



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Humanmedizin

Klinikum rechts der Isar
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

**Rekonstitution eines humanen Immunsystems in immundefizienten
Mäusen und Provokation mit allogenen Ewing Sarkomzellen**

Sabine U. Heim

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

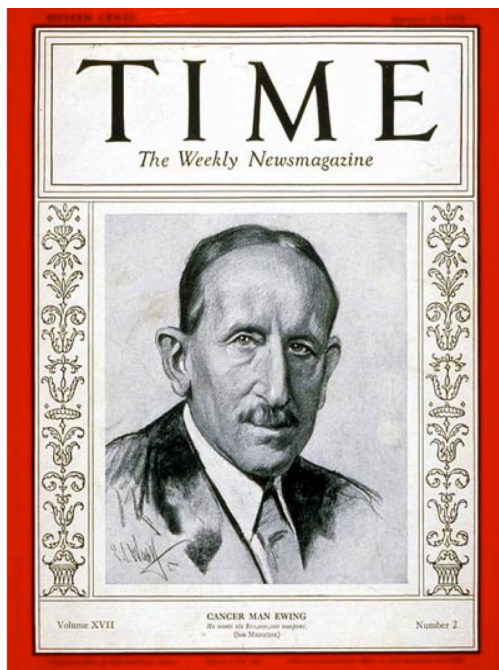
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach
2. Priv.-Doz. Dr. G. H. S. Richter

Die Dissertation wurde am 10.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.10.2015 angenommen.



James Ewing, 1866 - 1943,
"Cancer man", Erstbeschreiber
des "Ewing-Sarkoms"



William B. Coley, 1862 - 1936,
Vater der Immuntherapie gegen
Krebs

Abbildung 1 Quelle:
<http://www.time.com/time/covers/0,16641,19310112,00.html>, entnommen am 09.03.2011

Abbildung 2 Quelle:
http://en.wikipedia.org/wiki/William_Coley,
entnommen am 09.03.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Kurze Vorstellung und Zusammenfassung der Arbeit	8
1.2	Das Ewing-Sarkom und die Familie der Ewing-Tumore	9
1.2.1	Einführung	9
1.2.2	Diagnose und Zytogenetik.....	10
1.2.3	Prognosefaktoren	12
1.2.4	Therapieansätze.....	13
1.2.4.1	Lokaltherapie	13
1.2.4.2	Systemtherapie.....	13
1.2.4.3	Prognose und alternative Therapieansätze	15
1.3	Immuntherapie in der Tumorbekämpfung.....	17
1.3.1	<i>Targeted tumor therapy</i> - gezielte Tumorthherapie.....	17
1.3.2	Toleranz- und <i>immune escape</i> Mechanismen	18
1.3.3	Ansätze der Immuntherapie in der Tumorbekämpfung.....	21
1.3.4	Bisherige immuntherapeutische Ansätze beim EFT	24
1.3.5	Mögliche Ziel-Antigene beim EFT	25
1.4	Modelle des humanen Immunsystems in Mäusen.....	27
1.5	Eigener Versuchsaufbau.....	28
2	Material und Methoden.....	30
2.1	Materialtabelle.....	30
2.2	Herstellernachweis.....	35
2.3	Gewinnung der Stammzellen.....	38
2.3.1	Gewinnung des Nabelschnurblutes.....	38
2.3.2	Gewinnung der Lymphozytenfraktion.....	38
2.3.3	Zellzählung	39
2.3.4	Isolation der Stammzellen	40
2.3.5	Reinheitskontrolle/ Durchflusszytometrie	41
2.3.6	Aufbewahrung	42

2.3.7	Auftauen	43
2.3.8	Andere Stammzellquellen	43
2.4	Mäuse	43
2.5	Bestrahlung und Transplantation der Mäusewelpen.....	44
2.6	Blutabnahme.....	45
2.7	Blutanalyse	46
2.8	Tumorzellen	46
2.9	Herstellung reifer dendritischer Zellen	47
2.10	Provokations-Experimente.....	49
2.11	Behandlung der Kontrollgruppen	49
2.12	Organ- und Tumoranalyse.....	50
2.13	Statistische Auswertung.....	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Erfolgreiche Rekonstitution eines humanen Immunsystems	52
3.1.1	Peripheres Blut.....	52
3.1.2	Lymphatische Organe	55
3.2	Tumorzustand in gut rekonstituierten Mäusen geringer als in nicht rekonstituierten Mäusen	58
3.3	Tumorzustand in rekonstituierten und immunisierten Mäusen hoch signifikant geringer als in nicht rekonstituierten Mäusen	60
3.4	Aktiviert T-Zellen nur spärlich nachweisbar	62
3.5	Übersichtstabelle über die Experimente I bis III.....	63
4	Diskussion	64
4.1	Diskussion des Mausmodells.....	65
4.1.1	Diskussion der Etablierung des Modells	65
4.1.1.1	Zeitpunkt der Transplantation	65
4.1.1.2	Bestrahlung.....	66
4.1.1.3	Injektionsort	67
4.1.1.4	Stammzellquelle	67
4.1.1.5	Mausstamm und Mutation	68
4.1.1.6	Evaluation der Ergebnisse.....	70

4.1.2	Diskussion der Limitationen und Verbesserungsmöglichkeiten des Mausmodells	71
4.2	Diskussion der Immunogenität des EFTs	75
4.2.1	Toleranzmechanismen	75
4.2.2	<i>Escape Mechanismen</i>	78
4.3	Weiterentwicklungsansätze	79
4.4	Zusammenfassungen	84
4.4.1	Zusammenfassung deutsch	84
4.4.2	<i>English summary</i>	85
5	Anhang	86
5.1	Abbildungsverzeichnis	86
5.2	Literaturverzeichnis	87
5.3	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

AET:	<i>advanced Ewing Tumor</i>
AML:	akute myeloische Leukämie
ADCC:	<i>antigen-dependent cellular cytotoxicity</i>
AICD:	<i>activation induced cell death</i>
APC:	Antigen präsentierende Zelle
AWMF:	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCG:	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
CD:	<i>cluster of differentiation</i>
CDC:	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CML:	chronisch myeloische Leukämie
DC:	dendritische Zelle
DLI:	<i>donor lymphocyte infusion</i>
EICESS:	<i>European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study</i>
EFS:	<i>event free survival</i>
EFT:	<i>Ewing Family Tumor</i>
EWS:	Ewing-Sarkom
FACS:	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FISH:	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
ggf.:	gegebenenfalls
GM-CSF:	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GvHE:	<i>graft versus host effect</i>
GvTE:	<i>graft versus tumor effect</i>
GvETE:	<i>graft versus Ewing Tumor effect</i>
HIS Mäuse:	Mäuse mit humanem Immunsystem
HLA:	humanes Leukozyten-Antigen
HSCT:	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
huCD:	<i>human cluster of differentiation</i>
ICI:	<i>involved compartment irradiation</i>

ICOS:	<i>inducible co-stimulator</i>
IGF-1:	<i>insulin-like growth factor 1</i>
i.h.:	intrahepatisch
IL:	Interleukin
INF:	Interferon
KM:	Knochenmark
LK:	Lymphknoten
MDS:	myelodysplastisches Syndrom
MHC:	<i>major histocompatibility complex</i>
MRI:	Klinikum München Rechts der Isar
MRT:	Magnetresonanztomographie (Kernspin)
NK-Zellen:	natürliche <i>Killer</i> Zellen
OP:	Operation
OS:	<i>overall survival</i>
PBL:	<i>peripheral blood leukocytes</i>
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i>
pPNET:	periphere primitive neuroektodermale Tumore
RT:	Raumtemperatur
RX:	Strahlentherapie
s.u.:	siehe unten
TAA:	<i>tumor associated antigen</i>
TSA:	<i>tumor specific antigen</i>
TBI:	<i>total body irradiation</i>
TGF:	<i>tumor growth factor</i>
TNF:	<i>tumor necrosis factor</i>
u.a.:	unter anderem
u. U.:	unter Umständen
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.:	<i>versus</i>
WLI:	<i>whole lung irradiation</i>

1 Einleitung

1.1 Kurze Vorstellung und Zusammenfassung der Arbeit

Der Ewing *Family* Tumor (EFT) ist der zweithäufigste Knochentumor im Kindesalter und zeichnet sich durch ein spezifisches Onkogen aus. Insgesamt gehören 3 % aller im Kindesalter auftretenden malignen Neoplasien zu dieser Gruppe. Während die Prognose im lokalisierten Stadium recht günstig ist, ist sie bei fortgeschrittenem EFT schlecht und hat sich seit Einführung der Chemotherapie im Jahr 1973 nur wenig und auf Kosten hoher Therapietoxizität verbessert. Ähnliche Situationen finden sich auch bei anderen Krebserkrankungen, so dass neue, weniger toxische Therapieansätze dringend benötigt werden.

Vielversprechend sind in dieser Hinsicht die Ansätze der „*targeted therapy*“, also der gezielten Tumorthherapie, mit der möglichst spezifische Charakteristika von Tumorzellen selektiv angegriffen werden sollen. Das Immunsystem, spezialisiert auf das hochspezifische Erkennen molekularer Zelleigenschaften, ist hierfür ein ideales Instrument. Mehrere Beispiele aus der Antikörpertherapie belegen bereits den Erfolg. Leider weisen nur wenige Tumorzellen für Antikörper zugängliche Ziele auf ihrer Oberfläche auf. Wesentlich mehr Tumorzellen wären angreifbar, wenn die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf intrazelluläre Antigene genutzt werden könnte, die jedoch erst durch MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden müssen. Bedauerlicherweise gibt es trotz offensichtlicher genetischer Unterschiede zur Originalzelle kaum Tumorzellen, auf die sich eine patienteneigene, funktionelle T-Zell-Antwort nachweisen lässt. Verantwortlich dafür werden zentrale und periphere Toleranzmechanismen sowie verschiedene weitere *immune escape* Mechanismen gemacht. Zahlreiche Forschungsgruppen beschäftigen sich mit der Frage, wie T-Zellen dennoch in der Tumorbekämpfung eingesetzt werden können. Ein Ansatz hierfür ist die Gewinnung tumorspezifischer T-Zellen im allogenen Kontext, in dem die T-Zell-Antwort durch die Erkennung der Tumorzelle als fremd verstärkt wird. Der Ewing *Family* Tumor erscheint mit seiner spezifischen Genetik für diesen Therapieansatz besonders geeignet.

Gleichzeitig konnten in letzter Zeit große Fortschritte in der Entwicklung von humanisierten Mäusen gemacht werden, also chimären Mäusen, die Gene, Zellen oder ganze Organe humanen Ursprungs besitzen. Verknüpft damit ist die Hoffnung auf bessere Vorhersagekraft und Replizierbarkeit von *in vivo* Experimenten, die aus ethischen Gründen nicht am Menschen selbst sondern zunächst nur im Tiermodell durchgeführt werden können. Unter anderem stehen mehrere Modelle von Mäusen mit humanem hämato-lymphoiden System zur Verfügung, dessen Funktionalität im Sinne der Fähigkeit, auf infektiöse Stimuli zu reagieren, bereits vielfach demonstriert werden konnte.

Ziel dieser Arbeit war es, ein solches Mausmodell in unserem Labor zu etablieren und in ersten Provokationsexperimenten zu testen, ob es grundsätzlich auch in der Lage ist, auf (Ewing-)Tumorzellen zu reagieren. Damit wäre es eine ideale Plattform, Tumorzellen und T-Zellen im allogenen *in vivo*-Kontext miteinander zu konfrontieren, verschiedene Ansätze zur Überwindung von Toleranz- und *escape*- Mechanismen zu testen, tumorspezifische T-Zellen zu generieren oder die Effektivität und Nachhaltigkeit von T-Zell- oder DC-Vakzinen zu evaluieren. Dies könnte einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung der Immuntherapie in der Tumorbekämpfung leisten.

1.2 Das Ewing-Sarkom und die Familie der Ewing-Tumore

1.2.1 Einführung

Das Ewing-Sarkom ist mit 10 % nach dem Osteosarkom der zweithäufigste primäre maligne Knochentumor des Kindes. Insgesamt gehören 3 % aller bösartigen Neubildungen im Kindesalter zur Ewing-Tumor Familie, die neben dem klassischen und dem atypischen Ewing-Sarkom den Askin Tumor der Brustregion und die peripheren primitiven neuroektodermalen Tumore (pPNET) einschließt (1, 2).

Das Ewing-Sarkom betrifft etwas häufiger männliche Patienten als weibliche Patientinnen (Verhältnis 55 : 45) und zeigt eine deutliche Präferenz für Kaukasier, die häufiger als Asiaten betroffen sind und sogar sechsmal so oft wie Afrikaner.

Es findet sich ein Altersgipfel im zweiten Lebensjahrzehnt, der Altersmedian liegt bei 15 Jahren (3, 4).

Es befällt bevorzugt die flachen Knochen des Stammes, also Becken und Thoraxwand, und die Diaphysen der langen Röhrenknochen. 15 % treten jedoch auch als Weichteiltumor ähnlich dem Rhabdomyosarkom in Erscheinung und weisen keine offensichtliche Beziehung zu einem Knochen auf (5).

Die Symptomatik hängt entscheidend von der Lokalisation ab. Allgemeine Symptome sind Schmerzen, Schwellungen und pathologische Frakturen oder aber im fortgeschrittenen Stadium eine systemische Symptomatik mit Fieber, Gewichtsverlust und Laborveränderungen, wie erhöhten Entzündungszeichen und LDH-Erhöhung. Missdeutungen der Schmerzen als „Wachstumsschmerzen“ und Differenzialdiagnosen wie Sportverletzungen oder Osteomyelitis führen in vielen Fällen zu einer deutlichen Verzögerung der Diagnose, im Mittel um 3 bis 9 Monate. Bei ca. 25 % der Patienten liegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen vor. Diese finden sich am häufigsten in der Lunge und im Skelett (3).

1.2.2 Diagnose und Zytogenetik

Entscheidende Kriterien, nach denen das Ewing-Sarkom diagnostiziert werden kann, waren lange Zeit unklar. Zunächst war das Ewing-Sarkom 1921 von James Ewing durch seine Lokalisation und sein spezifisches gutes Ansprechen auf Bestrahlung charakterisiert worden, durch das es sich deutlich vom Osteosarkom unterscheidet. Mikroskopisch ließ es sich mit seinen unscheinbaren, undifferenzierten Zellen jedoch nur in die heterogene Gruppe der kindlichen Tumoren aus kleinen, blauen, runden Zellen (SRCT) einordnen, in die auch das Neuroblastom, das Rhabdomyosarkom und das Non-Hodgkin Lymphom gehören.

Aufgrund gemeinsamer Charakteristika wurde lange Zeit über die Verwandtschaft von Ewing-Sarkomen und pNETs diskutiert. Der Verdacht erhärtete sich, dass es sich um dieselbe Tumorentität mit einem unterschiedlichen Grad an neuronaler Differenzierung handelte.

1984 war die Entdeckung, dass etwa 83 % der Ewing-Tumore die spezifische balancierte Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ aufweisen, ein Meilenstein, der es in den meisten Fällen erlaubte, die Diagnose Ewing-Sarkom über die Untersuchung des

Karyotyps der Zellen zu bestätigen (6, 7). Da auch pNETs und Askin Tumore dieselbe Translokation zeigen, konnte endgültig ein gemeinsamer Ursprung angenommen werden. Es blieben jedoch weiterhin fast 20 % der Fälle, die die Translokation nicht aufweisen (8, 9).

Erst die Identifizierung des Hybridgens EWS-FLI1 durch Delattre *et al.* führte zu dem entscheidenden Diagnosekriterium (10). Dieses Hybridgen entsteht in den meisten Fällen durch die Translokation t(11;22), kann aber auch bei variiert oder zytogenetisch nicht nachweisbarer Translokation vorliegen. Es ist in 85 % aller Ewing-Sarkome, Askin Tumore und pNETs zu finden. In weiteren 10 % dieser Tumore liegt eine Genfusion aus EWS und ERG vor. ERG ist der engste Verwandte von FLI1 und wie dieses ein Transkriptionsfaktor der ETS-Familie (5, 11). In beiden Fällen wird das N-terminale Ende des EWS-Proteins mit der DNA bindenden Domäne des ETS Transkriptionsfaktors verknüpft. Dadurch gerät der Transkriptionsfaktor unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven Promoters EWS und die Transkription der Zielgene wird verändert (5, 12, 13). In <1 % der Fälle ist das EWS Gen mit einer von weiteren 3 Alternativen verknüpft, E1AF, FEV oder ETV, alle drei ebenfalls Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie (3, 5).

Der Nachweis dieser EWS/ ETS Fusionsgene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) oder *fluorescence in situ hybridization* (FISH) ermöglicht seither die schnelle und zuverlässige Diagnose (10). Dies führte dazu, dass Ewing-Sarkome, Askin Tumore und pNETs, deren Verwandtschaft bereits vorher vermutet worden war, unter dem Begriff Ewing Tumor Familie (EFT) zusammengefasst und über das Vorhandensein des EWS/ ETS Fusionsgens definiert werden.

EFT-Zellen weisen neuronale Differenzierung variabler Ausprägung auf, und scheinen die Fähigkeit zu besitzen, in Kultur neuronal auszudifferenzieren (14). Ob daraus zu schließen ist, dass sie sich von peripheren neuroektodermalen Stammzellen ableiten, oder ob diese neuronale Differenzierung durch die genetische Veränderung der Zellen hervorgerufen wird, ist noch Gegenstand der Diskussion (13). Das Genexpressionsmuster zeigt enge Verwandtschaft sowohl zu Nervenzellen als auch zu Endothelzellen (15). Dies führte zu der Vermutung, dass es sich um dem

Neuralrohr entstammende Zellen handelt, die gerade einen Prozess der mesenchymalen und endothelialen Differenzierung durchlaufen (16, 17), wobei eine EWS-FLI1 induzierte neuronale Differenzierung weiterhin nicht ausgeschlossen ist (17).

1.2.3 Prognosefaktoren

In der Vergangenheit hat sich immer deutlicher gezeigt, wie wichtig ein risikostratifizierter Therapieansatz beim EFT ist. Dabei hat sich die Einschätzung der relevanten Prognosefaktoren verändert. Die europäische Multicenterstudie E.U.R.O. Ewing hat Alter \leq 14 Jahre, Tumolvolumen \leq 400 ml und Ausmaß der Metastasierung als wichtigste Prognosefaktoren validiert (18). Metastasierter EFT ist nicht homogen zu sehen, sondern in Vorliegen von Lungen-, Knochen-, mehrfachen Knochen- oder Knochenmarksmetastasen oder kombinierter pulmonaler und extrapulmonaler Metastasierung zu differenzieren, da die Prognose in dieser Reihenfolge abnimmt (18). Eine wichtige Rolle spielt außerdem das radiologisch und histologisch (Ausmaß von Nekrosen) evaluierte Ansprechen auf Chemotherapie (19-21).

Morphologische Aspekte waren mehrfach als Prognosefaktor vorgeschlagen worden (29-31), der Grad der neuronalen Differenzierung erwies sich jedoch als unbedeutend (22, 23). Auch die Exonkombination des Hybridgens hat sich als Prognosefaktor nicht bestätigt (24), nachdem zunächst eine günstigere Prognose für die gängigste Kombination (EWS-FLI1 Typ 1) vermutet worden war (25, 26).

Die molekulargenetische Untersuchung von Blut und Knochenmark auf das Vorliegen des Hybridgens mittels PCR kann Aufschlüsse auf beginnende Invasion geben. Während der molekulargenetische Nachweis von Tumorzellen im Blut bisher keine prognostische Bedeutung zu haben scheint, ist anzunehmen, dass er im Knochenmark mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist (28).

Letztendlich kann die Einschätzung der Prognose auf Tumorlast und Tumorbiologie zurückgeführt werden (2). Burdach und Jürgens fassen außerdem primär in Knochen oder Knochenmark metastasierten und früh, multipel oder multifokal rezidivierten EFT als höchste Risikogruppe unter dem Begriff fortgeschrittener Ewing Tumor (AET) zusammen (29).

1.2.4 Therapieansätze

Da sich die Prognosefaktoren erst im Laufe der Zeit herauskristallisiert haben, wurden in der Vergangenheit Studien oft auf sehr inhomogener Grundlage durchgeführt. Dies macht die Auswertung sehr schwierig und trägt mit dazu bei, dass insbesondere bei disseminierter Erkrankung bis heute darüber diskutiert wird, welches Therapiekonzept für welche Patientengruppe am vorteilhaftesten ist. Die europäische Multicenterstudie E.U.R.O. Ewing 99 (18) und ihre Nachfolgestudie Ewing 2008 versuchen mit einer Risikostratifizierung in 3 Gruppen den neu gewichteten Prognosefaktoren gerecht zu werden.

Zusammenfassend wird im Rahmen eines multimodalen Konzepts eine Induktionschemotherapie angewandt, der eine möglichst radikale Lokaltherapie sowie eine Konsolidierungschemotherapie, ggf. kombiniert mit Strahlentherapie und Stammzelltransplantation folgt.

1.2.4.1 Lokaltherapie

Mehrfach hat sich gezeigt, wie entscheidend eine gute Lokaltherapie ist. Grundsätzlich ist ein chirurgisches und/ oder strahlentherapeutisches Vorgehen möglich. Wenn eine vollständige Resektion möglich ist, wird heute die chirurgische Therapie bevorzugt (30). In einer R1-Situation ist die Kombination aus Chirurgie und Strahlentherapie (RX) am effektivsten, ebenso bei nur knapper Resektion im Gesunden (31). In der Kombination kann die RX-Dosis und damit das Risiko sekundärer Sarkome reduziert werden. Zur lokalen Kontrolle bei irresektablen Primärtumoren wird alleinige RX in voller Dosierung von 60 Gy eingesetzt (32). Bei disseminierter Erkrankung zeigte sich in der Subgruppenanalyse der E.U.R.O. Ewing 99-Studie ebenfalls ein Vorteil für die kombinierte radio-chirurgische Lokaltherapie (32). Des Weiteren wird die chirurgische Resektion von Lungenmetastasen mit adjuvanter Lungenbestrahlung empfohlen (30).

1.2.4.2 Systemtherapie

Auf dem Gebiet der Systemtherapie ist man noch damit beschäftigt, die wirksamsten Schemata zu identifizieren. Als Substanzen werden in erster Linie Anthrazykline und Alkylantien gefolgt von Vincaalkaloiden, Actinomycin D und Etoposid eingesetzt (30).

Bei welchem Risikoprofil hier welche Agenzien, in welchen Intervallen und in welcher Dosierung benutzt werden sollten, und in welchem Ausmaß Bestrahlung und Stammzelltransplantation eingesetzt werden sollten, sind die Fragen, die die aktuelle Forschung u.a. zu beantworten versucht. Der Einsatz wird durch die Therapietoxizität limitiert.

1.2.4.2.1 Stammzelltherapie

In Verbindung mit myeloablativer (Radio-)Chemotherapie wird bei manchen Protokollen die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSCT) eingesetzt. Autologe HSCT birgt das Risiko von Kontamination des Transplantats mit Tumorzellen, selbst nach CD34-Selektion (29, 33). Kushner und Meyers fanden 2001 keine Verbesserung des Überlebens durch Einsatz von Hochdosischemotherapie mit autologer HSCT (34, 35), dies wird noch weiterhin in Studien evaluiert. Allogene HSCT erhöht dagegen die Toxizität der Therapie deutlich. Es ist dennoch eine interessante Alternative, da bei dem durch das exprimierte Translokationsprodukt potentiell immunogenen EFT ein *graft-versus-tumor* Effekt erhofft wird (29, 33, 36). Der Bericht von Koscielniak *et al.* 2005 über ein prolongiertes progressionsfreies Überleben bei einer Patientin mit rezidiviertem, metastasierten EFT nach allogener Transplantation bestärkt diese Hoffnung (37). Burdach *et al.* konnten in einer Studie mit 36 Patienten jedoch keinen Vorteil von allogener vs. autologer HSCT feststellen (33) und auch in einer neueren, retrospektiven Studie derselben Gruppe fand sich bei Patienten nach allogener HSCT kein Hinweis auf *graft-versus-tumor* Effekt (38). Hoffnung wird noch auf die zusätzliche Infusion von – möglicherweise sogar spezifisch selektierten – Spenderlymphozyten gesetzt, die sogenannte *donor lymphocyte infusion* (38). Systemische IL-2-Anwendung zur Verstärkung der Immunantwort im Rahmen von HSCT geht mit hoher Toxizität einher und ein Nutzen hat bisher nicht nachgewiesen werden können (33, 39).

1.2.4.2.2 Strahlentherapie in der Systemtherapie

Da sich der EFT besonders durch Strahlensensibilität auszeichnet, wurde seit Langem nach einer Möglichkeit gesucht, dies auch in der Systemtherapie bei disseminiertem EFT auszunutzen. Ganzkörperbestrahlung (TBI) allein bringt keine Verlängerung des ereignisfreien Überlebens (EFS), sondern erhöht nur die

therapiebedingte Toxizität (29, 34, 35, 39-41). Hierbei ist zu bedenken, dass 55 Gy zur lokalen Kontrolle benutzt werden, bei TBI jedoch nur ca. 12 Gy eingesetzt werden können (42). Der Schwellenwert für EFT-Zellen wird bei ca. 40 Gy geschätzt (39) und 48-54 Gy werden benötigt, um makroskopischen EFT zu eliminieren (29).

Involved compartment irradiation (ICI) ist eine vielversprechende Variante oder Ergänzung von TBI bei multifokalem EFT, bei der alle mittels Ganzkörper-MRT identifizierbaren Metastasen in lokalisationsabhängigen Dosierungen bestrahlt werden (29). Bedacht werden muss hierbei, dass auch die Lunge nur mit max. 12-20 Gy bestrahlt werden darf (42) und somit unterhalb des geschätzten Schwellenwertes für EFT bleibt. Dieses Verfahren wurde (16, 43) in einer kleinen Gruppe von Patienten mit Hochrisiko EFT und multiplen primären Knochenmetastasen eingesetzt, die eine klassische Induktionschemotherapie, lokale Intensivierung mit ICI auf der Basis von MRT-*Staging* und systemische Intensivierung mit myeloablativer Chemotherapie gefolgt von HSCT erhielten. Im Vergleich zu konventionellen Therapieprotokollen zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate (27 % vs 8 % nach 10 Jahren), allerdings zeichnete sich auch eine erhöhte Zahl von therapiebedingten Todesfällen ab. Das Konzept muss in größeren Patientengruppen evaluiert werden (16, 43).

1.2.4.3 Prognose und alternative Therapieansätze

Die EICES-Studie ergab ein ereignisfreies Überleben (EFS) nach 4 Jahren von ca. 70-75 % für lokalisierten EFT, von ca. 34 % bei Vorliegen von Lungenmetastasen und von nur noch ca. 28 % bei Knochen- bzw. Knochenmarksmetastasierung. Am schlechtesten ist die Prognose bei kombiniertem Knochen- und Lungenbefall mit ca. 14 % OS. (40)

Während für Patienten mit lokalisiertem EFT durch Therapiefortschritte einiges erreicht werden konnte, stagniert die Prognoseverbesserung durch Chemotherapie beim metastasierten EFT und die Therapietoxizität hat ihre Grenze erreicht (33, 35, 44-46). Daher besteht ein deutlicher Bedarf an alternativen, weniger toxischen Therapieansätzen.

Einige Beispiele für alternative Ansätze kommen für verschiedene Tumorentitäten in Frage, wie die Hemmung des IGF-1-Signalweges (47, 48), Antiangiogenese mit

VEGF-Inhibitoren oder mit Hilfe von *metronomic dosing* konventioneller Chemotherapeutika (42), sowie der Einsatz des Thyrosinkinasehemmers Imatinib, der spezifisch Thyrosinkinasen des Wachstumsfaktor-Rezeptors c-kit hemmt. Letzterer wird in bis zu 70 % der EFTs exprimiert (2, 42).

Spezifischer und daher im Fokus der Forschung sind Ansätze, die sich die EWS/ETS-Translokalisierung und das durch diese beeinflusste charakteristische Genexpressionsmuster von EFT-Zellen zu Nutze machen.

Zum Beispiel haben Hühn *et al.* ein Ribozym entwickelt, das *in vitro* in der Lage ist, das Transkriptionsprodukt von EWS-FLI1 selbst hochspezifisch zu binden und zu spalten und auch seine Inaktivierung durch siRNA an diskutiert (49). Die Hürden für einen Einsatz *in vivo* sind jedoch für beide Techniken noch sehr groß.

Eine Reihe von Arbeiten beschäftigt sich mit weiteren in EFT-Zellen hoch- und herabregulierten Genen und der Rolle ihrer Genprodukte in der Tumorigenese von EFTs. Hierzu gehören Gene, die direkt oder indirekt durch EWS-FLI1 reguliert werden, teilweise identifizierbar durch die Veränderung von Genexpressionsmustern in bekannten Zelllinien (z.B. Fibroblasten) nach Einschleusung von EWS-FLI1. So konnten im Laufe der Zeit mehrere hochregulierte Gene (z.B. ID2 (50), PTPL1 (50, 51)) sowie downregulierte Gene (z.B. p21 (52)) charakterisiert werden. Jedoch beeinflusst nicht nur die Expression des Hybridgens, sondern auch die Histologie der bisher unbekannt Ursprungszelle des EFTs die Genexpression. Staeger *et al.* (15) haben daher mithilfe von RNA-*microarrays* die Genexpressionmuster von EFT-Primärtumoren und zahlreichen normalen Geweben systematisch verglichen und eine Liste mit 37 EFT-spezifisch hochregulierten Genen identifizieren können.

Die Kenntnis dieser Genexpression führte zur weiteren Charakterisierung von relevanten Genen wie z.B. EZH2 (16, 17), STEAP1 (53), DKK2 (54) und GPR64 (55). Die genaue Kenntnis der Auswirkungen der Hochregulierung dieser Gene eröffnet zahlreiche neue Therapieziele. So führte die Suppression von EZH2, das über Methylierung von Histonen Gene stillzulegen vermag, in EFTs *in vivo* zur Ausdifferenzierung von neuronalen und endothelialen Merkmalen sowie zu einer Inhibition von Tumorwachstum und Metastasierung. Auch für EFT-Zelllinien mit DKK2-, GPR64- und STEAP1-*knockdown* konnte eine Wachstums- und

Metastasierungsverlangsamung bzw. -unterdrückung *in vivo* gezeigt werden. Besonders vielversprechend unter therapeutischen Aspekten ist die Tatsache, dass GPR64 für einen transmembranen Rezeptor kodiert, der sich sonst lediglich im Gewebe der Epididymis findet.

Man sucht also einerseits nach Möglichkeiten, durch Beeinflussung der Genexpression essentielle Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Malignität zu blockieren. Andererseits stellen hochregulierte Gene und ihre Produkte eine Zielscheibe für Immuntherapie – und zwar aufgrund ihrer meist intrazellulären Lokalisation insbesondere mithilfe zytotoxischer T-Zellen – dar.

Mit der Gewinnung solcher möglichst spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten setzt sich diese Arbeit auseinander.

1.3 Immuntherapie in der Tumorbekämpfung

1.3.1 Targeted tumor therapy - gezielte Tumorthherapie

Ein Großteil der aktuellen Krebsforschung beschäftigt sich mit der Suche nach zielgerichteten Therapien, die möglichst selektiv Tumorzellen angreifen und normale Körperzellen verschonen. So sollen Nebenwirkungen und Dosislimitationen von ungezielter Chemo- und Strahlentherapie überwunden werden, die alle Zellarten angreifen und bei denen lediglich ein mehr oder weniger ausgeprägter, dosisabhängiger Überlebensvorteil der normalen Körperzelle vor der Tumorzelle ausgenutzt wird. Dies kann eine höhere Lebensqualität während der Therapie durch geringere Toxizität, bessere Ergebnisse durch höhere Dosierung und ggf. sogar einen kurativen Therapieansatz im metastasierten Stadium durch gezieltes „Auffinden“ residualer Tumorzellen ermöglichen.

Ein seit Langem bekanntes Beispiel hierfür ist die Radiojodtherapie des Schilddrüsenkarzinoms, bei der spezielle Speichereigenschaften der Schilddrüsenzellen genutzt werden können, um die toxischen Einflüsse der Therapie mit hoher Präzision in die unmittelbare Nähe der Tumorzelle zu bringen. Leider weisen jedoch wenige Zellen ein so leicht zugängliches Unterscheidungscharakteristikum auf. Meist findet man erst auf molekularer Ebene Merkmale, die es möglich machen, Tumorzellen zu identifizieren.

Solche Merkmale zu erkennen und anzugreifen ist das Spezialgebiet des Immunsystems, das man daher in den letzten Jahren zunehmend für die Tumorthherapie zu nutzen versucht.

1.3.2 Toleranz- und *immune escape* Mechanismen

Die Frage, die sich in diesem Kontext stellt, ist, warum das Immunsystem nicht von allein in der Lage ist, Tumorentstehung zu verhindern, obwohl Tumorzellen doch im Vergleich zu normalen Körperzellen verändert sind und somit Ziel der Immunzellen, insbesondere der T-Zellen, sein müssten.

Viele Tumore scheinen nicht unter immunologischer Kontrolle zu stehen. Nur bestimmte Tumorarten zeigen eine erhöhte Inzidenz bei langfristig immunsupprimierten Patienten, wie HIV-Infizierten und Empfängern transplantierte Organe (56). Dazu gehören vor allem virusassoziierte Tumore, wie das Zervixkarzinom oder das Kaposi-Sarkom, und die für ihre Immunogenität bekannten Melanome und Nierenzellkarzinome. Immerhin haben solche Patienten insgesamt ein ca. 3-fach erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken, als Menschen mit uneingeschränkter Immunfunktion (56). Und interessanterweise steigt das Risiko bei der Subgruppe der Transplantierten, die ein Herz oder eine Lunge empfangen haben, was aufgrund von schlechterer HLA-Kompatibilität meist mit einer intensiveren Immunsuppression einhergeht als bei Nierenempfängern, nochmals deutlich auf das ca. 7-fache an (57). In Japan konnte in einer Kohortenstudie sogar ein signifikanter Zusammenhang zwischen der individuellen zytotoxischen Aktivität peripherer Lymphozyten und dem Risiko, an Krebs zu erkranken, gezeigt werden (58).

In den 1950er Jahren wurde das Konzept der *Immunosurveillance* formuliert, also die Idee, dass ständig entstehende Tumorzellen durch Leukozyten eliminiert werden, bevor sie sich vermehren können, und dadurch immunkompetente Individuen bis zu einem gewissen Grade vor Tumorentstehung geschützt werden (59). Erst wenn der Tumor Wege gefunden hat, durch verschiedene Anpassungsprozesse (*tumor editing*) der Immunreaktion zu entgehen, kommt es zu Tumorwachstum. Dies würde erklären, warum Tumore, die diesen Prozess durchlaufen haben, durch das Immunsystem des

Tumorträgers nicht wirksam bekämpft werden können. Seither ist dieses Konzept heftig umstritten und wurde eine Zeitlang weitgehend aufgegeben, als kein Unterschied in der Inzidenz chemisch induzierter Tumore in athymischen Nacktmäusen und Wildtypmäusen festgestellt werden konnte (60). Über die Jahre sammelten sich jedoch weitere Hinweise darauf an, dass Tumorentstehung in immundefizienten Organismen erleichtert ist. Unter anderem konnte schließlich gezeigt werden, dass in Rag2^{-/-} Mäusen entstandene Tumore zu 40 % von Wildtypmäusen abgestoßen werden können (61). Dies führte zu einem Wiederaufleben der Idee, dass das Immunsystem als effektives Tumorsuppressorsystem funktioniert, aber dass dies gleichzeitig zu einer Selektion von Tumorzellen führt, die in der Lage sind, in einer immunkompetenten Umgebung zu überleben (62, 63).

Die kontroverse Debatte hielt jedoch an (64, 65). Die Beobachtung von schon sehr früh im Prozess der Tumorentstehung auftretenden, unfunktionellen Immunantworten wie z.B. unfunktionellen zytotoxischen T-Zellen (66) hat das tatsächliche Stattfinden einer effektiven Reaktion immer wieder in Frage gestellt.

Parallel führte das zunehmende Verständnis von Abläufen im Mikroumfeld des Tumors zu der Erkenntnis, dass das Immunsystem nicht nur Antitumorantworten zeigt, sondern so umfunktioniert werden kann, dass es Tumorwachstum schützt und sogar fördert (67, 68). Dieser Dualismus kann zum Teil die widersprüchlichen Beobachtungen erklären (69). In jedem Fall stellt sich die Frage nach den Mechanismen, mit Hilfe derer der Tumor dem funktionellen Immunsystem entkommt, und auf welche Art und Weise man diese Mechanismen umgehen kann.

Zu diesen gehören einerseits Toleranzmechanismen, die sich auf Schutzfunktionen des Körpers gegen Autoreaktivität des Immunsystems zurückführen lassen. Andererseits zeigen die Tumore selbst sogenannte *escape*-Mechanismen, mit denen sie ihre Immunogenität verringern.

Einige davon sind bereits länger bekannt (70). An erster Stelle steht die zentrale Toleranz, in deren Rahmen im Thymus T-Zellen mit einer zu starken Bindung an körpereigenes MHC, durch das sich alle Körperzellen als „selbst“ ausweisen, von vorneherein eliminiert werden. Die verbleibenden T-Zellen weisen also wenn, dann

nur eine schwache Affinität zu körpereigenem MHC auf, auf dem die Tumorzelle Antigene präsentieren könnte.

Ein wichtiger peripherer Toleranzmechanismus ist die Induktion von Anergie, ein fehlendes Ansprechen oder sogar Apoptose der T-Zellen auf Signale des T-Zell-Rezeptors. Dieses Phänomen dient der Elimination von autoaggressiven T-Zellen, die der Selektion im Thymus entgangen sind und potentiell Rezeptoren für körpereigene Antigene besitzen. Es wird ausgelöst, wenn naive T-Zellen in der Peripherie auf eine große Zahl von für ihren Rezeptor passenden Antigenen treffen, ohne dass zugleich inflammatorische Signalwege des angeborenen Immunsystems aktiviert werden, wie das bei Infektionen durch Viren oder Bakterien über *Toll-like*-Rezeptoren der Fall ist. Diese inflammatorischen Signale induzieren die Expression von kostimulatorischen oder Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen. Interagiert eine T-Zelle in Abwesenheit dieser kostimulierenden Moleküle mit einem Antigen, so löst dies Toleranz vermittelnde Signale aus. Zusätzlich kann bei einer bereits antigenaktivierten T-Zelle, die sich gerade in Proliferation befindet, durch erneute Stimulation mittels Antigenbindung am T-Zell-Rezeptor Apoptose ausgelöst werden. Dieses Phänomen nennt man *activation induced cell death* (AICD, (71)).

Ein Beispiel für *escape*-Mechanismen ist der Verlust der MHC-Moleküle, die spezifisch das entsprechende Tumorpeptid binden würden. Auch die Tumorantigene selbst können durch Immunselektion, die dank der genetischen Instabilität von Tumorzellen entsprechend einer Resistenzentwicklung möglich ist, verloren gehen.

Hinzu kommen die bereits erwähnten vielfältigen Wechselwirkungen zwischen den Tumorzellen und ihrem sogenannten Mikroumfeld, bestehend aus Fibroblasten, Endothelzellen und infiltrierenden Leukozyten, die man erst in den letzten Jahren besser zu verstehen begonnen hat. Sie ergeben eine komplexe Dynamik, die letztendlich in der kompletten Umgestaltung der Funktionalität dieses Mikroumfelds zugunsten der Tumorzellen mündet (72). Bereits länger weiß man, dass Tumorzellen durch Zytokine, wie TGF- β oder IL-10, direkt zytotoxische T-Zellen und die Reifung von DCs inhibieren oder immunsuppressive Effekte von regulatorischen T-Zellen stimulieren können (70). Wahrscheinlich werden sie hierbei durch

Gewebsmakrophagen (67, 68) und DCs (72) unterstützt. Insbesondere die Modifikation der Funktionalität von DCs ist zunehmend in den Fokus gerückt. Sie werden aufgrund ihrer Effektivität in der Antigenpräsentation und ihrer Fähigkeit, naive T-Zellen Antigen-spezifisch zu aktivieren, auch als professionelle APCs bezeichnet und spielen als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenen Immunsystem eine essentielle Rolle in einer möglichen Antitumorantwort (73). DCs werden im Tumorumfeld nicht nur inaktiviert, sondern so umprogrammiert, dass sie schließlich Toleranz induzieren oder das Tumorwachstum sogar direkt durch Wachstumsfaktoren fördern (72).

1.3.3 Ansätze der Immuntherapie in der Tumorbekämpfung

120 Jahre liegt es zurück, dass der damals 29jährige William B. Coley mit der Injektion von Streptokokken direkt intratumoral die ersten Schritte in der Immuntherapie gegen Krebs unternahm. Er hatte von Komplettremissionen bei Krebspatienten nach Erysipel mit hohem Fieber gehört. Coleys' erste Versuchsperson war ein mehrfach voroperierter, aus Italien eingewanderter Drogenabhängiger Mitte 30, dem man nur noch wenige Wochen Lebenserwartung gab. Er lebte anschließend noch 8 Jahre. (74)

Die nächsten beiden Patienten verstarben an der Infektion, woraufhin Coley begann, die Streptokokken vor der Injektion abzutöten. Die damals beachtliche, von Coley erreichte Heilungsrate von 10 % durch Injektion des sogenannten „Coley's Toxin“ relativierte sich später unter dem zunehmenden Einsatz von Chemo- und Strahlentherapie. Dennoch können gelegentlich durch bloße unspezifische Stimulation des Immunsystems, durch die dann auch die tumorspezifische Immunantwort gesteigert wird, Erfolge erzielt werden. Hierzu zählt immer noch der Einsatz bakterieller Antigenmischungen, wie der abgeschwächte Mykobakterienstamm Bacillus Calmette-Guerin (BCG). Hauptsächlich Anwendung findet heute die systemische Applikation von Zytokinen wie IL-2 und IFN- α , z.B. bei Melanomen und Nierenzellkarzinomen, oder die lokale Extremitätenperfusion mit TNF- α bei Sarkomen oder Melanomen. Dieser Ansatz konnte sich jedoch nur bei wenigen Tumorerkrankungen etablieren und zwar hauptsächlich bei solchen, die bereits von sich aus stärker immunogen sind.

Große Erfolge hat man bereits auf dem Gebiet der Antikörper erzielen können. Voraussetzung für die Generierung tumorspezifischer Antikörper ist, dass es ein Tumorantigen gibt, das auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dies ist bei tatsächlich tumorspezifischen Antigenen eher nicht zu erwarten, da es sich meist um Veränderungen intrazellulärer Proteine handelt. Wohl aber führt die genetische Veränderung in einigen Fällen zu einer relativen Überexpression von Oberflächenmerkmalen, oder der histologische Grundtyp der veränderten Zelle zeichnet sich von vorneherein durch ein spezifisches Merkmal aus. Dies sind so genannte tumorassoziierte Antigene. Liegen solche Merkmale an der Zelloberfläche vor, können Antikörper z.B. in Mäusen generiert werden.

Zwei berühmte Beispiele sind Trastuzumab und Rituximab. Mit Hilfe von Trastuzumab wird ein auf $\frac{1}{4}$ aller Mammakarzinome überexprimierter Wachstumsrezeptor blockiert und eine antigenabhängige zelluläre Immunantwort (ADCC) ausgelöst (75). Rituximab ist in der Lage, durch Binden an das B-Zell-Antigen CD20 mittels verschiedener Effekte (u.a. ADCC, CDC (also komplementabhängige Zytotoxizität) und direkte Apoptoseinduktion) zur Elimination von B-Zellen zu führen (76) und ist somit bei vielen von B-Zellen abstammenden Leukämien oder Lymphomen wirksam.

Der T-Zell-Einsatz hat gegenüber der Antikörpertherapie den Vorteil, dass es nicht notwendig ist, dass sich das Antigen auf der Oberfläche der Zelle befindet. Es kann sich auch um ein intrazelluläres Protein oder Peptid handeln, wichtig ist jedoch, dass es prozessiert und von den MHC-Molekülen präsentiert wird. Prinzipiell hat man zwei Möglichkeiten, T-Zellen therapeutisch einzusetzen: man kann entweder Antigene verabreichen, um im Sinne einer Impfung eine wirksame spezifische T-Zellantwort im Patienten zu induzieren (aktive Immunisierung), oder man kann T-Zellen geben, die die Immunantwort für den Patienten übernehmen sollen (passive Immunisierung).

In der Tumorthherapie werden T-Zellen bereits seit längerem als unspezifisches T-Zell-Transplantat im Rahmen der *donor lymphocyte infusion* eingesetzt, also als Infusion von reifen Spenderlymphozyten nach allogener Knochenmark-Transplantation bei hämatologischen Krebserkrankungen (77). Damit geht man

jedoch ein hohes Risiko für unerwünschte *graft-versus-host* Effekte (GvHE) ein. Besser wäre es, wenn sich die Spender-T-Zellen, die für *graft-versus-tumor* Effekte (GvTE) zuständig sind, isolieren ließen, damit der antileukämische Effekt ohne *graft-versus-host* Effekt optimal genutzt werden könnte (78). Gelingt die Identifizierung eines spezifischen T-Zell-Rezeptors, so könnten T-Zellen per Vektor damit ausgestattet und zur passiven Immunisierung eingesetzt werden. Verwendet man hierfür patienteneigene T-Zellen, so müsste eine *graft-versus-host* Reaktion nicht mehr gefürchtet werden, allerdings könnten allogene T-Zellen eine höhere Avidität aufweisen und somit effektiver sein.

Intensive Forschung richtet sich auf dendritische Zellen (DCs), die aufgrund ihrer bereits erwähnten effektiven Antigenpräsentierung ein hohes Potential besitzen, Tumorantworten des Immunsystems hervorzurufen. Mit Tumorantigen beladen können sie als Tumorstoffe eingesetzt werden. Als aktive Immunisierung hätte dies den Vorteil, dass es sich nicht nur auf einen vorübergehenden Effekt beschränken würde, sondern im Idealfall durch lang lebende Gedächtnis-T-Zellen sogar ein Schutz vor sekundärer Metastasierung bestünde. (73, 79)

Leider sind Versuche, Tumorstoffe zu entwickeln, bisher eher enttäuschend. Grundsätzliche Probleme sind erstens die Frage, in wie weit Tumorantigene zwischen den Tumoren verschiedener Patienten identisch sind, und zweitens, ob die entsprechenden Peptide von den MHC-Allelen des jeweiligen Patienten präsentiert werden können. Um diese Probleme zu umgehen, müsste ein Tumorstoff mehrere Tumorantigene abdecken, oder jeweils direkt auf Basis des operativ aus dem Patienten gewonnenen Tumors entwickelt werden (80). Oder aber man findet ein Tumorantigen, das mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in den meisten Tumorzellen vorkommt und durch die gängigsten MHC-Allele präsentiert wird.

Vielversprechende Kandidaten für solche Tumorantigene sind die Genprodukte von in Tumorzellen veränderten Genen, also z.B. mutierte Onkogene oder Suppressorgene wie Ras und p53, oder Fusionsproteine wie die BCR-ABL Tyrosinkinase, die durch die Chromosomentranslokation t(9;22) bei chronisch myeloischer Leukämie entsteht (36). Auch der EFT weckte mit seiner in 85 % aller Tumore vorkommenden Translokation t(11;22) große Hoffnungen auf ein

tumorspezifisches Antigen (TSA) aus Peptiden des durch EWS-FLI1 kodierten Fusionsproteins (81).

1.3.4 Bisherige immuntherapeutische Ansätze beim EFT

Leider lässt sich jedoch in der Mehrzahl der Fälle keine zytotoxische Reaktion feststellen, wenn Lymphozytenkulturen mit Zellen, die diese mutierten Gene tragen, *in vitro* kultiviert werden (70). Teilweise können tumorreaktive T-Zellen aus Patienten oder OP-Präparaten isoliert werden. Auch beim EFT konnten Zhang *et al.* (82) bei 6 von 6 Patienten tumorzytotoxische T-Zellen im Pool der Gedächtnis T-Zellen nachweisen, die autologe sowie allogene Tumore in MHC Klasse I abhängiger Weise lysieren konnten, während dies T-Zellen gesunder Spender auch nach DC *priming* nicht gelang. Solche Zellen weisen jedoch meist eine geringe Zytotoxizität auf (70), was zu erwarten ist, da die Zellen – vermutlich aufgrund von Toleranz- und *escape*-Mechanismen – auch nicht in der Lage waren, das Tumorwachstum ihres Trägers zu kontrollieren.

In verschiedenen Studien wurden DCs eingesetzt, die mit lysierten Tumorzellen (83) oder Peptiden der Transfusionsregion (84, 85) gepulst worden waren. Teilweise konnten zwar vorübergehende T-Zell-Antworten auf die verwendeten Peptide nachgewiesen werden (84, 85), Regress oder Prognosevorteil konnten jedoch in keiner der Studien gezeigt werden.

Auch Thiel *et al.* (38) konnten in ihrer bereits erwähnten retrospektiven Untersuchung von 87 Patienten nach allogener Stammzelltransplantation keine Hinweise auf GvET finden. Und spontane Remissionen, wie sie bei anderen immunogenen Tumoren vorkommen, sind beim EFT bisher nicht bekannt.

Koscielniak *et al.* (37) hingegen bestärken mit ihrem Fallbericht über ein prolongiertes Überleben nach allogener Stammzelltransplantation die Hoffnung auf einen *graft-versus-Ewing-Tumor-effect* (GvETE) und damit die Hoffnung darauf, dass wirksame immunologische Antworten auf EFTs möglich sind. De Angulo *et al.* konnten zeigen, dass frühe Erholung der Lymphozytenzahlen nach Hochdosis Chemotherapie ein unabhängiger günstiger Prognosefaktor für OS in Hochrisiko EFTs ist (86), was ein indirekter Hinweis darauf sein könnte, dass autologe T-Zellen an der Aufrechterhaltung der Remission nach Chemotherapie beteiligt sind.

1.3.5 Mögliche Ziel-Antigene beim EFT

Da das spezifische Fusionsprotein des EFTs ein Transkriptionsfaktor ist, der im Zellkern exprimiert wird und nicht auf der Zelloberfläche erscheint, wo er von Antikörpern erkannt werden könnte, kommt nur eine Erkennung durch T-Zellen in Frage. Dazu ist die Präsentation der intrazellulären Antigene an der Zelloberfläche durch MHC-Komplexe nötig, und zwar möglichst durch MHC Klasse I. Denn während Präsentation auf MHC Klasse I zur Aktivierung zytotoxischer CD8 T-Zellen führt, aktiviert MHC Klasse II CD4 T-Zellen, die auch zu einer bei intrazellulären Antigenen ineffektiven und sogar kontraproduktiven humoralen Immunantwort führen können (87). Also müssen erstens Peptide in der Fusionsregion existieren, die an MHC Klasse I binden, und zweitens muss das Fusionsprotein intrazellulär so prozessiert werden, dass diese Peptide als Spaltprodukte anfallen.

Für EWS-FLI1 wurden in zwei Arbeiten die Peptide der Fusionsregion systematisch auf die Fähigkeit, an HLA Klasse I (also humanes MHC Klasse I) zu binden, getestet. In der Arbeit von Meyer-Wentrup *et al.* (88) wurden computergestützte Vorhersagealgorithmen zur Prädiktion der HLA Klasse I-Bindungsfähigkeit herangezogen. Auf diese Weise wurde ein Peptid ermittelt, das sich jedoch in der anschließenden Überprüfung nur als HLA Klasse II bindend herausstellte, was u.a. die eingeschränkte Vorhersagekraft der Prädiktionsalgorithmen sowohl hinsichtlich sich nicht erfüllender Bindungserwartungen als auch hinsichtlich der Möglichkeit von Bindungen, die nicht vorhergesagt wurden, demonstriert. HLA Klasse I bindende Peptide konnten nicht gefunden werden. In der Arbeit von Mackall *et al.* (89) wurde versucht, die Bindungsfähigkeit an HLA Klasse I anhand der Peptidlänge vorherzusagen. Es konnten zwei Peptide identifiziert werden, die in der bereits erwähnten Pilotstudie (85) auf DCs gepulst T-Zellstimulation hervorrufen konnten, eine Negativkontrolle nach Stimulation mit nicht gepulsten DCs wird jedoch ebenso wenig erwähnt wie eine Überprüfung, ob die T-Zellstimulation HLA Klasse I oder II getriggert war. Ob die gefundenen Peptide überhaupt entsprechend intrazellulär prozessiert werden, ist in beiden Arbeiten nicht bekannt.

Zusammengenommen sprechen die bisherigen Ergebnisse wie auch schon bei anderen Tumorarten mit bekannter spezifischer Translokation (90) nicht für das

Vorliegen eines dem Fusionsprotein direkt entstammenden Tumorantigens. Dennoch ist zu erwarten, dass in einer genetisch veränderten Zelle Peptide prozessiert werden, mittels derer sie sich von gesunden Zellen unterscheidet und die effektiv präsentiert werden können. Hierfür sprechen auch die vorher beschriebenen Ergebnisse von Zhang und Koscielniak (37, 82). Angesichts dessen haben Staeger *et al.* (15) in ihrer bereits erwähnten Arbeit mit Hilfe von *microarrays* Unterschiede der kompletten Genexpression zwischen gesunden und EFT-Zellen analysiert und damit potentielle zwar nicht rein tumorspezifische (TSAs), aber doch tumorassoziierte Antigene (TAAs) identifizieren können. Dies sind einerseits so genannte „*downstream* Gene“, also Gene, die durch EWS-FLI 1 reguliert sind, und andererseits konnte Staeger zeigen, dass auch die Regulation EWS-FLI 1-unabhängiger Gene in EFT-Zellen verändert sein kann, was auf die zu Grunde liegende Stammzelle zurückgeführt wird. Da die TAAs – wenn auch seltener als in den Tumorzellen – in gesunden Zellen vorkommen können, sind bei Immuntherapie allerdings Nebenwirkungen möglich.

Wieder mit Hilfe von computergestützten Vorhersagealgorithmen konnte Pirson (91) aus den von Staeger gefundenen Genen HLA-A0201 bindende Peptide gewinnen und zwei mit solchen Peptiden geprimte, HLA-A0201⁻ T-Zellklone sind in der Lage, in einem gezielten *mismatch* HLA-A0201⁺ EFT-Zelllinien *in vitro* spezifisch zu lysieren und das Tumorstadium dieser Zelllinien in immunsupprimierten Mäusen zu verlangsamen (92). Somit konnten zwei relativ spezifische, HLA-A0201 bindende EFT-Antigene identifiziert werden, die für immuntherapeutische Ansätze genutzt werden können, z.B. zur Aktivierung von T-Zellen im Rahmen von *donor lymphocyte infusions* (DLI) (vgl. (38)).

Um alle TAAs unabhängig der eingeschränkten Vorhersagekraft von Computeralgorithmen testen zu können, erscheint es attraktiv, T-Zellen – wie im vorliegenden Experiment geschehen – mit den EFT-Zellen selbst und damit mit der gesamten Bandbreite an möglichen, mit Sicherheit bereits prozessierten und mittels HLA Klasse I präsentierten Antigenen zu konfrontieren. So kann die enorme Vielfalt der T-Zellrezeptoren optimal ausgenutzt werden, um darüber eine wirksame T-Zellreaktion zu provozieren. In dieser Arbeit sollen nun die zuletzt erfolgreich

weiterentwickelten humanisierten Mausmodelle genutzt werden, um die Konfrontation von T-Zellen und Tumorzellen zunächst in einem allogenen Kontext *in vivo* zu ermöglichen.

1.4 Modelle des humanen Immunsystems in Mäusen

Die bisherigen Erkenntnisse über das Immunsystem lassen nur grob erahnen, wie viel es noch darüber zu erforschen gibt, und vor allem, wie viel therapeutisches Potential sich noch darin verbirgt. Die Forschung am Immunsystem konnte jahrelang nur *in vitro*, oder aber in Tier-, nämlich bevorzugt Mausmodellen durchgeführt werden, eingeschränkt immer durch die Frage, inwieweit man die gewonnenen Erkenntnisse auf die *in vivo* Situation im Menschen übertragen kann.

Befeuert durch die sich stetig ausbreitende HIV-Pandemie haben daher seit den späten 1980er Jahren verschiedene Arbeitsgruppen begonnen, Mausmodelle mit Immunzellen humaner Abstammung zu entwickeln (93). Damit sollte die Möglichkeit geschaffen werden, das humane Immunsystem und seine Reaktionen in einer *in vivo* Situation zu beobachten.

Seither sind diese Modelle stetig verbessert worden. Als Spenderzellen setzte man zunächst reife PBLs ein, von denen nur B- und T-Zellen überlebten, und das auch nur für eine limitierte Zeit (94). Als nächstes folgten schwierig verfügbare fetale Thymus- und Leberzellen, in denen Progenitorzellen enthalten sind, die in der Lage sind, alle hämatopoetischen Zellreihen hervorzubringen. Das Ergebnis waren weiterhin nur geringfügige Anteile humaner Zellen im peripheren Blut, immerhin waren diese jedoch auch nach 3-5 Monaten noch nachweisbar (95). Schließlich verwendete man aus Knochenmark (96) oder Nabelschnurblut (97) isolierte, hämatopoetische Stammzellen, doch es kam noch kaum zu einer Besiedelung des murinen Thymus mit humanen Progenitorzellen, was für eine nachhaltige Bildung von humanen T-Zellen nötig gewesen wäre.

Einen entscheidenden Fortschritt brachte hier erst eine Weiterentwicklung auf dem Gebiet der verwendeten Mausstämme. Begonnen hatte man mit dem C.B-17-Mausstamm, der die *severe combined immunodeficiency* (scid) Mutation aufwies, bei der aufgrund eines gestörten *rearrangements* der T-Zell-Rezeptor- und

Antikörpergene kaum reife T- und B-Zellen vorhanden sind (98). Nachdem es gelang, diese Mutation in Mäusen mit dem genetischen NOD-Hintergrund, die eine eingeschränkte NK-Zellen-Aktivität, Komplementaktivierung und Makrophagenaktivität aufweisen (99), zu etablieren, konnte die Effektivität der Transplantation deutlich verbessert werden (100). Diese sogenannten NOD/ SCID-Mäuse zeigten jedoch neben einer starken Strahlensensibilität sowie trotz der Mutation gelegentlich auftretenden T- und B-Zell-Populationen eine ausgeprägte Tendenz zur Entwicklung von Lymphomen im Alter von ca. 5 Monaten (101). Diese Tatsache schränkt die Möglichkeit von Langzeitexperimenten stark ein.

Bei der Bemühung um Alternativen wurden durch die Zerstörung von Genen, die für die Entwicklung von T-, B- und NK-Zellen essenziell sind, neue Mausstämme kreiert. Schließlich entstand die $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mutation, bei der sowohl T-, B-, als auch NK-Zellen fehlen (102).

Auch diese Mutation schien zunächst eine Enttäuschung zu sein, nachdem die ersten Versuche, erwachsene Tiere zu rekonstituieren, keine deutlichen Verbesserungen zeigten (101). Erst als Traggiai *et al.* (103) begannen, die humanen Stammzellen intrahepatisch in sublethal bestrahlte, neugeborene Mäuse zu injizieren, machte nicht nur der später erzielte Prozentsatz humaner Zellen im peripheren Blut einen deutlichen Sprung nach oben, sondern es wurden auch alle relevanten Zelluntergruppen des adaptiven Immunsystems, also T-, B- und dendritische Zellen, gebildet und konnten ihre Funktionalität unter Beweis stellen. Da auch NK-Zellen, Monozyten und Granulozyten nachgewiesen werden können, steht das gesamte Repertoire an humanen Leukozyten zur Verfügung (104). Damit liegt ein Modell vor, von dem in mehreren Ansätzen gezeigt werden konnte, dass es in der Lage ist, funktionell auf infektiöse Stimuli zu reagieren.

1.5 Eigener Versuchsaufbau

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit hatte zum Ziel, ein Modell eines humanen Immunsystems in Mäusen in unserem Labor zu etablieren. Hierzu wurde weitgehend das 2004 von Traggiai und Kollegen publizierte Modell (103) herangezogen, es wurde jedoch zunächst der Versuch unternommen, die Rekonstitution in $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$

Mäusen auf genetischem C57BL/ 6 Hintergrund durchzuführen. Später wurden wie in der Originalarbeit Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse auf Balb/ c Hintergrund verwendet.

Die Fähigkeit des Mausmodells, auf infektiöse Stimuli zu reagieren, konnte bereits demonstriert werden (103). Zweiter Teil dieser Arbeit war die Fragestellung, ob das rekonstituierte Immunsystem auch in der Lage ist, auf Tumorzellen zu reagieren, und damit zur Weiterentwicklung von Immuntherapien gegen Krebs geeignet ist, insbesondere zur Identifikation von tumorspezifischen T-Zell-Rezeptoren. Hierzu wurden Experimente mit subkutan injizierten Ewing-Tumor-Zellen durchgeführt und das Tumorwachstum in rekonstituierten Tieren mit dem Wachstum in Kontrollgruppen verglichen.

Generation and challenge of humanized mouse model for investigation of novel therapeutic approaches

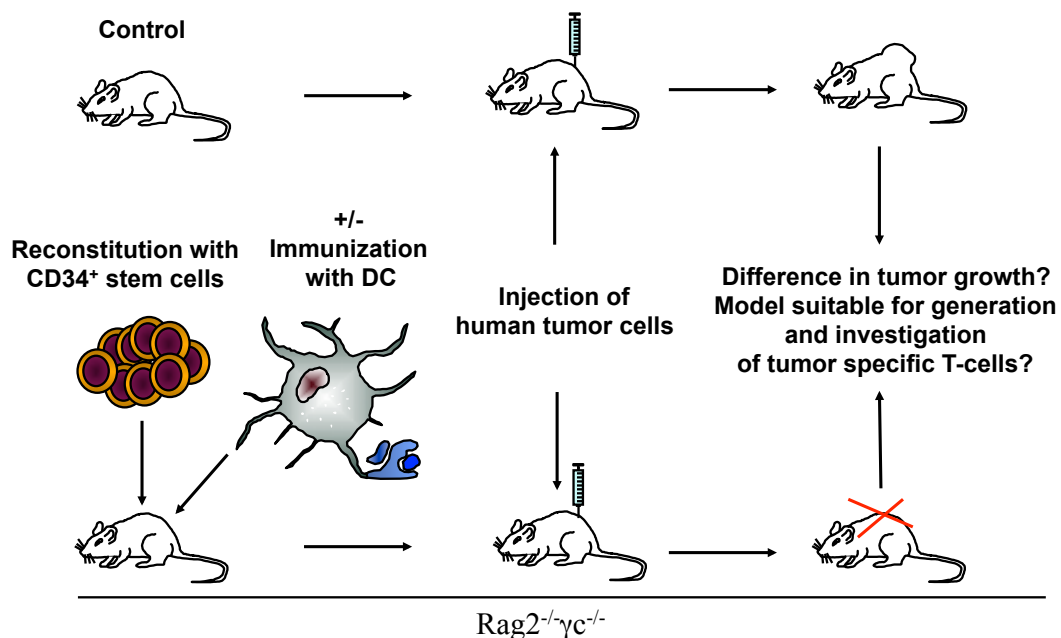


Abbildung 3: Eigener Versuchsaufbau

(Quelle: Priv.-Doz. Dr. G. Richter, eigene Arbeitsgruppe, bearbeitet)

2 Material und Methoden

2.1 Materialtabelle

Auftrennsäulen (MACS® Cell Separation Columns LS+/VS+ und MS+/RS+)	Miltenyi Biotec GmbH
Äther	Sigma
Basismedium für DC-Ausreifung (X-vivo 15)	Biowhittaker
Basismedium für Tumorzellkulturen (RPMI 1640)	Invitrogen
Bearbeitungssoftware für Durchflußzytometriedaten (CellQuest)	BD Biosciences
Bestrahlungsgerät mit Caesium ¹³⁷ -Quelle (Typ OB29902-1)	Buchler GmbH
Blutbildanalysegerät in der Veterinärmedizin	scil animal care company GmbH
Brutschrank (HERAcell® 150)	Heraeus
BSA (bovine serum albumin, gelöst, MACS® BSA Stock Solution)	Miltenyi Biotec GmbH
CCR7 PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD14 Magnetpartikel (BD IMag™ CD14 Magnetic Particles - DM)	BD Biosciences
CD19 APC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD25 PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD3 FITC / PE/ APC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD34 PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD38 APC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD4 FITC / PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences

CD45RA FITC / PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD69 APC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD8 FITC / PE / APC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD83 APC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
CD86 FITC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
D-PBS (phosphate buffered saline)	Invitrogen
DMSO (dimethyl sulfoxide)	Merck
DNase-I	Roche
Durchflusszytomerter Reinigungslösung (BD FACSTM)	BD Biosciences
Durchflu••zytometer (FACSCalibur™)	BD Biosciences
Durchflusszytometer Durchflusslösung (BD FACSTFlow™)	BD Biosciences
Durchflusszytometer Spülflüssigkeit (BD FACSTM)	BD Biosciences
EDTA-Mikrogefäß (1,3ml)	Sarstedt
Eismaschine (AF 100)	Scotsman
Ery-Lyse-Puffer	Apotheke Klinikum Rechts der Isar
Ewingtumorzelllinie A673	ATCC
Ewingtumorzelllinie SKNMC	Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Fc-Rezeptor blockierendes Reagenz (FcR blocking reagent)	Miltenyi Biotec GmbH
FCS (fetal calf serum)	Biochrom AG
Ficoll-Paque (Ficoll®-Paque)	GE Healthcare Biosciences
Formaldehyd	Merck
Futter, Trinkwasser, Streu	Altromin

Gestell für magnetische Zelltrennung (MACS® MultiStand)	Miltenyi Biotec GmbH
GM-CSF (Leukine sargramostim)	Bayer HealthCare Pharmaceuticals
Heparin	Ratiopharm
HLA-A2 FITC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
HLA-DR PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
HPC rat IgG 2α	Sigma
Humanes AB Serum	Lonza
humanes CD45 FITC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
Humanes IgG (10 mg/ml)	Apotheke Klinikum Rechts der Isar
IL-1β (Interleukin 1β)	R&D Systems
IL-4 (Interleukin 4)	R&D Systems
IL-6 (Interleukin 6)	R&D Systems
Infrarotlampe	petra electric
Injektionsnadel (30 Gauge) und -spritze (100µl) für Injektionen in die Leber/ Schwanzvene	Hamilton Bonaduz AG
Isopropanol	Sigma
Kryobox zur kontrollierten Abkühlung	Nalgene
Kryoröhrchen	Nunc
Kühlschrank (coolVario, +4°)	Siemens
Kühlschrank (HERAfreeze®, -80 °C)	Heraeus
L-glutamine (200 mM)	Invitrogen
Lanzette (Goldenrod Animal Lancet, Spitzenlänge 5 mm)	MEDIpoint International Inc.
Magnet für Zelltrennung (BD IMagnet)	BD Biosciences
Magnetisch markierte anti humanes CD34	Miltenyi Biotec GmbH

Antikörper (CD34 MicroBeads)	
Maus γ 1 APC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
Maus γ 1 FITC (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
Maus γ 1 PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
Mauskäfige mit Belüftungssystem	Tecniplast
Mausstall balb/c	Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki
Mausstall black six	Taconic Biosciences
Medium DMEM	Invitrogen
Mikropipetten (0.5-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l)	Eppendorf
Mikroplatten (96-well) für die Fluoreszenzfärbung	TPP
Mikroskope	Leica und Optech
Murines CD16/ CD32 (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
murines CD45 PE (BD Pharmingen™)	BD Biosciences
Nabelschnurentnahmeset (NSB-Kollektionsbeutel 1-BB-150-CPD-NP)	Gerätezentrale für Bluttransfusion des Österreichischen Roten Kreuz
NaN ₃ (Natriumazid)	Merck
Neubauer-Zählkammer	Brand
Paraformaldehyd	Merck
Pasteurpipetten	Peske OHG
Penicillin / Streptomycin (104 U/ml)	Invitrogen
Petrischalen (BD Falcon™)	BD Biosciences
PGE ₂ (Prostaglandin E2)	Cayman Chemical Company
Pipetten (BD Falcon™, 2, 5, 10 und 25 ml)	BD Biosciences
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 μ l mit	Biozym

Filter)	
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	MBP
Pipettierassistent (Easypet)	Eppendorf
Propidiumjodid	Sigma
Puffer für magnetische Zelltrennung (BD IMag™ Buffer: PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA, 0,09% NaN ₃)	BD Biosciences
Röhrchen für FACS-Färbung (BD Falcon™, abgerundet, Eindrückverschluss, 5 ml)	BD Biosciences
Röhrchen für Zellaufbereitungen (BD Falcon™, konisch, Schraubverschluss, 15 ml und 50 ml)	BD Biosciences
Safe-Lock Gefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Säulenhalter mit Magnetfeld (MiniMACS™ und MidiMACS™ Separator)	Miltenyi Biotec GmbH
Säulenpuffer (autoMACS™ Rinsing Solution)	Miltenyi Biotec GmbH bzw. Selbstanfertigung
Skalpelle	Feather
Spritzen (5, 10 und 20 ml)	B.Braun
Statistik Software (SPSS Version 17)	SPSS Inc./ IBM
Sterile Werkbank	Heraeus
Stickstofftank (K Serie, 240 Liter)	Taylor-Wharton
Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Office 2008)	Microsoft
TNF α (Tumor Nekrose Faktor α)	R&D Systems
Trypan Blau 0.4 %	Invitrogen
Trypsin / EDTA 10x	Invitrogen
Türks Lösung	Merck
Ultraschallbad (Elmasonic S6OH)	Elma

Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries
Wasserbad	GFL
Zellfilter (BD Falcon™, Nylon-Sieb, 40 µm)	BD Biosciences
Zellkulturflaschen (75 cm ² and 175 cm ²)	TPP
Zellkulturflaschen (BD Falcon™, unbehandelte Oberfläche, 75 cm ²)	BD Biosciences
Zentrifugen (Biofuge fresco, Multifuge 3 S-R)	Heraeus

Fixierlösung für die Fluoreszenzfärbung (1 % Paraformaldehyd in D-PBS)	Selbstanfertigung
Medium für Dendritische Zellen (X-Vivo 15, 1 % humanes Serum)	Selbstanfertigung
Trypsin / EDTA 1x (45 ml D-PBS, 5ml Trypsin-EDTA 10x)	Selbstanfertigung
Medium für Tumorzellkulturen (RPMI 1640, 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100 U/ml Pen / Strep)	Selbstanfertigung
Einfriermedium (FCS 90 %, DMSO 10 %)	Selbstanfertigung
Färbepuffer (0.1 % NaN ₃ , 2% FCS in D-PBS)	Selbstanfertigung
Säulenpuffer (D-PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA)	Selbstanfertigung
Auftaupuffer (RPMI, 12% FCS)	Selbstanfertigung

2.2 Herstellernachweis

Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland
ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, USA
B.Braun, Melsungen, Deutschland
Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Leverkusen, Deutschland

BD (Becton Dickinson) Biosciences, New Jersey, USA
Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Biowhittaker, East Rutherford, New Jersey, USA
Biozym, Hess. Olendorf, Deutschland
Brand, Wertheim, Deutschland
Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
Cayman Chemical Company, Cayman Europe, Tallin, Estonia
Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan
Elma, Singen, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feather, Osaka, Japan
GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden
Gerätezentrale für Bluttransfusion des Österreichischen Roten Kreuz, Eugendorf, Österreich
GFL, Großburgwedel, Deutschland
Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Heraeus, Hanau, Deutschland
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Leica, Wetzlar, Germany
Lonza, Basel, Switzerland
MacoPharma, Langen, Deutschland
MBP (Molecular BioProducts), San Diego, California, USA
MEDlpoint International Inc., New York, USA
Merck, Darmstadt, Deutschland

Microsoft
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nalgene, Rochester, New York, USA
Nunc, Naperville, USA
Optech, Vaughan, Canada
Peske OHG, München, Deutschland
R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Roche, Mannheim, Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland
Scotsman, Mailand, Italien
Siemens, Siemens-Electrorgeräte GmbH, München, Deutschland
Sigma, St. Louis, Missouri, USA
SPSS Inc., inzwischen IBM (International Business Machines Corporation), Armonk, New York, USA
Taconic Biosciences, New York, USA
Taylor-Wharton, Taylor-Wharton Germany GmbH, Husum, Deutschland
TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen, Schweiz
petra electric, Burgau, Deutschland
Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland
Altromin, Lage, Deutschland

2.3 Gewinnung der Stammzellen

2.3.1 Gewinnung des Nabelschnurblutes

Zur Rekonstitution der Mäuse wurden hämatopoetische Stammzellen benötigt. Diese wurden aus Nabelschnurblut gewonnen, das freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Priv.-Doz. Dr. V. Jacobs, Dr. Niemeyer und den Hebammen sowie mit Priv.-Doz. Dr. R. A. J. Oostendorp und seiner Arbeitsgruppe des Labors für Stammzellphysiologie vom Kreißsaal der Frauenklinik des Klinikums Rechts der Isar in München zur Verfügung gestellt wurde. Die Nabelschnurblutentnahme war im Rahmen des STEMMAT-Projektes von der lokalen Ethikkommission der Technischen Universität München am 28.01.2003 genehmigt worden und erfolgte auf Basis einer schriftlichen Einverständniserklärung durch die Mutter.

Das Nabelschnurblut kann nach der Geburt ohne jegliche Beeinträchtigung des Neugeborenen und der Mutter entnommen werden. Nach Abnabelung des Neugeborenen wird die Nabelschnur unter sterilen Bedingungen punktiert und das in der Nabelschnur und Plazenta enthaltene Blut gesammelt. Hierfür wurde das Stemcare Entnahmeset von Fresenius verwendet. Zur Verhinderung der Gerinnung sind in den Beuteln 21 ml Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD) als Antikoagulans vorgelegt. Bis zur Verarbeitung wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert. Es ist wichtig, dass die Stammzellen möglichst zeitnah aus dem entnommenen Nabelschnurblut isoliert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden, da durch den einsetzenden Alterungsprozess die Vermehrungsfähigkeit der Stammzellen abnimmt, je länger das Blut gelagert bleibt (105). Es wurde daher nur Nabelschnurblut verwendet, das nicht älter als 36 Stunden war. Proben mit einem Volumen von unter 50 ml wurden verworfen. Die gesamte Verarbeitung des Blutes fand unter der sterilen Werkbank statt.

2.3.2 Gewinnung der Lymphozytenfraktion

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurde die Leukozytenfraktion des Blutes gewonnen.

Hierzu wurde das Blut 1:4 mit EDTA-versetztem (2 mM) D-PBS verdünnt und jeweils 35 ml des Blut-D-PBS-Gemisches in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen vorsichtig auf

15 ml Ficoll®-Paque überschichtet. Nach 35 min Zentrifugation bei 400 g, Raumtemperatur und ausgestellter Zentrifugenbremse findet man in dem Falcon®-Röhrchen eine Auftrennung in die 4 Phasen Plasma, Leukozyten, Trennmedium und Erythrozyten (mit einem Großteil der Granulozyten). Nach dieser Zentrifugation wurde die Zentrifuge auf 4 °C gestellt. Die Leukozyten wurden vorsichtig abgesaugt und 1:2 mit D-PBS verdünnt. Es folgte eine Zentrifugation von 25 min bei 200 g, der sogenannte „*thrombowash*“. Bei Bedarf wurde danach eine Erythrozyten-Lyse (1,5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer auf ca. 1×10^8 Zellen, Inkubationszeit 5-10 min) durchgeführt. Abschließend folgte mehrfaches Waschen mit D-PBS bei 400 g über 10 min, bis der Überstand klar war.

2.3.3 Zellzählung

Für den folgenden Selektionsprozess musste zunächst die Zellzahl bestimmt werden. Es ist wichtig, dass nicht trotz Erythrozyten-Lyse evtl. restliche vorhandene Erythrozyten mitgezählt werden, was zu einer erhöhten Zellzahl und damit einem zu hohen Einsatz von Markierungsantikörpern (*MicroBeads*) führen würde. Dies hätte durch Zunahme von unspezifischen Bindungen negative Auswirkungen auf das Reinheitsergebnis. Deshalb wurde zur Zellzählung in der Neubauer Zählkammer essigsäurehaltige Türks Lösung eingesetzt, durch die Erythrozyten nach einer Latenz von ca. 2-3 min lysiert werden. 10 µl Zelllösung wurden mit 10 µl Türks Lösung versetzt und in die Neubauer Zählkammer gegeben.

Nach ca. 3 min Sedimentierungszeit und Einwirkungszeit von Türks Lösung erfolgte die Zählung in allen vier Quadranten, jeweils auf den oberen und linken Kanten liegende Zellen wurden mitgezählt, auf den rechten und unteren Kanten liegende Zellen nicht. Bei deutlich mehr als 200 Zellen pro Quadrant wurde die Zelllösung ggf. weiter verdünnt und die Kammer neu befüllt. Aus den vier Quadrantenergebnissen wurde der Mittelwert errechnet, dieser multipliziert um den Faktor 10^4 ergibt (bei einem Volumen von 0,1 µl pro Quadrant) die Zellzahl pro ml der eingefüllten Lösung. Durch die Verdünnung mit Türks Lösung muss noch mit dem Faktor 2 multipliziert werden, um auf die Konzentration der Zelllösung zu kommen, ggf. weitere Verdünnungen müssen entsprechend berücksichtigt werden.

Proben mit weniger als 1×10^8 Zellen wurden verworfen.

Bei anderen in der Arbeit vorkommenden Zellzählungen, bei denen eine Erythrozytenkontamination weniger gefürchtet werden musste bzw. weniger gravierende Auswirkungen gehabt hätte, wurde statt Türks Lösung Trypanblau eingesetzt, wodurch lediglich die toten Zellen angefärbt werden.

2.3.4 Isolation der Stammzellen

Aus der so gewonnenen Leukozytenfraktion wurden mittels Magnetseparation die hämatopoetischen Stammzellen isoliert, die sich durch das Oberflächenmerkmal CD34 auszeichnen. Bei diesem Verfahren wird das charakteristische Oberflächenmerkmal der Zielzellen, also in unserem Fall CD34, durch magnetisch beladene Antikörper (*MicroBeads*) markiert, so dass die Zielzellen bei der Passage durch eine mit metallischem Granulat gefüllte und in ein magnetisches Feld gespannte Säule hängen bleiben. Für die Separation wurde das CD34 *Isolation Kit* von Milteneyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet und entsprechend dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Jeweils 1×10^8 Zellen wurden in 300 μ l Säulenpuffer gelöst und mit 100 μ l FcR *blocking reagent* versetzt, um unspezifische Bindungen der *MicroBeads* an die Fc-Rezeptoren CD34-negativer Zellen zu verhindern. Mit diesem Reagenz wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert, anschließend wurden die *MicroBeads* dazugegeben, und zwar wiederum je 100 μ l pro 1×10^8 Zellen. Es folgte eine Inkubationszeit von 34 min bei 4 °C auf der Wiegeplatte, die auf Stufe 3,5 eingestellt war. Diese Zeit wurde genutzt, um den Säulenpuffer im Ultraschallbad zu entgasen (10 min) und den Zellseparator (MACS) vorzubereiten.

In das Magnetfeld des Zellseparators wurden der Zellmenge entsprechend die größere verfügbare Säule LS⁺/ VS⁺ (die kleinere Säule MS⁺/ RS⁺ wird für Zellmengen $< 10^8$ verwendet) gespannt und mit 3 ml Säulenpuffer vorgespült.

Die markierten Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation 2x in Säulenpuffer gewaschen (markierte Zellen wurden aufgrund höherer Empfindlichkeit nur noch bei max. 300 g zentrifugiert), auf eine Konzentration von $1-2 \times 10^8$ Zellen pro ml Säulenpuffer gebracht und durch ein angefeuchtetes 40 μ m Nylon-Sieb hindurch auf die Säule pipettiert. Es wurde 3x mit je 3 ml Säulenpuffer gewaschen. Die Säule

wurde daraufhin aus dem magnetischen Feld genommen und die hängen gebliebenen Zellen wurden mit 5 ml Säulenpuffer mittels eines zur Säule gehörigen Kolbens herausgedrückt (Positivfraktion). Die Positivfraktion wurde abzentrifugiert und in 0,5-1 ml Säulenpuffer gelöst ein weiteres Mal über eine Säule gegeben, diesmal über die Kleinere (Größe MS⁺/ RS⁺).

2.3.5 Reinheitskontrolle/ Durchflusszytometrie

Es schloss sich eine Reinheitskontrolle der Positivfraktion mittels Durchflusszytometrie an. Bei diesem Verfahren wird die unterschiedliche Lichtemission fluoreszierender Stoffe nach Anregung durch einen Laserstrahl genutzt. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden an Antikörper konjugiert, die spezifisch Zelloberflächenmerkmale erkennen können. Durch die Lichtstreuung erhält man zusätzliche Informationen über Größe (*Forward-Scatter*) und Granularität bzw. Komplexität (*Sideward-Scatter*) der Zellen. Für die spätere Rekonstitution der Mäuse wurde eine Reinheit von mindestens 95 % CD34⁺ Zellen mit einer maximalen T-Zell (CD3)-Kontamination von 0,1 % gefordert. Wurden diese Ziele nicht erreicht, wurden die Zellen erneut über eine Säule gegeben.

Zum Färben wurden monoklonale Antikörper der Firma Becton Dickinson Biosciences (San Jose, USA) verwendet, die jeweils mit einem der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE oder APC konjugiert waren. Bei allen Färbungen in dieser Arbeit wurde jeweils eine Isotypfärbung mit Mausantikörpern zur Justierung der Grundeinstellungen und Abgrenzung unspezifischer Färbungen von humanen Zellen sowie – wenn von der Zellzahl her möglich – eine CD4-FITC/ CD8-PE-Färbung zur Einstellung der Kompensation angefertigt. Außerdem wurde eine ungefärbte Leerprobe bereitgestellt, die zur Einstellen von *Forward-Scatter* (Größe) und *Sideward-Scatter* (Granularität) verwendet wurde. Waren murine Zellen in der Probe enthalten, wurde ein Isotyp mit Ratten IgG_{2a} angefertigt.

Bei der Prüfung auf Reinheit nach dem magnetischen Selektionsprozess wurden diese „Einstellungsfärbungen“ bereits vor dem Selektionsprozess abgenommen. Die Positivfraktion wurde auf CD3-FITC, CD34-PE und CD38-PE gefärbt. Um die Ausbeute zu evaluieren und um Informationen für eventuelle spätere

Mismatchoptionen zu erhalten, wurde die Negativfraktion auf HLA-A2-FITC, CD34-PE und CD38-APC gefärbt.

Je nach Verfügbarkeit wurden pro Färbung 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 40 μ l Färbepuffer (D-PBS/ 2 % FCS/ 0,05 % NaN_3) gelöst. Bei den magnetisch selektierten Zellen, die bereits im Rahmen des magnetischen Selektionsprozesses zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit den *MicroBeads* geblockt worden waren, wurde auf ein weiteres Blocken verzichtet. Bei anderen in dieser Arbeit vorkommenden Färbungen wurden die Zellen mit 100 μ g/ml humanem IgG (10 μ l/Probe) 10 Minuten auf Eis geblockt. Waren in der Probe sowohl murine als auch humane Zellen zu erwarten, wurde zusätzlich mit 1 μ l anti-Maus CD16/ CD32 geblockt.

Mit Ausnahme der HLA-A2-Färbung, für die 0,5 μ g Färbeantikörper pro 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen genügt, und des Isotyps, bei dem 0,75 μ g reicht, wurde jeweils mit 1 μ g der Antikörperlösung pro Probe gefärbt. Die Inkubationszeit betrug 20 min auf Eis. Der Inkubation folgten 2 Waschungen (1500 rpm, 5 min, 4 °C) mit Färbepuffer. Konnte die Messung sofort im Anschluss durchgeführt werden, wurden die Pellets zum Schluss in 300 μ l D-PBS resuspendiert, konnte die Messung erst mehr als 2 Stunden nach der Zellfärbung stattfinden, erfolgte die Resuspension in 200 μ l Fixierlösung (D-PBS/ 1 % Paraformaldehyd). In diesem Fall wurde die Probe vor der Messung mit D-PBS auf das Volumen von 300 μ l aufgefüllt.

5-10 Minuten vor dem Messen wurde jeder Probe außer dem Isotyp zur Abgrenzung von toten Zellen 1 μ l Propidiumjodid zugegeben, dies ist jedoch nur möglich, wenn keine paraformaldehydhaltige Fixierlösung verwendet wurde.

Gemessen und analysiert wurde mit dem Durchflusszytometer FACS Calibur der Firma Becton Dickinson unter Verwendung des Computerprogramms CellQuest. Mithilfe der oben genannten Standardproben wurde das Gerät eingestellt. Die Leukozytenpopulation wurde auf Basis der charakteristischen Verteilung zwischen *Forward-Scatter* und *Sideward-Scatter* festgelegt (vgl. Abb. 8) und die Prozentanteile der gemessenen Zelltypen darauf bezogen.

2.3.6 Aufbewahrung

Wenn die Stammzellen aus der Positivfraktion den Reinheitskriterien entsprachen, wurden sie in einer Konzentration von ca. 2×10^6 / ml in eiskaltem FCS/ 10 % DMSO aufgenommen, sofort in einer auf 4 °C vorgekühlten Kryobox im -80 °C-Kühlschrank kontrolliert um 1 °C pro Minute herabgekühlt und am folgenden Tag in den Stickstofftank überführt.

2.3.7 Auftauen

Beim Auftauen ist es das Ziel, die Zellen nur möglichst kurz dem im aufgetauten Zustand zelltoxischen DMSO auszusetzen. Die Proben wurden kurz im Wasserbad angetaut, sobald die Probe vom Probengefäß gelöst war in 10 ml vorgekühlten Auftaupuffer (RPMI, 12 % FCS) überführt und sofort in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend folgten 2 Waschgänge mit D-PBS.

2.3.8 Andere Stammzellquellen

Zu Beginn wurden einzelne, aus Knochenmark und peripherem Blut gewonnene Stammzellpräparate verwendet, die von bereits verstorbenen, hämatologischen Patienten in Remission zur späteren Verwendung als autologes Transplantat abgenommen worden waren.

Zu diesem Zweck wurden die in Stickstoff tiefgefrorenen Proben im 37 °C Wasserbad aufgetaut, bereits bei noch vorhandenen Eisklumpen mit 100 ml vorgekühltem, mit 100 U/ml DNase-I versetztem Auftaupuffer (RPMI, 12 % FCS) verdünnt und sofort in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Im Falle der Proben aus peripherem Blut wurden die Zellen wie in Kapitel 2.3.2 über einen [®]-Gradienten gegeben. Es wurden mindestens zwei weitere Waschgänge mit D-PBS durchgeführt und die Zellen vor dem Zählen über ein Zellsieb (40 µm) gegeben.

Anschließend erfolgte die weitere Aufarbeitung entsprechend dem Vorgehen bei Nabelschnurblutzellen.

2.4 Mäuse

Nach der Genehmigung des Tierversuchsantrages 55.2-1-54-2531-14-07 durch die Regierung von Oberbayern wurden die immundefizienten Mäuse unter pathogenfreien Bedingungen im Tierstall des Klinikums Rechts der Isar München

gezüchtet. Hierzu wurden die Mäuse in isolierenden Käfigen mit eigenem Lüftungssystem gehalten und mit sterilem Futter, Trinkwasser und Streu versorgt. Alle Manipulationen wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt.

Zunächst wurden Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund gezüchtet. 28 dieser Tiere wurden rekonstituiert.

Ab Dezember 2006 wurde eine Zucht von Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen mit BALB/c Hintergrund vom *Central Institute for Experimental Animals* (Kawasaki, Japan) aufgebaut. Von diesem Stamm wurden 41 Tiere rekonstituiert.

2.5 Bestrahlung und Transplantation der Mäusewelpen

Da die hämatopoetischen Eigenschaften der fetalen Leber *post partum* rasch nachlassen, wurden die neugeborenen Mäuse so bald wie möglich, idealerweise spätestens 24 Stunden nach ihrer Geburt bestrahlt. Traggiai et. al. (103) wählten hierfür eine fraktionierte Bestrahlung mit 2x2 Gray, eine Dosis, die als subletal titriert worden war. Aus praktischen Gründen wurde hier mit einer einmaligen Dosis von 3,5 Gray bestrahlt, was in der physikalischen Wirkung vergleichbar einzustufen ist. Hierfür wurde zunächst mit der Klinik für Strahlentherapie am MRI kooperiert, später wurde ein kleineres Bestrahlungsgerät mit Caesium¹³⁷-Quelle des Instituts für Mikrobiologie eingesetzt (Buchler GmbH, Braunschweig, Typ OB29902-1). 4 bis 12 Stunden nach der Bestrahlung wurden den Mäusen je 2x10⁵ der aufgetauten und erneut gewaschenen Stammzellen in 25 µl PBS gelöst intrahepatisch injiziert (s. Abb. 4). Hierfür wurde eine 30 Gauge Nadel verwendet.



Abbildung 4: Hepatische Injektion bei Mäusewelpen

Quelle: Dr. U. Thiel, eigene Arbeitsgruppe

Wichtig ist es, an dieser Stelle darauf zu achten, dass keine Luftblasen injiziert werden und dass möglichst langsam injiziert wird, um zu vermeiden, dass mit einem an der Einstichstelle austretenden Tropfen ein Großteil der Stammzellen wieder verloren geht.

2.6 Blutabnahme

Im Alter von 2-7 Monaten erfolgten die Blutabnahmen bei den transplantierten Tieren. Hierzu wurde mit einer Lanzette ein Areal am hinteren Ende des Kieferknochens punktiert, in dem sich *V. facialis* und *V. submandibularis* mit der *V. jugularis* vereinigen (s. Abb. 5). Bei dieser Methode wird keine Anästhesie benötigt, die Tiere werden relativ wenig beeinträchtigt und es kann Blut in guter Qualität und soweit dem Tier zumutbar in beliebigen Mengen entnommen werden.

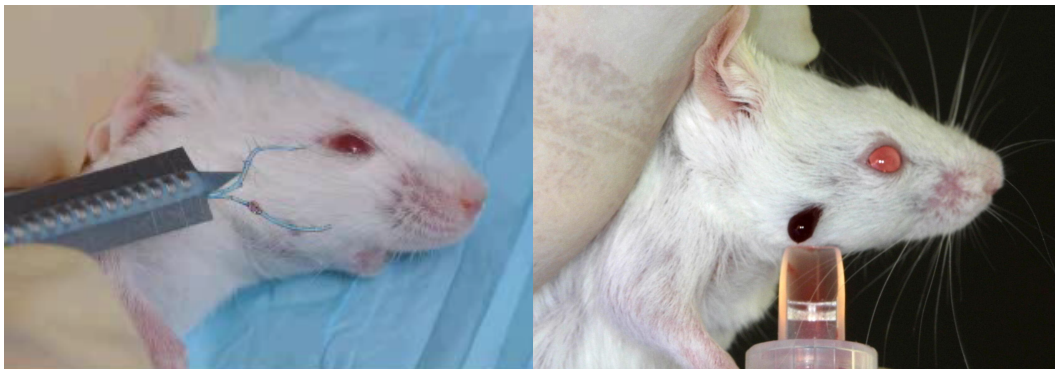


Abbildung 5: Blutentnahme bei Mäusen

Quelle: http://www.medipoint.com/html/for_use_on_mice.html, entnommen am 29.04.2009

Es wurden jeweils ca. 8 Tropfen Blut abgenommen.

Das Blut wurde in Eppendorfgläsern aufgefangen, in denen je 1 ml DMEM/ 5 % FCS/ 1 % Heparin vorgelegt war, und auf Eis transportiert.

Waren Blutbildbestimmungen geplant, so wurde das Blut in 1,3 ml EDTA-Röhrchen aufgenommen, die freundlicherweise von der Neugeborenen-Intensivstation des Klinikums Rechts der Isar in München zur Verfügung gestellt wurden.

2.7 Blutanalyse

Im Labor wurde das Blut zunächst bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und mit dem Pellet eine Erylyse (1 ml Ery-Lyse-Puffer, 1 min Inkubation, Abblocken mit D-PBS) durchgeführt. Nach 2 weiteren Waschungen bei 1500 rpm und 4 °C wurden die Zellen gezählt und entsprechend dem unter 2.3.5. bereits beschriebenen Protokoll gefärbt. Hier wurde vor dem Färben sowohl 10 µl humanes IgG als auch 1 µl anti-Maus CD32/ CD16 zugesetzt und 10 min inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Des Weiteren wurde ein Isotyp mit Ratten IgG_{2α} angefertigt. Gefärbt wurde auf humanes CD45, murines CD45, humanes CD19, CD3, CD45Ra und CCR7.

In den Experimenten II und III (s.u.) wurde bei einigen Mäusen des Weiteren eine Blutbildbestimmung, anfangs manuell und später automatisiert, durchgeführt. Hierfür wurde das veterinärmedizinische Blutanalysegerät der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar (MRI) verwendet.

2.8 Tumorzellen

Für die Provokation des Immunsystems wurde die HLA-A*0201⁺ Ewing Tumorzelllinie A673 (106) benutzt, in Vorversuchen mit Rag2^{-/-}γc^{-/-} C57BL/ 6 Mäusen kam die HLA-A*0201⁻ Ewing Tumorzelllinie SK-N-MC (107) zum Einsatz.

Eine Probe der Zellen wurde aufgetaut, im Brutschrank bei 37 °C in Kultur genommen und vermehrt, bis die benötigte Zellzahl erreicht war. Als Medium wurde RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM L-glutamine und 100 U/ ml Penicillin/ Streptomycin verwendet. Es wurden 75 cm²-Flaschen verwendet, die mit 10 ml Medium gefüllt wurden.

Alle 2-3 Tage wurden die Zellen umgesetzt. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 3-5 ml Trypsin/ EDTA 5-10 min im Brutschrank inkubiert. Die daraufhin suspendierten Zellen wurden aus den Kulturflaschen in 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und mit Medium gewaschen (1500 rpm, 5 min, Raumtemperatur).

Das Zellpellet wurde anschließend je nach Zelldichte entweder in 10 oder 20 ml Medium gelöst, auf 1 oder 2 Kulturflaschen verteilt und weiterhin im Brutschrank kultiviert.

Wenn die gewünschte Zellzahl erreicht wurde, wurden die Tumorzellen wiederum trypsiniert, gewaschen und in D-PBS gelöst.

Da in einem Vorversuch A673 in Rag2^{-/-}γc^{-/-} C57BL/ 6 Mäusen nicht anwachsen konnte, wurde hier ein Versuch mit der HLA-A*0201⁻ Ewing Tumorzelllinie SK-N-MC durchgeführt. Diese Zellen konnten in einigen Tieren anwachsen, so dass von den angewachsenen Tumoren erneut Zellkulturen angelegt werden konnten. Auch diese Zelllinien wuchsen jedoch nicht zuverlässig an. In Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen auf Balb/ c Hintergrund traten diese Probleme nicht auf.

2.9 Herstellung reifer dendritischer Zellen

Für die Herstellung von reifen dendritischen Zellen wurden CD14-positive Zellen, also Zellen der monozytären Linie, aus einem *buffy coat* gewonnen. Diese wurden in mit IL-4 und GM-CSF versetztem Medium 6 Tage kultiviert, wodurch die monozytären Vorläuferzellen zu unreifen DCs differenzierten, und anschließend mit einem Reifungscocktail aus 10 ng/ ml TNF α , 10 ng/ ml IL-1 β , 1000 IU/ ml IL-6 und 1 μ g/ ml PGE₂ zur Ausreifung gebracht.

Der *buffy coat* ist die mittlere, leukozyten- und thrombozytenreiche Schicht, die bei Sedimentation oder Zentrifugation einer Blutprobe entsteht und bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten und Frischplasmaprodukten übrig bleibt. *Buffy coats* wurden vom Blutspendedienst Ulm erhalten. Mittels Dichtegradientenzentrifugation entsprechend des unter 2.3.2 beschriebenen Protokolls wurde die Leukozytenfraktion gewonnen, allerdings hier nur mit einer Verdünnung von 1:2 *buffy coat* + PBS statt 1:4 wie bei Vollblut. Auch wurde die Dauer des *thrombowashs* auf 10

Minuten (statt 25) verkürzt. Eine Erythrozyten-Lyse zur Entfernung von Rest-Erythrozyten wurde mit 15 ml Erythrozytenlyse-Puffer über 4 Minuten durchgeführt, danach wurde der Puffer mit PBS geblockt. Die Zählung ergab 6×10^8 Leukozyten.

Die CD14-Selektion wurde anschließend mit dem Selektions-Kit von Becton Dickinson und entsprechend dem Protokoll der Herstellerfirma durchgeführt:

Hierfür wurde zunächst die Lösung mit den magnetischen, anti-huCD14-Partikeln durchmischt. Nach erneutem Waschen der Leukozytenfraktion wurde das Leukozyten-Pellet in einer Konzentration von 50 μ l pro 10^7 Zellen mit den geschüttelten Partikeln versetzt, sorgfältig durchmischt und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit dem vorher auf 1:10 mit sterilem Wasser verdünnten und auf 4 °C gekühlten BD IMag™ Puffer auf eine Konzentration von 6×10^7 Zellen pro ml gebracht. Die so gelösten Zellen wurden sofort in den BD Magneten platziert und für knappe 10 Minuten inkubiert.

Ohne die Lösung aus dem Magneten zu nehmen wurde anschließend der Überstand vorsichtig mit der Pipette entnommen. Die magnetische Selektion wurde zwei Mal jeweils mit derselben Verdünnung wiederholt, abschließend wurde eine Waschung mit D-PBS durchgeführt.

Auf diese Weise konnten $8,8 \times 10^7$ CD14+ Zellen aus dem *buffy coat* gewonnen werden.

Die gewonnenen monozytären Vorläuferzellen wurden in 40 ml Zellmedium X-VIVO, also bei einer Konzentration von ca. 2×10^6 / ml, gelöst. Hierzu wurde 1 % humanes AB Serum, 30 ng/ ml IL-4 und 800 U/ ml GM-CSF hinzugefügt. Diese Lösung wurde mit 10 ml pro Flasche auf Zellkulturflaschen verteilt und bei 37 °C kultiviert. Nach 3 Tagen wurde die gleiche Menge an Zytokinen erneut zugegeben sowie ca. ein Drittel des serumversetzten Mediums nachgefüllt. Nach insgesamt 6 Tagen entwickelten sich aus den Vorläuferzellen unreife DCs, was mikroskopisch bestätigt werden konnte.

Diese wurden nun 2 Tage mit oben genanntem Reifungscocktail zur Ausreifung gebracht.

Mit einer Färbung auf CD 86, HLA-DR und CD 83 entsprechend des Protokolls unter 2.3.5. wurde die Ausreifung der DCs in der Durchflusszytometrie kontrolliert.

2.10 Provokations-Experimente

Insgesamt wurden 3 Provokations-Experimente mit Tumorzellen durchgeführt, die jeweils rekonstituierten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen auf Balb/ c Hintergrund und nicht rekonstituierten Kontrollmäusen der gleichen Art inguinal subkutan injiziert wurden. Bei Experiment I wurden pro Tier 5x10⁶ Tumorzellen injiziert, bei Experiment II und III nur 3x10⁶ Zellen pro Tier. Die Zellen wurden jeweils in 200 µl D-PBS suspendiert. Als Maß der Rekonstitution der Tiere wurde der Anteil der huCD45 positiven, also humanen Zellen an Leukozyten im peripheren Blut der Mäuse herangezogen und als Rekonstitutionsquote bezeichnet.

In Experiment I wurden 3 Weibchen sowie ein Männchen im Alter von 4 - 5,5 Monaten eingesetzt. Der Median der Rekonstitutionsquoten betrug 12 %. Die Rekonstitutionsquoten wurden am Tag der Tumoringjektion bestimmt.

In Experiment II wurden 3 Männchen und 3 Weibchen im Alter von 3 - 3,5 Monaten injiziert. Der Median der Rekonstitutionsquote betrug 40 % und die Rekonstitutionsquoten waren im Alter von 2 - 2,5 Monaten bestimmt worden.

In Experiment III wurden 5 Männchen und 2 Weibchen eingesetzt, die zum Zeitpunkt der Tumoringjektion 8 - 10 Monate alt waren. Die Median der Rekonstitutionsquoten betrug 14 %, die Rekonstitutionsquoten waren bei 4 Mäusen im Alter von 2,5 und bei 3 Mäusen im Alter von 7 Monaten bestimmt worden. (Vgl. Abb. 19)

In Experiment III wurden den Versuchstieren 2 Wochen vor Injektion der Tumorzellen jeweils 2x10⁶ dendritische Zellen, die in je 200 µl D-PBS gelöst worden waren, in die Schwanzvene gespritzt.

Durch Erwärmung mittels kurzer Bestrahlung mit einer Infrarot-Lampe wurde eine Dilatation der Venen erreicht, so dass die Injektion vereinfacht wurde. Für die Injektion wurde wiederum eine 30 Gauge Nadel benutzt.

2.11 Behandlung der Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppen bestanden in Experiment I aus 4 und in Experiment II und III aus jeweils 5 nicht bestrahlten, nicht rekonstituierten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen. Ein gezielter Abgleich der Gruppen nach Alter und Geschlecht hat nicht stattgefunden, da dies weit mehr rekonstituierte Tiere erfordert hätte. In Experiment I handelte es sich um 3 Weibchen und ein Männchen im Alter von 1,5 - 3,5 Monaten, in Experiment II waren

es 5 Männchen im Alter von 4,5 - 6,5 Monaten und in Experiment III 5 Weibchen, jeweils jünger als 2 Monate. Den Tieren der Kontrollgruppe in Experiment III wurden ebenso wie den rekonstituierten Mäusen 14 Tage vor der Tumorzellinjektion 2×10^6 DCs in die Schwanzvenen injiziert.

2.12 Organ- und Tumoranalyse

Zur Organanalyse und zum exakten Vergleich der Tumorgrößen wurden die Mäuse getötet, sobald bei den ersten Tieren in der Gruppe die Tumorgröße von außen gemessen mehr als 1 cm^3 betrug. Hierfür wurde Äther eingesetzt.

Die Wachstumsdauer betrug im ersten Experiment 16, im II. 20 und im III. 12 Tage.

Milz, Thymi und Tumore wurden nach der Abtötung der Tiere herauspräpariert. Die Tumore wurden mit einem Messschieber in drei Dimensionen (a, b und c) vermessen und ihr Volumen nach der Formel $a \times b \times c$ angenähert.

Milzen und Thymi wurden fotografiert und dann zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Zu diesem Zweck wurden sie in PBS mit dem Kolben einer 10 ml Spritze durch ein $40 \mu\text{m}$ Nylon-Sieb gerieben und mehrmals gewaschen. Bei den Milzen wurde zusätzlich eine Erylyse (1 ml Ery-Lyse-Puffer, 1 min Inkubation, Abblocken mit D-PBS) durchgeführt.

Die entstandenen Einzelzellsuspensionen wurden anschließend gewaschen und entsprechend des unter 2.3.5. aufgeführten Färbeprotokolls gefärbt, wiederum ergänzt um ein 10minütiges Blocken mit sowohl $10 \mu\text{l}$ humanem IgG als auch $1 \mu\text{l}$ anti-Maus CD32/ CD16 vor dem Färben sowie einem Isotyp mit Ratten IgG_{2a}. Thymi wurden auf CD45, CD4, CD3 und CD8 gefärbt. Milzen wurden auf humanes CD45, C3, CD19, CD25, CD69 und murines CD45 gefärbt. In Experiment III waren die Milzzellen durch den Verarbeitungsprozess unbrauchbar geworden.

2.13 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Excel (Office 2008 und 2011) in Graphiken dargestellt. Die Statistik wurde am Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München erstellt, hierfür wurde das Programm SPSS (Version 17) benutzt.

Unterschiede zwischen Experimentalgruppe und Kontrollgruppe wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test evaluiert. Der Mann-Whitney-U-Test wurde als einseitiger Test durchgeführt. Die Nullhypothese lautete: Tumorwachstum in der Experimentalgruppe größer oder gleich dem Tumorwachstum in der Kontrollgruppe. Die Alternativhypothese lautete: Tumorwachstum in der Experimentalgruppe geringer als in der Kontrollgruppe. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

Die Unterschiede im Tumorwachstum in Bezug auf die Rekonstitutionsquote wurden ebenfalls im einseitigen Man-Whitney-U-Test auf Signifikanz überprüft. Die Nullhypothese lautete: Tumorwachstum bei hoher Rekonstitutionsquote größer oder gleich dem Tumorwachstum bei niedriger Rekonstitutionsquote. Die Alternativhypothese lautete: Tumorwachstum bei hoher Rekonstitutionsquote geringer als bei niedriger Rekonstitutionsquote. Als Signifikanzniveau galt ebenso $p < 0,05$.

Die Rekonstitutionsquoten aller Mäuse wurden als arithmetisches Mittel, Rekonstitutionsquoten der Experimentalgruppen als Mediane gemittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Erfolgreiche Rekonstitution eines humanen Immunsystems

In keiner der 28 rekonstituierten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse auf C57BL/ 6 Hintergrund ließen sich humane Zellen nachweisen, weder mit Stammzellen aus Nabelschnurblut noch mit Stammzellen aus Knochenmark.

Wir verlegten uns also auf weiße Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse mit Balb/ c Hintergrund. Insgesamt wurden 41 Mäuse dieser Mauslinie rekonstituiert. Hierfür wurden nur noch Stammzellen aus Nabelschnurblut verwendet. In den meisten dieser Mäuse gelang eine Rekonstitution. Im Folgenden wird auf Einzelheiten dieser Rekonstitutionsergebnisse eingegangen.

3.1.1 Peripheres Blut

Abbildung 6 zeigt den prozentualen Anteil der humanen Zellen an den Leukozyten im peripheren Blut bei allen rekonstituierten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen auf Balb/ c Hintergrund:

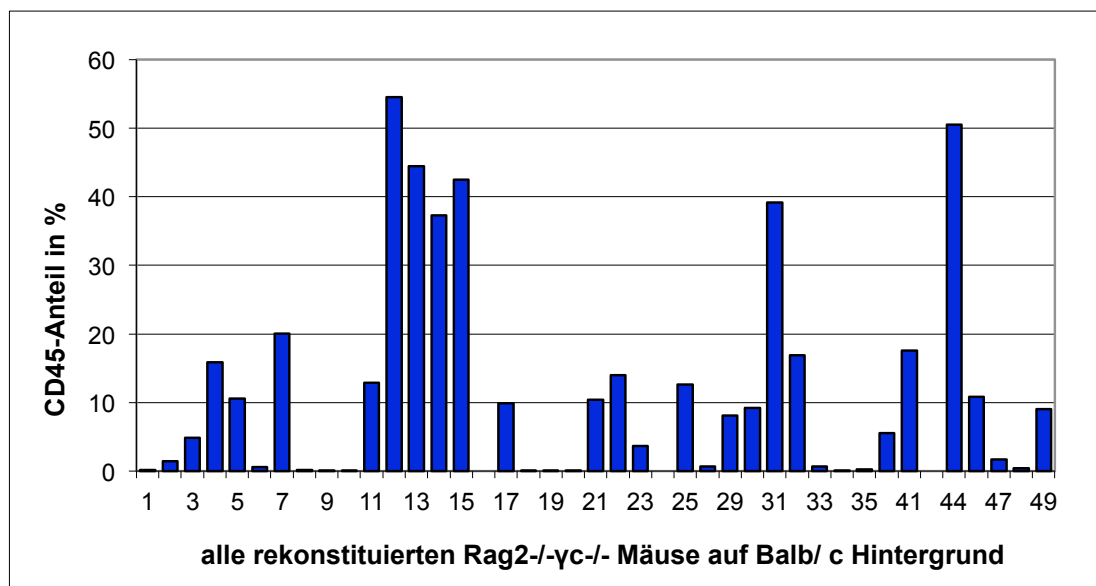


Abbildung 6: Rekonstitutionsquoten als Balkendiagramm entsprechend des prozentualen Anteils von CD45⁺ Zellen, also der Anteil humaner Zellen an den Leukozyten im peripheren Blut aller rekonstituierten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Balb/ c Mäuse

Es ist zu sehen, dass der Anteil der humanen Zellen an den Leukozyten im peripheren Blut bis zu über 50 % betragen kann, einige Mäuse haben hingegen kaum humane Zellen. Geht man davon aus, dass nur die Mäuse, die in der Blutanalyse einen Anteil von über 1 % humaner Zellen im Leukozytengate aufwiesen, korrekt transplantiert wurden, so ergibt sich eine Gruppe von 25 Mäusen. In dieser Gruppe stellt sich die Verteilung der CD3+ und CD19+ Zellen folgendermaßen dar:

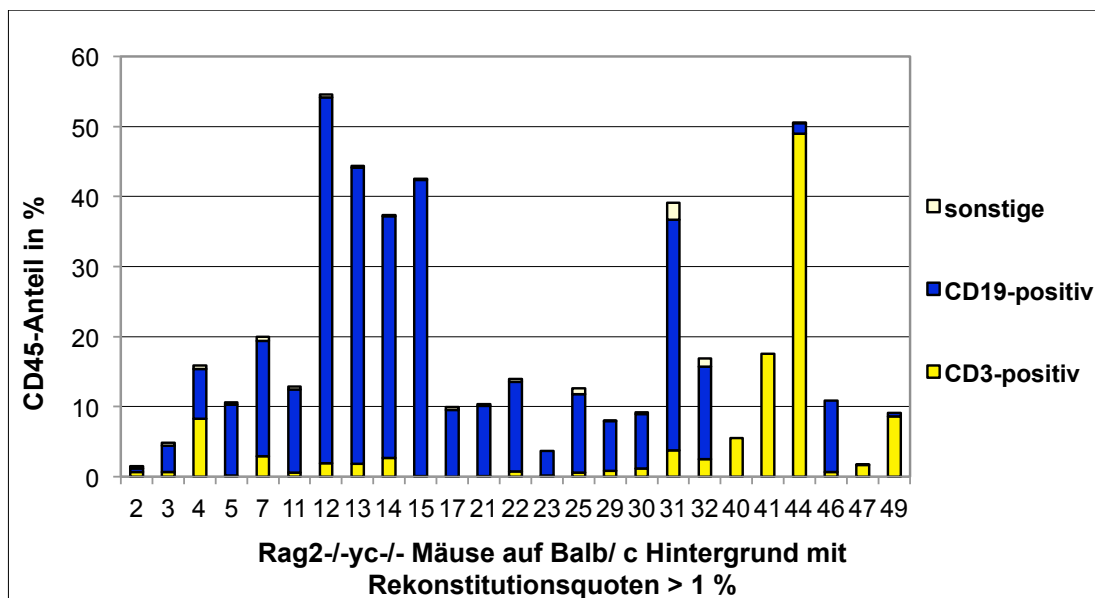


Abbildung 7: Rekonstitutionsquoten der rekonstituierten weißen Mäuse, die mehr als 1 % humaner Zellen im Leukozytengate aufweisen, farblich aufgeteilt in den gelben T-Zell- (CD3-positiv) und blauen B-Zell- (CD19-positiv) Anteil

Somit wird bei 17 von 25 Tieren (68 %) ein Mindestanteil von 10 % humanen Zellen erreicht. Der durchschnittliche Anteil beträgt 18,5 %. Die Verteilung der T- und B-Zellen fällt sehr unterschiedlich aus (vgl. auch Abb. 19). So variiert der Anteil an T-Zellen (CD3-positiv) zwischen 0,16 % und 100 % und der Anteil an B-Zellen (CD19-positiv) zwischen 0 % und 95 %. In der Mehrheit der Mäuse liegt jedoch ein größerer B-Zell-Anteil vor (als typisches Beispiel s. Abb.8). Als Trend lässt sich beobachten, dass der T-Zell-Anteil bei den Mäusen größer zu sein scheint, die relativ spät nach der Rekonstitution analysiert worden sind (vgl. wieder Abb. 19).

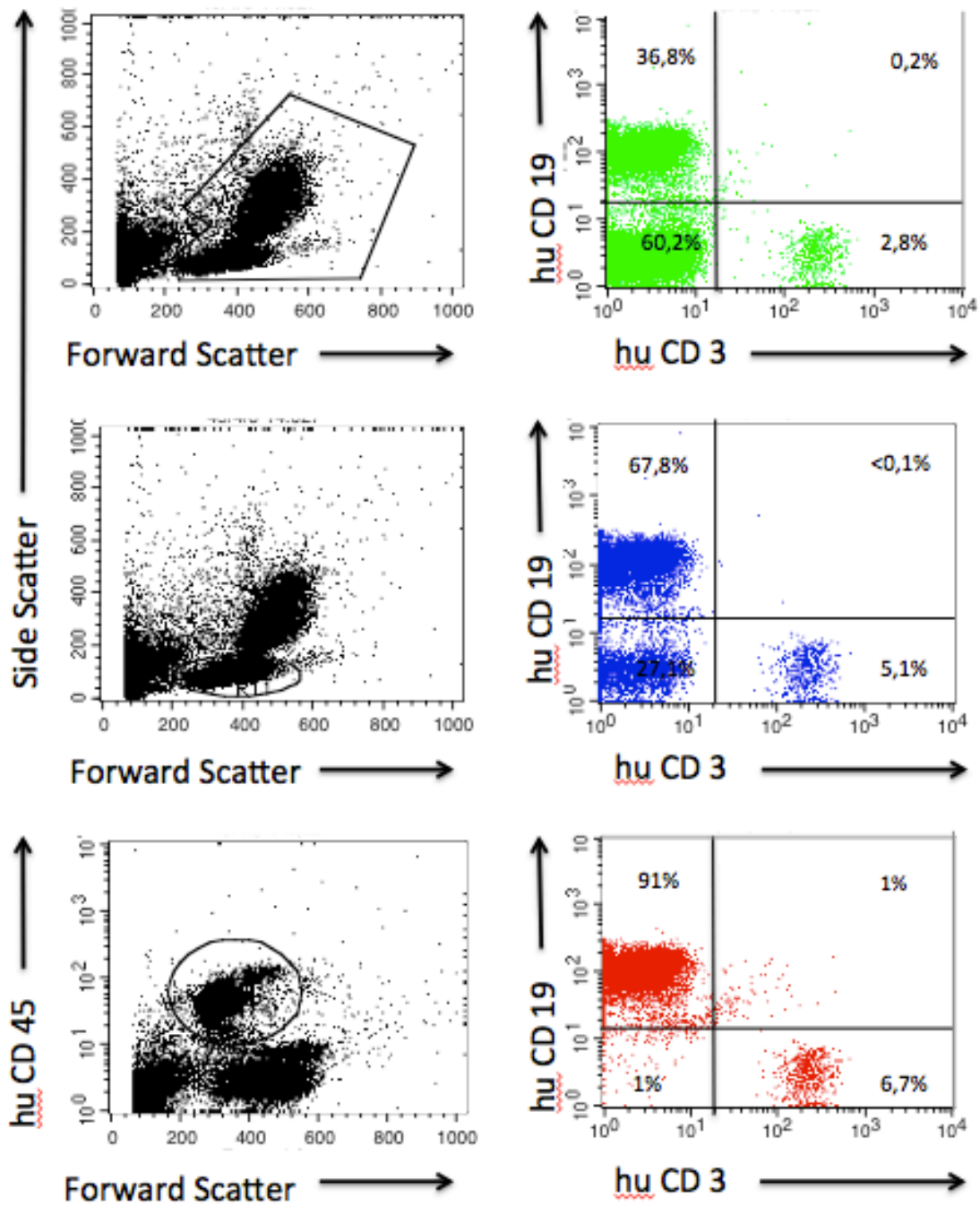


Abbildung 8: FACS-Analyse von peripherem Blut humanisierter Mäuse. Links oben: Leukozytengate, links Mitte: Gate der mononukleären Zellen, links unten: Gate der humanen Zellen; rechts: Verteilung von CD3 und CD19

M-Nr	Geschlecht	CD45*	CD3**	CD19**	Leukozytenzahl in 1000/ μ l	Lymphozyten Zahl in 1000/ μ l	Tumorzvolumen in mm ³
12	m	54,54	3,55	95,79	2,89	1,8	196,00
14	m	37,32	7,09	92,53	2,92	1,5	0,00
15	w	42,52	0,16	99,56	3,47	1,9	336,00
17	w	9,92	0,24	95,53	2,18	0,9	48,00
22	w	13,95	5,11	92,03	1,09	0,7	616,00
30	m	9,23	12,76	84,57	2,62	1,8	330,00
31	m	39,12	9,58	84,14	4,28	1,4	36,00
32	m	16,92	14,84	77,95	2,14	1	180,00
41	m	17,59	100	0	2,76	1,2	330,00
				Durchschnitt	2,71	1,36	
				Normbereich	2,5-15	0,5-3	

Abbildung 9: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen einzelner Mäuse zusammen mit den prozentualen Anteilen an CD45 (humane Zellen), CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen). In der hinteren Spalte übersichtshalber die bei diesen Tieren aufgetretenen Tumorzvolumina.

*in % vom Leukozytengate **in % der 45h+ Fraktion

Zur quantitativen Orientierung wurden bei einigen Mäusen aus Experiment II und III Blutbilder angefertigt (Abb. 9). Leider erlaubte die Blutmenge diese Untersuchung nicht bei allen Tieren. Es zeigte sich eine relativ konstante Leukozytenzahl im unteren Normbereich von ca. 1000-4000 Z/ μ l (Normbereich: 2500-15000 Z/ μ l). Die Lymphozytenzahl beträgt 700-1900 Z/ μ l (Normbereich: 500-3000 Z/ μ l).

3.1.2 Lymphatische Organe

Bereits makroskopisch war ein deutlicher Unterschied in der Größe der lymphatischen Organe erkennbar. Sowohl Milzen also auch Thymi der rekonstituierten Tiere waren deutlich größer als die entsprechenden Organe der nicht rekonstituierten Tiere (s. Abb 10-12).

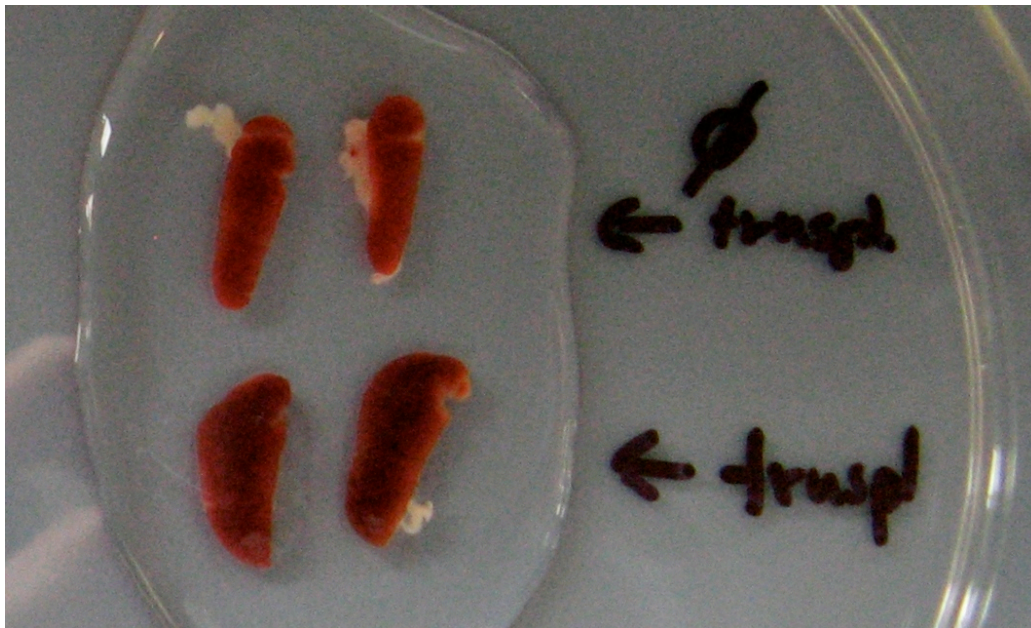


Abbildung 10: Im Bild oben Milzen nicht rekonstituierter, unten Milzen rekonstituierter Mäuse

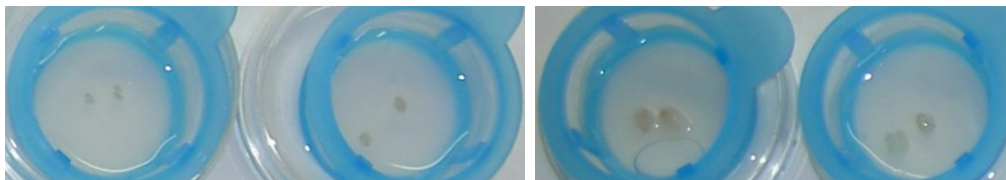


Abbildung 11: Im linken Bild 2 Thymi-Paare nicht rekonstituierter, im rechten Bild 2 Thymi-Paare rekonstituierter Mäuse

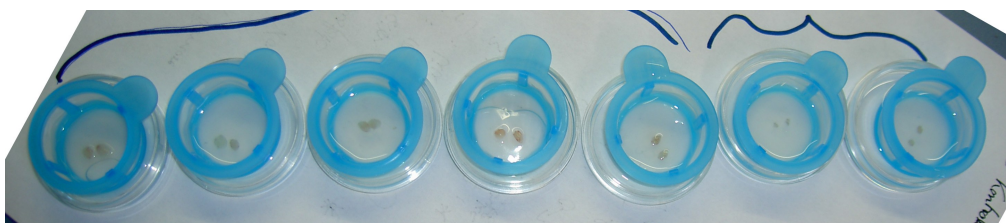


Abbildung 12: Im Bild links 5 Thymi-Paare rekonstituierter, rechts 2 Thymi-Paare nicht rekonstituierter Mäuse

Die FACS-Analyse des lysierten Thymusgewebes zeigte, dass die Thymi fast ausschließlich humane T-Zellen, also CD45+/ CD3+, enthalten (vgl. Abb. 13 links).

Der mediane prozentuale Anteil humaner Zellen (CD45-positiv) betrug bei den eingesetzten Mäusen in Experiment I noch 72 %, in Experiment II erreichte er dann bereits bei allen untersuchten Mäusen >95 % (in einer Maus wurde er nicht bestimmt). Zwischen 40 und 80 % der Zellen waren CD4/ CD8 doppelt positiv (vgl. Abb. 13 rechts). Das Verhältnis von CD4 zu CD8 betrug zwischen 2:1 und 1:2.

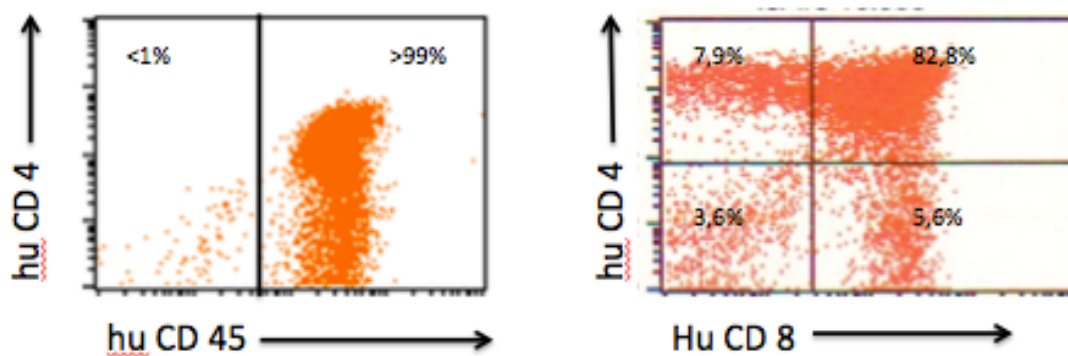


Abbildung 13: Thymuszellen einer rekonstituierten Maus in der FACS-Analyse. **Links:** Es finden sich fast ausschließlich humane Zellen. **Rechts:** Verteilung von CD4 und CD8. Ca. 80 % der Zellen sind doppelt positiv.

In den Milzen erreichte der mediane prozentuale Anteil humaner Zellen bei den Mäusen aus Experiment I 8 % und bei den Mäusen aus Experiment II 52 % (bei einer Maus wurde er nicht bestimmt). Ansonsten wiesen die Milzen in der FACS-Analyse, ähnlich wie das periphere Blut, zumeist eine deutlich in Richtung CD19⁺ verschobene Zell-Verteilung auf (vgl. Abb 14), allerdings kamen auch hier Ergebnisse vor, bei denen die CD3 positiven Zellen in der Mehrzahl waren. In Experiment III wurde an Thymi und Milzen keine Durchflusszytometrie durchgeführt.

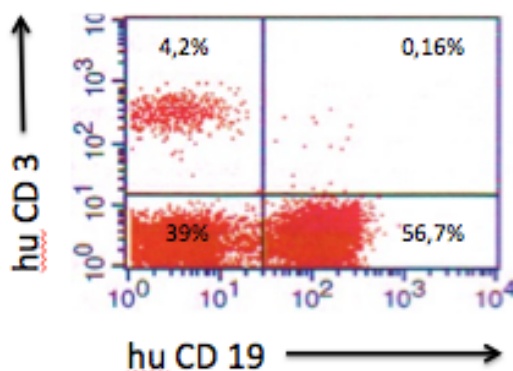


Abbildung 14: Verteilung von CD3 und CD19 in der Milz einer rekonstituierten Maus.

3.2 Tumorwachstum in gut rekonstituierten Mäusen geringer als in nicht rekonstituierten Mäusen

Insgesamt wurden drei Experimente durchgeführt, in denen das Wachstum von EFT-Zellen in rekonstituierten Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen mit Balb/ c Hintergrund mit dem Wachstum von EFT-Zellen in nicht rekonstituierten Kontrollgruppen der gleichen Mäuse verglichen wurde. Im ersten Experiment (Abb. 15) wurden je 5x10⁶ Tumorzellen in 5 rekonstituierte Mäuse sowie in 4 nicht rekonstituierte Kontrollmäuse injiziert. Der Median der Rekonstitutionsquoten betrug in der rekonstituierten Gruppe 12 %. Nach einer Wachstumsdauer von 16 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Tumorgrößen analysiert. Das mediane Tumolvolumen betrug 900 mm³ in der rekonstituierten und 1296 mm³ in der Kontrollgruppe, damit war es in der rekonstituierten Gruppe um 30,6 % niedriger. Dies entspricht einem nicht signifikanten Ergebnis im einseitigen Mann-Whitney-U-Test (p= 0,243).

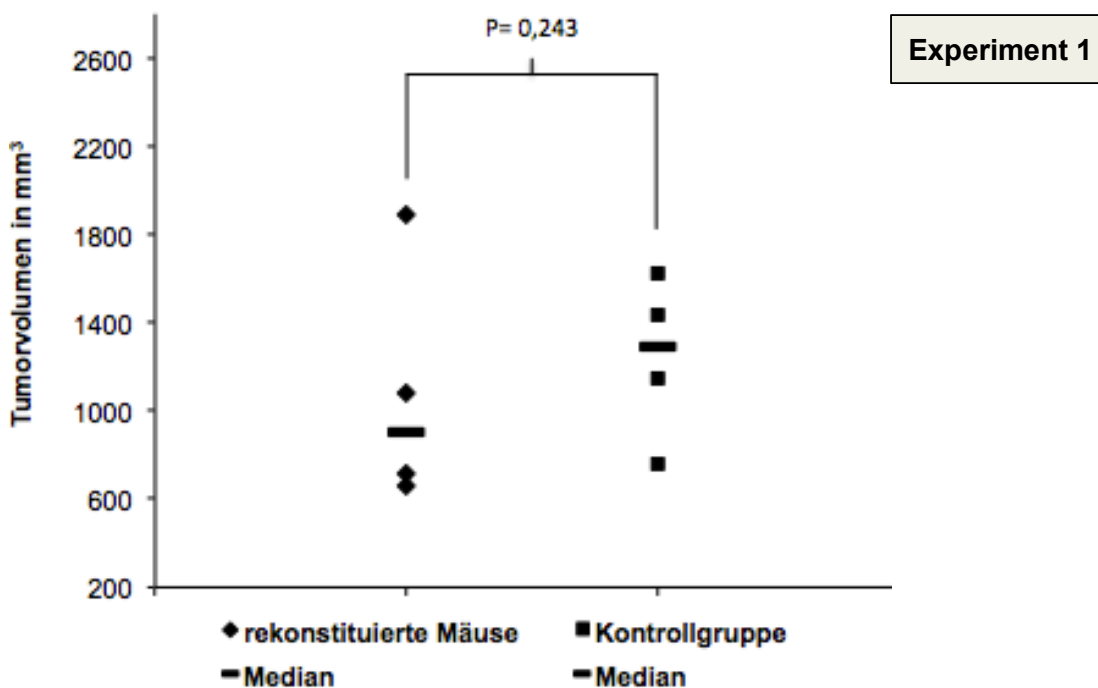


Abbildung 15: Tumorwachstum in rekonstituierten Mäusen, Experiment I. Links im Diagramm die Tumorumfänge (x-Achse) der rekonstituierten Mäuse (n= 4), rechts die der Kontrollmäuse (n= 4). Der Median der Rekonstitutionsquoten betrug 12 %. Pro Tier wurden 5x10⁶ Tumorzellen inguinal subcutan injiziert, nach 16 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Tumorgrößen ermittelt. Der Median des Tumorumfanges betrug 900 mm³ in der rekonstituierten und 1296 mm³ in der Kontrollgruppe, der Wachstumsunterschied zwischen den Gruppen ist im einseitigen Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant (p= 0,243).

Als eine mögliche Ursache für einen ausbleibenden signifikanten Wachstumsunterschied wurde eine primär zu hohe Tumorzellzahl in Betracht gezogen. Im zweiten Experiment (Abb. 16) wurde daher die Zahl der Tumorzellen auf 3×10^6 pro Tier reduziert. Es wurden 6 rekonstituierte Mäuse mit 5 Kontrollmäusen verglichen. Der Median der Rekonstitutionsquoten betrug 40 %. Die Mäuse wurden nach einer Wachstumsdauer von 20 Tagen geopfert. Der Median des Tumolvolumens betrug 146 mm^3 in der rekonstituierten und 405 mm^3 in der Kontrollgruppe, damit war er in der rekonstituierten Gruppe um 63,95 % niedriger. Dieses Ergebnis war im einseitigen Mann-Whitney-U-Test knapp signifikant mit $p = 0,041$.

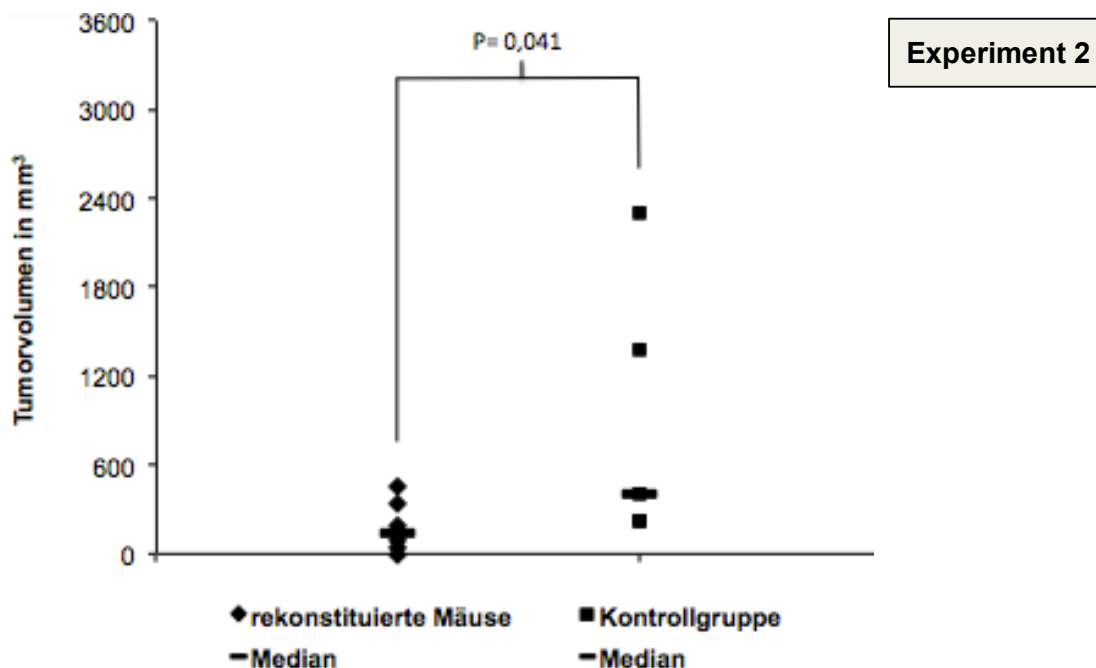


Abbildung 16: Tumorstadium in rekonstituierten Mäusen, Experiment II. Wiederum links im Diagramm die Tumorstadien (x-Achse) der rekonstituierten (n= 6), rechts die der Kontrollmäuse (n= 5). Der Median der Rekonstitutionsquoten betrug 40 %. Pro Tier wurden 3×10^6 Tumorzellen inguinal subcutan injiziert, nach 20 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Tumorstadien ermittelt. Die Mediane der Tumorstadien ergaben 146 mm^3 für die rekonstituierte und 405 mm^3 für die Kontrollgruppe, das Tumorstadium in der rekonstituierten Gruppe ist im einseitigen Mann-Whitney-U-Test mit $p = 0,041$ knapp signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

In Experiment II, in dem die eingesetzten Mäuse deutlich bessere Rekonstitutionsquoten aufwiesen als im ersten (Mediane 40 % vs. 12 %) und weniger Tumorzellen injiziert worden waren, ist also auch der Wachstumsunterschied zwischen rekonstituierten Mäusen und Kontrollgruppe weitaus deutlicher als im ersten Experiment. Das Ergebnis wird etwas eingeschränkt durch die hohe Varianz in der Kontrollgruppe, die durch die hohe Variabilität der Tumorumfänge zustande kam. Dennoch wird die Signifikanz knapp erreicht. Im zweiten Experiment gibt es sogar ein Tier, in dem gar kein Tumor gewachsen ist, das also scheinbar in der Lage war, die injizierten Tumorzellen komplett abzustößeln. Diese Maus hatte eine Rekonstitutionsquote von 37 %.

3.3 Tumorwachstum in rekonstituierten und immunisierten Mäusen hoch signifikant geringer als in nicht rekonstituierten Mäusen

Im letzten Experiment (Abb. 17) wurden 7 rekonstituierte Mäuse sowie 5 Kontrollmäuse eingesetzt. Der Median der Rekonstitutionsquoten betrug 14 %. Es wurde vermutet, dass eine eingeschränkte Antigenpräsentation im Mausmodell wesentlich für die insuffiziente Immunreaktion mitverantwortlich ist. Daher wurden 14 Tage vor der Tumorzellinjektion zusätzlich 2×10^6 reife dendritische Zellen injiziert. Die Tumorzellzahl betrug wiederum nur 3×10^6 pro Tier. Die Mäuse wurden nach einem Tumorwachstum von 12 Tagen geopfert. Der Median des Tumorumfanges betrug 330 mm^3 in der Gruppe der rekonstituierten Mäuse und 672 mm^3 in der Kontrollgruppe, damit war er in der rekonstituierten Gruppe um 50,9 % niedriger.

In Experiment III ergibt sich nach Durchführung des einseitigen Mann-Whitney-U-Tests ein hoch signifikanter Unterschied ($p = 0,003$) zwischen den Tumorumfängen der transplantierten, immunisierten Mäuse und den Tumorumfängen der nicht transplantierten, aber auch immunisierten Kontrollgruppe.

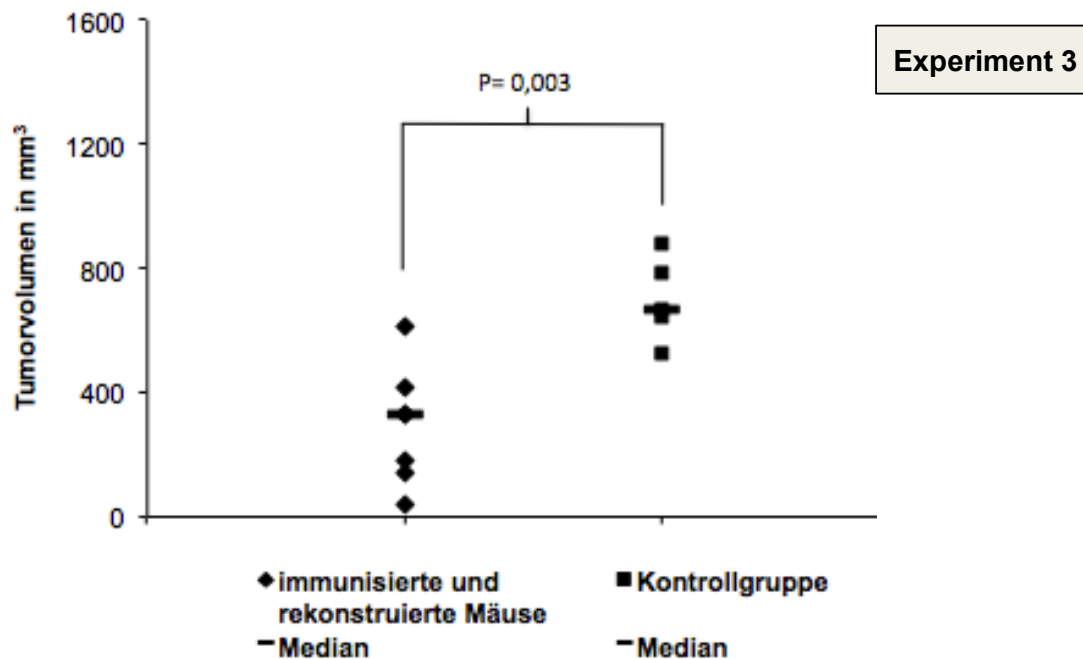


Abbildung 17: Tumorwachstum in rekonstituierten Mäusen, Experiment III. Wiederum links im Diagramm die Tumolvolumina (x-Achse) der rekonstituierten (n=7), rechts die der Kontrollmäuse (n=5). Der Median der Rekonstitutionsquoten betrug 14 %. Pro Tier wurden 3×10^6 Tumorzellen inguinal subcutan injiziert. Die Wachstumszeit der Tumorzellen betrug 12 Tage. Die Mediane der Tumolvolumina ergaben 330 mm^3 für die rekonstituierte und 672 mm^3 für die Kontrollgruppe, das Tumorwachstum in der rekonstituierten Gruppe ist im einseitigen Mann-Whitney-U-Test mit $p=0,003$ hoch signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

Abb. 18 zeigt das Tumorwachstum in allen rekonstituierten Mäusen, die in den Provokations-Experimenten verwendet wurden, gegenübergestellt ihrer Rekonstitutionsquote. Es wird deutlich, dass die Tumore umso kleiner waren, je besser das Immunsystem rekonstituiert war, mit einer Signifikanz von $p=0,0045$ im einseitigen Mann-Whitney-U-Test. Da die Tumormessung nicht zu einem normierten Zeitpunkt stattfand und auch unterschiedliche Tumorzellzahlen benutzt wurden, wurden die Tumolvolumina nach diesen Größen justiert, allerdings mit der Einschränkung, dass die Tumore möglicherweise im Laufe der Zeit keinen linearen Wachstumskurven folgen. Auch ist der Einfluss der Immunisierung der letzten 7 Mäuse nicht berücksichtigt, aber die meisten Mäuse mit Rekonstitutionsquote $>30\%$ wurden nicht immunisiert. Insgesamt ist das Diagramm über die Ergebnisse der

einzelnen Experimente hinaus ein Hinweis darauf, dass ein Zusammenhang zwischen Rekonstitutionsquoten und Tumorwachstum tatsächlich vorliegt.

Zusammenhang Rekonstitutionsquoten und Tumolvolumen

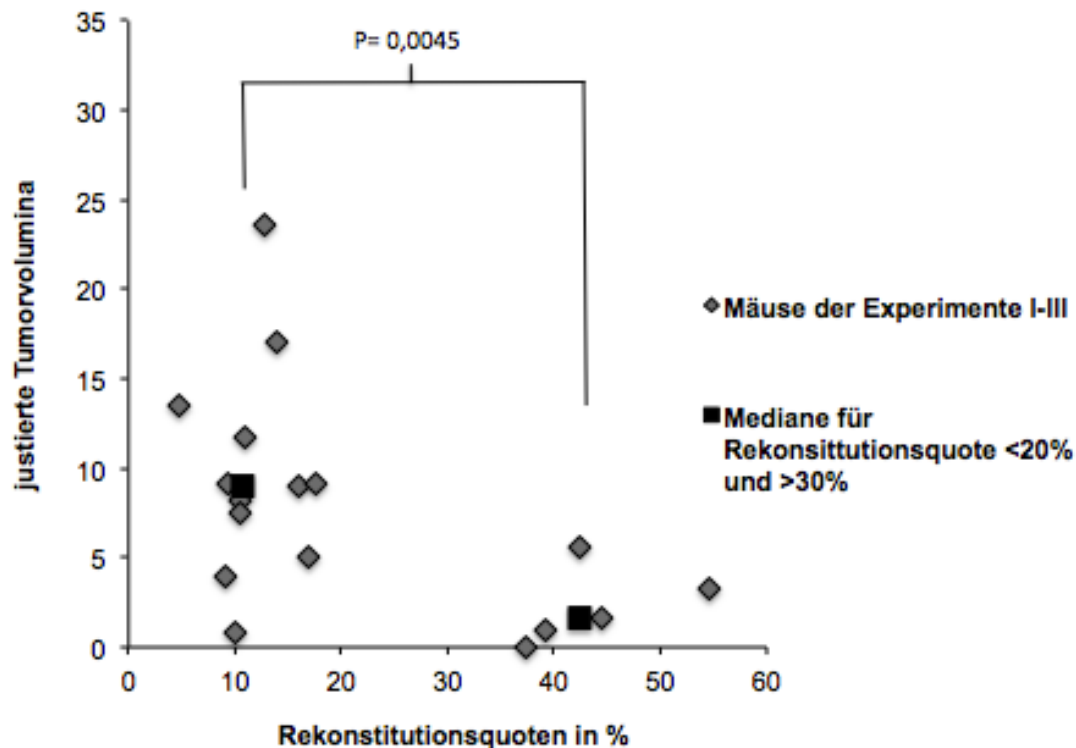


Abbildung 18: Tumorwachstum in Abhängigkeit von der Rekonstitutionsquote. Tumolvolumina in mm^3 geteilt durch Wachstumsdauer in Tagen und injizierte Tumorzellzahl/ 10^6 . Das Tumorwachstum ist bei einer Rekonstitutionsquote $>30\%$ geringer als bei einer Rekonstitutionsquote $<20\%$, mit einer Signifikanz von $p = 0,0045$ im einseitigen Mann-Whitney-U-Test.

3.4 Aktivierte T-Zellen nur spärlich nachweisbar

In den Experimenten I und II war in den Milzen auf die T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 und CD69 gefärbt worden. In einigen Tieren ließen sich diese Zelloberflächenmerkmale gar nicht nachweisen. Waren sie nachweisbar, so bewegten sie sich im Rahmen von $<1\%$ der Leukozyten, was jedoch bis zu 6% der T-Zellen ausmachte.

3.5 Übersichtstabelle über die Experimente I bis III

EXP 1	MNr	Ge- schlecht	Rekon- stitution	Blutanalyse	CD45*	CD3**	CD19**	DC-Injektion	Tumorinjektion	Euthanasie	Tumor- grösse in mm	Tumor- volumen in mm ³	Tumor- grösse Kontrollen	Tumor- volumen Kontrollen
	3	w	19.02.07	08.08.07	4,83	14,35	78,03		08.08.07, 5x10h6 A673	24.08.07	18x15x4	1080,00	16x9x8	1152
	4	w	19.02.07	08.08.07	15,9	52,02	44,59		08.08.07, 5x10h6 A673	24.08.07	16x9x5	720,00	15x12x8	1440
	5	w	10.04.07	08.08.07	10,58	1,86	95,34		08.08.07, 5x10h6 A673	24.08.07	11x10x6	660,00	18x15x6	1620
	11	m	10.04.07	08.08.07	12,85	4,88	92,35		08.08.07, 5x10h6 A673	24.08.07	18x15x7	1890,00	12x9x7	756
				Mittelwert	11,04				p=0,243		Median	1087,50		1242
				Median	11,72						Median	900,00		1296
				Alter in Monaten	5,5 und 4				Alter 5,5 und 4, Monate	16Tage nach Tumorinjekt.	Standard- abweichung	490,38		326,49
EXP 2														
	12	m	30.05.07	08.08.07	54,54	3,55	95,79		07.09.07, 3x10h6 A673	27.09.07	7x7x4	196,00	15x17x9	2295
	13	m	30.05.07	08.08.07	44,41	4,23	95,2		07.09.07, 3x10h6 A673	27.09.07	4x4x6	96,00	11x14x9	1386
	14	m	30.05.07	08.08.07	37,32	7,09	92,53		07.09.07, 3x10h6 A673	27.09.07	0x0x0	0,00	9x9x5	405
	15	w	30.05.07	08.08.07	42,52	0,16	99,56		07.09.07, 3x10h6 A673	27.09.07	6x7x8	336,00	9x6x4	216
	17	w	06.06.07	04.08.07	9,92	0,24	95,53		07.09.07, 3x10h6 A673	27.09.07	4x6x2	48,00	7x8x4	224
	21	w	06.06.07	04.08.07	10,38	0,44	97,12		07.09.07, 3x10h6 A673	27.09.07	9x10x5	450,00		
				Mittelwert	33,18				p=0,041		Mittelwert	187,67		905,2
				Median	39,92						Median	146,00		405
				Alter in Monaten	2,5 und 2				Alter 3,25 und 3 Monate	20Tage nach Tumorinjekt.	Standard- abweichung	160,22		818,77
EXP 3														
	22	w	05.07.07	29.09.07	13,95	5,11	92,03	25.04.08, 2x10h6 DCs	09.05.08, 3x10h6 A673	21.05.07	11x8x7	616,00	14x9x7	882
	30	m	05.07.07	29.09.07	9,23	12,76	84,57	25.04.08, 2x10h6 DCs	09.05.08, 3x10h6 A673	21.05.07	11x8x5	330,00	11,5x8x7	644
	31	m	05.07.07	29.09.07	39,12	9,58	84,14	25.04.08, 2x10h6 DCs	09.05.08, 3x10h6 A674	21.05.07	6x3x2	36,00	11x8x6	528
	32	m	05.07.07	29.09.07	16,92	14,84	77,95	25.04.08, 2x10h6 DCs	09.05.08, 3x10h6 A675	21.05.07	9x5x4	180,00	14x8x7	784
	41	m	04.09.07	08.04.08	17,59	1,00		0 25.04.08, 2x10h6 DCs	09.05.08, 3x10h6 A673	21.05.07	11x6x5	330,00	12x8x7	672
	46	w	04.09.07	08.04.08	10,83	6,54	93,46	25.04.08, 2x10h6 DCs	09.05.08, 3x10h6 A673	21.05.07	12x7x5	420,00		
	49	m	04.09.07	08.04.08	9,07	94,99	5,1	25.04.08, 2x10h6 DCs	09.05.08, 3x10h6 A676	21.05.07	7x4x5	140,00		
				Mittelwert	16,67				p=0,003		Mittelwert	293,14		702
				Median	13,95						Median	330,00		672
				Alter in Monaten	2,5 und 7				Alter 10 und 8 Monate	12Tage nach Tumorinjekt.	Standard- abweichung	179,45		121,38

Abbildung 19: Übersichtstabelle über die Experimente I bis III mit Datumsangaben, Rekonstitutionsergebnissen der einzelnen Mäuse für CD45, CD3 und CD19 sowie Tumorgößen von rekonstituierten Tieren und Kontrollgruppen.

**in % vom Leukozytengate

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ist es gelungen, ein Modell humanisierter Mäuse nach dem Vorbild von Traggiai *et al.* (103) in unserem Labor zu etablieren. Rekonstitutionsquoten von >10 % humaner Zellen im peripheren Blut wurden regelmäßig erreicht, im Idealfall sogar Quoten von >50 %. Lymphoide Organe werden ausgebildet.

Wie sich im Vergleich zu den Ergebnissen von Traggiai *et al.* zeigt, besteht jedoch noch Entwicklungspotential zu höheren Rekonstitutionsquoten und zur Ausbildung von mesenterialen Lymphknoten.

Des Weiteren konnte durch einen signifikanten Unterschied des Tumorwachstums zwischen rekonstituierten Mäusen und Kontrollgruppe in Experiment II und einem hoch signifikanten Unterschied in Experiment III erstmalig gezeigt werden, dass das nach diesem Modell in Mäusen rekonstituierte humane Immunsystem – obwohl noch relativ schwach – bereits in der Lage ist, zumindest in eingeschränktem Umfang auf Ewing-Tumorzellen zu reagieren.

Jedoch wird das Tumorwachstum nicht gänzlich verhindert und letztendlich ist nicht klar, durch welche Art von Immunantwort die Verlangsamung des Wachstums erreicht wird. Die Durchflusszytometrie in den Milzen der geopferten Mäuse in Experiment I und II zeigte nur minimale Populationen aktivierter T-Zellen (CD25+/ CD69+). Dies wirft die Frage auf, ob es sich tatsächlich um eine Immunantwort durch T-Zellen handelt.

Dass der Unterschied im Tumorwachstum an Ausmaß und Signifikanz deutlich zunimmt, wenn zusätzlich eine Immunisierung mit DCs erfolgte, spricht dennoch für eine von Antigenpräsentation abhängige Reaktion und damit für eine T-Zellantwort. Auch wurde zwar der Anteil humaner NK-Zellen in diesen Mäusen nicht bestimmt, aber von anderen Gruppen wissen wir, dass die Entwicklung von NK-Zellen in den Mausmodellen eingeschränkt ist (93, 108) und ihre Zahl daher noch geringer als die der T-Zellen. Dies macht eine unspezifische Immunantwort zusätzlich unwahrscheinlich.

Somit ist anzunehmen, dass es sich um einen T-Zell-Effekt handelt, die Zahl der aktivierten T-Zellen jedoch unzureichend war, um das Tumorwachstum gänzlich zu verhindern. T-Zellen könnten z.B. zunächst die injizierten, suspendierten Tumorzellen verringert haben, ohne in der Lage zu sein, den dennoch anwachsenden soliden Tumor

zu invadieren. In der FACS-Suche betragen die aktivierten T-Zellen (CD25+ / CD69+), wenn sie nachgewiesen werden konnten, zwar nur ca. 0,25 % - 3 % der humanen Leukozyten (Daten nicht dargestellt). Dennoch macht dies bis zu 6 % der T-Zellen aus, deren Zahl selbst ja oft recht gering ist. Um einen tumorspezifischen, aktivierten T-Zellklon aus dem Blut der Mäuse identifizieren zu können und die Tumore im Idealfall ganz zu eliminieren, müsste also die Immunantwort deutlich verstärkt werden.

Hierfür sind im Wesentlichen zwei Ansätze denkbar: Einerseits ist eine Verbesserung des Transplantationsmodells nötig, um das transplantierte Immunsystem sowohl quantitativ als auch qualitativ weiter an die Situation eines natürlichen humanen Immunsystems anzunähern (vgl. hierzu auch Reviews von 2009 (109), 2011 (110) und 2013 (111)) Andererseits ist zu vermuten, dass zusätzliche Maßnahmen ergriffen werden müssen, um Toleranz- und Tumor-*escape*-Mechanismen zu überwinden.

Im Folgenden werden zunächst das Transplantationsmodell und im Anschluss die immunologische Situation beim EFT diskutiert.

4.1 Diskussion des Mausmodells

4.1.1 Diskussion der Etablierung des Modells

Wie bereits ausgeführt orientiert sich das in unserem Labor etablierte Mausmodell an der Publikation von Traggiai *et al.* aus dem Jahr 2004 (103). In diesem Modell werden CD34-positive, aus Nabelschnurblut selektierte Stammzellen innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt intrahepatisch (i.h.) in subletal bestrahlte Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse-Jungtiere mit Balb/ c Hintergrund injiziert.

4.1.1.1 Zeitpunkt der Transplantation

Ein wesentlicher Punkt des Modells nach Traggiai *et al.* ist die Injektion in neugeborene Mäuse. Bisher war die Injektion meist im Alter von mehreren Wochen erfolgt (93), was unter anderem die Ursache für eine fehlende Ausbildung einer eigenen Thymopoese sein könnte (112). Die Empfänglichkeit für die Rekonstitution nimmt v.a. in den ersten Lebensstagen dramatisch ab. 1 Tag alte Tiere erreichten in einem Experiment mit intraperitonealer Injektion 8 Wochen nach Rekonstitution 80 % humane Zellen im

peripheren Blut, 1 Woche alte Tiere nur ca. 30 % und 2 Wochen alte Mäuse unter 10 % (104).

Hierfür gibt es mehrere Erklärungen. Erstens nimmt die Größe des Thymus mit dem Alter ab, ein Prozess, von dem vermutet wird, dass er in $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mäusen noch beschleunigt ist. Dies bedeutet, dass der Thymus mit zunehmendem Alter für die Entwicklung humaner T-Zellen nicht mehr ausreichend zur Verfügung steht (93). Des Weiteren ist insbesondere bei der intrahepatischen Injektion zu berücksichtigen, dass nur die fetale Leber für die Hämatopoese zuständig ist und somit der Injektionszeitpunkt so kurz wie möglich postpartal liegen sollte, bevor die Hämatopoese ins Knochenmark verlagert wird (s. Abb. 20).

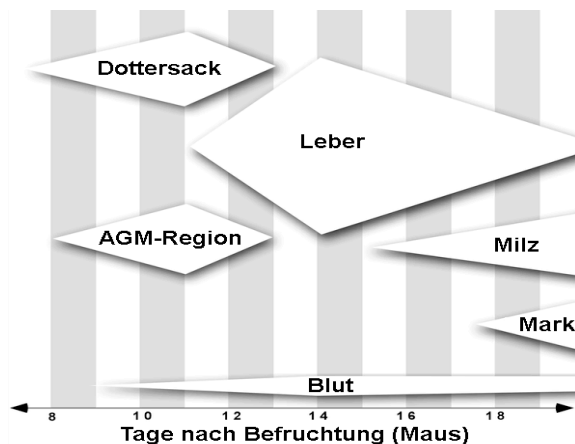


Abbildung 20:

Orte der fetalen Hämatopoese bei Mäusen während der Trächtigkeit. Geburt ca. an Tag 20.

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/H%C3%A4matopoese>, entnommen am 07.01.2012

Auch wird ein Zusammenhang zur Unreife der restlichen phagozytierenden Immunzellen (Makrophagen und Neutrophile) in Neugeborenen vermutet, die damit weniger limitierend auf die Transplantation wirken als in älteren Tieren (93), sowie zu der Tatsache, dass in diesem Alter von Natur aus eine Expansion des hämato-lymphoiden Systems stattfindet (108). Das Bestrahlen der Mäuse und Injizieren der Tumorzellen innerhalb der ersten 24 Stunden bereitete uns zunächst logistische Schwierigkeiten, später konnte diese Grenze jedoch dank einer flexibel zugänglichen Caesiumquelle eingehalten werden.

4.1.1.2 Bestrahlung

Durch die subletale Bestrahlung der Mäuse vor Transplantation werden die in Zellteilung befindlichen hämatopoetischen Zellen der Mäuse weitgehend zerstört. Die daraufhin transplantierten, humanen Zellen besitzen jedoch unverändert ihren in Teilung

befindlichen Anteil, so dass sie sich rascher vermehren und die verbleibenden murinen Zellen verdrängen können. Dieser Prozess wird oft mit Nischenbildung beschrieben. Die Effizienz der Transplantation wird dadurch deutlich erhöht. Gimeno *et al.* berichten, dass unbestrahlte Mäuse keine Transplantation zuließen (104), zwischenzeitlich beschriebene Alternativen haben bisher keine Überlegenheit gezeigt (111).

4.1.1.3 Injektionsort

In Bezug auf den Injektionsort gibt es unterschiedliche Ansätze. Bei den ersten Anfängen der humanisierten Mausmodelle wurden die Zellen unter die Nierenkapsel transplantiert, später waren intravenöse und intraperitoneale Injektion die gängigen Zugangswege (113). In der Überlegung, dass die Leber im fetalen Organismus das wichtigste hämatopoetische Organ ist (vgl. Abb. 20), wurde von Traggiai *et al.*, die intrahepatische Injektion zur Transplantation gewählt. Dies ist praktikabel und zeigt eine hervorragende Effizienz. Zudem sind die Transplantationsergebnisse zuverlässiger, wenn auch insgesamt nicht besser als beim peritonealen Zugang (93, 108).

4.1.1.4 Stammzellquelle

Als Stammzellquelle wurden bei uns zunächst – abweichend vom Traggiai-Modell – seit Langem eingefrorene Knochenmarkszellen verwendet. Hiermit konnte keine Rekonstitution erreicht werden. Dies liegt vermutlich hauptsächlich am zu diesem Zeitpunkt noch verwendeten Mausstamm (s.u.), jedoch ist auch eine Rolle der verwendeten Stammzellen anzunehmen.

Die Spenderzellen müssen unreif genug sein, um die Potenz zu besitzen, alle hämatopoetischen Zelllinien hervorzubringen. Dies sind im Wesentlichen die hämatopoetischen Stammzellen, die durch CD34-Positivität gekennzeichnet sind. Es ist jedoch beschrieben, dass zu einer langfristigen und nachhaltigen Rekonstitution nur die CD34+ / CD38- Zellen, nicht aber CD34+ / CD38+ Zellen in der Lage sind (114). Diese Fraktion macht ca. 2,5 % (115) der mononukleären Zellen der fetalen Leber, die jedoch als Quelle nicht verfügbar ist, und nur 0,05 % der mononukleären Zellen des Knochenmarks oder Nabelschnurblutes (116) aus. Im peripheren Blut Erwachsener findet man sie kaum. Interessanterweise ist also diese Fraktion in Nabelschnurblut und Knochenmark in etwa gleich groß, obwohl der Anteil der CD34+ Zellen im Knochenmark

höher ist als im Nabelschnurblut (116, 117). Nabelschnurstammzellen haben zudem gegenüber Knochenmarkstammzellen ein siebenfach stärkeres rekolonisierendes Potential und proliferieren schneller auf Zytokinstimulation (116, 118). So ist bei Verwendung von Nabelschnurstammzellen mit einer höheren und nachhaltigeren Rekonstitution zu rechnen (119).

Wichtig unter dem Aspekt, dass autologe Konstellationen für bestimmte Fragestellungen notwendig sein können (vgl. Kap. 4.3), ist jedoch, dass auch mit den Stammzellen Erwachsener erfolgreiche Transplantationen möglich sind (111).

Die in unserem Fall verwendeten Knochenmarkszellen stammten zusätzlich zum Teil aus dem Jahr 1998 und zeigten beim Auftauen einen hohen Anteil toter Zellen. Es ist denkbar, dass durch diese lange Aufbewahrungszeit die Qualität der Zellen gelitten hat. Bei ausbleibendem Rekonstitutionserfolg wechselten wir somit auf Nabelschnurblut als Stammzellquelle wie von Traggiai und Kollegen beschrieben. Aber auch dies führte erst zum Erfolg, als auch der verwendete Mausstamm (s.u.) gewechselt wurde.

4.1.1.5 Mausstamm und Mutation

Traggiai und Kollegen verwendeten für ihr Modell $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mäuse auf Balb/ c Hintergrund und nutzten damit die $\gamma c^{-/-}$ Mutation, mit der in den Jahren zuvor ein Durchbruch erreicht worden war. Dies ist eine Mutation, die die gemeinsame γ -Kette der Interleukinrezeptoren betrifft und daher zahlreiche interleukinabhängige Signalwege unterbricht. Seit der Einführung der $\gamma c^{-/-}$ bzw. $Il2rg^{-/-}$ Mutation (120) und seiner Kombination mit der $Rag2^{-/-}$ Mutation (101, 121) oder der $scid$ -Mutation (122, 123), die beide die Ausbildung von B- und T-Zellen verhindern, können sowohl Elemente des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems weiter eingeschränkt und unter anderem die NK-Zell-Entwicklung und ein Auftreten von funktionellen Lymphozyten im Alter, wie es bei vorher genutzten Modellen bekannt war, vollständig verhindert werden.

Aufgrund von besserer Verfügbarkeit wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Versuch unternommen, das Modell von Traggiai et al. auf $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund zu übertragen. Es ist zwar schon relativ früh in der Entwicklungsgeschichte humanisierter Mausmodelle klar geworden, dass der genetische Hintergrund des Mausstamms, der mit einer Mutation ausgestattet wird, eine große Rolle für die Effektivität der Transplantation spielt. So gelang die erste Verbesserung der

Transplantationsergebnisse durch die Übertragung der scid-Mutation, mit der das erste humanisierte Mausmodell etabliert wurde (95), auf den NOD-Stamm (99, 100). Ursache hierfür sind nur teilweise bekannte Polymorphismen, die durch die Beeinflussung der Stärke des angeborenen Immunsystems zu einer verbesserten Transplantationsakzeptanz führen (93, 110); z.B. zeigen NOD-Mäuse schwächere Makrophagen- und NK-Zell-Aktivität (124), wohingegen in C57BL/ 6 Tieren das Komplementsystem und die NK-Zell-Funktion stark sind (125). Angesichts der weiteren Schwächung des angeborenen Immunsystems und der Unterdrückung der NK-Zell-Entwicklung in Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen erschien es jedoch den Versuch wert, den effizienten Ansatz der intrahepatischen Injektion in neugeborene Tiere auch bei Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen mit C57BL/ 6 Hintergrund zu erproben. Legrand *et al.* (93) berichteten allerdings bereits zur gleichen Zeit, dass im Erwachsenenalter bei diesem Stamm nur eine sehr dürftige Rekonstitution von <1 % humaner Zellen erzielt werden konnte, während bei jeweils erwachsenen NOD/ scid-Mäusen oder Mäusen mit Rag2^{-/-}γc^{-/-} -Mutation auf BALB/ c Hintergrund ein Niveau von ca. 20 % erreicht wird. 28 erfolglos rekonstituierte Mäuse bestätigten schließlich, dass auch mit der Transplantation im Neugeborenenalter dieser Mausstamm nicht für die Rekonstitution geeignet ist. Dies steht in Übereinstimmung mit mündlich ausgetauschten Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen und den Resümees in mehreren Reviews in denen festgestellt wird, dass bei C57BL/ 6 mit Rag2^{-/-}γc^{-/-} -Mutation keine Berichte von erfolgreichen Transplantationen vorliegen (108, 110, 113), Dementsprechend stellte sich in unserer Arbeitsgruppe beim Wechsel auf BALB/ c-Mäuse mit Rag2^{-/-}γc^{-/-} -Mutation auch ein prompter Erfolg ein.

BALB/ c Rag2^{-/-}γc^{-/-} und NOD/ scid γc^{-/-} Mäuse haben sich bisher als Empfängerstämme durchgesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass der NOD-Hintergrund im Vergleich zu BALB/ c noch günstigere Transplantationsbedingungen insbesondere für T-Zellen bietet (126). Verantwortlich hierfür ist wohl v.a. eine niedrigere Makrophagenaktivität durch Polymorphismen des murinen SIRPA-Gens. Durch die Expression des humanen SIRPA-Gens in BALB/ c Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen konnte dieser Nachteil ausgeglichen werden (127). Eine wichtige Einschränkung des NOD/ scid-Stammes, nämlich die Verkürzung der Lebenszeit durch die Entwicklung von Lymphomen, tritt bei der Kombination mit dem γc^{-/-}

knock out nicht mehr auf (128), aber BALB/ c Mäuse bieten Vorteile bei der genetischen Manipulation von embryonalen Stammzellen (127).

4.1.1.6 Evaluation der Ergebnisse

Unter Berücksichtigung oben genannter Aspekte erreichten die humanen Zellen bei 68 % aller Tiere einen Mindestanteil von 10 % der Leukozyten im peripheren Blut (= Rekonstitutionsquote). Das beste Ergebnis waren 55 %, durchschnittlich betrug der Anteil 18,5 %. Der Anteil in Milzen und Thymi wurde nur in Experiment I und II bestimmt. In Experiment I betrug der mediane Anteil bei den Milzen 8 %, in den wesentlich besser rekonstituierten Mäusen aus Experiment II bereits 52 %. In den Thymi fanden sich bei Experiment I im Median 72 % und in Experiment II jeweils >95 % humane Zellen. Dies war zu erwarten, da der Thymus, das primäre lymphoide Organ der Thymopoese, überwiegend aus T-Zellen besteht, die in BALB/ c Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen ja nicht gebildet werden.

Legrand *et al.* berichten, dass mit dem Modell nach Traggiai *et al.* die humanen Zellen bei 80 % aller Tiere einen Mindestanteil von 10 % im peripheren Blut erreichen und der durchschnittliche Anteil über 60 % beträgt. Des Weiteren werden die Anteile humaner Zellen mit >95 % im Thymus, >60 % in der Leber und >50 % in Milz und Knochenmark angegeben (93).

Somit wird diese sehr hoch gesetzte Messlatte in der vorliegenden Arbeit noch nicht ganz erreicht. Nach sorgfältigem Überprüfen aller methodischen Schritte und Abgleich mit dem ausführlichen von Traggiai *et al.* zur Verfügung gestellten Material ist jedoch von einem systematischen Fehler der Methodik nicht mehr auszugehen. Vielmehr ist anzunehmen, dass die handwerkliche Routine im Handling der Stammzellen sowie in der Technik der intrahepatischen Injektion eine entscheidende Rolle spielt. Hierzu passt, dass Rekonstitutionsquoten innerhalb eines Wurfs, dessen Mäuse alle mit derselben Stammzellprobe sowie von derselben Person rekonstituiert wurden, sich meist ähneln. Es kann eine deutliche Lernkurve zwischen den verschiedenen Würfen beobachtet werden. So erreicht der erste Wurf nur eine mediane Rekonstitutionsquote von 3,15 %, während einer der späteren Würfe, der unter optimalen Bedingungen und nach Ausräumung der logistischen Schwierigkeiten bzgl. der Bestrahlung rekonstituiert wurde, eine mediane Rekonstitutionsquote von 43,5 % zeigt.

Möglicherweise hätte das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Blutanalyse und Tumorinjektion stärker berücksichtigt werden sollen. In der Arbeit von Traggiai *et al.* werden die Zellverhältnisse in Tieren im Alter von 1 bis 6 Monaten dargestellt ((103) Fig 1). Ab dem 3. Monat konnten in allen Mäusen T-Zellen nachgewiesen werden, ab dem 4. Monat stieg der T-Zell-Anteil nochmals an und blieb bis ungefähr zum 6. Monat stabil, außerdem nahm die Zahl der reifen Thymozyten bei älteren Mäusen zu. Mäuse, die älter als 6 Monate waren, wurden nicht untersucht. Auch in dieser Arbeit und bei der weiteren Anwendung des Modells in unserer Arbeitsgruppe ergaben wiederholte Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Rekonstitutionsquoten (Günther Richter, persönliche Mitteilung). In den hier gezeigten Experimenten wurden die Blutanalysen im Alter von 2-7 Monaten und die Tumorinjektionen im Alter von 3-10 Monaten durchgeführt, das Alter hat also eine große Bandbreite. Es könnte sein, dass sehr junge oder sehr alte Tiere zum Zeitpunkt der Tumorinjektion noch nicht oder nicht mehr über ihr volles Potential verfügen.

Insgesamt ist zu erwarten, dass mit zunehmender Routine auch in unserer Arbeitsgruppe Rekonstitutionsquoten von durchschnittlich >50 % erreicht werden. Von Traggiai *et al.* wissen wir, dass in diesem Modell alle größeren Zelllinien des hämatopoetischen Systems beobachtet werden können, inklusive NK-Zellen, konventionellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen und Monozyten. Aus den Mäusen gewonnene T-Zellen konnten ihre Funktionalität unter Beweis stellen und die Anreicherung von IgM und IgG im Serum demonstriert eine vollständige B-Zell-Reifung. Die Zellen werden in der Maus *de novo* gebildet, so dass ihre Zahl über mehrere Monate stabil bleibt. Sekundäre lymphoide Organe werden besiedelt und die Ausbildung von Keimzentren findet statt (93, 103).

4.1.2 Diskussion der Limitationen und Verbesserungsmöglichkeiten des Mausmodells

Abgesehen von den Schwierigkeiten der technischen Umsetzung weist auch das Modell an sich Defizite auf, die die Funktionsfähigkeit des Immunsystems in den Mäusen einschränken.

Ein Problem findet sich wahrscheinlich bei der Antigenpräsentation (93). Die schwache Ausprägung bzw. das Fehlen einer T-Zell-Reaktion sowohl gegen BALB/ κ als auch

gegen autologe humane dendritische Zellen in *mixed leucocyte settings* spricht für eine funktionierende negative Selektion sowohl auf die humanen als auch auf die murinen Antigene (93, 103). Die positive Selektion der T-Zellen kann theoretisch sowohl durch murine Stromazellen im Thymus als auch durch dem KM entstammende humane Zellen stattfinden (129). Es wäre jedoch zu erwarten, dass durch eine Überzahl der murinen Stromazellen beim Prozess der positiven Selektion viele der selektierten T-Zellen nur murine MHCs erkennen können. Diese auf Maus-MHC selektierten humanen T-Zellen könnten folglich keine Antigene erkennen, die ihnen in der Peripherie durch humanes HLA exprimierende APCs präsentiert werden. Zwar konnten Traggiai *et al.* eine T-Zell-Reaktion auf EBV-Antigene im Kontext mit humanen MHC-Molekülen nachweisen. Diese ist jedoch schwach und es ist damit zu rechnen, dass die Zahl in Frage kommender T-Zellen vermindert ist.

Ein Ansatz, die T-Zell-Selektion zu optimieren, ist der Transfer von HLA Klasse I und II Genen in die DNA der Empfängermause, so dass die zentrale Selektion auf humanes MHC gewährleistet ist. Da das Überleben der humanen T-Zellen in der Peripherie sowohl von Zytokinen als auch von der Interaktion mit humanem MHC abhängig ist, wird auch gehofft, dass dies die Lebenszeit der T-Zellen, die bisher in den Chimären verkürzt ist, verbessert (93, 108). Einige Gruppen haben mit dieser Strategie bereits erste positive Effekte verzeichnen können (Review s. (111)), und es besteht weiteres Entwicklungspotential.

Die Verbesserung unserer Ergebnisse durch die zusätzliche Transplantation von DCs weist zudem darauf hin, dass die Entwicklung und Funktionalität von DCs als wichtigste APCs unzureichend ist. Grundsätzlich konnte die Entwicklung von funktionellen DCs in dem verwendeten Mausmodell nachgewiesen werden, und auch eine gewisse Interaktion der Zellen über die Speziesgrenze hinweg (103). Allerdings zeigten sich in Lymphknoten und Thymus nur niedrige DC-Zahlen und ihre Reifung wurde nur *ex vivo* nachgewiesen. Es ist also möglich, dass nicht kreuzreaktive Zytokine im Migrations- und Reifungsprozess *in vivo* fehlen (s.u.). Verbesserung verspricht man sich neben der Zytokinsubstitution von der genetischen Ablation muriner DCs, um mehr Nischen für humane DC-Entwicklung zu schaffen und um eine vermutlich ineffektive und evtl. auch

kontraproduktive konkurrierende Antigenpräsentation durch murine DCs auszuschalten (111). Zusätzlich könnte jedoch auch völlig unabhängig vom Mausmodell eine Umprogrammierung der Funktionalität von DCs im Tumorumfeld bestehen, die vermutlich einen wichtigen Toleranzmechanismus in der Tumorantwort darstellt (67, 68, 72).

Eine weitere Hürde in der Antigenpräsentation ist die in $\gamma c^{-/-}$ Mäusen in der Regel ausbleibende Entwicklung von peripheren LKs (93, 110, 130), in denen normalerweise die Interaktion zwischen T-Zellen und ausgereiften DCs stattfindet. Der *knock-out* von γc führt zur Unterbrechung eines interleukinabhängigen Signalweges, der für die Induktion von lymphatischem Gewebe notwendig ist (131). So können nur mesenteriale LKs regelmäßig in HIS (Balb/c $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$) Mäusen gefunden werden (103), in der hier beschriebenen Arbeit mit noch relativ niedrigem Rekonstitutionserfolg wurden gar keine LKs gefunden. Deshalb wurde vorgeschlagen, das Modell mit $Rag2^{-/-}IL-2R\beta^{-/-}$ Mäusen zu testen, da diesen Mäusen ebenfalls T-, B- und NK-Zellen fehlen, jedoch eine normale Lymphknotenentwicklung zu erwarten ist (93, 108). Bisher konnte allerdings mit keiner Mutation ein ebenbürtiges Ergebnis wie mit γc *knock-out* erreicht werden (110). Da aber auch T- und NK-Zellen die Anlage von peripheren LKs induzieren können, wird evtl. eine verbesserte T-Zell-Entwicklung das Problem lösen (111).

Ebenfalls ein bedeutender limitierender Faktor für das Modell sind die bereits erwähnten Grenzen der Kreuzreaktivität von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen über die Interspeziesgrenze hinweg, da diese für die nachhaltige Bildung und Funktion von Leukozyten entscheidend sind. Objektive Kriterien für zuverlässige Vorhersagen von Kreuzreaktivität fehlen, so dass ihre Identifikation auf Analysen der Mausmodelle angewiesen ist. Aufgrund von Übereinstimmung von Beobachtungen der Zellentwicklung in chimären Mausmodellen, die vor allem zu Gunsten von B-Zellen ausfällt, wird z.B. davon ausgegangen, dass murines GM-CSF, M-CSF, IL-3, Erythropoietin und Thrombopoietin, die myeloide und erythroide Differenzierung fördern, nicht kreuzreaktiv zu humanen Zellen sind, während Flt3 Ligand und IL-7, die die lymphoide Differenzierung unterstützen, zumindest in einigem Umfang kreuzreaktiv sein müssen (93, 108). Es gibt verschiedene Ansätze, nicht kreuzreaktive Zytokine zu ersetzen.

Besonders interessant ist ein *knock in* der kodierenden Gene in die Empfängermäuse, da dies eine dauerhafte Zytokinproduktion in physiologischen Konzentrationen sicherstellt und zusätzlich die murinen Gene ausschaltet. Einige entsprechende Modelle liegen bereits vor, wodurch die Transplantationsergebnisse weiter verbessert werden konnten (110, 111).

Abgesehen von den qualitativen Problemen der Antigenerkennung muss auch an ein quantitatives Problem gedacht werden. Im Allgemeinen wird der Transplantationserfolg der Mäuse am prozentualen Anteil der humanen Zellen an den Leukozyten im peripheren Blut gemessen. Nur selten findet man Angaben über absolute Zellzahlen, die jedoch, wie jedem Kliniker vertraut ist, letztendlich über Immunschwäche oder Immunstärke entscheiden. Um einen Eindruck zu gewinnen, in welchen Größenordnungen wir uns mit dem Mausmodell bewegen, wurden bei den letzten beiden Experimenten bei einigen Mäusen Blutbilder angefertigt. Es konnte festgestellt werden, dass sich die Leukozytenzahlen der Mäuse an der unteren Grenze des Normbereichs befinden (s. Abb. 9). Eine genauere Betrachtung der Entwicklung der absoluten Leukozytenzahlen über die Lebenszeit der Mäuse hinweg wäre daher zur Festlegung des optimalen Zeitpunktes der Tumorinjektion empfehlenswert und sollte in die Beurteilung der Mausmodelle mit einfließen.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die Zahl und Funktion der NK-Zellen im peripheren Blut rekonstituierter Mäuse vermindert ist (im Gegensatz zum Thymus, wo sie einen eher höheren Anteil erreichen) (93, 108). Ursache hierfür sind wiederum fehlende Zytokinsignale sowie die fehlende Lizenzierung durch ausreichende HLA-exprimierende Zellen, so dass auch hier Verbesserungen durch einen *knock in* von HLA zu erwarten sind (111). Es konnte gezeigt werden, dass bei EFT-Patienten eine eingeschränkte NK-Zell-Funktionalität vorliegt (132) (vgl. Kap. 4.2.2.), was für eine Rolle von NK-Zellen bei der Immunantwort auf EFTs spricht, da es zur Selektion von NK-Zellen inhibierenden EFT-Zellen kam. Somit besteht bzgl. der NK-Zellen ggf. weiteres Potential, das mit dem vorliegenden Modell nicht ausgeschöpft wird. Andererseits zeigen Diefenbach *et al.* (133, 134), dass die T-Zell-Aktivierung bei Mäusen ohne NK-Zellen nicht schlechter ist als bei

Mäusen mit NK-Zellen, auch wenn dies aufgrund des Einflusses, den NK-Zellen mittels Produktion von IFN γ auf die T-Zell-Aktivierung haben können (70), zu erwarten wäre.

4.2 Diskussion der Immunogenität des EFTs

Sehen wir von den Schwächen des Mausmodells einmal ab, so ist zu überlegen, welche Eigenschaften der Ewing Tumorzellen selbst dafür verantwortlich sein könnten, dass es in diesem sowie anderen *settings* nur zu einer unzureichenden Immunreaktion gegen sie kommt. Schließlich handelt es sich im vorliegenden Experiment um einen allogenen Kontext, in dem funktionelle T-Zellen auf nicht körpereigene Tumorzellen treffen. Zudem besitzen die Tumorzellen eine spezifische Translokation, und auch wenn die bisherigen Ergebnisse nicht für das Vorliegen eines dem Fusionsprotein direkt entstammenden Tumorantigens sprechen (vgl. Kap. 1.3.5. und (88, 89)), sind EWS-FLI 1 regulierte TAAs zu erwarten, die den EFT an sich zu einem geeigneten Kandidaten für immuntherapeutische Ansätze machen.

Wie in Kapitel 1.3.4 und 1.3.5 beschrieben, gibt es einige Arbeiten, die spezifische T-Zellantworten beschreiben, auch wenn sie nur schwach ausfallen und die sichere Identifizierung von Epitopen limitiert bleibt. Dies bekräftigt jedoch, dass geeignete TAAs vorhanden sein müssen, also Tumorantigene, die nicht ausschließlich im Tumor, sondern nur vermehrt dort exprimiert werden. Einige dieser T-Zell-Populationen sind offenbar auch in der Lage, EFT-Zellen *in vitro* abzutöten. Zytotoxische Wirksamkeit *in vivo* hingegen scheint damit nur eingeschränkt assoziiert zu sein, geschweige denn Elimination der EFT-Tumore. Als Ursachen sind Toleranz- und *escape*- Mechanismen anzunehmen, die systematisch umgangen werden müssen. Das unterstreicht die Bedeutung der Entwicklung eines zuverlässigen *in vivo* Modells, in dem man diesbezügliche Strategien überprüfen kann.

4.2.1 Toleranzmechanismen

Im Rahmen der zentralen Toleranz (vgl. Kap. 1.3.2.) werden T-Zellen mit zu starker Affinität zum eigenen MHC-Komplex sowie T-Zellen mit hoher Affinität zu tumorassoziierten Selbst-Antigenen (TAAs) von vorneherein aussortiert. Es ist daher zu erwarten, dass potentiell vorhandene tumorreaktive T-Zellen nur eine schwache Affinität zu ihrem Zielepitop aufweisen. Dies ist vermutlich ein wichtiger Teil der Erklärung, warum

autologe tumorspezifische T-Zellen z.B. bei Zhang *et al.* (82) nicht in der Lage waren, das Tumorwachstum zu kontrollieren. Durch den allogenen Kontext fehlt der Tumorzelle im vorliegenden Experiment dieser Schutz. Zu dem fremden MHC-Komplex müssen passende T-Zellen mit sehr hoher Affinität vorliegen, wodurch bei der Bindung an ein tumorspezifisches Antigen eine hohe Avidität zu erwarten ist. Diese Annahme wird bei dem *in vitro*-Ansatz von Pirson (91), in dem der allogene Ansatz dem autologen deutlich überlegen war, bestätigt. Der Vorteil wird jedoch durch eine übermächtige unspezifische Immunantwort erkauft, worauf später eingegangen wird (s. Kap. 4.3).

Periphere Toleranzmechanismen sind vielfältig. Zu ihnen gehören Anergie oder *clonal deletion*, die durch die Konfrontation der T-Zellen mit einem Antigen in Abwesenheit kostimulatorischer Faktoren induziert werden (70) (vgl. Kap. 1.3.2). Diese Kostimulation kommt vor allem durch Aktivierung von CD28, das konstitutiv auf T-Zellen exprimiert wird, zustande. Die Expression von CD28-Liganden (B7.1 oder B7.2) auf APCs wird durch eine Aktivierung ihrer Toll-like-Rezeptoren (TLR) vermittelt, die z.B. durch typischerweise in Viren und Bakterien vorkommende Strukturen, sog. pathogenassoziierte Muster (PAMPs), ausgelöst wird (70). Diese fehlt – wie in unserem Ansatz – bei der Konfrontation mit Tumorzellen. Transfektion von Faktor B7 auf die Tumoroberfläche ist diesbezüglich ein Lösungsansatz, der insbesondere in Kombination mit Zytokinen effektiv ist (135-137) (vgl. Kap. 4.3). Weitere Kostimulation kann durch *inducible co-stimulator* ICOS (70, 137) oder Aktivierung des NKG2D Rezeptors (81) zustande kommen, die jedoch beide erst auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert werden und somit weiterhin von der B7-vermittelten Kostimulation abhängig bleiben. Ließe sich ihre Expression induzieren, könnte dies zur Verstärkung der Kostimulation genutzt werden.

Ein weiterer Mechanismus ist *activation induced cell death* (AICD), ein Apoptosemechanismus, der bei Reaktivierung einer bereits aktivierten T-Zelle in Kraft tritt, so dass eine effektive T-Zell-Antwort bei der übermächtigen Präsenz eines Antigens verhindert wird (71) (vgl. Kap. 1.3.2.). So ist von der Therapie der CML bekannt, dass das Ansprechen auf immuntherapeutische Ansätze mit der Tumorlast korreliert (138, 139). Es wird angenommen, dass eine minimale Ratio im Verhältnis Immunzellen zu

Tumorzellen existiert, unterhalb derer auch aktive Immunzellen keinen Effekt erzielen können. Paradox ist, dass dieser AICD, genau wie die T-Zell-Aktivierung, entscheidend von IL2 abhängig ist (140). Die Blockade des Mechanismus' könnte zur Effektivität Tumor infiltrierender T-Zellen beitragen (137, 141, 142). Vermutlich könnte auch eine Verbesserung des Verhältnisses von Lymphozyten zu Tumorzellen das Auftreten von AICD vermeiden oder zumindest verringern, also in unserem Modell verbesserte Transplantationsergebnisse mit höheren absoluten Lymphozytenzahlen, oder aber eine weitere Reduktion der injizierten Tumorzellen mit dem Kompromiss der verlängerten Latenz des Tumorwachstums.

Als ebenfalls hemmend für eine zytotoxische T-Zell-Antwort wurde das Auftreten einer ineffektiven humoralen Tumorantwort identifiziert, möglicherweise aufgrund von Konkurrenz um die Antigene (87). Da die humorale Tumorantwort ein Ergebnis indirekter Antigenpräsentation durch APCs ist, während die direkte Antigenpräsentation via MHC I auf der Zielzelle selbst nur in einer zytotoxischen T-Zell-Antwort münden kann, sind Strategien zur Förderung der direkten Antigenpräsentation wünschenswert, auch hier kann Transfektion von B7 auf die Tumoroberfläche beitragen (137, 143). Da DCs die einzigen MHC I exprimierenden APCs sind (144), unterstreicht dies ihre Bedeutung in der Anti-Tumorantwort.

Gerade DCs, aber auch weitere Immunzellen in der Tumorumgebung, können jedoch durch den Tumor in ihrer Funktion verändert worden sein (vgl. Kap. 1.3.2.). Vermutlich auch deshalb besitzt der Einsatz von DCs als Tumorstoffe ein ausbaufähiges Potential, wie bereits vielfach demonstriert werden konnte (73, 79), obwohl zuverlässige Erfolge in der klinischen Umsetzung bisher fehlen. Die Immunreaktion wird durch den Tumor nicht nur unterdrückt, sondern Immunzellen zum Fördern des Tumorwachstums umprogrammiert (67, 68). Wahrscheinlich wird zukünftig ein zunehmendes Verständnis der komplexen Rolle der gesamten Tumor Mikroumgebung neue Therapieoptionen mit dem Ziel der Rekrutierung dort vorhandener Immunzellen, insbesondere der DCs, eröffnen (72). Auch in unserem Ansatz zeigte sich eine deutliche Signifikanzzunahme der Verlangsamung des Tumorwachstums nach Immunisierung mit reifen DCs. Für die Weiterentwicklung und Optimierung von DC-Therapien und die Evaluierung von

Lebensdauer und Qualität der durch sie stimulierten T-Zellen könnten HIS-Mäuse zukünftig als Modell dienen.

4.2.2 *Escape Mechanismen*

Die *escape* Mechanismen umfassen eine Vielzahl von Wegen, mit Hilfe derer sich Tumore der Erkennung entziehen, aktiv das Immunsystem seiner Träger inhibieren oder den Signalwegen der induzierten Lyse entgehen. Einige Arbeiten geben Hinweise darauf, welche dieser Mechanismen beim EFT eine Rolle spielen könnten und wie sie umgangen werden können.

So konnte festgestellt werden (145), dass auf allen untersuchten EFT-Zellen (Zelllinien und Patientenproben) das antiapoptotische Molekül cFLIP exprimiert wurde. CFLIP hemmt einen Apoptosemechanismus, der von dem Enzym Caspase-8 abhängig ist, welches zusätzlich in EFT-Linien downreguliert sein kann (146). Es existiert jedoch ein Apoptosemechanismus, der auch caspaseunabhängig ablaufen kann und durch cFLIP nicht gehemmt wird. Es ist anzunehmen, dass dieser - Granzym/ Perforin-vermittelte - Signalweg in EFT-Zellen zuverlässiger ist. Sowohl NK-Zellen als auch T-Zellen sind in der Lage, beide Apoptose-Wege zu induzieren. Somit wären Strategien sinnvoll, die es erlauben würden, T-Zellen und NK-Zellen mehr zu dem Granzym/ Perforin vermittelten Signalweg zu veranlassen. Eine stärkere T-Zell/ MHC Interaktion wird als möglicher Trigger hierfür vermutet (145), was die Bedeutung des allogenen Ansatzes zur Gewinnung von T-Zell-Rezeptoren mit hoher Avidität unterstreichen würde.

In einer anderen Arbeit (132) wurde gezeigt, dass EFT-Zellen in hoher Zahl aktivierende Liganden für die NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 besitzen, die Zytotoxizität der NK-Zellen von EFT-Patienten jedoch deutlich reduziert ist. Durch den Einsatz von IL-15 konnte die Funktion wiederhergestellt werden. Die Ursache der eingeschränkten Funktion ist unklar, eine reduzierte NK-Zellzahl oder die Herabregulation von NKG2D-Liganden, wie bei verschiedenen anderen Tumorentitäten als *escape*-Mechanismus beschrieben, konnten jedoch ausgeschlossen werden. Denkbar ist ein Zusammenhang zu dem Ergebnis von Brinkrolf *et al.* (147), das zeigte, dass T-Regulatorzellen, die die NK-Zellfunktion hemmen können (148), im Knochenmark von Patienten mit metastasiertem EFT im Vergleich zu Patienten mit lokalisertem EFT leicht aber signifikant (5 % vs 3,3 %) erhöht sind. Zerstörung dieser Regulatorzellen als Methode zur

Erhöhung der Immunreaktion auf einen Tumor wurde beschrieben (149). Da NK-Zellen über die Produktion von IFN γ die spezifische Immunantwort beeinflussen können (70), wäre es denkbar, dass die Verschlechterung ihrer Funktion in EFT-Patienten auch eine Bedeutung für die T-Zell-basierte Immunantwort hat.

In einer weiteren Arbeit wurde in EFT-Zelllinien in 79 % der Fälle ein komplettes oder teilweises Fehlen von HLA Klasse I und ebenfalls in der Mehrheit der Fälle eine fehlende Expression von HLA Klasse II festgestellt (150). Während die Expression von HLA Klasse I durch IFN γ induzierbar war, war dies für HLA Klasse II nicht möglich. Dies stellt ein entscheidendes Hindernis für den erfolgreichen Einsatz von T-Zell-Therapie dar, selbst wenn TAAs auf HLA-exprimierenden Zelllinien identifiziert werden können. Die in unserem Modell verwendeten EFT-Linien zeigten in der Durchflusszytologie eine normale HLA-Expression, für andere EFT-Linien kann jedoch die Induktion von HLA-Expression durch Einsatz von IFN γ (150) notwendig sein. Gleichzeitig lässt der Verlust der HLA-Expression vermuten, dass die EFT-Zelle hierdurch einer T-Zell-Reaktion auf tumorspezifische oder -assoziierte Peptide entgeht und bestärkt die Hoffnung, dass es eine effektive Reaktion gegeben hat.

4.3 Weiterentwicklungsansätze

Aus den vorangegangenen Betrachtungen des Mausmodells und der Immunogenität des EFTs ergeben sich nun verschiedene Weiterentwicklungsmöglichkeiten, die zum Teil in den einzelnen Kapiteln bereits angesprochen wurden.

So wird beständig an der Verbesserung des Mausmodells gearbeitet, um damit noch stabilere Immunreaktionen zu erzeugen, z.B. durch komplettes *knock in* von humanem MHC und nicht kreuzreaktiven Zytokinen, Verbesserung der Entwicklung von Lymphknoten und Ablation muriner DCs. *Escape*- und Toleranz-Mechanismen⁵ insbesondere im Tumor *microenvironment*⁵ müssen noch genauer identifiziert und gezielt umgangen werden. Induktion von Kostimulation, Verbesserung bzw. Wiederherstellung der Antigenpräsentation durch DCs und Einsatz von IFN γ zur HLA-Induktion oder IL-15 zur Verbesserung der NK-Zell-Funktion stellen Beispiele hierfür dar.

Zwei Ansätze wurden in unserer Arbeitsgruppe von Kollegen bereits verfolgt. In einem Experiment wurde mit autologen DCs immunisiert, deren Vorläufer bereits bei der

Isolation der Stammzellen aus dem Nabelschnurblut gewonnen worden waren und die vor der Injektion mit aus Pirsons Arbeit (91) bekannten Tumorpeptiden gepulst wurden. Im anderen Experiment wurden die Tumore mit dem bereits diskutierten kostimulatorischen Molekül B7 transfiziert, das in großer Zahl auf der Oberfläche aktivierter DCs exprimiert wird (vgl. Kap. 4.2.1.). So kann die bisher fehlende Kostimulation direkt durch die Tumorzellen zustande kommen, evtl. könnte es auch zu einer zusätzlichen direkten Lyse durch NK-Zellen (151) führen. Beide Ansätze haben vielversprechende Ergebnisse gezeigt (s. Abb. 21). Eine mögliche Erweiterung wäre die zusätzliche Transfektion von IL-4 oder IL-7, von der gezeigt wurde, dass sie die Effektivität der Kostimulation weiter erhöhen kann (135, 136).

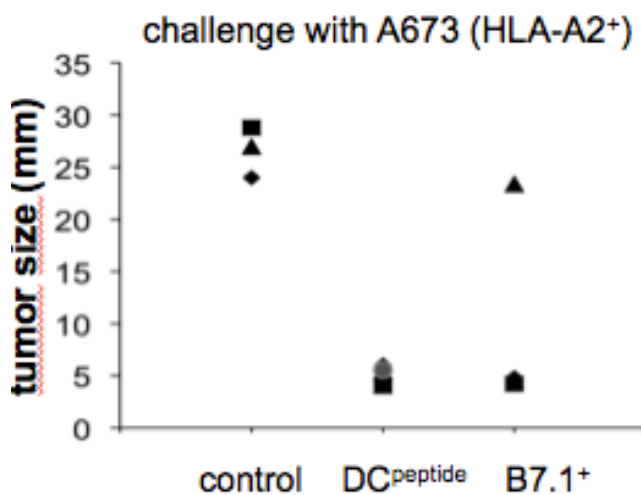


Abbildung 21: Deutlich verlangsamtes Tumorwachstum nach Immunisierung mit Ewingpeptid- beladenen DCs und Konfrontation mit B7.1 transfizierten Tumorzellen. Mit freundlicher Genehmigung von Priv.-Doz. Dr. G. Richter und Dr. U. Thiel.

Zwei Jahre nach Beginn dieser Arbeit veröffentlichte eine chinesische Arbeitsgruppe um Guo *et al.* (152) erste Ergebnisse eines Projektes, in dem ebenfalls in humanisierten Mäusen die Immunreaktion auf Ewing Tumorzellen nach Einsatz verschiedener DC basierender Immunisierungsstrategien getestet wurde. Wie bei uns wurde der Erfolg am Größenwachstum des Tumors gemessen. Es handelt sich um ein recht einfaches Mausmodell, bei dem erwachsenen Mäusen PBMCs intraperitoneal injiziert werden. Bezüglich des Erfolgs der Rekonstruktion wird lediglich berichtet, dass IgG über den Zeitraum von mehreren Wochen gebildet wird, bezüglich der T-Zellfunktion in diesem Modell wird wenig bekannt. Es zeigt sich in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen

ein Vorteil immunisierter gegenüber nicht immunisierter Mäuse. Interessanterweise ergab sich kein Unterschied im Tumorwachstum nach Immunisierung mit normalen DCs oder mit EWS-FLI1-modifizierten DCs. In Kongruenz mit Meyer-Wentrup *et al.* (88) scheint also die spezifische Translokalisierung nicht zu MHC-präsentierten, angreifbaren Antigenen auf der Tumoroberfläche zu führen. Mit Tumorzellen gepulste DCs können wohl hingegen spezifischere Immunreaktionen stimulieren. Als beste Tumorstoffe aber schneiden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels Elektrofusion gebildete DC-Tumorzell-Hybride ab, mit deren Hilfe alle in Frage kommenden Antigene präsentiert werden können, ohne dass sie vorher identifiziert werden müssen. Interessanterweise wurden Tumorzellen, PBMCs und DCs mit jeweils übereinstimmenden HLA-Gruppen verwendet. Somit scheinen die DC-Tumorzellhybride auch im HLA-identischen Zustand potente und spezifische T-Zell-Stimulatoren darzustellen. Es ist anzunehmen, dass das Immunsystem des Modells nach Traggiai *et al.* deutlich mehr Potential hat als das von Guo gewählte. Versucht man einen vorsichtigen numerischen Vergleich, so kann man der Graphik von Guo entnehmen, dass ohne Immunisierung der Mittelwert der Tumorgrößen an Tag 20 ca. das Achtfache unseres Mittelwertes am selben Tag betrug, obwohl sogar etwas weniger ($2,5 \times 10^6$ statt 3×10^6) Tumorzellen injiziert worden waren. Selbstverständlich ist solch ein Vergleich mit Vorsicht zu genießen, da in den völlig unterschiedlichen Laboren weitere Störfaktoren Einfluss genommen haben könnten. Doch auch vor dem Hintergrund der Kenntnisse über verschiedene Mausmodelle (vgl. Diskussion des Mausmodells) ist eine Überlegenheit des Modells nach Traggiai *et al.* zu erwarten. Somit wäre es ein interessanter Ansatz, fusionierte DC-Tumorzell-Hybride als Tumorstoffe in nach Traggiai *et al.* rekonstituierten Mäusen einzusetzen und damit die Stärken beider Modelle zu kombinieren.

Eine Limitation unseres Ansatzes ist definitiv die Identifizierung des tumorspezifischen T-Zellklons in der Menge der alloreaktiven T-Zellen. Da der Ansatz von Guo *et al.* auch mit HLA-*matching* zu einer Tumorreaktion geführt hat, wäre ein HLA-*matching* oder sogar eine autologes *setting* (nach Rekonstitution mit Knochenmarkstammzellen des Patienten) eine Möglichkeit, die T-Zellreaktion (wenn ausreichend erzeugbar) stärker auf die tumorspezifischen Antigene zu fokussieren, um später ihre Selektion zu erleichtern. Aber auch ein gezielter HLA-*mismatch* wäre eine Option, da hiermit eine ausgeprägtere T-

Zellreaktion zu erwarten ist und, wie zuvor erläutert (vgl. 1.3.2.), die Chance auf eine höhere Avidität und auf stärkere Antigen-Rezeptor-Bindungen steigt, evtl. sogar nur allogene T-Zellen schließlich in der Lage sein werden, Tumorwachstum zu kontrollieren (153). Dies würde jedoch die Problematik der Übermacht an unspezifischen, alloreaktiven T-Zellen noch verschärfen. Denn 1-10 % einer T-Zell-Population können auf fremdes MHC reagieren, während die Bindungswahrscheinlichkeit an ein beliebiges Antigen nur $1:10^4$ bis 10^6 beträgt (70). Nach Erreichen einer Tumorabstoßung müssten aus der großen Zahl an lediglich alloreaktiven T-Zellen tumorpeptidspezifische T-Zellen identifiziert werden. Dies ist letztendlich wohl doch nur möglich, indem vorher bekannte Tumorantigene zum *priming* der T-Zellen verwendet werden, um danach spezifisch auf diese Antigene reaktive T-Zellen mittels *Pentamer-staining* zu selektieren. Dies entspräche dem Ansatz, den Pirson *in vitro* verfolgt hat und mit dem er peptidspezifische, allostringierte T-Zellklone identifizieren konnte, die später in der Lage waren (92), Wachstum von EFT-Tumoren *in vivo* zu verlangsamen.

Allerdings entfällt bei diesem Ansatz wieder die Möglichkeit, neue, unbekannte Antigene zu adressieren. Wünschenswert wäre eine Methode, tumorspezifische T-Zellen aus lediglich alloreaktiven T-Zellen selektieren zu können. Alternativ könnten die Anstrengungen tatsächlich auf die Identifikation eines autologen oder HLA-identischen, tumorreaktiven T-Zellklons fokussiert werden und dessen Rezeptor sekundär auf allogene T-Zellen transferiert werden.

Da die bisherige Erfahrung mit immuntherapeutischen Ansätzen beim EFT nicht für ein einzelnes hochpenetrantes, tumorspezifisches Antigen spricht, ist von mehreren tumorassoziierten Antigenen auszugehen. Somit wird möglicherweise erst der Einsatz mehrerer T-Zell-Klone, evtl. sogar auf Basis der individuellen Tumorzelllinie generiert, zum Erfolg führen. Die Identifikation der Rezeptoren dieser T-Zellen würde es wie erwähnt ermöglichen, die Rezeptoren zu klonen und in Spender-T-Zellen zu transferieren. Neben der Generierung der spezifischen T-Zellen könnte das humanisierte Mausmodell eine wichtige Rolle für die Auswahl geeigneter Spender-T-Zellen und die Evaluation ihrer Lebensdauer, Qualität und Funktionsfähigkeit spielen (137).

Auch für die Evaluation von durch DC-Vakzine aktivierten T-Zellen stehen HIS-Mäuse als Modell zur Verfügung. Die laufende Verbesserung der Mausmodelle wird vermutlich

zukünftig so realistische Verhältnisse schaffen, dass an ihnen auch das *microenvironment* des Tumors und die Rekrutierung der darin vorkommenden Immunzellen studiert werden können. Hierzu können zusätzlich, wie in unserer Arbeitsgruppe bereits begonnen, die Tumorzellen den Mäusen nicht subkutan sondern intravenös injiziert werden, so dass das hämatogene Metastasierungsmuster und damit das realistischere Tumorumfeld des Ewingtumors simuliert wird.

4.4 Zusammenfassungen

4.4.1 Zusammenfassung deutsch

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einsatz von nach Traggiai *et al.* (103) humanisierten Mäusen zur Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze gegen Krebszellen vielversprechend verlaufen ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Tumorwachstum in rekonstituierten und nicht rekonstituierten Mäusen konnte gezeigt werden, so dass von einer stattfindenden Immunreaktion auszugehen ist. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz von dendritischen Zellen verstärkt werden. Dies ist gleichzeitig ein starker Hinweis darauf, dass es sich um eine spezifische Immunreaktion handelt. Die Weiterentwicklung des Modells in unserer Arbeitsgruppe durch vorheriges Beladen der dendritischen Zellen mit bekannten Tumorpeptiden und Transfektion von B7 auf die Tumorzellen hat in ersten Versuchen eine weitere Verbesserung dieser Ergebnisse gezeigt. Dies spricht zusätzlich dafür, dass es sich um eine von Antigenpräsentation abhängige und damit spezifische Immunreaktion handelt, und zeigt, dass das Modell zur Untersuchung von Strategien zur Überwindung von Tumor *escape*-und Toleranzmechanismen geeignet ist.

Gleichzeitig bieten humanisierte Mausmodelle noch reichlich Potential zur Weiterentwicklung, z.B. Verbesserung der Selektion auf humanes MHC, Verbesserung der Entwicklung von Lymphknoten und Substitution nicht kreuzreaktiver Zytokine.

Es ist durchaus realistisch, dass nach dem Ausschöpfen all dieser Möglichkeiten eine spezifische Immunreaktion erzeugt werden kann, die stark genug ist, um die entsprechenden T-Zellen aus den Mäusen zu isolieren und spezifische Rezeptoren für Tumorantigene zu identifizieren. Des Weiteren kann das Modell zur Weiterentwicklung und Evaluation von adoptiver T-Zell-Therapie und DC-Vakzinierung sowie zur weiteren Untersuchung des Tumor *microenvironments* dienen. Damit verknüpft ist die Hoffnung auf eine nebenwirkungsarme und effiziente Therapieoption für Patienten, für die bisher, wie im Falle der metastasierten Ewing Tumor Patienten, mit hochtoxischen Regimen nur eine Überlebensverbesserung von einigen Monaten erreicht werden kann. Der Einsatz humanisierter Mäuse könnte zu einem wichtigen Instrument in der Entwicklung von Immuntherapie gegen Krebs werden.

4.4.2 English summary

In conclusion we state that the attempt to use immunologically humanized mice based on the model of Traggiai et al. (103) for the development of immunotherapeutic strategies against cancer led to encouraging results. A significant difference between tumor growth in reconstituted and not reconstituted mice was observed which proves the potential of the reconstituted human immune system to react against tumor cells. The effect was even clearer when mice were additionally immunized with dendritic cells. This strongly suggests that the immune reaction is specific even though the number of activated T cells was low. Modification of the experiment by our group by pulsing dendritic cells with known tumor peptides before injection or by transfection of B7 onto the tumor cells, showed a further improvement of the results obtained. This indicates again an antigen dependent and so fore specific immune reaction and proves the model is suitable for examining strategies to overcome tumor escape and tolerance mechanisms.

At the same time there are still plenty of prospects for further improvement of humanized mice models, for example enhancement of T cell selection on human MHC, enhancement of lymph node development and substitution of cytokines that are not cross-reactive between mice and humans.

There are good reasons to believe that after making use of these possibilities there might be a specific immune reaction robust enough to isolate specific T cells from mice and identify specific T cell receptors for tumor antigens. Moreover, the model is an ideal tool to further evaluate adoptive T cell therapy and DC vaccination as well as the complex interactions of the tumor with its microenvironment. With all this in mind, we are hopeful that we can contribute towards an efficient therapy with minimal side effects for patients who are suffering with tumors, where currently – as in the case of metastatic Ewing Family tumor – survival rates are only increased by a couple of months under highly toxic regimes. The use of humanized mice has the potential to become a powerful instrument in the development of immune therapy against cancer.

5 Anhang

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 James Ewing, 1866-1943 (Quelle: http://www.time.com/time/covers/0,16641,19310112,00.html , entnommen am 09.03.2011).....	2
Abb. 2 William B. Cole, 1862-1936 (Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/William_Coley , entnommen am 09.03.2011).....	2
Abb. 3 Eigener Versuchsaufbau (Quelle: PD Dr. G. Richter, eigene Arbeitsgruppe, bearbeitet)	29
Abb. 4 Hepatische Injektion bei Mäusewelpen (Photo: Dr. U. Thiel, eigene Arbeitsgruppe)	45
Abb. 5 Blutentnahme bei Mäusen (Quelle: http://www.medipoint.com/html/for_use_on_mice.html , entnommen am 29.04.2009)	45
Abb. 6 Rekonstitutionsquoten aller rekonstituierten weißen Mäuse (eigenes Diagramm)	52
Abb. 7 Rekonstitutionsquoten der rekonstituierten weißen Mäuse, die mehr als 1% humaner Zellen im Leukozytengate aufweisen mit CD3- und CD19-Anteilen (eigenes Diagramm)	53
Abb. 8 FACS-Analyse periph. Blut rekonstruierter Mäuse nach CD3 u. CD19 (eigene FACS-Bilder)....	54
Abb. 9 Blutbildergebnisse (Leukozyten- und Lymphozytenzahlen, eigene Tabelle)	55
Abb. 10 Milzen nicht rekonstituierter und rekonstituierter Mäuse im Vergleich (eigenes Photo)	56
Abb. 11 Thymi-Paare nicht rekonstituierter und rekonstituierter Mäuse im Vergleich (eigenes Photo) ..	56
Abb. 12 Thymi-Paare rekonstituierter und nicht rekonstituierter Mäuse im Vergleich (eigenes Photo) ..	56
Abb. 13 FACS-Analyse Thymuszellen rekonstituierter Mäuse nach CD45,CD8 u. CD4 (eigene Bilder) 57	
Abb. 14 FACS-Analyse Milzzellen rekonstituierter Mäuse nach CD3 u. CD19 (eigene FACS-Bilder).....	57
Abb. 15 Ergebnisdarstellung Experiment I (eigenes Diagramm)	58
Abb. 16 Ergebnisdarstellung Experiment II (eigenes Diagramm)	59
Abb. 17 Ergebnisdarstellung Experiment III (eigenes Diagramm)	61
Abb. 18 Beziehung zwischen Rekonstitutionsquoten und Tumolvolumen (eigenes Diagramm).....	62
Abb. 19 Übersichtstabelle über die Experimente I bis III (eigene Tabelle)	63
Abb. 20 Orte der fetalen Hämatoese bei Mäusen während der Trächtigkeit (Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/H%C3%A4matopoese , entnommen am 07.01.2012)	66
Abb. 21 Tumorwachstum nach Immunisierung mit Ewingpeptid beladenen DCs und nach Konfrontation mit B7.1-transfizierten Tumoren (Quelle: Dr. U. Thiel und PD Dr. G. Richter, eigene Arbeitsgruppe, mit freundlicher Genehmigung).	80

5.2 Literaturverzeichnis

1. Lahl M, Fisher VL, Laschinger K. 2008. Ewing's sarcoma family of tumors: an overview from diagnosis to survivorship. *Clin J Oncol Nurs* 12: 89-97
2. Rodriguez-Galindo C, Spunt SL, Pappo AS. 2003. Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. *Med Pediatr Oncol* 40: 276-87
3. Pizzo P.A. PDG. 2005. *Principles and Practice of pediatric oncology* Lippincott Williams & Wilkins
4. Jürgens H. P, M., Zoubek A. 2006. Ewing-Tumoren. In *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, ed. GG Gadner H., Niemeyer C., Ritter J., pp. 894-910: Springer Verlag
5. Arvand A, Denny CT. 2001. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20: 5747-54
6. Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Zucker JM, Mazabraud A. 1984. Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 12: 21-5
7. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. 1984. Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 12: 1-19
8. Turc-Carel C, Aurias A, Mugneret F, Lizard S, Sidaner I, Volk C, Thiery JP, Olschwang S, Philip I, Berger MP, et al. 1988. Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 32: 229-38
9. Gorman PA, Malone M, Pritchard J, Sheer D. 1991. Cytogenetic analysis of primitive neuroectodermal tumors. Absence of the t(11;22) in two of three cases and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 51: 13-22
10. Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, et al. 1994. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 331: 294-9

11. Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, Tillman RM, Ramani P, Cullinane C, Coleman N. 2003. FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res* 63: 4568-76
12. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, et al. 1992. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359: 162-5
13. Kovar H. 2005. Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 15: 189-96
14. Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ. 1987. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 127: 507-18
15. Staeger MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE. 2004. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64: 8213-21
16. Burdach S, Plehm S, Unland R, Dirksen U, Borkhardt A, Staeger MS, Muller-Tidow C, Richter GH. 2009. Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle* 8: 1991-6
17. Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rossler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Lowel D, von Luettichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staeger MS, Muller-Tidow C, Burdach S. 2009. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5324-9
18. Ladenstein R, Potschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, van den Berg H, Dirksen U, Hjorth L, Michon J, Lewis I, Craft A, Jurgens H. 2010. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol* 28: 3284-91
19. Picci P, Bohling T, Bacci G, Ferrari S, Sangiorgi L, Mercuri M, Ruggieri P, Manfrini M, Ferraro A, Casadei R, Benassi MS, Mancini AF, Rosito P, Cazzola A, Barbieri E, Tienghi A, Brach del Prever A, Comandone A, Bacchini P, Bertoni F. 1997. Chemotherapy-induced tumor necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 15: 1553-9
20. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Rimondini S, Longhi A, Bacchini P, Forni C, Manfrini M, Donati D, Picci P. 2000. Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma

- of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *J Clin Oncol* 18: 4-11
21. Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, Amann G, Dockhorn-Dworniczak B, Harms D, Muller-Wehrich S, Welte K, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Gobel U, Treuner J, Voute PA, Zoubek A, Gadner H, Jurgens H. 2001. Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 19: 1818-29
 22. Terrier P, Henry-Amar M, Triche TJ, Horowitz ME, Terrier-Lacombe MJ, Miser JS, Kinsella TJ, Contesso G, Llombart-Bosch A. 1995. Is neuro-ectodermal differentiation of Ewing's sarcoma of bone associated with an unfavourable prognosis? *Eur J Cancer* 31A: 307-14
 23. Parham DM, Hijazi Y, Steinberg SM, Meyer WH, Horowitz M, Tzen CY, Wexler LH, Tsokos M. 1999. Neuroectodermal differentiation in Ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior. *Hum Pathol* 30: 911-8
 24. van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, Lessnick SL, Marina N, Triche TJ, Spoto R, Womer RB, Lawlor ER. 2010. Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 28: 1989-94
 25. de Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PH, Barr FG, Ladanyi M. 1998. EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 16: 1248-55
 26. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith TL, Jurgens H, Gadner H, Kovar H. 1996. Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14: 1245-51
 27. Fagnou C, Michon J, Peter M, Bernoux A, Oberlin O, Zucker JM, Magdelenat H, Delattre O. 1998. Presence of tumor cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with Ewing's tumor. *Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique. J Clin Oncol* 16: 1707-11
 28. Zoubek A, Ladenstein R, Windhager R, Amann G, Fischmeister G, Kager L, Jugovic D, Ambros PF, Gadner H, Kovar H. 1998. Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: a preliminary evaluation. *Int J Cancer* 79: 56-60

29. Burdach S, Jurgens H. 2002. High-dose chemoradiotherapy (HDC) in the Ewing family of tumors (EFT). *Crit Rev Oncol Hematol* 41: 169-89
30. Dirksen Uta, Jürgens Heribert, Hämatologie DGfOpU. 2014. S1 Leitlinie: Ewing-Sarkome des Kindes- und Jugendalters. *AWMF Online*
31. Ullmann C, BJ-D, Holter et al. 2008. Ergebnisse der multidisziplinären Behandlung lokalisierter Ewing-Sarkome bei Kindern und Jugendlichen. *Strahlenther Onkol* 137-44
32. Donaldson SS. 2004. Ewing sarcoma: radiation dose and target volume. *Pediatr Blood Cancer* 42: 471-6
33. Burdach S, van Kaick B, Laws HJ, Ahrens S, Haase R, Korholz D, Pape H, Dunst J, Kahn T, Willers R, Engel B, Dirksen U, Kramm C, Nurnberger W, Heyll A, Ladenstein R, Gadner H, Jurgens H, Goel U. 2000. 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* 11: 1451-62
34. Meyers PA, Krailo MD, Ladanyi M, Chan KW, Sailer SL, Dickman PS, Baker DL, Davis JH, Gerbing RB, Grovas A, Herzog CE, Lindsley KL, Liu-Mares W, Nachman JB, Sieger L, Wadman J, Gorlick RG. 2001. High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis. *J Clin Oncol* 19: 2812-20
35. Kushner BH, Meyers PA. 2001. 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* 19: 870-80
36. Disis ML, Cheever MA. 1996. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 8: 637-42
37. Koscielniak E, Gross-Wieltsch U, Treuner J, Winkler P, Klingebiel T, Lang P, Bader P, Niethammer D, Handgretinger R. 2005. Graft-versus-Ewing sarcoma effect and long-term remission induced by haploidentical stem-cell transplantation in a patient with relapse of metastatic disease. *J Clin Oncol* 23: 242-4
38. Thiel U, Wawer A, Wolf P, Badoglio M, Santucci A, Klingebiel T, Basu O, Borkhardt A, Laws HJ, Kodaera Y, Yoshimi A, Peters C, Ladenstein R, Pession A,

- Prete A, Urban EC, Schwinger W, Bordigoni P, Salmon A, Diaz MA, Afanasyev B, Lisukov I, Morozova E, Toren A, Bielora B, Korsakas J, Fagioli F, Caselli D, Ehninger G, Gruhn B, Dirksen U, Abdel-Rahman F, Aglietta M, Mastrodicasa E, Torrent M, Corradini P, Demeocq F, Dini G, Dreger P, Eyrich M, Gozdzik J, Guilhot F, Holler E, Koscielniak E, Messina C, Nachbaur D, Sabbatini R, Oldani E, Ottinger H, Ozsahin H, Schots R, Siena S, Stein J, Suflarska S, Unal A, Ussowicz M, Schneider P, Woessmann W, Jurgens H, Bregni M, Burdach S. 2011. No improvement of survival with reduced- versus high-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplants in Ewing tumor patients. *Ann Oncol* 22: 1614-21
39. Burdach S, Meyer-Bahlburg A, Laws HJ, Haase R, van Kaik B, Metzner B, Wawer A, Finke R, Gobel U, Haerting J, Pape H, Gadner H, Dunst J, Juergens H. 2003. High-dose therapy for patients with primary multifocal and early relapsed Ewing's tumors: results of two consecutive regimens assessing the role of total-body irradiation. *J Clin Oncol* 21: 3072-8
40. Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, Dockhorn-Dworniczak B, Dunst J, Frohlich B, Winkelmann W, Zoubek A, Jurgens H. 1998. Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol* 9: 275-81
41. Ladenstein R, Lasset C, Pinkerton R, Zucker JM, Peters C, Burdach S, Pardo N, Dallorso S, Coze C. 1995. Impact of megatherapy in children with high-risk Ewing's tumours in complete remission: a report from the EBMT Solid Tumour Registry. *Bone Marrow Transplant* 15: 697-705
42. Hendershot E. 2005. Treatment approaches for metastatic Ewing's sarcoma: a review of the literature. *J Pediatr Oncol Nurs* 22: 339-52
43. Burdach S, Thiel U, Schoniger M, Haase R, Wawer A, Nathrath M, Kabisch H, Urban C, Laws HJ, Dirksen U, Steinborn M, Dunst J, Jurgens H. 2010. Total body MRI-governed involved compartment irradiation combined with high-dose chemotherapy and stem cell rescue improves long-term survival in Ewing tumor patients with multiple primary bone metastases. *Bone Marrow Transplant* 45: 483-9
44. Sandoval C, Meyer WH, Parham DM, Kun LE, Hustu HO, Luo X, Pratt CB. 1996. Outcome in 43 children presenting with metastatic Ewing sarcoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1992. *Med Pediatr Oncol* 26: 180-5
45. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gadner H, Craft AW. 2000. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from

- the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 18: 3108-14
46. Kovar H, Alonso J, Aman P, Aryee DN, Ban J, Burchill SA, Burdach S, De Alava E, Delattre O, Dirksen U, Fourtouna A, Fulda S, Helman LJ, Herrero-Martin D, Hogendoorn PC, Kontny U, Lawlor ER, Lessnick SL, Llombart-Bosch A, Metzler M, Moriggl R, Niedan S, Potratz J, Redini F, Richter GH, Riedmann LT, Rossig C, Schafer BW, Schwentner R, Scotlandi K, Sorensen PH, Staeger MS, Tirode F, Toretsky J, Ventura S, Eggert A, Ladenstein R. 2012. The first European interdisciplinary ewing sarcoma research summit. *Front Oncol* 2: 54
 47. Olmos D, Martins AS, Jones RL, Alam S, Scurr M, Judson IR. 2011. Targeting the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Ewing's Sarcoma: Reality and Expectations. *Sarcoma* 2011: 402508
 48. Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini PL, Maurici D, Picci P, Manara MC, Baldini N. 1996. Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res* 56: 4570-4
 49. Huhn R, Staeger MS, Hesse M, Liebig B, Burdach SE. 2009. Cleavage of the Ewing tumour-specific EWSR1-FLI1 mRNA by hammerhead ribozymes. *Anticancer Res* 29: 1901-8
 50. Nishimori H, Sasaki Y, Yoshida K, Irifune H, Zembutsu H, Tanaka T, Aoyama T, Hosaka T, Kawaguchi S, Wada T, Hata J, Toguchida J, Nakamura Y, Tokino T. 2002. The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* 21: 8302-9
 51. Abaan OD, Levenson A, Khan O, Furth PA, Uren A, Toretsky JA. 2005. PTPL1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 and modulates Ewing's Sarcoma tumorigenesis. *Oncogene* 24: 2715-22
 52. Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Iwamoto Y. 2003. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-FlI1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 278: 15105-15
 53. Grunewald TG, Diebold I, Esposito I, Plehm S, Hauer K, Thiel U, da Silva-Buttkus P, Neff F, Unland R, Muller-Tidow C, Zobywalski C, Lohrig K, Lewandrowski U, Sickmann A, Prazeres da Costa O, Grolach A, Cossarizza A, Butt E, Richter GH, Burdach S. 2012. STEAP1 is associated with the invasive and oxidative stress phenotype of Ewing tumors. *Mol Cancer Res* 10: 52-65

54. Hauer K, Calzada-Wack J, Steiger K, Grunewald TG, Baumhoer D, Plehm S, Buch T, da Costa OP, Esposito I, Burdach S, Richter GH. 2013. DKK2 mediates osteolysis, invasiveness, and metastatic spread in Ewing sarcoma. *Cancer Res* 73: 967-77
55. Richter GH, Fasan A, Hauer K, Grunewald TG, Berns C, Rossler S, Naumann I, Staeger MS, Fulda S, Esposito I, Burdach S. 2013. G-Protein coupled receptor 64 promotes invasiveness and metastasis in Ewing sarcomas through PGF and MMP1. *J Pathol*
56. Vajdic CM, van Leeuwen MT. 2009. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* 125: 1747-54
57. Roithmaier S, Haydon AM, Loi S, Esmore D, Griffiths A, Bergin P, Williams TJ, Schwarz MA. 2007. Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. *J Heart Lung Transplant* 26: 845-9
58. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356: 1795-9
59. Burnet M. 1957. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1: 779-86
60. Stutman O. 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183: 534-6
61. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-11
62. Dupont B. 2002. Introduction: current concepts in immunity to human cancer and therapeutic antitumor vaccines. *Immunol Rev* 188: 5-8
63. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-8
64. Schreiber TH, Podack ER. 2009. A critical analysis of the tumour immunosurveillance controversy for 3-MCA-induced sarcomas. *Br J Cancer* 101: 381-6
65. Qin Z, Blankenstein T. 2004. A cancer immunosurveillance controversy. *Nat Immunol* 5: 3-4; author reply -5

66. Willimsky G, Czeh M, Loddenkemper C, Gellermann J, Schmidt K, Wust P, Stein H, Blankenstein T. 2008. Immunogenicity of premalignant lesions is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness. *J Exp Med* 205: 1687-700
67. Whiteside TL. 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27: 5904-12
68. Whiteside TL. 2010. Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol* 125: S272-83
69. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-70
70. Murphy K. TP, Walport M., ed. 2008. *Janeway's Immunobiology*, Vols. 1: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC
71. Kabelitz D, Oberg HH, Pohl T, Pechhold K. 1994. Antigen-induced death of mature T lymphocytes: analysis by flow cytometry. *Immunol Rev* 142: 157-74
72. Benencia F, Muccioli M, Alnaeeli M. 2014. Perspectives on Reprogramming Cancer-Associated Dendritic Cells for Anti-Tumor Therapies. *Front Oncol* 4: 72
73. Palucka K, Banchereau J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 12: 265-77
74. Levine DB. 2008. The Hospital for the Ruptured and Crippled: William Bradley Coley, third Surgeon-in-Chief 1925-1933. *HSS J* 4: 1-9
75. Vu T, Claret FX. 2012. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol* 2: 62
76. Weiner GJ. 2010. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 47: 115-23
77. Dazzi F, Fozza C. 2007. Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: risk factors and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol* 20: 311-27
78. Feng X, Hui KM, Younes HM, Brickner AG. 2008. Targeting minor histocompatibility antigens in graft versus tumor or graft versus leukemia responses. *Trends Immunol* 29: 624-32

79. Palucka K, Ueno H, Banchereau J. 2011. Recent developments in cancer vaccines. *J Immunol* 186: 1325-31
80. Rammensee HG, Weinschenk T, Gouttefangeas C, Stevanovic S. 2002. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev* 188: 164-76
81. Goletz TJ, Mackall CL, Berzofsky JA, Helman LJ. 1998. Molecular alterations in pediatric sarcomas: potential targets for immunotherapy. *Sarcoma* 2: 77-87
82. Zhang H, Merchant MS, Chua KS, Khanna C, Helman LJ, Telford B, Ward Y, Summers J, Toretsky J, Thomas EK, June CH, Mackall CL. 2003. Tumor expression of 4-1BB ligand sustains tumor lytic T cells. *Cancer Biol Ther* 2: 579-86
83. Geiger J, Hutchinson R, Hohenkirk L, McKenna E, Chang A, Mule J. 2000. Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells. *Lancet* 356: 1163-5
84. Dagher R, Long LM, Read EJ, Leitman SF, Carter CS, Tsokos M, Goletz TJ, Avila N, Berzofsky JA, Helman LJ, Mackall CL. 2002. Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study. *Med Pediatr Oncol* 38: 158-64
85. Mackall CL, Rhee EH, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Bernstein D, Tesso M, Long LM, Grindler D, Merino M, Kopp W, Tsokos M, Berzofsky JA, Helman LJ. 2008. A pilot study of consolidative immunotherapy in patients with high-risk pediatric sarcomas. *Clin Cancer Res* 14: 4850-8
86. De Angulo G, Hernandez M, Morales-Arias J, Herzog CE, Anderson P, Wolff J, Kleinerman ES. 2007. Early lymphocyte recovery as a prognostic indicator for high-risk Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 29: 48-52
87. Qin Z, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. 1998. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 4: 627-30
88. Meyer-Wentrup F, Richter G, Burdach S. 2005. Identification of an immunogenic EWS-FLI1-derived HLA-DR-restricted T helper cell epitope. *Pediatr Hematol Oncol* 22: 297-308
89. Mackall CL, Helman LJ. 2000. Targeting pediatric malignancies for T cell-mediated immune responses. *Curr Oncol Rep* 2: 539-46

90. Rodeberg DA, Nuss RA, Heppelmann CJ, Celis E. 2005. Lack of effective T-lymphocyte response to the PAX3/FKHR translocation area in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Immunol Immunother* 54: 526-34
91. Pirson S. 2009. Generation of autologous and allorestricted cytotoxic T cell clones directed against Ewing Tumor antigens.
92. Thiel U, Pirson S, Muller-Spahn C, Conrad H, Busch DH, Bernhard H, Burdach S, Richter GH. 2011. Specific recognition and inhibition of Ewing tumour growth by antigen-specific allo-restricted cytotoxic T cells. *Br J Cancer* 104: 948-56
93. Legrand N, Weijer K, Spits H. 2006. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *J Immunol* 176: 2053-8
94. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. 1988. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335: 256-9
95. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. 1988. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241: 1632-9
96. Kamel-Reid S, Dick JE. 1988. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242: 1706-9
97. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Patterson B, Broxmeyer HE, Dick JE. 1994. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 83: 2489-97
98. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-30
99. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154: 180-91
100. Hesselton RM, Greiner DL, Mordes JP, Rajan TV, Sullivan JL, Shultz LD. 1995. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. *J Infect Dis* 172: 974-82

101. Mazurier F, Fontanellas A, Salesse S, Taine L, Landriau S, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Peault B, Di Santo JP, de Verneuil H. 1999. A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J Interferon Cytokine Res* 19: 533-41
102. Colucci F, Soudais C, Rosmaraki E, Vanes L, Tybulewicz VL, Di Santo JP. 1999. Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model: investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation. *J Immunol* 162: 2761-5
103. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG. 2004. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304: 104-7
104. Gimeno R, Weijer K, Voordouw A, Uittenbogaart CH, Legrand N, Alves NL, Wijnands E, Blom B, Spits H. 2004. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/- gammac-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood* 104: 3886-93
105. Döhmen GR, Hans Edgar. 2002. Stammzellen: Forschung im Überblick. *Dtsch Arztebl* 99(41): A-2680 / B-2285 / C-2148: 2680-4
106. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-23
107. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33: 2643-52
108. Manz MG. 2007. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* 26: 537-41
109. Legrand N, Ploss A, Balling R, Becker PD, Borsotti C, Brezillon N, Debarry J, de Jong Y, Deng H, Di Santo JP, Eisenbarth S, Eynon E, Flavell RA, Guzman CA, Huntington ND, Kremsdorf D, Manns MP, Manz MG, Mention JJ, Ott M, Rathinam C, Rice CM, Rongvaux A, Stevens S, Spits H, Strick-Marchand H, Takizawa H, van Lent AU, Wang C, Weijer K, Willinger T, Ziegler P. 2009. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe* 6: 5-9

110. Willinger T, Rongvaux A, Strowig T, Manz MG, Flavell RA. 2011. Improving human hemato-lymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement. *Trends Immunol* 32: 321-7
111. Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, Willinger T, Eynon EE, Flavell RA, Manz MG. 2013. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol* 31: 635-74
112. Kerre TC, De Smet G, De Smedt M, Zippelius A, Pittet MJ, Langerak AW, De Bosscher J, Offner F, Vandekerckhove B, Plum J. 2002. Adapted NOD/SCID model supports development of phenotypically and functionally mature T cells from human umbilical cord blood CD34(+) cells. *Blood* 99: 1620-6
113. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. 2007. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7: 118-30
114. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. 1997. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5320-5
115. Coulombel L. 2004. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23: 7210-22
116. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. 1995. A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86: 3745-53
117. Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H. 1999. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells* 17: 286-94
118. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. 2003. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 101: 4233-44
119. Bernard D, Peakman M, Hayday AC. 2008. Establishing humanized mice using stem cells: maximizing the potential. *Clin Exp Immunol* 152: 406-14
120. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. 1995. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 377-81

121. Goldman JP, Blundell MP, Lopes L, Kinnon C, Di Santo JP, Thrasher AJ. 1998. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol* 103: 335-42
122. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. 2002. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-82
123. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, Harada M. 2005. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 106: 1565-73
124. Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, Pertel T, Carnaud C, Bluestone JA, Lanier LL. 2003. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18: 41-51
125. Christianson SW, Greiner DL, Schweitzer IB, Gott B, Beamer GL, Schweitzer PA, Hesselton RM, Shultz LD. 1996. Role of natural killer cells on engraftment of human lymphoid cells and on metastasis of human T-lymphoblastoid leukemia cells in C57BL/6J-scid mice and in C57BL/6J-scid bg mice. *Cell Immunol* 171: 186-99
126. Brehm MA, Cuthbert A, Yang C, Miller DM, Dilorio P, Laning J, Burzenski L, Gott B, Foreman O, Kavirayani A, Herlihy M, Rossini AA, Shultz LD, Greiner DL. 2010. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation. *Clin Immunol* 135: 84-98
127. Strowig T, Rongvaux A, Rathinam C, Takizawa H, Borsotti C, Philbrick W, Eynon EE, Manz MG, Flavell RA. 2011. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2-/-gamma(c)-/- mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13218-23
128. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R. 2005. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174: 6477-89
129. Zinkernagel RM, Althage A. 1999. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8092-7

130. Randall TD, Carragher DM, Rangel-Moreno J. 2008. Development of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 26: 627-50
131. Cupedo T, Mebius RE. 2005. Cellular interactions in lymph node development. *J Immunol* 174: 21-5
132. Verhoeven DH, de Hooge AS, Mooiman EC, Santos SJ, ten Dam MM, Gelderblom H, Melief CJ, Hogendoorn PC, Egeler RM, van Tol MJ, Schilham MW, Lankester AC. 2008. NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Mol Immunol* 45: 3917-25
133. Diefenbach A, Raulet DH. 2002. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol Rev* 188: 9-21
134. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413: 165-71
135. Cayeux S, Beck C, Aicher A, Dorken B, Blankenstein T. 1995. Tumor cells cotransfected with interleukin-7 and B7.1 genes induce CD25 and CD28 on tumor-infiltrating T lymphocytes and are strong vaccines. *Eur J Immunol* 25: 2325-31
136. Cayeux S, Beck C, Dorken B, Blankenstein T. 1996. Coexpression of interleukin-4 and B7.1 in murine tumor cells leads to improved tumor rejection and vaccine effect compared to single gene transfectants and a classical adjuvant. *Hum Gene Ther* 7: 525-9
137. Richter G. 2011. Mechanisms and Target Structures in Tumor immunology - Overcoming Tumor Escape by Selective Allo-reactive T Cells.
138. Ahmed N, Heslop HE, Mackall CL. 2010. T-cell-based therapies for malignancy and infection in childhood. *Pediatr Clin North Am* 57: 83-96
139. Dazzi F, Szydlo RM, Goldman JM. 1999. Donor lymphocyte infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplant: where we now stand. *Exp Hematol* 27: 1477-86
140. Lenardo MJ. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353: 858-61
141. Tabbekh M, Franciszkiewicz K, Haouas H, Lecluse Y, Benihoud K, Raman C, Mami-Chouaib F. 2011. Rescue of tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death enhances the antitumor CTL response in CD5-deficient mice. *J Immunol* 187: 102-9

142. Richter GH, Mollweide A, Hanewinkel K, Zobywalski C, Burdach S. 2009. CD25 blockade protects T cells from activation-induced cell death (AICD) via maintenance of TOSO expression. *Scand J Immunol* 70: 206-15
143. Cayeux S, Richter G, Noffz G, Dorken B, Blankenstein T. 1997. Influence of gene-modified (IL-7, IL-4, and B7) tumor cell vaccines on tumor antigen presentation. *J Immunol* 158: 2834-41
144. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-9
145. de Hooge AS, Berghuis D., Justo Santos S., Mooiman E., Romeo S., Kummer J.A., Egeler R. M., van Tol M. J. D., Melief, C. j. M., Hofendoorn P. C. W., Lankester A. C. 2007. Expression of cellular FLICE inhibitory protein, caspase-8, and protease inhibitor-9 in Ewing sarcoma and implications for susceptibility to cytotoxic pathways. *Clin Cancer Res* 13: 106-14
146. Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. 2001. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20: 5865-77
147. Brinkrolf P, Landmeier S, Altvater B, Chen C, Pscherer S, Rosemann A, Ranft A, Dirksen U, Juergens H, Rossig C. 2009. A high proportion of bone marrow T cells with regulatory phenotype (CD4+CD25hiFoxP3+) in Ewing sarcoma patients is associated with metastatic disease. *Int J Cancer* 125: 879-86
148. Zimmer J, Andres E, Hentges F. 2008. NK cells and Treg cells: a fascinating dance cheek to cheek. *Eur J Immunol* 38: 2942-5
149. Morse MA, Hobeika AC, Osada T, Serra D, Niedzwiecki D, Lyerly HK, Clay TM. 2008. Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* 112: 610-8
150. Berghuis D, de Hooge AS, Santos SJ, Horst D, Wiertz EJ, van Eggermond MC, van den Elsen PJ, Taminau AH, Ottaviano L, Schaefer KL, Dirksen U, Hooijberg E, Mulder A, Melief CJ, Egeler RM, Schilham MW, Jordanova ES, Hogendoorn PC, Lankester AC. 2009. Reduced human leukocyte antigen expression in advanced-stage Ewing sarcoma: implications for immune recognition. *J Pathol* 218: 222-31
151. Cayeux S, Richter G, Becker C, Pezzutto A, Dorken B, Blankenstein T. 1999. Direct and indirect T cell priming by dendritic cell vaccines. *Eur J Immunol* 29: 225-34

152. Guo W, Guo Y, Tang S, Qu H, Zhao H. 2008. Dendritic cell-Ewing's sarcoma cell hybrids enhance antitumor immunity. *Clin Orthop Relat Res* 466: 2176-83
153. Burdach S, Kolb HJ. 2013. The vigor of defense against non-self: potential superiority of allorestricted T cells in immunotherapy of cancer? *Front Oncol* 3: 100

5.3 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. S. Burdach für die Vergabe und ganz herzlich Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Richter für die erfahrene, geduldige und hilfsbereite Betreuung dieser Doktorarbeit.

Des Weiteren danke ich Frau Haas von der Hämatologie am Klinikum Schwabing für die anfängliche Bereitstellung von Stammzellproben und Beratungen bzgl. des Auftauprozesses, Herrn Priv.-Doz. Dr. Jacobs, den Hebammen der Frauenklinik Rechts der Isar und den entbundenen Müttern für die Bereitstellung des Nabelschnurblutes, sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. Oostendorp und seiner Mitarbeiterin Frau Rushton vom Labor für Stammzellphysiologie (MRI) für hilfreiche Beratungen und Unterweisungen.

Herrn Dr. Brill und den Tierpflegern des Mausstalls (MRI) vielen Dank für die sorgfältige Betreuung der Mäuse, den Mitarbeitern der Strahlenklinik (MRI), insbesondere den Physikern Frau Schill und Herrn Nisselbeck für die flexible Unterstützung bei der anfänglichen Bestrahlung der Mäusewelpen sowie dem Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (MRI) für die spätere Mitbenutzung ihrer Bestrahlungseinheit.

Danke an Frau Schafnitzel vom hämatologischen Labor des Klinikums Rechts der Isar für die Einführung in manuelle Blutbilderstellung sowie an das Labor der III.Med (MRI) für die Mitbenutzung des Gerätes der Blutbilderstellung für Tiere. Danke an die Firma Miltenyi Biotec für die Bereitstellung des FACSaliburs sowie an ihren Produktspezialist Herrn Dr. Steibl für umfangreiche telefonische Beratungen und Bereitstellung von Verfahrensprotokollen. Ebenso Danke an Frau Wolf vom Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum Rechts der Isar für die Unterstützung bei der Auswertung.

Vor allem aber herzlichen Dank an Günther Richter, Colette Zobiwalski, Andreas Mollweide, Stefan Pirson, Sabine Rössler, Annette Fasan, Stephanie Plehm, Uwe Thiel und Beate Beinvogel für die Einführung in die Wunderwelt der Labore, Unterrichtung in Methoden, anregende Diskussionen sowie tatkräftige und jederzeit bereitwillige Hilfe bei meinem Projekt. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Freunden und Familie für ihre liebevolle Unterstützung. Für das Gefangenhalten, Verletzen und Töten der Mäuse, die für dieses Projekt verwendet wurden, möchte ich um Verzeihung bitten.