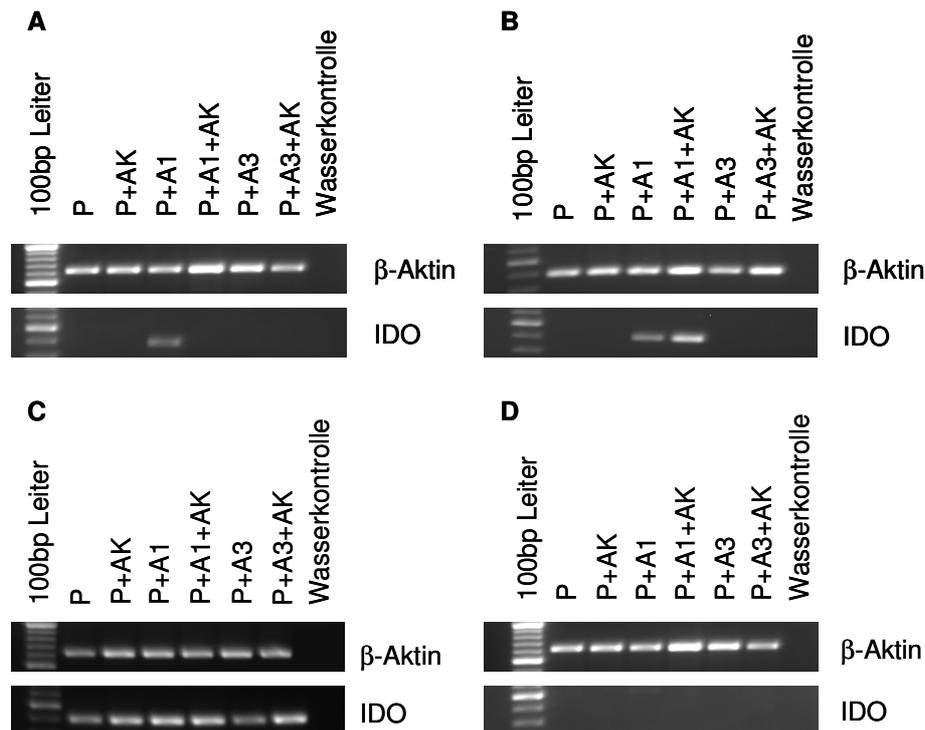


Abbildung 14 Wirkung von IL2-transgenen A673-Zellen und dem Antikörper gegen CD137 auf die Expression von IDO in der Tumorzelllinie A673 in unterschiedlichen *in-vitro*-Kokulturen mit PBMC von verschiedenen Spendern. Wildtyp-Tumorzellen des in Abbildung 11 geschilderten Experimentalansatzes wurden geerntet und ihre RNA isoliert. Untersucht wurde diese dann mittels konventioneller RT-PCR mit Primern für β -Aktin und IDO. In allen Ansätzen wurden die Wildtyp-Tumorzellen kokultiviert mit HLA-kompatiblen PBMC (= P). Bei 3 Ansätzen wurden die Vertiefungen der 6-Loch-Platte vorher mit 10 μ g/ml Antikörper gegen CD137 beladen (= AK). Weiterhin entsprechen A1 = A673-Zellen, IL2-transgen; A3 = A673-Zellen, transfiziert mit Kontrollvektor. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle. Unterscheidend in den vier Bildern sind die eingesetzten PBMC verschiedener Spender (Bildteil **A**, **B**, **C** und **D**). Dargestellt wurde für unterschiedliche Reaktionsmuster jeweils ein repräsentatives Ergebnis.

Bei der Analyse verschiedener Spender zeigte sich, dass einzelne Spender in ihrem Reaktionsverhalten deutlich von dem oben gezeigten Muster abwichen. So kam es bei einzelnen Spendern in keinem der Ansätze zur Expression von IDO (in Abbildung 14 für PBMC in Bildteil D). Für andere PBMC (in Bildteil C) konnte bei allen sechs Ansätzen eine Expression von IDO nachgewiesen werden. Bei anderen PBMC (in Bildteil B) kam es nur bei den beiden Ansätzen zu einer Detektion von IDO, in denen die IL2-transgenen A673-Zellen zum Einsatz kamen. Entgegen den oben und dem in Bildteil A dargestellten Ergebnissen bewirkte hier der Antikörper gegen CD137 keine Reduktion der Expression von IDO. Um diese Ergebnisse besser verstehen zu können, wurden auch für diese Experimente die Zytokine IL2 und IFN γ mit Hilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* bestimmt (Abbildung 15).

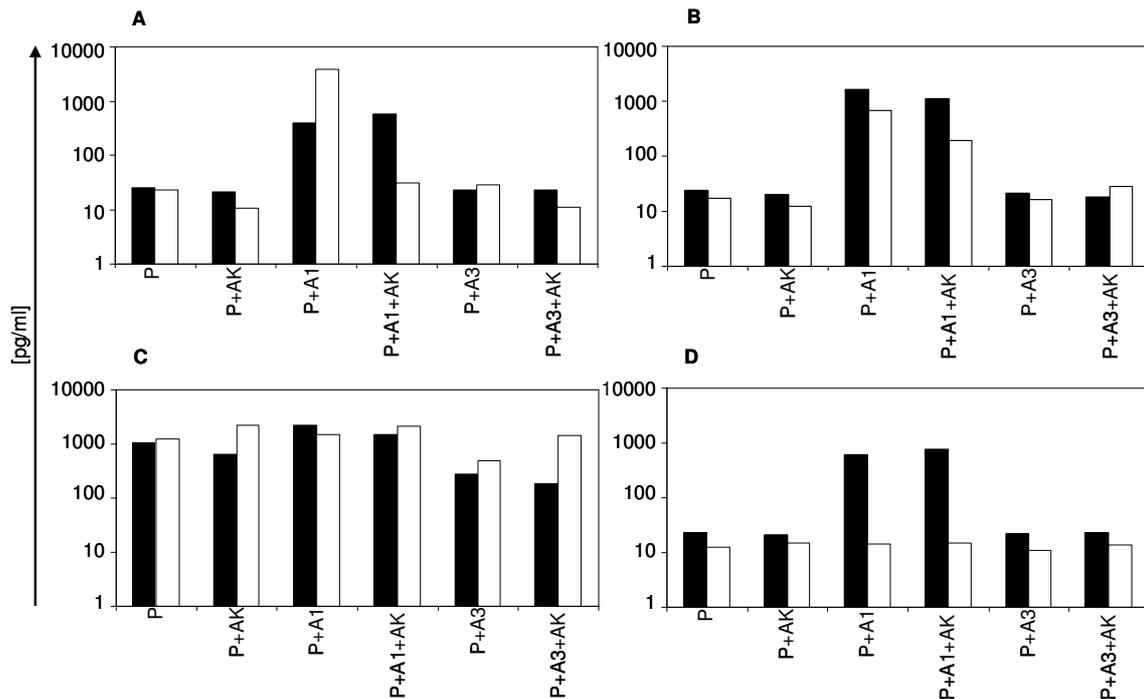


Abbildung 15 Wirkung von IL2-transgenen A673-Zellen und dem Antikörper gegen CD137 auf die Konzentration von IL2 und IFN γ im Zellkulturüberstand nach der *in-vitro*-Kokultur mit A673-Zellen und PBMC verschiedener Spender. Die Zellkulturüberstände des in Abbildung 11 geschilderten Experimentalansatzes wurden geerntet und mit Hilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* die Konzentration von IL2 (schwarze Balken) und IFN γ (weiße Balken) bestimmt. Hierbei entsprechen P = PBMC, A1 = A673-Zellen, IL2-transgen; A3 = A673-Zellen, transfiziert mit Kontrollvektor; AK = Antikörper gegen CD137. Unterscheidend in den vier Bildern sind die eingesetzten PBMC verschiedener Spender (Bildteil A, B, C und D; entsprechend Abbildung 14). Dargestellt wurde für unterschiedliche Reaktionsmuster jeweils ein repräsentatives Ergebnis.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, kam es im Experiment im Bildteil D zu keiner Expression von IDO. Die Untersuchung der Zellüberstände zeigte nun, dass zwar in den beiden Ansätzen, welche die IL2-transgenen A673-Zellen enthielten, IL2 gebildet wurde, aber die PBMC durch diese Stimulation nicht mit der IFN γ -Sekretion reagierten. Im Bildteil C wurde deutlich, dass bei allen sechs Ansätzen die IL2-Konzentration in den Zellkulturüberständen gleichwertig hoch war, und mit diesen auch eine hohe Konzentration an IFN γ einherging. Damit war die IDO-Expression in allen sechs Ansätzen in Abbildung 14 in Bildteil C gut zu erklären. In den Bildteilen A und B war zu sehen, dass nur in den Ansätzen IL2 gebildet wurde, in denen die IL2-transgenen A673-Zellen anwesend waren. Aber in Bildteil B zeigte sich, dass der Antikörper gegen CD137 keine verringerte IFN γ -Sekretion bewirkte. Um den Zusammenhang zwischen der IDO-Expression und der Menge an IL2 und IFN γ in den einzelnen Ansätzen zu verdeutlichen, wurden diese hier nochmals gemeinsam dargestellt. Im Bildteil A der Abbildung 16 ist zu sehen, dass

es bei einer geringen Konzentration von IL2 nicht zu einer Expression von IDO kam.

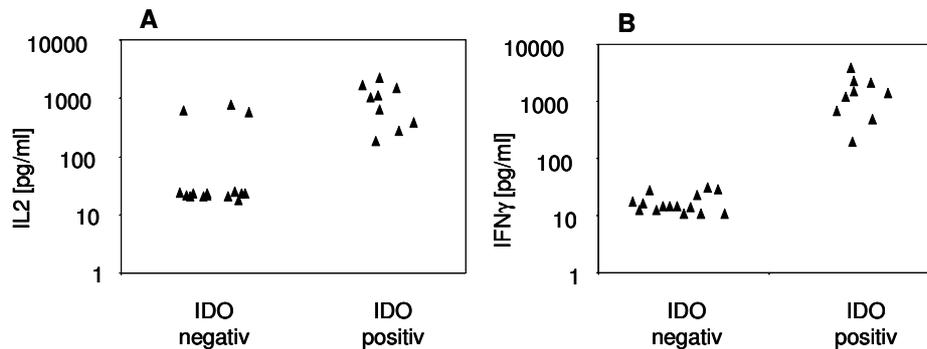


Abbildung 16 Zusammenhang der IDO-Expression und der Konzentration von IL2 oder IFN γ . Dargestellt sind die einzelnen Konzentrationen von IL2 (A) und IFN γ (B) bestimmt mit Hilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* und die zu den Ansätzen gehörende IDO-Expression.⁴

Höhere Mengen an IL2 führten bei neun Ansätzen zu einer Detektierbarkeit von IDO. Bei drei weiteren Ansätzen kam es jedoch nicht dazu, obwohl die IL2-Konzentration bei diesen im gleichen Bereich lag. Somit war keine Abhängigkeit zwischen IL2 und der Expression von IDO zu erkennen. Im Bildteil B ist für IFN γ ein eindeutigeres Verteilungsmuster zu erkennen. Alle Ansätze, die mehr als 190pg/ml IFN γ enthielten, zeigten in der konventionellen RT-PCR eine Bande für IDO. Eine direkte Abhängigkeit zwischen der Expression von IDO und der Anwesenheit des Antikörpers gegen CD137 konnte somit nicht bestätigt werden.

3.2.2 Expressionsanalysen für IDO, IDO2 und KYNU in Tumorzelllinien verschiedenster Entitäten

Da in den vorangegangenen Experimenten die Abhängigkeit von IDO und IFN γ nahe gelegt werden konnte, und auch in der Literatur eine Induktion von IDO durch IFN γ z. B. in verschiedenen Typen von PBMC (Carlin et al. 1987), manchen Zelllinien (Werner-Felmayer et al. 1989) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) (Meisel et al. 2004) beschrieben wurde, wurde die Wirkung von IFN γ auf etablierte Zelllinien unterschiedlicher Tumor-Entitäten untersucht. Es wurde dabei die Expression von IDO und andere Enzyme des Tryptophanstoffwechsels näher betrachtet.

⁴ Die hier beschriebenen Daten wurden bereits veröffentlicht. Siehe Max et al. 2009b.

Die Enzyme IDO und Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) sind verantwortlich für die Umsatzrate im Tryptophanstoffwechsel. Während TDO konstitutiv hauptsächlich in der Leber exprimiert wird, kann IDO durch IFN γ in verschiedenen Zelltypen induziert werden und nimmt hierbei die Rolle eines immunsuppressiven Faktors ein. Seit einiger Zeit ist Indolamin-2,3-Dioxygenase-2 (IDO2) als ein weiteres Enzym bekannt, das ebenfalls an diesem wichtigen Schritt des Tryptophanstoffwechsels Anteil hat (Ball et al. 2007). Als weiteres Enzym wurde die Kynureninase (KYNU) untersucht, sie ist ebenfalls Bestandteil des Tryptophanstoffwechsels und führt zur Bildung der toxischen Metabolite Anthranilat und 3-Hydroxyanthranilat.

Es wurde untersucht, ob schon ohne IFN γ eine Expression der 3 Gene in den verschiedenen Zelllinien vorlag und ob diese dann durch IFN γ verstärkt oder überhaupt induziert werden könnte.

Zuerst wurde die Menge IFN γ bestimmt, die zu einer Induktion von IDO in Ewing-Tumor-Zelllinien führte. Dazu wurde die Zelllinie A673 mit unterschiedlichen Konzentrationen IFN γ (0 bis 500U/ml) inkubiert. Die Zellen wurden dann nach drei Tagen geerntet, ihre RNA isoliert und die Expression von IDO in den A673-Zellen mithilfe konventioneller RT-PCR untersucht. Ohne IFN γ zeigten die A673-Zellen keine Expression von IDO, erst bei einer Konzentration von 200U/ml konnte eine sehr leichte Induktion der Expression beobachtet werden. Bei 400 und 500U/ml IFN γ war eine deutliche Expression von IDO feststellbar (Abbildung 17).

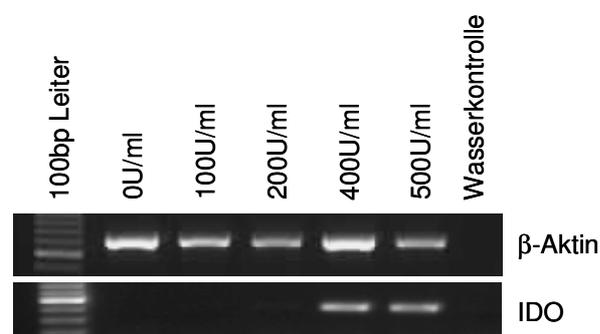


Abbildung 17 Untersuchung der Expression von IDO nach Stimulation von A673 mit unterschiedlichen IFN γ -Konzentrationen (0, 100, 200, 400 und 500U/ml). RNA der verschiedenen Stimulationszustände der A673-Zellen wurde durch RT-PCR mit den Primern für β -Aktin und IDO untersucht. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Für die folgenden Untersuchungen der Zelllinien verschiedener Tumorentitäten wurden 500U/ml $\text{INF}\gamma$ ausgewählt, um ein sicheres Signal zu erhalten. Die zu analysierenden Zellen wurden nach drei Tagen Inkubation im normalen und stimulierten Zustand geerntet, ihre RNA isoliert und dann die Expression von β -Aktin, IDO und KYNU mittels konventioneller RT-PCR untersucht. Da die Signale für IDO2 in allen untersuchten Proben mit den verwendeten Primern ausgesprochen schwach waren, wurden diese hier durch Einsatz des Produktes der ersten PCR in eine zweite PCR mit identischen Bedingungen verstärkt.

In Abbildung 18 ist eine schwache Expression von IDO im Normalzustand der Ewing-Tumor-Zelllinien SK-N-MC und TC-32 zu erkennen, welche durch die Zugabe von $\text{INF}\gamma$ deutlich erhöht wurde. Bei den restlichen Ewing-Tumor-Zelllinien und den MSC lag keine Expression von IDO im unstimulierten Zustand vor, diese wurde erst durch die Zugabe von $\text{INF}\gamma$ induziert. Bei der Expressionsanalyse von IDO2 war kein Signal bei den verschiedenen Zelllinien im unstimulierten Zustand zu detektieren.

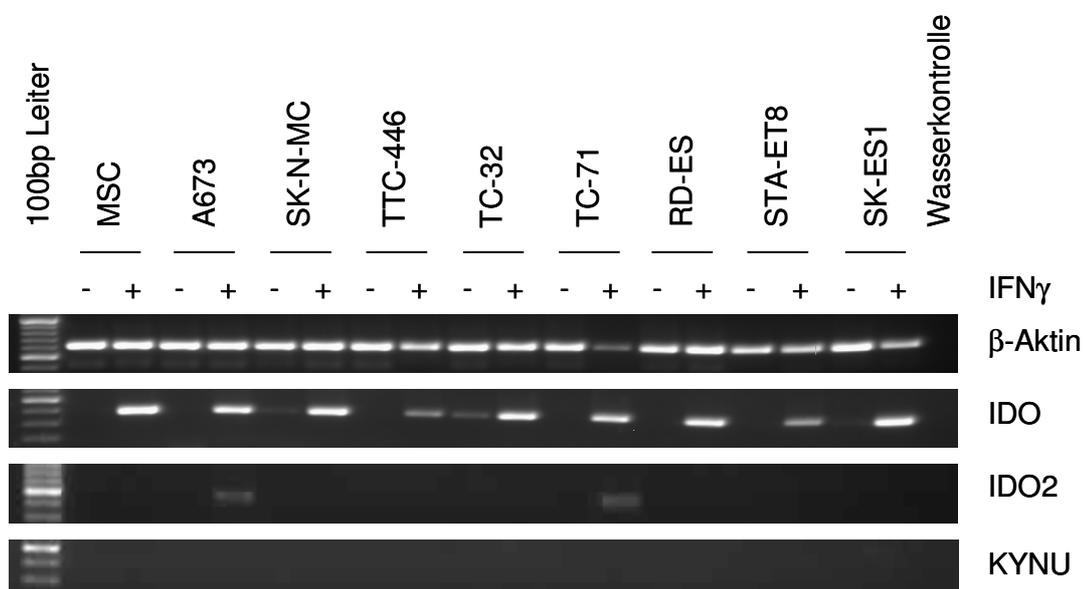


Abbildung 18 Expressionsanalyse verschiedener Ewing-Tumor-Zelllinien auf IDO, IDO2 und KYNU. RNA der verschiedenen Zelllinien wurde durch RT-PCR mit Primern für β -Aktin, IDO, IDO2 und KYNU untersucht. Hierbei wurden die Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) von 500U/ml $\text{INF}\gamma$ untersucht. Neben den Ewing-Tumor-Zelllinien (A673, SK-N-MC, TTC-446, TC-32, TC-71, RD-ES, STA-ET8 und SK-ES1) ist auch die Wirkung von $\text{INF}\gamma$ auf mesenchymale Stammzellen (MSC) dargestellt. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.⁵

⁵ Teile der hier beschriebenen Daten wurden bereits veröffentlicht. Siehe Max et al. 2009b.

Nach der Stimulation mit $\text{INF}\gamma$ war nur bei den Linien A673 und TC-32 eine Expression zu verzeichnen, bei diesen beiden Zelllinien korrelierte die Expression von IDO und IDO2 mit der $\text{INF}\gamma$ -Gabe. Die Expression von KYNU konnte weder im Normalzustand noch nach Zugabe von $\text{INF}\gamma$ detektiert werden. Es wurde weiterhin untersucht, ob verschiedenen Hodgkin-Lymphom- und Neuroblastom-Zelllinien nach der Inkubation mit $\text{INF}\gamma$ eine Expression von IDO, IDO2 und KYNU zeigen. Bei den verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien war nur bei der Linie KM-H2 eine Expression von IDO (Abbildung 19) festzustellen. Das Gen wurde in dieser Zelllinie konstitutiv exprimiert, aber es kam durch $\text{INF}\gamma$ nicht zu einer Steigerung der IDO-Expression. Hingegen kam es bei den Neuroblastom-Zelllinien durch $\text{INF}\gamma$ zu einer Induktion der IDO-Expression (dieses lag konstitutiv nicht vor). Zu einer Expression von IDO2 kam es weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand der verschiedenen Zelllinien. Die Expression von KYNU war nur bei der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie KM-H2 nachweisbar, sehr leicht im unstimulierten Zustand und deutlich verstärkt durch die Stimulation der Zellen mit $\text{INF}\gamma$.

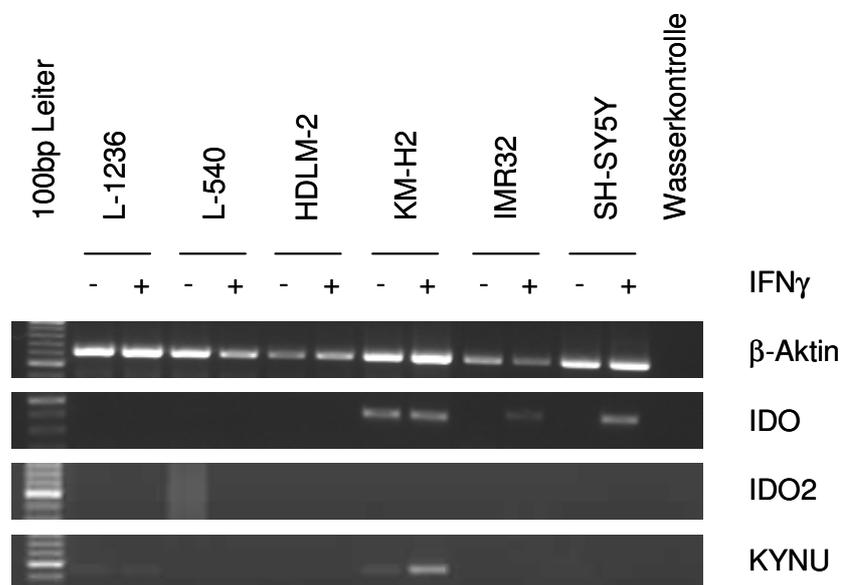


Abbildung 19 Expressionsanalyse verschiedener Hodgkin-Lymphom- und Neuroblastom-Zelllinien auf IDO, IDO2 und KYNU. RNA der verschiedenen Zelllinien wurde durch RT-PCR mit den Primern für β -Aktin, IDO, IDO2 und KYNU untersucht. Hierbei wurden die Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) von 500U/ml $\text{INF}\gamma$ untersucht. Dargestellt ist die Wirkung von $\text{INF}\gamma$ auf Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-1236, L-540, HDLM-2 und KM-H2) und Neuroblastom-Zelllinien (IMR32 und SH-SY5Y). 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Es wurde weiterhin untersucht, ob verschiedenen LCL nach der Inkubation mit IFN γ eine Expression von IDO, IDO2 und KYNU zeigen. In Abbildung 20 wurden als Positivkontrolle erneut MSC mitgeführt, da in den LCL in keinem der beiden Zustände (unstimulierter und stimulierter Zustand) eine Expression von IDO detektiert werden konnte. Die Analyse für IDO2 zeigte eine Erhöhung der Expression für die Zelllinien CSIII und A2+2310. Wobei CSIII schon eine leichte konstitutive Expression von IDO2 aufwies.

Bei KYNU konnte kein Einfluss von IFN γ auf die Expression festgestellt werden. Die Zelllinien LCL73, CSIII und A2+2310 exprimierten KYNU konstitutiv. Diese Expression wurde durch die Stimulation nicht gesteigert. Die beiden anderen LCL wiesen in keinem der beiden Zustände KYNU auf. Weiterhin wurde ein Spektrum verschiedener Zelllinien untersucht: THP1 (akute monozytische Leukämie), K562 (chronische myeloide Leukämie), HL-60 (akute myeloide Leukämie), Jurkat (T-Zelleukämie), HT-1080 (Fibrosarkom) und HeLa (Zervixkarzinom). Eine Expression von IDO war bei den verschiedenen Leukämie-Zelllinien nicht zu verzeichnen (Abbildung 21).

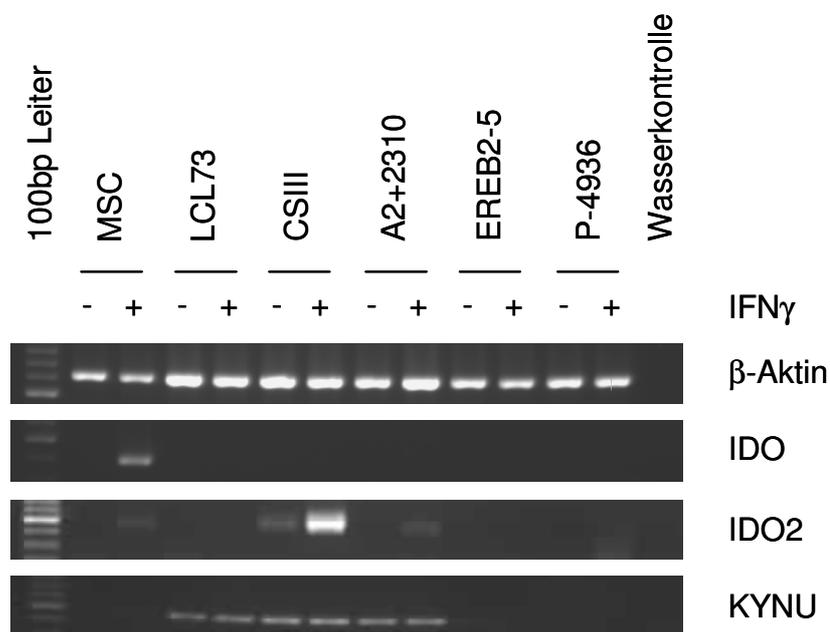


Abbildung 20 Expressionsanalyse verschiedener LCL auf IDO, IDO2 und KYNU. RNA der verschiedenen Zelllinien wurde durch RT-PCR mit den Primern für β -Aktin, IDO, IDO2 und KYNU untersucht. Hierbei wurden die Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) von 500U/ml IFN γ untersucht. Neben den LCL (LCL73, CSIII, A2+2310, EREB2-5 und P-4936) ist auch die Wirkung von IFN γ auf mesenchymale Stammzellen (MSC) dargestellt. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Beim Fibrosarkom und beim Zervixkarzinom kam es durch IFN γ zu einer Induktion der Expression. IDO2 hingegen war nur bei der Zelllinie Jurkat zu detektieren, ohne eine erkennbare Steigerung der Expression durch IFN γ . Die Expression von KYNU konnte bei den Zelllinien THP1 und HeLa beobachtet werden. Auch hierbei hatte IFN γ keinen weiteren nennenswerten Einfluss auf die Expression von KYNU in den beiden unterschiedlichen Zelllinien.

Abschließend wurden Glioblastom- (U87-MG), Melanom- (518A2, 31IGR1), anaplastische (HTH 74, 8505C), papilläre (B-CPAP) und follikuläre (FTC-133) Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien untersucht. Die Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien B-CPAP und FTC-133 (Abbildung 22) exprimierten IDO konstitutiv, durch die Stimulation der Zellen mit IFN γ kam es zu einer leichten Erhöhung des Signals. Bei allen anderen Zelllinien lag keine Expression im unstimulierten Zustand vor, nur nach der Inkubation der Zellen mit IFN γ kam es zu einer Induktion von IDO.

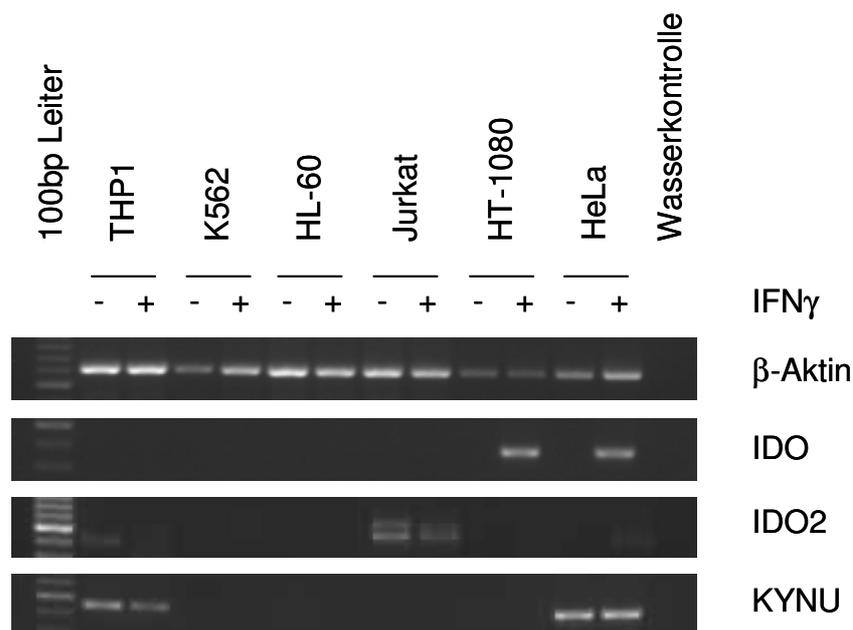


Abbildung 21 Expressionsanalyse verschiedener Zelllinien auf IDO, IDO2 und KYNU. RNA der verschiedenen Zelllinien wurde durch RT-PCR mit den Primern für β -Aktin, IDO, IDO2 und KYNU untersucht. Hierbei wurden die Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) von 500U/ml IFN γ untersucht. Dargestellt ist die Wirkung von IFN γ auf ein Fibrosarkom (HT-1080), ein Zervixkarzinom (HeLa) und verschiedene Leukämien (THP1, K562, HL-60 und Jurkat). 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

IDO2 wurde nur von den Zelllinien B-CPAP und HTh 74 im unstimulierten Zustand exprimiert. Die Zelllinien U87-MG und 31IGR1 exprimierten konstitutiv KYNU, welches auch nach der Stimulation mit IFN γ weiterhin unbeeinflusst erhalten blieb. Bei den untersuchten Zelllinien zeigten zusammengefasst Ewing-Tumor-, Neuroblastom-, Fibrosarkom-, Zervixkarzinom-, Glioblastom-, Melanom- und Schilddrüsenkarziom-Zelllinien nach einer Inkubation mit IFN γ die Expression von IDO. Hingegen exprimierten die verschiedenen Leukämie-, Hodgkin-Lymphom- (außer KM-H2) und lymphoblastoiden Zelllinien kein IDO nach IFN γ -Stimulation. Bei den Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien B-CPAP, FTC-133 (Abbildung 22) und den Ewing-Tumor-Zelllinie TC-32 und SK-N-MC (Abbildung 18), welche auch konstitutiv IDO exprimieren, führte die IFN γ -Gabe zu einer Steigerung der IDO-Expression. Eine Besonderheit ist die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie KM-H2, sie exprimierte schon konstitutiv IDO. Durch IFN γ wurde diese Expression aber nicht deutlich erhöht (Abbildung 19).

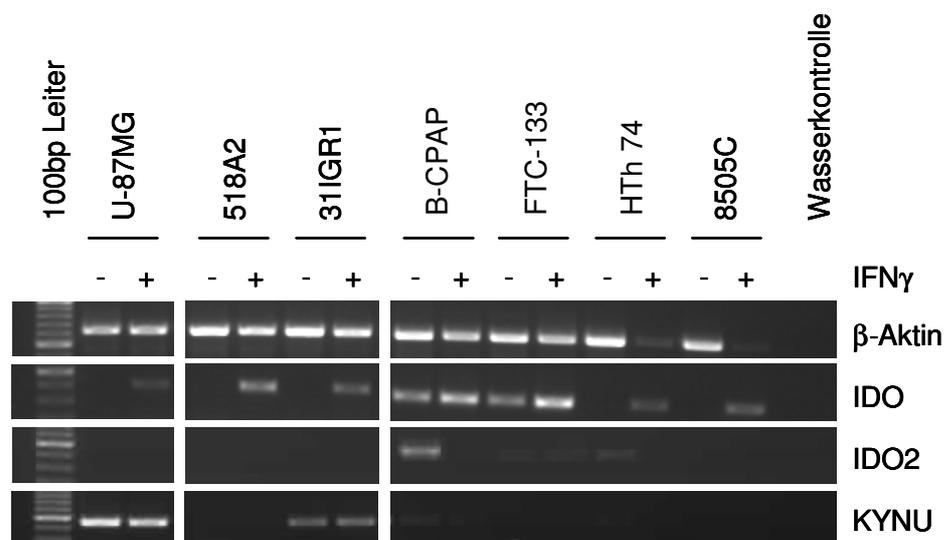


Abbildung 22 Expressionsanalyse verschiedener Zelllinien auf IDO, IDO2 und KYNU. RNA der verschiedenen Zelllinien wurde durch RT-PCR mit den Primern für β -Aktin, IDO, IDO2 und KYNU untersucht. Hierbei wurden die Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) von 500U/ml IFN γ untersucht. Dargestellt ist die Wirkung von IFN γ auf Glioblastom- (U87-MG), Melanom- (518A2, 31IGR1), anaplastische (HTh 74, 8505C), papiläre (B-CPAP) und follikuläre (FTC-133) Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Für die beiden Gene IDO2 und KYNU ließ sich keine solche einheitliche Aussage treffen. Zwar wurde IDO2 bei den Ewing-Tumor-Zelllinien A673, TC32 (Abbildung 18) und den LCL A2+2310, CSIII (Abbildung 20) durch IFN γ -Gabe induziert, aber

bei den restlichen Zelllinien dieser Entitäten war das Expressionsmuster nicht einheitlich.

Die Expression von KYN_U hingegen war vollkommen unbeeinflusst von IFN_γ. Wenn es detektierbar war, dann immer im unstimulierten und stimulierten Zustand in gleichem Maße, z. B. bei LCL73-, CSIII-, A2+2310- (Abbildung 20); THP1-, HeLa- (Abbildung 21) und U87-MG-, 31IGR1-Zellen (Abbildung 22).

3.2.3 *In vitro* Untersuchungen zum möglichen Einfluss vom CD137/CD137L-System auf die Expression vonIDO in Tumorzellen unter Zugabe von definierten IL2-Konzentrationen

Mithilfe des gewählten Analysesystems (siehe Abbildung 11) war es nicht möglich, das Ergebnis des experimentellen Tierversuches *in vitro* eindeutig zu bestätigen. Es konnte zwar deutlich eine Induktion der IDO-Expression durch IL2-transgene Tumorzellen über IFN_γ gezeigt werden, jedoch konnte keine eindeutige Modulation dieser Expression durch den Antikörper gegen CD137 gezeigt werden. Es ist möglich, dass die erhaltenen Ergebnisse auf eine Voraktivierung der PBMC der einzelnen verschiedenen Spender zurückzuführen sind. Zusätzlich ließ sich die Produktion von IL2-transgenen Tumorzellen nicht steuern. Deshalb wurden Versuche mit definierten IL2-Konzentrationen durchgeführt. Eingesetzt wurde *Proleukine*, ein modifiziertes IL2-Derivat der Firma Chiron. Im Ansatz befanden sich zusätzlich noch Wildtyp-A673, PBMC und in den jeweiligen Ansätzen der Antikörper gegen CD137.

Dazu wurden PBMC aus drei untypisierten Rest-Blut-Schichten (BC) und zwei weiteren frisch gewonnenen Blutspenden isoliert, und diese mit unterschiedlichen Mengen IL2 (0, 3000, 6000, 12000, 24000, 30000 und 48000U/ml) inkubiert. Die Ansätze wurden weiterhin mit An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137, wie unter Material und Methoden 2.4.4 beschrieben, vervollständigt. Nach der Kultur von drei Tagen wurden die A673-Zellen geerntet, ihre RNA isoliert und diese mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von IDO untersucht. Der Zellkulturüberstand wurde aufbewahrt und mit Hilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* auf die Konzentration von IFN_γ, TNF_α, IL6, IL10 und IL4 analysiert.

Exemplarisch ist in Abbildung 23 die relative Expression von IDO in der Ewing-Tumor-Zelllinie A673 nach Kokultur (Material und Methoden 2.4.4) mit PBMC aus frischem Blut dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei den niedrigen IL2-Konzentrationen die Anwesenheit des Antikörpers gegen CD137 zu einer Erniedrigung der IDO-Expression führte (siehe 3000U/ml IL2). Bei den höheren Konzentrationen hingegen, führte der Antikörper zu einer Erhöhung der Expression von IDO gegenüber den Ansätzen ohne Antikörper (siehe 24000U/ml IL2). Bei der Analyse der Expression von IDO für die verschiedenen PBMC-Präparationen wurde ein sehr variables Bild erhalten. In Abbildung 24 wurde für fünf PBMC-Präparationen die IDO-Expression für 3000U/ml IL2 in An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137 dargestellt.

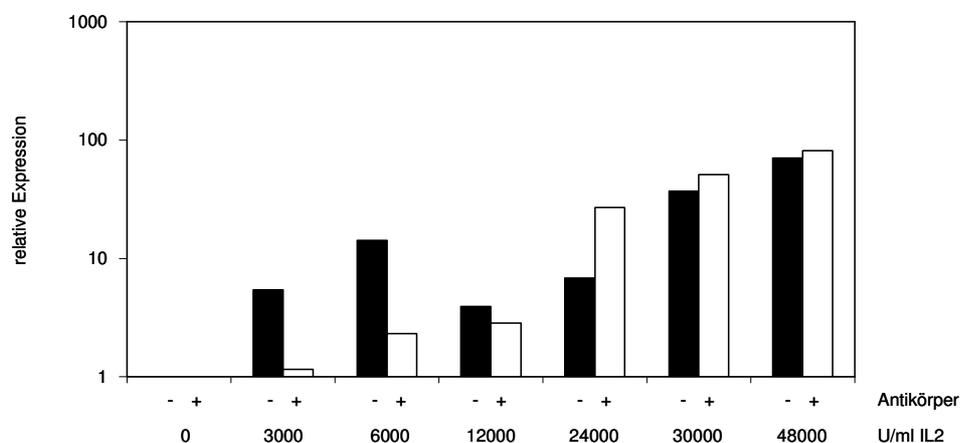


Abbildung 23 Relative Expression von IDO in A673-Zellen nach Kokultur mit PBMC, verschiedenen IL2-Konzentrationen und An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137. A673-Zellen wurden geerntet und ihre RNA aufgereinigt. Untersucht wurde diese dann mittels quantitativer RT-PCR mit Primern für β -Aktin und IDO. Die Berechnungen für die quantitative RT-PCR erfolgten nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Material und Methoden 2.2.5.), wobei die A673-Zellen ohne IL2 und ohne Antikörper als eins gesetzt wurden.

Es lag für das Verhältnis der beiden Ansätze keine statistische Signifikanz vor. Jedoch war eine Tendenz der Erniedrigung der IDO-Expression unter Einfluss des Antikörpers zu erkennen. Die Zytokinbestimmungen mithilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* wurden im Folgenden für drei untypisierte BC-Schichten und zwei frische Blutspenden durchgeführt. Es war zu erkennen, dass ohne Zugabe von IL2 keine Sekretion von $IFN\gamma$ (Abbildung 25) in den Ansätzen stattfand. Der alleinige Einsatz des Antikörpers gegen CD137 führte ohne eine weitere Stimulation nicht zur $IFN\gamma$ -Sekretion. Bei den beiden geringeren Konzentrationen von IL2 (3000 und 6000U/ml) wurde bei Anwesenheit des Antikörpers weniger $IFN\gamma$ sezerniert.

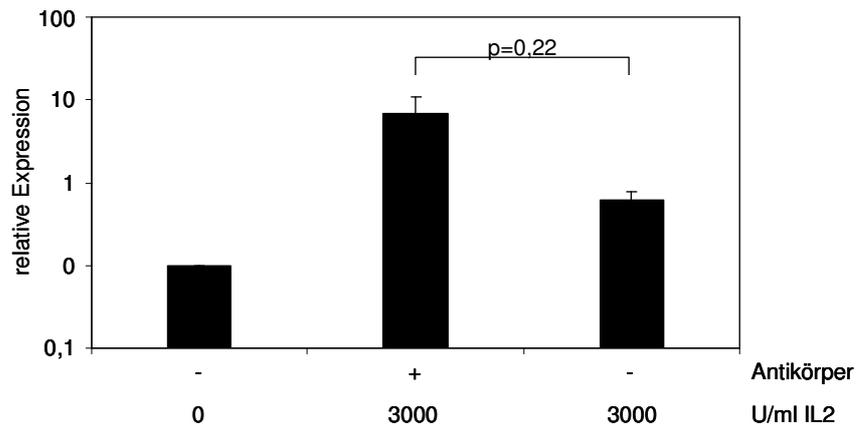


Abbildung 24 Relative Expression von IDO in A673-Zellen nach Kokultur mit PBMC, 0 und 3000U/ml IL2 in An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137. A673-Zellen wurden geerntet und ihre RNA aufgereinigt. Untersucht wurde diese mittels quantitativer RT-PCR mit den Primern für β -Aktin und IDO. Die Berechnungen für die quantitative RT-PCR erfolgten nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Material und Methoden 2.2.5.), wobei die A673-Zellen ohne IL2 und ohne Antikörper als eins gesetzt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert für fünf PBMC-Präparationen mit Standardfehler.

Bei den höheren Konzentrationen waren kaum noch Unterschiede bei An- und Abwesenheit des Antikörpers zu detektieren.

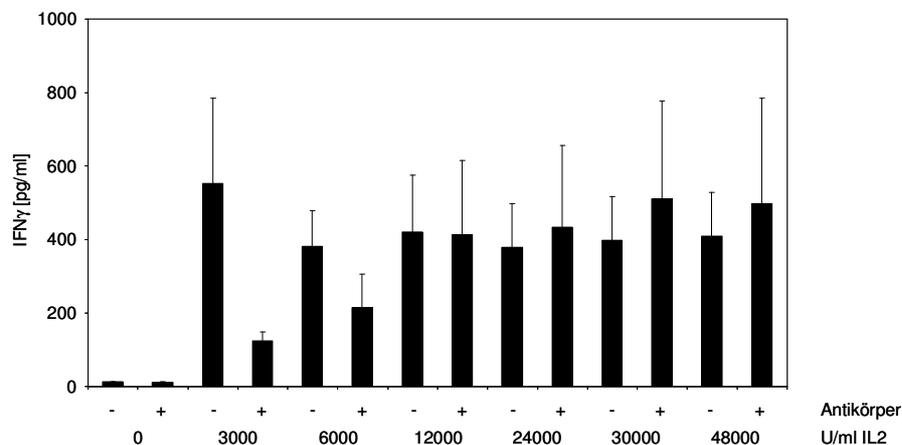


Abbildung 25 Analyse des Zytokins IFN γ in Zellkulturüberständen nach *in-vitro*-Kultivierung. Untersucht wurden Zellkulturüberstände nach *in-vitro*-Kokultur von PBMC und A673-Zellen unter Einfluss von verschiedenen IL2-Konzentrationen und An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137 (Material und Methoden 2.4.4). Gezeigt ist der Mittelwert für fünf unabhängige Ansätze mit Standardfehler.

Da der Einfluss des Antikörpers nicht bei allen eingesetzten PBMC-Präparationen gleich deutlich erkennbar war, wurde als nächstes die Abhängigkeit von IDO zu

IFN γ für die fünf verschiedenen Ansätze untersucht. Es konnte mit $R=0,84$ eine lineare Abhängigkeit von IDO zu IFN γ gezeigt werden (Abbildung 26).

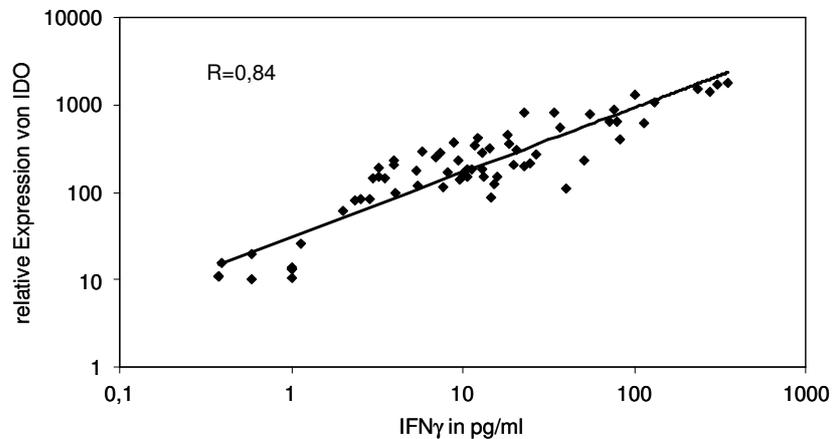


Abbildung 26 Darstellung der linearen Abhängigkeit von IDO zu IFN γ nach *in-vitro*-Kokultur von PBMC und A673-Zellen unter Einfluss verschiedener IL2-Konzentrationen und An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137. Bestimmt wurde die relative Expression von IDO für fünf separate Ansätze. Bestimmt wurde diese mittels quantitativer RT-PCR mit den Primern für β -Aktin und IDO. Die Berechnungen für die quantitative RT-PCR erfolgten nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Material und Methoden 2.2.5.), wobei die A673-Zellen ohne IL2 und ohne Antikörper als eins gesetzt wurden. Die Konzentration von IFN γ wurde mit Hilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* in pg/ml bestimmt. R = Korrelationskoeffizient.

Mithilfe des *CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* wurden weiterhin in den Zellkulturüberständen der einzelnen Ansätze die Zytokine TNF α , IL6, IL10 und IL4 bestimmt.

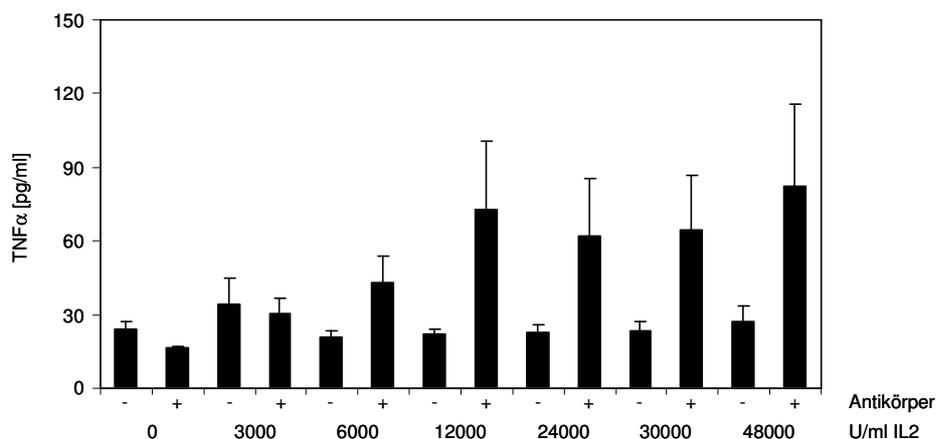


Abbildung 27 Analyse des Zytokins TNF α in Zellkulturüberständen nach *in-vitro*-Kultivierung. Untersucht wurden Zellkulturüberstände nach *in-vitro*-Kokultur von PBMC und A673-Zellen unter Einfluss von verschiedenen IL2-Konzentrationen und An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137 (Material und Methoden 2.4.4). Gezeigt ist der Mittelwert für fünf unabhängige Ansätze mit Standardfehler.

So wurde die Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ in den Zellkulturüberständen der einzelnen Ansätze untersucht (Abbildung 27). Es wurde deutlich, dass die Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ in den Ansätzen ohne Antikörper gegen CD137 weitestgehend gleich blieb (von 20 bis 34pg/ml). Hingegen erhöhte sich bei den Ansätzen mit Antikörper gegen CD137 die Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ stetig. Im Ansatz mit 0U/ml IL2 lag die Konzentration bei 16pg/ml und erhöhte sich beständig bis auf 82pg/ml im Ansatz mit 48000U/ml IL2.

Bei dem Zytokin IL10 (Abbildung 28) hingegen konnten keine Veränderungen durch die Steigerung der IL2-Konzentration beobachtet werden. In den Ansätzen ohne Antikörper gegen CD137 lagen die erhaltenen Daten zwischen 40pg/ml (6000U/ml IL2) bis 60pg/ml (0U/ml IL2). Mit Antikörper waren diese geringer und lagen dort zwischen 20pg/ml (0U/ml IL2) und 30pg/ml (48000U/ml IL2). Dies bedeutet, dass der Antikörper gegen CD137 die Konzentration an IL10 in den zugehörigen Ansätzen um die Hälfte herabsetzte, z. B. hatte bei 3000U/ml IL2 der Ansatz ohne Antikörper 42pg/ml IL10 und mit 22pg/ml.

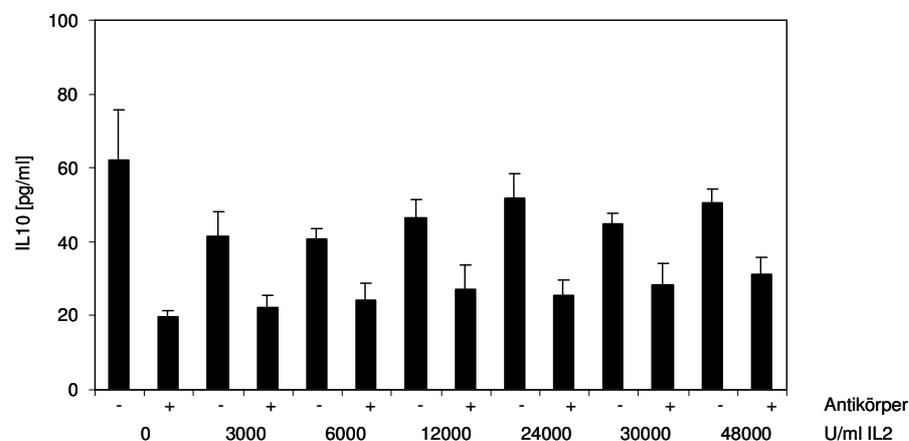


Abbildung 28 Analyse des Zytokins IL10 in Zellkulturüberständen nach *in-vitro*-Kultivierung. Untersucht wurden Zellkulturüberstände nach *in-vitro*-Kokultur von PBMC und A673-Zellen unter Einfluss von verschiedenen IL2-Konzentrationen und An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137 (Material und Methoden 2.4.4). Gezeigt ist der Mittelwert für fünf unabhängige Ansätze mit Standardfehler.

Die Bestimmung der Konzentration von IL6 (Abbildung 29) in den einzelnen Zellkulturüberständen zeigte in den Ansätzen ohne Antikörper gegen CD137 eine leichte Steigerung der Konzentration mit steigender IL2-Konzentration. Dies bedeutete einen Anstieg von 8000pg/ml IL6 bei 0U/ml IL2 bis hin zu 13000pg/ml

IL6 bei 48000U/ml IL2. Bei den Ansätzen mit Antikörper war eine geringere Konzentration IL6 festzustellen. Sie stieg von 1800pg/ml IL6 bei 0U/ml IL2 bis zu 8700pg/ml IL6 bei 48000U/ml IL2 an.

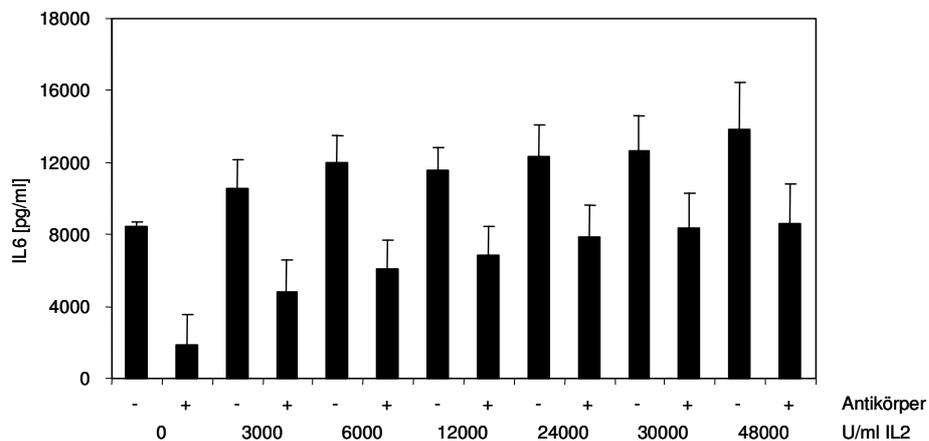


Abbildung 29 CBA-Analyse für das Zytokin IL6. Untersucht wurden Zellkulturüberstände nach *in-vitro*-Kokultur von PBMC und A673-Zellen unter Einfluss von verschiedenen IL2-Konzentrationen und An- und Abwesenheit des Antikörpers gegen CD137 (Material und Methoden 2.4.4). Gezeigt ist der Mittelwert für fünf unabhängige Ansätze mit Standardfehler.

Es wurde ebenfalls die Konzentration für das Zytokin IL4 bestimmt. Dieses war nur in äußerst geringen Mengen detektierbar und zeigte für die einzelnen Ansätze keine Unterschiede in der Konzentration (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Wirkung eines neutralisierenden $\text{INF}\gamma$ -Antikörpers auf IDO-Expression nach Kokultur

Um die erhaltenen Ergebnisse der vorangegangenen Experimente zu untermauern, wurde in einem weiteren Ansatz die Wirkung eines neutralisierenden Antikörpers gegen $\text{INF}\gamma$ im Kokultur-System untersucht. Hierbei wurden die Zellen, wie unter Material und Methoden 2.4.4 beschrieben, mit Zellkultureinsätzen kultiviert.

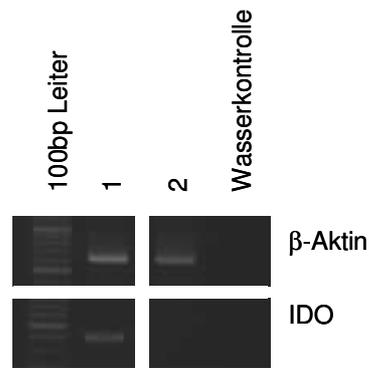


Abbildung 30 Wirkung eines neutralisierenden IFN γ -Antikörpers auf die Expression von IDO in der Tumorzelllinie A673 nach *in-vitro*-Kokulturen mit PBMC und 30000U/ml IL2. A673-Zellen wurden wie in Material und Methoden 2.4.4 kokultiviert, geerntet und ihre RNA isoliert. Untersucht wurde diese mittels konventioneller RT-PCR mit den Primern β -Aktin und IDO. Es entsprechen 1 = A673 + PBMC + 30000U/ml IL2, 2 = A673 + PBMC + 30000U/ml IL2 + 1 μ g/ml IFN γ -Antikörper. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Anstatt des Antikörpers gegen CD137 wurde ein IFN γ neutralisierender Antikörper (1 μ g/ml) eingesetzt. Die Ewing-Tumor-Zelllinie A673 und die PBMC wurden dabei mit 30000U/ml IL2 stimuliert, da sicher war das die A673-Zellen unter diesem Einfluss IDO exprimieren. Die Zellen wurden so für drei Tage kultiviert und anschließend aus den A673-Zellen die RNA isoliert. Es konnte in der konventionellen RT-PCR deutlich gezeigt werden, dass es zu einer Expression von IDO in Gegenwart von 30000U/ml IL2 kam (Abbildung 30). Durch die Anwesenheit des neutralisierenden IFN γ -Antikörpers (1 μ g/ml) wurde die Expression von IDO unterbunden.

3.2.5 Hemmung der Proliferation von PBMC durch IDO exprimierende Tumorzellen

Es wurde anschließend untersucht, ob die Expression von IDO in der Ewing-Tumor-Zelllinie A673 in ähnlicher Weise, wie für MSC beschrieben (Meisel et al. 2004) zu einer verringerten Proliferation von PBMC in einer Kokultur führte. Um A673-Zellen einsetzen zu können, welche IDO exprimieren wurden diese für 3 Tage mit 500U/ml IFN γ inkubiert (IDO-Expression wurde mittels PCR überprüft, Daten nicht gezeigt).

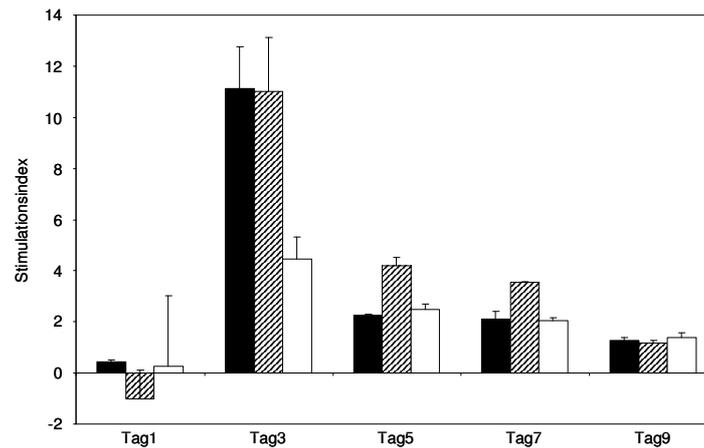


Abbildung 31 Stimulationsindex von PBMC kokultiviert mit +/- IDO exprimierenden A673-Zellen. Die Stimulationsindizes wurden bezogen auf die unstimulierten PBMC. Die PBMC wurden unter Anwesenheit von IL2 (schwarze Balken), IL2 und unstimulierte A673-Zellen (gestreifte Balken), sowie IL2 und IFN γ stimulierte A673-Zellen (= IDO-Expression) (weiße Balken) kultiviert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 9 Tagen kokultiviert und alle 2 Tage wurde eine Proliferationsbestimmung der PBMC durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Triplikate mit Standardfehler.

Es wurden 1×10^5 PBMC (HLA-A1 positiv) und 5×10^4 A673 (mit oder ohne IDO-Expression) in 200 μ l Medium und Anwesenheit von 3000U/ml IL2 zusammen kultiviert (Triplikate). Die Zellen wurden an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 mit dem *Cell Proliferation ELISA BrdU* einem Proliferationstest unterzogen. In Abbildung 31 wurden die Stimulationsindizes (Quotient der stimulierten zu unstimulierten Zellen) der einzelnen Ansätze dargestellt, sie beziehen sich auf die unstimulierten PBMC. Es ist zu erkennen, dass an Tag drei die höchste Proliferation der PBMC zu verzeichnen war. Die PBMC proliferierten in Anwesenheit von IL2 und A673 in gleich starkem Maße, was mit der geringen Immunogenität der Tumorzellen zu erklären ist. Die IDO exprimierenden Tumorzellen führten hingegen zu einer geringeren Proliferation der PBMC.

Es kann somit zusammenfassend festgehalten werden, dass IDO möglicherweise in die Immunsuppression im EFT-Immunotherapie-Modell involviert sein könnte.

Die in diesen Untersuchungen festgestellte mögliche Modulation der IDO-Expression des Antikörpers gegen CD137 in den untersuchten Tumorzellen wurde nun weiter analysiert. Da der Antikörper durch seine räumliche Nähe nur auf die eingesetzten PBMC wirken konnte (siehe Abbildung 11), sollte sein Einfluss auf diese Zellen mithilfe der DNA-Mikroarray-Analyse näher untersucht werden.

3.3 Untersuchung des Einflusses des Antikörpers gegen CD137 auf T-Zellen mithilfe der DNA-Mikroarray-Analyse

Da CD137 besonders stark auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, wurde nun der Einfluss eines Antikörpers gegen CD137 auf T-Zellen mithilfe der DNA-Mikroarray-Analyse genauer untersucht. Hierzu wurden PBMC aus frischem Blut gewonnen und die T-Zellen mittels magnetischer Zell-Sortierung (MACS-Aufreinigung) aus ihnen isoliert. Die durch die DNA-Mikroarray-Analyse erhaltenen Daten wurden validiert und eines der differentiell exprimierten Gene eingehender analysiert.

3.3.1 Vorarbeiten und -untersuchungen für die DNA-Mikroarray-Analyse

Die MACS-Aufreinigung von T-Zellen wurde mit dem *Pan T Cell Isolation Kit II (human)* durchgeführt. Die frisch isolierten PBMC enthielten 55% CD3 positive Zellen, 7% CD19 positive Zellen, 15,7% CD16 + CD56 positive Zellen und 18,4% CD14 positive Zellen (Daten nicht gezeigt). Bei der Aufreinigung wurden CD14-, CD16-, CD19-, CD36-, CD56-, CD123- und Glycophorin A-positive Zellen magnetisch von den CD3-positiven T-Zellen separiert. Somit war es möglich, eine besonders reine T-Zell-Population zu isolieren. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometeranalyse dokumentiert und ist in Abbildung 32 dargestellt.

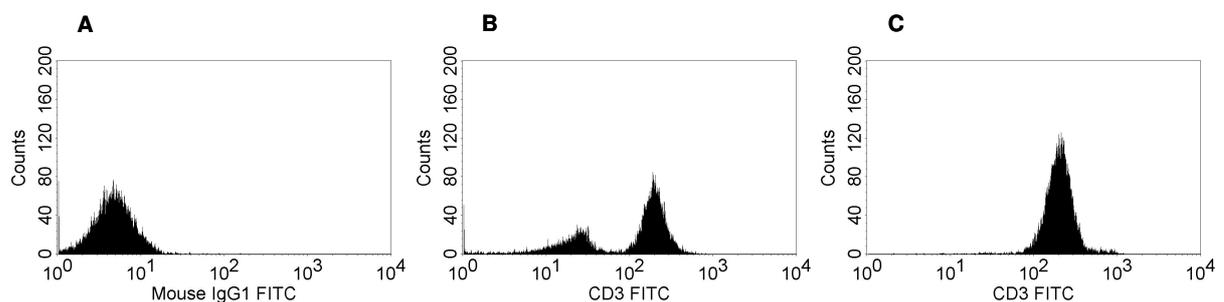


Abbildung 32 Darstellung der Reinheit der T-Zell-Population nach MACS-Aufreinigung. In Bildteil A ist der Isotyp für die CD3-Färbung als Histogramm dargestellt. Bildteil B und C zeigen den Zustand in der CD3-Färbung vor (B) und nach (C) der MACS-Aufreinigung.

Nach der MACS-Aufreinigung waren die T-Zellen zu ca. 99% rein. Die so isolierten T-Zellen wurden für drei Tage in den verschiedenen Stimulationsansätzen, wie

unter Material und Methoden 2.4.5 dargestellt, kultiviert. Folgende Stimulationsansätze wurden mit je 2×10^6 Zellen/ml angesetzt:

- A** Medium ohne weitere Stimulation
- B** Stimulation mit einem Antikörper gegen CD3 (für erstes Signal der T-Zell-Aktivierung)
- C** Stimulation mit einem Antikörper gegen CD3 (für erstes Signal der T-Zell-Aktivierung) und einem Kontroll-Antikörper (Kontroll-Antikörper für den Antikörper gegen CD137)
- D** Stimulation mit einem Antikörper gegen CD3 (für erstes Signal der T-Zell-Aktivierung) und einem Antikörper gegen CD137 (für zweites, kostimulatorisches Signal der T-Zell-Aktivierung).

Nach einer Kultur von drei Tagen wurden die T-Zell-Ansätze geerntet, wobei ein Teil für die DNA-Mikroarray-Analyse in Trizol[®]-Reagenz aufgenommen wurde, um aus diesen Zellen RNA zu isolieren. Der Rest wurde für die Bestimmung der Proliferation weiter bearbeitet.

Die Proliferationsanalyse wurde mit Hilfe des *Cell Proliferation ELISA BrdU* durchgeführt. Hierfür wurden die T-Zellen aus den 24-Loch-Platten geerntet und je 2×10^5 Zellen je 100 μ l (Triplikate) für 2h mit 20 μ M BrdU bei 37°C erneut inkubiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte dann nach Material und Methoden 2.5.3.

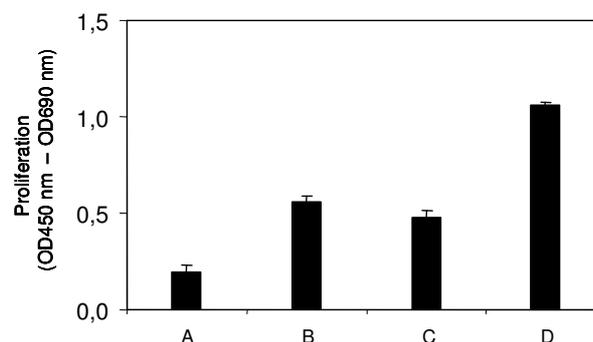


Abbildung 33 Bestimmung der Proliferation der T-Zellen nach drei Tagen in Kultur unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Bestimmung der optischen Dichte bei 450nm (Referenzwellenlänge bei 690nm), als Maß für die Proliferation der T-Zellen. Die Zellen wurden hierfür für zwei Stunden mit BrdU inkubiert. Stimulationsansätze: A = Medium, B = Stimulation mit Antikörper gegen CD3, C = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper, D = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137. Dargestellt ist der Mittelwert von drei Ansätzen mit Standardfehler.

Durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 450nm (Referenzwellenlänge bei 690nm) konnte gezeigt werden, dass schon der Antikörper gegen CD3 allein eine Proliferation der T-Zellen bewirkt (Abbildung 33). Diese konnte durch die Wirkung des CD137-Antikörpers verdoppelt werden. Der Kontroll-Antikörper zeigte hingegen keine solche Wirkung auf die T-Zellen.

3.3.2 DNA-Mikroarray-Analyse

Die DNA-Mikroarray-Analyse wurde mit HG U133Plus 2.0 Mikroarrays der Firma Affymetrix durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden mithilfe der Bild-erfassungs- und Auswertungssoftware (*Microarray Suite 5.0*) auf einen Wert von 500 skaliert. Sie wurden dann in eine Textdatei überführt und mit der Tabellenkalkulation des Programms Excel von Microsoft analysiert. Um hochregulierte SONDENSÄTZE zu identifizieren, wurden nur solche weiter analysiert, deren Signalstärke im Stimulationsansatz D (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137) über 100 lagen. Weiter wurden nur die SONDENSÄTZE als hochreguliert angenommen, bei denen der Stimulationsansatz D (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137) gegenüber Stimulationsansatz B (Stimulation mit Antikörper gegen CD3) und C (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper) um mindestens den Faktor 2 erhöht war. Mit Hilfe dieser Auswertung konnten 110 hochregulierte SONDENSÄTZE bestimmt werden. Um herabregulierte SONDENSÄTZE zu erkennen, wurden nur solche weiter untersucht, die im Stimulationsansatz B (Stimulation mit Antikörper gegen CD3) und C (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper) eine Signalintensität von 150 aufwiesen. Anschließend wurden die SONDENSÄTZE herausgefiltert, welche einen Faktor unter 0,5 bei dem Vergleich von Stimulationsansatz D (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137) zu den Stimulationsansätzen B (Stimulation mit Antikörper gegen CD3) und C (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper) aufwiesen. Dadurch wurden 129 herabregulierte SONDENSÄTZE herausgefiltert. Für die erhaltenen 239 SONDENSÄTZE wurde eine *Cluster*-Analyse mithilfe des Programms Genesis durchgeführt (dargestellt in Abbildung 34).

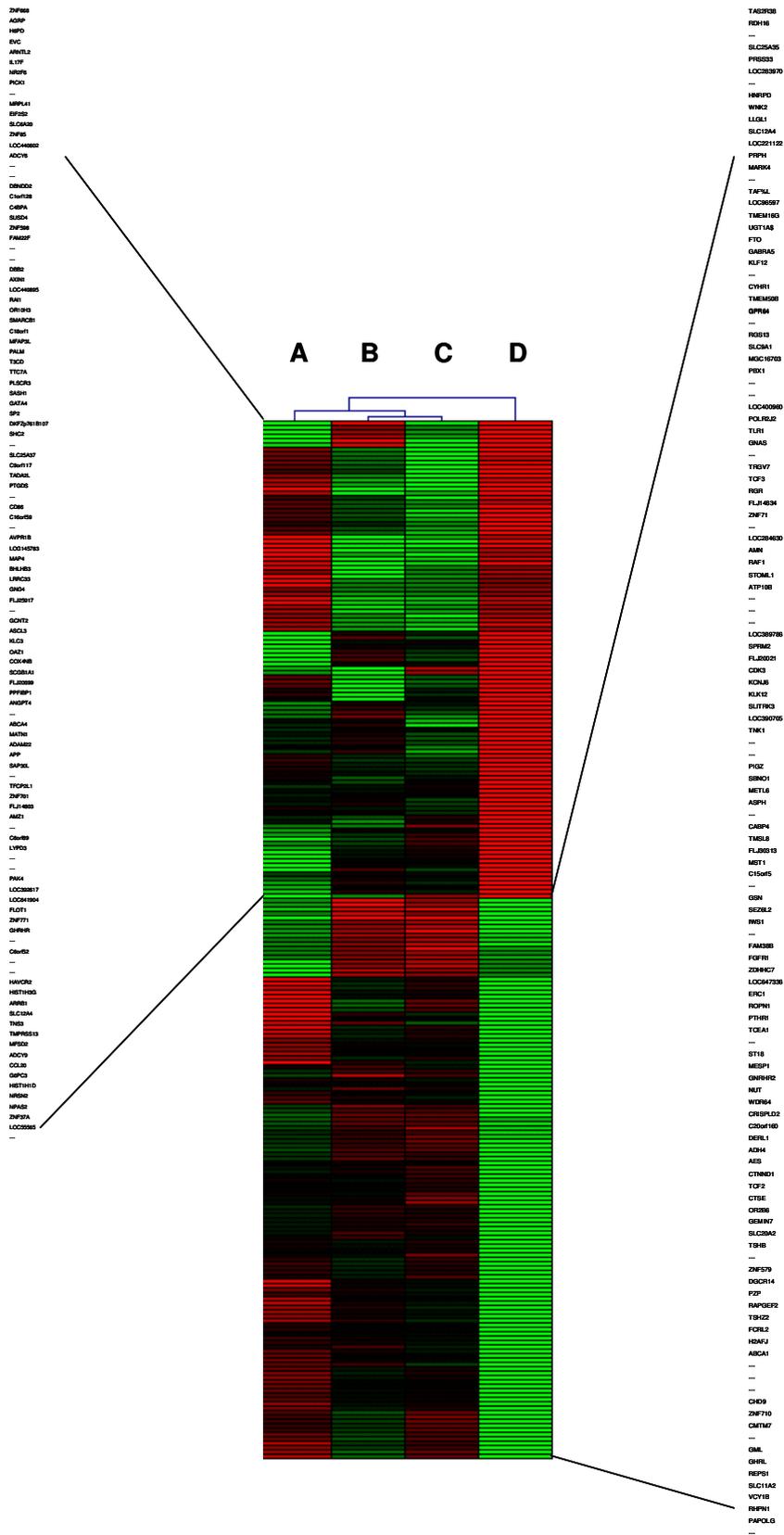


Abbildung 34 DNA-Mikroarray-Analyse (HG U133 Plus 2.0 Mikroarray) nach Stimulation von T-Zellen. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Genesis (logarithmierte und medianzentrierte Rohdaten, Manhattan-Distanz, *complete linkage clustering*). Rote Farbtöne entsprechen hohen, grüne Farbtöne niedrigen Signalintensitäten. Stimulationsansätze: A = Medium, B = Stimulation mit Antikörper gegen CD3, C = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper, D = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137.

Die Daten wurden hierzu logarithmiert und medianzentriert, als Abstandsmaß die Manhattan-Distanz (*complete linkage clustering*) verwendet. Aus dieser Analyse war eindeutig ersichtlich, dass die beiden Stimulationsansätze B (Stimulation mit Antikörper gegen CD3) und C (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper) für viele Sondensätze ähnliche Signalintensitäten aufweisen. Ebenfalls zeigten diese beiden Stimulationsansätze dann eher eine Zugehörigkeit zu Ansatz A (Medium), als zum Ansatz D (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137), welcher sich sehr deutlich von den anderen Ansätzen abgrenzte.

3.3.3 Validierung der DNA-Mikroarray-Analyse

Für die Validierung der Mikroarraydaten wurden Untersuchungen mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt. Bei der Analyse fand sich neben anderen herabregulierten Genen auch ein herabregulierter Sondensatz (244373_at), der einem *expressed sequence tag* (EST) zuzuordnen war. Durch BLAST-Analysen konnte gezeigt werden, dass dieser EST eine hundertprozentige Übereinstimmung mit einem Bereich in einem Intron des Gens *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* (RAF1) aufwies.

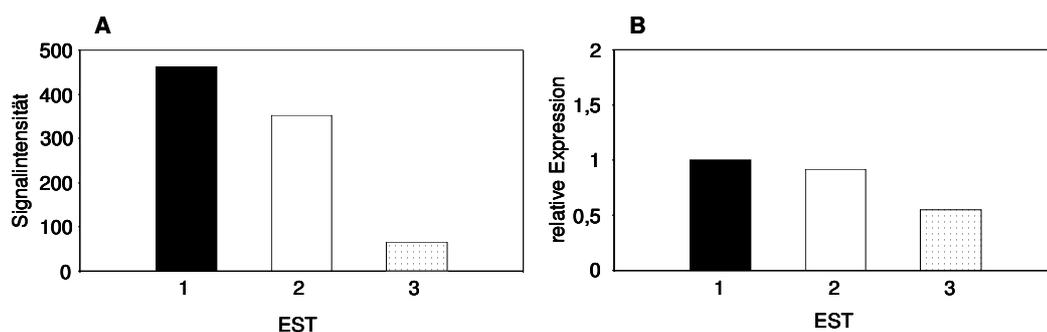


Abbildung 35: Validierung des herabregulierten EST nach DNA-Mikroarray-Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Dargestellt sind die Signalintensitäten für den Sondensatz des EST (Bildteil A). Bildteil B zeigt die zugehörigen relativen Expressionen des EST, welche mit quantitativer RT-PCR ermittelt wurden. Die Berechnung für die quantitative RT-PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Material und Methoden 2.2.5), wobei Stimulationsansatz 1 als eins gesetzt wurde. Stimulationsansätze: 1 = Medium (schwarzer Balken), 2 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper (weißer Balken), 3 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137 (gepunkteter Balken). Als Kalibrator-Gen für die quantitative RT-PCR wurde β -Aktin genutzt.

Das Intron lag im Gen zwischen Exon 10 und 11. Wie Abbildung 35 zeigt, konnte auch für RAF1 mithilfe von Primern, welche spezifisch für Exon 9 und Exon 12 des

RAF1-Gens waren, eine niedrigere Expression von RAF1 in Zellen nach Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137 beobachtet werden.

Unter den herabregulierten Genen wurden weiterhin folgende für eine nähere Analyse ausgewählt: *SLIT and NTRK-like family member 3* (SLITRK3), *pre-B-cell leukemia homeobox 1* (PBX1) und *catenin (cadherin-associated protein), delta 1* (CTNND1). Für die herabregulierten Gene (Abbildung 36) konnten deutliche Veränderung gegenüber Stimulationsansatz 1 (Medium) und Stimulationsansatz 2 (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper) gezeigt werden. Der Stimulationsansatz 1 (Medium) wurde für die quantitative Bestimmung der relativen Expression des einzelnen Genes als eins gesetzt.

Die deutlichen Unterschiede in den Signalintensitäten (Mikroarray-Daten) der einzelnen Gene spiegeln sich allerdings nicht ganz so deutlich in der relativen Expression (quantitative RT-PCR) der einzelnen Gene wieder. So verringerte sich die relative Expression von Stimulationsansatz 3 (Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137) gegenüber Stimulationsansatz 1 (Medium) nur geringfügig. Von dem eins gesetzten Mediumwert wurde SLITRK3 auf 0,6; CTNND1 auf 0,3; PBX1 auf 0,2 und RAF1 auf 0,6 herabgesetzt.

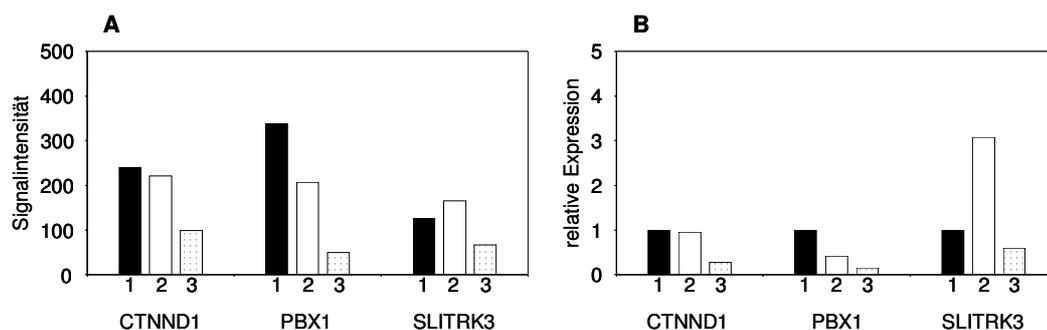


Abbildung 36 Validierung herabregulierter Gene nach DNA-Mikroarray-Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Dargestellt sind die Signalintensitäten für die SONDENSÄTZE der Gene SLITRK3, CTNND1 und PBX1 (Bildteil **A**). Bildteil **B** zeigt die zugehörigen relativen Expressionen der genannten Gene, welche mit quantitativer RT-PCR ermittelt wurden. Die Berechnung für die quantitative RT-PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Material und Methoden 2.2.5), wobei Stimulationsansatz 1 als eins gesetzt wurde. Stimulationsansätze: 1 = Medium (schwarzer Balken), 2 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper (weißer Balken), 3 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137 (gepunkteter Balken). Als Kalibrator-Gen für die quantitative PCR wurde β -Aktin genutzt.

Unter den hochregulierten Genen wurden folgende zur weiterführenden Analyse ausgewählt: Interleukin 17F (IL17F, auch ML1 genannt) und *chemokine CC motif ligand 20* (CCL20, auch MIP3 α , SCAY20 bzw. LARC genannt). Für die hochregulierten Gene IL17F und CCL20 konnte mithilfe konventioneller RT-PCR (Abbildung 37) und quantitativer RT-PCR (Abbildung 38) das Ergebnis der Signalintensität des SONDENSATZES bestätigt werden.

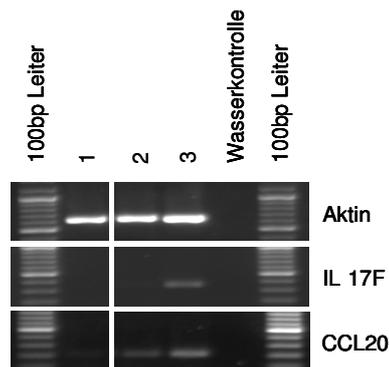


Abbildung 37 Validierung hochregulierten Gene nach DNA-Mikroarray-Analyse mittels konventioneller RT-PCR. Untersucht wurde die cDNA mittels konventioneller RT-PCR mit den Primern für β -Aktin, IL17F und CCL20. Stimulationsansätze: 1 = Medium, 2 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper, 3 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Wie in Abbildung 38 sichtbar, wurde die Expression von IL17F durch die Stimulation mit den Antikörpern gegen CD3 und CD137 gegenüber dem reinen Mediumansatz um das 30-fache und gegenüber der Stimulation mit dem Antikörper gegen CD3 und dem Kontroll-Antikörper um das fast 4-fache erhöht. Bei CCL20 hingegen konnte mit der quantitativen RT-PCR zwar auch eine Erhöhung der relativen Expression gezeigt werden, aber diese war bei weitem nicht so stark. So wurde die Expression von CCL20 im Stimulationsansatz mit den Antikörpern gegen CD3 und CD137 gegenüber dem Medium um das 4-fache und gegenüber dem Ansatz mit Kontroll-Antikörper um das fast 1,5-fache erhöht.

Aufgrund der interessanten immunologischen Funktion wurde das während der DNA-Mikroarray-Analyse als hochreguliert identifizierte Zytokin IL17F, nun in unterschiedlichen *in-vitro*-Kokultur-Experimenten näher untersucht.

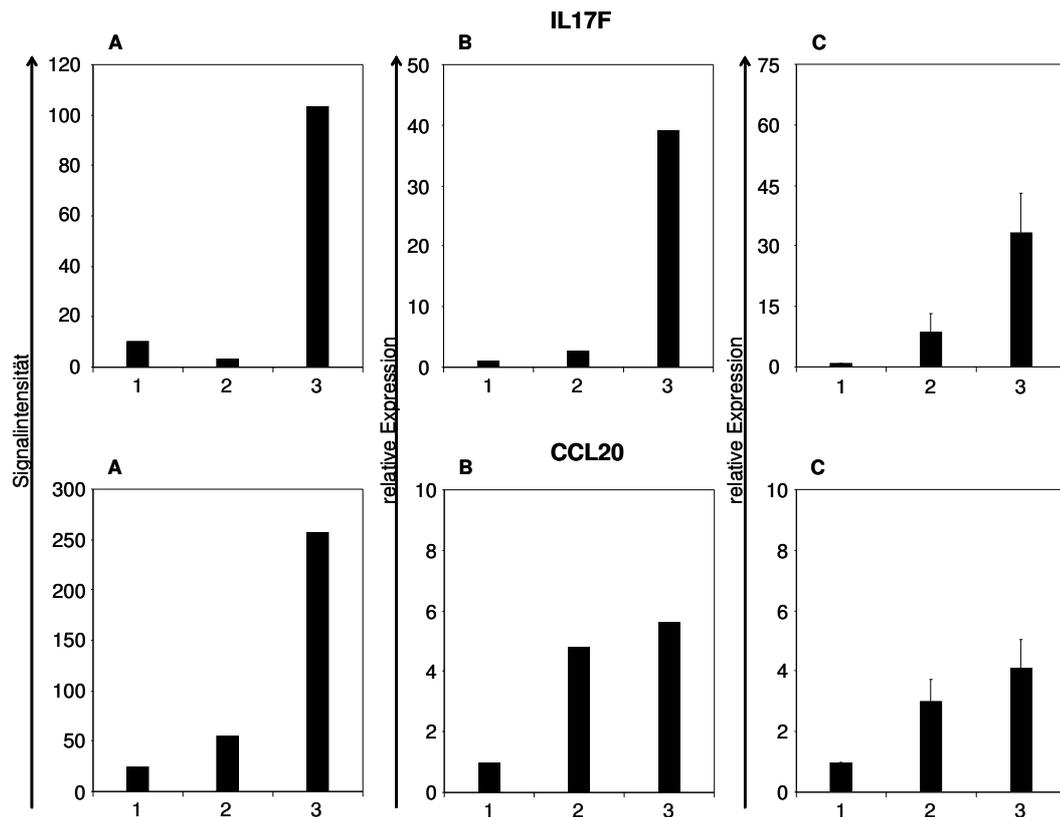


Abbildung 38 Validierung für IL17F und CCL20 nach DNA-Mikroarray-Analyse mittels quantitativer RT-PCR. In Bildteil **A** ist die Signalintensität für den Sondensatz von IL17F und CCL20 dargestellt. Gezeigt ist weiterhin die relative Expression für die gleiche cDNA, welche in der DNA-Mikroarray-Analyse verwendet wurde (Bildteil **B**). In Bildteil **C** ist für vier unabhängige Versuche der Mittelwert mit Standardfehler gezeigt. Die Berechnung für die quantitative RT-PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Material und Methoden 2.2.5), wobei Stimulationsansatz 1 als eins gesetzt wurde. Stimulationsansätze: 1 = Medium, 2 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper, 3 = Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und dem Antikörper gegen CD137.

3.3.4 Einfluss von IL17F auf die Kokultivierung der Ewing-Tumor-Zelllinie SK-N-MC mit PBMC

Als ein erstes Experiment wurden SK-N-MC-Tumorzellen (EFT) und PBMC in einem Verhältnis von 1:5 für eine Dauer von drei Tagen in einer 6-Lochplatte kokultiviert. Ihnen wurden ansteigende Konzentrationen des Zytokins IL17F zugesetzt (0, 1, 10 und 100ng/ml). Die Zellen wurden nach der Ernte einer Durchflusszytometeranalyse unterzogen. Die Tumorzellen wurden dabei mit CD117 und die PBMC mit CD45 angefärbt. Die Anwesenheit IL17F in den einzelnen Ansätzen hatte keinen Effekt auf das Überleben der Tumorzellen und/oder die Proliferation der PBMC (Abbildung 39). Auch die Steigerung der Konzentration des Zytokins

hatte keine Wirkung auf das Überleben der Tumorzellen und/oder die Proliferation der PBMC.

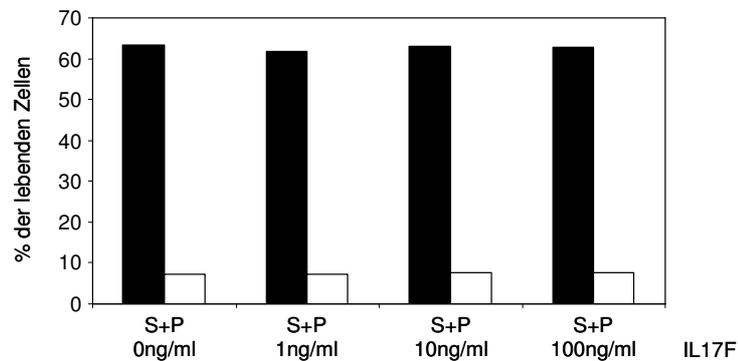


Abbildung 39 Tumorzell-Überleben nach *in-vitro*-Kokultur unter Einfluss verschiedener IL17F-Konzentrationen mittels Durchflusszytometeranalyse. Eingesetzt wurden SK-N-MC ($2,5 \times 10^5$ Zellen) und PBMC (1×10^6 Zellen), welche für drei Tage unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen IL17F (0, 1, 10 und 100 ng/ml) kultiviert wurden. Mittels Durchflusszytometeranalyse wurden die Tumorzellen (schwarze Balken) mit CD117 und die PBMC (weiße Balken) mit CD45 angefärbt, und aus der lebenden Zell-Population bestimmt.

Da die Möglichkeit bestand, dass IL17F seine Wirkung nur in Gegenwart aktivierter T-Zellen entfaltet, sollte sein Einfluss in Anwesenheit von *Proleukine*, einem modifizierten IL2-Derivat der Firma Chiron, getestet werden. In diesem Kokultur-Experiment wurden SK-N-MC und PBMC wieder in einem Verhältnis von 1:5 in einer 6-Lochplatte gehalten. Ihnen wurden verschiedene Konzentrationen von IL2 (0, 300, 3000 und 30000U/ml) zugesetzt und die Zellen in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL17F für drei Tage kultiviert wurden. Die Zellen wurden nach der Ernte einer Durchflusszytometeranalyse unterzogen (Tumorzellen = CD117, PBMC = CD45). Bei den IL2-Konzentrationen zwischen 300 und 30000U/ml konnten keine Unterschiede im Überleben der Tumorzellen erkannt werden, da in allen Ansätzen keine lebenden Tumorzellen mehr nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Unterschiede in den einzelnen Ansätzen waren auch bei den PBMCs nicht zu erkennen.

Bei einer Konzentration von 30U/ml IL2 hingegen konnte eine IL17F abhängige Unterdrückung des Tumorwachstums beobachtet werden (siehe Abbildung 40). Dabei konnten im Ansatz mit ausschließlich Tumorzellen und PBMC unter den lebenden Zellen 65% SK-N-MC und 25% PBMC detektiert werden. Durch die Zugabe von 30U/ml IL2 erhöhte sich die Anzahl der PBMC auf 43% und die Anzahl der Tumorzellen reduzierte sich auf 34%.

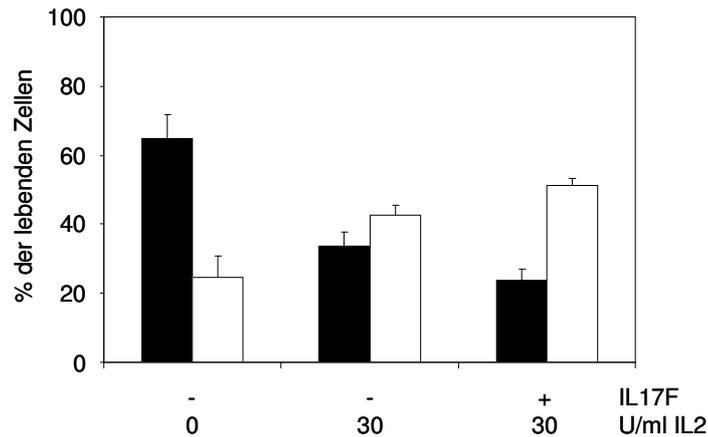


Abbildung 40 Analyse mittels Durchflusszytometer zum Überleben von Tumorzellen nach *in-vitro*-Kultur mit 30U/ml IL2 in An- und Abwesenheit von 100ng/ml IL17F. Es wurden SK-N-MC ($2,5 \times 10^5$ Zellen) (schwarze Balken) und PBMC (1×10^6 Zellen) (weiße Balken) für drei Tage unter Einfluss von 30U/ml IL2 in An- und Abwesenheit von 100ng/ml IL17F kultiviert. Mittels Durchflusszytometeranalyse wurden die Tumorzellen mit CD117 und die PBMC mit CD45 angefärbt. In die Analyse wurden alle Zell-Populationen mit Ausnahme der toten Zellen einbezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardfehler.

Die Anwesenheit von IL17F führte zu einem noch stärkeren Absterben der Tumorzellen auf 24% und die Proliferation der PBMC wurde noch weiter auf 52% gesteigert.

3.3.5 Einfluss von IL17F auf die Expression von IDO in Tumorzellen

Da IL17F durch den Antikörper gegen CD137 in T-Zellen induziert wurde (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38), bestand auch die Möglichkeit, dass IL17F in unserem *in-vitro*-Tumormodell (siehe Abbildung 11) zu einer Inhibierung der IDO-Expression in den Ewing-Tumor-Zellen führte. Daher wurde analysiert, ob in diesem *in-vitro*-Modell die Gabe von IL17F die gleiche Wirkung auf die Expression von IDO hatte, wie der Einsatz des Antikörpers gegen CD137.

Hierzu wurden die Zellen in An- und Abwesenheit von 3000 U/ml IL2 (Abbildung 24), Antikörpern gegen CD137 oder IL17F kokultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von IL17F nicht zur Inhibierung der IDO-Expression führt (siehe Abbildung 41).

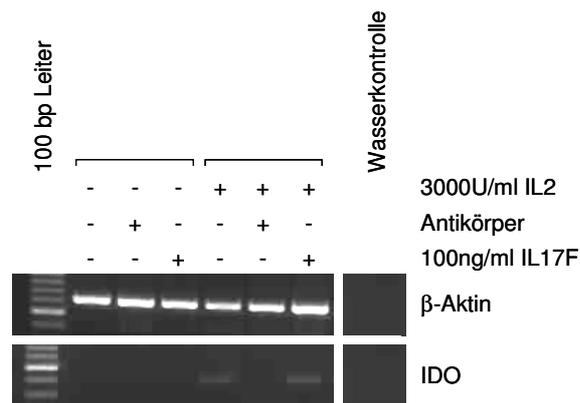


Abbildung 41 Wirkung von einem Antikörper gegen CD137 oder IL17F auf die Expression von IDO in der Tumorzelllinie A673 in einer *in vitro* Kokultur mit PBMC. A673-Zellen wurden geerntet und ihre RNA isoliert. Untersucht wurde diese dann mittels konventioneller RT-PCR mit den Primern für β -Aktin und IDO. In allen Ansätzen wurden die A673-Zellen kokultiviert mit HLA-kompatiblen PBMC. 100bp Leiter = Längenstandard, Wasserkontrolle = Negativkontrolle.

Somit konnte gezeigt werden, dass der Antikörper gegen CD137 in diesem *in vitro*-Modell nicht über IL17F zur Inhibierung der IDO-Expression in den Tumorzellen führte.

4 Diskussion

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte in einem Tiermodell für die Immuntherapie des Ewing-Tumors durch IL2-transgene Tumorzellen die tumorgerichtete Immunantwort verbessert werden. Die induzierte Immunantwort beruhte hierbei in erster Linie auf einer starken Aktivierung von NK-Zellen (Staege et al. 2004a). Da für lang anhaltende Immunantworten die Aktivierung von T-Zellen erforderlich ist, sind für dieses immuntherapeutische Modell Verbesserungen notwendig. Der Einsatz kostimulatorischer Signale, wie diese durch das CD137/CD137L-System vermittelt werden, könnte hierfür eine Möglichkeit darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte dieses Systems unter besonderer Berücksichtigung des Ewing-Tumor-Modells untersucht.

4.1 Expression von CD137 und CD137L

Mithilfe der Genexpressionsanalyse wurden verschiedene Zellarten auf die Expression von CD137 und CD137L untersucht. Der kostimulatorische Rezeptor konnte dabei in den Datensätzen der verwendeten T-Zellpopulationen nicht nachgewiesen werden. Da es sich bei den untersuchten Zellen nicht um aktivierte Zellen handelte, war dies auch nicht zu erwarten. Die geringe Expression in Proben der untersuchten Monozyten, war vergleichbar mit den Ergebnissen einer Analyse, bei der Monozyten gesunder Spender untersucht wurden (Kienzle und von Kempis 2000). Die relativ starke Expression in Makrophagen ist seit einiger Zeit bekannt (Setareh et al. 1995). Die starke Expression von CD137 in anaplastischen großzelliger Lymphomen wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben, passt jedoch zum T-Zellcharakter dieser Zellen (Harris et al. 1994). Der zugehörige kostimulatorische Ligand konnte sehr stark in lymphoblastoiden Zelllinien nachgewiesen werden. Diese stellen eine Gruppe aktivierter antigenpräsentierender Zellen (B-Zellen) dar. Für diesen Zelltyp ist die Expression von CD137L seit einiger Zeit bekannt (Vinay und Kwon 1998, Laderach et al. 2003).

Bei der Genexpressionsanalyse von Hodgkin-Lymphom-Zelllinien konnte beobachtet werden, dass diese entweder den kostimulatorischen Rezeptor oder den Liganden höher exprimierten. Durch die Analyse der Immunglobulingene konnte

gezeigt werden, dass der größte Teil der HL-Zellen in B-Zellen ihren Ursprung nehmen (Braeuninger et al. 1997), die Tumorzellen weisen aber nur vereinzelte lymphozytäre (B-Zell-) Marker auf (Schwering et al. 2003). Daneben jedoch können unter den Tumorzellen auch Zellen mit T-Zell-Charakter (Drexler et al. 1992) und Zellen mit myelomonozytären Merkmalen nachgewiesen werden (Bargou et al. 1992). Die Expression von CD137L durch die Zelllinien L-1236 und KM-H2 weist darauf hin, dass diese Zellen den Charakter antigenpräsentierender Zellen tragen. Die Zelllinien weisen laut DSMZ-Datenbank auch in ihrem Expressionsprofil solche Antigene auf (z. B. CD15, CD80 bei L-1236 und CD14, CD15, CD21 bei KM-H2). Die Linien L-540 und HDLM-2 exprimieren stark den kostimulatorischen Rezeptor, was auf einen T-Zell-Charakter hindeutet. Auch für sie sind schon weitere Antigene (z. B. CD2, CD25 bei L-540 und CD4, CD25 bei HDLM-2), die diese Einordnung unterstützen, bekannt. Durch eine weiterführende Analyse der DNA-Mikroarraydaten konnte ein weiteres Gen, Interleukin 26 (IL26), identifiziert werden, welches diese Hypothese und Zuordnung der einzelnen Zelllinien unterstützt (Föll et al. 2008b). IL26 ist bisher bekannt als Zytokin welches nach einer Infektion mit *Herpesvirus saimiri* (HVS) in T-Zellen induziert wird. Es wird vermutet, dass IL26 für die Stimulation des Wachstums und die spontane Proliferation von T-Zellen nach Infektion durch HVS (Knappe et al. 2000) verantwortlich ist. Weiterhin unterstützend für den T-Zell-Charakter IL26-exprimierender Hodgkin-Lymphom-Zellen ist auch, dass anaplastisch großzellige Lymphome (haben T-Zell-Charakter) ebenfalls IL26 exprimieren (Iqbal et al. 2010). Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse ist es also möglich, verschiedene Hodgkin-Lymphom-Zelllinien unterschiedlichen Lymphozyten-Phänotypen zuzuordnen. In unseren Untersuchungen bestand eine Korrelation zwischen dem T-Zell-Charakter von L-540 und HDLM-2 und der Sensitivität gegenüber dem Zellzyklusinhibitor Roscovitin (Föll et al. 2008b). Es ist bekannt das Hodgkin-Lymphome mit T-Zell-Charakteristika eine unvorteilhaftere Prognose haben (Niedobitek et al. 2002), aus diesem Grund könnte eine Behandlung mit Roscovitin eine attraktive Behandlungsoption gerade für diese Lymphome darstellen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometeranalyse wurden verschiedene Tumorzelllinien auf die Expression von CD137L untersucht. Es ist bekannt das CD137L auf verschiedenen humanen Karzinomzelllinien, auf soliden Tumoren, auf Zellen der akuten Leukämie, sowie auf Zellen von B- und T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

exprimiert wird (Mullauer et al. 1998, DeBenedette et al. 1999a, Salih et al. 2000, Salih et al. 2001, Palma et al. 2004). Zur Kontrolle der Funktionstüchtigkeit des genutzten Antikörpers für die Durchflusszytometrie wurden Zelllinien auf die Expression von CD137L untersucht, für die eine Expression des kostimulatorischen Liganden schon bekannt war, die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi und die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa. Für die Linie Daudi wurde die Expression von CD137L durch Zhou und Kollegen gezeigt (Zhou et al. 1995). Die untersuchten Daudi-Zellen exprimierten deutlich CD137L, diese Expression konnte durch eine 24-stündige Inkubation mit LPS noch gesteigert werden. Durch Li et al. konnten mit Hilfe einer cDNA-Bank der Zelllinie HeLa CD137L-Transkripte in diesen Zellen nachgewiesen werden (Accession-Number: CR624086). Aus diesem Grund wurde auch diese Zelllinie mittels Durchflusszytometeranalyse auf die Expression von CD137L untersucht. So wurde durch eine extrazelluläre Färbung gezeigt, dass nur eine geringe Menge der lebenden Zellen auf der Oberfläche CD137L exprimieren, intrazellulär hingegen war es möglich, beinahe in allen lebenden Zellen den kostimulatorischen Liganden nachzuweisen. Es ist wahrscheinlich, dass einige der Zellen lösliches CD137L freisetzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung des löslichen Liganden signifikant mit der Progression der Erkrankung in Patienten mit akuter myeloider Leukämie und Non-Hodgkin-Lymphomen einhergeht. Somit könnte lösliches CD137L als ein immunologischer Marker für Krankheitsüberwachung und Therapieplanung genutzt werden (Hentschel et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit für verschiedene Experimente verwendete Ewing-Tumor-Zelllinie A673 keine Expression des kostimulatorischen Liganden aufwies. Die Zelllinie war somit für weiterführende Experimente prädestiniert, um durch gezielte Gabe von Antikörpern gegen CD137 oder Transfektion der Zelllinie mit CD137L eine gezielte Stimulation über das CD137/CD137L-System zu erzeugen. Die Transfektion der Linie A673 mit CD137L-tragenden Expressionsvektor führte bei ca. der Hälfte der lebenden Zellen zu einer Expression von CD137L auf ihrer Oberfläche.

Die mithilfe der Durchflusszytometrie für die Zelllinie erhaltenen Daten wurden durch die Genexpressionsanalyse untermauert. Es wurden Datensätze von verschiedenen Ewing-Tumor-Proben, unterschiedlichen Geweben und lymphoblastoiden Zellen (LCL) auf die Expression von CD137 und CD137L untersucht.

So konnte für den kostimulatorischen Rezeptor CD137 nur eine sehr geringe oder gar keine Expression in allen drei untersuchten Gruppen gezeigt werden. Der kostimulatorische Ligand wies eine starke Expression in LCL auf, in Ewingtumorproben und verschiedenen Geweben war auch er nicht nachweisbar. Somit wurde die durch die Durchflusszytometrie erhaltenen Daten für die Expression von CD137L mit einer weiteren Methode bestätigt, auch in anderen Ewing-Tumorproben war nur eine geringe oder keine Expression feststellbar.

4.2 Einfluss des CD137/CD137L-Systems auf die Expression der Indolamin-2,3-dioxygenase

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des CD137/CD137L-Systems in einem bereits durch unsere Arbeitsgruppe etablierten immuntherapeutischen Modell für EFT analysiert. Die Familie der Ewing-Tumore zeichnet sich durch eine sehr geringe Immunogenität aus, aber mithilfe von transgen exprimiertem IL2 durch die Ewing-Tumor-Zelllinie A673-Zellen konnte die immunstimulatorische Aktivität gegen diese Ewing-Tumor-Zellen gesteigert werden. Diese durch die IL2-Expression vermehrte Antitumor-Antwort gegen A673 wurde durch eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung von tumorspezifischen T-Zellen und NK-Zellen vermittelt (Staege et al. 2004a). Trotz der gesteigerten immunstimulatorischen Aktivität konnte das Wachstum der Tumorzellen nicht vollständig unterdrückt werden, so dass eine weitere Modifizierung des Tiermodelles notwendig erschien.

In Tiermodellen für die Sarkomzelllinie Ag104 und die Mastozytomzelllinie P815, beides ebenfalls niedrig immunogene Tumore, konnte das Wachstum der Tumore durch die Gabe von stimulierenden Antikörpern gegen CD137 gestoppt werden (Melero et al. 1997). Des Weiteren konnte für einige primäre CD137L exprimierende Ewing-Tumore gezeigt werden, dass in den Patienten tumorreaktive T-Zellen (CD3+ und CD137+) existieren, die in einem Xenografttransplantationsmodell das Wachstum und die Metastasierung des Tumors kontrollieren können (Zhang et al. 2003).

Es wurde daher versucht beide Stimuli (Aktivierung der T-Zellen durch IL2 und ihre Kostimulation über CD137) gleichzeitig einem Modell einzusetzen. Auch dies

fürhte in der Maus nicht zum Rückgang des Tumors (Kühnöl 2009), was den Verdacht nahe legte, dass die Tumorzellen durch einen Escape-Mechanismus dem Immunsystem entkamen. Das in Abbildung 42 dargestellte Modell für die Wechselwirkung von IL2, IFN γ und IDO erscheint aufgrund der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zur Erklärung derartiger Escape-Phänomene geeignet. Nachdem Munn und Kollegen zeigten, dass IDO eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Immunität und Verhinderung einer T-Zell-Reaktion auf Föten während der Schwangerschaft in der Maus spielt (Munn et al. 1998), wurde die Funktion dieses Enzyms auch für den Immunescape von Tumoren interessant. So konnte für die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa gezeigt werden, dass diese ko-kultiviert mit PBMC und unter Einfluss von IL2 die Proliferation von T-Zellen über einen IDO-abhängigen Mechanismus hemmt (Logan et al. 2002). Bis jetzt ist noch unklar, wie dieser immunsupprimierende Effekt durch IDO erzeugt wird, aber es existieren zwei Theorien, die diesen Mechanismus erklären sollen. Die Tryptophan-Hunger-Theorie beruht auf der Tatsache, dass der Verlust von Tryptophan bei T-Zellen zu einem Zellzyklusarrest (Munn et al. 1999) und zur Apoptose (Lee et al. 2002) führt. Bei der Tryptophan-Metabolit-Theorie sind die toxischen Metabolite des Tryptophanstoffwechsel entscheidend. Sie führen zu einem Zellzyklusarrest und zur Apoptose von Lymphozyten (Fallarino et al. 2003). Außerdem bewirken sie eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (Chen et al. 2008). In dem hier untersuchten Modell konnte in dem Tumor eine Expression von IDO nachgewiesen werden, welcher in Gegenwart von PBMC und IL2-transgenen Tumorzellen entstand. Die Tumore welche in den Tieren mit Kontroll-Behandlung (Behandlung nur mit PBMC, Behandlung mit PBMC und Kontroll-transgenen Tumorzellen) entstanden, wiesen keine Expression von IDO auf. Auch bei Anwesenheit von IL2-transgenen Tumorzellen und CD137L-transgenen Tumorzellen konnte keine Expression des immunsuppressiven Enzyms nachgewiesen werden. Bei diesem experimentellen Ansatz wurde folglich die Expression von IDO in den Tumorzellen durch die Aktivierung über das CD137/CD137L-System gehemmt. Bei der weiteren Analyse dieser Phänomene *in vitro* zeigten die unterschiedlichen Spender deutlich ein variables Verhalten. So konnte zwar auch das Ergebnis aus dem *in vivo* Versuch (Induktion von IDO durch IL2-transgene Tumorzellen und Inhibierung der IDO-Expression durch IL2-transgene Tumorzellen und den Antikörper gegen CD137) bestätigt

werden, jedoch traten auch Reaktionsmuster auf. Bei einigen Spendern wurde durch den Einsatz des Antikörpers gegen CD137 keine Inhibierung der IDO-Expression erzielt, bei anderen Spender wurde in allen Ansätzen IDO exprimiert unabhängig von den IL2-transgenen Tumorzellen und wieder andere zeigten in keinem der Ansätze eine Expression von IDO.

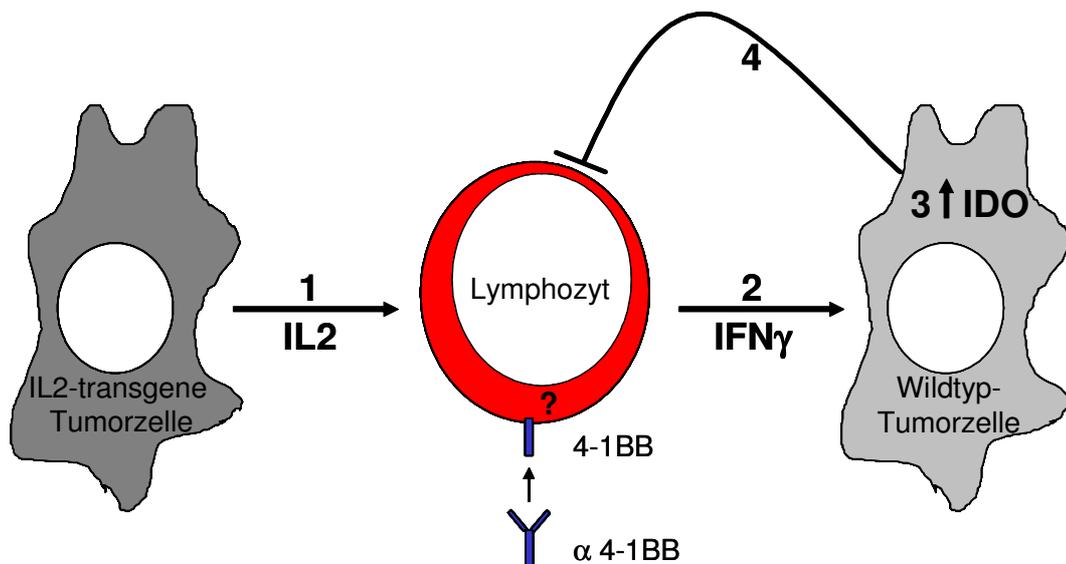


Abbildung 42 Modell zur Induktion der IDO-Expression durch IL2-transgene Tumorzellen. Hierbei kommt es zur Sekretion von IL2 durch die genetisch veränderten Tumorzellen (1), dies induziert dann die Sekretion von IFN γ durch die anwesenden Lymphozyten (2). Das gebildete IFN γ induziert in den Wildtyp-Tumorzellen die Expression von IDO (3) und dies führt dann nachfolgend zur Inhibition der Immunreaktion (4). Der Einsatz des Antikörpers gegen CD137 könnte dabei möglicherweise die IFN γ -Sekretion der Lymphozyten modulieren. Abbildung nach Max et al. 2009.⁶

Bei der weiteren Analyse dieser Phänomene *in vitro* zeigten die unterschiedlichen Spender ein variables Verhalten. So konnte zwar auch das Ergebnis aus dem *in vivo* Versuch (Induktion von IDO durch IL2-transgene Tumorzellen und Inhibierung der IDO-Expression durch IL2-transgene Tumorzellen und den Antikörper gegen CD137) bestätigt werden, jedoch traten auch andere Reaktionsmuster auf. Bei einigen Spendern wurde durch den Einsatz des Antikörpers gegen CD137 keine Inhibierung der IDO-Expression erzielt, bei anderen Spender wurde in allen Ansätzen IDO exprimiert unabhängig von den IL2-transgenen Tumorzellen und wieder andere zeigten in keinem der Ansätze eine Expression von IDO. Durch die anschließend durchgeführte Zytokinbestimmung konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Spender mit unterschiedlicher IFN γ -Produktion auf das zugefügte

⁶ Die hier beschriebenen Daten wurden teilweise bereits veröffentlicht. Siehe Max et al. 2009b.

IL2 reagierten. Diese Reaktion ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Voraktivierung der eingesetzten PBMC zurückzuführen. Die Expression von IDO korrelierte in allen Ansätzen nicht mit der IL2-Menge, sondern mit dem durch die PBMC gebildeten IFN γ nach dem IL2-Stimulus. Beim Vergleich der Ansätze in denen der Antikörper gegen CD137 die Expression von IDO hemmte oder nicht hemmte, war deutlich zu sehen das durch die IL2-transgenen Tumorzellen unterschiedliche Mengen an IL2 freigesetzt wurden. Schon diese geringen Unterschiede führten möglicherweise zu veränderten IFN γ -Mengen.

Aus diesem Grund und mit dem Wissen aus der Literatur, dass IDO in verschiedenen PBMC-Typen, verschiedenen Tumorzelllinien und MSC induziert werden kann (Carlin et al. 1987, Werner-Feldmayer et al. 1989, Meisel et al. 2004), wurde der Einfluss von IFN γ auf die Expression von IDO, und zwei weiteren Enzymen des Tryptophanstoffwechsels (IDO2 und KYNU) in Zelllinien unterschiedlichster Entitäten analysiert. In Tabelle 6 wurde nochmals die Induktion der Expression von IDO in den Zelllinien zusammenfassend dargestellt.

Für verschiedene in dieser Arbeit untersuchte Zelllinien konnte das erhaltene Ergebnis der Induktion von IDO durch IFN γ in Daten aus anderen Untersuchungen bestätigt werden, z. B. für die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa (Takikawa et al. 1988, de la Maza et al. 1988, Chen et al. 2007, Löb et al. 2009), für die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y (Werner- Feldmayer1989, Miyazaki et al. 2009), für die Glioblastomzelllinie U87MG (Miyazaki et al. 2009).

Tabelle 6 Zusammenfassung der IDO-Expression der untersuchten Zelllinien. Darstellung der IDO-Expression unter Anwesenheit von IFN γ für mesenchymale Stammzellen (MSC), Ewing-Tumor- (A673, SK-N-MC, TTC-466, TC-32, TC-71, RD-ES, STA-ET8 und SK-ES1), Neuroblastom- (IMR32, SH-SY-5Y), Fibrosarkom- (HT-1080), Zervixkarzinom- (HeLa), Glioblastom- (U87-MG), Melanom- (518A2, 31IGR1), Schilddrüsenkarzinom- (B-CPAP, FTC-133, HTh 74, 8505C), Hodgkin-Lymphom- (L1-236, L-540, HDLM-2, KM-H2), Leukämie- (THP1, K562, HL-60, Jurkat), lymphoblastoide Zelllinien (LCL-73, CSIII, A2+2310, EREB2-5, P4936).

Zelllinien mit gesteigerter Expression von IDO nach IFN γ -Stimulation	Zelllinien ohne gesteigerte Expression von IDO nach IFN γ -Stimulation
A673, SK-N-MC, TTC-46 TC-32, TC-71, RD-ES, STA-ET8, SK-ES1	LCL-73, CSIII, A2+2310, EREB2-5, P-4936
IMR32, SH-SY5Y	L-1236, L-540, HDLM-2, KM-H2
HT-1080, HeLa	THP1, K562, HL-60, Jurkat
U87-MG, 518A2, 31IGR1, B-CPAP, FTC-133, HTh 74, 8505C	

Die Induktion von IDO konnte in verschiedenen Melanom-Zelllinien in einer unabhängigen Arbeit gezeigt werden. Die hier untersuchten Zelllinien 518A2 und 311GR1 wurden dabei nicht mit analysiert, zeigen aber die gleiche Induktion durch IFN γ (Chen et al. 2007). Des Weiteren ist auch für verschiedene Leukämie-Zelllinien beobachtet worden, z. B. HL-60-Zellen (Ozaki et al. 1988) und Jurkat-Zellen (Chen et al. 2007), dass eine Stimulation mit IFN γ bei ihnen nicht zu einer Expression von IDO führt. Für die akute monozytische Leukämie-Linie THP1 konnte in der hier vorgelegten Arbeit keine Induktion von IDO nach IFN γ -Gabe gezeigt werden, in einer früheren Arbeit konnte aber für diese Zelllinie nach Einsatz einer höheren IFN γ -Dosis die Enzymaktivität von IDO, also der Abbau von Tryptophan im Zellkulturüberstand, mithilfe der HPLC nachgewiesen werden (Ozaki et al. 1988, Edelstein et al. 1989). Die erreichte Aktivität von IDO war im Vergleich mit den anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien relativ gering. Für die Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Induktion von IDO mithilfe der auf der mRNA basierenden PCR-Methode nachgewiesen werden. In einer früheren Arbeit wurde für diese Zelllinie postuliert, dass sie nach IFN γ -Gabe kein IDO exprimiert (Takikawa et al. 1988). Dabei wurde nicht IDO direkt nachgewiesen, sondern das Stoffwechselprodukt L-Kynurein. Wie in der hier vorliegenden Arbeit durch den Nachweis des Enzyms Kynureinase (KYNU) gezeigt werden konnte, bedeutet eine Expression von IDO nicht zwingend, dass auch weitere Enzyme des Stoffwechselweges exprimiert werden. Somit kann nicht direkt durch Fehlen von L-Kynurein auf eine nicht vorhandene Expression von IDO geschlossen werden. Für die untersuchten Hodgkin-Lymphom-, Ewing-Tumor-, Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien und die LCL wurden erstmals Analysen zur Induktion von IDO durch IFN γ durchgeführt, aus der Literatur sind solche Untersuchungen noch nicht bekannt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nur Zelllinien, bei denen der Ursprung des Tumors im mesenchymalen Stützgewebe (Sarkome) oder im ekto- oder entodermalen Epithelgewebe (Karzinome) liegt, durch IFN γ zur Expression von IDO angeregt werden (Ewing-Tumor-, Neuroblastom-, Melanom-, Fibrosarkom-, Zervixkarzinom-, Glioblastom- und Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien). Bei Zelllinien deren Ursprung im lymphatischen Gewebe oder in blutbildenden Organen liegt, kam es nicht zu einer Expression von IDO nach einer Stimulation der Zellen mit IFN γ (Hodgkin-Lymphom-, verschiedene Leukämie-Zelllinien und

LCL). Diese Beobachtung wird auch durch weitere Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen unterstützt, die eine Induktion von IDO in verschiedenen anderen Tumorzelllinien mit Ursprung im mesenchymalen Stützgewebe oder im ekto- oder entodermalen Epithelgewebe zeigen konnten, z. B. Ovarialkarzinome (Melichar et al. 2003), hepatozelluläre Karzinome (Pan et al. 2008), Dickdarmkarzinome (Brandacher et al. 2006), Nierenzellkarzinom (Riesenberg et al. 2007) und humane und Maus-Mesotheliom-Zelllinien (Phan-Bich et al. 1997). Für verschiedene Leukämien gibt es Untersuchungen zur Expression von IDO in humanem peripherem Blut und Knochenmark. Durch diese Analysen konnten Tendenzen zur Produktion von IDO bei manchen Patienten in diesen Materialien festgestellt werden (Curti et al. 2007, Hoshi et al. 2009, Chamuleau et al. 2008). Die hier untersuchten Leukämie-Linien, die nur maligne Zellen enthalten, zeigten nach der Inkubation mit IFN γ keine Expression von IDO. Die untersuchten Proben aus peripherem Blut und Knochenmark enthalten neben den malignen Blasten auch die normal in Blut und Knochenmark vorkommenden Zellen. Für dendritische Zellen (Weber et al. 2006), Monozyten (Musso et al. 1994) und mesenchymale Stammzellen (Meisel et al. 2004) ist bekannt, dass sie nach einer Inkubation mit IFN γ IDO exprimieren. Es besteht die Möglichkeit, dass die Expression von IDO in den untersuchten Materialien auf diese Zellen und nicht auf maligne Zellen zurückzuführen ist. Die Gruppe um Chamuleau konnte zusätzlich zeigen, dass Patienten mit geringer oder nicht vorhandener Expression von IDO in peripherem Blut und Knochenmark ein deutliche verlängertes Überleben zeigten (Chamuleau et al. 2009), was die Expression von IDO auch für die Leukämie zu einem entscheidenden Tumor-Immun-Escape-Mechanismus der Krankheit machen könnte.

Über das Enzym IDO2 ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sehr viel bekannt, seine Expression wurde erstmals 2007 für Mensch und Maus beschrieben. Dabei wurde die Theorie aufgestellt, dass IDO2 durch eine Genduplikation von IDO vor der Entstehung der Tetrapoden entstanden ist (Ball et al. 2007). Die IDO2-Expression konnte in verschiedenen humanen Geweben gezeigt werden, z. B. in Leber, Dünndarm, Milz, Plazenta, Thymus, Lunge, Gehirn, Niere und Dickdarm (Metz et al. 2007). Die Induktion von IDO2 durch IFN γ wurde bis jetzt nur für die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa nachgewiesen (Löb et al. 2009). Die hier gezeigte Expression von IDO2 für die Zelllinie HeLa ist deutlich geringer als in der Arbeit

von Löb gezeigt (vgl. Abbildung 21), was auf die Verwendung unterschiedlicher PCR-Primer zurückzuführen sein könnte. In der Arbeit von Löb und Kollegen wird darauf hingewiesen, dass ihre gewählten Primer am 3` Ende des IDO2-Genes liegen und somit auch inkomplette Transkripte nachweisen, die möglicherweise nicht für das IDO2-Protein kodieren (Löb et al. 2009). In der hier vorgelegten Arbeit wurden Primer, die in der Mitte der mRNA lokalisiert sind, für den PCR-Nachweis genutzt. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte erstmals eine Expression von IDO2 unbeeinflusst von IFN γ in den Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien B-CPAP, 133-FTC und HTh 74, sowie in den Leukämie-Zelllinien THP1 und Jurkat nachgewiesen werden. Eine Expressionsinduktion von IDO2 durch IFN γ konnte für die beiden Ewing-Tumor-Zelllinien A673 und TC-32, sowie für die LCL CSIII und A2+2310 gezeigt werden. Es kann festgehalten werden, dass IDO2 nicht mit der Expression von IDO einhergeht und seine Expression nur bei einigen Zelllinien auf die Induktion durch IFN γ zurückzuführen ist.

Es ist bekannt, dass die KYNU relativ stark in Leber, Plazenta, Lunge, und in geringerem Maße auch in Herz, Gehirn, Skelett-Muskulatur, Niere und Pankreas exprimiert wird (Alberati-Giani et al. 1996). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde nur in einer veröffentlichten Publikation ein möglicher Einfluss von IFN γ auf die Expression von KYNU untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass KYNU in einigen Glioblastom-Zelllinien exprimiert wird, ohne dabei durch IFN γ beeinflusst zu werden (Miyazaki et al. 2009). Dies stimmt mit den hier durchgeführten Untersuchungen überein. KYNU konnte nur in einigen Zelllinien nachgewiesen werden, in LCL73, CSIII und A+2310 (LCL), in der akuten monozytischen Leukämie-Linie THP1, der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa, der Melanom-Zelllinie 31IGR1 und in der Glioblastom-Zelllinie U87-MG (sowie auch sehr schwach in der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-1236). In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse von Miyazaki und Kollegen für die Expression von KYNU in U87-MG-Zellen bestätigt werden. Des Weiteren konnte für die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y keine Expression der KYNU nachgewiesen werden, was ebenfalls mit den Ergebnissen der genannten Arbeit übereinstimmt. Es ist festzuhalten, dass die Expression der KYNU nicht im Zusammenhang mit IFN γ steht und somit eine Regulation durch andere Mechanismen besteht.

Bei den Untersuchungen zu den drei Enzymen des Tryptophanstoffwechsel nimmt die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie KM-H2 für IDO und die KYNU eine Sonderstellung

ein. So ist sie die einzige Zelllinie mit Ursprung im lymphatischen Gewebe oder in blutbildenden Organen, die eine Expression von IDO aufwies. Die Expression wurde aber nicht durch eine Stimulation mit IFN γ beeinflusst. Auch bei der Betrachtung der KYNU zeigt sich bei KM-H2 ein erstaunliches Bild, so scheint in dieser Zelllinie die Expression durch IFN γ gesteigert zu werden.

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte die Induktion der IDO-Expression in Tumorzellen durch IL2-transgene Tumorzellen bestätigt werden. Jedoch konnte eine Regulierung der IDO-Expression durch den Antikörper gegen CD137 nicht eindeutig gezeigt werden. Um als eine mögliche Ursache die nicht steuerbare Produktion von IL2 durch die transgenen Tumorzellen auszuschließen, wurden diese durch die Gabe definierter IL2-Mengen ersetzt. Die IL2-Konzentration variierte in den Ansätzen zwischen 3000 U/ml und 48000 U/ml. Die Analyse der Expression von IDO zeigte, dass bei geringen Mengen IL2 (3000, 6000 und 12000 U/ml) IDO in der Ewing-Tumor-Zelllinie induziert wurde. Durch das Zusetzen des Antikörpers gegen CD137 konnte diese Expression gehemmt oder verringert werden. Die geringen Dosen IL2 können mit einem ineffektiven Aktivierungssignal der T-Zellen gleich gesetzt werden, bei denen der Antikörper gegen CD137 eine kostimulatorische Wirkung entfaltet. Bei höheren Konzentrationen an IL2 (24000, 30000 und 48000 U/ml) wurde eine gesteigerte Expression von IDO in den Kulturen ohne Antikörper gegen CD137 erreicht. Durch Zugabe des Antikörpers gegen CD137 wurde eine leichte Erhöhung der IDO-Expression erzielt. Durch die hohen IL2-Konzentrationen wurde wahrscheinlich in den T-Zellen ein potentes Signal erzeugt, dass durch den Antikörper gegen CD137 nicht mehr wesentlich beeinflusst werden konnte. Auch bei den hier durchgeführten Experimenten wurde durch die unterschiedlich eingesetzten PBMC-Präparationen ein variables Bild erhalten. So konnte für die exemplarisch herausgegriffene Kultivierung der Zellen unter Einfluss von 3000 U/ml IL2, zwar eine deutliche Tendenz in der Hemmung der Expression von IDO gezeigt werden, diese war aber aufgrund der durch die PBMC entstandenen Variabilität nicht signifikant. Die Konzentration von IFN γ in den einzelnen Ansätzen variierte ähnlich stark wie die Expression von IDO. Zwischen beiden konnte eine starke Korrelation gezeigt werden. Die Funktion des Antikörpers wurde in den hier gezeigten Untersuchungen durch die Beeinflussung von IFN γ auf die Tumorzellen übertragen. Durch den Einsatz eines IFN γ -

neutralisierenden Antikörpers wurde ein gleiches Ergebnis erzielt. Es ist bekannt, dass die Modulation der CD137-Freisetzung zu einer Induktion des proinflammatorischen TH-1-Zytokines IFN γ in CD8 $^+$ T-Zellen und NK-Zellen führt (Shuford et al. 1997, Wilcox et al. 2002c). Durch die steigende IL2-Konzentration in Anwesenheit des Antikörpers gegen CD137 konnte die Produktion von TNF α gesteigert werden. Ohne Stimulation über CD137 blieb die Konzentration von TNF α in den Ansätzen mit gesteigerter IL2-Konzentration gleich. Es ist bekannt, dass durch die Stimulation über CD137 Makrophagen und Monozyten zur Expression von TNF α angeregt werden (Langstein et al. 1998, Kienzle und von Kempis 2000) und, dassIDO ebenfalls durch TNF α induziert werden kann (Babock et al. 2000, Robinson et al. 2003). Für IL10 konnte in dieser Arbeit eine Herabregulierung durch die Anwesenheit des Antikörpers gegen CD137 gezeigt werden. Es ist aus der Literatur bekannt, dass durch die Stimulation von CD137 in Monozyten die Produktion von IL10 inhibiert wird (Kienzel und van Kempis 2000). Durch die steigende Konzentration an IL2 in den einzelnen Stimulationsansätzen kam es zu einem Anstieg der IL6-Konzentration, die durch die Anwesenheit des Antikörpers gegen CD137 deutlich niedriger ausfiel. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch eine Stimulation über CD137 in dendritischen Zellen und Monozyten IL6 induziert wird (Futagawa et al. 2002, Wilcox et al. 2002a, Geng et al. 1994). Die geringen Mengen an IL4, welche nachgewiesen werden konnten, zeigten keine Veränderungen durch den Antikörper gegen CD137. Dies konnte auch schon durch anderen Arbeiten bestätigt werden (Li et al. 2003). Somit kann also festgestellt werden, dass durch die Stimulation über CD137 die T-Zell-Immunität in Richtung einer TH1-Antwort (IFN γ , TNF α) und weg von einer TH2-Antwort gedrängt wird. Dies wurde auch schon an einem Tiermodell gezeigt, indem die CD137-Stimulation zur Unterstützung einer DC-Vakzine *in vitro* und *in vivo* eingesetzt wurde (Li et al. 2003, Ito et al. 2004).

Aus der Literatur ist für verschiedene IDO-exprimierende Zellarten z. B. IFN γ -stimulierte Makrophagen (Munn et al. 1999), IDO-transgene Mausmastozytom-Zelllinie P815 (Uyttenhove et al. 2003), IDO-transgene dendritische Zellen der Maus (Funeshima et al. 2005) und IFN γ stimulierte MSC bekannt, dass sie die Proliferation von PBMC hemmen (Meisel et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IDO in der Ewing-Tumor-Zelllinie A673 zu einer Inhibierung der Proliferation von zugesetzten allogenen PBMC führte. Somit

konnte gezeigt werden, dassIDO nicht nur auf mRNA-Basis in den Zellen vorhanden ist, sondern auch, dass dieIDO exprimierenden Zellen die erwartete Funktion ausüben. Es ist bekannt, dass die Proliferationshemmung der PBMC am stärksten bei den T-Zellen zu finden ist, wobei besonders stark CD8+ T-Zellen betroffen sind (Forouzandeh et al. 2008, Qian et al. 2009). Aber auch für CD4+ T-Zellen konnte eine Proliferationshemmung durch die Expression vonIDO gezeigt werden, diese ist aber deutlich geringer ausgebildet, als bei CD8+ T-Zellen (Forouzandeh et al. 2007, Qian et al. 2009). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass auch B-Zellen, die mit IFN γ behandelten MSC kultiviert wurden, in einen Zellzyklusarrest und Apoptose verfallen (Maby-El Hajjami et al. 2009). Wie genau die Wirkung vonIDO auf die T- und B-Zellen erfolgt, ist bis jetzt weitestgehend unverstanden. Es konnte aber ein Signalweg über *general control non-derepressible-2* (GCN2) identifiziert werden, der beim Auftreten von unbeladener transfer-RNA, die hier durch Mangel an Tryptophan entstehen, angeschaltet wird und zu Zellzyklus-Arrest, Differenzierung oder Apoptose in Abhängigkeit von Zelltyp und initiiertem Stress führen kann (Crosby et al. 2000, Harding et al. 2000, Niwa und Walter 2000). Durch eine gleichzeitige Aktivierung von GCN2 und eine Aktivierung des TCR auf T-Zellen wird in diesen eine Apoptose oder Anergie ausgelöst (Munn et al. 2005), und somit möglicherweise die Wirkung vonIDO übertragen.

4.3 Untersuchung des Einflusses des Antikörpers gegen CD137 auf T-Zellen mithilfe DNA-Mikroarray-Analyse

Durch magnetische Zellsortierung isolierte T-Zellen wurden mit Hilfe der DNA-Mikroarray-Analyse eingehender untersucht. Dabei konnten 110 hochregulierte und 129 herabregulierte Gene identifiziert werden. Weiterführende Analysen wurden in dieser Arbeit mit 2 hochregulierten und 5 herabregulierten Genen durchgeführt. Als durch den Antikörper gegen CD137 hochregulierte Gene konnten Interleukin 17F (IL17F auch ML1) und *chemokine CC motif ligand 20* (CCL20 auch MIP3 α , SCAY20, LARC) identifiziert werden. Des Weiteren wurden *SLIT and NTRK-like family member 3* (SLITRK3), *catenin (cadherin-associated protein)*, *delta 1* (CTNND1), ein EST mit Homologie zum Onkogen RAF1 (*v-raf-1*

murine leukemia viral oncogene homolog 1) und *pre-B-cell leukemia homeobox 1* (PBX1) als Gene identifiziert, die durch den Antikörper gegen CD137 herabreguliert wurden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht besonders viel über das Gen *SLIT and NTRK-like family member 3* (SLITRK3) und sein Expressionsverhalten bekannt. Die SLITRK-Protein-Familie besteht aus sechs Mitgliedern und ihre Expression wurde bis jetzt als stark auf neurales Gewebe beschränkt beschrieben (Aruga und Mikoshiba 2003). In diesem Zusammenhang wird der Proteinfamilie die Kontrolle des Neuritenwachstums zugeschrieben (Aruga und Mikoshiba 2003). Des Weiteren konnte eine Expression aller Familienmitglieder in verschiedenen Gehirntumoren (z. B. Astrozytome, Glio- und Medullablastome) festgestellt werden, wobei SLITRK3 dabei eine Sonderstellung in der Expression zukommt (Aruga et al. 2003). Weder über eine Expression, noch über eine mögliche Funktion von SLITRK3 in aktivierten oder unaktivierten T-Zellen ist bis jetzt etwas bekannt.

Catenin (cadherin-associated protein), delta 1 (CTNND1) ist ein wichtiger Reaktionspartner von Cadherinen. Diese stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die für die Vermittlung der Zelladhäsion und Wachstumsinhibierung nach Zellkontakten verantwortlich sind (Takechi 1995). In Untersuchungen unterschiedlicher Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Catenine für die Stabilisierung von Cadherin eine äußerst wichtige Rolle spielen (Davis et al. 2003, Ireton et al. 2002, Xiao et al. 2003). Seine Funktion wird von CTNND1 durch Bindung von Rho-GTPasen erzeugt, die dadurch in ihrer inaktiven Form gehalten werden (Anastasiadis et al. 2000, Noren et al. 2000, Magie et al. 2002). Ein Ansatz, in dem CTNND1 mittels RNA-Interferenz in Mausfibroblasten (NIH3T3-Zellen) inaktiviert wurde, zeigte eine starke konstitutive Aktivierung von Rho, eine Transformation der Zellen und den Verlust der Wachstumsinhibierung nach Zellkontakt (Wildenberger et al. 2006). Auch in einem Mausmodell für Hauttumore konnte an konditionalen *CTNND1-knockout* Mäusen eine anormale Superaktivierung von RhoA-GTPasen und somit eine Hyperaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gezeigt werden (Perez-Moreno et al. 2008). Die Expression von CTNND1-Isoformen konnte auf verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und normalen Lymphozyten nachgewiesen werden (Wu et al. 2006). Mit der Herabregulierung von CTNND1 durch den Antikörper gegen CD137 sollte es auch in T-Zellen über die Rho-GTPasen zu einer Aktivierung von NF- κ B kommen. Wie

bekannt ist kann es nach Kostimulation durch CD137 über TRAF2 zu einer Aktivierung von NF- κ B kommen (Karin und Lin 2002). Welche Signalkaskaden zu einer Herabregulierung von CTNND1 führen, ist nicht bekannt. Die Aktivierung von NF- κ B über diesen Mechanismus verstärkt möglicherweise wohl die durch TRAF2 erfolgte Aktivierung.

Das Gen *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* (RAF1) ist ein Mitglied der MAP-Kinase-Familie, und somit entscheidend an Differenzierung, Proliferation, Reparatur von DNA und Zelltod beteiligt. Durch die Aktivierung von RAF1 über Ras wird im Weiteren dann der MEK/ERK-Weg durchlaufen. Neben RAF1 existieren zwei weitere Mitglieder der Ser/Thr-Kinase-Familie A-RAF und B-RAF. Alle drei Isoformen werden unterschiedlich aktiviert, außerdem bestehen quantitative Unterschiede in ihrer Fähigkeit, MEK zu aktivieren (Marais et al. 1997). Durch die Erzeugung von RAF1-*knockout* Mäusen wird die Vermutung nahe gelegt, dass RAF1 eher eine Apoptose inhibierende als eine Proliferation begünstigende Funktion besitzt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in RAF1-negativen Zellen oder Mäusen eine Aktivierung von ERK vorlag (Mikula et al. 2001). Auch durch andere Untersuchungen in Mausfibroblasten konnte gezeigt werden, dass B-RAF hauptsächlich für die Aktivierung durch den MEK/ERK-Weg verantwortlich ist (Pritchard et al. 1995, Reuter et al. 1995). Somit könnte auch erklärbar sein, dass trotz einer Herabregulierung von RAF1 in T-Zellen durch die Kostimulation über CD137 ein funktionstüchtiger MEK/ERK-Signalweg durchschritten wird. In dieser Arbeit wurde ein EST (*expressed sequence tag*) von RAF1 als herabreguliert identifiziert. Dieses EST entspricht einem Intron des RAF1-Gens, somit ist es möglich, dass eine bis jetzt unbekannte Splicevariante durch den Antikörper gegen CD137 reguliert wurde.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist das Gen *pre-B-cell leukemia homeobox 1* (PBX1) hauptsächlich für die Bildung von verschiedenen Fusionsprodukten durch chromosomale Rearrangements bekannt (Staege und Max 2009). So bildet PBX1 verschiedene Translokationen mit unterschiedlichen Partnern, z. B. mit EWSR1 in Myoepitheliomen (Brandal et al. 2008) und mit TCF3 bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (Carroll et al. 1984). Des Weiteren ist PBX1 an der Entwicklung von Gliedmaßen bei Maus, Huhn und Drosophila beteiligt (Mercader et al. 1999). PBX1 spielt eine Rolle bei der Entwicklung und Funktion des Pankreas bei Maus und Mensch, und die Störung der PBX1-Aktivität wird mit einer

Anfälligkeit für Diabetes mellitus in Zusammenhang gebracht (Kim et al. 2002). Über die Expression und die mögliche Funktion von PBX1 in aktivierten oder unaktivierten T-Zellen gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Erkenntnisse. Für dieses interessante Gen sollten aber weiterführende Untersuchungen für die Kostimulation bei der Aktivierung von T-Zellen durchgeführt werden.

Durch den Einsatz des Antikörpers gegen CD137 kam es unter gleichzeitiger Aktivierung über CD3 zu einer starken Heraufregulierung von CCL20 und IL17F. Dies konnte auch durch weiterführende unabhängige Experimente bestätigt werden. Mit CCL20 wurde ein Chemokin identifiziert, das mit hoher Wahrscheinlichkeit eine entscheidende Rolle beim *Trafficking* und *Homing* von Lymphozyten und dendritischen Zellen in die sekundären Lymphorgane spielt, und eine bedeutende Rolle für das Ausreifen von Leukozyten einnimmt (Campbell et al. 1998, Cyster 1999, Sozzani et al. 1999). Für CCL20 ist eine Expression in Mukosa, Leber, Lunge, peripheren Lymphknoten, Thymus und PBMC bekannt (Rossi et al. 1997, Hieshima et al. 1997, Tanaka et al. 1999). Der zugehörige Rezeptor CCR6 ist auf unreifen dendritischen Zellen, sowie T- und B-Zellen zu finden (Power et al. 1997, Liao et al. 1999, Krzysiek et al. 2000). Es konnte in einer Arbeit durch DNA-Mikroarray-Analysen gezeigt werden, dass es zu einer Expression von CCL20 in über CD3 aktivierten und über CD28 kostimulierten T-Zellen kommt (Wang et al. 2008). Es existiert seit einiger Zeit die Annahme, dass CD28 und CD137 bei der Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen wechselseitig agieren (Watts und DeBenedette 1999). Somit könnten sich beide Moleküle bei der Aktivierung von CCL20 unterstützen. Über die Funktion von CCL20 in T-Zellen ist bis jetzt nicht viel bekannt. Es wird aber vermutet das durch die Expression dieses Chemokins die proinflammatorische Immunantwort bei der Aktivierung unterstützt wird und ein Einfluss auf die Rekrutierung von T-Zellen und anderen Leukozyten zu Orten der Inflammation erfolgt (Wang et al. 2008).

Als ein weiteres Gen, das durch die Stimulation über CD137 heraufreguliert wurde, konnte IL17F identifiziert werden. Es gehört zu einer relativ neuen Zytokinfamilie (enthält auch die Mitglieder IL17A bis E) und wird von einer CD4+ T-Zell-Population gebildet. Neben IL17F wird in TH17-Zellen auch der Rezeptor CCR6 (Hirota et al. 2007) und das Chemokien CCL20 (Wilson et al. 2007) exprimiert. Dieses konnte in der vorgelegten Arbeit auch als durch den Antikörper gegen CD137 heraufreguliert identifiziert werden. Es ist aus einem Mausmodell

bekannt, dass $\text{TNF}\alpha$ und IL6, neben $\text{TGF}\beta 1$ und $\text{IL}1\beta$, an der Differenzierung von TH17-Zellen beteiligt sind (Veldhoen et al. 2006). Wie schon bei den Untersuchungen zur Expression von IDO in Tumorzellen gezeigt, kam es beim Einsatz des Antikörpers gegen CD137 zu einer Sekretion von IL6 (4000-8000 pg/ml) und $\text{TNF}\alpha$ (30-120 pg/ml). Dies legt nahe, dass durch den Antikörper gegen CD137 in einer reinen T-Zellpopulation der Grundstein für die Differenzierung von TH17-Zellen gelegt wird. Es ist weiterhin bekannt das TH17-Zellen bei unterschiedlichsten Tumorerkrankungen während der Tumorentwicklung erhöht in der näheren Umgebung des Tumors anzutreffen sind: z. B. beim Prostatakarzinom (Steiner et al. 2003, Sfanos et al. 2008, Derhovanessian et al. 2009), Mammakarzinom (Horlok et al. 2009), Myelom (Dhodapkar et al. 2008), Melanom (von Euw et al. 2009), Ovarialkarzinom (Miyahara et al. 2008, Kryczek et al. 2009), Nierenzellkarzinom (Inozume et al. 2009), Kolonkarzinom (Le Gouvello et al. 2008), der akuten myeloischen Leukämie (Wrobel et al. 2003), dem Magenkarzinom (Zhang et al. 2008) und B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Yang et al. 2009). Es ist bekannt, dass IL17A an der Induktion von VEGF in Fibroblasten, vaskuläre Endothelialzellen und Mausmakrophagen beteiligt ist (Honorati et al. 2006, Takahashi et al. 2005, Jeon et al. 2007) und somit für die Induktion von Angiogenese verantwortlich gemacht werden kann. Für IL17F hingegen konnte eine Hemmung der Angiogenese von vaskulären Endothelialzellen gezeigt werden (Starnes et al. 2001). Die Unterstützung der Angiogenese stellt einen Protumorfaktor dar, da somit Tumorzellen in ihrem Wachstum und ihrer Verbreitung unterstützt werden könnten. Für die Mitglieder der IL17-Zytokinfamilie sind auch Antitumoreigenschaften bekannt, so konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass sie besser die Eliminierung etablierte Tumore vermitteln können als TH1-T-Zellen (Muranski et al. 2008). Auch in der hier vorgelegten Arbeit konnte in einer MLTC (gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur) gezeigt werden, dass es durch Zugabe von IL17F zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzellen und zu einer signifikant stärkeren Proliferation der zugesetzten PBMC kam. Diese Reaktion wird ermöglicht, da TH17-Zellen anscheinend dazu befähigt sind, in außergewöhnlichem Maße $\text{CD}8^+$ T-Zellen zu aktivieren (Benchetrit et al. 2002, Martin-Orozco et al. 2009) und dendritische Zellen in Tumorbereiche zu rekrutieren (Martin-Orozco et al. 2009). Es wird vermutet, dass letzteres über CCL20 erfolgt. Bei der anschließenden Analyse, ob IL17F einen möglichen Faktor bei der

Inhibierung der IDO-Expression in Tumorzellen durch den Antikörper gegen CD137 darstellt, wurde die Expression von IDO durch den Einsatz von IL17F nicht gesenkt. Die Funktion von TH17-Zellen kommt nur in Gegenwart von ausreichenden Mengen IFN γ zum tragen (Muranski et al. 2008), welches ja, wie festgestellt, zur Expression von IDO führt.

Zusammengefasst konnte mithilfe der DNA-Mikroarrayanalyse das Zytokin IL17F als ein Gen identifiziert werden, das durch eine Stimulation über CD137 in aktivierten T-Zellen stark exprimiert wurde und welches zur Verstärkung Ewing-Tumor-gerichteter Immunantworten möglicherweise geeignet erscheint.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Gabe von IL2 zu PBMC und räumlich getrennten Tumorzellen in den Tumorzellen zu einer Expression des immunsupprimierenden Enzyms IDO kommt. Zu dieser Expression kam es durch eine IFN γ -Produktion der PBMC nach der IL2-Stimulation. Die Literatur bestätigend zeigte sich ebenfalls, dass diese IDO exprimierenden Tumorzellen dazu befähigt waren, die Proliferation von zugesetzten PBMC zu hemmen. Seit geraumer Zeit kommt die IL2-Hochdosistherapie bei unterschiedlichsten Tumorerkrankungen zum Einsatz, z. B. beim metastasierenden Melanom (Atkins et al. 1999, Guirguis et al. 2002, Smith et al. 2008) und beim metastasierenden Nierenzellkarzinom (Guirguis et al. 2002, Klapper et al. 2008). Diese ist meist nur in geringem Maße wirksam. So zeigten nur 6 bis 13% der Patienten eine vollständiges und 10 bis 12% eine partielles Ansprechen (Atkins et al. 1999, Guirguis et al. 2002, Smith et al. 2008, Klapper et al. 2008). Diese unbefriedigenden Reaktionen könnten mit einer Induktion der IDO-Expression in den vorhandenen Tumorzellen der Patienten zusammenhängen. Da durch den Einsatz des Antikörpers gegen CD137 bei geringen Dosen IL2 nicht immer eine Abnahme der IDO-Expression zu erzielen war, und bei hohen Dosen die Expression von IDO auch noch erhöht wurde, sollte bei einer Therapie mit IL2 eher ein Hemmstoff gegen IDO eingesetzt werden. Für IDO konnten *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Inhibitoren erfolgreich identifiziert werden. Der bekannteste und zurzeit am meisten genutzte Inhibitor für IDO ist 1-Methyl-Tryptophan (Friberg et al. 2001, Hou et al. 2007, Scott et al. 2009). Seit einiger Zeit wird intensiv nach weiteren Inhibitoren gesucht. So konnte auch für den Bitterstoff Curcumin (Novak Kujundzic

et al. 2008) und das Phytoalexin Brassinin (Banerjee et al. 2008) eine Inhibition von IDO in Tumorzellen gezeigt werden. Eine Kombination von IL2-Hochdosistherapie und passendem IDO-Inhibitor könnte zu einer besseren Therapieform für verschiedene Krebserkrankungen werden.

Mithilfe der DNA-Mikroarray-Technologie konnte mit IL17F ein interessantes Zytokin identifiziert werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion des Tumorwachstums und die gestärkte Proliferation von PBMC durch IL17F konnte auch schon in einem Xenotransplantationsmodell für Hepatokarzinome in Nacktmäusen gezeigt werden (Xie et al. 2009)⁷. Somit stellt IL17F ein interessantes neues Zytokin für die Immuntherapie dar. Ob die Anwendung von IL17F (oder die oben genannte Anwendung von IDO-Inhibitoren) für die Behandlung von Ewing-Tumoren erfolgreich eingesetzt werden kann und die noch immer schlechte Prognose gerade für Patienten mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien verbessern kann, bedarf weiterer Untersuchungen, beispielsweise in geeigneten Xenotransplantationsmodellen.

⁷ Originalartikel in chinesisches, Zitat an Abstrakt angelehnt.

5 Zusammenfassung

Die Aktivierung der T-Zelle ist ein mehrstufiger Prozess, welcher mit der Adhäsion zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle (APC) beginnt. Das darauf folgende erste Signal wird durch die Interaktion eines Komplexes aus dem antigenen Peptid und Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes der APC und dem T-Zell-Rezeptor der T-Zelle vermittelt. Für eine vollständige Aktivierung der T-Zelle muss nun das kostimulatorische Signal folgen. Ein solches Signal kann durch die Aktivierung über das kostimulatorische Molekül CD137 durch seinen Liganden CD137L erfolgen. Nach der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand kommt es zur Aktivierung, Proliferation und zum gesteigerten Überleben der T-Zelle.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Bedeutung des CD137/CD137L-Systems am Beispiel Ewing-Tumor-gerichteter Immunantworten durchgeführt. Durch Genexpressionsanalysen und Durchflusszytometeranalysen wurde die Abwesenheit von CD137L auf den verwendeten Ewing-Tumorzellen belegt. Zugleich konnte die Expression von CD137 in einigen Monozyten, in Makrophagen und dem anaplastisch großzelligen Lymphom aufgezeigt werden. Der Ligand konnte hauptsächlich in lymphoblastoiden Zellen nachgewiesen werden. Als eine Besonderheit konnte die divergente Verteilung beider Faktoren in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien aufgezeigt werden. Die Expression von CD137 korrelierte hierbei mit der Expression weiterer T-Zellmarker, insbesondere von Interleukin 26.

Im Weiteren wurde ein *in vitro*-System zur Analyse des Einflusses von CD137 auf die T-Zell-Aktivierung genutzt. Hierbei wurde die Expression des immunsupprimierenden Enzyms IDO in Ewing-Tumor-Zellen analysiert. Es zeigte sich teilweise eine Hemmung der IDO-Induktion durch Antikörper gegen CD137. Dabei konnte eine eindeutige Abhängigkeit zwischen IDO-Expression in den eingesetzten Tumorzellen und $\text{INF}\gamma$ -Sekretion durch IL2 stimulierte PBMC gezeigt werden. Eine direkte Abhängigkeit zwischen der Stimulation mit dem Antikörper gegen CD137 und der Hemmung der IDO-Expression konnte hingegen nicht bestätigt werden. Bei der Analyse der Induktion der Expression von IDO durch $\text{INF}\gamma$, konnte diese bevorzugt in Zelllinien mit Ursprung im mesenchymalen Stützgewebe oder im

ekto- und entodermalen Epithelgewebe gezeigt werden. Erstmals konnte dabei die Expression vonIDO in verschiedenen Ewing-Tumor-Zelllinien nach Inkubation mit IFN γ gezeigt werden. Die IDO-exprimierenden Ewing-Tumor-Zellen hatten hierbei auch die Fähigkeit die Proliferation von PBMC zu hemmen. Hingegen wiesen Tumorzellen mit Ursprung im lymphatischen Gewebe oder in blutbildenden Organen keine Expression von IDO nach Stimulation mit IFN γ auf.

Das Zytokin IL17F konnte durch eine Stimulation über CD137 als stark exprimiert mithilfe der DNA-Mikroarray-Analyse identifiziert werden. Eine weitergehende Analyse zeigte, dass es durch Einsatz des Zytokins in der gemischten Lymphozyten/Tumorzellkultur zu einer Reduktion von Tumorzellen und zu einer starken Proliferation von PBMC kam.

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit mit IDO und IL17F zwei neue Angriffspunkte für die mögliche Immuntherapie von Ewing-Tumoren gefunden werden, welche zumindest teilweise durch Antikörper mit Spezifität für CD137 moduliert werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* (2003) 3:745-756.
- Alberati-Giani D, Buchli R, Malherbe P, Broger C, Lang G, Kohler C, Lahm H-W, Cesura AM. Isolation and expression of a cDNA clone encoding human kynureninase. *Europ J Biochem* (1996) 239:460-468.
- Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, Din WS, Goodwin RG. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol* (1994) 24:2219-2227.
- Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB. Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* (2000) 2:637-644.
- Aruga J and Mikoshiba K. Identification and characterisation of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* (2003) 24:117-129.
- Aruga J, Yokota N, Mikoshiba K. Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene* (2003) 315:87-94.
- Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* (1999) 17:2105-2116.
- Babock TA and Carlin JM. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor α in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* (2000) 12:588-594.
- Bachmann MF, Barner M, Kopf M. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. *J Exp Med* (1999a) 190:1383-1392.
- Bachmann MF, Wong BR, Josien R, Steinman RM, Oxenius A and Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* (1999b) 189:1025-1031.
- Bai XF, Liu J, Li O, Zheng P, Liu Y. Antigenic drift as a mechanism for tumor evasion of destruction by cytolytic T lymphocytes. *J Clin Invest* (2003) 111:1487-1496.
- Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jermin LS, Hunt NH. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein in humans and mice. *Gene* (2007) 396:203-213.
- Banerjee T, Duhadaway JB, Gaspari P, Sutanto-Ward E, Munn DH, Mellor AL, Malachowski WP, Prendergast GC, Muller AJ. A key in vivo antitumor mechanism of

- action of natural product-based brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Oncogene* (2008) 27:2851-2857.
- Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* (2005) 2:e161.
- Bargou RC, Mapara MY, Zugck C, et al. Characterization of a novel Hodgkin cell line, HD-MyZ, with myelomonocytic features mimicking Hodgkin's disease in severe combined immunodeficient mice. *J Exp Med* (1993) 177:1257-1268.
- Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Edgar R. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles--database and tools update. *Nucleic Acids Res* (2007) 35:D760-765.
- Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Ribecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic TH2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* (1999) 155:537-547.
- Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* (2002) 99:2114-2121.
- Bendandi M and Longo DL. Biologic therapy for lymphoma. *Curr Opin Oncol* (1999) 11:343-350.
- Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K, Bernstein A. Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev* (1991) 5:908-918.
- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* (2006) 11:503-519.
- Bianco R, Daniele G, Giardiello F, Tortora G. Monoclonal antibodies targeting the epidermal growth factor receptor. *Curr Drug Targets* (2005) 6:275-287.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* (1973) 33:2643-2652.
- Blazar BR, Kwon BS, Panoskaltsis-Mortari A, Kwak KB, Peschon JJ, Taylor PA. Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Immunol* (2001) 166:3174-3183.
- Bloom ET. Further definition by cytotoxicity tests of cell surface antigens of human sarcomas in culture. *Cancer Res* (1972) 32:960-967.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* (2002) 27:19-26.

- Boon T and van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* (1996) 183:725-729.
- Braeuninger A, Kuppers R, Strickler JG, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal centre-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94:9337-9342.
- Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, Werner ER, Werner-Felmayer G, Weiss HG, Göbel G, Margreiter R, Königsrainer A, Fuchs D, Amberger A. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* (2006) 12:1144-1151.
- Brandal P, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Gorunova L, Skjeldal S, Micci F, Heim S. Detection of a t(1;22)(q23;q12) translocation leading to an EWSR1-PBX1 fusion gene in a myoepithelioma. *Genes Chromosomes Cancer* (2008) 47:558-564.
- Bronte V, Tsung K, Rao JB, Chen PW, Wang M, Rosenberg SA, Restifo NP. IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases. *J Immunol* (1995) 154:5282-5292.
- Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* (1993) 178: 1223-1230.
- Bukczynski J, Wen T, Watts TH. Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* (2003) 33:446-454.
- Bukczynski J, Wen T, Ellefsen K, Gaudie J, Watts TH. Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101:1291-1296.
- Burdach S. Th granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF): basic science and clinical application. *Klin Padiatr* (1991) 203:302-310.
- Burdach S. Treatment of advanced Ewing tumors by combined radiochemotherapy and engineered cellular transplants. *Pediatr Transplant* (2004) 8 Suppl 5:67-82.
- Burdach S and Jürgens H. High-dose chemoradiotherapy (HDC) in the Ewing family of tumors (EFT). *Crit Rev Oncol Hematol* (2002) 41:169-189.
- Burdach S, van Kaick B, Laws HJ, Ahrens S, Haase R, Körholz D, Pape H, Dunst J, Kahn T, Willers R, Engel B, Dirksen U, Kramm C, Nürnberger W, Heyll A, Ladenstein R, Gadner H, Jürgens H, Göbel U. Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Dusseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria. *Ann Oncol* (2000) 11:1451-1462.

- Cabrera T, Pedrajas G, Cozar JM, Garrido A, Vincente J, Tallada M, Garrido F. HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* (2003a) 62:324-327.
- Cabrera T, Maleno I, Lopez-Nevot MA, Redondo M, Fernandes MA, Collado A, Garrido F. High frequency of HLA-B44 allelic loss in human solid tumors. *Hum Immunol* (2003b) 64:941-950.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* (1998) 279:381-384.
- Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH. 4-1BBL induces cell division, sustains survival and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* (2001) 167:1313-1324
- Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI. Biological response modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol* (1987) 139:2414-2418.
- Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finley WH. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood* (1984) 63:721-724.
- Chamuleau ME, van de Loosdrecht AA, Hess CJ, Janssen JJ, Zevenbergen A, Delwel R, Valk PJ, Löwenberg B, Ossenkoppele GJ. High INDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome. *Haematologica* (2008) 93:1894-1898.
- Chen LP, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I, Hellstrom KE. Human Papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor reaction antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88:110-114.
- Chen L, Mizuno MT, Singhal MC, Hu SL, Galloway DA, Hellström I, Hellström KE. Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngenic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papilloma virus type 16. *J Immunol* (1992) 148:2617-2621.
- Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* (1993) 14:483-486.
- Chen PW, Mellon JK, Mayhew E, Wang S, He YG, Hogan N, Niederkorn JY. Uveal melanoma expression of indoleamine 2,3-dioxygenase: establishment of an immune privileged environment by tryptophan depletion. *Exp Eye Res.* (2007) 85:617-625.
- Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* (2008) 181:5396-5404.
- Cheung CC, Kandel RA, Bell RS, Mathews RE, Ghazarian DM. Extraskeletal Ewing sarcoma in a 77-year-old woman. *Arch Pathol Lab Med* (2001) 125:1358-1360.
- Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, Ahmann G, Price-Troska T, Henderson K, Chung TH, Kim S, Mulligan G, Bryant B, Carpten J, Gertz M, Rajkumar SV, Lacy M, Dispenzieri A, Kyle

- R, Greipp P, Bergsagel PL, Fonseca R. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res* (2007) 67:2982-2989.
- Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, Miller Y, Ley K. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics* (2007) 29:149-160.
- 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- cells. *J Immunol* (1997) 158:3081-3089.
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* (2002) 115:679-688.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* (1977) 270:347-349.
- Cooper D, Bansal-Pakala P, Croft M. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur J Immunol* (2002) 32:521-529.
- Coyle AJ and Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* (2001) 2:203-209.
- Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T cell immunity? *Nat Rev Immunol* (2003a) 3:609-620.
- Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* (2003b) 14:265-273.
- Crosby JS, Chefalo PJ, Yeh I, Ying S, London IM, Leboulch P, Chen JJ. Regulation of hemoglobin synthesis and proliferation of differentiating erythroid cells by heme-regulated eIF-2 α kinase. *Blood* (2000) 96:3241-3248.
- Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, Salvestrini V, Bonanno G, Rutella S, Durelli I, Horenstein AL, Fiore F, Massaia M, Colombo MP, Baccarani M, Lemoli RM. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. *Blood* (2007) 109:2871-2877.
- Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* (1999) 286:2098-2102.
- Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* (2003) 163:525-534.
- Davis DM. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol* (2002) 23:356-363.
- Dawicki W and Watts TH. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* (2004) 34:743-751.

- 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* (1999a) 181:985-992.
- DeBenedette MA, Wen T, Bachmann MF, Ohashi PS, Barber BH, et al. Analysis of 4-1BB ligand-deficient mice and of mice lacking both 4-1BB ligand and CD28 reveals a role for 4-1BB ligand in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J Immunol* (1999b) 163:4833-4841.
- de la Maza LM and Peterson EM. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res.* (1988) 48:346-350.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A, Thomas G. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* (1992) 359:162-165.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* (2003) 14:193-209.
- Derhovanessian E, Adams V, Hähnel K, Groeger A, Pandha H, Ward S, Pawelec G. Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *Int J Cancer* (2009) 125:1372-1379.
- Dhodapkar KM, Barbuto S, Matthews P, Kukreja A, Mazumder, Vesole D, Jagannath S, Dhodapkar MV. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood* (2008) 112:2878-2885.
- Diehl V, Kirchner HH, Schaadt M, Fonatsch C, Stein H, Gerdes J, Boie C. Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* (1981) 101:111-124.
- Disis ML, Bernhard H, Shiota FM, Hand SL, Gralow JR, Huseby ES, Gillis S, Cheever MA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood* (1996) 88:202-210.
- Disis ML and Cheever MA. HER-2/neu oncogenic protein: issues in vaccine development. *Crit Rev Immunol* (1998) 18:37-45.
- Drexler HG, Gaedicke G, Lok MS, Diehl V, Minowada J. Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res* (1986) 10:487-500.
- Drexler HG and Minowada J. Hodgkin's disease derived cell lines: a review. *Hum Cell* (1992) 5:42-53.

- Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, Yu D, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Sherry R, Leitman SF, Rosenberg SA. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother.* (2001) 24:363-373.
- Dunn T, Praisman L, Hagag N, Viola MV. ERG gene is translocated in an Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* (1994) 76:19-22.
- Edelstein MP, Ozaki Y, Duch DS. Synergistic effects of phorbol ester and INF-gamma on the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in THP-1 monocytic leukemia cells. *J Immunol* (1989) 143:2969-2673.
- Ehlers A, Oker E, Bentink S, Lenze D, Stein H, Hummel M. Histone acetylation and DNA demethylation of B cells result in a Hodgkin-like phenotype. *Leukemia* (2008) 22:835-841.
- Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc N Y Pathol Soc* (1921) 21:17-24.
- Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM, Paulin C. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer* (1994) 73:2206-2212.
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by kynurenines. *Adv Exp Med Biol* (2003) 527:183-190.
- Fleuren GJ, Gorter A, Kuppen PJK, Litvinov S, Warnaar SO. Tumor heterogeneity and immunotherapy of cancer. *Immunol Rev* (1995) 145:91-113
- Foell J, Strahotin S, O'Neil SP, McCausland MM, Suwyn C, Haber M, Chander PN, Bapat AS, Yan XJ, Chiorazzi N, Hoffmann MK, Mittler RS. CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. *J Clin Invest* (2003) 111:1505-1518.
- Foell JL, Diez-Mendonado BI, Diez OH, Holzer U, Ruck P, Bapat AS, Hoffmann MK, Mittler RS, Dannecker GE. Engagement of the CD137 (4-1BB) costimulatory molecule inhibits and reverses the autoimmune process in collagen-induced arthritis and establishes lasting disease resistance. *Immunology* (2004) 113:89-98.
- Foell JL, Hesse M, Volkmer I, Schmiedel BJ, Neumann I, Staeger MS. Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen. *Pediatr Blood Cancer* (2008a) 51:228-234.
- Foell JL, Max D, Giersberg C, Korholz D, Staeger MS. Sensitivity of Hodgkin's lymphoma cell lines to the cell cycle inhibitor roscovitine. *Anticancer Res* (2008b) 28:887-894.
- Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli C, Sperti C, Roveroni G, Pedrazzoli G, Plebani M. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res.* (1997) 17:1227-1230.

- Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, Gentilizi O, Braga M. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumors. *Cancer Lett* (1996) 104:1-5.
- Forouzandeh F, Jalili RB, Germain M, Duronio V, Ghahary A. Differential immunosuppressive effect of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on primary human CD4+ and CD8+ T cells. *Mol Cell Biochem* (2008) 309:1-7.
- Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH, Antonia SJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* (2002) 101:151-155.
- Funeshima N, Fujino M, Kitazawa Y, Hara Y, Hara Y, Hayakawa K, Okuyama T, Kimura H, Li XK. Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Gene Med* (2005) 7:565-575.
- Futagawa T, Akiba H, Kodama T, Takeda K, Hosoda Y, Yagita H, Okumura K. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* (2002) 14:275-286.
- Gammeltoft S, Ballotti R, Kowalski A, Westermark B, Van Obberghen E. Expression of two types of receptor for insulin-like growth factors in human malignant glioma. *Cancer Res* (1988) 48:1233-1237.
- Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H. Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics* (2005) 86:127-141.
- Geng Y, Gulbins E, Altman A, Lotz M. Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91:8602-8606.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* (1973) 51:1417-1423.
- Gramaglia I, Cooper D, Miner KT, Kwon BS, Croft M. Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* (2000) 30:392-402.
- Gravestien LA and Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* (1998) 10:423-434.
- Greiner JW, Zeytin H, Anver MR, Schlom J. Vaccine-based therapy directed against carcinoembryonic antigen demonstrates antitumor activity on spontaneous intestinal tumors in the absence of autoimmunity. *Cancer Res* (2002) 62:6944-6951.
- Gommerman JL and Browning JL. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* (2003) 3:642-655.

- Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, et al. 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.
- Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Rastegar M, Ohmann C. Growth regulation of human thyrocytes by thyrotropin, cyclic adenosine monophosphate, epidermal growth factor and insulin-like growth factor. In: Goretzki PE, Röher HD editors. *Frontiers of hormone research*. Basel: Karger; (1989) 56-80.
- Guirguis LM, Yang JC, White DE, Steinberg SM, Liewehr DJ, Rosenberg SA, Schwartzentruber DJ. Safety and efficacy of high-dose interleukin-2 therapy in patients with brain metastases. *J Immunother* (2002) 25:82-87.
- Gutiérrez NC, Ocio EM, de Las Rivas J, Maiso P, Delgado M, Fermiñán E, Arcos MJ, Sánchez ML, Hernández JM, San Miguel JF. Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* (2007) 21:541-549.
- Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* (1996) 86:353-364.
- Hanahan D and Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* (2000) 100:57-70.
- Hansel NN, Cheadle C, Diette GB, Wright J, Thompson KM, Barnes KC, Georas SN. Analysis of CD4+ T-cell gene expression in allergic subjects using two different microarray platforms. *Allergy* (2008) 63:366-369.
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* (2000) 5:897-904.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* (1994) 84:1361-1392.
- Heldin NE, Cvejic D, Smeds S, Westermark B. Coexpression of functionally active receptors for thyrotropin and platelet-derived growth factor in human thyroid carcinoma cells. *Endocrinology* (1991) 129:2187-2193.
- 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.
- Hersey P and Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* (2001) 1:142-150.

- Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiya H. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* (1997) 272:5846-5853.
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S: Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* (2007) 204:2803-2812.
- Honorati MC, Neri S, Cattini L, Facchini A. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* (2006) 14:345-352.
- Horlock C, Stott B, Dyson PJ, Morishita M, Coombes RC, Savage P, Stebbing J. The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer* (2009) 100:1061-1067.
- Hoshi M, Ito H, Fujigaki H, Takemura M, Takahashi T, Tomita E, Ohyama M, Tanaka R, Saito K, Seishima M. Indoleamine 2,3-dioxygenase is highly expressed in human adult T-cell leukemia/lymphoma and chemotherapy changes tryptophan catabolism in serum and reduced activity. *Leuk Res* (2009) 33:39-45.
- Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* (2007) 67:792-801.
- 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) 158:2600-2845.
- Inozume T, Hanada K, Wang QJ, Yang JC. IL-17 secreted by tumor reactive T cells induces IL-8 release by human renal cancer cells. *J Immunother* (2009) 32:109-117.
- Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, Vose JM, McKeithan T, Kucuk C, Geng H, Deffenbacher K, Smith L, Dybkaer K, Nakamura S, Seto M, Delabie J, Berger F, Loong F, Au WY, Ko YH, Sng I, Armitage JO, Chan WC. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* (2010) 115:1026-1036.
- Iretton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* (2002) 159:465-476.

- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* (1997) 388:190-195.
- Ito F, Li Q, Shreiner AB, Okuyama R, Jure-Kunkel MN, Teitz-Tennenbaum S, Chang AE. Anti-CD137 monoclonal antibody administration augments the antitumor efficacy of dendritic cell-based vaccines. *Cancer Res* (2004) 64:8411-8419.
- Ito T, Seyama T, Hayashi Y, Dohi K, Akiyama M. Establishment of 2 human thyroid-carcinoma cell-lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene-mutations. *Int J Oncol* (1994) 4:583-586.
- Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, Kim NS, Yie SW, Byeon WH, Eom SH, Ha KS, Kim YM, Kim PH. Mechanisms underlying TGF-beta1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol* (2007) 81:557-566.
- Jin B, Tao Q, Peng J, Soo HM, Wu W, Ying J, Fields CR, Delmas AL, Liu X, Qiu J, Robertson KD. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Hum Mol Genet* (2008) 17:690-709.
- Johnson JP. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* (1991) 10:11-22.
- Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaja M, Steinmann RM and Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* (2000) 191:495-502.
- Jürgens H, Paulussen M, Zoubek A. Ewing-Tumoren. In: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Hrsg. von H. Gadner, M. K. Gaedeke, J. Ritter und C. M. Niemeyer. Springer Verlag (2006) 894-910.
- Kaiser U, Auerbach B, Oldenburg M. The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* (1996) 20:389-395.
- Kamesaki H, Fukuhara S, Tatsumi E, Uchino H, Yamabe H, Miwa H, Shirakawa S, Hatanaka M, Honjo T. Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood* (1986) 68:285-292.
- Karin M and Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol* (2002) 3:221–227.
- Khong HT and Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* (2002) 3:999-1005.

- Kienzle G and von Kempis J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* (2000) 12:73-82.
- Kim JA, Averbook BJ, Chambers K, Rothchild K, Kjaergaard J, Papay R, Shu S. Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation. *Cancer Res* (2001) 61:2031-2037.
- Kim J, Choi WS, La S, Suh JH, Kim BS, Cho HR, Kwon BS, Kwon B. Stimulation with 4-1BB (CD137) inhibits chronic graft-versus-host disease by inducing activation-induced cell death of donor CD4⁺ T cells. *Blood* (2005) 105:2206-2213.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* (1994) 266:2011-15.
- Kim SK, Selleri L, Lee JS, Zhang AY, Gu X, Jacobs Y, Cleary ML. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *lpf1*-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nature Genet* (2002) 30:430-435.
- Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, Salford LG, Sjogren HO, Widegren B. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer* (2000) 89:251-258.
- Klapper JA, Downey SG, Smith FO, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Sherry RM, Royal RE, Steinberg SM, Rosenberg S. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer* (2008) 113:293-301.
- Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wiqzell H, Clifford P. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res* (1968) 28:1300-1310.
- Knappe A, Hor S, Wittmann S, Fickenscher H. Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with Herpesvirus saimiri. *J Virol* (2000) 74:3881-3887.
- Kollias G and Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: Specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* (2002) 13:315-321.
- Koopman LA, Corver WE, van der Silk AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* (2000) 191:961-975.

- Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGFbeta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* (1998) 77:1492-1494.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* (2009) 114:1141-1149.
- Krzysiek R, Lefevre EA, Bernard J, Foussat A, Galanaud P, Louache F, Richard Y. Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in human B cells. *Blood* (2000) 96:2338-2345.
- Kushner BH and Meyers PA. How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol* (2001) 19:870-880.
- Kühnöl CD. Verstärkung einer IL-2-initiierten Immunantwort gegen eine Zelllinie der Ewing-Tumor-Familie durch Stimulation des kostimulatorischen Rezeptors CD137. Doktorarbeit im Fachbereich Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. (2009) 51-53.
- Kwon BS and Weismann SM. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86:1963-1967.
- Kwon BS, Hurtado JC, Lee ZH, Kwack KB, Seo SK, Choi BK, Koller BH, Wolisi G, Broxmeyer HE, Vinay DS. Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* (2002) 168:5483-5490.
- Laderach D, Movassagh M, Johnson A, Mittler RS, Galy A. 4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of CD80(+) murine squamous cell carcinoma and the requirements of co-stimulatory molecules on tumour and host cells. *Immunology* (2000) 101:541-547.
- Laderach D, Wesa A, Galy A. 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cell Immunol* (2003) 226:37-44.
- Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, Auclair C, Couvreur P. EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 279:401-406.
- Langstein J, Michel J, Fritsche J, Kreutz M, Andreesen R, Schwarz H. CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol* (1998) 160:2488-2494.

- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* (2002) 107:452-460.
- Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* (1999) 5:677-685.
- Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, Mansour H, Chaumette MT, Berrehar F, Seikour A, Charachon A, Karoui M, Leroy K, Farcet JP, Sobhani I. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut* (2008) 57:772-729.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* (1996) 14:233-258.
- Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, May WA. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* (1995) 10:423-431.
- Li Q, Carr A, Ito F, Teitz-Tennenbaum S, Chang A. Polarization effects of 4-1BB during CD28 costimulation in generating tumor-reactive T cells for cancer immunotherapy. *Cancer Res* (2003) 63:2546-2552.
- Li R, Ruttinger D, Li R, Si LS, Wang YL. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch Surg* (2003) 388:406-412.
- Li Y, Hellstrom KE, Nevby SA, Chen L. Costimulation by CD48 and B7-1 induces immunity against poorly immunogenic tumors. *J Exp Med* (1996) 183:639-644.
- Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol* (1999) 162:186-194.
- Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. (2001) 25:402-408.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* (2001) 104:487-501
- Löb S, Königsrainer A, Zieker D, Brücher BL, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother*. (2009) 58:153-157.
- Logan GJ, Smyth CMF, Earl JW, Zaikina I, Rowe PB, Smythe JA, Alexander IE. HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Immunology* (2002) 105:478-487.

- Lozzio CB and Lozzio BB. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst* (1973) 50:535-538.
- Maby-El Hajjami H, Amé-Thomas P, Pangault C, Tribut O, DeVos J, Jean R, Bescher N, Monvoisin C, Dulong J, Lamy T, Fest T, Tarte K. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res* (2009) 69:3228-3237.
- Magie CR, Pinto-Santini D, Parkhurst SM. Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development* (2002) 129:3771-3782.
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* (1997) 272:4378-4383.
- Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William DA, Hall DM, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen RI, Rappaport EF, Saitta B. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem Cells Dev* (2007) 16:53-73.
- Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, Hwu P, Restifo NP, Overwijk WW, Dong C. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* (2009) 31:787-798.
- Max D, Hesse M, Volkmer I, Staeger MS. High expression of the evolutionarily conserved alpha/beta hydrolase domain containing 6 (ABHD6) in Ewing tumors. *Cancer Sci.* (2009a) 100:2383-2389.
- Max D, Kühnöl CD, Burdach S, Staeger MS, Föll J. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in an immunotherapy model for Ewing family tumors. In: *Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology*. Hrsg. von R. E. Schmidt Bologna, Medimond (2009b) 383-386.
- May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Denny CT. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90:5752-5756.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* (1989) 57:79-88.
- McLaughlin JP, Schlom J, Kantor JA, Greiner JW. Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccinia vaccine when given in combination with interleukin-2. *Cancer Res* (1996) 56:2361-2367.

- Meisel R, Zibert A, Laryea A, Göbel U, Däubner W, Dilloo D. Human bone stromal cells inhibit allogenic responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* (2004) 103:4619-4621.
- Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, Mittler RS, Chen L. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* (1997) 3:682-685.
- 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 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol* (1998) 28:1116-1121.
- Melichar B, Hu W, Patenia R, Melicharová K, Gallardo ST, Freedman R. rIFN-gamma-mediated growth suppression of platinum-sensitive and -resistant ovarian tumor cell lines not dependent upon arginase inhibition. *J Transl Med* (2003) 19:5.
- Mercader N, Leonardo E, Azpiazu N, Serrano A, Morata G, Martinez-A C, Torres M. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* (1999) 402:425-429.
- Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res* (2007) 67:7082-7087.
- Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Růth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccarini M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J* (2001) 20:1952-1962.
- Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, Wang RF. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:15505-15510.
- Miyazaki T, Moritake K, Yamada K, Hara N, Osago H, Shibata T, Akiyama Y, Tsuchiya M. Indoleamine 2,3-dioxygenase as a new target for malignant glioma therapy. Laboratory investigation. *J Neurosurg* (2009) 111:230-237.
- Mukherjee P, Ginardi AR, Madsen CS, Tinder TL, Jacobs F, Parker J, Agarwal B, Longenecker BM, Gendler SJ. MUC-1-specific CTLs are non-functional within a pancreatic tumor microenvironment. *Glycoconj J* (2001) 18:931-942.
- Mullauer L, Mosberger I, Chott A. Fas ligand expression on nodal non-Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol* (1998) 11:369-375.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* (1998) 281:1191-1193.

- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* (1999) 189:1363-1372.
- Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* (2002) 297:1867-1870.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* (2005) 22:633-642.
- Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC, Restifo NP. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* (2008) 112:362-373.
- Musso T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, Varesio L. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* (1994) 83:1408-1411.
- Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Clifford P, Manolov G, Fenyö EM, Klein E. Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas. *Cancer* (1969) 23:64-79.
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* (1998) 4:328-332.
- Niedobitek G, Pazolt D, Teichmann M, Devergne O. Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EB13, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Pathol* (2002) 198:310-316.
- Niwa M and Walter P. Pausing to decide. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97:12396-12397.
- Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* (2000) 150:567-580.
- Novak Kujundzić R, Grbesa I, Ivkić M, Katdare M, Gall-Troselj K. Curcumin downregulates H19 gene transcription in tumor cells. *J Cell Biochem* (2008) 104:1781-1792.
- Nozawa K, Ohata J, Sakurai J, Hashimoto H, Miyajima H, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Preferential blockade of CD8C T cell responses by administration of anti-CD137 ligand monoclonal antibody results in differential effect on development of murine acute and chronic graft-versus-host diseases. *J Immunol* (2001) 167:4981-4986.
- Ono K and Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* (2000) 12:1-13.

- Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85:1242-1246.
- Palma C, Binashi M, Bigioni M, Maggi CA, Goso C. CD137 and CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival. *Int J Cancer* (2004) 108:390-398.
- Pan K, Wang H, Chen MS, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, Huang W, Li JJ, Song HF, Xia JC. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* (2008) 134:1247-1253.
- Panelli MC, Wunderlich J, Jeffries J, Wang E, Mixon A, Rosenberg SA, Marincola FM. Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother* (2000) 23:487-498.
- Perez-Iratxeta C, Palidwor G, Porter CJ, Sanche NA, Huska MR, Suomela BP, Muro EM, Krzyzanowski PM, Hughes E, Campbell PA, Rudnicki MA, Andrade MA. Study of stem cell function using microarray experiments. *FEBS Lett* (2005) 579:1795-1801.
- Perez-Moreno M, Song W, Pasolli HA, Williams SE, Fuchs E. Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:15399-15404.
- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* (1998) 16:2659-2671.
- Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* (2003) 14:185-191.
- Phan-Bich L, Buard A, Petit JF, Zeng L, Tenu JP, Chretien P, Monnet I, Boutin C, Bignon J, Lemaire G, Jaurand MC. Differential responsiveness of human and rat mesothelioma cell lines to recombinant interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1997) 16:178-186.
- Piva R, Pellegrino E, Mattioli M, Agnelli L, Lombardi L, Boccalatte F, Costa G, Ruggeri BA, Cheng M, Chiarle R, Palestro G, Neri A, Inghirami G. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J Clin Invest* (2006) 116:3171-3182.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* (1992) 359:845-848.

- Ponten J and Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1968) 74:465-486.
- Power CA, Church DJ, Meyer A, Alouani S, Proudfoot AE, Clark-Lewis I, Sozzani S, Mantovani A, Wells TN. Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 α from lung dendritic cells. *J Exp Med* (1997) 186:825-835.
- Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH3T3 cells. *Mol Cell Biol* (1995) 15:6430-6442.
- Qian F, Vilella J, Wallace PK, Mhawech-Fauceglia P, Tario JD Jr, Andrews C, Matsuzaki J, Valmori D, Ayyoub M, Frederick PJ, Beck A, Liao J, Cheney R, Moysich K, Lele S, Shrikant P, Old LJ, Odunsi K. Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* (2009) 69:5498-5504.
- Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* (2004) 22:307-328.
- Ragnhammar P. Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors. *Med Oncol* (1996) 13:167-176.
- Rao JB, Chamberlain RS, Bronte V, Carroll MW, Irvine KR, Moss B, Rosenberg SA, Restifo NP. IL-12 is an effective adjuvant to recombinant vaccinia virus-based tumor vaccines: enhancement by simultaneous B7-1 expression. *J Immunol* (1996) 156:3357-3365.
- Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* (1974) 33:1027-1033.
- Reuter CW, Catling AD, Jelinek T, Weber MJ. Biochemical analysis of MEK activation in NIH 3T3 Fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *J Biol Chem* (1995) 270:7644-7655.
- Riesenberg R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, Castro M, Kammerer R, Takikawa O, Hatz RA, Stief CG, Hofstetter A, Zimmermann W. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* (2007) 13:6993-7002.
- Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . *J Interferon Cytokine Res* (2003) 23:413-421.
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation

- of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* (1998) 4:321-327.
- Rossi DL, Vicari AP, Franz-Bacon K, McClanahan TK, Zlotnik A. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol* (1997) 158:1033-1036.
- 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, Nuessler 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.
- Salvesen GS and Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96:10964-10967.
- Sano K, Nakamura H, Mabuchi S, Tanaka T, Nakagawara A, Takai Y. Expression of the smg p25A (a ras p21-like GTP-binding protein) gene in human neuroblastoma cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* (1990) 50:7242-7245.
- Saoulli K, Lee SY, Cannons JL, Yeh WC, Santana A, et al. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med* (1998) 187:1849-1862.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* (1953) 97:695-710.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* (1977) 19:621-626.
- Schwarz H, Blanco FJ, von Kempis J, Valbracht J, Lotz M. ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* (1996) 87:2839-2845.
- Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, Dalla-Favera R, Rajewsky K, Kuppers R. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* (2003) 101:1505-1512.
- Scott GN, DuHadaway J, Pigott E, Ridge N, Prendergast GC, Muller AJ, Mandik-Nayak L. The immunoregulatory enzyme IDO paradoxically drives B cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* (2009) 182:7509-7517.

- Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH, Choi BK, Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* (2004) 10:1088-1094.
- Setareh M, Schwarz H, Lotz M. A mRNA variant encoding a soluble form of 4-1BB, a member of the murine NGF/TNF receptor family. *Gene* (1995) 164:311-315.
- Sezer O, Jugovic D, Blohmer JU, Turzynski A, Thiel G, Langelotz C, Possinger K, Kovar H. CD99 positivity and EWS-FLI1 gene rearrangement identify a breast tumor in a 60-year-old patient with attributes of the Ewing family of neoplasms. *Diagn Mol Pathol* (1999) 8:120-124.
- Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, Meeker AK, Isaacs WB, Drake CG. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* (2008) 14:3254-3261.
- Shao H, Fu Y, Liao T, Peng Y, Chen L, Kaplan HJ, Sun D. Anti-CD137 mAb treatment inhibits experimental autoimmune uveitis by limiting expansion and increasing apoptotic death of uveitogenic T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2005) 46:596-603.
- Sharpe AH and Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:116-126.
- Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification *in vivo* of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* (1997) 186:47-55.
- Smith FO, Downey SG, Klapper JA, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Levy CL, White DE, Steinberg SM, Rosenberg SA. Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clin Cancer Res* (2008) 14:5610-5618.
- Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* (2003) 22:7359-7268.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* (2001) 409:207-11.
- Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* (1994) 6:146-151.
- Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* (1999) 66:1-9.
- Staege MS, Gorelov V, Bulankin A, Fischer U, Dumon K, Hohndorf L, Hattenhorst U, Kramm C, Burdach S. Stable transgenic expression of IL-2 and HSV1-tk by single and

- fusion tumor cell lines bearing EWS/FLI-1 chimeric genes. *Pediatr Hematol Oncol.* (2003) 20:119-40.
- Staege MS, Hansen G, Baersch G, Burdach S. Functional and molecular characterization of interleukin-2 transgenic Ewing tumor cells for in vivo immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer* (2004a) 43:23-34.
- Staege MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res.* (2004b) 64:8213-8221.
- Staege MS and Max D. Genetics and epigenetics of the TET-ETS translocation network. *Genetics and Epigenetics* (2009) 2:1-15.
- Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* (2001) 167:4137-4140.
- Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, Marberger MJ. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* (2003) 56:171-182.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101:6062-6067.
- Sugamura K, Ischii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-Cell costimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol* (2004) 4:420-431.
- Sun Y, Chen HM, Subudhi SK, Chen J, Koka R, Chen L, Fu YX. Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nat Med* (2002) 8:1405-1413.
- Takahashi C, Mittler RS, Vella AT. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* (1999) 162:5037-5040.
- Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* (2005) 98:189-193.
- Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* (1995) 7:619-627.
- Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by

- interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem.* (1988) 263:2041-2048.
- Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R, Pearson TC, Larsen CP. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* (1999) 163:4859-4868.
- Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiyama H, Yoshie O. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* (1999) 29:633-642.
- Taraban VY, Rowley TF, O'Brien L, Chan HT, Haswell LE, Green MH, Tutt AL, Glennie MJ, Al-Shamkhani. Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of antitumor immune responses. *Eur J Immunol* (2002) 32:3617-3627.
- Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* (2007) 11:421-429.
- Toretsky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D, Helman LJ. The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* (1997) 272:30822-30827.
- Toub N, Bertrand JR, Tamaddon A, Elhames H, Hillaireau H, Maksimenko A, Maccario J, Malvy C, Fattal E, Couvreur P. Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma. *Pharm Res* (2006) 23:892-900.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamauchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* (1980) 26:171-176.
- Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res* (1970) 30:2110-2118.
- Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* (1984) 12-19.
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* (2003) 9:1269-1274.
- Van den Eynde B and van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* (1997) 9:684-693.
- van Elsas A, Aarnoudse C, van der Minne CE, van der Spek CW, Brouwenstijn N, Osanto S, Schrier PI. Transfection of IL-2 augments CTL response to human melanoma cells in vitro: immunological characterization of a melanoma vaccine. *J Immunother* (1997) 20:343-353.

- Van Pel A, van der Bruggen P, Coulie PG, Brichard VG, Lethé B, Van den Eynde B, Uyttenhove C, Renauld J-C, Boon T. Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev* (1995) 145:229-250.
- Veldhoen M, Hocking R, Atkins C, Locksley R, Stockinger B. TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells *Immunity* (2006) 24:179-189.
- Viemann D, Goebeler M, Schmid S, Nordhues U, Klimmek K, Sorg C, Roth J. TNF induces distinct gene expression programs in microvascular and macrovascular human endothelial cells. *J Leukoc Biol* (2006) 80:174-185.
- Vinay DS and Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* (1998) 10:481-489.
- Vinay DS and Kwon BS. Relative abilities of 4-1BB (CD137) and CD28 to co-stimulate the response of cytokine deflected Th1 and Th2 cells. *Immunobiology* (1999) 200:246-263.
- von Euw E, Chodon T, Attar N, Jalil J, Koya RC, Comin-Anduix B, Ribas A. CTLA4 blockade increases Th17 cells in patients with metastatic melanoma. *J Transl Med* 2009. 7:35.
- Wang J, Guo Z, Dong Y, Kim O, Hart J, Adams A, Larsen CP, Mittler RS, Newell KA. Role of 4-1BB in allograft rejection mediated by CD8 α T cells. *Am J Transplant* (2003) 3:543-551.
- Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET. Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells identifies novel immune response players in T-cell activation. *BMC Genomics* (2008) 9:225.
- Watts TH and DeBenedette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol.* (1999) 11:286-293.
- Weber WP, I Feder-Mengus C, Chiarugi A, Rosenthal R, Reschner A, Schumacher R, Zajac P, Misteli H, Frey DM, Oertli D, Heberer M, Spagnoli GC. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8 $^{+}$ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. *Eur J Immunol* (2006) 36:296-304.
- Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production and the development of cytolytic effector function. *J Immunol* (2002) 168:4897-4906.
- Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. *Biochem Biophys Acta* (1989) 1012:142-147.

- Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, Miser J, Kao-Shan S, Tsai S, Israel MA. Cytogenetic characterization of selected small round cell tumors of childhood. *Cancer Genet Cytogenet* (1986) 21:185-208.
- Wilcox RA, Chapoval AI, Gorski KS, Otsuji M, Shin T, Flies DB, Tamada K, Mittler RS, Tsuchiya H, Pardoll DM, Chen L. Cutting edge: expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* (2002a) 168:4262-4267.
- Wilcox RA, Flies DB, Zhu G, Johnson AJ, Tamada K, Chapoval AI, Strome SE, Pease LR, Chen L. Provision of antipromoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* (2002b) 109:651-659.
- Wilcox RA, Tamada K, Strome SE, Chen L. Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *J Immunol* (2002c) 169:4230-4236.
- Wildenberger GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. p120-Catenin and p190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho. *Cell* (2006) 127:1027-1039.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* (2007) 8:950-957.
- Wolf J, Kapp U, Bohlen H, Kornacker M, Schoch C, Stahl B, Mucke S, von Kalle C, Fonatsch C, Schaefer HE, Hansmann ML, Diehl V. Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* (1996) 87:3418-3428.
- Wróbel T, Mazur G, Jazwiec B, Kuliczowski K. Interleukin-17 in acute myeloid leukemia. *J Cell Mol Med* (2003) 7:472-474.
- Wu Y, Liu W, Sun H, Zhou H, Xu H. Expression of P120 catenin mRNA in Non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* (2006) 26:185-187.
- Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* (2009) 69:5522-5530.
- Xiao K, Allison D, Kottke M, Buckley K, Vincent P, Faundez V, Kowalczyk A. Cellular levels of p120-catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* (2003) 163:535-545.
- Xie YF, Sheng WH, Miao JC, Yang JC. The effect of human IL-17F on growth of human hepatocarcinoma xenograft tumor in nude mice. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* (2006) 22:772-778.

- Zhang B, Rong G, Wie H, Zhang M, Bi J, Ma L, Xue X, Wie G, Liu X, Fang. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) 374:533-537.
- Zhang H, Merchant MS, Chua KS, Khanna C, Helman LJ, Telford B, Ward Y, Summers J, Toretsky J, Thomas EK, June CH, Mackall CL. Tumor expression of 4-1BB ligand sustains tumor lytic T cells. *Cancer Biol Ther* (2003) 2:579-586.
- Zhou Z, Kim S, Hurtado J, Lee ZH, Kim KK, Pollock KE, Kwon BS. Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand. *Immunol Lett* (1995) 45:67-73.
- Zhou Z, Reddy K, Guan H, Kleinermann ES. VEGF (165), but not VEGF (189), stimulates vasculogenesis and bone marrow cell migration into Ewing's sarcoma tumors in vivo. *Mol Cancer Res.* (2007) 11:1125-1132.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros P, Combaret V, Lenoir G, Aurias A, Thomas G, Delattre O. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* (1993) 12:4481-4487.
- Zwerner JP, Guimbellot J, May WA. EWS/FLI function varies in different cellular backgrounds. *Exp Cell Res* (2003) 290:414-419.

7 Anhang

7.1 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Genbezeichnungen

In der folgenden Tabelle wurden Genkürzel zusammengestellt, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Neben dem Genkürzel wurde die Gen-Identifikationsnummer der *Entrez*-Datenbank (GenID) und Identifikationsnummer der *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM)-Datenbank aufgeführt. Es wurden Gene, deren Abkürzungen nur in Expressionsbildern und tabellarischen Zusammenstellungen auftauchen, hier aus Platzgründen nicht aufgeführt.

Abkürzung	GenID	OMIM	Bezeichnung (Synonyme) deutsche/andere
APAF1	317	602233	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
APO-1	355	134637	<i>apoptosis antigen 1</i> (FAS, TNFRSF6)
APO-3	8718	603366	<i>apoptosis inducing receptor 3</i> (TNFRSF25, DR3)
APRIL	8741	604472	<i>a proliferation inducing ligand</i> (TNFSF13)
APT1LG1	356	134638	<i>apoptosis (APO-1) antigen ligand 1</i> (FASL, TNFSF6)
A-RAF	369	311010	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
ATF1	466	123803	<i>activating transcription factor 1</i>
BAFF	10673	603969	<i>B-cell activating factor</i> (TNFSF13B)
BAFFR	115660	606269	<i>B cell-activating factor receptor</i> (TNFRSF13C)
BAGE	574	605167	<i>B melanoma antigen</i>
BCL2	596	151430	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL2L1	598	---	<i>BCL2-like 1</i> (Bcl-X)
BCMA	608	109545	<i>B cell maturation antigen</i> (TNFRSF17, BCM)
BDNF	627	113505	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
B-RAF	673	164757	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BTLA	151888	607925	<i>B and T lymphocyte associated</i>
CASP8	841	601763	<i>caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CCL20	6364	601960	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i> (MIP-3 α , SCAY20, LARC)
CCND1	595	168461	Cyclin D1
CCR6	1235	601835	<i>chemokine (C-C motif) receptor 6</i> (CD196, DCR2)
CD134	7293	600315	<i>cluster of differentiation 134</i> (TNFRSF4, OX40)
CD134L	7292	603594	<i>cluster of differentiation 134 ligand</i> (TNFSF4, OX40L)
CD137	3604	602250	<i>cluster of differentiation 137</i> (TNFRSF9, 4-1BB)
CD137L	8744	606182	<i>cluster of differentiation 137 ligand</i> (TNFSF9, 4-1BBL)
CD14	929	158120	<i>cluster of differentiation 14</i>
CD15	2526	104230	<i>cluster of differentiation 15</i> (FUT4)
CD2	914	186990	<i>cluster of differentiation 2</i> (SRBC)
CD20	931	112210	<i>cluster of differentiation 20</i> (MS4A1, B1)
CD21	1380	120650	<i>cluster of differentiation 21</i> (CR2)
CD25	3559	147730	<i>cluster of differentiation 25</i> (IL2RA)
CD27	939	186711	<i>cluster of differentiation 27</i> (TNFRSF7, S152)
CD27L	970	602840	<i>cluster of differentiation 27 ligand</i> (TNFSF7, CD70)
CD28	940	186760	<i>cluster of differentiation 28</i>
CD30	943	153243	<i>cluster of differentiation 30</i> (TNFRSF8, Ki-1)
CD30L	944	603875	<i>cluster of differentiation 30 ligand</i> (TNFSF8, CD153)
CD4	920	186940	<i>cluster of differentiation 4</i>

Abkürzung	GenID	OMIM	Bezeichnung (Synonyme) deutsche/andere
CD40	958	109535	<i>cluster of differentiation 40</i> (TNFRSF5)
CD40L	959	300386	<i>cluster of differentiation 40 ligand</i> (TNFSF5, CD154)
CD69	969	107273	<i>cluster of differentiation 69</i>
CD80	941	112203	<i>cluster of differentiation 80</i> (B7.1)
CD86	942	601020	<i>cluster of differentiation 86</i> (B7.2)
CFLAR	8837	603599	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i> (c-FLIP)
c-IAP1	329	601712	<i>cellular inhibitor of apoptosis 1</i> (BIRC2)
c-IAP2	330	601721	<i>cellular inhibitor of apoptosis 2</i> (BIRC2)
CREB1	1385	123810	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
CREB3L1	90993	---	<i>cAMP responsive element binding protein 3-like 1</i>
CREB3L2	64764	608834	<i>cAMP responsive element binding protein 3-like 2</i>
CTLA-4	1493	123890	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CTNND1	1500	601045	<i>catenin (cadherin-associated protein), delta 1</i>
DCR3	8771	603361	<i>decoy receptor 3</i> (TNFRSF6B)
DDIT3	1649	126337	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
DR6	27242	605732	<i>death receptor 6</i> (TNFRSF21)
E6	1489078	---	<i>E6 transforming protein [Human papillomavirus type 16]</i>
E7	1489079	---	<i>E7 transforming protein [Human papillomavirus type 16]</i>
EDA	1896	300451	<i>ectodysplasin A</i>
EDA2R	60401	300276	<i>ectodysplasin A2 receptor</i> (TNFRSF27)
EDAR	10913	604095	<i>ectodysplasin A receptor</i>
EGFR	1956	131550	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERG	2078	165080	<i>ETS related gene</i>
ETV1	2115	600541	<i>ETS variant 1</i>
ETV4	2118	600711	<i>ETS variant 4</i>
EWSR1	2130	133450	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
FEV	54738	607150	<i>fifth Ewing variant</i>
FLI1	2313	193067	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>
GAGE1	2543	300594	<i>G antigen 1</i>
GCN2	440275	609280	<i>general control non-derepressible-2</i>
GITR	8784	603905	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein</i> (TNFRSF18)
GITRL	8995	603898	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand</i> (TNFSF18)
GM-CSF	1437	138960	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HER2/neu	2064	164870	(ERBB2, NEU, HER2)
HVEM	8764	602746	<i>herpesvirus entry mediator</i> (TNFRSF14, LIGHTR)
ICOS	29851	604558	<i>inducible T-cell co-stimulator</i>
IDO	3620	147435	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i> (INDO)
IDO2	169355	612129	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase 2</i> (INDO2, INDOL1)
IFN γ	3458	147570	<i>gamma Interferon</i>
IL10	3586	124092	<i>interleukin 10</i>
IL15R	3601	601070	<i>interleukin 15 receptor</i>
IL17A	3605	603149	<i>interleukin 17A</i> (IL17, CTLA8)
IL17F	112774	606496	<i>interleukin 17F</i> (ML1)
IL1R1	3554	147810	<i>interleukin 1 receptor, type I</i>
IL1R2	7850	147811	<i>interleukin 1 receptor, type II</i>
IL2	3558	147680	<i>interleukin 2</i>
IL26	55801	605679	<i>interleukin 26</i>
IL4	3565	147780	<i>interleukin4</i>
IL6	3569	147620	<i>interleukin 6</i> (BSF2, HGF)
IL6R	3570	147880	<i>interleukin 6 receptor</i>
IL7R	3575	146661	<i>interleukin 7 receptor</i>

Abkürzung	GenID	OMIM	Bezeichnung (Synonyme) deutsche/andere
KYNU	8942	605197	Kynureninase
LFA-2	914	186990	<i>lymphocyte-function antigen-2</i> (CD2)
LIGHT	8740	604520	<i>ligand for herpesvirus entry mediator</i> (TNFSF14)
LIPI	149998	609252	<i>lipase, member I</i>
LT α	4049	153440	<i>lymphotoxin alpha</i> (TNFSF1)
LT β R	4055	600979	<i>lymphotoxin beta receptor</i> (TNFRSF3, TNFCR)
MAGEA1	4100	300016	<i>melanoma antigen family A 1</i>
MUC1	4582	158340	Mucin 1
NCAM	4684	116930	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NFATC2	4773	600490	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i>
NGF	4803	162030	<i>nerve growth factor</i> (beta polypeptide)
NGFR	4804	162010	<i>nerve growth factor receptor</i> (TNFRSF16, CD271)
NR4A3	8013	600542	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>
NT3	4908	162660	<i>neurotrophin 3</i> (NGF2, NTF3)
NT4	4909	162662	<i>neurotrophin 4</i> (NTF4)
OPG	4982	602643	<i>osteoprotegerin</i> (TNFRSF11B)
p53	7157	191170	(TP53)
PATZ1	23598	---	<i>POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1</i>
PBX1	5087	176310	<i>pre-B-cell leukemia homeobox 1</i>
POU5F1	5460	164177	<i>POU class 5 homeobox 1</i>
RAF1	5894	164760	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> (c-RAF)
RANK	8792	603499	<i>receptor activator of nuclear factor-kappa B</i> (TNFRSF11A)
RANKL	8600	602642	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i> (TNFSF11)
SLITRK3	22865	606979	<i>SLIT and NTRK-like family, member 3</i>
SP3	6670	601804	<i>specificity protein 3 transcription factor</i>
TACI	23495	604907	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i> (TNFRSF13B, CD267)
TAF15	8148	601574	<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa</i>
TAJ	55504	606122	<i>toxicity and JNK inducer</i> (TNFRSF19, TROY)
TCF3	6929	147141	<i>transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)</i> (E2A, ITF1)
TDO	6999	191070	Tryptophan-2,3-dioxygenase
TGF α	7039	190170	<i>transforming growth factor, alpha</i>
TGF β	7040	190180	<i>transforming growth factor, beta</i>
TNF	7124	191160	<i>tumor necrosis factor</i> (TNFSF2, TNF α)
TNF-R	7132	191190	<i>tumor necrosis factor receptor</i> (TNFRSF1A, TNFR1)
TNF-R-II	7133	191191	<i>tumor necrosis factor receptor 2</i> (TNFRSF1B, TNFR2)
TRAF2	7186	601895	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAIL	8743	603598	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> (TNFSF10, CD253)
TRAILR1	8797	603611	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1</i> (TNFRSF10A, DR4)
TRAILR2	8795	603612	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1</i> (TNFRSF10B, DR5)
TRAILR3	8794	603613	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1</i> (TNFRSF10C, DRC1)
TRAILR4	8793	603614	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1</i> (TNFRSF10D, DRC2)
TWEAK	8742	602695	<i>TNF-related WEAK inducer of apoptosis</i> (TNFSF12A)
TWEAKR	51330	605914	<i>TWEAK receptor</i> (TNFRSF12A)
TYR	7299	606933	Tyrosinase
WT1	7490	194070	<i>Wilms tumor 1</i>
ZNF384	171017	609951	<i>zinc finger protein 384</i>

7.2 Heraufregulierte Gene nach Inkubation von T-Zellen mit CD137-spezifischen Antikörpern

Angegeben sind die hochexprimierten Gene nach Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und Antikörper gegen CD137, im Vergleich zur Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einer Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper. Dargestellt ist die Affymetrix-Sondensatz-Identifikationsnummer (HG U133Plus 2.0), die Genbezeichnung, sowie die Signalintensitäten für die 3 Ansätze:

Stimulation mit Antikörper gegen CD3 (1)

Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper (2)

Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und Antikörper gegen CD137 (3)

Sondensatz	Gen	1	2	3
1556444_a_at	---	42	32	150
1556494_at	---	16	22	108
1556748_x_at	---	41	45	154
1556909_at	---	9	18	126
1561107_at	---	46	50	118
1568804_at	---	60	35	127
1570068_at	---	76	31	177
212889_x_at	---	20	20	106
213114_at	---	89	83	198
216446_at	---	31	25	127
217129_at	---	17	12	102
226997_at	---	48	60	129
230279_at	---	129	157	361
234773_x_at	---	29	36	188
239774_at	---	33	29	105
240124_at	---	26	41	118
241431_at	---	48	40	115
243034_at	---	14	30	105
1569102_at	ABCA4	48	23	119
208237_x_at	ADAM22	65	49	164
216743_at	ADCY6	29	18	115
204498_s_at	ADCY9	32	31	126
207193_at	AGRP	50	24	116
1562261_at	AMZ1	36	35	100
221134_at	ANGPT4	64	31	131
222013_x_at	APP	66	47	158
224204_x_at	ARNTL2	107	9	225
218832_x_at	ARRB1	23	34	115
221161_at	ASCL3	8	31	126
208260_at	AVPR1B	55	51	121
212849_at	AXIN1	20	115	312
231243_s_at	BHLHB3	53	35	108
219556_at	C16orf59	95	59	194
209573_s_at	C18orf1	20	38	114
229856_s_at	C1orf128	63	54	132
205654_at	C4BPA	41	36	123
239417_x_at	C6orf52	32	44	106

Anhang

Sondensatz	Gen	1	2	3
224987_at	C6orf89	271	254	581
1557867_s_at	C9orf117	68	47	156
205476_at	CCL20	58	55	257
205685_at	CD86	86	75	175
222504_s_at	COX4NB	16	45	105
224668_at	DBNDD2	117	69	249
239310_at	DDB2	31	24	123
1553839_at	DKFZp761B107	50	52	147
208725_at	EIF2S2	39	19	111
219432_at	EVC	85	35	175
234414_at	FAM22F	48	36	117
222267_at	FLJ14803	108	106	244
218272_at	FLJ20699	51	40	152
1564295_at	FLJ25917	14	57	113
208748_s_at	FLOT1	36	29	137
221759_at	G6PC3	47	33	166
1570276_a_at	GATA4	49	50	102
215595_x_at	GCNT2	41	58	194
207825_s_at	GHRHR	40	37	164
1555765_a_at	GNG4	19	60	157
206933_s_at	H6PD	64	28	147
235458_at	HAVCR2	19	18	171
214537_at	HIST1H1D	32	30	156
208496_x_at	HIST1H3G	15	20	102
234408_at	IL17F	36	3	103
1552749_a_at	KLC3	45	79	175
229013_at	LOC145783	183	139	402
229581_at	LOC392617 /// LOC641904	90	91	275
1561335_at	LOC440602	56	38	164
229096_at	LOC440895	32	16	118
242704_at	LOC55565	38	32	138
235359_at	LRRRC33	180	171	376
204952_at	LYPD3	46	56	113
200835_s_at	MAP4	108	75	222
206904_at	MATN1	85	81	196
210843_s_at	MFAP3L	20	33	113
225316_at	MFSD2	65	72	191
221936_x_at	MRPL41	70	25	172
1557690_x_at	NPAS2	34	27	142
209262_s_at	NR2F6	33	7	115
218359_at	NRSN2	41	38	176
211691_x_at	OAZ1	38	88	208
208520_at	OR10H3	32	40	105
203154_s_at	PAK4	82	88	247
203859_s_at	PALM	33	53	111
204746_s_at	PICK1	42	17	121
218828_at	PLSCR3	341	356	721
203735_x_at	PPFIBP1	194	123	391
211748_x_at	PTGDS	86	78	240
1556540_a_at	RAI1	42	41	155
226772_s_at	SAP30L	53	39	125
226022_at	SASH1	98	97	201
205725_at	SCGB1A1	44	40	115

Sondensatz	Gen	1	2	3
213464_at	SHC2	37	39	107
209402_s_at	SLC12A4	83	118	285
237618_at	SLC25A37	38	44	109
234291_s_at	SLC6A20	38	13	115
231324_at	SMARCB1	57	44	146
237795_s_at	SP2	59	63	133
219389_at	SUSD4	96	64	263
210537_s_at	TADA2L	48	46	129
216128_at	TBCD	28	52	121
227642_at	TFCP2L1	34	18	112
223659_at	TMPRSS13	36	40	109
217853_at	TNS3	34	41	101
240454_at	TTC7A	21	47	106
1562232_at	ZNF37A	44	44	166
232367_x_at	ZNF598	53	37	152
219047_s_at	ZNF668	91	26	189
220242_x_at	ZNF701	207	172	426
219781_s_at	ZNF771	37	29	121
1554445_at	ZNF85	15	9	102

7.3 Herabregulierte Gene nach Inkubation von T-Zellen mit CD137-spezifischen Antikörpern

Angegeben sind die herabregulierten Gene nach Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und Antikörper gegen CD137, im Vergleich zur Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einer Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper. Dargestellt ist der Affymetrix-Sondensatz-Identifikationsnummer (HG U133Plus 2.0), Genbezeichnung, sowie die Signalintensitäten für die 3 Ansätze:

Stimulation mit Antikörper gegen CD3 (1)

Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und einem Kontroll-Antikörper (2)

Stimulation mit Antikörper gegen CD3 und Antikörper gegen CD137 (3)

Sondensatz	Gen	1	2	3
239235_at	---	426	407	40
238904_at	---	266	221	31
239360_at	---	204	173	28
235999_at	---	1047	1799	189
244373_at	---	366	352	66
234171_at	---	173	211	39
1566498_at	---	152	168	36
217135_x_at	---	185	200	46
229968_at	---	191	195	50
240393_at	---	251	202	74
229879_at	---	160	177	48
237772_at	---	266	348	80
234885_at	---	212	210	64
240737_at	---	201	327	62

Anhang

Sondensatz	Gen	1	2	3
1556250_at	---	226	214	72
1562476_at	---	252	201	81
1561561_x_at	---	213	232	69
231818_x_at	---	226	175	75
238181_at	---	159	158	61
234033_at	---	218	257	84
1564490_at	---	162	159	65
239801_at	---	227	189	93
1566446_at	---	473	522	198
241012_at	---	180	255	76
233427_x_at	---	398	587	172
233218_at	---	151	167	66
244157_x_at	---	181	209	81
237199_at	---	170	199	79
231207_at	---	206	223	96
203812_at	---	196	219	91
1562810_at	---	163	163	78
236375_at	---	197	234	94
215385_at	---	796	1022	381
231203_at	---	392	516	188
242526_at	---	195	211	94
244431_at	---	223	299	108
236569_at	---	272	294	131
1556107_at	---	412	655	204
244464_at	---	164	276	82
203504_s_at	ABCA1	161	170	75
223781_x_at	ADH4	463	425	138
220989_s_at	AMN	211	180	39
214070_s_at	ATP10B	207	205	62
1565763_at	C13orf33	282	251	46
208109_s_at	C15orf5	157	154	66
1570070_at	C20orf160	430	359	150
1553204_at	C20orf200	429	421	166
230457_at	C6orf35	233	245	112
1554202_x_at	CABP4	520	715	233
229468_at	CDK3	803	942	342
221541_at	CRISPLD2	214	191	82
1557944_s_at	CTNND1	221	221	99
205927_s_at	CTSE	179	171	78
223421_at	CYHR1	191	332	94
225488_at	DERL1	184	170	69
241748_x_at	DGCR14	278	202	100
1563947_a_at	ERC1	214	274	101
1565775_at	FAM38B	156	182	70
1563674_at	FCRL2	329	338	164
210973_s_at	FGFR1	395	436	159
228832_at	FLJ20021	234	275	115
217280_x_at	GABRA5 /// LOC727729	156	200	77
219085_s_at	GEMIN7	164	151	60
223862_at	GHRL	151	225	69
208000_at	GML	166	245	83
235851_s_at	GNAS	211	256	65

Anhang

Sondensatz	Gen	1	2	3
1553067_a_at	GNRHR2	201	177	52
220936_s_at	H2AFJ	174	179	84
216495_x_at	IVD	256	251	107
224775_at	IWS1	224	193	88
211304_x_at	KCNJ5	159	172	59
220782_x_at	KLK12	179	187	70
206124_s_at	LLGL1	154	177	62
1560278_at	LOC221122	167	237	76
1565728_at	LOC284630	157	153	32
237163_x_at	LOC390705	241	219	94
1568640_at	LOC400960	189	180	46
231696_x_at	LOC654779	216	366	93
229678_at	LOC728431	190	192	78
1570541_s_at	LOC729936	150	158	38
1566456_at	LOC729988	331	385	120
1563007_at	LOC730217	200	209	97
233483_at	LOC96597	190	170	81
229195_at	MESP1	257	240	63
1553688_at	METTL6	154	168	45
1552698_at	MGC16703	170	211	46
205614_x_at	MST1	275	259	105
231338_at	NUT	347	321	99
216522_at	OR2B6	177	167	82
1556929_at	PAPOLG	301	528	144
212151_at	PBX1	180	207	50
1565845_at	PDXDC2	152	164	28
220041_at	PIGZ	168	194	55
228823_at	POLR2J2	165	164	41
213847_at	PRPH	172	184	83
1552348_at	PRSS33	236	216	35
205911_at	PTHR1	157	186	78
207330_at	PZP	261	293	98
206753_at	RDH16	270	178	44
215922_at	REPS1	231	333	115
1559714_at	RGR	274	200	30
228405_at	RHPN1	153	211	71
233203_at	ROPN1	151	190	74
216162_at	SBNO1	158	186	53
238406_x_at	SEZ6L2	207	209	98
237106_at	SLC11A2	237	371	114
211112_at	SLC12A4	192	225	68
228836_at	SLC25A35	245	197	65
209453_at	SLC9A1	295	177	55
206732_at	SLITRK3	175	165	67
216629_at	SRRM2	157	169	78
204701_s_at	STOML1	220	184	46
1553555_at	TAS2R38	288	160	41
205313_at	TCF2	208	214	90
241918_at	TMEM16G	233	215	102
205347_s_at	TMSL8	207	307	96
205793_x_at	TNK1	322	309	105
215345_x_at	TRGV7	320	250	28

Anhang

Sondensatz	Gen	1	2	3
214529_at	TSHB	207	185	81
235815_at	TSHZ2	204	224	76
207126_x_at	UGT1A4	165	185	78
206922_at	VCY /// VCY1B	200	271	92
1553373_at	WDR64	158	155	67
1562026_at	WNK2	182	182	67
218606_at	ZDHHC7	2238	2407	925
229140_at	ZNF579	215	208	88
234575_at	ZNF71	223	231	34
213542_at	ZNF710	211	346	78

Lebenslauf

Name: Daniela Max.

Geburtsdatum: 18.10.1977.

Geburtsort: Staßfurt.

Nationalität: Deutsch.

Familienstand: Ledig.

1984-1992: POS W. I. Lenin, Staßfurt.

1992-1996: Salzland-Gymnasium, Staßfurt.

1992: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife.

1996-1997: freiwilliges ökologisches Jahr (Kinder- und Erholungszentrum Güntersberge).

1997-2004: Studium der Biologie (Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg).

2000: Vordiplom der Biologie.

2002-2003: Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik (Pflanzen- und Zellphysiologie (Prof. Dr. U. Johanningmeier) der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.

2003-2004: Experimentelle Diplomarbeit im Fachbereich Biologie Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (Prof. Dr. U. Johanningmeier).

2004: Diplom in Biologie.

2004: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Botanik (Pflanzen- und Zellphysiologie) (Prof. Dr. U. Johanningmeier) der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.

2004-2005: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Neuroonkologischen Labor der Neurochirurgie (Prof. Dr. W. Burkert) der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.

2005-: wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungslabor für krebskranke Kinder der Kinderklinik an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg; Landeszentrum für Zell- und Gentherapie. Experimentelle Promotionsarbeit.

Erklärung

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden von mir nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Zugleich erkläre ich, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist bzw. jemals anhängig war.

Halle, 08.04.10

(Daniela Max)

Danksagung

Ich danke PD Dr. J. Föll für die Überlassung dieses interessanten Themas, sowie für die Überlassung des in dieser Arbeit genutzten Antikörpers (α -human CD137).

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. R. G. Sawers für die Übernahme des Erstgutachtens.

Weiterhin bedanke ich mich bei PD Dr. M. S. Staeger für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Durch seine Fähigkeit zu motivieren, durch seine stetige Diskussionsbereitschaft und vor allen Dingen durch seine Geduld hat er in starkem Maße Anteil an dieser Arbeit.

Prof. Dr. D. Körholz danke ich für die hilfreichen Anregungen und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter des Forschungslabors für krebskranke Kinder am Landeszentrum für Zell- und Gentherapie für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Eine besondere Hilfe bei großen und kleinen Fragen waren für mich über die lange Zeit Ines, Manuela, Corinna, Benjamin, Anja, Ingo und Caspar. Des Weiteren danke ich auch allen medizinischen Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten der Arbeitsgruppe für die nette Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich C. Kühnöl, J. Hartmann, T. Müller, B. Schmiedel, J. Wohlrab, M. S. Staeger, G. Bornkamm, G. Laux und L. Müller für die Überlassung von Zelllinien, die in dieser Arbeit analysiert wurden.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und der ganzen Familie, die mich meinen Weg gehen ließen und mir immer unterstützend zur Seite standen. Ein spezieller Dank geht dabei an meine Schwester Susi, die mich durch gute und schlechte Stunden begleitete. Zu danken habe ich auch meinen Freunden, die immer für mich da waren und durch ihre jeweilige Einzigartigkeit mein Leben bereichern. Ein ganz spezieller Dank geht dabei an Nic, die durch ihren Glauben an mich und diese Arbeit besonders an den schlechten Tagen ein Aufgeben verhindert hat. In diesem Zusammenhang danke ich Steffen und Nic für das Obdach, welches sie mir während einiger Schreibphasen gewährten.

Des Weiteren danke ich Andreas, Katja, Christian, Jan, Ronny und vor allem Martin für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

Zu guter letzt danke ich Jan für seinen Humor, sein Lachen und die gemeinsam verbrachte Zeit.

Publikationsliste

Originalarbeiten:

1. Föll JL, **Max D**, Giersberg C, Körholz D, Staege MS. Sensitivity of Hodgkin's lymphoma cell lines to the cell cycle inhibitor roscovitine. *Anticancer Res* 28:887-894 (2008).
2. Hönnscheidt C, **Max D**, Richter N, Staege MS. Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Scand J Immunol* 70:216-25 (2009).
3. **Max D**, Hesse M, Volkmer I, Staege MS. High expression of the evolutionarily conserved alpha/beta hydrolase domain containing 6 (ABHD6) in Ewing tumors. *Cancer Science* 100:2383-2389 (2009).

Übersichtsartikel:

1. Staege MS and **Max D**. Genetics and epigenetics of the TET-ETS translocation network. *Genetics and Epigenetics* 2:1-15 (2009).
2. Staege MS, Hesse M and **Max D**. Lipases and related molecules in cancer. *Cancer Growth and Metastasis Im Druck* (2009).
3. **Max D**, Kühnöl CD, Burdach S, Staege MS, Föll J. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in an immunotherapy model for Ewing family tumors. *2nd European congress of immunology*, 13.-16.09.2009, Berlin. In: *Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology*, Hrsg. von R. E. Schmidt Bologna, Medimond 383-386 (2009).

Konferenzbeiträge:

1. **Max D**, Kühnöl CD, Staege MS, Föll J. CD137/CD137Ligand as co-stimulatory molecules for adoptive immunotherapy. *XX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung*, 06.-09.06.2007, Wilsede. *Klin Pädiatr* 219:188 (2007).
2. **Max D**, Weißflog G, Hutter C, Kaftan J, Mauz-Körholz C, Körholz D, Staege MS. Characterization of tumour associated and tissue specific gene expression profiles. *The 8th international conference of anticancer research*, 17.-22.10.2008, Kos, Griechenland. *Anticancer Res* 28:3496-3497 (2008).
3. **Max D**, Weißflog G, Hutter C, Kaftan J, Mauz-Körholz C, Körholz D, Staege MS. Charakterisierung von tumorassoziierten und gewebespezifischen Gen-Expressionsprofilen. *Jahrestagung der Sächsisch-Thüringischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin und Kinderchirurgie*, 03.-04.04.2009, Dresden. *Kinder- und Jugendmedizin* 9:A23 (2009).
4. **Max D**, Hesse M, Volkmer I, Kramm C, Staege MS. Hohe Expression einer neuen alpha/beta-Hydrolase, ABHD6, in Ewing-Tumoren. *Jahrestagung der Sächsisch-Thüringischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin und Kinderchirurgie*, 03.-04.04.2009, Dresden. *Kinder- und Jugendmedizin* 9:A24 (2009).
5. **Max D**, Weißflog G, Hutter C, Kaftan J, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D, Staege MS. Identification of putative cancer/testis antigens by comparative gene expression profiling. *2nd European congress of immunology*, 13.-16.09.2009, Berlin (2009).
6. **Max D**, Kühnöl CD, Burdach S, Staege MS, Föll J. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in tumour cells in an immunotherapy model for Ewing family tumours (EFT). *2nd European congress of immunology*, 13.-16.09.2009, Berlin (2009).