

**Granulozyten-ADCC und CDC gegen Neuroblastomzellen
unter Verwendung von Anti-GD2-Antikörpern mit und ohne
Complementbindungsstelle**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Neumann, Jens

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Fierlbeck

Für meine Familie und meine Freundin Evamaria

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1. Einleitung	1
1.1. Spezifische Ansätze zur Therapie von Krebserkrankungen	1
1.2. Das Neuroblastom	2
1.2.1. Der Catecholaminstoffwechsel der Neuroblastomzellen	3
1.2.2. Die hohe Expression des Gangliosides GD2 beim Neuroblastom.....	5
1.3. Antikörper und ihr Einsatz bei der Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen	6
1.4. ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity).....	7
1.4.1. Granulozyten ADCC (allgemein und beim Neuroblastom)	9
1.4.2. Rolle von Perforin / Granzym bei der Granulozyten-ADCC	11
1.5. CDC (Complement-dependent cytotoxicity)	13
1.6. Biological response modifiers (BRM): β-Glucan und Biobran®	14
1.6.1. β -Glucan.....	15
1.6.2. BIOBRAN®.....	16
1.7. Klinischer Einsatz von Anti-GD2-Antikörpern beim Neuroblastom.....	16
1.8. Ziel der Doktorarbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Chemikalien.....	21
2.1.2. Antikörper (AK)	22
2.1.3. Geräte	22
2.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.5. Neuroblastom-Zelllinien	24
2.1.6. Zellkulturmedien	24

2.2. Methoden	25
2.2.1. Allgemeines zum Arbeiten mit Zellkulturen.....	25
2.2.2. Kultivierung der Neuroblastomzellen	25
2.2.3. Subkultivierung der Zellen	26
2.2.4. Bestimmung der Zellzahl	26
2.2.5. Einfrieren der Zellen	27
2.2.6. Blutentnahme und Isolierung der Leukozyten	28
2.2.6.1. Granulozytenisolierung aus Vollblut.....	28
2.2.6.2. Isolierung der mononucleären Blutzellen (MNBC)	29
2.2.6.3. Gewinnung von Heparin-Plasma	30
2.2.7. Bestimmung des Differentialblutbildes mit dem ADVIA 120	30
2.2.8. Europium-Assay	35
2.2.8.1. Prinzip und Durchführung	35
2.2.8.2. ADCC.....	40
2.2.8.3. CDC	41
2.2.8.4. ADCC + CDC	42
2.2.9. [⁵¹ Cr]Chrom-Assay	43
2.2.9.1. Gewinnung und Markierung der Neuroblastomzellen	43
2.2.9.2. Isolierung und Vorbehandlung der Granulozyten und MNBC	43
2.2.9.3. Beschickung der 96-Well-Rundbodenplatte	44
2.2.10. Chemilumineszenz	45
3. Ergebnisse	50
3.1. Untersuchungen unter Verwendung des Europium Assays	50
3.1.1. ADCC Untersuchungen	50
3.1.1.1. Vorversuche: Charakterisierung der Methodik.....	50
3.1.1.1.1. Spontanlyse beim Europium-Assay.....	50
3.1.1.1.2. Lyse durch unstimulierte Granulozyten (Vergleich zur Spontanlyse)	50

3.1.1.1.3. Festlegung der Auswertungsprotokolle	53
3.1.1.1.4. Einfluss von GM-CSF (und G-CSF) auf die Lyse von NB-2 durch Granulozyten.....	53
3.1.1.1.5. Granulozyten-ADCC mit AK ⁺ und AK ⁻ (NB-1 und NB-2).....	54
3.1.2. Neuroblastomzell-Lyse durch das Complementsystem.....	60
3.1.2.1. Einfluss von AK ⁺ und AK ⁻ auf die Complementlyse durch Serum	60
3.1.3. Lyse der Neuroblastomzellen in Gegenwart von Serum (CDC) und Granulozyten (ADCC).....	66
3.2. Untersuchungen unter Verwendung des ⁵¹Chrom-Assays	68
3.2.1. Vergleich der Spontanlysen zu den Ansätzen in Gegenwart von Granulozyten	68
3.2.2. ADCC von Neuroblastomzellen durch unstimulierte und vorstimulierte Granulozyten	69
3.3. Bedeutung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) bei neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang mit der ADCC gegenüber Neuroblastomzellen	71
3.3.1. Kommt es bei der Granulozyten-ADCC mit AK ⁻ - Antikörpern zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen?.....	71
3.3.2. Wirkung der Vorstimulation der Granulozyten mit Biobran [®] auf die Bildung von ROS in der ADCC-Reaktion gegen Neuroblastomzellen	73
3.3.3. Die Rolle externer ROS bei der ADCC durch Granulozyten und der Lyse von Neuroblastomzellen	75
4. Diskussion	77
5. Zusammenfassung.....	88
6. Literaturverzeichnis	89
Erklärung zum Eigenanteil.....	89
Danksagung	95

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl.: antibody dependent cellular cytotoxicity)
AK	Antikörper
AK ⁺	hier: Antikörper gegen GD2 <u>mit</u> Complementbindungsstelle
AK ⁻	hier: Antikörper gegen GD2 <u>ohne</u> Complementbindungsstelle
ATP	Adenosintriphosphat
BATDA	Bis-Acetoxyethyl-2,2':6'2"-Terpyridine-6,6"-Dicarboxylid Acid
Bq	Becquerel (Zerfälle pro Sekunde)
BRM	Biological response modifiers
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ⁺⁺	Calcium
CGD	Septische Granulomatose (engl.: chronic granulomatous disease)
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CL	Chemilumineszenz
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENA-78	Epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78
engl.	Englisch
E:T-Verhältnis	Effektor-/Target-Verhältnis

Abkürzungsverzeichnis

etc.	et cetera
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated cell sorting
f.c.	final concentration
FCS	Fetal Calve Serum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (engl.: granulocyte-colony stimulating factor)
GD2	Gangliosid GD2
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GO	Glukose-Oxidase
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-P-DH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GPX	Glutathionperoxidase
Gr.	Granulozyt(en)
GR	Glutathion-Reduktase
griech.	griechisch
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
HK	Hexokinase
IF- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
insb.	insbesondere
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IU	Internationale Einheit
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leukotrien-B4

Abkürzungsverzeichnis

LUC	large unstained cells
m	Meter
Mg ⁺⁺	Magnesium
min	Minuten
MGN-3	Biobran®; generischer Name
MNC	Mononukleäre Zellen
MPO	Myeloperoxidase
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NOX	NADPH-Oxidase
NRBCs	Non Red Blood Cells
opson.	opsonisiert
PAF	Plättchenaktivierender Faktor (engl. platelet activating factor)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Saline)
PBS ⁺⁺	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Saline) mit Calcium und Magnesium
PMA	Phorbol-(12)-myristat-(13)-acetat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RLU	relative Lichteinheiten (engl.: relative light units)
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (engl.: reactive oxygen species)
rpm	round per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S.D.	Standard Deviation (Standardabweichung)
SOD	Superoxiddismutas

1. Einleitung

1.1. Spezifische Ansätze zur Therapie von Krebserkrankungen

Neben den Standardverfahren bei der Behandlung von malignen Tumoren (Operation, Strahlentherapie, Chemotherapie) kommen in zunehmendem Maße spezifischere Therapiemaßnahmen zum Einsatz, bei denen man versucht, verschiedene charakteristische zelluläre und biochemische Eigenschaften der betreffenden Erkrankung näher zu charakterisieren und durch eine optimierte Diagnostik, gepaart mit klinischen Erfahrungen durch entsprechende Studien, gezieltere Therapieansätze zu entwickeln. Im Bereich der Leukämiebehandlung hat man z.B. durch den immer weiter verbesserten Einsatz von FACS (fluorescence-activated cell sorting) Analysen zur Charakterisierung der entsprechenden malignen Leukozyten große Fortschritte erzielt und die rasanten Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der DNS (Genom/Transcriptom) Analysen („personalisierte Medizin“) eröffnen nun bis vor kurzem noch ungeahnte neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der Immuntherapie, Gentherapie oder der metabolischen Beeinflussung der Krebserkrankungen (Collins, 2011).

Bei der Konzeption spezifischer Therapien stehen zwei verzahnte Prinzipien im Vordergrund: Man versucht durch einen Angriff auf eine oder mehrere charakteristische Targetstrukturen der malignen Zelle diese - im Gegensatz zu dem eher unspezifischen Einsatz herkömmlicher Zytostatika - gezielt zu zerstören, wodurch gleichzeitig Nebenwirkungen auf gesunde Systeme (z.B. auf die Hämatopoese) verhindert/reduziert werden könnten. Es lassen sich aber verschiedene Probleme auch bei diesem Ansatz nicht (ganz) vermeiden:

- Da sich maligne Zellen ja von normalen Zellen durch onkogene Veränderungen/Supressorgen-Änderungen ableiten, bestehen oft bezüglich einer „spezifischen“ Eigenschaft nur quantitative (nicht

Einleitung

qualitative) Unterschiede zwischen den malignen und den normalen bzw. verwandten gesunden Zellen.

- Innerhalb eines Tumorzellverbandes mit seiner riesigen Anzahl an Zellen (~ einige Milliarden Zellen pro Gramm Gewebe), ist die Ausprägung eines spezifischen Merkmals nicht homogen, manchmal fehlt sie ganz oder verändert sich im Verlaufe der Erkrankung (siehe unten). Von besonderer Bedeutung sind, insbesondere im Hinblick auf Chemotherapieresistenz die immer wieder zum Auftreten von Rezidiven führt, die Gruppe der Tumor-Stammzellen, deren Zerstörung von zentraler Bedeutung ist (Hsu et al., 2013).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Einsatz von Antikörpern, die gegen das beim Neuroblastom stark exprimierte Gangliosid GD2 gerichtet sind an Neuroblastomzellen *in vitro* untersucht. Dabei wurde vergleichend die Granulozyten ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) im Vergleich zur CDC (Complement dependent cytotoxicity) analysiert. Für diese Untersuchungen wurden zwei Antikörper verwendet, die sich nur dadurch unterscheiden, dass der eine von beiden keine Complementbindungsstelle besitzt. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit erläutert.

1.2. Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor des sympathischen Nervensystems, der - im Gegensatz z.B. zum Melanom - selten somatische Mutationen zeigt und deshalb wenig immunogen ist (Cheung and Dyer, 2013). Es wird im ersten Lebensjahr am häufigsten von allen soliden malignen Erkrankungen diagnostiziert und zeichnet sich im ersten Lebensjahr durch eine hohe Rate an Spontanremissionen aus (siehe Kapitel 1.2.1.). Ca 10 von 1

Einleitung

Millionen Kindern unter 15 Jahren leiden an dieser Erkrankung (USA). Das Neuroblastom wird in 4 Stadien eingeteilt (I-IV + IVs). Im Stadium IV (Hochrisiko-Patienten) beträgt die Überlebensrate, trotz großer Fortschritte in der Diagnostik und mancher neuen Ansätze in der Therapie, nur 30%. Bei Diagnose haben 50-60% Metastasen. Allerdings gibt es hoffnungsvolle Ansätze die Überlebenszeit der Patienten durch Erhaltungstherapie nach Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation spürbar zu verbessern: Dazu werden Substanzen wie 13-cis Retinsäure (Isoretinoin) und Antikörper, die gegen das an Neuroblastomzellen stark exprimierte Gangliosid GD2 gerichtet sind, in Kombination mit Cytokinen wie Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) und Interleukin 2 (IL-2) eingesetzt (siehe Tab. 1). (Yang and Sondel, 2010; Yu et al., 2010).

Im Hinblick auf die Ansätze zu einer mehr oder weniger „spezifischen“ Therapie des Neuroblastoms werden im Folgenden zwei, sich bereits in der klinischen Praxis befindlichen Möglichkeiten vorgestellt: Zuerst wird kurz die Bedeutung des Catecholaminstoffwechsels als Grundlage für die Entwicklung von radioaktiv markiertem mIBG behandelt. Anschließend wird ausführlicher die sich aus dem Vorhandensein einer hohen Gangliosid-GD2 Expression ergebende Möglichkeit einer Antikörpertherapie besprochen, welche Gegenstand dieser Doktorarbeit ist.

1.2.1. Der Catecholaminstoffwechsel der Neuroblastomzellen

Als Tumor des sympathischen Nervensystems sind Neuroblastome grundsätzlich in der Lage Catecholamine (Dopamin, Noradrenalin) zu synthetisieren (Biedler et al., 1978). Der Catecholamin-Stoffwechsel der Neuroblastomzellen ist ein wichtiger Labor-Parameter zur Diagnostik eines Neuroblastoms (Bestimmung der Dopamin- und Noradrenalin-Abbauprodukte Vanillinmandelsäure, VMA, und Homovanillinsäure, HVA, im Urin). Diese Bestimmungen wurden auch dafür herangezogen, um die lange Zeit ungeklärte

Einleitung

Frage zu beantworten, ob eine frühzeitige Diagnostik des Neuroblastoms einen positiven Einfluss auf anschließende Therapien haben könnte: Zu diesem Ansatz wurde, in einer von der Deutschen Krebshilfe geförderten Screening-Studie an > 1 Million Kindern die Frage aufgeworfen, ob eine frühzeitige Diagnostik eines Neuroblastoms (vor dem ersten Lebensjahr - durch Bestimmung der Abbauprodukte VMA und HVA - („Windeltest“)), Hinweise dafür liefern könnte, ob eine frühzeitige Entdeckung und - potentiell eine frühzeitige Behandlung - eine Progression eines niedrigen Stadiums in ein höheres verhindern könnte. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass ein routinemäßiges Screening nicht sinnvoll ist, und dass durch das Phänomen der „spontanen“ Remission eine Überdetektion der Neuroblastome stattfindet - d.h., dass mit diesem Screening-Verfahren mehr Neuroblastome detektiert werden, als später klinisch manifest werden (Schilling et al., 2002). Neuroblastome können auch Transporter für die Aufnahme von Catecholaminen (Noradrenalin-Transporter (NAT), weniger Dopamin-Transporter, (DAT)) exprimieren (Pacholczyk et al., 1991). Die letzte Eigenschaft machte man sich zu Nutze, um mit Hilfe einer Noradrenalin-analogen Substanz, meta-Jodbenzylguanidin (mIBG), Neuroblastome mit Hilfe einer szintigraphischen Diagnostik (mit Jod-123 mIBG, [¹²³I]mIBG) zu detektieren (Glowniak et al., 1993). Dies ist seit den Arbeiten von Kimmig et al. (1984) und Treuner et al. (1984) die weltweite Standard-Methode bei der Neuroblastomdiagnostik. [¹³¹I]mIBG wird zur Therapie des Neuroblastoms verwendet (Treuner, 1985). Probleme dieser „spezifischen“ Therapie und Diagnostik bestehen darin, dass auch gesundes sympathisches Nervengewebe NAT exprimiert und auch andere Zellen, insbesondere Nierenzellen u.a. über sog. OCTs (organic cationic transporters) verfügen, über die Catecholamine und mIBG sehr gut aufgenommen werden (Bayer et al., 2009).

1.2.2. Die hohe Expression des Gangliosides GD2 beim Neuroblastom

Ein anderer, wichtiger Ansatzpunkt für die Diagnostik und Therapie des Neuroblastom ist das Disialo-Gangliosid GD2, das an der Zellmembran der meisten Neuroblastomzellen in erhöhtem Maße - im Vergleich zu „normalen“ Zellen (Neurone, Haut-Melanozyten, periphere Schmerzfasern) - exprimiert wird (Svennerholm et al., 1994).

Ganglioside sind Glykolipide, die im Rahmen der Sphingolipid-Biosynthese synthetisiert werden und aus ca. 60 verschiedenen Vertretern bestehen. Das Gangliosid GD2, dessen Bezeichnung auf die Nomenklatur von Svennerholm zurückgeht (Svennerholm, 1964), hat folgende Struktur:

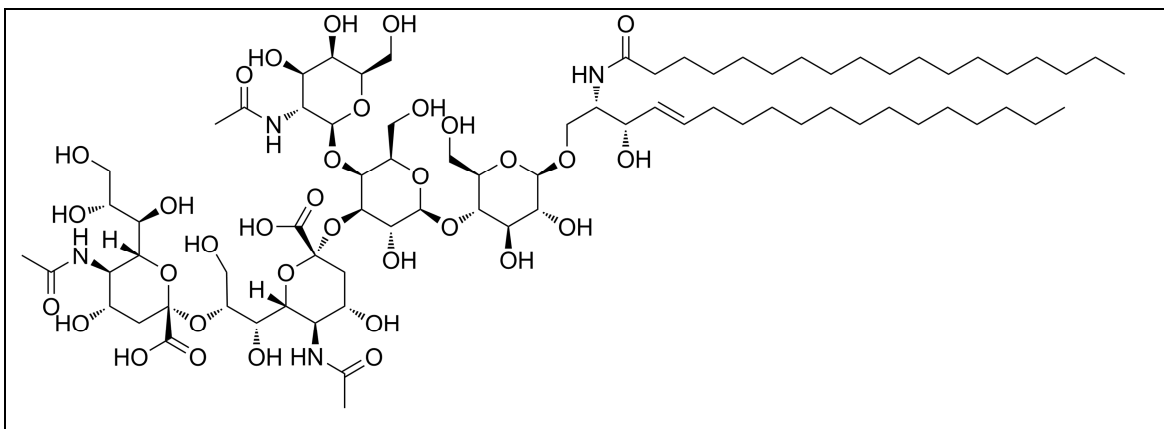


Abb. 1: Struktur des Gangliosides GD2 (aus: wikipedia.de).

In dieser Arbeit ging es, wie bereits erwähnt, darum, die Wirkung von zwei verschiedenen Antikörpern, die das Gangliosid GD2 erkennen, an zwei GD2 positiven Neuroblastomzelllinien zu untersuchen (ADCC durch Granulozyten bzw. CDC). Bevor näher auf diese Experimente eingegangen wird, sollen zuvor einige allgemeine Aspekte beim Einsatz von Antikörpern zusammengefasst werden.

1.3. Antikörper und ihr Einsatz bei der Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen

Antikörper (Immunglobuline, IGs) werden von Plasmazellen (B-Zell-Lymphozyten) gebildet und erkennen an fremden Strukturen (Antigenen) verschiedene Abschnitte (Epitope). Sie werden in verschiedene Klassen eingeteilt (Ig G, M, A, E). Seit der Möglichkeit zur *ex vivo* Herstellung von Monoklonalen Antikörpern (Kohler and Milstein, 1975) eröffneten sich unzählige Anwendungsbereiche zur Diagnostik und Therapie. Der grundsätzliche Aufbau eines Antikörpers (IgG1) ist untenstehend abgebildet:

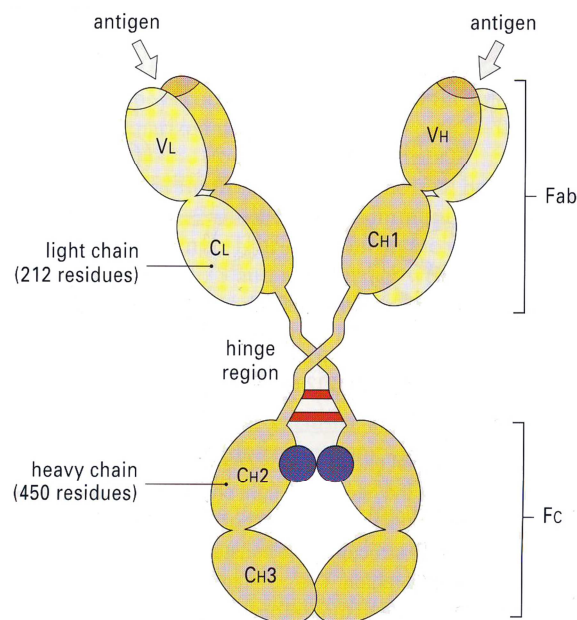


Abb. 2: Struktur eines Antikörpers (IgG1) (aus: Roitt Brostoff Male, Immunology, 4. Auflage, Verlag Stuttgart, 1996).

Anmerkung: Im Fab-Teil befindet sich die Antigen-Bindungsstelle, im Fc-Bereich die Complementbindungsstelle bzw. der Bereich, an dem der Antikörper an Fc-Rezeptoren von Effektorzellen (NK-Zellen, Monocyten, Granulozyten) binden kann. Kohlenhydratbereiche („Kugeln“) bilden sich zwischen den CH2 Domänen aus.

Einleitung

Diagnostisch werden Antikörper bei Krebserkrankungen (insb. Leukämie) hauptsächlich bei FACS-Analysen eingesetzt, um aus dem CD (Cluster of differentiation)-Muster eine genaue Einordnung vornehmen zu können, als Voraussetzung für eine gezielte Therapie. In radioaktiv markierter Form, z.B. mit Jod-123, können sie zur szintigraphischen Diagnostik herangezogen werden. Für therapeutische Zwecke können Antikörper mit Toxinen oder Radioaktivität (Jod-125 / Jod 131) gekoppelt werden oder auch an Liposomen (in die toxische Substanzen verpackt werden: Immunliposomen) oder an Nanopartikel gebunden werden. Antikörper können aber auch direkt therapeutisch eingesetzt werden und ihre cytotoxische Wirkung über ADCC bzw. CDC zur Entfaltung bringen. Da dieser Aspekt das eigentliche Thema der Doktorarbeit ist, wird unter besonderer Berücksichtigung des Neuroblastoms im Folgenden näher darauf eingegangen.

Beim Neuroblastom wurden die ersten klinischen Studien mit „unbeladenen“ anti-GD2-Antikörpern mit Maus-Antikörpern durchgeführt, gegen die sich aber bald HAMAs (Human antibodies against mouse antibodies) bildeten (siehe Tab. 1). Deswegen wurden Weiterentwicklungen in Richtung humanisierter Antikörper vorgenommen (siehe Tab. 1; Yang and Sondel, 2010).

1.4. ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity)

Als Effektorzellen bei der Bekämpfung von Tumorzellen kommen in erster Linie NK-Zellen (natural killer cells), aber auch Monozyten (Makrophagen) und Granulozyten in Betracht (Alderson and Sondel, 2011; Caligiuri, 2008; Souto et al., 2011). Die Effektorzellen besitzen Fc-Rezeptoren, die praktisch auf allen hämatopoetischen Zellen (bis auf T-Zellen) vorkommen, an die mit Antikörper beladenen Tumorzellen binden können (Deo et al., 1997). Bei den Fc-Rezeptoren werden Fc- γ , Fc- α und Fc- ϵ unterschieden, in Abhängigkeit von den

Einleitung

bindenden Antikörpern IgG, IgA und IgE (Ravetch, 1997). Die Fc γ -Rezeptoren werden in 4 Klassen eingeteilt:

Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RIIa (CD32), Fc γ RIa (CD64), Fc γ RIV: IIIa und IIa: low affinity receptors; Ia: high affinity receptor; auch ein Inhibitor-Rezeptor wurde gefunden: Fc γ RIIb.

Beim Neuroblastom (und anderen Tumoren) spielen vor allem NK-Zellen (besonders nach Inkubation mit IL-2) als Effektorzellen eine Rolle (Hank et al., 1990), sowie TAMs (Tumor associated macrophages).

In Abhängigkeit vom „microenvironment“ können TAMs zum Typ 1 (antitumor Effekte) oder Typ 2 (protumor Effekte) werden (Lewis et al., 2006). Besonders ausgeprägte Anti-Tumor-Effekte können in Gegenwart von Anti-GD2-Antikörpern durch M-CSF aktivierte Macrophagen erzielt werden (Munn et al., 1989).

Eine Reihe von Rezeptoren spielen bei der Granulozyten ADCC eine Rolle: CD16 (Fc γ RIII), (CD32 (Fc γ RIIa).

Ergänzend zu den Fc γ R sind auch die Complement-Rezeptoren CR3 und CR4 der Granulozyten kritische Adhäsionsmoleküle für diesen Typus der ADCC (Deo et al., 1997; Kushner et al., 1992). Van Egmond et al., 2001 berichteten, von der gemeinsamen Wirkung von CD89 (Fc α RI) und CD64 (Fc γ RI), dessen Expression durch IFN- γ oder G-CSF induziert werden kann, auf das killing der Tumorzellen.

Die Art der Glykosylierung des Fc-Fragmentes des Antikörpers beeinflusst die Fc-Rezeptor-vermittelte Aktivität: Neutrophile killen bevorzugt über stark fucosylierte Antikörper (bessere Bindung an Fc γ RII), während umgekehrt die ADCC von Mononuklearen Effektorzellen durch gering fucosylierte AK vermittelt wird (bessere Bindung an Fc γ RIIIa) (Peipp et al., 2008). Neben der Fc-Rezeptorbindung fand man bei IgG1 2F8, dass die Glykosylierung der Asn297 in der CH2 Domäne eine wichtige Rolle bei der Complementaktivierung (CDC) spielt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Anti-GD2 Antikörper (hu

Einleitung

14.18K332A, AK⁻) wurde durch den Austausch von Lysin gegen Alanin die Complementaktivierung verhindert.

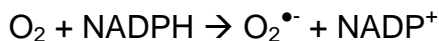
Die Abtötung der malignen Zellen kann, je nach Effektorzelle, über verschiedene Mechanismen verlaufen. Da in der vorliegenden Arbeit die ADCC von Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen untersucht wurde, wird im Folgenden näher auf deren Wirkungsmechanismen eingegangen.

1.4.1. Granulozyten ADCC (allgemein und beim Neuroblastom)

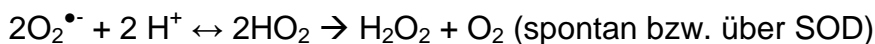
Laut Cheung (Cheung and Dyer 2013) ist die Granulozyten-ADCC gegen das Neuroblastom im Vergleich zu anderen Krebsarten von speziellem Charakter und klinisch von Bedeutung.

Neutrophile Granulozyten stellen die quantitativ größte Population innerhalb der Leukozyten dar (ca 40-70%). Ihre Hauptaufgabe ist die unspezifische Abwehr von Bakterien und Pilzen, die - als wichtigste Reaktion - phagozytiert und anschließend im Phagolysosom zerstört werden. Dabei kommt es zur Aktivierung einer NADPH-Oxidase (NOX-2), die Superoxid-Anion [O₂^{•-}] bildet:

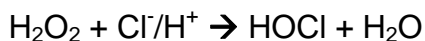
Reaktionsgleichungen (Halliwell and Gutteridge, 2007):



aus dem in weiterer Folge H₂O₂ entsteht:



das schließlich in der Myeloperoxidase-Reaktion weiter zu Hypochloriger Säure (HOCl) umgewandelt wird:



Einleitung

Die Bildung dieser reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, reactive oxygen species) ist für die Abtötung der Mikroorganismen essentiell, da ein Defekt der NADPH-Oxidase zu schwersten, lebensbedrohlichen Infektionen führt (Krankheitsbild der septischen Granulomatose, CGD) (Assari, 2006).

Interessanterweise spielen bei der Abtötung der Tumorzellen (insb. Neuroblastomzellen) reaktive Sauerstoffverbindungen als zytotoxisches Agens keine essentielle Rolle: Während bei der ADCC von Erythrozyten durch Granulozyten reaktive Sauerstoffverbindungen beteiligt zu sein scheinen (Borregaard und Kragballe, 1980), und auch bei manchen Tumorzellen ROS in der Tumorzelllyse involviert sein könnten (Hafeman and Lucas, 1979); (Weiss and LoBuglio, 1982); (weitere Zitierungen in Kushner and Cheung, 1991), spielt dieser Prozess bei anderen keine Rolle (Horner, 2007), so auch nicht beim Neuroblastom (Bruchelt et al., 1989a; Kushner and Cheung, 1991). Granulozyten von Patienten mit septischer Granulomatose waren sogar besser in der Lage, Neuroblastomzellen abzutöten, als Granulozyten von gesunden Personen (Bruchelt et al., 1989b).

Wenn ROS, eigentlich unerwarteterweise, bei der Granulozyten-ADCC keine Rolle spielen, welche Mechanismen spielen dann eine Rolle?

Für Neuroblastomzellen als Zielzellen konnten Barker and Reisfeld 1993 zeigen, dass bei der Granulozyten ADCC mit Hilfe des human/Maus chimere Anti-GD2 Antikörpers ch 14.18 eine Degranulation der Granula-Inhalte der Granulozyten erforderlich ist. Agenzien, die die Degranulation verhindern, hemmen die Zytotoxizität. Dabei spielen die kationischen Peptide Defensine (kationische Peptide; Mr 3000-4000), die an die Tumorzellen binden und sie permeabilisieren, eine große Rolle, ferner Cathepsin G (dessen Wirkung durch Phenylmethylsulfonylfluorid gehemmt werden konnte). Die ADCC war in Gegenwart von GM-CSF gehemmt, was durch eine erhöhte Degranulation durch GM-CSF erklärt wurde (Zipfel et al., 1997). An NB7 Neuroblastoma Zellen wurde darüber hinaus auch gezeigt, dass auch isoliertes Cathepsin G und Defensine (HNP1) die Lyse auslösen können, dass also kein Kontakt zwischen Effektor- und Targetzelle nötig ist.

Einleitung

Ein weiterer Mechanismus der Granulozyten-ADCC durch Apoptose konnte von Stockmeyer et al. an einer breast cancer Zelllinie mit Hilfe eines gegen HER-2/neu gerichteten Antikörpers gezeigt werden (Stockmeyer et al., 2003). Apoptose konnte bei einem niedrigen E:T (10:1) Verhältnis ausgelöst werden und war abhängig von der Interaktion mit dem Fc -Rezeptor der Granulozyten. In weiterführenden Arbeiten dieser Gruppe wurde gezeigt, dass Trogocytose-ähnliche Mechanismen der Granulozyten induzierten ADCC-Apoptose vorausgehen (Horner et al., 2007). Trogocytosis (von griech. togo: zernagen, fressen) wurde zuerst an T-, B- und NK-Zellen beobachtet (Joly and Hudrisier, 2003) und ist durch einen Austausch von Plasma-Membran-Bestandteilen zwischen Effektor und Targetzelle gekennzeichnet (=> Antigen-Rezeptor-Signaling), wie mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Membran-Lipiden gezeigt werden konnte.

1.4.2. Rolle von Perforin / Granzym bei der Granulozyten-ADCC

Perforin ist ein Poren erzeugendes monomeres Protein, welches mit der lytischen Komponente C9 des Complementsystems verwandt ist. Es wird aus Vesikeln der Killer-Zelle (NK-Zellen, cytotoxische T-Zellen) freigesetzt und polymerisiert in Gegenwart von Calcium unter Bildung von Transmembrankanälen in der Targetzell-Membran => Lyse der Targetzelle (Nekrose). Granzyme sind proteolytische Enzyme, die wahrscheinlich über Endozytose in die Targetzellen aufgenommen werden und dort Caspasen aktivieren => Apoptose (Russel and Ley 2002). Horner et al. (2007) beobachteten, dass durch Inhibierung von Perforin keine Hemmung der Granulozyten-ADCC erreicht werden konnte. Eine endgültige Klärung der Rolle von Perforin/Granzym bei der Granulozyten-ADCC steht aber noch aus.

Generell muss aber erwähnt werden, dass - im Vergleich zu NK-Zellen - Granulozyten, auch bei hohen E:T-Verhältnissen *in vitro* kaum in der Lage sind, Neuroblastomzellen direkt abzutöten (Bruchelt et al., 1989a). Auch in Gegenwart von Antikörpern (ADCC) ist die Effektivität im Vergleich zu ADCC

Einleitung

von NK-Zellen gering, kann aber in Gegenwart von G-CSF/GM-CSF, Interferonen (Hokland and Berg, 1981) sowie durch Vorbehandlung mit β -Glucan stark gesteigert werden (siehe Kapitel 1.6.).

1.5. CDC (Complement-dependent cytotoxicity)

GD2 stellt ein T-Zellen unabhängiges onkokoetales Antigen dar. Verschiedene Antikörper die gegen GD2 gerichtet sind werden in der Therapie des Neuroblastoms schon seit einigen Jahren, teils mit guten klinischen Erfolgen, eingesetzt (Übersicht bei Yang and Sondel, 2010). Potentielle Wirksysteme sind dabei, neben der ADCC Reaktionen, die Complement-dependent cytotoxicity (CDC). Die Aktivierung des Complementsystems, die auf verschiedene Weise erfolgen kann (siehe Abb. 3), führt dabei durch die Ausbildung von Poren in der Tumorzelle zu deren Zerstörung.

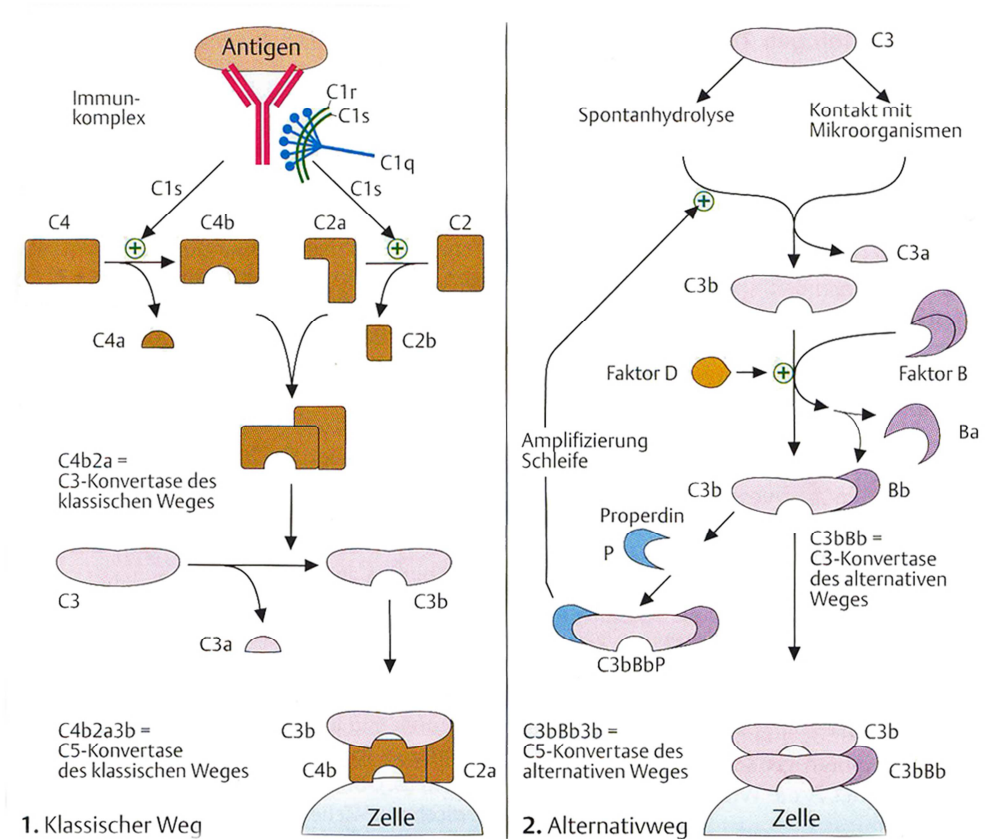


Abb. 3: Verschiedene Wege der Aktivierung des Complementsystems (aus: Taschenbuch der Immunologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, 2007).

Einleitung

Im Falle der CDC gegenüber Neuroblastomzellen durch Bindung der eingesetzten Antikörper an das Gangliosid GD2 ist zu berücksichtigen, dass dieses Gangliosid auch an verschiedenen normalen Körperzellen vorkommt, u.a. auch an den sog. „pain fibers“. Beim klinischen Einsatz der gegen GD2 gerichteten Antikörper bei der Behandlung des Neuroblastoms wurden als schwerwiegende Nebenwirkung starke Schmerzen bei den behandelten Patienten registriert, wobei der Verdacht auftrat, dass diese auf CDC gegen pain fibers zurückzuführen sei. Aus klinischen Studien war bekannt, dass die Anti-GD2 Applikation mit einem initialen Anstieg von C3a und gleichzeitigem Abfall von C3c gemeinsam mit einem Abfall von C4 verbunden ist (Handgretinger et al., 1992). Aus diesem Grund wurden Konzepte verfolgt, die gegen GD2 gerichteten Antikörper so zu verändern, dass durch einen Austausch einer Aminosäure (Lysin, K vs Alanin, A 322) an der Complementbindungsstelle keine CDC-Reaktion mehr ausgelöst werden kann. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen an Ratten zeigten, dass durch die Konstruktion von (hu 14.18.K322A) das tatsächlich erreicht werden konnte: Der Antikörper war - im Gegensatz zu dem ursprünglichen 14.18 - nicht in der Lage, CDC auszuführen, während ADCC (mit NK als Effektorzellen) uneingeschränkt möglich war (Sorkin et al., 2010).

1.6. Biological response modifiers (BRM): β -Glucan und Biobran®

Neben den „klassischen“ Cytokinen (GM-CSF, G-CSF, IL-2...) sind in der Literatur einige andere Substanzen (Biological response modifiers, BRM) beschrieben, die einen fördernden Einfluss auf die Aktivität von Effektorzellen haben. Dazu gehören β -Glucane und Araboxylane („Biobran®“).

1.6.1. β -Glucan

β -Glucane sind immunstimulierende Agenzien (BRM), die in der asiatischen Medizin seit vielen Jahrzehnten eingesetzt werden, aber zunehmend auch im Westen Verwendung finden (Chan et al., 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass sie zu einer Verbesserung der Anti-Tumorwirkung von mAbs führen. Je nach Herkunft sind die β -D-Glucopyranosyl-Polymere entweder primär $\beta(1,4)$ verknüpft (Hafer und Gerste) oder (1,3) mit kurzen $\beta(1,6)$ Ketten (Pilze). Makrophagen zerlegen sie in kleine aktive Fragmente, die an den Complement-Rezeptor CR3 (CD 11b/CD18; Mac 1, $\alpha M\beta 2$ -integrin) binden. CR3 kommt auf Macrophagen, NK, aber insbesondere bei Neutrophilen vor (Allendorf, 2005; Li et al., 2006; Li et al., 2007; Hong et al., 2006).

β -D-Glucane können die ADCC von NK-Zellen, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten steigern (Cheung and Modak, 2002).

Cheung und Modak konnten im Mausmodell zeigen, dass oral verabreichtes (1,3), (1,4)- β -D-Glucan synergistische Effekte mit dem Anti-GD2 Antikörper 3F8 (Maus IgG3) bei der Neuroblastomtherapie hervorrief (Cheung and Modak, 2002). In Zusammenhang mit der möglichen Rolle der Granulozyten bei der ADCC von Neuroblastom und anderen Tumorzellen ist auch die Studie von Hong et al., (2003) sehr interessant, die zeigen konnten, dass β -Glucan als Adjuvans die ADCC fördert, indem es Granulozyten rekrutiert.

Die erfolgversprechenden Daten führten dazu, dass am Sloan Kettering Cancer Center von Kushner et al. eine Studie an high-risk Neuroblastom unter Einschluss von β -Glucan initiiert wurde (siehe Tab.1) (Liu et al., 2009).

1.6.2. BIOBRAN®

Ein weiteres Polysaccharid (aus Pflanzenfasern), das als BRM eingestuft werden kann und oral aufgenommen wird, ist Biobran®/MGN-3 (ein Arabinoxylan). Dieses Heteroglykan (Hemicellulose) aus β -1,4 Xylose + 2,3, oder 2,3, verbundener Arabinose wird durch Hydrolysierung von Hemizellulose B aus Reiskleie + einem Enzymextrakt aus dem Shiitake-Pilz hergestellt.

Wirkung: Erhöht Aktivität und Anzahl von NK-Zellen, Stimulation von T und B Zellen, Anregung der Sekretion von TNF und IFN gamma (Zerbes, 2012).

Außerdem wurde beschrieben, dass Biobran®/MGN-3 die Abtötung von Mikroorganismen durch Phagozyten (Neutrophile und Makrophagen) erhöht (Steigerung der Phagocytose und des oxidativen bursts) (Ghoneum et al., 2008).

Mit Biobran®/MGN-3 wurden in der Kinderklinik Tübingen bereits Versuche bzgl. ihrer Wirkung auf NK-Zellen durchgeführt (Zerbes, 2012). In der vorliegenden Arbeit sollten einige Pilotversuche bzgl. der Granulozyten-ADCC durchgeführt werden.

1.7. Klinischer Einsatz von Anti-GD2-Antikörpern beim Neuroblastom

Aufbauend auf der Publikation von Yang und Sondel (2010) sind in Tabelle 1 verschiedene klinische Studien bezüglich des bisherigen Einsatzes verschiedener Anti-GD2 Antikörper beim Neuroblastom zusammengestellt. Klinische Tests wurden bereits mit verschiedenen Anti-GD2-Antikörpern durchgeführt: 3F8, 14.G2a (Maus), ch14.18 (Human mouse chimeric variant of 14.18 (Maus)).

Einleitung

Tab.1: Studien mit verschiedenen Anti-GD2 Antikörpern beim Neuroblastom.

Antikörper	Besonderheiten	Klin. Studien	Anmerkung	Ref.
I. Nur mAb				
3F8	Maus; in vitro: ADCC + CDC	+ phase I, II	HAMA	19 26 47 48
14.18	Maus, Isotype switch von 14.18, IgG3; CDC, ADCC	+	HAMA	54-56
Ch14.18	Human mouse chimeric variant of 14.18	+ phase I single agent therapie		58-59
Hu14.18K322A	Gleiche variable Region wie ch.14.18; 3 Unterschiede: 1. Humanisiert, nicht chimeric (→ weniger immunogen); 2. In Position 322: Single switch von K zu A: Keine Complement-Aktivierung 3. Produziert in : YB2/O statt CHO: Keine Fucosylierung der Fc-Region → Anstieg der ADCC	Phase I (St Jude)		
II. mAb + X				
14.G2a + IL-2	IL-2: Anstieg und Zahl von NK; Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen	Phase I Partielles Ansprechen	HAMA	64-65
CH14.18 + GM-CSF + IL-2 + CRA a) Pilot b) Phase III	c) Nach autologer Stammzelltransplantation	226 Patienten follow up: 2.1 Jahre event free Überleben: 67 vs 47% Generelles Überleben: 86 vs 76% zum Zeitpunkt 2 Jahre	b) Methode der Wahl	a) 67 68 b) 16
	(6 Zyklen isotretinoin) Standard Therapie für high risk Neuroblastoma: Myeloablative Therapie mit autolog. Stammzell-Rescue, gefolgt von Therapie mit Isotretinoin → > 50% relapse			
	Vs Immuntherapie: 6 Zyklen isotretinoin + ch14.18 + alternierend GM-CSF und IL-2			
	ADCC (ch14.18): erhöht durch GM-CSF (Ref 12 + 13 von Yu, NEnglJMed und durch IL-2 (Ref 14-16 von Yu, NEnglJMed)			
3F8 + β-glucan	β-glucan stimuliert TNF-alpha secretion erhöht ADCC		Gute Toleranz	71 72-76

Einleitung

Literatur (Referenzen aus Yang and Sondel). Die Zahlen beziehen sich auf die Literaturstellen bei Yang and Sondel.

16: Yu et al., 2010; 19: Cheung et al., 1985; 26: Cheung et al., 1987;
47: Cheung et al., 1998; 48: Cheung, 2000; 54: Mujoo et al., 1989;
55: Saarinen et al., 1985; 56: Munn and Cheung 1987; 58: Simon et al., 2004;
59: Simon et al., 2005; 64: Frost et al., 1997; 65: Hank et al., 1999;
67: Yu et al., 1997; 68: Yu et al., 1995; 71: Xia et al., 1999;
72: Vetvicka et al., 1997; 73: Di Renzo et al., 1991; 74: Vetvicka et al., 1996;
75: Czop and Austen, 1985; 76: Thornton et al., 1996

In der Arbeit von Yang und Sondel sind zusätzlich noch konjugierte Antikörper gegen GD2 aufgeführt (Radioimmunokonjugate, an die Zytokine gebunden sind (ch 14.18-IL2; hu 14.18-I1-2); allerdings haben diese mit der Fragestellung dieser Doktorarbeit nichts zu tun und werden deshalb hier nicht weiter thematisiert.

1.8. Ziel der Doktorarbeit

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Effekte zweier gegen GD2-gerichteter Antikörper auf ihre Wirksamkeit gegenüber GD2-exprimierenden Neuroblastomzellen zu untersuchen, wobei die CDC und die ADCC mit Granulozyten als Effektorzellen untersucht werden sollte. Die beiden Antikörper unterscheiden sich nur dadurch, dass einer der beiden („AK⁻“) keine Complementbindungsstelle besaß, und daher nur über die ADCC wirksam sein sollte:

AK⁺:

Antikörper gegen das Gangliosid GD2, mit Complement-Bindungsstelle
[CHIMERIC Antibody CH 14.18, Subclass: Human IgG/Kappa]

AK⁻: (hu 14.18.K322A)

Antikörper gegen das Gangliosid GD2, ohne Complement-Bindungsstelle
[Hu 14.18 MoAb] :→

In Position 322: Single switch von K (Lysin) zu A (Alanin): → Keine Complement-Aktivierung

Für die Untersuchungen sollte der ⁵¹Chrom-Assay bzw. der Europium-Assay verwendet werden.

Die ADCC-Untersuchungen sollten ohne bzw. nach Vorbehandlung der Granulozyten mit G-CSF bzw. GM-CSF sowie mit Biobran® durchgeführt

Einleitung

werden. Schließlich sollte untersucht werden, ob ROS einen Einfluss auf die Granulozyten-ADCC - insbesondere bei Verwendung von AK^- - ausübt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Biobran [®] /MGN-3, rein, Arabinoxylan, 10mg/ml Lösung	Braun
Bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylic acid, (BATDA, DELFIA)	PerkinElmer
D(+) Glucose	Sigma-Aldrich
Essigsäure (100%)	Merck
Ethanol	Merck
Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF, Neupogen [®])	Amgen
Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	Behring
H ₂ O ₂ , 30%	Merck
Histopaque 1119 und 1077	Sigma-Aldrich
Luminol	Sigma-Aldrich
Medunasal [®] -Heparin 500 I.U. [100 I.U./ml]	Meduna-Arzneimittel
NaOH	Merck
Na-chromat [⁵¹ Cr]	Hartmann Analytic, Braunschweig
Activity: 74 MBq (2 mCi)/ml PBS	
Spez. Activity: 0.28 TBq/mmol	
Phosphate Buffered Saline (PBS)	
Mit Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺ (PBS ⁺⁺)	Gibco
Ohne Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺ (PBS)	Gibco
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Zymosan	Sigma-Aldrich

Material und Methoden

2.1.2. Antikörper (AK)

AK⁺: Antikörper gegen das Gangliosid GD2, mit Complement-Bindungsstelle
CHIMERIC Antibody CH 14.18, Subclass: Human IgG/Kappa, 6mg/ml

AK⁻: Antikörper gegen das Gangliosid GD2, ohne Complement-Bindungsstelle

a) Hu 14.18 MoAb Development 8.6 mg/ml # 5/6 in PBS, 100mM Arginine
0.03% Tween-80, pH 6.0

b) Hu 14.18 MoAb Development 10 mg/ml Vial # 42

AK⁻ war ab dem 9. Versuch verbraucht, sodass anschließend eine neue AK-
Charge genutzt wurde. Die Antikörper wurden, wenn nicht anders vermerkt, in
einer f.c. von jeweils 1µg/ml Zellsuspension eingesetzt.

2.1.3. Geräte

Gerät:	Name:	Firma:
Blutbildanalysator	ADVIA 120	Bayer Technicon/ Siemens
Analysenwaage	Analytic AC210S	Sartorius 1205
Betaplate liquid Scintillation counter		Perkin-Elmer Wallac
Brutschrank	Hera cell	Heraeus
Feinwaage	M.C.1	Sartorius
Fluorimeter	Victor Multilable Counter	Perkin-Elmer
Inversmikroskop		Wilovert
Laborwaage	E400 D	Ohaus
Lichtmikroskop		Zeiss
Luminometer	Tropix TR717	Perkin-Elmer
Luminometer-Software	WinGlow	Perkin-Elmer
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph

Material und Methoden

Multipette	10µl, 100µl	Eppendorf
pH-Meter	pH 535 MultiCal	WTW-Weilheim
Pipetten	(10, 100, 1000µl)	Gilson
Pipettierhilfe	Pipettboy Plus	Integra Biosciences
Plattenschüttler		Heidolph
Sicherheitswerkbank	Hera safe	Heraeus
Ultraschallgerät	Sonifier B-12-Cell Disrupter	Branson-Sonic-Power
Vortex	(Mischgerät)	Heidolph
Wasserbad		Kottermann
Zentrifugen	Totixa 50 RS, Mikro 22 R	Hettich

Alle Daten wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel ausgewertet.

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Eppendorfcups (1,5; 2ml)	Eppendorf
Kulturflaschen 750ml	Corning
Kanülen, steril	Braun
LumaPlates™	Perkin-Elmer
Parafilm	Serva
Pipettenspitzen	Eppendorf
Repetierpipettenspitzen 10 µl, 100 µl	Eppendorf
Sterile Einmalpipetten (5, 10, 25ml)	Costar
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	Falcon
96 Well Platte, blickdicht	Wallac
96 Well Platte Rundboden	Corning
96 Well Platte Flachboden	Corning

2.1.5. Neuroblastom-Zelllinien

NB-1: GD2-positive humane Neuroblastomzelllinie mit nicht eindeutiger Herkunft
Diese Neuroblastomzelllinie war GD2-positiv (FACS-Analyse, durchgeführt von Frau Dr. Sabine Schleicher, Kinderklinik Tübingen), konnte aber ansonsten nicht eindeutig zugeordnet werden.

NB-2, Kelly: GD2-positive humane Neuroblastomzelllinie von DSMZ Braunschweig (Schwab et al., 1983); (Preis et al., 1988).

2.1.6. Zellkulturmedien

Roswell Park Memorial Institute – Medium 1640 [RPMI 1640]	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml; 10 000 µg/ml)	Biochrom
L-Glutamin (200mM)	Biochrom
FCS (fetal calf serum)	Biochrom
Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)	Biochrom

Die Zellkulturzusätze FCS, Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin wurden bei -20°C gelagert und zur einfacheren Nutzung aliquotiert.

Das RPMI 1640 Medium wurde im 4°C Kühlraum gelagert und nach Zugabe der Zusätze im 4°C Laborkühlschrank aufbewahrt.

Inaktivierung von FCS

Zur Inaktivierung (Complement-Inaktivierung) wurde FCS bei 56°C für 30 min im Wasserbad erhitzt => FCS_i (FCS inaktiv).

Material und Methoden

RPMI⁺: 500ml RPMI Medium wurden mit 5ml Penicillin/Streptomycin (P/S) und 5ml L-Glutamin (200mM) versetzt.

RPMI⁺/FCS_i: 500 ml RPMI⁺ + 50ml inaktiviertes FCS (FCS_i)

[Medium 1, Standardmedium]

Für die Complementlyse wird Medium benötigt, dem FCS zugeführt wird, welches zuvor nicht inaktiviert wurde.

RPMI⁺/FCS_a: 500ml RPMI⁺ Medium + 50ml aktives FCS (FCS_a) [Medium 2]

Einfriermedium

Die gewünschte Menge an RPMI⁺ Medium wurde mit 20% (v/v) inaktiviertem FCS (FCS_i) und 10% (v/v) DMSO als Kristallisationsschutz versetzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeines zum Arbeiten mit Zellkulturen

Das Passagieren sowie Einfrieren der Zellen fand immer unter sterilen Bedingungen statt. Auch die Herstellung von Medien und Verdünnungen von Antikörpern wurde steril durchgeführt. Vor Gebrauch wurden das Medium und Trypsin immer im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Zellsuspensionen wurden, sofern nicht explizit anders erwähnt, immer bei 400g und 3°C für 5 min abzentrifugiert.

2.2.2. Kultivierung der Neuroblastomzellen

Zunächst wurden die Zellen aus dem Stickstofftank im Stickstofflager geholt, auf Eis transportiert und aufgetaut. Anschließend wurden sie zum Waschen in

Material und Methoden

ein 50ml Röhrchen überführt und mit 35ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt. Wie oben beschrieben wurden die Zellen für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das auf dem Boden befindliche Zellpellet wurde mit vorgewärmtem Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) resuspendiert und in eine 750ml Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurde das Volumen auf 35ml mit Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt und die Flasche mit leicht geöffnetem Deckel bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank gezüchtet. Je nach Bedarf musste das Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) von 35ml Volumen/Flasche ca. alle 3 Tage gewechselt werden (Farbveränderung des Mediums von rot zu orange-gelb).

2.2.3. Subkultivierung der Zellen

Der adhärent wachsende Zellrasen auf dem Boden der Kulturflasche wurde mikroskopisch geprüft. Passagiert wurde, wenn der Flaschenboden zu ca. 80-90% bewachsen war. Dazu wurde das Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) mit der Vakuumpumpe unter der Sterilbank abgesaugt und 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 60 Sekunden wurden die Zellen durch mechanisches Klopfen vom Boden der Flasche gelöst und 7,5ml frisches Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) zugegeben, um die Wirkung von Trypsin zu stoppen. Die Zellsuspension wurde gut resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt, die jeweils mit frischem Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) auf 35ml aufgefüllt wurden.

2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen mussten die Zellen, wie vorab beschrieben, abtrypsinieren werden. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50ml Röhrchen überführt, mit 45ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 3-5ml Medium 1

Material und Methoden

(RPMI⁺/FCS_i) gut resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblau-Lösung vermischt. Von diesem Gemisch wurden 8,5 µl in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Durch das Trypanblau wurden die toten im Gegensatz zu den lebenden Zellen blau angefärbt. Die lebenden, zu zählenden Zellen, waren als helle Strukturen mit dunkler Umrandung zu erkennen. Bei der Zählung wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 20% der Zellen Trypanblau-positiv waren, da ansonsten im Test eine zu hohe Spontanlyse zu erwarten ist. Es wurden 2-4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt und der Mittelwert zur Errechnung der Zellzahl/ml verwendet. Dieser Mittelwert wurde mit 2 multipliziert, da die Zellsuspension zuvor 1:1 mit Trypanblau verdünnt wurde.

Zur Berechnung wurde folgende Gleichung genutzt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times 2 \times 10^4$$

Um auf die gewünschte Zellzahl zu kommen, wurde die Zellsuspension mit frischem Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) entsprechend verdünnt.

2.2.5. Einfrieren der Zellen

Das Kulturmedium wurde abgesaugt, nachdem sich ein konfluenter Zellrasen auf dem Boden der Kulturflasche gebildet hatte. Die adhärennten Zellen wurden mit 2ml Trypsin/EDTA abgelöst und in geringem Volumen Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei 400g wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit Einfriermedium versetzt und die Suspension auf Cryoröhrchen verteilt. Im direkten Anschluss wurden die Röhrchen mit Papiertüchern umwickelt und über Nacht auf -80°C heruntergekühlt. Zur längerfristigen Konservierung wurden die Cryoröhrchen anschließend auf Trockeneis zum Stickstofflager transportiert und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.6. Blutentnahme und Isolierung der Leukozyten

Das Blut wurde jeweils kurz vor Versuchsbeginn von freiwilligen Blutspendern unter ärztlicher Aufsicht und nach Aufklärung der Spender durch venöse Punktion entnommen. Die zur Entnahme genutzten Spritzen wurden zuvor mit Heparin versehen. Dabei wurde zu 20ml Vollblut jeweils 1ml Heparin [100 Units] vorgelegt.

Zur Serumgewinnung wurde Blut mit dafür vorgesehenen Serum-Röhrchen abgenommen. Nach ca. 30 min wurde das Blut zentrifugiert und der Überstand, das Serum, in 1,5ml Eppendorf-Cups aliquotiert. Die Serum-Eppendorf-Cups wurden bei -20°C eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

2.2.6.1. Granulozytenisolierung aus Vollblut

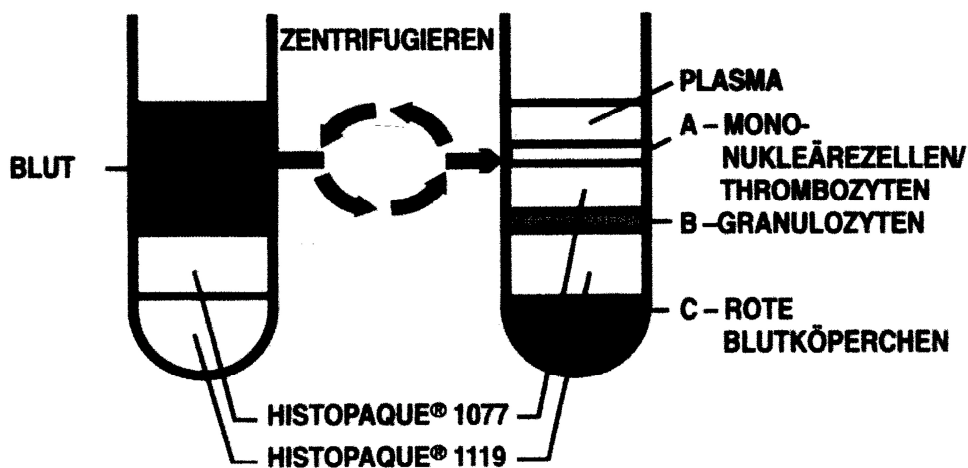


Abb. 4: Blutprobenaufarbeitung mittels Histopaque (Firmenheft SIGMA Diagnostics, INC).

Material und Methoden

Durchführung

Zunächst wurde bei freiwilligen Spendern venöses Blut entnommen und heparinisiert [100 I.U./ml]. Je nach Granulozytenbedarf wurden 15ml Falcon-Röhrchen mit den beiden Dichtegradientenlösungen Histopaque 1119 und 1077 beschickt. In jedes Röhrchen wurden dazu 3,75ml Histopaque 1119 abgefüllt, anschließend wurden jeweils 3,75ml Histopaque 1077 langsam über die erste Lösung gegeben. Die sich überlagernden Dichtegradientenlösungen wurden nun mit 5ml heparinisiertem Vollblut überschichtet und bei 633g, 20 min, 3°C und An- und Rücklauf Stufe 3 zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden das thrombozytenreiche Plasma, die Schicht der mononukleären Blutzellen und die obere Histopaqueschicht vorsichtig bis zur unteren Histopaqueschicht abgesaugt und verworfen. An der Grenze zur unteren Schicht hatten sich die Granulozyten angesiedelt. Diese Schicht mit Granulozyten wurde in allen Röhrchen vorsichtig mittels Pipette abgehoben. Dabei war darauf zu achten, dass die sich am Boden des Falcon-Röhrchens befindliche Erythrozytenschicht nicht aufgewirbelt wird. Die so gewonnenen Granulozyten wurden in 50ml Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS (mit Ca^{++} und Mg^{++}) aufgefüllt und bei 400g, 3°C für 10 min zentrifugiert.

Im weiteren Verlauf wurde nach dem Zentrifugieren der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 4ml PBS^{++} aufgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis kühl gelagert.

Zur Zellzahlbestimmung am ADVIA 120 wurden aus der Granulozytensuspension 400 μl in ein Eppendorf-Röhrchen überführt.

2.2.6.2. Isolierung der mononucleären Blutzellen (MNBC)

Je nach Aufgabenstellung wurden neben den Granulozyten bei manchen Versuchen auch die mononucleären Blutzellen aus dem heparinisierten Vollblut isoliert.

Material und Methoden

Hierzu wurde zunächst nur die erste Schicht, das Thrombozyten-haltige Heparin-Plasma, aus den Röhrchen abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde die dünne Schicht mit den mononukleären Blutzellen mit einer Pipette aufgehoben und ebenso wie die Granulozyten, in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt (siehe Abb. 4). Die weiteren Schritte wurden wie bei der zuvor beschriebenen Granulozytenisolierung durchgeführt.

2.2.6.3. Gewinnung von Heparin-Plasma

Auch hierzu konnte die Gewinnung im Zuge der Granulozytenisolierung durchgeführt werden. Wie in Abbildung 4 zu erkennen, bildet die oberste Schicht das thrombozytenreiche Heparin-Plasma. Dieses wurde je nach Volumenbedarf in 15ml Falcon-Röhrchen abgefüllt und zentrifugiert (5 min, 3000g), um die Thrombozyten zu entfernen. Anschließend wurden 1ml-Portionen in Eppendorf-Cups aliquotiert und für weitere Versuche bei -20°C eingefroren.

2.2.7. Bestimmung des Differentialblutbildes mit dem ADVIA 120

ADVIA 120

Zur Bestimmung des Differentialblutbildes wurde das Blutanalysegerät ADVIA 120 der Firma Siemens verwendet, mit dem entweder ein kleines oder ein großes Blutbild bestimmt werden kann. Es wird in der Tübinger Kinderklinik zur hämatologischen Routinediagnostik eingesetzt. Da das Messprinzip des Gerätes zur Differenzierung der Leukozyten über die Bestimmung der Peroxidase-Aktivität verläuft, wird es hier näher vorgestellt, da im Zusammenhang mit den Myelo-Peroxidase (MPO)-positiven Granulozyten wichtige Informationen erhalten werden (→ Problem der Degranulierung während der Granulozytenpräparation, siehe später).

Material und Methoden

Messung mit dem ADVIA 120

Zur analytischen Einheit des ADVIA 120 gehört das Durchflusszytometer mit Laser, Halogenlampe und Hämoglobin-Photometer.

Das Gerät hat vier Kanäle: Erythrozyten-/Thrombozyten-, Hämoglobin-, Peroxidase- und Basophilenkanal. Nach Aufnahme des heparinisierten Blutes wird die Probe in diesen vier Kanälen auf die unterschiedlichen Parameter untersucht. Hierbei erfolgt die Messanalytik nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie (Anmerkung: Normalerweise wird in der Routinediagnostik EDTA-Blut verwendet, heparinisiertes Blut liefert ungenaue Thrombozytenwerte, was aber für die in dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungen keine Rolle spielt).

Bei dieser Arbeit kam es vor allem auf die Bestimmung und Differenzierung der Leukozytenkonzentration an, da bei der Granulozytenisolierung die Zellzahl bestimmt und die Isolierung auf Reinheit und Vitalität untersucht werden mussten.

Die Erythrozyten-/Thrombozyten- und Hämoglobinkanäle dienen der Bestimmung des kleinen Blutbildes mit Ausnahme der Leukozytenzahl.

Zur Bestimmung der Leukozytenkonzentration dienen der Peroxidasekanal und der Basokanal (siehe Abb. 5). Hierbei erfolgt die Trennung in fünf Zellpopulationen im Peroxidasekanal durch Halogenlicht an peroxidasegefärbten Leukozyten (Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten), Peroxidase-negative Lymphozyten + basophile Granulozyten und LUC (large unstained cells) über Volumen (Streulicht) und Peroxidaseaktivität (Absorption).

Die Separierung von Mononukleären (Lymphozyten + Monozyten), Polymorphkernigen (neutrophile + eosinophile Granulozyten) sowie basophilen Granulozyten erfolgt im Basokanal durch Doppelwinkel-Laserstreulicht an Leukozytenkernen. Nur die basophilen Granulozyten werden bei der Vorbehandlung nicht lysiert und können deshalb eindeutig von den anderen Leukozyten unterschieden werden.

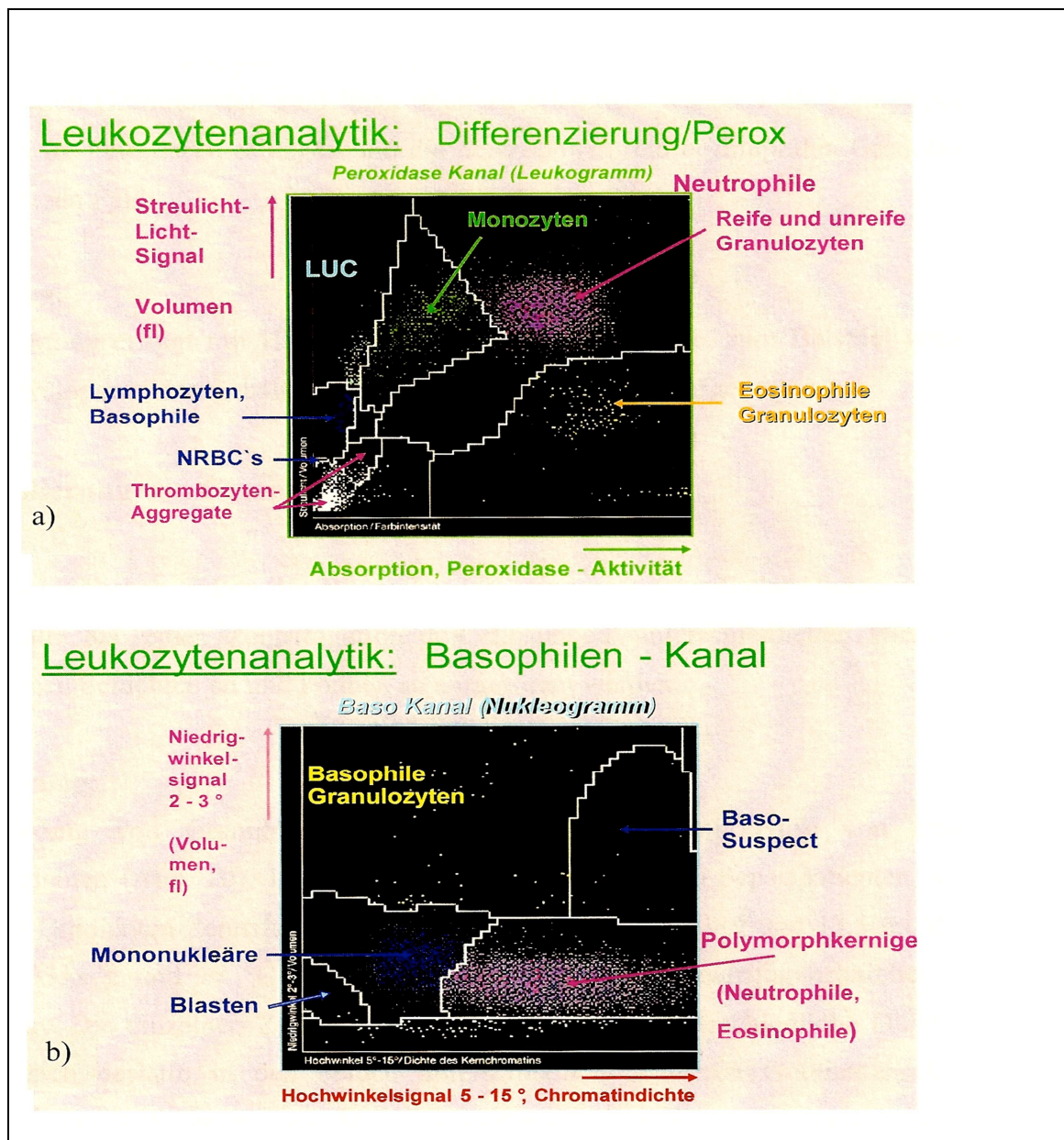


Abb. 5: Vollblut-Leukogramm. Punktwolke der Leukozyten, gemessen am ADVIA 120 im Perox- und Baso-Kanal (von Bayer-Vital/Siemens).

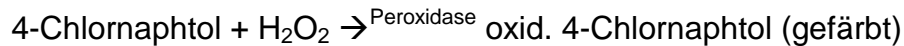
Anmerkung: a) Perox-Kanal: Auf der x-Achse in der Perox-Graphik ist die Peroxidaseaktivität nach rechts ansteigend dargestellt. Auf der y-Achse ist das Streulichtverhalten der Zellen zu sehen. Trümmer, Thrombozyten und die Non Red Blood Cells (NRBCs) sind unten links dargestellt. Darüber sind Lymphozyten und basophile Granulozyten zu finden. Im Feld oben links werden die großen unidentifizierten Zellen (LUC) abgebildet, rechts davon die Monozyten. Die reifen neutrophilen Granulozyten sind rechts oben zu sehen. Im Bereich darunter sind die eosinophilen Granulozyten aufgezeigt.

b) Baso-Kanal: In diesem Kanal können die basophilen Granulozyten von Lymphozyten unterschieden werden. Dies geschieht durch unterschiedliches Streuwinkelverhalten. Die basophilen Granulozyten sind links oben zu erkennen, während die Lymphozyten und Monozyten im Feld darunter zu dargestellt sind. Im Feld unten rechts befinden sich die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten.

Material und Methoden

Der Peroxidase-Kanal

Ein kleiner Teil der Blutprobe wird mit dem Peroxidaserreagenz (4-Chlornaphtol; H₂O₂) von Peroxidase positiven Zellen angefärbt:



und in der Flußküvette analysiert.

Peroxidase positive Zellen sind die eosinophilen Granulozyten (eosinophile Peroxidase), die neutrophilen Granulozyten (MPO) und - in geringerem Ausmaß - die Monozyten (MPO).

Zur fotometrischen Bestimmung der Enzymaktivität dient eine Halogenlampe. Die Zellgröße/Granularität wird mit der Streulichtmessung bestimmt.

Die Peroxidaseaktivität wird gegen die Lichtstreuung (Zellgröße, Granulation) im Diagramm aufgetragen. Eine Besonderheit, gerade im Hinblick auf die Verwendung von isolierten Granulozyten, ist der Umstand, dass die durch die Labilität der Granulozyten verursachte teilweise Degranulation (durch mechanischen Stress u.a. während der Zentrifugation), zu einem Verlust der MPO führt, wodurch sich die Granulozytenwolke in charakteristischer Weise nach links (Richtung Monozyten/LUC) verschiebt (siehe Abb. 6).

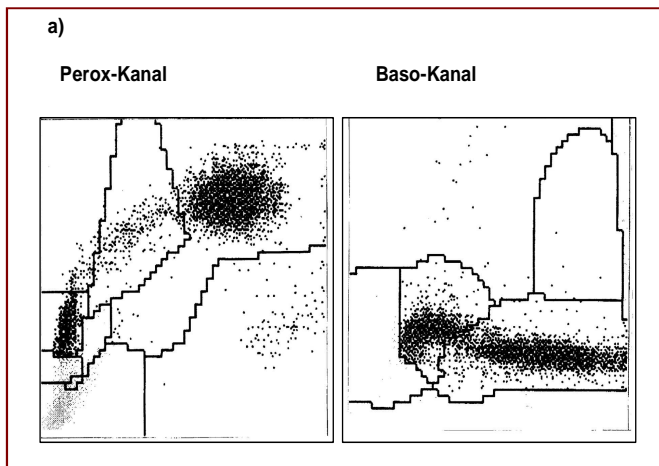
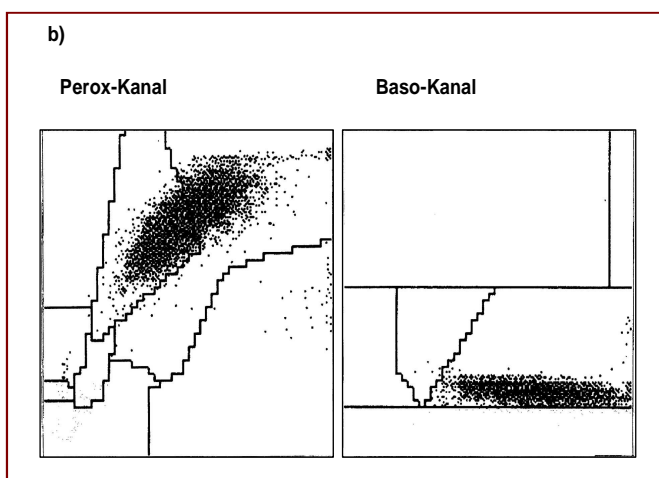


Abb.6: Charakteristische Linksverschiebung der Granulozytenwolke im Perox-Kanal nach Histopaque-Isolierung.

Im Baso-Kanal (Messung der Zellkernform) erscheint nach der Isolierung fast ausschließlich die Fraktion der Polymorphkernigen Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile)

a) Perox- und Baso-Kanal im Vollblut.



b) Perox- und Baso-Kanal nach Isolierung der Granulozyten; sehr reine Granulozyten-Fraktion, ca. 95% (Baso-Kanal).

*Perox-Kanal:
Ein erheblicher Teil der Granulozyten ist durch die Degranulation in das Monozytenfeld verschoben (-> falsche %-Zuordnung im*

Der Baso-Kanal

Im Baso-Kanal wird die Anzahl der mononukleären Blutzellen, (MNBC, Lymphozyten + Monozyten), der polymorphkernigen Zellen (neutrophile und eosinophile Granulozyten) und basophilen Granulozyten in getrennten Feldern bestimmt. Da in diesem Kanal die Kernmorphologie der Leukozyten dargestellt wird, wird er auch Kernsegmentierungskanal genannt. Hier werden die Zellkerne vom Zytoplasma befreit („stripping“) und im Doppelwinkel-Laserstreulicht gemessen.

Prinzip der Messung: Ein Teil der Blutprobe wird mit dem „Cytoplasmatic stripping Reagenz“ behandelt. Dieses Reagenz lysiert alle zytoplasmatischen

Material und Methoden

Membranen, mit Ausnahme der Membranen der Basophilen. Die so behandelte Suspension wird nun durch eine Flussküvette geleitet. Dort wird das Streulicht in zwei verschiedenen Winkelbereichen ($2-3^\circ$ und $5-15^\circ$) gemessen. Diese beiden Winkelbereiche werden in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen (siehe Abb. 6).

Aus den Werten des Perox- und Basokanals errechnet das Gerät die Leukozytenzusammensetzung der Blutprobe.

2.2.8. Europium-Assay

2.2.8.1. Prinzip und Durchführung

Die Methode des Europium-Assay ist eine Alternative zum klassischen $^{51}\text{Chrom}$ -Assay und dient der Bestimmung der Zytotoxizität von Effektorzellen (Natürliche Killerzellen, Monozyten, Granulozyten...) gegenüber verschiedenen Targetzellen. Im Vergleich zum $^{51}\text{Chrom}$ -Assay ist der Europium-Assay ein nicht-radioaktiver Zytotoxizitätstest.

Prinzip

Um die Zytotoxizität feststellen zu können werden zunächst die Targetzellen mit BATDA inkubiert, welches die Zellwand leicht passieren kann. Der Ligand wirkt intrazellulär fluoreszenzverstärkend. Die Esterbindungen des Liganden werden intrazellulär hydrolysiert, sodass eine hydrophile Verbindung (TDA) entsteht, die die Zellwand nicht mehr passieren kann (siehe Abb. 7a). Der Ligand kann nur von lysierten Zellen freigesetzt und so im Zellüberstand nachgewiesen werden (siehe Abb.7b).

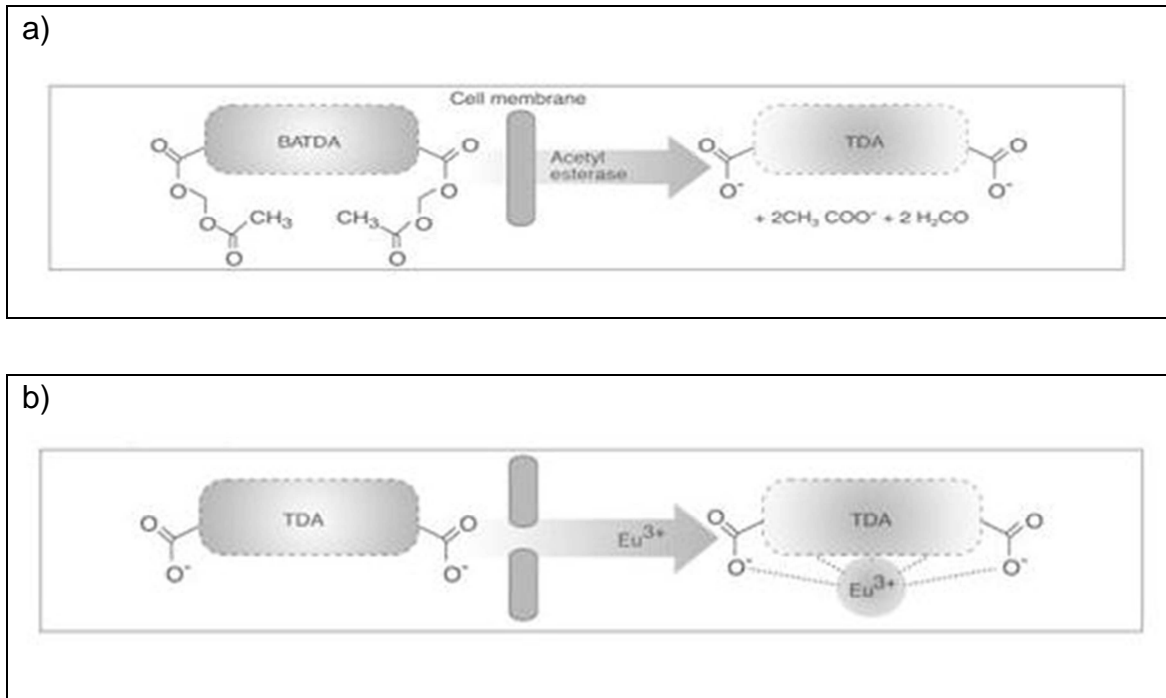


Abb. 7: Prinzip der Zellmarkierung mit BATDA.

a) Nachdem der Ligand die Zellmembran der Targetzelle passiert hat, hydrolysiert er durch die Acetyl-Esterase in der Zelle zu TDA.

b) Nur bei der Lyse von Targetzellen wird TDA freigesetzt. Nach Zugabe von Europium-Lösung im Überstand bildet sich ein fluoreszierender Chelat-Komplex. (aus Perkin Elmer Produktinfo: Cell Cytotoxicity Assay).

Material und Methoden

Die mit BATDA markierten Targetzellen werden zusammen mit den Effektorzellen (Granulozyten oder MNBC) inkubiert. Haben die Effektorzellen auf die Targetzellen zytotoxischen Einfluss, so setzen die lysierten Zellen den hydrophilen Liganden TDA wieder frei. Unter Zugabe von Europiumlösung bildet sich aus dem in den Überstand freigesetzten Liganden ein stark fluoreszierender, stabiler Chelatkomplex, EuTDA, dessen Menge sich mittels Fluorometer zeitversetzt bestimmen lässt (siehe Abb. 8).

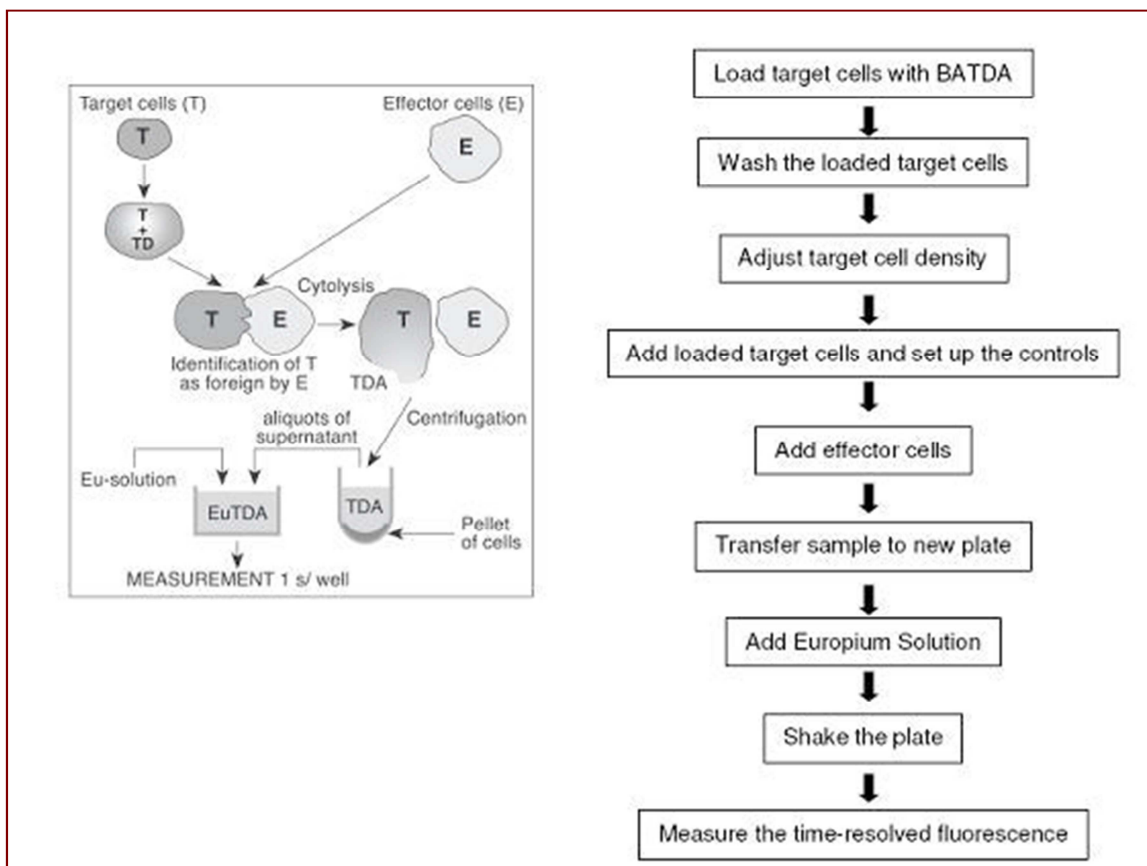


Abb.8: Prinzip des EuTDA-Assays: Effektorzellen schädigen die Zellmembran der Targetzellen, wodurch TDA aus diesen freigesetzt werden kann. Nach Zugabe der Europium-Lösung entsteht der stabile EuTDA Chelatkomplex, dessen Fluoreszenz gemessen wird (aus Perkin Elmer Produktinfo: Cell Cytotoxicity Assay).

Material und Methoden

Berechnung der spezifischen Lyse

Um die spezifische Zytotoxizität der Effektorzellen auf die Targetzellen zu berechnen, wird das Ergebnis (% spezifische Lyse) auf die maximalen Zelllyse sowie die Spontanlyse (ohne Effektor-Zellen) bezogen.

Die Spontanlyse ist der Wert, der durch spontanen Zellzerfall und somit Freisetzung des Liganden erreicht wird, ohne Einfluss von Effektorzellen.

Die Maximallyse ist der Wert, der erreicht ist, wenn alle Targetzellen lysiert sind.

Die spezifische Lyse sollte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Spezifische Lyse in \%} = (\text{Messwert} - \text{Spontanlyse} / \text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}) \times 100$$

Durchführung

Gewinnung und Markierung der Targetzellen (Neuroblastomzellen)

Die im Brutschrank über einige Tage herangewachsenen NB-Zellen wurden vom Zellkulturmedium Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) befreit, und mit ca. 2,5ml Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abtrypsiniert. Die NB-Zellen wurden mit dem zuvor auf 37°C angewärmten Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) versetzt und zentrifugiert (5 min, 400g). Nach dem Zentrifugieren wurde das Medium abgesaugt, das Zellpellet in frischem, angewärmtem Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) vorsichtig resuspendiert und auf 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt. Dieser Zellsuspension wurden 4µl pro ml Zellsuspension BATDA Lösung zugeführt und 60 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dem Inkubieren wurde die Zellsuspension gewaschen. Dazu wurde sie zunächst erneut bei 400g für 5 min zentrifugiert, das Medium abgesaugt, das Pellet mit frischem, angewärmtem Medium aufgefüllt und vorsichtig resuspendiert. Dieser Vorgang wurde 4 mal wiederholt. Nach dem Waschvorgang wurde das Zellpellet erneut mit frischem

Material und Methoden

Medium aufgefüllt, gut resuspendiert, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf 50.000 Zellen/ml eingestellt (siehe Kapitel 2.2.4.).

Gewinnung und Vorbereitung der Effektoren (Granulozyten)

Die Präparation der Granulozyten und Markierung der Neuroblastomzellen wurden am gleichen Tag durchgeführt.

Die Granulozyten wurden, wie in Kapitel 2.2.6.1. beschrieben, isoliert und im Zellkulturmedium 1 resuspendiert und auf die benötigte Zellzahl/ml eingestellt.

Die Effektorzellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zu einer gleichbleibenden Anzahl von Targetzellen gegeben (E:T-Verhältnis E:T 50:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1).

Die jeweilige Granulozytensuspension wurde bei einigen Versuchen vor Inkubation mit den Targetzellen für 2 Stunden mit unterschiedlichen Zusätzen (GM-CSF, G-CSF, Biobran[®]) vorinkubiert, um deren Wirkung auf die Zelllyse zu analysieren.

Testansatz (Beschickung der 96-Well-Platten)

Der Test wurde in einer Rundboden-Mikrotiterplatte (U-Form, 96 Kavitäten) angesetzt.

In allen Europium-Versuchen wurden der Background, die Spontanlyse, Maximallyse mit Lysepuffer und Maximallyse mit Ultraschall bestimmt. Von jedem dieser vier Testansätze wurden 4 Wells beschickt.

Background: Um den Background zu bestimmen wurden 600-1000µl der markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen in einem Eppendorfcup 2 min bei ca. 1000 g zentrifugiert und der Überstand (500µl) abgehoben. Von diesem wurden je 100µl in 4 Wells verteilt und 100µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) zugegeben.

Material und Methoden

Spontanlyse: Von den markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen wurden je 100µl in 4 Wells pipettiert. Alle 4 Wells wurden dann mit 100µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt.

Maximallyse mit Lysepuffer: Von den markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen wurden je 100µl in 4 Wells pipettiert. Diesen wurden jeweils 20µl Lysepuffer und 80µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) zugegeben.

Maximallyse mit Ultraschall: Von den markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen wurden 1000µl in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und mit Ultraschall zertrümmert. Davon wurden je 100µl in 4 Wells gegeben und mit 100µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt.

2.2.8.2. ADCC

Um herauszufinden, welche Wirkung Effektorzellen unter Zugabe von 2 verschiedenen Antikörpern gegen das Gangliosid GD2 der Neuroblastomzellen (NB) haben (ADCC), wurden weitere Wells beschickt. Als Effektorzellen wurden in den meisten Versuchen Granulozyten (Gr) verwendet. In manchen Versuchen kamen allerdings auch MNBC zum Einsatz.

Mit jedem Ansatz wurden immer 3 Wells wie folgt beschickt:

100µl Gr + 100µl NB + 10µl oder 20µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) od. PBS

100µl Gr + 100µl NB + 10µl oder 20µl AK⁺ bzw. AK⁻ in Medium 1 (1µg/ml)

Vorbereitung

In 3 Wells wurden jeweils 100µl der zuvor markierten Neuroblastomzellen pipettiert und eine gewisse Menge (in den meisten Versuchen 10µl) Medium oder PBS zugegeben.

Material und Methoden

In 3 Wells wurden ebenfalls jeweils 100µl der zuvor markierten Neuroblastomzellen pipettiert. Hier wurde in jedes Well zusätzlich eine gewisse Menge (in den meisten Versuchen 10µl) AK⁺ bzw. AK⁻ zugegeben. Die wie unter „Testansatz“ beschickte 96-Well-Platte wurde nun für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, damit die AK an das Gangliosid GD2 der Neuroblastomzellen binden konnten. Anschließend wurden jeweils 100µl Effektorzellen (Granulozyten bzw. MNBC) in der benötigten Konzentration (E:T-Verhältnis 50:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1 oder 2,5:1) zugegeben.

2.2.8.3. CDC

Um die beiden Antikörper (AK⁺/AK⁻) auf ihre Fähigkeit zur Complementlyse hin zu testen, wurden Versuche durchgeführt, in denen keine Effektorzellen im Testsystem anwesend waren. Die Wells wurden wie folgt beschickt:

100µl NB-Zellsuspension + 100µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) + 10-20µl PBS

100µl NB + 100µl Medium 2 (RPMI⁺/FCS_a) + PBS

100µl NB + AK⁺/AK⁻ + 100µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i)

100µl NB + AK⁺/AK⁻ + 100µl Medium 2 (RPMI⁺/FCS_a)

Die vorgelegten 100µl NB-Zellsuspensionen wurden für ca. 30 min im Brutschrank mit den Antikörpern inkubiert, bevor anschließend die entsprechenden Medien ± Zusätzen zugegeben wurden.

In einem weiteren Ansatz wurden die mit AK beladenen Neuroblastomzellen mit jeweils 100µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) versetzt und anschließend wurden 10-20µl Serum oder Heparin-Plasma dem Ansatz zugegeben.

NB + Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) + Medium oder PBS

NB + Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) + Serum/Heparin-Plasma

NB + Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) + AK⁺ bzw. AK⁻

NB + Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) + AK⁺ bzw. AK⁻ + Serum/Heparin-Plasma

2.2.8.4. ADCC + CDC

Um die möglichen ADCC und CDC Effekte kombiniert zu untersuchen, wurden die dafür vorgesehenen Wells sowohl mit Effektorzellen (Granulozyten), als auch mit Serum/Heparin-Plasma oder Medium 2 (RPMI⁺/FCS_a) beschickt.

100µl Gr + 100µl NB + 10-20µl Serum/Heparin-Plasma oder Medium 2 (RPMI⁺/FCS_a) + PBS

100µl Gr + 100µl NB + 10µl Serum/Heparin-Plasma oder Medium 2 (RPMI⁺/FCS_a) + 10µl AK⁺ bzw. AK⁻

In 3 Wells wurden jeweils 100µl zuvor markierte Neuroblastomzellen pipettiert, und eine bestimmte Menge (in den meisten Versuchen 10µl) der entsprechenden Zusätze gegeben.

Die so beschickten 96-Well-Platten wurden nun für ca. 30 min im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert, damit die AK an den Neuroblastomzellen binden konnten. Nach der Inkubation wurden die Wells mit jeweils 100µl Granulozytensuspension und einer gewissen Menge (meist 10µl) Serum/Heparin-Plasma oder Medium 2 (RPMI⁺/FCS_a) aufgefüllt.

Weitere Prozessierung aller Ansätze

Waren die 96-Well-Platten vollständig beschickt, wurden sie für 2 min bei 400 g anzentrifugiert und für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert (200g, 5 min) und 20µl der jeweiligen Überstände in die Wells einer Flachbodenplatte, die zuvor mit je 200µl Europiumlösung bestückt wurde, transferiert. Die so vorbereiteten Flachbodenplatten wurden für 20 min auf einem Horizontalschüttler inkubiert, anschließend wurde die Fluoreszenz am Victor Multilabel-Counter gemessen.

2.2.9. [⁵¹Cr]Chrom-Assay

Zusätzlich zu den Europium Versuchen wurde ein Teil der Untersuchungen auch mit dem ⁵¹Chrom-release Assay durchgeführt.

Auch bei diesen Versuchen wurden als Effektorzellen Granulozyten und MNBC, und als Targetzellen Neuroblastomzellen (NB-1/NB-2) verwendet.

Ebenfalls wurden die beiden Antikörper (AK⁺/AK⁻) eingesetzt. Je nach Versuch wurde außerdem GM-CSF, G-CSF zur Aktivierung der Granulozyten, wie auch Serum, Heparinplasma und H₂O₂ verwendet.

2.2.9.1. Gewinnung und Markierung der Neuroblastomzellen

Zunächst wurden die Neuroblastomzellen, wie unter Kapitel 2.2.4. beschrieben, gewonnen. Diese wurden auf 4x10⁶ Zellen/10ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) eingestellt und im Brutschrank in einem 15ml-Zentrifugenröhrchen mit geöffnetem Deckel bis zum Einsatz inkubiert. Unmittelbar vor der Markierung mit ⁵¹Chrom wurden die Neuroblastomzellen zentrifugiert (5 min, 400 g), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet im gleichen Röhrchen in 500µl RPMI⁺/FCS_i gut resuspendiert.

Zu den Neuroblastomzellen wurde ⁵¹Chrom-Lösung (zu 500µl Neuroblastomzellsuspension 10 µl [⁵¹Cr]-Natriumchromat (740 KBq / 20µCi)) gegeben und die Zellsuspension für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die mit ⁵¹Chrom markierten Zellen 3x mit je 10ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift und Abpipettieren des Rücklaufs wurde das Zellpellet in 10ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) resuspendiert und davon je 100µl/Well auf eine 96-Well-Rundbodenplatte verteilt.

2.2.9.2. Isolierung und Vorbehandlung der Granulozyten und MNBC

Die Isolierung der Granulozyten und MNBC wurde - wie in Kapitel 2.2.6.1. und Kapitel 2.2.6.2 beschrieben - durchgeführt. Die Granulozytensuspension wurde auf 3 15ml-Zentrifugenröhrchen verteilt und wie folgt unterschiedlich beschickt:

Zugabe von PBS (10µl/ml Zellsuspension)

Zugabe von G-CSF [(10µl/ml Zellsuspension); f.c.: 10-1000 Units/ml]

Zugabe von GM-CSF [(10µl/ml Zellsuspension); f.c.: 10-1000 Units/ml]

Die so beschickten Röhrchen wurden mit offenem Deckel bei 37°C in den Brutschrank gestellt und für 1-1,5 Stunden bis zum Gebrauch inkubiert.

Die 3 Granulozytensuspensionen wurden jeweils, je nach Versuchsprotokoll, verdünnt und unverdünnt eingesetzt.

2.2.9.3. Beschickung der 96-Well-Rundbodenplatte

Während die mit ⁵¹Chrom markierten Neuroblastomzellen für 1 Stunde im Brutschrank inkubierten, konnten die Effektorzellen (je 100µl) in eine 96-Well-Rundbodenplatte je nach Versuch und Pipettierschema vorgelegt werden.

Nach Beendigung der Inkubationszeit der Neuroblastomzellen wurden die Targetzellen (je 100µl) in die vorbereitete Platte zu den Effektorzellen pipettiert und je nach Versuch die Ansätze mit unterschiedlichen Substanzen ergänzt.

Zusätzlich wurde immer die Spontanlyse (SR) und Maximallyse (MR) bestimmt und dazu je 3 Wells wie folgt beschickt:

SR: 100µl Targets + 100µl Medium

MR: 100µl Targets + 100µl Triton X (2%ig)

Die so beschickte 96-Well-Rundbodenplatte wurde für 3,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Platte kurz anzentrifugiert (5 min, 400 g) und anschließend je 50µl Überstand entnommen und auf eine Luma-Platte übertragen.

Material und Methoden

Diese nun, nur mit Überstand befüllte Luma-Platte, wurde über Nacht stehengelassen, sodass der Inhalt trocknen konnte. Anschließend wurde die freigesetzte Aktivität im Counter gemessen.

Die Lyserate sollte wie folgt berechnet werden:

$$\frac{(\text{Messwert} - \text{Spontanlyse})}{(\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse})} \times 100$$

2.2.10. Chemilumineszenz

Messung des oxidativen bursts mit Hilfe der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz in Assoziation mit der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen.

In diesem Versuchsblock sollte bestätigt werden, dass die ADCC-Reaktion durch Granulozyten unter Verwendung von AK^+ unabhängig von der ROS-Bildung erfolgt, vor allem aber sollte der Frage nachgegangen werden, ob das auch bei AK^- , nach Verlust der Complementbindungsstelle, der Fall ist. Ferner sollte in diesem Versuchsblock untersucht werden, ob die externe Zugabe von H_2O_2 bei der ADCC Reaktion einen Einfluß auf die Abtötung der Neuroblastomzellen hat (Model für die Bildung von ROS im entzündeten Tumorgebiet *in vivo*). Parallel dazu diente die Inkubation der Granulozyten mit opson. Zymosan als positive Kontrolle.

Um die Produktion von ROS im Rahmen dieser Untersuchungen nachzuweisen, erfolgte eine Messung der Chemilumineszenz

Prinzip der Methode

Durch den „oxidativen burst“ von neutrophilen Granulozyten werden Lichtquanten emittiert. Dieses Phänomen wird Chemilumineszenz oder chemisches Leuchten genannt.

Material und Methoden

Sobald neutrophile Granulozyten Stress ausgesetzt werden, indem sie z.B. durch opson. Zymosan oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert werden, bilden sie reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS). So werden z.B. Superoxidanionen, H_2O_2 , Hydroxylradikale, Singlet-Sauerstoff oder hypochlorige Säure gebildet. Diese reagieren u.a. mit ungesättigten Doppelbindungen des Zellmaterials und überführen diese in Derivate des Dioxtandions. Diese sehr energiereichen Verbindungen geben ihre Energie an fluoreszenzfähige Moleküle in der Zelle ab. Dadurch werden diese in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt.

Durch den Übergang vom instabilen zum stabilen chemischen Zustand kommt es zu einer Energiefreisetzung in Form einer Lichtemission. Dies bezeichnet man als Chemilumineszenz (Biolumineszenz) (Allen, 1982).

Diese Lumineszenzen fallen sehr schwach aus. Um sie zu verstärken können Lumineszenzverstärker, wie z.B. Luminol, eingesetzt werden. So werden sie in einen besser messbaren Bereich gebracht. Dabei besteht eine Korrelation zwischen Höhe des beobachteten Chemilumineszenz-Signals und der ROS-Produktion. Dabei wird Luminol größtenteils durch H_2O_2 und HOCl in das Lichtemittierende 3-Aminophthalsäure-Dianion umgewandelt. Bei der Umwandlung spielen das Superoxidanion und der Singlet-Sauerstoff eine geringere Rolle (Müller-Peddinghaus, 1984; Bruchelt und Schmidt 1984; Vilim and Wilhelm, 1989).

Die ausgehenden Lichtsignale werden von einer Photozelle aufgenommen, nachdem sie durch einen Photomultiplier verstärkt wurden.

Die von uns durchgeführte Messung reaktiver Sauerstoffverbindungen im Luminometer „Tropix TR717“ der Firma Perkin Elmer wurde nach diesem Prinzip durchgeführt. Es wurde die dazugehörige Software WinGlow verwendet. Die Lichtquanten wurden als Reaktionskinetik aufgezeichnet. Das Integral

Material und Methoden

wurde als Summenwert der Einzelwerte abgeschätzt. Die Fläche unter der Kurve ist proportional zur Menge der insgesamt gebildeten ROS. Dadurch wird eine semiquantitative Bestimmung abgegebener Lichtquanten pro Sekunde bei chemischen Reaktionen ermöglicht. Nach Aktivierung der Granulozyten kommt es zu einem Maximum der Bildung von ROS bevor der Ausgangswert wieder erreicht wird. Die Messung erfolgte über 30 min bei Zimmertemperatur. In Einzelversuchen erfolgte die Messzeit über 1 Stunde.

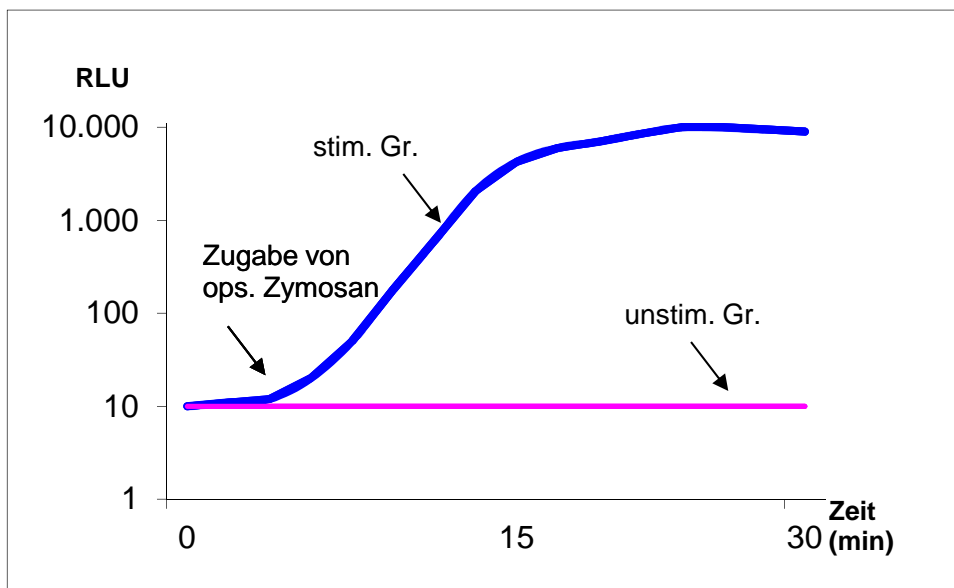


Abb. 9: Beispiel ROS-Bildung bei isolierten Granulozyten (eigene Darstellung).

Anmerkung: Die isolierten Granulozyten (pro Well 100.000 Zellen in PBS⁺⁺) wurden über 30 min mit Luminol f.c. 4 µg/ml pro Well) inkubiert. Opsonisiertes Zymosan (f.c. 250 µg/ml) diente als Stimulanz. Unstimulierte Granulozyten wurden durch die Isolation im Histopaquegradienten schwach aktiviert und wiesen nur eine geringe ROS-Bildung auf. Nach Stimulation mit opson. Zymosan stieg die ROS-Produktion stark an und begann nach ca. 30 min langsam wieder abzusinken.

Abk.: unstim.= unstimuliert; stim.= stimuliert; Gr.= Granulozyten.; RLU= relative Lichteinheiten (engl.: relative light units); ops.= opsonisiert.

Anmerkung: Diese Versuchsserie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. med. Volker Bernd Beck durchgeführt.

Material und Methoden

Durchführung

In Kapitel 2.2.4. und 2.2.6.1. ist die Gewinnung und Markierung der Neuroblastomzellen sowie die Gewinnung und Vorbereitung der neutrophilen Granulozyten bereits beschrieben. Bei den CL-Untersuchung wurde eine nichttransluminente 96-Well-Platte genutzt.

Die neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen (200.000 Zellen/75µl) wurden in G-CSF bzw. GM-CSF (1000 U/ml Zellsuspension) 2 Stunden vorinkubiert.

Von jedem Zellansatz wurden immer 3 Wells beschickt:

- a) 3 Wells mit jeweils 100µl der Neuroblastomzellen (5000 Zellen)
+ 10µl AK⁺ bzw. AK⁻.
- b) 3 Wells mit jeweils 100µl der Neuroblastomzellen
+ 10µl RPMI-Medium als Volumenausgleich.

Damit die Antikörper an den Neuroblastomzellen binden können, wurde die so beschickte 96-Well-Platte dann für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss daran wurden den wie oben beschriebenen Ansätzen jeweils 200.000 Granulozyten in 75µl PBS⁺⁺ mit Glukose (5 mmol/l) bzw. RPMI-Medium in der benötigten Konzentration (E:T-Verhältnis 40:1) zugegeben.

War die 96-Well-Platte wie oben beschrieben vollständig beschickt, wurde zunächst je Well 25µl Luminol (f.c. 4 µg/ml) zugegeben. Die Zugabe erfolgte automatisch über den P-Injektor des Tropix TR717 vor dem ersten Messzyklus. Parallel dazu erfolgte in einem weiteren Ansatz die Zugabe von 25µl opson. Zymosan (1:10-verdünnt: f.c. 250 µg/ml; 1:5-verdünnt: f.c. 500 µg/ml). Hiermit sollte gezeigt werden, dass das „Testsystem Granulozyten“ in der Lage ist,

Material und Methoden

ROS zu bilden (Positivkontrolle). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Ein Volumenausgleich mit PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l Glukose bzw. RPMI-Medium wurde immer durchgeführt.

Es wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in welchem untersucht werden sollte, ob Biobran® bei Zugabe der beiden verschiedenen Antikörper (AK⁺/AK⁻) einen Einfluss auf die Zellyse von Neuroblastomzellen hat (siehe Kapitel 3.1.1.1.5.).

Um die Effekte von Biobran® auf eine ROS-Bildung zu prüfen, wurde die Messung der Chemilumineszenz durchgeführt.

Um dies herauszufinden, wurde den entsprechend bestückten Wells 10µl des Zuckers (f.c. 0,5 mg/ml) zugegeben.

In weiteren Versuchen wurden die, wie bereits beschrieben, isolierten Granulozyten (200.000 Zellen/75µl) für 2 Stunden mit Biobran® (0,1 mg/ml Zellsuspension) vorinkubiert, bevor sie den Targetzellen (5000 Zellen/100µl) hinzugegeben wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen unter Verwendung des Europium-Assays

3.1.1. ADCC Untersuchungen

3.1.1.1. Vorversuche: Charakterisierung der Methodik

3.1.1.1.1. Spontanlyse beim Europium-Assay

Zunächst wurden Versuche durchgeführt, durch die die Spontanlyse der beiden GD2-positiven Zellreihen NB-1 und NB-2 ermittelt wurden. Die Spontanlyse ist der Anteil des Europium-Komplexes (ausgedrückt in Prozent), der von selbst, ohne Zugabe von beispielsweise Effektorzellen oder Antikörpern, aus den Zellen freigesetzt wird.

Für die NB-1 Zellen war dieser Wert ca. 27% [$27,1 \pm 6,07$, $n = 10$, (range: 16-37)], für NB-2 Zellen ca 34% [$33,6 \pm 3,38$, $n = 5$, (range: 28-37)].

3.1.1.1.2. Lyse durch unstimulierte Granulozyten (Vergleich zur Spontanlyse)

Um zu untersuchen in welchem Maße die Effektorzellen (Granulozyten) auf die Targetzellen (Neuroblastomzellen) wirken, wurden Versuche durchgeführt, in denen die lytische Wirkung der Effektorzellen mit der Spontanlyse des jeweiligen Versuches verglichen wurde.

Ergebnisse

Einfluss verschiedener E:T-Verhältnisse auf die Lyse von NB-1 und NB-2

Mit beiden Zelllinien NB-1 und NB-2 wurde je ein Vorversuch mit den E:T-Verhältnissen von 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 durchgeführt.

Wie in Tabelle 2 zu sehen, wurden im Vergleich zur Spontanlyse sowohl für NB-1 als auch für NB-2 negative Werte erhalten, d.h. in Gegenwart der Granulozyten wurde sogar noch weniger Europium-Komplex im Überstand gefunden als nur im Medium.

Tab. 2: Vergleich der Lyse von NB-1 und NB-2-Zellen durch Granulozyten (Gr) bei verschiedenen E:T-Verhältnissen im Vergleich zur Spontanlyse (= „0“%).

E:T	Lyse % NB-1 mit Gr	Lyse % NB-2 mit Gr
20:1	-14	-10
10:1	-20	-17
5:1	-19	-19
2,5:1	-19	-18

Spontanlyse NB-1: 27%; Spontanlyse NB-2: 32%

Ausgehend von diesen unerwarteten Ergebnissen wurden weitere Versuche mit einem höheren E:T-Verhältnis (50:1) durchgeführt. Auch hier wurden überraschenderweise wieder Negativwerte im Vergleich zur Spontanlyse erhalten:

Lyse von NB-1 nach Inkubation mit 9 verschiedenen Granulozytenpräparationen im Vergleich zur Spontanlyse: $-12,6 \pm 13,5\%$.

Lyse von NB-2 nach Inkubation mit 5 verschiedenen Granulozytenpräparationen im Vergleich zur Spontanlyse: $-2 \pm 4,4\%$.

Es war zwar (aus $^{51}\text{Chrom}$ Versuchen) bekannt, dass unstimulierte Granulozyten (ohne Antikörper) kaum in der Lage sind, Neuroblastomzellen zu

Ergebnisse

lysieren, aber die eindeutigen und durchgehend negativen Lysewerte waren doch unerwartet.

Zuerst wurde das auf den Europium-Assay zurückgeführt (ev. Quencheffekte?), allerdings stellte sich heraus, dass ähnliche Effekte später auch beim $^{51}\text{Chrom}$ -Assay erhalten wurden (siehe Kapitel 3.2.1.). Es wurde der Verdacht geäußert, dass eventuell die bei der Spontanlyse freigesetzten Europium-Komplexe von den Granulozyten aufgenommen wurden (z.B. durch Pinozytose), und dass auf diese Weise geringere Messwerte im Überstand zu Stande kämen als in Abwesenheit der Granulozyten. Aus diesem Grund wurde der Überstand der Spontanlyse genommen, mit Granulozyten inkubiert und nachgesehen, ob in Gegenwart der Granulozyten das Fluoreszenzsignal abnimmt. Das war aber nicht der Fall (Daten nicht gezeigt).

Auf Grund dieser erhaltenen Ergebnisse, die im Kapitel „Diskussion“ näher thematisiert werden, wurde für die folgenden Versuche das in Kapitel 3.1.1.1.3. beschriebene Auswerteverfahren verwendet.

3.1.1.1.3. Festlegung der Auswertungsprotokolle

Da unstimulierte Granulozyten (im Gegensatz zu MNBC), auch in hohen E:T-Verhältnissen nicht in der Lage sind Neuroblastomzellen zu lysieren, wurden für die weiteren Untersuchungen zur ADCC die Ansätze „unstimulierte Granulozyten (50) : NB-Zellen (1) als Ausgangswert festgelegt, d.h. die freigesetzte Menge des Komplexes im Überstand wurde statt der üblichen „Spontanlyse ohne Effektorzellen“ verwendet. Aufbauend auf diesen Werten wurde dann der Einfluss von Stimulantien (G-CSF etc.) sowie der Antikörper (ADCC) auf die Zelllyse untersucht.

Beispiel: „Lyse“ von NB-1 durch Granulozyten*:	800 cpm
Lyse von mit AK beladenen NB-1 durch Granulozyten:	1400 cpm
Maximallyse:	9200 cpm

*Keine Lyse durch Granulozyten alleine (E:T= 50:1 → 0%):
 $(1400 \text{ cpm} - 800 \text{ cpm} / 9200 \text{ cpm} - 800 \text{ cpm}) \times 100 = \underline{7.1\%}$
d.h. bei Beladung der Neuroblastomzellen mit Antikörpern kam es zu 7,1% Lyse durch Granulozyten, im Vergleich zu dem Ansatz, bei dem die Neuroblastomzellen ohne AK inkubiert wurden (0%).

3.1.1.1.4. Einfluss von GM-CSF (und G-CSF) auf die Lyse von NB-2 durch Granulozyten

Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor G-CSF ist ein Glykopeptid, welches bei Entzündungen vom Körper ausgeschüttet wird und die Bildung von Granulozyten anregt und deren Aktivität steigert. Der Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor GM-CSF ist ebenfalls ein Glykopeptid. Es wird bei Entzündungen von Zellen des Immunsystems

Ergebnisse

ausgeschüttet, regt die Differenzierung von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen an und fördert das Wachstum ihrer Vorstufen.

In diesem Versuchsblock wurde geprüft, ob die Vorbehandlung der Granulozyten mit G-CSF oder GM-CSF zu einer Lyse der Neuroblastomzellen (NB-2) führt.

Dazu wurden die Granulozyten zuvor für 2-3 Stunden mit G-CSF oder GM-CSF im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Vorinkubation der Granulozyten mit GM-CSF (ohne Zugabe von Antikörpern) führte zu keiner Steigerung der Zelllyse: $-3,84 \pm 2,78\%$ (n = 5); auch die Vorinkubation mit G-CSF führte zu keiner nennenswerten Lyse (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.1.5. Granulozyten-ADCC mit AK⁺ und AK⁻ (NB-1 und NB-2)

In diesem Versuchsblock wurde die Wirkung von 2 an das Gangliosid GD2 der Neuroblastomzellen bindende Antikörper (AK⁺ und AK⁻) auf die ADCC durch Granulozyten untersucht. Der Unterschied beider AK besteht darin, dass der eine Antikörper eine Complementbindungsstelle besitzt (AK⁺), der andere Antikörper nicht (AK⁻). Es sollte geprüft werden, ob beide AK in gleicher Weise in der Lage sind, eine Granulozyten-ADCC-Reaktion auszulösen.

Im Einzelnen hatten die Versuche die Beantwortung verschiedener Fragen zum Ziel:

- Abhängigkeit der Lyse von der AK-Menge (0.1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml)
- ADCC ohne Vorbehandlung der Granulozyten
- ADCC nach Vorbehandlung der Granulozyten mit GM-CSF / G-CSF
- Einfluss von Biobran[®] auf die ADCC
- Vergleich der Wirkung von Granulozyten und MNBC

Ergebnisse

Abhängigkeit der ADCC von der Antikörpermenge

Die Neuroblastomzelllinie NB-1 wurde dazu mit unterschiedlichen AK^+ / AK^- -Konzentrationen (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml) inkubiert.

Beide AK zeigten sehr ähnliche Wirkungen: Während die Granulozyten bei einer AK-Konzentration von 0.1 μ g/ml noch keine Effekte zeigten (AK^+ : -1% Lyse; AK^- : -1% Lyse) zeigten sich bei dem hier gewählten Spender bei Verwendung von 1 μ g/ml deutliche Effekte (AK^+ : 21% Lyse; AK^- : 19% Lyse). Eine weitere Erhöhung der Konzentration (10 μ g/ml) führte zu keiner erneuten Steigerung (AK^+ : 10% Lyse; AK^- : 6% Lyse). Deshalb wurden die weiteren Untersuchungen mit der AK -Konzentration von 1 μ g/ml durchgeführt.

ADCC ohne Vorbehandlung der Granulozyten

Sowohl bei NB-1 als auch bei NB-2 wurden nach Beladung mit AK^+ bzw. AK^- (1 μ g/ml, davon 10 μ l zum Testansatz) nur moderate lytische Effekte beobachtet, falls die Granulozyten zuvor nicht mit GM-CSF oder G-CSF inkubiert wurden.

NB-1: $AK^+ = 2 \pm 3,93\%$

$AK^- = 0 \pm 7,2\%$ (n = 8)

NB-2: $AK^+ = 4 \pm 4,87\%$

$AK^- = 2,5 \pm 5,34\%$ (n = 3)

ADCC nach Vorbehandlung der Granulozyten mit GM-CSF / G-CSF

Wurden die Granulozyten zuvor mit GM-CSF bzw. G-CSF vorinkubiert, so stieg in beiden Fällen die spezifische Lyse der mit AK^+ bzw. AK^- beladenen NB-1 Zellen deutlich an (siehe Abb. 10).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit NB-2 Zellen erhalten, wenn die Granulozyten mit G-CSF vorstimuliert wurden (mit GM-CSF nicht durchgeführt): Lyse mit AK^+ : 13 ± 9 ; Lyse mit AK^- : 18 ± 13 ; (n = 2).

Ergebnisse

NB-1 / GM-CSF / G-CSF

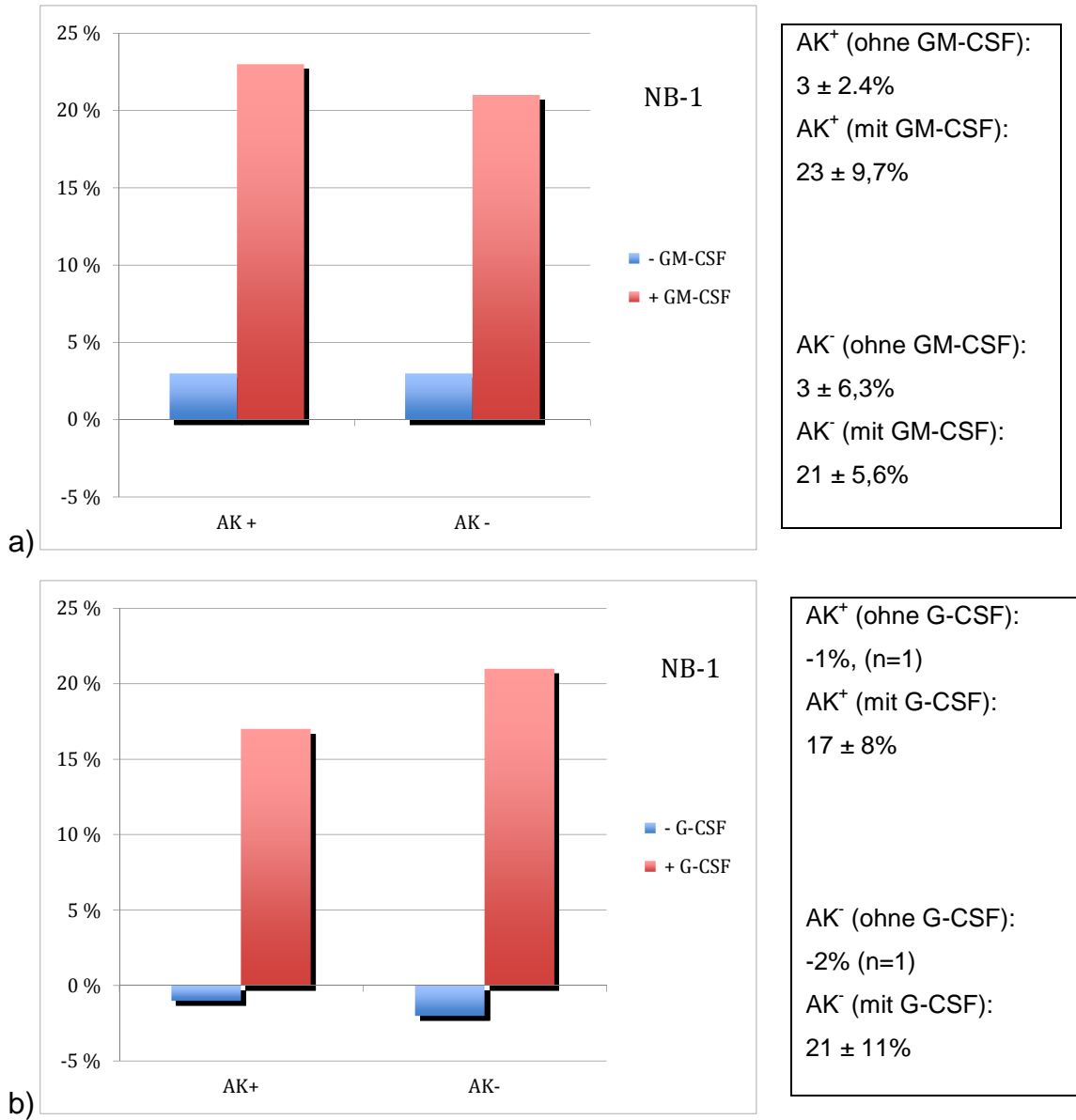


Abb. 10: Lyse (%) von mit AK⁺ bzw. AK⁻ beladenen NB-1 Zellen durch Granulozyten vor und nach Vorbehandlung a) mit GM-CSF (n = 5) bzw. b) mit G-CSF (n = 3).

Ergebnisse

Einfluss von Biobran® auf die Granulozyten-ADCC

Nachdem gezeigt wurde, dass unter dem Einfluss von G-CSF/GM-CSF die Granulozyten-ADCC mit AK⁺ und AK⁻ gegenüber Neuroblastomzellen ausgelöst bzw. gesteigert werden konnte, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Wirkung des Immunmodulators Biobran® auf diese Reaktion hin untersucht. Dazu wurden die Granulozyten - in Analogie zur Inkubation mit GM-CSF/G-CSF - für 2 Stunden mit Biobran® (0,1 mg/ml, f.c. 0,5 mg/ml) vorinkubiert.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, führte die Gegenwart von Biobran® sowohl bei der Zelllinie NB-1, als auch bei NB-2 Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Granulozyten-ADCC, sowohl bei Verwendung des AK⁺ als auch bei AK⁻. Nur einen minimalen Effekt auf die Lyse der Neuroblastomzellen hatte eine Vorbehandlung der Granulozyten mit Biobran® in Abwesenheit der Antikörper.

Ergebnisse

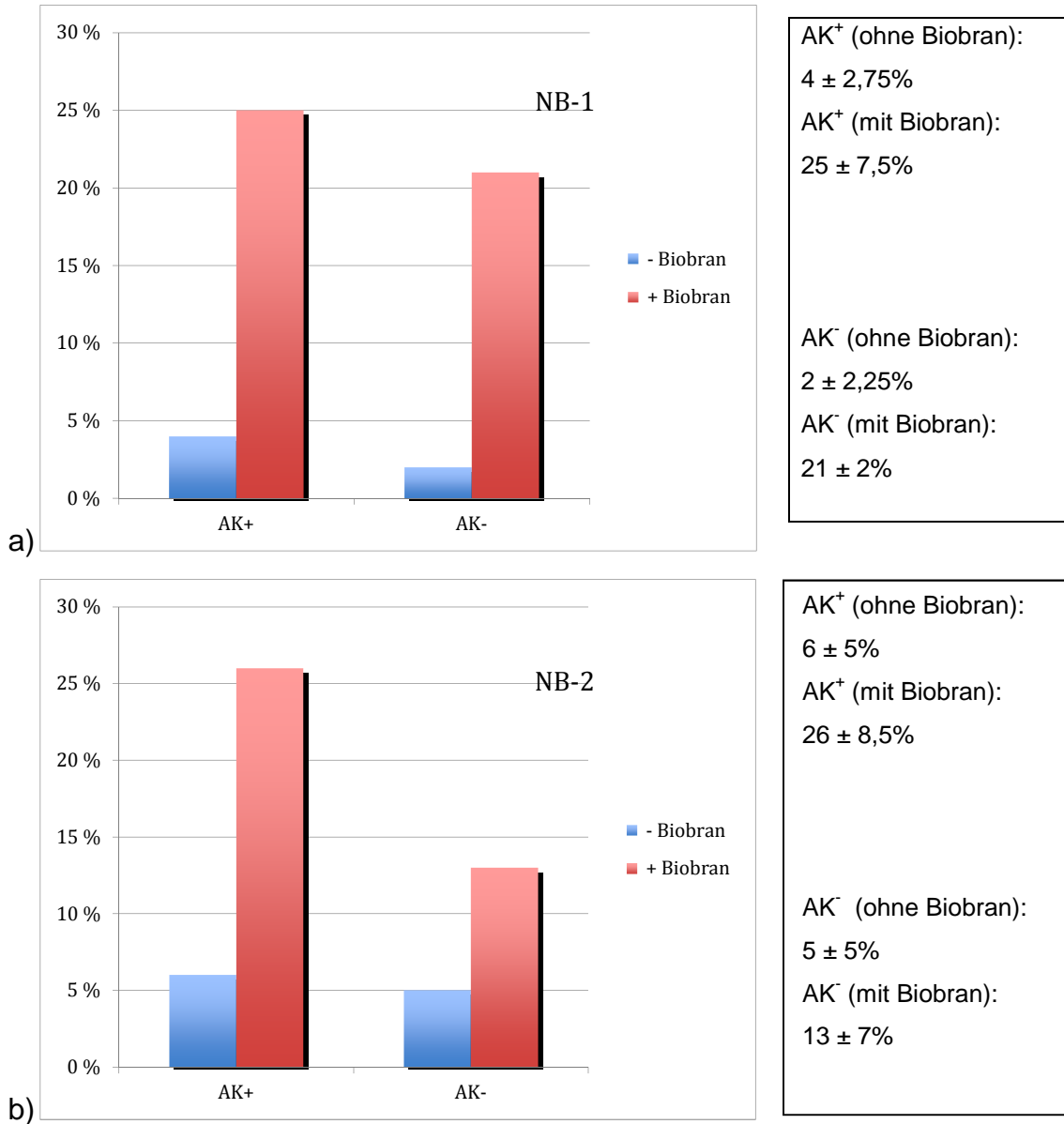


Abb. 11: Einfluss der Vorbehandlung der Granulozyten mit Biobran® auf die ADCC (% Lyse) gegen Neuroblastomzellen a) NB-1 (n = 2) bzw. b) NB-2 (n = 2).

Ergebnisse

Vergleich der ADCC durch Granulozyten und MNBC

Um den lytischen Effekt von beiden Antikörpern durch Granulozyten mit dem lytischen Effekt durch MNBC zu vergleichen, wurden hierzu fünf Versuche mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

Zu besseren Vergleichszwecken wurden sowohl bei den Granulozyten als auch bei den MNBC die Lysewerte ohne Antikörper als \emptyset gesetzt.

Abbildung 12 zeigt, dass MNBC im Gegensatz zu Granulozyten bei gleichem E:T-Verhältnis (50:1) eine ausgeprägte Fähigkeit gegenüber Neuroblastomzellen (Linie NB-1) zur ADCC haben, sowohl bei Verwendung von AK^+ als auch AK^- .

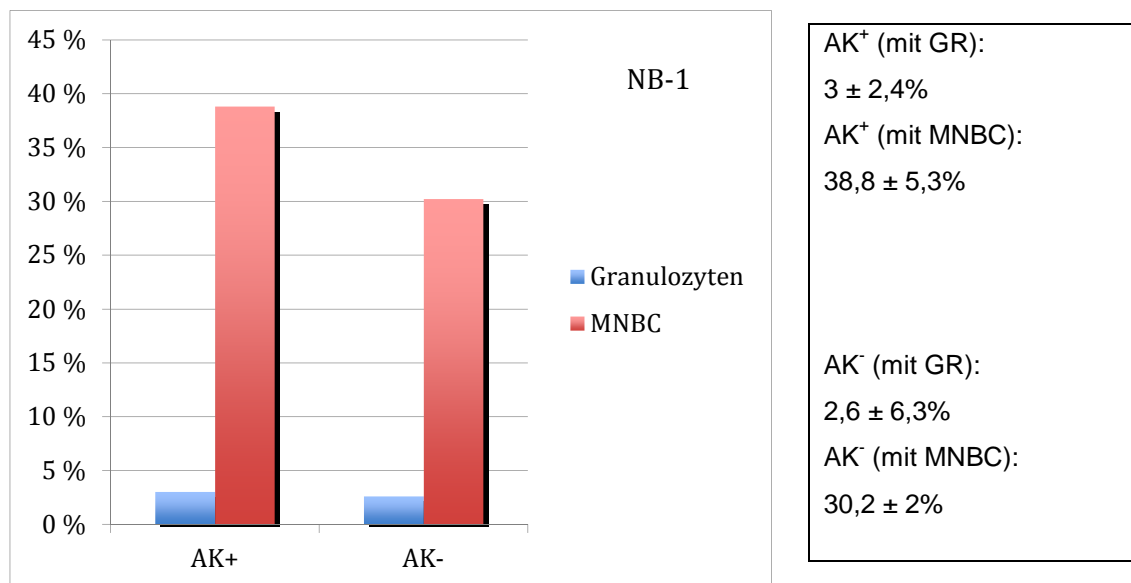


Abb. 12: ADCC (% Lyse) von Granulozyten und MNBC gegenüber der mit AK^+ bzw. AK^- beladenen Neuroblastomlinie NB-1; (n = 5).

3.1.2. Neuroblastomzell-Lyse durch das Complementsystem

Complementlyse

Wie bereits erwähnt unterscheiden sich die beiden Anti-GD2-Antikörper darin, dass AK^+ eine Complementbindungsstelle besitzt und somit Complement aus dem Serum oder Plasma binden kann. AK^- hat diese Complementbindungsstelle nicht. Wie aus den vorausgegangenen ADCC Untersuchungen zu erkennen war, verhielten sich beide Antikörper sehr ähnlich. In dem nun folgenden Versuchsblock ohne Effektorzellen sollte geprüft werden, ob sich die beiden Antikörper tatsächlich in ihrer Wirkung unterscheiden. Die Werte der Lyse wurden hier immer auf die jeweiligen Spontanlysewerte (Neuroblastomzellen in Medium) bezogen.

3.1.2.1. Einfluss von AK^+ und AK^- auf die Complementlyse durch Serum

Die mit AK^+ bzw. AK^- beladenen Neuroblastomzellen NB-1 und NB-2 wurden in Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) inkubiert, dem entweder PBS (Kontrolle) oder humanes Serum (10µl bzw. 20µl auf 200µl Gesamtvolumen) zugegeben wurde.

Wie aus Abbildung 13 zu erkennen ist, kommt es in Gegenwart von AK^+ und Serum zu einer intensiven Lyse, während AK^- praktisch keine Effekte zeigt.

Ergebnisse

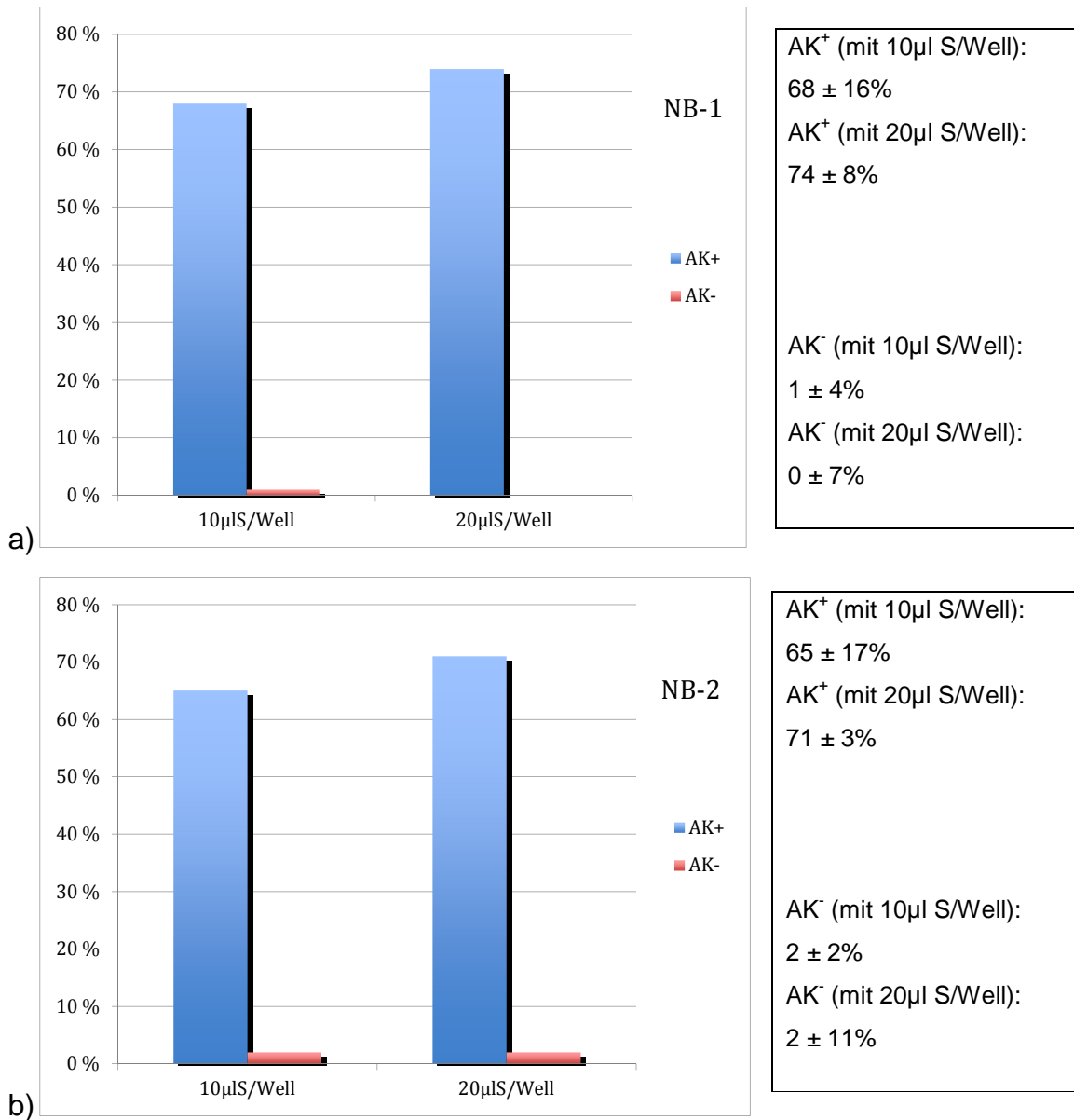


Abb. 13: Einfluss von AK⁺ bzw. AK⁻ und Serum (S; 10 oder 20µl/Well) auf die Lyse (%) a) von NB-1-Zellen (n = 6-8) und b) NB-2-Zellen (n = 6-7).

Bei beiden Zelllinien kam es bei Verwendung von 20µl Serum (f.c.: 10%) nur zu einem leichten zusätzlichen Anstieg der Lyse im Vergleich zu 10µl Serum (f.c.: 5%). Eine detaillierte Abhängigkeit der CDC von der Serumkonzentration ist in Abbildung 14 gezeigt.

Ergebnisse

CDC in Abhängigkeit von der Serumkonzentration

Abbildung 14 zeigt in einem Einzelversuch den Einfluss der Serumkonzentration auf die CDC gegenüber NB-1 und NB-2 Zellen.

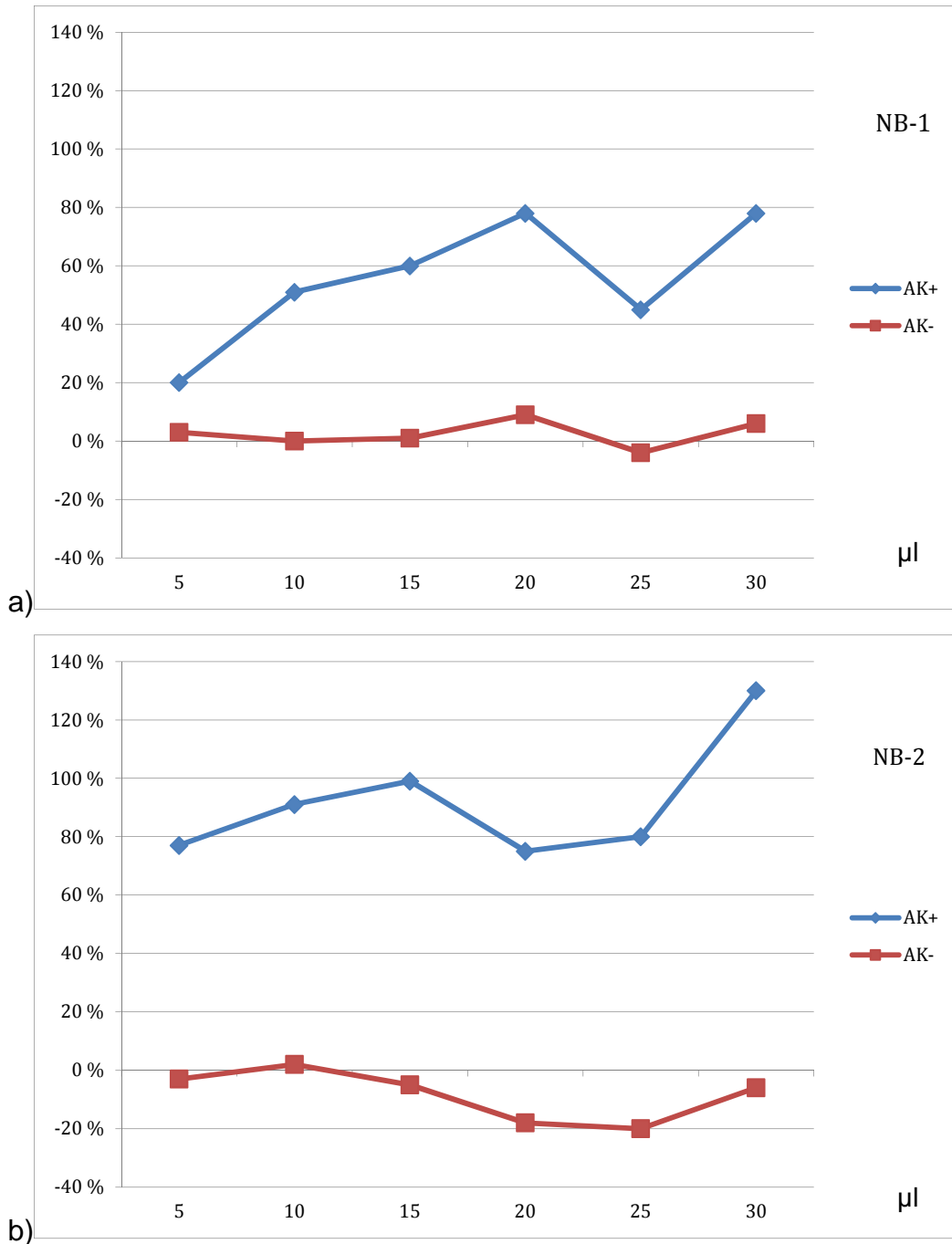


Abb. 14: Einfluss verschiedener Serum- Konzentrationen (0, 5, 10, 15, 20, 25 oder 30 μl /Well) auf die lytische Wirkung (% Lyse) von AK⁺ bzw. AK⁻ gegenüber a) NB-1-Zellen und b) NB-2-Zelle.

Ergebnisse

Während bei der CDC der mit AK^+ beladenen NB-1 Zellen trotz der Messwertschwankungen eine deutliche Abhängigkeit des Lysegrades von der Serumkonzentration zu erkennen ist, sieht man diese Abhängigkeit bei NB-2 Zellen nicht so ausgeprägt, da hier die Ausgangswerte (CDC bei 5 μ l Serum) bereits sehr hoch liegen (ca. 80%). Unabhängig von der Serumkonzentration war praktisch keine Lyse der mit AK^- beladenen Neuroblastomzellen zu beobachten.

Complementlyse durch Serum verschiedener Probanden

Mit der Fragestellung, ob Serum unterschiedlicher Personen Einfluss auf die Höhe der Complementlyse hat, wurde jeweils ein Versuch mit den Zellreihen NB-1 und NB-2 durchgeführt, indem Serum von drei verschiedenen, nicht verwandten Personen genutzt wurde. Hierbei wurden jeweils zwei Serummengen (10 μ l und 20 μ l Serum/Well) verwendet.

Abbildung 15 zeigt, dass das Ausmaß der CDC auf AK^+ beladene Neuroblastomzellen bei allen drei Personen etwa gleich ist; AK^- beladene Neuroblastomzellen aller drei Proben zeigten praktisch keine CDC.

Auffälligerweise ist die Lyserate mit AK^+ bei NB-2 Zellen geringer als bei NB-1 Zellen; als Konsequenz erkennt man bei NB-2 Zellen eine deutliche Abhängigkeit von der Serumkonzentration.

Ergebnisse

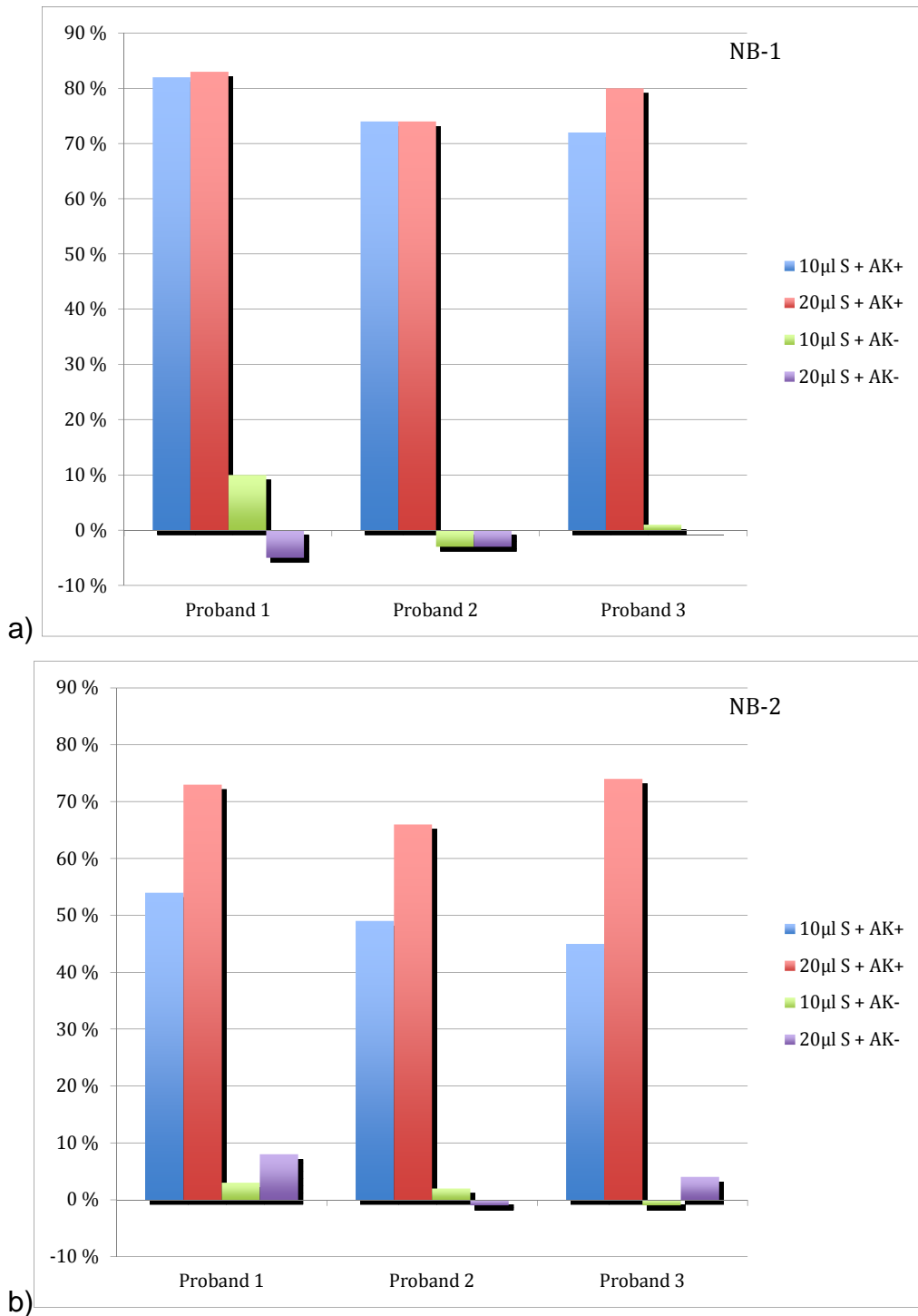
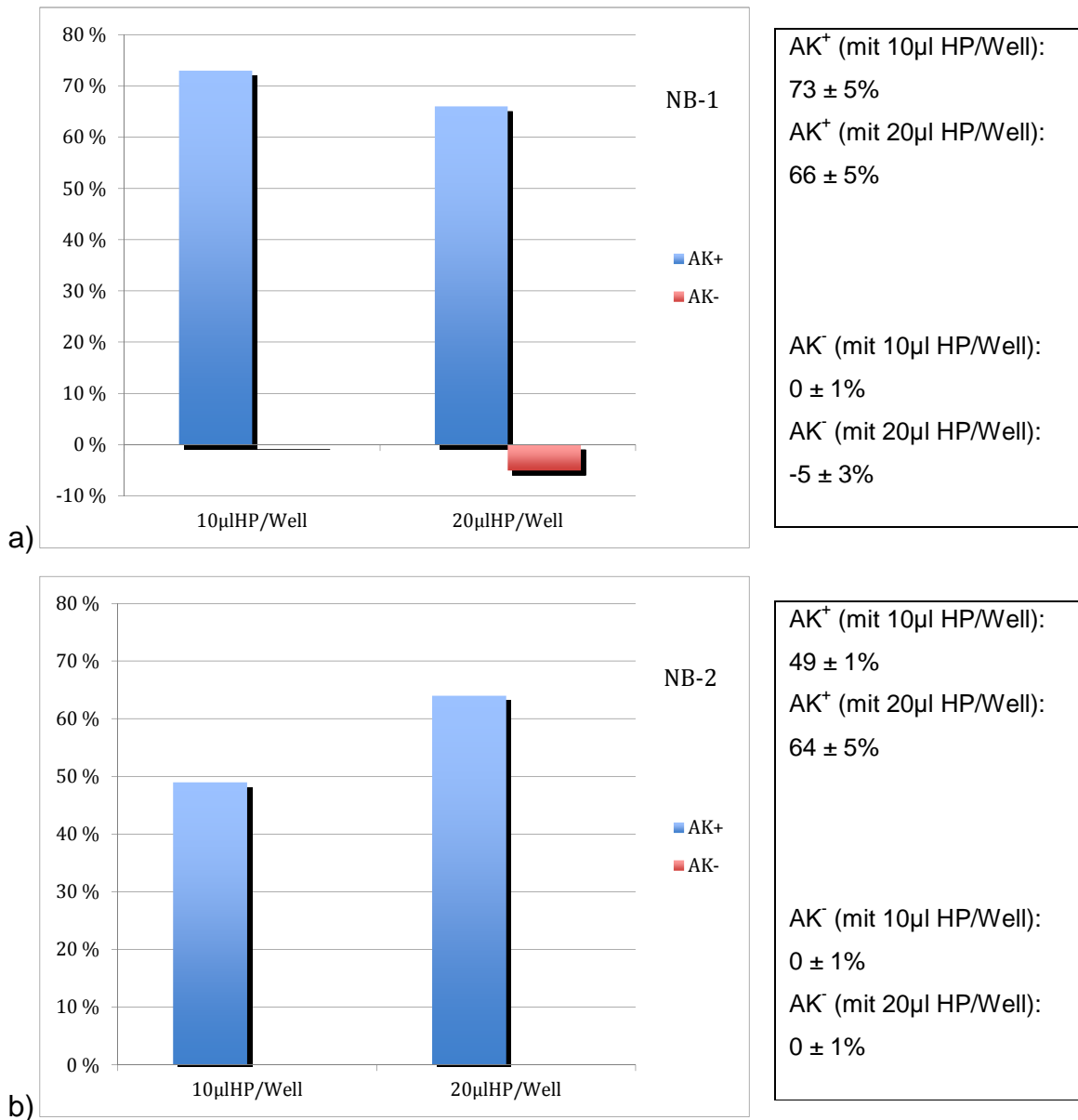


Abb. 15: Einfluss von Serum (10, 20µl/Well) drei verschiedener Probanden auf die lytische Wirkung (%) von AK^+ bzw. AK^- gegenüber a) NB-1 und b) NB-2 Zellen.

Ergebnisse

Einfluss der AK auf die Complementlyse in Heparin-Plasma

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, verhält sich Heparin-Plasma (5% bzw. 10% im Testansatz) ähnlich wie Serumproben im Hinblick auf die CDC: Beide Neuroblastomzelllinien wurden nach Beladung mit AK⁺ sehr gut lysiert, während AK⁻ praktisch keine Effekte zeigte.



3.1.3. Lyse der Neuroblastomzellen in Gegenwart von Serum (CDC) und Granulozyten (ADCC)

In dieser abschließenden Reihe der Europium-Versuche wurde untersucht, welchen Einfluss die Kombination aus Granulozyten-ADCC und CDC auf die beiden Neuroblastomzelllinien NB-1 und NB-2 ausübt.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen, wobei ein Teil der Ansätze vorher mit G-CSF zur Steigerung der Granulozyten-ADCC behandelt wurde. Beide GD2-positiven Neuroblastomzelllinien verhielten sich sehr ähnlich.

Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen den erwarteten Werten: In Anwesenheit von AK⁺ kam es einer intensiven Lyse der NB Zellen durch ADCC und CDC Effekte. Diese Lyse fiel deutlich geringer aus, wenn AK⁻ verwendet wurde, da hier nur die ADCC zum Tragen kommt. Wurden die Ansätze zuvor mit G-CSF vorbehandelt, so kam es in allen Ansätzen zu dem erwarteten Anstieg der Lyseraten.

Die Werte der Ansätze, die mit Gr + Serum ohne Antikörper durchgeführt wurden, wurden „0“ gesetzt und dies als Bezug genommen. Diese Untersuchungen zeigen die große Dominanz der CDC (bei nur 5% Serum) im Vergleich zu der ADCC (E:T=50 :1) mit G-CSF vorstimulierten Granulozyten .

Ergebnisse

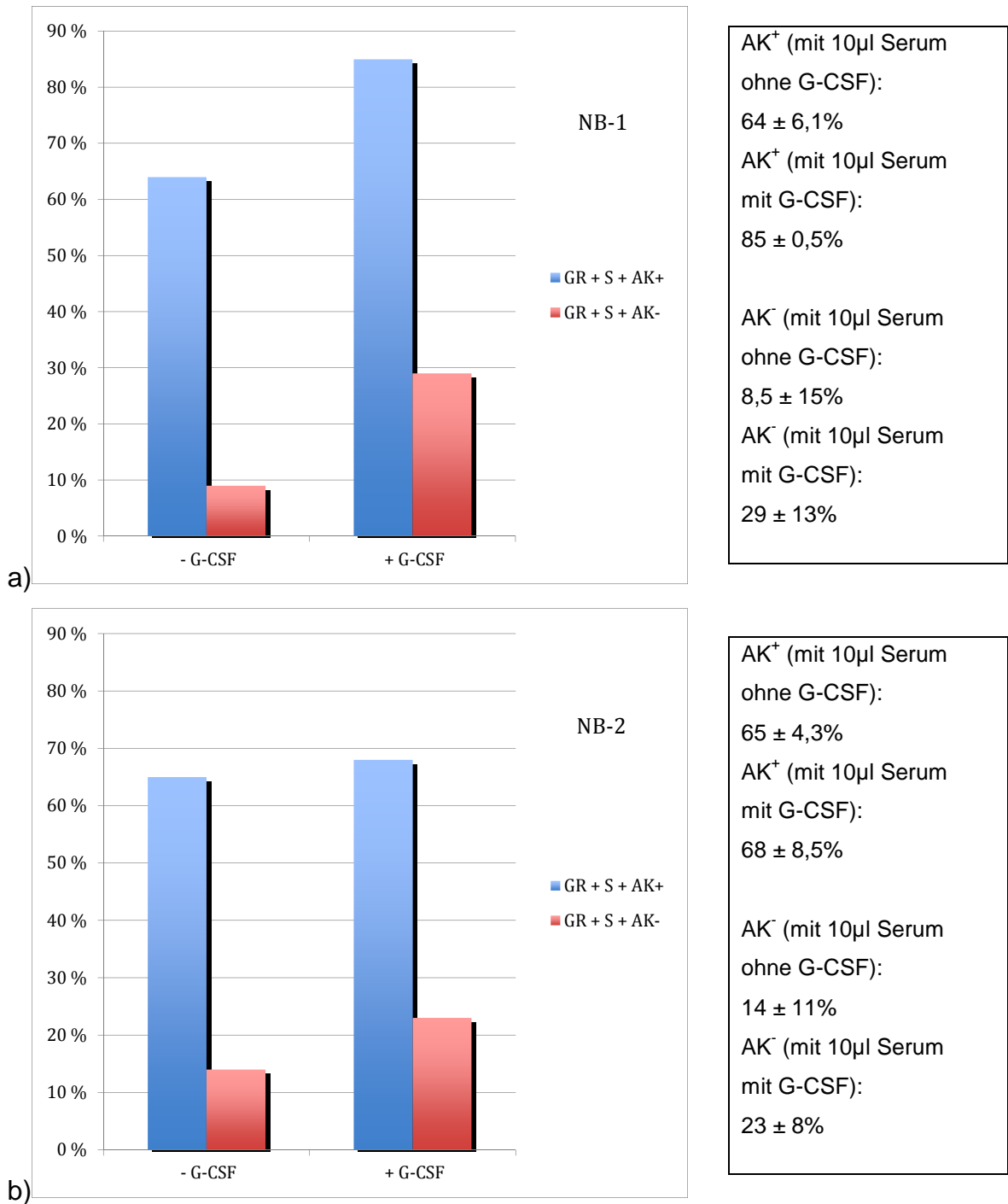


Abb. 17: Lyse (%) von NB-1 (a) und NB-2 (b) durch Granulozyten (E:T= 50:1) + 10µl Serum in Gegenwart von AK⁺ und AK⁻. Granulozyten wurden ohne (n = 4) und mit (n = 2) Vorinkubation mit G-CSF eingesetzt.

3.2. Untersuchungen unter Verwendung des ⁵¹Chrom-Assays

Ein Teil der Untersuchungen wurde mit dem ⁵¹Chrom-Assay durchgeführt. Insbesondere sollte dabei auch untersucht werden, ob die bei den Europium-Assay gemachten Beobachtungen, dass die Inkubationswerte mit Granulozyten (ohne Stimulierung mit G-CSF/GM-CSF bzw. ohne Antikörper) häufig niedriger waren als die der reinen Spontanlyse (d.h. in Abwesenheit der Granulozyten), auch beim Einsatz von ⁵¹Chrom auftreten.

3.2.1. Vergleich der Spontanlysen zu den Ansätzen in Gegenwart von Granulozyten

Es wurden Ansätze mit 100µl Neuroblastomzellen (ca 5000 Zellen) + 100µl Medium im Vergleich zu Ansätzen mit 100µl Neuroblastomzellen (ca 5000 Zellen) + 100µl Granulozyten (ca 250.000 Zellen) miteinander verglichen. Wie auch beim Europium-Assay zeigte sich, dass meist in den Ansätzen in Gegenwart von Granulozyten, weniger Protein-gebundenes ⁵¹Chrom im Überstand zu finden war, als in den Ansätzen mit reinem Medium (Daten hier nicht gezeigt):

NB-1: xy % ± ... (n =); NB-2: xy % ± ... (n =)

Es ist bekannt, dass unstimulierte Granulozyten praktisch nicht in der Lage sind, Neuroblastomzellen zu lysieren. Überraschend war aber, dass die Werte auch hier meist unter den „Spontanlysewerten“ mit reinem Medium lagen. Die Berechnung erfolgte daher in Analogie zu Kapitel 2.2.8.1.

Mögliche Ursachen werden im Kapitel „Diskussion“ besprochen.

Übliche Berechnung der Spontanlyse: Radioaktivität im Überstand (NB-Zellen + Medium) = „0%“

Berechnung der Spontanlyse auf Grund der erhaltenen Ergebnisse:
Radioaktivität im Überstand (NB-Zellen + Granulozyten im Medium) = „0%“

Ergebnisse

Basierend auf diesen Daten wurde bei den weiteren Untersuchungen zur ADCC von nicht-vorstimulierten bzw. mit G-CSF/GM-CSF vorstimulierten Granulozyten die Inkubationswerte mit reinen, nicht-vorstimulierten Granulozyten als Referenzwert anstelle der eigentlichen Spontanlyse verwendet. Unter der (geprüften) Annahme, dass unter den gewählten Inkubationsbedingungen keine Lyse der Neuroblastomzellen durch unstimulierte Granulozyten stattfindet, wurden diese Werte als Ausgangswerte („0-Werte“) gesetzt (wie in 3.1.1.1.3 für den Europium-Assay beschrieben).

3.2.2. ADCC von Neuroblastomzellen durch unstimulierte und vorstimulierte Granulozyten

Abbildung 18 zeigt zusammenfassend die Wirkung der beiden Anti-GD2-Antikörper AK^+ und AK^- auf die Lyse der Neuroblastomzellen durch unstimulierte und 2,5 Stunden mit G-CSF bzw. GM-CSF vorstimulierte Granulozyten im ^{51}C hrom-Assay.

Ergebnisse

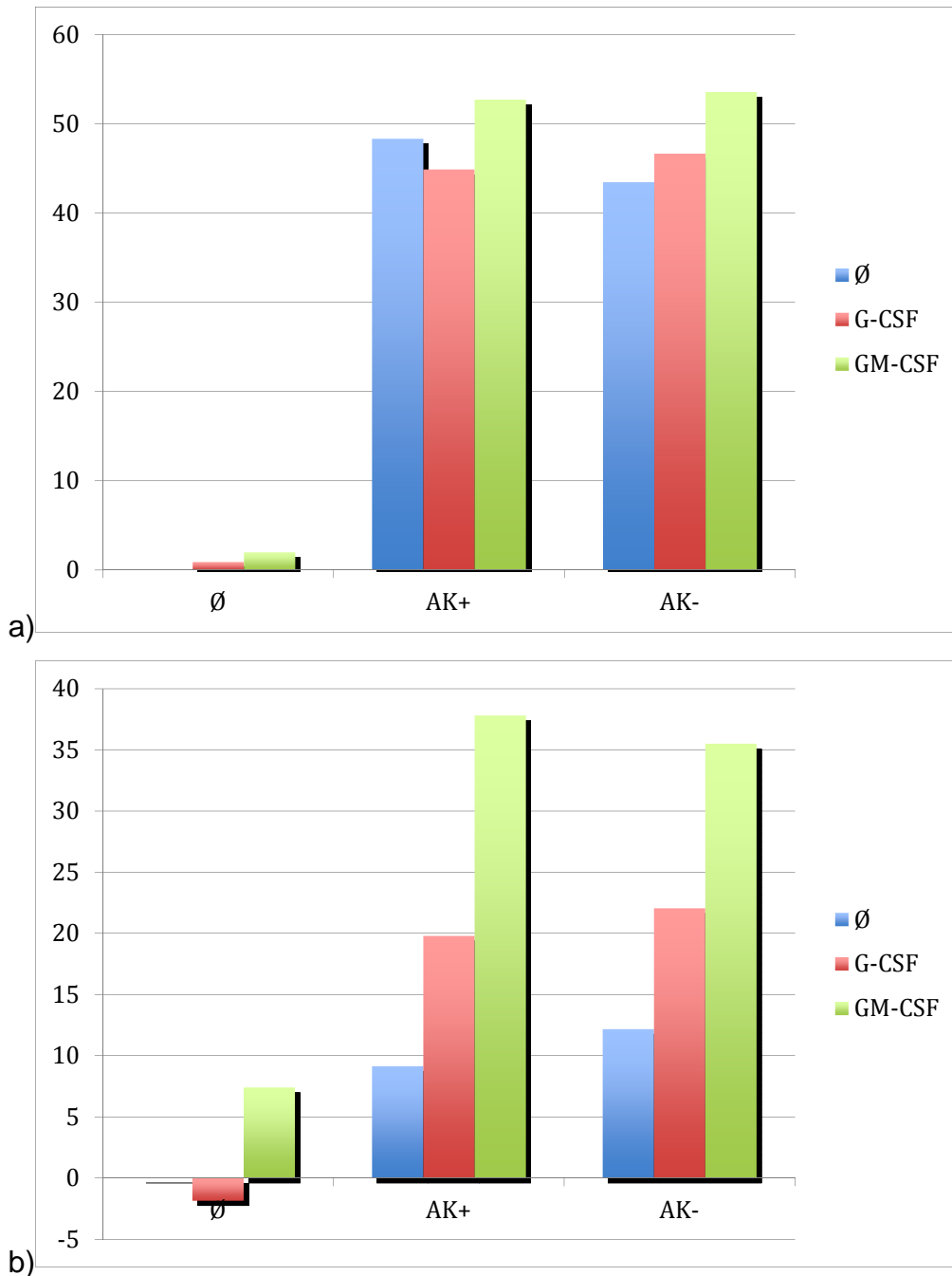


Abb. 18: ADCC von Granulozyten auf die Neuroblastomzelllinien NB-1 (a) und NB-2 (b).

Granulozyten wurden 2,5 Stunden bei 37°C in Abwesenheit bzw. Gegenwart von G-CSF und GM-CSF (je 1000 U/ml) vorinkubiert. Die Neuroblastomzelllinien wurden vor Zugabe der Granulozyten 30 min mit den entsprechenden Antikörpern (AK⁺ und AK⁻) vorinkubiert. 100µl Granulozytensuspension (ca. 250.000 Zellen) und 100µl Neuroblastomzellsuspension (ca. 5000 Zellen) wurden 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert. 50µl Überstand wurden anschließend gemessen. Bezugssystem (0%-Wert): Ansatz mit nicht-stimulierten Granulozyten in Abwesenheit der Antikörper. NB-1: (n= 5); NB-2: (n= 2).

3.3. Bedeutung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) bei neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang mit der ADCC gegenüber Neuroblastomzellen

3.3.1. Kommt es bei der Granulozyten-ADCC mit AK⁻ - Antikörpern zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen?

ROS spielen - im Gegensatz zu ihrer essentiellen Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen - keine Rolle bei der immunologischen Tumorlyse (ADCC) gegenüber Neuroblastomzellen durch neutrophile Granulozyten. Das wurde in verschiedenen vorausgegangenen Untersuchungen, unter Verwendung von AK⁺ gezeigt.

Allerdings ist es theoretisch denkbar, dass durch die genetische Modifikation von AK⁺ zu AK⁻ (keine Complementbindungsstelle) die Interaktion dieses Antikörpers mit den Granulozyten so verändert ist, dass es zu einem anderen Aktivierungsweg, z.B. zur Aktivierung der NADPH-Oxidase, kommt. Aus diesem Grund wurden die in Abbildung 19 gezeigten Versuche durchgeführt. Eine mögliche Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wurde über die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz gemessen.

Für die Luminol-abhängige Chemilumineszenz wurden 200.000 Granulozyten in 75µl RPMI-Medium in eine nichttransluminente 96-Well-Platte gegeben. Diesem Ansatz wurden 5000 Neuroblastomzellen der Zelllinien NB1 und NB2 (E:T-Verhältnis 40:1) in 100µl RPMI-Medium pro Well, ± 10µl Antikörper AK⁺ (a) / AK⁻ (b) zugefügt. Die Granulozyten wurden zuvor teils mit G-CSF bzw. GM-CSF [1000 U/ml Granulozytensuspension] 2 Stunden vorinkubiert. Dann wurden 25µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well) zugegeben. Die Chemilumineszenz-Messung wurde für 30 min bei 37 °C im Luminometer durchgeführt. Parallel dazu wurde ein Teil der Granulozyten mit 25µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert, um zu zeigen, dass die Granulozyten grundsätzlich in der Lage sind

Ergebnisse

ROS zu bilden (positive Kontrolle). Die Messeinheit ist Relative Lights Units (RLU) (n=3).

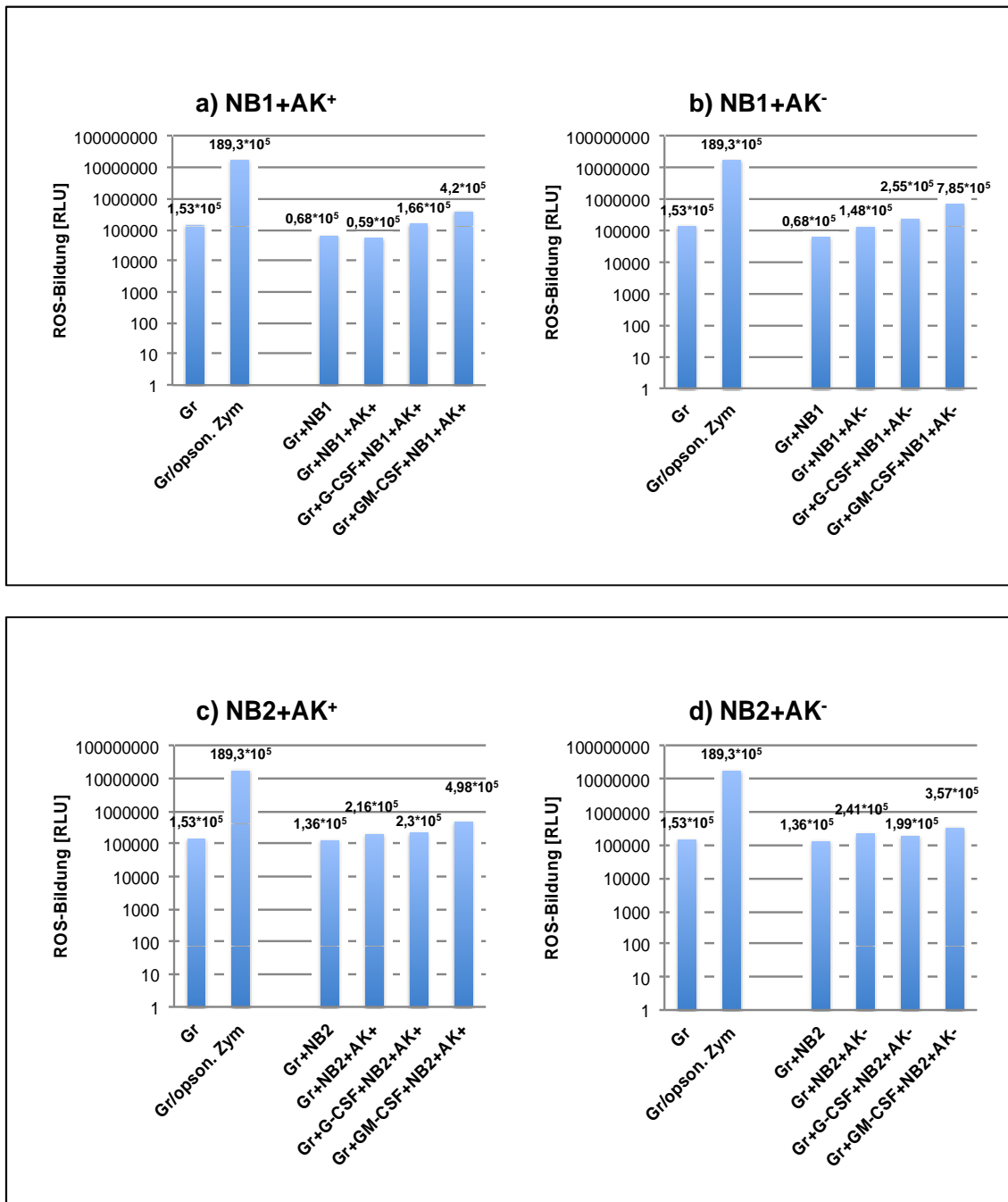


Abb. 19: Prüfung auf Bildung von ROS im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten auf Neuroblastomzellen der Zelllinie NB1 und NB2 bei Inkubation mit AK⁺ und AK⁻.

Ergebnisse

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch (von n=3). Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 200.000 Granulozyten als Effektorzellen in 75µl RPMI-Medium in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. Dem Ansatz wurden 5000 Neuroblastomzellen der Zelllinien NB1 und NB2 (E:T-Verhältnis 40:1) in 100µl RPMI-Medium, plus/minus 10µl Antikörper AK⁺ bzw. AK⁻ zugegeben. Zudem wurden die Granulozyten teils mit G-CSF bzw. GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) 2 Stunden vorinkubiert. Ferner Zugabe von 25µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well). Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Als Kontrolle dienten sowohl ein Reaktionsansatz von Granulozyten, als auch ein Reaktionsansatz mit Granulozyten und NB1 bzw. NB2, jedoch ohne Zugabe von Antikörpern. Die Granulozyten wurden anschließend mit 25µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert, um zu zeigen, dass die Granulozyten grundsätzlich in der Lage sind ROS zu erzeugen. Dies wird in dieser Graphik zur besseren Übersicht nur für den Granulozyten-Ansatz gezeigt (Gr/opson. Zym). Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Volker Bernd Beck durchgeführt.

Während in Gegenwart von ops. Zymosan im Vgl. zu unstimulierten Granulozyten eine sehr starke Steigerung der CL-Signale zu beobachten war ($1.53 \times 10^5 \rightarrow 189 \times 10^5$) kam es bei allen anderen Ansätzen (Gr + AK; GSF/GM-CSF) lediglich zu geringfügigen Veränderungen (wahrscheinlich unspezifischen Messwertschwankungen) ($1.53 \times 10^5 \rightarrow \max 7.85 \times 10^5$).

3.3.2. Wirkung der Vorstimulation der Granulozyten mit Biobran[®] auf die Bildung von ROS in der ADCC-Reaktion gegen Neuroblastomzellen

Abbildung 11 zeigte, dass die Granulozyten-ADCC gegenüber mit AK⁺ und AK⁻ beladenen Neuroblastomzellen stark gesteigert werden konnte, wenn die Granulozyten zuvor mit Biobran[®] inkubiert wurden.

Da aus der Literatur bekannt war, dass Granulozyten mit Hilfe der Aktivierung durch Biobran[®] vermehrt reaktive Sauerstoffverbindungen bilden, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die mit G-CSF/GM-CSF aktivierten Granulozyten zusätzlich noch mit Biobran[®] versetzt wurden, um dadurch einen - möglichen - zusätzlichen Effekt über die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei der ADCC zu erzielen. Wie aus Abbildung 20 zu entnehmen ist, konnte aber auch unter diesen Bedingungen keine Steigerung der Chemilumineszenz -Signale erhalten werden, im Gegenteil, es kam sogar zu einer (minimalen) Abnahme der Chemilumineszenz -Signale.

Ergebnisse

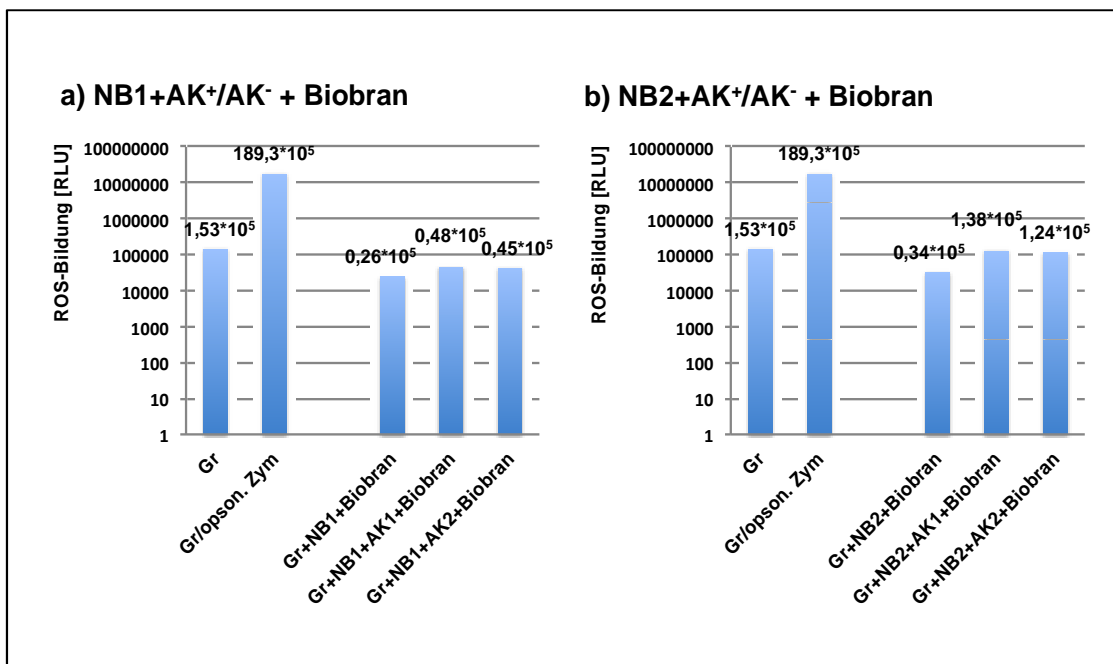


Abb. 20: Prüfung auf Bildung von ROS bei Zugabe von Biobran® im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten auf Neuroblastomzellen der Zelllinie NB1 und NB2 bei Inkubation mit AK^+ und AK^- .

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch. Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 200.000 Granulozyten als Effektorzellen in 75 μ l RPMI-Medium (2h Vorinkubation in RPMI-Medium) in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. Dem Ansatz wurden 5000 Neuroblastomzellen der Zelllinie NB1 (a)/NB2 (b) (E:T-Verhältnis 40:1) in 100 μ l RPMI-Medium, plus/minus 10 μ l Antikörper AK^+ / AK^- zugegeben. Ferner Zugabe von 10 μ l Biobran® (f.c. 500 μ g/ml), 25 μ l Luminol (f.c. 4 μ g/ml pro Well).

Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37°C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Als Kontrolle dienten sowohl ein Reaktionsansatz von Granulozyten, als auch ein Reaktionsansatz mit Granulozyten, Biobran® und NB1/NB2, jedoch ohne Zugabe von Antikörpern. Die Granulozyten wurden anschließend mit 25 μ l opson. Zymosan (f.c. 250 μ g/ml) stimuliert, um zu zeigen, dass die Granulozyten grundsätzlich in der Lage sind ROS zu erzeugen. Dies wird in dieser Graphik zur besseren Übersicht nur für den Granulozyten-Ansatz gezeigt (Gr/opson. Zym). Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Volker Bernd Beck durchgeführt.

3.3.3. Die Rolle externer ROS bei der ADCC durch Granulozyten und der Lyse von Neuroblastomzellen

Die ADCC der Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen verläuft ohne Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Dies wurde durch das Ausbleiben der Luminol-vermittelten Chemilumineszenzreaktion bestätigt, während die gleichen Granulozyten ein eindeutiges Signal bei der Inkubation mit opson. Zymosan zeigten (siehe Abb. 19).

Die Frage war nun, welchen Einfluss eine „künstliche“ Erzeugung von ROS auf die Granulozyten ADCC ausübt, d.h., ob die ADCC in Gegenwart von ROS beeinflusst wird. Das könnte z.B. bei in den Tumor eingewanderten Granulozyten der Fall sein, wenn neben der ADCC durch applizierte Anti-GD2-Antikörper gleichzeitig auch z.B. durch Entzündungsprozesse aktivierte Granulozyten vorhanden sind. Dazu wurden zu den Granulozyten/Neuroblastomzellen/Antikörpern im Inkubationsansatz opson. Zymosan, Glucose-Oxidas bzw. H_2O_2 gegeben und ihr Einfluss auf die ADCC gemessen. Pilotversuche (Einzelversuche) zeigten, dass unter den verschiedenen Bedingungen unter dem Strich praktisch kein Einfluss auf die ADCC zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Allerdings sollte zur Interpretation dabei auch das Testsystem an sich berücksichtigt werden: Es ist bekannt, dass H_2O_2 eine gute cytotoxische Wirkung auf Neuroblastomzellen ausübt: Im 72 Stunden MTT-Test werden in Gegenwart von $100\mu M H_2O_2$ so gut wie alle Neuroblastomzellen abgetötet (Deubzer et al., 2010). Im Gegensatz dazu „überlebten“ beim $^{51}Chrom$ -release Assay bis zu $500\mu M H_2O_2$ praktisch alle Zellen, während ein Anstieg des $^{51}Chrom$ -release im Vergleich zu unbehandelten Neuroblastomzellen erst bei millimolaren Konzentrationen einsetzte (siehe Tabelle 3).

Ergebnisse

Tab. 3: Lyse (%) von NB Zellen durch H₂O₂, gemessen im 3,5 Stunden ⁵¹Chrom -release Assay.

H2O2	NB1	NB2
10µM	5%	
50µM	<0%	
100µM	<0%	
500µM	1%	
1mM	14%	5%
5mM	42%	24%

Angaben im Vergleich zur Spontanlyse ohne H₂O₂

4. Diskussion

Antikörper, die gegen das Gangliosid GD2 gerichtet sind (Maus 3F8, chimeric ch14.18) spielen seit vielen Jahren eine bedeutende Rolle in der klinischen Behandlung des Neuroblastoms (Review in Yang and Sondel, 2010). Pionierarbeiten dazu wurden auch an der Kinderklinik in Tübingen geleistet (Handgretinger et al., 1992; Handgretinger et al., 1995; Navid et al., 2014). Die ersten klinischen Anwendungen erfolgten mit Antikörpern aus der Maus, gegen die sich jedoch bald HAMAS (human antibodies against mouse antibodies) entwickelten. Diese führten in weiterer Folge zur Produktion von humanisierten Antikörpern. Von ihrer biologischen Wirkung her gesehen sind die Complement dependent cytotoxicity (CDC) und die antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) diejenigen Wirkungsmechanismen, welche die zentrale Rolle spielen. Bei der ADCC spielen in erster Linie Natural Killer (NK)- Zellen eine Rolle (und hier insbesondere in Kombination mit IL-2 (LAK cells; lymphokin-activated killer cells), daneben können aber auch Monozyten und Granulozyten über ihre Fc-Rezeptoren zur Bindung und zur Abtötung der Neuroblastomzellen führen. Die Rolle der Granulozyten wird dabei generell unterschiedlich beurteilt: Während Scott et al in ihrem Review „Antibody therapy of cancer“ Granulozyten als Effektorzellen kaum erwähnen (siehe Abb. 21; Scott et al., 2012), messen Cheung und Dyer den Granulozyten gerade bei der ADCC gegen Neuroblastomzellen eine wichtige Bedeutung zu (siehe Abb. 22; Cheung and Dyer, 2013).

Diskussion

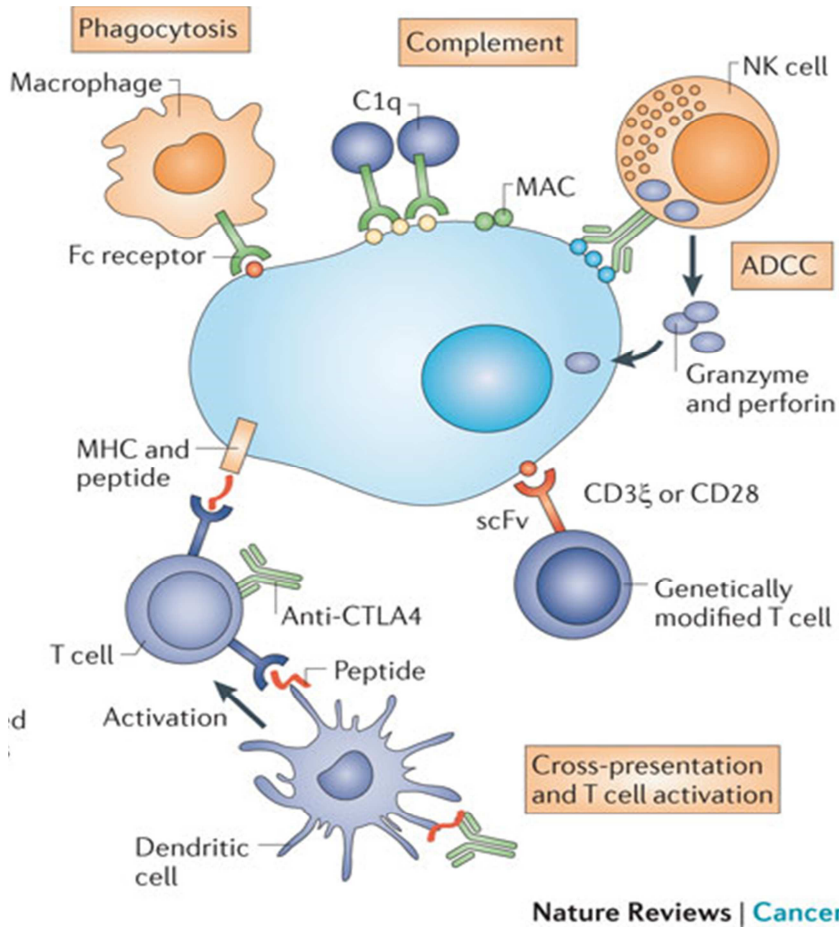


Abb. 21: Immune-mediated tumour cell killing (Originalabbildung und Text nach Scott et al., 2012).

Immune-mediated tumour cell killing can be carried out by the induction of phagocytosis; complement activation; antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC); genetically modified T cells being targeted to the tumour by single-chain variable fragment (scFv); T cells being activated by antibody-mediated cross-presentation of antigen to dendritic cells; and inhibition of T cell inhibitory receptors, such as cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4).

Diskussion

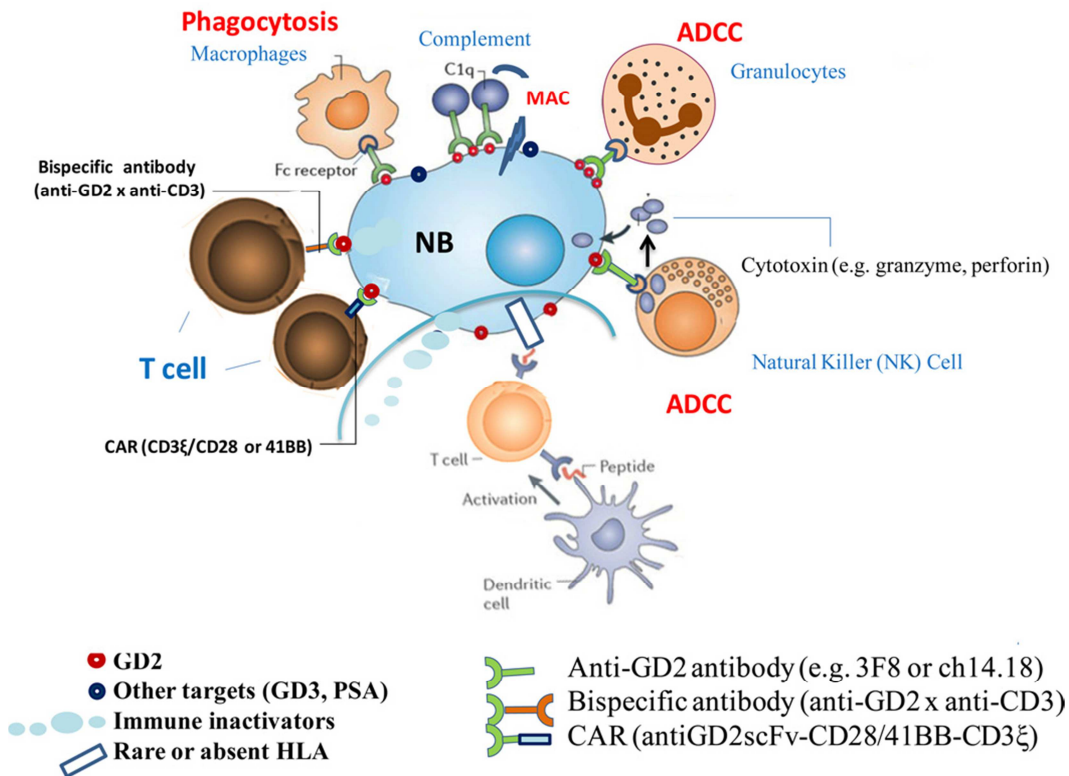


Abb. 22: Immunotherapy of Neuroblastoma (Originalabbildung und Text nach Cheung and Dyer, 2013).

NB evades T-cells by downregulating or losing HLA expression, thereby interfering with the afferent arm (priming through dendritic cells), homing of T-cells to NB, and the CTL effector phase of adaptive immunity. Soluble inhibitors of immune response (e.g. FasL, gangliosides) are constantly released into the tumor stroma to impair cellular immunity. In addition, NB recruits pro-tumor macrophages and silences NK cells. Myeloid suppressor cells and T-reg can also suppress immunity. The paucity of mutations in NB compared to adult cancers like melanoma, the immaturity of the immune system in young patients, their massive disease and the intensive chemotherapy all combine to make NB poorly immunogenic for T-cells. Carbohydrate differentiation antigens (e.g. GD2, GD3 and polysialic acid (PSA)), all of which being classically T-independent antigens, offered alternative targets for antibody-based therapies. In the presence of monoclonal antibodies (e.g. 3F8 or ch14.18) specific for GD2, NB loses their defense and becomes highly susceptible to (1) NK (natural killer) cell mediated antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), (2) granulocyte mediated ADCC, (3) complement mediated cytotoxicity by binding to C1q thereby activating the complement cascade, delivering membrane attack complex (MAC) to tumor cell membrane, and (4) monocyte-macrophage mediated cytotoxicity. Even polyclonal T-cells can be retargeted to kill NB through MAb in the form of chimeric antigen receptors (CAR) or bispecific antibodies (anti-GD2 x anti-CD3). CARs are anti-tumor single chain Fv fragments (scFv) genetically fused through a transmembrane domain to T-cell activating motifs (CD3 ξ and CD28/41BB) and transfected into killer lymphocytes.

Diskussion

In vitro und *in vivo* scheinen verschiedene Interleukine (neben IL2 bei NK-Zellen, bei Granulozyten G-CSF und GM-CSF) in der Lage zu sein, die cytotoxischen Wirkungen auf Neuroblastomzellen zu verstärken (Yu et al., 2010). Die klinisch bedeutsamste Nebenwirkung bei der Anwendung dieser Antikörper ist das Auftreten von starken Schmerzen (visceral pain and allodynia), wofür vor allem die CDC verantwortlich gemacht wurde (Galvan et al., 2006). Aus diesem Grund wurde der ursprünglich eingesetzte Mensch-Maus chimere Antikörper ch14.18 so modifiziert, dass durch eine Punkt-Mutation (hu14.18K332A) die Complementaktivierung verhindert wurde. Das führte im Rattenversuch zu einer Reduzierung der Antikörper-induzierten Allodynia (Sorkin et al., 2010). Während, wie zu erwarten war, dadurch auch die CDC Effekte gegen Neuroblastomzellen zurückgingen, blieben die ADCC praktisch unbeeinflusst, wobei als Effektorzellen bei der zitierten Arbeit von Sorkin et al NK-Zellen (CD56+CD3-) verwendet wurden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der beiden Antikörper (ch14.18, hier als AK⁺, also zur CDC fähig, und hu14.18K332A, hier als AK⁻, also nicht zur CDC fähig, bezeichnet) auf zwei GD2-positive Neuroblastomzellen *in vitro* untersucht, wobei für die ADCC-Reaktion anstelle der NK-Zellen Granulozyten als Effektorzellen verwendet wurden. Die bei diesen Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse und verschiedene methodische Aspekte werden im Folgenden diskutiert.

CDC Reaktion von AK⁺ und AK⁻

Wie aus der Abbildung 14 zu entnehmen ist, zeigt AK⁺ eine intensive CDC Reaktion in Abhängigkeit der Serum-Menge im Testsystem, während diese Reaktion bei Verwendung von AK⁻ sehr deutlich reduziert war. Im Vergleich zur Granulozyten ADCC erwies sich die CDC als sehr effektiv (siehe Abb. 17). Das hier verwendete Serum führte in Abwesenheit der Antikörper im Vergleich zum RPMI-Medium zu einer etwas erhöhten Zelllyse, einem bekannten Phänomen, die, in Abhängigkeit vom Spender, allerdings massiv ausgeprägt sein kann (Ollert et al., 1997). Somit ergibt sich wahrscheinlich die Notwendigkeit, dass

Diskussion

auf Grund der starken Schmerzentwicklung bei der Verwendung des Anti-GD2 Antikörpers mit Complementbindungseigenschaften, auf die Anti-Neuroblastomwirkung durch die CDC verzichtet werden muss, da diese Schmerzen auch relativ Opiat-resistent sind. – Eine Phase I-Studie wurde bereits mit diesem AK⁻ publiziert. (Navid et al., 2014).

Granulozyten ADCC unter Verwendung von AK⁺ und AK⁻

Allgemeine Vorbemerkungen:

Neutrophile Granulozyten stellen mit ca 40-70% die häufigste Leukozyten-Zellpopulation im Blut dar. Sie besitzen Fc-Rezeptoren und sind damit grundsätzlich zur ADCC-Reaktion in der Lage. Über ihre Rolle bei der Abtötung von Neuroblastom- und anderen Tumorzellen *in vivo* herrscht Unklarheit, insbesondere im Vergleich zu anderen Effektorzellen wie den NK-Zellen. Aus *in vitro* Untersuchungen (auch in der vorliegenden Arbeit) ist bekannt, dass Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen auch bei sehr hohen E:T-Verhältnissen (50:1) kaum in der Lage sind, diese Zellen direkt abzutöten. In Gegenwart von Antikörpern gegen GD2 kommt es zur Neuroblastomzelllyse, allerdings bleibt auch diese im Vergleich zu NK-Zellen schwach und wird erst in Gegenwart von G-CSF oder GM-CSF deutlich gesteigert (auf die potentielle Problematik dieser Vorbehandlung wird später noch eingegangen).

Über die Mechanismen der Granulozyten-ADCC gibt es verschiedene Beschreibungen in der Literatur (siehe Kapitel 1). Offensichtlich spielt die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei diesem Prozess keine Rolle. Das ist insofern erwähnenswert, da die Unfähigkeit zur Bildung von ROS, wie sie bei der septischen Granulomatose durch eine Störung der NADPH-Oxidase (NOX-2) auftritt, zu schwersten, lebensbedrohlichen Störungen aufgrund mangelnder Abtötung von Mikroorganismen führt. Bei der ADCC (unter Verwendung von ch14.18 (AK)) erwiesen sich Granulozyten von Patienten mit septischer Granulomatose ganz im Gegenteil sogar als effektiver bei der Abtötung von Neuroblastomzellen, als von gesunden Personen (Bruchelt et al., 1989). In der

hier vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass auch der AK^- seine Granulozyten-ADCC ohne die Produktion von ROS ausführen kann. Generell könnte es sogar, bei Betrachtung der *in vivo* Situation, von Vorteil sein, wenn in einem Tumoreal die eingewanderten Granulozyten keine ROS bilden, da diese durchaus auch hemmende Effekte auf andere immunkompetente Leukozyten haben können (Schielau and Finn, 2001). Ein anderer Aspekt, der zu Vorsicht bei der Interpretation der *in vitro* Ergebnisse mahnt, stellt die Verwendung von Faktoren wie G-CSF und GM-CSF dar: Während im isolierten System die Granulozyten ADCC, sowohl bei der Verwendung von AK^+ als auch AK^- erst durch vorausgegangene Aktivierung mit G-CSF bzw. GM-CSF ausgelöst werden kann, ist bei Übertragung auf die *in vivo* Situation mit ihren vielfältigen und komplexen Interaktionen eventuell große Vorsicht geboten: Es wurde berichtet, dass die NK-Funktion in Gegenwart von G-CSF streng inhibiert wird (Schlahasa et al., 2011). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass es Subpopulationen von Neuroblastomzellen gibt, die den G-CSF-Rezeptor exprimieren und eine besonders hohe Tumorgenität aufweisen (Hsu et al., 2013). Betrachtet man also die Granulozyten ADCC isoliert, so übt die Gegenwart von G-CSF einen erwünschten positiven Effekt aus; betrachtet man hingegen das Gesamtsystem *in vivo*, so könnten sich die Netto-Effekte dramatisch umkehren. Bei GM-CSF scheint die Situation anders zu sein. Auch hier wurde die Granulozyten-ADCC im isolierten *in vitro* System deutlich gesteigert, aber es wurde auch berichtet, dass eine Neuroblastomtherapie nach Induktionstherapie und Stammzell-Transplantation mit dem Antikörper ch14.18 + GM-CSF, IL-2 und Isotretinoin signifikant bessere Ergebnisse lieferte, als die „Standard-Therapie“ mit Isotretinoin allein (Yu et al., 2010). In einer weiteren Studie unter Verwendung von 3F8 in Kombination mit GM-CSF und 13 cis retinoic acid, aber ohne IL-2, zeigten sich ebenfalls sehr erfolgversprechende Ergebnisse (Cheever et al., 2009).

Im Gegensatz zu G-CSF könnte GM-CSF möglicherweise auch einen eher stimulierenden Effekt auf NK-Zellen ausüben (Kim et al., 2001), allerdings wird die Rolle von GM-CSF kontrovers beschrieben: (Koulova et al., 2005) fanden keine synergistischen Effekte von IL-2 und GM-CSF bei der Behandlung des Nierenzellcarcinoms, und Schiller et al., 1996 beschreiben eine Hemmung der

Diskussion

NK-Zell Zytotoxizität durch GM-CSF. Es sollte also noch geprüft werden, ob bei der Kombination IL-2/GM-CSF (+ Isoretinoin) GM-CSF einen abschwächenden Effekt auf die IL-2 verstärkende Toxizität von NK-Zellen ausübt.

Neben GM-CSF und IL-2 in Kombination mit Anti-GD2 Antikörpern werden in zunehmendem Maße auch andere biological response modifiers (BRM) eingesetzt. Zu diesen gehören β -Glucane, von denen berichtet wurde, dass sie sowohl die NK-, Granulozyten- und Monozyten ADCC steigern können (siehe Kapitel 1). In hier durchgeführten Pilotversuchen wurde gezeigt, dass Biobran[®]/MGN-3 die Granulozyten ADCC, ähnlich wie GM-CSF/G-CSF, steigern kann. Diese Biobran[®]-Effekte scheinen ebenfalls ohne die Aktivierung des „oxidative burst“ abzulaufen. Im Hinblick auf die geschilderten Probleme bei der Verwendung von G-CSF könnte der Befund, dass Biobran[®] die ADCC der Granulocyten (auch) ohne Beteiligung von ROS fördert, insofern von Bedeutung sein, da Granulocyten, wenn sie ROS (H₂O₂) produzieren, wie bereits erwähnt, eine Hemmung der T-Zell-Funktion auslösen könnten.

Ähnliche Effekte wurden bereits vorher für NK-Zellen beschrieben. Biobran[®] könnte deshalb eine erfolgversprechendere und sichere Wirkung haben.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes aus den durchgeführten *in vitro* Versuchen sagen:

1. Der Einsatz von AK⁻ anstelle von AK⁺ verursacht eine deutliche Reduzierung der gesamtlytischen Aktivität (CDC+ADCC) gegenüber Neuroblastomzellen, ist aber wahrscheinlich nötig, um die massiven Schmerznebenwirkungen zu reduzieren.

2. Obwohl G-CSF (GM-CSF) erst eine signifikante Granulozyten-ADCC *in vitro* ermöglicht, sollte zumindest bei G-CSF ihr klinischer Einsatz hinterfragt werden, da möglicherweise *in vivo* unvorteilhafte Wirkungen zum Tragen kommen

Diskussion

(Hemmung der deutlich effektiveren NK-ADCC und Stimulierung G-CSF-Rezeptor-positiver Neuroblastom-Stammzellen).

3. Eine Alternative könnten BRM wie Biobran® darstellen, da sich offensichtlich sowohl die NK-Monozyten und wie auch die Granulozyten ADCC steigern können.

Abschließend soll - im Hinblick auf die Rolle von Granulozyten bei der Tumorbehandlung - noch eine grundsätzliche Frage aufgegriffen werden: Sind sie eigentlich nützlich oder eher schädlich bei der Behandlung von Tumoren?

Obwohl einige Arbeiten zu dem Schluss kommen, dass Granulozyten eine positive Wirkung bei der Abtötung von Tumoren, insbesondere bei der ADCC haben, ist das nicht ganz eindeutig: Eine hohe Infiltration von Tumorgewebe mit Granulozyten scheint eher mit einer schlechten Prognose verbunden zu sein, da Subpopulationen eine hemmende Wirkung auf andere Effektorzellen (NK-Zellen, T-Zellen) ausüben könnten (Rieber et al., 2013). Darüber hinaus scheinen die Effekte der Granulozyten (*in vitro* Untersuchungen) auf Neuroblastomzellen im Vergleich zu den Effekten von NK-Zellen und der Complementlyse eher bescheiden zu sein, auch nach der Aktivierung mit G-CSF/GM-CSF (hohes E:T-Verhältnis für eine effektive Lyse nötig).

Zuletzt sei noch auf einige methodische Aspekte (Probleme) bei der Durchführung dieser *in vitro* Experimente einzugehen:

1. Granulozyten sind äußerst labile Zellen, die bereits während der Isolierung aus dem Vollblut einen deutlichen Hang zur Degranulation zeigen (siehe Abb. 4). Da diskutiert wird, dass Granulozyten über die Ausschüttung lysosomaler Enzyme (Defensine, Cathepsin G), (Barker and Reisfeld, 1993) aktiv sind, könnte ihre Wirkung *in vivo* also deutlich höher sein als *in vitro*.

Diskussion

2. Sowohl beim Europium-Assay als auch beim $^{51}\text{Chrom}$ -release Assay trat das Problem auf, dass der „Spontan-release“ der Neuroblastomzellen in Gegenwart von Granulozyten (die von sich aus keine lytische Aktivität besitzen), meist geringer war als in reinem Inkubationsmedium (= das eigentliche Medium zur Bestimmung des „Spontan-releases“). Ursprüngliche Annahmen, dass die bei der Spontanlyse aus den Neuroblastomen freigesetzten Komponenten ($^{51}\text{Chrom}$ markierter Proteine bzw. Europium-Komplexe) von den Granulozyten aufgenommen werden könnten und somit als Ursache für die im Vergleich zur Spontanlyse (ohne Granulozyten) geringeren Messwerte verantwortlich seien, konnten sich experimentell allerdings nicht beweisen lassen. Da bekannt war, dass Granulozyten alleine keine lytische Aktivität aufweisen (Lyse: 0%), wurde dieser Wert als Spontanwert verwendet, um negative Werte zu vermeiden, die sich gelegentlich ergeben hätten, wenn stattdessen das Medium als Null-Wert (Spontanwert) verwendet worden wäre. Steigerungen der Lyse durch Wirkungen von BRM und Antikörpern wurden auf diesen Wert bezogen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere die Wirkung eines gegen das Gangliosid GD2 gerichteten Antikörpers [(hu14.18K332A), AK⁻] untersucht, der gegenüber einem ursprünglichen, bereits klinisch in der Therapie des Neuroblastoms verwendeten [ch 14,18, AK⁺] so verändert wurde, dass er keine Complement-Bindungsstelle mehr besitzt. Dadurch sollen die klinischen Nebenwirkungen (Schmerzen) reduziert werden. Unter Verwendung von zwei GD2-positiven Neuroblastomzelllinien wurde die Granulozyten-ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) und die CDC (Complement dependent cytotoxicity) mit beiden Antikörpern mit Hilfe des ⁵¹Chrom- release-Assays und des Europium-Assays untersucht. Dabei zeigte AK⁺ eine ausgeprägte CDC, während AK⁻, wie erwartet, keine Wirkung zeigte. Bezüglich der Granulozyten-ADCC erwiesen sich beide Antikörper als praktisch identisch wirksam: Die – per se auch bei hohen E:T-Verhältnissen (Effektor:Targetzellen) - schwache Granulozyten-ADCC Reaktion wurde in beiden Systemen durch GM-CSF bzw. G-CSF deutlich gesteigert. Reaktionsmechanistisch erwies sich auch die Cytotoxizität von AK⁻ unabhängig von der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, wie das schon früher für AK⁺ beschrieben wurde. Im Vergleich zu ADCC-Reaktionen mit NK-Zellen ist die Granulozyten-ADCC sehr gering und nur mit GM-CSF bzw. G-CSF einigermaßen effektiv. Allerdings muss für den klinischen Einsatz berücksichtigt werden, dass z.B. G-CSF eher hemmend auf die deutlich effektivere NK-ADCC wirkt und auch gerade beim Neuroblastom höchst problematisch ist, da es sogar förderlich auf das Wachstum der NB-Zellen sein könnte. Somit ist eine Anwendung dieses Faktors wahrscheinlich nicht empfehlenswert. GM-CSF scheint hingegen klinisch in Kombination mit Anti-GD₂-Antikörpern insgesamt eher positiv zu wirken. Andere „biologic response modifiers“ (BRM), wie das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Oligoglycan Biobran®, zeigten ähnlich wie GM-CSF/G-CSF *in vitro* eine steigernde Wirkung auf die Granulozyten-ADCC (und erhöht auch die NK-ADCC) und wird bereits klinisch eingesetzt. Zusammenfassend kann also für diese *in vitro* Versuche gesagt werden, dass der Verlust der Complement-Aktivierungsstelle eine deutliche Reduzierung der

Zusammenfassung

cytotoxischen Aktivität von AK^- im Vergleich zu AK^+ darstellt, während der Beitrag der Granulozyten ADCC im Vergleich dazu eher gering ist. Biobran® könnte ein aussichtsreicher BRM sein, vorausgesetzt, dass die positiven Effekte der Granulozyten-ADCC bei der Abwehr von Tumor (Neuroblastom)- Zellen die negativen (potentielle Wirkung als Suppressorzelle) überwiegen.

6. Literaturverzeichnis

- Alderson KL, Sondel PM, (2011) Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol.* 379123.
- Allen RC, (1982) Chemiluminescence and the study of phagocyte redox metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 141: 411-421.
- Allendorf DJ, Yan J, Ross GD, et al., (2005) C5a-mediated leukotriene B₄-amplified neutrophil chemotaxis is essential in tumor immunotherapy facilitated by anti-tumor monoclonal antibody and beta-glucan. *J Immunol.* 174(11): 7050-7056.
- Assari T, (2006) Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol.* 5:4.
- Barker E, Reisfeld RA, (1993) A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 53(2): 362-367.
- Bayer M, Kuçi Z, Schömig E, et al., (2009) Uptake of mIBG and catecholamines in noradrenaline- and organic cation transporter-expressing cells: potential use of corticosterone for a preferred uptake in neuroblastoma- and pheochromocytoma cells. *Nucl Med Biol.* 36(3): 287-294.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, et al., (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38(11 Pt 1): 3751-3757.
- Borregaard N, Kragballe K, (1980) Role of oxygen in antibody-dependent cytotoxicity mediated by monocytes and neutrophils. *J Clin Invest.* 66(4): 676-683.
- Bruchelt G, Schmidt KH, (1984) Comparative studies on the oxidative processes during phagocytosis measured by luminol-dependent chemiluminescence. *J Clin Chem Clin Biochem.* 22(1): 1-13.
- Bruchelt G, Handgretinger R, Kimmig A, et al., (1989a) Effects of granulocytes on human neuroblastoma cells measured by chemiluminescence and chromium-51 release assay. *J Biolumin Chemilumin.* 3(2): 93-96.
- Bruchelt G, Handgretinger R, Fierlbeck G, et al., (1989b) Lysis of neuroblastoma cells by the ADCC-reaction: granulocytes of patients with chronic granulomatous disease are more effective than those of healthy donors. *Immunol Lett.* 22(3): 217-220.
- Caligiuri MA, (2008) Human natural killer cells. *Blood.* 112(3): 461-469.

Literaturverzeichnis

- Collins, F.S., *Meine Gene - Mein Leben*. 2011, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Chan GC, Chan WK, Sze DM, (2009) The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*. 2:25.
- Cheung NK, Modak S, (2002) Oral (1-->3),(1-->4)-beta-D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 8(5): 1217-1223.
- Cheung NK, Dyer MA, (2013) Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 13(6): 397-411.
- Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, et al., (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*. 15(17): 5323-5337.
- Deo YM, Graziano RF, Repp R, et al., (1997) Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. *Immunol Today*. 18(3): 127-135.
- Deubzer B, Mayer F, Kuçi Z, et al., (2010) H₂O₂-mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin. *Cell Physiol Biochem*. 25(6): 767-774.
- Deubzer JE, (2010) Der Einfluss von Ascorbat, 2-Deoxy-D-Glukose und Dichlorazetat auf das Wachstum und den Glukosestoffwechsel von Neuroblastomzellen mit und ohne N-myc-Amplifikation. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
- Galvan MD, Luchetti S, Burgos AM, et al., (2008) Deficiency in complement C1q improves histological and functional locomotor outcome after spinal cord injury. *J Neurosci* 28(51): 13876-13888.
- Ghoneum M, Matsuura M, Gollapudi S, (2008) Modified arabinoxylan rice bran (MGN3/Biobran) enhances intracellular killing of microbes by human phagocytic cells in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 21(1): 87-95.
- Glowniak JV, Kilty JE, Amara SG, et al., (1993) Evaluation of metaiodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine and serotonin transporters. *J Nucl Med*. 34(7): 1140-1146.
- Hafeman DG, Lucas ZJ, (1979) Polymorphonuclear leukocyte-mediated, antibody-dependent, cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst. *J Immunol*. 123(1): 55-62.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Forth edition, Oxford University Press.

Literaturverzeichnis

- Handgretinger R, Baader P, Dopfer R, et al., (1992) A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol Immunother.* 35(3): 199-204.
- Handgretinger R, Anderson K, Lang P, et al., (1995) A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 31A(2): 261-267.
- Hank JA, Weil-Hillman G, Surfus JE, et al., (1990a) Addition of interleukin-2 in vitro augments detection of lymphokine-activated killer activity generated in vivo. *Cancer Immunol Immunother.* 31(1): 53-59.
- Hank JA, Robinson RR, Surfus J, et al., (1990b) Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* 50(17): 5234-5239.
- Hokland P, Berg K, (1981) Interferon enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 127(4): 1585-1588.
- Hong F, Hansen RD, Yan J, et al., (2003) Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res.* 63(24): 9023-9031.
- Hong F, Yan J, Baran JT, et al., (2004) Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol.* 173(2): 797-806.
- Horner H, Frank C, Dechant C, et al., (2007) Intimate cell conjugate formation and exchange of membrane lipids precede apoptosis induction in target cells during antibody-dependent, granulocyte-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 179(1): 337-345.
- Hsu DM, Agarwal S, Benham A, et al., (2013) G-CSF receptor positive neuroblastoma subpopulations are enriched in chemotherapy-resistant or relapsed tumors and are highly tumorigenic. *Cancer Res.* 73(13): 4134-4146.
- Joly E, Hudrisier D, (2003) What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol.* 4(9): 815.
- Kim KY, Kang MA, Nam MJ, (2001) Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma. *Cancer Lett.* 166(1): 33-40.
- Kimmig B, Brandeis WE, Eisenhut M, et al., (1984) Scintigraphy of a neuroblastoma with I-131 meta-iodobenzylguanidine. *J Nucl Med.* 25(7): 773-775.

Literaturverzeichnis

- Köhler G, Milstein C, (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256(5517): 495-497.
- Koulova L, Novik Y, Caliendo G, et al., (2005) A phase 2 study of moderate dose interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic or unresectable renal cell carcinoma. *J Immunother*. 28(6): 576-581.
- Kushner BH, Cheung NK, (1991) Clinically effective monoclonal antibody 3F8 mediates nonoxidative lysis of human neuroectodermal tumor cells by polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res*. 51(18): 4865-4870.
- Kushner BH, Cheung NK, (1992) Absolute requirement of CD11/CD18 adhesion molecules, FcRII and the phosphatidylinositol-linked FcRIII for monoclonal antibody-mediated neutrophil antihuman tumor cytotoxicity. *Blood*. 79(6): 1484-1490.
- Lewis CE, Pollard JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 66(2): 605-612.
- Li B, Allendorf DJ, Hansen R, et al., (2006) Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol*. 177(3): 1661-1669.
- Li B, Allendorf DJ, Hansen R, et al., (2007) Combined yeast {beta}-glucan and antitumor monoclonal antibody therapy requires C5a-mediated neutrophil chemotaxis via regulation of decay-accelerating factor CD55. *Cancer Res*. 67(15): 7421-7430.
- Liu J, Gunn L, Hansen R, et al., (2009) Combined yeast-derived beta-glucan with anti-tumor monoclonal antibody for cancer immunotherapy. *Exp Mol Pathol*. 86(3): 208-214.
- Müller-Peddinghaus R, (1984) In vitro determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence. *Int J Immunopharmacol*. 6(5): 455-466.
- Munn DH, Cheung NK, (1989) Antibody-dependent antitumor cytotoxicity by human monocytes cultured with recombinant macrophage colony-stimulating factor. Induction of efficient antibody-mediated antitumor cytotoxicity not detected by isotope release assays. *J Exp Med*. 170(2): 511-526.
- Navid F, Sondel PM, Barfield R, et al., (2014) Phase I trial of a novel anti-GD2 monoclonal antibody, Hu14.18K322A, designed to decrease toxicity in children with refractory or recurrent neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 32(14): 1445-1452.

Literaturverzeichnis

- Ollert MW, David K, Vollmert C, et al., (1997) Mechanisms of in vivo anti-neuroblastoma activity of human natural IgM. *Eur J Cancer* 33(12): 1942-1948.
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG, (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human adrenaline transporter. *Nature* 350: 350-354
- Peipp M, Lammerts van Bueren JJ, Schneider-Merck T, et al., (2008) Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*. 112(6): 2390-2399.
- Preis PN, Saya H, Nádasdi L, et al., (1988) Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res*. 48(22): 6530-6534.
- Ravetch JV, (1997) Fc receptors. *Curr Opin Immunol*. 9(1): 121-125.
- Rieber N, Gille C, Köstlin N, (2013) Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin Exp Immunol*. 174(1): 45-52.
- Russell JH, Ley TJ, (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 20: 323-370.
- Schilling FH, Spix C, Berthold F, et al., (2002) Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med*. 346(14): 1047-1053.
- Schiller JH, Hank JA, Khorsand M, et al., (1996) Clinical and immunological effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor coadministered with interleukin 2: a phase IB study. *Clin Cancer Res*. 2(2): 319-330.
- Schlahsa L, Jaimes Y, Blasczyk R, et al., (2011) Granulocyte-colony-stimulatory factor: a strong inhibitor of natural killer cell function. *Transfusion* 51(2): 293-305.
- Schmielau J, Finn OJ, (2001) Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 61(12): 4756-4760.
- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al., (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983 305(5931): 245-248.
- Sorkin LS, Otto M, Baldwin WM 3rd, et al., (2010) Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain*. 149(1): 135-142.

Literaturverzeichnis

- Souto JC, Vila L, Bru A, (2011) Polymorphonuclear neutrophils and cancer: Intense and sustained neutrophilia as a treatment against solide tumors. *Med. Res. Reviews.* 31(3): 311-363.
- Stockmeyer B, Beyer T, Neuhuber W, et al., (2003) Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J Immunol.* 171(10): 5124-5129.
- Svennerholm L, (1964) The gangliosides. *J Lipid Res.* 5: 145-155.
- Svennerholm L, Boström K, Fredman P, et al., (1994) Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta.* 1214(2): 115-123.
- Treuner J, Feine U, Niethammer D, et al., (1984) Scintigraphic imaging of neuroblastoma with [¹³¹I]iodobenzylguanidine. *Lancet.* 1(8372): 333-334.
- Treuner J. (1985) Use of ¹³¹I-meta-iodobenzylguanidine in pediatric oncology. *Nuklearmedizin.* 24(1): 26-28.
- van Egmond M, van Spriel AB, Vermeulen H, et al., (2001) Enhancement of polymorphonuclear cell-mediated tumor cell killing on simultaneous engagement of fcgammaRI (CD64) and fcalphaRI (CD89). *Cancer Res.* 61(10): 4055-4060.
- Vilim V, Wilhelm J, (1989) What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Radic Biol Med.* 6(6): 623-629.
- Weiss SJ, LoBuglio AF, (1982) Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest.* 47(1): 5-18.
- Yang RK, Sondel PM, (2010) Anti-GD2 Strategy in the treatment of neuroblastoma. *Drugs Future.* 35(8): 665.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, et al., (2010) Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med.* 363(14): 1324-1334.
- Zerbes P., Untersuchungen zum Einfluss des Nahrungsergänzungspräparates Biobran/MGN3 auf die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen. Medizinische Doktorarbeit, Universitätsklinikum für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, 2012.
- Zipfel M, Carmine TC, Gerber C, et al., (1997) Evidence for the activation of myeloperoxidase by f-Meth-Leu-Phe prior to its release from neutrophil granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 232(1): 209-212.

Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst habe. Ich habe keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden teilweise in Zusammenarbeit mit der Doktorarbeit von Herrn Dr. med. Volker Bernd Beck durchgeführt. Insbesondere wurden die zahlreichen Isolierungen der Granulozyten aus Vollblut gemeinsam durchgeführt und anschließend für die entsprechenden unterschiedlichen Versuche aufgeteilt. Der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen lag bei Herrn Beck auf der Charakterisierung des Granulozyten-Energiestoffwechsels und ihrer Funktion in Abhängigkeit ihrer Lagerungsdauer. Der Schwerpunkt der vorliegenden Doktorarbeit von Jens Neumann lag an der Granulozyten ADCC und CDC gegenüber Neuroblastomzellen. Einige Versuche wurden gemeinsam durchgeführt.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe, und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Danksagung

Danksagung

Diese Dissertation entstand an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in der Abteilung Hämatologie und Onkologie unter der Leitung des ärztlichen Direktors Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger, dem ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke.

Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Bruchelt für die Festlegung des Themas der Dissertation und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Bereitschaft zur Übernahme der Erstgutachterrolle. Mit seinem enormen Wissen ließ er mich an seiner Forschungserfahrung teilhaben und führte mich mit seiner Begeisterungsfähigkeit auch durch schwierige Phasen der Laborarbeit.

Herrn Dr. med. Volker Bernd Beck danke ich besonders für seine kollegiale Unterstützung und Zusammenarbeit im Labor.

Viel Hilfe erhalten habe ich von den Kolleginnen und Kollegen des hämato-onkologischen Routinelabors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Meiner Freundin Evamaria danke ich für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und für die Geduld während des Zusammenschreibens.