

Aus der Orthopädischen Klinik der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Krauspe

In-vitro Untersuchungen über den Einfluss exogener Zytokine an  
humanen Osteosarkomzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Sebastian Schmidt**

2002

„ Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. “

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.,  
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Harry Merk

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Bojar

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet.

## **Danksagung**

Herrn **Univ.-Prof. Dr. med. Harry Merk** danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, für Anregungen und Beratung und die Vermittlung orthopädischer Kenntnisse.

Mein Dank gilt Herrn **Univ.-Prof. Dr. med. Hans Bojar** für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und den damit verbundenen Möglichkeiten zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Für die Grundidee und die stetige Diskussionsbereitschaft bei der Betreuung meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn **Priv.-Doz. Dr. med. Axel W. A. Baltzer** und Herrn **Dr. med. Christian Liebau** bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Herrn **Dr. rer. nat. Johannes Bernhard Prisack**, Herrn **Dr. rer. nat. Christiaan Karreman** und allen Mitarbeitern des Instituts für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Tumor und Immunsystem	1
1.2	Osteosarkome	3
1.3	Zytokine	3
1.4	Funktion des Enzyms Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO)	5
1.5	Die Oberflächenantigene ICAM-1 und HLA-I	6
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>8</b>
2.1	Zellkultur	8
2.1.1	Zellkulturmedien und Zusätze	8
2.1.2	Kulturbedingungen	8
2.1.3	Zytokine	9
2.1.4	Zelllinien	10
2.1.5	Gewinnung peripherer Blutlymphozyten	10
2.2	Versuchsansätze	11
2.2.1	Untersuchung zur Bestimmung der Zytotoxizität	11
2.2.2	Induktion der Indolamin 2.3-dioxygenase (IDO)	12
2.2.3	Durchflusszytometrische Erfassung von Oberflächenantigenen	16
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>24</b>
3.1	Zytotoxizitätsbestimmung mit dem MTT-Assay nach Zytokinapplikation	24
3.2	Nachweis der IDO-Induktion	27
3.2.1	IDO-Induktion durch IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18	27
3.2.2	Induktion der IDO nach Inkubation mit zytokinaktivierten Lymphozyten	30
3.2.3	Induktion der IDO in humanen Blutlymphozyten	33
3.2.4	Induktion der IDO durch Lymphozytenkulturüberstand	34
3.3	Nachweis und Induktion der HLA-I und ICAM-1 Expression	36
3.3.1	Expressionsänderung von ICAM-1 durch IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$	36
3.3.2	Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-I durch IL-12 und IL-18	39
3.3.3	Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-1 nach Koinkubation mit IL-12 und IL-18 aktivierten Lymphozyten	42

3.3.4	Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-I durch direkten und indirekten Lymphozytenkontakt	48
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>55</b>
4.1	MTT-Assay – Zytotoxizitätsnachweis bei humanen Osteosarkomzellen	55
4.2	IDO Induktion	56
4.3	Expression von Oberflächenantigenen bei humanen Osteosarkomzellen	58
4.4	Zytokine	62
<b>5.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>66</b>

## Einleitung

### 1.1 Tumor und Immunsystem

Bereits gegen Ende des letzten Jahrhunderts konnte die Wissenschaft erste Erkenntnisse zu Mechanismen immunologischer Tumorabwehr liefern. Schon in dieser Zeit sah man die Möglichkeit, das körpereigene Immunsystem gegen entartete Zellen zu lenken. So gelang es in den letzten zwei Jahrzehnten, auf menschlichen Tumoren, Antigene zu charakterisieren, die von Antikörpern oder T-Lymphozyten erkannt werden.

Maligne neoplastische Zellen vermehren sich unkontrolliert, infiltrieren gesunde Gewebe und bilden häufig Metastasen, die außerhalb des Ursprungsgewebes weiterwachsen können [1]. Bei vielen Tumoren, einschließlich der Osteosarkome, konnten durch molekularbiologische Untersuchungen relativ spezifische genetische Alterationen festgestellt werden. Diese, je nach Wirkung als Onkogene oder Tumorsuppressorgene zu wertenden Genprodukte, können eine unkontrollierte Proliferation, einen Durchbruch und die Metastasierung in andere Organsysteme ermöglichen.

Obwohl Neoplasmen von autologen Geweben stammen, kann der Prozess der malignen Transformation mit der Expression von neuen oder veränderten Oberflächenantigenen auf den Tumorzellen einhergehen. Das Immunsystem welches mit seinen spezialisierten Zellen, den Lymphozyten bzw. Leukozyten und Makrophagen, auf alle Gewebe und Flüssigkeiten des Körpers verteilt ist, kann diese Tumorantigene erkennen und Reaktionen auslösen, die sich gegen die neoplastischen Zellen richten. Eine Vielzahl solcher Tumorantigene ist heute bekannt. Ihr Nachweis ist ein wichtiges Hilfsmittel in der Tumordiagnostik und kann auch in bestimmten Fällen ein wichtiges prognostisches Kriterium sein.

Histologische Untersuchungen menschlicher Tumoren haben gezeigt, dass die Mehrzahl der Tumoren deutlich erkennbar mit inflammatorischen Zellen infiltriert ist. Man beobachtet Infiltrate, bestehend aus T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und

Makrophagen sowohl in den Tumoren als auch in ihrer unmittelbaren Umgebung. Dieser immunologische Entzündungsvorgang ist von einer ständig funktionierenden interzellulären Kommunikation abhängig. Neben dem direkten Kontakt von Zellen über membrangebundene Rezeptoren kommt den Zytokinen, als Botenstoffe, eine zentrale Rolle zu. Zytokine können in vielfältiger Weise immunkompetente Zellen steuern. Die Aktivierung und Hemmung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen, die Beeinflussung der Aktivität von T-Helferzellen, B-Zellen und Makrophagen sind einige ihrer Wirkungen. Außerdem sind auch direkte und indirekte Wirkungen auf den Stoffwechsel der Tumorzellen bekannt und schließlich können Tumorzellen selbst Zytokine produzieren.

Es können also durch Stimulation des Immunsystems mit Zytokinen immunologische Abwehrmechanismen gegen Krebszellen potenziert und auch die Tumorzellproliferation sowie die Tumorzelldifferenzierung durch direkte und indirekte zytotoxische / zytostatische Wirkung moduliert werden [1].

Man unterscheidet prinzipiell die zelluläre von der humoralen Immunreaktion. *In vitro* Experimente haben jedoch gezeigt, dass Tumorzellen in erster Linie durch die zellulären Abwehrmechanismen zerstört werden. Hierbei erkennen und eliminieren Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), aktivierte Makrophagen und Lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK) die Tumorzellen auch in Abwesenheit eines bestimmten Tumorantigens. Im Gegensatz dazu stehen die spezifischen Abwehrmechanismen wie die T-Zell vermittelte Zytotoxizität und die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Diese können nur in Anwesenheit eines Tumorantigens aktiviert werden. Die Effizienz der Immunantwort wird durch die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) Klasse I und II Oberflächenmolekülen [2,3] und der Präsenz von Adhäsionsmolekülen beeinflusst [4,5].

## **1.2 Osteosarkome**

Osteosarkome werden in der Literatur als Ergebnis einer aktiven Proliferation von Osteoblasten dargestellt, welche undifferenziert, atypisch und oft mitotisch sind [6-9]. Unter den malignen primären Knochentumoren stellen die Osteosarkome mit 40% den größten Anteil dar, gefolgt von Chondrosarkomen mit 9% und Ewingsarkomen mit 7.5% [10]. Mit jährlich etwa 1900 tödlich verlaufenden Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland beträgt der Anteil von Knochensarkomen etwa 1% aller tödlichen Neoplasien [11]. Osteosarkome treten überwiegend bei Jugendlichen auf. Ihr Anteil in dieser Altersgruppe, bezogen auf alle malignen Neoplasien, beträgt 3,4% [12,13]. Das männliche Geschlecht ist etwa doppelt so häufig betroffen, wie das weibliche. Das Osteosarkom geht meistens von den Metaphysen der langen Röhrenknochen aus. Bevorzugte Lokalisation sind die knieelenksnahen Anteile von Femur und Tibia [10]. Die Tendenz der Osteosarkome zur frühen Metastasierung insbesondere in die Lungen macht den natürlichen Verlauf dieser Erkrankungen sehr ungünstig. Ohne moderne interdisziplinäre Behandlungsmethoden beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Extremitätenbefall im metastasiertem Stadium nur 24% [14].

## **1.3 Zytokine**

Innerhalb der immunologischen Vorgänge zur Bekämpfung der Tumorzellen nehmen die Zytokine eine Schlüsselrolle ein. Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteohormonen, welche von nahezu allen Zellen des Körpers gebildet werden. Als autokrin, parakrin oder endokrin wirksame Polypeptide bilden sie ein Netzwerk, welches interzelluläre Kommunikationen ermöglicht und dadurch Wachstum, Differenzierung und funktionelle Aktivität von Zellen steuert [15]. Entsprechend ihrer (vermuteten) Funktion erfolgte die Einteilung der Zytokine in verschiedene Zytokinfamilien. Interferone (IFN), Interleukine (IL),

Chemokine, Tumornekrosefaktoren (TNF), Transforming Growth Factors (TGF) und andere Wachstumsfaktoren.

Interferone sind Proteine die antivirale, zellwachstumsregulierende und immunmodulatorische Eigenschaften besitzen [16-19]. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) nimmt unter den bekannten Zytokinen eine Schlüsselposition in der Aktivierung und Regulation der zellvermittelten Tumorabwehr ein. IFN- $\gamma$  wird unter anderem von aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet. Die Stimulierung der IFN- $\gamma$  Expression führt letztlich zur Aktivierung der zellzerstörenden Mechanismen, beispielsweise in zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen, und ist somit eine grundlegende Voraussetzung für die effektive immunologische Tumorabwehr [20,21].

Die IFN- $\gamma$  Aktivierung kann durch Interleukine erfolgen. Bekannt ist diese Wirkung seit längerem für IL-2. Der Antitumor-Effekt einer IL-2 Applikation ist für die verschiedensten Tumorentitäten gezeigt worden. So kann die systemische Anwendung von IL-2 beispielsweise zu Tumorregressionen bei kleinzelligen Nierenkarzinomen führen [22].

In jüngerer Zeit sind weitere IFN- $\gamma$  induktive Interleukine beschrieben worden [23]. IL-12, auch als Natural Killer Cell Stimulating Faktor (NKCF) bezeichnet, wird überwiegend von aktivierten B- und T-Lymphozyten gebildet und stimuliert die IFN- $\gamma$  Synthese und dessen Ausschüttung in aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen [24-26]. *In vivo* wurde gezeigt, dass IL-12 antitumorale Eigenschaften gegen eine Reihe von Mäusetumoren hat, indem das Tumorwachstum gehemmt und die Metastasierung reduziert wird [27,28]. In einer Vielzahl von Tiermodellen konnten Antikörper gegen dieses Zytokin, die Antitumor Effekte aufheben [28].

Mit IL-18, auch als Interferon Gamma Inducing Factor (IGIF) bezeichnet, wurde ein weiteres Zytokin mit ähnlichem Reaktionsmuster gefunden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass IL-18 Mäuse- und humane NK-Zell Zytotoxizität verstärkt [29,30]. IL-18 wird von

Kupfer-Zellen und aktivierten Makrophagen produziert [30,31]. Neben synergistischen Wirkungen zwischen IL-12 und IL-2 gibt es Hinweise auf einen Synergismus von IL-12 und IL-18 [23]. Diese sind an einem Antitumor Effekt beteiligt, indem sie essentielle Substanzen für den Tumor reduzieren [32], die Blutgefäßbildung limitieren, T-Lymphozyten anlocken [33] und Tumorantigene den Zellen des Immunsystems präsentieren (HLA-I).

Obwohl IL-12 und IL-18 ähnliche Reaktionen des Immunsystems fördern, haben beide Zytokine keine identische Wirkung [31]. Die Möglichkeit, dass beide Zytokine, nämlich IL-12 und IL-18, eine zellvermittelte Immunantwort und eine synergistische IFN- $\gamma$  Ausschüttung induzieren, ist die Grundlage für diese Arbeit.

#### **1.4 Funktion des Enzyms Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO)**

Auf Grund der Möglichkeit Neoplasmen mit IFN- $\gamma$  zu behandeln, [34] gab es immer wieder Untersuchungen, die gezeigt haben, dass eine starke Synthese und Aktivität des Enzyms IDO (EC 1.3.11.17) für einen Mechanismus verantwortlich ist, der sich gegen Tumorzellen richtet [35-38]. Das Enzym IDO wird in verschiedenen gesunden und pathologischen Geweben induziert [39-41] und ist hauptsächlich für den L-Tryptophan Katabolismus zuständig [42-44]. Es katalysiert die Reaktion von L-Tryptophan zu N-formyl-L-kynurenin [45-47], indem es den Pyrrolring des L-Tryptophans oxidativ spaltet. Die Verfügbarkeit dieses Enzyms gewährleistet die Proteinsynthese sowie den Proteinabbau, die Genomreplikation und das Zellwachstum [48,49]. Es konnte an peripheren Blutmonozyten gezeigt werden, dass die Induktion des Enzyms IDO eine Erhöhung des L-Tryptophan Metabolismus bewirkt [36] und eine wichtige Rolle in der Etablierung von Zellwachstums- und immunmodulatorischen Eigenschaften durch IFN- $\gamma$  spielt.

## **1.5 Die Oberflächenantigene ICAM-1 und HLA-I**

Wie schon erwähnt, werden durch IFN- $\gamma$  Proteine produziert [50], die eine wichtige Rolle in den durch IL-12 ausgelösten Interferon vermittelten Antitumor Effekten spielen. Zu diesen Proteinen gehören auch das Histokompatibilitätsantigen-I (HLA-I) und das Interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), welches die Bildung von Konjugaten mit zytolytischen T Zellen vermittelt.

Recht häufig wurden Veränderungen in der Expression von HLA-I Molekülen festgestellt. In Verbindung mit einer hohen Metastasierungsbereitschaft wurde bei Mammakarzinomen über eine verminderte oder fehlende Expression berichtet. Andererseits lässt sich bei hoher Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, bei primären Melanomen eine hohe Metastasierungsbereitschaft vorhersagen.

Interleukine beeinflussen viele biochemische Vorgänge, wie eben auch die Induktion derIDO und die Regelung der Oberflächenexpression von HLA-Antigenen und ICAM-1 auf Tumorzellen. So kann die Expression von HLA-I und ICAM-1 durch IFN- $\gamma$  auch bei Osteosarkomzellen induziert und verstärkt werden [51].

Das Immunsystem des menschlichen Organismus besitzt zwei wichtige Eigenschaften. Es kann es sehr präzise körperfremde von körpereigenen Strukturen unterscheiden. Hierzu besitzt es bestimmte Erkennungsmoleküle, die Antigenrezeptoren. Die zweite Eigenschaft ist die außergewöhnliche Mobilität durch immunkompetente Zellen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten), die praktisch alle Regionen des menschlichen Körpers erreichen können. Genauso wie das Immunsystem, benutzen auch maligne Zellen die selben molekularen Mechanismen, um sich im Körper über Lymphgefäße und Blutgefäße auszubreiten.

Unter den verschiedenen Rezeptoren der Lymphozytenmembran [52,53], gibt es zwei unterschiedliche Klassen. Zum einen sind dies Antigenrezeptoren [54], die allein dazu befähigt sind, körperfremdes Material in Form von präsentierten Peptiden zu erkennen. Die

anderen werden als Adhäsionsrezeptoren bezeichnet und treten nur mit körpereigenen Molekülen in Wechselwirkung [55].

## Material und Methoden

### 1.6 Zellkultur

#### 1.6.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Als Zellkulturmedium wurde MEM Medium und RPMI 1640 Medium verwendet. Es wurde 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Fa. Seromed), 20mM L-Glutamin (Fa. Gibco), 2.5µg/ml Amphotericin B (Fa.Gibco), 10µg/ml Gentamicin (Fa. Gibco), 1% MEM-Non-Essential Amino Acid Solution 100x (Fa.Sigma) benutzt.

	Medium-1	Medium-2
Basismedium	MEM-Medium ohne Glutamin (Fa. Gibco)	RPMI 1640 Medium ohne Glutamin
Serum hitzeinaktiviert (58°C, 30 min.)	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10% FCS (Fa. Seromed)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 5% FCS (Fa. Seromed)</li></ul>
Zusätze	<ul style="list-style-type: none"><li>• 20mM L-Glutamin</li><li>• 2.5µg/ml Amphotericin B (Fa.Gibco)</li><li>• 10µg/ml Gentamicin (Fa. Gibco)</li><li>• 1% MEM-Non-Essential Amino Acid Solution 100x (Fa.Sigma)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 20mM L-Glutamin,</li><li>• 2.5µg/ml Amphotericin B (Fa.Gibco),</li><li>• 10µg/ml Gentamicin (Fa. Gibco)</li></ul>

**Tab. 1** Bezeichnungen und Zusammensetzungen der verwendeten Zellkulturmedien. Die Antibiotika und das L-Glutamin wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

#### 1.6.2 Kulturbedingungen

- Trypsin/EDTA-Lösung: 0.05% Trypsin, 0.02% EDTA steril in PBS (Fa. Boehringer Mannheim)
- PBS: 8g NaCl, 0.2 g KCl, 1.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4 mit H<sub>2</sub>O ad 1 Liter auffüllen und autoklavieren.

Alle Zellkulturen wurden unter aseptischen Bedingungen bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Weiterführung der Zellkulturen erfolgte unter Verwendung von Nunc-Deltaclon<sup>TM</sup> Plastikmaterial, Vereinzeln der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung 1x und Teilung der Zellsuspension im angegebenen Verhältnis (Tab. 2). Die verwendeten Zellkulturmedien sind in Tab. 1 dargestellt.

Zelllinie	Herkunft/Typ	Medium	Kulturteilung	Bezugsquelle
HOS	human / Osteosarkom	1	1:10	ECACC
MG-63	human / Osteosarkom	1	1:3	ECACC

**Tab. 2** Die Tabelle zeigt die Bezeichnungen, die Herkunft und die Kulturparameter der verwendeten Zelllinie.

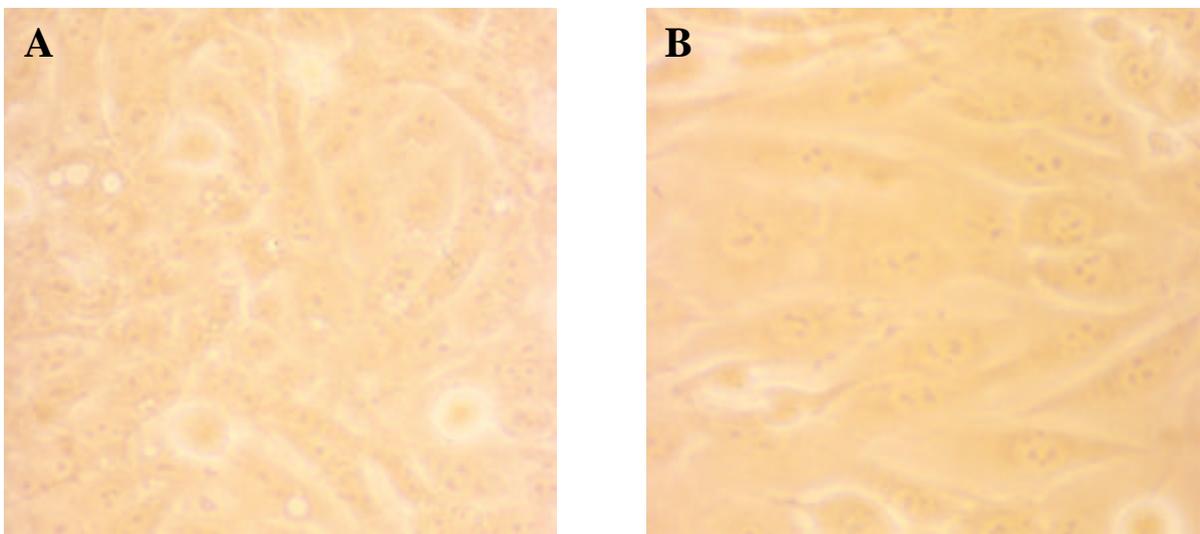
### 1.6.3 Zytokine

Zytokin	Konzentration	Spezie	Katalognummer	Firma
Interleukin-12	[5µg/ml]	human	Nr. 219-IL-005	R&D Systems
Interleukin-18	[25µg/ml]	human	Nr. 318-IL	R&D Systems
IFN-γ	[10 <sup>5</sup> U/ml]	human	Polyferon	Renschler
TNF-α	[10 <sup>4</sup> U/ml]	human	PHC3011	BIOSOURCE

**Tab. 3** Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine.

#### 1.6.4 Zelllinien

Verwendet wurden die Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63. Diese Zelllinien wurden von der European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, UK) kommerziell erworben. HOS entstammt einem primären Osteosarkom eines 13-jährigen Mädchens. MG-63 ist eine stabile reproduzierbare Osteosarkomzelllinie, die einem 14-jährigen männlichen Patienten entnommen wurde. In der Zellkultur können die kolonieformenden Zellen zu hoher Dichte heranwachsen. Genetisch liegt bei diesen Tumorzellen eine Abweichung vom normalen Chromosomensatz vor.



**Abb. 1** Gezeigt werden die Osteosarkomzelllinien HOS (A) und MG-63 (B) unter aseptischen Zellkulturbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung.

#### 1.6.5 Gewinnung peripherer Blutlymphozyten

Die Isolation der Lymphozyten erfolgte unter aseptischen Bedingungen der Zellkultur. 4 ml EDTA-Blut eines klinisch unauffälligen, HIV-negativen Spenders wurden mit 4 ml PBS verdünnt und in einem 15 ml Probenröhrchen (Fa. Falcon) auf 10ml Ficoll-Paque (Fa. Pharmacia) geschichtet. Durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 2400 U/min in einer Eppendorf-Hermle Zentrifuge/Z320 wurden Erythrozyten und Granulozyten abgetrennt. Mononukleäre Zellen reichert sich in der Interphase an, wurden mit einer Transferpipette

abgenommen, zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und bei 1500 U/min zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mikroskopisch in einer Neubauerkammer bestimmt.

## **1.7 Versuchsansätze**

### **1.7.1 Untersuchung zur Bestimmung der Zytotoxizität**

#### Hintergrund

Nachfolgend wird der MTT-Test, oder auch Tetrazolium-Assay genannt, beschrieben. Er ist ein *in-vitro* Chemosensitivitätstest, der semi-quantitativ nur lebende Zellen erfasst. Favorisiert wird dieser Test auch vom National Cancer Institut in den USA im Rahmen eines breiten Screening-programms für Zytostatika. Mosmann et al. beschrieben 1983 diese Methode zur Quantifizierung des Tumorwachstums, die auf der Annahme beruht, dass nur lebende Zellen die basischen Tetrazolium Verbindungen zu einem blaufarbenen Formazansalz reduzieren können. Die Menge dieses gebildeten Formazans ist daher direkt proportional zur Anzahl lebender Tumorzellen. Der Test erfolgt auf Mikrotitrationsplatten und ist schnell, einfach und kostengünstig.

#### Methodik

Zur Bestimmung der Vitalität der Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 bei Behandlung mit den Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurde der direkte zytostatische / zytotoxische Effekt in einem Standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) Test durchgeführt. Das Zellmaterial wird nach einer Trypsinbehandlung aus 10ml Plastikpetrischalen geerntet und mit Hilfe einer Mikropipette in 96-Well Flachbodenmikrotiterplatten ausgebracht. Die Tumorzellen wurden mit einer Konzentration

von  $5 \times 10^3$  Zellen pro Vertiefung und 100  $\mu$ l Medium-1 eingesetzt. Eine lineare Verdünnungsreihe zu 7.81 U/ml bis 2000 U/ml IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurde verwendet.

Nach 72 h Inkubation bei 37°C wurden 100  $\mu$ l Medium und 100  $\mu$ g MTT (Stammlösungskonzentration MTT 7.5 mg/ml in PBS gelöst, Gebrauchslösung 1:10 in Medium verdünnt, Fa. Sigma) pro Vertiefung auf die Mikrotiterplatte gegeben und bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion durch Ausklopfen und Zugabe von 200  $\mu$ l 0.5%igem DMSO (Dimethylsulfoxid) gestoppt. Man beobachtet ein Umschlagen der Lösung von gelb nach dunkelblau und bestimmt die Absorption bei 573 nm und bei 630 nm als Referenzwellenlänge in einem Mikroplatten-Photometer.

## **1.7.2 Induktion der Indolamin 2.3-dioxygenase (IDO)**

### Hintergrund

Untersuchungen am IDO Stoffwechsel haben gezeigt das eine starke Synthese und Aktivität des Enzyms Indolamin 2.3-dioxygenase (EC 1.3.11.17) für einen Mechanismus verantwortlich ist, der sich gegen Tumorzellen richtet [35-38]. IDO wird in gesunden und pathologischen Geweben durch IFN- $\gamma$  induziert und ist hauptsächlich für den L-Tryptophan Katabolismus zuständig [36,42-44]. Es katalysiert die Reaktion L-Tryptophan zu N-formyl-L-kynurenin, indem es den Pyrrolring des L-Tryptophans oxidativ spaltet [45-47] (Abb.1). Die Verfügbarkeit dieses Enzyms gewährleistet die Proteinsynthese und den Proteinabbau, die Genomreplikation und das Zellwachstum [48,49].

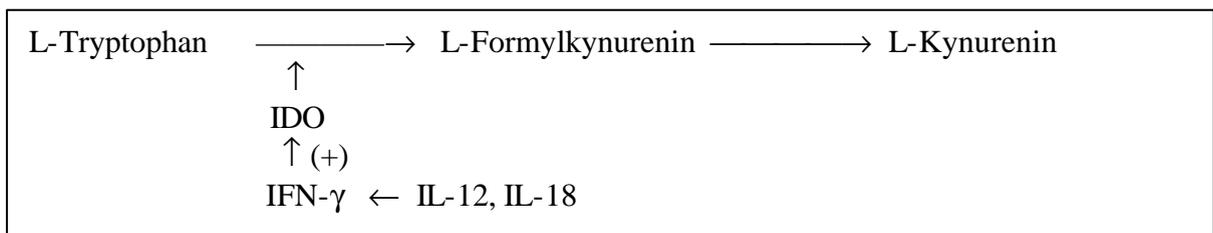
Der Nachweis und die Induktion des Enzyms IDO wurde bei der Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 mit den Zytokinen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 in verschiedenen Konzentrationsansätzen durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurden die Messungen nach Co-Inkubation mit aktivierten peripheren Blutlymphozyten wiederholt.

### 1.7.2.1 IDO Induktion durch IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18

Für eine 96er Flachboden-Mikrotiterplatte, wurden  $1.8 \times 10^6$  Osteosarkomzellen/12ml Medium-1 eingesetzt. 100 $\mu$ l dieser Zelllösung ergaben dann  $1.5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung. Um den L-Tryptophan Stoffwechsel messen zu können wurde eine definierte Menge von 50 $\mu$ g/ml L-Tryptophan (Fa. Sigma) hinzugegeben.

Die Verdünnungsreihen der Zytokine IFN- $\gamma$  [ $10^5$  U/ml] und TNF- $\alpha$  [ $10^4$  U/ml], wurden so angesetzt, dass sich lineare Verdünnungsreihen von 4 U/ml bis 2000 U/ml IFN- $\gamma$  bzw. TNF- $\alpha$  ergaben. Die Zytokine IL-12 und IL-18 wurden nur in zwei Verdünnungen zu je 50ng/ml und 200ng/ml angesetzt.

Nach 72 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Gehalt wurde die Reaktion mit 10 $\mu$ l 30%iger Trichloressigsäure gestoppt und das n-Formylkynurenin durch 30-minütige Inkubation bei 50°C zu Kynurenin hydrolysiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation in einer Heraeus Minifuge-T bei 2000 U/min, wurden 100 $\mu$ l Überstand abgenommen und mit 100 $\mu$ l Ehrlichsreagenz (0.4% pDimethylaminobenzaldehyd in Essigsäure, Fa. Sigma) vermischt. Die Absorption konnte dann bei 490 nm in einem Plattenlesegerät bestimmt werden.



**Abb. 2** Stoffwechselweg des Tryptophans und der IFN- $\gamma$  abhängigen Indolaminoxigenase.

### **1.7.2.2 Herstellung eines zytokinaktivierten Lymphozytenmediums**

Periphere Blutlymphozyten wurden nach dem unter Punkt 1.6.5 beschriebenen Verfahren von einem gesunden menschlichen Spender entnommen und isoliert. Auf einer 6-well Platte wurden die Lymphozyten zu je  $1 \times 10^6$  Zellen/well eingestellt, so dass sich eine Endkonzentration für IL-12 und IL-18 von 30ng/ml und für IFN- $\gamma$  von 2000 U/ml ergab. Um freies IFN- $\gamma$  abzufangen, wurde ein monoklonaler Anti-human IFN- $\gamma$  Antikörper (Nr. MAB285, Fa. R&D Systems, Wiesbaden) mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Das Lymphozytenmedium wurde dann für 48 h unter sterilen Bedingungen bei 5%  $\text{CO}_2$  Begasung und  $37^\circ\text{C}$  Umgebungstemperatur inkubiert.

### **1.7.2.3 Koinkubation von Osteosarkomzellen und Lymphozyten**

Auf einer 96 well Flachboden Mikrotiterplatte wurden  $3.6 \times 10^6$  Osteosarkomzellen/12ml Medium-1 eingesetzt, wonach dann  $100 \mu\text{l}$  dieser Lösung  $3 \times 10^4$  Tumorzellen ergaben. Die isolierten Lymphozyten, wurden mit einer Menge von  $2 \times 10^5$  pro Vertiefung eingesetzt, so dass man eine Lymphozyten-/Tumorzellratio von ca. 6:1 erhielt. Die Konzentration der Zytokine IL-12 [ $5 \mu\text{g/ml}$ ] und IL-18 [ $25 \mu\text{g/ml}$ ] wurde auf 100ng/ml eingestellt. Als Kontrolle wurden auch Proben erstellt, in denen Tumorzellen und Lymphozyten getrennt voneinander gemessen wurden, damit Rückschlüsse auf die IDO Induktion gezogen werden konnten. Die Endkonzentration von L-Tryptophan betrug  $50 \mu\text{g/ml}$ .

Nach 72h Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  wurde die Reaktion mit  $10 \mu\text{l}$  30%iger Trichloressigsäure gestoppt und das n-Formylkynurenin durch 30-minütige Inkubation bei  $50^\circ\text{C}$  zu Kynurenin hydrolysiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation in einer Heraeus Minifuge-T bei 2000 U/min, wurden  $100 \mu\text{l}$  Überstand abgenommen und mit  $100 \mu\text{l}$  Ehrlichsreagenz

(0.4% pDimethylaminobenzaldehyd in Essigsäure, Fa. Sigma) vermischt. Die Absorption konnte dann bei 490 nm in einem Plattenlesegerät bestimmt werden.

#### **1.7.2.4 Induktion der IDO durch Zellkulturüberstände zytokinaktivierter**

##### **Lymphozyten**

Wie unter Punkt 1.7.2.2 beschrieben, wurde ein zytokinaktiviertes Lymphozytenmedium hergestellt. Auf einer 96 well Flachboden Mikrotiterplatte wurden die Osteosarkomzellen mit Medium-1 so eingesetzt, dass sich für jede Vertiefung der Mikrotiterplatte  $3 \times 10^4$  Tumorzellen ergaben. Nach 48 stündiger Inkubation der Lymphozyten wurden die Zelllösung in Röhrchen (Fa. Falcon) aufgenommen und das Zellmaterial für 5 min. bei 2000 U/min abzentrifugiert. Der Zellkulturüberstand konnte so mit einer Transferpipette abgenommen werden und zu gleichen teilen den Tumorzellen zugefügt werden. Die Endkonzentration von L-Tryptophan betrug  $50 \mu\text{g/ml}$ . Um zu sehen ob sich ein IFN- $\gamma$  Effekt blocken ließ, wurde ein monoklonaler Anti-human IFN- $\gamma$  Antikörper (Nr. MAB285, Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden) mit  $1 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt.

Nach 72 Stunden Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  wurde die Reaktion mit  $10 \mu\text{l}$  30%iger Trichloressigsäure gestoppt und das n-Formylkynurenin durch 30-minütige Inkubation bei  $50^\circ\text{C}$  zu Kynurenin hydrolysiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation in einer Heraeus Minifuge-T bei 2000 U/min, wurden  $100 \mu\text{l}$  Überstand abgenommen und mit  $100 \mu\text{l}$  Ehrlichsreagenz (0.4% pDimethylaminobenzaldehyd in Essigsäure, Fa. Sigma) vermischt. Die Absorption konnte dann bei 490 nm in einem Plattenlesegerät bestimmt werden.

### **1.7.3 Durchflusszytometrische Erfassung von Oberflächenantigenen**

#### **1.7.3.1 Beschreibung der FACS<sup>â</sup>-Analyse**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Dabei können die Zellen mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper anhand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden, was eine Unterscheidung von Zellen mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften ermöglicht.

Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine Kapillare mit Überdruck in den Messbereich befördert, wobei das eigentliche Probenmaterial zur Gewährleistung eines kontinuierlichen Flusses von einem Mantelstrom isotoner Pufferlösung umgeben ist. Dieser Druck beschleunigt die Zellen beim Eintreffen am Analysepunkt derartig, dass sie in der Suspension einzeln und perlenkettenartig aneinandergereiht vorliegen. Zellaggregate werden durch diesen Vorgang aufgelöst.

Am Analysenpunkt trifft monochromatisches Licht einer Wellenlänge von 488 nm, das mittels eines fokussierten Argonlaserstrahls generiert wird, auf die Einzelzelle. Jede Zellart streut entsprechend ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile das auftreffende Licht in spezifischer Weise. Der größte Anteil des Lichtes wird vorwärts gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC), nach Ausblendung des ungebrochenen Zentralstrahles, ein Maß für die Größe der Zelle darstellt.

Ein weiterer Teil des Lichtes wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und als Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC, 90-Streulicht) bezeichnet. Das Maß der Seitwärtsstreuung ist von der Granularität der Zelle abhängig.

Die zu bestimmenden Zellen können mit monoklonalen Antikörpern markiert werden, die ihrerseits mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten

Antikörpern handelte es sich um den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Diese Farbstoffe werden durch das vom Laser generierte Licht mit der Wellenlänge 488 nm zur Fluoreszenz angeregt und emittieren daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Das Fluoreszenzspektrum von FITC weist ein Maximum bei 515 nm (gelb-grün), das von Phycoerythrin ein Maximum bei 580 nm (rot-orange) auf. Damit sind die Gipfel der Emissionsmaxima deutlich voneinander zu unterscheiden und können von entsprechenden Detektoren erfasst werden.

Über Spiegel- und Filtersysteme werden die von jeder einzelnen Zelle ausgesandten Fluoreszenz- und Streulichtsignale auf Photoverstärkerröhren geleitet. Diese Signale werden von Detektoren erfasst. Es wird die Amplitude des Pulses bestimmt und zur quantitativen Auswertung auf den angeschlossenen Computer übertragen. Dabei können pro Zelle fünf Einzelparameter simultan erfasst werden : Vorwärtsstreulicht (FSC, forward light scatter), Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward light scatter, 90-Streulicht), Fluoreszenzsignal 1 (FITC), Fluoreszenzsignal 2 (PE), Fluoreszenzsignal 3 (nicht verwendet).

Für jeden dieser Parameter ist der Messbereich in eine definierte Anzahl von Kanälen (hier 1024) eingeteilt, denen der jeweilige Puls entsprechend seiner Intensität zugeordnet wird.

Die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen erfolgte in einem FACScan-Analyser der Fa. Becton Dickinson (Mountain view, USA). Das Gerät ist mit einem 15 mW Argon LASER (488 nm Anregungswellenlänge) und einer Filtereinstellung von 530 nm für die FITC-Fluoreszenz-Detektion ausgerüstet. Durch Einstellung eines Gatters in der Punktdarstellung des Vor- und Seitenstreulichtes wurden Zellrümpfer von der Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung des Fluoreszenzsignales von 3000-5000 Zellen erfolgte anhand eines Histogrammes auf logarithmischer Kanalskala mittels FACScan-Software (Fa. Becton Dickinson). Zur graphischen Darstellung der Histogramme wurde die Transfersoftware LifUtilities Ver. A003 (Hewlett Packard) und WinMDI Ver. 2.8 verwendet.

### **1.7.3.2 Expressionsänderung von ICAM-1 nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$**

An der Osteosarkomzelllinie HOS wurde die Expression des Oberflächenantigens ICAM-1 nach Zugabe der Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bestimmt. Auf einer 6 Well-Platte (Fa. Coster<sup>®</sup>) wurden pro Vertiefung 3 ml Medium vorgelegt und die Osteosarkomzellen zu  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Die Zytokine IFN- $\gamma$  [ $10^5$  U/ml] und TNF- $\alpha$  [ $10^4$  U/ml] sind dann in einer Verdünnungsreihe zu 10U/ml, 100U/ml, und 1000 U/ml IFN- $\gamma$  bzw. zu 50U/ml und 500 U/ml TNF- $\alpha$  eingestellt worden. Anschließend wurde für 72 h bei 37°C inkubiert. Der Zellmonolayer wurde dann mit PBS gewaschen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Vertiefung suspendiert und in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Suspension wurde kurz anzentrifugiert, der Trypsinüberstand abgenommen und mit 1 ml PBS gepuffert. Danach splittete ich die Proben in zwei Teile, so dass ich die Kontrollproben erhielt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1500 U/min für 5 Minuten erfolgte die Abnahme des Überstandes.

Als Antikörper wurde der monoklonale Antikörper AK CD 54-FITC (Fa. Immunotech, Nr. 0726) und zur Negativkontrolle das Negative Control Ig G1 FITC/Ig G1 Phyco (Fa. Immunotech, Nr. 1203) benutzt.

Es wurden jeweils 18  $\mu$ l der Antikörper mit 540 $\mu$ l PBS und 10 $\mu$ l FKS versetzt. Von jeder Mischung wurden jeweils 90  $\mu$ l auf die Zellen in den Eppendorfgefäßen gegeben und 1 Stunde im Kühlschrank bei +4°C inkubiert. Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden dann mit 500 $\mu$ l PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und gemessen.

### **1.7.3.3 Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-I durch exogenes IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18**

An den Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 wurde die Expression der Oberflächenantigene ICAM-1 (CD54) und HLA-I nach externer Zugabe der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 bestimmt. Auf einer 6 Well-Platte (Fa. Coster<sup>®</sup>) wurden pro Vertiefung 3ml Medium vorgelegt und die Osteosarkomzellen zu  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Die Zytokine sind dann auf eine Konzentration von 100ng/ml eingestellt worden. Anschließend wurde für 72 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen des Zellmonolayers mit PBS wurden die Zellen dann mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Vertiefung resuspendiert und in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Suspension wurde kurz anzentrifugiert, der Trypsinüberstand abgenommen und mit 1 ml PBS gepuffert. Danach gab man die Hälfte eines Eppendorfgefäßes auf ein neues Eppendorfgefäß, so dass man insgesamt 12 Proben erhielt. Danach erneute Zentrifugation bei 1500U/min für 5 Min. und Abnahme des Überstandes.

Als Antikörper benutzte ich den monoklonalen AK CD 54-FITC (Nr. IM0544, Fa. Immunotech), HLA-DR (Nr.IM0463, Klon B8.12.2, FITC, Fa. Immunotech) und zur Negativkontrolle das Negative Control Ig G1 FITC/Ig G1 Phyco (Nr.IM0280, Fa. Immunotech).

Es wurden jeweils 90 $\mu$ l der Antikörper mit 2.8ml PBS und 50 $\mu$ l FKS versetzt. Von jeder Mischung gab ich jeweils 100 $\mu$ l auf die Zellen in den Eppendorfgefäßen und inkubierte sie 1h bei +4°C. Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden dann mit 300 $\mu$ l PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und gemessen.

#### **1.7.3.4 Expressionsänderung von ICAM-1 und MHC-I durch exogenes IL-12 und IL-18 in einer Konzentrationsreihe**

An den Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 wurde die Expression der Oberflächenantigene ICAM-1 und HLA-I nach Zugabe der Zytokine IL-12 und IL-18 bestimmt. Auf einer 6 Well-Platte (Fa. Coster®) wurden pro Vertiefung 3ml Medium vorgelegt und die Osteosarkomzellen zu  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Die Zytokine IL-12 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), IL-18 ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) und IFN- $\gamma$  ( $10^5 \text{U/ml}$ ) sind dann in einer Verdünnungsreihe zu  $0 \text{ng/ml}$ ,  $1 \text{ng/ml}$ ,  $10 \text{ng/ml}$ ,  $100 \text{ng/ml}$  und  $1000 \text{ng/ml}$  eingestellt worden. Anschließend wurde für 72h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Zellmonolayer wurde dann mit PBS gewaschen mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Vertiefung suspendiert und in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Suspension wurde kurz anzentrifugiert, der Trypsinüberstand abgenommen und mit 1ml PBS gepuffert. Danach trennte ich die Proben zu zwei gleichen Teilen, um die Kontrollproben zu erhalten. Danach erneute Zentrifugation bei  $1500 \text{U/min}$  für 5 Minuten und Abnahme des Überstandes.

Als Antikörper benutzte ich den monoclonal AK CD 54-FITC (Fa. Immunotech) und zur Negativkontrolle das Negative Control Ig G1 FITC/Ig G1 Phyco (Fa. Immunotech). Es wurden jeweils  $90 \mu\text{l}$  der Antikörper mit  $2.8 \text{ml}$  PBS und  $50 \mu\text{l}$  FKS versetzt. Von jeder Mischung gab ich jeweils  $100 \mu\text{l}$  auf die Zellen in den Eppendorfgefäßen und inkubierte sie 1h bei  $4^\circ\text{C}$ . Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden dann mit  $500 \mu\text{l}$  PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und gemessen.

### **1.7.3.5 Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-I bei Osteosarkomzellen in Co-Inkubation mit aktivierten Lymphozyten**

An der Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 wurde die Expression der Oberflächenantigene ICAM-1 und HLA-I nach Zugabe der Zytokine IL-12 und IL-18 und in Koinkubation mit peripheren Blutlymphozyten bestimmt. Auf einer 6 Well-Platte (Fa. Coster<sup>®</sup>) wurden pro Vertiefung 3ml Medium vorgelegt und die Osteosarkomzellen zu  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Die Gewinnung und Isolation der Lymphozyten ist unter 2.3.4 beschrieben worden. Sie konnten dann mit  $2.5 \times 10^5$  Lymphozyten pro Vertiefung eingesetzt werden, so dass sich ein Lymphozyten/Tumorzellverhältnis von 5:1 ergab. Die Zytokine IL-12 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) und IL-18 ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) sind dann auf  $30 \text{ng/ml}$  eingestellt worden. Zusätzlich wurde ein monoklonaler Anti-human IFN- $\gamma$ -Antikörper mit  $1 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Anschließend wurde für 72h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  Begasung inkubiert. Der Zellmonolayer wurde dann mit PBS gewaschen, mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Vertiefung suspendiert und in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Suspension wurde kurz an zentrifugiert, der Trypsinüberstand abgenommen und mit 1ml PBS gepuffert. Danach trennte man die Proben zu zwei gleichen Teilen, um die Isotyp-Kontrollproben zu erhalten. Danach erneute Zentrifugation bei  $1500 \text{U/min}$  für 5 min. und Abnahme des Überstandes. Als Antikörper verwendete ich die monoklonalen Maus Antikörper HLA-DR (Nr.F-1902, Fa. SIGMA) und ICAM-1 (Nr.F-7143, Fa. DAKO). Die genauen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen sind oben aufgeführt. Es wurden jeweils  $190 \mu\text{l}$  der Antikörper mit  $740 \mu\text{l}$  PBS und  $20 \mu\text{l}$  FKS versetzt. Von jeder Mischung gab ich jeweils  $50 \mu\text{l}$  auf die Zellen in den Eppendorfgefäßen und inkubierte die Suspension 1h auf Eis. Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden dann mit  $500 \mu\text{l}$  PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und gemessen.

Antigen (human)	Antikörper Klon	Endkonz.	Isotyp	Bezugsquelle	Kopplung
HLA-I	W6/32	40µg/ml	IgG2a,κ Maus	SIGMA®	FITC
ICAM-1 (CD54)	6.5B5	20µg/ml	IgG2a,κ Maus	DAKO	FITC

**Tab. 4** Eingesetzte Antikörper zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Oberflächenantigen-Expression auf humanen Osteosarkomzellen.

### **1.7.3.6 Expressionsänderung von ICAM-1 bei Osteosarkomzellen in Koinkubation mit aktivierten Blutlymphozyten in direktem und indirektem Kontakt**

An der Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 wurde die Expressionsänderung des Oberflächenantigens ICAM-1 nach Zugabe der Zytokine IL-12 und IL-18 in Koinkubation mit peripheren Blutlymphozyten bestimmt. Die Gewinnung und Isolation der Lymphozyten ist weiter oben beschrieben worden. Die Lymphozyten hatten direkten Kontakt zu den Tumorzellen. In einem zweiten Versuchsteil wurden die Lymphozyten durch Zellkultureinsätze (Ø 9mm mit 0.45µm Porengröße, Nr.3495, Fa. Falcon) von den Tumorzellen getrennt inkubiert. Auf einer 24 Well-Platte (Fa. Coster®) wurde pro Vertiefung 1ml Medium vorgelegt und die Osteosarkomzellen zu  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Die Lymphozyten konnten dann mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung eingesetzt werden, so dass sich ein Lymphozyten/Tumorzellverhältnis von 5:1 ergab. Die einzelnen Zellsuspensionen sind mit den Zytokinen IL-12 (5µg/ml) und IL-18 (25µg/ml) dann auf je 30ng/ml eingestellt worden. Zusätzlich wurde ein monoklonaler Anti-human IFN-γ-Antikörper mit 1µ/ml eingesetzt. Anschließend wurde für 72h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach Entfernung der Zellkultureinsätze, wurde der Zellmonolayer dann mit PBS gewaschen, der Rückstand mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Vertiefung suspendiert und in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Suspension wurde kurz anzentrifugiert, der Trypsinüberstand

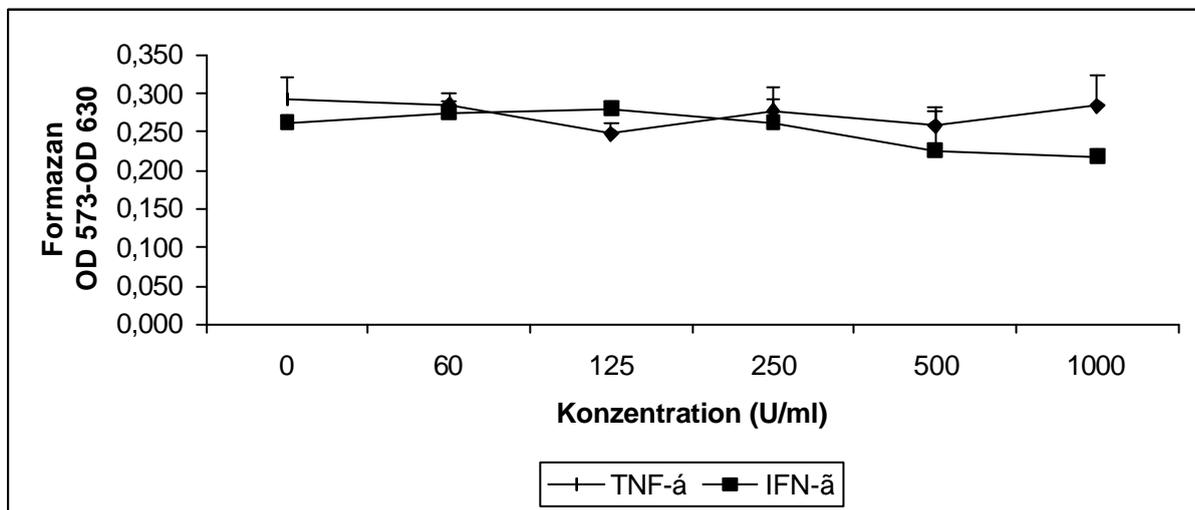
abgenommen und mit 1ml PBS gepuffert. Danach trennte man die Proben in zwei gleiche Teile, um die Isotyp-Kontrollproben zu erhalten. Danach wurde erneut bei 1500U/min für 5 min. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Als Antikörper verwendete ich den monoklonalen Maus Antikörper ICAM-1 (Nr.F-7143, Fa. DAKO) und als Isotypkontrolle den Maus Antikörper IgG2a, $\kappa$  (Nr.F-6522, Fa. SIGMA<sup>®</sup>). Die genauen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Es wurden jeweils 250 $\mu$ l der Antikörper mit 1000 $\mu$ l PBS und 25 $\mu$ l FKS versetzt. Von jeder Mischung gab ich jeweils 50 $\mu$ l auf die Zellen in den Eppendorfgläsern und inkubierte die Suspension 1h auf Eis. Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden dann mit 500 $\mu$ l PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und gemessen.

## Ergebnisse

### 1.8 Zytotoxizitätsbestimmung mit dem MTT-Assay nach Zytokinapplikation

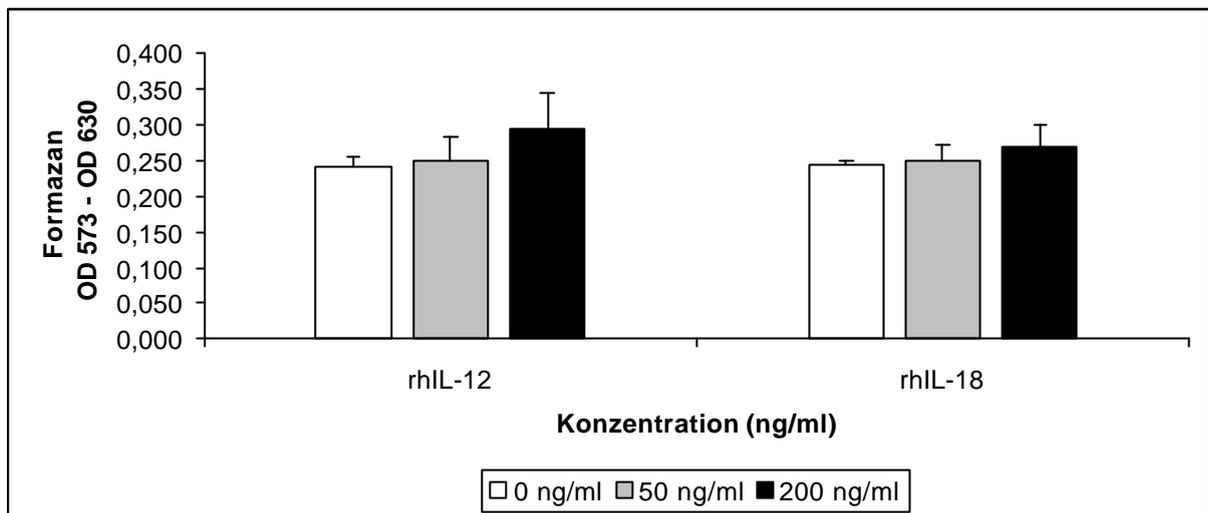
Mit Hilfe des MTT-Assay ist die Zytotoxizität der verwendeten Zytokine in einer festgelegten Konzentrationsreihe bestimmt worden. Hiermit sollte zum einen die Zytotoxizität der Zytokine selbst und zum anderen die notwendige Ausgangskonzentration für die Zytokinapplikation ermittelt werden. Dargestellt wird die optische Dichte des Zellkulturmediums, die äquivalent die Vitalität der Osteosarkomzellen wiedergibt.

Eine Veränderung der Vitalität bei den HOS Zellen unter TNF- $\alpha$  Einfluss bis 1000U/ml ist nur gering (Vitalitätsabnahme 2.7%). IFN- $\gamma$  hingegen, zeigt eine signifikante Reduzierung der vitalen Tumorzellen (Vitalitätsabnahme 17.1%,  $p < 0.01$ , Abb. 3). Der Kurvenverlauf für TNF- $\alpha$  lässt keinen Abfall erkennen, bei 250U/ml IFN- $\gamma$  hingegen wird ein deutlicher Abfall erkennbar.



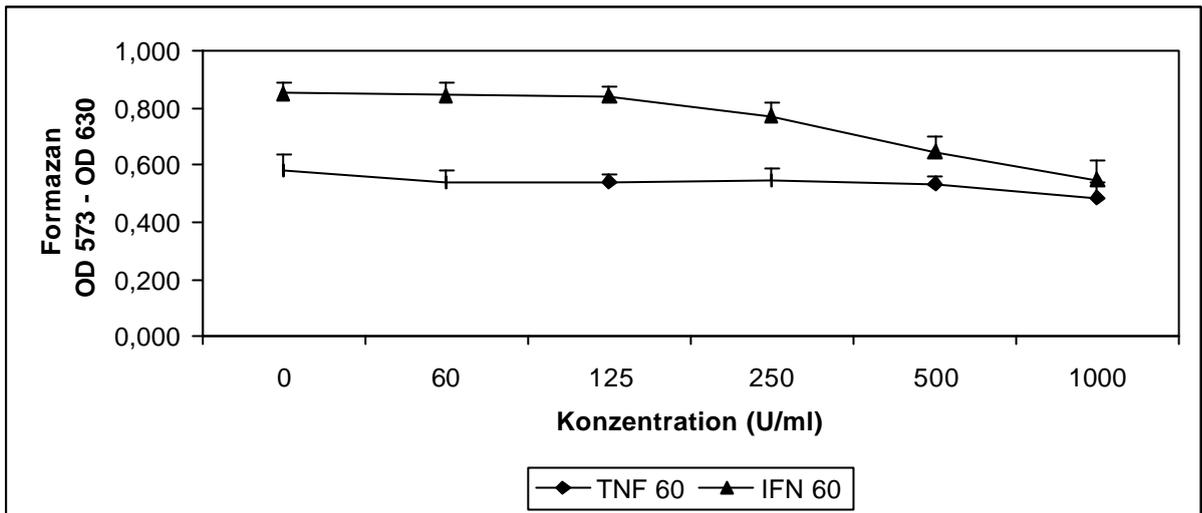
**Abb. 3** Vitalität von HOS Zellen 60min nach TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Gabe in einer festgelegten Konzentrationsreihe. Dargestellt wird die optische Dichte des Zellkulturmediums  $\pm$  SA. Die Dichte gibt äquivalent die Vitalität der Osteosarkomzellen wieder.

Die direkte Wirkung der Zytokine IL-12 und IL-18 in einer Konzentration von 50 ng/ml zeigt keine nennenswerte Veränderung der Zellvitalität. Bei einer Zytokinkonzentration von 200ng/ml ist die Menge der vitalen Tumorzellen am größten.



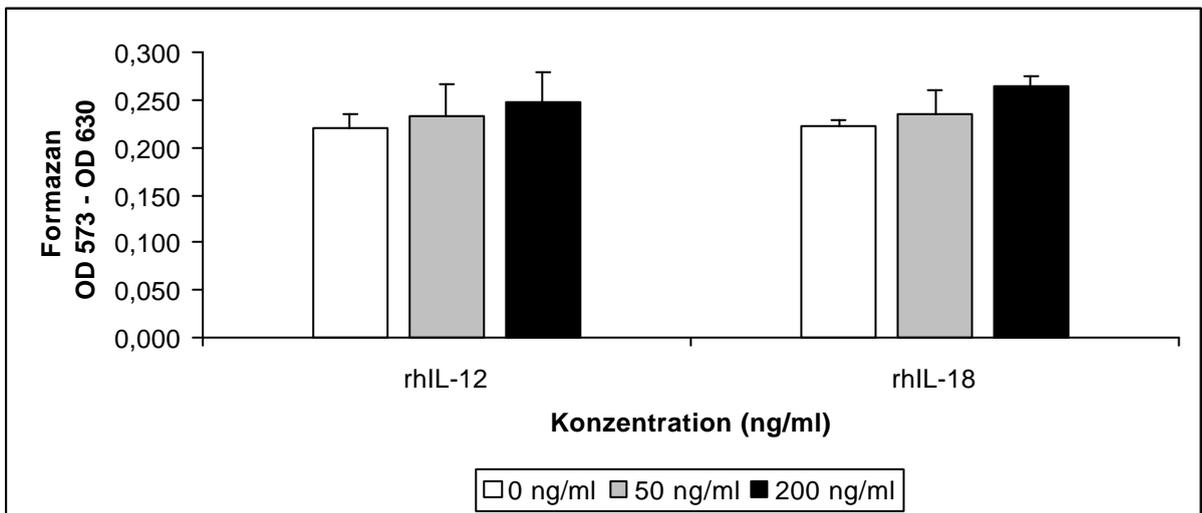
**Abb. 4** Vitalität von HOS Zellen 60min nach IL-12 und IL-18 Applikation bei 0ng/ml (Kontrolle), 50ng/ml und 200ng/ml IL-12 bzw. IL-18. Dargestellt wird die optische Dichte des Zellkulturmediums  $\pm$  SA. Die Dichte gibt äquivalent die Vitalität der Osteosarkomzellen wieder.

Sowohl die Applikation von 1000U/ml TNF- $\alpha$  als auch von 1000U/ml IFN- $\gamma$  bei MG-63 Zellen führt zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität (1000U/ml TNF- $\alpha$  vers. Kontrolle,  $p < 0,05$ ; 1000U/ml IFN- $\gamma$  vers. Kontrolle,  $p < 0,01$ ). Die Vitalitätsabnahme lag unter TNF- $\alpha$  Einfluss bei 16,6%. Sehr sensibel reagierten die Tumorzellen auf IFN- $\gamma$  mit 35,5% Vitalitätsabnahme. Die Vitalität nimmt unter Konzentrationszunahme von TNF- $\alpha$  kontinuierlich ab. Bei Steigerung der IFN- $\gamma$  Konzentration nimmt die Vitalität deutlich bei 250U/ml ab (**Abb. 5**).



**Abb. 5** Vitalität von MG-63 Zellen 60min nach TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Gabe in einer festgelegten Konzentrationsreihe. Dargestellt wird die optische Dichte des Zellkulturmediums  $\pm$  SA. Die Dichte gibt äquivalent die Vitalität der Osteosarkomzellen wieder.

Auch bei den MG-63 Zellen ergab die direkte Zugabe der Zytokine IL-12 und IL-18 eine geringe Steigerung der Vitalität nach Erhöhung der Interleukinkonzentration (Abb. 6).



**Abb. 6** Vitalität von MG-63 Zellen 60min nach IL-12 und IL-18 Applikation bei 0ng/ml (Kontrolle), 50ng/ml und 200ng/ml IL-12 bzw. IL-18. Dargestellt wird die optische Dichte des Zellkulturmediums  $\pm$  SA. Die Dichte gibt äquivalent die Vitalität der Osteosarkomzellen wieder.

In diesem Versuchsabschnitt konnte der zytotoxische Effekt von IFN- $\gamma$  an humanen Osteosarkomzellen gezeigt werden. Die Sensibilität der Osteosarkomzellen ist gegenüber IFN- $\gamma$  Applikation wesentlich höher als unter TNF- $\alpha$  Applikation. Basierend auf dieser Grundlage nimmt IFN- $\gamma$  eine zentrale Rolle für die folgenden Versuchsabschnitte ein.

## **1.9 Nachweis der IDO-Induktion**

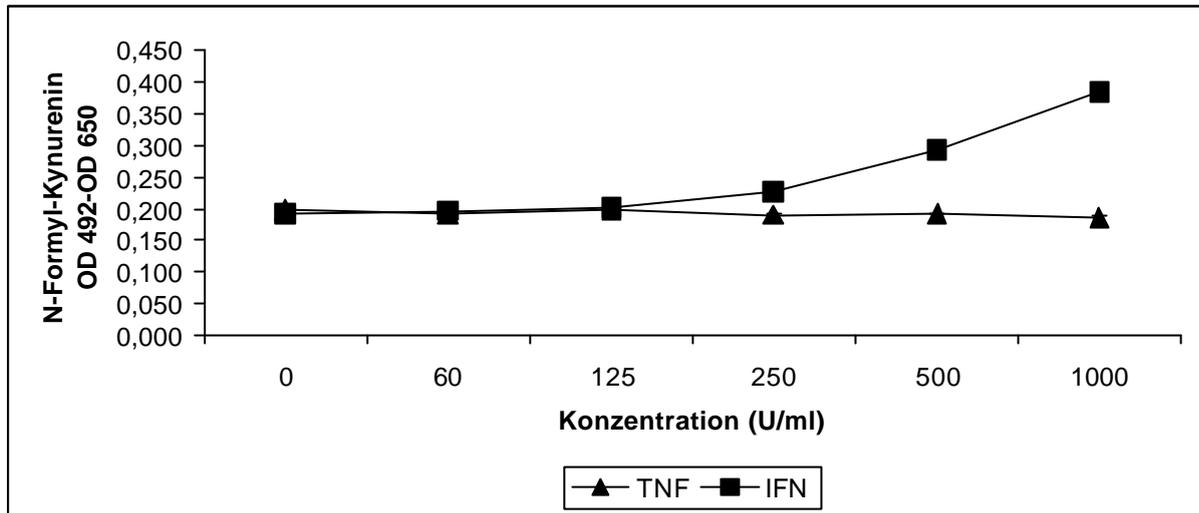
### **1.9.1 IDO-Induktion durch IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18**

Zunächst wurde die relative IDO Aktivität der Osteosarkomzellen HOS und MG-63 in einer Konzentrationsreihe mit den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bestimmt. Hierbei zeigten die Zelllinien in einer Konzentrationsreihe mit IFN- $\gamma$  eine Erhöhung der relativen IDO Aktivität, durch TNF- $\alpha$  konnte die relative IDO Aktivität für die Zelllinien nicht gesteigert werden. Durch IFN- $\gamma$  konnte bei den HOS Zellen ab einer Konzentration von 125U/ml und bei den MG-63 Zellen ab einer Konzentration von 62U/ml ein deutlicher Anstieg der IDO Aktivität festgestellt werden. Bei TNF- $\alpha$  dagegen ergab selbst eine Konzentrationssteigerung bis 1000U/ml keine IDO Induktion.

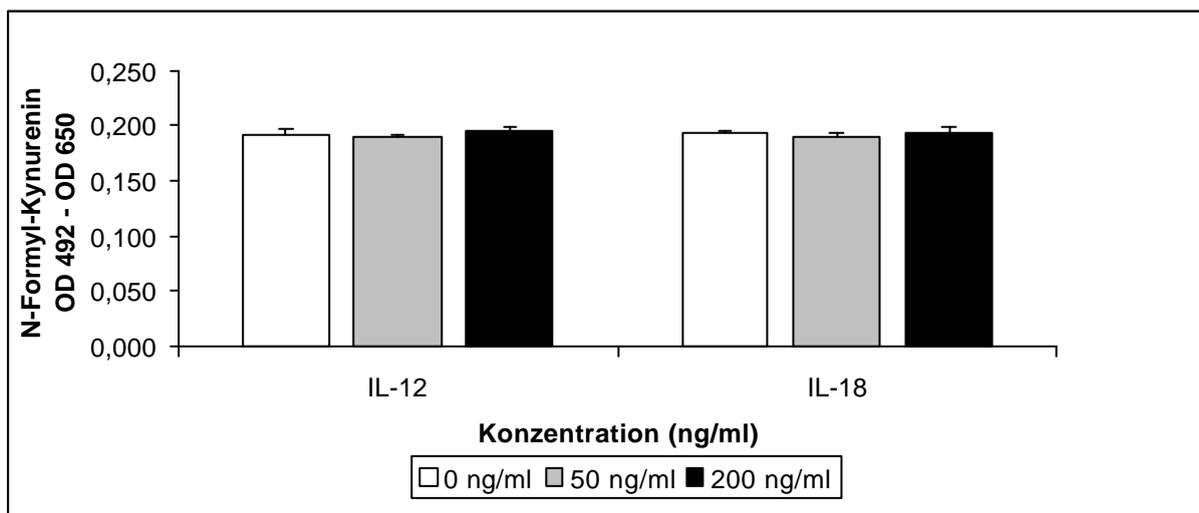
Bei der untersuchten Zelllinie HOS besteht zwischen der IFN- $\gamma$  Konzentration und der relativen IDO Aktivität eine hohe signifikante Korrelation ( $r=0.969$ ,  $p<0.01$ ). Bei der Zelllinie MG-63 besteht zwischen steigender IFN- $\gamma$  Konzentration und relativer IDO Aktivität nur eine mittlere nicht signifikante Korrelation ( $r=0.672$ ). Zwischen der steigenden TNF- $\alpha$  Konzentration und der relativen IDO Aktivität besteht bei den HOS Zellen ( $r=-0.808$ ) und bei den MG-63 Zellen ( $r=0.01$ ) jedoch keine Korrelation.

Die Zytokine IL-12 und IL-18 wurden der HOS Zelllinie exogen in einer Konzentrationsreihe von 0ng/ml (Kontrolle), 50ng/ml und 200ng/ml zugeführt. Durch die Zytokine IL-12 und IL-

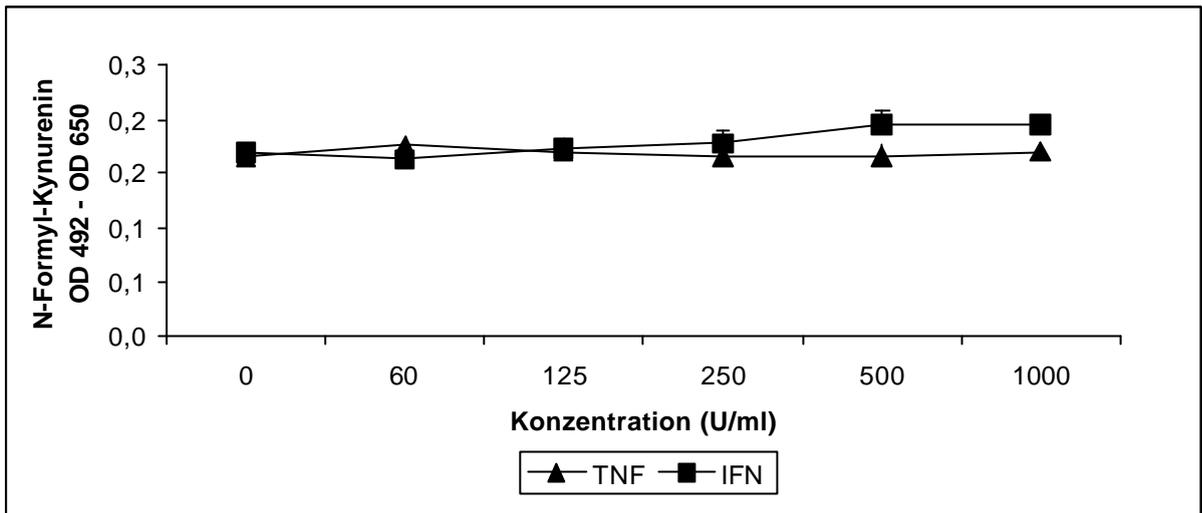
18 konnte keine nennenswerte Induktion der IDO gezeigt werden (Abb. 8). Für die Zelllinie MG-63 zeigt sich eine sehr signifikante Steigerung gegenüber der Kontrollreihe mit 200ng/ml IL-12 ( $p < 0.01$ ) und 200ng/ml IL-18 ( $p < 0.01$ ), (Abb. 10).



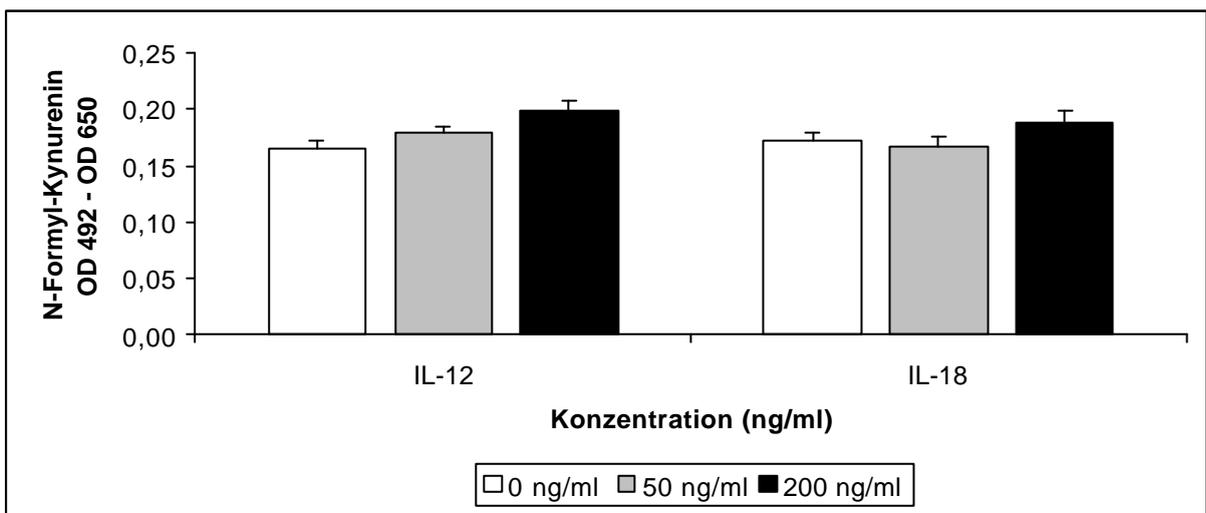
**Abb. 7** Induktion der IDO Aktivität in HOS Zellen durch exogene Zytokine (IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) in einer Konzentrationsreihe. Der Anstieg der Kurve unter IFN- $\gamma$  Gabe beginnt bei 250U/ml. Ab dieser Konzentration wird eine deutliche IDO Induktion nachweisbar. TNF- $\alpha$  dagegen weist im Kurvenverlauf keinen Anstieg auf.



**Abb. 8** Induktion der IDO Aktivität in HOS Zellen durch exogene Zytokine (IL-12 und IL-18). Bei einer Interleukinkonzentration von 200ng/ml kommt es für IL-12 und IL-18 zu einer geringen Steigerung der IDO Induktion. Diese beträgt für IL-12 2.6% und für IL-18 0.5%.



**Abb. 9** Induktion der IDO Aktivität in MG-63 Zellen durch exogene Zytokine. Die IDO Induktion lässt sich mit IFN- $\gamma$  ab einer Konzentration von 250 U/ml steigern. TNF- $\alpha$  hat in der Konzentrationsreihe keinen Einfluss auf die IDO Induktion.



**Abb. 10** Induktion der IDO Aktivität in MG-63 Zellen durch exogene Zytokine. Mit einer IL-12 Konzentration von 200ng/ml kann die IDO Aktivität um 21,3 % signifikant ( $p < 0,01$ ) gesteigert werden, mit einer IL-18 Konzentration von 200ng/ml um 9,9 % ( $p < 0,01$ ). Bei einer Interleukinkonzentration von 200ng/ml wird durch IL-12 gegenüber IL-18 eine höhere IDO Induktion von 5,3 % erreicht.

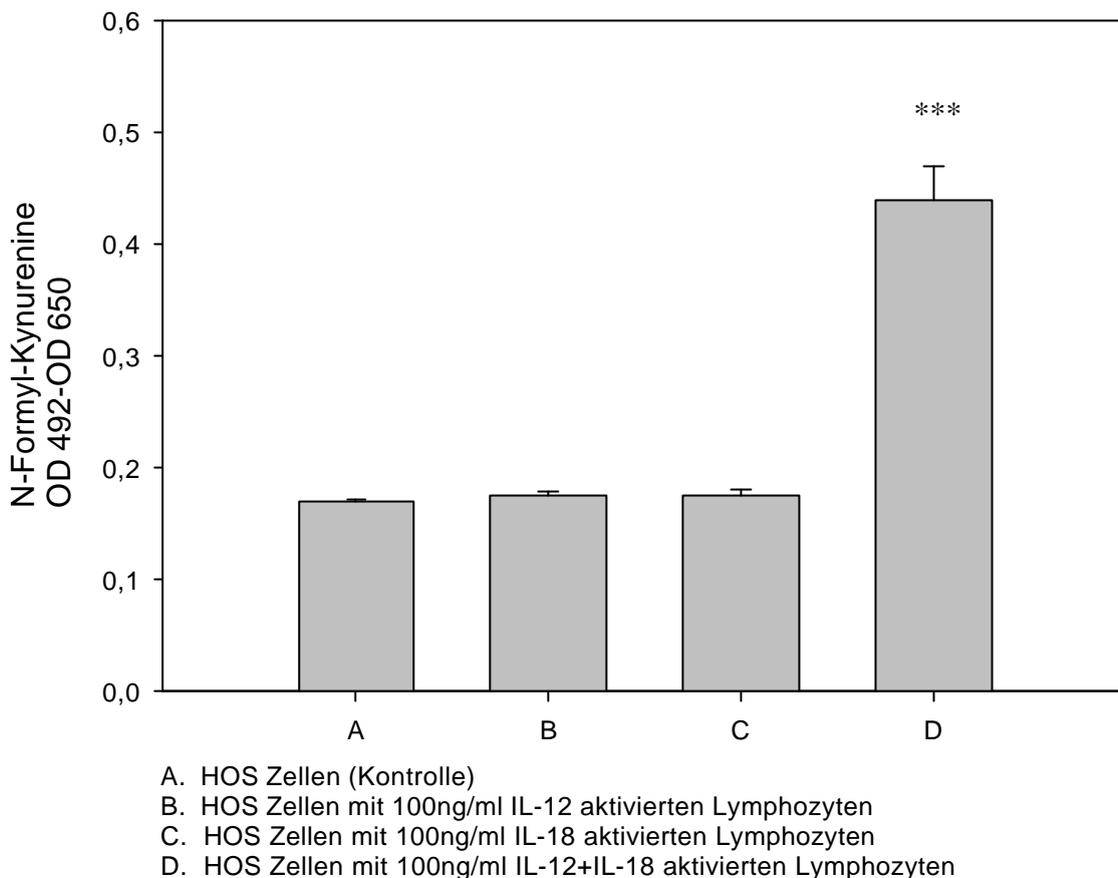
Durch die direkte Zugabe von IL-12 und IL-18 konnte für die Zelllinie MG-63 eine Steigerung der IDO Induktion ohne Koinkubation mit Lymphozyten erreicht werden. So konnte die IDO Induktion ohne die exogene Wirkung von IFN- $\gamma$  erfolgen.

### **1.9.2 Induktion der IDO nach Inkubation mit zytokinaktivierten Lymphozyten**

In Koinkubation wurden humane periphere Blutlymphozyten mit Osteosarkomzellen der Zelllinien HOS und MG-63 inkubiert. Unter Zusatz von IL-12 und IL-18 mit einer Endkonzentration von jeweils 100ng/ml kam es zur Aktivierung der Lymphozyten. Die Kontrollreihe bestand aus unbehandelten Tumorzellen. So konnte die IDO Aktivität jeweils im Vergleich zur Kontrollreihe errechnet und angegeben werden.

Um zu prüfen, ob sich das Enzym IDO auch in humanen peripheren Blutlymphozyten induzieren lässt, wurde unter gleichen Versuchsbedingungen, einer Testreihe mit den verwendeten Lymphozyten, die selben Zytokinkonzentrationen und Kombinationen zugeführt.

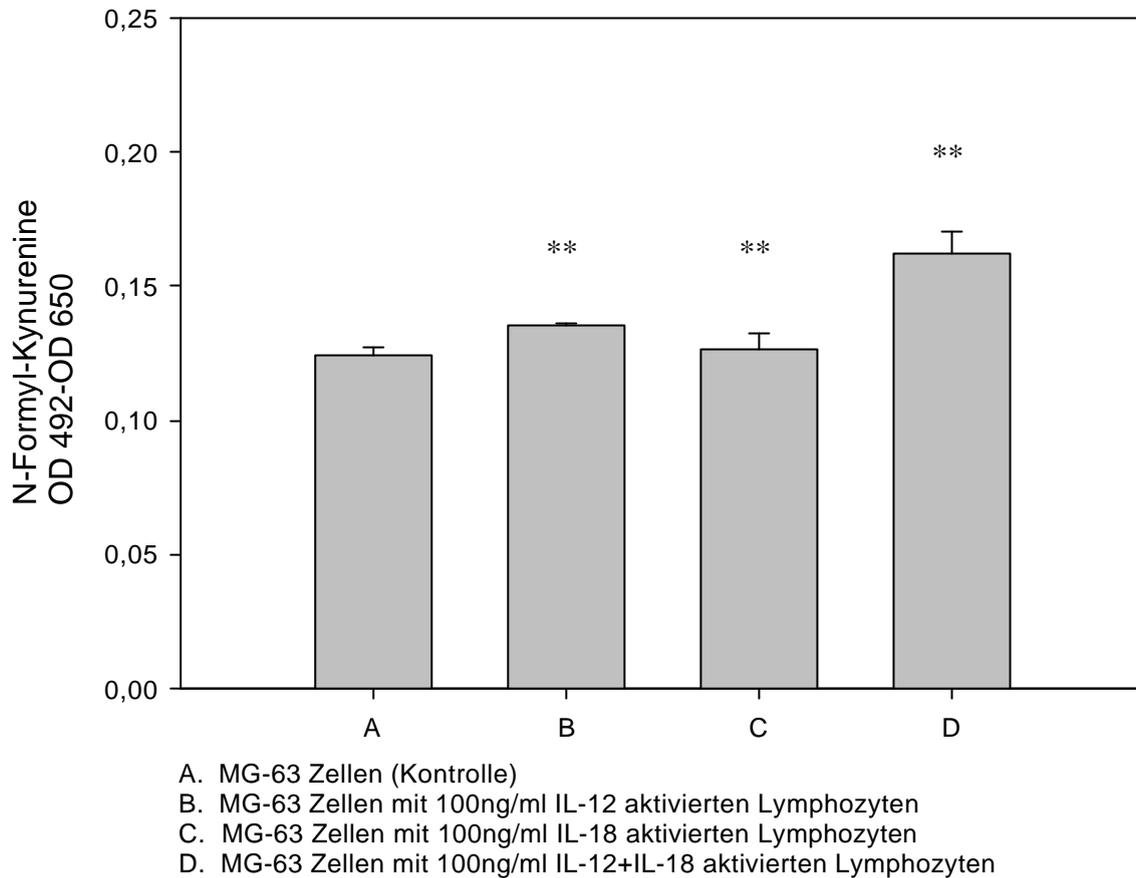
Die Inkubation der HOS Zellen mit zytokinaktivierten Lymphozyten zeigt eine Erhöhung der IDO Aktivität. Lymphozyten die mit IL-12 und IL-18 allein aktiviert wurden zeigen eine geringe IDO Aktivitätserhöhung. Durch IL-12 ( $m=175 \pm 0.007$ ) wurde eine Erhöhung der IDO-Aktivität um 2.9% und für IL-18 ( $m=176 \pm 0.01$ ) eine Erhöhung um 3.5% erreicht. Die kombinierte Aktivierung der Lymphozyten mit IL-12 und IL-18 ( $m=440 \pm 0.058$ ,  $p<0.001$ ), kann die IDO Aktivität im Vergleich zur Kontrollreihe ( $m=170 \pm 0.005$ ) sehr signifikant um 61.4 % steigern (Abb. 7). Im Vergleich zu den Einzelapplikationen mit IL-12 (60.3%,  $p<0.001$ ) und IL-18 (60%,  $p<0.001$ ) kann durch die Kombination von IL-12 und IL-18 ebenfalls eine höchst signifikante Steigerung erreicht werden (Abb. 11).



**Abb. 11** Induktion der IDO Aktivität in HOS Zellen durch zytokinaktivierte Lymphozyten. Die Stimulierung erfolgte mit **B.** 100ng/ml IL-12 und **C.** 100ng/ml IL-18 und deren Kombination **D.** Als Kontrolle **A.** dienen nicht-stimulierte HOS Zellen. \*\*\* $p < 0.001$  vers. A. (Kontrolle HOS Zellen).

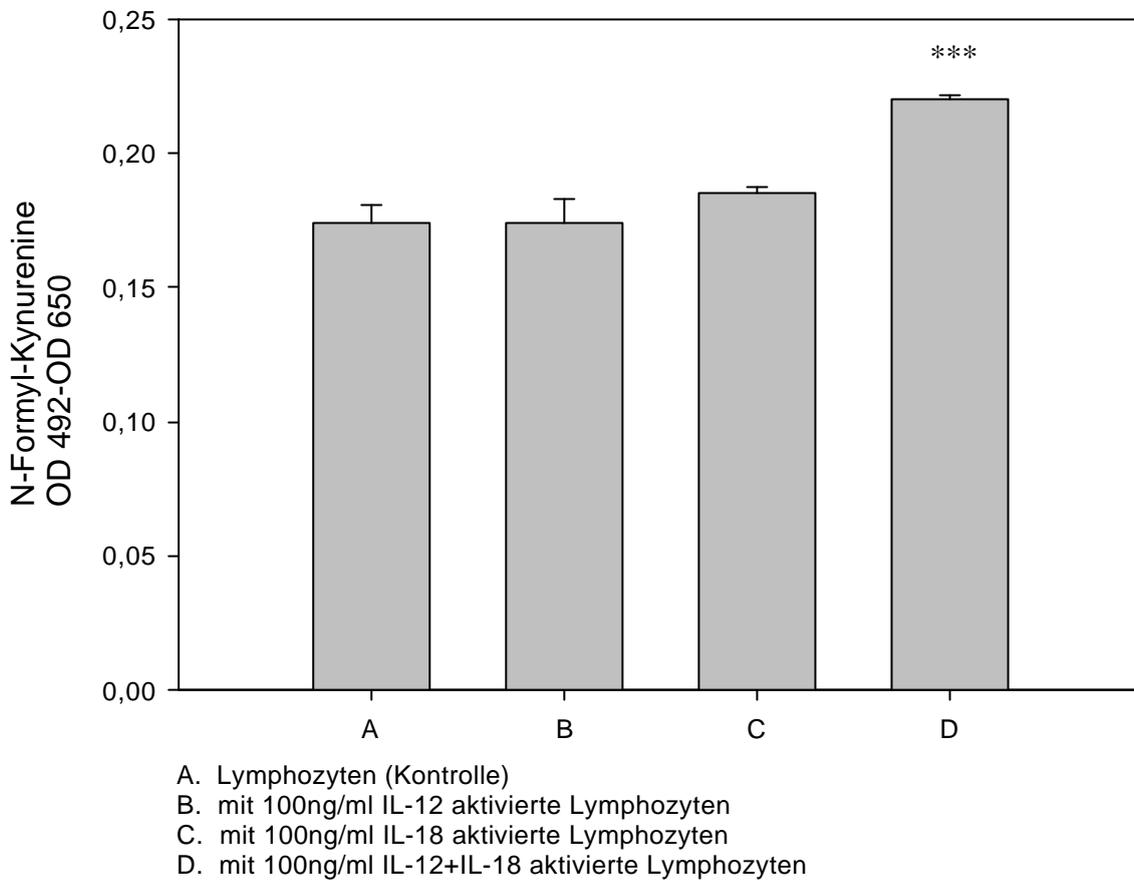
Die Induktion bzw. die IDO Aktivität lässt sich auch an der MG-63 Zelllinie bestimmen. Man kann auch hier eine Zunahme der IDO Aktivität durch die Kombination von IL-12 und IL-18 erkennen. Die Aktivierung der Lymphozyten mit IL-12 und IL-18 getrennt ergeben für IL-12 ( $m=135 \pm 0.002$ ,  $p < 0.01$ ) eine signifikante IDO Aktivitätserhöhung um 8.1% und für IL-18 eine Erhöhung um 2.4% ( $m=127 \pm 0.014$ ) im Vergleich zur Kontrollreihe ( $m=124 \pm 0.008$ ). Bei der Kombination von IL-12 und IL-18 ( $m=162 \pm 0.019$ ,  $p < 0.01$ ), ergibt sich eine sehr signifikante Aktivitätserhöhung von 23.5% im Vergleich zur Kontrollreihe ( $m=124 \pm 0.008$ ). Gegenüber den Einzelgaben von IL-12 und IL-18 konnte wiederum mit dieser

Interleukinkombination eine signifikante (IL-12+IL-18 vers. IL-12: 16.7%,  $p<0.01$  und IL-12+IL-18 vers. IL-18: 21.6%,  $p<0.01$ ) Erhöhung der IDO Aktivität erreicht werden (Abb. 12).



**Abb. 12** Induktion der IDO Aktivität in MG-63 Zellen durch zytokinaktivierte Lymphozyten. Die Stimulierung erfolgte mit **B.** 100ng/ml IL-12 und **C.** 100ng/ml IL-18 und deren Kombination **D.** Als Kontrolle **A.** dienen nicht-stimulierte MG-63 Zellen. \*\* $p<0.01$  vers. A. (Kontrolle MG-63 Zellen).

### 1.9.3 Induktion der IDO in humanen Blutlymphozyten



**Abb. 13** Induktion der IDO Aktivität in peripheren Lymphozyten mit je **B.** 100ng/ml IL-12, **C.** 100ng/ml IL-18 und deren Kombination **D.** \*\*\* $p < 0,001$  vers. A (Kontrolle Lymphozyten).

Auch in den verwendeten Lymphozyten konnte eine Induktion des Enzyms IDO teilweise nachgewiesen werden. Durch IL-12 ( $m=174 \pm 0,019$ ) konnte keine IDO Aktivitätserhöhung erreicht werden. Die IL-18 Stimulation ( $m=185 \pm 0,005$ ) ergab eine Steigerung um 5,9% und die Kombination von IL-12 und IL-18 ( $m=220 \pm 0,004$ ) eine höchst signifikante Steigerung um 20,9% ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $m=174 \pm 0,013$ ).

Das Ausmaß der IDO Aktivitätserhöhung der Lymphozyten im Vergleich zur IDO Aktivitätserhöhung der Osteosarkomzellen HOS und MG-63 ist für IL-12 und der

Kombination von IL-12 und IL-18 geringer. Die alleinige Stimulation mit IL-18, ergab jedoch eine höhere IDO Aktivität an den Lymphozyten als an den Osteosarkomzellen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Beeinflussung des Tryptophanstoffwechsels, im wesentlichen durch die Kombination mit IL-12 und IL-18 an den Osteosarkomzellen stattfand. Der Vergleich der Kombination von IL-12 und IL-18 mit den Einzelapplikationen dieser Interleukine ergibt eine signifikante Steigerung der IDO Aktivität (IL-12+IL-18 vers. IL-12 20.9%,  $p < 0.01$  und IL-12+IL-18 vers. IL-18 15.9%,  $p < 0.001$ ).

	HOS	MG-63	Lymphozyten
IL-12	2.9%	8.1%	0%
IL-18	3.4%	2.4%	5.9%
IL-12+IL-18	61.4%	23.5%	20.9%

**Tab. 5** Dargestellt werden die IDO Aktivitäten der Zelllinien HOS, MG-63 und die peripher Blutlymphozyten. Die einzelnen Werte stellen die prozentuale Erhöhung der IDO Aktivität durch IL-12 und IL-18 im Vergleich zur Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen) dar.

#### 1.9.4 Induktion der IDO durch Lymphozytenkulturüberstand

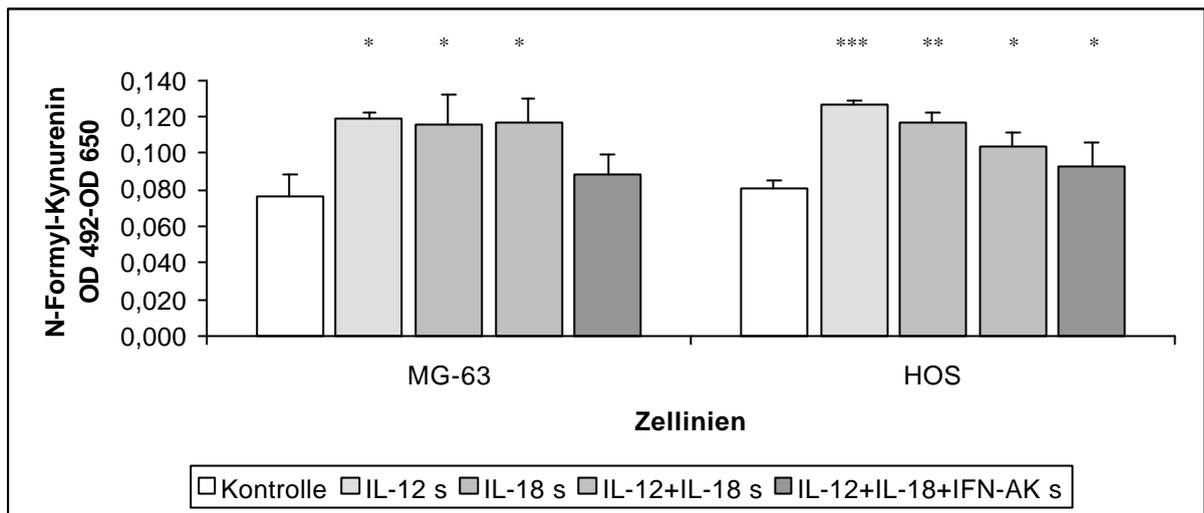
Frisch isolierte humane periphere Blutlymphozyten wurden zusammen mit den Zytokinen IL-12 und IL-18 inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der entstandene Überstand den Osteosarkomzellkulturen zugeführt um die Induktion der IDO einzuleiten. Zusätzlich wurde während der Inkubation ein IFN- $\gamma$  Antikörper eingesetzt um den gesamten IFN- $\gamma$  Anteil aus dem Medium abzufangen. Anschließend konnte die IDO Aktivität der Osteosarkomzellen bestimmt werden. Verglichen werden die Mittelwerte der unbehandelten Kontrollreihe mit den Mittelwerten der einzelnen Untersuchungsreihen.

Der Überstand mit IL-12 allein, konnte die IDO Aktivität bei den HOS und MG-63 Zellen erhöhen. Es konnte eine signifikante IDO-Aktivitätserhöhung bei den HOS Zellen ( $p < 0.001$ ) und bei den MG-63 Zellen ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden.

Der Überstand mit IL-18 allein, zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der IDO Aktivität der HOS Zellen ( $p < 0.01$ ) Zellen und der MG-63 Zellen ( $p < 0.05$ ). Bei beiden Zelllinien kann durch IL-12 gegenüber IL-18 eine höhere IDO Aktivität erreicht werden. Mit der Kombination von IL-12 und IL-18 konnte ebenfalls die IDO Aktivität bei den HOS Zellen ( $p < 0.05$ ) und den MG-63 Zellen ( $p < 0.05$ ) gesteigert werden.

Mit Hilfe des IFN- $\gamma$  Antikörpers wurde freies IFN- $\gamma$  im Zellmedium gebunden und bewiesen, dass IFN- $\gamma$  für die IDO Induktion von wesentlicher Bedeutung ist. Die Untersuchungsreihen mit der Kombination aus IL-12 und IL-18, zeigten nach IFN- $\gamma$  Blockierung eine Reduktion der IDO Aktivität. Eine signifikante IFN- $\gamma$  Blockierung konnte für MG-63 ( $p < 0.05$ ) nachgewiesen werden. Nach IFN- $\gamma$  Blockierung ergibt sich für die HOS Zellen und für die MG-63 Zellen eine IFN- $\gamma$  unabhängige Restaktivität der IDO innerhalb der Probe mit der Kombination von IL-12 und IL-18. Die Restaktivität der IDO nach IFN- $\gamma$  Blockierung beträgt für die HOS Zellen 10.6% und für die MG-63 Zellen 24.8%.

Da die Erhöhung der IDO Induktion nicht vollständig geblockt werden konnte, muss ein separater Mechanismus vorhanden sein der eine IFN- $\gamma$  unabhängige IDO Induktion verursacht.



**Abb. 14** Induktion des Enzyms IDO durch lymphozytenkonditioniertes Medium. Die Osteosarkomzellen wurden mit dem Überstand von Lymphozyten inkubiert die zuvor mit 100ng/ml IL-12 und 100ng/ml IL-18 und deren Kombination aktiviert worden sind. Als Kontrolle (ÿ) dienten unbehandelte Osteosarkomzellen. (s)=supernatant \*p<0.05, \*\*p<0.01 und \*\*\*p<0.001 vers. Kontrolle.

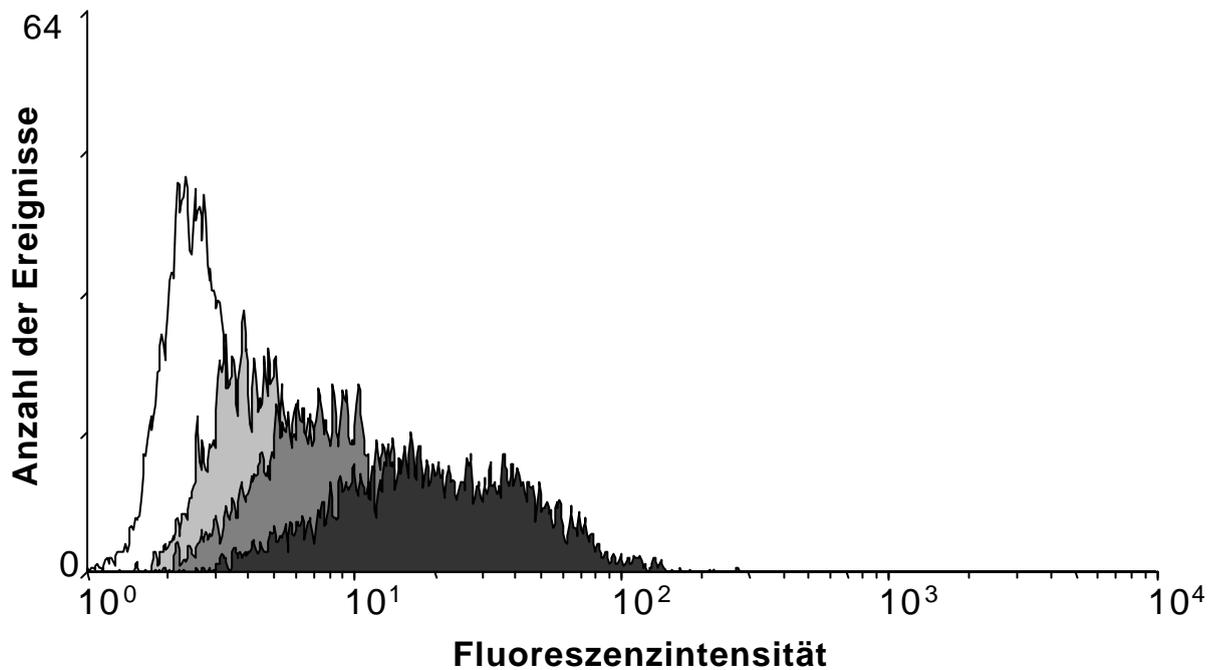
## 1.10 Nachweis und Induktion der HLA-I und ICAM-1 Expression

### 1.10.1 Expressionsänderung von ICAM-1 durch IFN-g und TNF-a

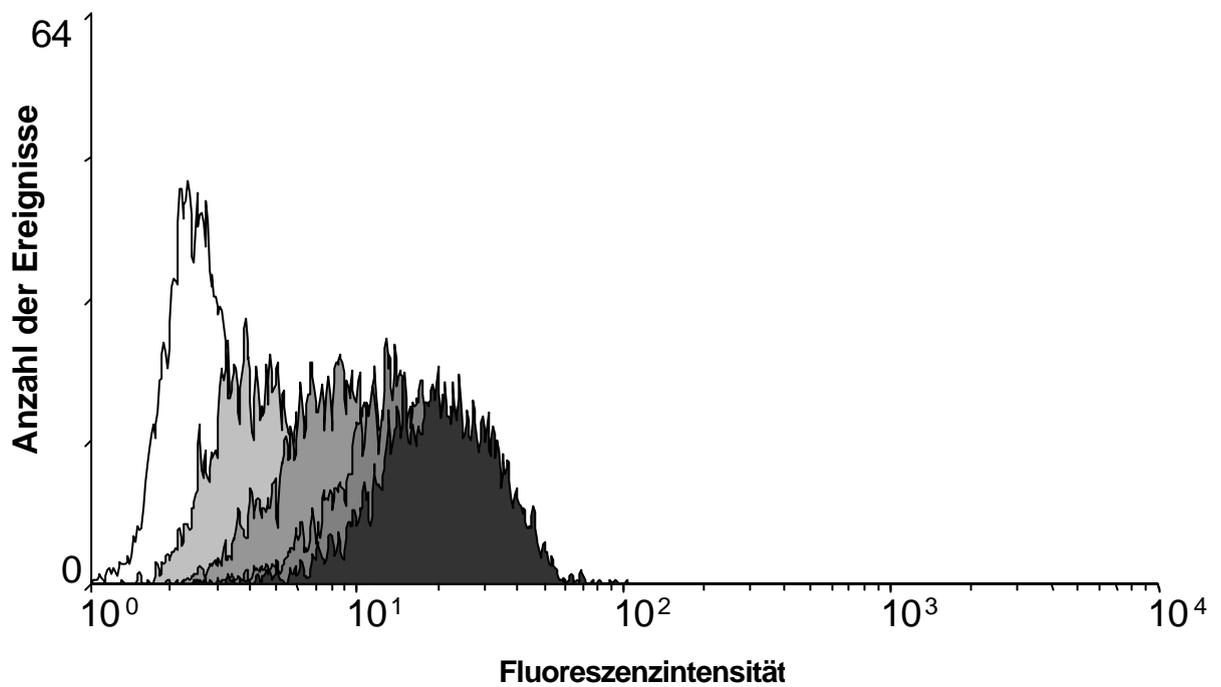
Es konnte bereits gezeigt werden das die Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  einen Einfluss auf den Stoffwechsel von humanen Osteosarkomzellen haben. In diesem Ergebnisteil wird mittels durchflusszytometrischer Messung die Expressionsänderung des Oberflächenmoleküls ICAM-1 an HOS Zellen bestimmt. Die exogene Zugabe von TNF- $\alpha$  zur Osteosarkomzellkultur konnte die Expression des Oberflächenmoleküls ICAM-1 verstärken. Bei einer TNF- $\alpha$  Konzentration von 50U/ml (M=4.83), konnte gegenüber der Kontrolle (M=2.11) eine Steigerung von 56.3%, bei 500U/ml (M=16.89) eine Steigerung von 87.5% im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (Abb. 15).

Auch die exogene Applikation von IFN- $\gamma$  konnte unter Konzentrationserhöhung eine Steigerung der ICAM-1 Expression bewirken. 10U/ml IFN- $\gamma$  (M=5.95) bewirkten eine

Steigerung um 64.5%, 100U/ml IFN- $\gamma$  (M=11.96) eine Steigerung um 82.4% und 1000U/ml IFN- $\gamma$  (M=17.73) eine Steigerung um 88% im Vergleich zur Kontrolle (M=2.11, Abb. 16).



**Abb. 15** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung des Oberflächenmoleküls ICAM-1 auf HOS Zellen nach exogener TNF- $\alpha$  Inkubation. Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung der FACS-Signale durch graphische Überlagerung der Histogramme.  unspezifischer Kontrollantikörper,  ICAM-1 Expression auf HOS Zellen,  ICAM-1 Expression auf HOS Zellen nach 50U/ml TNF- $\alpha$ ,  ICAM-1 Expression auf HOS Zellen nach 500U/ml TNF- $\alpha$ .



**Abb. 16** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung des Antigens ICAM-1 auf HOS Zellen nach exogener IFN- $\gamma$  Inkubation. Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung der FACS-Signale durch graphische Überlagerung der Histogramme.  unspezifischer Kontrollantikörper,  ICAM-1 Expression auf HOS Zellen,  ICAM-1 Expression auf HOS Zellen nach 10U/ml IFN- $\gamma$ ,  ICAM-1 Expression auf HOS Zellen nach 100U/ml IFN- $\gamma$ ,  ICAM-1 Expression auf HOS Zellen nach 1000U/ml IFN- $\gamma$ .

### 1.10.2 Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-I durch IL-12 und IL-18

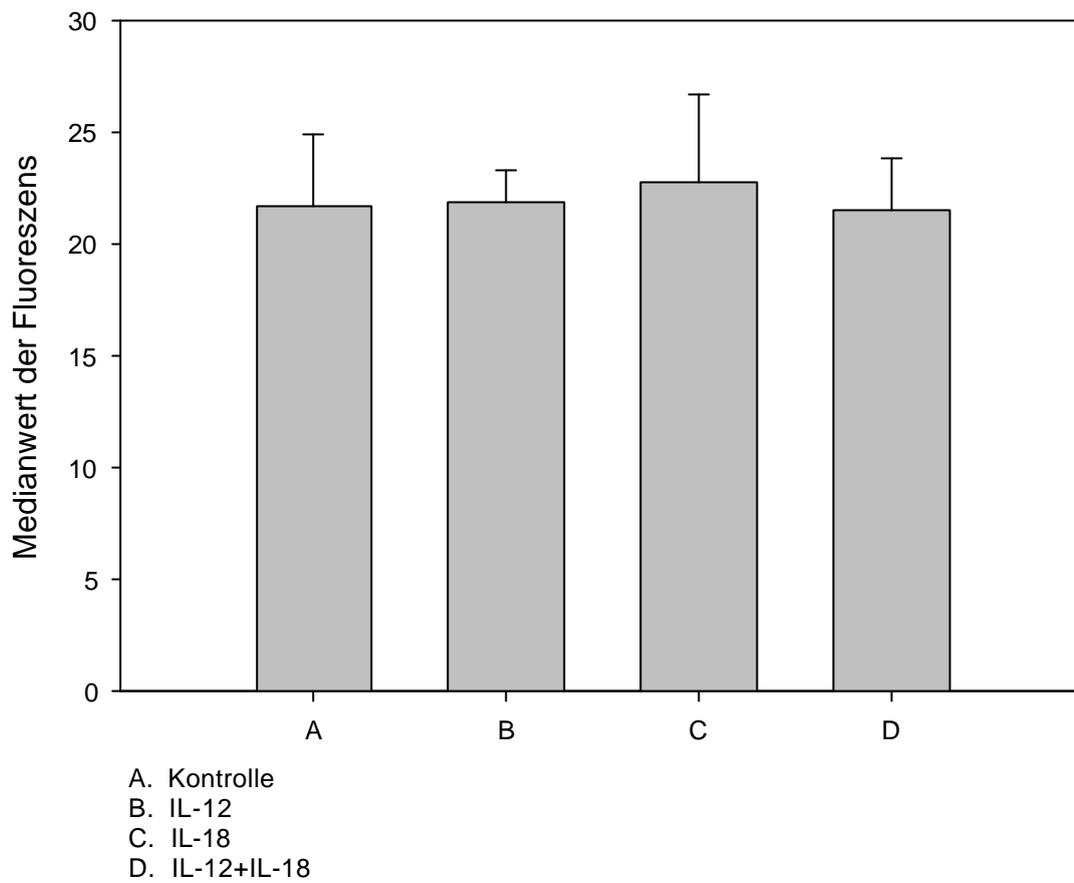
In diesem Versuchsteil wurden den HOS Zellen IL-12 und IL-18 einzeln und in Kombination in einer Konzentration von 30ng/ml exogen zugeführt. Die Expression der Oberflächenantigene ICAM-1 und HLA-I wurde dann durchflusszytometrisch für die Zelllinie HOS gemessen werden.

Die exogen zugeführten Interleukine-12 und -18 bewirkten keine wesentliche Veränderung im Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle ICAM-1 und HLA-1 (Abb. 17 und Abb. 18). Weder die Einzelapplikation noch die kombinierte Stimulation mit IL-12 und IL-18 ergab eine Expressionssteigerung. So zeigten die HOS Zellen für die ICAM-1 und HLA-I Expression folgende gemittelte Medianwerte der Fluoreszenz (Tab. 6).

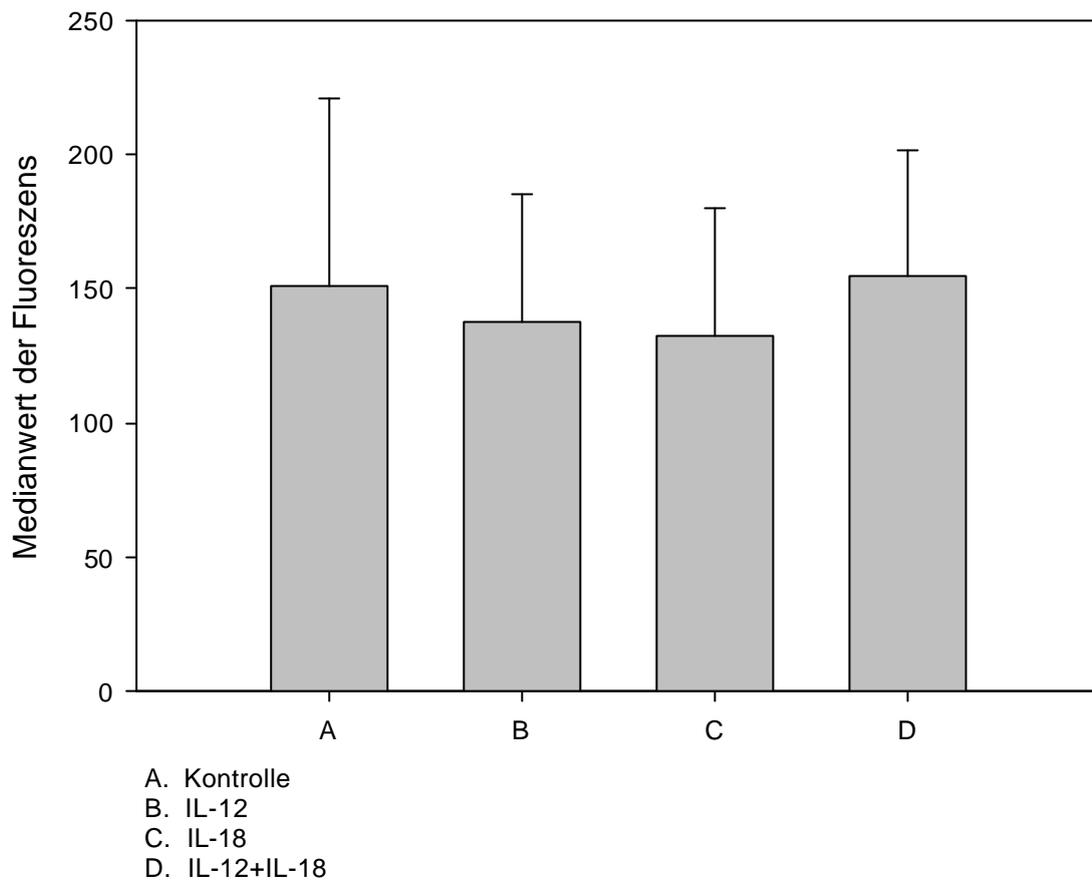
Ein ähnliches Verhalten wies die Zelllinie MG-63 auf, deren Abbildungen jedoch nicht gezeigt werden.

Zytokine	Medianwert der Fluoreszenz	Medianwert der Fluoreszenz
	(ICAM-1)	(HLA-1)
Kontrolle	21.74 ± 4.5	151.10 ± 98.8
IL-12	21.84 ± 2.04	137.56 ± 67.38
IL-18	22.81 ± 5.44	132.36 ± 67.97
IL-12+IL-18	21.52 ± 3.34	154.47 ± 66.98

**Tab. 6** Dargestellt sind die Mittelerte der Medianwerte nach durchflusszytometrischer Messung der Fluoreszenzintensität und Stimulation durch IL-12 und IL-18 von ICAM-1 bei HOS Zellen. Die Mittelwerte der Medianwerte werden ± SA angegeben.



**Abb. 17** Expressionsänderung von ICAM-1 bei HOS Zellen durch exogene Applikation von **B.** 30ng/ml IL-12, **C.** 30ng/ml IL-18 und deren **D.** Kombination  $\pm$  SA.



**Abb. 18** Expressionsänderung von HLA-I bei HOS Zellen durch exogene Applikation von **B.** 30ng/ml IL-12, **C.** 30ng/ml IL-18 und deren **D.** Kombination  $\pm$  SA.

### **1.10.3 Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-1 nach Koinkubation mit IL-12 und IL-18 aktivierten Lymphozyten**

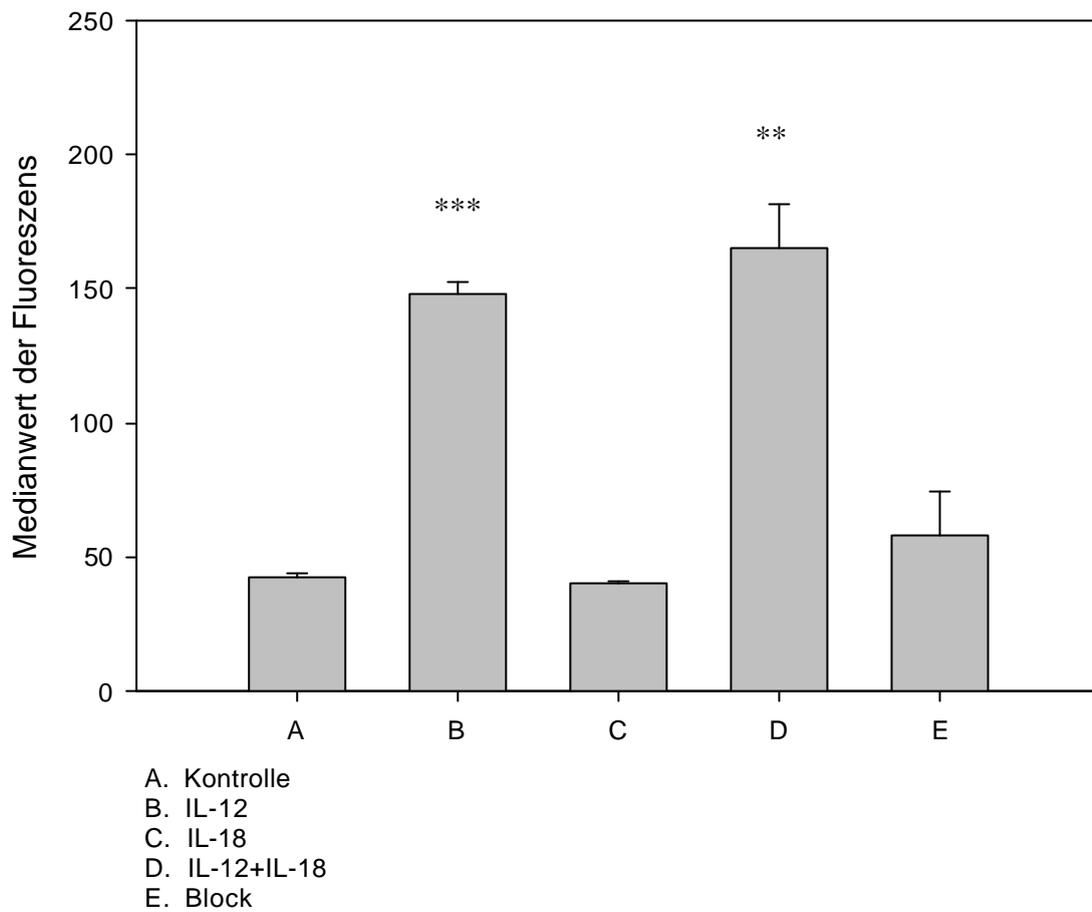
Die ICAM-1 Expression konnte durch die Kombination von IL-12 und IL-18 bei den HOS Zellen gesteigert werden.

Dabei konnte an den HOS Zellen eine Erhöhung um 74.4% ( $p < 0.01$ ) im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Für diese Zelllinie ergab die alleinige Koinkubation mit IL-12 aktivierten Lymphozyten ebenfalls eine Expressionssteigerung um 71.3% ( $p < 0.001$ ). So konnte durch die Kombination von IL-12 und IL-18 eine nochmalige Erhöhung der ICAM-1 Expression nachgewiesen werden.

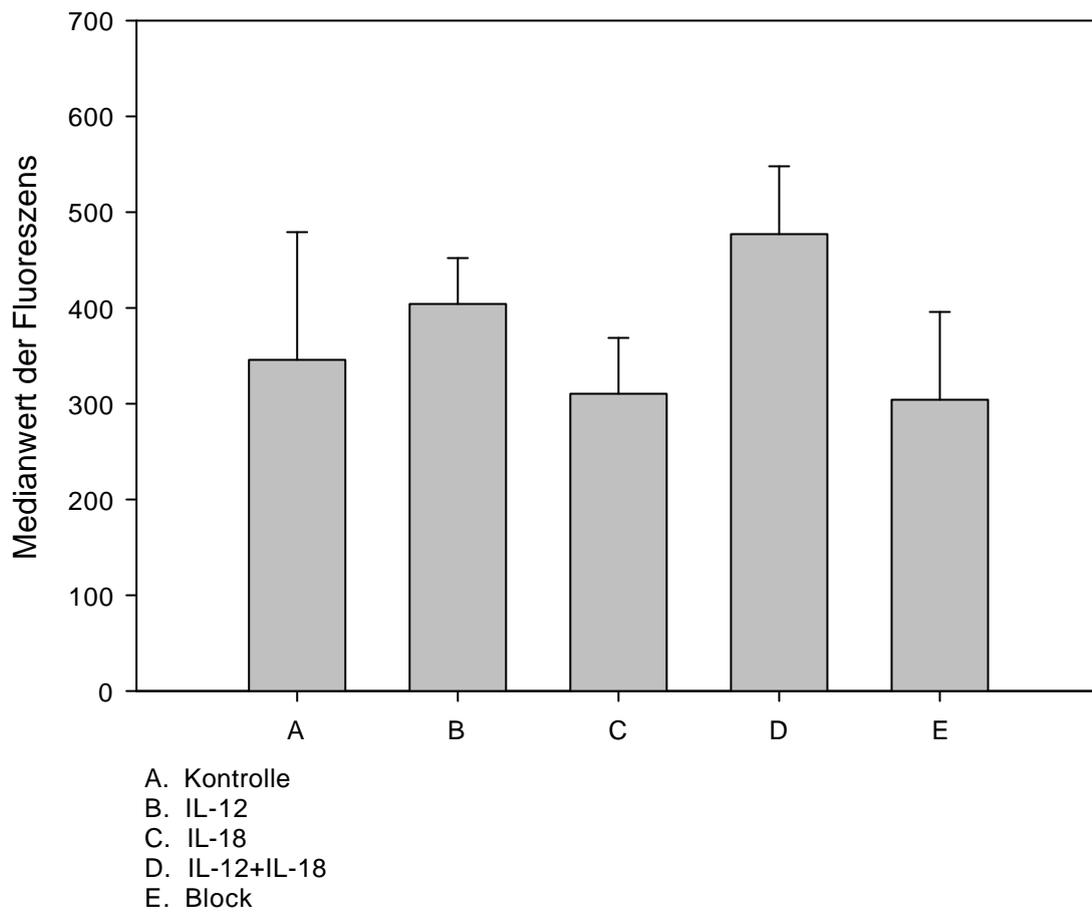
Für HLA-1 konnte ebenfalls eine Veränderung des Expressionsmusters nachgewiesen werden. Durch die Lymphozytenaktivierung mit 30 ng/ml IL-12 kann die HLA-I Expression um 14.1 % im Vergleich zur Kontrollreihe gesteigert werden. Durch die Kombination mit 30ng/ml IL-18 ergibt sich eine Steigerung um 27.6 %.

Sowohl für die ICAM-1 als auch für die HLA-I Induktion konnte durch Stimulation mit IL-18 allein keine Erhöhung der Expression gegenüber der Kontrollreihe nachgewiesen werden.

Freies IFN- $\gamma$  konnte durch einen Antikörper geblockt werden.



**Abb. 19** Expressionsänderung von ICAM-I bei HOS Zellen durch zytokinaktivierte Lymphozyten nach exogener Applikation von **B.** 30ng/ml IL-12, **C.** 30ng/ml IL-18 und deren **D.** Kombination  $\pm$  SA. **A.** Kontrolle. **E.** Anti-IFN- $\gamma$  Block. \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  vers. Kontrolle. IFN-gamma Block vers. IL12+IL18 \*\* $p < 0.01$ ).



**Abb. 20** Expressionsänderung von HLA-I bei HOS Zellen durch zytokinaktivierte Lymphozyten nach exogener Applikation von **B.** 30ng/ml IL-12, **C.** 30ng/ml IL-18 und deren **D.** Kombination  $\pm$  SA. **A.** Kontrolle. **E.** Anti-IFN- $\gamma$  Block.

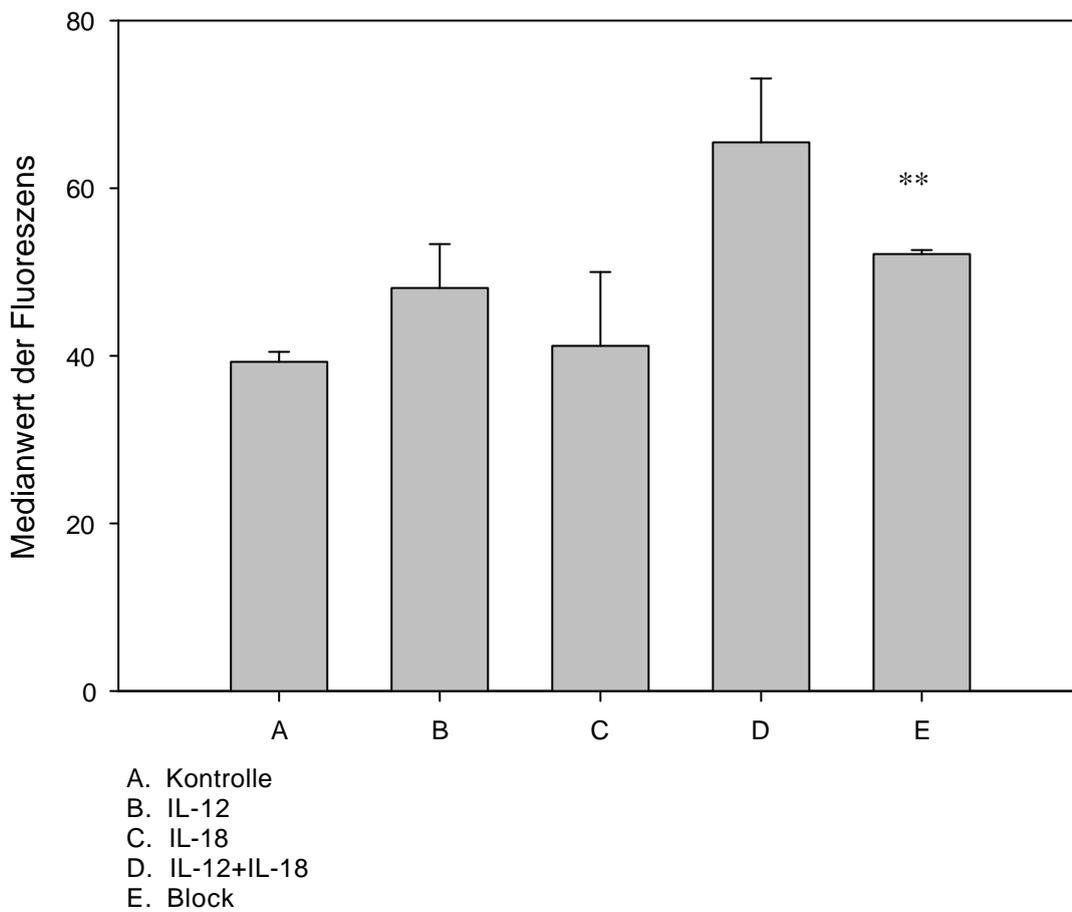
	ICAM-1	HLA-I
<b>Kontrolle L</b>	42.32 ± 1.77	346.06 ± 188.29
<b>IL-12</b>	147.65 ± 8.38	403.11 ± 83.99
<b>IL-18</b>	40.15 ± 1.29	311.39 ± 97.39
<b>IL-12+IL-18</b>	165.38 ± 27.96	478.04 ± 120.14
<b>IL-12+IL-18+Anti-IFN-g AK</b>	58.29 ± 27.91	303.63 ± 159.95

**Tab. 7** Medianwerttabelle der Oberflächenmoleküländerung von ICAM-1 und HLA-I durch Koinkubation von HOS Zellen und zytokinaktivierten Lymphozyten. Darstellung der Medianwerte als Mittelwerte ± SA (n=3).

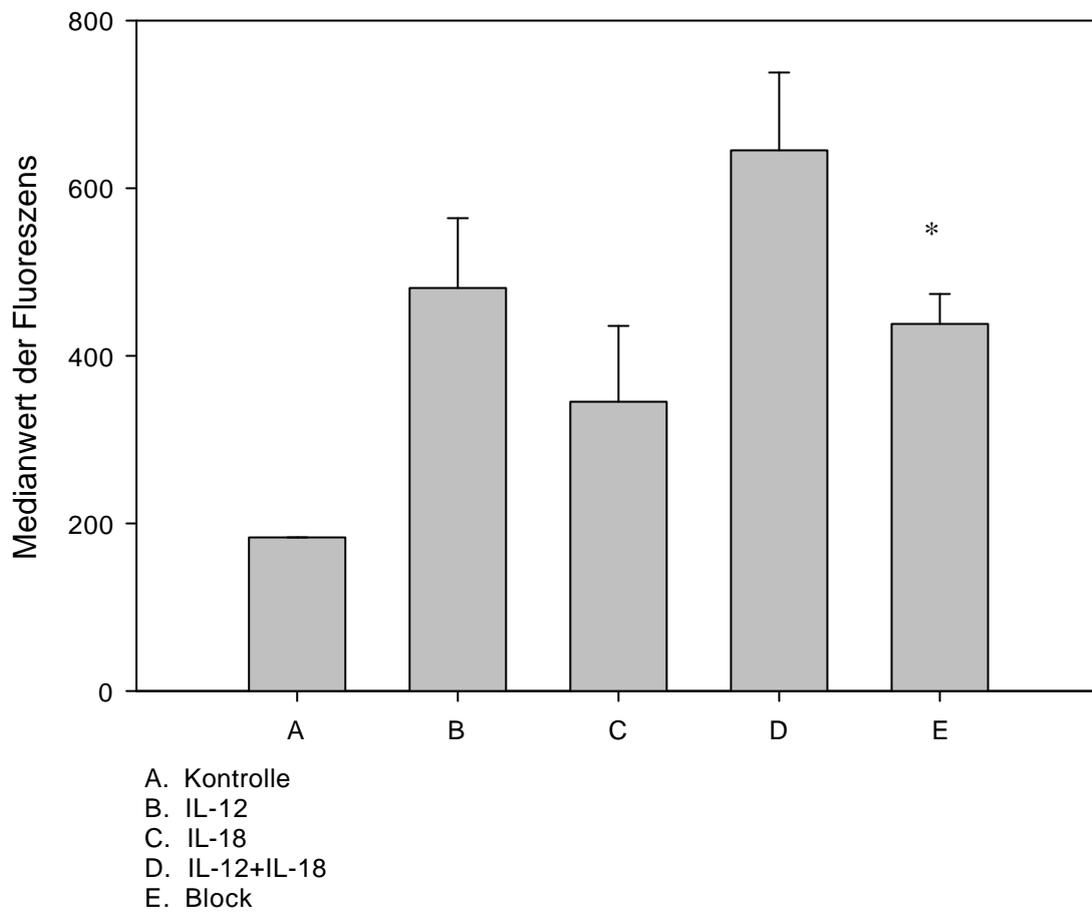
Für die Zelllinie MG-63 konnte ebenfalls durch IL-12 eine ICAM-1 Steigerung um 16.5% und durch die Interleukinkombination von IL-12 und IL-18 eine Steigerung um 38.7% gemessen werden (Abb. 21).

Auch die HLA-I Expression konnte durch IL-12 und IL-18 mit 71.7% wesentlich gegenüber der Kontrolle gesteigert werden (Abb. 22).

Die Zelllinie MG-63 weist nach Blockierung von IFN- $\gamma$  eine signifikante ICAM-1 Restexpression von 23% ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle auf. Somit konnte für die humane Osteosarkomzelllinie MG-63 eine IFN- $\gamma$  unabhängige ICAM-1 Expression ermittelt werden.



**Abb. 21** Expressionsänderung von ICAM-1 bei MG-63 Zellen durch zytokinaktivierte Lymphozyten nach exogener Applikation von **B.** 30ng/ml IL-12, **C.** 30ng/ml IL-18 und deren **D.** Kombination  $\pm$  SA. **A.** Kontrolle. **E.** Anti-IFN- $\gamma$  Block **\*\*** $p < 0.01$  vers. D.



**Abb. 22** Expressionsänderung von HLA-I bei MG-63 Zellen durch zytokinaktivierte Lymphozyten nach exogener Applikation von **B.** 30ng/ml IL-12, **C.** 30ng/ml IL-18 und deren **D.** Kombination  $\pm$  SA. **A.** Kontrolle. **E.** Anti-IFN- $\gamma$  Block \* $p < 0.05$  vers. D.

	ICAM-1	HLA-I
<b>Kontrolle L</b>	40.08 ± 0.46	182.34 ± 1.61
<b>IL-12</b>	48.00 ± 7.58	479.92 ± 119.91
<b>IL-18</b>	41.11 ± 12.58	345.64 ± 126.52
<b>IL-12+IL-18</b>	65.42 ± 10.79	645.05 ± 130.15
<b>IL-12+IL-18+Anti-IFN-g AK</b>	52.02 (*p<0.05) ± 0.71	437.86 ± 49.90

**Tab. 8** Medianwerttabelle der Oberflächenantigenänderung von ICAM-1 und HLA-I durch Koinkubation von MG-63 Zellen mit zytokinaktivierten Lymphozyten (T-Test). Es werden die Mittelwerte der Medianwerte der Kontrollgruppe (unbehandelte Osteosarkomzellen) gegen die Medianwerte der jeweiligen Probe verglichen (n=3).

#### 1.10.4 Expressionsänderung von ICAM-1 und HLA-I durch direkten und indirekten

##### Lymphozytenkontakt

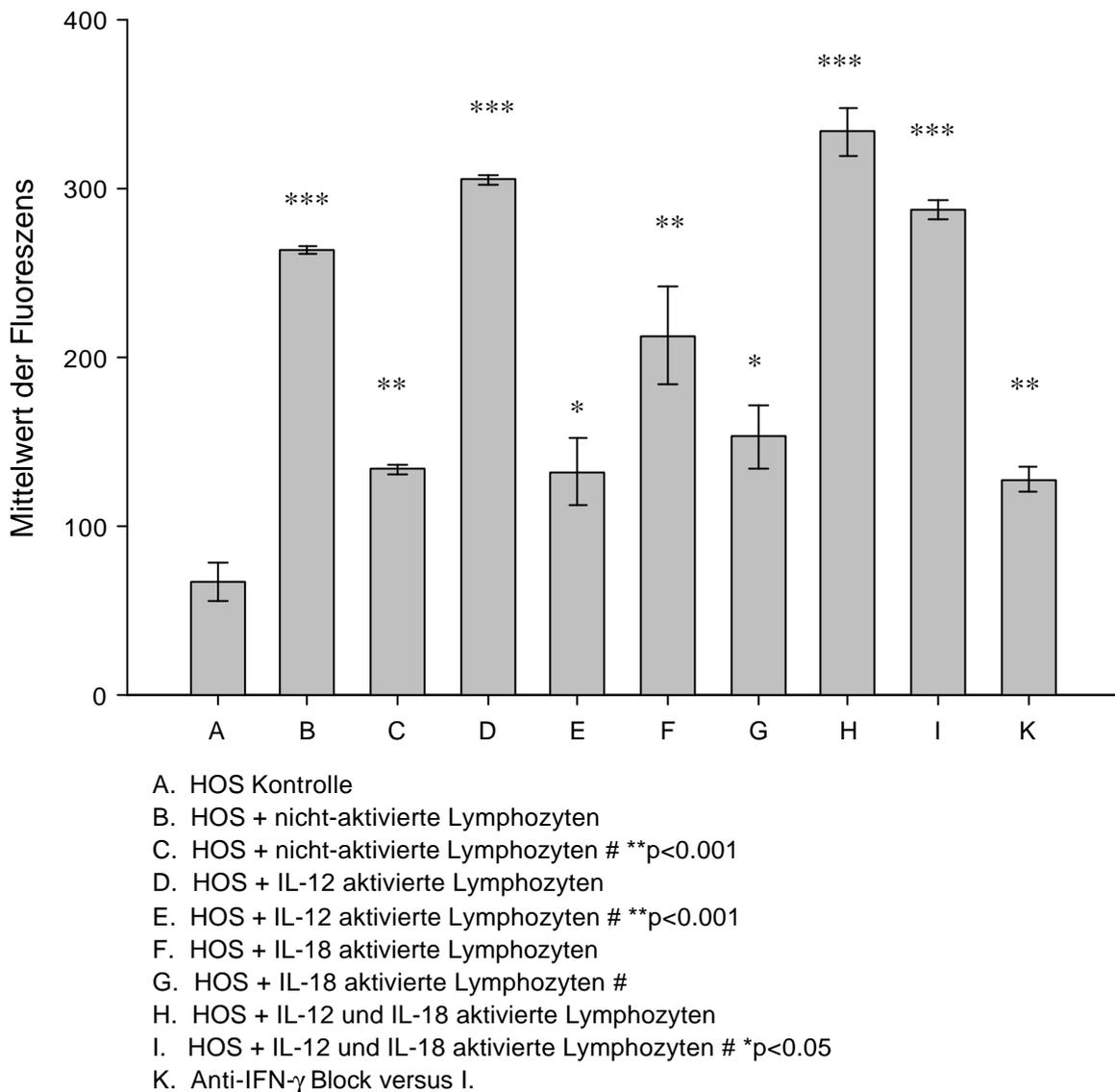
##### 1. Direkt und Indirekt induzierte ICAM-1 Expression bei HOS Zellen

Humane Osteosarkomzellen der Zelllinie HOS und MG-63 wurden mit nicht-aktivierten und zytokinaktivierten Lymphozyten koinkubiert. Eine Probe unbehandelter humaner Osteosarkomzellen diente als Kontrolle. Um heraus zu finden ob der direkte Zellkontakt zwischen Lymphozyten und Osteosarkomzellen einen Einfluss auf das Expressionsmuster von ICAM-1 hat, wurde ein Zellkultureinsatz verwendet. Die Proben mit nicht-aktivierten Lymphozyten zeigen bei Verwendung des Zellkultureinsatzes eine Expressionsabnahme von ICAM-1 ( $M=133.97 \pm 5.59$ ) gegenüber der Probe ohne Verwendung des Zellkultureinsatzes ( $M=263.8 \pm 3.65$ ,  $p<0.001$ ). Nach Co-Inkubation mit zytokinaktivierten Lymphozyten bewirkt der Zellkultureinsatz ebenfalls eine Verringerung der ICAM-1 Expression für IL-12 von 56.6 % ( $p<0.001$ ), für IL-18 von 28 % und für die Kombination von IL-12 und IL-18 von 13.9 % ( $p<0.05$ ) (Abb. 23, Tab. 9). Es bestätigt sich ohne Verwendung des

Zellkultureinsatzes eine signifikant erhöhte ICAM-1 Expression durch IL-12 ( $M=305.65 \pm 4.67$ ,  $p<0.001$ ) und eine nochmalige signifikante Expressionssteigerung durch die Kombination von IL-12 und IL-18 ( $M=334.07 \pm 23.8$   $p<0.001$ ) gegenüber der Probe mit nicht-aktivierten Lymphozyten. Gegenüber der Probe mit den nicht-aktivierten Lymphozyten mit Zellkultureinsatz kann durch IL-18 ( $M=153.63 \pm 32.56$ ,  $p<0.05$ ) die ICAM-1 Expression um 12.8% gesteigert werden. Durch die Kombination von IL-12 und IL-18 mit Zellkultureinsatz ( $M=287.78 \pm 9.43$ ) kann diese Expressionserhöhung von ICAM-1 gegenüber der Probe um 53.4% ( $p<0.001$ ) signifikant gesteigert werden (Abb. 23).

Nach Blockierung von IFN- $\gamma$ , konnte gegenüber der Probe (Kombination von IL-12 und IL-18) mit Zellkultureinsatz eine IFN- $\gamma$  unabhängige ICAM-1 Expression von 42.9% ( $p<0.001$ ) und gegenüber der Probe ohne Zellkultureinsatz von 37% ( $p<0.01$ ) erreicht werden.

Der Vergleich zwischen der Kombination von IL-12 und IL-18 nach IFN- $\gamma$  Blockierung und der Kontrolle (unbehandelte Osteosarkomzellen) ergab eine signifikante ICAM-1 Restexpression von 45.3% ( $p<0.05$ ). Für die HOS Zellen kann so ein IFN- $\gamma$  unabhängiger Mechanismus für die ICAM-1 Expression angenommen werden.



**Abb. 23** ICAM 1 Expression bei HOS Zellen nach Kokultivierung mit zytokinaktivierten (D-I) und nicht-aktivierten (B, C) Lymphozyten mit (#) und ohne Zellkontakt. K zeigt den IFN-γ Block gegen die Kombination von IL-12 und IL-18. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 vers. A (Kontroll Gruppe). #\*\*\*p<0.001 und #\*p<0.05 vers. die gleiche Gruppe ohne Zellkultureinsatz. K verglichen mit C zeigt den vollständigen Block von IFN-γ. Die Daten werden als Mittelwert ± SE der Fluoreszenz Intensitäten dargestellt. (# Inkubation mit Zellkultureinsatz)

	ICAM-1 Abnahme (%)
L+IL-12 -> L+IL-12 #	56.6
L+IL-18 -> L+IL-18 #	28
L+IL-12+IL-18 -> L+IL-12+IL-18 #	13.9

**Tab. 9** Verringerung der ICAM-1 Expression durch Verwendung eines Zellkultureinsatzes bei HOS Zellen nach Inkubation mit zytokinaktivierten Lymphozyten. Die Aktivierung der Lymphozyten erfolgte mit 100ng/ml IL-12, 100ng/ml IL-18 und deren Kombination. (#) Zellkultureinsatz, (L) Lymphozyten.

## 2. Direkt und Indirekt induzierte ICAM-1 Expression bei MG-63 Zellen

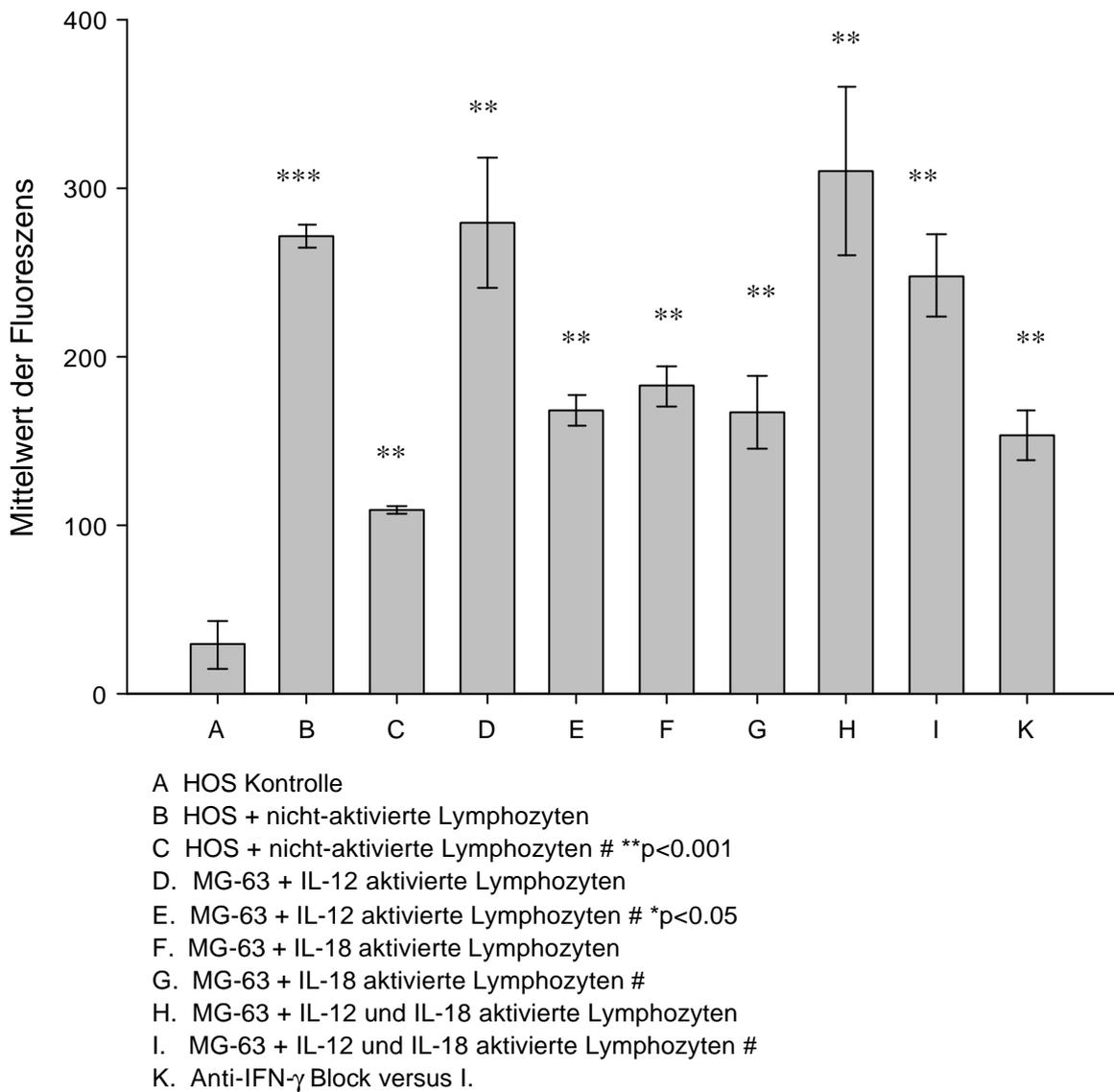
Wie bei den HOS Zellen zeigten die Proben mit nicht-aktivierten Lymphozyten bei MG-63 Zellen mit Zellkultureinsatz eine Expressionsabnahme von ICAM-1 ( $M=109.87 \pm 3.95$ ) gegenüber der Probe ohne Zellkultureinsatz ( $M=271.9 \pm 11.13$ ,  $p<0.001$ ). Nach Koinkubation mit IL-12 lässt sich für die Probe mit Zellkultureinsatz ebenfalls eine Verringerung der ICAM-1 Expression von 39.6%, für IL-18 von 8.5% und für die Kombination von IL-12 und IL-18 von 20.0% nachweisen (Abb. 24, Tab. 10).

Ohne Verwendung des Zellkultureinsatzes konnte für IL-12 ( $M=279.59 \pm 67.0$ ) eine Steigerung der ICAM-1 Expression von 2.6% und eine nochmalige Steigerung durch die Kombination von IL-12 und IL-18 ( $M=310.49 \pm 86.26$ ) von 12.4% gegenüber der Probe mit nicht-aktivierten Lymphozyten gemessen werden. Nach Verwendung des Zellkultureinsatzes konnte gegenüber der Probe mit nicht-aktivierten Lymphozyten die ICAM-1 Expression durch IL-12 ( $M=168.88 \pm 15.32$ ) um 34.9% ( $p<0.01$ ), durch IL-18 ( $M=167.46$ ) um 34.4% ( $p<0.01$ ) und durch die Kombination beider Interleukine ( $248.46 \pm 42.04$ ) um 55.8% ( $p<0.01$ ) gesteigert werden (Abb. 24).

Nach IFN- $\gamma$  Blockierung konnte gegenüber der Probe (Kombination IL-12/IL-18) mit Zellkultureinsatz eine ICAM-1 Expression von 37.9% und gegenüber der Probe ohne Zellkultureinsatz von 50.3% erreicht werden.

Der Vergleich zwischen der Kombination von IL-12 und IL-18 nach IFN- $\gamma$  Blockierung und der Kontrolle (unbehandelte Osteosarkomzellen) ergab eine signifikante ICAM-1 Restexpression von 80.9% ( $p < 0.01$ ). Für die MG-63 Zellen kann so ebenfalls ein IFN- $\gamma$  unabhängiger Mechanismus für die ICAM-1 Expression angenommen werden.

In diesem Versuchsabschnitt konnte gezeigt werden, dass die Trennung der Tumorzellen von Lymphozyten insgesamt eine verminderte ICAM-1 Expression nach sich zieht. An beiden Zelllinien konnte durch IL-12 sowohl mit als auch ohne Zellkultureinsatz, gegenüber den nicht-aktivierten Lymphozyten, eine ICAM-1 Steigerung erreicht werden. Durch IL-18 hingegen konnte keine wesentliche Veränderung der ICAM-1 Expression nachgewiesen werden. Aber die Kombination beider Interleukine bewirkte eine nochmalige Expressionserhöhung. Weiterhin konnte auch hier gezeigt werden, dass für beide Zelllinien ein IFN- $\gamma$  unabhängiger Weg für die ICAM-1 Expression existieren muss.



**Abb. 24** ICAM 1 Expression bei MG-63 Zellen nach Kokultivierung mit zytokinaktivierten (D-I) und nicht-aktivierten (B, C) Lymphozyten mit (#) und ohne Zellkontakt. K zeigt den IFN- $\gamma$  Block gegen die Kombination von IL-12 und IL-18. \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 vers. A (Kontroll Gruppe). \*\*\*p<0.01 and \*\*p<0.05 vers. Die gleiche Gruppe ohne Zellkultureinsatz. K verglichen mit C zeigt den vollständigen Block von IFN- $\gamma$ . Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SE der Fluoreszenzintensität (# Inkubation mit Zellkultureinsatz).

ohne Netz -> mit Netz #	ICAM-1 Abnahme (%)
L+IL-12 -> L+IL-12 #	39.6
L+IL-18 -> L+IL-18 #	8.5
L+IL-12+IL-18 -> L+IL-12+IL-18 #	20.0

**Tab. 10** Verringerung der ICAM-1 Expression durch Verwendung eines Zellkultureinsatzes bei HOS Zellen nach Inkubation mit zytokinaktivierten Lymphozyten. Die Aktivierung der Lymphozyten erfolgte mit 100ng/ml IL-12, 100ng/ml IL-18 und deren Kombination. (#) Zellkultureinsatz, (L) Lymphozyten.

## Diskussion

### 1.11 MTT-Assay – Zytotoxizitätsnachweis bei humanen Osteosarkomzellen

IFN- $\gamma$  besitzt eine Zytotoxizität die im direkten Zellkontakt bei den Zelllinien HOS und MG-63 einen Viatalitätsverlust bewirkt. Für TNF- $\alpha$  konnte keine wesentliche Vitalitätsabnahme der Tumorzellen nachgewiesen werden. In Bezug auf die Osteosarkomzelllinien verfügen IL-12 und IL-18 nur über eine geringe Zytotoxizität, die die Vitalität der Zellen kaum beeinflusst.

Mit dem MTT-Assay besteht die Möglichkeit mit einem einfachen Verfahren eine sichere Aussage über die Vitalität von Osteosarkomzellen zu erhalten [56-58]. Auf Grund der gezeigten Ergebnisse wird deutlich, dass IFN- $\gamma$  über eine Zytotoxizität gegenüber Osteosarkomzellen verfügt, die die Vitalität der Tumorzellen wesentlich beeinflusst. So kann bestätigt werden, dass IFN- $\gamma$  eine wichtige Komponente des Immunsystems bei der Beeinflussung des Tumorzellwachstums einnimmt [28,59]. Durch die Zytotoxizitätsbestimmung kann vermutet werden, dass IFN- $\gamma$  eine Schlüsselposition bei der Immunantwort auf Osteosarkomzellen einnimmt. Für TNF- $\alpha$  wurde ebenfalls in verschiedenen Versuchsmodellen eine Anti-Tumorwirkung nachgewiesen [34]. Mariani et al. zeigten das die Antitumorwirkung von TNF- $\alpha$  auf Osteosarkomzellen im wesentlichen von der Expression bestimmter Oberflächennatigene abhängig ist [60]. Desweiteren ist bekannt, das TNF- $\alpha$  die Knochenresorption und die Osteoblastenproliferation stimuliert [61].

Auf Grund der neueren Erkenntnisse über die synergistische Wirkungsweise von IL-12 und IL-18 wurde die Antitumorwirkung auf die verwendeten Osteosarkomzellen übertragen. Die Grundlage für diese Überlegung bildeten die 1998 und 1999 veröffentlichten Ergebnisse über synergistische Wirkungsweisen von IL-12 und IL-18 [23,62-64]. Caughlin et al. konnten im

Tiermodell nachweisen, dass IL-12 und IL-18 bei der Behandlung des Mammakarzinoms, einen IFN- $\gamma$  vermittelten Antitumor Effekt aufweisen [24].

An den Osteosarkomzelllinien kam es durch IL-12 und IL-18 zu keiner Verringerung der Tumorzellvitalität. Es muss angenommen werden das weitere Botenstoffe zur Entfaltung der Antitumorwirkung notwendig sind. Welche Stellung dabei IFN- $\gamma$  einnimmt soll im Folgenden erläutert werden.

### **1.12 IDO Induktion**

Der Einfluss der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 auf das Enzym IDO der humanen Osteosarkomzelllinien HOS und MG-63 im in-vitro-Modell soll im Folgenden diskutiert werden.

Mit den Zytokinen IL-12 und IL-18 kann bei den humanen Osteosarkomzellen HOS und MG-63 die Induktion des Enzyms IDO erreicht werden. Durch die Kombination der Zytokine IL-12 und IL-18 konnte gegenüber der Einzelapplikation dieser Interleukine eine nochmalige Steigerung der IDO Induktion lymphozytenvermittelt nachgewiesen werden. Somit konnte durch das IFN- $\gamma$  abhängige Enzym IDO gezeigt werden, dass die Interleukine-12 und 18 eine wesentliche Rolle bei der IFN- $\gamma$  Ausschüttung spielen.

In einer Vielzahl durchgeführter in-vitro und in-vivo Untersuchungen konnte die beeinflussende Wirkung des Tumorzellstoffwechsel durch IDO Induktion bewiesen werden. Diese antiproliferative Wirkung basiert auf der Erhöhung des L-Tryptophan Metabolismus [32,65]. Die Mechanismen die zu dieser antiproliferativen Wirkung führen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Sicher ist allerdings das IFN- $\gamma$  hier einen entscheidenden Einfluss hat [32]. Weiterhin wurde bewiesen, dass IFN- $\gamma$  eine inhibitorische Wirkung auf Osteolysen hat [66], die eine wichtige Komponente beim Osteosarkom darstellen.

Bisher wurde die zytokinabhängigeIDO Induktion für humane Osteosarkomzellen nicht beschrieben. In unserer Untersuchung konnten wir einen direkten IFN- $\gamma$  Effekt auf dieIDO der Osteosarkomzellen nachweisen.

An Glioblastomen [67] und HeLa [68] Zellen konnte eine durch TNF- $\alpha$  induzierteIDO Aktivität gezeigt werden. Diese Ergebnisse konnten wir an Osteosarkomzellen allerdings nicht bestätigen. Durch direkte TNF- $\alpha$  Applikation kam es an den Osteosarkomzellen zu keiner Steigerung derIDO Induktion.

Die Applikation von IL-12 und IL-18 bewirkte an den humanen Osteosarkomzellen eineIDO Induktion. Mit der Kombination dieser Interleukine konnte dieser Effekt noch gesteigert werden. Diese weitere Erhöhung derIDO Aktivität konnte nur durch Koinkubation mit Lymphozyten nachgewiesen werden.

Der Effekt erklärt sich durch die synergistische Wirkungsweise von IL-12 und IL-18 die eine IFN- $\gamma$  Ausschüttung durch T-Zellen bewirkt [23,62-64] und sehr wahrscheinlich auch durch die vermehrte IL-18 Rezeptor Genexpression auf den Lymphozyten nach IL-12 Stimulation [69].Dieser Synergismus konnte durch unsere Versuche bestätigt werden.

Die Wirkung von Lymphozyten und lymphozytenkonditioniertem Medium sind bisher für ossäre Abbauprozesse untersucht worden, sowie die Wirkung einzelner Zytokine auf die Osteoblastenfunktion [70]. Allerdings ist es so, dass es sich immer um ein Netzwerk von Zytokinen handelt, welches diese Wirkungsweise entfaltet.

Es konnte zwar eineIDO Induktion durch lymphozytenkonditioniertes Medium an den HOS und MG-63 Zellen nachgewiesen werden, in dieser Versuchsreihe wurde aber deutlich, dass die Interleukinkombination keine weitere Erhöhung derIDO Aktivität bewirkt. Es muss vermutet werden, dass der fehlende direkte Zellkontakt zwischen Tumorzellen und immunkompetenten Zellen für die geringereIDO Induktion verantwortlich ist. Trotz der Inaktivierung von IFN- $\gamma$  verblieb eine Restaktivität derIDO. So konnte gezeigt werden, dass

IL-12 und IL-18 auch ohne IFN- $\gamma$ , eine wenn auch nur geringeIDO Induktion, bewirken können. Andererseits muss angenommen werden, dass noch weitereIDO induzierende Faktoren für die Restaktivität verantwortlich sind.

Die möglichen verschiedenen Konzentrationskombinationen zwischen IL-12 und IL-18 haben gezeigt, dass mit steigender Konzentration der beiden Interleukine dieIDO Aktivität nicht proportional ansteigt. Es war auffällig, dass ab unterschiedlichen Konzentrationen die unterhalb des Maximalpunktes lagen, keine Steigerung derIDO Induktion mehr möglich war. Dieses Phänomen könnte mit dem Tryptophanstoffwechsel in Zusammenhang gebracht werden. Der Verbrauch des Anfangs eingesetzten Tryptophans kann hier als limitierender Faktor derIDO Induktion angesehen werden. Desweiteren muss hier eine Enzymsättigung diskutiert werden.

Diese Untersuchungen zur Induktion des EnzymsIDO haben gezeigt, dass die untersuchten Osteosarkomzellen die Voraussetzungen für einen IFN- $\gamma$  abhängigen Antitumor Mechanismus erfüllen. Es besteht die Möglichkeit durch IL-12 und IL-18 die IFN- $\gamma$  Ausschüttung zu steigern. Diese IFN- $\gamma$  Erhöhung bewirkt eine verstärkteIDO Induktion [35,36,44] in den Osteosarkomzellen. Hierdurch kann ein verstärkter L-Tryptophan Abbau in den Osteosarkomzellen eingeleitet werden [38]. Die Reduktion dieser essentiellen Aminosäure könnte ein wichtiger Bestandteil bei der Apoptose von Osteosarkomzellen sein.

### **1.13 Expression von Oberflächenantigenen bei humanen Osteosarkomzellen**

Eine stabile und effiziente HLA-I Antigenexpression ist für eine effektive CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunantwort essentiell [71,72]. Veränderungen der HLA-I Antigene sind somit für die Klinik von diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Bedeutung.

In 25-75% einer Gruppe Tumoren unterschiedlicher Histologie ist die HLA-I Oberflächenexpression im Vergleich zur korrespondierenden nicht-malignen Gruppe

vermindert [73,74]. Diese defiziente HLA Expression in humanen Tumoren erlaubt Tumoren über verschiedene Wege so dem Immunsystem zu entkommen.

Neben der erwähnten Anomalie der HLA Oberflächenmoleküle stellt die fehlende oder defiziente Expression des Interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) einen wesentlichen Faktor dar. Es beeinflusst in erster Linie die Interaktion von T-Zellen und Tumorzellen und damit die antitumorale Immunantwort [5]. Die fehlende Expression von ICAM-1 in humanen Tumoren unterschiedlicher Histologie, hat eine defiziente T-Zell-vermittelte Immunantwort zu Folge [75].

Durch IFN- $\gamma$  und konnten wir in einer Versuchsreihe nachweisen, dass eine Steigerung der ICAM-1 Expression auf HOS und MG-63 Zellen möglich ist. Eine Konzentrationserhöhung beider Zytokine bewirkte für die Osteosarkomzellen eine nochmalige Steigerung der ICAM-1 Expression.

Die Bedeutung von IFN- $\gamma$  und für die Expression der Oberflächenantigene auf Tumorzellen wurde in den letzten 6 Jahren mehrfach nachgewiesen. ICAM-1 als Adhäsionsrezeptor führt zu Zellinteraktionen die zur Kohäsion und Aktivierung notwendig sind. Ein wichtiger Ligand für ICAM-1 stellt LFA-3 dar. Diese Interaktion bewirkt eine Zytokinproduktion, T-Zellproliferation und -aktivierung und eine zellvermittelte Zytolyse [76].

IFN- $\gamma$  ist ein wesentlicher Mediator für die akute Immunantwort auf Tumorzellen. Die Anwendung dieser Zytokine auf humane Osteosarkomzellen ermöglicht durch die Expressionssteigerung von ICAM-1 eine verstärkte immunologische Reaktion. Mariani et al. zeigten 1997 die Steigerung der ICAM-1 Expression auf humanen Osteosarkomzellen und konnten dadurch eine gesteigerte Lyse der Tumorzellen durch NK-Zellen nachweisen.

Trotz adjuvanter Chemotherapie entwickeln ein Teil der Osteosarkompatienten Lungenmetastasen. Dieses Phänomen kann wahrscheinlich durch eine Resistenz der malignen Tumorzellen auf Chemotherapeutika erklärt werden [77]. Zukünftig könnten neue spezielle

Therapieverfahren auf der Basis immunmodulatorischer Ansätze mit Zytokinen, Verbesserungen zur Eradikation chemotherapieresistenter Osteosarkomzellen erbringen.

Durch die exogene Gabe von IL-12 und IL-18 zu den verwendeten humanen Osteosarkomzellen konnte in einem weiteren Versuchsabschnitt gezeigt werden, dass ohne die Koinkubation von Lymphozyten keine Expressionssteigerung der Oberflächenantigene ICAM-1 und HLA-I erreicht werden kann. Dieses Phänomen spiegelt nochmals die vermittelnde Rolle von IFN- $\gamma$  in dem Netzwerk der Zytokine wieder. Es muss diskutiert werden, dass durch das Fehlen von IL-12 und IL-18 Rezeptoren auf der Oberfläche der Osteosarkomzellen es zu keiner interleukininduzierten Steigerung von ICAM-1 und HLA-I kommt. Erst durch die Anwesenheit immunkompetenter Zellen die sich durch IL-12 und IL-18 aktivieren lassen kann ein gesteigertes Expressionsmuster von ICAM-1 und HLA-I nachgewiesen werden. Man muss annehmen, dass für eine Expressionssteigerung der Oberflächenantigene durch Interleukine der direkte Zellkontakt zu Lymphozyten notwendig ist. Für verschiedene Interleukine konnte im in-vitro Modell diese Wirkungsweise an Osteosarkomzellen nachgewiesen werden [78].

Nach Koinkubation der Osteosarkomzellen HOS und MG-63 mit humanen Blutlymphozyten und anschließender Aktivierung durch IL-12 und IL-18 konnte für die Zelllinien HOS und MG-63 eine Steigerung der ICAM-1 Expression nachgewiesen werden. Mit der Interleukinkombination konnte für beide Zelllinien die größte Steigerung der ICAM-1 Expression gemessen werden. Diese lag auch in jedem Fall oberhalb der ICAM-1 Expression nach der Einzelapplikation dieser Interleukine. So bestätigt sich die Tatsache, dass zwischen IL-12 und IL-18 ein Synergismus besteht, der zu einer verstärkten IFN- $\gamma$  Produktion führt [79].

Für das Oberflächenantigen HLA-I bestätigt sich bei den HOS und MG-63 Zellen eine vermehrte Expression durch die Kombination von IL-12 und IL-18, sowohl gegenüber den

unbehandelten Zellen als auch gegenüber der Einzelapplikation dieser Interleukine. Hierbei war besonders auffällig, dass die Zelllinie MG-63 durch diese Interleukinkombination eine besonders stark erhöhte HLA-I Expression aufwies. Diese unterschiedlich hohe Expression von HLA-I an den Tumorzellen basiert sehr wahrscheinlich auf den heterogenen Eigenschaften der HLA-I Antigenexpression [80]. Weiterhin ist bekannt, dass die fortlaufende Zellkultivierung zu einer spontanen Veränderung des Expressionsmusters von Oberflächenproteinen an Tumorzellen führt [81,82]. Wie in der Vergangenheit an Melanomzellen gezeigt [83] konnte mit dieser Expressionssteigerung der Oberflächenproteine ICAM-1 und HLA-I an humanen Osteosarkomzellen durch die Einwirkung von IL-12 und IL-18 die Voraussetzung für einen Antitumormechanismus bewiesen werden.

Nach Aktivierung durch die IL-12/IL-18 Kombination konnte an beiden Osteosarkomzelllinien durch IFN- $\gamma$  Blockierung, eine IFN- $\gamma$  unabhängige ICAM-1 Restexpression festgestellt werden. Für HLA-I konnte allerdings nur an den MG-63 Zellen eine interleukininduzierte IFN- $\gamma$  unabhängige Restexpression gemessen werden. Weiteren in-vitro Studien muss es vorbehalten bleiben diesen Mechanismus zu identifizieren. So wäre es möglich, neue Ansätze für weitere Antitumormechanismen zur immuntherapeutischen Behandlung von Osteosarkompatienten zu finden.

Um die Frage nach der Notwendigkeit des direkten Zellkontaktes zwischen Lymphozyten und Osteosarkomzellen zur ICAM-1 Expression beantworten zu können, kam in einem weiteren Versuchsabschnitt ein Zellkultureinsatz zur Anwendung. Dieser Zellkultureinsatz verhindert den unmittelbaren Zellkontakt, lässt jedoch eine Interaktion von niedrig molekularen Botenstoffen, zu denen auch IFN- $\gamma$  gehört, zu. Nach Koinkubation der Lymphozyten mit IL-12 und IL-18 wurde für alle Versuchsproben mit Zellkultureinsatz eine verringerte ICAM-1 Expression gemessen. Insgesamt bestätigte sich allerdings auch in diesen Proben die Tendenz, dass die Kombination von IL-12 und IL-18 die höchste ICAM-1 Expression gegenüber der

Einzelapplikation dieser Interleukine bewirkt. So konnte auch ohne direkten Zellkontakt gezeigt werden, dass IL-12 in Kombination mit IL-18 eine vermehrte IFN- $\gamma$  Ausschüttung und somit eine gesteigerte ICAM-1 Expression bewirkt. Da ICAM-1 zu Zellinteraktionen führt die zur Kohäsion und Zellaktivierung notwendig sind bewirkt der indirekte Zellkontakt mit verminderter ICAM-1 Expression eine verringerte Zytokinproduktion, verringerte T-Zellproliferation und -Aktivierung [76]. Die Verringerung der ICAM-1 Expression beeinflusst in erster Linie die Interaktion von T-Zellen und Tumorzellen und bewirkt eine defiziente T-Zell vermittelte Immunantwort [5,75]. Der direkte Zellkontakt zwischen Lymphozyt und Osteosarkomzelle und somit auch die effiziente ICAM-1 Expression ist für die antitumorale Immunantwort notwendig.

Nach Verwendung des IFN- $\gamma$  Antikörpers konnte auch in diesem Versuchsabschnitt eine IFN- $\gamma$  unabhängige ICAM-1 Restexpression für die humanen Osteosarkomzellen HOS und MG-63 nachgewiesen werden. Hiermit lässt sich zeigen, dass ein weitere interleukininduzierter, IFN- $\gamma$  unabhängiger Weg für die ICAM-1 Expression existieren muss. Obwohl dieser Weg an humanen Osteosarkomzellen noch nicht identifiziert werden konnte, besteht die Möglichkeit dass dieser Mechanismus mit dem Vorhandensein von IL-12 und IL-18 Rezeptoren im Zusammenhang steht.

#### **1.14 Zytokine**

Bisher ergaben sich in klinischen Studien eindeutige Hinweise für die grundsätzliche Wirksamkeit von Zytokinen zur Beeinflussung immunkompetenter Zellen. Eine Zytokinvermittelte Immunmodulation könnte eine Behandlungsmöglichkeit von Tumorkrankheiten darstellen. Bei Patienten mit malignem Melanom und metastasierendem Nierenzellkarzinom wurden Krankheitsrückbildungen unter Therapie mit den Zytokinen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Interleukin-2 und Interleukin-6 beobachtet. Aufschluss für diese zytokininduzierten

Tumorregressionen geben folgende Hinweise. Die Ansprechraten der verschiedenen Zytokintherapieansätze lassen sich vergleichen [84,85] und die Tumorrückbildungen sind in Einzelfällen gut dokumentiert. Desweiteren beobachtet man leukozytäre Infiltrate sowie eine enge Beziehung zwischen HLA Genexpression und dem klinischen Ansprechen [86].

Um eindeutigere Ergebnisse zur Beeinflussung des Immunsystems mit Zytokinen gegenüber Tumorzellen zu erhalten, bedarf es weiterer Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Tumorabstoßungen.

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection oft Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
FACS®	fluoreszensaktivierter Zellsorter
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IDO	Indolamin-2.3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LAK	Lymphokinaktivierte Killerzellen
LFA	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
MTT	3-[4.5-Dimethylthiazol-2yl] 2.5 Diphenyltetrazolium Bromid
Nm	Nanometer
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PBL	periphere Blutlymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
U/min	Umdrehung/Minute
U/ml	Einheiten/Milliliter
Vol	Volumen

■ **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 30. 04. 1974  
Geburtsort: Lünen  
Familienstand: ledig  
Eltern: Dr. med. Rolf Rudolf Heinrich Schmidt und  
Jutta Schmidt-Lohoff, geb. Lohoff

■ **Schulbildung**

1980 - 1984 Besuch der Nikolaus-Groß Schule, Städtische Grundschule Lünen  
1984 - 1993 Besuch des Freiherr-vom-Stein Gymnasiums Lünen  
Abschluss : Allgemeine Hochschulreife

■ **Zivildienst**

1993 – 1994 Ausbildung zum Rettungssanitäter, DRK Lünen

■ **Hochschulbildung**

1994 - 1997 Studium der Humanmedizin an der  
Georg-August-Universität Göttingen  
1997 - 2001 Studium der Humanmedizin an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
14. 03. 1997 Ärztliche Vorprüfung  
27. 08. 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
25. 08. 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
20. 11. 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

■ **Dissertation**

1998 - 2001 Thema: In-vitro Untersuchungen über den Einfluss exogener  
Zytokine an humanen Osteosarkomzellen, Orthopädische  
Universitätsklinik Düsseldorf, Abt. Tumor und Prothetik  
(Univ.-Prof. Dr. H. Merk)

■ **Ärztliche Tätigkeit**

ab 01.01.2002 Arzt im Praktikum in der Klinik für Unfall und  
Wiederherstellungschirurgie am Klinikum Wuppertal, Ärztlicher  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Dávid

## Literaturverzeichnis

- [1] Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1996) Immunologie. Verlag Hans Huber, Bern, Schweiz
- [2] Garrido F., Cabrera T., Concha A., Glew S., Ruiz-Cabello F., Stern P.L. (1993) Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14:491-499
- [3] Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar J.J., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M., Stern P.L. (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18:89-95
- [4] Bluestone J.A. (1995) New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 2:555-559
- [5] Hogg N. and Landis R.C. (1993) Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol* 5:383-390
- [6] Rhim J.S., Cho H.Y., Huebner R.J. (1975) Non-producer human cells induced by murine sarcoma virus. *Int J Cancer* 15:23-29
- [7] Fogh J., Fogh J.M., Orfeo T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59:221-226
- [8] Billiau A., Edy V.G., Heremans H., Van Damme J., Desmyter J., Georgiades J.A., De Somer P. (1977) Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* 12:11-15
- [9] Ponten J. and Saksela E. (1967) Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer* 2:434-447
- [10] Freyschmidt, J., Ostertag, H., and Jundt, G. (1998) Knochentumoren. Springer-Verlag, Berlin
- [11] Wippermann B., Schratt H.E., Tscherne H. (1997) [Malignant bone tumors]. *Unfallchirurg* 100:172-185
- [12] Friedman M.A. and Carter S.K. (1972) The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. *J Surg Oncol* 4:482-510
- [13] Sweetnam R., Knowelden J., Seddon H. (1971) Bone sarcoma: treatment by irradiation, amputation, or a combination of the two. *Br Med J* 2:363-367
- [14] Saeter G., Hoie J., Stenwig A.E., Johansson A.K., Hannisdal E., Solheim O.P. (1995) Systemic relapse of patients with osteogenic sarcoma. Prognostic factors for long term survival. *Cancer* 75:1084-1093

- [15] Aultzky, W.E. and Huber, Ch.H. (2001) Zytokine in der klinischen Tumorthapie.
- [16] Stewart, W.E. (1979) The Interferon System. Springer, NewYork
- [17] Lengyel P. (1982) Biochemistry of interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 51:251-282
- [18] Kirchner, H. and Shellekens, H. (1984) The Biology of the Interferon System. Elsevier Scientific, Amsterdam
- [19] Clemens M.J. and McNurlan M.A. (1985) Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. *Biochem J* 226:345-360
- [20] Tsung K., Meko J.B., Peplinski G.R., Tsung Y.L., Norton J.A. (1997) IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158:3359-3365
- [21] Bloom E.T. and Horvath J.A. (1994) Cellular and molecular mechanisms of the IL-12-induced increase in allospecific murine cytolytic T cell activity. Implications for the age-related decline in CTL. *J Immunol* 152:4242-4254
- [22] Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Chang A.E., Avis F.P., Leitman S., Linehan W.M., Robertson C.N., Lee R.E., Rubin J.T. (1987) A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316:889-897
- [23] Coughlin C.M., Salhany K.E., Wysocka M., Aruga E., Kurzawa H., Chang A.E., Hunter C.A., Fox J.C., Trinchieri G., Lee W.M. (1998) Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 101:1441-1452
- [24] Coughlin C.M., Wysocka M., Kurzawa H.L., Lee W.M., Trinchieri G., Eck S.L. (1995) B7-1 and interleukin 12 synergistically induce effective antitumor immunity. *Cancer Res* 55:4980-4987
- [25] Coughlin C.M., Wysocka M., Trinchieri G., Lee W.M. (1997) The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12. *Cancer Res* 57:2460-2467
- [26] Car B.D., Eng V.M., Schnyder B., LeHir M., Shakhov A.N., Woerly G., Huang S., Aguet M., Anderson T.D., Ryffel B. (1995) Role of interferon-gamma in interleukin 12-induced pathology in mice. *Am J Pathol* 147:1693-1707
- [27] Brunda M.J., Luistro L., Hendrzak J.A., Fountoulakis M., Garotta G., Gately M.K. (1995) Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 17:71-77

- [28] Nastala C.L., Edington H.D., McKinney T.G., Tahara H., Nalesnik M.A., Brunda M.J., Gately M.K., Wolf S.F., Schreiber R.D., Storkus W.J. (1994) Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 153:1697-1706
- [29] Ushio S., Namba M., Okura T., Hattori K., Nukada Y., Akita K., Tanabe F., Konishi K., Micallef M., Fujii M., Torigoe K., Tanimoto T., Fukuda S., Ikeda M., Okamura H., Kurimoto M. (1996) Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 156:4274-4279
- [30] Okamura H., Tsutsi H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K. (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378:88-91
- [31] Micallef M.J., Ohtsuki T., Kohno K., Tanabe F., Ushio S., Namba M., Tanimoto T., Torigoe K., Fujii M., Ikeda M., Fukuda S., Kurimoto M. (1996) Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 26:1647-1651
- [32] Burke F., Knowles R.G., East N., Balkwill F.R. (1995) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma in vivo. *Int J Cancer* 60:115-122
- [33] Sgadari C., Angiolillo A.L., Cherney B.W., Pike S.E., Farber J.M., Koniaris L.G., Vanguri P., Burd P.R., Sheikh N., Gupta G., Teruya-Feldstein J., Tosato G. (1996) Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13791-13796
- [34] Schiller J.H., Witt P.L., Storer B., Alberti D., Tombes M.B., Arzoomanian R., Brown R.R., Proctor R.A., Voss S.D., Spriggs D.R. (1992) Clinical and biologic effects of combination therapy with gamma-interferon and tumor necrosis factor. *Cancer* 69:562-571
- [35] Ozaki Y., Edelstein M.P., Duch D.S. (1987) The actions of interferon and antiinflammatory agents of induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 144:1147-1153
- [36] Ozaki Y., Edelstein M.P., Duch D.S. (1988) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1242-1246
- [37] Brown R.R., Ozaki Y., Datta S.P., Borden E.C., Sondel P.M., Malone D.G. (1991) Implications of interferon-induced tryptophan catabolism in cancer, auto-immune diseases and AIDS. *Adv Exp Med Biol* 294:425-435

- [38] Takikawa O., Kuroiwa T., Yamazaki F., Kido R. (1988) Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem* 263:2041-2048
- [39] Yoshida R., Imanishi J., Oku T., Kishida T., Hayaishi O. (1981) Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:129-132
- [40] Yoshida, R., Urade, Y., Sayama, S., Takikawa, O., Ozaki, Y., and Hayaishi, O. (1982) In Coon, M.L., Ernster, L., and Esterbrook, R.W. (eds.) *Oxygenase and Oxygen Metabolism*. Academic, New York, pp 569
- [41] Yasui H., Takai K., Yoshida R., Hayaishi O. (1986) Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6622-6626
- [42] Carlin J.M., Ozaki Y., Byrne G.I., Brown R.R., Borden E.C. (1989) Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects. *Experientia* 45:535-541
- [43] Edelstein M.P., Ozaki Y., Duch D.S. (1989) Synergistic effects of phorbol ester and INF-gamma on the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in THP-1 monocytic leukemia cells. *J Immunol* 143:2969-2973
- [44] Taylor M.W. and Feng G.S. (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5:2516-2522
- [45] Hayaishi O., Hirata F., Ohnishi T., Henry J.P., Rosenthal I., Katoh A. (1977) Indoleamine 2,3-dioxygenase: incorporation of  $^{18}O_2$  and  $^{18}O_2$  into the reaction products. *J Biol Chem* 252:3548-3550
- [46] Ozaki Y., Reinhard J.F., Nichol C.A. (1986) Cofactor activity of dihydroflavin mononucleotide and tetrahydrobiopterin for murine epididymal indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 137:1106-1111
- [47] Ozaki Y., Nichol C.A., Duch D.S. (1987) Utilization of dihydroflavin mononucleotide and superoxide anion for the decyclization of L-tryptophan by murine epididymal indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* 257:207-216
- [48] Ballard, F.J. (1987) Regulation of intracellular protein breakdown with specific reference to cultured cells. *Lysosomes: Their Role In Protein Breakdown*. Academic Press, London, UK, pp 285
- [49] Brunner M. (1973) Regulation of DNA synthesis by amino acid limitation. *Cancer Res* 33:29-32
- [50] Young H.A. and Hardy K.J. (1995) Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 58:373-381

- [51] Scotlandi K., Baldini N., Campanacci M., Lollini P.L., Picci P., Serra M. (1992) Induction of HLA class II antigens in osteosarcoma cells by interferons and tumor necrosis factor alpha. *Anticancer Res* 12:767-772
- [52] Knapp, W. (1989) *Leucocyte Typing IV White Cell Differentiation Antigens*. University Press, Oxford, UK
- [53] Springer T.A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434
- [54] Meuer S.C., Acuto O., Hercend T., Schlossman S.F., Reinherz E.L. (1984) The human T-cell receptor. *Annu Rev Immunol* 2:23-50
- [55] Meuer, S.C. (2001) *Handbook of Immunopharmacology*. In Craig Wegner (ed.) *Adhesion Molecules: Regulators of the Local Immune Response*. Academic Press, New York
- [56] Yazawa Y., Takagi T., Asakura S., Suzuki K., Kano Y. (1999) Effects of 4-hydroperoxy ifosfamide in combination with other anticancer agents on human cancer cell lines. *J Orthop Sci* 4:231-237
- [57] Takeshita H., Kusuzaki K., Tsuji Y., Hirata M., Hashiguchi S., Nakamura S., Murata H., Ashihara T., Hirasawa Y. (1998) Avoidance of doxorubicin resistance in osteosarcoma cells using a new quinoline derivative, MS-209. *Anticancer Res* 18:739-742
- [58] Liu C., Dai G., Zhang X. (1996) [Chemosensitivity test for human osteosarcoma cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 18:445-447
- [59] De Maeyer, E. and De Maeyer-Guignard, J. (1988) *Interferons and other regulatory zytokines*. John Wiley & Sons, NewYork, NY
- [60] Mariani E., Tarozzi A., Meneghetti A., Cattini L., Facchini A. (1998) TNF-alpha but not IL-1 and IL-6 modifies the susceptibility of human osteosarcoma cells to NK lysis. *Int J Oncol* 13:349-353
- [61] Wallach S., Avioli L.V., Feinblatt J.D., Carstens J.H. (1993) Zytokines and bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 53:293-296
- [62] Yamanaka K., Hara I., Nagai H., Miyake H., Gohji K., Micallef M.J., Kurimoto M., Arakawa S., Kamidono S. (1999) Synergistic antitumor effects of interleukin-12 gene transfer and systemic administration of interleukin-18 in a mouse bladder cancer model. *Cancer Immunol Immunother* 48:297-302
- [63] Lauwerys B.R., Renaud J.C., Houssiau F.A. (1998) Inhibition of in vitro immunoglobulin production by IL-12 in murine chronic graft-vs.-host disease: synergism with IL-18. *Eur J Immunol* 28:2017-2024
- [64] Lauwerys B.R., Renaud J.C., Houssiau F.A. (1999) Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Zytokine* 11:822-830

- [65] de la Maza L.M. and Peterson E.M. (1988) Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res* 48:346-350
- [66] Watanabe K., Tanaka Y., Morimoto I., Yahata K., Zeki K., Fujihira T., Yamashita U., Eto S. (1990) Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1035-1041
- [67] Daubener W. and MacKenzie C.R. (1999) IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol* 467:517-524
- [68] Babcock T.A. and Carlin J.M. (2000) Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Zytokine* 12:588-594
- [69] Ahn H.J., Maruo S., Tomura M., Mu J., Hamaoka T., Nakanishi K., Clark S., Kurimoto M., Okamura H., Fujiwara H. (1997) A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* 159:2125-2131
- [70] Stock J.L., Coderre J.A., DeVito W.J., Baker S. (1998) Effects of human lymphocyte-conditioned medium on MG-63 human osteosarcoma cell function. *Zytokine* 10:603-612
- [71] Benacerraf B. (1981) Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212:1229-1238
- [72] Tanaka K., Yoshioka T., Bieberich C., Jay G. (1988) Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Annu Rev Immunol* 6:359-380
- [73] Bernards H.J. (1987) Suppression of MHC gene expression in cancer cells. *TIG* 3:298-301
- [74] Bontkes H.J., Walboomers J.M., Meijer C.J., Helmerhorst T.J., Stern P.L. (1998) Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression. *Lancet* 351:187-188
- [75] Seliger B. and Huber C. (1999) "Immune escape"-Mechanismen von humanen Tumoren. *Onkologie* 5:668-678
- [76] Kohka H., Yoshino T., Iwagaki H., Sakuma I., Tanimoto T., Matsuo Y., Kurimoto M., Orita K., Akagi T., Tanaka N. (1998) Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. *J Leukoc Biol* 64:519-527
- [77] Mariani E., Tarozzi A., Meneghetti A., Cattini L., Facchini A. (1997) Human osteosarcoma cell susceptibility to natural killer cell lysis depends on CD54 and increases after TNF alpha incubation. *FEBS Lett* 406:83-88

- [78] Meneghetti A., Mariani E., Santi S., Riccio M., Cattini L., Paoletti S., Facchini A. (1999) NK binding capacity and lytic activity depend on the expression of ICAM-1 on target bone tumours. *Int J Oncol* 15:909-914
- [79] Yoshimoto T., Takeda K., Tanaka T., Ohkusu K., Kashiwamura S., Okamura H., Akira S., Nakanishi K. (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161:3400-3407
- [80] Ruiz-Cabello F., Lopez Nevot M.A., Gutierrez J., Oliva M.R., Romero C., Ferron A., Esteban F., Huelin C., Piris M.A., Rivas C., . (1989) Phenotypic expression of histocompatibility antigens in human primary tumours and metastases. *Clin Exp Metastasis* 7:213-226
- [81] Holtkamp B., Fischer Lindahal K., Segall M. (1979) Spontaneous loss and subsequent stimulation of H-2 expression in clones of a heterozygous lymphoma cell line. *Immunogenetics* 9:405-409
- [82] Lollini P.L., Colombo M.P., De Giovanni C., Nicoletti G., Parmiani G., Prodi G., Nanni P. (1985) In vivo reexpression of H-2 antigens in B16 melanoma cells. *Exp Clin Immunogenet* 2:14-23
- [83] Yue F.Y., Geertsen R., Hemmi S., Burg G., Pavlovic J., Laine E., Dummer R. (1999) IL-12 directly up-regulates the expression of HLA class I, HLA class II and ICAM-1 on human melanoma cells: a mechanism for its antitumor activity? *Eur J Immunol* 29:1762-1773
- [84] Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T. (1985) Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313:1485-1492
- [85] Sleijfer D.T., Janssen R.A., Buter J., de Vries E.G., Willems P.H., Mulder N.H. (1992) Phase II study of subcutaneous interleukin-2 in unselected patients with advanced renal cell cancer on an outpatient basis. *J Clin Oncol* 10:1119-1123
- [86] Marincola F.M., Venzon D., White D., Rubin J.T., Lotze M.T., Simonis T.B., Balkissoon J., Rosenberg S.A., Parkinson D.R. (1992) HLA association with response and toxicity in melanoma patients treated with interleukin 2-based immunotherapy. *Cancer Res* 52:6561-6566

# **In-vitro Untersuchungen über den Einfluss exogener Cytokine an humanen Osteosarkomzellen**

Sebastian Schmidt

## **Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, weiteren Aufschluss über den Einsatz rekombinanter humaner Cytokine zur Immunmodulation an humanen Osteosarkomzellen zu gewinnen. Hierzu wurde ein in-vitro Versuchsmodell entwickelt in dem von primären humanen Osteosarkomen abgeleitete Zelllinien zusammen mit immunkompetenten Zellen kultiviert. Durch Stimulation des Immunsystems mit bestimmten Cytokinen, können immunologische Abwehrmechanismen gegen Krebszellen potenziert und die Tumorzellproliferation und Tumorzelldifferenzierung moduliert werden. Ziel war es auch, direkte Cytokineffekte gegenüber indirekten, also über eine Stimulation immunkompetenter Zellen vermittelte Wirkung an den Osteosarkomzellen zu vergleichen. In diesem in-vitro Modell kamen dann die Cytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 zur Anwendung. Mit modernen zellbiologischen Methoden wurde dann anschließend die Wirkung der Cytokinapplikation über verschiedene Nachweismethoden charakterisiert. Die bekannte Wirkung dieser Cytokine ist gekennzeichnet durch eine Veränderung der Expression der Oberflächenantigene ICAM-1 und HLA I, so wie die Beeinflussung des essentiellen Tryptophanstoffwechsels. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Induktion des Enzyms Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in den humanen Osteosarkomzellen HOS und MG-63 durch Cytokine zu erhöhen. Besonders die synergistische Wirkungsweise von IL-12 und IL-18 auf die IDO Induktion bei Osteosarkomzellen sollte bei diesem Versuchsvorhaben bewiesen werden. Es wurden zwei verschiedene Wege (direkt/indirekt) zur IDO Induktion untersucht. Bei der direkten Wirkung wurden die Cytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 in unterschiedlichen Konzentrationen exogen zugeführt. Die indirekte Wirkung beschreibt die Cytokinwirkung nach Aktivierung von Lymphozyten. Nach Aktivierung der Lymphozyten mit IL-12 und IL-18 und anschließender Co-Inkubation mit den Osteosarkomzellen (indirekte Wirkung) konnte eine Aktivitätserhöhung der IDO gegenüber unbehandelten Osteosarkomzellen erreicht werden. Die Kombination dieser Interleukine konnte eine signifikante Erhöhung der IDO Aktivität sowohl gegenüber den unbehandelten Zellen als auch gegenüber den Einzelapplikationen der Interleukine zeigen. Bei Applikation von IL-12 und IL-18 ohne Lymphozytenaktivierung (direkte Wirkung), ließ sich nur bei einer Zelllinie eine geringe Aktivitätserhöhung von IDO nachweisen. Freies IFN- $\gamma$  konnte durch einen Antikörper geblockt werden. Die IDO Aktivität wurde hierdurch wesentlich verringert. So stellte sich heraus, dass diese Vorgänge wesentlich durch die Präsenz von IFN- $\gamma$  beeinflusst werden. So wie die IDO Induktion, beeinflussen Interleukine auch die Regelung der Oberflächenexpression von HLA-I Antigenen und ICAM-1 auf Tumorzellen. Durch die exogene Zugabe von IL-12 und IL-18 ohne vorherige Stimulation von Lymphozyten konnte keine Veränderung im Expressionsmuster von HLA-I und ICAM-1 festgestellt werden. Nach Lymphozytenaktivierung durch die Kombination von IL-12 und IL-18 konnte allerdings die ICAM-1 und HLA-I Expression der Osteosarkomzellen sowohl gegenüber einer unbehandelten Kontrollreihe, als auch gegenüber der Interleukin Einzelapplikation gesteigert werden. Nach IFN- $\gamma$  Blockierung kam es auch hier zu einer wesentlichen Verringerung der ICAM-1 und HLA-I Expression. Wenn es gelingen sollte den IFN- $\gamma$  unabhängigen Weg, der zytokininduzierten Beeinflussung humaner Osteosarkomzellen weiter aufzuschlüsseln, könnten die erzielten Resultate eine Grundlage für neue Therapieansätze bei der zukünftigen Behandlung von Osteosarkompatienten sein. Es werden aber auch weitere Untersuchungen nötig sein, um das zytotoxische und zytostatische Potential von IL-12 und IL-18 auch in vivo besser abschätzen zu können.