

# **Einfluß von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Tumorzellyse durch Immunzellen**

**I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

**Mareike Schmudde**

geboren am 27. Juli 1980

in Karlsruhe

Greifswald, 23. März 2010

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fesser

1. Gutachter: Prof. Dr. Barbara M. Bröker

2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Steinle

Tag der Promotion: 28.06.2010

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Das menschliche Immunsystem .....                                 | 1         |
| 1.1.1 Aufgaben und Aufbau des Immunsystems .....                       | 1         |
| 1.1.2 Aktivierung von NK-Zellen.....                                   | 1         |
| 1.1.3 Aktivierung von T-Zellen.....                                    | 3         |
| 1.1.4 Die Immunantwort gegen Tumoren .....                             | 4         |
| 1.1.5 Die Rolle des Immunsystems in der Tumorthherapie .....           | 5         |
| 1.2 Histondeacetylase-Inhibitoren .....                                | 6         |
| 1.2.1 Regulation der Genexpression durch Histonacetylierung .....      | 6         |
| 1.2.2 HDACs und ihre Inhibition durch HDIs .....                       | 7         |
| 1.2.3 Veränderte Histonacetylierung in Tumorzellen .....               | 8         |
| 1.2.4 HDIs besitzen Anti-Tumor-Aktivität.....                          | 9         |
| 1.2.5 Immunmodulatorische Effekte von HDIs.....                        | 11        |
| 1.3 Ziele der Arbeit.....  | 12        |
| <br>   |           |
| <b>2. Material .....</b>   | <b>13</b> |
| 2.1 Laborgeräte.....   | 13        |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien.....   | 14        |
| 2.3 Reagenzien und Chemikalien .....                                   | 14        |
| 2.4 Eukaryotische Zellen und Zelllinien.....                           | 16        |
| 2.5 Medien, Puffer, Lösungen .....                                     | 16        |
| 2.6 Antikörper.....  | 18        |
| 2.6.1 Antikörper für Oberflächenfärbungen .....                        | 18        |
| 2.6.2 Antikörper für Maskierungsexperimente.....                       | 19        |
| 2.7.3 Antikörper für die Isolierung von Zellpopulationen.....          | 19        |
| 2.7 Kits .....   | 19        |
| 2.8 Software.....  | 19        |
| <br>   |           |
| <b>3. Methoden.....</b>  | <b>20</b> |
| 3.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur .....                          | 20        |
| 3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen .....                         | 20        |
| 3.1.2 Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen .....              | 20        |
| 3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl .....                              | 20        |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden.....                                 | 21        |
| 3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMCs)..... | 21        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.2     | Isolierung von CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen aus PBMCs.....   | 21        |
| 3.2.3     | Isolierung von NK-Zellen aus PBMCs.....  | 21        |
| 3.3       | Stimulation humaner Immunzellen .....  | 22        |
| 3.3.1     | Inaktivierung von humanem Serum .....  | 22        |
| 3.3.2     | IL-2-Aktivierung von PBMCs.....  | 22        |
| 3.3.3     | IL-2-Aktivierung von NK92C1-Zellen .....   | 22        |
| 3.3.4     | Proliferationsassay mit PBMCs.....   | 22        |
| 3.3.5     | Inaktivierung von Tumorzellen mit Mitomycin C .....  | 23        |
| 3.3.6     | Allogenes T-Zell-Priming .....   | 23        |
| 3.4       | Messung von Tumorzelltod.....  | 24        |
| 3.4.1     | Durchflußzytometrische Messung.....  | 24        |
| 3.4.2     | <sup>51</sup> Cr-Release-Assay.....  | 24        |
| 3.5       | Durchflußzytometrische Methoden.....   | 25        |
| 3.5.1     | Färbung extrazellulärer Moleküle .....   | 25        |
| 3.5.2     | Zellzyklusanalyse .....  | 26        |
| 3.5.3     | CD107a-Mobilisierung.....  | 26        |
| 3.5.4     | Zytokinbestimmung mit dem <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) .....   | 27        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>28</b> |
| 4.1       | HDI sensibilisieren Tumorzellen für zytolytische Effekte aktivierter<br>NK-Zellen.....   | 28        |
| 4.1.1     | NK-Zellen, nicht jedoch CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen mobilisieren CD107a<br>nach Tumorzellkontakt.....                                 | 28        |
| 4.1.2     | HDI verstärken die Tumorzelltodinduktion durch NK92C1-<br>Zellen.....  | 29        |
| 4.1.3     | Lyse der Tumorzellen durch PBMCs ist abhängig von<br>aktivierenden NK-Rezeptoren .....   | 31        |
| 4.1.4     | HDI erhöhen die Expression aktivierender NK-Liganden auf<br>Tumorzellen.....   | 33        |
| 4.1.5     | HDI beeinflussen nicht die Expression von Todesrezeptoren auf<br>Tumorzellen.....  | 35        |
| 4.2       | HDI verhindern die Aktivierung tumorreaktiver NK-Zellen – sie<br>beeinflussen aber nicht ihre zytolytischen Effektorfunktionen ..... | 36        |
| 4.2.1     | SAHA während der IL-2-Aktivierung hemmt die zytolytische<br>NK-Aktivität.....  | 36        |
| 4.2.2     | SAHA hemmt die IL-2-induzierte PBMC-Proliferation .....  | 38        |
| 4.2.3     | SAHA hemmt die IL-2-induzierte Zytokinsekretion durch<br>PBMCs .....   | 38        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.4     | HDIs beeinflussen nicht die Zytotoxizität IL-2-aktivierter NK-Zellen.....                    | 40        |
| 4.3       | SAHA verhindert die polyklonale T-Zell-Aktivierung.....                                      | 42        |
| 4.3.1     | SAHA hemmt die antigenunabhängige polyklonale T-Zell-Aktivierung.....                        | 42        |
| 4.3.2     | SAHA hemmt die antigenabhängige polyklonale T-Zell-Aktivierung.....                          | 45        |
| 4.4       | SAHA sensibilisiert Tumorzellen für zytolytische Effekte aktivierter T-Zellen.....           | 48        |
| 4.4.1     | SAHA-Vorbehandlung verstärkt die Tumorzelltodinduktion durch CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen..... | 48        |
| 4.4.2     | HDIs erhöhen die Expression ko-stimulierender T-Zell-Liganden auf Tumorzellen.....           | 50        |
| 4.5       | SAHA beeinflusst nicht die zytolytischen Effektorfunktionen tumorreaktiver T-Zellen .....    | 52        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>53</b> |
| 5.1       | Tumorzellyse durch NK-Zellen.....  | 53        |
| 5.2       | Synergismus von HDIs und IL-2-aktivierten NK-Zellen .....                                    | 55        |
| 5.3       | Direkte Wirkung von HDIs auf NK-Zellen.....  | 57        |
| 5.4       | Tumorzelltodinduktion durch tumorspezifische T-Zellen.....                                   | 60        |
| 5.5       | Direkte Wirkung von HDIs auf T-Zellen .....  | 62        |
| 5.6       | Therapeutische Relevanz der Ergebnisse .....   | 64        |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>66</b> |
|           | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>68</b> |
|           | <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>  | <b>73</b> |
|           | <b>Anhang.....</b>   | <b>75</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 Das menschliche Immunsystem

### 1.1.1 Aufgaben und Aufbau des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes funktionelles System, das der Abwehr körperfremder Substanzen und Organismen sowie der Elimination körpereigener transformierter Zellen dient. Im Laufe der Evolution entwickelten sich zahlreiche Überwachungs- und Abwehrmechanismen, wobei heute zwischen Mechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems unterschieden wird. Angeborene und adaptive Immunität sind jedoch eng miteinander verzahnt, überschneiden sich teilweise und regulieren sich gegenseitig. Nur ihr Zusammenspiel bewirkt eine effektive Verteidigung.

Die erste Verteidigungslinie stellt das angeborene Immunsystem dar, das innerhalb von Minuten nach einer Infektion aktiv wird. Es baut sich auf aus Phagozyten (Monozyten und Granulozyten) und NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) auf zellulärer Ebene und aus dem Komplementsystem auf humoraler Ebene. Phagozyten besitzen relativ unspezifische aktivierende Rezeptoren, sog. PRRs (*pattern recognition receptors*), die an konservierte Strukturen von Pathogenen, sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), binden. Die Aktivität der NK-Zellen wird durch aktivierende und inhibierende Rezeptoren reguliert und wird in Kapitel 1.1.2 ausführlicher erläutert. Die meisten Krankheitserreger und transformierten Zellen werden durch das angeborene Immunsystem erfolgreich bekämpft.

Kann das angeborene Immunsystem einer Infektion oder dem Wachstum von Tumorzellen nicht Einhalt gebieten, wird in der Regel eine adaptive Immunantwort ausgelöst. Sie ist gekennzeichnet durch Antigenspezifität, Rezeptordiversität und die Etablierung eines spezifischen Immungedächtnisses. Effektoren der adaptiven Immunantwort sind T- und B-Lymphozyten und die von letzteren sezernierten Antikörper. Die Aktivierung der Lymphozyten mit passender Rezeptorspezifität und ihre nachfolgende Proliferation nimmt ca. drei bis fünf Tage in Anspruch. Erst nach dieser Zeitspanne differenzieren die Nachkommen zu Effektorzellen. Auf die Aktivierung der T-Zellen wird in Kapitel 1.1.3 näher eingegangen.

### 1.1.2 Aktivierung von NK-Zellen

NK-Zellen sind die zytolytischen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Neben ihrer zytolytischen Aktivität sind sie durch die Fähigkeit gekennzeichnet, Zytokine und

Chemokine zu sezernieren, die eine Inflammation unterstützen und regulatorische Wirkung auf die adaptive Immunantwort ausüben. NK-Zellen machen ca. 15 % aller zirkulierenden Lymphozyten aus und werden grob als  $CD3^-CD56^+$ -Zellen definiert. Eine weitere Unterteilung in zwei Hauptgruppen beruht auf der Expressionsdichte des Adhäsionsmoleküls CD56. Etwa 90 % der humanen NK-Zellen exprimieren CD56 in niedriger Dichte, außerdem den niedrigaffinen Fc-Rezeptor für IgG (Fc $\gamma$ RIII, CD16) in hoher Dichte. Diesen  $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -NK-Zellen wird eine hohe Zytotoxizität zugeschrieben, und sie sind in der Lage, Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) auszuüben. Ca. 10 % der NK-Zellen exprimieren CD56 in hoher Dichte ( $CD56^{bright}$ -NK-Zellen); sie sind die Hauptquelle der von NK-Zellen sezernierten immunregulatorischen Zytokine [1].

Obwohl NK-Zellen wie T- und B-Zellen zu den Lymphozyten gehören, besitzen sie keine antigenspezifischen Rezeptoren und durchlaufen nach ihrer Aktivierung auch keine klonale Expansion. Vielmehr sind sie in der Lage, infizierte oder transformierte körpereigene sowie körperfremde Zellen spontan, ohne vorherige Sensibilisierung zu erkennen und zu lysieren. Die Aktivität der NK-Zellen wird durch das Zusammenspiel verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren gesteuert. Nur NK-Zellen, die keine inhibierenden Signale erhalten, können aktiviert werden und ihre Zielzellen töten.

Die wichtigsten inhibierenden Rezeptoren humaner NK-Zellen sind die KIRs (*killer Ig-like receptors*) und Heterodimere aus den beiden C-Typ-Lektinen CD94 und NKG2A. Der CD94/NKG2A-Rezeptor erkennt das nur wenig polymorphe MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E, dessen Expression von der Gesamtdichte der MHC-Klasse-I-Moleküle abhängt. KIRs bilden eine vielfältige Rezeptorfamilie; sie werden klonal auf NK-Zellen exprimiert und erkennen alle Determinanten der MHC-Klasse-I-Moleküle [2]. Jede funktionelle NK-Zellen exprimiert mindestens einen inhibierenden Rezeptor, der seinen Liganden auf körpereigenen Zellen erkennt. Das bedeutet im Gegenzug, daß NK-Zellen jene (körpereigenen und körperfremden) Zellen erkennen und eliminieren, die in ihrer Expressionsdichte und/oder ihrem Repertoire an inhibierenden NK-Liganden von normalen körpereigenen Zellen abweichen (*missing-self*-Erkennung) [3].

Um aktiviert zu werden, benötigen NK-Zellen ein positives Signal. Dieses Signal kann zum einen durch die Bindung von CD16 an opsonierte, d.h. mit IgG besetzte Zielzellen vermittelt werden. Zum anderen besitzen humane NK-Zellen eine Reihe aktivierender Rezeptoren, die an oberflächengebundene Liganden auf Zielzellen binden. Hierzu gehören NKG2D, DNAM-1 und die NCRs (*natural cytotoxicity receptors*) NKp46, NKp44 und NKp30. Die durch Streß induzierbaren Moleküle MICA, MICB und die ULBPs (*UL16-binding proteins*), strukturell mit MHC-Klasse-I-Molekülen verwandt, sind die humanen NKG2D-Liganden. An DNAM-1 (CD226) binden zwei Mitglieder aus der Nectin-Familie: der Poliovirus-Rezeptor (PVR, CD155) und Nectin-2 (CD112). Die Liganden der NCRs

sind bisher nicht identifiziert worden. Darüber hinaus existieren eine Reihe koaktivierender Rezeptoren wie 2B4 oder NTB-A [2, 4]. Die NK-Zell-Aktivität wird weiterhin von verschiedenen Zytokinen wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 und Typ-I-Interferonen beeinflusst [5] und unterliegt der Regulation durch regulatorische T-Zellen (Tregs) [6].

Effektorfunktionen aktivierter NK-Zellen sind ihre zytolytische Aktivität und die Zytokinsekretion. NK-Zellen können ihre Zielzellen auf zwei mögliche Arten töten: zum einen durch die Exozytose lytischer Granula, die das membranzerstörende Protein Perforin sowie Granzyme (Serinproteasen) enthalten; zum anderen über Moleküle aus der TNF-Superfamilie, die an Todesrezeptoren auf Zielzellen binden und dadurch deren Apoptose induzieren. Aktivierte NK-Zellen sezernieren v.a. IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-10, IL-13 und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) sowie Chemokine, die zusammen eine inflammatorische Immunantwort stimulieren [1, 5].

### 1.1.3 Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen bilden die zelluläre Komponente des adaptiven Immunsystems. T-Zellen sind durch die Expression antigenspezifischer T-Zell-Rezeptoren (TCRs) gekennzeichnet. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um ein Heterodimer aus TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Kette, seltener um ein Heterodimer aus TCR $\gamma$ - und TCR $\delta$ -Kette.  $\gamma$ : $\delta$ -T-Zellen besitzen andere, weit weniger gut definierte, Funktionen als  $\alpha$ : $\beta$ -T-Zellen; im folgenden sind mit dem Begriff „T-Zellen“ immer  $\alpha$ : $\beta$ -T-Zellen gemeint. Der TCR wird an der Oberfläche von T-Zellen zusammen mit mehreren akzessorischen Ketten exprimiert – dem CD3-Komplex und einem  $\zeta$ -Homodimer – die für die Signalübertragung nach der Bindung des TCR an sein Antigen sorgen. Eine strukturelle und auch funktionelle Einteilung in zwei Hauptgruppen der T-Zellen geschieht auf der Basis der Ko-Rezeptoren CD4 und CD8, die mit dem TCR-Komplex aggregieren. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen i.d.R. ihr Peptidantigen in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen und differenzieren nach ihrer Aktivierung meistens zu T-Helferzellen (Th-Zellen). CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen gewöhnlich Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe und differenzieren zu zytolytischen T-Zellen (CTLs), die ihre Zielzellen durch die Exozytose lytischer Granula oder Liganden-vermittelt töten können.

Um vollständig aktiviert zu werden, benötigen T-Zellen nach der Antigenerkennung durch ihren TCR ein zweites Signal, ohne das sie in einen Zustand der Nicht-Reaktivität, genannt Anergie, verfallen würden. Dieses zweite Signal erhalten sie von ko-stimulierenden Molekülen, wobei die Art des ko-stimulierenden Signals Qualität und Dauer einer T-Zell-Antwort beeinflusst. Das am besten charakterisierte ko-stimulierende Signal wird durch die Bindung des ko-stimulierenden Moleküls CD28 an seine Liganden CD80 (B7.1) oder



CD86 (B7.2) vermittelt. CD28 wird sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Die Expression der strukturell eng verwandten Moleküle B7.1 und B7.2 ist im allgemeinen auf professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) beschränkt [7]. Einmal aktiviert benötigen Effektor-T-Zellen für die Ausübung ihrer Funktionen nur noch geringere ko-stimulierende Signale und sind nicht mehr auf die Ligation von CD28 angewiesen. MHC-exprimierende Zellen, die nicht zu den APCs zählen, können durch eine Transfektion mit B7-Molekülen in die Lage versetzt werden, T-Zell-Antworten auszulösen [8]. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe B7.2-transfizierter Melanomzellen allogene T-Zellen eines nicht verwandten Spenders aktiviert, wobei hier Alloantigene, die auf den Fremd-MHC-Molekülen präsentiert wurden, als Ersatz für Tumorantigene dienten [8, 9].

Eine Aktivierung von T-Zellen unabhängig von ihrer TCR-Spezifität wird durch mitogene Substanzen erreicht. Superantigene gehören zu den stärksten bekannten T-Zell-Mitogenen. Diese mikrobiellen Toxine werden v.a. von Bakterien wie Staphylokokken und Streptokokken, aber auch von Viren produziert. Sie binden unabhängig von der TCR-Spezifität an konservierte Bereiche der TCR- $\beta$ -Kette sowie an MHC-II-Moleküle außerhalb der Peptidbindungsgrube und aktivieren dadurch 10–30 % aller T-Zellen [10]. Ein weiteres starkes T-Zell-Mitogen ist Phytohämagglutinin (PHA), ein pflanzliches Lektin, das T-Zellen in Anwesenheit von APCs unspezifisch stimuliert.

#### **1.1.4 Die Immunantwort gegen Tumoren**

Das zelluläre Immunsystem – Effektoren sind in diesem Fall hauptsächlich NK- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen – spielt eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren. Auf drei Arten schützt das Immunsystem vor Tumoren: Erstens schützt es vor Virus-induzierten Tumoren, indem es virale Infektionen bekämpft. Zweitens werden Immunantworten normalerweise streng reguliert, so daß sich chronische Entzündungsreaktionen, die förderlich für eine Tumorentstehung sein können, nicht entwickeln<sup>1</sup>. Drittens kann das Immunsystem Tumorzellen anhand tumorspezifischer Antigene oder streßinduzierter Oberflächenmoleküle erkennen und eliminieren – dieser Vorgang wird *immune surveillance* genannt [12].

Dennoch – Tumoren entstehen auch in immunkompetenten Organismen, und mit den Jahren wurde immer klarer, daß Tumoren die Funktionen des Immunsystems sogar für ihre Zwecke ausnutzen können. Das Konzept des *tumour immunoediting* beschreibt die Rolle des Immunsystems bei der Tumorentstehung unterteilt in drei Phasen. Die erste Phase, genannt Elimination, entspricht der *immune surveillance*. Werden nicht alle Tumorzellen

---

<sup>1</sup> Es wird angenommen, daß mehr als 15 % aller humanen Krebsfälle durch die Umstände einer Infektion hervorgerufen werden; einige davon (z.B. chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* oder mit Hepatitisviren) fördern indirekt die Karzinogenese durch die Induktion einer chronischen Inflammation [11].

eliminiert, kann sich ein Gleichgewicht zwischen Immunsystem und entstehendem Tumor einstellen. In dieser zweiten Phase können sich die Tumorzellen unter dem Selektionsdruck des Immunsystems weiter verändern, so daß Tumorvarianten entstehen, die den Angriffen des Immunsystems entkommen. Tumorzellen bedienen sich dabei vieler unterschiedlicher Strategien. Um eine T-Zell-vermittelte Immunantwort zu umgehen, werden MHC-Klasse-I-Moleküle vermindert oder nicht mehr exprimiert, oder die Antigenprozessierung wird unterdrückt. Tumorzellen können außerdem durch Veränderungen in der Expression von Todesrezeptoren und Caspasen verhindern, daß sie von CTLs oder NK-Zellen getötet werden. Nicht zuletzt üben manche Tumoren selbst immunsuppressive Aktivität aus, indem sie T-Zell-Funktionen z.B. durch die Produktion vonIDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) oder NO hemmen oder Fas-exprimierende tumorspezifische T-Zellen mittels Expression von FasL töten. All diese Mechanismen führen zum *tumour escape* (Phase drei), d.h. das Immunsystem ist nicht länger in der Lage, das Tumorstadium aufzuhalten [12, 13].

### **1.1.5 Die Rolle des Immunsystems in der Tumorthherapie**

Immer stärker rückt die Tatsache ins Bewußtsein, daß das Immunsystem auch bei der therapeutischen Behandlung von Tumoren eine Rolle spielt. Das Immunsystem kann durch den Einsatz von Tumortheraeutika auf zwei Arten im positiven Sinne angesprochen werden: Einige Therapeutika rufen spezifische zelluläre Antworten hervor, durch die der Tumorzelltod immunogen wird, andere stimulieren auf direkte oder indirekte Weise das Immunsystem [14]. Untersuchungen in verschiedenen Mausmodellen haben deutlich auf einen Beitrag der T-Zellen zu den Anti-Tumor-Effekten zytotoxischer Agenzien (z.B. Anthracyclinen und Oxaliplatin) oder ionisierender Strahlung hingewiesen [15]. *In vitro* wurde gezeigt, daß durch eine Schädigung der Tumor-DNA (z.B. durch ionisierende Strahlung oder Topoisomerase-Inhibitoren) Tumorsuppressor-Proteine wie z.B. der Transkriptionsfaktor p53 aktiviert werden, die auch das angeborene Immunsystem zu einer Anti-Tumor-Antwort veranlassen können. Geringe Dosen ionisierender Strahlung stimulieren außerdem eine Immunantwort, indem sie zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, Tumor-assoziierten Antigenen und Fas auf Tumorzellen und Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen führen. Des weiteren wurden *in vitro* und in einigen klinischen Studien immunstimulierende Effekte für Substanzen aus den Klassen der Antimetabolite, der alkylierenden Agenzien, der Anthracycline u.a. nachgewiesen. Andererseits haben viele Chemotherapeutika nicht zu unterschätzende immunsuppressive Nebenwirkungen, die entweder direkter Art (Inhibition oder Abtöten von Effektorzellen) oder indirekter Art (Induktion von Anergie oder Immunparalyse) sein können [14].

Neben den positiven Nebeneffekten, die viele Therapeutika auf die Tumorabwehr durch das Immunsystem ausüben, werden auch verschiedene Strategien verfolgt, das Immunsystem gezielt für die Tumorbekämpfung zu aktivieren. So werden durch die Gabe von Zytokinen während der Behandlung einiger humaner Tumoren NK-Zellen direkt oder indirekt endogen aktiviert. Mehrere klinische Studien untersuchten den Einsatz von IL-2 allein oder in Kombination mit IL-21, wobei die Ergebnisse jedoch gemischt ausfielen. Auch immunstimulierende DNA-Komplexe aktivieren *in vivo* NK-Zellen, was zu einer erhöhten Anti-Tumor-Aktivität beiträgt. Häufiger als eine Aktivierung von NK-Zellen *in situ* kommt jedoch ihre Aktivierung außerhalb des Patienten zum Einsatz. Der adoptive Transfer Lymphokin-aktivierter Killerzellen (LAKs) hat seinen Ursprung in der Mitte der 1980er Jahre. Während zu Beginn noch autologe Zellen transferiert wurden, hat sich nun der Fokus zu Gunsten allogener haploidentischer NK-Zellen verschoben. NK-Zellen von Spendern, deren KIR-Liganden nicht mit denen des Empfängers übereinstimmen, haben in klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse gebracht. Parallel zu den Studien mit allogenen NK-Zellen wird inzwischen auch der Transfer der KIR-defizienten NK-Zelllinie NK-92 untersucht [5].

## **1.2 Histondeacetylase-Inhibitoren**

### **1.2.1 Regulation der Genexpression durch Histonacetylierung**

Die DNA ist der universale Träger der genetischen Information. Bei Eukaryoten ist sie als Chromatin im Zellkern enthalten. Die Grundeinheit des Chromatins bildet das Nukleosom, das aus einem Oktamer der vier sog. *Core*-Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 besteht, um das sich 147 Basenpaare der DNA winden. H1-Histone, sog. *Linker*-Histone, sorgen für eine Stabilisierung der Nukleosomen und die Aufrechterhaltung höherer Ordnungen der Chromatinstruktur.

Die Besonderheit der *Core*-Histone besteht in der riesigen Anzahl an möglichen Modifikationen ihrer langen N-terminalen „Schwänze“. Kovalente Histonmodifikationen gehören neben der DNA-Methylierung und dem RNA-assoziierten *Silencing* zu den epigenetischen Mechanismen, d.h. den meiotisch und mitotisch vererbaren Änderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind. Im Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen entsteht der sog. Histon-Code. Darüber hinaus werden kovalente und nicht kovalente Histonmodifikationen sehr flexibel eingesetzt, um die Transkription einer Zelle den jeweiligen Gegebenheiten anzupassen. Am besten erforscht sind hier Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der Histone.

Durch die Acetylierung von Lysinresten im N-terminalen „Schwanz“ der *Core*-Histone werden physikalische Eigenschaften des Chromatins direkt verändert. Dadurch werden Protein-Protein-Interaktionen und der Zugang der Proteine zur DNA während der Transkription reguliert. Allgemein ausgedrückt korreliert die Histonacetylierung mit einer Auflockerung des Chromatins und daraus folgender transkriptioneller Aktivierung, die Histondeacetylierung mit transkriptioneller Repression. Doch auch hier gibt es Ausnahmen, so daß, abhängig von der Natur des betreffenden Gens, eine Deacetylierung auch zur Genrepression führen kann [16-19].

### 1.2.2 HDACs und ihre Inhibition durch HDIs

Histonacetylierung und -deacetylierung werden durch zwei Arten von Enzymen im Gleichgewicht gehalten: Histonacetyltransferasen (HATs) versehen die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten der Histonschwänze mit einem Acetylrest, der von Histondeacetylasen (HDACs) wieder entfernt werden kann.

Bisher sind 18 humane HDACs identifiziert worden, die sich anhand ihrer Sequenz und Domänenstruktur in vier Klassen zusammenfassen lassen (Tab. 1.1). Die HDACs der Klassen I, II und IV sind Zink-abhängige Enzyme, Mitglieder der dritten Klasse, die Sirtuine, benötigen  $\text{NAD}^+$  für ihre enzymatische Aktivität<sup>2</sup>. Die Funktion der HDACs ist nicht redundant, außerdem unterscheiden sie sich in ihrer zellulären Lokalisation und gewebespezifischen Expression. Neben Histonen sind inzwischen mindestens 50 Nicht-Histonproteine mit bekannter biologischer Funktion identifiziert worden, die als Substrate von HDACs deacetyliert werden können. Unter ihnen sind Transkriptionsfaktoren, Transkriptionsregulatoren, Signaltransduktionsmediatoren, DNA-Reparaturenzyme, Chaperone und Strukturproteine [20, 21].

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDIs) hemmen die enzymatische Aktivität Zink-abhängiger HDACs, indem sie ein Chelat mit dem Zinkatom im aktiven Zentrum dieser HDACs bilden. HDIs unterscheiden sich z.T. sehr in ihrer chemischen Struktur (es gibt sechs Klassen: kurzkettige aliphatische Säuren, Hydroxamsäuren, Benzamide, zyklische Tetrapeptide, elektrophile Ketone und Mischformen), in ihrer inhibitorischen Effizienz (wirksame Konzentrationen liegen zwischen dem nanomolaren und dem millimolaren Bereich) und in ihrer Spezifität für bestimmte HDACs (s. Tab. 1.1) [22, 23]. In dieser Arbeit wurden Natriumbutyrat (NaB) aus der Klasse der kurzkettigen Fettsäuren und die Hydroxamsäure SAHA (Suberoylanilid-Hydroxamsäure, Vorinostat<sup>®</sup>) verwendet.

---

<sup>2</sup> Sirtuine haben bei Säugern Nicht-Histonproteine als Substrate; nur bei Hefen ist eine Histondeacetylase-aktivität der SIR-Proteine bekannt.

**Tabelle 1.1 Klassifizierung der HDACs und Spezifitäten ausgewählter HDIs.**

| Klasse | Unterklasse | HDAC            | Inhibition durch HDIs  |
|--------|-------------|-----------------|------------------------|
| I      | Ia          | HDAC1<br>HDAC2  | } Depsipeptid } MS-275 |
|        | Ib          | HDAC3           |                        |
|        | Ic          | HDAC8           |                        |
| II     | IIa         | HDAC4           | } Tubacin              |
|        |             | HDAC5           |                        |
|        |             | HDAC7           |                        |
|        |             | HDAC9           |                        |
|        | IIb         | HDAC6<br>HDAC10 |                        |
| IV     |             | HDAC11          |                        |

VPA, Valproinsäure; SAHA, Suberoylanilid-Hydroxamsäure; TSA, Trichostatin A.

Modifiziert nach [22].

Durch die Hemmung der HDACs induzieren HDIs die Acetylierung von Histonen und anderen HDAC-Substraten. Sie beeinflussen mindestens 22 % des Transkriptom, wobei sie die Expression mancher Zielgene induzieren, anderer reprimieren. Die meisten Gene, die von unterschiedlichen HDIs beeinflusst werden, sind identisch, aber jeder Inhibitor besitzt außerdem eine Reihe spezifischer Zielgene. Die genaue Zahl der in ihrer Transkription veränderten Gene hängt außerdem von der Dauer der Kultur und der HDI-Konzentration ab. Genexpressionsänderungen resultieren entweder aus einem direkten Einfluß des HDI auf den Genpromotor, oder sind sekundärer Art. [20, 24].

### 1.2.3 Veränderte Histonacetylierung in Tumorzellen

In gesunden Zellen herrscht ein balanciertes Gleichgewicht zwischen Histonacetylierung und -deacetylierung. Wird dieser Zustand gestört und dadurch das Transkriptionsmuster einer Zelle verändert, kann die Entstehung von Tumoren die Folge sein. Epigenetische Änderungen, die mit Tumoren assoziiert sind, können das gesamte Genom betreffen oder auf die Expression oder Aktivität definierter epigenetischer Regulatoren beschränkt sein [22]. Im allgemeinen sind die Histone in Tumorzellen verstärkt deacetyliert [25], das Chromatin befindet sich somit in einem kondensierteren Zustand, und die transkriptionelle Aktivität der Zellen ist eingeschränkt.

Eine Ursache für die verstärkte Deacetylierung in Tumorzellen ist die Überexpression bestimmter HDACs, die bei vielen Tumoren beobachtet wurde. So ist z.B. HDAC1 bei Prostata-, Magen-, Darm- und Brustkarzinomen überexprimiert, HDAC2 bei kolorektalen, Zervix- und Magenkarzinomen. Hinweise auf einen ursächlichen Zusammenhang der HDAC-Überexpression und der Tumorentwicklung geben siRNA-Studien, bei denen ein HDAC-*Knockdown* zur Suppression von Tumorzellwachstum und -überleben führte [22].

Neben der Überexpression kann auch eine fehlerhafte Rekrutierung von HDACs zu einer erhöhten lokalen HDAC-Aktivität führen. Dies geschieht zum einen durch die Überexpression von repressiv wirkenden Transkriptionsfaktoren, die mit HDACs interagieren. Zum anderen entstehen durch bestimmte chromosomale Translokationen onkogene DNA-bindende Fusionsproteine die mit HDACs assoziieren. Die besten Beispiele hierfür sind die akute promyeloische Leukämie (APL) und die akute myeloische Leukämie (AML), bei denen die Fusionsproteine PML-RAR $\alpha$ , PLZF-RAR $\alpha$  und AML1-ETO HDACs rekrutieren und so die Expression spezifischer Zielgene reprimieren [22, 26].

Die Inaktivierung von HATs stellt den zweiten großen Mechanismus der verstärkten Histondeacetylierung in Tumorzellen dar. Auch hier können chromosomale Translokationen auftreten, die die HAT-Aktivität beeinträchtigen. Bei der akuten myeloischen Leukämie ist z.B. ein Fusionsprotein aus dem Zinkfinger-Protein MOZ (*monocytic-leukaemia zinc-finger*) und der HAT CBP (*cAMP response element-binding protein*) identifiziert worden, das in seiner Funktion von der Wildtypform des CBP abweicht. HATs werden des Weiteren durch Genmutationen, wie es beim Rubinstein-Taybi-Syndrom der Fall ist (betroffen ist auch hier das *CBP*-Gen), oder durch onkogene virale Proteine inaktiviert [26].

Alle beschriebenen Veränderungen in der Funktionsweise von HDACs und HATs haben die Dysregulation eng kontrollierter Transkriptionsprogramme zur Folge und wirken sich in vielerlei Hinsicht auf normale zelluläre Vorgänge aus.

#### **1.2.4 HDIs besitzen Anti-Tumor-Aktivität**

Die verstärkte Histondeacetylierung in Tumorzellen durch Inhibition der HDACs zu kontern, verspricht Erfolg in der Bekämpfung von Tumorzellen. Tatsächlich wurden HDIs aufgrund ihrer Fähigkeit entdeckt, die zelluläre Differenzierung von Tumorzellen zu induzieren. Des Weiteren führen sie *in vitro* zu Zellzyklusarrest und Apoptose von Tumorzellen unterschiedlichster histologischer Ursprünge. Ihre Besonderheit und daher auch ihr therapeutisches Potential liegen in der Tatsache begründet, daß HDIs Anti-Tumor-Aktivitäten besitzen, gleichzeitig aber nicht transformierte Zellen weitgehend unbeeinflusst lassen [16, 20, 22].

Die Inhibition des Zellzyklus ist eine Voraussetzung für die terminale Differenzierung von Tumorzellen. Niedrige HDI-Konzentrationen induzieren dabei vorzugsweise einen G<sub>1</sub>-Arrest, hohe Konzentrationen induzieren sowohl G<sub>1</sub>- als auch G<sub>2</sub>/M-Arrest. Oft spielt beim G<sub>1</sub>-Arrest die Induktion des generellen Zellzykluskinase-Inhibitors p21 durch HDIs eine wichtige Rolle, doch in manchen Fällen sind auch andere Zellzykluskinase-Inhibitoren wie p15 und p27 involviert. Die Inhibition der Zellzykluskinasen führt über die

Dephosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) zur Blockade des Transkriptionsfaktors E2F, so daß S-Phasen-spezifische Gene nicht mehr transkribiert werden. Neben dem p21-vermittelten Weg sind weitere Ursachen für einen G<sub>1</sub>-Arrest identifiziert worden, so z.B. die HDI-vermittelte Repression der *Cyclin D*- und *Cyclin A*-Gene oder die Induktion der Zellzyklus-Regulationsgene *GADD45α* und *GADD45β*. Ein G<sub>2</sub>/M-Arrest kann durch die Aktivierung eines G<sub>2</sub>-Phase-Kontrollpunktes durch HDIs erreicht werden. Allerdings ist der zugrunde liegende Mechanismus weit weniger erforscht als beim G<sub>1</sub>-Arrest [20, 22, 26].

Das große therapeutische Potential der HDIs ist in ihrer Fähigkeit begründet, Apoptose selektiv in Tumorzellen zu induzieren. Dies kann auf zwei Arten geschehen: über den Todesrezeptor-vermittelten (extrinsischen) Weg und/oder über den mitochondrialen (intrinsischen) Weg. Die beiden Wege lassen sich funktionell unterscheiden, sind aber auf molekularer Ebene miteinander verknüpft. Beim extrinsischen Weg der Apoptose binden Todesrezeptoren wie Fas (CD95) oder die TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) -Rezeptoren DR4 und DR5 an ihre Liganden (FasL, TRAIL). Dies führt zur Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 10, die ihrerseits Effektor-Caspasen aktivieren und somit den programmierten Zelltod einläuten. In transformierten, nicht jedoch in normalen Zellen können HDIs die Expression der Todesrezeptoren und ihrer Liganden induzieren. Daneben ist auch eine verminderte Expression von c-FLIP, einem Inhibitor des extrinsischen Weges, nach HDI-Inkubation beobachtet worden. Außer dem extrinsischen Weg der Apoptose aktivieren HDIs den intrinsischen Weg. Dabei führen HDIs über Mechanismen, die bisher noch nicht vollständig aufgeklärt sind, zur Freisetzung von Cytochrom *c* aus Mitochondrien, was die Aktivierung von Caspase 9 zur Folge hat. Eine wesentliche Rolle spielt hier, daß HDIs die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen zugunsten der pro-apoptotischen Seite verändern. Neben der Induktion von Apoptose existieren weitere Mechanismen des HDI-induzierten Zelltodes, es seien nur der mitotische Zelltod, der autophagische Zelltod und der Zelltod infolge der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) genannt [20, 22, 26].

HDIs besitzen nicht nur direkte Anti-Tumor-Wirkung sondern verstärken auch die Anti-Tumor-Effekte einer Vielzahl von Tumorthapeutika. So zeigen sie synergistische oder additive Wirkung mit konventionellen Chemotherapeutika wie Antimetaboliten oder Topoisomerase-Inhibitoren, mit DNA-demethylierenden Agenzien, Proteasom-Inhibitoren, Kinase-Inhibitoren, hormoneller Therapie, ionisierender Strahlung und Todesrezeptor-liganden wie rekombinantem TRAIL [20, 22, 23, 27].

Die beschriebenen Anti-Tumor-Effekte sind hauptsächlich der direkten Wirkung der HDIs auf die Genexpression durch Histonhyperacetylierung zuzuschreiben. Dennoch spielt die HDI-Wirkung auf die Aktivität von Nicht-Histonproteinen wie z.B. der Transkriptions-

faktoren p53 oder NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) eine wesentliche Rolle bei der Beeinflussung von Tumorzellwachstum und -überleben. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich nur die halbe Wahrheit, das tumortherapeutische Potential der HDIs auf ihre umkehrende Wirkung der transkriptionellen Repression in Tumorzellen zurückzuführen. Vielmehr wird durch den Transformationsprozeß das Epigenom derart verändert, daß in normalen Zellen nicht transkribierte Gene nun aufgrund der HDI-Wirkung abgelesen werden können [22].

Die vielversprechenden Ergebnisse präklinischer Studien haben HDIs in den Fokus der klinischen Forschung rücken lassen. Eine Reihe von HDIs aus den unterschiedlichen Klassen befindet sich derzeit in Phase-I- und Phase-II-Studien für die Behandlung hämatologischer Erkrankungen sowie solider Tumoren [21]. SAHA wurde im Juni 2006 für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms von der *US Food and Drug Administration* zugelassen [28] und befindet sich zur Zeit in mehreren klinischen Studien in Kombination mit anderen Chemotherapeutika [21]. Ein Zulassungsgesuch für Europa wurde allerdings im vorigen Jahr zurückgezogen.

### **1.2.5 Immunmodulatorische Effekte von HDIs**

Die verstärkte Expression von Todesrezeptoren auf HDI-behandelten Tumorzellen sowie der Synergismus von HDIs und dem Todesrezeptorliganden TRAIL deuten bereits auf eine Beeinflussung der Immunabwehr von Tumoren durch HDIs hin.

HDIs können die Immunogenität transformierter Zellen erhöhen, indem sie die Expression der MHC-Moleküle, ko-stimulierender Moleküle, aktivierender NK-Liganden oder interzellulärer Adhäsionsmoleküle steigern [22]. Eine Sensibilisierung von Tumorzellen unterschiedlichen histologischen Ursprungs durch HDIs für die zytolytische Wirkung IL-2-aktivierter PBMCs wurde in einer Vorgängerarbeit bereits demonstriert [29, 30]. Weiterhin wurde gezeigt, daß HDIs die Tumorzellyse durch isolierte NK- [31-33] und zytotoxische T-Zellen [34] verstärken können. Außerdem erhöhen HDIs die Calreticulin-Expression auf apoptotischen Tumorzellen und führen dadurch zu einer immunogenen Form des Zelltods [35].

HDIs beeinflussen Immunzellen auch direkt: Es sind Veränderungen in der Aktivität und/oder Zytokinproduktion von Immunzellen durch HDIs beschrieben worden. Möglicherweise spielt hier neben der direkten Histonacetylierung innerhalb von Promotor- oder *Enhancer*-Regionen von Zytokingenen auch der Einfluß der HDIs auf den Acetylierungsstatus der für die Regulation einer Immunantwort essentiellen Transkriptionsfaktoren STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), STAT3 und NF- $\kappa$ B eine Rolle [22].



### 1.3 Ziele der Arbeit

HDI's bilden eine sich rapide entwickelnde Klasse vielversprechender Anti-Tumor-Medikamente. Ihr größtes therapeutisches Potential liegt in ihrer Kombinierbarkeit mit den verschiedensten Tumortherapiestrategien und ihrer verstärkenden Wirkung auf diese. Besondere Beachtung muß hier die Rolle des Immunsystems finden, eine bisher oft unterschätzte Größe in der Bekämpfung von Tumoren.

Diese Arbeit untersucht die kombinierte Wirkung von HDIs und humanen Immunzellen auf die Tumorzelltodinduktion *in vitro*. Ein bereits etabliertes System, in dem Tumorzellen durch eine HDI-Vorbehandlung für die Lyse durch IL-2-aktivierte PBMCs sensibilisiert wurden, sollte näher definiert werden. Dazu gehörten die Spezifizierung der Effektorzellen sowie die Untersuchung des molekularen Mechanismus der Sensibilisierung. Ein zweites System sollte etabliert werden, das die Aufklärung des Einflusses von HDIs auf die Tumorzelltodinduktion durch zytolytische T-Zellen ermöglichte.

Parallel zu den Untersuchungen der HDI-Wirkung auf Tumorzellen stand der direkte Einfluß der HDIs auf die verwendeten Immunzellen im Blickpunkt. Üben HDIs immunsuppressive Wirkung aus? Wenn ja, ist diese Wirkung abhängig vom Aktivierungsstatus der Immunzellen? Messungen von Proliferation, Zytokinsekretion und zytolytischer Aktivität der in verschiedenen Phasen der Aktivierung mit HDIs konfrontierten Immunzellen sollten die gestellten Fragen beantworten.

## 2. Material

### 2.1 Laborgeräte

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Agarose-Gelelektrophoresekammer | OWL Separation Systems, Portsmouth, NH, USA |
| Analysenwaage                   | Sartorius, Göttingen                        |
| Autoklav                        | Tuttnauer Systec, Wettenberg                |
| Bakterienschüttler              | New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA   |
| Bürker-Zählkammer               | Laboroptik, Friedrichsdorf                  |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator      | Binder Labortechnik, Tuttlingen             |
| Digitalwaage                    | Sartorius, Göttingen                        |
| Durchflußzytometer:             |   |
| BD FACScan                      | BD, Heidelberg                              |
| BD FACSCalibur                  | BD, Heidelberg                              |
| Gammazähler                     | Perkin Elmer, Waltham, MA, USA              |
| Inkubator für Bakterienkulturen | Binder Labortechnik, Tuttlingen             |
| MACS Separator (Magnetkammer)   | Miltenyi Biotec, Gladbach                   |
| Mikroskope:                     |   |
| Lichtmikroskop                  | Carl Zeiss, Jena                            |
| Inverses Mikroskop              | Hund, Wetzlar                               |
| Mikrowelle                      | Severin, Sundern                            |
| Mischgerät (Vortex)             | Heidolph, Schwabach                         |
| Netzteil für Elektrophoresen    | Bio-Rad, München                            |
| Phosphorimager                  | Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA      |
| Photometer                      | Biometra, Göttingen                         |
| Pipetten                        | Eppendorf, Hamburg                          |
| Pipettierhilfe                  | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt           |
| Quarzküvette                    | Biometra, Göttingen                         |
| SDS-Gelelektrophoresekammer     | <i>Mini Protean II</i> , Bio-Rad, München   |
| Sterilwerkbank                  | Heraeus Instruments, Hanau                  |
| Tritium Storage Phosphor Screen | Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA      |
| UV-Lampe mit Digitalkamera      | MWG-Biotec, Ebersberg                       |
| UV-Photometer                   | Biometra, Göttingen                         |
| Wasserbad                       | Thermo Haake, Karlsruhe                     |
| Zellerntegerät                  | Inotech, Dottikon, Schweiz                  |

## Zentrifugen:

|                       |                            |
|-----------------------|----------------------------|
| Biofuge fresco / pico | Heraeus Instruments, Hanau |
| Megafuge 1.0 / 1.0R   | Heraeus Instruments, Hanau |

**2.2 Verbrauchsmaterialien**

|   |   |
|---|---|
| FACS-Röhrchen (Polystyrenröhrchen, 5 ml)            | BD, Heidelberg                            |
| Glasfaserfilter                                     | Wallac, Turku, Finnland                   |
| Kanülen   | Dispomed, Gelnhausen                      |
| Kryoröhrchen (1 ml)                                 | Nunc, Roskilde, Dänemark                  |
| Mehrwegehahn  | B. Braun, Melsungen                       |
| MS Columns (Magnetsäulen)                           | Miltenyi Biotech, Gladbach                |
| Petrischalen (6 cm, 10 cm)                          | Greiner, Frickenhausen                    |
| Pipettenspitzen                                     | Eppendorf, Hamburg<br>Sarstedt, Nümbrecht |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)            | Eppendorf, Hamburg                        |
| Spritzen (10 ml)                                    | B. Braun, Melsungen                       |
| Sterilfilter (0,45 µm)                              | VWR, Darmstadt                            |
| Sterilpipetten                                      | Sarstedt, Nümbrecht                       |
| Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm <sup>2</sup> )   | Nunc, Roskilde, Dänemark                  |
| Zellkulturplatten<br>(6-, 24-, 96-Well, Flachboden) | Nunc, Roskilde, Dänemark                  |
| Zellkulturplatten<br>(96-Well, Flachboden)          | Greiner, Frickenhausen                    |
| Zellkulturplatten<br>(96-Well, Rundboden)           | Greiner, Frickenhausen                    |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml)                         | Sarstedt, Nümbrecht                       |
| Zentrifugenröhrchen (50 ml)                         | BD, Heidelberg                            |

**2.3 Reagenzien und Chemikalien**

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <sup>51</sup> Chrom     | Perkin Elmer, Waltham, MA, USA         |
| Annexin-V-FITC          | BD Biosciences, Heidelberg             |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen             |
| DMEM (high Glucose)     | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| FACSflow                | BD Biosciences, Heidelberg             |

|   |  |
|---|--|
| Gammaglobuline (human; Cohn II)                       | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Glukose   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Lymphozyten-Separationsmedium<br>(Dichte: 1,077 g/ml) | PAA Laboratories, Pasching, Österreich   |
| Fixationsmedium                                       | ADG, Kaumberg, Österreich  |
| Fluoresbrite plain YG 10.00 micron<br>microspheres    | Polysciences, Warrington, PA, USA  |
| Fötale Kälberserum (FCS)                              | PAA Laboratories, Pasching, Österreich   |
| G418 (Geneticin)                                      | Invitrogen, Karlsruhe  |
| Humanserum (AB-Serum, gepoolt)                        | Institut für Immunologie und<br>Transfusionsmedizin, Universität<br>Greifswald |
| IL-2 (Proleukin)                                      | Chiron, Emeryville, CA, USA  |
| Improved MEM Zinc Option                              | Invitrogen, Karlsruhe  |
| L-Glutamin mit Penicillin/Streptomycin                | PAA Laboratories, Pasching, Österreich   |
| Latexkügelchen (10 micron)                            | Polysciences, Eppelheim  |
| MEM- $\alpha$   | Gibco BRL, Eggenstein  |
| [Methyl- $^3\text{H}$ ]-Thymidin                      | Amersham Biosciences, Freiburg   |
| Mitomycin C   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Monensin  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )                        | Merck, Darmstadt   |
| Natriumbutyrat (NaB)                                  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Nylonwatte  | Kisker, Steinfurt  |
| PBS   | PAA Laboratories, Pasching, Österreich   |
| Penicillin/Streptomycin                               | PAA Laboratories, Pasching, Österreich   |
| Permeabilisationsmedium                               | ADG, Kaumberg, Österreich  |
| Pferdeserum (donor horse serum)                       | Biochrom, Berlin   |
| Phytohämagglutinin (PHA)                              | Virotech, Rüsselsheim  |
| Propidiumjodid  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Propidiumjodid (DNA staining solution)                | Orpegen Pharma, Heidelberg   |
| RNase A   | Roche Diagnostics, Mannheim  |
| RPMI 1640   | PAA Laboratories, Pasching, Österreich   |
| Saponin   | Merck, Darmstadt   |
| Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)                    | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Suberoylanilidhydroxaminsäure (SAHA)                  | Alexis, Grünberg   |
| Trypanblau-Lösung                                     | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Trypsin/EDTA (10x)                                    | PAA Laboratories, Pasching, Österreich   |

## 2.4 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

|  |  |
|--|--|
| Blut (Buffy coat; human)   | Institut für Immunologie und<br>Transfusionsmedizin, Universität<br>Greifswald |
| NK92C1 (humane NK-Zelllinie)   | Dr. C. Watzl, Heidelberg   |
| polyklonale NK-Zellen  | Dr. D. Pende, Genua, Italien   |
| DAOY (humane Medulloblastomzelllinie)  | Dr. M. Grotzner, Zürich, Schweiz   |
| PC3 (humane Prostatakarzinomzelllinie)   | ATCC, Rockville, MD, USA   |
| SkMel63 (humane Melanomzelllinie)  | Dr. U. Moebius, Deutsches<br>Krebsforschungszentrum, Heidelberg                |
| SkMel63-B7.2 (humane Melanom-<br>zelllinie, stabil transfiziert mit CD86<br>(B7.2), Geneticin-resistent) | Dr. U. Moebius, Deutsches<br>Krebsforschungszentrum, Heidelberg                |

## 2.5 Medien, Puffer und Lösungen

|              |   |
|--------------|---|
| DMEM         | DMEM (high Glucose)<br>10 % FCS<br>4 mM L-Glutamin<br>200 U/ml Penicillin<br>200 µg/ml Streptomycin |
| improved MEM | Improved MEM Zinc Option<br>10 % FCS<br>200 U/ml Penicillin<br>200 µg/ml Streptomycin               |
| R10F         | RPMI 1640<br>10 % FCS<br>4 mM L-Glutamin<br>200 U/ml Penicillin<br>200 µg/ml Streptomycin           |

---

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| R10H                                | RPMI 1640<br>10 % Humanserum<br>4 mM L-Glutamin<br>200 U/ml Penicillin<br>200 µg/ml Streptomycin |
| MEM-α                               | MEM-α<br>12 % FCS<br>12 % Pferdeserum<br>200 U/ml Penicillin<br>200 µg/ml Streptomycin           |
| Trypsin/EDTA (gebrauchsfertig)      | PBS<br>10 % Trypsin/EDTA (10x)   |
| Trypanblau-Lösung (gebrauchsfertig) | PBS<br>10 % Trypanblau-Stammlösung   |
| SAHA-Stammlösung                    | 2,5 mM SAHA<br>in DMSO   |
| NaB-Stammlösung                     | 500 mM NaB<br>in PBS   |
| G418-Stammlösung                    | 100 mg/ml G418<br>in PBS   |
| FACS-Puffer                         | FACSflow<br>2 % FCS<br>0,02 % NaN <sub>3</sub>   |
| Saponinpuffer                       | FACSflow<br>2 % FCS<br>0,1 % Saponin<br>0,02 % NaN <sub>3</sub>                                  |
| MACS-Puffer                         | PBS<br>0,5 % FCS   |

## 2.6 Antikörper

Soweit nicht anders vermerkt, waren alle Antikörper murinen Ursprungs und richteten sich gegen humane Epitope.

### 2.6.1 Antikörper für Oberflächenfärbungen

**Tabelle 2.1 Primärantikörper für Oberflächenfärbungen.**

| Antigen  | Klon     | Fluorochrom | Isotyp | Referenz                   |
|----------|----------|-------------|--------|----------------------------|
| CD3      | UCHT-1   | FITC        | IgG1   | DakoCytomation, Hamburg    |
| CD3      | SP34     | PE          | IgG3   | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD8      | RPA-T8   | FITC        | IgG1   | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD56     | NCAM16.2 | FITC        | IgG2b  | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD80     | L307.4   | FITC        | IgG1   | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD86     | FUN-1    | PE          | IgG2b  | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD95     | DX2      | FITC        | IgG1   | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD107a   | H4A3     | PE-Cy5      | IgG1   | BD Biosciences, Heidelberg |
| DR4      | DJR1     | -           | IgG1   | Biozol, Eching             |
| DR5      | DJR2-4   | -           | IgG1   | Biozol, Eching             |
| HLA-DR   | G46-6    | PE          | IgG2a  | BD Biosciences, Heidelberg |
| MHC-I    | W6-32    | -           | IgG2a  | ATCC, Rockville, MD, USA   |
| MICA     | BAM195   | -           | IgG1   | IST, Genua, Italien        |
| MICB     | 236511   | -           | IgG2b  | R&D Systems, Wiesbaden     |
| Nectin-2 | L14      | -           | IgG2a  | IST, Genua, Italien        |
| PVR      | L95      | -           | IgG1   | IST, Genua, Italien        |
| ULBP1    | M295     | -           | IgG1   | Amgen, Seattle, WA, USA    |
| ULBP2    | M311     | -           | IgG1   | Amgen, Seattle, WA, USA    |
| ULBP3    | M551     | -           | IgG1   | Amgen, Seattle, WA, USA    |

**Tabelle 2.2 Isotypkontrollen für Oberflächenfärbungen.**

| Klon     | Fluorochrom | Isotyp | Referenz                        |
|----------|-------------|--------|---------------------------------|
| n.a.     | -           | IgG1   | eBioscience, San Diego, CA, USA |
| MOPC-21  | FITC        | IgG1   | BD Biosciences, Heidelberg      |
| MOPC-21  | PE-Cy5      | IgG1   | BD Biosciences, Heidelberg      |
| n.a.     | -           | IgG2a  | DakoCytomation, Hamburg         |
| G155-178 | PE          | IgG2a  | BD Biosciences, Heidelberg      |
| 27-35    | -           | IgG2b  | BD Biosciences, Heidelberg      |
| 27-35    | PE          | IgG2b  | BD Biosciences, Heidelberg      |

**Tabelle 2.3 Sekundärantikörper für Oberflächenfärbungen.**

| Antigen    | Fluorochrom | Isotyp             | Referenz   |
|------------|-------------|--------------------|--|
| Maus-IgG/M | FITC        | polyklonal (Ziege) | BD Biosciences, Heidelberg                       |
| Maus-IgG1  | PE          | polyklonal (Ziege) | } Southern Biotechnology,<br>Birmingham, AL, USA |
| Maus-IgG2a | PE          | polyklonal (Ziege) |  |





## **3. Methoden**

### **3.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur**

#### **3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Zellbiologische Arbeiten wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt, alle dabei verwendeten Materialien waren steril. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Sofern nicht anders vermerkt wurden folgende Standardmedien verwendet: für PC3-Zellen DMEM; für DAOY-Zellen improved MEM; für SkMel63-Zellen R10F; für PBMCs R10H; für NK92C1-Zellen MEM- $\alpha$ . Das Medium der transfizierten Zelllinie SkMel63-B7.2 enthielt zur ständigen Selektion 1 mg/ml G418.

Die adhärennten Tumorzelllinien PC3, DAOY und SkMel63 / SkMel63-B7.2 wurden bei Konfluenz mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst (5 min, 37°C), mit Medium gewaschen und nach Bedarf verdünnt wieder in die Kulturflasche gegeben. NK92C1-Zellen wurden in Suspension in einer Dichte von ca. 100.000 Zellen/ml kultiviert und alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:3 verdünnt. PBMCs wurden nur kurzzeitig kultiviert und nicht ausgedünnt. Zum Waschen wurden die Zellen im allgemeinen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert.

#### **3.1.2 Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen**

Die Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,25 \cdot 10^6$ /ml in FCS mit 7,5 % DMSO (hygroskopisch) suspendiert, 20 min bei 4°C, danach drei bis vier Tage bei -70°C gekühlt und anschließend in Stickstofftanks gelagert. Um Suspensionszellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie nach dem Auftauen mit Medium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen, und in Kulturflaschen überführt. Adhärennte Zellen wurden nach dem Auftauen direkt in Kulturflaschen überführt. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel.

#### **3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl**

10  $\mu$ l Zellsuspension wurden mit 90  $\mu$ l Trypanblau-Lösung gemischt. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Bürker-Zählkammer. Eine tot/lebend-Differenzierung wurde durch den Ausschluß des Trypanblaus aus lebenden Zellen ermöglicht.

## 3.2 Isolierung von Subpopulationen humaner Immunzellen

### 3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMCs)

Mononukleäre Zellen wurden nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation aus erythrozytendepletierten Vollblutkonzentraten, sog. *buffy coats*, gewonnen. Je 40 ml des 1:3 mit PBS verdünnten Blutes wurden auf 10 ml Ficoll der Dichte  $1,077 \text{ g/cm}^3$  überschichtet und bei 2800 rpm 15 min zentrifugiert (ohne Bremse). Zellen mit hoher Dichte – Granulozyten und Erythrozyten – sedimentierten während die mononukleären Zellen eine Interphasering zwischen Ficoll und Serum bildeten. Dieser Zellring wurde entnommen und dreimal mit PBS gewaschen (einmal bei 1700 rpm, zweimal bei 800 rpm, jeweils 6 min).

### 3.2.2 Isolierung von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen aus PBMCs

CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden in einem Drei-Schritte-Verfahren aus PBMCs isoliert.  $1 \cdot 10^8$  PBMCs wurden 1,5 h in 50 ml R10H in einer  $175 \text{ cm}^2$ -Kulturflasche im Brutschrank inkubiert. Dabei adhärten ein Großteil der Monozyten an die Plastikoberfläche der Flasche. Durch Abkippen der nicht adhärten Zellen wurden die Lymphozyten angereichert.

Im zweiten Schritt wurde das unterschiedliche Adhärenzverhalten mononukleärer Zellen an Nylonwatte ausgenutzt. Die angereicherten Lymphozyten wurden in 2 ml R10F aufgenommen und auf einer mit R10F äquilibrierten Nylonsäule (10 ml-Spritze, gefüllt mit 1 g Nylonwatte) im Brutschrank inkubiert. B-Zellen und Monozyten adhärten an die Nylonwatte, so daß nach 45 min die T-Zellen in 15 ml warmem R10F eluiert wurden.

Der dritte Schritt bestand aus einer positiven Selektion der CD3<sup>+</sup>-Zellen mittels MicroBead-gekoppelter anti-CD3-Antikörper laut Herstellerprotokoll (Miltenyi Biotech). Die angereicherten T-Zellen wurden in 80 µl eiskaltem MACS-Puffer mit 20 µl CD3-MicroBeads je  $1 \cdot 10^7$  Zellen aufgenommen und bei 4°C 15 min inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml MACS-Puffer je  $1 \cdot 10^7$  Zellen wurden bis zu  $1 \cdot 10^8$  Zellen in 0,5 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine in der Magnetkammer platzierte Magnetsäule gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit je 0,5 ml MACS-Puffer wurde die Säule aus der Kammer entnommen, und die CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden in 1 ml MACS-Puffer eluiert.

Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit Hilfe eines anti-CD3-Antikörpers durchflußzytometrisch kontrolliert.

### 3.2.3 Isolierung von NK-Zellen aus PBMCs

NK-Zellen wurden am *Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro* in Genua mit Hilfe des *RosetteSep Human NK cell enrichment cocktail* laut Herstellerprotokoll isoliert (StemCell

Technologies, Vancouver, BC, Kanada). Polyklonale NK-Zell-Populationen wurden durch die Kultivierung auf bestrahlten Feeder-Zellen in Anwesenheit von 2 µg/ml PHA und 100 U/ml rIL-2 erhalten. Die polyklonalen NK-Zellen wurden von Dr. D. Pende für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### **3.3 Stimulation humaner Immunzellen**

#### **3.3.1 Inaktivierung von humanem Serum**

Spenderserum (Blutgruppe AB) wurde bei 56°C mindestens 30 min hitzeinaktiviert. Nach 15-minütiger Zentrifugation (4000 rpm) wurde das Serum steril filtriert und bei -20°C gelagert.

#### **3.3.2 IL-2-Aktivierung von PBMCs**

Mittels Ficoll isolierte PBMCs wurden drei Tage mit rIL-2 stimuliert.  $6 \cdot 10^7$  Zellen wurden dazu in einer 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche in 50 ml R10H aufgenommen und mit 6000 U/ml rIL-2 versetzt. In einigen Fällen wurde der Aktivierungskultur SAHA in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt.

#### **3.3.3 IL-2-Aktivierung von NK92C1-Zellen**

NK92C1-Zellen wurden drei Tage mit rIL-2 stimuliert.  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden dazu in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche in 10 ml MEM- $\alpha$  aufgenommen und mit 6000 U/ml rIL-2 versetzt.

#### **3.3.4 Proliferationsassay mit PBMCs**

Die Zellproliferation nach Stimulation wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA der Zellen nachgewiesen und quantifiziert. Die radioaktive Strahlung war dabei proportional zur Neusyntheserate der DNA und damit zur Proliferation der Zellen.

Für Proliferationsassays wurde R10F als Zellkulturmedium verwendet. PBMCs wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität in einem Volumen von 100 µl/Kavität in 96-Well-Flachbodenplatten gegeben. Als Stimulanz wurden je Kavität 50 µl IL-2, PHA oder SEB in serieller Verdünnung zugegeben. Um den Einfluß von HDIs auf die PBMC-Proliferation zu untersuchen, wurde SAHA in unterschiedlichen Konzentrationen in einem

Volumen von 50 µl/Kavität eingesetzt, so daß das Gesamtvolumen in jedem Ansatz 200 µl betrug.

Nach dreitägiger Kultur im Brutschrank (bei IL-2 als Stimulanz auch nach sechstägiger Kultur) wurden je Kavität 0,5 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin in einem Volumen von 20 µl zugegeben. Der Einbau des radioaktiv markierten Thymidins in die DNA wurde nach weiteren 17 h durch Einfrieren der Platten beendet.

Mit Hilfe eines automatischen Zellerntege­räts wurden die PBMCs auf Glasfaserfilter übertragen. Die getrockneten Filter wurden zusammen mit einem Standard zwei Tage auf Tritium Storage Phosphor Screens aufgelegt. Diese Schirme wurden am Phosphorimager eingescannt, und die Datenauswertung erfolgte mit der Software ImageQuaNT 5.2. Durch den mitgeführten normalisierten Standard ließen sich die Meßdaten von den gemessenen volume-Werten in cpm-Werte umwandeln. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten, von denen der Mittelwert gebildet wurde. Die Standardabweichung lag immer unter 20 % mit Ausnahme von Werten unter 2000 cpm.

### **3.3.5 Inaktivierung von Tumorzellen mit Mitomycin C**

SkMel63- bzw. SkMel63-B7.2-Zellen, die für die Stimulation allogener T-Zellen eingesetzt werden sollten, wurden mit Mitomycin C, einem in die DNA interkalierenden Agens, inaktiviert. Die Tumorzellen wurden dazu in serumfreiem RPMI 1640 in einer Dichte von  $5 \cdot 10^7$  Zellen/ml mit 200 µg/ml Mitomycin C versetzt und unter Lichtabschluß 20 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Mitomycin C durch dreimaliges Waschen mit je 15 ml R10F aus dem Medium entfernt.

### **3.3.6 Allogenes T-Zell-Priming**

Aus PBMCs isolierte CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden durch siebentägige Ko-Kultivierung mit inaktivierten SkMel63-B7.2-Zellen geprimt. Als Zellkulturmedium wurde R10F verwendet. In 96-Well-Flachbodenplatten wurden je Kavität  $5 \cdot 10^4$  inaktivierte SkMel63-B7.2-Zellen in einem Volumen von 100 µl plattiert. Am folgenden Tag, nachdem die Tumorzellen adhärirt waren, wurden je Kavität  $1 \cdot 10^5$  CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in einem Volumen von 50 µl hinzugefügt. Um den Einfluß von HDIs auf das T-Zell-Priming zu untersuchen, wurden je Kavität 50 µl SAHA in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. In Kontrollansätzen wurden die CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mit 1 µg/ml PHA, mit inaktivierten SkMel63-Zellen (ohne B7.2-Expression) oder ausschließlich mit R10F kultiviert. Das Gesamtvolumen betrug in jedem Ansatz 200 µl.

Die Charakterisierung des T-Zell-Primings erfolgte anhand von Zytokinsekretion und Proliferation. Dazu wurden sieben Tage nach Beginn der Ko-Kultur typische Th1/Th2-

Zytokine im Zellkulturüberstand quantifiziert (s. 3.5.4) bzw. die Kultur wurde mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin versetzt, um die induzierte Zellproliferation durch Messung der inkorporierten Radioaktivität zu bestimmen (s. 3.3.4).

Um ausreichend viele geprimte SkMel63-spezifische T-Zellen für weiterführende Versuche zu generieren, wurden  $3,75 \cdot 10^6$  inaktivierte SkMel63-B7.2-Zellen zusammen mit  $7,5 \cdot 10^6$  CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen sieben Tage kultiviert.

## 3.4 Messung von Tumorzelltod

### 3.4.1 Durchflußzytometrische Messung

Bei der durchflußzytometrischen Bestimmung wurde die Tumorzelltodinduktion durch Effektorzellen anhand der Anzahl überlebender Zielzellen nach Ko-Inkubation quantifiziert.

In 24-Well-Flachbodenplatten wurden je Kavität  $4 \cdot 10^4$  DAOY-Zellen bzw.  $5 \cdot 10^4$  PC3-Zellen in 1 ml des zugehörigen Mediums plattiert. Am folgenden Tag, nachdem die Zellen adhärirt waren, wurde das Medium entfernt und durch 1 ml SAHA bzw. NaB in unterschiedlichen Konzentrationen in Medium ersetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der HDI entfernt. Es folgte eine 24- oder 48-stündige Ko-Inkubation der Tumorzellen mit aktivierten PBMCs bzw. mit aktivierten NK92C1-Zellen. In einigen Ansätzen wurde an dieser Stelle der HDI in seiner zuvor eingesetzten Konzentration wieder zugegeben.

Die zytolytische Wirkung der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurde wegen der geringen Menge geprimter T-Zellen in 96-Well-Flachbodenplatten durchgeführt. Dazu wurden je Kavität  $3 \times 10^3$  Wildtyp-SkMel63-Zellen plattiert. Die Zugabe von SAHA und T-Zellen erfolgte jeweils nach 24 Stunden. Das Gesamtvolumen je Kavität betrug 100  $\mu\text{l}$ .

Nach der Ko-Inkubation wurden die adhärennten Tumorzellen mittels Trypsin/EDTA gelöst und im FACScan quantifiziert. Absolute Zellzahlen ließen sich durch die Zugabe von 50.000 Microbeads (Fluoresbrite plain YG 10.00 micron microspheres) zu jeder Probe errechnen. Tote Zellen wurden durch eine Propidiumjodidfärbung ausgeschlossen.

Die Ergebnisse wurden mit der Kombinationsindexmethode nach Chou und Talalay [36] analysiert. Dazu wurde die Calcsyn-Software von Biosoft verwendet.

### 3.4.2 $^{51}\text{Chrom}$ -Release-Assay

Der klassische  $^{51}\text{Chrom}$ -Release-Assay stellte die zweite Methode zur Quantifizierung der Tumorzelltodinduktion dar. Dabei setzten markierte Zielzellen nach ihrer Lyse Radio-

aktivität frei, so daß die anschließend im Kulturüberstand gemessene radioaktive Strahlung proportional zur Lyserate war.

Tumorzellen wurden für die radioaktive Markierung pelletiert und je  $1 \cdot 10^6$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$   $^{51}\text{Cr}$  ( $100 \mu\text{Ci}$ ) resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen dreimal gewaschen und mit Medium auf  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Effektorzellen wurden. In 96-Well-Rundbodenplatten wurden je Kavität zuerst die Effektorzellen (IL-2-aktivierte PBMCs oder polyklonale NK-Zellen), anschließend die Tumorzellen gegeben. Während die Konzentration der Tumorzellen konstant  $5 \cdot 10^3$  Zellen/Kavität betrug, variierte die Anzahl der Effektorzellen je nach E/T-Ratio. Das Gesamtvolumen je Kavität betrug  $200 \mu\text{l}$ . Kontrollansätze enthielten entweder nur Tumorzellen zur Bestimmung der spontanen Lyse oder Tumorzellen mit  $2 \text{ N HCl}$  zur Bestimmung der totalen Lyse. Nach vierstündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden  $100 \mu\text{l}$  des Kulturüberstandes abgenommen und in einem Gammazähler analysiert. Die spezifische Lyse, angegeben in Prozenten der maximalen Lyse errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{spezifische Lyse (in \%)} = \frac{\text{Lyse (Probe)} - \text{Lyse (spontan)}}{\text{Lyse (maximal)} - \text{Lyse (spontan)}} \times 100$$

Für die Maskierungsversuche wurden die Effektorzellen ca. 30 min mit monoklonalen Antikörpern prä-inkubiert ( $50 \mu\text{l/Kavität}$ ). Die Antikörper waren spezifisch für verschiedene aktivierende NK-Rezeptoren und wurden in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt.

### 3.5 Durchflußzytometrische Methoden

#### 3.5.1 Färbung extrazellulärer Moleküle

Die Expression von Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen wurde durchflußzytometrisch quantifiziert. Je Färbungsansatz wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden zweimal mit  $1 \text{ ml}$  eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Fc-Rezeptoren wurden  $10 \text{ min}$  mit  $5 \mu\text{l}$  Gammaglobulinen (Cohn II;  $10 \mu\text{g/ml}$ ) geblockt. Die Antikörperinkubation ( $5 \mu\text{l}$  einer  $50 \mu\text{g/ml}$ -Lösung) erfolgte  $30 \text{ min}$  bei  $4^\circ\text{C}$ . Falls erforderlich schloß sich nach zweimaligem Waschen die Inkubation des sekundären Antikörpers unter denselben Bedingungen an. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in  $100 \mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und im FACScan analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software WinMDI 2.8. Die mittlere relative Fluoreszenzintensität (MRFI) wurde berechnet als Quotient der relativen Fluoreszenzintensität der spezifischen Färbung und der relativen Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle.

Um die Reinheit isolierter T-Zellen zu überprüfen, wurde analog verfahren. Für die Oberflächenfärbung des Markers CD3 wurden 2  $\mu\text{l}$  des FITC-gekoppelten anti-CD3-Antikörpers verwendet.

### 3.5.2 Zellzyklusanalyse

Um die Expression des aktivierenden NK-Liganden MICA in den einzelnen Phasen des Zellzyklus zu untersuchen, wurde im Anschluß an die Färbung von MICA eine Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid durchgeführt. Propidiumjodid interkaliert in die DNA und läßt somit die DNA-Menge einer Zelle erkennen.

Extrazelluläres MICA auf Tumorzellen wurde wie oben beschrieben mit einem spezifischen unmarkierten und einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper angefärbt (s. 3.5.1). Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Fixationsmedium 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml eiskaltem FACS-Puffer erfolgte die DNA-Färbung mit 0,5 ml PBS, welches 1 % Glukose, 50  $\mu\text{g/ml}$  RNase A und 50  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid enthielt. Dieser Inkubationsschritt fand bei Raumtemperatur im Dunkeln statt und dauerte 30 min. Die Zellen wurden direkt im Anschluß im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software WinMDI 2.8.

### 3.5.3 CD107a-Mobilisierung

Die Bestimmung der CD107a-Oberflächenexpression auf NK- und T-Zellen diente der Analyse ihrer Aktivierung nach Tumorzellkontakt.

In 24-Well-Flachbodenplatten wurden je Kavität  $4 \cdot 10^4$  DAOY-Zellen bzw.  $5 \cdot 10^4$  PC3-Zellen in 1 ml des zugehörigen Mediums plattiert. Bei einigen Versuchen wurde am folgenden Tag, nachdem die Zellen adhärirt waren, das Medium entfernt und durch 1 ml SAHA bzw. NaB in Medium ersetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der HDI entfernt. Es folgte eine fünfstündige Ko-Inkubation der Tumorzellen mit aktivierten PBMCs in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Monensin und 10  $\mu\text{l}$  des PE-Cy5-gekoppelten anti-CD107a-Antikörpers. In einigen Ansätzen wurde an dieser Stelle außerdem SAHA in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Das Gesamtvolumen je Kavität betrug immer 1 ml.

Nach der Ko-Inkubation mit den Tumorzellen wurde das Medium mit den PBMCs vollständig abgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Fc-Rezeptoren wurden 10 min mit 10  $\mu\text{l}$  Gammaglobulinen (Cohn II; 10  $\mu\text{g/ml}$ ) geblockt. Die Antikörperinkubation (5  $\mu\text{l}$  einer 50 $\mu\text{g/ml}$ -Lösung) erfolgte 40 min bei 4°C. Um die CD107a-Expression auf NK- und T-Zellen analysieren zu können, wurden in getrennten Ansätzen NK-Zellen als

CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-Zellen und T-Zellen als CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen gefärbt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und im FACScan analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software WinMDI 2.8.

### 3.5.4 Zytokinbestimmung mit dem *Cytometric Bead Array* (CBA)

Das Prinzip des CBA zur Quantifizierung von Zytokinkonzentrationen in Kulturüberständen entspricht einem Sandwich-ELISA. Durch den Einsatz der Durchflußzytometrie lassen sich jedoch sechs verschiedene Zytokine pro Ansatz messen. Dafür werden sechs Bead-Populationen mit jeweils definierten (unterschiedlichen) Fluoreszenzintensitäten genutzt, die mit Fangantikörpern gegen IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-5, IL-4 bzw. IL-2 beschichtet sind. Die Fluoreszenz der Beads wird im dritten Kanal eines Zytometers gemessen, so daß die Bead-Populationen anhand ihrer Fluoreszenzintensitäten unterschieden werden können. PE-konjugierte zytokinspezifische Detektionsantikörper (PE-Reagenz) erlauben eine Quantifizierung der Zytokine in der Probe. Mit Hilfe des zum CBA-Kit gehörenden Standards lassen sich absolute Zytokinkonzentrationen errechnen.

PBMCs wurden wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben drei Tage stimuliert; CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben sieben Tage geprimt. Jeweils 20 µl der gewonnenen Kulturüberstände wurden mit 20 µl PE-Reagenz und 20 µl kombinierter Beads versetzt und drei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Proben einmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen worden waren, wurden die Beads in 200 ml Waschpuffer resuspendiert und im FACScan analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der zum CBA-Kit gehörenden Software.



## 4. Ergebnisse

Diese Arbeit untersucht den Einfluß von Histondeacetylase-Inhibitoren (HDIs) auf die Erkennung und Abtötung von Tumorzellen durch humane Immunzellen. Im Fokus der Arbeit stehen dabei sowohl die Wirkung der HDIs auf Tumorzellen im Hinblick auf deren Sensibilität für zytolytische Effekte von Immunzellen als auch der direkte Einfluß der HDIs auf Immunzellen. Als Immunzellen wurden im ersten Teil der Arbeit PBMCs, im zweiten Teil CD3<sup>+</sup>-T-Zellen eingesetzt.

### 4.1 HDIs sensibilisieren Tumorzellen für zytolytische Effekte aktivierter NK-Zellen

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß eine HDI-Vorbehandlung Tumorzellen (Medulloblastomzelllinie DAOY, Prostatakarzinomzelllinie PC3) für die Zelltodinduktion durch IL-2-aktivierte PBMCs sensibilisiert [30]. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zielten auf eine Spezifizierung der Effektorzellen in diesem System. Außerdem wurden Hinweise auf den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus der Sensibilisierung gesucht.

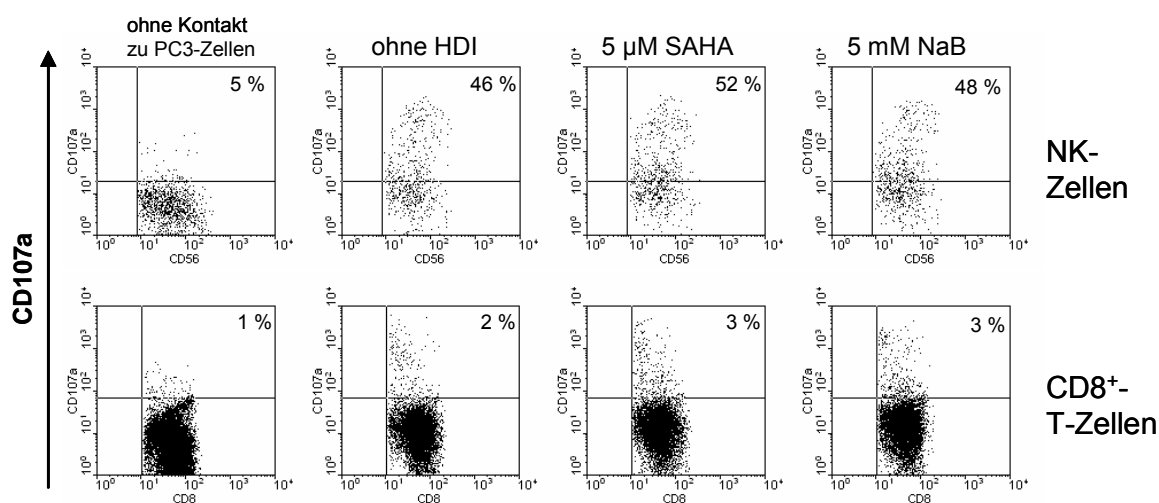
#### 4.1.1 NK-Zellen, nicht jedoch CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mobilisieren CD107a nach Tumorzellkontakt

IL-2-aktivierte PBMCs induzieren innerhalb von 24 h effektiv Tumorzelltod *in vitro* – doch welche Zellpopulationen sind die tatsächlich verantwortlichen Effektorzellen? Zytotoxische Effektorzellen (NK-Zellen, T-Zellen), die eine Zielzelle erkannt haben, degranulieren. Dabei gelangt CD107a aus den intrazellulären Granula an die Zelloberfläche und kann somit als Indikator für eine Zellaktivierung genutzt werden.

Wie aus Abb. 4.1 ersichtlich ist, exprimierten PBMCs, die keinen Kontakt zu PC3-Tumorzellen gehabt hatten, kaum CD107a (5 % der NK-Zellen, 1 % der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen). Bereits nach 5-stündiger Ko-Inkubation mit PC3-Zellen war jedoch bei 46 % der NK-Zellen eine CD107a-Expression auf der Zelloberfläche nachweisbar. Im Gegensatz dazu blieb die CD107a-Expression auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen niedrig (2 %). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß im untersuchten System der Tumorzelltodinduktion NK-Zellen und nicht T-Zellen die hauptsächlichen Effektorzellen waren.

Eine 24-stündige Vorbehandlung der PC3-Zellen mit 5 µM SAHA oder 5 mM NaB – HDI-Konzentrationen, die in der oben erwähnten Arbeit Tumorzellen für die Lyse durch PBMCs sensibilisierten – ließ den Anteil der CD107a<sup>+</sup>-NK-Zellen nicht weiter steigen

(52 % bzw. 48 %) und führte auch nicht zu einer Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (3 % CD107a<sup>+</sup>).



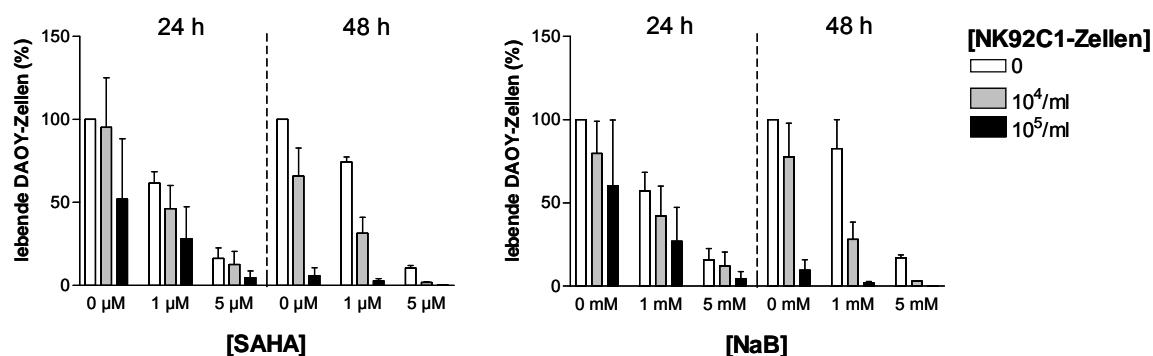
**Abbildung 4.1** NK-Zellen, nicht jedoch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mobilisieren CD107a nach Tumorzellkontakt. Die Dotplots zeigen die CD107a-Expression auf CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-NK-Zellen und auf CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. IL-2-aktivierte PBMCs wurden 5 h mit PC3-Zellen ko-inkubiert, die entweder unbehandelt, mit 5 µM SAHA vorbehandelt oder mit 5 mM NaB vorbehandelt waren. In einem Kontrollansatz hatten die PBMCs keinen Kontakt zu PC3-Zellen. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

#### 4.1.2 HDIs verstärken die Tumorzellinduktion durch NK92C1-Zellen

Da NK-Zellen durch den Kontakt mit Tumorzellen zur Degranulation angeregt wurden, wurde nun untersucht, ob NK-Zellen bei gleichem Versuchsaufbau wie IL-2-aktivierte PBMCs Tumorzelltod induzieren konnten. Dazu wurden Zellen der NK-Zelllinie NK92C1 als Effektorzellen genutzt. Sie wurden drei Tage mit IL-2 aktiviert und 24 h bzw. 48 h mit DAOY-Tumorzellen ko-inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Tumorzellen durchflußzytometrisch erfaßt.

NK92C1-Zellen führten zu einer Reduktion der lebenden DAOY-Zellen, induzierten also Tumorzelltod (Abb. 4.2). Nach 24 h hatten  $1 \cdot 10^4$ /ml NK92C1-Zellen (entsprechend einer E/T-Ratio von ca. 1:10) 5 %,  $1 \cdot 10^5$ /ml NK92C1-Zellen (entsprechend einer E/T-Ratio von ca. 1:1) 48 % der DAOY-Zellen getötet. Eine 24-stündige Inkubation der DAOY-Zellen mit 5 µM SAHA oder 5 mM NaB vor der Ko-Kultur mit NK92C1-Zellen hatte bereits per se toxische Wirkung. Darüber hinaus verstärkte die HDI-Vorbehandlung die zytolytischen Effekte der NK92C1-Zellen: Eine Vorbehandlung mit 1 µM SAHA gefolgt von einer 24-stündigen Ko-Inkubation mit  $1 \cdot 10^5$ /ml NK92C1-Zellen führte zu einer Abnahme der lebenden DAOY-Zellen um 72 %, und sogar 95 % der DAOY-Zellen überlebten die Kombination von 5 µM SAHA und  $1 \cdot 10^5$ /ml NK92C1-Zellen nicht. Wurde die Ko-

Inkubationszeit mit NK92C1-Zellen auf 48 h erhöht, verstärkte sich die Tumorzelltod-induktion weiter.



**Abbildung 4.2 NK92C1-Zellen induzieren Tumorzelltod.** DAOY-Zellen wurden 24 h mit SAHA oder NaB in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Danach wurden sie mit IL-2-aktivierten NK92C1-Zellen 24 h oder 48 h ko-inkubiert. Die Anzahl lebender DAOY-Zellen wurde durchflußzytometrisch ermittelt und ist dargestellt als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel und Spannen von zwei unabhängigen Versuchen.

Eine Möglichkeit, synergistische Effekte zweier Medikamente oder Behandlungen in Zahlenwerten auszudrücken und somit vergleichbar zu machen, ist die Berechnung der Kombinationsindizes (*combination indices*, CI) nach Chou und Talalay [36]. Beträgt der CI-Wert 1, zeigt dies einen additiven Effekt an. Werte unter 1 deuten auf einen Synergismus der beiden Medikamente / Behandlungen hin, der umso stärker ist, je niedriger der Wert ausfällt.

**Tabelle 4.1 CI-Werte von HDIs und NK92C1-Zellen.**

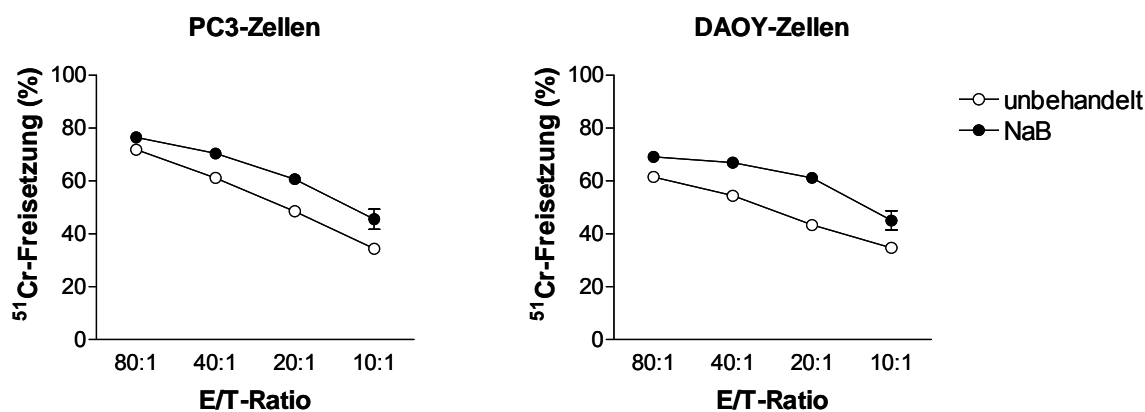
| HDI  | NK92C1-Inkubation | HDI-Konzentration | NK92C1-Konzentration (ml <sup>-1</sup> ) | CI   |
|------|-------------------|-------------------|--|------|
| SAHA | 24 h              | 1 µM              | 10 <sup>4</sup>                          | 0,67 |
|      |                   |                   | 10 <sup>5</sup>                          | 0,44 |
|      |                   |                   | 10 <sup>4</sup>                          | 0,80 |
|      | 48 h              | 1 µM              | 10 <sup>5</sup>                          | 0,36 |
|      |                   |                   | 10 <sup>4</sup>                          | 0,78 |
|      |                   |                   | 10 <sup>5</sup>                          | 0,68 |
| 48 h | 5 µM              | 10 <sup>4</sup>   | 0,44                                     |      |
|      |                   | 10 <sup>5</sup>   | 0,23                                     |      |
|      |                   | 10 <sup>4</sup>   | 0,23                                     |      |
| NaB  | 24 h              | 1 mM              | 10 <sup>4</sup>                          | 0,63 |
|      |                   |                   | 10 <sup>5</sup>                          | 0,38 |
|      |                   |                   | 10 <sup>4</sup>                          | 0,78 |
|      | 48 h              | 5 mM              | 10 <sup>5</sup>                          | 0,33 |
|      |                   |                   | 10 <sup>4</sup>                          | 0,52 |
|      |                   |                   | 10 <sup>5</sup>                          | 0,37 |
| 48 h | 1 mM              | 10 <sup>4</sup>   | 0,42                                     |      |
|      |                   | 10 <sup>5</sup>   | 0,17                                     |      |
|      |                   | 10 <sup>4</sup>   | 0,17                                     |      |

CI < 1 und = 1 zeigen einen synergistischen bzw. additiven Effekt an.  $n = 2$ .

Die CI-Methode wurde hier angewendet, um den kombinatorischen Effekt von HDI-Behandlung und Ko-Inkubation mit NK92C1-Zellen zu quantifizieren. In Tab. 4.1 sind die CI-Werte für alle Kombinationen, wie sie oben beschrieben und in Abb. 4.2 gezeigt sind, aufgeführt. Die durchweg niedrigen Werte zeigen eine synergistische Wirkung von HDIs und NK92C1-Zellen an. Dies wird besonders deutlich bei der Kombination von  $1 \cdot 10^5$ /ml NK92C1-Zellen mit 5  $\mu$ M SAHA oder 5 mM NaB, da hier die Werte sogar unter 0,4 lagen. SAHA und NaB sensibilisierten DAOY-Zellen also stark für die zytolytischen Effektorfunktionen der NK92C1-Zellen.

#### 4.1.3 Lyse der Tumorzellen durch PBMCs ist abhängig von aktivierenden NK-Rezeptoren

NK-Zellen ließen sich von DAOY- und PC3-Zellen aktivieren, und HDIs verstärkten die Tumorzellyse durch IL-2-aktivierte PBMCs und NK92C1-Zellen. Deshalb sollte die Rolle aktivierender NK-Rezeptoren bei der Erkennung von Tumorzellen aufgeklärt werden. Dafür wurden vierstündige  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assays durchgeführt. Abb. 4.3 zeigt, daß IL-2-aktivierte PBMCs bereits nach dieser kurzen Ko-Inkubationszeit PC3- und DAOY-Zellen töteten. Eine HDI-Vorbehandlung der Tumorzellen hatte auch in diesem Fall einen sensibilisierenden Effekt auf die Zelltodinduktion, der allerdings geringer ausfiel als bei einer 24-stündigen Ko-Inkubation von Effektor- und Zielzellen (vgl. [29]).



**Abbildung 4.3** IL-2-aktivierte PBMCs induzieren bereits nach 4 h Tumorzelltod. Unbehandelte oder 24 h mit 5 mM NaB vorbehandelte PC3- und DAOY-Zellen wurden mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert und 4 h mit IL-2-aktivierten PBMCs bei den angegebenen E/T-Ratios ko-inkubiert. Anschließend wurde die Menge des in den Kulturüberstand freigesetzten  $^{51}\text{Cr}$  bestimmt. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel und Spannen von Duplikaten.

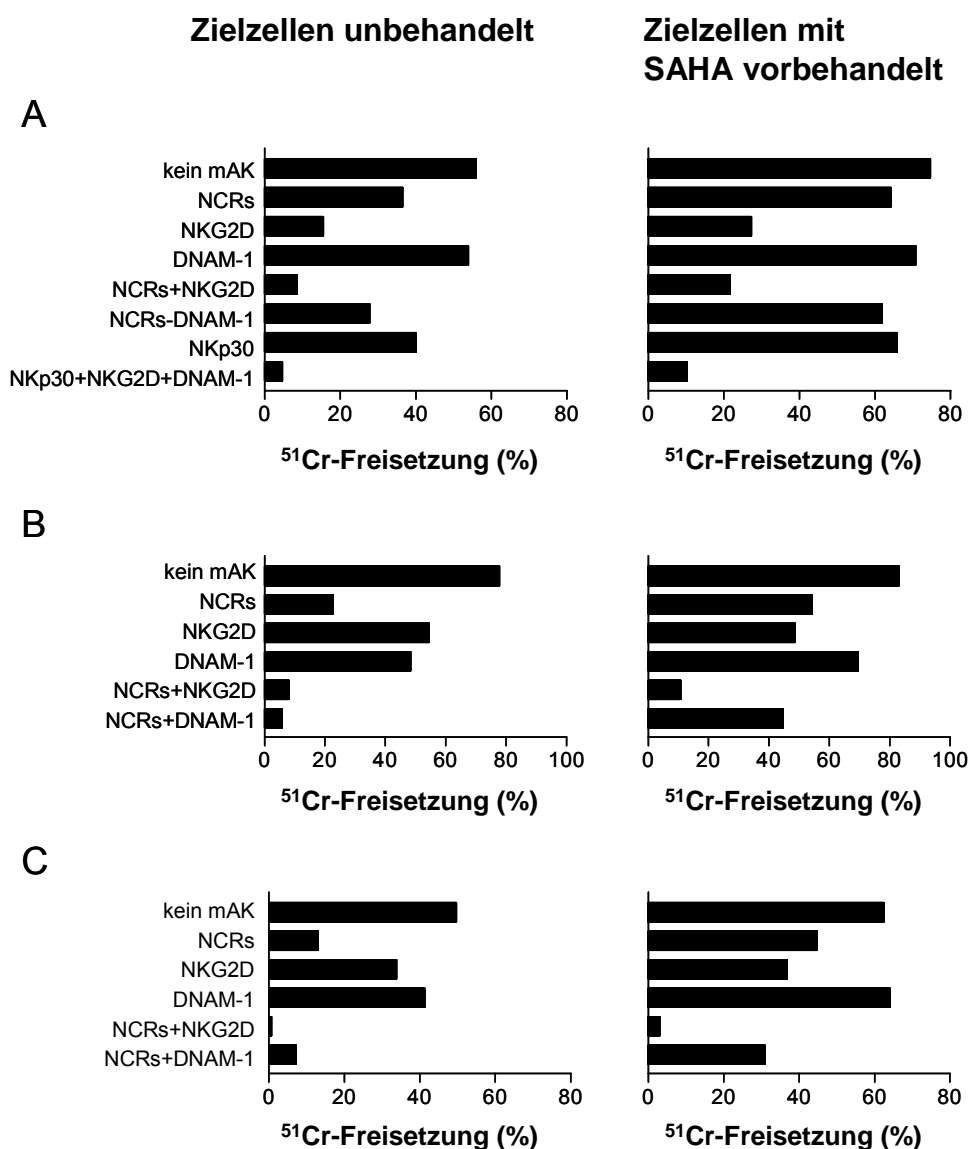
Um die Abhängigkeit der zytolytischen Aktivität IL-2-aktivierter PBMCs von verschiedenen aktivierenden NK-Rezeptoren zu untersuchen, wurden blockierende monoklonale Antikörper im  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assay eingesetzt. Die Antikörper richteten sich

gegen die wichtigsten bekannten aktivierenden NK-Rezeptoren: NKG2D, DNAM-1 und die NCRs. Eine Prä-Inkubation der Effektorzellen mit diesen Antikörpern sollte die jeweiligen Rezeptoren maskieren. Die Maskierung von Rezeptoren, die eine Rolle bei der Tumorzellerkennung spielten, würde somit zu einer Verminderung der zytolytischen Aktivität der Effektorzellen führen.

Wie in Abb. 4.4A (DAOY-Zellen als Zielzellen) und Abb. 4.4B (PC3-Zellen als Zielzellen) zu erkennen ist, verringerte die Blockade jedes einzelnen NK-Rezeptors die Tumorzellyse, wobei der Grad der Verringerung von der Tumorzelllinie abhing. Bei DAOY-Zellen führte die Maskierung von NKG2D zu einer drastischen Abnahme der Zellyse, wohingegen die Maskierung von DNAM-1 oder den NCRs geringere Effekte hatte. Andererseits hing die PC3-Zellyse hauptsächlich von den NCRs und nur in geringerem Maße von NKG2D und DNAM-1 ab. Die gleichzeitige Blockade von zwei Rezeptoren erhöhte den protektiven Effekt bei beiden Zelllinien. Wurden alle drei Rezeptortypen blockiert (da der anti-NKp30-Antikörper den gleichen Effekt erzielte wie ein Mix gegen alle drei NCRs, wurde er hier stellvertretend verwendet), verhinderte die Lyse vollständig. Dies bedeutet, daß (a) NKG2D, DNAM-1 und die NCRs eine wichtige Rolle bei der Tumorzellerkennung und Lyse durch IL-2-aktivierte PBMCs spielen und daß (b) keine weiteren aktivierenden Rezeptoren an diesen Prozessen beteiligt sind.

Wie oben bereits beschrieben wurde, erhöhte eine HDI-Vorbehandlung der Tumorzellen ihre Lyse im <sup>51</sup>Chrom-Release-Assay. Doch auch die Lyse der HDI-vorbehandelten Tumorzellen wurde vollständig unterbunden durch die kombinierte Maskierung von NKG2D, DNAM-1 und den NCRs (Abb. 4.4A). Dies beweist, daß die HDI-Behandlung nicht zum Engagement alternativer aktivierender NK-Rezeptoren führt. Die HDI-Behandlung der Tumorzellen hatte aber eine andere auffällige Wirkung: Sie verringerte den protektiven Effekt von nur einem oder zwei blockierenden Antikörpern, was sich in einer höheren Lyserate als bei den entsprechenden Ansätzen mit unbehandelten Tumorzellen niederschlug (Abb. 4.4A und B).

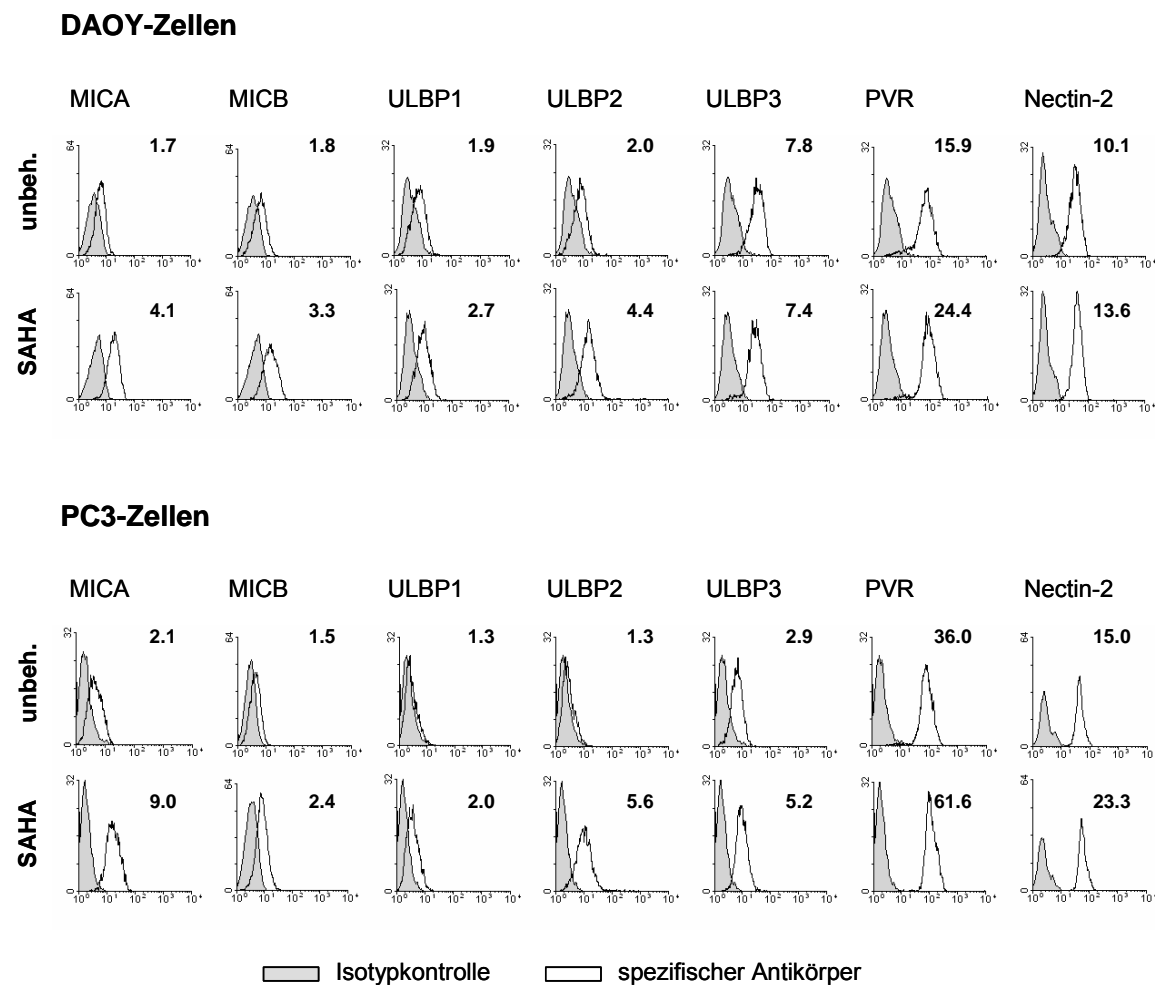
Auch die zytolytische Aktivität IL-2-aktivierter polyklonaler NK-Zellen ließ sich durch blockierende Antikörper gegen die aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D, DNAM-1 und die NCRs vermindern (Abb. 4.4C). Die protektiven Effekte waren mit denen der PBMC-Versuche vergleichbar und verringerten sich auch hier nach HDI-Vorbehandlung der Tumorzellen.



**Abbildung 4.4 Tumorzellyse ist abhängig von aktivierenden NK-Rezeptoren.**  $^{51}\text{Cr}$ -markierte Tumorzellen wurden als Zielzellen für IL-2-aktivierte PBMCs bei einer E/T-Ratio von 40:1 (A und B) oder für IL-2-aktivierte polyklonale NK-Zellen bei einer E/T-Ratio von 5:1 (C) eingesetzt. Die Ko-Inkubation von Effektor- und Zielzellen fand in Anwesenheit von blockierenden Antikörpern gegen die angegebenen aktivierenden NK-Rezeptoren statt. Als Zielzellen wurden DAOY-Zellen (A) und PC3-Zellen (B und C) eingesetzt. Wie angegeben waren sie entweder unbehandelt oder mit  $5\ \mu\text{M}$  SAHA vorbehandelt.

#### 4.1.4 HDIs erhöhen die Expression aktivierender NK-Liganden auf Tumorzellen

Die HDI-vermittelte Sensibilisierung von Tumorzellen für die zytolytischen Effekte von NK-Zellen korrelierte mit einer Erhöhung der Redundanz der beteiligten aktivierenden NK-Rezeptoren durch HDIs. Daher schien ein Einfluß von HDIs auf die Expression der zugehörigen Liganden auf den Tumorzellen naheliegend.

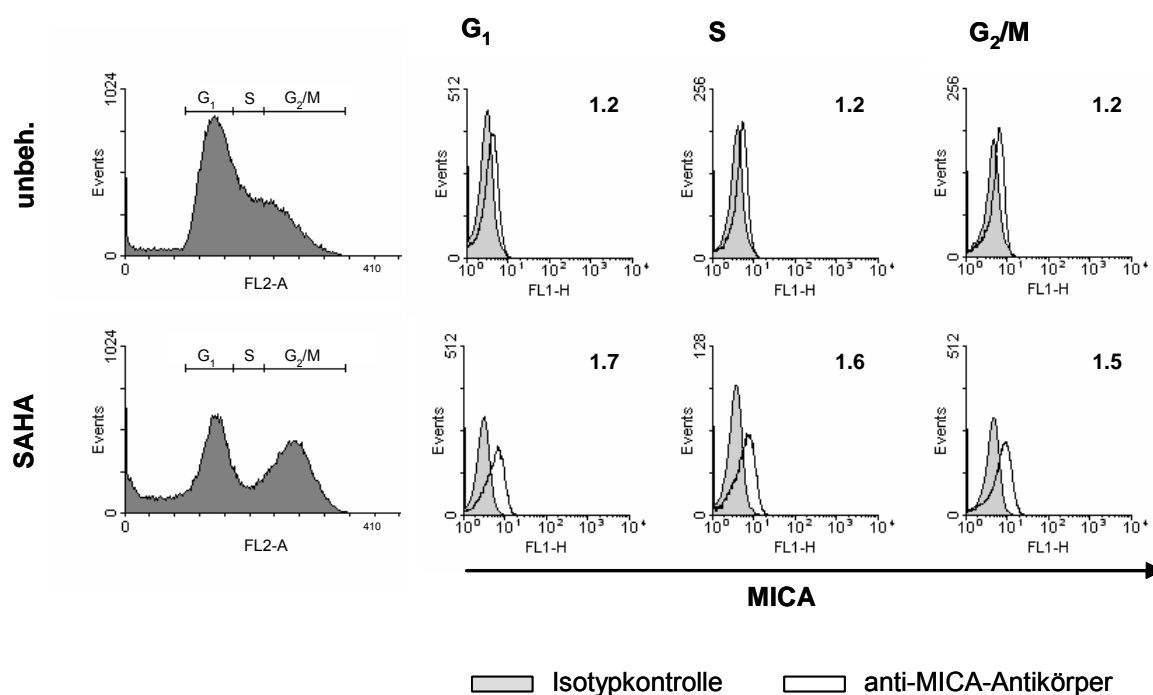


**Abbildung 4.5 SAHA erhöht die Oberflächenexpression aktivierender NK-Liganden auf Tumorzellen.** Auf unbehandelten oder 24 h mit 5  $\mu$ M SAHA vorbehandelten DAOY- und PC3-Zellen wurde die Oberflächenexpression der aktivierenden NK-Liganden MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, PVR und Nectin-2 durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die aktivierenden NK-Liganden oder mit Kontrollantikörpern des entsprechenden Isotyps gefärbt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.

Die Oberflächenexpression der Liganden für die aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 wurde durchflußzytometrisch analysiert. Eine Untersuchung der noch unbekanntem NCR-Liganden war aus technischen Gründen nicht möglich. Sowohl auf DAOY- als auch auf PC3-Zellen ergab sich eine hohe Grundexpression der DNAM-1-Liganden PVR und Nectin-2 und eine mittlere bis niedrige Grundexpression der NKG2D-Liganden MICA, MICB und der ULBPs. Nach 24-stündiger SAHA- Behandlung wurden alle NK-Liganden verstärkt exprimiert (Abb. 4.5). Am deutlichsten trat dieser Effekt bei MICA und ULBP2 auf, deren Expressionsdichte auf PC3-Zellen um mehr als das Vierfache anstieg. Die Behandlung der Tumorzellen mit NaB führte zu einem ähnlichen Anstieg der NK-Liganden-Expression (s. Anhang A.1). Diese Ergebnisse liefern eine mögliche Erklärung für die verstärkte Lyse von HDI-behandelten Tumorzellen durch

NK-Zellen: Die erhöhte Expression der aktivierenden NK-Liganden könnte zu einer besseren Erkennung und folglich effizienteren Abtötung der Tumorzellen durch NK-Zellen führen.

Da HDIs neben Apoptose auch Zellzyklusarrest induzieren, sollte ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Erhöhung der Expression der aktivierenden NK-Liganden auf eine Akkumulation der Tumorzellen in einer bestimmten Zellzyklusphase zurückzuführen war. Aus Abb. 4.6 wird ersichtlich, daß eine Behandlung von DAOY-Zellen mit 5  $\mu$ M SAHA zu einem G<sub>2</sub>/M-Arrest führt. Es wird jedoch deutlich, daß MICA – wegen seiner starken Induktion hier stellvertretend für alle aktivierenden NK-Liganden gemessen – in allen Phasen des Zellzyklus gleichmäßig exprimiert wird. Der HDI-induzierte Zellzyklusarrest ist also keine Erklärung für die erhöhte MICA-Expression.



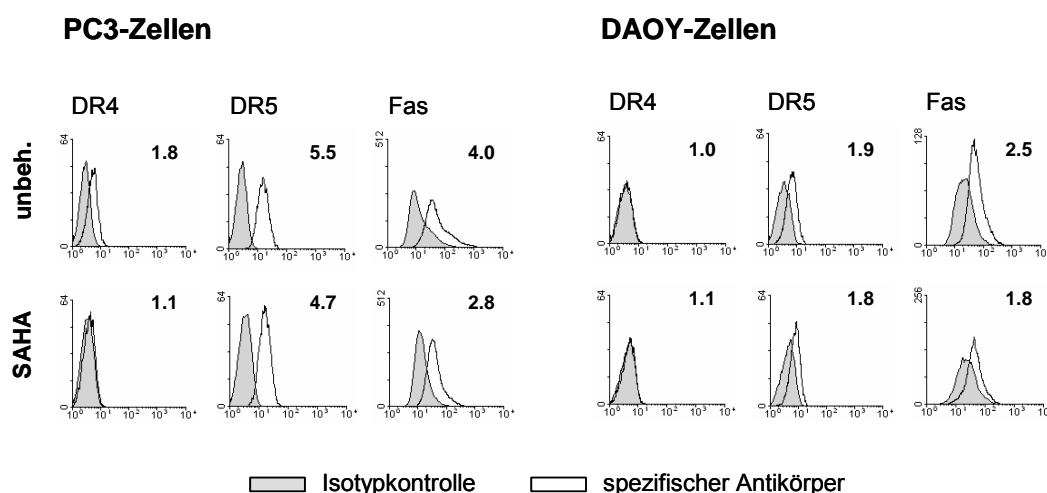
**Abbildung 4.6** MICA wird in allen Phasen des Zellzyklus gleichmäßig exprimiert. Die Zellzyklusphasen unbehandelter oder 24 h mit 5  $\mu$ M SAHA vorbehandelter DAOY-Zellen wurden anhand der PI-Inkorporation in die DNA bestimmt. Die MICA-Expression wurde in jeder Phase durchflußzytometrisch mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers ermittelt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.

#### 4.1.5 HDIs beeinflussen nicht die Expression von Todesrezeptoren auf Tumorzellen

HDIs erleichterten die Erkennung von Tumorzellen durch NK-Zellen. Hatten sie auch einen direkten Einfluß auf die Zelltodinduktion? Erste Untersuchungen in dieser Richtung beinhalteten die Analyse der Oberflächenexpression von Todesrezeptoren auf Tumorzellen nach HDI-Behandlung.



Unbehandelte PC3-Zellen exprimierten Fas (CD95) und DR5 (TRAIL-R2) in hoher Dichte und DR4 (TRAIL-R1) in niedriger Dichte (Abb. 4.7). Unbehandelte DAOY-Zellen exprimierten nur Fas und DR5, nicht aber DR4. Eine Behandlung der Tumorzellen mit 5  $\mu$ M SAHA (Abb. 4.7) oder 5 mM NaB (s. Anhang A.2) führte nicht zu einer verstärkten sondern vielmehr zu einer leicht erniedrigten Expression dieser Todesrezeptoren. HDIs vermittelten demnach keine Sensibilisierung der Tumorzellen für Todesliganden auf aktivierten NK-Zellen.



**Abbildung 4.7 SAHA erhöht nicht die Oberflächenexpression von Todesrezeptoren auf Tumorzellen.** Auf unbehandelten oder 24 h mit 5  $\mu$ M SAHA vorbehandelten DAOY- und PC3-Zellen wurde die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren DR4, DR5 und Fas durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Todesrezeptoren oder mit Kontrollantikörpern des entsprechenden Isotyps gefärbt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.

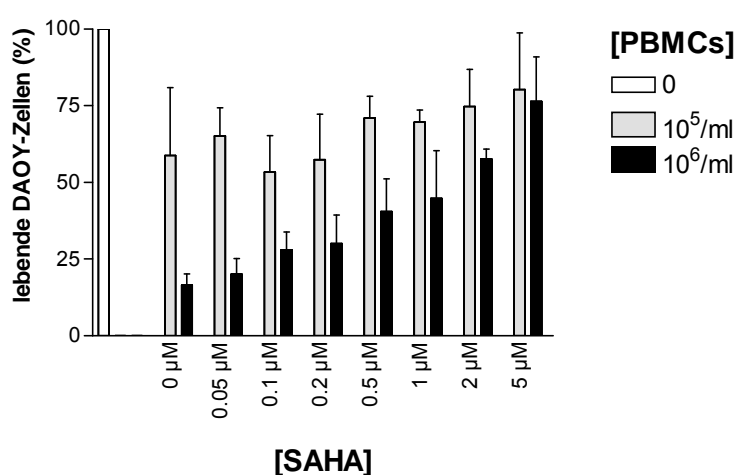
## 4.2 HDIs verhindern die Aktivierung tumorreaktiver NK-Zellen – sie beeinflussen aber nicht ihre zytolytischen Effektorfunktionen

HDIs übten eine starke zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen aus und sensibilisierten sie für zytolytische Effektorfunktionen aktivierter NK-Zellen – hatten sie auch einen direkten Einfluß auf tumorreaktive NK-Zellen? Im folgenden wurde die Sensibilität von PBMCs für HDIs einerseits während ihrer Aktivierungs- und andererseits während ihrer Effektorphase untersucht.

### 4.2.1 SAHA während der IL-2-Aktivierung hemmt die zytolytische NK-Aktivität

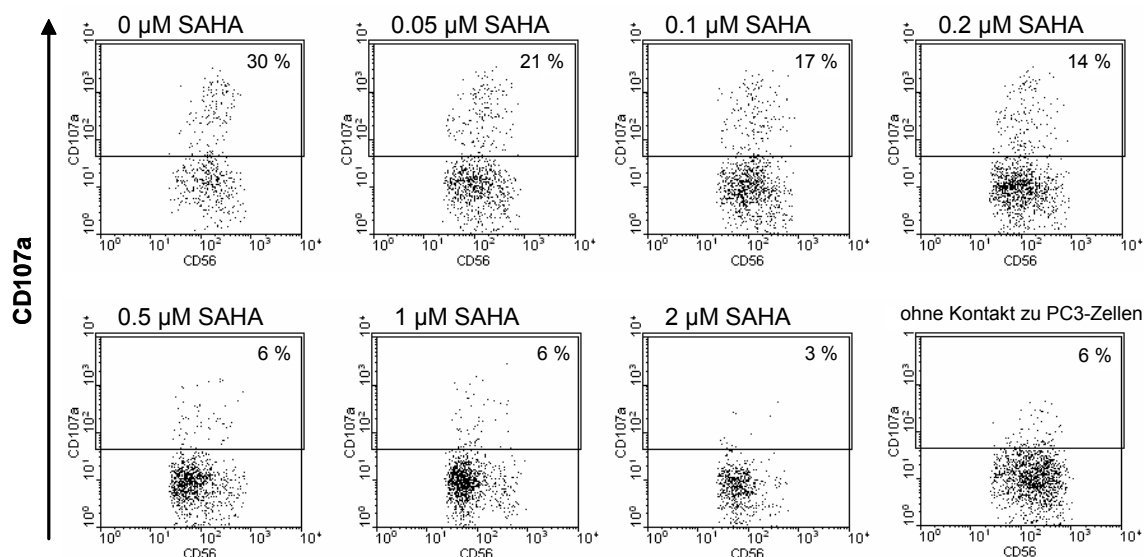
Als erstes wurde untersucht, ob PBMCs, die in Anwesenheit von SAHA mit IL-2 aktiviert wurden, weiterhin in der Lage sein würden, Tumorzellen zu töten. Dazu wurden die

PBMCs drei Tage mit IL-2 und steigenden Konzentrationen von SAHA inkubiert. Für die folgende 24-stündige Ko-Inkubation mit DAOY-Zellen wurden die Kontroll-PBMCs, die ohne SAHA aktiviert worden waren, ausgezählt und genau auf  $1 \cdot 10^5/\text{ml}$  bzw.  $1 \cdot 10^6/\text{ml}$  eingestellt. Von den übrigen PBMC-Ansätzen wurden entsprechende Volumina verwendet. Abb. 4.8 zeigt den konzentrationsabhängigen negativen Effekt von SAHA auf die IL-2-vermittelte Aktivierung der zytotoxischen Funktionen der PBMCs. Während  $1 \cdot 10^6/\text{ml}$  PBMCs, die ohne SAHA mit IL-2 aktiviert worden waren, 84 % der Tumorzellen töteten, reduzierte der Einsatz von  $0,1 \mu\text{M}$  SAHA diesen Anteil bereits auf 72 %, und  $5 \mu\text{M}$  SAHA führten dazu, daß nur noch 24 % der DAOY-Zellen getötet wurden.



**Abbildung 4.8 Anwesenheit von SAHA während der IL-2-Aktivierung beeinträchtigt das tumorlytische Potential von PBMCs.** PBMCs wurden drei Tage mit IL-2 in Anwesenheit der angegebenen SAHA-Konzentrationen aktiviert. Danach wurden DAOY-Zellen mit diesen PBMCs 24 h ko-inkubiert. Die Anzahl lebender DAOY-Zellen wurde durchflußzytometrisch ermittelt und ist dargestellt als prozentualer Anteil der Kontrollzellen, die nicht mit PBMCs ko-inkubiert worden waren. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Die einfachste Erklärung für diese Beobachtung ist ein konzentrationsabhängiger PBMC-Zelltod durch SAHA. Abb. 4.9 macht jedoch deutlich, daß SAHA darüber hinaus die Fähigkeit vitaler NK-Zellen zu degranulieren einschränkte. Dreißig Prozent der NK-Zellen, die ohne SAHA mit IL-2 aktiviert worden waren, exprimierten CD107a nach einer Ko-Kultur mit PC3-Zellen. Mit der Erhöhung der SAHA-Konzentration in der IL-2-Aktivierungskultur nahm dieser Anteil stark ab: Nur noch 3 % der NK-Zellen externalisierten CD107a nach dem Einsatz von  $2 \mu\text{M}$  SAHA.



**Abbildung 4.9** Anwesenheit von SAHA während der IL-2-Aktivierung beeinträchtigt die CD107a-Mobilisierung von NK-Zellen. Die Dotplots zeigen die CD107a-Expression auf CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-NK-Zellen. PBMCs wurden drei Tage mit IL-2 in Anwesenheit der angegebenen SAHA-Konzentrationen aktiviert. Danach wurden sie 5 h mit PC3-Zellen ko-inkubiert. In einem Kontrollansatz hatten sie keinen Kontakt zu PC3-Zellen. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

#### 4.2.2 SAHA hemmt die IL-2-induzierte PBMC-Proliferation

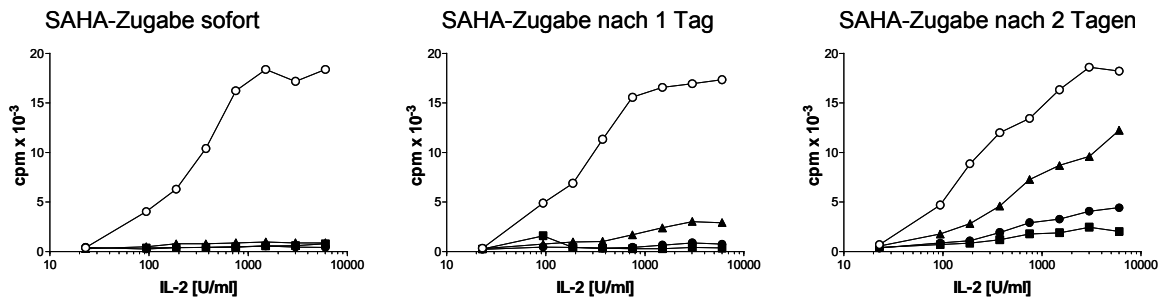
Als weiteres Maß für die IL-2-Aktivierung der PBMCs wurde ihre Proliferation untersucht. PBMCs wurden drei oder sechs Tage mit IL-2 in Anwesenheit von SAHA kultiviert. Anschließend wurde die Proliferation durch Messung des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus in die DNA quantifiziert. Wie in Abb. 4.10 zu erkennen ist, induzierte IL-2 dosisabhängig eine Proliferation der PBMCs. Wurde SAHA zu Beginn der Aktivierungskultur hinzugefügt, wurde die Proliferation vollständig inhibiert. Die SAHA-Zugabe zu späteren Zeitpunkten zeigte schwächere inhibierende Effekte. So kam es bei der dreitägigen Kultur sogar in Anwesenheit von 5 µM SAHA zu einer geringen Proliferation der PBMCs. Bei der sechstägigen Kultur fiel auf, daß die SAHA-Zugabe nach zwei Tagen eine stärkere inhibierende Wirkung hatte als bei der dreitägigen Kultur. Die Ergebnisse fielen aber ähnlich aus, wenn SAHA jeweils am letzten Tag der Kultur zugegeben wurde.

#### 4.2.3 SAHA hemmt die IL-2-induzierte Zytokinsekretion durch PBMCs

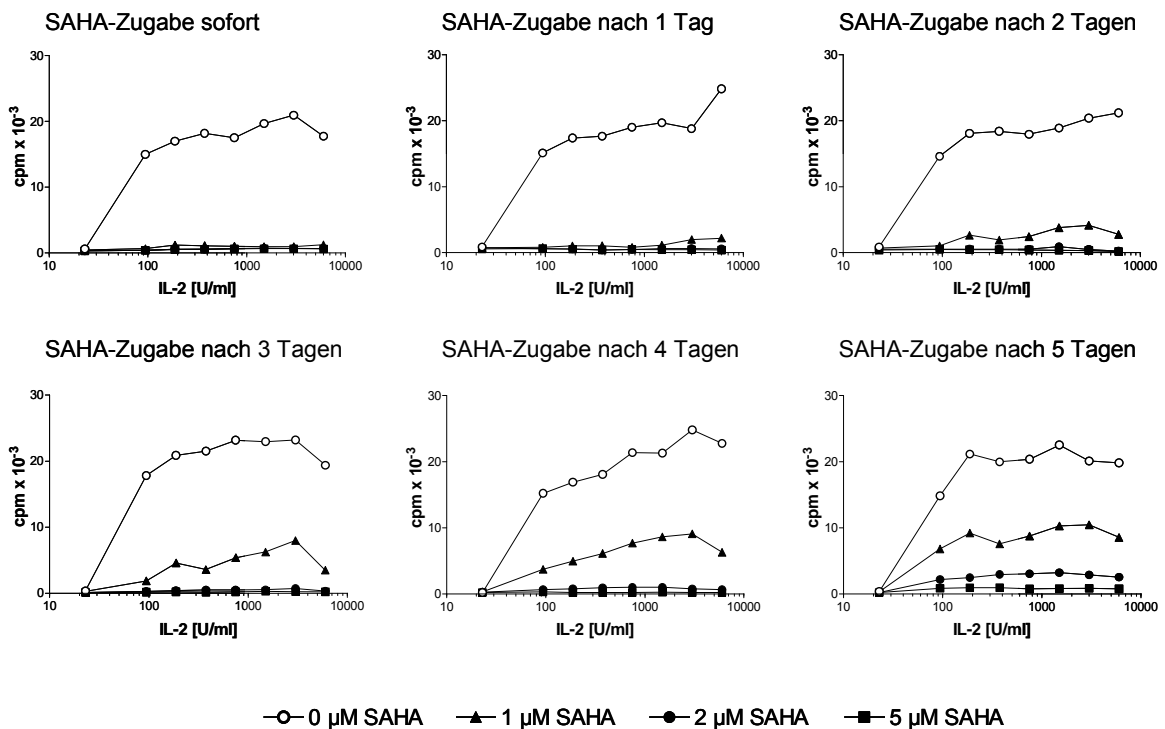
Parallel zur IL-2-induzierten Proliferation der PBMCs wurde auch ihre Zytokinsekretion in Abhängigkeit von SAHA untersucht. Eine dreitägige Inkubation der PBMCs mit 6000 U/ml IL-2 bewirkte die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und TNF im Bereich von ng/ml sowie geringerer Mengen von IL-10, IL-5 und IL-4 (Abb. 4.11). Die Zugabe von bereits 1 µM SAHA zu Beginn der Aktivierungskultur verhinderte die Sekretion von IFN- $\gamma$  und

TNF vollständig und erniedrigte die bereits schon geringe Sekretion von IL-10, IL-5 und IL-4 weiter.

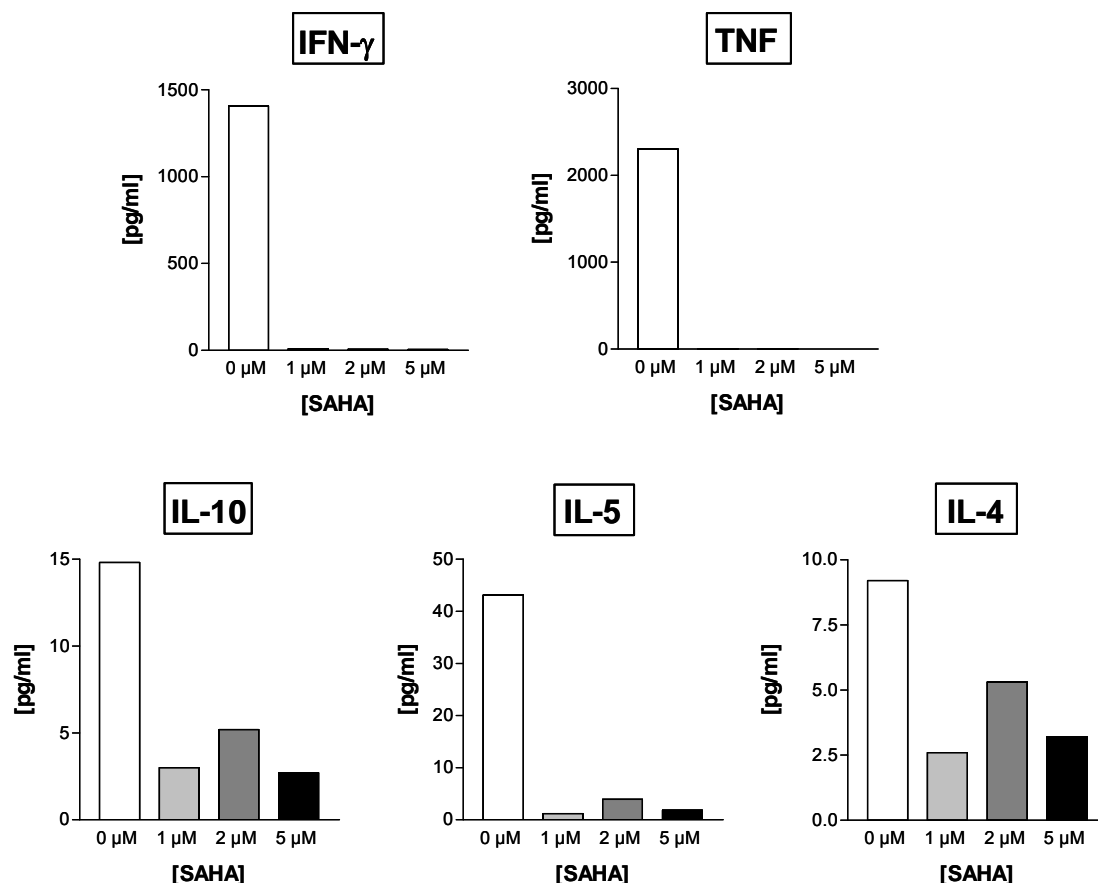
### 3-tägige Kultur



### 6-tägige Kultur



**Abbildung 4.10 SAHA hemmt die IL-2-induzierte Proliferation von PBMCs.** PBMCs wurden drei bzw. sechs Tage mit IL-2 aktiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde SAHA in unterschiedlichen Konzentrationen der Kultur zugesetzt. Als Maß für die resultierende Proliferation diente der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die Zell-DNA. Die gemessene Radioaktivität ist in cpm angegeben. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.



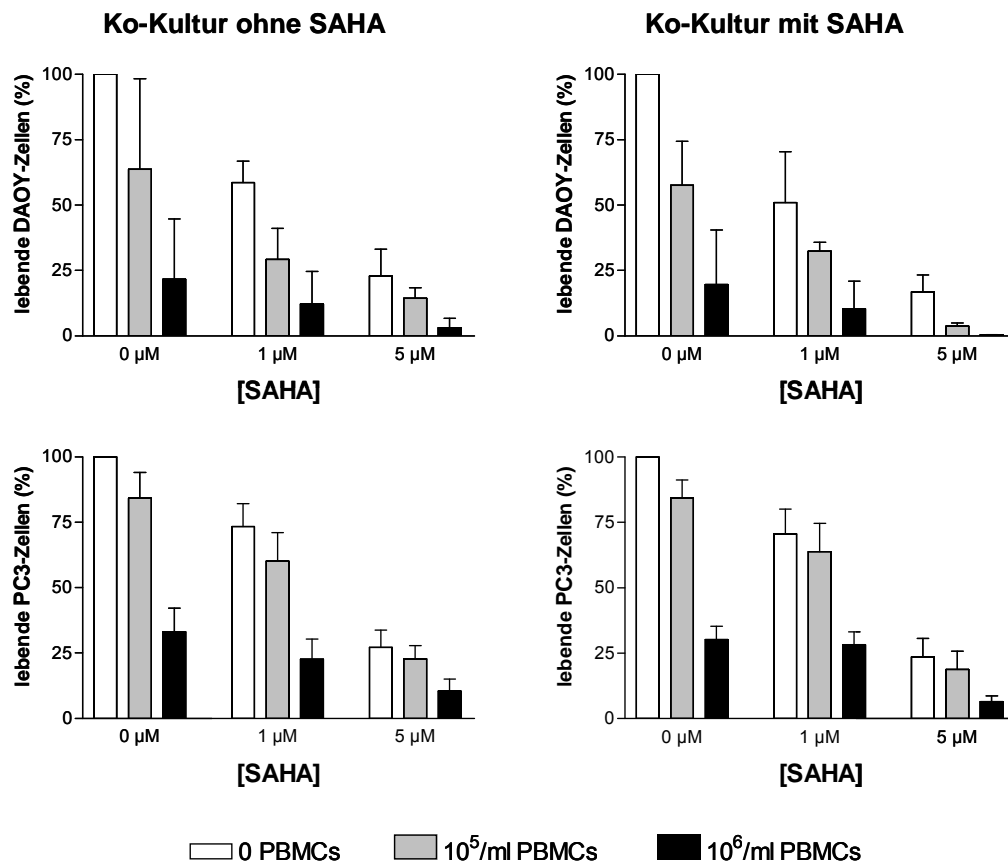
**Abbildung 4.11 SAHA hemmt die IL-2-induzierte Zytokinsekretion durch PBMCs.** PBMCs wurden drei Tage mit 6000 U/ml IL-2 und SAHA in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Zytokine wurden durchflußzytometrisch quantifiziert.

#### 4.2.4 HDIs beeinflussen nicht die Zytotoxizität IL-2-aktivierter NK-Zellen

SAHA inhibierte die IL-2-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen und hemmte ihre Fähigkeit, Tumorzellen zu töten. Allerdings wurden die Immunzellen mit zunehmender Dauer der IL-2-Aktivierung immer weniger sensitiv für die inhibierenden SAHA-Effekte. Wurden demnach die zytolytischen Effektorfunktionen von vollständig IL-2-aktivierten Immunzellen nicht mehr von HDIs beeinflusst?

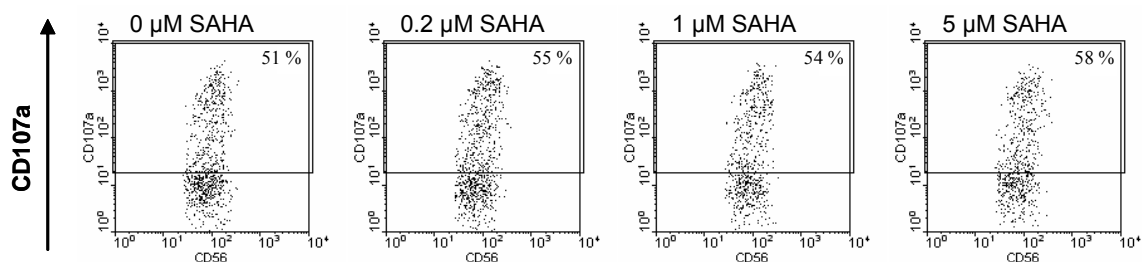
Um zu untersuchen, wie sich die Anwesenheit von HDIs auf die zytolytische Aktivität vollständig aktivierter PBMCs auswirkte, wurden in vergleichenden Ansätzen HDI-vorbehandelte Tumorzellen mit IL-2-aktivierten PBMCs entweder in Abwesenheit oder Anwesenheit des entsprechenden HDIs ko-inkubiert. Aus Abb. 4.12 wird ersichtlich, daß die Fähigkeit der aktivierten PBMCs, Tumorzellen zu töten, von der Anwesenheit von SAHA gänzlich unberührt blieb. Neben der tumortoxischen Wirkung von SAHA ist in beiden Ansätzen eine nahezu identische tumorlytische Wirkung der aktivierten PBMCs zu

erkennen. Auch der sensibilisierende Effekt von SAHA für die PBMC-Effektorfunktionen blieb bei Anwesenheit des HDI erhalten. Für NaB ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Sie finden sich im Anhang (A.3).



**Abbildung 4.12 Anwesenheit von SAHA während der Ko-Kultur von IL-2-aktivierten PBMCs und Tumorzellen beeinträchtigt das tumorlytische Potential der PBMCs nicht.** Tumorzellen wurden 24 h mit SAHA in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Danach wurden sie mit IL-2-aktivierten PBMCs 24 h ko-inkubiert. SAHA wurde dabei entweder entfernt oder verblieb in der ursprünglichen Konzentration im Kulturmedium. Die Anzahl lebender Tumorzellen wurde durchflußzytometrisch ermittelt und ist dargestellt als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis waren IL-2-aktivierte NK-Zellen trotz Anwesenheit von SAHA in der Lage, den Aktivierungsmarker CD107a als Reaktion auf den Kontakt zu Tumorzellen zu mobilisieren (Abb. 4.13). Der Anteil der CD107a<sup>+</sup>-NK-Zellen verminderte sich nicht einmal bei 5 μM SAHA in der Ko-Kultur.



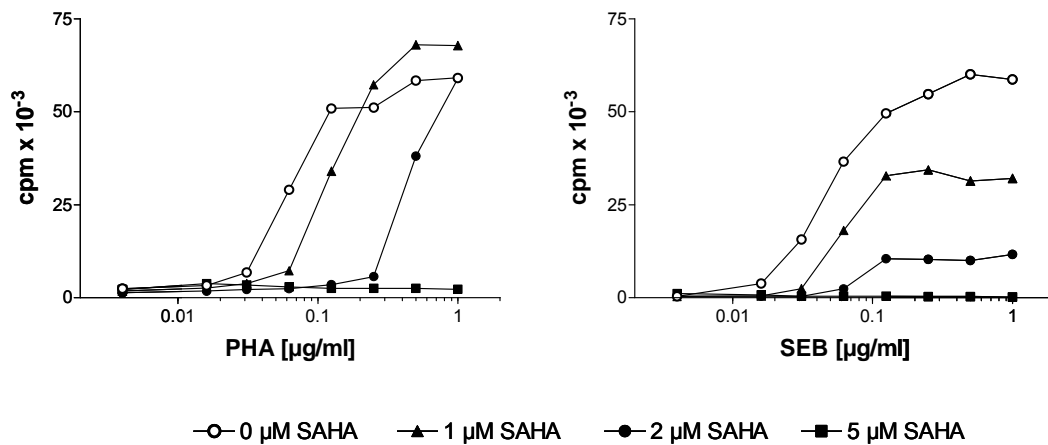
**Abbildung 4.13** Anwesenheit von SAHA während der Ko-Kultur von IL-2-aktivierten PBMCs und Tumorzellen beeinträchtigt die CD107a-Mobilisierung von NK-Zellen nicht. Die Dotplots zeigen die CD107a-Expression auf CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-NK-Zellen. IL-2-aktivierte PBMCs wurden 5 h mit PC3-Zellen in Anwesenheit der angegebenen SAHA-Konzentrationen ko-inkubiert. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

### 4.3 SAHA verhindert die polyklonale T-Zell-Aktivierung

Der zweite Teil der Arbeit wendet sich der Frage zu, ob und wie tumorlytische T-Zell-Effekte von HDIs beeinflusst werden. Hier soll zunächst geklärt werden, ob sich HDIs – ähnlich wie bei NK-Zellen – auf die Aktivierung tumorreaktiver T-Zellen in der Phase des *Primings* auswirken.

#### 4.3.1 SAHA hemmt die antigenunabhängige polyklonale T-Zell-Aktivierung

Bevor die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen untersucht wurde, sollte festgestellt werden, ob HDIs prinzipiell die T-Zell-Aktivierung beeinflussen. Dazu wurden PBMCs drei Tage entweder mit dem T-Zell-spezifischen Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) oder dem Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) stimuliert. SAHA inhibierte die PHA- und SEB-induzierte Proliferation in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration (Abb. 4.14). 5  $\mu$ M SAHA verhinderten das Immunzellwachstum vollständig, wohingegen geringere SAHA-Konzentrationen nur zu einer Verminderung führten. Bei hohen PHA-Konzentrationen zeigte SAHA keinen inhibierenden Effekt mehr.

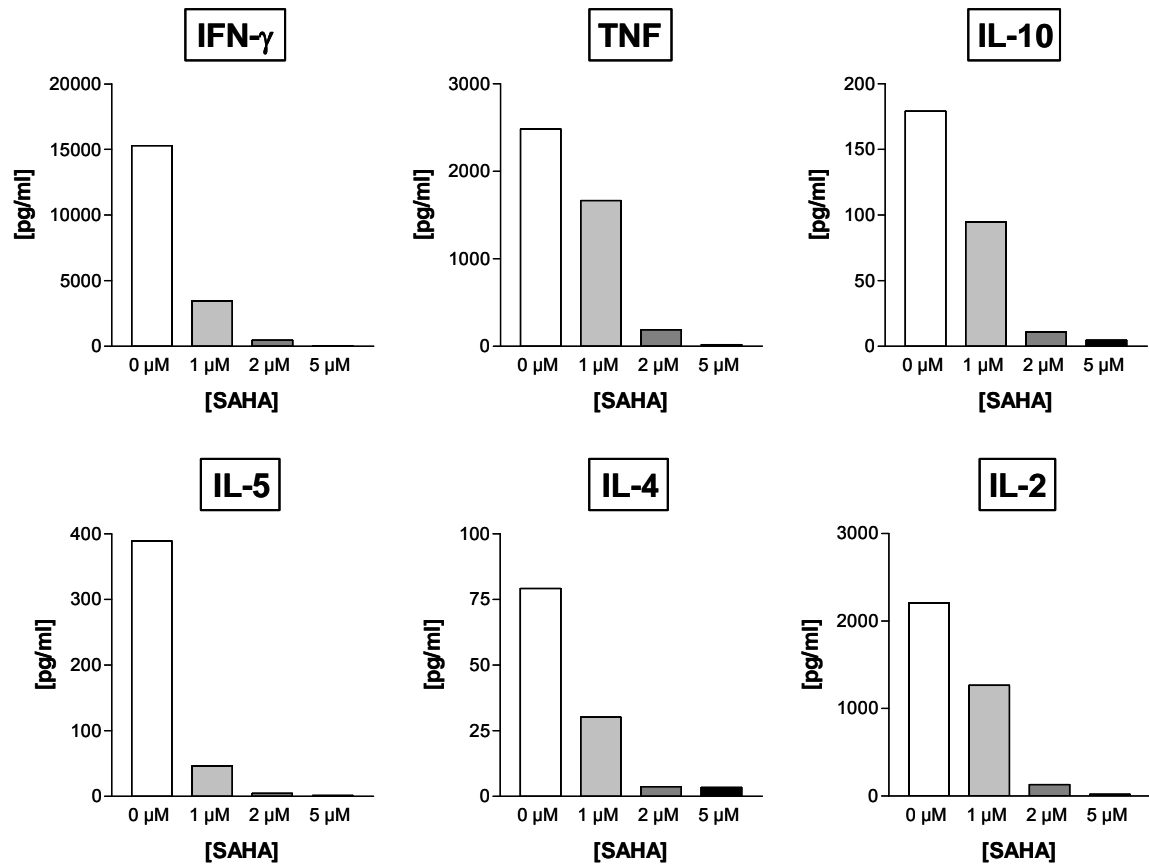


**Abbildung 4.14 SAHA hemmt die PHA- und SEB-induzierte Proliferation von PBMCs.** PBMCs wurden drei Tage mit PHA bzw. SEB und SAHA in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Als Maß für die resultierende Proliferation diente der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die Zell-DNA. Die gemessene Radioaktivität ist in cpm angegeben. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei (PHA) bzw. zwei (SEB) unabhängige Versuche.

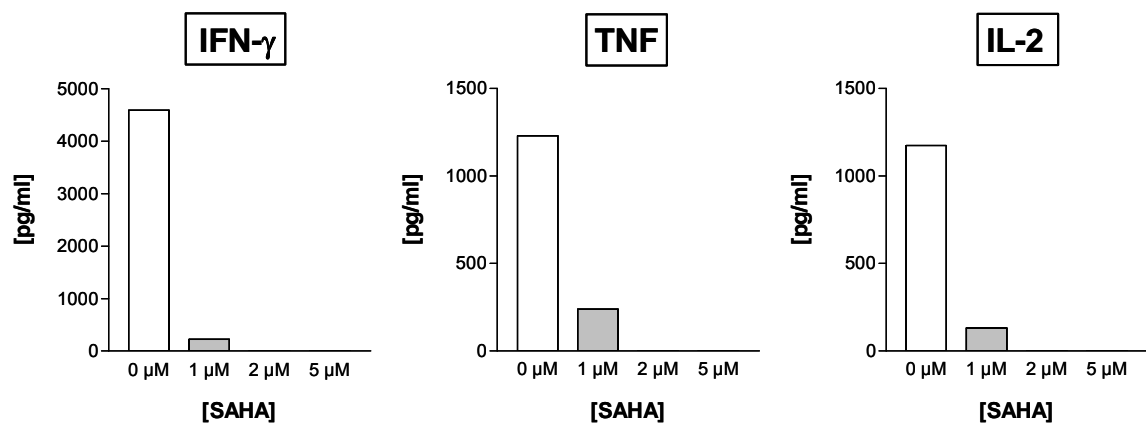
Wie schon bei der PBMC-Stimulation mit IL-2 wurde auch in den oben beschriebenen Ansätzen die Menge der sezernierten Zytokine durchflußzytometrisch bestimmt. Nach dreitägiger Inkubation mit 0,5 µg/ml PHA wurden IFN- $\gamma$ , TNF und IL-2 im Bereich von ng/ml sowie geringere Mengen von IL-10, IL-5 und IL-4 sezerniert (Abb. 4.15). 1 µg/ml SEB induzierte die Sekretion von IFN- $\gamma$ , TNF und IL-2 im ng/ml-Bereich. IL-10, IL-5 und IL-4 wurden hier nicht detektiert. Bereits 1 µM SAHA reduzierte die Zytokinausschüttung drastisch, und ab 2 µM SAHA waren diese Zytokine im Kulturüberstand kaum noch nachweisbar.



## PHA



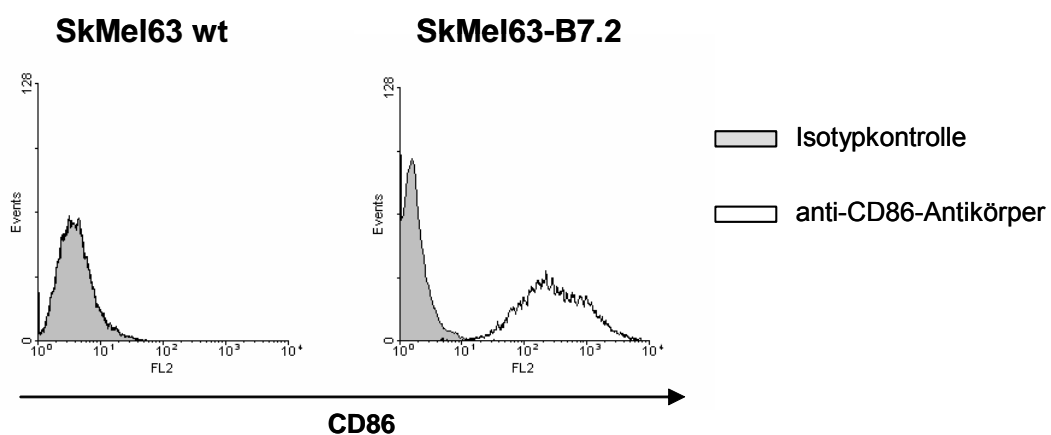
## SEB



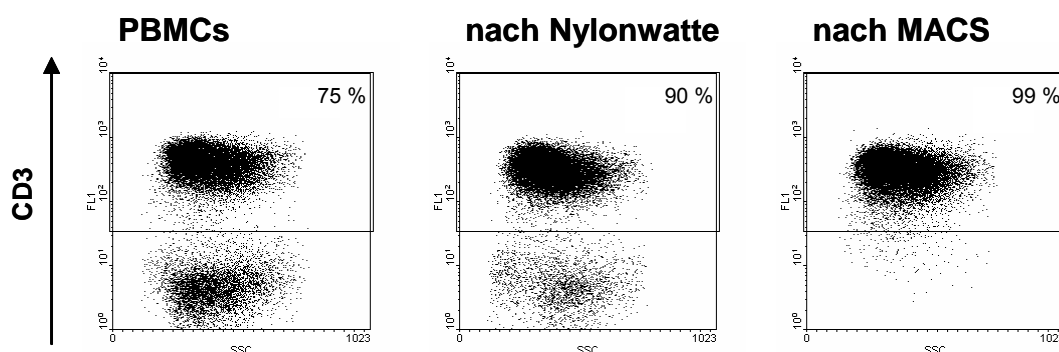
**Abbildung 4.15** SAHA hemmt die PHA- und SEB-induzierte Zytokinsekretion durch PBMCs. PBMCs wurden drei Tage mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  PHA bzw. 1  $\mu\text{g/ml}$  SEB und SAHA in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Zytokine wurden durchflußzytometrisch quantifiziert.

### 4.3.2 SAHA hemmt die antigenabhängige polyklonale T-Zell-Aktivierung

Um das Verhalten tumorspezifischer T-Zellen auf HDIs zu untersuchen, wurden allogene Spender-T-Zellen mit Hilfe der CD86-transfizierten Melanomzelllinie geprimt. SkMel63-B7.2-Zellen exprimieren neben CD86 sowohl MHC-Klasse-I-Moleküle als auch MHC-Klasse-II-Moleküle (s. auch Abb. 4.21). Bei diesem T-Zell-Priming-Modell fungierten Alloantigene als Ersatz für Tumorantigene. Abb. 4.16 zeigt, daß die SkMel63-B7.2-Zellen tatsächlich das ko-stimulierende Molekül CD86 in hoher Dichte exprimierten – eine Voraussetzung für alle folgenden Untersuchungen. Die nicht transfizierten Wildtyp-SkMel63-Zellen exprimierten CD86 nicht.



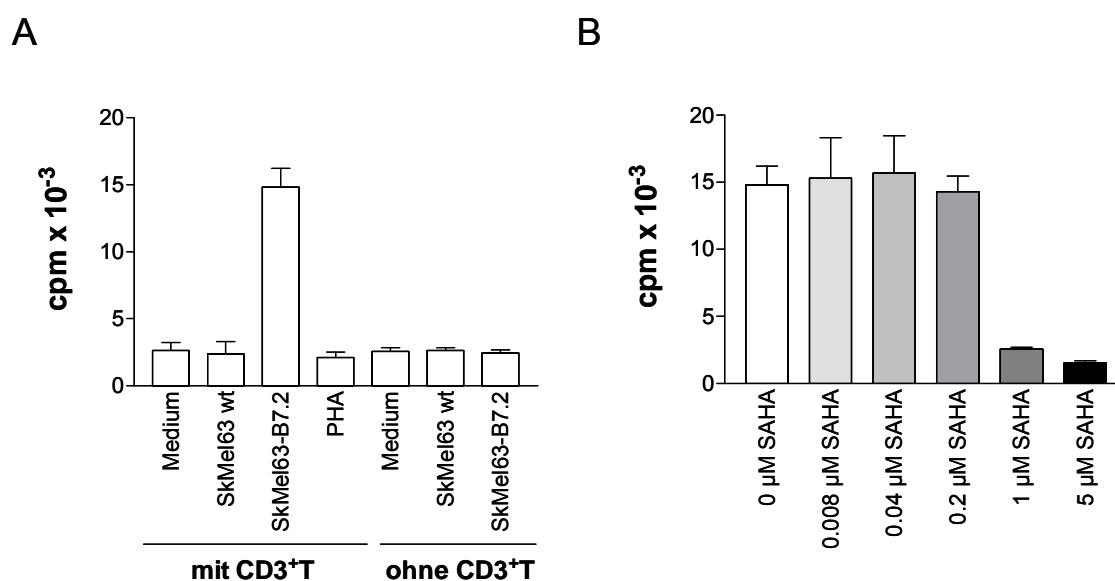
**Abbildung 4.16 SkMel63-B7.2-Zellen exprimieren CD86 in hoher Dichte.** Die CD86-Expression auf SkMel63-B7.2- und Wildtyp-SkMel63-Zellen wurde durchflußzytometrisch mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers ermittelt.



**Abbildung 4.17 Isolierte T-Zellen zeigen sehr hohe Reinheit.** Aus PBMCs wurden mit Hilfe von Nylonwatte und dem MACS-System (MicroBead-gekoppelter anti-CD3-Antikörper) CD3<sup>+</sup>-T-Zellen isoliert. Der Anteil der CD3<sup>+</sup>-Zellen an den Ausgangszellen und nach jedem Reinigungsschritt wurde durchflußzytometrisch mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers ermittelt.

Aus Spender-PBMCs wurden CD3<sup>+</sup>-T-Zellen isoliert. Ihre Reinheit wurde regelmäßig kontrolliert, und lag stets zwischen 97 % und 99 % (Abb. 4.17). Diese T-Zellen wurden sieben Tage mit Mitomycin C-inaktivierten SkMel63-B7.2-Zellen ko-kultiviert. Als Maß für ihre Aktivierung wurde der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau infolge der induzierten Proliferation bestimmt. Aus Abb. 4.18A wird ersichtlich, daß CD3<sup>+</sup>-T-Zellen nur in der Gegenwart von SkMel63-B7.2-Zellen, die über CD86 den nötigen Ko-Stimulus geben konnten, nicht jedoch durch Wildtyp-SkMel63-Zellen ohne CD86-Expression aktiviert wurden. CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, die statt mit SkMel63-Zellen mit 1 mg/ml PHA kultiviert worden waren, zeigten keine Proliferation. Mitomycin C verhinderte die Proliferation der SkMel63-Zellen vollständig.

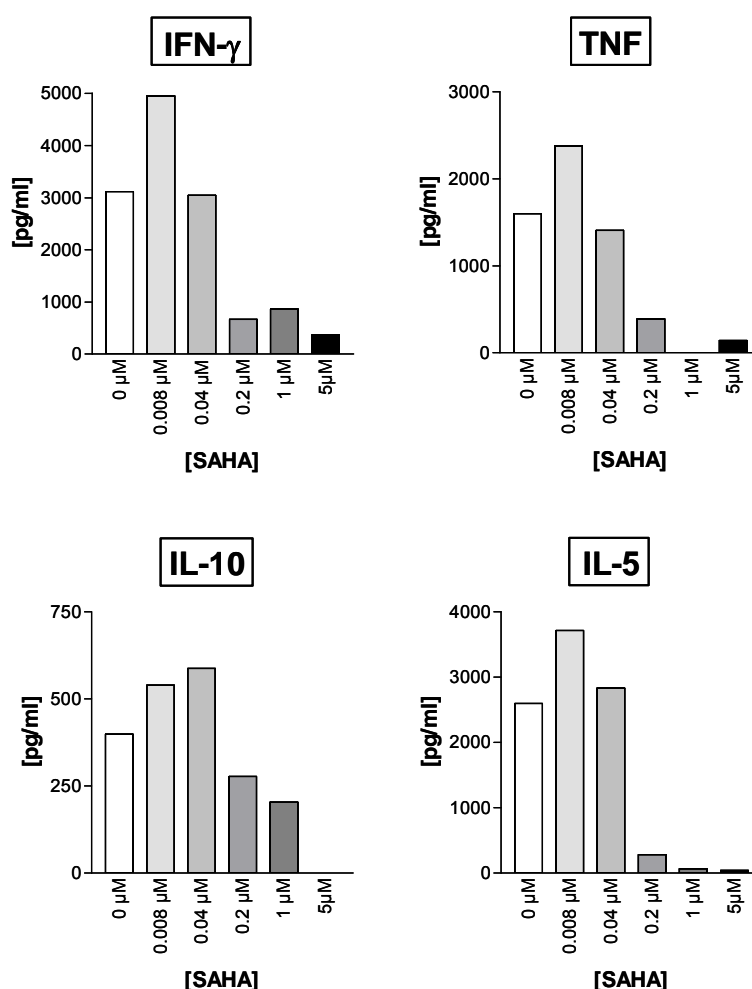
Nun wurde SAHA der Ko-Kultur von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und SkMel63-B7.2-Zellen zugesetzt, um zu untersuchen, ob T-Zellen in der Phase des Primings sensitiv auf HDIs reagierten. Konzentrationen bis 0,2 µM SAHA zeigten keinen Effekt auf die T-Zell-Proliferation (Abb. 4.18B). Hingegen wurde ab 1 µM SAHA das Wachstum der Immunzellen vollständig inhibiert.



**Abbildung 4.18** Nur SkMel63-B7.2-Zellen induzieren die Proliferation allogener CD3<sup>+</sup>-T-Zellen – SAHA wirkt inhibierend auf die Proliferationsinduktion. (A) Gereinigte CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit Wildtyp-SkMel63-Zellen, SkMel63-B7.2-Zellen, PHA oder ohne Stimulanz sieben Tage ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden SkMel63-Zellen ohne CD3<sup>+</sup>-T-Zellen kultiviert. (B) Gereinigte CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit SkMel63-B7.2-Zellen in Anwesenheit der angegebenen SAHA-Konzentrationen sieben Tage ko-kultiviert. Als Maß für die resultierende Proliferation diente der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die Zell-DNA. Die gemessene Radioaktivität ist in cpm angegeben. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die Inhibition des Primings durch SAHA spiegelte sich auch in der Menge der sezernierten T-Zell-Zytokine wider. Die Ko-Inkubation von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mit SkMel63-B7.2-Zellen bewirkte die Ausschüttung großer Mengen IFN- $\gamma$ , TNF und IL-5 sowie geringerer Mengen IL-10; IL-4 und IL-2 wurden nicht detektiert (Abb. 4.19). Durch die Zugabe von 0,008  $\mu$ M SAHA steigerte sich die Zytokinsekretion leicht, fiel ab einer SAHA-Konzentrationen von 0,2  $\mu$ M jedoch stark ab. Wurden CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mit Wildtyp-SkMel63-Zellen ko-kultiviert, kam es zu keiner Zytokinausschüttung (ohne Abb.).

Insgesamt wurde also neben der antigenunabhängigen auch die antigenabhängige T-Zell-Aktivierung negativ durch SAHA beeinflusst.



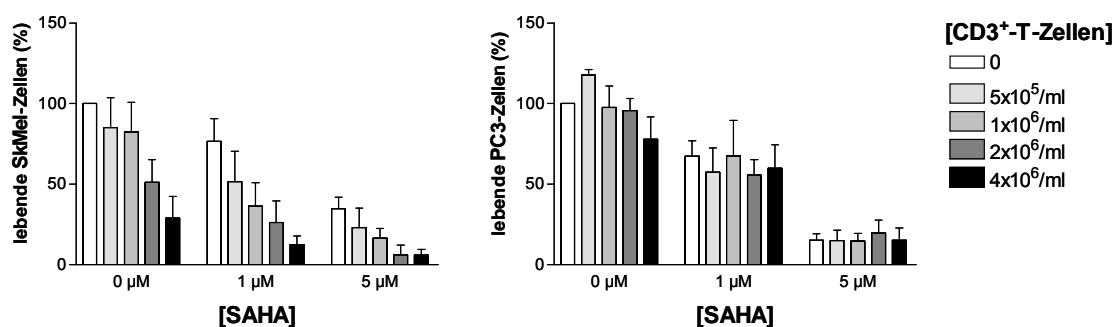
**Abbildung 4.19 SAHA hemmt die durch SkMel63-B7.2-Zellen induzierte Zytokinsekretion von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen.** Gereinigte CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit SkMel63-B7.2-Zellen in Anwesenheit der angegebenen SAHA-Konzentrationen sieben Tage ko-kultiviert. Die Zytokine wurden durchflußzytometrisch quantifiziert. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

## 4.4 SAHA sensibilisiert Tumorzellen für zytolytische Effekte aktivierter T-Zellen

Nachdem ein deutlicher Einfluß von SAHA auf T-Zellen in der Phase des Primings festgestellt worden war, sollte nun die HDI-Wirkung auf T-Zellen in der Effektorphase beleuchtet werden. Zunächst wurde ihre indirekte Wirkung untersucht: Erhöhte eine HDI-Vorbehandlung die Sensibilität von Tumorzellen für zytolytische T-Zell-Effekte?

### 4.4.1 SAHA-Vorbehandlung verstärkt die Tumorzelltodinduktion durch CD3<sup>+</sup>-T-Zellen

Da in der Effektorphase keine Ko-Stimulation durch B7-Moleküle mehr benötigt wird, konnten für die folgenden Untersuchungen Wildtypzellen als Zielzellen für aktivierte CD3<sup>+</sup>-T-Zellen eingesetzt werden. Wie in Abb. 4.20 zu erkennen ist, lysierten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, die mit den CD86 exprimierenden SkMel63-B7.2-Zellen stimuliert worden waren, Wildtyp-SkMel63-Zellen in Abhängigkeit von ihrer eingesetzten Konzentration. Die Antigen-spezifität der Effektorzellen wird dadurch deutlich, daß PC3-Zellen resistent gegen die Angriffe der mit SkMel63-B7.2-Zellen geprimten T-Zellen waren. SkMel63- und PC3-Zellen unterscheiden sich in ihrem Haplotyp: SkMel63-Zellen exprimieren z.B. HLA-A2 und HLA-A23, wohingegen PC3-Zellen die Allele HLA-A25 und HLA-A30 besitzen.



**Abbildung 4.20 SAHA sensibilisiert SkMel63-Zellen für die Zelltodinduktion durch SkMel63-spezifische T-Zellen.** SkMel63- und PC3-Zellen wurden 24 h mit SAHA in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Danach wurden sie mit SkMel63-B7.2-geprimten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen 24 h koinkubiert. Die Anzahl lebender Tumorzellen wurde durchflußzytometrisch ermittelt und ist dargestellt als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Um nun zu untersuchen, ob HDIs Tumorzellen nicht nur für die zytolytischen Effekte von IL-2-aktivierten NK-Zellen sondern auch von geprimten T-Zellen sensibilisierten, wurden die Wildtyp-SkMel63-Zellen 24 h mit SAHA vorbehandelt und dann 24 h mit den stimulierten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen ko-inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Tumorzellen durchflußzytometrisch gemessen. SAHA induzierte den Zelltod sowohl von SkMel63- als auch von PC3-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. Bei den SkMel63-Zellen fand durch die SAHA-Vorbehandlung eine Verstärkung des T-Zell-induzierten Tumorzelltods statt (Abb. 4.20). So reduzierten 5 µM SAHA die Anzahl der lebenden Wildtyp-SkMel63-Zellen um 65 %, 4·10<sup>6</sup>/ml CD3<sup>+</sup>-T-Zellen waren in ähnlichem Maße effektiv, aber nur 6 % der Tumorzellen überlebten die Kombination von SAHA und T-Zellen. Bei PC3-Zellen konnte die SAHA-Vorbehandlung die Resistenz gegen die SkMel63-B7.2-geprimten T-Zellen nicht aufheben.

Um den kombinatorischen Effekt von SAHA-Behandlung und Ko-Inkubation mit geprimten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen zu quantifizieren, wurde wieder die CI-Methode angewendet (s. Kapitel 4.1.2). In Tab. 4.2 sind die CI-Werte für die Wirkung aller untersuchten Kombinationen auf Wildtyp-SkMel63-Zellen (s. Abb. 4.20) zusammengefaßt. Sie lagen durchweg unter 0,7 und sanken bei einer Vorbehandlung der SkMel63-Zellen mit 5 µM SAHA und anschließender Ko-Inkubation mit 2·10<sup>6</sup>/ml CD3<sup>+</sup>-T-Zellen sogar auf 0,28 ab. Diese Werte deuten auf einen sehr starken Synergismus des HDI und geprimter T-Zellen hin.

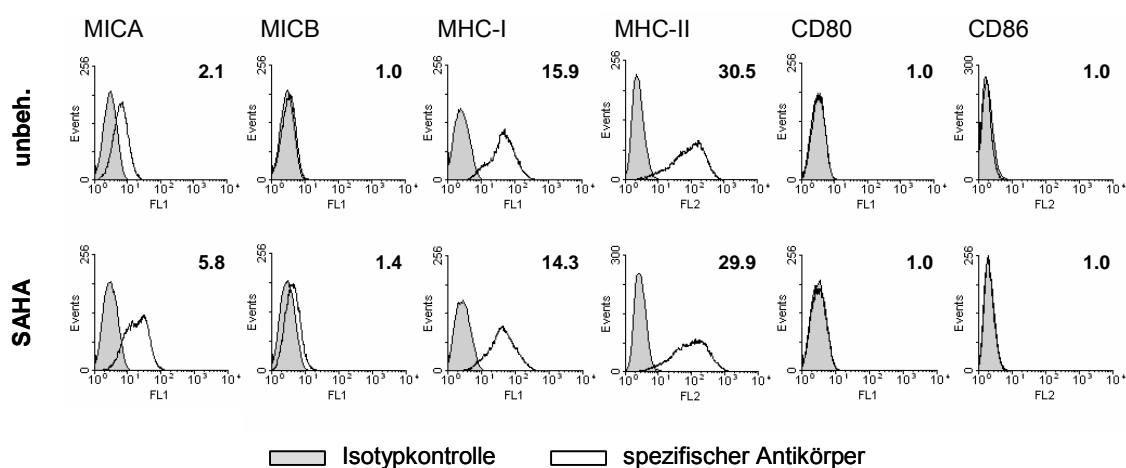
**Tabelle 4.2 CI-Werte von SAHA und geprimten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen.**

| SAHA-Konzentration | T-Zell-Konzentration (ml <sup>-1</sup> ) | CI   |
|--------------------|--|------|
| 1 µM               | 1x10 <sup>5</sup>                        | 0,60 |
|                    | 1x10 <sup>6</sup>                        | 0,51 |
|                    | 2x10 <sup>6</sup>                        | 0,56 |
|                    | 4x10 <sup>6</sup>                        | 0,50 |
| 5 µM               | 1x10 <sup>5</sup>                        | 0,70 |
|                    | 1x10 <sup>6</sup>                        | 0,55 |
|                    | 2x10 <sup>6</sup>                        | 0,28 |
|                    | 4x10 <sup>6</sup>                        | 0,39 |

CI < 1 und = 1 zeigen einen synergistischen bzw. additiven Effekt an.  $n \geq 3$ .

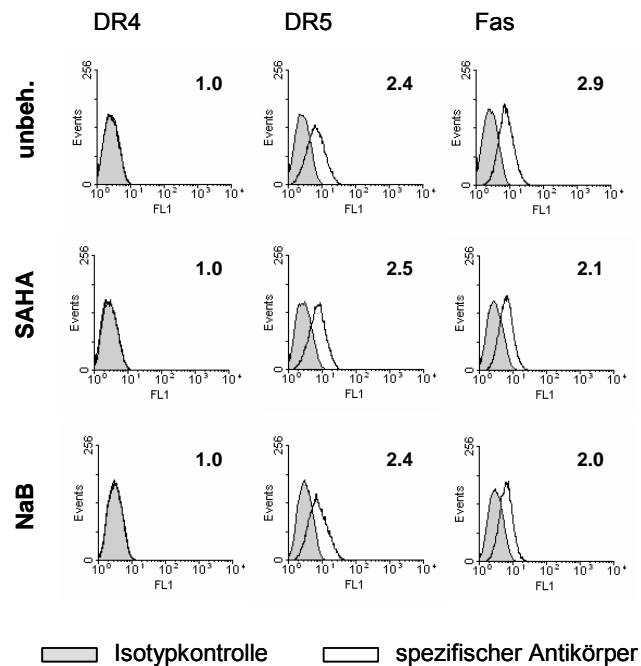
#### 4.4.2 HDIs erhöhen die Expression ko-stimulierender T-Zell-Liganden auf Tumorzellen

Eine mögliche Ursachen für die Sensibilisierung der Tumorzellen für die zytolytische Aktivität geprimter T-Zellen könnte die HDI-induzierte Expression von Oberflächenmolekülen sein, die TCR-vermittelte Signale verstärken oder die TCR-vermittelte Antigenerkennung erleichtern. Deshalb wurde die Oberflächenexpression von MIC-, MHC- und B7-Molekülen auf SkMel63-Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Es ergab sich eine hohe Grundexpression sowohl von MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Molekülen und eine niedrige Grundexpression des NKG2D-Liganden MICA (Abb. 4.21). Der NKG2D-Ligand MICB sowie die B7-Moleküle CD80 und CD86 wurden nicht detektiert. Nach SAHA- (Abb. 4.21) oder NaB- (s. Anhang A.4) Behandlung wurde MICA verstärkt exprimiert, MICB wurde leicht induziert. Die Expression der MHC-Moleküle blieb auf etwa gleich hohem Niveau. Eine Expression von CD80 und CD86 wurde nicht induziert. Die erhöhte Expression der MIC-Moleküle könnte also zur HDI-bedingten Sensibilisierung der Tumorzellen für zytolytische T-Zell-Effekte beitragen.



**Abbildung 4.21 SAHA erhöht die Oberflächenexpression von MICA und MICB, nicht aber der MHC- und B7-Moleküle auf Wildtyp-SkMel63-Zellen.** Auf unbehandelten oder 24 h mit 5  $\mu$ M SAHA vorbehandelten Wildtyp-SkMel63-Zellen wurde die Oberflächenexpression von MICA, MICB, MHC-I, MHC-II, CD80 und CD86 durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen diese Moleküle oder mit Kontrollantikörpern des entsprechenden Isotyps gefärbt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.

Der Todesrezeptor DR4 wurde weder auf unbehandelten noch auf HDI-behandelten SkMel63-Zellen exprimiert (Abb. 4.22). Die mäßige Grundexpression des Todesrezeptors DR5 wurde durch HDIs nicht beeinflusst, die von Fas wurde leicht verringert. HDIs vermittelten also keine Sensibilisierung der SkMel63-Zellen für die zugehörigen Todesliganden auf aktivierten T-Zellen.



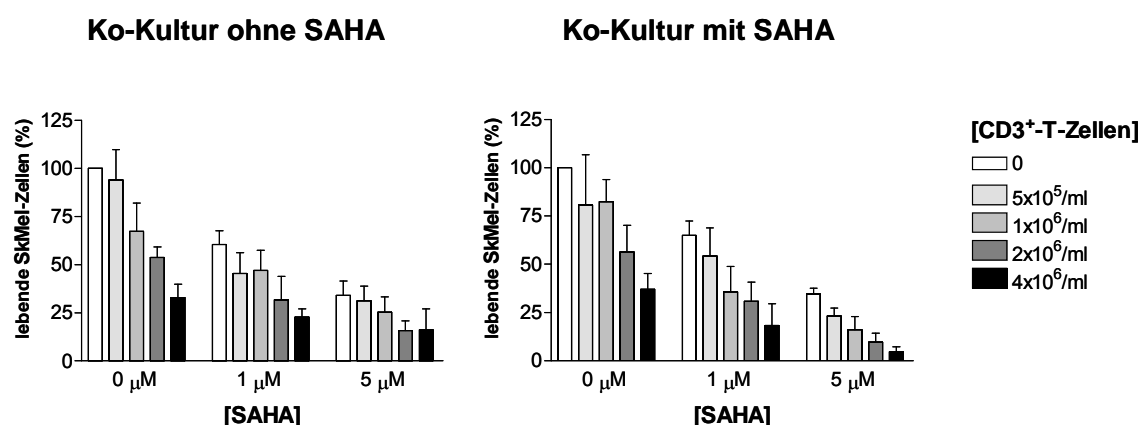
**Abbildung 4.22 HDIs erhöhen nicht die Oberflächenexpression von Todesrezeptoren auf Wildtyp-SkMel63-Zellen.** Auf unbehandelten oder 24 h mit 5  $\mu$ M SAHA oder 5 mM NaB vorbehandelten Wildtyp-SkMel63-Zellen wurde die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren DR4, DR5 und Fas durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Todesrezeptoren oder mit Kontrollantikörpern des entsprechenden Isotyps gefärbt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.



## 4.5 SAHA beeinflusst nicht die zytolytischen Effektorfunktionen tumorreaktiver T-Zellen

Abschließend wurde die direkte Wirkung des HDI SAHA auf T-Zellen in der Effektorphase untersucht. Würden  $CD3^+$ -T-Zellen – trotz Inhibition in der Phase des Primings – nach ihrer Aktivierung ähnlich vollständig IL-2-aktivierten PBMCs resistent gegen immunsuppressive Effekte von SAHA sein?

Wildtyp-SkMel63-Zellen wurden 24 h mit SAHA vorbehandelt. Um den Einfluß des HDI auf die zytolytische Aktivität der T-Zellen zu bestimmen, wurden sie danach in vergleichenden Ansätzen 24 h mit SkMel63-B7.2-geprimten  $CD3^+$ -T-Zellen entweder in Abwesenheit oder in Anwesenheit von SAHA ko-inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Tumorzellen durchflußzytometrisch gemessen. Abb. 4.23 zeigt, daß die Anwesenheit von SAHA während der Ko-Inkubation von Ziel- und Effektorzellen keine Auswirkungen auf die Tumorzelltodinduktion hatte. Die tumorlytische Aktivität der geprimten  $CD3^+$ -T-Zellen unterschied sich in beiden Ansätzen nur unwesentlich, und die sensibilisierende Wirkung von SAHA blieb auch bei Anwesenheit von SAHA erhalten.



**Abbildung 4.23** Anwesenheit von SAHA während der Ko-Kultur von geprimten T-Zellen und Tumorzellen beeinträchtigt das tumorlytische Potential der T-Zellen nicht. SkMel63-Zellen wurden 24 h mit SAHA in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Danach wurden sie mit SkMel63-B7.2-geprimten  $CD3^+$ -T-Zellen 24 h ko-inkubiert. SAHA wurde dabei entweder entfernt oder verblieb in der ursprünglichen Konzentration im Kulturmedium. Die Anzahl lebender Tumorzellen wurde durchflußzytometrisch ermittelt und ist dargestellt als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

## 5. Diskussion

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDIs) induzieren *in vitro* wie *in vivo* die Differenzierung, Zellzyklusarrest und/oder Apoptose von Tumorzellen. Ihre direkte tumortoxische Wirkung in Verbindung mit ihrer Fähigkeit, die zytotoxische Aktivität anderer Tumorthapeutika zu verstärken, bildet die Grundlage ihres Einsatzes als Anti-Tumor-Agenzien.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt HDIs auf die Tumortoxizität verschiedener aktivierter Immunzellpopulationen haben. Es wurde gezeigt, daß HDIs die Sensibilität von Tumorzellen für die zytolytischen Effekte aller untersuchten Immunzellen erheblich verstärken. Im Fall von IL-2-aktivierten PBMCs und NK-Zellen war dieser Prozeß abhängig von aktivierenden NK-Rezeptoren. Der sensibilisierenden Wirkung der HDIs stand jedoch ihr direkter Einfluß auf die Immunzellen entgegen: SAHA unterdrückte die IL-2-Aktivierung der NK-Zellen sowie das Primen zytotoxischer T-Zellen. Im Gegensatz dazu wurden NK- und T-Zellen, die in Abwesenheit von HDIs aktiviert wurden, resistent gegen deren suppressive Wirkung und zeigten später – auch in Anwesenheit der HDIs – normale zytolytische Aktivität.

### 5.1 Tumorzellyse durch NK-Zellen

#### *Lymphokin-aktivierte Killerzellen*

Der erste Teil dieser Arbeit baut auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe auf, in denen gezeigt wurde, daß HDIs unterschiedlicher Klassen die Sensibilität humaner Tumorzellen für zytolytische Effektormechanismen humaner IL-2-aktivierter PBMCs erhöhen [29, 30].

Durch Inkubation von PBMCs mit hochdosiertem IL-2 werden sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-Zellen) generiert [37]. LAK-Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber autologen wie allogenen Tumorzellen aus und umfassen sowohl CD3<sup>-</sup>-NK-Zellen als auch CD3<sup>+</sup>-T-Zellen [38]. Durch IL-2 wird die Proliferation der T-Zellen und ihre Differenzierung zu Effektorzellen gesteuert. T-Zellen, die bereits zuvor Antigenkontakt in Verbindung mit einem ko-stimulierenden Signal hatten, sind dank ihres hoch affinen IL-2-Rezeptors in der Lage, auf sehr geringe IL-2-Konzentrationen anzusprechen. Allerdings können auch ruhende T-Zellen, die nur einen mäßig affinen IL-2-Rezeptor exprimieren, auf hohe IL-2-Konzentrationen reagieren und zu Proliferation und Differenzierung angeregt werden. NK-Zellen zeigen bereits im nicht aktivierten Zustand spontane zytolytische Aktivität gegen eine Reihe von Tumorzellen. Sie antworten auf die Aktivierung mit IL-2 mit einer Steigerung ihrer Anti-Tumor-Zytotoxizität. Dies geschieht durch die Ausweitung ihrer molekularen Ausstattung, z.B. durch eine erhöhte

Expression oberflächengebundener Todesliganden wie TRAIL oder FasL [39, 40]. Durch die in dieser Arbeit angewendete Hochdosis-IL-2-Inkubation der PBMCs könnte sich demnach die Zytotoxizität sowohl von NK- als auch von T-Zellen erhöht haben.

#### *CD107a als Marker für zytolytische Aktivität*

Weil IL-2 sowohl T-Zellen als auch NK-Zellen zur Zytotoxizität stimulieren kann, galt es nun zu klären, welche Zellpopulation(en) in dem verwendeten System als Effektoren fungierten. Infolge der Erkennung einer Zielzelle setzen NK- und zytotoxische T-Zellen den Inhalt ihrer zytolytischen Granula im Bereich der immunologischen Synapse frei, um die Zielzelle zu töten. Bei diesem Prozeß gelangt auch CD107a, das sich auf der Innenseite der Vesikelmembran befindet, an die Zelloberfläche. Die Expressionsdichte von CD107a korreliert stark mit Zytokinsekretion und NK- bzw. T-Zell-vermittelter Lyse von Zielzellen [41, 42] und stellt somit einen zuverlässigen Marker für die zytolytische Aktivität von NK- und T-Zellen dar.

Wurden IL-2-aktivierte PBMCs mit Tumorzellen ko-inkubiert, zeigte sich eine starke Steigerung der CD107a-Expression auf CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-NK-Zellen. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen exprimierten CD107a hingegen nicht. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß die beobachtete PBMC-vermittelte Tumortoxizität hauptsächlich in der zytolytischen Aktivität der IL-2-aktivierten NK-Zellen begründet war. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß die NK-Zelllinie NK92C1 im untersuchten System als Effektor agieren konnte.

#### *Aktivierende NK-Rezeptoren*

Die zytolytische Aktivität von NK-Zellen wird durch das Zusammenwirken aktivierender und inhibierender NK-Rezeptoren reguliert. Um die oben vorgestellte Hypothese zu überprüfen, wurde deshalb die Abhängigkeit der PBMC-Zytotoxizität von der Funktionsfähigkeit bestimmter aktivierender NK-Rezeptoren untersucht. Dazu wurden im <sup>51</sup>Chrom-Release-Assay blockierende Antikörper gegen die wichtigsten aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D, DNAM-1 und die NCRs (NKp46, NKp44 und NKp30) eingesetzt. Die Blockade einzelner Rezeptoren führte zu einer Abnahme der Tumorzell-lyserate, und beweist damit, daß diese Rezeptoren in die Aktivierung der Effektorzellen involviert sind. Unterschiede, die im Grad der Lyseinhibition zwischen den beiden Tumorzelllinien DAOY und PC3 auftraten, spiegeln wahrscheinlich die leicht unterschiedliche Expressionsdichte der aktivierenden NK-Liganden auf diesen Tumorzellen wider. Die zytolytische Aktivität von PBMCs und polyklonalen NK-Zellen gegenüber derselben Tumorzelllinie (PC3) wurde durch die Maskierung gleicher Rezeptoren hingegen

vergleichbar stark vermindert – ein weiterer wichtiger Hinweis auf die Funktion der NK-Zellen als Effektorzellen im Gemisch der PBMCs. Wurden nun alle drei genannten Rezeptortypen maskiert, fand keine Tumorzellyse mehr statt. Alle drei aktivierenden NK-Rezeptor(typ)en NKG2D, DNAM-1 und NCRs, und nur diese drei, sind also an der Erkennung der Tumorzellen durch PBMCs beteiligt. Da die NCRs ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert werden [43], legt dieses Ergebnis nahe, daß die Tumorzellyse durch IL-2-aktivierte PBMCs hauptsächlich auf der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen beruhte.

### *Zytotoxische T-Zellen*

Zytotoxische T-Zellen spielten im untersuchten System höchstens eine marginale Rolle. Darauf weist auch die Kinetik des beobachteten Zelltods nach 24 Stunden (bzw. sogar schon nach vier Stunden im  $^{51}\text{Chrom}$ -Release-Assay) hin: Eine Differenzierung alloreaktiver  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen benötigt hingegen mehrere Tage Zeit. Eine Gedächtnisantwort gegen die Alloantigene, die in unserem System gleichzeitig die Tumorantigene darstellten, in allen Versuchen, d.h. mit T-Zellen verschiedener Blutspender, erscheint äußerst unwahrscheinlich. Für die Aktivierung naiver  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen wären außerdem T-Zell-ko-stimulierende Moleküle wie CD80 und CD86 nötig, die auf den verwendeten Tumorzellen nicht exprimiert wurden (ohne Abb.). Um zytolytische T-Zell-Effekte zu untersuchen, wurde daher ein alternatives System zur Aktivierung der Effektorzellen genutzt. Die Ergebnisse werden in den Kapiteln 5.4 f. besprochen.

## **5.2 Synergismus von HDIs und IL-2-aktivierten NK-Zellen**

### *Redundanzerhöhung der aktivierenden NK-Rezeptoren*

HDIs sensibilisierten Tumorzellen für die zytolytischen Effekte sowohl von IL-2-aktivierten NK-Zellen aus einem PBMC-Gemisch als auch von reinen NK-Zellen der NK-Zelllinie NK92C1. Auf welchen molekularen Veränderungen beruhte die Sensibilisierung? Für eine erste Annäherung an diese Frage wurde mittels  $^{51}\text{Chrom}$ -Release-Assay die Zelltodinduktion HDI-behandelter und unbehandelter Tumorzellen verglichen. Unter Verwendung blockierender Antikörper gegen NKG2D, DNAM-1 und die NCRs sollte die Bedeutung dieser aktivierenden NK-Rezeptoren für die Sensibilisierung ergründet werden. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich in zwei Aussagen zusammenfassen: Erstens führte die simultane Maskierung aller drei untersuchten Rezeptor(typ)en in beiden Fällen (SAHA-Behandlung – keine Behandlung der Tumorzellen) zu einer kompletten Inhibition

der Tumorzelllyse. Dies schließt die Möglichkeit aus, daß die Induktion alternativer aktivierender NK-Liganden auf HDI-behandelten Tumorzellen für deren Sensibilisierung verantwortlich ist. Zweitens hatte die Maskierung von nur einem oder zwei aktivierenden Rezeptoren einen deutlich geringeren protektiven Effekt, wurden die Tumorzellen mit HDIs vorbehandelt. Die HDI-Inkubation der Zielzellen verstärkte demnach das aktivierende Signal, das die Effektorzellen über jeden einzelnen aktivierenden Rezeptor erhielten. Das bedeutet, daß HDIs die Redundanz der schon zuvor involvierten aktivierenden Rezeptoren erhöhen, ohne weitere Rezeptoren in den Erkennungsprozeß der Zielzellen einzubinden.

#### *Erhöhte Expression der aktivierenden NK-Liganden*

Die wahrscheinlichste Ursache der Redundanzserhöhung der aktivierenden NK-Rezeptoren ist die HDI-induzierte Heraufregulation ihrer Liganden, wie sie für alle NKG2D- und DNAM-1-Liganden, besonders jedoch für MICA und ULBP2, beobachtet wurde. Durch die erhöhte Ligandendichte ist ein stärkeres aktivierendes Signal für NK-Zellen und dadurch eine Verstärkung ihrer zytolytischen Aktivität zu erwarten. Diese Hypothese stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein. So wurde bereits publiziert, daß die HDIs VPA und FR901228 die mRNA-Level für MICA und MICB erhöhen und die Expression dieser immunstimulierenden Moleküle auf transformierten Zellen verstärken. Die behandelten Zellen wurden dadurch sensibler für eine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität [32, 33]. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings nicht untersucht, ob die HDI-Effekte auf eine erhöhte Transkription oder eine mRNA-Stabilisierung zurückzuführen waren. Auch konnte die Expression der NCR-Liganden nicht untersucht werden. Die NCR-Liganden selbst sind bisher noch nicht identifiziert worden, und NCR-Ig-Fusionsproteine, mit denen eine Oberflächendetektion der unbekanntenen Liganden möglich gewesen wäre, standen leider nicht zur Verfügung. Eine verstärkte Expression dieser Liganden auf Tumorzellen durch HDIs ist daher nicht ausgeschlossen.

HDI induzieren in Tumorzellen einen Zellzyklusarrest. Daher wäre eine triviale Erklärung für die erhöhte MICA-Expression ein HDI-induzierter Arrest in einer bestimmten Zellzyklusphase, die durch eine hohe basale MICA-Expression gekennzeichnet ist. Eine solche Ursache ließ sich jedoch ausschließen, da MICA in allen Zellzyklusphasen gleichermaßen stark exprimiert wurde. Die detaillierte Analyse der verschiedenen Phasen zeigt außerdem, daß durch die HDI-Behandlung MICA in jeder Phase verstärkt exprimiert wird. Dieses Ergebnis impliziert, daß die beobachtete MICA-Heraufregulation nicht durch eine HDI-bedingte Zellzyklusverschiebung in den Tumorzellen hervorgerufen wurde. Vielmehr liegt hier eine echte Erhöhung der MICA-Oberflächenexpression unabhängig vom Zellzyklus vor.

### *Apoptoseinduktion*

Der nur vierstündige  $^{51}\text{Chrom}$ -Release-Assay ergab tendenziell die gleichen Ergebnisse wie der 24-stündige Ausgangstest. Allerdings war der Synergismus von HDIs und IL-2-aktivierten Effektorzellen bei der kürzeren Ko-Inkubationszeit geringer. Eine längere Ko-Inkubationszeit von Effektor- und Zielzellen wirkt sich demnach positiv auf die sensibilisierende Wirkung der HDIs aus. Dies deutet darauf hin, daß HDIs hauptsächlich die Apoptoseinduktion verstärken, einen zeitaufwendigeren Prozeß als schnelle Tötungsmechanismen wie die Lyseinduktion durch den Inhalt zytotoxischer Granula [44, 45]. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß der Anteil  $\text{CD107a}^+$ -NK-Zellen nach Ko-Inkubation mit HDI-vorbehandelten Tumorzellen nicht höher als nach Ko-Inkubation mit unbehandelten Tumorzellen ausfiel. Die verstärkte Apoptoseinduktion scheint dabei ihre Ursache nur in der bereits oben diskutierten effizienteren Erkennung der HDI-behandelten Tumorzellen durch die NK-Zellen zu haben, nicht in einer Erhöhung der Suszeptibilität der Tumorzellen für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose. In der Literatur wird daneben eine HDI-bedingte Sensibilisierung von Tumorzellen für rekombinantes TRAIL bzw. für zytolytische Effektormechanismen von Immunzellen aufgrund einer erhöhten Oberflächenexpression der Todesrezeptoren DR4, DR5 und Fas beschrieben [20, 22, 46-49]. Dies fand bei den hier verwendeten Tumorzelllinien jedoch nicht statt: Die Expression der genannten Todesrezeptoren sank nach HDI-Behandlung der Tumorzellen sogar leicht ab.

### **5.3 Direkte Wirkung von HDIs auf NK-Zellen**

Die Sensibilisierung von Tumorzellen durch HDIs für zytolytische Effekte der NK-Zellen läßt eine Kombination dieser Medikamentengruppe mit *in vitro* oder *in vivo* aktivierten Immunzellen als vielversprechende Therapiestrategie erscheinen. Folglich muß die Frage nach einer direkten Wirkung der HDIs auf Immunzellen gestellt werden. Steht der Einfluß von HDIs auf Immunzellen gar ihrer sensibilisierenden Aktivität entgegen? Die dazu durchgeführten Untersuchungen zeigten einen großen Unterschied zwischen der Wirkung von HDIs auf NK-Zellen in der Aktivierungsphase und NK-Zellen in der Effektorphase.

#### *NK-Zellen in der Aktivierungsphase*

Als erstes wurde getestet, wie eine HDI-Inkubation während der Aktivierungsphase auf das zytolytische Potential der Immunzellen auswirkt. PBMCs wurden während der gesamten dreitägigen IL-2-Aktivierung dem HDI SAHA ausgesetzt. Ihre anschließend gemessene zytolytische Aktivität nahm mit steigender SAHA-Konzentration ab, wobei bereits sehr

niedrige Konzentrationen, die noch nicht tumortoxisch wirkten, die Zelltodinduktion negativ beeinflussten. Da in den verschiedenen Ansätzen gleiche Volumina der PBMC-Aktivierungskulturen verwendet wurden, die PBMCs also nicht auf dieselbe Zelldichte eingestellt wurden, spiegeln sich darin zwei Phänomene wider. Erstens übte SAHA, zumindest im Bereich therapeutischer Konzentrationen, eine zytotoxische Wirkung auf die PBMCs aus. Dadurch kam es zu einer Verringerung vitaler PBMCs in der Aktivierungskultur in Abhängigkeit von der SAHA-Konzentration und somit zu einer Erniedrigung der E/T-Ratio bei der anschließenden Konfrontation mit den Tumorzellen. Vitalitätsfärbungen mit Trypanblau (ohne Abb.) belegten den zytotoxischen Effekt von SAHA auf die PBMCs. Dies wird durch Ogbomo et al. gestützt, die nach viertägiger Inkubation polyklonaler NK-Zellen mit IL-2 in Anwesenheit von 2  $\mu$ M SAHA 48 % Zelltod beobachteten. Allerdings waren auch bei vorliegender Arbeit selbst SAHA-Konzentrationen im mikromolaren Bereich nicht in der Lage, sämtliche NK-Zellen zu töten. Die verbliebenen vitalen NK-Zellen hatten jedoch die Fähigkeit verloren, CD107a zu mobilisieren. Zweitens inhibierte SAHA also die Aktivierung der PBMCs durch IL-2, so daß sie nur noch vermindert zytolytisch aktiv waren. Eine Verringerung des zytolytischen NK-Potentials durch HDIs wird auch von Ogbomo et al. berichtet. In ihrer Studie führten sie die Suppression der zytolytischen NK-Zellaktivität durch HDI-Inkubation während der IL-2-Aktivierung auf eine Verminderung der NKp46- und NKp30-Expression sowie auf eine Beeinträchtigung der Granulafreisetzung zurück [50].

Wurden die PBMCs in Anwesenheit von SAHA mit IL-2 aktiviert, reduzierte sich nicht nur ihre Zytotoxizität sondern auch die IL-2-induzierte PBMC-Proliferation sowie die IL-2-induzierte Sekretion verschiedener Zytokine. War SAHA ab dem Beginn der Kultur anwesend, proliferierten die Zellen überhaupt nicht. Außerdem verringerte sich die Menge aller gemessenen Zytokine, so daß von einer tatsächlichen Hemmung der NK-Funktionen, nicht von der Aktivierung einer Alternativantwort ausgegangen werden muß. Je später der HDI der PBMC-Aktivierungskultur zugesetzt wurde, desto geringer wurde die Proliferationshemmung. Zellen, die bereits eine gewisse Zeit unter dem Einfluß von IL-2 gestanden hatten, proliferierten auch in Anwesenheit von SAHA, wenn auch schwächer als in Abwesenheit des HDI. Neben der Dauer der vorangegangenen IL-2-Aktivierung war für die resultierende Proliferation auch die Dauer des Verbleibs von SAHA entscheidend. So hatte bei der sechstägigen Kultur die SAHA-Zugabe nach zwei Tagen IL-2-Aktivierung einen stärkeren hemmenden Effekt als bei der nur dreitägigen Kultur. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß der Aktivierungszustand der PBMCs entscheidend für ihre Sensibilität für die immunsuppressive HDI-Wirkung ist. Eine vollständige HDI-Resistenz ließ sich durch IL-2 jedoch nicht erreichen.

### *NK-Zellen in der Effektorphase*

Entscheidend für den therapeutischen Einsatz IL-2-aktivierter Immunzellen in Kombination mit einer HDI-Behandlung ist jedoch nicht die proliferative Kapazität der Immunzellen sondern ihr tumorlytisches Potential. Die Messungen der Tumorzellto-induktion belegen eindeutig, daß die zytolytische Aktivität vollständig IL-2-aktivierter PBMCs selbst durch hohe HDI-Konzentrationen nicht gehemmt werden kann. Bezeichnenderweise beeinflussen HDIs weder die CD107a-Mobilisation noch die Tumorzellyse, wenn die PBMCs zuvor drei Tage lang mit hochdosiertem IL-2 aktiviert worden waren. Die Sensibilität der PBMCs für suppressive HDI-Effekte hängt also tatsächlich von ihrem Aktivierungszustand ab. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß während der Zellaktivierung in Folge des IL-2-Rezeptor-Signals die regulierte Acetylierung von Transkriptionsfaktoren und Histonen notwendig ist. Dadurch wird der geregelte Ablauf von Prozessen wie dem Zellzyklus und Änderungen im Transkriptionsmuster gewährleistet. So berichteten Taplik et al., daß nach IL-2-Stimulation muriner T-Zellen die Aktivität von HATs und HDACs fein balanciert wurde [51]. Ein genomweiter Vergleich der Transkription ruhender und IL-2-aktivierter humaner NK-Zellen von Dybkaer et al. zeigt, wie IL-2 die NK-Zytotoxizität erhöhen könnte. Es fanden sich nach IL-2-Exposition eine Induktion von Molekülen der Granula- wie der Liganden-vermittelten Zytotoxizität (u.a. *Granzyme A, B, M, H, Perforin 1; FasL, TRAIL*), von Genen, die bei sekretorischen Funktionen eine Rolle spielen, außerdem eine Induktion aktivierender NK-Rezeptoren (u.a. *DNAM-1, NKp44, NKp30*) und eine Repression inhibierender NK-Rezeptoren [52]. Darüber hinaus induziert IL-2 die Expression der KIRs [53], die für den Erwerb der NK-Zell-Effektorfunktionen nötig sind. Cichocki et al. zeigten, daß bei diesem Vorgang epigenetische Mechanismen eine Rolle spielen [54]. Im Gegensatz zu den komplexen, zeitaufwendigen Abläufen der Zellaktivierung werden die zytotoxischen Mechanismen der Effektorzellen innerhalb von Minuten nach der Erkennung von Zielzellen induziert [55]. Es kommt zur Bindung bereits vorhandener Effektormoleküle und/oder Freisetzung gespeicherter Granulainhalte – epigenetische Modifikationen spielen hier keine Rolle mehr. Zu diesem Zeitpunkt können Inhibitoren epigenetischer Prozesse nicht mehr hemmend eingreifen, und Zellen in diesem Stadium sind bei der Ausübung ihrer zytolytischen Effektormechanismen resistent gegen HDIs.



## 5.4 Tumorzellinduktion durch tumorspezifische T-Zellen

### *Primen tumorspezifischer T-Zellen*

Die bisher diskutierten Ergebnisse erbrachten den Nachweis, daß HDIs Tumorzellen für die zytolytischen Effekte aktivierter NK-Zellen sensibilisieren. Nun sollte ein System etabliert werden, mit dessen Hilfe entsprechende Untersuchungen auch für zytotoxische T-Zellen möglich wären. Um die benötigten tumorspezifischen T-Effektorzellen zu generieren, wurde die CD86-transfizierte Melanomzelllinie SkMel63-B7.2 zum Primen allogener Spender-T-Zellen genutzt. Diese Tumorzelllinie exprimiert neben CD86 sowohl MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Moleküle. Rudy et al. zeigten, daß sie dadurch in der Lage ist, sowohl CD8<sup>+</sup>- als auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu aktivieren [8]. Derart geprimte T-Zellen übten zytotoxische Aktivität gegenüber nicht transfizierten Wildtyp-SkMel63-Zellen aus.

In der vorliegenden Arbeit beruhte das Primen isolierter Spender-T-Zellen methodisch auf der Dissertation von U. Speck [9]. Allerdings wurden einige Änderungen vorgenommen, um das System zu optimieren und den Gegebenheiten unseres Labors anzupassen. Da für die Inaktivierung der SkMel63-B7.2-Zellen keine  $\gamma$ -Strahlungsquelle zur Verfügung stand, wurden die Stimulatorzellen mit Mitomycin C inaktiviert. Dabei stellte sich eine 20-minütige Inkubation mit 200  $\mu$ g/ml Mitomycin C als optimal heraus, um einerseits eine weitere Proliferation der SkMel63-B7.2-Zellen zu verhindern, andererseits ihre Vitalität nicht zu sehr einzuschränken. Die Aufreinigung der T-Zellen wurde durch eine positive Selektion mittels MicroBead-gekoppelter anti-CD3-Antikörper im Anschluß an ihre Aufreinigung über die Nyloensäule verbessert. Dadurch wurde stets eine 99%ige Reinheit der T-Zellen erreicht. Die Antikörpermarkierung und Separation der Zellen beeinflussten laut Hersteller weder Vitalität noch Proliferation der Zellen [56]. So wurde garantiert, daß nur T-Zellen als Effektorzellen verwendet wurden und daß diese ausschließlich durch die SkMel63-B7.2-Zellen und nicht durch verbliebene APCs aktiviert wurden. Die Tatsache, daß eine Stimulation mit PHA – ein APC-abhängiger Prozeß – zu keiner T-Zell-Aktivierung führte, unterstreicht den hohen Reinheitsgrad der T-Zellen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von U. Speck führte auch die Anwesenheit von FCS zu keiner unspezifischen Aktivierung der T-Zellen.

### *Zytolytische Aktivität*

Ein erfolgreiches Primen der T-Zellen mit SkMel63-B7.2-Zellen deutete sich bereits durch deren starke Proliferation und Zytokinsekretion an. Anschließend wurde die zytolytische Aktivität der geprimten Immunzellen untersucht, wobei nicht transfizierte Wildtyp-SkMel63-Zellen als Zielzellen eingesetzt wurden. Die SkMel63-Zellen wurden effektiv

ohne die Notwendigkeit eines Ko-Stimulus von den T-Zellen getötet. Dieser Vorgang war TCR-abhängig: Die geprimten T-Zellen waren spezifisch für SkMel63-Alloantigene. Tumorzellen eines differierenden Haplotyps (PC3-Zellen) wurden nicht lysiert. Ob es sich bei den Effektorzellen um zytotoxische CD8<sup>+</sup>- oder CD4<sup>+</sup>-T-Zellen handelte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Allerdings erreichten Rudy et al. eine Inhibition der zytotoxischen T-Zell-Aktivität nur durch den Einsatz monoklonaler Antikörper, die gegen MHC-Klasse-I-Moleküle gerichtet waren, nicht jedoch durch anti-MHC-Klasse-II-Antikörper [8]. Somit wiesen sie nach, daß SkMel63-B7.2-Zellen MHC-Klasse-I-restringierte Alloantigen-spezifische zytotoxische T-Zellen induzierten; zytotoxische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen spielten bei den beobachteten Effekten höchstens eine untergeordnete Rolle.

### *Synergismus von HDIs und T-Zellen*

Eine Vorbehandlung mit SAHA sensibilisierte die als Zielzellen eingesetzten Wildtyp-SkMel63-Zellen für die Zelltodinduktion durch geprimte T-Zellen. Besonders die Kombination von 5 µM SAHA und T-Zell-Konzentrationen ab  $2 \cdot 10^5$ /ml zeigte einen sehr starken Synergismus. Bei der Kombination von HDIs und PBMCs/NK-Zellen wurde als eine mögliche Ursache für die Sensibilisierung die verstärkte Expression aktivierender NK-Liganden identifiziert. Im Falle der T-Zellen läßt sich ein ähnliches Szenario vorstellen: NKG2D fungiert nicht nur als aktivierender NK-Rezeptor sondern auch als ko-stimulierender Rezeptor auf T-Zellen [57] – die Heraufregulation von NKG2D-Liganden auf HDI-behandelten Tumorzellen führt somit wahrscheinlich auch zu einer Verstärkung des TCR-Signals und erklärt zumindest teilweise die erhöhte Lyse rate SAHA-behandelter Tumorzellen durch T-Zellen. Ein weiterer Mechanismus der Sensibilisierung wird durch die Arbeit von Weiser et al. nahegelegt: Sie beobachteten, daß der HDI FR91228 die DAC (5-Aza-2'-Desoxycytidin)-induzierte Expression des Cancer/Testis-Antigens NY-ESO-1 in verschiedenen Tumorzelllinien erhöhte [58]. Eine Ursache für die HDI-bedingte Verbesserung der Antigenpräsentation ist möglicherweise eine Erhöhung der Expression von Proteinen der Antigenprozessierung (z.B. TAP-1, TAP-2, LMP-2 und Tapasin), die zu einem Anstieg in der MHC-Klasse-I-Expression führt [59]. Auch im Falle der vorliegenden Untersuchungen ist eine Erhöhung der Antigenichte durch SAHA also denkbar. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichteten Pellicciotta et al. jedoch, daß der HDI Trichostatin A die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle und dadurch die Lyseinduktion der Tumorzellen durch CTLs verringerte [60]. Nicht vollständig überlappende Sets von Zielproteinen der unterschiedlichen HDIs sowie Unterschiede im Reaktionsmuster der Tumorzellen sind wahrscheinlich für diese Diskrepanzen verantwortlich.

## 5.5 Direkte Wirkung von HDIs auf T-Zellen

Die Untersuchungen der direkten Wirkung von HDIs auf NK-Zellen hatten bereits zu einem differenzierten Bild geführt, das eine Abhängigkeit der suppressiven HDI-Wirkung vom Aktivierungsstatus der Immunzellen offenbarte. Gleichmaßen sollte nun auch für tumorspezifische T-Zellen der Frage nachgegangen werden, ob und unter welchen Bedingungen HDIs deren zytolytische Funktion beeinflussen.

### *T-Zellen in der Aktivierungsphase*

Erste Versuche befaßten sich mit der antigenunabhängigen polyklonalen T-Zell-Aktivierung, ausgelöst durch das Mitogen PHA oder das Superantigen SEB. In beiden Fällen wurden die induzierte Proliferation und Zytokinsekretion bei Anwesenheit von SAHA während der Stimulation reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, daß SAHA prinzipiell in der Lage ist, die T-Zell-Aktivierung zu beeinflussen. Allerdings konnten hohe PHA-Konzentrationen – im Gegensatz zu den höchsten hier verwendeten SEB-Konzentrationen – den negativen Effekt von SAHA auf die T-Zell-Proliferation überwinden. Da PHA eine deutlich stärkere Zytokinsekretion induzierte als SEB, ist davon auszugehen, daß die gewählte Dosis PHA ein stärkeres aktivierendes Signal lieferte als SEB. Beide Beobachtungen zusammenfassend bedeutet dies, daß die Stärke des T-Zell-aktivierenden Signals mitbestimmend für das Ausmaß der HDI-bedingten Suppression ist. Hier bietet sich eine mögliche Erklärung für Widersprüche in der Literatur. So berichteten Skov et al. von einer Inhibition der aktivierungsinduzierten T-Zell-Proliferation durch den HDI FR901228 sogar noch 24 Stunden nach Beginn der Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern [61]. Hingegen beobachteten Tao et al. eine ungehinderte Proliferation isolierter T-Zellen aus Trichostatin-A-behandelten Mäusen als Reaktion auf ihre Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern und bestrahlten APCs [62].

Um der klinischen Situation näher zu kommen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Einfluß von SAHA auf die Primingphase tumorspezifischer T-Zellen untersucht. Dazu wurde wieder das in Kapitel 5.4 diskutierte Primingmodell verwendet. Tumortoxische SAHA-Konzentrationen (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) hemmten diese antigenabhängige polyklonale T-Zell-Aktivierung komplett, wie aus der stark verminderten Proliferation und Zytokinsekretion ersichtlich wird. Der Kontakt mit den ko-stimulierenden SkMel63-B7.2-Zellen liefert den T-Zellen demnach nur ein mäßig starkes Aktivierungssignal, das zwar zur Differenzierung tumortoxischer Effektorzellen führt, jedoch keine Resistenz gegen suppressive HDI-Effekte verleiht. Ob die Inkubation der T-Zellen während der Primingphase mit SAHA nur zu einer Inhibition der T-Zell-Aktivierung oder auch zum T-Zelltod führte, wurde nicht untersucht. Doch obwohl eine Induktion von T-Zelltod nicht ausgeschlossen werden kann [63], deutet die Beobachtung, daß ähnliche SAHA-

Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ ) die PHA-induzierte Proliferation nicht hemmten, eher auf eine Blockade der Tumorzell-induzierten Proliferation lebender T-Zellen hin. Skov et al. zeigten überdies, daß die FR901228- und Trichostatin-A-vermittelte Inhibition von PBL- und  $\text{CD4}^+$ -T-Zell-Proliferation keine Folge einer Erniedrigung der Zellvitalität war [61]. Vielmehr verhinderten in dieser Studie HDIs die charakteristische Aggregation der T-Zellen nach Aktivierung, verbunden mit einer verminderten aktivierungsinduzierten Expression von CD25, CD154 (CD40L) und von Adhäsionsmolekülen. Auf molekularer Ebene scheinen hierbei die HDI-vermittelte Inhibition der c-Myc-Expression sowie die Inhibition der Translokation von NF- $\kappa\text{B}$  in den Zellkern von Bedeutung zu sein [63]. HDIs greifen außerdem bereits ganz zu Anfang in die TCR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen ein: Sie inhibieren die HDAC6, die aufgrund ihrer Tubulin-acetylierenden Funktion eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung der immunologischen Synapse spielt [64] und schwächen die TCR-Signaltransduktion durch ihre negative Wirkung auf die Expression der Transmittermoleküle ZAP-70, LAT und SLP-76 [65]. Weiterhin könnte die beobachtete Inhibition der T-Zell-Aktivierung zum Teil auch auf die Aktivität von Tregs zurückzuführen sein, deren suppressive Funktion durch HDIs erhöht wird [62, 66], so daß von einem Zusammenwirken direkter und indirekter suppressiver HDI-Effekte ausgegangen werden muß. Infolge all dieser Mechanismen kommt es nach der Konfrontation von T-Zellen mit ihrem Antigen in Anwesenheit von HDIs zur Induktion von Anergie [67, 68]. Diese antigenspezifische Nicht-Reaktivität und das generell antiinflammatorische Milieu lassen HDIs daher auch als mögliche Basis für eine Behandlung systemischer Entzündungen [69, 70] und generalisierter Autoimmunerkrankungen [71] sowie zur Reduktion der *graft-versus-host disease* [72-74] erscheinen.

#### *T-Zellen in der Effektorphase*

In starkem Kontrast zu der inhibierenden Wirkung, die HDIs auf die Primingphase der T-Zellen ausüben, steht die offensichtliche Resistenz bereits aktivierter T-Zellen gegenüber HDIs. Im direkten Vergleich wurden keine Unterschiede der zytolytischen Aktivität tumorreaktiver T-Zellen in An- oder Abwesenheit von SAHA festgestellt. Das in diesem Punkt übereinstimmende Verhalten geprimter T-Zellen und IL-2-aktivierter PBMCs unterstreicht daher die Unabhängigkeit rasch induzierter zytolytischer Mechanismen von epigenetischen Modifikationen. Darüber hinaus schließen die Ergebnisse auch eine zytotoxische Wirkung der HDIs auf aktivierte Immunzellen aus. Dies ließe sich durch eine Verschiebung der Balance pro- und anti-apoptotischer Moleküle infolge der Aktivierung erklären. Sowohl für T- als auch für NK-Zellen wurde die aktivierungsinduzierte Heraufregulation anti-apoptotischer Moleküle als Folge eines TCR- oder Mitogenstimulus bzw. nach Zytokinexposition beschrieben [75-77].

## 5.6 Therapeutische Relevanz der Ergebnisse

HDIs haben in zahlreichen *in vitro*-Studien seit über 20 Jahren ihr großes tumortoxisches Potential unter Beweis gestellt. Obwohl die Aktivität vieler natürlich vorkommender HDIs auf biochemischem Wege verbessert wurde und stetig neue HDIs synthetisiert werden, ist bisher jedoch mit SAHA erst ein einziger HDI für die Patientenbehandlung zugelassen. Tatsächlich haben fast alle klinischen Studien positive Effekte dieser Substanzen verzeichnet, doch gleichzeitig rufen viele HDIs auch – je nach Dosis mehr oder minder starke – Nebenwirkungen (hauptsächlich Müdigkeit, Übelkeit und Erbrechen sowie Störungen des Elektrolythaushaltes) hervor [16, 78-80]. Eine Erfolg versprechende Strategie, die Effektivität der HDIs zu steigern und Nebenwirkungen durch eine Dosiserniedrigung zu senken, ist ihr kombinierter Einsatz mit anderen Tumorthapeutika. Doch auch hier ist Vorsicht geboten, da möglicherweise erst die Kombination der Medikamente Nebenwirkungen zutage treten läßt.

Die Einbindung des Immunsystems in die medikamentöse Behandlung von Tumoren könnte möglicherweise eine Dosiserniedrigung der Therapeutika erlauben und die Gefahr von Nebenwirkungen vermindern. Die starke immunsuppressive Wirkung der meisten Tumorthapeutika ist auch aus diesem Grund problematisch. Wie läßt sie sich möglichst gering halten? Die Ergebnisse dieser Arbeit haben *in vitro* einen starken Synergismus von HDIs und aktivierten Immunzellen bezüglich der Tumorzelltodinduktion gezeigt. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß auch *in vivo* Effektorfunktionen des Immunsystems zum therapeutischen Erfolg der HDIs beitragen. Als naheliegende Strategie folgt daraus, die Effektivität einer HDI-Therapie von Tumorpatienten durch eine zusätzliche immunstimulierende Behandlung zu steigern. Durch die Untersuchungen zur direkten Wirkung der HDIs auf Immunzellen wurde in dieser Arbeit jedoch deutlich, daß die einzelnen Schritte einer solchen Kombinationstherapie (einerseits die Aktivierung des Immunsystems bzw. einzelner Zellpopulationen, andererseits die Gabe des HDI) exakt aufeinander abgestimmt werden müssen, um ihre Effektivität zu gewährleisten. Um mögliche immunmodulatorische Effekte der HDIs zu umgehen, sind daher zwei Ansätze denkbar, bei denen die Immunzellaktivierung von der HDI-Wirkung entweder räumlich oder zeitlich getrennt wird. So ließe sich zum Beispiel eine HDI-Behandlung der Tumorpatienten mit einem adoptiven Transfer *in vitro* aktivierter zytotoxischer Immunzellen kombinieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß hier sowohl aktivierte NK-Zellen als auch geprimte zytotoxische T-Zellen eingesetzt werden könnten. Allerdings ist der Transfer allogener geprimter T-Zellen mit einem hohen *graft-versus-host-disease*-Risiko verbunden, so daß der Einsatz aktivierter NK-Zellen die sicherere Alternative darstellt [5]. Der zweite Ansatz würde aus einer vorausgehenden Immunstimulation der Tumorpatienten und einer nachfolgenden HDI-vermittelten Sensibilisierung der Tumorzellen für die Angriffe des

patienteneigenen Immunsystems bestehen. Die klinische Herausforderung einer solchen sequentiellen Therapie liegt in der *in vivo*-Immunstimulation, die zu einer ausreichend starken Aktivierung der zytotoxischen Immunzellen geführt haben muß, bevor die HDI-Gabe erfolgt. So könnten suppressive HDI-Effekte ausgeschlossen bzw. minimiert werden. Eine viel diskutierte und untersuchte Möglichkeit, besonders NK-Zellen *in vivo* zu aktivieren und zu expandieren, ist die Verabreichung von Zytokinen (z.B. IL-2 und/oder IL-15), hämatopoietischen Wachstumsfaktoren und/oder immunmodulatorischen Medikamenten [5, 81, 82]. In ihrer Übersichtsarbeit schlagen Zitvogel et al. darüber hinaus sehr detailliert eine sechsstufige Immunchemotherapie vor, die u.a. eine Suppression der tumorinduzierten Toleranzmechanismen (z.B. durch anti-CTLA-4, anti-IL-10, Cyclophosphamid) und die Induktion einer aktiven (T- und B-Zell-basierten) Immunantwort durch Tumorstoffen beinhaltet [15].

Bisher haben sich nur wenige klinische Studien mit einer Kombination aus konventioneller Chemotherapie und Anti-Tumor-Vakzinierung und/oder immunstimulierender Behandlung befaßt [15]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen dazu motivieren, therapeutische Strategien in dieser Richtung verstärkt zu verfolgen, und geben Anlaß zu der Hoffnung, daß besonders die Gruppe der HDIs unter Einbindung des Immunsystems Erfolge in der Bekämpfung von Tumoren bringen wird.

## 6. Zusammenfassung

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDIs) bilden eine Gruppe relativ neuer vielversprechender anti-neoplastischer Wirkstoffe. Sie hemmen die Funktion der Histondeacetylasen und greifen somit in die Regulation der genomweiten Transkription ein. HDIs besitzen direkte tumortoxische Wirkung, lassen nicht transformierte Zellen jedoch weitgehend unbeeinflusst. Darüber hinaus verstärken sie die zytotoxischen Aktivitäten einer Vielzahl anderer Tumorthapeutika und sensibilisieren Tumorzellen für die zytolytischen Effekte aktivierter NK-Zellen. Die Einbindung des Immunsystems in die Tumorthherapie wirft jedoch die Frage nach einer direkten, möglicherweise hemmenden Wirkung der HDIs auf Immunzellen auf.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welcher Mechanismus dem Synergismus von HDIs und aktivierten NK-Zellen zugrunde liegt, ob HDIs Tumorzellen auch für die zytolytischen Effekte tumorspezifischer T-Zellen sensibilisieren und welche direkte Wirkung HDIs auf Immunzellen ausüben. Alle Arbeiten wurden *in vitro* mit humanen Zellen/Zelllinien durchgeführt. Als HDIs kamen SAHA und NaB zum Einsatz.

Aufbauend auf ein bereits etabliertes *in-vitro*-Testsystem, wurde gezeigt, daß nach IL-2-Aktivierung von PBMCs im wesentlichen NK-Zellen Tumorzelltod induzierten. Dabei war die Funktionsfähigkeit der aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D, DNAM-1 und der NCRs kritisch für Erkennung und Lyse der Tumorzellen, wie der Einsatz blockierender Antikörper deutlich machte. Sowohl bei unbehandelten als auch bei HDI-behandelten Tumorzellen führte die Maskierung all dieser Rezeptoren zu einer vollständigen Inhibition der Tumorzellyse, d.h. die Induktion alternativer aktivierender NK-Liganden durch HDIs wurde ausgeschlossen. Wurden nur ein oder zwei aktivierende Rezeptoren maskiert, ergab sich hingegen ein Unterschied zwischen unbehandelten und HDI-behandelten Tumorzellen: Der protektive Effekt der Maskierung fiel bei HDI-behandelten Tumorzellen deutlich geringer aus. HDIs erhöhen also die Redundanz der schon zuvor involvierten aktivierenden NK-Rezeptoren. Oberflächenfärbungen legten nahe, daß diese Redundanz-erhöhung – und somit die Sensibilisierung der Tumorzellen – auf die HDI-induzierte Heraufregulation aktivierender NK-Liganden auf Tumorzellen zurückzuführen ist. Ein Einfluß der HDIs auf die Expression der Todesrezeptoren Fas, DR4 und DR5 wurde ausgeschlossen.

Um die Untersuchungen auf das Zusammenwirken von HDIs und zytotoxischen T-Zellen auszuweiten, wurde ein Primingsystem zur Generation tumorspezifischer T-Effektorzellen etabliert. Allogene Spender-T-Zellen wurden mit Hilfe CD86-transfizierter Zellen der Melanomzelllinie SkMel63 geprimt, d.h. in diesem System dienten Alloantigene als Ersatz

für Tumorantigene. Starke T-Zellproliferation und die Sekretion T-Zell-spezifischer Zytokine zeigten ein erfolgreiches Priming der T-Zellen an. Geprimte tumorspezifische T-Zellen lysierten Wildtyp-SkMel63-Zellen effektiv ohne die Notwendigkeit eines Ko-Stimulus. Die Vorbehandlung mit SAHA sensibilisierte die SkMel63-Zellen für die Zelltodinduktion durch T-Zellen. Eine mögliche Ursache für den Synergismus könnte auch hier die verstärkte Expression der NKG2D-Liganden sein, da NKG2D auf T-Zellen als kostimulierender Rezeptor fungiert.

Da funktionsfähige Immunzellen eine Voraussetzung für die beschriebenen sensibilisierenden HDI-Effekte sind, wurde auch die direkte Wirkung der HDIs auf NK- und T-Zellen untersucht. Tumortoxische Konzentrationen von SAHA verhinderten ihre aktivierungsinduzierte Proliferation und Zytokinsekretion, beeinträchtigten die CD107a-Mobilisierung und hemmten die zytolytische Aktivität der Immunzellen. Diese Beobachtungen spiegeln zwei Phänomene wider: Erstens übt SAHA eine zytotoxische Wirkung auf die Immunzellen aus, und zweitens inhibiert SAHA die IL-2-Aktivierung von NK-Zellen sowie das Priming tumorspezifischer T-Zellen. In starkem Gegensatz dazu wurden NK- und T-Zellen, die in Abwesenheit von HDIs aktiviert wurden, resistent gegen deren zytotoxische und immunsuppressive Wirkung und zeigten später – auch in Anwesenheit hoher HDI-Konzentrationen – normale zytolytische Aktivität. Die Sensibilität von NK- und T-Zellen für suppressive HDI-Effekte hängt also von ihrem Aktivierungszustand ab, und nur vollständig aktivierte Immunzellen sind resistent gegen HDIs.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein großes therapeutisches Potential der Kombination von HDIs und immunstimulierender Behandlung auf. Als eine vielversprechende therapeutische Strategie erscheint daher ein sequentieller Ansatz, bestehend aus der Immunstimulation der Tumorpatienten gefolgt von der HDI-vermittelten Sensibilisierung der Tumorzellen für die Angriffe des patienteneigenen Immunsystems.



## Literaturverzeichnis

1. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. 22(11): p. 633-40.
2. Moretta, L., et al., *Surface NK receptors and their ligands on tumor cells*. Seminars in Immunology, 2006. 18(3): p. 151-8.
3. Kärre, K., *NK cells, MHC class I molecules and the missing self*. Scand J Immunol, 2002. 55(3): p. 221-8.
4. Moretta, L. and A. Moretta, *Killer immunoglobulin-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2004. 16(5): p. 626-33.
5. Ljunggren, H.-G. and K.-J. Malmberg, *Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(5): p. 329-39.
6. Ghiringhelli, F., et al., *The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression*. Immunol Rev, 2006. 214: p. 229-38.
7. Crow, M.K., *Modification of accessory molecule signaling*. Springer Semin Immunopathol, 2006. 27(4): p. 409-24.
8. Rudy, W., et al., *Differential function of CD80- and CD86-transfected human melanoma cells in the presence of IL-12 and IFN-g*. International Immunology, 1997. 9(6): p. 853-60.
9. Speck, U., *Beeinflussung antigenspezifischer humaner T-Zellen durch die Blockade von CD152 (CTLA-4)*, in *Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Immunologie*. 2002, Universität Hamburg: Hamburg.
10. Fraser, J.D. and T. Proft, *The bacterial superantigen and superantigen-like proteins*. Immunol Rev, 2008. 225: p. 226-43.
11. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(1): p. 24-37.
12. Swann, J.B. and M.J. Smyth, *Immune surveillance of tumors*. J Clin Invest, 2007. 117(5): p. 1137-46.
13. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(10): p. 715-27.
14. Zitvogel, L., et al., *Immunological aspects of cancer chemotherapy*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(1): p. 59-73.
15. Zitvogel, L., et al., *The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?* J Clin Invest, 2008. 118(6): p. 1991-2001.
16. Riester, D., C. Hildmann, and A. Schwienhorst, *Histone deacetylase inhibitors--turning epigenic mechanisms of gene regulation into tools of therapeutic intervention in malignant and other diseases*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. 75(3): p. 499-514.
17. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: A landscape takes shape*. Cell, 2007. 128: p. 635-8.

18. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. 128: p. 693-703.
19. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. 429(6990): p. 457-63.
20. Xu, W.S., R.B. Parmigiani, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action*. Oncogene, 2007. 26(37): p. 5541-52.
21. Glaser, K.B., *HDAC inhibitors: Clinical update and mechanism-based potential*. Biochem Pharmacol, 2007. 74(5): p. 659-71.
22. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(9): p. 769-84.
23. Nolan, L., et al., *Will histone deacetylase inhibitors require combination with other agents to fulfil their therapeutic potential?* Br J Cancer, 2008. 99(5): p. 689-94.
24. Peart, M.J., et al., *Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(10): p. 3697-702.
25. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet, 2005. 37(4): p. 391-400.
26. Johnstone, R.W., *Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2002. 1(3): p. 287-99.
27. Carew, J.S., F.J. Giles, and S.T. Nawrocki, *Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy*. Cancer Lett, 2008. 269(1): p. 7-17.
28. Marks, P.A. and R. Breslow, *Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug*. Nat Biotechnol, 2007. 25(1): p. 84-90.
29. Schmulde, M., et al., *Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells*. Cancer Lett, 2008.
30. Braun, A., *Sensibilisierung von Tumorzellen für immunologische Effektormechanismen durch Histondeacetylase-Inhibitoren*, in *Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin*. 2007, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald: Greifswald.
31. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor*. Nature, 2005. 436(7054): p. 1186-90.
32. Skov, S., et al., *Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B*. Cancer Res., 2005. 65(23): p. 11136-45.
33. Armeanu, S., et al., *Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate*. Cancer Res, 2005. 65(14): p. 6321-9.
34. Kato, N., et al., *Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells*. Leukemia, 2007. 21(10): p. 2103-8.

35. Sonnemann, J., et al., *The histone deacetylase inhibitor vorinostat induces calreticulin exposure in childhood brain tumour cells in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol*.
36. Chou, T.-C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. *Pharmacol Rev*, 2006. 58(3): p. 621-81.
37. Grimm, E.A., *Human lymphokine-activated killer cells (LAK cells) as a potential immunotherapeutic modality*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. 865(3): p. 267-79.
38. Phillips, J.H. and L.L. Lanier, *Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity*. *J Exp Med*, 1986. 164(3): p. 814-25.
39. Mirandola, P., et al., *Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity*. *Blood*, 2004. 104(8): p. 2418-24.
40. Kayagaki, N., et al., *Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells*. *J Immunol*, 1999. 163(4): p. 1906-13.
41. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. *J Immunol Methods*, 2004. 294(1-2): p. 15-22.
42. Rubio, V., et al., *Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells*. *Nat Med.*, 2003. 9(11): p. 1377-82.
43. Moretta, A., et al., *Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity*. *Immunol Today*, 2000. 31(5): p. 228-34.
44. Sen, S., *Programmed cell death: concept, mechanism and control*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1992. 67(3): p. 287-319.
45. Henkart, P.A., *Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity*. *Annu Rev Immunol*, 1985. 3: p. 31-58.
46. Insinga, A., et al., *Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway*. *Nat Med*, 2005. 11(1): p. 71-6.
47. Nebbioso, A., et al., *Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells*. *Nat Med*, 2005. 11(1): p. 77-84.
48. Sonnemann, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors interact synergistically with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in carcinoma cell lines*. *Invest New Drugs*, 2005. 23(2): p. 99-109.
49. Sonnemann, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells*. *Int J Oncol*, 2006. 28(3): p. 755-66.
50. Ogbomo, H., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity*. *FEBS Lett*, 2007. 581(7): p. 1317-22.
51. Taplik, J., et al., *Histone H4 acetylation during interleukin-2 stimulation of mouse T cells*. *FEBS Lett*, 1998. 436: p. 349-52.
52. Dybkaer, K., et al., *Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways*. *BMC Genomics*, 2007. 8: p. 230.

53. de Rham, C., et al., *The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors*. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9(6): p. R125.
54. Cichocki, F., et al., *The transcription factor c-Myc enhances KIR gene transcription through direct binding to an upstream distal promoter element*. *Blood*, 2008. 113(14): p. 3245-53.
55. Griffiths, G.M., *The cell biology of CTL killing*. *Curr Opin Immunol*, 1995. 7: p. 343-8.
56. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. *Cytometry*, 1990. 11(2): p. 231-8.
57. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. *Science*, 1999. 285: p. 727-9.
58. Weiser, T.S., et al., *Sequential 5-Aza-2 deoxycytidine-depsipeptide FR901228 treatment induces apoptosis preferentially in cancer cells and facilitates their recognition by cytolytic T lymphocytes specific for NY-ESO-1*. *J Immunother*, 2001. 24(2): p. 151-61.
59. Setiadi, A.F., et al., *Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors*. *Cancer Res*, 2008. 68(23): p. 9601-7.
60. Pellicciotta, I., et al., *Presentation of telomerase reverse transcriptase, a self-tumor antigen, is down-regulated by histone deacetylase inhibition*. *Cancer Res*, 2008. 68(19): p. 8085-93.
61. Skov, S., et al., *Histone deacetylase inhibitors: a new class of immunosuppressors targeting a novel signal pathway essential for CD154 expression*. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1430-8.
62. Tao, R., et al., *Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells*. *Nat Med*, 2007. 13(11): p. 1299-307.
63. Moreira, J.M.A., P. Scheipers, and P. Sørensen, *The histone deacetylase inhibitor trichostatin A modulates CD4+ T cell responses*. *BMC Cancer*, 2003. 3: p. 30.
64. Serrador, J.M., et al., *HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization*. *Immunity*, 2004. 20: p. 417-28.
65. Januchowski, R. and P.P. Jagodzinski, *Trichostatin A down-regulates ZAP-70, LAT and SLP-76 content in Jurkat T cells*. *Int Immunopharmacol*, 2007. 7(2): p. 198-204.
66. Johnson, J., et al., *Effects of histone deacetylase inhibitor SAHA on effector and FOXP3+ regulatory T cells in rhesus macaques*. *Transplantation Proceedings*, 2008. 40: p. 459-61.
67. Edens, R.E., S. Dagtas, and K.M. Gilbert, *Histone deacetylase inhibitors induce antigen specific anergy in lymphocytes: A comparative study*. *Int Immunopharmacol*, 2006. 6: p. 1673-81.
68. Gilbert, K.M. and W.O. Weigle, *Th1 cell anergy and blockade in G1a phase of the cell cycle*. *J Immunol*, 1993. 151(3): p. 1245-54.
69. Leoni, F., et al., *The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo*. *Mol Med*, 2005. 11(1-12): p. 1-15.

70. Leoni, F., et al., *The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(5): p. 2995-3000.
71. Reilly, C.M., et al., *The histone deacetylase inhibitor trichostatin A upregulates regulatory T cells and modulates autoimmunity in NZB/W F1 mice*. Journal of Autoimmunity, 2008. 31: p. 123-30.
72. Reddy, P., et al., *Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect*. PNAS, 2004. 101(11): p. 3921-6.
73. Reddy, P., et al., *Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice*. J Clin Invest, 2008. 118(7): p. 2562-73.
74. Leng, C., et al., *Reduction of graft-versus-host disease by histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid is associated with modulation of inflammatory cytokine milieu and involves inhibition of STAT1*. Exp Hematol, 2006. 34(6): p. 776-87.
75. Kobayashi, K., et al., *Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(4): p. 1457-62.
76. Sharief, M.K. and Y.K. Semra, *Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2001. 119(2): p. 350-7.
77. Zheng, X., et al., *Bcl-xL is associated with the anti-apoptotic effect of IL-15 on the survival of CD56(dim) natural killer cells*. Mol Immunol, 2008. 45(9): p. 2559-69.
78. Gojo, I., et al., *Phase I and pharmacological study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leukemias*. Blood, 2007. 109(7): p. 2781-90.
79. Fouladi, M., et al., *Phase I study of depsipeptide in pediatric patients with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group report*. J Clin Oncol, 2006. 24(22): p. 3678-85.
80. Duvic, M., et al., *Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)*. Blood, 2007. 109(1): p. 31-9.
81. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Cytokine modulation of the innate immune system in the treatment of leukemia and lymphoma*. Adv Pharmacol, 2004. 51: p. 295-318.
82. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(2): p. 169-83.

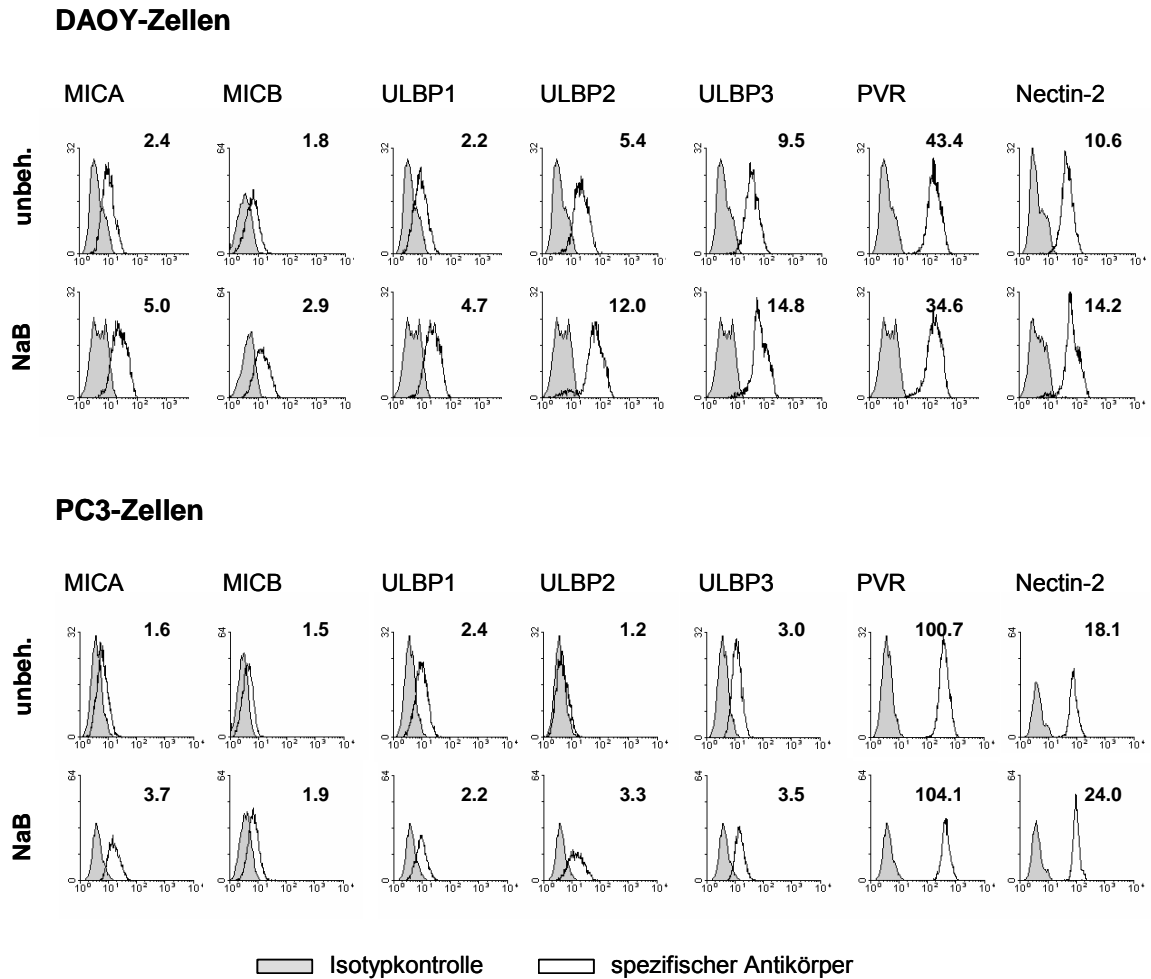
## Abkürzungsverzeichnis

|           |   |
|-----------|---|
| APC       | antigenpräsentierende Zelle   |
| CD        | Differenzierungsantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )   |
| cpm       | Impulse pro Minute ( <i>counts per minute</i> )   |
| CTL       | zytotoxischer T-Lymphozyt   |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )   |
| DR4/5     | Todesrezeptor 4/5 ( <i>death receptor 4/5</i> )   |
| EDTA      | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| E/T-Ratio | Effektor/Target-Ratio   |
| FACS      | <i>hier</i> : Syn. für Durchflußzytometrie ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )                         |
| FCS       | fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )   |
| HAT       | Histonacetyltransferase   |
| HDAC      | Histondeacetylase   |
| HDI       | Histondeacetylase-Inhibitor   |
| HLA       | humanes Leukozytenantigen   |
| IFN       | Interferon  |
| Ig        | Immunglobulin   |
| IL        | Interleukin   |
| KIR       | Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor auf natürlichen Killerzellen ( <i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i> ) |
| LAK       | Lymphokin-aktivierte Killerzellen   |
| M         | molar   |
| MICA/B    | <i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i>   |
| MHC       | Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )                                      |
| MRFI      | mittlere relative Fluoreszenzintensität   |
| NaB       | Natriumbutyrat  |
| NCR       | natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor  |
| NF-κB     | Kernfaktor-κB ( <i>nuclear factor-κB</i> )  |
| NK-Zelle  | natürliche Killerzelle  |
| PBMC      | mononukleäre Zelle des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )                             |
| PBS       | phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )  |
| PHA       | Phytohämagglutinin  |
| PVR       | Poliovirus-Rezeptor   |

|          |   |
|----------|---|
| RNA      | Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )                            |
| rpm      | Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )                |
| SAHA     | Suberoylanilid-Hydroxamsäure ( <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> ) |
| TCR      | T-Zellrezeptor  |
| Th-Zelle | T-Helferzelle   |
| TNF      | Tumornekrosefaktor  |
| TRAIL    | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>                            |
| Treg     | regulatorische T-Zellen   |
| U        | Einheit ( <i>unit</i> )   |
| ULBP     | UL16-bindendes Protein  |
| WT       | Wildtyp   |

# Anhang

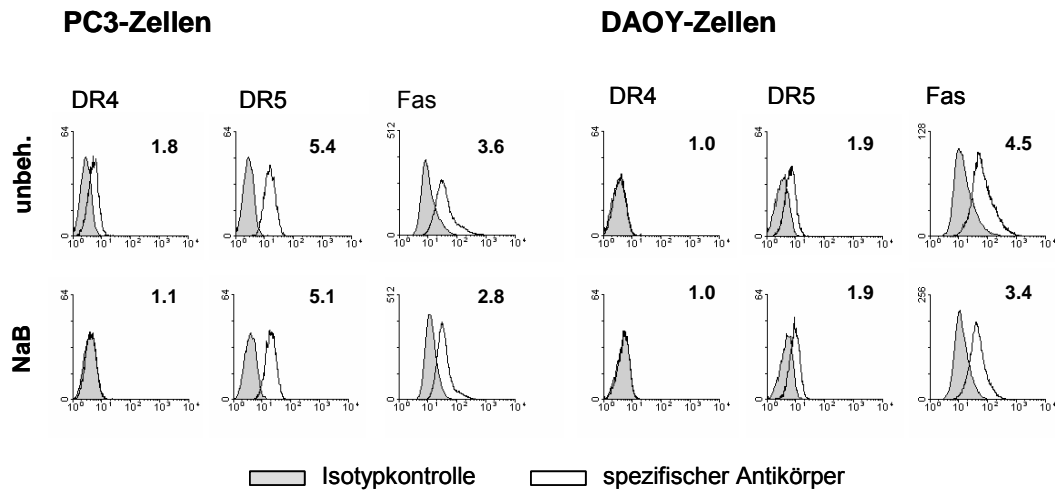
## A.1 Expression aktivierender NK-Liganden auf Tumorzellen nach NaB-Behandlung (zu Kapitel 4.1.4.)



**Abbildung A.1 NaB erhöht die Oberflächenexpression aktivierender NK-Liganden auf Tumorzellen.** Auf unbehandelten oder 24 h mit 5 mM NaB vorbehandelten DAOY- und PC3-Zellen wurde die Oberflächenexpression der aktivierenden NK-Liganden MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, PVR und Nectin-2 durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die aktivierenden NK-Liganden oder mit Kontrollantikörpern des entsprechenden Isotyps gefärbt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.

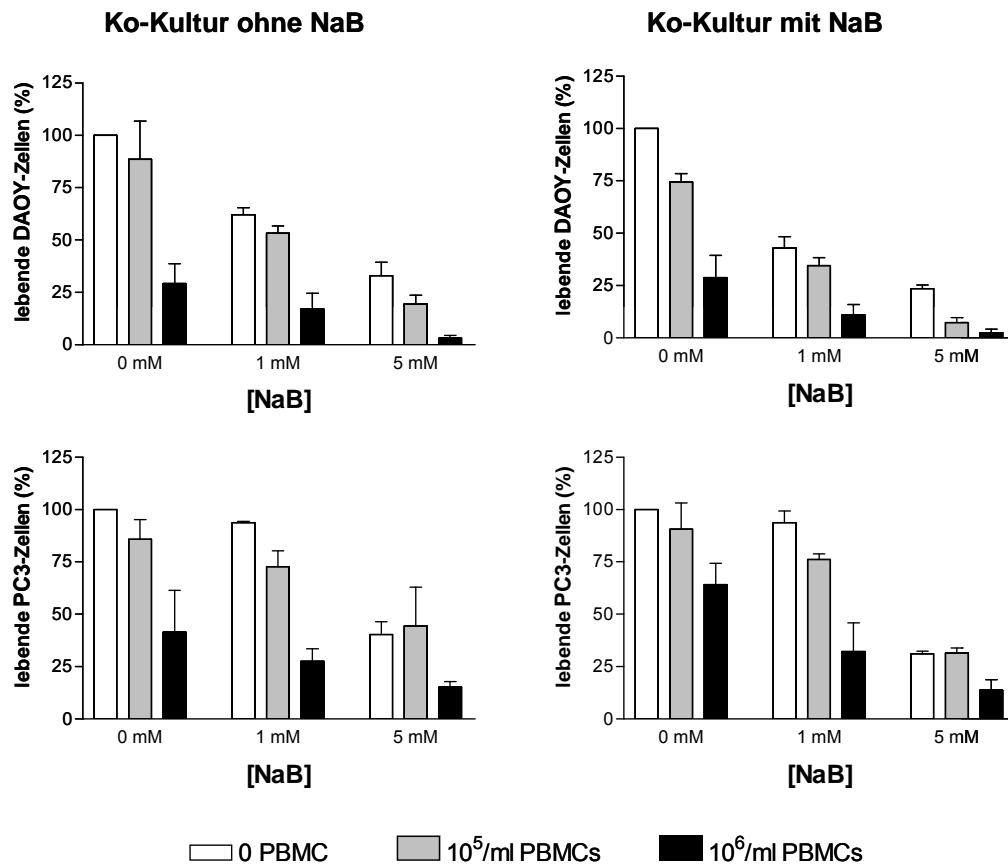


## A.2 Expression von Todesrezeptoren auf Tumorzellen nach NaB-Behandlung (zu Kapitel 4.1.5.)



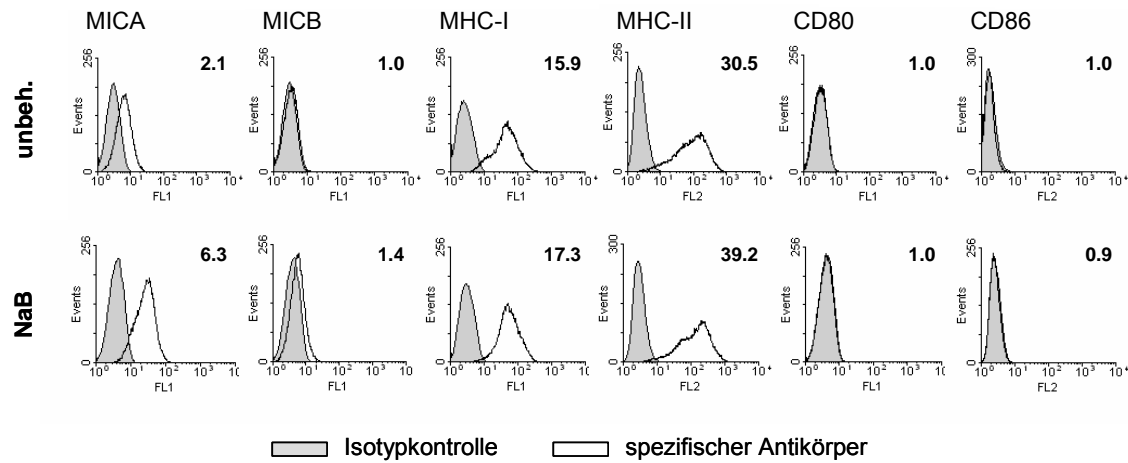
**Abbildung A.2 NaB erhöht nicht die Oberflächenexpression von Todesrezeptoren auf Tumorzellen.** Auf unbehandelten oder 24 h mit 5 mM NaB vorbehandelten DAOY- und PC3-Zellen wurde die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren DR4, DR5 und Fas durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Todesrezeptoren oder mit Kontrollantikörpern des entsprechenden Isotyps gefärbt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.

### A.3 Zytotoxizität IL-2-aktivierter NK-Zellen in Anwesenheit von NaB (zu Kapitel 4.2.4.)



**Abbildung A.3** Anwesenheit von NaB während der Ko-Kultur von IL-2-aktivierten PBMCs und Tumorzellen beeinträchtigt das tumorlytische Potential der PBMCs nicht. Tumorzellen wurden 24 h mit NaB in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Danach wurden sie mit IL-2-aktivierten PBMCs 24 h ko-inkubiert. NaB wurde dabei entweder entfernt oder verblieb in der ursprünglichen Konzentration im Kulturmedium. Die Anzahl lebender Tumorzellen wurde durchflußzytometrisch ermittelt und ist dargestellt als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

#### A.4 Expression ko-stimulierender T-Zell-Liganden auf Wildtyp-SkMel63-Zellen nach NaB-Behandlung (zu Kapitel 4.4.2.)



**Abbildung A.4** NaB erhöht die Oberflächenexpression von MICA, MICB und der MHC-Moleküle, nicht aber der B7-Moleküle auf Wildtyp-SkMel63-Zellen. Auf unbehandelten oder 24 h mit 5 mM NaB vorbehandelten Wildtyp-SkMel63-Zellen wurde die Oberflächenexpression von MICA, MICB, MHC-I, MHC-II, CD80 und CD86 durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen diese Moleküle oder mit Kontrollantikörpern des entsprechenden Isotyps gefärbt. Die Zahlen geben die MRFI-Werte an.

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Barbara Bröker für die Überlassung dieses spannenden Promotions-themas, für die gute wissenschaftliche Betreuung und für ihre stetige Diskussions-bereitschaft.

Vielen Dank an Erika Friebe für ihre geduldige Unterstützung im Labor.

Dr. Daniela Pende danke ich für ihre Hilfe bei den <sup>51</sup>Chrom-Release-Assays.

Ein herzlicher Dank an Dr. Jürgen Sonnemann, der mich immer treu und zuverlässig mit der neuesten Fachliteratur versorgt hat.

Ich danke Inken Schmudde für die vielen pdfs und fürs Korrekturlesen.

Allen Mitarbeitern der AG Bröker danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und so manchen Pausenplausch.

Ich danke Peter Michael, Ida und Grete für Ansporn, Aufmunterung und Abwechslung.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten:

**M. Schmudde**, E. Friebe, J. Sonnemann, J. F. Beck, B. M. Bröker. Histone deacetylase inhibitors prevent activation of tumour-reactive NK cells and T cells but do not interfere with their cytolytic effector functions. *Cancer Lett.* in press

J. Sonnemann, S. Gressmann, S. Becker, S. Wittig, **M. Schmudde**, J. F. Beck. The histone deacetylase inhibitor vorinostat induces calreticulin exposure in childhood brain tumour cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* in press

**M. Schmudde**, A. Braun, D. Pende, J. Sonnemann, U. Klier, J. F. Beck, L. Moretta, B. M. Bröker. Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells. *Cancer Lett* 272: 110-21 (2008)

S. Holtfreter, D. Grumann, **M. Schmudde**, H. T. Nguyen, P. Eichler, B. Strommenger, K. Kopron, J. Kolata, S. Giedrys-Kalemba, I. Steinmetz, W. Witte, B. M. Broker. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45: 2669-80 (2007)

K. Rogasch, V. Ruhmling, J. Pane-Farre, D. Hoper, C. Weinberg, S. Fuchs, **M. Schmudde**, B. M. Broker, C. Wolz, M. Hecker, S. Engelmann. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 188: 7742-58 (2006)

### Kongreßbeiträge (Abstracts):

**M. Schmudde**, A. Braun, D. Pende, J. Sonnemann, U. Klier, J. F. Beck, L. Moretta, B. M. Bröker. Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells. *EFIS-EJI Natural killer cell symposium*, Bad Herrenalb, Germany (2008)

**M. Schmudde**, A. Braun, U. Klier, D. Pende, J. Sonnemann, L. Moretta, J. F. Beck, B. M. Bröker. Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells. *In 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology*, Heidelberg, Germany (2007)

**M. Schmudde**, U. Klier, A. Braun, J. Sonnemann, J. F. Beck, B. M. Bröker. Histone deacetylase inhibitors increase tumour cell sensitivity to cytotoxic effects of IL2-activated PBMC. *In 2nd International Alfred Krupp Kolleg Symposium on Stress, Behaviour and Immune Response*, Greifswald, Germany (2006)

**M. Schmudde**, A. Braun, J. Sonnemann, J. F. Beck, B. M. Bröker. Histone deacetylase inhibitors increase tumour cell sensitivity to cytotoxic effects of IL2-activated human PBMC. *In 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology*, Paris, France (2006)

**M. Schmudde**, A. Braun, J. Sonnemann, J. F. Beck, B. M. Bröker. Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for the cytotoxic effects of IL2-activated PBMC. *In 2. Spring School on Immunology*, Ettal, Germany (2006)

**M. Schmudde**, S. Holtfreter, A.K. Ziebandt, P. Eichler, S. Engelmann, K. Selleng, W. Witte, M. Hecker, B.M. Bröker. High throughput analysis of *S. aureus* superantigens. *In 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the DGfI German Society of Immunology*, Kiel, Germany (2005)

**M. Schmudde**, S. Holtfreter, A.K. Ziebandt, P. Eichler, S. Engelmann, K. Selleng, W. Witte, M. Hecker, B.M. Bröker. High throughput analysis of *S. aureus* superantigens: Carriage of furunculosis-associated clonal lineages in Pomeranian blood donors. *In 2nd Euroconference "Interactions between innate and adaptive immunity in mammalian defense against bacterial infection"*, Joachimsthal, Germany (2005)

## Tabellarischer Lebenslauf

### Mareike Schmudde

geboren am 27. Juli 1980 in Karlsruhe  
verheiratet, 2 Töchter

### Schullaufbahn

Aug. 1987 – Mai 1989

Grundschule Bergwald, Karlsruhe

Mai 1989 – Juli 1991

Grundschule Pfeffingen, Albstadt

Aug. 1991 – Juni 2000

Gymnasium Ebingen, Albstadt

### Akademische Laufbahn

Okt. 2000 – Okt. 2005

Studium der Humanbiologie  
an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Hauptfach: Immunologie;  
Nebenfächer: Genetik, Biochemie

Nov. 2004 - Okt. 2005

Diplomarbeit  
am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin,  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Betreuerin: Prof. Dr. Barbara M. Bröker  
Titel: „Neue Methoden zur Untersuchung von  
Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*“

Okt. 2005

Abschluß des Studiums als Diplom-Humanbiologin

Okt. 2005 – April 2008

Promotionsstipendium des Alfred-Krupp-  
Graduiertenkollegs "Tumorbiologie"

seit Okt. 2005

Promotion  
am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin,  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Betreuerin: Prof. Dr. Barbara M. Bröker  
Thema: Einfluß von Histondeacetylase-Inhibitoren auf  
die Tumorzellyse durch Immunzellen

Kläden, 23. März 2010