

Die Rolle des IL-2 Signalweges in einem murinen Adenocarcinoma Modell

Dissertation zur Erlangung
des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
(Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität
Mainz

Marcus Tepe

Dezember 2009

Labor für Molekulare und Zelluläre Immunologie der Lunge
Institut für Molekulare Medizin
Universitätsmedizin
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

[Die Namen von Dekan und
Gutachtern sind gelöscht]

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2010

Erklärung

Ich erkläre, daß ich die vorlegte Thesis selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur die den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Mainz, den 16. Dezember 2009

[Personenbezogene Daten gelöscht]

Teilergebnisse der Arbeit sind zur Veröffentlichung in Vorbereitung

Tepe M et al., The role of IL-2 signal transduction in murine model of adenocarcinoma

Kongreßbeiträge

Tepe M et al., The role of IL-2 signal transduction in murine model of adenocarcinoma, ÖGAI/DGfI 2008, Joint Annual Meeting of Immunology, Wien, 3. - 6. September 2008

Danksagung

[Personenbezogene Daten in der Danksagung sind gelöscht]

**Es ist keine Schande, nichts zu wissen,
wohl aber, nichts lernen zu wollen.**

Sokrates, griechischer Philosoph, 470 - 399 v. Chr

Inhalt

1	Einleitung	10
1.1	Das Immunsystem	10
1.1.1	Das Angeborene Immunsystem	10
1.1.2	Das Adaptive Immunsystem	10
1.1.3	Weitere Aufgaben und Fehlfunktion des Immunsystems	13
1.2	Die Lunge	14
1.2.1	Anatomie	14
1.2.2	Funktion der Lunge	15
1.3	Tumor und Krebs	15
1.3.1	Beligne Krebsarten	16
1.3.2	Maligne Krebsarten	16
1.4	Tumorstadien	17
1.5	Lungenkrebs	18
1.5.1	Ursachen für Lungenkrebs	18
1.5.2	Detektion und Diagnose von Lungenkrebs	19
1.5.3	Behandlung von Lungenkrebs	20
1.6	Behandlungsstrategien	20
1.6.1	Regionale Chemotherapie	20
1.6.2	Systemische Chemotherapie	21
1.6.3	Onkologische Chirurgie	21
1.6.4	Strahlentherapie	21
1.6.5	Photodynamische Therapie (PDT)	22
1.6.6	Radiofrequenz Ablation (RFA)	22
1.6.7	Regionale Hyperthermie	23
1.7	Immuntherapie	23
1.7.1	Interferon und Zytokine in der Immuntherapie	24
1.7.2	Monoklonale Antikörper in der Immuntherapie	24
1.7.3	Krebs Vaccine	25
1.8	Tumorimmunologie	26
1.8.1	Tumorspezifische und assoziierte Antigene	27
1.8.2	Tumor-Assoziierte Antigene	27
1.8.3	Tumornekrose	27
1.8.4	Immunsystem versus Tumor	28
1.8.5	Regulatorische T Zellen	29
1.9	Zytokine des Immunsystems	29
1.10	Klasse-I-Zytokinrezeptoren	30
1.10.1	Die allgemeine γ -Kette (CD132)	32
1.11	Der Interleukin-2 Rezeptorkomplex	33
1.11.1	Der IL-2R α (CD25)	34
1.11.2	Der IL-2R β (CD122)	35
1.11.3	Interleukin-2 [IL-2]	36
1.12	Der Tumor Necrosis Factor Signalweg	38
1.12.1	Die TNF-Signal-Transduktion	39
1.12.2	Der TNF-Rezeptor-1	40
1.12.3	Der TNF-Rezeptor-2	43
1.12.4	Koordination von TNFR1 und TNFR2	44
1.12.5	Regulation von TNF-Rezeptoren	45
1.12.6	Physiologische Rolle von TNF	45

1.13	Interferon- γ [IFN- γ]	46
1.14	Zielsetzung des Projekts	48
2	Material	49
2.1	Chemikalien	49
2.2	unmarkierte Antikörper	51
2.3	Fluorochrom markierte Antikörper	52
2.4	Kits	52
2.5	Puffer und Lösungen	53
2.5.1	Puffer für ELISA	53
2.5.2	Puffer für FACS	53
2.5.3	Zellisolation und Zellkultur	54
2.5.4	Western Blot	54
2.6	Laborgeräte	56
3	Methoden	58
3.1	Mäuse	58
3.1.1	Protokoll des murinen Adenokarzinom Modells	58
3.1.2	Versuchsgruppen	59
3.1.3	Antikörper- und Interleukinbehandlung von Mäusen	60
3.2	Zellkultur	60
3.2.1	L1C2 Bronchioadenocarcinoma Zelllinie	60
3.2.2	Isolierte CD4 ⁺ T Zellen	61
3.2.3	Hybridoma Zellkultur	61
3.3	Gewinnung von Gesamtzellen	61
3.3.1	Gewinnung von Gesamtzellen aus der Lunge	62
3.3.2	Gewinnung von Gesamtzellen aus der Milz	62
3.4	Isolation von T Zellen	63
3.4.1	Zellisolation mit dem Dynal [®] System	63
3.4.2	Zellisolation mittels magnetischer Zellseparation	64
3.5	Durchflußzytometrie (FACS)	65
3.5.1	Prinzip der Durchflußzytometrie	65
3.5.2	Färbung von Zelloberflächenproteinen	66
3.5.3	Auswertung von FACS Daten	67
3.5.4	Färbung von intrazellulären Proteinen	68
3.5.5	Färbung von apoptotischen Zellen	68
3.6	ELISA	70
3.7	Isolation von Gesamtproteinen	72
3.8	Aufreinigung von Antikörpern	73
3.8.1	Prinzip der Aufreinigung	73
3.8.2	Vorbereitung der Überstände	73
3.8.3	Aufbau der Apparatur	74
3.8.4	Prozedur der Aufreinigung	75
3.8.5	Elution des Antikörpers	75
3.8.6	Reinigung und Lagerung der Säule	76
3.8.7	Aufbewahrung des gewonnenen Antikörpers	76
3.8.8	Entsalzung des Antikörpers	76
3.8.9	Bestimmung der Konzentration	76
3.8.10	Nachweis der Spezifität	77
3.9	Westernblot	78
3.9.1	Herstellung der Westerblot Gele	78
3.9.2	Gelelektrophorese	80

3.9.3	Transfer auf Mikrozellulosemembran	81
3.10	Statistik.....	81
4	Ergebnisse	82
4.1	Das murine Adenokarzinoma Modell	82
4.1.1	Histologie von Gewebeschnitten.....	83
4.2	Expression von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern	84
4.2.1	Expression von CD69.....	85
4.2.2	Expression von CD127.....	86
4.2.3	Expression von CD44.....	87
4.2.4	Regulatorische T Zellen	89
4.3	Produktion von Zytokinen.....	91
4.3.1	Interferon - γ	91
4.3.2	Tumor Nekrosis Faktor α	92
4.4	Differenzierung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T Zellen	93
4.5	Messung der Apoptose von L1C2 Tumorzellen	95
4.5.1	Frühe Phase der Tumorentwicklung (Tag 10).....	95
4.5.2	Späte Phase der Tumorentwicklung (Tag 21).....	97
4.6	Modifikation des murinen Tumormodells.....	99
4.7	Blockade der IL-2R α -Kette CD25.....	100
4.7.1	Histologie	100
4.7.2	Regulatorische T Zellen	101
4.7.3	Expression von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern	102
4.7.4	Zytokinproduktion.....	104
4.8	Intranasale Gabe von rekombinantem Interleukin 2	106
4.8.1	Aktivierung des Interleukin-2 Signalweges	106
4.8.2	Tumorstadium nach intranasaler Applikation von IL-2	107
4.8.3	Regulatorische T Zellen	109
4.8.4	Expression des Oberflächenmarkers CD127.....	110
4.8.5	Expression des Aktivierungsmarkers CD44	111
4.8.6	Zytokinproduktion.....	112
4.9	Adenokarzinoma Modell mit TNF- α <i>knock out</i> Mäusen.....	114
4.9.1	Survival Kurve	114
4.9.2	Expression von Aktivierungsmarkern.....	115
4.9.3	Produktion von Effektorzytokinen	117
4.9.4	Effektorfunktion der CD4 ⁺ T Zellen	119
5	Diskussion	121
5.1	L1C2 Tumormodell.....	121
5.2	Applikation von anti-CD25	123
5.3	Applikation von Interleukin-2.....	125
5.4	Verwendung von TNF- α -KO Mäusen	127
5.5	Therapiemöglichkeiten.....	130
5.6	Perspektiven	130
	Zusammenfassung	132
	Abkürzungsverzeichnis	133
	Abbildungsverzeichnis	135
	Literaturverzeichnis.....	137
	Curriculum Vitae.....	149

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Für die Verteidigung eines Organismus wie des Menschen oder der Maus hält das Immunsystem verschiedene Systeme und Strategien bereit, welche der Kontrolle oder Vernichtung eines in den Organismus eingedrungenen Pathogens dienen und die Zusammenarbeit von verschiedenen Zelltypen und Proteinen voraussetzen.

1.1.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

Der sich entwickelnde Organismus verfügt bereits über eine Reihe von Abwehrmechanismen, die als Angeborenes Immunsystem bezeichnet werden. Hierzu gehören neben den natürlichen Barrieren (Epithelien) auch biochemische Komponenten in Form des sogenannten Komplementsystems und Zellen, die durch bereits in einem naiven Stadium der Differenzierung exprimierten Rezeptoren Strukturen auf Bakterien oder anderen Pathogenen erkennen und diese über Phagozytose aus dem Körper entfernen können. Zum Angeborenen Immunsystem zählen dendritische Zellen, Makrophagen, basophile und eosinophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen [1].

1.1.2 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM

Dem Angeborenen Immunsystem steht das Erworbene (Adaptive) Immunsystem zur Seite. Im Gegensatz zu der angeborenen Immunität ist das Erworbene (adaptive) Immunsystem darauf konzipiert, durch klonale Selektion ein Repertoire an Immunzellen (Lymphozyten) bereitzustellen, die mit unterschiedlich spezifischen Rezeptoren theoretisch alle Pathogene erkennen können.

Zum adaptiven Immunsystem gehören hauptsächlich B und T Lymphozyten. Beide Zelltypen werden im Knochenmark gebildet und gehören damit zu den Haematopoetischen Zellen. Um eine Erkennung körpereigener Strukturen (Selbsterkennung, Autoreaktivität) durch Lymphozyten zu vermeiden, durchlaufen sie während ihrer Reifung zu funktionsfähigen naiven Immunzellen eine Reihe von

Selektionsmechanismen, welche alle Zellen eliminieren, die entweder körpereigene Strukturen erkennen (autoreaktiv) oder in jedweder Weise unreaktiv, demnach funktionsunfähig sind. Lediglich etwa fünf Prozent der ursprünglich gebildeten Zellen durchlaufen erfolgreich diese Selektion.

Die Aktivierung des Adaptiven Immunsystems setzt eine Interaktion der Lymphozyten mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) voraus. APCs nehmen Pathogene über Phagozytose auf, so daß sich das Pathogen in einer intrazellulären Kapsel (Endosom) befindet. Innerhalb des Endosoms wird der pH Wert verringert, was eine Aktivierung zersetzender Enzyme (Proteasen) zur Folge hat. Das Pathogen wird zu einzelnen Bruchstücken degradiert. Mit diesen Bruchstücken werden im nächsten Schritt membranständige Proteine beladen, die als *main histo-compability complex* (MHC) bezeichnet werden (Abbildung 1). Beladene MHC Moleküle erfahren einen Transport an die Zelloberfläche, wo sie die Pathogenbruchstücke den Rezeptoren der Immunzellen zugänglich machen.

Besitzt ein Lymphocyt eine Spezifität für eines der präsentierten Peptide, kann dieser Lymphocyt mit seinem Rezeptor, zum Beispiel eine T Zelle mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR), sowohl an das MHC, als auch an das Peptid binden. Eine solche Bindung aktiviert unter Zunahme weiterer kostimulatorischer Moleküle den Lymphocyt (Abbildung 2) [2].

Abbildung aus Copyright-
gründen gelöscht

Abbildung 1: Phagozytose und Degradierung eines Pathogens durch eine APC

APCs phagozytieren Pathogene in sogenannte Endosomen. In den Endosomen wird der pH Wert gesenkt, um Proteasen zu aktivieren, welche das Pathogen in Bruchstücke degradieren. Die Bruchstücke werden auf MHC Moleküle geladen. [10]

Im weiteren Verlauf einer Adaptiven Immunantwort werden generell drei Phasen durchlaufen. Zunächst beginnen die aktivierten Lymphocyt mit einer Phase der Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen, die zum Infektionsort wandern. Dieses wird als Expansionsphase der Immunantwort bezeichnet. Am Infektionsort

wird das Pathogen durch Ausschüttung von zytotoxischen Zytokinen und Induktion von Apoptose mittels Zelloberflächenmolekülen im Zell-Zell-Kontakt bekämpft.



Abbildung 2: Interaktion von T Zelle und APCs

Die T Zelle kann mittels des T Zell Rezeptor (TCR) mit dem von der APC exprimierten und mit einem Peptid beladenen MHC interagieren. Eine Aktivierung der T Zelle erfolgt bei Bindung sowohl an das MHC, als auch an das Peptid. [10]

Nach erfolgreicher Beseitigung des Pathogens gilt es, die Aktivität der Immunzellen wieder einzudämmen. In der Restriktionsphase wird zunächst die Ausschüttung von Zytokinen reduziert, welche die immunologische Funktion gefördert, beziehungsweise das Überleben der Immunzellen gesichert haben. Zum Überleben der Immunzellen trägt das autoreaktive Zytokin Interleukin-2 entscheidend bei.

Als zweites immunologisches Paradigma neben der Expansion tritt nach der erfolgreichen Bekämpfung des Pathogens die Absterbephase der Immunzellen an dessen Stelle, wenn diese nicht mehr benötigt werden. Der Vorgang des Absterbens erfolgt über den sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose) oder über passives Absterben (Nekrose). Durch das Fehlen von Antigenen und das damit einhergehende aktivierende Signal an die Zellen, sowie eine Reduktion stimulierender Zytokine geht ein Großteil der Immunzellen in die Apoptose über [3, 4].

Diejenigen Zellen jedoch, deren Aktivierungssignal in der Expansionsphase eine ausreichend große Intensität aufgewiesen hatte, erfahren eine weitere Differenzierung, welche außerhalb der primären Organe (Thymus, Knochenmark) erfolgt, nämlich in der Peripherie in Organen wie Milz und Lymphknoten. Über klonale Mechanismen reifen diese Effektorzellen in der Restriktionsphase zu sogenannten Gedächtniszellen (memory cells). Die Gedächtnis-Lymphozyten

verbleiben für lange Zeit im Organismus und können bei einem erneuten Auftreten des Antigens, sprich bei einer erneuten Infektion wieder eine Effektorfunktion aufnehmen, so daß eine gegen das gleiche Antigen gerichtete Immunantwort schneller und effektiver erfolgen kann. Das Persistieren der *memory cells* stellt die Gedächtnisphase der Immunantwort dar [5, 6].

1.1.3 WEITERE AUFGABEN UND FEHLFUNKTION DES IMMUNSYSTEMS

Die klonale Selektion der Lymphozyten folgt komplexen Mechanismen, bei denen mitunter Fehler auftreten können. Demnach ist es möglich, daß Lymphozyten, die für Epitope des eigenen Organismus spezifisch sind, der klonalen Selektion entgehen und zu funktionsfähigen Zellen heranreifen. Greifen diese Lymphozyten körpereigenes Gewebe an, spricht man von einer Autoimmunreaktion. Verschiedene Krankheiten sind auf autoreaktive Lymphozyten zurückzuführen, wozu unter anderem Multiple Sklerose und *Lupus erythematoses* gehören.

Weiterhin können Immunzellen auftreten, die Antigene auf an sich harmlosen Strukturen erkennen und eine Immunantwort ohne wirkliches Pathogen hervorrufen. Eine solche allergische Reaktion kann sich von akutem Auftreten zu einem chronischen Stadium entwickeln und unangenehme bis gefährliche Wirkung nach Antigen-Kontakt mit sich ziehen.

Doch nicht nur die Abwehr gegen körperfremde Strukturen ist eine wichtige Aufgabe des Immunsystems. Die natürliche Gewebeerneuerung beinhaltet sowohl den Aufbau von Gewebe durch Zellteilung, als auch den Abbau von Zellen durch Initiierung von Apoptose. Solche apoptotische Zellen werden von Immunzellen phagozytiert und damit aus dem gesunden Gewebe entfernt. Auf diese Weise wird verhindert, daß von zerstörten Zellen ausgeschüttete Substanzen auch andere Zellen in der näheren Umgebung schädigen [4].

1.2 Die Lunge

1.2.1 ANATOMIE

Die menschliche Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln. Der rechte Lungenflügel kann in einen oberen, einem mittleren und einem unteren Lungenlappen (*Lobus superior*, *Lobus medius*, *Lobus inferior*) unterteilt werden. Der linke Lungenflügel besitzt nur einen oberen und einen unteren Lungenlappen (*Lobus superior* und *Lobus inferior*) und weist ein geringeres Volumen als der rechte Flügel auf. Jeder Lungenlappen ist in mehrere Segmentläppchen, so genannte Lobuli, unterteilt.



Abbildung 3: Anatomie der Lunge

Links: Bilobialer Aufbau der Lunge mit rechtem und linkem Lungenflügel. Rechts: Alveolen und Bronchialbaum. (Bild links: Radiologie Zentrum Karlsruhe, Bild rechts: Patrick J. Lynch, medical illustrator)

Die Atemluft wird über das Bronchialsystem in die Lunge geleitet. Die am Kehlkopf beginnende Trachea gabelt sich in den rechten und linken Hauptbronchus. Jeder Hauptbronchus verzweigt sich baumartig bis hin zu den Lungenbläschen (Alveolen), die wie eine traubenförmige Aussackung das äußere Ende des Bronchialbaumes bilden. Die Alveolen sind von einem elastischen Bindegewebe und einem feinen Blutgefäßsystem umgeben, welches als Bronchialbaum bezeichnet wird.

Die Verzweigung bis in kleinste Gefäße und Alveolen stellt eine sehr große Oberfläche bereit. Die Gesamtoberfläche der Alveolen einer Lunge beträgt zwischen siebenzig und achtzig Quadratmeter [7].

1.2.2 FUNKTION DER LUNGE

Die Aufgabe der Lunge ist ein Gasaustausch in der Atemluft. Als Stoffwechselprozeß gilt es, daß das im arteriellen Blut enthaltene Kohlendioxid (CO₂) an die Atemluft abzugeben, um im Austausch den für physiologische Vorgänge wichtigen Sauerstoff (O₂) aufzunehmen.

Während die gesamte Lunge je nach Körpergröße ein Volumen von vier bis fünf Litern aufweist, beträgt das Atemvolumen etwa einen halben Liter. Ein erwachsener Mensch atmet in Ruhe etwa zwölf bis fünfzehn Mal pro Minute ein und aus.

1.3 Tumor und Krebs

Der Begriff Tumor leitet sich vom lateinischen *tumor, -oris* ab und bedeutet Geschwulst oder Schwellung. In der Medizin wird mit Tumor eine Zunahme des Gewebevolumentens aufgrund unterschiedlicher Ursachen bezeichnet. Eine erhöhte Raumbeanspruchung (Intumeszenz) kann durch Abtasten des Körpers diagnostiziert werden.

Weitergehend werden gerade in Bezug auf Gewebeneubildung die Begriffe Neoplasie oder Neoplasma verwendet. Darunter kann eine physiologische Neubildung eines Gewebes verstanden werden, aber auch eine autonome, pathologische Gewebevermehrung. Letzteres führt zu der häufigen Verwendung dieses Begriffs im Zusammenhang mit sogenannten malignen Tumoren. Generell können sich Neoplasien in allen Körpergeweben entwickeln. Je nach Lokalisation können diese Tumore die Funktion des von ihm befallenen Gewebes beeinträchtigen, was bis zum Ausfall des Organs oder sogar zum Tod führen kann.

Die Diagnose von Neoplasien im Körper eines Patienten wird als Krebs bezeichnet. Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland.

1.3.1 BELIGNE KREBSARTEN

In einem Organismus kann es unter Umständen zu unkontrollierten Gewebewucherungen kommen, die sich allerdings nach außen gegenüber anderer Gewebe abgrenzen. Darüber hinaus verbleiben diese Geschwüre an einem Ort und können im Normalfall durch einen chirurgischen Eingriff entfernt werden.

Zu den benignen Tumoren zählen Muttermale und Geschwülste aus Fettgewebe, die als Lipome bezeichnet werden.

1.3.2 MALIGNEN KREBSARTEN

Maligner Krebs kann in verschiedenen Formen auftreten. Eine grundlegende Eigenschaft aller malignen Krebsarten ist die Metastasierung.

Eine Metastase (von griech. μετασταση → μετα (meta-) weg, στασε (stase-) Stelle, Ort) ist ein Tochtertumor, der sich vom Primärtumor abgesetzt hat. Metastasen entstehen durch Ablösen von Tumorzellen des Primärtumors, die sich im Organismus an anderer Stelle zu einem neuen Tumor entwickeln.

Wie oben erwähnt können Tumore durch ihr Wachstum und ihren physiologischen Eigenschaften die Funktion lebenswichtiger Organe beeinträchtigen. Im Allgemeinen kann Krebs nicht als eine einzige Krankheit bezeichnet werden, vielmehr kommen hier unterschiedliche Krankheiten zusammen. Es gibt über einhundert verschiedene Arten von Krebs, von denen man folgende Gruppen unterscheidet:

- **Karzinom:** Karzinomkrebs entsteht in der Haut oder Geweben, die Organe umschließen, beziehungsweise auskleiden.
- **Sarkom:** Sarkomkrebs entsteht vornehmlich in Knochen, Fett, Muskeln, Blutgefäßen, Knorpel und anderen Bindegeweben.
- **Leukemia:** Leukemie beginnt in den Blut-formenden Zellen im Knochenmark und verursacht eine große Anzahl abnormaler Blutzellen im Blut.
- **Lymphome und Myelome:** Krebs des Immunsystems
- **Krebs im ZNS:** Krebs, der sich auf das Gewebe in Gehirn oder Rückenmark bezieht.

1.4 Tumorstadien

Das Ausmaß der Verbreitung eines Tumors läßt eine Einstufung desselben zu. Die Einstufung erfolgt zunächst unter der Berücksichtigung der Primärtumorgröße, wie auch des Vorhandenseins oder Abwesenheit von Metastasen in Lymphknoten oder anderen Organen. Eine sogenannte TMN Klassifikation („*staging*“) wird nach den Vorgaben der UICC (unio internationalis contry cancerum) vorgenommen.

Dabei steht T für Tumor, N für Lymphknotenbefall („*nodus*“) und M für Metastasen. Sämtliche bösartige Tumor in allen Organen werden nach dem TNM System eingeteilt. Folgende Stadien sind dabei zu beachten:

T 1-3	in der Regel auf das entsprechende Organ begrenzter Tumor
T 4	Tumor überschreitet Organgrenze
N 0	kein Lymphknotenbefall
N 1-2	in der Regel regionaler Lymphknotenbefall
N 3	Befall entfernter Lymphknoten
M 0	keine Fernmetastasen
M 1	Fernmetastasen

Für jede Art von Tumor existiert eine eigene Einteilung nach der TNM Klassifikation, in der T 1-4, N 1-3 und M 0 - 1 genau festgelegt werden. Ausgehend von der entsprechenden TNM-Klassifikation findet eine Zuordnung zu den einzelnen Tumorstadien statt.

Eine solche Zuordnung ist zum einen Grundlage zur Wahl einer Krebstherapie, zum anderen wichtig für die Beurteilung der Heilungsaussichten.

Auch wenn die sogenannten kleinzelligen Bronchialkarzinome ebenfalls nach dem TNM System einzuteilen sind, greift man hier auf die vereinfachte Einteilung entsprechend der Stadieneinteilung der *Verterans Administration Lung Cancer Study Group* (VALG) zurück, welche Tumorstadien von „*limited*“ und „*extensive disease*“ beinhaltet.

Basierend auf der VALG-Klassifikation werden diese beiden Tumorstadien nach der Marburger Klassifikation noch weiter aufgeteilt [8].

1.5 Lungenkrebs

Bei der medizinischen Charakterisierung von Neoplasien in der Lunge ist festzustellen, daß circa neunzig Prozent zu den malignen Krebsarten gehören. Mehr als die Hälfte der Tumore entwickelt sich in den oberen Teilen der Lunge, da diese besser durchlüftet sind und schädliche, kanzerogene Substanzen an diesen Stellen besseren Zugang haben. Die Mehrzahl der Karzinome entwickelt sich zudem aus Schleimhautzellen der Bronchien.

Als besonders gefährlich sticht das kleinzellige Lungenkarzinom (*small cell lung carcinoma, SCLC*) von den Lungentumorarten heraus, weil es schnell wächst und sich bald im Körper ausbreitet.

Im Gegensatz dazu wachsen Großzellige Karzinome (*non small cell lung carcinoma, NSCLC*) langsamer, versprechen eine bessere Prognose und stellen in etwa 80 Prozent der diagnostizierten Lungentumore dar. Grundsätzlich können NSCLC in drei Typen unterschieden werden:

- Ein **Adenokarzinom** geht aus Drüsengewebe hervor und stellt die häufigste Form des malignen Lungenkrebses dar. Adenokarzinom entsteht meistens im peripheren Bereich der Lunge. Das Bronchioalvolarkarzinom ist ein Subtyp des Adenokarzinom und entsteht an den unterschiedlichsten Stellen in der Lunge, von wo aus es sich entlang bestehender alveolarer Wände verbreitet.
- Das **Plattenepithelkarzinom** oder Epidermales Karzinom entsteht hauptsächlich in der zentralen Region der Bronchien.
- Das **Großzellige Karzinom** tritt eher selten auf und wird auch als Undifferenziertes Karzinom bezeichnet [9].

1.5.1 URSACHEN FÜR LUNGENKREBS

Lungenkrebs gehört in Deutschland zu den häufigsten bösartigen Krebserkrankungen und tritt überwiegend ab dem vierzigsten Lebensjahr auf, während das Durchschnittsalter bei circa sechzig Jahren liegt. Das Erkrankungsrisiko

nimmt mit dem Alter zu, wobei eine Gefährdung ebenfalls in direktem Zusammenhang mit Tabakkonsum steht.

Generell geht man davon aus, daß verschiedene Faktoren bei der Entstehung von Lungenkrebs zusammenwirken. Zunächst einmal können schädigende Substanzen, die mit der Luft eingeatmet werden, die Schleimhautzellen der Bronchien schädigen und in tumoröse Zellen umwandeln. Weiterhin spielen Faktoren wie Ernährung, Infektionen (Tuberkulose) und möglicherweise auch genetische Disposition eine Rolle bei der Entstehung von Lungentumoren.

Vorwiegend ist in dieser Richtung allerdings der fortwährende Konsum von Tabakprodukten, so daß neunzig Prozent der Lungenerkrankungen dem Rauchen zugeschrieben werden können. Die Menge an konsumiertem Tabak und die Zeitdauer des Rauchens spielen bei der Risikoabschätzung eine Rolle. Auch das sogenannte Passivrauchen, sprich das Einatmen des von Zigaretten, Zigarren oder ähnlichem abgegebenen Qualms, ist hier zu nennen, da dieser Qualm eine höhere Konzentration der kanzerogenen Substanzen enthält, als der von den Rauchern selbst eingeatmete.

Weitere schädigende Substanzen, die besonders in Kombination mit Tabakkonsum die Krebsentstehung fördern können, sind Asbest, Arsen, Chrom, Nickel, Berilium, Cadmium, aromatische Kohlenwasserstoffe und wahrscheinlich auch Dieseldämpfe. Hier sind im Besonderen Menschen gefährdet, die berufsbedingt mit diesen Substanzen in Berührung kommen.

Ebenfalls begünstigen Faktoren wie vitaminarme Ernährung und die Belastung von Dieselruß die Entwicklung von Lungentumoren.

1.5.2 DETEKTION UND DIAGNOSE VON LUNGENKREBS

Unglücklicherweise verursachen Lungentumore zu Beginn ihres Wachstums keinerlei Beschwerden. Haben sich erst einmal ausreichend große Tumore entwickelt, treten Symptome auf, die jedoch nicht unbedingt explizit für eine

Krebserkrankung charakteristisch sind und vielfach mit anderen Krankheitsbildern übereinstimmen. Länger anhaltender Husten, Heiserkeit, Bronchitis, Atemnot, Schmerzen in der Brust, Auswurf mit und ohne Blut, Schwellungen an Hals und Gesicht, Appetitlosigkeit, Lähmungen und mit Schmerzen gepaarte Fieberschübe können Hinweise – unter anderem – auf Lungentumore sein.

1.5.3 BEHANDLUNG VON LUNGENKREBS

Bei der Behandlung von Lungentumoren sind Faktoren wie Form des Lungenkrebses und Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose zu berücksichtigen. Weiterhin hat die Therapie ebenfalls Einfluß auf die Lungenfunktion, so daß Alter, der allgemeine Gesundheitszustand und mögliche Begleiterkrankungen berücksichtigt werden müssen.

1.6 Behandlungsstrategien

Ist für einen Patienten die Diagnose Krebs gestellt worden, hält die Medizin eine Reihe unterschiedlicher Behandlungsmöglichkeiten bereit, die jeweils der Krebsart und den physiologischen Bedingungen angepaßt werden können.

1.6.1 REGIONALE CHEMOTHERAPIE

Bei der regionalen Chemotherapie werden Zytostatika zielgerichtet in bestimmten Körperregionen verabreicht. Die regionale Anwendung der Medikamente erhöht die Wirkstoffkonzentration an der gewünschten Stelle im Tumor und reduziert die Nebenwirkungen auf den Rest des Körpers. Die höhere Konzentration des Chemotherapeutikas am Tumor soll die im Tumor bestehende Resistenz überwinden und die Effektivität verbessern. Die Applikation kann über einen intraarteriellen Katheter oder intraperitoneal erfolgen.

1.6.2 SYSTEMISCHE CHEMOTHERAPIE

Die Systemische Chemotherapie betrifft im Vergleich zur regionalen den gesamten Körper. Sie besteht aus einer Kombination verschiedener Zytostatika, die allerdings ein entsprechendes Nebenwirkungsprofil mit sich bringen können.

1.6.3 ONKOLOGISCHE CHIRURGIE

Um einen Tumor an sich zu entfernen, steht die onkologische Chirurgie zur Verfügung. Die Resektion eines Tumor kann kurativ (heilend) oder pallativ (lindernd) sein. Operationen werden für weitgehend alle Bereiche des Körpers durchgeführt. Vielfach wird eine perioperative Stimulation des Immunsystems angewendet.

Bestimmte Tumorformationen sind allerdings trotz aller zur Verfügung stehenden Methoden nicht vollständig entfernbar. Vor allem stark ausgebreitete Wucherungen oder Tumore in ungünstiger Lage müssen mit einer Vortherapie behandelt werden, um in erster Linie eine Größenreduktion zu erreichen. Dieses wird je nach Art oder Lokalisation des Tumors durch regionale Induktionstherapie und/oder mit Vorbestrahlung erreicht. Hat sich die Größe des Tumors verringert, kann eine Resektion und entsprechende Nachbehandlung erfolgen.

1.6.4 STRAHLENTHERAPIE

Bei der Strahlentherapie werden hochenergetische Gammastrahlen verwendet, um die sich teilenden Krebszellen abzutöten. Die Bestrahlung kann zum einen extern mittels Apparaturen erfolgen, welche die Strahlung direkt von außen auf den im Körper lokalisierten Tumor richten. Zum anderen wird eine interne Behandlung mit Strahlungsträgern durchgeführt, die in versiegelten Kapseln in der Nähe des Tumors platziert werden.

Gerade in denjenigen Fällen, wo keine operative Entfernung des Tumors möglich ist, kann die Strahlentherapie eingesetzt werden. Allerdings hilft die Strahlentherapie nur dabei, den Tumor in seiner Größe zu verringern, wenn es auch in zehn Prozent der Patienten zu einer langfristigen Abstoßung kommt.

Weitergehend wird Strahlentherapie häufig in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt. Unglücklicherweise zieht eine Bestrahlung verschiedene Nebenwirkungen mit sich. Ermüdungserscheinungen und Antriebslosigkeit kombinieren sich mit der Anfälligkeit gegenüber Infektionen aufgrund der durch die Strahlung reduzierten Lymphozyten und Trombozyten. Bei Bestrahlung von Verdauungsorganen können Funktionseinschränkungen wie Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall auftreten.

1.6.5 PHOTODYNAMISCHE THERAPIE (PDT)

Eine recht neue Therapie stellt die sogenannte photodynamische Behandlung dar. Hierbei wird eine photosynthetisierende Substanz, zum Beispiel Porphyrin, vor der chirurgischen Operation in den Blutkreislauf appliziert. Die Substanz wird bevorzugt in sich schnell teilenden Zellen eingebaut, wie es gerade Krebszellen darstellen. Vor der Operation wird mittels Lichtstrahlen der passenden Wellenlänge die photoreaktive Substanz angeregt, was wiederum die Produktion von Toxinen nach sich zieht, die den Tumor schädigen. PDT hat den Vorteil, daß die Therapie direkt auf den Tumor anzuwenden ist, weniger angreifend als eine chirurgische Operation ist und mehrfach an der gleichen Stelle angewendet werden kann.

Nachteil ist hier, daß der Tumor durch die Lichtstrahlen erreicht werden muß, eignet sich also nicht für die Behandlung von tiefsitzenden oder größeren Tumoren. Die Effektivität der PDT wird derzeit weiter verbessert.

1.6.6 RADIOFREQUENZ ABLATION (RFA)

RFA wird als Alternative zu chirurgischen Eingriffen angesehen. Dabei wird eine Nadel in den Tumor eingebracht, vielfach mit Unterstützung der Computertomographie, um energetische Radiowellen zu übertragen. Die elektrische Energie der Wellen erzeugt große Hitze, welche Tumorgewebe abtötet und kleinere Blutgefäße verschließt, die den Tumor versorgen. Im Normalfall verursacht RFA keine Schmerzen. Allerdings ist RFA lediglich für frühe Tumorstadien geeignet,

wenn auch hier die Risiken mit gleichen Heilungschancen im Vergleich zu einer chirurgischen Operation nicht gegeben sind.

1.6.7 REGIONALE HYPERTHERMIE

Eine ebenfalls recht neue Therapie zur Tumorbehandlung baut auf die regionale Überwärmung des Tumors (Hyperthermie). Die eingebrachte Wärme schädigt die Krebszellen und verringert die Größe des Tumors.

Bei der Hyperthermie wird das Tumorgewebe von außen auf eine Temperatur von 48° C überwärmt, wobei das umliegende gesunde Gewebe durch die Hitze nicht beschädigt wird. Derartig hohe Temperaturen wirken auf Körpergewebe zytotoxisch. Zudem werden von dem überwärmten (Tumor-) Gewebe sogenannte Hitzeschockproteine produziert. Werden diese vornehmlich vom erhitzten Tumorgewebe prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert, ermöglicht dies eine spezifischere Erkennung und nachfolgende Reaktion durch das Immunsystem, so daß hier eine Art Tumor assoziiertes Antigen vorliegt (siehe Kapitel 1.8).

1.7 Immuntherapie

Neben den von außen eingebrachten Therapien besteht natürlich die Möglichkeit, das körpereigene Immunsystem zu aktivieren, um den Tumor spezifisch anzugreifen und zu bekämpfen. Generell besteht sogar eine der Aufgaben des Immunsystems darin, den Organismus gegen Tumorentwicklung zu schützen, wenn auch die genauen Mechanismen und Zusammenhänge noch nicht ganz verstanden werden. Sicher ist jedoch, daß zwar das Immunsystem zunächst mit einem sich etablierten Tumor in dem Sinne überfordert ist, jedoch nach angewandter Therapie unter Umständen eine komplette Heilung unterstützt.

Gerade deshalb wird mittels der Immuntherapie versucht, die natürlichen Abwehrmechanismen, die anscheinend bei Tumorkranken nicht ausreichend ist, zu aktivieren und eine spezifische Abwehr gegen den Tumor zu erreichen.

Beim derzeitigen Stand der biomedizinischen Forschung und der medizinischen Behandlung selbst werden bestimmte Zytokine und monoklonale Antikörper

eingesetzt, jedoch ist vieles noch in den klinischen Phasen der Entwicklung, bzw. benötigt weitere Grundlagenforschung.

1.7.1 INTERFERON UND ZYTOKINE IN DER IMMUNTHERAPIE

Zytokine, darunter die sogenannten Interferone, werden von Immunzellen produziert und dienen der Kommunikation der Zellen untereinander, sowie der Effektorfunktion gegenüber einer Zielzelle.

Interferon- α war eines der ersten Zytokine, die in der Immuntherapie eingesetzt wurde. Zum einen wurde gezeigt, daß IFN- α das Tumorstadium direkt hemmt und zudem das Immunsystem aktivieren kann. Es wird zur Behandlung von verschiedenen Krebsarten eingesetzt, zum Beispiel verschiedene Myeloma, chronische Leukämien oder maligne Melanome.

Weitere Zytokine, die tumorschädigende Eigenschaften besitzen, sind Interleukin-2 und Tumornekrosisfaktor. IL-2 wird bei der Behandlung von Nierenkrebs und Melanoma eingesetzt.

Leider ist die Behandlung mit Zytokinen immer noch mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden, die unter anderem hohes Fieber und Unwohlsein beinhalten und sich bei hohen Dosen der verabreichten Zytokine noch verstärken können.

1.7.2 MONOKLONALE ANTIKÖRPER IN DER IMMUNTHERAPIE

Im Kontrast zur Stimulation des Immunsystems mit Zytokinen werden in der Immuntherapie auch Antikörper eingesetzt. Durch die vorher definierte Spezifität sollen sie tumoröse Zellen entsprechend markieren und den Immunzellen zugänglich machen. Die Antikörper werden meistens über sogenannte Hybridomzellkulturen im Labor hergestellt.

Ein großer Vorteil besteht zudem darin, die Antikörper modifizieren zu können. Die ersten derartigen Antikörper stammten aus Mauszellen. Hierbei ist zu beachten, daß Mausantikörper nach kurzer Zeit im menschlichen Organismus als fremde Struktur erkannt und vom Immunsystem depletiert werden. Nach molekularer Modifikation

wurden später sogenannte humanisierte Antikörper hergestellt, bei denen die murinen Fc Bereiche der Antikörper durch humane ausgetauscht worden sind und somit hauptsächlich humanen Ursprungs sind.

Als Beispiele für therapeutisch angewendete monoklonale Antikörper wären zum einen das Medikament Rituximab (Ritucan) zur Behandlung von non-Hodgkin-Lymphom zu nennen, zum anderen Trastuzumab (Herceptin), welches die Behandlung von Brustkrebs unterstützt.

Als weitere Option wird versucht, tumorspezifische Antikörper mit zytotoxischen Substanzen, Toxinen oder Radioisotopen zu koppeln. Die Spezifität der Antikörper gewährleistet die Wirkung der mit ihnen verbundenen Substanzen direkt am Tumor, was eine gezielte Anti-Tumor-Wirkung vermitteln soll.

1.7.3 KREBS VACCINE

Die Entwicklung von Impfungen in Form von Vaccinen hat die Bekämpfung von Krankheiten wie Polio, Pocken und Diphtherie revolutioniert. In ähnlicher Weise ist es von großem Interesse, auch in Bezug auf Tumor Vaccine entwickeln zu können, wenn es sich auch in dem Fall weitaus schwieriger gestaltet. Deswegen befinden sich diese im Gegensatz zu den bereits für Behandlungen eingesetzten Zytokine und monoklonalen Antikörpern erst in einer frühen Phase der Entwicklung.

Mögliche Krebsvaccine stammen in den meisten Fällen von tumorösem Gewebematerial, um entsprechende Antigene bereitzustellen. Die Krebsvaccine werden mit anderen Substanzen kombiniert, die der Anregung des Immunsystems dienen. Beides soll das Immunsystem gegen den entsprechenden Krebs wappnen.

Während es jedoch noch nicht möglich war, über Krebsvaccine eine vollständige Regression von Tumoren zu bewirken, werden diese in der Regel gut vertragen und helfen je nach Situation bei der Bekämpfung der Tumore. Gerade im Zusammenhang mit malignem Melanoma haben Studien gezeigt, daß lymphoma-assoziierte Proteine, so genannte Idiotypen, das Immunsystem stimulieren und die Entwicklung von Lymphomen verhindern können.

Generell wird an der Entwicklung von Krebsvaccinen für alle Arten von Tumoren geforscht. Der neuste Fortschritt wurde bei der Entwicklung von Dendritischen-Zell-Vaccinen erzielt. Die Dendritischen Zellen nehmen das Vaccin auf, prozessieren und präsentieren es entsprechend auf den MHC Molekülen, so daß spezifische Zellen der adaptiven Immunantwort aktiviert werden können.

1.8 Tumorimmunologie

Die wichtigste Voraussetzung für die ordnungsgemäße Funktion des Immunsystems ist dessen Fähigkeit, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden zu können. Da es sich bei einem sich entwickelnden Tumor aber um körpereigenes Gewebe handelt, besteht hier die Schwierigkeit der Identifikation als eine den Körper gefährdende Wucherung. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, werden Immunzellen während ihres Reifungsprozesses daraufhin selektiert, nur körperfremde Epitope zu erkennen, jede Selbsterkennung führt zur Apoptose der unreifen Zelle, ein Prozeß der als *Zentrale Toleranz* bezeichnet wird.

Der Selektionsprozeß sieht eine Konfrontation der unreifen Immunzellen mit einer Vielzahl von Epitopen vor, die von Epithelzellen im Thymus präsentiert werden. Alle unreifen Zellen, die nicht in der Lage sind, an die epithelial exprimierten MHC Moleküle zu binden oder deren Bindung zu stark ausfällt, sterben mittels des Programmierten Zelltods, lediglich bei intermediärer Affinität erhalten die Zellen ein Signal zur Reifung zu naiven Effektorzellen. Dennoch ist es möglich, daß Immunzellen trotz einer Spezifität für körpereigene Epitope der Selektion entgehen.

Das Gewebe eines Tumors jedoch produziert mitunter Proteine, die in gesundem Gewebe gar nicht oder nur gering exprimiert werden. Werden diese, für das Immunsystem sozusagen unbekannte Proteine, beziehungsweise deren Fragmente mittels MHC Molekülen präsentiert, können sie von Immunzellen erkannt und bekämpft werden.

1.8.1 TUMORSPEZIFISCHE UND ASSOZIIERTE ANTIGENE

Trotz der eben erwähnten Expression von Tumorantigenen und der damit verbundenen Erkennung schaffen es die unterschiedlichen Tumorarten, der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entkommen. Daher ist es möglich, tumorspezifische T Zellen zum Beispiel im peripheren Blut eines Patienten zu finden, die durchaus dazu in der Lage sind, *in vitro* Tumorzellen zu töten, dies im Körper selbst jedoch nicht vermögen, beziehungsweise reicht die Effektorfunktion der Zellen nicht aus, den Tumor effektiv zu bekämpfen.

Über solche isolierten T Zellen lassen sich allerdings tumor-spezifische Antigene identifizieren. Im Fall wirklich nur für den Tumor zutreffender Antigene spricht man von tumorspezifischen Antigenen (TSA, *tumor specific antigens*). Solche Antigene entstehen durch mutierte Proteine oder aber, im Falle eines Virusinduzierten Tumors, aus den Virusproteinen.

1.8.2 TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE

Neben den tumorspezifischen Antigenen gibt es eine Reihe von Antigenen, die zwar auch von gesundem Gewebe exprimiert werden, jedoch vom Tumor als mutiertes Gewebe in erhöhtem Maße. In diesem Fall spricht man von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA, *tumor associated antigens*).

In beiden Fällen jedoch handelt es sich um Strukturen, die vom Immunsystem als unbekannt angesehen werden können und eine Immunantwort nach sich ziehen.

1.8.3 TUMORNEKROSE

Eine weitere mögliche Abfolge einer Immunreaktion basiert auf der Eigenschaft des Tumors, neben wachsenden Zellen auch nekrotische Zellen aufzuweisen. Eine apoptotische Zelle durchläuft verschiedene Stadien, die im Endeffekt zur Bildung sogenannter *apoptotic bodies* führt. In den *apoptotic bodies* sind alle Zellinhalte, inklusive Enzymen, fragmentierte Nukleodidstücke und dergleichen enthalten, so daß diese nicht in die Umgebung abgegeben werden. *Apoptotic bodies* werden von Makrophagen oder anderen phagozytierenden Zellen aufgenommen.

Im Kontrast dazu zerfällt in der Nekrose die entsprechende Zelle, so daß durch die perforierte Zellmembran Substanzen mit zum Teil toxischer Wirkung auf umliegende Zellen austreten können. Im Falle von nekrotischen Tumorzellen können freigesetzte Proteine von Dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert werden. Nach Wanderung zu den Lymphknoten und Präsentation dieser Antigene gegenüber spezifischen T- und B-Zellen, werden diese aktiviert.

1.8.4 IMMUNSYSTEM VERSUS TUMOR

Aus dem Repertoire der unterschiedlichen Immunzellen sind es vor allem die Natürlichen Killerzellen und die tumor-spezifischen Cytotoxischen T Lymphozyten, die maßgeblich an der Bekämpfung eines Tumors beteiligt sind.

Tumorspezifische Cytotoxische T Lymphozyten (CTL) interagieren mit den von den Tumorzellen exprimierten MHC I Molekülen und sezernieren Substanzen, welche die Zielzellen zur Apoptose bringen.

Auf den vom Tumorgewebe exprimierten MHC Molekülen werden außer Selbst-Peptiden auch die oben beschriebenen tumor-assoziierten (Kapitel 1.8.2) und tumor-spezifischen Antigene (Kapitel 1.8.1) präsentiert. Es ist jedoch bekannt, daß mit fortschreitendem Wachstum des Tumors eben diese MHC Moleküle herunterregelt werden, so daß dahingehend die Erkennung der Tumorzellen erschwert wird. Darüber hinaus fehlen Tumorzellen vielfach kostimulatorische Moleküle, die zusätzliche Signale an eine Zytotoxische T Zelle (*cytotoxic lymphocyte*, CTL) geben würden und für deren Aktivierung essentiell sind. Weiterhin sind Adhensionsmoleküle auf Tumorzellen, die für CTLs wichtig sind, vermindert exprimiert.

Auch vom Immunsystem gegen den Tumor gerichtete Antikörper können im Gegensatz zu ihrer eigentlichen Funktion, nämlich der Markierung unbekannter Strukturen, diesen unterstützen. Zum einen ist es so möglich, stimulatorische Funktion zu vermitteln, sprich gebundene Antikörper aktivieren entsprechende Rezeptoren, die positive Signale an die Tumorzelle vermitteln. Zum anderen können

durch gebundene Antikörper Epitope auf der Zelloberfläche verdeckt werden, die eine Erkennung der mutierten Zelle ermöglicht hätten.

Zusätzlich zum Entzug oder Verdecken von Oberflächenstrukturen können Tumorzellen Zytokine freisetzen, die das Immunsystem hemmen. Regulatorische T Zellen produzieren TGF- β , um die Funktion von Effektorzellen einzuschränken. Auch Tumore können Zytokine wie TGF- β produzieren.

Neben den immunsuppressiven Zytokinen können Tumore auch Zytokine herstellen, die ihre eigene Proliferation stimulieren und damit autokrin wirksam sind.

1.8.5 REGULATORISCHE T ZELLEN

Wie schon erwähnt besteht die Funktion von regulatorischen T Zellen in der Hemmung von Effektorfunktionen nach der Bekämpfung eines Pathogens und zur Kontrolle von Immunreaktionen.

Die wirksamsten von Regulatorischen T Zellen produzierten Zytokine sind TGF- β und Interleukin-10. Neben dem Vorhandensein der dazugehörigen Rezeptoren auf den zu hemmenden Zellen ist es bei beiden Zytokinen wichtig, in welcher Konzentration sie vorliegen.

Zu den Markern, mit denen regulatorische T Zellen zu charakterisieren sind, gehören die Oberflächenmoleküle CD4 (Differenzierungsmarker), die α -Kette des IL-2 Rezeptors CD25 und der nukleäre Transkriptionsfaktor FoxP3. Als weitere Marker gelten zudem die Oberflächenmoleküle GITR und CTLA-4, die je nach Differenzierungs-, beziehungsweise Reifungsgrad von der Regulatorischen T Zelle exprimiert werden.

1.9 Zytokine des Immunsystems

Ein wichtiger Faktor in der Koordination einer Immunantwort ist die Kommunikation der Immunzellen untereinander. Diese Kommunikation erfolgt dabei über Botenstoffe, sogenannte Zytokine. Werden diese von Immunzellen ausgeschüttet, können sie auf die gleiche Zelle wirken (autokrin) oder über

Verteilung in der Umgebung auf andere Immunzellen (parakrin). [11] Eine Untergruppe der Zytokine bilden die sogenannten *Interleukine* (lateinisch: *inter* = zwischen, *leukos* = weiß). Interleukine werden hauptsächlich von Lymphozyten produziert, also den weißen Blutkörperchen.

Die Gruppe der Zytokine läßt sich über ihre jeweilige Struktur in unterschiedliche Klassen einteilen, welche die Helikalen Zytokine [14], die trimere Tumornekrosisfaktor-Familie [15], die Zysteinknoten-Wachstumsfaktoren [16] und die β -trifol Wachstumsfaktoren [17] umfassen.

Die Signalgebung der Zytokine erfolgt über von den Zielzellen expremierten und für das entsprechende Zytokin spezifische Rezeptoren. Zytokinrezeptoren werden aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in sechs Hauptfamilien untergliedert: Klasse I Zytokinrezeptoren, Klasse II Zytokin-rezeptoren, Tumornekrosisfaktorrezeptoren, Interleukin-1 Rezeptoren, Thyrosinkinaserzeptoren und Chemokinrezeptoren [11, 12, 13].

Generell stellt die Kommunikation über Zytokine, respektive die an die Zellen zu übertragenden Signale ein breites Spektrum an Funktionen bereit, welche die Induktion einer Immunantwort, Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose beinhalten.

1.10 Klasse-I-Zytokinrezeptoren

Die größte Gruppe der oben erwähnten Rezeptorfamilien stellen die Klasse-I-Zytokinrezeptoren dar, die auch unter der Bezeichnung Haematopoeietinrezeptoren bekannt sind [12, 18, 19] Diese Typ I Membranproteine besitzen eine N-terminale extrazelluläre und eine C-terminale intrazelluläre Orientierung. Die extrazellulären Segmente zeigen einen modularen Aufbau, der eine bis zu 200 Aminosäuren lange Zytokinbindungshomologie-Region (cytokine binding homology region, CHR) [20] und klassische Motive zur Zytokinbindung aufweist. Letztere sind strukturell verwandt mit dem sogenannten human growth hormone Rezeptorkomplex (hGH) [21].

Die Zytokinbindungsstelle für die meisten CHR Module ist in der Spitze der Ellenbogenregion, die hauptsächlich aus Zwischensträngen besteht, welche die β -Stränge von beiden N- und C-terminalen Domänen verbinden [21]. Das grundlegende CHR Modul ist in jedem Klasse I Zytokinrezeptor vorhanden [21, 27], von dem ein einziges ausreicht, um den Liganden zu binden und eine Rezeptorhomodimerisation zu bewerkstelligen. Allerdings benötigen Klasse I Rezeptoren zusätzliche Domänen wie Immunglobulin-ähnliche Domänen, wie sie in der gp130 Familie gefunden werden können, um ein Signal an die Zelle weitergeben zu können [28, 29].

Die durch Assoziation entstehenden Rezeptorkomplexe treten als Heterodimere (IL-4, IL-7, etc.) [48], als Heterotrimere (IL-2, IL-15) [49, 50], Tetramere (G-CSF) [51, 52], Hexamere (hIL-6/IL-6 α /gp130) [53] oder sogar Dodekamere (GM-CSF/GM-CSF α / β c) [54]. Die prägnanteste Eigenschaft dieser Rezeptorkomplexe ist der Gebrauch einer allgemeinen, in verschiedenen Komplexen beinhaltenden Rezeptoreinheit zur Signalgebung zusammen mit zytokinspezifischen Ketten.

Die signalgebende Kette besitzt in den meisten Fällen keine Spezifität für ein Zytokin, beinhaltet aber intrazelluläre Motife zum Starten einer intrazellulären Signalkaskade. In Kombination jeweils mit den zytokinspezifischen α -Ketten entsteht ein für das entsprechende Zytokin hochaffiner Rezeptorkomplex. Die Kombinationsmöglichkeiten der Rezeptorketten unterstützt eine gewebe-spezifische Expression und Verwendung der Rezeptorkomplexe [29].

Bindet ein Ligand an den Rezeptor, lagern sich die Rezeptoren zusammen (Oligomerisierung) und bringen ihre intrazellulären Domänen in räumliche Nähe. Auf diese Weise sind sie in der Lage, mit Tyrosinkinase aus der Januskinase Familie, begrenztem Maße auch mit TYK Kinasen, zu assoziieren [31, 32, 33, 35].

Die an den Rezeptor assoziierten JAK, respektive TYK Kinasen können sich selbst und die intrazellulären Domänen der Rezeptoren phosphorylieren. Die phosphorylierten Tyrosine der Rezeptoren dienen anschließend als Andockstellen für eine weitere Gruppe von Proteinen. Binden sogenannte *signal transfer and activator*

of transcription (STAT) an die Rezeptoren, werden sie phosphoreliert und können anschließend wieder vom Rezeptor dissoziieren.

Phosphorelierte STATs formen Dimere, welche wiederum in den Nukleus translozieren können, um dort an entsprechenden DNA Sequenzen zu binden und als Transkriptionsfaktor wirken [34, 35, 36].

Alternative Signalwege der Klasse-I-Zytokinrezeptoren stellen Mechanismen über RAS-RAF-MAP Kinasen [37], PI3 Kinasen [38] und Insulin Substratrezeptoren [39] dar.

Leider sind die strukturellen Aspekte der JAK-STAT Kommunikation während der Rezeptorsignalgebung nur wenig verstanden und stellen demnach ein großes Zukunftsziel in der Strukturbiologie der Zytokinrezeptoren dar [40].

1.10.1 DIE ALLGEMEINE γ -KETTE (CD132)

Eine Rezeptoreinheit, die für die Signalgebung eines Rezeptors, wichtig ist, stellt die sogenannte Allgemeine γ -Kette dar.

Die Allgemeine γ -Kette ist der signalgebende Rezeptor für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 [29]. Die biologische Wichtigkeit der γ -Kette wird dadurch deutlich, daß Mutationen in derselben oder auch in der mit ihr assoziierten JAK3 Kinase die Funktion aller γ -Ketten abhängiger Zytokine unterbindet, was schwerwiegende Folgen nach sich zieht (x-linked severe combined immunodeficiency disease (X-SCID) [41, 42].

Eine Ausnahme dazu stellt der Rezeptor für IL-2, beziehungsweise für IL-15 dar, welche beide aus Heterodimeren bestehen, genauer gesagt aus strukturmäßig einzigartigen α -Untereinheiten, die mit einer β -Kette und der γ -Kette zu einem Rezeptorkomplex assoziieren.

Im Vergleich dazu bestehen die Typ I Rezeptoren für IL-4, IL-7, IL-9 und IL-21 aus jeweils einer α -Kette und der γ -Kette. Ein interessanter Aspekt besteht darin, daß die α -Ketten zum Teil mehrere Zytokine binden können. So heterodimerisiert IL-4R α mit

der γ -Kette zu einem Typ I Rezeptor für IL-4, während in Assoziation mit IL-13R α 1 ein Typ II IL-4R entsteht, der zudem auch IL-13 binden kann [43, 44, 45].

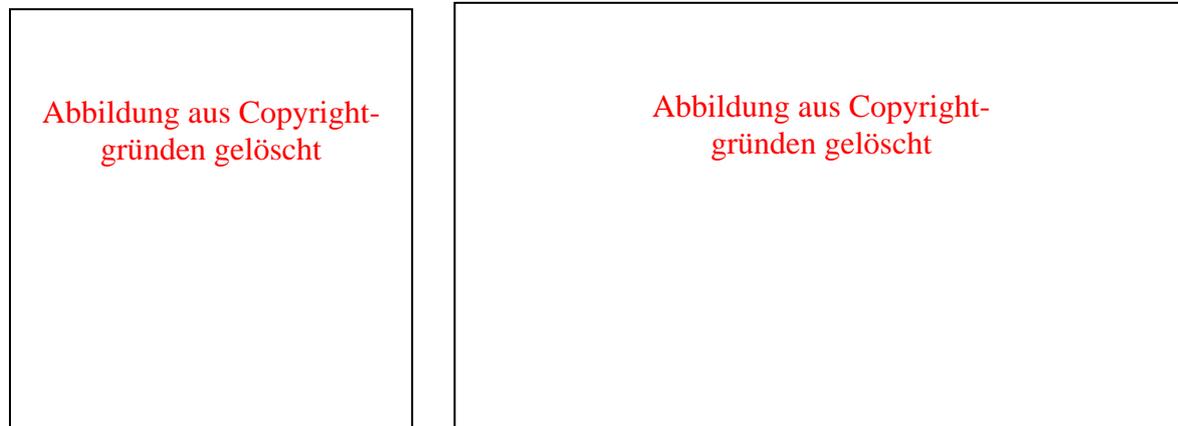


Abbildung 4: CHR und γ c - Rezeptorkomplexe

(A) Die Allgemeine γ -Kette bindet unterschiedliche Zytokine. Die entsprechend interagierenden Zytokine besitzen eine dreidimensionale Struktur, die vor allen durch Bündel von vier Helices charakterisiert sind. (B) Kombinationen von Rezeptorkomplexen, die jeweils aus einer liganden-spezifischen α - und/oder β -Kette besteht, die mit der Allgemeinen γ -Kette assoziieren. [40]

1.11 Der Interleukin-2 Rezeptorkomplex

Wie oben bereits erwähnt weichen die Rezeptorkomplexe für IL-2 und IL-15 von den anderen Klasse I Rezeptoren ab. Prägnantester Unterschied neben dem trimeren Charakter der Komplexe ist das Fehlen der CHR Domäne. Um IL-2, respektive IL-15 binden zu können, besitzen die α -Ketten eine sogenannte Sushi-Domäne [46, 47].

Der vollständige Rezeptorkomplex umfaßt drei unterschiedliche Ketten, IL-2R α , IL-2R β und die allgemeine γ -Kette. IL-2R α wird als Rezeptor mit geringer Affinität für IL-2 angesehen ($K_d \approx 10$ nM), hat aber keine eigene Signalübertagung [55]. IL-2R β formt mit der γ -Kette einen IL-2 Rezeptor mit mittlerer Affinität ($K_d \approx 1$ nM) und wird so auf NK Zellen, Makrophagen und ruhenden T Zellen exprimiert [56]. IL-2R β besitzt selbst eine geringe Affinität zu IL-2 ($K_d \approx 100$ nM), während die γ -Kette allein keine meßbare Affinität aufweist [57, 58].

Die Heterodimerisation von IL-2 β und der γ -Kette in der Anwesenheit von IL-2 ist notwendig und ausreichend für ein effektives Signal an die Zelle durch die

Aktivierung von JAK1 und JAK2 Kinasen, die nach Ligandenbindung entsprechend mit den intrazellulären Domänen assoziieren [59, 60]. Jedoch ist es der vollständige Rezeptorkomplex, der die meisten biologischen Effekte von IL-2 *in vivo* vermittelt [61].

Über eine Reihe von Untersuchungen von Bindungseigenschaften und Affinitäten von löslichen Formen der verschiedenen Rezeptorvarianten [62, 63, 64, 65, 66] und ähnlichen Analysen mittels thermodynamischen Messungen [57] kann das IL-2 Rezeptor System als sehr genau charakterisiert angesehen werden angesichts der zellulären und biochemischen Errungenschaften [40].

Die erste komplexe Struktur der allgemeinen γ -Kette wurde in der Tat im vierteiligen Komplex aus IL-2/IL-2R α /IL-2R β / γ c erreicht [49, 50]. Betrachtet man den Rezeptorkomplex aus Sicht von der Zellmembran aus wird ersichtlich, daß IL-2R α oben auf dem Zytokin IL-2 zu liegen kommt, während IL-2R β und γ c eine Ypsilon-artige Formation einnimmt, in dessen Kerbe das Zytokin bindet.

Wie oben erwähnt exprimieren ruhende Zellen hauptsächlich den IL-2R β und die γ -Kette. Durch Aktivierung über ein entsprechendes Antigen wird die Expression von IL-2R α erhöht, so daß die Zellen sensitiver auch für geringere Konzentration an IL-2 werden und eine einfache klonale Expansion ermöglicht.

1.11.1 DER IL-2R α (CD25)

Der humane IL-2R α wird auch als Tac Antigen bezeichnet, ist ca. 55 kDa groß und weist extrazellulär 219 Aminosäuren auf, die Transmembrandomäne ist 19 Aminosäuren und die zytoplasmatische Domäne ebenfalls 19 Aminosäuren groß [67, 68, 69].

Der kurze zytoplasmatische Schwanz ist an der Signaltransduktion nicht beteiligt, weist aber zwischen Mensch und Maus eine hohe Homologie auf, so daß vermutet wird, daß dieser eine noch nicht bekannte, aber dennoch wichtige Funktion haben könnte [60].

Die Sequenzanalyse der IL-2R α zeigt, daß diese Rezeptorkomponente die sonst vorhandene Charakteristik der Klasse I Zytokinrezeptoren nicht aufweist. Die

Krisallisation von IL-2 zusammen mit IL-2R α war ein wichtiger Meilenstein, nicht nur in Hinsicht auf das Ziel, Therapeutika für die Immunsuppression zu entwickeln [70]. Durch die im Jahr 2005 erreichte Darstellung in einer Auflösung von 2,8 Å [46] wurde nicht nur die besondere Struktur dieser Kette ersichtlich, sondern auch wichtige Hinweise gewonnen, inwieweit die Rezeptoren mit IL-2 und mit den anderen Untereinheiten zusammenarbeiten. Der globulare Teil des IL-2R α der extrazellulären Region besteht aus zwei sogenannten Sushi-Modulen. IL-2 kann in einer Vertiefung zwischen zwei Helices andocken und wird auf diese Weise den seitlich sich angliedernden IL-2R β und γ Kette präsentiert.

Dieser Umstand führte zu der Vermutung, daß IL-2R α Moleküle durch ihre hochaffine Bindung ein effizientes Einfangen von freiem IL-2 unterstützen, welches sie direkt an die anderen Rezeptorkomponenten weitergeben. Darüber hinaus ist IL-2R α etwa zehn bis zwanzig Mal höher exprimiert als IL-2R β [71].

Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) mit löslichen Rezeptordomänen zeigten einen Affinitätsanstieg bei IL-2R β in der Anwesenheit von IL-2R α [57]. Zudem steigt die Umsetzung von IL-2 um das drei- bis zwanzigfache, wenn die Rezeptoren beide auf der Zelloberfläche exprimiert werden [55, 58]. Eine mögliche Erklärung wäre eine kombinierte Bindungsdomäne für IL-2, welche die kombinierten Rezeptoreinheiten miteinander bereitstellen können. Zwei Perspektiven beschreiben die Wirkung dieser Kooperation. Zum einen kann der höher exprimierte IL-2R α durch Einfangen des IL-2 aus der Umgebung das Zytokin an der Zelloberfläche konzentrieren. Zum andern könnte eine Bindung an IL-2R α eine geringfügige Konformitätsveränderung bei dem angedockten IL-2 bewirken, was aber nachfolgend die Affinität zu IL-2R β erhöht [40].

1.11.2 DER IL-2R β (CD122)

Auch wenn die Nomenklatur bezüglich des IL-2R β abweicht, ist diese Rezeptorkette analog zu den anderen α -Rezeptoren für andere Zytokine zu sehen, die ebenfalls mit der allgemeinen γ -Kette zur Signalübertragung assoziieren. In diesem Fall jedoch

besteht die hauptsächliche Bindungsaktivität bei einer weiteren Rezeptoreinheit, nämlich IL-2R α , so daß man auf dieser Basis von der IL-2 Rezeptor β -Kette spricht.

IL-2R β ist ein circa 75 kDa großes Protein und besteht aus einer 214 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne, die Transmembrandomäne zählt 25 Aminosäuren, zuzüglich 286 Aminosäuren für die intrazelluläre Domäne [72].

Letztere weist ein Box 1 und ein Box 2 Motiv an der membranproximalen Region auf, die Bindungsstellen für JAK 1 bereitstellen [35].

Wie erwähnt, wirkt die Kombination von IL-2R β mit der allgemeinen γ -Kette bereits als Rezeptor mit geringer Affinität zu IL-2. Nach Bindung von IL-2 assoziieren IL-2 β R und γ c, so daß über ihre in räumliche Nähe gebrachten intrazellulären Domänen der JAK Kinase Signalweg aktiviert wird.

1.11.3 INTERLEUKIN-2 [IL-2]

Das Zytokin Interleukin 2 ist ein Prototyp Mitglied und erfüllt vielseitige Funktionen im Immunsystem [56, 73, 74]. Unter physiologischen Bedingungen wird IL-2 hauptsächlich von aktivierten T Zellen produziert und fördert die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von reifen T und B Zellen und die zytolytische Aktivität von Natürlichen Killerzellen [56]. Ruhende Zellen produzieren kein IL-2.

Interleukin-2 selbst ist ein Protein bestehend aus 133 Aminosäuren und weist eine Masse von 15,4 kDa auf. Bezogen auf die Aminosäuresequenz weist IL-2 keinerlei Ähnlichkeiten zu anderen Zytokinen auf.



Abbildung 5: Strukturelle Eigenschaften des Interleukins 2

Struktur und Reaktivität des Interleukins 2: (A) zeigt ein Modell von Interleukin-2 mit den Bindungsepitopen der Aminosäuren Tyr-103 für die γ -Kette und Phe-169 für gp130. In (B) sind an der Oberflächenstruktur von IL-2 hydrophobische (blau) und hydrophile (rot) Bereiche gezeigt, die an der Bindung des Zytokins beteiligt sind. (C) Interaktion zwischen Interleukin-2 und der γ -Kette. Die Helices und die Kontaktaminosäuren sind an den Rezeptor angedockt [40].

Das von einer Zelle nach deren Aktivierung produzierte IL-2 kann zum einen auf andere Zellen in parakriner Weise wirken, sprich zur Stimulation anderer Zellen beitragen, zum anderen auch auf die gleiche Zelle in autokriner Weise. Demnach ist IL-2 sowohl im Menschen, als auch in der Maus ein wichtiger Wachstumsfaktor für Immunzellen. Neben der Stimulation zu Proliferation und der Aktivierung von Immunzellen unterstützt IL-2 die klonale Expression von Memory Zellen [122, 123]. Aufgrund dieser Funktionen ist IL-2 ein zentraler Regulator zur Steuerung einer Immunantwort und spielt eine wichtige Rolle in anti-inflammatorischen Reaktionen, Haematopoese und die Kontrolle von Tumoren.

IL-2 stimuliert die Produktion von IFN- γ , aber auch von IL-1, TNF- α und TNF- β . In Zusammenhang mit anderen Zytokinen ergeben sich weitere Perspektiven. Ist zum Beispiel eine ruhende Zelle durch ein entsprechendes Antigen aktiviert worden und expandiert in Reaktion auf IL-2, entscheidet sich ihr weiterer Weg durch IL-4, ob sie sich zu einer Th2 Zelle entwickelt (in Anwesenheit von IL-4) oder zu einer Th1 Zelle (ohne IL-4). Darüber hinaus stimuliert IL-2 zusammen mit IL-4 B Zellen zur Proliferation und vor allem zur Produktion von Immunglobulinen [43].

Abbildung 6: Der IL-2 Rezeptorkomplex

(A) Extrazellulärer Rezeptorkomplex des IL-2R mit IL-2, IL-2R α , IL-2R β und γ -Kette, (B) IL-2 in seinem vierteiligen Rezeptorkomplex. IL-2 wird von IL-2R α in *cis* Stellung an IL-2R β und γ -Kette präsentiert, (C) Sequenzieller Zusammenbau des IL-2-Rezeptorkomplexes [40].



Abbildung aus
Copyright-
gründen gelöscht



Abbildung aus
Copyright-
gründen gelöscht



Abbildung aus Copyright-
gründen gelöscht

1.12 Der Tumor Necrosis Factor Signalweg

Tumornekrosisfaktor, auch bekannt als TNF- α , wurde 1975 als ein endotoxin-induzierendes Glykoprotein entdeckt. Als solches verursachte TNF- α haemorrhagische Nekrose von Sarkoma, die in Mäuse transplantiert wurden [75].

TNF wird seitdem mit einer Reihe von Entzündungserscheinungen, Infektionen und für den Organismus böswilligen Konditionen in Zusammenhang gebracht. Die wichtige Rolle, die TNF in verschiedenen Krankheitsbildern spielt, wurde bei der Behandlung durch die Effizienz von verabreichten anti-TNF Antikörpern oder löslichen TNF Rezeptoren (TNFRs) hervorgehoben. Dahingehend ließen sich Krankheiten wie Rheumatoide Arthritis oder ähnliche, auf inflammatorischen Effekten beruhende Krankheiten kontrollieren.

Im Organismus selbst wird TNF hauptsächlich von Monozyten, beziehungsweise Makrophagen während einer entzündlichen Krankheit produziert. Jedoch können auch andere Zellen nach entsprechender Aktivierung TNF sezernieren. Dazu gehören Mastzellen, T und B Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Neutrophile, Endothelzellen, Glatte und Herzmuskelzellen, Fibroblasten und Osteoklasten. Bezüglich der T Zellen beschränkt sich die Expression von TNF- α auf die CD4⁺ T Zellen, während CD8⁺ T Zellen so gut wie kein TNF- α produzieren.

TNF ist in gesunden Organismen normalerweise nicht nachweisbar, lediglich unter inflammatorischen oder infektiösen Konditionen sind erhöhte Mengen in Serum oder Gewebe festzustellen [78, 79]. Bei Infektionen korrelieren die TNF Level sogar mit der Schwere der Infektion [80, 81].

Verschiedene Stimuli können bei aktivierten Zellen die Produktion von TNF- α veranlassen, was Interferone, IL-2, GM-CSF und Immunkomplexe mit einschließt. Antagonisten, die eine Produktion unterbinden, sind Substanzen wie IL-6, TGF- β und Vitamin D3.

Eine Expression von TNF kann zunächst als pro-TNF auf der Zelloberfläche erfolgen. Das Pro-TNF Protein, welches eine Größe von 26 kDa aufweist, kann durch Matrix-Metalloproteasen in seiner extrazellulären Domäne gespalten werden, so daß die lösliche Form von TNF- α mit einer Größe von 17 kDa entsteht. Beide Formen assoziieren als Trimer zu ihrer aktiven Form und können über ihre Rezeptoren unterschiedliche biologische Aktivitäten vermitteln.

TNF- α converting enzyme (TACE, auch bekannt als ADAM-17) vermittelt die Ausschüttung von TNF von der Zelloberfläche [76], aber ist ebenfalls an der Prozessierung von anderen zellmembranverankerten Proteinen beteiligt, was auch die TNF-Rezeptoren einschließt, die in diesem Fall als lösliche Rezeptoren die Aktivität von TNF einschränken können [77].

Die Funktion von TACE kann dahingehend entweder pro- oder anti-inflammatorisch sein, je nach dem auf welcher Zelle es wirkt, sprich auf einer Effektorzelle (z. B. Makrophage) oder einer Zielzelle (z.B. Endothelzelle), um entweder den Liganden oder den Rezeptor von der Oberfläche zu lösen.

1.12.1 DIE TNF-SIGNAL-TRANSDUKTION

TNF Signaltransduktionswege sind komplex und noch nicht wirklich verstanden. Die Schlüsselaufgabe des TNF Signalweges ist die Regulation der Transkription von NF κ B. Allerdings wurden laut unterschiedlicher Untersuchungen unter anderem mit interferierender RNA die mögliche molekulare Kombination von 221 Molekülen und 80 bisher unbekanntem Interaktoren identifiziert, die in der Modulation allein des TNF-NF κ B Weges beteiligt sein könnten [82].

Alle bekannten Signalwege durch TNF werden von zwei unterschiedlichen Rezeptoren vermittelt, nämlich dem TNFR1 (auch mit TNFRSF1A, CD120a oder p55 bezeichnet) und dem TNFR2 (alternativ als TNFRSF1B, CD120b, p75 benannt). Für beide Rezeptoren liegt eine unterschiedliche Regulation auf verschiedenen Zelltypen in normalem und erkranktem Gewebe vor [83].

Die extrazellulären, liganden-bindenden Domänen von TNF-Rezeptoren beinhalten Cystein-reiche Subdomänen, die charakteristisch für Mitglieder der *nerve growth factor*/ TNF-Rezeptoren Gen-Familie sind. Im Kontrast dazu zeigen die intrazellulären Domänen der beiden Rezeptoren keinerlei Sequenzhomologien und sind frei von intrinsischen Enzymaktivitäten, was für eine aktive Signalübertragung die Rekrutierung von zytosolischen Proteinen durch Protein-Protein-Interaktionsdomänen erfordert [84].

Die Fähigkeit von TNFR1 und TNFR2, zum einen mit dem gleichen, zum anderen mit unterschiedlichen Molekülen zu interagieren, erklärt die unterschiedlichen Funktionen der Signalgebung.

Basierend auf Zellkulturarbeit und Studien mit Rezeptor-KO-Mäusen ist bekannt, daß sowohl die pro-inflammatorischen, als auch die Apoptosesignalwege, welche durch TNF vermittelt werden können und Gewebeverletzung mit sich ziehen kann, im Großen und Ganzen von TNFR1 vermittelt werden. Die Signaltransduktion von TNFR2 dagegen ist noch nicht gut genug charakterisiert, wenn auch erste Ergebnisse zeigen, daß TNFR2 Signale Gewebeerneuerung und Angiogenese vermittelt.

1.12.2 DER TNF-REZEPTOR-1

TNFR1 Signale werden durch die Rekrutierung des sogenannten *TNFR-associated-death-domain-protein* (TRADD) vermittelt (12). TNFR1 ist ein Typ 1 Transmembranprotein, welches in ruhenden Zellen hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist, von wo aus diese auf die Zelloberfläche gebracht werden können.

Die wirkliche Bedeutung des im Golgiapparat vorliegenden Vorrats an TNFR1 Molekülen ist unklar. Eine Hypothese besagt, daß auf diese Weise die Oberflächenexpression schnell durchzuführen ist, um die Zelle zügig für TNF Signale empfänglich zu machen. Unterstützt wird dies durch die Parallele, als daß für Glattmuskulaturzellen gezeigt wurde, daß in deren Fall ein Vorrat an Fas-Molekülen im Golgi vorliegt, von wo aus die Moleküle leicht auf die Zelloberfläche gebracht werden können und die Zelle für Fas-FasL Interaktion empfänglich macht [85].

Der auf der Oberfläche expremierte TNFR1 assoziiert zu Trimeren, welche mit sogenannten *pre-ligand assembly domains* (PLAD) assoziieren [86], welche in einer, der Membran abgewandten Zysteinreichen Region andocken.



Abbildung 7: TNF-Rezeptor

Strukturelles Modell eines TNF- α Trimers gebunden durch den trimere TNF Rezeptor. (Bild: <http://www.ensembl.discovery.com>)

Ist kein Ligand an den Rezeptor gebunden, vor-assoziiieren die zytoplasmatischen Domänen mit dem *silencer of death domain* (SODD) Protein [87]. SODD soll ein konstitutives Signal des TNFR1 verhindern [88].

Sowohl TNFR1, als auch SODD besitzen sogenannte *death domains* (DD). Die hauptsächlich Eigenschaft diese Proteinmotivs besteht darin, die Interaktion zwischen DD tragenden Protein herzustellen, sprich eine DD kann an die DD eines anderen Proteins binden. Demzufolge bindet SODD mit der eigenen DD an die DD von TNFR1 und unterbindet auf diese Weise eine Signaltransduktion.

Bindet nun TNF als Ligand an den TNFR1, wird SODD gelöst und gibt die DD des Rezeptors frei. Nunmehr kann ein Protein names *TNFR-associated-death domain protein* (TRADD) binden. TRADD initiiert die Rekrutierung von zwei weiteren Proteinen. Das erste ist das *receptor-interacting-protein 1* (RIP-1), eine Serin-Theonin-Kinase, die an TRADD durch eine eigene DD bindet. Das zweite Protein stellt *TNFR-associated-factor-2* (TRAF-2) dar, eine E3 Ubiquitinligase [89], die keine DD beinhaltet. Der gesamte Komplex wird in die Zelle aufgenommen [90], bevor der TRADD-RIP1-TRAF2 Komplex von TNFR1 gelöst wird. Inhibitoren für diesen Prozeß können eine Signalgebung unterbinden [91, 92].

Die Weiterführung der Signalkaskade erfordert die Rekrutierung und Aktivierung von verschiedenen Mitogen-aktivierten Protein Kinasen Kinasen Kinasen (MAP3Ks). RIP-1 rekrutiert MEKK-3 und *transforming-growth-factor- β* (TGF- β)-*activated kinase*

(TAK-1). Diese wiederum aktivieren die β -Untereinheit des *inhibitor of κ B* (I κ B) Komplexes [93, 94], wodurch zur Phosphorelierung des I κ B Proteins kommt. Letzteres bewirkt eine I κ B Ubiquitinierung und dessen Degradation durch Proteasome.

Zytosolische I κ B Proteine bilden einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren der NF- κ B Familie und halten sie durch Maskierung der Lokalisationssignale im Zytosol. Wird I κ B nunmehr aktiviert und entsprechend degradiert, wird NF- κ B freigesetzt, kann in den Nukleus translozieren und dort die Transkription entsprechender Gene initiieren.

TRAF2 kann ebenfalls die NF κ B Aktivierung vermitteln, zum einen durch die Bindung der IKK Komplexes [95], zum anderen durch Rekrutierung des *inhibitor of cellular apoptosis proteins* (cIAP)-1 und -2. CIAPs besitzen Kaspaseinhibitoren, die ebenfalls über eine Ubiquitinligaseaktivität verfügen und kann sich an der I κ B Degradation beteiligen [96].

Der TRADD-RIP1-TRAF2 Komplex kann ebenso die sogenannte *apoptosis-signalling-kinase-1* (ASK-1) rekrutieren, welches eine MAP3K darstellt, die mit TRAF2 assoziiert [97] und MAP2Ks aktiviert, was MEK-4 und -6 mit einschließt [98, 99]. Dies MEKs phosphorelieren und aktivieren *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs) und p38 MAPKs.

TNFR1 kann auch mit sogenannten FAN (factor associated with neutral SMase activation) interagieren und die Apoptose der Zellen über den mitochondrialen Weg aktivieren [100, 101].

Zusätzlich zur Vermittlung von Überlebenssignalen und proinflammatorischen Signalen über NF- κ B und AP-1, kann TNFR1 ebenso Signalwege des Programmierten Zelltods initiieren. Dieses umschließt die Bindung von *Fas-associated DD protein* (FADD) zu TRADD und die nachfolgende Rekrutierung von Pro-Kaspase 8 durch den FADD-TRADD-Komplex. Autokatalytische Aktivierung der gebundenen Pro-Kaspase 8 entläßt Kaspase 8, die wiederum die Apoptose der Zelle

durch Aktivierung von Pro-Kaspase 3 initiieren kann. Die Rekrutierung und Aktivierung von Pro-Kaspase 8 kann durch cFLIP gehemmt werden. Erhöhte Menge an cFLIP vermittelt durch NF- κ B Aktivierung kann die Aktivierung des Apoptosesignalweges verhindern [102].

Zu den oben genannten Signalwegen gibt es anscheinend noch weitere, die aber auf molekularer Ebene noch nicht entschlüsselt worden sind [103].

Abbildung aus Copyright-
gründen gelöscht

Abbildung 8: Der TNF Signalweg

Schematische Darstellung des TNF Signalweges: TNF bindet an seinen Rezeptor TNFR1, woraufhin sich intrazellulär TRADD, TRAF2 und RIP1 rekrutiert werden (complex I). Dieser Komplex initiiert die NF- κ B Aktivierung durch Degradation von dessen Inhibitor I κ B. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B unterstützt unter anderem die Produktion von cFLIP, welches den apoptotischen Signalweg hemmt.

Der aktivierte TNFR1 kann auch durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden und dort dissoziiert der TRADD-TRAF2-RIP1 Komplex. Dieser Komplex rekrutiert FADD und Kaspase 8 (complex II), welches des apoptotischen Signalweg initiiert, je nach Menge an inhibierendem cFLIP. (Bild: Kimberley et al., Arthritis Research & Therapy, 2007 9:217)

1.12.3 DER TNF-REZEPTOR-2

Die Signalwege, die von TNFR2 vermittelt werden, sind weniger gut definiert. Jedoch scheint es, daß TNFR2 sowohl gleiche, als auch gegenteilige Signale im Vergleich zu TNFR1 vermitteln kann.

TNFR2 trägt in seiner intrazellulären Domäne keine DD, kann jedoch mit TRAFs interagieren. Sowohl TRAF1, als auch TRAF2 können an der zytoplasmatischen Domäne des TNFR2 binden, wobei der eigentliche Kontakt durch TRAF2 erfolgt. Allerdings scheint trotz liganden-abhängiger Aktivierung von TNFR2 und die Rekrutierung von TRAF2 kein starkes Signal vermittelt zu werden, weil hemmende Faktoren das Signal unterbrechen können [104].

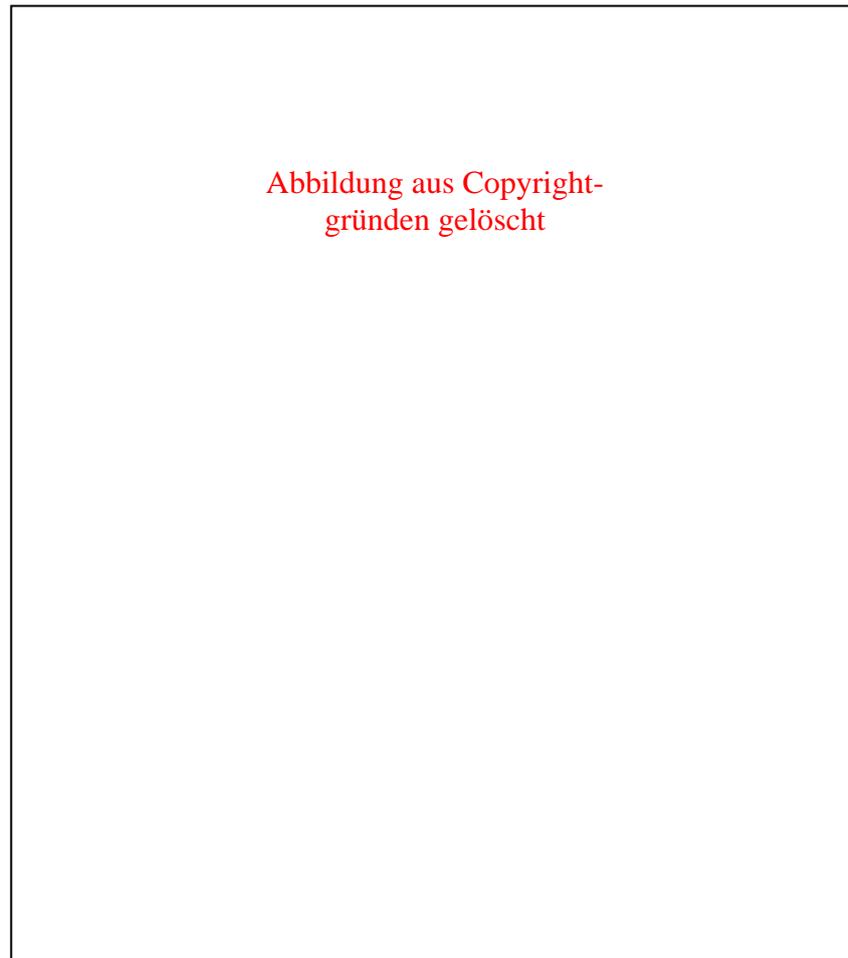


Abbildung 9: Signalweg des Tumornekrosisfaktor α

Gezeigt ist eine Schema der Signalkaskade der beiden TNFR1 und TNFR2 nach Ligandenbindung. Die Rezeptoren interagieren mit TRAF Molekülen oder Proteinen, die eine sogenannte *death domain* (DD) enthalten. DD Proteine dienen nach Interaktion mit TNFR1, um über Caspasen die Apoptose der Zelle zu initiieren. Über TRAF2 und nachfolgende Aktivierung von NF- κ B bewirkt die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nukleus zur Initiation der Transkription entsprechender Gene. (Bild: <http://www.sabiosciences.compathway.php>)

1.12.4 KOORDINATION VON TNFR1 UND TNFR2

Die Kapazität der unterschiedlichen Signalmechanismen von TNFR1 und TNFR2 stimmt mit der Fähigkeit von jedem Rezeptor überein, verschiedene biologische Antworten in Zellkulturen zu vermitteln.

Dahingehend ist es notwendig und ausreichend, daß TNFR1 nach Ligandenbindung zytotoxische und proinflammatorische Effekte zu vermitteln, während TNFR2 eher dafür zuständig ist, Zellaktivierung, Migration und Proliferation der Zelle zu unterstützen.

Bei geringen Konzentrationen ist es sogar möglich, daß TNFR2 auch TNFR1 Signale vermittelt [105]. Dies erfolgt möglicherweise in der Ligandenbindung an beide Rezeptoren, wobei TNFR2 das von ihm gebundene TNF an TNFR1 weitergeben wird [106]. Die Kooperation zwischen den Rezeptoren kann auch erklären, weshalb sich mitunter liganden-induzierte Heterokomplexe beider Rezeptoren bilden [107].

1.12.5 REGULATION VON TNF-REZEPTOREN

Die meisten Zelllinien und Primärgewebe exprimieren beide TNF Rezeptoren, wenn auch TNFR2 bevorzugt auf Zellen der haematopoetischen Linie exprimiert wird [108]. Allerdings ist die Expression der TNF Rezeptoren *in vivo* weniger ausgeprägt und wird stark reguliert.

Eine Reihe von Stimuli wie TNF, IL-1 oder IL-10, erhöhten die Expression von TNFR2 durch transkriptionelle Aktivierung, wohingegen TNFR1 von diesen Stimuli eher heruntergeregelt wird [109, 110, 114].

Für Zellen des Endothels ist es darüber hinaus bekannt, daß durch inflammatorische Mediatoren TNFR1 von der Zelloberfläche abgespalten werden kann [111, 112]. Stickstoffoxid und Hydrogenperoxid sind für die Aktivierung von Metalloproteinasen verantwortlich, welche TNFR1 enzymatisch spalten können [113] (vergleiche Kapitel 1.12).

1.12.6 PHYSIOLOGISCHE ROLLE VON TNF

Nichtsdestotrotz besteht die Hauptaufgabe von TNF in der Verteidigung des Organismus gegen bakterielle, virale und parasitäre Infektionen. Physiologisch ist TNF also wichtig für eine normale Antwort auf die Infektion, jedoch kann eine unangemessene oder exzessive Produktion schädlich sein. In dieser Hinsicht war eine der ersten Entdeckungen von TNF als ein endotoxin lipopolysaccharide (LPS-) induzierter Vermittler von muriner Kachexie, welches ein Syndrom für Anorexie darstellt, Gewichtsverlust und Proteinabbau, was Krebs und Entzündungserscheinungen kompliziert [115].

Die Wichtigkeit von TNF als Modulator der Verteidigung des Organismus wird vor allen bei Untersuchungen mit Verwendung von TNF-Rezeptor defizienten Mäuse deutlich. Solche Tiere sind zwar resistent gegenüber letalen Dosen zum Beispiel des Bakteriums *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, zeigen aber eine deutlich geschwächte Abwehr gegen das Bakterium *Listeria monocytogenes*, so daß sie der Infektion erliegen [116, 117].

In Bezug auf Krebs wurde TNF ursprünglich als ein anti-Tumor Mittel beschrieben, hat jedoch seine Funktion aufgrund seiner Toxizität in seiner Rolle als chemotherapeutische Substanz eingebüßt. Weiterhin kann TNF sogar unter bestimmten Umständen die Kanzerogenese durch Unterstützung der Proliferation, Invasion oder Metastasierung von Tumorzellen bewirken [118].

Auf der anderen Seite wird TNF zur palliativen Behandlung von metastasierenden Sarkome oder Melanoma eingesetzt [119, 120] oder zur Kontrolle des Tumor in Patienten mit hepatischen Metastasen [121].

Obwohl die Blockade von TNF nicht den gewünschten Vorteil bei der Behandlung von schwerer Sepsis bringt, bekräftigten die Untersuchungen dessen Einsatz für die Behandlung von inflammatorischen Krankheiten wie Rheumatische Arthritis, die physiologische Rolle von TNF in Sepsis und bösartigen Tumoren weitaus positiver erscheinen läßt.

1.13 Interferon- γ [IFN- γ]

IFN- γ wird hauptsächlich von T Zellen, dabei sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T Zellen, Natürlichen Killerzellen und teilweise auch von B Zellen produziert, die durch die Bindung von Antigenen aktiviert worden sind. Zusätzlich kann ebenfalls eine Stimulation durch Interleukin-2 (siehe Kapitel 1.11.3), bFGF und EGF eine Produktion von IFN- γ aktivieren und unterstützen.

IFN- γ ist ein dimeres Protein mit Untereinheiten aus 146 Aminosäuren, wobei zwei molekulare Formen des biologisch aktiven Proteins mit einer Größe von 20 und 25

kDa beschrieben worden sind. Massenunterschiede können nicht zuletzt auf unterschiedliche Glycolysation zurückgeführt werden.

Rezeptoren für IFN- γ wurden in unterschiedlicher Form gefunden und werden von fast allen Zellen exprimiert.

Bezüglich der biologischen Funktion wird INF- γ antivirale und antiparasitäre Eigenschaften zugeschrieben. Außerdem hemmt IFN- γ die Proliferation von normalen, als auch transformierten Zellen. Insgesamt obliegt IFN- γ eher immunmodulatorische Funktionen.

Die Produktion von IFN- γ wird in T Zellen nach Stimulation mit IL-2 bewirkt. Zusammen mit IL-2 und IL-1 wird es unter anderem für die Expression des IL-2 Rezeptors benötigt. Durch Blockade des IL-2 Rezeptors unterbindet man zusätzlich die Produktion von IFN- γ , wodurch dieses auch den zellvermittelten Mechanismus der Zytotoxizität beeinflusst.

Weiterhin kann IFN- γ das T Zell Wachstum und die funktionale Differenzierung beeinflussen. In dieser Hinsicht wird IFN- γ speziell von denjenigen T Zellen produziert, die eine Differenzierung zu Th1 vollzogen haben. Gleichzeitig hemmt IFN- γ die Differenzierung von naiven T Zellen sowohl der Th2 Linie, als auch der Treg und der Th17.

1.14 Zielsetzung des Projekts

Neben der Stimulation mit verschiedenen Zytokinen ist die Anwesenheit von Interleukin-2 ein Schlüsselfaktor in der Koordination, Aufrechterhaltung und durch Reduktion auch Beendigung einer Immunantwort. In Zusammenhang mit einem sich entwickelnden Tumor wird das körpereigene Immunsystem aktiviert, kann jedoch ab einem bestimmten Zeitpunkt das Wachstum des Tumors nicht mehr einschränken oder kontrollieren.

Ein Umstand, der in diesem Zusammenhang vielfach in verschiedenen Systemen gezeigt wurde, ist die hohe Anzahl an regulatorischen T Zellen im Tumor. Letztere werden vielfach über die Expression zum einen der α -Kette des IL-2 Rezeptors (Siehe Kapitel 1.11.1), zum anderen des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert.

Grundlage dieser Arbeit ist die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen regulatorischen T Zellen und Effektorzellen in einem murinen Modell für Bronchioadenokarzinom. Weiterhin sollen durch Applikationen von Antikörpern oder rekombinantem Protein der Einfluß des Interleukin-2 Signalgebung auf die genannten Zellpopulationen dargestellt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

3,3,5,5- Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka, Buchs, Schweiz
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Riedel-de Haen, Seelze
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aprotinin aus der Rinderlunge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Assay Diluent für Elisa	BD Biosciences, Heidelberg
Casy Clean	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casy Ton	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Dest. Wasser	Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	E. Merck AG, Darmstadt
Di-Natrium-EDTA	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Di-natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	E. Merck AG, Darmstadt
DNase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
Essigsäure	E. Merck AG, Darmstadt
Ethanol (EtOH)	E. Merck AG, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Farblösung für Proteinassay nach Bradford	Biorad, München
Fettfreie Trockenmilch	Applichem, Darmstadt

Formaldehyd	E. Merck AG, Darmstadt
Fötales Kälber Serum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Gelatine	E. Merck AG, Darmstadt
Gene Ruler™ 1 kb DNA Leiter	MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot
Glycerin	E. Merck AG, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HRP Streptavidin	Dako, Glostrup, Dänemark
Kaleidoskop WB Standards	Biorad, München
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumhydroxide (KOH)	E. Merck AG, Darmstadt
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
LPS (E. coli 0111:B4 LPS)	Invivo Gen, San Diego, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium Azid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	E. Merck AG, Darmstadt
Natrium-dodecylsulfat (SDS) ultra pure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	E. Merck AG, Darmstadt
Natronlauge	E. Merck AG, Darmstadt
Nonidet P 40	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PBS EDTA pH7,5	Cambrex Bio Science, Verviers
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
Pentobarbital (Narcoren)	Merial, Rohrdorf
Phosphat gepufferte Salzlösung	Biochrom KG, Berlin

(PBS)	
Polyacrylamid 40%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pufferlösung, pH 4,00	E. Merck AG, Darmstadt
Pufferlösung, pH 7,00	E. Merck AG, Darmstadt
Rinderserum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
Salzsäure (HCl) 25%	E. Merck AG, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	E. Merck AG, Darmstadt
Sterofundin	Braun, Melsungen
Streptavidin-Cy2	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Cy3	Dianova, Hamburg
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 0.05%	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween 20	E. Merck AG, Darmstadt
Wasserstoffperoxyd	E. Merck AG, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	E. Merck AG, Darmstadt

2.2 unmarkierte Antikörper

α CD3e	BD Biosciences, Heidelberg
α CD28	BD Biosciences, Heidelberg
PC61	Hybridoma PC61, siehe Kapitel 3.8

2.3 Fluorochrom markierte Antikörper

Target	Format	Firma
CD3e	PE	Bioscience, San Diego, CA
CD4 (L3T4)	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD4 (L3T4)	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD4 (L3T4)	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD4 (L3T4)	PE-Cy7	eBioscience, San Diego, CA
CD25	PE-Cy5.5	Caltag Invitrogen GmbH
CD44	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD44 (Pgp-1, Ly-24)	PE-Cy5	BD Biosciences, Heidelberg
CD62L	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD69 (H1, 2F3)	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD69 (H1, 2F3)	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD95	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD122 (TB b1)	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD127	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD178	PE	eBioscience, San Diego, CA
Foxp3 (FJK16a)	APC	eBioscience, San Diego, CA
ISO IgG2a (KLH)	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
ISO IgG2b (eB149/10H5)	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
ISO IgG2a (KLH)	PE	BD Biosciences, Heidelberg
ISO IgG2b (eB149/10H5)	PE	BD Biosciences, Heidelberg

2.4 Kits

Annin V FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
ECL	
Western blotting detection system	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Mouse TNF- α ELISA Kit (BD OptEIA™)	BD Biosciences
Mouse IFN- γ ELISA Kit (BD OptEIA™)	BD Biosciences
Fixation/Permeabilisierung Kit	eBiosciences, San Diego, CA

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 PUFFER FÜR ELISA

Karbonat Coating Buffer	0,356 g Na_2CO_3 0,84 g NaHCO_3 ad 100 ml Aqua dest. einstellen auf pH 9,5
Phosphat Coating Buffer	1,18 g Na_2HPO_4 1,61 g NaH_2PO_4 ad 100 ml Aqua dest. einstellen auf pH 6,5
TMB Lösung	120 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin 2,5 ml Aceton 22,5 ml Ethanol 150 μl H_2O_2
Substrat Puffer	6,3 g Zitronensäuremonohydrat ad 1000 ml Aqua dest. einstellen mit 4 N KOH auf pH 4,1
Stopp Lösung	28 ml H_2SO_4 (97%) ad 500 ml Aqua dest.
Wasch Puffer	0,005 % Tween 20 in PBS
<h3>2.5.2 PUFFER FÜR FACS</h3>	
FACS Puffer	PBS EDTA, pH 7,5 0,5 % BSA

2.5.3 ZELLISOLATION UND ZELLKULTUR

Alle Puffer und Lösungen für die Zellkultur, beziehungsweise Zellisolation wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße) und im Untraschallbad entgast.

ACKlyse Puffer	8,29 g NH ₄ Cl
	1 g KHCO ₃
	0,367 g Na ₂ EDTA
	ad 1000 ml Aqua dest.
	einstellen mit NaOH auf pH 7,2 - 7,4

Coating Puffer	0,1 M NaHCO ₃ pH 8,2
----------------	---------------------------------

MACS Puffer	0,5 % BSA
	PBS EDTA pH 7,5

Zellkulturmedium für isolierte Zellen	5 % FCS
	1 % Penicillin / Streptomycin
	in RPMI Medium

Zellkulturmedium für L1C2 Tumorzellen	10 % FCS
	1 % Penicillin / Streptomycin
	in RPMI Medium

2.5.4 WESTERN BLOT

Inhibitormix	325 µl PBS
	25 µl Aprotinin
	25 µl Trypsininhibitor (5 mg/ml)
	25 µl Nonidet P40 10%

Gelpuffer	3 M Tris HCl 0,3 % SDS ad 100 ml Aqua dest. einstellen auf pH 8,45
Trenngel (Stocklösung)	10 ml Gelpuffer 7,3 ml Polyacrylamid 40 % 8,7 ml Aqua dest.
Sammelgel (Stocklösung)	3,1 ml Gelpuffer 1,2 ml Polyacrylamid 40 % 4 g Glycerin 8,2 ml Aqua dest.
Trenngel (Gebrauchslösung)	10 ml Trenngel Stocklösung 10 µl TEMED 100 µl APS
Sammelgel (Gebrauchslösung)	5 ml Sammelgel Stocklösung 5 µl TEMED 50 µl APS
Kathodenpuffer	0,1 M Tris HCl 0,1 M Tricin 0,1 % SDS einstellen auf pH 8,5
Anodenpuffer	0,2 M Tris HCl einstellen auf pH 8,9

Transferpuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol 3,3 ml SDS 10 % ad 1000 ml Aqua dest. einstellen auf pH 8,1
Blotto (Blocking Puffer)	5 % Magermilchpulver 0,05 % Tween 20 PBS
Wasch Puffer	0,05 % Tween 20 PBS
Stripping Puffer	0,1 M Glycin Aqua dest. einstellen auf pH 2,8

2.6 Laborgeräte

Arpege 70, Stickstofftank	Air Liquide Deutschland, Düsseldorf
AxioCam MRc	Carl Zeiss GmbH, Jena
Biometra DOC Gelanalysierer	Biometra GmbH, Göttingen
Dispergiergerät Micra D1	ART Labortechnik, Müllheim
Elektrophorese System	Biorad, München
Mini-Protean	
ELISA-Lesegerät	Dynex Technologies, Chantilly, VA
FACS Calibur	BD PharMingen, Heidelberg
Glasgeräte	Schott, Mainz
Inkubator 1 (Brutschrank):	Binder GmbH, Tuttlingen
Binder CB210	
Inkubator 2: Cellstar	Nunc, Wiesbaden

Kompaktschüttler KS 15A	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Kühlschränke	Liebherr, Bosch
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss GmbH, Jena
Mikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
Mikroskop Nikon TMS S3	Cambridge Scientific Products
Neubauer-Kammer	Roth, Karlsruhe
OctoMACS Isolierungseinheit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PH-Meter	InoLab, Weilheim
Photometer	Biochrom, Berlin
Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipettus	Hirschmann Laborgeräte
QuadroMACS Separation Unit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Schweißgerät Futura Jr.	Audion Elektro, Weesp, NL
Stereo Mikroskop Stemi 200-C	Carl Zeiss GmbH, Jena
Sterilbank 1 Holten Laminair 1.5	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank 2	Nunc GmbH Wiesbaden
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, gekühlt Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Transferkammer Trans Blot Cell	Biorad, München
Ultraschallbad Sonorex RK 510S	Bandelin Elektronik, Berlin
Vakuumpumpe MINI VAC E1	PEQLAB Biotech, GmbH, Erlangen
Vortexer Reax Control	Heidolph, Schwabach
Waagen AE50, PM300	Mettler, Basel
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänsingen
Zellzähler CASY TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Megafuge 1.0R Sorvall	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Minifuge T	Heraeus Instruments, Hanau

3 Methoden

3.1 Mäuse

Für die durchgeführten Experimente wurden männliche und weibliche BalbcJ Mäuse verwendet. Mäuse vom Genotyp „wildtyp“ wurden vom ZVTE der Johannes-Gutenberg-Universität bezogen. Die BalbcJ TNF-*knockout* Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Frances Balkwill und Robert Moore, Institute of Cancer Barts and The London, Queen Mary's School of John Vane Science Centre, London, UK zur Verfügung gestellt.

Die Richtlinien der Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz wurden bei Haltung der Mäuse und bei der Durchführung der Experimente eingehalten.

3.1.1 PROTOKOLL DES MURINEN ADENOKARZINOM MODELLS

Um immunologische Zusammenhänge von Adenokarzinom in der Lunge nachvollziehen und untersuchen zu können, ist von Dubinett das hier verwendete murine Modell entwickelt worden.

Die Adenokarzinoma Zelllinie L1C2 wird in Kulturflaschen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben kultiviert. An Tag 0 werden pro Maus $2 \cdot 10^5$ Zellen in einem Volumen von 200 μl Medium in die Schwanzvene der Tiere injiziert. An Tag 21 nach Injektion wird die Lunge analysiert.

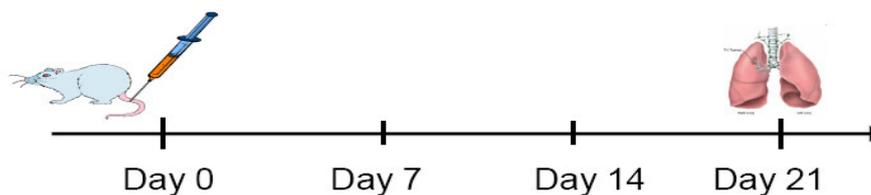


Abbildung 10: Design des murinen Adenokarzinoma Modells

An Tag 0 werden je Maus $2 \cdot 10^5$ L1C2 Zellen intravenös injiziert. An Tag 21 haben sich in Lunge und anderen Organen Metastasen gebildet. Die Lunge wird den entsprechenden Analysen unterzogen. In den verschiedenen Versuchsgruppen wurden zusätzlich Antikörper, bzw. Interleukin intranasal appliziert (vergleiche Kapitel 3.1.2 und 3.1.3).

3.1.2 VERSUCHSGRUPPEN

Die durchgeführten Experimente basieren auf dem Tumormodell, welches von Dubinett et al. (San Diego) entwickelt wurde. Basis ist die Adenokarzinom Zelllinie L1C2, die Mäusen des Stammes Balb/c intravenös injiziert wird. Die Anzahl der Zellen bestimmt die Entwicklung des Tumors: Je mehr Zellen, desto schneller und häufiger entwickeln sich Metastasen. Über die Vene gelangen die L1C2 Zellen nach der Injektion in die Lunge, wo sie haften bleiben und sich die ersten Tumore entwickeln. Später findet man Metastasen in fast allen Bereichen des Körpers.

Um Vergleiche zu Patienten führen zu können, wurde die optimale Anzahl der applizierten L1C2 mit $2 \cdot 10^5$ ermittelt. Eine niedrigere Anzahl erreichte ein Tumorwachstum erst nach einer großen Zeitspanne, eine höhere führte zu unregelmäßigem Tumorwachstum und vorzeitigem Ableben der Versuchstiere.

	Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21
Behandlung 1	-	-	-	
Behandlung 2	$2 \cdot 10^5$ L1C2	-	-	
Behandlung 3	$2 \cdot 10^5$ L1C2	50 μ g PC61	50 μ g PC61	Analyse der CD4 ⁺ T Zellen
Behandlung 4	-	50 μ g PC61	50 μ g PC61	
Behandlung 5	$2 \cdot 10^5$ L1C2	40 ng rIL-2	40 ng rIL-2	
Behandlung 6	$2 \cdot 10^5$ L1C2	200 ng rIL-2	200 ng rIL-2	
Behandlung 7	$2 \cdot 10^5$ L1C2	1 μ g rIL-2	1 μ g rIL-2	

Tabelle 1: Zusammenstellung der Versuchsgruppen

Die Applikation der Tumorzellen erfolgte intravenös. Die in den entsprechenden Gruppen genannten Mäuse erhielten die Antikörpern (PC61 \rightarrow anti-CD25), beziehungsweise die Interleukine intranasal nach Narkotisierung mit Avertin.

In Tabelle 1 sind die unterschiedlichen Versuchsgruppen zusammengefaßt. Die erste Kontrollgruppe enthielt unbehandelte Tiere, die nicht mit Tumorzellen injiziert wurden. Die zweite Kontrollgruppe bestand aus Mäusen, welche Tumorzellen appliziert bekamen, jedoch keiner weiteren Behandlung unterzogen wurden. Die Behandlung mit Antikörper, beziehungsweise Interleukinen erfolgte intranasal.

3.1.3 ANTIKÖRPER- UND INTERLEUKINBEHANDLUNG VON MÄUSEN

Die zu applizierenden Antikörper, beziehungsweise die Interleukine wurden in PBS verdünnt, so daß die jeweils angegebenen Mengen in einem Volumen von 50 µl enthalten waren.

Zur Narkotisierung wurde eine Avertinlösung hergestellt. Hierzu wurden 0,5 g 5,5,5-Tri-Brom-Ethanol abgewogen und in 0,5 ml Amylalkohol gelöst. Die Lösung wurde in 19,5 ml PBS verdünnt, um die fertige Avertinlösung zu erhalten.

Zur Narkotisierung der Mäuse wurden 200 – 250 µl Avertin (je nach Größe der Mäuse) intraperitoneal gespritzt. Nach Überprüfung der Anästhesie wurden 50 µl Substanz (PC61, IL-2, IL-7 jeweils in PBS) auf die Nase der Mäuse aufgebracht. Durch natürliche Atmung wurde die Flüssigkeit in die Nase, respektive in die Lungen aufgenommen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 L1C2 BRONCHIOADENOCARCINOMA ZELLINIE

Die Adenokarzinom Zelllinie L1C2 wurde in RPMI Vollmedium mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Um die Zellen zu passagieren, wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Nach Aufbringen von 1 ml Accutase-Lösung erfolgte eine Inkubation von drei bis vier Minuten bei 37° C im Brutschrank. Die Accutase verdaut die Oberflächenmoleküle der L1C2 Zellen und löst sie so vom Boden der Kulturflasche. Haben sich alle Zellen gelöst, werden diese mit Kulturmedium abgespült.

Die Zellsuspension wird für acht Minuten bei 800 rpm. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Das erneute Ausplattieren erfolgte in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:20.

3.2.2 ISOLIERTE CD4⁺ T ZELLEN

Die während des Experiments isolierten Zellen wurden mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter in Kulturmedium aufgenommen. Mikrotiterplatten wurden mit $5 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 Antikörper beschichtet (αCD3 1:100 in NaHCO_3 , für eine Stunde bei 37°C). Nach Waschen der Mikrotiterplatte mit PBS wurden die Zellen in folgenden Mengen aufgebracht:

96-Well-Platte: $200 \mu\text{l}$ mit $2 \cdot 10^5$ Zellen

48-Well-Platte: $500 \mu\text{l}$ mit $5 \cdot 10^5$ Zellen

Dem verwendeten Kulturmedium wurde zusätzlich αCD28 Antikörper mit einer Endkonzentration von $2,5 \mu\text{g/ml}$ zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank wurden die Überstände der Kulturen gesammelt und bei -20°C für die spätere Zytokinanalyse eingefroren.

3.2.3 HYBRIDOMA ZELLKULTUR

Die Hybridoma Zelllinie PC61 wurde mit freundlicher Unterstützung von ... zur Verfügung gestellt. Die PC61 Zellen wurden in IMDM (Iscove's modified Doubecco's Medium) mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin, β -Mercaptoethanol kultiviert.

Nach einer Kultivierungszeit von drei Tagen wird das Medium aus den Kulturflaschen entnommen und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Das Medium wird in sterilen Gefäßen gesammelt und bei -20°C bis zur Aufreinigung eingefroren. Das Zellpellet wird verworfen.

3.3 Gewinnung von Gesamtzellen

Die in den Versuchen verwendeten immunkompetenten Zellen, in den meisten Fällen CD4^+ T Zellen, wurden zur Durchführung der entsprechenden Analysen und Assays aus zwei verschiedenen Geweben isoliert. Da sich die T Zellen im lebenden Organismus innerhalb des Gewebes befinden, muß die zusammenhängende Struktur

der Organe zunächst in eine Zellsuspension gebracht werden, um daraus die gewünschten Zellen isolieren zu können.

Dabei ist zu beachten, daß Lungengewebe im Vergleich zu der Milz über weitaus ausgeprägtere Kollagenstrukturen verfügt, so daß hier ein zusätzlicher enzymatischer Schritt zur Lösung der Kollagenfasern notwendig wird.

3.3.1 GEWINNUNG VON GESAMTZELLEN AUS DER LUNGE

Die Lunge wird aus der Maus entfernt und in 3 ml RPMI Medium auf Eis aufbewahrt. Mittels Skalpell wird die Lunge unter sterilen Bedingungen zerkleinert und in 5 ml Collagenase II Lösung überführt. Das Lungen-Collagenase-Gemisch wird unter Schütteln für eine Stunde bei 37° C inkubiert.

Die Collagenase verdaut enzymatisch die Kollagenstrukturen zwischen den Gewebezellen und erzeugt eine Einzelzellsuspension. Im nächsten Schritt wird das Collagenasegemisch auf ein Zellsieb mit der Porengröße 0,4 µm aufgetragen und mittels eines Stempels durch das Sieb gedrückt. Das Aufbewahrungsmedium wurde zum Spülen des Siebs genutzt. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 1500 rpm wird das Pellet in 5 ml ACKlyse Puffer resuspendiert. Der ACKlyse Puffer stellt eine hypotonen Salzlösung dar, welche die Zellmembran von Erythrozyten durch osmotische Wirkung zum Platzen bringt. Die Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur stellt eine weitgehende Lyse der roten Blutkörperchen sicher. Durch zweimaliges Waschen mit jeweils 10 ml PBS und dazwischen entsprechend erfolgter Zentrifugation (5 Minuten, 1500 rpm) werden Zelltrümmer aus der Suspension entfernt. Die gewonnenen Gesamtzellen werden in 10 ml PBS+0,5%BSA (MACS Puffer) suspendiert und die Zellkonzentration mittels CASY® (Cell Analysing System, Cell Counter, Firma Schärfe Systems) bestimmt.

3.3.2 GEWINNUNG VON GESAMTZELLEN AUS DER MILZ

Die Gewinnung von Gesamtzellen aus der Milz erfolgt in ähnlichen Schritten wie die Gewinnung von Lungengesamtzellen, die allerdings ohne Collagenaseverdau auskommt. Die aus der Maus entnommenen Milzen werden ebenfalls in Medium

aufbewahrt und direkt auf das Zellsieb verbracht. Mittels eines Stempels (Unterseite eines Spritzenkolbens) wird die Milz durch das Sieb gedrückt und mehrfach mit Medium gespült. Die nachfolgenden Schritte entsprechen der Gewinnung von Gesamtzellen aus der Lunge.

3.4 Isolation von T Zellen

Die Isolation der immunkompetenten Zellen aus der Gesamtzellsuspension wurde mittels zwei Isolationsmethoden durchgeführt. Beide Methoden beruhen auf den Einsatz von spezifischen Antikörpern, die gegen Oberflächenmoleküle der Zellen gerichtet sind (CD4 oder CD25) und mit magnetischen Beads gekoppelt sind.

3.4.1 ZELLISOLATION MIT DEM DYNAL® SYSTEM

Das Dynal® System basiert auf der spezifischen Bindung magnetischer Beads an ein gewünschtes Oberflächenmolekül der Zielzelle. Bringt man nach erfolgter Bindung die Zellsuspension in ein Magnetfeld ein, werden die von den Beads gebundenen Zellen festgehalten, während ungebundene, demnach nicht magnetisch markierte Zellen entfernt werden können. Das Dynal® System arbeitet mit 15-ml-Falcon-Röhrchen und benötigt entsprechende Magneten, die auf einem Ständer fixiert sind.

Gemäß dem vom Hersteller vorgeschriebenen Protokoll wird die Gesamtzellsuspension in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen pro Milliliter in Dynalpuffer (PBS mit 3% FCS) suspendiert. Die gewünschte Menge Dynal® Beads wird dem Vorratsgefäß entnommen und einmalig in Dynalpuffer gewaschen, um unerwünschte Reste der Beadspufferlösung zu entfernen. Für $1 \cdot 10^7$ Zellen werden 25 μ l CD4-spezifische Beads der Mauszellsuspensionen zugefügt. Die Inkubation erfolgt bei 4° C im Kühlraum unter ständiger Bewegung auf dem Rolltisch.

Die Beads binden an die CD4 Moleküle der entsprechenden Zellen. Die Falcontubes werden nach Ablauf der ersten Inkubation für zwei Minuten in den Dynalmagneten gestellt, bis sich die Beads inklusive der gebundenen Zellen an den Magneten geheftet haben. Der Überstand kann mit einer Pipette abgenommen werden. Nach zweimaligem Waschen mit 3 bis 5 ml Dynalpuffer zum Entfernen von nicht

gebundenen Zellen, wird das Tube aus dem Magneten entfernt und die Zellen+Beads in 100 μl Kulturmedium (hier: RPMI mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen aufgenommen. Pro 100 μl Volumen werden 10 μl Detachabead[®] Lösung zum Ablösen der Magnetpartikel von den Zellen zugesetzt und das Gemisch für eine Stunde bei Raumtemperatur unter vertikaler und horizontaler Bewegung inkubiert. Die Detachabead[®] Lösung schneidet die magnetische Komponente der Beads ab. Nach erfolgter Trennung von Beads und Zellen werden letztere gewaschen und stehen für weitere Methoden zur Verfügung. Die Bestimmung der isolierten Zellzahl erfolgte mit dem CASY.



Abbildung 11: Prinzip der Zellisolation nach Dynal[®]

Die Suspension von Gesamtzellen wird mit Dynalbeads inkubiert. Die Beads binden spezifisch an von den Zellen exprimierte Oberflächenmarkern, so daß markierte Zellen in einem Magnetfeld hängen bleiben, während die restlichen Zellen mit einer Pipette entfernt werden können. Dynalbeads können von den Zellen wieder entfernt werden („detaching“). (Bild: www.invitrogen.com)

3.4.2 ZELLISOLATION MITTELS MAGNETISCHER ZELLSEPARATION

Das Prinzip des *magnetic activated cell sorting* (MACS) beruht ähnlich der Dynal Isolation auf der Bindung spezifischer, magnetischer Beads an die entsprechenden Oberflächemoleküle, die von den zu isolierenden Zellen exprimiert werden.

Nach dem Protokoll des Herstellers wurde die Gesamtzellsuspension in MACS Puffer auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen pro 90 μl MACS Puffer eingestellt. Nach Zugabe von 10 μl Microbeads pro $1 \cdot 10^7$ Zellen erfolgt eine Inkubation bei 4° C im Kühlschrank. Anders als im Dynalsystem wird die Zell-Beads-Suspension nicht bewegt.

Nach Bindung der Beads an die Zellen erfolgt eine zehnminütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Das Pellet wird in 500 μl Dynalpuffer aufgenommen und auf die vorher äquilibrierten Säulen aufgetragen. Die Suspension fließt durch die MACS Säule, die

in einem Magnetfeld angebracht ist. Alle Zellen, hier: CD4⁺ T Zellen, an welche die spezifischen Beads gebunden haben, bleiben im Magnetfeld zurück, während die CD4⁻ Zellen in ein Auffangtube fließen. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 500 µl MACS Puffer wird die Säule (inklusive der magnetisch gebundenen Zellen) aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein neues Tube gesetzt. Nach Auftragen von 1 ml MACS Puffer auf die Säule werden die Zellen mit dem zugehörigen Stempel eluiert. Die Konzentration der isolierten Zellen wird mittels CASY bestimmt.



Abbildung 12: Prinzip der MACS Zellisolation

In die Gesamtzellsuspension werden MACS Beads zugegeben, die spezifisch an Oberflächenmarker der zu isolierenden Zellen binden. Beim Durchlaufen der Separation Column bleiben markierte Zellen durch magnetische Anziehung hängen, unmarkierte Zellen passieren die Säule. Nach Herausnehmen der Säule aus dem Magnetfeld können die isolierten Zellen eluiert werden. Rechts ist die Apparatur zu sehen. (Bilder: <http://www.miltenyibiotec.com/>)

3.5 Durchflußzytometrie (FACS)

3.5.1 PRINZIP DER DURCHFLUßZYTOMETRIE

Zur Charakterisierung von Zellpopulationen und Messung der Reinheit von isolierten Zellen wurde die Methode des *fluorescence activated cell sorting* (FACS) verwendet.

Die zu vermessenden Zellen passieren einzeln in der Meßkapillare einen Laserstrahl und verursachen bei ihrem Durchtritt eine Streuung des Lichts. Photodetektoren messen zum einen diese Streuung des Lichts, zum anderen die Fluoreszenz von entsprechenden Chromatophoren, die sich mittels Antikörpern, intrazellulärer

Farbstoffe oder transgen eingebrachte Reporterfarbstoffe in, beziehungsweise auf den Zellen befinden (vergleiche Kapitel 3.5.2 und 3.5.4).

Zur Untersuchung der Expression gewünschter Gene oder zur Markierung bestimmter Zellpopulationen ist es möglich, über eine transgene Veränderung die Sequenz für einen Reporterfarbstoff in die Zellen einzubringen. Über den vorgelagerten Promotor kann die Expression des Reporters bestimmt werden, sei es kontinuierlich oder parallel zu der Expression des endogenen Promotors.

Die Färbung von entsprechend exprimierten Oberflächenproteinen erfolgt mittels Antikörper, die spezifisch an das gewünschte Protein bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

Fluoreszenz wird verstanden als die Anregung eines Farbstoffes mit der passenden Wellenlänge und darauffolgende Emission von Licht einer anderen Wellenlänge. Eine Zelle, an welche ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gebunden hat, weil sie das gewünschte Protein exprimiert, ist über die Emission des Fluorochroms von anderen Zellen zu unterscheiden, an die keine Antikörper gebunden haben. Das vom Fluorochrom emittierte Licht, sprich die Intensität der emittierten Wellenlänge ist eine Maß für die Expression des entsprechenden Moleküls.

3.5.2 FÄRBUNG VON ZELLOBERFLÄCHENPROTEINEN

Von den aus den Organen gewonnenen Gesamtzellen (siehe Kapitel 3.3) werden $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Oberflächenfärbung entnommen und in FACS Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 1500 rpm) wird der Überstand verworfen und die Zellen in 100 μ l PBS mit den entsprechenden Antikörpern resuspendiert. Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten bei 4° C im Kühlschrank.

Nach Zentrifugation (5 Minuten, 1500 rpm.) wird der Überstande verworfen, die Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert und auf Eis für die Messung im FACScalibur aufbewahrt.

3.5.3 AUSWERTUNG VON FACS DATEN

Bezüglich der Auswertung werden zunächst zwei Parameter benötigt, um grundlegend die Zellen nach Größe und Granularität differenzieren zu können. Eine Darstellung des sogenannten *forward scatter* (Größe) gegen den *sideward scatter* (Granularität) läßt die Eingrenzung eines Bereiches zu, der nach diesen Parametern die Lymphozyten enthält.

Alle Zellen dieses Bereichs (*gate*) werden in weiteren Darstellungen nach Fluoreszenzintensität der eingesetzten Fluorochrome, beziehungsweise den damit gefärbten Molekülen dargestellt.

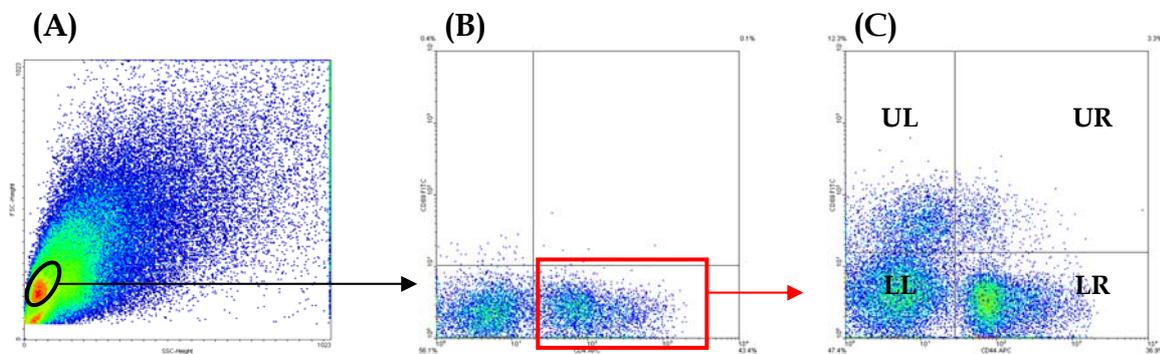


Abbildung 13: Gating von Lymphozyten und Darstellung im Density Blot

(A) Aufteilung der Zellen nach der Lichtstreuung in Richtung des Laserstrahls (Forward Scatter) und der seitlichen Streuung (Side Scatter). Lymphozyten sind relativ klein, wenig granulär und können in einem kleinen Bereich (schwarzes Oval) abgegrenzt werden. Das schwarze Oval wird als *Region 1* definiert.

(B) Die Fluoreszenzintensität zweier Fluorochrome werden als Funktionsparameter für die x und y Achse gegeneinander aufgetragen, wobei sich nur auf Zellen der *Region 1* bezogen wird. Auf diese Weise lassen sich zum Beispiel alle CD4 positiven Zellen aus der *Region 1* als Population im rechten, unteren Quadranten darstellen, die mit der *Region 2* markiert werden.

(C) Auftragung der Fluoreszenzintensität zweier weiterer Fluorochrome als x und y Parameter, beispielsweise derjenigen, welche die Oberflächenmoleküle CD44 und CD69 markieren. Dargestellt werden Zellen die sich sowohl auf *Region 1*, als auch auf *Region 2* beziehen, so daß alle Zellen CD4 positiv sind. Nach den Quadranten lassen sich weitere Populationen unterscheiden: Quadrant LL (lower left) → CD4⁺CD44⁻CD69⁻, Quadrant LR (lower right) → CD4⁺CD44⁺CD69⁻, Quadrant UL (upper left) → CD4⁺CD44⁻CD69⁺, Quadrant UR (upper right) → CD4⁺CD44⁺CD69⁺.

3.5.4 FÄRBUNG VON INTRAZELLULÄREN PROTEINEN

Um intrazelluläre Proteine nachweisen zu können, hier der Transkriptionsfaktor FoxP3, müssen die zu färbenden Zellen zunächst fixiert, dann permeabilisiert werden. Dies ist notwendig, um die Diffusion des Antikörpers in das Zellinnere zu gewährleisten. Da durch Fixierungs- und zusätzlichen Zentrifugationsschritten Zellen verloren gehen, werden von den Gesamtzellen $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Färbung verwendet. Vor der Fixierung wird eine Oberflächenfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 3.5.2). In Erweiterung werden die Zellen nach der Färbung nicht in PBS, sondern in 500 μ l Fixierungs-/Permeabilisierungslösung aufgenommen und für drei Stunden bei 4° C inkubiert. Nach Waschen mit dem im Kit enthaltenen Puffer werden die Zellen in PBS mit anti-FoxP3 Antikörper (1:50 in 80 μ l Fix-Perm-Puffer) resuspendiert. Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten bei 4° C. Nach erneutem Waschen werden die Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen, auf Eis aufbewahrt und im FACScalibur vermessen.

3.5.5 FÄRBUNG VON APOPTOTISCHEN ZELLEN

Um die Apoptose, sprich den Fortgang des programmierten Zelltods darzustellen, bedient man sich zwei Färbungen, die parallel gehandhabt werden. Mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers wird die Expression von Annexin überprüft. Das Protein Annexin ist in der äußeren Zellmembran verankert und die funktionalen Domänen zeigen ins Zytosol. Wird die Zelle unter Streß gesetzt oder auf anderem Wege der programmierte Zelltod eingeleitet, verliert die Zellmembran an Polarisierung und Annexinmoleküle, die in der lebenden Zellen von außen nicht zugänglich sind, wechseln die Seite innerhalb der Membran (Flip-Flop-Prinzip), wodurch Annexin V extrazellulär meßbar wird. Das erste Anzeichen der Apoptose ist also die äußere Expression von Annexin, welches dann mittels eines Antikörpers wie andere Oberflächenmoleküle einzufärben ist. Das erste Anzeichen der Apoptose ist also die äußere Expression von Annexin, welches dann mittels eines Antikörpers wie andere Oberflächenmoleküle anzufärben ist. Ist die Apoptose weiter fortgeschritten, destabilisiert sich die Zellmembran weiter und wird für verschiedene Moleküle durchlässig, die diese Barriere vorher nicht passieren konnten. Propidiumiodid (PI) hat fluoreszente Eigenschaften und bindet an degradierte DNA.

Befindet sich PI in der Umgebung einer sterbenden Zelle, kann diese Substanz über die instabile Membran in die Zelle eindringen und interkaliert mit der DNA.

Sind also Zellen in einer Kultur positiv für Annexin, befinden sie sich in einem frühen Stadium der Apoptose. Zeigen sie zudem eine positive Färbung für PI, haben sie eine spätere Phase der Apoptose erreicht.

Für die Darstellung apoptotischer Zellen im FACS wurde das Annexin-V-Fitc Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) verwendet. In Abweichung zum Protokoll des Herstellers wurde der auf die Proben aufzubringende Mastermix für jede Probe mit 50 µl Binding Buffer, 2 µl Annexin-V-Fitc Antikörper und 3 µl Propidiumiodid berechnet.

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 15 Minuten im Dunkeln. Durch Zugabe des vierfachen Volumens Binding Buffer (hier 200 µl) wird die Reaktion gestoppt. Die Messung im FACS wurde innerhalb einer Stunde nach Abstoppen durchgeführt.

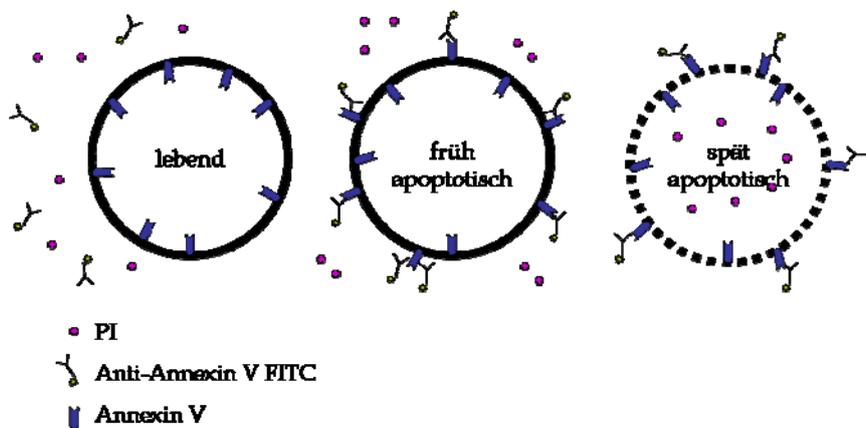


Abbildung 14: Prinzip der Apoptose Färbung

In lebenden Zellen ist das Membranprotein Annexin nach innen ins Zytosol gerichtet. In der frühen Phase der Apoptose kann sich das Annexin aufgrund der sich destabilisierenden Membran nach außen drehen und ist somit für FACS Antikörper zugänglich. In den späteren Stadien der Apoptose ist die Membran porös und durchlässig für Substanzen wie PI, welches mit degradiertem DNA interkaliert.

3.6 ELISA

Zur Messung von Proteinen, die von Zellen in einer Zellkultur produziert worden sind, wurden die Überstände gesammelt und mittels ELISA überprüft. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) macht sich eine Antigen-Antikörperreaktion zu nutze, indem markierte Antikörper die sich in Lösung befindlichen, nachzuweisenden Proteine bindet und über die Markierung sichtbar macht.

In dieser Arbeit wurde das Prinzip der sogenannten Sandwich ELISA verwendet. In Zusammenfassung wird dazu eine 96-Well-Platte mit einem sogenannten Capture Antikörper beschichtet, unspezifische Bindungsstellen durch einen Puffer blockiert und die Proben in der Platte inkubiert. Während dieser Inkubation binden die nachzuweisenden Proteine (soweit vorhanden) an die an die Gefäßwände gekoppelten Antikörper. Ein zweiter Antikörper, dessen Spezifität sich auf ein anderes Epitop bezieht (anders würden die Antikörper sich gegenseitig behindern) kann im nächsten Schritt ebenfalls an das Protein binden. An diesen sogenannten Detektionsantikörper ist Biotin gekoppelt. Wird nun eine Enzymlösung Komplexen aus Streptavidin (reagiert und bindet an Biotin) und HRP (*horse radish peroxidase* = Rettichperoxidase), kann ein Substrat in eine Farbreaktion umgesetzt werden. Die Intensität der Farbreaktion ist ein Maß für die in dem ursprünglich vorhandene Menge an nachzuweisendem Protein. Die Quantifizierung erfolgt in Relation zu eine Standardverdünnungsreihe, für die rekombinantes Protein verwendet wird. Zusätzlich wurde statt Proben frisches Medium als Leerkontrolle aufgebracht.

Für die durchgeführten ELISA wurde die in Kapitel 2.1 aufgeführten Kits verwendet. Dabei wurde in folgenden Schritten vorgegangen:

1. Beschichtung einer 96-Well-Immunoplatte mit Capture-Antikörper. Der Capture AK wurde 1:250 in Phosphat- oder Carbonatpuffer verdünnt (40 µl AK in 10 ml Puffer). 100 µl pro Well, Inkubation über Nacht bei 4° C
2. Dreimaliges Waschen im ELISA Washer
3. Auftragen des Blocking Buffers (hier: Assay Diluent, siehe Kapitel 2.1). 100 µl pro Well, Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur.
4. Dreimaliges Waschen im ELISA Washer

-
5. Auftragen der Standardreihe, der Proben und Mediumkontrollen. 100 µl pro Well, Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur.
 6. Fünfmaliges Waschen im ELISA Washer
 7. Auftragen des Detektionsantikörpers
 - a. ELISA IFN- γ :
 - i. Detectionantibody und HRP/Streptavidin jeweils 1:250 verdünnt in Assay Diluent. 100 µl pro Well, Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur
 - b. ELISA TNF- α :
 - i. Detectionantigoy 1:250 verdünnt in Assay Diluent. 100 µl pro Well, Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur.
 - ii. Dreimaliges Waschen im ELISA Washer
 - iii. Auftragen von HRP/Streptavidin Lösung 1:250 verdünnt in Assay Diluent. 100 µl pro Well, Inkubation für 30 Minuten.
 8. Siebenmaliges Waschen im ELISA Washer
 9. Auftragen von Substratlösung: TMB Lösung 1:20 verdünnt in Substratpuffer, 100 µl pro Well, Inkubation variabel
 - a. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Farbgebung der Standards und war je nach ELISA unterschiedlich.
 10. Zugabe von 50 µl Stopplösung (0,5% H₂SO₄).
 11. Messung im ELISA Reader

Die TMB Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 40 µg TMB (Tetramethylbenzidin) wurden in 833 µl Aceton gelöst und in 7,5 ml Ethanol überführt. Anschließend wurden 50 µl H₂O₂ zugesetzt. Für eine ELISA Platte wurden 500 µl TMB Lösung mit 9,5 ml Substratpuffer gemischt und 100 µl pro Well aufgetragen (siehe oben, Schritt 9).

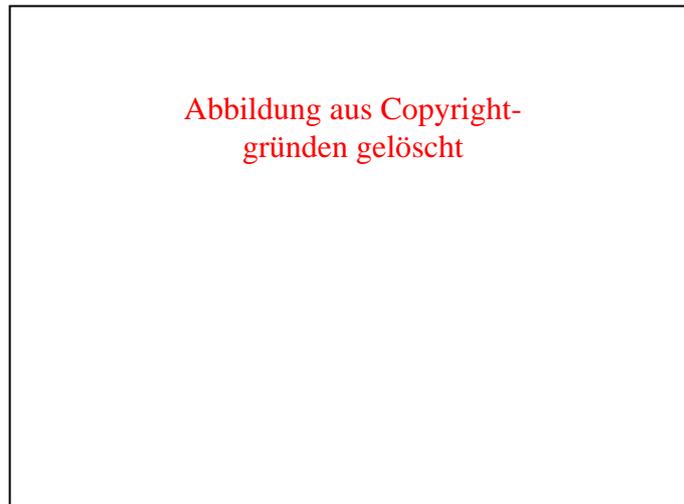


Abbildung 15: Prinzip des Sandwich-ELISA

Die Durchführung eines Sandwich-ELISA erfolgt in folgenden Schritten: 1. Beschichtung der Immunoplatte mit dem Capture Antikörper 2. Blocken zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen 3. Aufbringen von Proben, Standards und Leerkontrollen 4. Inkubation mit Detection Antikörper, ggf. gleichzeitig mit HRP/Streptavidin Lösung 5. Aufbringen von Substratlösung 6. Messung im ELISA Reader. Die Abbildung zeigt schematisch den Komplex aus gebundenem Capture Antikörper, dem nachzuweisenden Protein, dem daran gebundenen Detection Antikörper und die Anwesenheit des Substrats. (Bild: <http://www.newenglandbiolabs.de>)

3.7 Isolation von Gesamtproteinen

Die cyrokonservierten Lungengewebestücke werden in gefrorenem Zustand mit 200 µl Puffer versehen und mit dem Homogenisator zerkleinert. Das Homogenisat wird für 2 Minuten im Ultraschallbad beschallt und 15 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Eine anschließende Zentrifugation von 30 Minuten bei 12.000 rpm trennt die Zelltrümmer von den isolierten Proteinen.

Nach Überführung des Überstandes in neue Eppendorf-Gefäße wird die Konzentration mittels Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Hierzu werden in Einwegküvetten 800 µl PBS mit 2 µl Proteinlösung und 200 µl Bradford-Proteinreagenz (BioRad) befüllt und bei 595 nm im Photometer vermessen. Für die Standardkurve werden die Küvetten mit 1 µl, 2 µl, 4 µl und 8 µl einer BSA Lösung mit 2 mg/ml BSA in PBS bestückt. Dies entspricht Konzentrationen von 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml und 16 mg/ml. Alle Konzentrationen werden gegen einen Nullwert gemessen und in einer Standardkurve aufgerechnet.

3.8 Aufreinigung von Antikörpern

3.8.1 PRINZIP DER AUFREINIGUNG

Die Hybridoma Zellen, in diesem Fall der Klon PC61, sind eine aus B Zellen gewonnene Zelllinie, die in der Lage sind, Antikörper mit gewünschter Spezifität herzustellen (PC61 entspricht anti-CD25 Antikörpern). Die als Zellkultur gehaltenen Hybridoma Zellen (siehe Kapitel 3.2.3) sezernieren den von ihnen hergestellten Antikörper in das umgebende Medium, so dass die Antikörper aus den Mediumüberständen isoliert werden kann.

Ein Antikörper-Protein besteht aus vier über Disulfidbrücken verknüpften Ketten, zwei schweren (jeweils 50 kDa) und zwei leichten Ketten (jeweils 25 kDa). Die schweren Ketten weisen den sogenannten Fc Teil (*fragment cristallizable*) auf.

Das aus Bakterien gewonnene Protein G besitzt die Eigenschaft, den Fc Teil von Antikörpern zu binden, wenn entsprechende Bedingungen wie pH Wert die Bindung unterstützen. Für die Aufreinigung von Antikörpern macht man sich diese Eigenschaft zunutze. Das Protein G kann als Säule gepackt werden, so dass Flüssigkeit das Protein G passieren kann und unter Verwendung einer Pufferlösung zur Schaffung der Bindungsbedingungen die in der Flüssigkeit gelösten Antikörper am Protein G haften bleiben. Alle anderen Protein passieren die Säule ungehindert.

Nach einem entsprechenden Waschschrift wird über einen Eluationspuffer (anderer pH Wert) die Bindung von Protein G und Antikörper aufgehoben, so dass der Antikörper als Eluat aufgefangen werden kann.

3.8.2 VORBEREITUNG DER ÜBERSTÄNDE

Für die Aufreinigung werden mindestens zwei Liter Mediumüberstand benötigt, da die Durchführung des Protokolls zeitaufwendig ist und eine ausreichend große Ausbeute erzielt werden sollte.

Im ersten Schritt werden die in den Mediumüberständen gelösten Antikörper ausgefällt. Dazu werden pro einem Liter Überstand 472 g Ammoniumsulfat $[(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4]$ (entspricht einer Salzlösung von 70%) nach und nach zugefügt und unter ständigem Rühren gelöst. Die so erhaltene Lösung wird über Nacht bei 4° C im Kühlraum inkubiert.

Nach Resuspensieren des ausgefällten Niederschlags erfolgt eine Zentrifugation bei 4000 rpm für eine Stunde. Die gefällten Proteine, welche unter anderem die Antikörper enthält befinden sich nach der Zentrifugation im Pellet; die Überstände werden für spätere Überprüfung der Ausfällung aufbewahrt.

Das Pellet wird in Ammoniumsulfatlösung aufgenommen, welche die gleiche Salzkonzentration aufweisen muß wie diejenige zur Ausfällung (hier: 70%), damit die Proteine im Pellet verbleiben und nicht wieder in Lösung gehen. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 4000 rpm für 30 Minuten. Auch hier wird der Überstand für spätere Analysen aufbewahrt.

Das so erhaltene Pellet wird in 15 ml PBS aufgenommen. Erwartet man eine höhere Konzentration, kann das Volumen auf 30 oder 45 ml erhöht werden, da die Aliquotmenge für einen Durchlauf 15 ml beträgt.

Die Antikörperlösung wird erneut bei 4000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet enthält letzte Zellreste und unerwünschte Verunreinigungen und wird entsprechend verworfen. Die Antikörper bleiben in Lösung, durch Sterilfiltration (Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm) wird eine höhere Haltbarkeit gewährleistet.

3.8.3 AUFBAU DER APPARATUR

Die Lösungen für die Aufreinigung werden über eine Peristaltikpumpe auf die Protein G Säule aufgebracht. Die entsprechenden Schläuche wurden vor der Verwendung mit Ethanol desinfiziert.

Die einzusetzenden Flüssigkeiten wie PBS, Glycinpuffer oder die Probe können in gewünschten Mengen in Sarstedtröhrchen vorbereitet werden. Der zuführende Schlauch kann somit einfach in das entsprechende Gefäß getaucht werden. Die aufgenommene Flüssigkeit wird durch die Peristaltikpumpe auf die Protein G Säule gepumpt. Nach Passage der Säule gelangt die Flüssigkeit über einen Schlauch durch eine Detektoreinheit, welche den Proteingehalt der Lösung grafisch wiedergibt. Im Anschluß an die Detektoreinheit wird die Flüssigkeit in Sammelbehältern aufgefangen.

3.8.4 PROZEDUR DER AUFREINIGUNG

Die zu verwendenden, gekühlt aufbewahrten Pufferlösungen sollten vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht haben, um ein durch den Temperaturunterschied mögliches Ausgasen in der Protein G Säule zu vermeiden.

Die Antikörperlösung (siehe Kapitel 3.8.2) wird resuspendiert und bei 9000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird die Lösung in Aliquots von 15 ml aufgeteilt.

Die Protein G Säule wird mit 50 ml PBS äquilibriert und anschließend ein Aliquot (15 ml) der Antikörperlösung aufgebracht.

Die Geschwindigkeit der Pumpe ist so einzustellen, dass die auf die Säule aufgebrachte Menge an Lösung genau derjenigen entspricht, welche die Säule wieder verlässt. Die Fließgeschwindigkeit der aufgebrachten Probe beim Passieren der Protein G Säule ist abhängig von der Konzentration der Antikörper, dass heißt je höher die Konzentration, desto langsamer die Fließgeschwindigkeit.

Ist das Aliquot der Antikörperlösung vollständig aufgebracht, wird die Säule mit PBS gespült. Alle ungebundenen Proteine werden somit aus der Säule entfernt.

3.8.5 ELUATION DES ANTIKÖRPERS

Nach dem Waschschritt wird der Antikörper mit 15 ml 0,1 M Glycinpuffer mit einem pH von 2,7 eluiert. Durch den niedrigen pH Wert lösen sich die Antikörper vom Protein G, werden ausgespült und in einem separaten Gefäß aufgefangen. Nach der Eluation wird abermals PBS zum Waschen auf die Säule aufgebracht. Soll ein weiteres Aliquot aufgereinigt werden wiederholt sich die Prozedur (Kapitel 3.8.4 und 3.8.5).

Der eluierte Antikörper ist pH empfindlich und muß sofort nach der Eluation neutralisiert werden. Dazu wird dem entsprechenden Aliquot pro 10 ml Volumen die Menge von 340 µl 1 M Tris-HCl Puffer pH 9 zugefügt.

3.8.6 REINIGUNG UND LAGERUNG DER SÄULE

Nach dem letzten Waschschrift wird die Säule zur besseren Reinigung mit PBS mit 0,1% Triton-x 100 Detergenz gespült. Der Waschpuffer wird anschließend mit PBS wieder entfernt.

Durch Desinfektion wird die Säule mit 20% Ethanol gespült. Ist das vorher enthaltene PBS durch die Ethanollösung ersetzt, kann die Säule bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

3.8.7 AUFBEWAHRUNG DES GEWONNENEN ANTIKÖRPERS

Das Eluat aus der Aufreinigung muß über Nacht ein weiteres Mal mit Ammoniumsulfat gefällt werden. Hierzu wird der Antikörperlösung pro 10 ml 4,72 g Ammoniumsulfat zugefügt (entspricht 70 %, siehe 3.8.2) und gelöst. Die Fällung erfolgt über Nacht bei 4° C im Kühlschrank.

3.8.8 ENTSALZUNG DES ANTIKÖRPERS

Die Entsalzung der Antikörperlösung erfolgt über eine PD10 Säule.

Nach der Fällung über Nacht wird die Antkörperlösung resuspendiert und bei 9000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird in PBS aufgenommen.

Nach Äquilibrierung der PD10 Säule mit 20 ml PBS werden ALiquots von 2,5 ml der Antikörperlösung aufgetragen. Die Eluation erfolgt mit 3,5 ml PBS mit anschließendem Spülen der Säule mit 20 ml PBS. Die Eluate können nach der Entsalzung vereinigt werden. Die PD10 Säule wird ähnlich der Protein G Säule mit 20% Ethanollösung gespült und gelagert.

Die Antikörperlösung wird zur besseren Haltbarkeit steril filtiert (Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße)

3.8.9 BESTIMMUNG DER KONZENTRATION

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Antikörper wurden in einer Verdünnungsreihe eingesetzt und vermessen, wobei die Extinktion von 1,4 der gelösten Menge von 1 mg Protein entspricht.

3.8.10 NACHWEIS DER SPEZIFITÄT

Die Spezifität des aufgereinigten PC61 Antikörpers wurde mittels ELISA von Alexandra Hobel, Technische Assistentin, Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt und hierüber bestätigt.

Als zweite Methode wurde die Spezifität des aufgereinigten Antikörpers experimentell in vitro überprüft. Der PC61 Antikörper bindet kovalent an das CD25 Oberflächenmolekül. Der für die Durchflußzytometrie verwendete Antikörper entspricht ebenfalls dem Klon PC61, weist also die gleichen Zielepitope auf.

Als Vorbereitung wurden CD4⁺ T Zellen (MACS Isolation, siehe Kapitel 3.4.2) aus der Milz von unbehandelten Mäusen isoliert. Die gewonnenen CD4⁺ Zellen wurden in einer 24-Well Zellkulturplatte über Nacht mit anti-CD3 stimuliert, um eine Aktivierung der T Zellen zu erreichen.

Die Zellen wurden aus den Wells geerntet, vereinigt und in drei Gruppen aufgeteilt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min mit 100 µl PBS, 100 µl PBS mit PC61 oder 100 µl PBS mit IgG, welches der gleichen Immunglobulinklasse wie PC61, jedoch ohne Spezifität, entspricht.

Nach einer Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten erfolgte eine Färbung mit anti-CD4 FITC und anti-CD25 PE-Cy7 (vergleiche Kapitel 3.5.2).

Während der Vorinkubation mit dem unmarkierten, selbst aufgereinigten PC61 Antikörper werden alle für diesen Antikörper verfügbaren Bindungsstellen besetzt, die kovalente Bindung stellt die Stabilität sicher.

Die Zellen für alle drei Gruppen entstammen demselben Pool und erhalten für die FACS Färbung die gleiche Antikörperlösung. Letztere zielt auf eine Markierung der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 ab, wobei der PE-Cy7 markierte Antikörper gegen CD25 ebenfalls dem Klon PC61 entspricht.

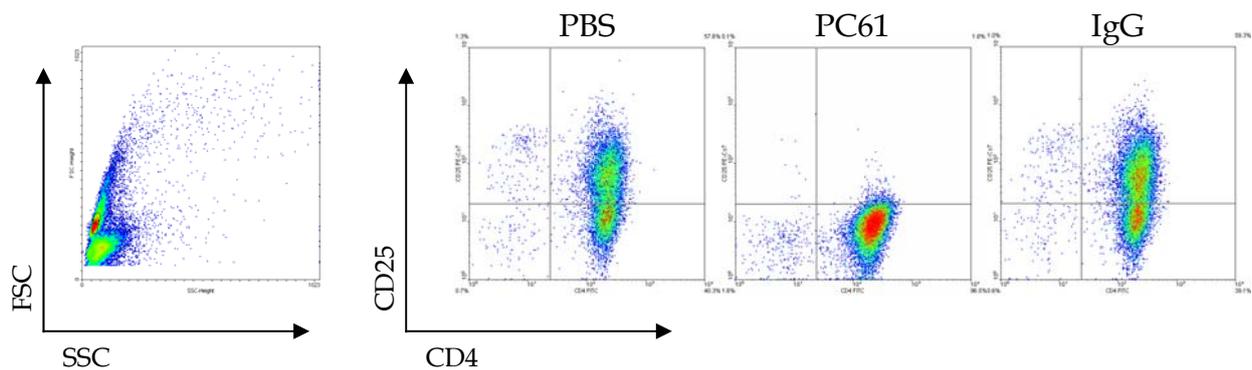


Abbildung 16: Nachweis der Spezifität des PC61 Antikörpers

Unbehandelte Milz $CD4^+$ T Zellen wurden über Nacht mit anti-CD3 stimuliert. Die dadurch aktivierten T Zellen wurden mit PBS, PC61 und Kontroll-IgG vorinkubiert, bevor eine FACS Färbung durchgeführt wurde.

Die mit PBS und unspezifischem IgG vorinkubierten $CD4^+$ T Zellen zeigen eine eindeutige Expression des CD25 Oberflächenmoleküls. Wurden die gleichen T Zellen jedoch mit PC61 vorinkubiert, fehlt die im FACS nachzuweisende Färbung. Alle Bindungsstellen der CD25 Oberflächenmoleküle sind durch den eigenhändig aufgereinigten PC61 Antikörper blockiert, so daß der fluoreszenzmarkierte Antikörper, welcher dem gleichen Klon zugrunde liegt, nicht mehr binden kann.

Die Expression von CD25 ist bei Gruppe 1 und 3 eindeutig im FACS zu erkennen, jedoch fehlt die Fluoreszenz für PE-Cy7 bei Gruppe 2 (Abbildung 16). Da es sich um die gleichen Zellen handelt, muß hier ebenfalls eine Expression von CD25 vorliegen, jedoch wurden die Bindungsstellen durch den unmarkierten PC61 blockiert, so dass keine Fluoreszenzmarkierung möglich war. Der aufgereinigte PC61 Antikörper besitzt die gleiche Spezifität wie der FACS PC61 Antikörper und ist biologisch aktiv.

3.9 Westernblot

3.9.1 HERSTELLUNG DER WESTERBLOT GELE

Die SDS-PAGE Gele wurden mittels Zwei-Phasen-Polymerisation hergestellt, um eine gleichmäßige Auftrennung der Proteingemische unter denaturierenden Bedingungen zu gewährleisten, was für die spätere Quantifizierung unerlässlich ist. Im sogenannten Sammelgel wird das Proteingemisch gleichmäßig in Laufrichtung in der jeweiligen Spur konzentriert, bis sie in das Trenngel eintreten. Im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe.

Die in Tabelle 2 aufgeführte Gebrauchslösung für das Trenngel wird direkt nach Zugabe von TEMED und APS zwischen zwei Glasplatten eingebracht, zwischen denen sich Abstandhalter (Spacer) befinden. Die Spacer stellen die Stärke des Gels sicher (0,75 mm, 1 mm oder 1,5 mm). Das noch flüssige Trenngel wird mit destilliertem Wasser zum Schutz gegen Verdunstung überdeckt. Nach circa einer Stunde ist das Trenngel vollständig polymerisiert.

Tabelle 2: Lösungen für SDS-PAGE

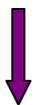
Gelpuffer

Aqua dest.	50 ml
Tris	36,34 g
SDS 20%	1,5 ml

Einstellen des pH auf 8,45 mit HCl

Sterilfiltration zur besseren Haltbarkeit

Stammlösung		Stammlösung			
Sammelgel		Trenngel	15 %	10 %	7,5 %
		Glycerin	4 g	4 g	4 g
Gelpuffer	1,550 ml	Gelpuffer	10 ml	10 ml	10 ml
40% PAA	0,6 ml	40% PAA	11,2 ml	7,46 ml	5,6 ml
Aqua dest.	4,1 ml	Aqua dest.	4,8 ml	8,54 ml	10,4 ml



Gebrauchslösung

Gebrauchslösung		Gebrauchslösung	
Sammelgel		Trenngel	
Stammlösung	10 ml	Stammlösung	5 ml
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl
APS 10%	50 µl	APS 10%	50 µl

Im zweiten Schritt wird nach Entfernen des Wassers die Gebrauchslösung des Sammelgels auf das Trenngel aufgebracht und ein Kamm eingesetzt, über den die Breite und Anzahl der Geltaschen festgelegt wird. Nach erfolgter Polymerisation können die Proben in die Geltaschen pipettiert werden.

3.9.2 GELELEKTROPHORESE

Pro aufzubringender Probe werden 50 µg des isolierten Gesamtproteins verwendet. Das Protein wird mit Wasser und RotiLoad für 5 Minuten bei 95 Grad Celsius denaturiert.

Das SDS-PAGE-Gel wird in die Elektrophoresekammer mit der Geltaschenseite nach innen eingespannt und die obere (innere) Kammer mit Kathodenpuffer, die untere (äußere) mit Anodenpuffer befüllt. Die Proben wurden mit einem Gesamtvolumen von 20 µl in die Taschen des Gels gefüllt.

Die erste anzulegende Spannung beträgt 30 Volt. Durch die Spannung treten die Proteine in das Gel ein und durch das stark negative SDS wird die über die Aminosäurestruktur der Proteine vermittelte nominelle Ladung negiert. Nach circa einer halben Stunde Laufzeit sind die im Sammelgel befindlichen Proteine zu einer gleichmäßigen Bande zusammengebracht. Nach dem Übergang ins das Trenngel wird die Spannung auf 90 Volt erhöht. Die erhöhte Spannung sorgt für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (Abbildung 17).



Abbildung aus Copyright-
gründen gelöscht

Abbildung 17: Prinzip der SDS-PAGE Gelelektrophorese (Bild: http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html)

3.9.3 TRANSFER AUF MIKROZELLULOSEMEMBRAN

Zur Vorbereitung werden drei Whatman-Papiere sowie die Zellulosemembran in Transferpuffer eingeweicht. Das SDS-PAGE-Gel wird nach der Auftrennung aus der Kammer entfernt und die Glasscheiben vorsichtig voneinander getrennt. Ein trockenes Stück Whatman-Papier wird auf das Gel gelegt, so daß das Gel durch Kapillarkräfte am Papier haften bleibt und die verbleibende Glasscheibe entfernt werden kann. Auf die offen liegende Gelfläche kann nun die eingeweichte Membran aufgebracht und von zwei Whatman-Papiere überdeckt werden. Auch auf der Gelzugewandten Seite wird ein zweites Whatman-Papier aufgelegt. Mittels einer Walze (Pipette) werden verbleibende Luftblasen zwischen Papier, Gel und Membran nach außen gedrückt.

Der auf diese Weise geschichtete Blot (Whatman-Papier - Gel - Membran - Whatman-Papier) wird mit Fleece-Polstern in einer Kassette fixiert und senkrecht in die Transferkammer eingehängt. Die Ausrichtung erfolgt mit der Gelseite in Richtung Kathode, der Membran in Richtung Anode. Nach Auffüllen der Kammer mit Transferpuffer wird ein Elektrofeld mit einer Spannung von 13 Volt angelegt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgt über Nacht.

3.10 Statistik

Die in dieser Arbeit enthaltenen Experimente wurden in mehrfacher Weise durchgeführt. Die aus den Messungen erhaltenen Werte wurden gemittelt (mean value) und der Standardfehler des Mittels berechnet (SEM, *standard error of the mean*). Im Vergleich der Versuchsgruppen wurde der Students two-tailed t test verwendet, um signifikante Unterschiede zu bestimmen.

Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte, der SEM ist aufgezeigt. Die Signifikanzen werden wie folgt angegeben:

$p < 0,05$ → *
 $p < 0,01$ → **
 $p < 0,001$ → ***

4 Ergebnisse

4.1 Das murine Adenokarzinoma Modell

Das in dieser Arbeit verwendete Tumormodell basiert auf der Zelllinie L1C2. Die Zellen werden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben kultiviert, geerntet und zur Injektion vorbereitet. An Tag 0 wird die entsprechende Menge an L1C2 Zellen (zumeist $2 \cdot 10^5$ Zellen) in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert.

Ein Schema ist in Abbildung 18 zu sehen.

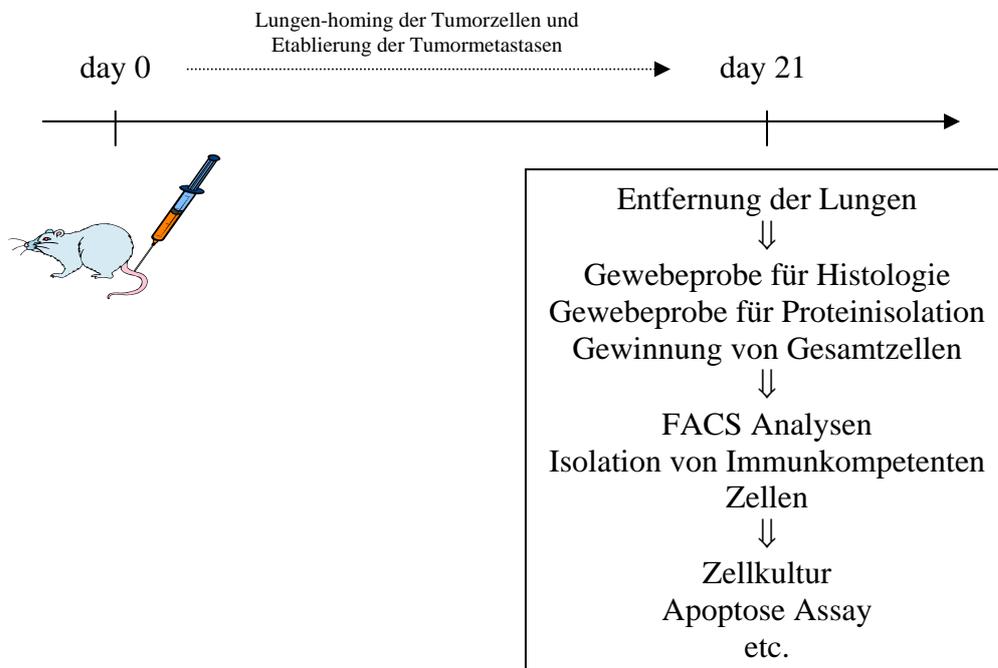


Abbildung 18: Schema des murinen Adenokarzinom Modells

An Tag Null werden den Mäusen die Tumorzellen intravenös verabreicht. Die L1C2 verursachen Metastasen in der Lunge und anderen Geweben. An Tag 21 werden die Lungen operativ entfernt, zu einer Gesamtzellsuspension aufgelöst und für FACS Färbungen, respektive der Isolation von Immunkompetenten Zellen verwendet. Die isolierten Zellen (meist $CD4^+$) wurden als Zellkultur verwendet oder in verschiedenen Assays eingesetzt.

Die Menge der Zellen wurde zwischen $1 \cdot 10^5$ und $3 \cdot 10^5$ gewählt, um verschiedene Stadien der Tumorentwicklung nachvollziehen zu können. Allerdings ist zu beachten, daß $1 \cdot 10^5$ L1C2 Zellen nur eine geringe Metastasenentwicklung nach sich zog, während $3 \cdot 10^5$ L1C2 Zellen einen extrem starken Tumorbefall bewirkte, so daß

die Tiere der entsprechenden Versuchsgruppen nur bis Tag 10 des Protokolls zu verwenden waren.

Nach intravenöser Injektion gelangen die L1C2 Zellen zunächst in die Lunge, wo sich in der darauffolgenden Zeit die ersten Metastasen bilden. Die maximale Inkubationszeit der L1C2 wurde auf 21 Tage festgelegt. Nach diesem Zeitraum ist eine starke Streuung der Metastasen festzustellen, die außer in der Lunge auch in Körperregionen wie Herz, Rippenfell, Leber, im Rückenbereich und am Kopf gefunden werden können. Vielfach konnten Lähmungserscheinungen der hinteren Gliedmaße beobachtet werden.

Am Tag des Experiments wurden die Lungen entfernt, Gewebeproben zur Proteinisolierung eingefroren und in Formalin für die histologische Analyse verwahrt. Die restliche Lunge wurde zerkleinert, die Zellen enzymatisch aufgetrennt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten (siehe Kapitel 3.3.1). Diese Einzelzellsuspension wurde zu Färbungen für die Durchflußzytometrie, sowie die Isolation von immunkompetenten T Zellen verwendet.

Die isolierten T Zellen wurden in Zellkulturen verwendet, aus denen Mediumüberstände für die Analyse im ELISA gesammelt wurden, sowie in Kultur zusammen mit L1C2 Tumorzellen zur Ermittlung der Apoptoseinduktion als Hinweis auf die Effektorfunktion der T Zellen.

4.1.1 HISTOLOGIE VON GEWEBESCHNITTEN

Die Tumorausdehnung in der Lunge wurde mittels histologischer Gewebefärbungen ermittelt. Die während des Experiments genommenen Gewebeproben wurden nach Formalinkonservierung zur fachkundigen Bearbeitung dem Institute de Pathologie unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Anton Lehr in Lousanne überlassen.

Die sogenannte Haematoxilin-Eosin (HE) Färbung hebt die Zellkerne gegen den Zellkörper hervor. Tumore zeichnen sich durch eine hohe Zelldichte aus und sind in HE Färbungen als dunkel-violette Bereiche zu erkennen.

Als Maß der Ausdehnung der Tumormetastasen wurde deren Fläche in Relation zu der Gesamtfläche des entsprechenden Gewebeschnittes gesetzt. In Abbildung 19 ist eine Übersicht über die Tumorentwicklung gezeigt.

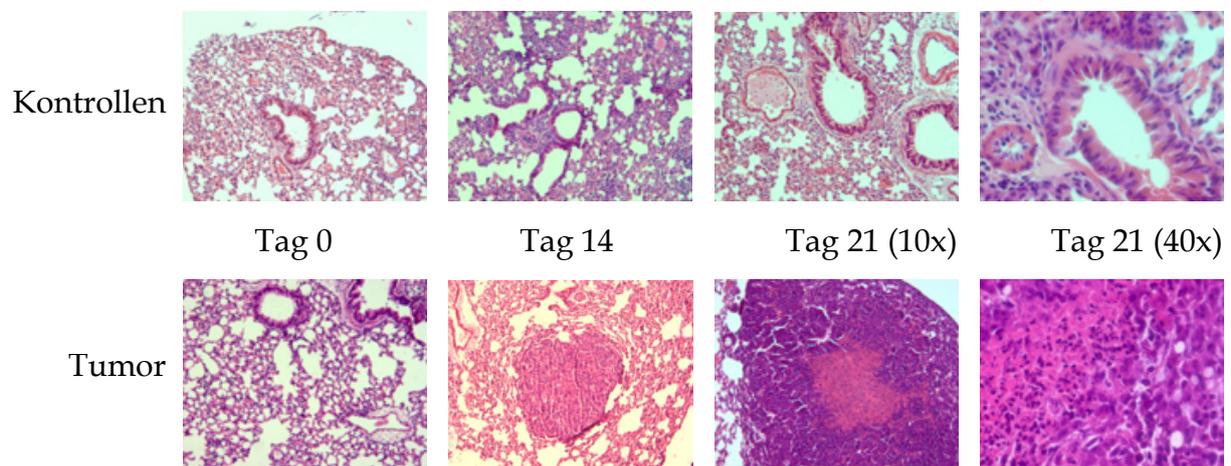


Abbildung 19: Histologische Färbung von Lungengewebeschnitten

Die hier gezeigten Gewebeschnitte wurde einer histologischen Haematoxilin und Eosin (HE) Färbung unterzogen. Über die HE-Färbung lassen sich Zellkerne darstellen, die Zellen selbst erscheinen rötlich. Solide Tumore zeichnen sich durch eine hohe Zelldichte aus, so daß sie über die HE Färbung als dunkel violette Bereiche zu erkennen sind, da hier viele Zellkerne nah beieinander liegen.

Bereits bei zehnfacher Vergrößerung sind die Metastasen gut erkennbar. Die L1C2 Zellen entwickeln zunächst einen fast runden Tumor im Lungengewebe (Tag 14), welcher nach weiterem Wachstum eine große Fläche einnehmen kann (Tag 21). Bei vierzigfacher Vergrößerung läßt sich die Zellstruktur in verschiedenen Bereichen der soliden Tumore erkennen.

4.2 Expression von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Zellpopulationen wurden Proben der aus den Lungen gewonnenen Gesamtzellsuspensionen für die Durchflußzytometrie (FACS) mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbt.

Dabei lag das spezielle Augenmerk in dieser Arbeit auf den CD4⁺ T Zellen. Neben der Expression von CD4 wurden zunächst unterschiedliche Marker für Aktivierung oder Adhäsion überprüft. Weiterhin wurden die gängigen Marker der regulatorischen T Zellen, CD4⁺, CD25⁺ und FoxP3 analysiert. Da FoxP3 ein Transkriptionsfaktor darstellt, mußten hier auf das Protokoll für intrazelluläre FACS Färbung zurückgegriffen werden (vergleiche Kapitel 3.5.4).

4.2.1 EXPRESSION VON CD69

Ein wichtiger Faktor bei der Charakterisierung der Immunzellen ist der Grad der Aktivierung. Ein Oberflächenmarker, der für den Grad der Aktivierung einer Zelle herangezogen werden kann, ist CD69, welcher auch mit Leu-23 bezeichnet wird. CD69 wird nicht von ruhenden Zellen exprimiert, sondern wird in kurzer Zeit nach der T-Zellaktivierung auf die Zellmembran verbracht und dient auf CD3⁺ T Zellen als Differenzierungsmarker von T Lymphozyten.

Der Expression von CD69 geht eine Stimulation des T-Zellrezeptors (TCR) in Koordination mit CD3 voraus. Die Kombination von Stimulation des TCR und Korezeptor CD3 aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche in direkter Weise die Expression von CD69 bewirkt.

CD69 wiederum induziert bei gleichzeitiger Stimulation über PKC die Produktion von IL-2 in der Zelle. Infolgedessen wird ebenfalls die Expression von CD25 erhöht und letztendlich die IL-2 abhängige Proliferation unterstützt.

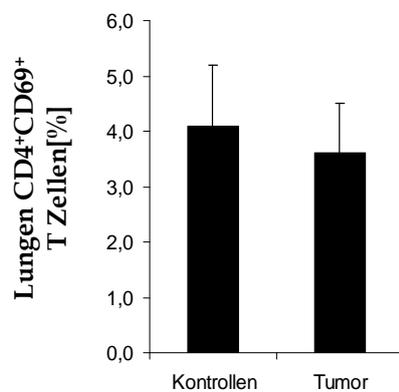
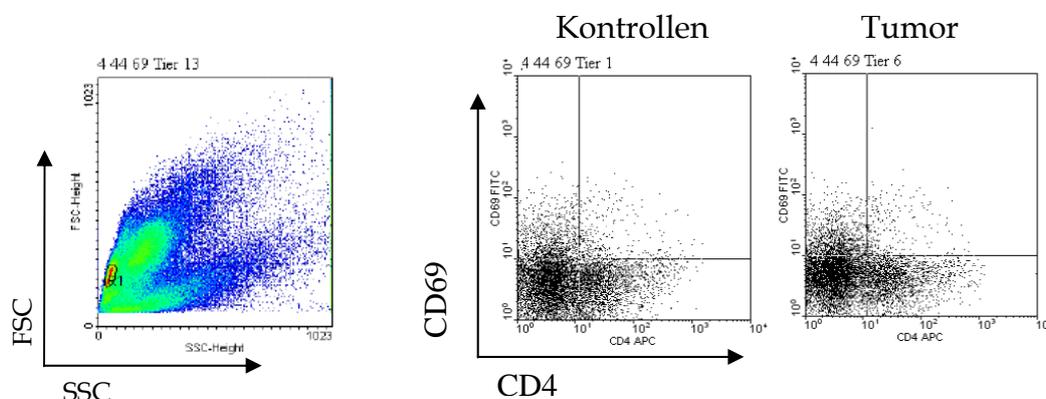


Abbildung 20: Expression des Aktivierungsmarkers CD69

Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 ist im vorliegenden Tumormodell im Vergleich von isolierten T Zellen aus unbehandelten und tumor-behandelten Tieren unverändert. Der Aktivierungszustand der CD4⁺ T Zellen ist gemessen an der Expression von CD69 im Tumor nicht erhöht.



In Abbildung 20 ist eine Färbung von CD4 und CD69 gezeigt. CD4⁺ T Zellen zeigen trotz vorhandenem, etabliertem Tumor bei den behandelten Tieren gemessen an der Expression von CD69 keine Veränderung ihrer Aktivierung.

4.2.2 EXPRESSION VON CD127

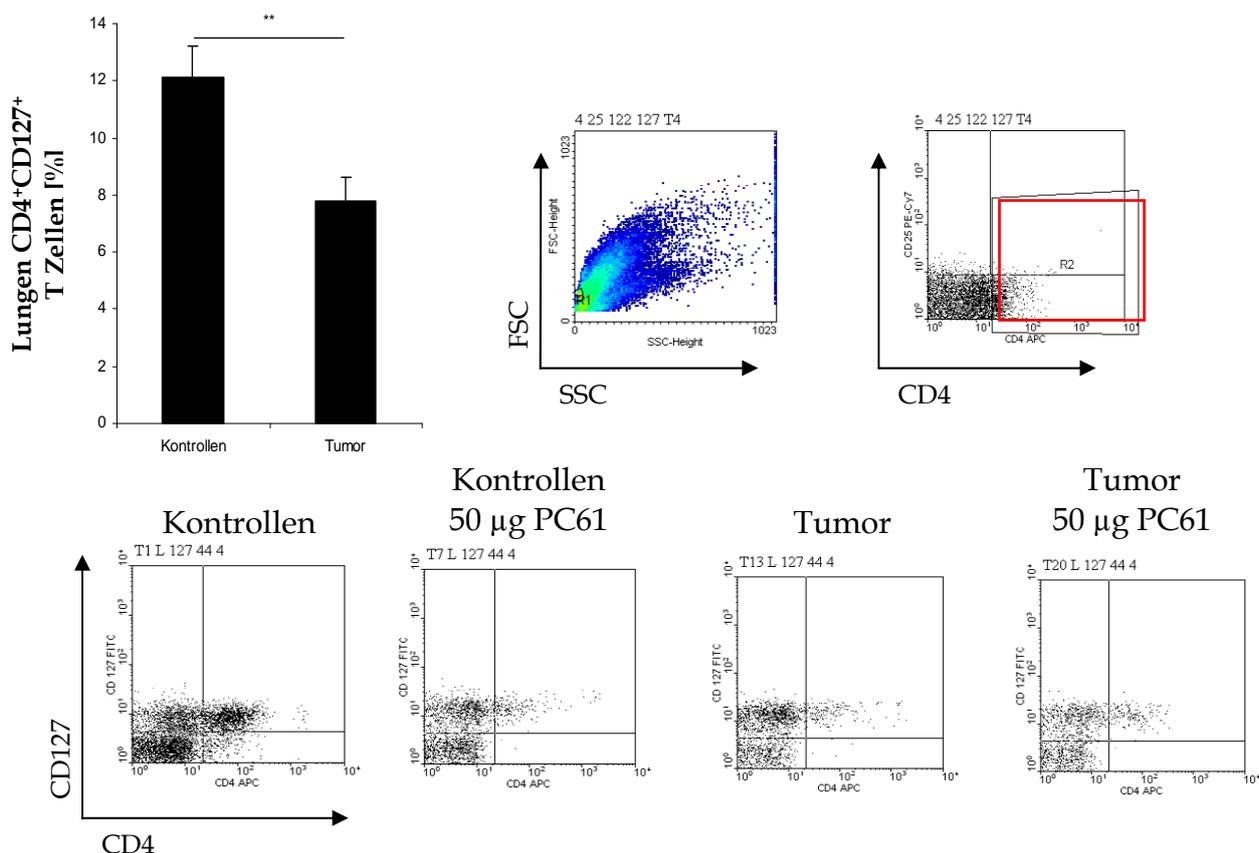


Abbildung 21: Expression der IL-7 Rezeptor α -Kette

Die α -Kette des IL-7 Rezeptors gilt als Marker für eine Gedächtnis (Memory) T Zelle, die nach Aufeinandertreffen mit Tumorzellen die adaptive Immunität heraufreguliert. Dargestellt ist die Expression Prozent von CD4⁺ T Zellen. Die Expression von CD127 ist bei tumor-behandelten Tieren signifikant reduziert.

Ein weiterer, für die Charakterisierung zu verwendender Marker stellt die α -Kette des IL-7 (CD127) Rezeptors dar. CD127 ist ein Oberflächenprotein, welches auf B Zellen eine Größe von 65 bis 75 kDa, auf T Zellen von 90 kDa aufweist. CD127 assoziiert mit einem Dimer aus der IL-2R- β -Kette (CD122, vergleiche Kapitel 1.11.2) und der allgemeinen γ -Kette (CD132, vergleiche Kapitel 1.10.1) zu einem funktionsfähigen Rezeptor für IL-7.

Generell wird CD127 als ein Marker für die sogenannten Memory-T-Cells, also den Gedächtniszellen in der T Zell Population angesehen. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, wird die Expression von CD127 im Zusammenhang von Tumor signifikant heruntergeregelt. Gemessen daran sinkt also die Zahl der intratumoralen Gedächtniszellen in der Lunge.

4.2.3 EXPRESSION VON CD44

Das CD44 Glycoprotein ist ein Zelloberflächenmolekül, welches an Zell-Zell-Kontakten, Zelladhäsion und Migration beteiligt ist. Neben seiner Funktion als Rezeptor für *haluronic acid* kann es mit anderen Liganden wie Osteopontin, Kollagen oder Matrixmetalloproteasen interagieren [124].

Darüber hinaus ist CD44 an einer Reihe von zellulären Funktion beteiligt, was Lymphozytenaktivierung, Rezirkulation, Homing, Hematopoiesis und Tumor Metastasierung einschließt. Transkripte für das Gen von CD44 werden einem komplexen alternativen Splicing unterzogen, was zu vielen Isoformen dieses Proteins führt. Jedoch sind die genauen Funktionen vieler dieser Varianten noch unklar. Das alternative Splicing ist die Grundlage für die strukturelle und funktionale Vielfalt dieses Proteins, was unter Umständen auch zur Bildung von Tumor Metastasen dienen kann [125].

In dieser Hinsicht wird die Transkription des CD44 Gens zumindest zum Teil durch Beta-Catenin und den Wnt Signalweg aktiviert, was mit der Entwicklung von Tumoren in Zusammenhang gebracht wird. Mittlerweile wurden verschiedene Varianten des CD44 Moleküls als Zelloberflächenmarker für einige Brustkrebsarten und Prostatakrebsstammzellen gefunden [125].

Zusammen mit CD25 wird CD44 dafür verwendet, T Zellen in frühen Entwicklungsstadien im Thymus zu detektieren. Weiterhin ist CD44 ein Marker für Effektor T Zellen.

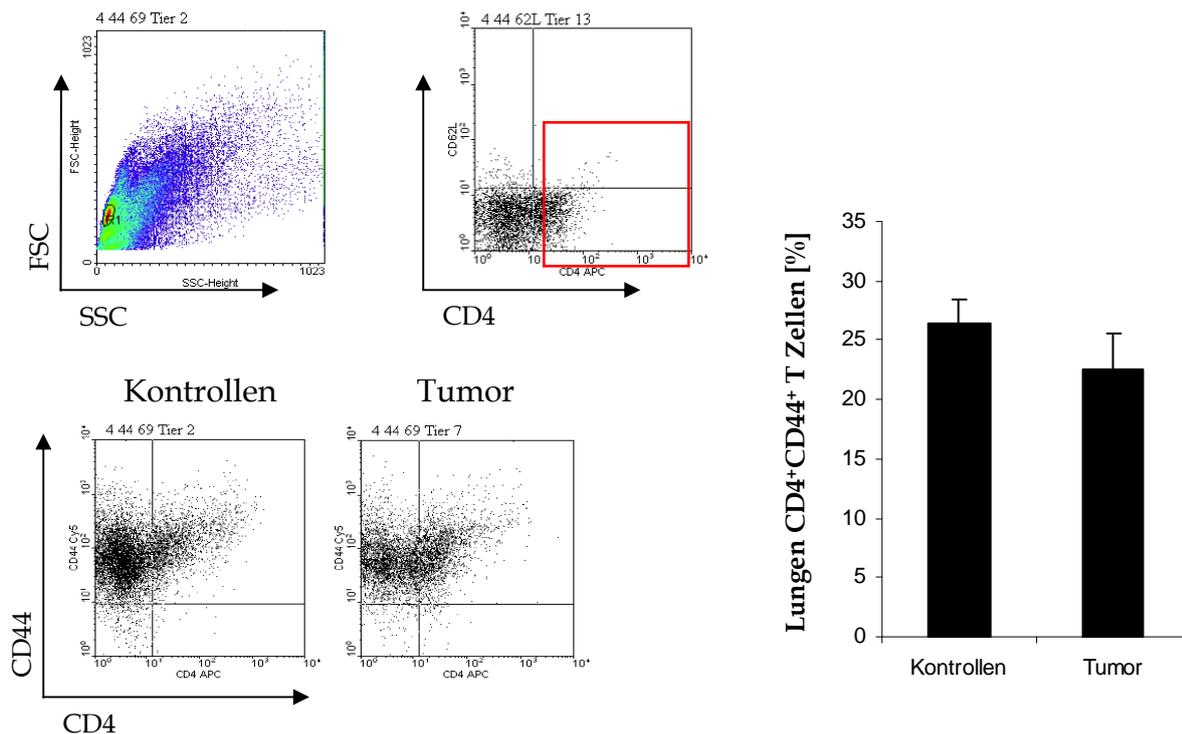


Abbildung 22: Expression des Markers CD44

Die Expression von CD44 ist zum einen ein Maß für die Migration der T Zellen, zum anderen ist CD44 ein Marker für Effektorzellen. Die Expression von CD44 ist auf CD4⁺ T Zellen im Vergleich von naiven und intratumoralen T Zellen geringfügig reduziert, weist jedoch keine signifikante Reduktion auf.

Das Zelloberflächenmarkers CD44 ist ein Marker für die Aktivierung der T Zellen, zusätzlich ein Homing-Marker, der die Migration der Zellen unterstützt. Die Expression von CD44 auf CD4⁺ T Zellen ist in dem verwendeten Tumormodell reduziert (siehe Abbildung 22).

Gemessen daran ist anzunehmen, daß die Aktivierung, beziehungsweise die Fähigkeit der Migration der intratumoralen T Zellen reduziert ist, wenn auch kein signifikanter Rückgang des Expression zu verzeichnen ist.

4.2.4 REGULATORISCHE T ZELLEN

Die vielseitigen Funktionen des Immunsystems stellen eine effektive Verteidigung gegen eingedrungene Pathogene und Parasiten dar, bewerkstelligen die Beseitigung von apoptotischen körpereigenen Zellen und kontrollieren mutiertes Gewebe, welches sich zu einem Tumor entwickeln könnte. Den hierzu wichtigen Effektorzellen sind so genannte Regulatorische T Zellen (T regs) gegenübergestellt, deren Funktion darin besteht, eine erfolgte Immunantwort zu regulieren oder die Eigentoleranz zu gewährleisten.

Es ist jedoch bekannt, daß gerade in Tumorgeweben diese regulatorischen T Zellen in erhöhter Zahl vorkommen und durch ihre natürliche Funktion, also der Hemmung der Effektorzellen, dem Tumor die Möglichkeit geben, sein Wachstum ungehindert fortzusetzen.

In dieser Hinsicht wurde als interne Kontrolle in allen durchgeführten Experimenten die regulatorischen T Zellen im FACS dargestellt. Als spezifischen Marker gilt neben der Expression des Differenzierungsmoleküls CD4 die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25, siehe Kapitel 1.11.1) und dem Transkriptionsfaktor FoxP3 (*forkhead box transkription factor 3*).

Abbildung 23 zeigt eine repräsentative FACS-Messung des Tumormodells für CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T Zellen.

Die gemeinsame Expression der Marker CD4⁺, CD25⁺ und FoxP3⁺ auf den isolierten Zellen zeigt einen signifikanten Anstieg. Die Charakteristik der erhöhten Regulatorischen T Zellen ist den Erwartungen entsprechend in dem verwendeten Tumormodell nachzuvollziehen.

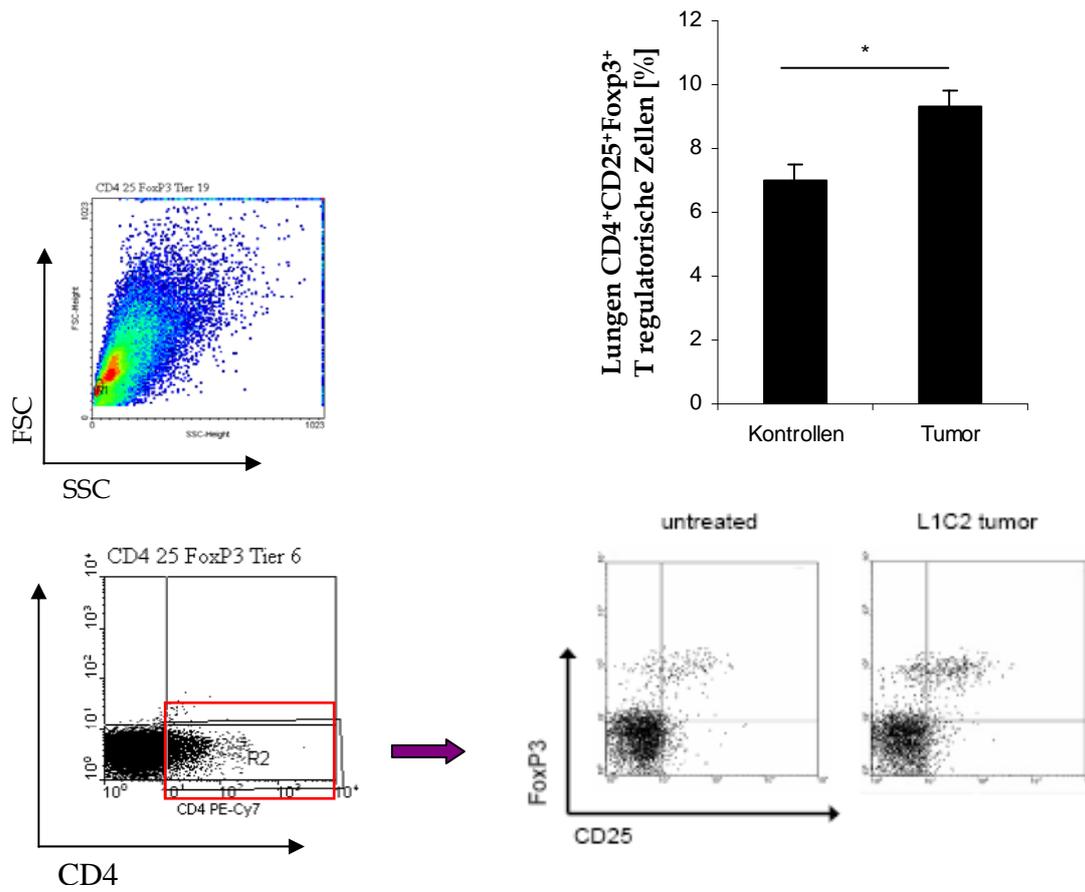


Abbildung 23: Expression von CD25⁺ und FoxP3⁺ in CD4⁺ Zellen

Regulatorische T Zellen werden durch die Expression von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ charakterisiert. T regs sind in Tumorgewebe signifikant erhöht. In dem L1C2 Bronchioadenocarcinoma Modell wurde diese Erhöhung als interne Kontrolle angesehen. Hier ist die signifikante Erhöhung der T reg gezeigt, links repräsentative Dotplots (Zellen gated auf CD4⁺), rechts im Quantifizierung in Prozent der CD4⁺ T Zellen (FACS).

4.3 Produktion von Zytokinen

Die Effektorfunktion von T Zellen wird zum einen durch Zell-Zell-Kontakt, zum anderen durch die Produktion von zytotoxischen Zytokinen vermittelt. Die Zellen der Kategorie T Helferzellen 1 (Th1) produzieren als Effektorzellen hauptsächlich Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Nekrosis Faktor- α (TNF- α) (siehe Kapitel 1.13 und 1.12). Beide Zytokine schädigen Pathogene und Tumorzellen, so daß eine erhöhte Produktion dieser Zytokine die Abwehr eines Tumors unterstützt.

4.3.1 INTERFERON - γ

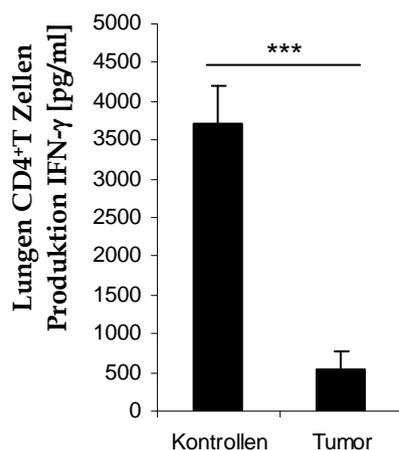


Abbildung 24: Produktion von Interferon γ von CD4⁺ aus naiven und tumorbehandelten Tieren

Dargestellt ist die im ELISA ermittelte Menge an IFN- γ , die in Mediumüberständen aus CD4⁺ Zellkulturen gemessen wurden. Intratumorale T Zellen produzieren signifikant weniger IFN- γ .

Die in Abbildung 24 gezeigte Grafik repräsentiert die Produktion von Interferon- γ von CD4⁺ Zellen.

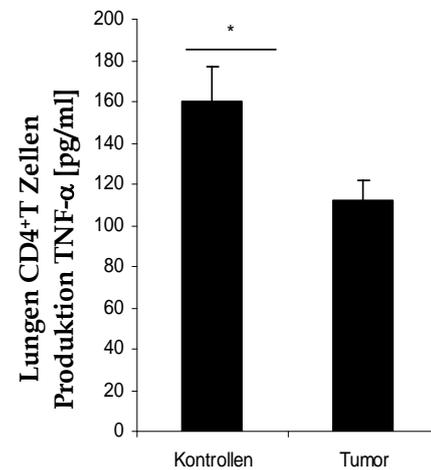
Aus unbehandelten Mäusen isolierte CD4⁺ T Zellen produzieren eine große Menge an Interferon- γ , erfüllen also die Effektorfunktion, die von *in vitro* mit α CD3 und α CD28 Antikörpern stimulierten immunkompetenden Zellen zu erwarten ist. Sind die CD4⁺ T Zellen allerdings aus L1C2 behandelten Mäusen isoliert, sinkt die Menge an Interferon- γ signifikant, so daß die intratumorellen T Zellen anscheinend eine eingeschränkte Funktionalität in Bezug auf IFN- γ mit sich bringen.

4.3.2 TUMOR NEKROSIS FAKTOR α

In Anlehnung an die Reduktion von $\text{INF-}\gamma$ ist auch die Menge an $\text{TNF-}\alpha$ im Medium von *in vitro* kultivierten CD4^+ T Zellen signifikant reduziert, wenn die Zellen aus L1C2 behandelten Mäusen stammen.

Abbildung 25: Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ von CD4^+ T Zellen aus naiven und tumorbehandelten Tieren

Dargestellt ist die im ELISA ermittelte Menge an $\text{TNF-}\alpha$, die in Mediumüberständen aus CD4^+ T Zellkulturen gemessen wurden. Intratumorale T Zellen produzieren signifikant weniger $\text{TNF-}\alpha$.



Gemessen an der Produktion der Th1 Zytokine $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ fehlen den intratumoralen T Zellen unter den physiologischen Bedingungen des Tumors die Fähigkeit, ihre Funktion ordnungsgemäß auszuüben.

4.4 Differenzierung von CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T Zellen

Bei den oben aufgezeigten Ergebnissen ist zu beachten, dass es sich bei den verwendeten Zellen um eine Population handelt, deren Isolierung über den Differenzierungsmarker CD4 erfolgte. Die Gesamtpopulation der CD4⁺ T Zellen stellt jedoch eine Kombination auch unterschiedlichen Subpopulationen dar, was Effektorzellen, Regulatorische T Zellen und Gedächtniszellen mit einschließt.

In Anbetracht der Tatsache, dass im Tumor der Anteil der Regulatorischen T Zellen ansteigt, könnte der signifikante Rückgang der Zytokinproduktion auf die Anwesenheit dieser Population zurückzuführen sein.

Der Ausschluss von Regulatorischen T Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T Zellen) gerade in Bezug auf den Transkriptionsfaktor FoxP3 mittels der verwendeten Isolationsmethoden war experimentell leider nicht möglich. Eine Separation setzt eine Markierung des FoxP3s voraus. Eine derartige intrazelluläre Färbung beinhaltet die Fixierung der Zellen, so daß anschließend keine weitere Zellkultur mehr möglich ist. Dahingehend mußte sich in den durchgeführten Experimenten auf die Aussage CD4⁺CD25⁺ T Zellen verlassen werden.

Legt man zugrunde, daß sich die Regulatorischen T Zellen in der Population der CD4⁺CD25⁺ T Zellen befinden, kann über die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 eine Separation vorgenommen werden. Dabei ist zu beachten, dass nicht nur die Regulatorischen T Zellen CD25 exprimieren, sondern auch die aktivierten Effektorzellen.

Experimentell wurde im ersten Schritt mittels des Dynal Systems (siehe Kapitel 3.4.1) eine Isolation der CD4⁺ T Zellen durchgeführt. Das Dynal System ermöglicht das Abschneiden der magnetischen Beads („Detachen“), so dass eine zweite Isolation erfolgen kann. Im zweiten Schritt konnten mittels MACS (siehe Kapitel 3.4.2) die Populationen der CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T Zellen getrennt werden. Als Hinweis auf die Effektorfunktion wurde im ELISA die Produktion von TNF- α bestimmt.

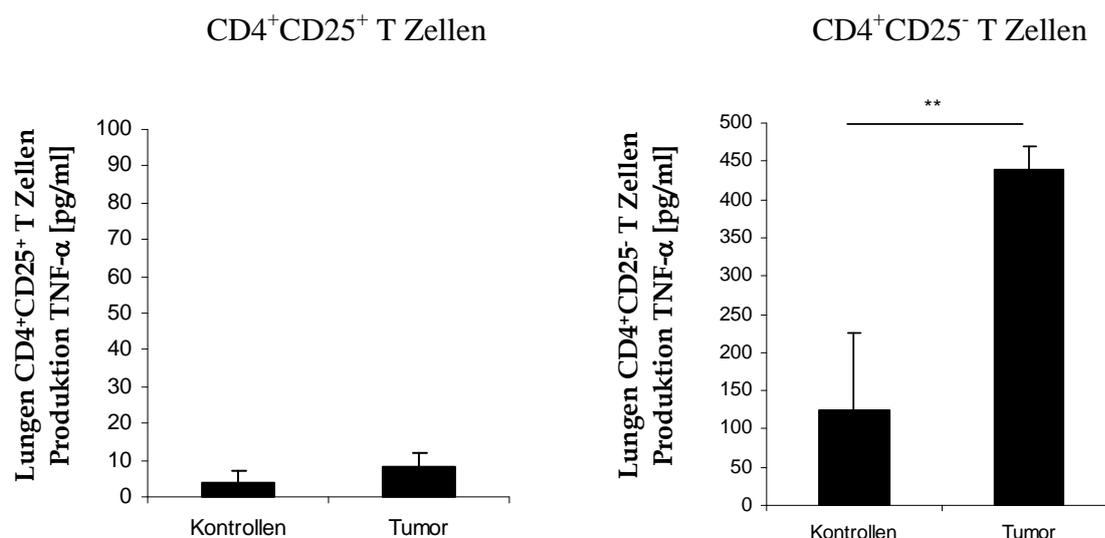


Abbildung 26: Produktion von TNF- α von CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T Zellen

Dargestellt ist die Menge an TNF- α gemessen mittels ELISA aus Mediumüberständen von *in vitro* kultivierten Zellen. CD4⁺ T Zellen, welche zudem CD25 exprimieren, zeigen eine sehr geringe Produktion von TNF- α , während sich für CD25 negative CD4⁺ T Zellen eine eindeutige Menge an TNF im Medium nachweisen läßt.

Wie in Abbildung 26 zu sehen ist produziert die Population der CD4⁺CD25⁺ T Zellen kaum TNF- α . Die Menge des Zytokins liegt unter der Nachweisgrenze des ELISAs. Selbst diejenigen Zellen, die aus naiven Tieren stammen, werden im Vergleich zu den intratumoralen trotz antikörperunterstützter Stimulation nicht zur Produktion dieses Effektorzytokins angeregt. Dieser Effekt kann auf die Regulatorischen T Zellen zurückgeführt werden, die darüber hinaus nach erfolgter Separation in der Population der CD4⁺CD25⁺ T Zellen einen höheren Anteil einnehmen als in der CD4⁺ Gesamtpopulation.

Bei der Population der CD4⁺CD25⁻ T Zellen dagegen ist eine ausgeprägte Produktion von TNF- α festzustellen. Diejenigen Zellen aus unbehandelten Mäusen sezernieren geringe Mengen TNF- α , welches signifikant ansteigt, wenn es sich um intratumorale CD4⁺CD25⁻ T Zellen handelt.

Es kann vermutet werden, daß die TNF- α Produktion der CD4⁺ T Zellen (siehe Kapitel 4.3.2) tatsächlich auf die Population der CD4⁺CD25⁻ zurückzuführen ist. Das

würde heißen, daß die T Zellen auch ohne den Aktivierungsmaker CD25 eine Effektorfunktion ausüben können.

4.5 Messung der Apoptose von L1C2 Tumorzellen

Zur Überprüfung der Effektorfunktion der isolierten CD4⁺ T Zellen wurden diese mit L1C2 Tumorzellen über Nacht inkubiert. Die Messung der Apoptose in den Tumorzellen mittels Färbung der Annexin V Expression, beziehungsweise Reaktion auf Propidiumiodid (PI) soll als Maß für die Effektorfunktion der eingesetzten T Zellen werden, die über Zytokine oder hier auch Zell-Zell-Kontakt vermittelt werden kann.

Als Kontrolle gilt die Apoptoserate in einer L1C2 Kultur, denen keine T Zellen zugefügt worden sind. Die T Zellen für die Kokultur wurden zum einen aus naiven Mäusen, zum anderen aus Mäusen isoliert, die mit L1C2 Zellen behandelt worden sind.

4.5.1 FRÜHE PHASE DER TUMORENTWICKLUNG (TAG 10)

In der frühen Phase der Tumorentwicklung, was in dem verwendeten Modell dem Tag zehn nach Injektion der Tumorzellen entspricht, sind die CD4⁺ T Zellen in der Lage, Apoptose in den mit ihnen in Co-Kultur inkubierten L1C2 Zellen zu induzieren.

Wie Abbildung 27 zeigt liegt die Apoptoserate der L1C2 Zellen bei circa 12 Prozent und wird in Kokultur mit CD4⁺ T Zellen auf 21 Prozent gesteigert. Die aus unbehandelten Tieren isolierten Zellen befinden sich in einen nicht-aktivierten, naiven Zustand und hatten vorher keinen Kontakt zu einem Pathogen oder aber mutiertem Gewebe. Trotzdem sind sie in der Lage, Apoptose in den Tumorzellen zu induzieren, was als antigen-unabhängige Entwicklung einer Effektorfunktion angesehen werden kann. Im Vergleich dazu stammen die Zellen der Tumorgruppen aus Lungen, in denen auf L1C2 basierende Metastasen vorhanden waren, so daß hier

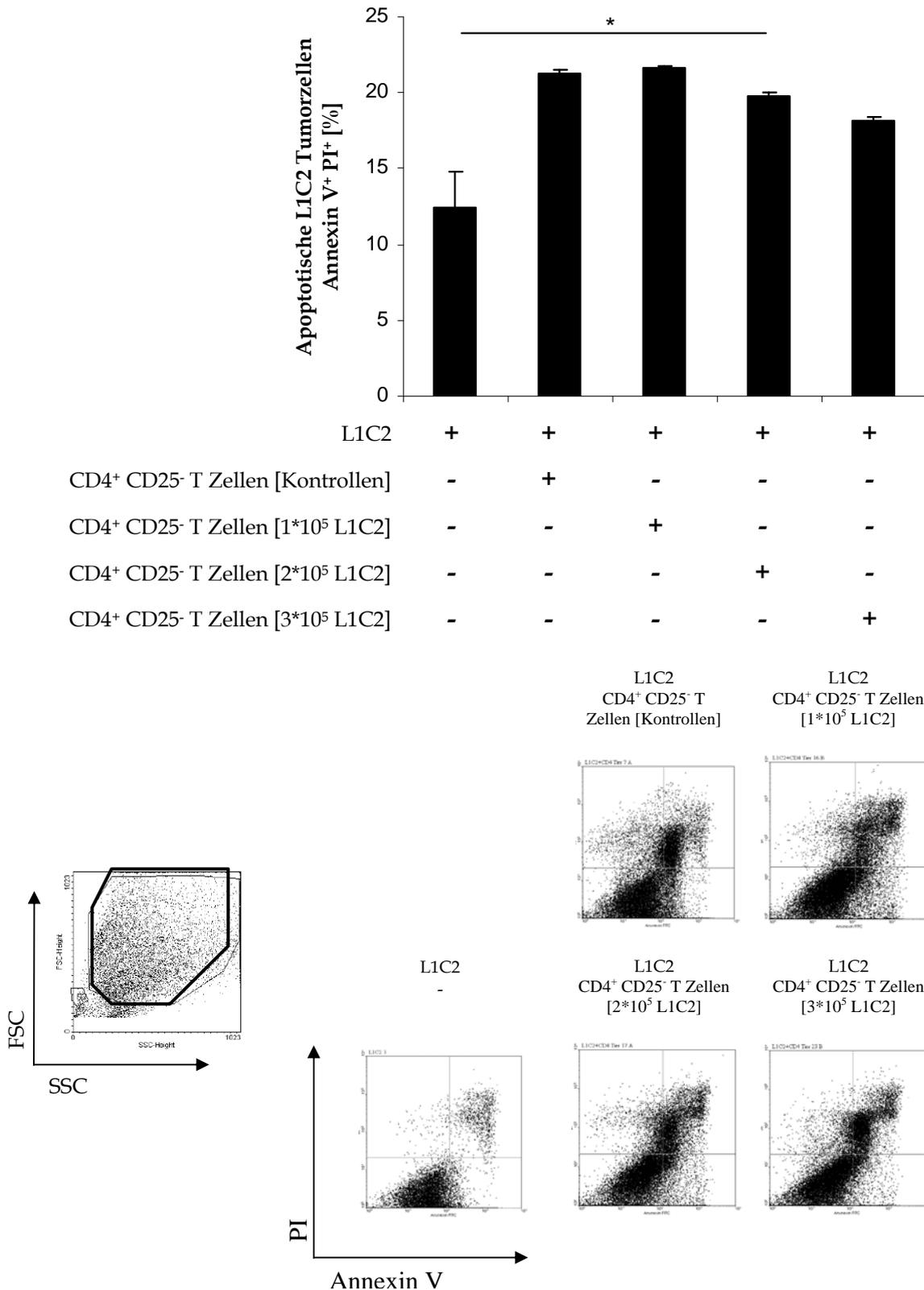


Abbildung 27: Apoptose von L1C2 Zellen in Kokultur mit isolierten CD4⁺ T Zellen an Tag 10

Über Nacht wurden aus Mauslungen isolierte CD4⁺ T Zellen mit L1C2 Tumorzellen inkubiert und die Apoptoserate mittels Annexin/PI Färbung im FACS bestimmt. Die Apoptoserate von L1C2 Zellen ohne T Zellen gilt als Grundwert, beziehungsweise Referenz. Isolierte T Zellen, sowohl aus naiven Tieren, als auch aus Tumorbehandelten Tieren sind an Tag 10 in der Lage, Apoptose in den Tumorzellen zu induzieren.

bereits ein Kontakt zum Tumor und gegebenenfalls eine Spezifität entwickelt haben kann. Letzteres hätte eine höhere Apoptoserate erwarten lassen, was jedoch nicht nachzuvollziehen ist. Die Effektorfunktion der intratumoralen T Zellen unterscheidet sich nicht von derjenigen der naiven Zellen.

4.5.2 SPÄTE PHASE DER TUMORENTWICKLUNG (TAG 21)

In der späten Phase der Tumorentwicklung ändert sich die Effektorfunktion der Zellen. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der Apoptosemessung für Tag 21 nach Injektion der Tumorzellen.

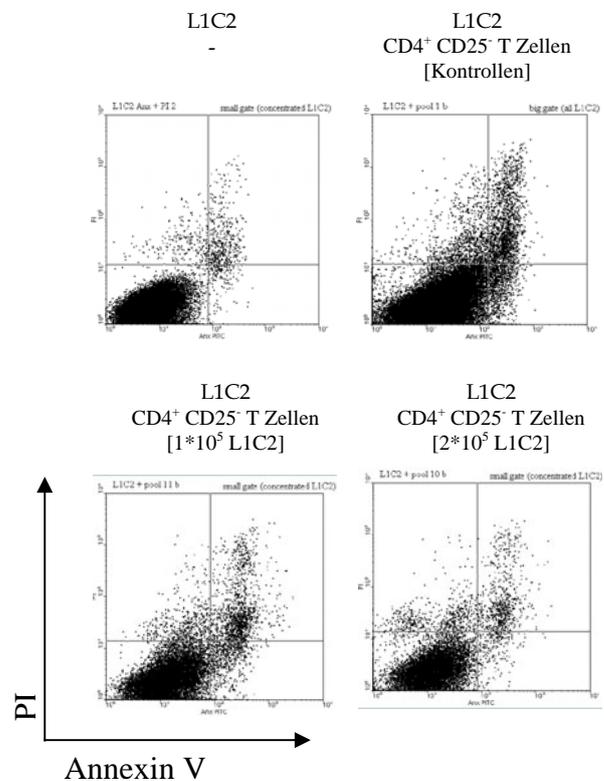
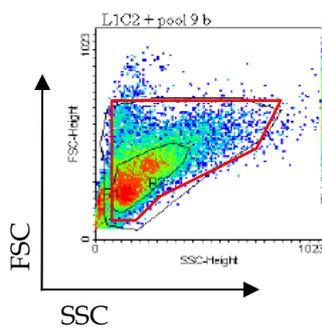
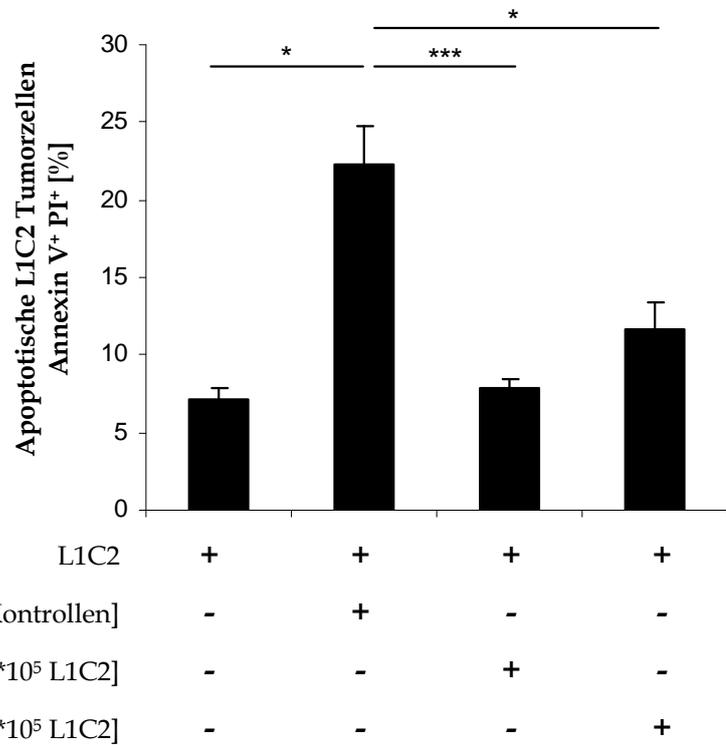
Die L1C2 Zelllinie ohne Zugabe von T Zellen zeigt als Grundwert eine Apoptoserate von circa sieben Prozent. Werden die Tumorzellen im Verhältnis 1:1 mit CD4⁺ Zellen kultiviert, die aus naiven Mäusen isoliert worden sind, steigt die Apoptose signifikant auf den dreifachen Wert. Die spontane Effektorfunktion der T Zellen ist auch hier nachweisbar.

Im Gegensatz dazu fehlt bei denjenigen Kokulturen die erhöhte Apoptose, in denen intratumorale CD4⁺ T Zellen verwendet wurden. Wie oben erwähnt wäre gerade in dem Fall nach längerem Kontakt zum Tumor *in vivo* eine Erhöhung der Apoptoseinduktion zu erwarten, die jedoch in signifikanter Weise ausbleibt.

Der fehlende Nachweis einer Effektorfunktion könnte in diesem Fall abermals auf die erhöhte Anzahl von Regulatorischen T Zellen zurückgeführt werden oder aber auf tatsächlichen Verlust der Effektorfunktion der T Zellen trotz möglicher Tumorspezifität.

Abbildung 28: *in vitro* Apoptose-induktion bei L1C2 Zellen in Kokultur mit T Zellen der Lunge

Im Balkendiagramm ist der prozentuale Anteil der Annexin und PI positiven Zellen dargestellt. Der erste Balken repräsentiert die Apoptose in der Kultur der Tumorzellen, die ohne Zugabe von T Zellen gehalten wurden. Die Apoptose der Kokulturen wurden mit dieser Apoptoserate in Relation gebracht.



4.6 Modifikation des murinen Tumormodells

Wenn also auch diejenigen CD4⁺ T Zellen, die nicht den Aktivierungsmarker CD25 tragen, trotzdem eine Effektorfunktion ausüben können und in Abwesenheit der CD25⁺ T Zellen TNF- α in hoher Menge produzieren, könnte durch Blockade des CD25 Moleküls *in vivo* ein Effekt zur Steigerung der Tumorabwehr erzielt werden.

Zudem könnte in dem vorangegangenen Modell durch die Gabe von Interleukin-2 oder auch denkbar von anti-Interleukin-6 eine Verstärkung der T Zell-Effektorfunktion und somit eine bessere Tumorabwehr hervorgerufen werden.

In dieser Hinsicht wurde das in Abbildung 18 gezeigte Tumormodell durch eine intranasale Behandlung der Mäuse erweitert. An den Tagen 7 und 14 wurden den zu behandelnden Tieren intranasal 50 μ g anti-CD25 Antikörper (PC61), beziehungsweise rekombinantes IL-2 verabreicht.

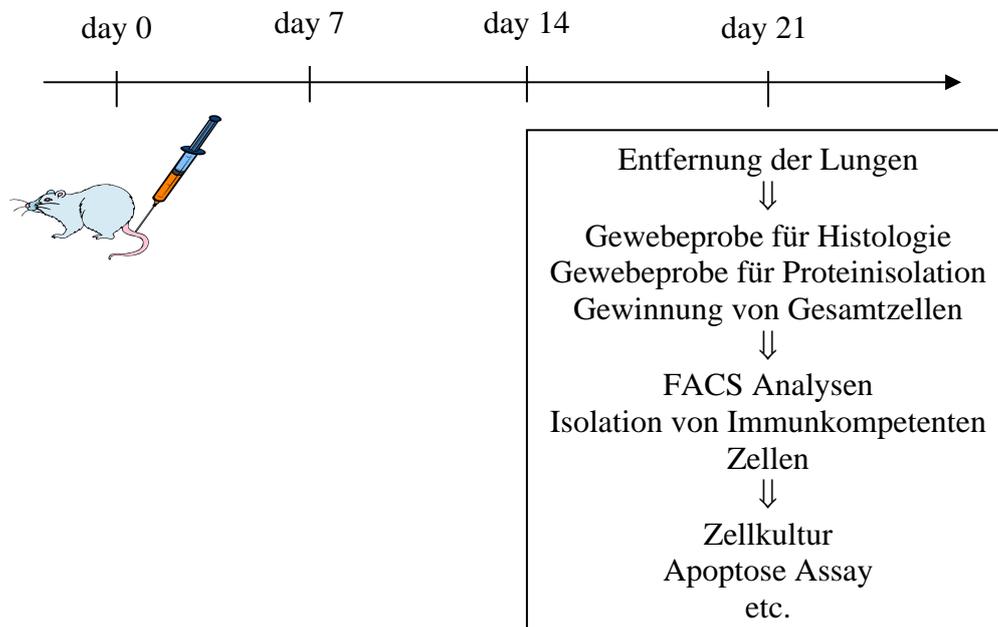


Abbildung 29: Modifikation des murinen Adenokarzinoma Modells mit IL-2 oder anti-CD25 Gabe
 Zusätzlich zu der Injektion der L1C2 Tumorzellen an Tag 0 werden die Mäuse an Tagen 7 und 14 einer Behandlung unterzogen. Intranasal wird zum einen 50 μ g PC61, zum anderen verschiedene Dosen IL-2 (40 ng, 200 ng, 1 μ g) verabreicht.

4.7 Blockade der IL-2R α -Kette CD25

Zur Blockade des Oberflächenmoleküls CD25 wurde der anti-CD25 Antikörper PC61 verwendet. PC61 bindet kovalent an die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und behindert dessen Funktion. Derart blockierte CD25 Moleküle werden von der Zelloberfläche entfernt und infolgedessen verlieren die Zellen den vollständigen (hochaffinen) Rezeptorkomplex für Interleukin-2, so daß kein starkes Signal über IL-2 Stimulation mehr erfolgen kann und dahingehend das Signal für die Effektorfunktion der T Zelle ausbleibt.

Zu denjenigen Zellen, die CD25 exprimieren, gehören wie oben erwähnt die Regulatorischen T Zellen, so dass diese Population nach Verabreichung von CD25-neutralisierenden Antikörpern depletiert, beziehungsweise zumindest reduziert werden kann.

4.7.1 HISTOLOGIE

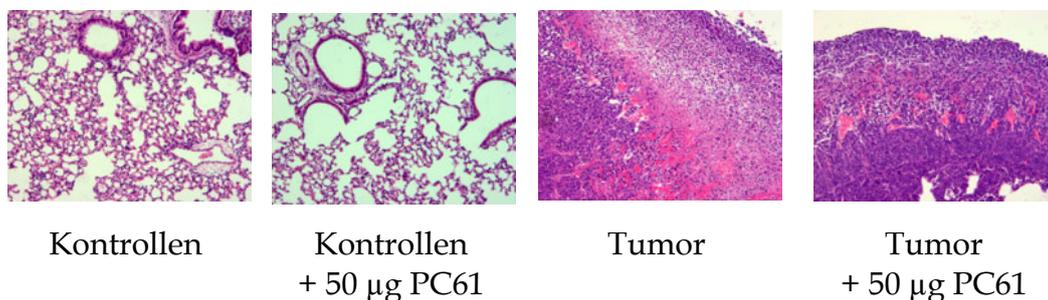
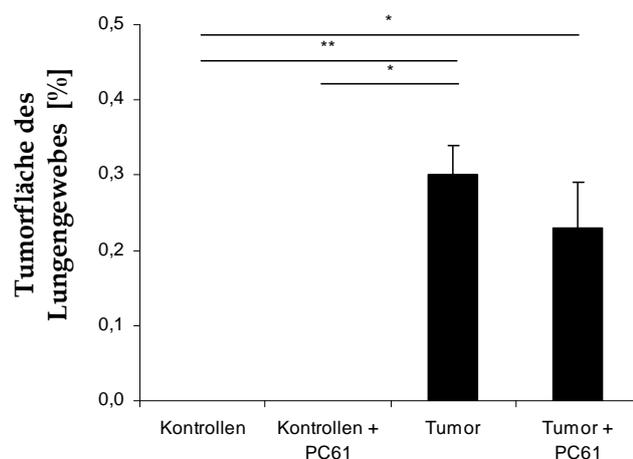


Abbildung 30: Tumorquantifizierung Adenokarzinoma Modell nach Applikation von PC61

Histologische Bilder von Mäuselungen des murinen Adenokarzinoma Modells nach Erweiterung um intranasale Verabreichung von CD25-neutralisierenden Antikörpern an den Tagen 7 und 14.



Die histologische Quantifizierung der Tumorausdehnung jedoch ergibt, dass auch in den mit PC61 behandelten Tumor-Mäusen eine starke Tumorentwicklung zu verzeichnen ist. Die Tumorlast ist zwar in den behandelten Mäusen etwas geringer, jedoch konnte an den Versuchstieren kein visueller Unterschied in der Metastasierung festgestellt werden.

4.7.2 REGULATORISCHE T ZELLEN

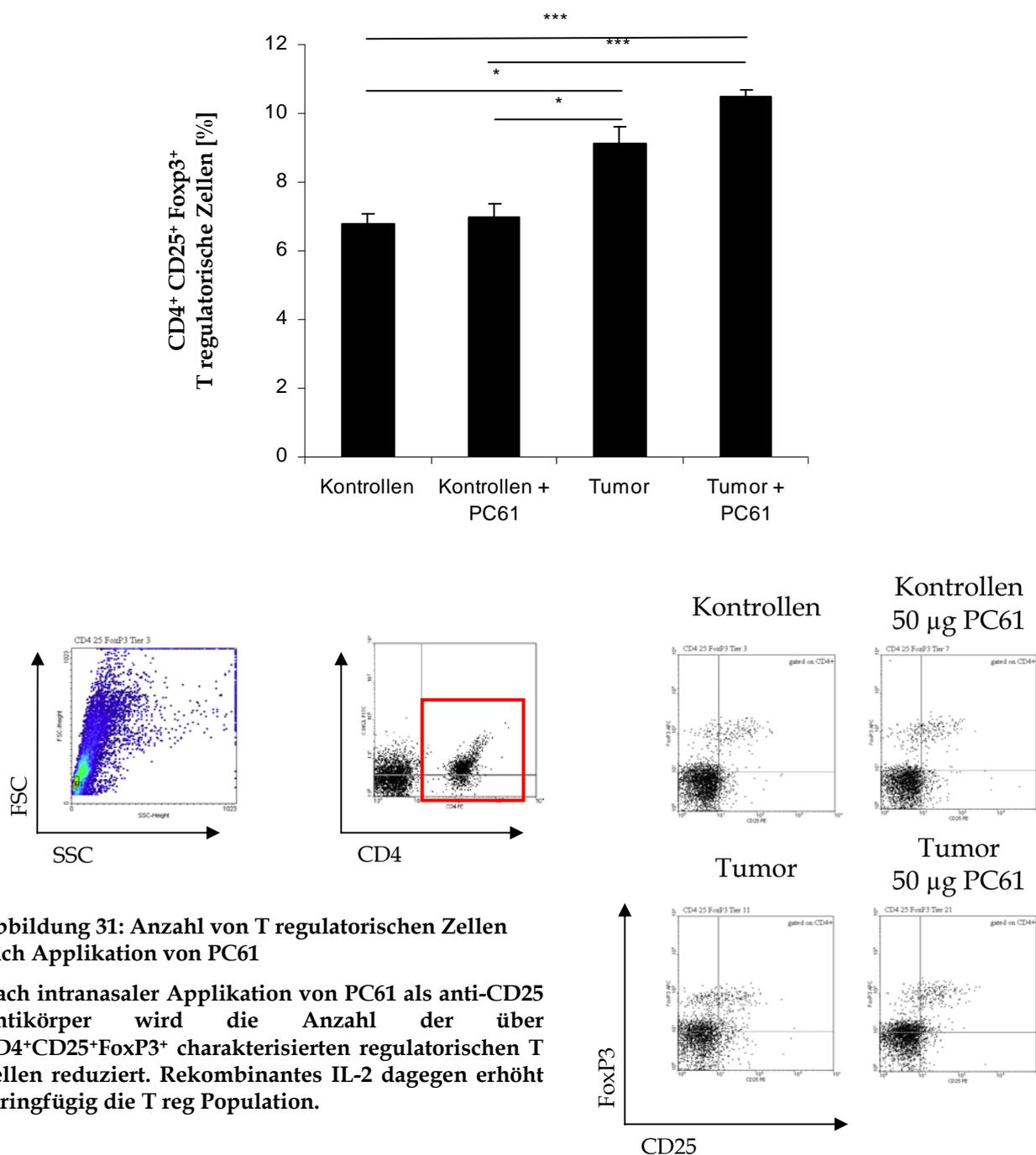


Abbildung 31: Anzahl von T regulatorischen Zellen nach Applikation von PC61

Nach intranasaler Applikation von PC61 als anti-CD25 Antikörper wird die Anzahl der über CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ charakterisierten regulatorischen T Zellen reduziert. Rekombinantes IL-2 dagegen erhöht geringfügig die T reg Population.

Wie in Abbildung 31 gezeigt, wird die Population der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatorischen T Zellen im Vergleich zu der Tumorkontrollgruppe nicht reduziert. Der neutralisierende Antikörper war also nicht in der Lage, einen Teil der Regulatorischen T Zellen aus der Lunge zu entfernen.

4.7.3 EXPRESSION VON AKTIVIERUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSMARKERN

Wie in den oberen Kapitel beschrieben, werden zur Charakterisierung einzelner T Zell Populationen Marker wie CD127 und CD44 herangezogen. CD127 steht dahingehend für die Population der *Memory T cells*.

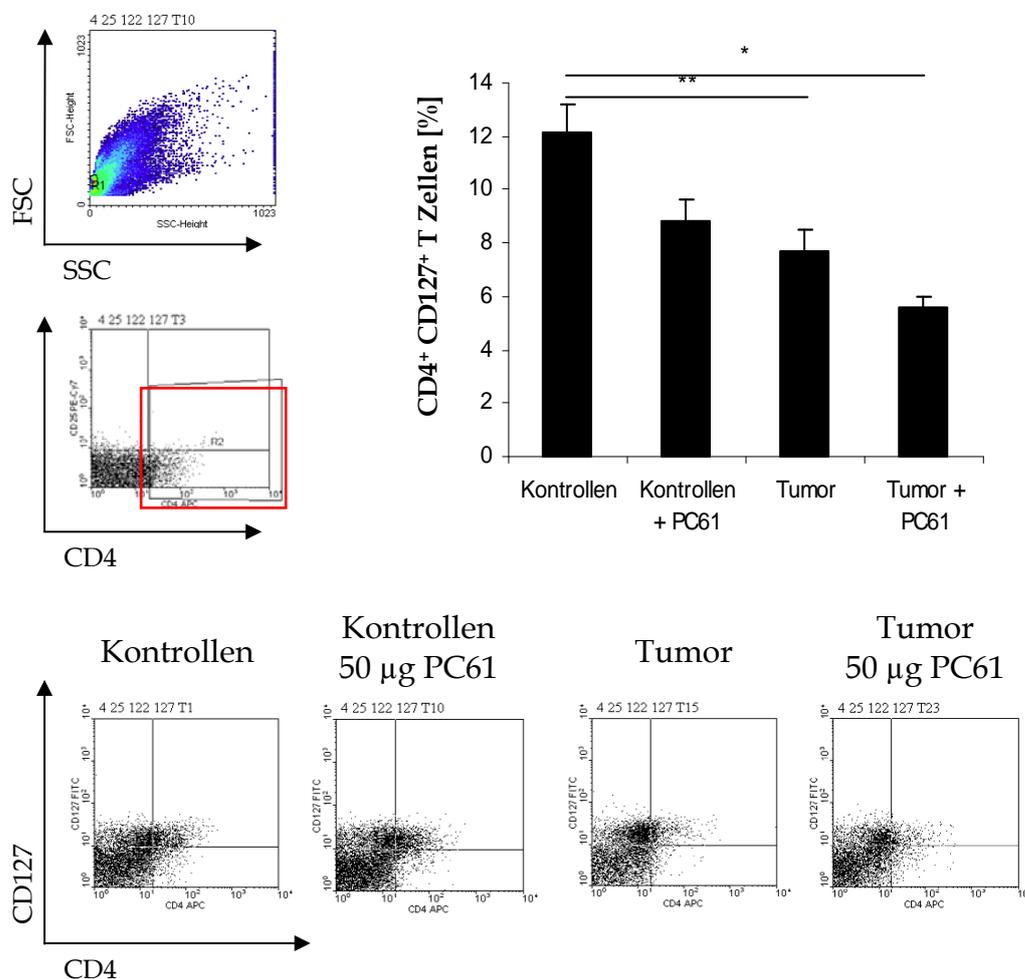


Abbildung 32: Expression der Aktivierungsmarker CD127

Die Expression von CD127 ist in beiden Tumorguppen signifikant geringer als in den tumorfreien Versuchs-Gruppen. Die Expression von CD44 ist bei der Tumorgruppe unverändert, steigt jedoch nach intranasaler Behandlung mit anti-CD25 Antikörper.

Die Expression von CD127 ist in naiven, mit PC61 behandelten Tieren gegenüber den vollständig unbehandelten Kontrollen reduziert. Die Reduktion erhöht sich, wenn es sich um intratumorale T Zellen handelt und auch hier ist im Vergleich zwischen den Tumorgruppen eine Verringerung der Memory T Zellen zu verzeichnen.

Die Differenzierung von aktivierten T Zellen zu Memory Zellen setzt zunächst ein starkes Signal über den T Zell Rezeptor voraus, im weiteren Verlauf ist die Stimulation mit IL-2 notwendig, um den Fortbestand der Population zu sichern. Blockiert man über die Applikation mit PC61 den hochaffinen Rezeptor für IL-2, ist eine Differenzierung zu langlebigen Memory T Zellen nicht mehr möglich (Abbildung 32).

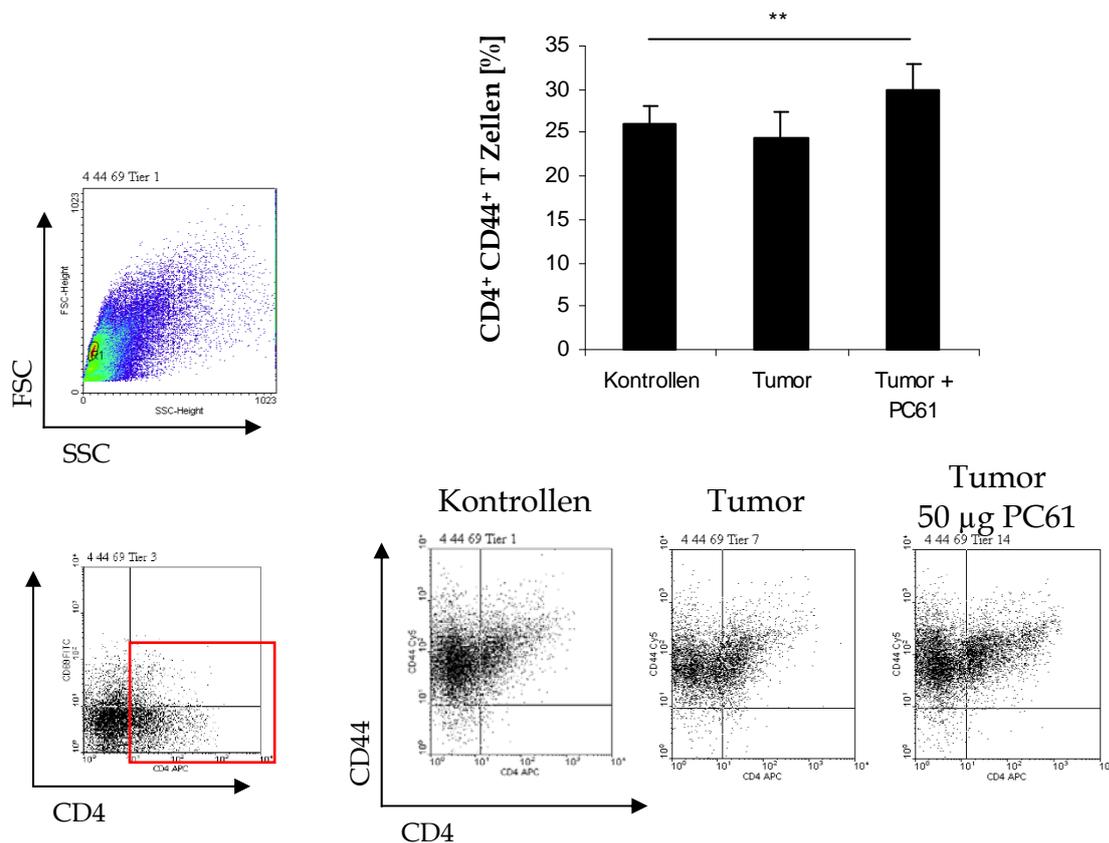


Abbildung 33: Expression des Aktivierungsmarkers CD44

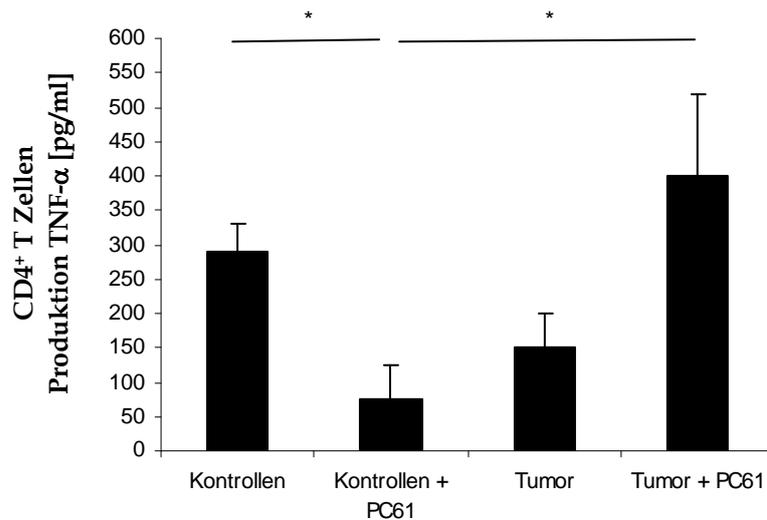
Im Gegensatz zu einer Reduktion der Memory T Zellen steigt die Expression von CD44 und damit einer Population migrationsfähiger und aktivierter T Zellen (Abbildung 33). Trotz einer Signifikanz in der Erhöhung nach Behandlung mit PC61 ist in Anbetracht der Tumorbelastung keine wirkliche Erhöhung der Effektorfunktion zu verzeichnen.

4.7.4 ZYTOKINPRODUKTION

Die Reduktion der regulatorischen T Zellen *in vivo* sollte theoretisch die Abwehrfunktion gegenüber des Tumors begünstigen, da die Effektorzellen besser ihrer Funktion nachkommen können.

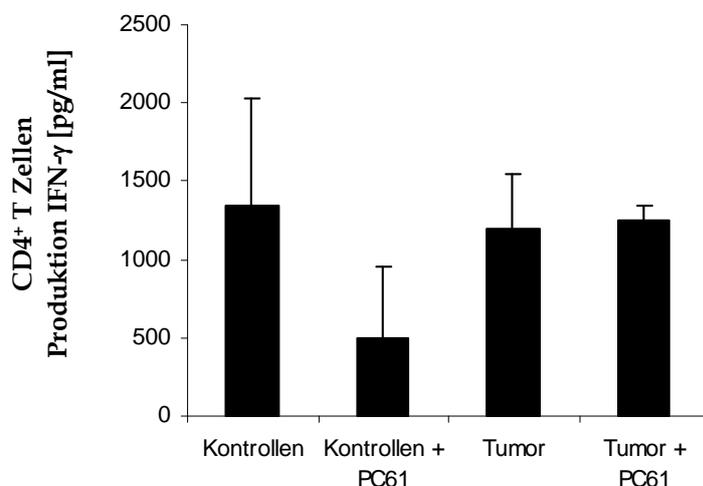
In Abbildung 34 ist die TNF- α Produktion aufgezeigt, wobei vier Versuchsgruppen zu unterscheiden sind. Die intranasal mit PC61 behandelten Mäuse ohne Tumor weisen gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant geringere TNF- α Produktion auf. Auch die Gruppe der mit Tumor behandelten Mäuse zeigt eine deutliche Verringerung dieses Zytokins. Die Stimulation durch die α CD3 und α CD28 Antikörper in der Zellkultur reicht hier nicht, die Zellen zu einer Zytokinproduktion zu aktivieren.

Bei denjenigen CD4⁺ Zellen allerdings, die aus Tieren isoliert wurden, welche mit Tumor und PC61 behandelt wurden, steigt die TNF- α Produktion. In Zusammenhang mit sich *in vivo* entwickelndem Tumor scheint tatsächlich nach Depletion der CD25 exprimierenden Zellen durch PC61 die Ausschüttung von TNF- α , welches nach den *in vitro* ermittelten Ergebnissen (siehe 4.4, Abbildung 26) von den CD25 negativen T Zellen stammen muß, erhöht zu werden.



Bezüglich der Produktion von IFN- γ von den isolierten CD4⁺ T Zellen ist erkennbar, daß sich diese mit Ausnahme der PC61 behandelten Mäusen (Gruppe 2) nicht verändert (Siehe Abbildung 35).

Im Vergleich der erhöhten TNF- α Produktion zu der histologischen Tumorquantifizierung ist die geringfügige Reduktion des Tumors in Gruppe vier erklärbar. Allerdings scheint die Erhöhung von TNF- α unter Zunahme des gleichbleibenden IFN- γ Levels nicht ausreichend für eine signifikante Regression des Tumors zu sein.



4.8 Intranasale Gabe von rekombinantem Interleukin 2

Die Aktivierung von ruhenden T Zellen, welche in dieser Phase konstitutiv den niedrigaffinen Rezeptor für Interleukin-2 bestehend aus CD122 und CD132 exprimieren, erfolgt über Stimulation des T Zell Rezeptors mit Kostimulation durch weitere Moleküle, sowie die Anwesenheit von Interleukin-2. In aktiviertem Zustand wird die Expression von CD25 erhöht, so daß sich der hochaffine Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche bildet. Die eigene Produktion von Interleukin-2, beziehungsweise das Vorhandensein dieses Zytokins stellt das Überleben, sowie den Fortbestand der Population sicher (vergleiche Kapitel 1.11).

Um die Effektorfunktion zu unterstützen, wurde das grundlegende murine Adenokarzinommodell durch die intranasale Applikation von Interleukin-2 erweitert. Das rekombinante Interleukin-2 sollte als zusätzliche Stimulation, respektive als Unterstützung oder Verstärkung der durch den Tumor erfolgten Aktivierung von tumor-spezifischen T Zellen.

4.8.1 AKTIVIERUNG DES INTERLEUKIN-2 SIGNALWEGES

Neben der im FACS darzustellenden Expression der IL-2 Rezeptorkomponenten wurde die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade durch Westerblotanalyse dargestellt.

Nach Bindung von IL-2 an den Rezeptorkomplex folgt die Interaktion und Phosphorylierung mit Januskinasen und anschließende Aktivierung von STAT5. In Abbildung 36 ist ersichtlich, daß zunächst einmal die Menge an phosphorylierten, also aktiviertem STAT5 (pSTAT5) bei Mäusen mit Tumor erhöht ist. Nach intranasaler Applikation und entsprechender Tumorbehandlung steigt abermals die Menge an pSTAT5, so daß man dahingehend von einer Verstärkung des IL-2 Signalweges ausgehen kann.

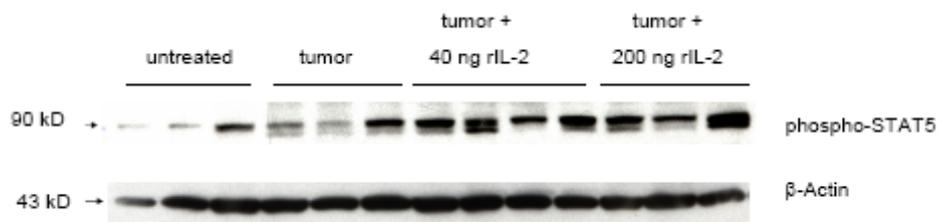
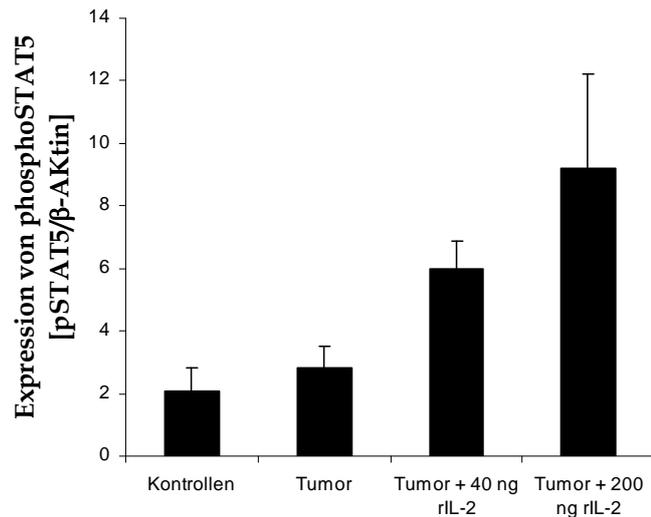


Abbildung 36: Expression von phospho-STAT5 und β -Aktin im Westerblot nach i.n. Applikation von Interleukin 2

Gezeigt wird die Expression von phosphoreliertem STAT5, einem Molekül aus der IL-2 Signalkaskade. Deutlich zu erkennen ist die Erhöhung, wenn rekombinantes Interleukin 2 intranasal während der Tumorentwicklung verabreicht wurde.



4.8.2 TUMORWACHSTUM NACH INTRANASALER APPLIKATION VON IL-2

Wenn also das phosphorelierte STAT5 des IL-2 Signalwegs durch die zusätzliche Verabreichung des Zytokins erhöht ist, sollten sich auch die dadurch vermittelten T Zell Funktionen verstärken lassen. Mit anderen Worten müßte die Funktion aller CD25, beziehungsweise den zum IL-2-Rezeptorkomplex gehörenden CD122 und CD132, exprimierenden Zellen erhöht sein. Da sowohl die aktivierten T Effektorzellen, als auch die Regulatorischen T Zellen CD25 exprimieren, ist es fraglich, welche Population von dem verabreichten Zytokin eher angesprochen wird. Bei Betrachtung der Tumorbelastung kann festgestellt werden, daß geringe Dosen an Interleukin-2 (hier 40 ng) das Tumorwachstum eher noch begünstigen.

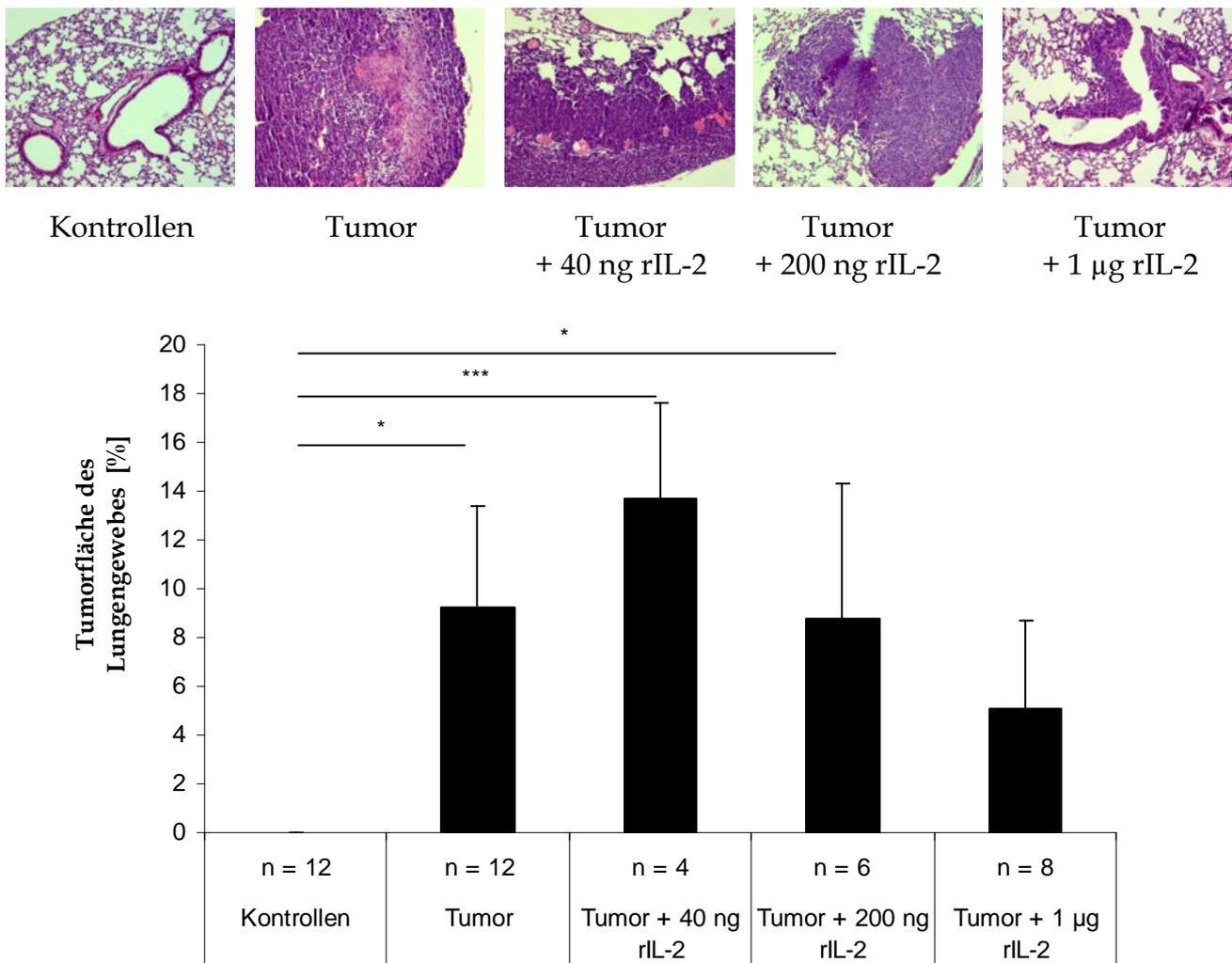


Abbildung 37: Tumorfläche in Prozent der Gesamtfläche nach i.n. Gabe von rIL-2 (40ng/200ng)

Die intranasale Applikation von rIL-2 in einer Dosierung von 40 ng an Tagen 7 und 14 nach Injektion der L1C2 Zellen erhöht die Tumorfläche. Bei einer Dosis von 200 ng rIL-2 entspricht das Tumorwachstum demjenigen der Kontrollgruppe. Trotz Stimulation der Effektorzellen ist kein Rückgang, beziehungsweise Verringerung des Tumors festzustellen.

Auch eine höhere Dosierung (hier 200 ng) bringt keinen Rückgang des Tumorwachstums, die Tumorbelastung entspricht derjenigen der Tumorkontrollgruppe.

4.8.3 REGULATORISCHE T ZELLEN

Da die Behandlung mit IL-2 wie oben erwähnt sowohl die T-Effektorzellen, als auch die Regulatorischen T Zellen anspricht, könnte die Stimulation der letzteren eine Erklärung sein, warum die Tumorbelastung trotz Erhöhung der TNF- α Ausschüttung keine Regression des Tumors bewirkt hat.

Während der Anteil der Regulatorischen T Zellen in der Tumorkontrollgruppe (Gruppe 2) wie erwartet bereits signifikant höher als die unbehandelten Kontrollen liegt, steigt dieser noch einmal, wenn die Mäuse mit IL-2 behandelt wurden.

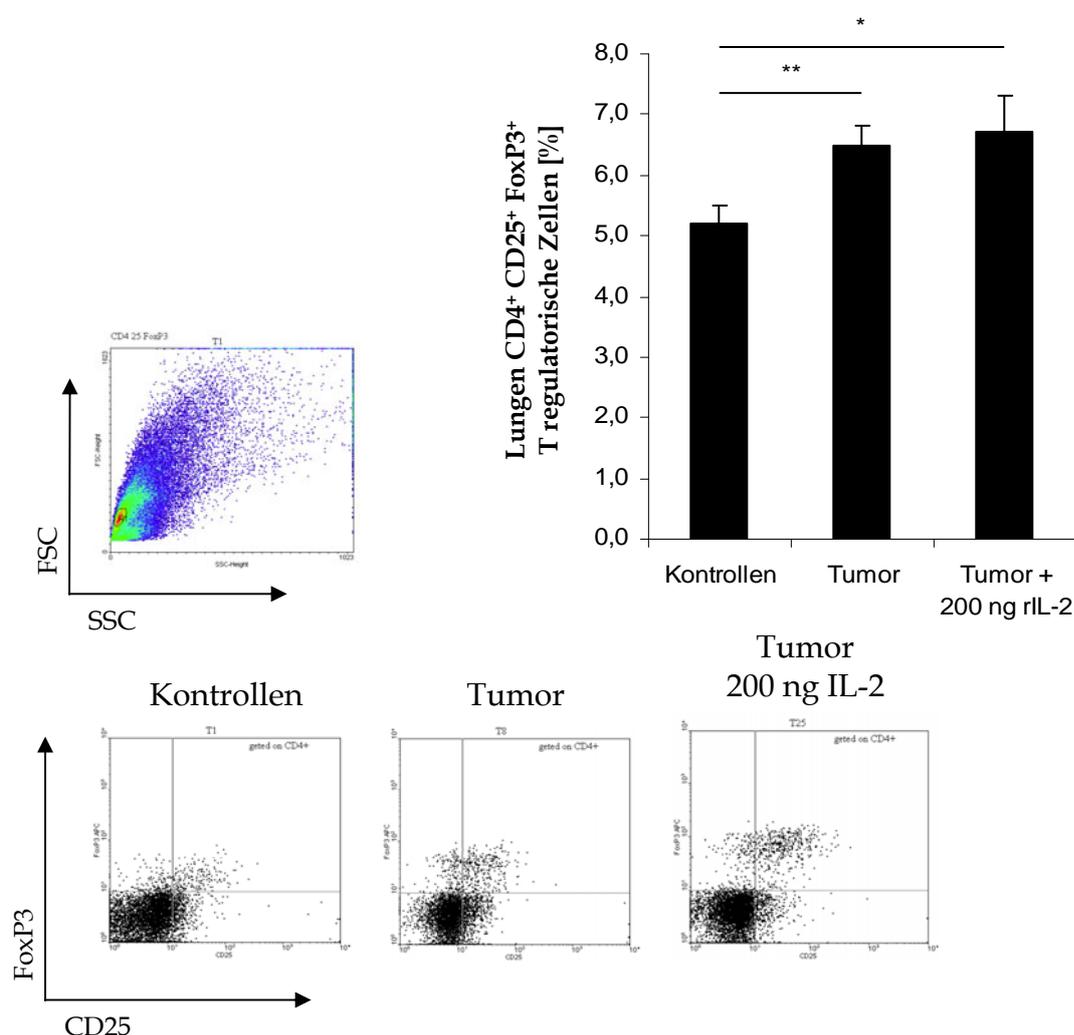


Abbildung 38: Regulatorische T Zellen nach intranasaler Behandlung mit rIL-2

Der Anteil Regulatorischer T Zellen erhöht sich signifikant nach intranasaler Applikation von Interleukin-2.

Die in diesen Experimenten verwendeten Dosen an rekombinantem IL-2 sind also eher den Regulatorischen T Zellen zuträglich, als zur Unterstützung der Effektorzellfunktion.

4.8.4 EXPRESSION DES OBERFLÄCHENMARKERS CD127

Die starke Population der Regulatorischen T Zellen bewirkt neben der Unterstützung der Tumorentwicklung auch den Effekt, daß die benannten Aktivierungsmarker signifikant heruntergeregelt werden, also der allgemeine Aktivierungszustand der Effektorzellen in der Tumorgruppe, sowie in den IL-2 Gruppen erheblich verringert ist (Abbildung 39).

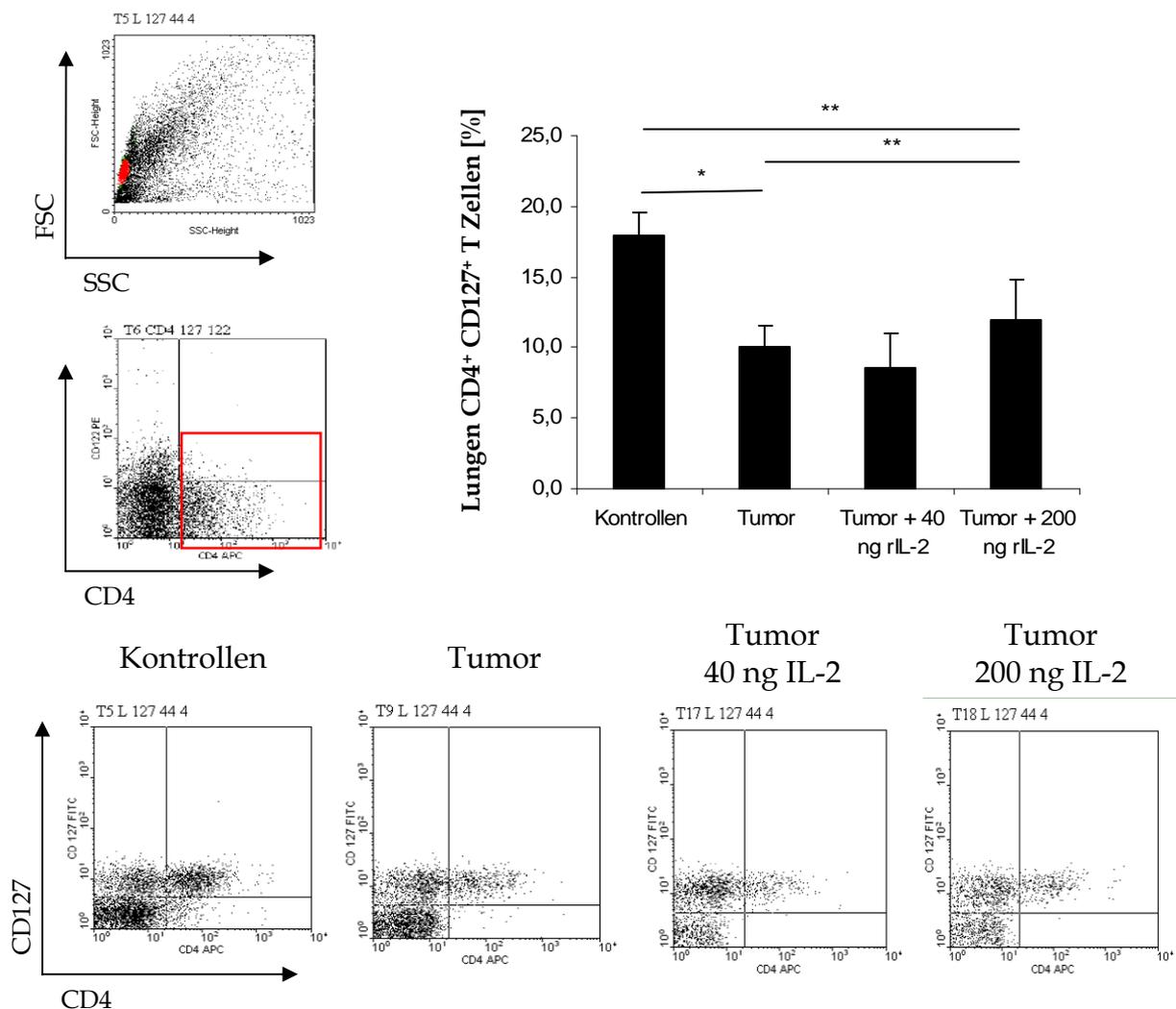


Abbildung 39: Expression der IL-7-Rezeptor α -Kette auf CD4⁺ T Zellen

Die Expression der IL-7 Rezeptor α Kette ist bei allen intratumoralen CD4⁺ reduziert. Nach Gabe von Interleukin-2 erhöht sich diese wieder signifikant, erreicht aber nicht die Expression der naiven Zellen.

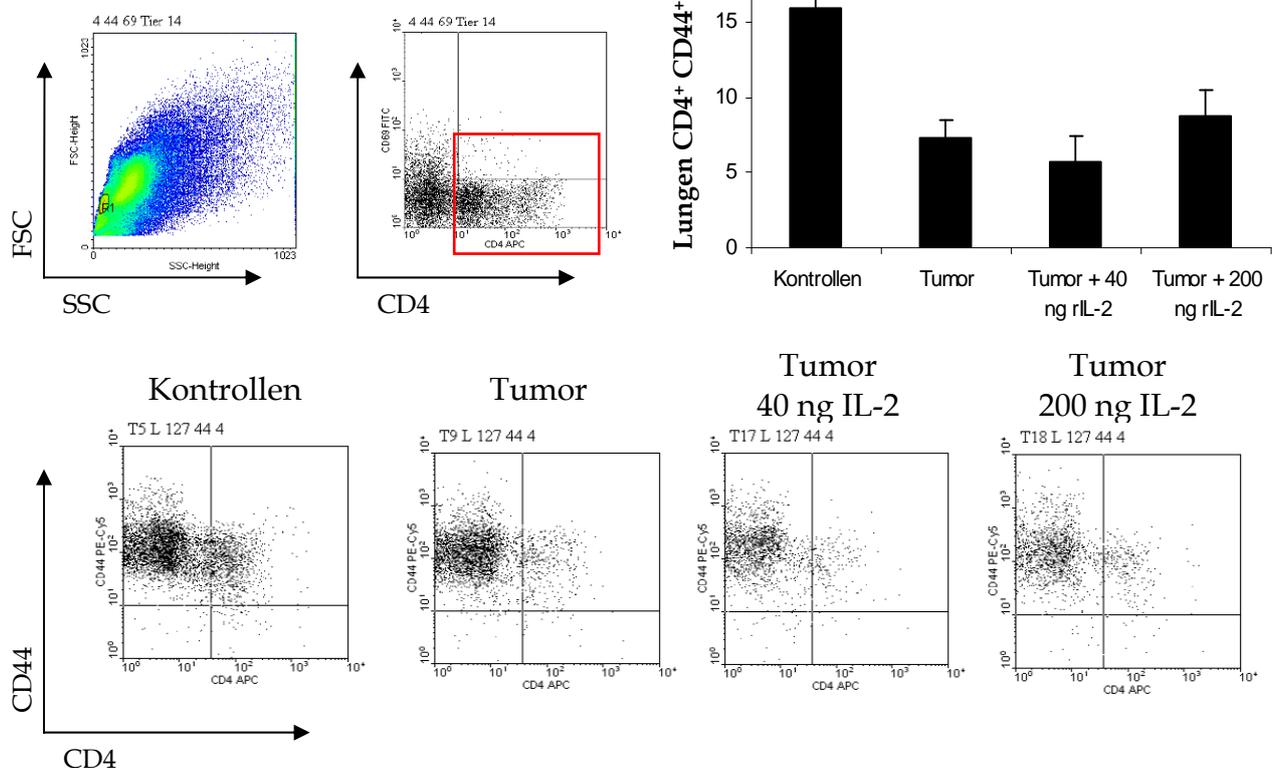
4.8.5 EXPRESSION DES AKTIVIERUNGSMARKERS CD44

Wie bereits in den oben stehenden Kapiteln dargestellt, ist für die Expression von CD44 und damit die Aktivierung und Migrationsfähigkeit der intratumoralen T Zellen signifikant reduziert. Auch nach intra nasaler Applikation von rIL-2, welches den Fortbestand entsprechender Populationen unterstützen sollte, ist die Expression von CD44 signifikant reduziert.

Die eingesetzten Dosen an rekombinantem IL-2 haben keinen Einfluß auf die Expression von CD44.

Abbildung 40: Expression von CD44

Ähnlich der Expression von CD127 (siehe Abbildung 39) zeigt sich für das Zelloberflächenmolekül CD44. Während die Expression bei naiven CD4⁺T Zellen bei circa 16 Prozent liegt, reduziert sich die Expression signifikant bei allen intratumoralen CD4⁺T Zellen. Die Behandlung mit Interleukin 2 bringt keine Veränderung.



4.8.6 ZYTOKINPRODUKTION

Im Gegensatz jedoch zu dem geringeren Aktivierungszustand zeigt die Zytokinproduktion ein anderes Bild. Gerade die geringere Dosis an IL-2 (Gruppe 3) läßt die CD4⁺ Zellen in signifikant mehr TNF- α produzieren, als bei Gabe der höheren Dosis.

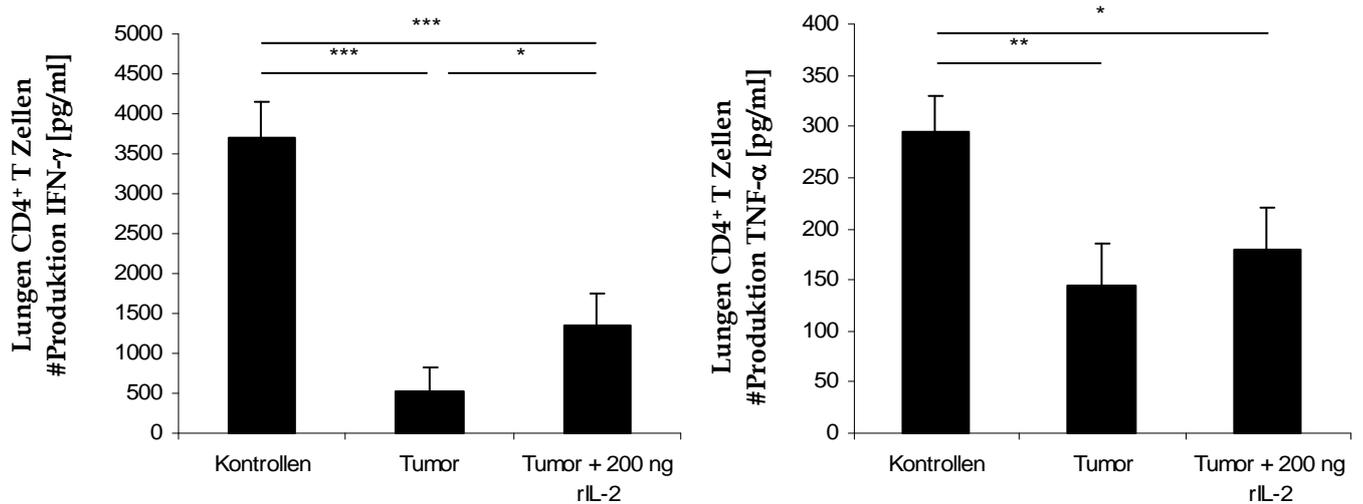


Abbildung 41: Produktion von IFN- γ und TNF- α von CD4⁺ T Zellen

Dargestellt ist die mittels ELISA gemessene Menge an Interferon- γ und TNF- α in Mediumüberständen von CD4⁺ Zellkulturen. Neben der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit L1C2 behandelten Tumorkontrollgruppe wurde der Versuchsgruppe 200 ng Interleukin-2 an den Tagen 7 und 14 intranasal appliziert.

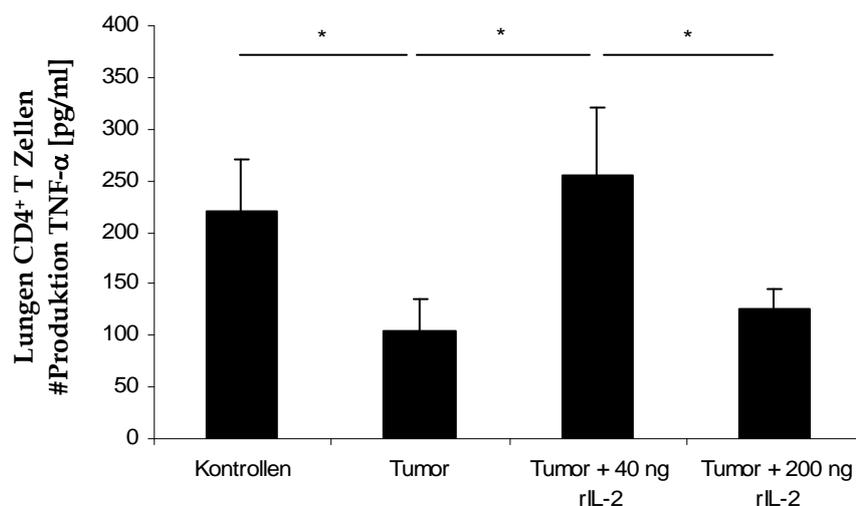


Abbildung 42: Produktion des Effektorzytokins TNF- α nach Stimulation mit IL-2

In Zusammenfassung konnte bei Stimulation mit IL-2 beobachtet werden, daß dieses Zytokin eher die Regulatorischen T Zellen stimuliert, die wiederum das Wachstum des Tumors durch Hemmung der Effektoren begünstigen. Auch eine erhöhte Menge an TNF- α führt zu keiner Regression des Tumors.

Unter Hinzunahme der TNF-Signalgebung ist jedoch zu beachten, daß TNF nicht nur die Induktion von Apoptose in einer Zelle bewirkt, sondern auch über Signalgebung des TNFR2 ein gegenteiliges Signal geben kann (vergleiche Kapitel 1.12.3). Sollte dies in dem verwendeten Modell der Fall sein, wäre die erhöhte Menge an TNF- α eher als Unterstützung des Tumors, denn als Effektorzytokin anzusehen.

4.9 Adenokarzinoma Modell mit TNF- α *knock out* Mäusen

Die Rolle des Zytokins TNF- α im verwendeten Adenocarcinommodell ist nach den oben stehenden Ergebnissen unklar. Eine Verifizierung, inwieweit das von den T Zellen produzierte TNF den Tumor bekämpft oder ihn möglicherweise unterstützt, soll durch Neutralisierung des TNFs *in vivo* überprüft werden.

Um jegliche Anwesenheit von TNF auszuschließen, wurden zu diesem Zweck TNF-Knock-out Mäuse nach dem entsprechenden Protokoll verwendet.

4.9.1 SURVIVAL KURVE

Als ersten Vergleich von Wildtyp Mäusen und TNFKO Mäusen werden vier Gruppen herangezogen, die gleichzeitig geschlechterspezifische Unterschiede aufzeigen könnten.

Jedes Tier erhielt eine Injektion mit $2 \cdot 10^5$ L1C2 an Tag 0. Die Gruppen setzten sich wie folgt zusammen:

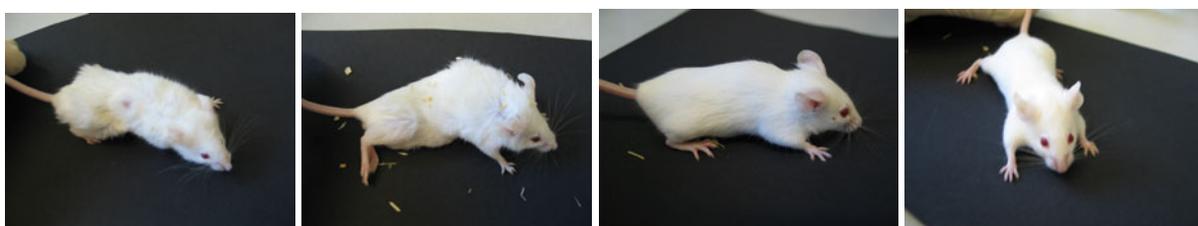
Gruppe ◆ : BalbcJ Wildtyp ♂♂

Gruppe ■ : BalbcJ Wildtyp ♀♀

Gruppe ▲ : BalbcJ TNFKO ♂♂

Gruppe ● : BalbcJ TNFKO ♀♀

Die aus diesen Gruppen resultierende Survival-Kurve ist in Abbildung 44 zu sehen.



Wildtyp ♂

Wildtyp ♀

TNF-KO ♂

TNF-KO ♀

Abbildung 43: L1C2 behandelte Mäuse im Vergleich von wildtyp und TNF-KO

Die Fotos zeigen die mit Tumorzellen (jeweils $2 \cdot 10^5$ L1C2) behandelten Mäuse im Vergleich von wildtyp BalbcJ zu TNF-*knockout* BalbcJ. Während makroskopisch bei den wildtyp Mäusen eindeutig Metastasen sichtbar sind, zeigen die TNF-*knockout* keinerlei Anzeichen einer Tumorbelastung.

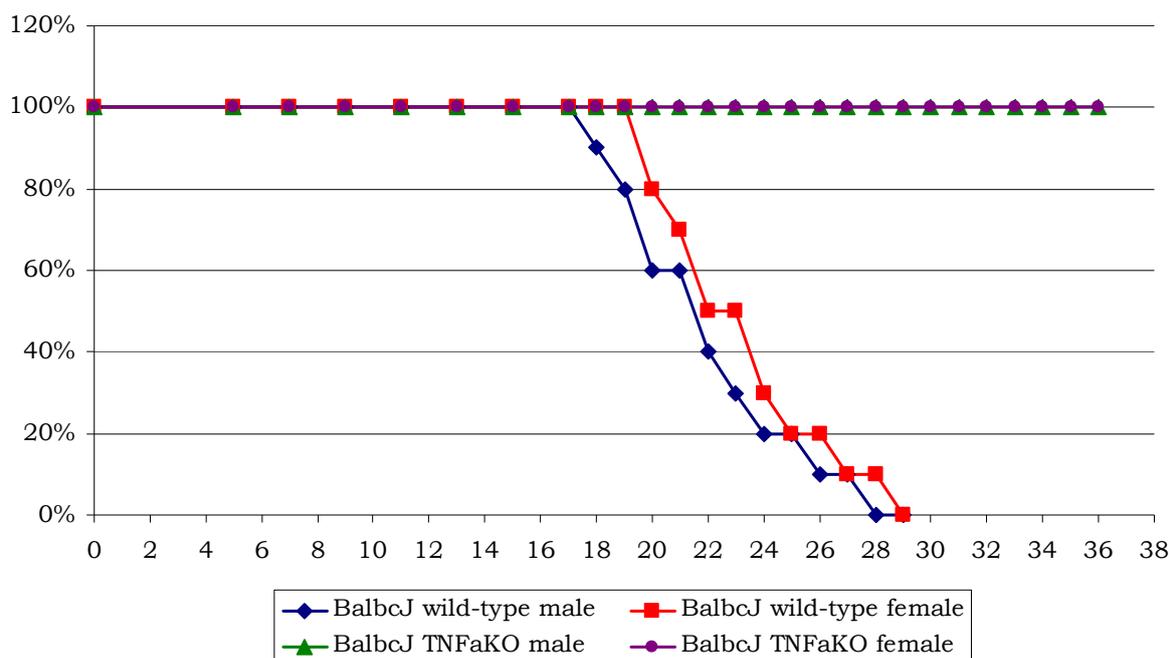


Abbildung 44: Survival Kurve des Tumormodells mit wildtyp und TNF-knockout Mäusen

An Tag Null wurden den Mäusen $2 \cdot 10^5$ L1C2 Tumorzellen intravenös appliziert. Die TNF *knock out* Mäuse zeigten keinerlei Tumorentwicklung bis mehrere Wochen nach Injektion der Zellen (n=10).

Wie in der Kurve klar ersichtlich ist, erliegen alle wildtyp Mäuse spätestens nach 29 Tagen dem L1C2 Tumor. Im Kontrast dazu zeigten die knockout Mäuse keinerlei Anzeichen einer Metastasierung, sowohl äußerlich als auch nach Sektion.

4.9.2 EXPRESSION VON AKTIVIERUNGSMARKERN

Die Anzahl an aktivierten Zellen gemessen an der Expression von CD25 ist in den Kontrollgruppen ohne Tumor im Vergleich von wildtyp und knockout unverändert. Daher ist anzunehmen, daß der knockout keinerlei Einfluß auf die grundlegende Population von CD4⁺CD25⁺ hat.

Im Vergleich dazu ist bei der Wildtyp Tumor Gruppe ein leichter Anstieg der CD4⁺CD25⁺ T Zellen zu verzeichnen. Die Tumor Knockout Gruppe allerdings weist einen signifikanten Rückgang dieser Population auf (Abbildung 45).

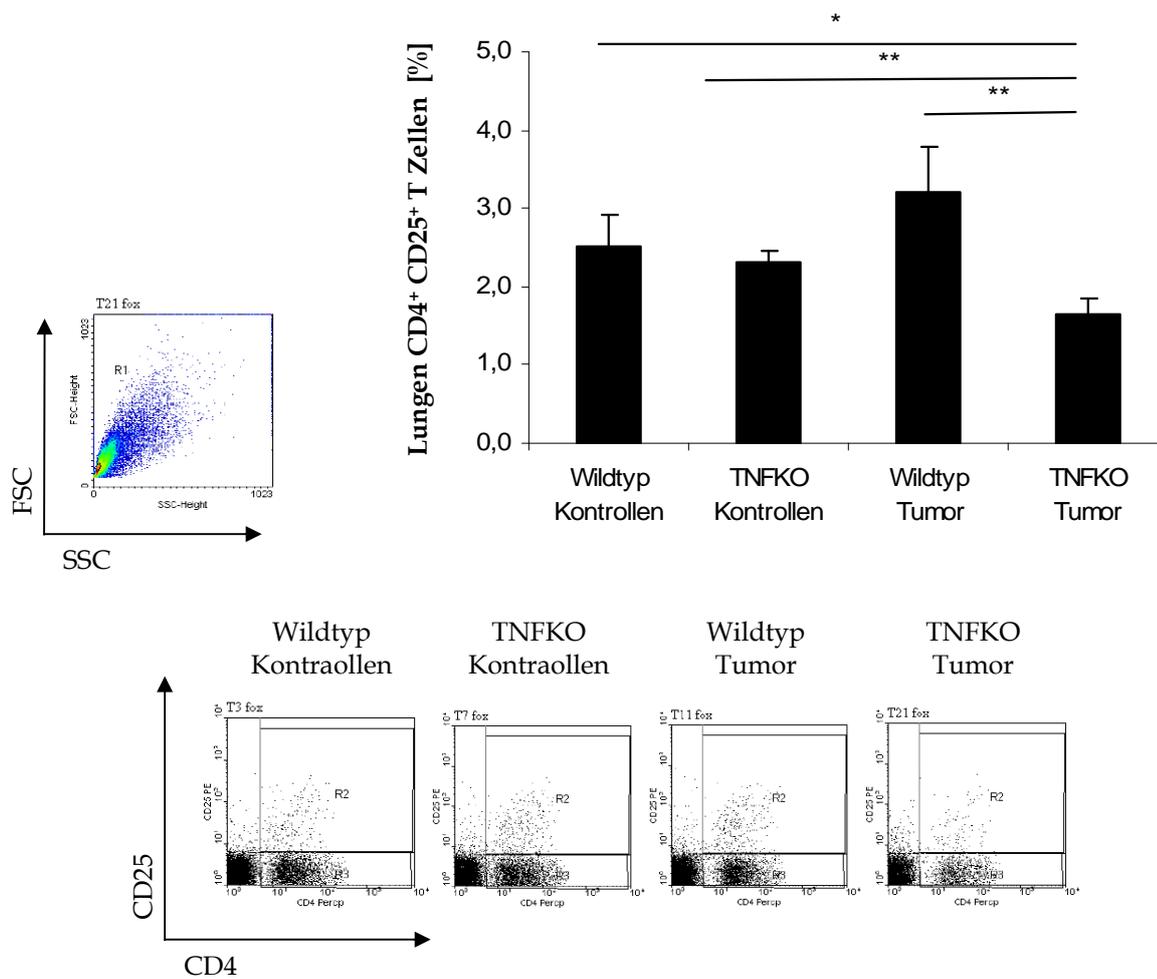


Abbildung 45: Expression von CD25 auf CD4⁺ T Zellen

Prozentualer Anteil von CD4⁺CD25⁺ T Zellen der Lymphozyten der Lunge. Die Messung erfolgte aus Gesamtzellen mit einem Gating auf Lymphozyten mit der

In Bezug auf die Expression von CD44 ist klar ersichtlich, daß im Vergleich von wildtyp und knockout in beiden Gruppen die knockouts signifikant weniger migrationsfähige Zellen aufweisen. Innerhalb der Gruppen bleibt die Expression unverändert (Abbildung 46).

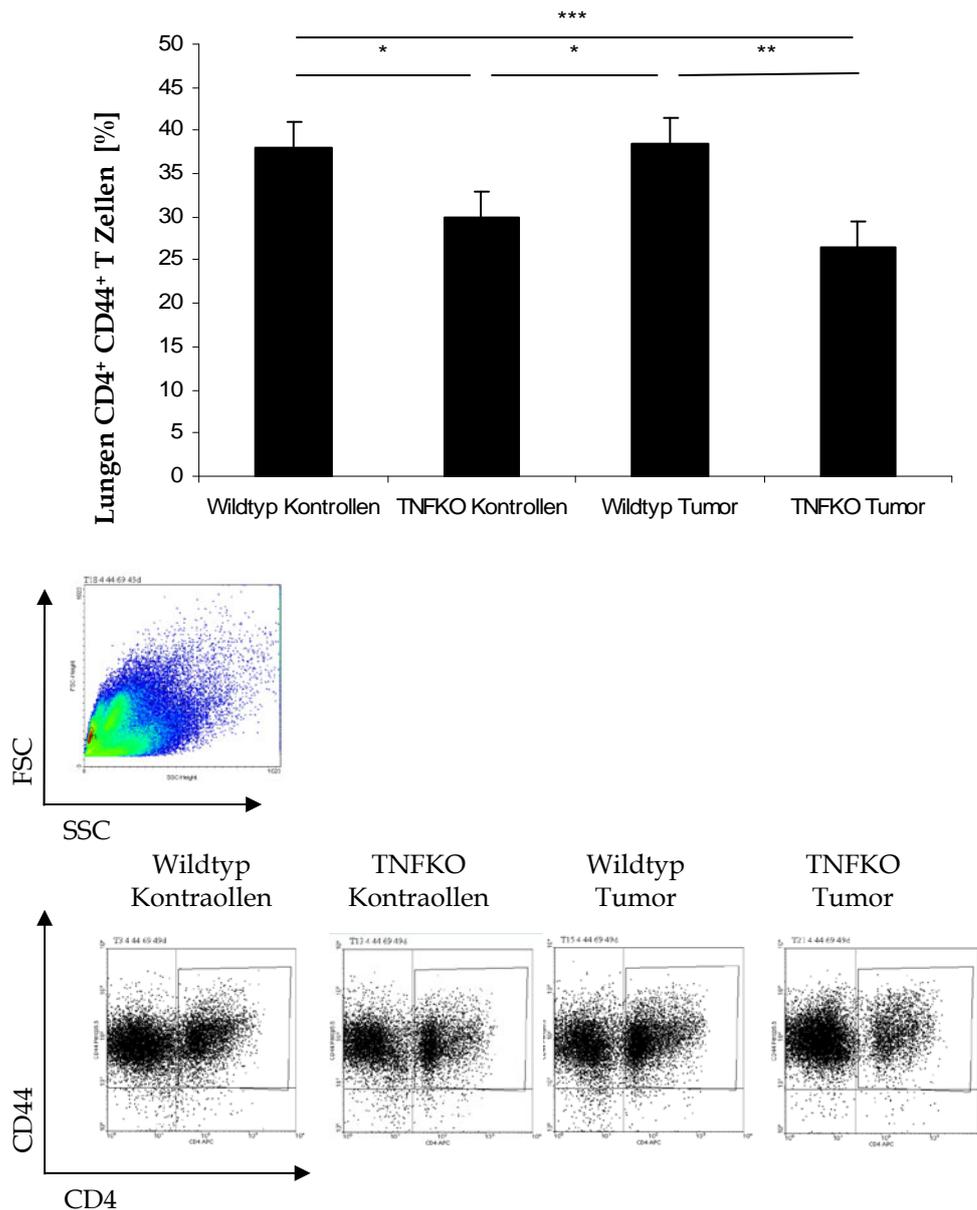


Abbildung 46: Expression von CD4 und CD44

4.9.3 PRODUKTION VON EFFEKTORZYTOKINEN

Zur Überprüfung der Effektorfunktion der isolierten CD4⁺ Zellen wurden entsprechend die Effektorzytokine TNF- α und INF- γ im ELISA gemessen.

Wie zu erwarten war, zeigen die aus TNF-Knockout Mäusen isolierten Zellen keinerlei TNF- α Produktion, während die wildtyp Zellen eine deutliche Menge dieses Zytokins aufweisen (Abbildung 47). Hierbei ist abermals festzustellen, daß die

intratumoralen wildtyp CD4⁺ T Zellen signifikant weniger TNF an das Medium abgeben, als die Kontrollen ohne Tumor.

In Bezug auf IFN- γ kehrt sich das Bild um (Abbildung 48). Während die Wildtypen sezernieren eine Menge von bis zu 900 pg/ml IFN- γ , wobei festzustellen ist, daß sich zwischen Kontrolle und Tumorgruppe kein großer Unterschied zeigt. Im Vergleich dazu verdreifacht sich die Menge an IFN- γ bei den knockout CD4⁺ T Zellen, steigt also signifikant an.

Die intratumoralen TNF-KO Zellen sezernieren wenig mehr IFN- γ , als die dazugehörigen Kontrollen.

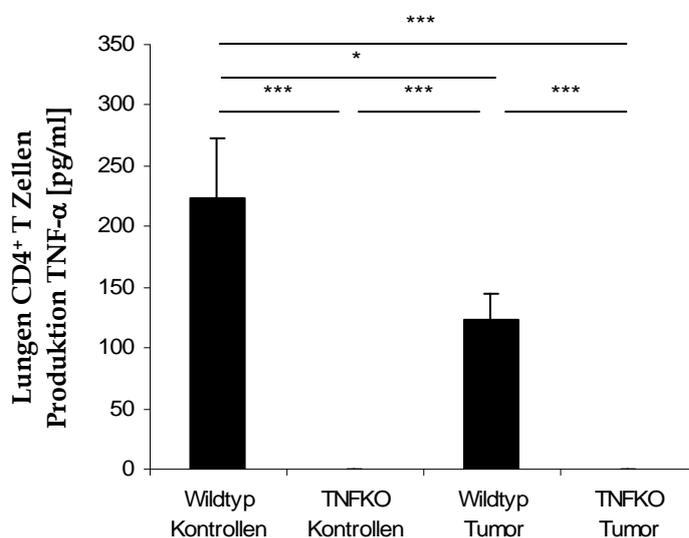


Abbildung 47: Produktion von TNF- α von CD4⁺ T Zellen aus wildtyp und TNF-KO Mäusen

Dargestellt ist die im ELISA gemessene Konzentration von TNF- α in Mediumüberständen von *in vitro* kultivierten CD4⁺ T Zellen in pg pro ml.

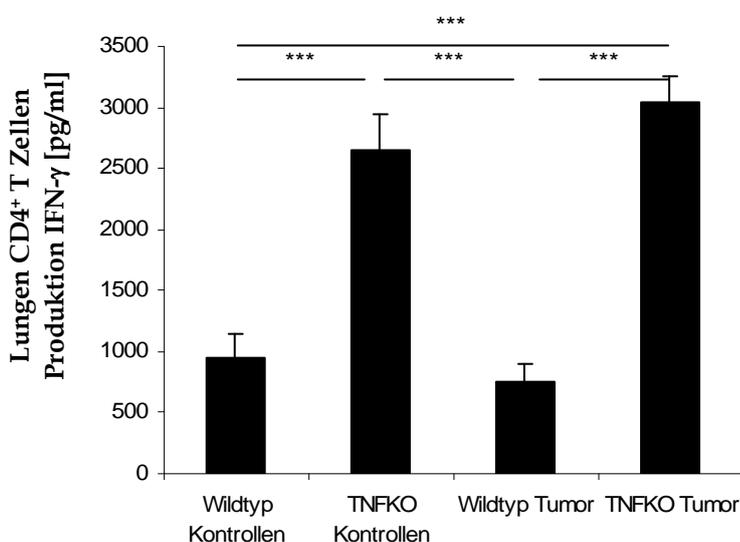


Abbildung 48: Produktion von Interferon- γ von CD4⁺ T Zellen aus wildtyp und TNF-KO Mäusen

Dargestellt ist im ELISA gemessene Konzentration von TNF- α in Mediumüberständen von *in vitro* kultivierten CD4⁺ T Zellen.

Der signifikante Rückgang der TNF- α Produktion bei den Wildtyp-Gruppen ist nach den in Kapitel 4.3.2 aufgeführten Ergebnissen zu erwarten. Ebenso das Fehlen jeglicher TNF- α bedingt durch das Knockout.

Allerdings ist an dieser Stelle die großen Mengen an IFN- γ bei den Knockouts interessant. Das Fehlen von TNF- α bewirkt also eine signifikante Erhöhung des Effektorzytokins IFN- γ , welches den Grund für die gute Abwehr des L1C2 Tumors darstellt.

4.9.4 EFFEKTORFUNKTION DER CD4⁺ T ZELLEN

Für die Überprüfung der Effektorfunktion *in vitro* wurde ein weiterer Apoptosetest durchgeführt, in dem kultivierte L1C2 Zellen mit aus den Mäusen isolierten CD4⁺ T Zellen inkubiert und die Apoptose der Tumorzellen gemessen wurde.

Bei der Apoptosemessung von L1C2 Zellen sind in bekannter Weise die Apoptoseraten der Testgruppen zu derjenigen der allein kultivierten L1C2 Zellen in Relation zu setzen.

Die aus wildtyp Mäusen isolierten Zellen zeigen in der Kontrollgruppe ohne Tumor eine signifikante Erhöhung der Apoptose in den L1C2 Zellen, wie es erwartet wurde (vergleiche Kapitel 4.5). Im Vergleich hierzu steigt die Apoptose signifikant für die naiven Zellen aus den TNFKO Mäusen.

Im Gegensatz zu den in Kapitel 4.5 dargestellten Ergebnissen zeigen die aus wildtyp Mäusen isolierten intratumoralen T Zellen durchaus eine Effektorfunktion, wenn diese auch im direkten Vergleich zu den naiven Kontrollen geringer ausfällt.

Doch auch die intratumoralen TNFKO CD4⁺ T Zellen erfüllen in gleichem Maße wie die naiven Zellen eine Effektorfunktion durch Induktion von Apoptose.

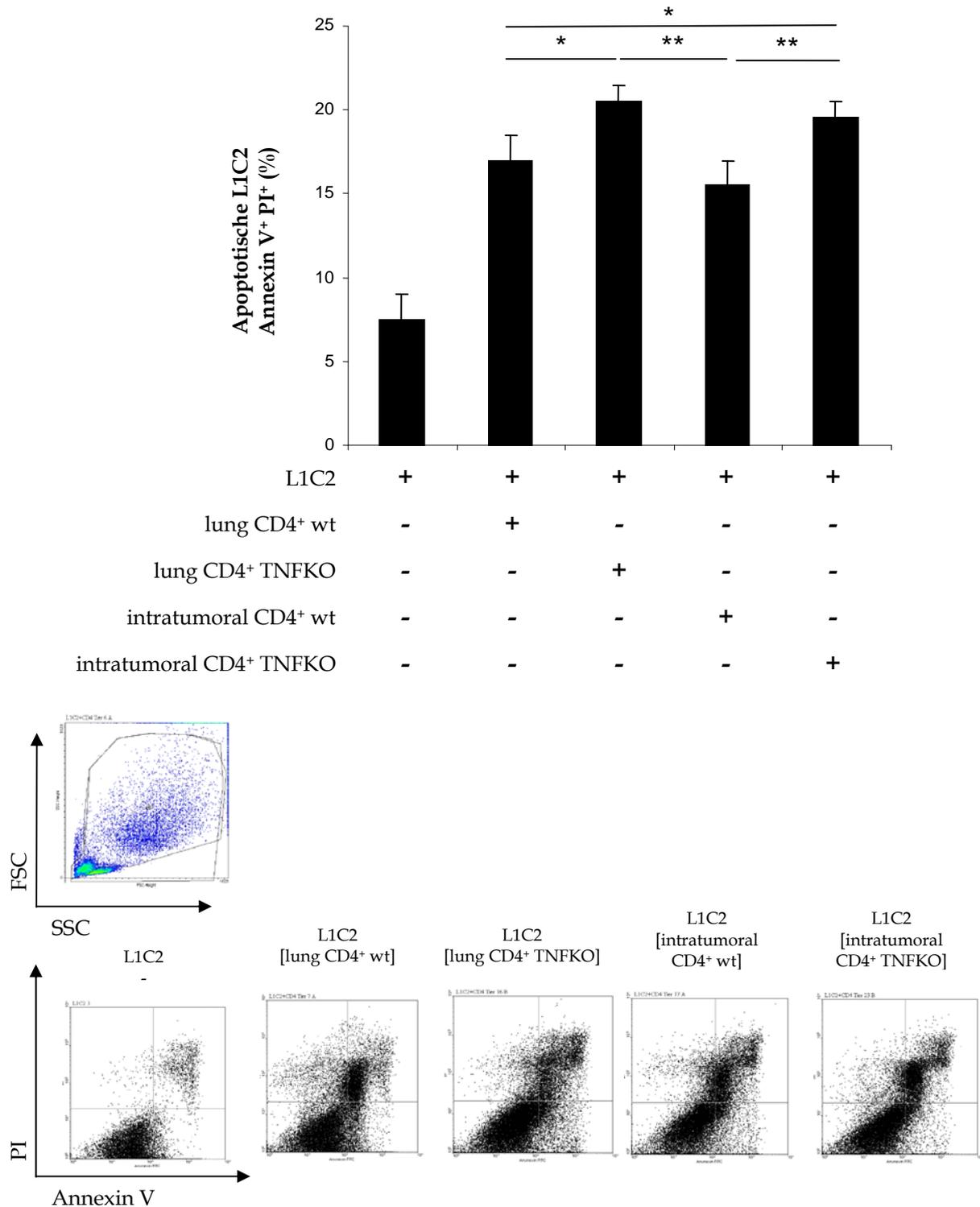


Abbildung 49: Effektorfunktion von wildtyp und TNF-KO CD4+ T Zellen

Gemessen wurde die Expression von Annexin V und die positive Färbung mit Propidiumiodid in den L1C2 Zellen, die mit aus Lungen isolierten CD4+ T Zellen für 20 Stunden koinkubiert wurden. Als Vergleich besteht der prozentuale Anteil an apoptotischen L1C2, die ohne Immunzellen inkubiert wurden. Die Apoptoseinduktion durch intratumorale T Zellen aus TNF-KO Mäusen liegt signifikant höher als diejenige der intratumoralen wildtyp T Zellen.

5 Diskussion

5.1 L1C2 Tumormodell

Eine prägnante Eigenschaft humaner Tumore ist der signifikante Anstieg der regulatorischen T Zellen im Tumorgewebe. Diese regulatorischen T Zellen schränken durch ihre Funktion die Wirkung der den Tumor bekämpfenden Immunzellen ein, so daß die Anwesenheit der T regs in indirekter Weise das Wachstum des Tumors unterstützt.

Erreicht der sich etablierende Tumor eine ausreichende Größe, können sich einzelne Zellen vom Primärtumor lösen und an anderen Stellen, zunächst im umliegenden Gewebe, später im gesamten Körper Metastasen bilden. Je weiter das Tumorstadium und die Metastasierung fortgeschritten sind, desto schlechter sind die Heilungsaussichten.

Um experimentell den Verlauf der Tumorentwicklung nachzustellen und immunologische Fragen beantworten zu können, sollte ein zu verwendendes Modell im Vergleich zum humanen Verlauf parallele Eigenschaften mitbringen.

Das in dieser Arbeit verwendete murine Adenokarzinommodell basiert auf der Tumorzelllinie L1C2. Die aus menschlichen Tumoren gewonnenen L1C2 Zellen [126] können mit einfachen Mitteln in einer Zellkultur gehalten werden und entwickeln nach intravenöser Applikation in Balb/c Mäusen Metastasen in der Lunge. Über die Anzahl der injizierten Zellen, sowie die Dauer der Inkubation in den Versuchstieren können unterschiedliche Tumorstadien nachvollzogen werden. Die verwendete Menge von $2 \cdot 10^5$ L1C2 Zellen und die Inkubationszeit von 21 Tagen entspricht einem späten Tumorstadium. Die Metastasierung ist zu diesem Zeitpunkt fortgeschritten, so daß Tumore in verschiedenen Organen und Geweben der Mäuse zu finden sind. Die experimentelle Isolation immunkompetenter Zellen ermöglicht eine Analyse der immunologischen Vorgänge im murinen Tumor.

In der vorliegenden Arbeit gilt den $CD4^+$ T Zellen ein besonderes Augenmerk. Zu dieser Population an Immunzellen gehören mit einem Anteil von circa fünf Prozent auch die regulatorischen T Zellen. Im Gegensatz zu den T Effektorzellen

exprimieren Regulatorische T Zellen konstitutiv die α -Kette des IL-2 Rezeptorkomplexes (CD25), welches sonst nur nach Aktivierung einer Immunzelle auf der Zelloberfläche vorliegt. Weiterhin werden Regulatorische T Zellen durch die Expression des Transskriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert.

Das Oberflächenmolekül CD25 bildet zusammen mit CD122 und CD132 den hochaffinen Rezeptorkomplex für das Zytokin Interleukin-2. Interleukin-2 fungiert als Regulator bei immunologischen Vorgängen und ist unter anderem für die Aktivierung von T Zellen, damit einhergehend die Ausschüttung von Zytokinen und den Fortbestand der Population während der Immunreaktion zuständig.

In Bezug auf intratumorale immunologische Vorgänge ist Interleukin-2 als Stimulator sowohl der Effektorzellen, als auch der Regulatorischen T Zellen von großer Wichtigkeit, da es als regulatorisches Zytokin in das Wechselspiel zwischen Tumorabwehr durch die Effektoren und der inhibierenden Wirkung der Regulatoren eingreift.

Aktivierte Effektorzellen der CD4⁺ Population sezernieren Zytokine wie Tumor Nekrosis-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) (vergleiche Kapitel 1.12.6 und 1.13).

TNF- α , welches ursprünglich als wichtiges Zytokin bei der Abwehr von Bakterien entdeckt wurde, besitzt in verschiedenen Tumormodellen eine zum Teil entgegenbesetzte Wirkung, je nach Therapie als *Bolus* (hohe Dosis - einmalig positiv) oder auch als fortdauernde *low-dose* Therapie (negativ). Während es bereits als Therapeutikum zur Abwehr eines Tumors eingesetzt wird, scheint TNF in anderen Zusammenhängen das Wachstum des Tumors eher zu begünstigen [118]. Wie offensichtlich ist, muß im Zusammenhang mit der Tumorabwehr TNF- α eine ambivalente Rolle zugeordnet werden, die stark von Verabreichungsart und -dosis abhängig zu sein scheint.

Letzten Endes steht und fällt die immunologische Abwehr eines Tumors mit der Kontrolle der Regulatorischen T Zellen über die Effektorzellen. Die Balance zwischen Regulatorischen und Effektor T Zellen wird stark durch die Anwesenheit, beziehungsweise die Menge an Interleukin-2 beeinflusst.

So ist bekannt, daß schon geringe Dosen von IL-2 die Funktion der effektorischen T Zellen durch Förderung deren Proliferation unterstützen, während höhere Dosen an IL-2 den Regulatorischen T Zellen durch deren höhere Sensivität, vermittelte über CD25, einen Vorteil verschaffen [127].

Warum jedoch die Anzahl der Regulatorischen T Zellen im Tumor gerade in den fortgeschritten Stadien erhöht ist, bleibt unklar.

5.2 Applikation von anti-CD25

Eine weitverbreitete Charakterisierung für Regulatorische T Zellen ist die konstitutive Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors CD25 und des Transkriptionsfaktors FoxP3 (vergleiche Kapitel 1.8.5).

Eine *in vivo* Depletion dieser Zellen ist mit unterschiedlichen experimentellen Methoden zu erreichen. Eine sehr einfache und kostengünstige Methode besteht in der Applikation von neutralisierenden Antikörpern, die an das gewünschte Oberflächenmolekül binden und es dadurch in seiner Funktion behindern oder vollständig beeinträchtigen.

Da im vorliegenden Adenokarzinommodell festgestellt werden konnte, daß auch die CD4⁺CD25⁻ T Zellen Effektorzytokine, im Speziellen TNF- α , ausschütten und *in vitro* Apoptose in L1C2 Tumorzellen induzieren können, wurde das Modell um die Applikation von PC61 erweitert. PC61 bindet kovalent an CD25 und blockiert vollständig dessen Funktion, eine Interaktion mit dem Dimer aus CD122 und CD132 zur Bildung des hochaffinen IL-2 Rezeptors ist nicht mehr möglich (vergleiche Kapitel 1.11). Derart beeinflusste Zellen können kein starkes Überlebenssignal durch IL-2 mehr erfahren und aktivieren den Apoptosesignalweg.

Die Applikation des Antikörpers PC61 erfolgte intra nasal, um eine direkte Wirkung auf die CD25 exprimierenden T Zellen in der Lunge zu erhalten. Als Zeitpunkte der Verabreichung wurde der Tag 7 und Tag 14 gewählt, um eine gleichmäßige Depletion der CD25 exprimierenden Zellen während der Inkubationsphase in der Lunge zu erreichen.

Die an Tag 21 isolierten T Zellen enthielten jedoch für alle Tumorgruppen einen signifikant erhöhten Anteil an Regulatorischen T Zellen. Die Behandlung der Mäuse mit PC61 hatte also nicht den gewünschten Effekt der Treg Depletion, zumindest was die späte Phase der Inkubationszeit angeht.

Wenn man jedoch davon ausgeht, daß zumindest nach den Zeitpunkten der PC61 Applikation die CD25 exprimierenden T Zellen inklusive der Regulatorischen T Zellen depletiert worden sind, müßte die Tumorbelastung geringer sein, wenn die CD25 negativen Zellen wie *in vitro* gezeigt Effektorfunktionen ausüben. Doch auch die Tumorbelastung insgesamt bleibt in den Tumorgruppen gleich, wie in den pathologischen Analysen zu sehen ist.

Die effektorische Funktion der CD4⁺CD25⁻ T Zellen reicht also nicht aus, um den Tumor effektiv zu bekämpfen. Dies legt nahe, daß die aktivierten und damit CD25 exprimierenden Effektorzellen in Zusammenarbeit mit den CD25 negativen Zellen eine effektivere Abwehr gewährleisten würden, wenn nicht der erhöhte Anteil an Regulatorischen T Zellen dieses behindern würde.

Die Problematik in der Verwendung von PC61 liegt anscheinend darin, daß neben den Regulatorischen T Zellen auch die aktivierten und damit CD25 exprimierenden Effektor T Zellen durch PC61 depletiert werden, auch wenn ohne PC61 aus noch zu untersuchenden Gründen der Tumor nicht abgewehrt wird.

Ein Tiermodell, bei dem die Regulatorischen T Zellen vollständig depletiert sind, stand leider nicht zur Verfügung. Solche sogenannten *scurfy* Mäuse, bei denen FoxP3 mutiert wurde, sterben bereits früh, da sie in ihrer Entwicklung eine CD4⁺ T

Effektorzell-Überpopulation entwickeln und es somit zu chronischen und auch letalen Autoimmunerkrankungen kommt [128, 129].

5.3 Applikation von Interleukin-2

Die Alternative zur Depletion der CD25⁺ Zellen mittels eines neutralisierenden Antikörper wäre eine Stimulation der aktivierten T Effektorzellen durch das Zytokin Interleukin-2. Wie oben bereits erwähnt, exprimieren T Effektorzellen nach Aktivierung den vollständigen Rezeptor für dieses Zytokin, um somit ein starkes IL-2 Signal zu erhalten, welches das Überleben und die Funktionstüchtigkeit der Zellen bewerkstelligt.

Auch hier besteht wieder die Schwierigkeit, daß nicht nur die T Effektorzellen, sondern auch die Regulatorischen T Zellen über den hochaffinen IL-2 Rezeptorkomplex verfügen und ebenfalls auf eine Stimulation mit diesem Zytokin ansprechen.

In dieser Hinsicht ist es wichtig zu berücksichtigen, daß unterschiedliche Dosen von *in vivo* zu applizierendem rekombinantem Interleukin-2 verschiedene Populationen von T Zellen unterstützen. Wie bereits erwähnt ist bekannt, daß geringe Dosen an IL-2 die T Effektorzellen stimulieren, während höhere Dosen (10 ng/ml, beziehungsweise 100 ng/ml) eher die Regulatorischen T Zellen begünstigen.

Um die Wirkung von rekombinantem Interleukin-2 auf intratumorale Immunzellen zu überprüfen, wurde das L1C2 Adenokarzinommodell um die Applikation verschiedener Dosen Interleukin-2 erweitert (siehe Kapitel 4.8).

Für die hier durchgeführten Experimente wurden Dosen von 40 und 200 ng gewählt. Wie sich bereits in den pathologischen Gewebefärbungen zeigte, führt die geringere Dosis von 40 ng bei zweifacher Injektion an Tag 7 und 14 zu einer erhöhten Tumorblastung in den auf diese Weise behandelten Versuchstieren. Zwar sind die Regulatorischen T Zellen signifikant erhöht, jedoch unterscheidet sich die Erhöhung

nicht von derjenigen der mit der hohen Dosis behandelten Tiere. Dennoch weisen die Ergebnisse tendentiell darauf hin, daß die Dosis von 40 ng gemessen an den pathologischen Befunden die Funktion der Regulatorischen T Zellen unterstützt, weil die Tumorbelastung ansteigt und der Versuch einer tumorreduzierenden Therapie auf diese Weise nicht zu erreichen ist.

Die höhere Dosis von 200 ng, die ebenfalls jeweils an den Tagen 7 und 14 intranasal appliziert wurden, zeigt eine pathologisch ähnliche Tumorbelastung wie die Tumorkontrollen.

In Bezug auf die Expression von Oberflächenmolekülen ist bei beiden Dosen eine signifikante Reduktion der Aktivierungsmarker CD44 und CD127 im Vergleich zu der tumorfreien Kontrollgruppe festzustellen.

Bei Betrachtung der drei Tumorgruppen ist anzumerken, daß die Expression von CD127 nach Gabe der hohen Dosis gegenüber den Tumorkontrollen signifikant ansteigt, jedoch nicht die Expression der naiven Kontrollen erreicht. Das Interleukin-2 steigert also in der höheren Dosis die Bildung, beziehungsweise den Fortbestand von Gedächtniszellen in Adenocarcinoma.

Die Zytokinproduktion ist für die Tumorgruppen für Interferon- γ und TNF- α signifikant reduziert. Allerdings ist es möglich, durch die Stimulation mit Interleukin-2 die IFN- γ Produktion im Vergleich zu der Tumorkontrollgruppe signifikant zu erhöhen, wenn auch nur ein Viertel der Menge der naiven CD4⁺ T Zellen erreicht wird.

Es ist in allen Experimenten offensichtlich, daß die Anwesenheit des Tumors eine signifikante Reduktion der Effektorzytokine mit sich zieht. Durch die Stimulation mit Interleukin-2 allerdings wird die effektorische Funktion gemessen an der erhöhten Produktion von Interferon- γ gefördert. Für TNF- α ist nur eine Tendenz dahingehend festzustellen.

In Zusammenfassung kann festgestellt werden, daß entsprechend der Erwartungen geringe Dosen von Interleukin-2 das Tumorwachstum unterstützen, vermutlich durch Stimulation der Regulatorischen T Zellen.

Wird die applizierte Menge erhöht, wird die Effektorfunktion der entsprechenden T Zellen unterstützt und die Tumorlast im Gegensatz zur geringen Dosis reduziert. Allerdings reichten die gewählten Dosen nicht dazu aus, die Effektorfunktion derart zu erhöhen, daß sich eine effektive Tumorbekämpfung eingestellt hat.

Was aber an den vorliegenden Ergebnissen deutlich wird, ist der Zusammenhang von Tumorwachstum und des von den CD4⁺ T Zellen produzierte TNF- α . Die höhere Dosis des Zytokins IL-2 bewirkt eine leichte Erhöhung der Effektorzytokine. Die geringe Dosis zieht jedoch eine weitaus höhere Steigerung gerade des Zytokins TNF- α nach sich. In Zusammenhang mit der in diesen Tieren zu messenden höheren Tumorbelastung wirft es die Frage auf, ob hier TNF wirklich als Effektorzytokin zu sehen ist.

Da zwei Rezeptoren für TNF bekannt sind, die unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren, die nicht nur die Zelle zur Apoptose bringen können, sondern durchaus ein Überlebenssignal bereitstellen können (vergleiche Kapitel 1.12), sollte der Effekt des zum Teil erhöht ausgeschütteten TNF- α untersucht werden.

Sollte das im Modell zu messende TNF- α eine apoptoseinduzierende Wirkung vermitteln, müßte ein Weg gefunden werden, dieses zur Unterstützung der Tumorabwehr durch Stimulanzien der TNF Rezeptor I induzierten Apoptose zu erhöhen. Im anderen Fall, sprich als Vermittler von Überlebenssignalen, müßte das Modell um eine TNF- α neutralisierende Methode erweitert werden.

5.4 Verwendung von TNF- α -KO Mäusen

Das Zytokin Tumor Nekrosis Faktor alpha wurde ursprünglich dadurch entdeckt, als daß es als Faktor für die Induktion von Apoptose in Zielzellen verantwortlich gemacht wurde. Wie bei vielen anderen Zytokinen auch, geht aber die tatsächliche

Rolle weit über diese primär identifizierte Funktion hinaus, da unterschiedliche Dosen und verschiedene Rezeptormoleküle eine teils entgegengesetzte Wirkung auf die Zielzelle haben können.

Neben der Induktion von Apoptose gibt es für TNF- α noch einen Signalweg über den TNFRII, der leider noch nicht ganz verstanden wurde, aber wohl mit Überlebenssignalen zusammenhängt.

In dem verwendeten L1C2 Adenokarzinommodell ist in den Tumorkontrollgruppen im Vergleich zu den naiven Tieren eine signifikante Reduktion von TNF- α festzustellen. In Anbetracht der grundlegenden und namensgebenden Funktion wurde dies zunächst als ein nachteiliger Effekt angesehen. Eine Erhöhung wäre demnach wünschenswert gewesen, um den sich entwickelnden Tumor wirksam bekämpfen zu können.

Weiterhin zeigten die Experimente, daß die Produzenten des TNF- α nicht zu den, gemessen an der Expression von CD25 als entsprechender Marker, aktivierten T Effektorzellen gehörten, sondern in der Population der CD4⁺CD25⁻ T Zellen zu finden sind. Die Effektorfunktion, die über TNF vermittelt werden sollte, reichte jedoch nicht aus, um eine Tumorreduktion zu erhalten, selbst wenn während der Inkubationsphase durch neutralisierende Antikörper CD25 positiven T Zellen depletiert werden.

Unter Einbeziehung desjenigen Signalweges, der über TNFRII ein Überlebenssignal vermitteln kann, würde die Reduktion der TNF- α Ausschüttung im L1C2 Adenokarzinommodell eher die Tumorablewehr unterstützen, als neben anderen Faktoren den Tumor zu schädigen.

Bei vollständiger Elimination von TNF in den Versuchstieren durch Verwendung einer TNF-knockout Maus wird die Funktion dieses Zytokins in dem verwendeten Modell sichtbar.

Die mit L1C2 behandelten TNF-knockout-Mäuse zeigten keinerlei Anzeichen einer Tumorentwicklung. Bei Überprüfung der Funktionalität der CD4⁺ T Zellen konnte gezeigt werden, daß bei Verlust jeglicher TNF- α Produktion eine weitaus höhere Sezernierung von Interferon- γ erreicht werden kann, was die effektive Tumorabwehr erklären kann.

Sind auch Makrophagen an dieser Abwehr beteiligt, könnte dies auch heißen, daß der Mangel an TNF- α bedeutet, daß diese ihre phagozytierende Funktion eventuell noch durch eine Erhöhung der Relation von IFN- γ und TNF- α um einiges zu steigern in der Lage sind. Das würde auch die Elimination des Tumors zur Folge haben, da apoptotische Zellen durch Phagozytose zum Beispiel durch Makrophagen entsprechend entfernt werden.

Diese Vermutung wird ebenfalls durch eine Apoptosemessung unterstützt. Hier konnte gezeigt werden, daß die aus TNF-KO-Mäusen isolierten CD4⁺ T Zellen eine signifikant höhere Funktionalität gemessen an der Apoptoseinduktion in den L1C2 Tumorzellen besitzen.

In Zusammenfassung deuten die Ergebnisse darauf hin, daß TNF- α in dem vorliegenden Adenokarzinommodell vermutlich eher die Funktion erfüllt, als Stimulus oder zumindest als Unterstützung des Fortbestands des Tumors zu gelten. Alle Versuchstiere eines TNF-knockout-Stammes zeigten im L1C2 Adenokarzinommodell keinerlei Anzeichen einer Tumorentwicklung.

Ein Effektorzytokin, welchem hier eine besondere Rolle zugeordnet werden muß, ist Interferon- γ . Bei den aus wildtyp Mäusen isolierten CD4⁺ T Zellen war in Zusammenhang mit einer Tumorbelastung eine signifikant reduzierte IFN- γ Produktion festzustellen, während die CD4⁺ T Zellen aus naiven, also nicht mit Tumor behandelten Mäusen nach Stimulation eine deutliche Menge IFN- γ sezernieren. Diejenigen CD4⁺ T Zellen jedoch, die aus TNF-knockout-Mäusen isoliert wurden, zeigten sowohl ohne, als auch mit Tumorbehandlung eine signifikant, teilweise vierfach höhere Produktion von IFN- γ im Vergleich zu naiven wildtyp CD4⁺ T Zellen.

Die Abwehr des Tumors ist möglicherweise auf diese hohe Produktion von IFN- γ zurückzuführen.

5.5 Therapiemöglichkeiten

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Therapiemöglichkeiten in einem murinen Adenokarzinommodell überprüft. Die Behandlung mit anti-CD25 Antikörpern zur Deletion der in einem etablierten Tumor erhöhten CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatorischen T Zellen war ineffektiv, da durch die neutralisierenden Antikörper ebenfalls die aktivierten T Effektorzellen reduziert werden.

Im Kontrast dazu zeigten die Applikation von unterschiedlichen Dosen Interleukin-2 zur Stimulation der aktivierten T Zellen einen ambivalenten Charakter. In keiner der Dosierungen war eine Tumorregression zu erreichen, da IL-2 sowohl die Regulatorischen T Zellen, als auch die T Effektorzellen stimuliert.

Allerdings ist mit Deletion, sprich vollständiger Abwesenheit von Tumor Nekrosis Faktor α ein kurativer Effekt zu verzeichnen. TNF- α scheint in dem vorliegenden Modell nicht als Effektorzytokin zur Induktion von Apoptose in den Tumorzellen zu fungieren, sondern über die alternativen Signalwege das Wachstum des Tumors zu unterstützen.

5.6 Perspektiven

Die oben stehenden Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, daß TNF- α im Rahmen des L1C2 Adenokarzinommodells eine neue Funktion zugewiesen werden muß. Zur Überprüfung des negativen Effekts auf die Tumorabwehr wurden in der vorliegenden Arbeit TNF-knockout-Mäuse verwendet. Um einen genaueren Einblick in die tatsächliche Funktion von TNF- α zu bekommen, sollte neben den Tumor-KO-Mäusen auch eine Behandlung von wildtyp Mäusen mit TNF-neutralisierenden Antikörpern in Betracht gezogen werden. Dabei kann herausgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt eine anti-TNF Behandlung anzuwenden ist, ob der Antikörper

systemisch oder lokal verabreicht werden kann und welche Dosierung gewählt werden muß.

Weiterhin könnte eine solche Therapie, welche auf der Neutralisierung von TNF basiert, durch eine Stimulation der T Effektorzellen durch gleichzeitige Applikation von Interleukin-2 erweitert werden.

Zusammenfassung

Die Ursachen für die Entstehung von Lungentumoren sind vielseitig. Aus geschädigtem Drüsengewebe der Lunge kann sich die Tumorart des Adenokarzinoms entwickeln, welches zu den malignen Tumoren gehört und nach Etablierung eines Primärtumors metastasieren kann.

Es konnte vielfach gezeigt werden, daß das Immunsystem bei der Bekämpfung des mutierten Gewebes im fortschreitenden Verlauf des Tumorwachstums an Effektivität verliert. Wenn die Mechanismen auch noch nicht ganz verstanden sind, ist eine fehlerhafte Regulation der Immunabwehr eine mögliche Ursache.

Das Zytokin, welches bei dieser Regulation eine wichtige Rolle spielt, ist das Interleukin-2, welches immunkompetente Zellen aktiviert und deren Fortbestand während der Immunreaktion gewährleistet.

Die alpha-Kette des IL-2 Rezeptorkomplexes CD25 ist ein gängiger Marker für die Population der so genannten regulatorischen T Zellen. Regulatorische T Zellen treten in Tumorgeweben in erhöhtem Maße auf und inhibieren die gegen den Tumor gerichteten Effektoreigenschaften anderer Immunzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem murinen Bronchioadenokarzinommodell gezeigt werden, daß sowohl die Behandlung mit dem anti-CD25 Antikörpern, als auch Stimulation der T Zell Populationen nach Applikation von IL-2 keine Verbesserung der Tumorabwehr zu erreichen ist.

Jedoch wurde ersichtlich, daß neben Interleukin-2 dem Zytokin TNF-alpha eine besondere Position zugeordnet werden muß. Es ist bekannt, daß TNF-alpha in verschiedenen experimentellen Tumor-Modellen unterschiedliche Funktionen besitzt. Eine Deletion des TNFs, hier dargestellt mittels TNF-knockout Mäusen, zeigte eindeutig eine kurative Wirkung.

Als Therapieansatz wäre im nächsten Schritt eine anti-TNF Behandlung durch Applikation neutralisierender Antikörper zu empfehlen, gegebenenfalls in Kombination mit rekombinantem Interleukin-2 zur Stimulation T Effektor-Immunzellen.

Abkürzungsverzeichnis

α -	Anti-	
AK	Antikörper	
APC	<i>Antigen presenting cell</i>	Zelltyp
Aqua dest.	Aqua destillata	Destilliertes Wasser
BAL	Broncho-alveoläre lavage	Lungenspülung
BALF	Broncho-alveoläre lavage fluid	
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	Rinderserum
CD	<i>cluster of differenciation</i>	Zelloberflächenmarker
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	PCR Produkt
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>	Zelltyp
DC	Dentritic cell	Zelltyp
DD	<i>death domain</i>	cytoplasmatisches Motif eines Zelloberflächenproteins, aktiviert Apoptosekaskade
DNA	Desoxyribonukleinacid	
ELISA	Enzyme linked immuno sorbend Assay	Experimentelle Methode
Et al.	Et alteri	Lat. „und andere“
FACS	Fluorescence activated cell scan/sorting	Experimentelle Methode
FADD	<i>Fas receptor associated death domain</i>	cytoplasmatisches Motif eines Zelloberflächenproteins, aktiviert Apoptosekaskade
FCS	Fetal calf serum	
Foxp3	Forkhead box protein 3	Transkriptionsfaktor
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor-related	Oberflächenmarker
i.p.	Intraperitoneal	Injektion in den Bauchraum
i.v.	Intravenous	Injektion in die Vene

IFN	<i>interferon</i>	Effektorzytokin
IFN	Interferon	Effektorzytokin
Ig	Immunglobulin	
IL	<i>interleukin</i>	Interleukin (Botenstoff)
IL	Interleukin	Zytokin
KO	Knockout	
MACS	Magnetic activated cell sorting	Experimentelle Methode
MHC	Major histocompatibility complex	Zelloberflächenprotein
mRNA	Messenger RNA	
n.s.	Nicht signifiant	
P	Irrtumswahrscheinlichkeit	
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Experimentelle Methode
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	Physiologische Kochsalzlösung
RNA	Ribonukleinsäure	
RT	Reverse transscriptase	Enzym
RT	Raumtemperatur	
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Transkriptionsfaktor
TCT	T cell receptor	Zelloberflächenmarker
TGF- β	Transforming growth factor β	Zytokin
Th	T - Helferzellen	Zelltyp
Th1	<i>T helper cell type 1</i>	Zelltyp
TIL	<i>Tumor infiltrating lymphocyte</i>	Zelltyp
TNF	<i>tumor necosis factor</i>	Effektorzytokin
TRADD	<i>TNF receptor associated death domain</i>	cytoplasmatisches Motif eines Zelloberflächenproteins, aktiviert Apoptosekaskade
Treg	Regulatorische T Zelle	Zelltyp
Wt	wildtyp	Genotyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phagozytose und Degradierung eines Pathogens durch eine APC	11
Abbildung 2: Interaktion von T Zelle und APCs.....	12
Abbildung 3: Anatomie der Lunge.....	14
Abbildung 4: CHR und γ c - Rezeptorkomplexe	33
Abbildung 5: Strukturelle Eigenschaften des Interleukins 2	36
Abbildung 6: Der IL-2 Rezeptorkomplex	37
Abbildung 7: TNF-Rezeptor	41
Abbildung 8: Der TNF Signalweg.....	43
Abbildung 9: Signalweg des Tumornekrosinfaktor α	44
Abbildung 10: Design des murinen Adenokarzinoma Modells.....	58
Abbildung 11: Prinzip der Zellisolation nach Dynal [®]	64
Abbildung 12: Prinzip der MACS Zellisolation.....	65
Abbildung 13: Gating von Lymphozyten und Darstellung im Density Blot	67
Abbildung 14: Prinzip der Apoptose Färbung	69
Abbildung 15: Prinzip des Sandwich-ELISA	72
Abbildung 16: Nachweis der Spezifität des PC61 Antikörpers.....	78
Abbildung 17: Prinzip der SDS-PAGE Gelelektrophorese (Bild: http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html)	80
Abbildung 18: Schema des murinen Adenokarzinom Modells	82
Abbildung 19: Histologische Färbung von Lungengewebeschnitten.....	84
Abbildung 20: Expression des Aktivierungsmarkers CD69	85
Abbildung 21: Expression der IL-7 Rezeptor α -Kette	86
Abbildung 22: Expression des Markers CD44	88
Abbildung 23: Expression von CD25 ⁺ und FoxP3 ⁺ in CD4 ⁺ Zellen.....	90
Abbildung 24: Produktion von Interferon γ von CD4 ⁺ aus naiven und tumorbehandelten Tieren.....	91
Abbildung 25: Produktion von TNF- α von CD4 ⁺ T Zellen aus naiven und tumorbehandelten Tieren.....	92
Abbildung 26: Produktion von TNF- α von CD4 ⁺ CD25 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T Zellen....	94
Abbildung 27: Apoptose von L1C2 Zellen in Kokultur mit isolierten CD4 ⁺ T Zellen an Tag 10.....	96
Abbildung 28: <i>in vitro</i> Apoptose-induktion bei L1C2 Zellen in Kokultur mit T Zellen der Lunge.....	98
Abbildung 29: Modifikation des murinen Adenokarzinoma Modells mit IL-2 oder anti-CD25 Gabe.....	99
Abbildung 30: Tumorquantifizierung Adenokarzinoma Modell nach Applikation von PC61	100
Abbildung 31: Anzahl von T regulatorischen Zellen nach Applikation von PC61...	101
Abbildung 32: Expression der Aktivierungsmarker CD127	102
Abbildung 33: Expression des Aktivierungsmarkers CD44	103

Abbildung 34: Produktion von TNF- α von CD4 ⁺ T Zellen nach Behandlung mit PC16	105
Abbildung 35: Produktion von Interferon- γ von CD4 ⁺ nach Behandlung mit PC61	105
Abbildung 36: Expression von phospho-STAT5 und β -Aktin im Westerblot nach i.n. Applikation von Interleukin 2	107
Abbildung 37: Tumorfläche in Prozent der Gesamtfläche nach i.n. Gabe von rIL-2 (40ng/200ng).....	108
Abbildung 38: Regulatorische T Zellen nach intranasaler Behandlung mit rIL-2.....	109
Abbildung 39: Expression der IL-7Rezeptor α -Kette auf CD4 ⁺ T Zellen.....	110
Abbildung 40: Expression von CD44	111
Abbildung 41: Produktion von IFN- γ und TNF- α von CD4 ⁺ T Zellen.....	112
Abbildung 42: Produktion des Effektorzytokins TNF- α nach Stimulation mit IL-2.	112
Abbildung 43: L1C2 behandelte Mäuse im Vergleich von wildtyp und TNF-KO....	114
Abbildung 44: Survival Kurve des Tumormodells mit wildtyp und TNF-knockout Mäusen.....	115
Abbildung 45: Expression von CD25 auf CD4 ⁺ T Zellen.....	116
Abbildung 46: Expression von CD4 und CD44	117
Abbildung 47: Produktion von TNF- α von CD4 ⁺ T Zellen aus wildtyp und TNF-KO Mäusen.....	118
Abbildung 48: Produktion von Interferon- γ von CD4 ⁺ T Zellen aus wildtyp und TNF-KO Mäusen.....	118
Abbildung 49: Effektorfunktion von wildtyp und TNF-KO CD4 ⁺ T Zellen	120

Literaturverzeichnis

1. Janeway CA, Medzhitov R, *Innate Immune Recognition*, Annu Rev Immunol 20:197-216, 2002
2. Medzhitov R, Janeway CA Jr., *Innate Immune recognition and control of adaptive immune responses*, Immunology, Vol. 10, pp 351-353, 1998
3. Williams MA, Bevan MJ, *Effector and memory CTL differentiation*, Annu Rev Immunol. 2007; 25:171-92.
4. Kaech SM, Wherry EJ, *Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection*, Immunity. 2007 Sep; 27(3):393-405.
5. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J, *T cell fitness determined by signal strength*, Nat Immunol. 2003 Apr;4(4):355-60. Epub 2003 Mar 17.
6. Lanzavecchia A, Sallusto F., *Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response*, Nat Rev Immunol. 2002 Dec;2(12):982-7.
7. Schiebler T. et al.: *Anatomie. Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Springer, Berlin 1997
8. http://www.qualimed.de/krebs_klassifikationen.html
9. www.onkologie.de/Krebs/Krebsarten/Lungenkrebs.html
10. Janeway C. et al.: *Immunobiology*, 6th edition, Garland Science Publishing, 2005
11. Thomson AW, Lotzke MT, *The Cytokine Handbook*, Vol. 1, London/San Diego, Academic, 627 pp., eds 2003
12. Leonard WJ, *Type I cytokines and interferons and their receptors*, Fundamental Immunology ed WPaul, pp. 741-74, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999
13. Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE, *The cytokine facts book*, London/San Diego: Acad. Press, 2001
14. Nicola NA, Hilton DJ, *General classes and functions of four-helix bundle cytokines*, Adv. Protein Chem, 52:1-65, 1998
15. Idriss HT, Naismith JH, *TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*, Microsc. Res. Tech, 50:184-95, 2000

-
16. Sun PD, Davies DR, *The cysteine-knot growth factor superfamily*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 24:269-91, 1995
 17. Murzin AG, Lesk AM, Chothia C, *β -trefoil fold patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors*, J. Mol. Biol. 223:531-43, 1992
 18. Bazan JF, *Haematopoietic receptors and helical cytokines*, Immunol. Today, 11:350-54, 1990
 19. Cosmann D, *The haematopoietic receptor superfamily*, Cytokine 5:95-106, 1993
 20. Bazan JF, *Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors*, Cell, 61:753-54, 1990
 21. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA, *Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex*, Science, 255:306-12, 1992
 22. Mackiewicz A, Wiznerowicz M, Roeb E, Nowak J, Pawloski T et al., *Interleukin-6-type cytokines and their receptors for gene therapy of melanoma*, Ann N Y Acad Sci, 762:361-74, 1995
 23. Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, Murakami M, Yamaskai K et al., *Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6 binding and for IL-6 signal transduction through gp130*, EMBO J, 12:1705-12, 1993
 24. Mosley B, Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B et al., *Cloning and characterization of an alternate signalling subunit conferring OSM specific receptor activation*, J. Biol. Chem., 271:32635-43, 1996
 25. Elson GC, Gaber P, Losberger C, Herren S, Gretener D et al, *Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type-I receptor family*, J. Immunol., 161:1371-79, 1998
 26. Sprecher CA, Grant FJ, Baumgartner JW, Presnell SR, Schrader SK et al., *Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 246:82-90, 1998
 27. Livnah O, Stura EA, Johnson DL, Middleton SA, Mulcahy LS et al, *Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: The EPO receptor complex at 2.8 Å*, Science, 273:464-71, 1996
-

-
28. Chow D, He X, Snow AL, Rose-John S, Garcia KC, *Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signalling complex*, *Science* 291:2150-55, 2001
 29. Ozaki K, Leonard WJ, *Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy*, *J Biol Chem* 277:29355-58, 2002
 30. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC, *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6- α -receptor/gp130 complex*, *Science* 300:2101-4, 2003
 31. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G Schaper F, *Principles of Interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*, *Biochem. J.* 374:1-20, 2003
 32. Murray PJ, *The JAK-STAT-signalling pathway: input and output integration*, *J. Immunol.* 178:2623-29, 2007
 33. Danell JE Jr, Kerr IM, Stark GR, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*, *Science* 264:1415-21, 1994
 34. Ihle JN, *The Stat family in cytokine signalling*, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:211-17, 2001
 35. Leonard WJ, O'Shea JJ, *Jaks and STATs: biological implications*, *Annu. Rev. Immunol.* 16:293-322, 1998
 36. Schindler C, Levy DE, Decker T, *JAK-STAT signalling: from interferons to cytokines*, *J. Biol. Chem* 282:20059-63, 2007
 37. Dong C, Davis RJ, Flavell RA, *MAP-kinases in the immune response*, *Annu. Rev. Immunol.* 20:55-72, 2002
 38. Cantley LC, *The phosphoinositide 3-kinase pathway*, *Science* 296:1655-57, 2002
 39. Kelly-Welch A, Hanson EM, Keegan AD, *Interleukin-4 (IL-4) pathway*, *Sci. STKE* 2005:cm9, 2005
 40. Xinquan Wang, Patrick Lupardus, Sherry L. La Porte, K. Christopher Garcia, *Structural Biology of Shared Cytokine Receptors*, *Annu. Rev. Immunol.* 27:2.1-2.32, 2009
 41. Puck JM, *IL2RGbase: a database of γ -chain defects causing human X-SCID*, *Immunol Today* 17:507-11, 1996
-

-
42. Leonard WJ, *Cytokines and immunodeficiency diseases*, Nat Rev Immunol 1:200-8, 2001
 43. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE, *The IL-4 receptor: signalling mechanisms and biologic functions*, Annu Rev Immunol 17:701-38, 1999
 44. Andrews AL, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE, *IL-4 receptor α is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets*, J Immunol 176:7456-61, 2006
 45. Mueller TD, Zhang JL, Sebald W, Duschl A, *Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system*, Biochem Biophys Acta 1592:237-50, 2002
 46. Rickert M, Wang X, Boulanger MJ, Goriatcheva N, Garcia KC, *The structure of interleukin-2 complexed with its α receptor*, Science 308:1477-80, 2005
 47. Lorenzen I, Dingley AJ, Jacques Y, Grotzinger J, *The structure of the interleukin-15 α receptor and its implications for ligand binding*, J Biol Chem 281:6642-47, 2006
 48. LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X et al, *Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system*, Cell 132:259-72, 2008
 49. Wang X, Rickert M, Garcia KC, *Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α , β and γ receptors*, Science 310:1159-63, 2005
 50. Stauber DJ, Debler EW, Horton PA, Smith KA, Wilson IA, *Crystal structure of IL-2 signalling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor*, Proc Natl Acad Sci USA 103:2788-93, 2006
 51. Chow D, He X, Snow AL, Rose-John S, Garcia KC, *Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signalling complex*, Science 291:2150-55, 2001
 52. Tamada T, Honjo E, Maede Y, Okamoto T, Ishibashi M et al, *Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor signalling complex*, Proc Natl Acad Sci USA 103:3135-40, 2006
 53. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC, *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6- α -receptor/gp130 complex*, Science 300:2101-4, 2003

-
54. Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M et al. *The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a new mode of cytokine receptor activation*, Cell 134:496-507, 2008
 55. Wang HM, Smith KA. 1987. *The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure*. J. Exp. Med. 166:1055-69
 56. Nelson BH, Willerford DM. 1998. *Biology of the interleukin-2 receptor*. Adv. Immunol. 70:1-81
 57. Rickert M, Boulanger MJ, Goriatcheva N, Garcia KC. 2004. *Compensatory energetic mechanisms mediating the assembly of signaling complexes between interleukin-2 and its α , β , and γ receptors*. J. Mol. Biol. 339:1115-28
 58. Liparoto SF, Ciardelli TL. 1999. *Biosensor analysis of the interleukin-2 receptor complex*. J. Mol Recognit. 12:316-21
 59. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, et al. 1994. *Heterodimerization of the IL-2 receptor β - and γ -chain cytoplasmic domains is required for signalling*. Nature 369:330-33
 60. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD. 1994. *Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor β and γ chains mediate the signal for T-cell proliferation*. Nature 369:333-36
 61. Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, et al. 1992. *Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor*. Science 257:379-82
 62. Sana TR, Wu Z, Smith KA, Ciardelli TL. 1994. *Expression and ligand binding characterization of the β -subunit (p75) ectodomain of the interleukin-2 receptor*. Biochemistry 33:5838-45
 63. Wu Z, Johnson KW, Goldstein B, Choi Y, Eaton SF, et al. 1995. *Solution assembly of a soluble, heteromeric, high affinity interleukin-2 receptor complex*. J. Biol. Chem. 270:16039-44
 64. Wu Z, Johnson KW, Choi Y, Ciardelli TL. 1995. *Ligand binding analysis of soluble interleukin-2 receptor complexes by surface plasmon resonance*. J. Biol. Chem. 270:16045-51

-
65. Wu Z, Goldstein B, Laue TM, Liparoto SF, Nemeth MJ, Ciardelli TL. 1999. *Solution assembly of the pseudohigh affinity and intermediate affinity interleukin-2 receptor complexes*. Protein Sci. 8:482–89
 66. Liparoto SF, Myszka DG, Wu Z, Goldstein B, Laue TM, Ciardelli TL. 2002. *Analysis of the role of the interleukin-2 receptor γ chain in ligand binding*. Biochemistry 41:2543–51
 67. Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, Rudikoff S, Pumphrey J, et al. 1984. *Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor*. Nature 311:626–31
 68. Nikaido T, Shimizu A, Ishida N, Sabe H, Teshigawara K, et al. 1984. *Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor*. Nature 311:631–35
 69. Cosman D, Cerretti DP, Larsen A, Park L, March C, et al. 1984. *Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor*. Nature 312:768–71
 70. Lambert G, Stura EA, Wilson IA. 1989. *Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between interleukin-2 and a soluble form of the p55 component of the high affinity interleukin-2 receptor*. J. Biol. Chem. 264:12730–36
 71. Smith KA, Cantrell DA. 1985. *Interleukin 2 regulates its own receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:864–68
 72. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, et al. 1989. *Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's*. Science 244:551–56
 73. Smith KA. 1988. *Interleukin-2: inception, impact, and implications*. Science 240:1169–76
 74. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. 1993. *The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes*. Annu. Rev. Immunol. 11:245–68
 75. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci USA 1975;72(9):3666–3670.
 76. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature 1997;385(6618):729–733.
-

-
77. Wang J, Al-Lamki RS, Zhang H, Kirkiles-Smith N, Gaeta ML, Thiru S, et al. *Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signalling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool.* J Biol Chem 2003;**278**(24):21751–21760.
78. Robak T, Gladalska A, Stepień H. *The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis.* Eur Cytokine Netw 1998;**9**(2):145–154.
79. Nurnberger W, Platonov A, Stannigel H, Beloborodov VB, Michelmann I, von Kries R, et al. *Definition of a new score for severity of generalized Neisseria meningitidis infection.* Eur J Pediatr 1995;**154**(11):896–900.
80. Waage A, Halstensen A, Espevik T. *Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease.* Lancet 1987;**1**(8529):355–357.
81. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. *TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.* Lancet 1990;**336**(8725):1201–1204.
82. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, et al. *A physical and functional map of the human TNF α /NF- κ B signal transduction pathway.* Nat Cell Biol 2004;**6**(2):97–105.
83. Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. *Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants.* Lab Invest 2001;**81**(11):1503–1515.
84. Ledgerwood EC, Pober JS, Bradley JR. *Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction.* Lab Invest 1999;**79**(9):1041–1050.
85. Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. *Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis.* Science 1998;**282**(5387):290–293.
86. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signalling.* Science 2000;**288**(5475):2351–2354.
-

-
87. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. *Prevention of constitutive TNF receptor 1 signalling by silencer of death domains.* Science 1999;**283**:543–546.
88. Endres R, Hacker G, Brosch I, Pfeffer K. *Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signalling in the absence of the silencer of death domains.* Mol Cell Biol 2003;**23**(18):6609–6617.
89. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV. *Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor- κ B activation and association with tumor necrosis factor signalling proteins.* J Biol Chem 1996;**271**:19935–19942.
90. Jones SJ, Ledgerwood EC, Prins JB, Galbraith J, Johnson DR, Pober JS, et al. *TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1.* J Immunol 1999;**162**(2):1042–1048.
91. Bradley JR, Johnson DR, Pober JS. *Four different classes of inhibitors of receptor-mediated endocytosis decrease TNF-induced gene expression in human endothelial cells.* J Immunol 1993;**150**:5544–5555.
92. Schutze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, et al. *Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signalling.* J Biol Chem 1999;**274**:10203–10212.
93. Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, et al. *The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation.* Nat Immunol 2001;**2**:620–624.
94. Blonska M, Shambharkar PB, Kobayashi M, Zhang D, Sakurai H, Su B, et al. *TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor α (TNF α) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3, leading to NF- κ B activation.* J Biol Chem 2005;**280**:43056–43063.
95. Devin A, Lin Y, Yamaoka S, Li Z, Karin M, Liu Z. *The α - and β -subunits of I κ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF.* Mol Cell Biol 2001;**21**:3986–3994.
96. Chen ZJ. *Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway.* Nat Cell Biol 2005;**7**:758–765.
97. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, et al. *ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2.* Mol Cell 1998;**2**(3):389–395.
-

-
98. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signalling pathways*. Science 1997;**275**:90–94.
 99. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, et al. *ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2*. Mol Cell 1998;**2**:389–395.
 100. Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, et al. *FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase*. Cell 1996;**86**:937–947.
 101. Slowik MR, De Luca LG, Min W, Pober JS. *Ceramide is not a signal for tumor necrosis factor-induced gene expression but does cause programmed cell death in human vascular endothelial cells*. Circ Res 1996;**79**:736–747.
 102. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. *NF- κ B signals induce the expression of c-FLIP*. Mol Cell Biol 2001;**21**:5299–5305.
 103. Bradley JR, *TNF-mediated inflammatory diseases*, J Pathol 214:149-160, 2008
 104. Grech AP, Gardam S, Chan T, Quinn R, Gonzales R, Basten A, et al. *Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signalling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated factor 2 (TRAF2)-binding site*. J Biol Chem 2005;**280**(36):31572–31581.
 105. Slowik MR, De Luca LG, Fiers W, Pober JS. *Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration*. Am J Pathol 1993;**143**(6):1724–1730.
 106. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. *Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signalling by the 55-kDa TNF receptor*. J Biol Chem 1993;**268**(25):18542–18548.
 107. Pinckard JK, Sheehan KC, Schreiber RD. *Ligand-induced formation of p55 and p75 tumor necrosis factor receptor heterocomplexes on intact cells*. J Biol Chem 1997;**272**(16):10784–10789.
-

-
108. Santee SM, Owen-Schaub LB. *Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization.* J Biol Chem 1996;**271**(35):21151–21159.
109. Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W. *Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA.* J Biol Chem 1993;**268**(4):2762–2766.
110. Winzen R, Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Brakebusch C, Kemper O, et al. *Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells.* J Immunol 1992;**148**(11):3454–3460.
111. Madge LA, Sierra-Honigmann MR, Pober JS. *Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation.* J Biol Chem 1999;**274**(19):13643–13649.
112. Bradley JR, Johnson DR, Pober JS. *Endothelial activation by hydrogen peroxide. Selective increases of intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class I.* Am J Pathol 1993;**142**(5):1598–1609.
113. Hino T, Nakamura H, Abe S, Saito H, Inage M, Terashita K, et al. *Hydrogen peroxide enhances shedding of type I soluble tumor necrosis factor receptor from pulmonary epithelial cells.* Am J Resp Cell Mol Biol 1999;**20**(1):122–128.
114. Winzen R, Wallach D, Kemper O, Resch K, Holtmann H. *Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1.* J Immunol 1993;**150**(10):4346–4353.
115. Cerami A, Ikeda Y, Le Trang N, Hotez PJ, Beutler B. *Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor).* Immunol Lett 1985;**11**(3–4):173–177.
116. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. *Mice deficient for the 55 kDa tumor necrosis factor receptor are*
-

-
- resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection*, Cell 1993;**73**(3):457–467.
117. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, et al. *Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes*, Nature 1993;**364**(6440):798–802.
118. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. *Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis*. Nat Med 1999;**5**(7):828–831.
119. Grunhagen DJ, de Wilt JH, Graveland WJ, van Geel AN, Eggermont AM, *The palliative value of tumor necrosis factor alpha-based isolated limb perfusion in patients with metastatic sarcoma and melanoma*, Cancer 2006;**106**(1):156–162.
120. Grunhagen DJ, van Etten B, Brunstein F, Graveland WJ, van Geel AN, de Wilt JH, et al. *Efficacy of repeat isolated limb perfusions with tumor necrosis factor alpha and melphalan formultiple in-transit metastases in patients with prior isolated limb perfusion failure*. Ann Surg Oncol 2005;**12**(8):609–615.
121. van Etten B, de Vries MR, van IMG, Lans TE, Guetens G, Ambagtsheer G, et al. *Degree of tumour vascularity correlates with drug accumulation and tumour response upon TNFa-based isolated hepatic perfusion*. Br J Cancer 2003;**88**(2):314–319.
122. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ, *Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells*, Nature. 2006 Jun 15; 441(7095):890-3.
123. Bachmann MF, Oxenius A, *Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again*, EMBO Rep. 2007 Dec; 8(12):1142-8.
124. Sackstein R et al., *Ex Vivo Glycan Engineering of CD44 Programs Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Trafficking to Bone*, Nature Medicine, 2008
125. Li et al, *Beyond tumorigenesis : cancer stem cells in metastasis*, Cell Research (2007) 17:3-14 doi:10.1038/sj.cr.7310118
-

-
126. Dubinett SM, Patrone L, Tobias J, Cochran AJ, Wen DR, McBride WH, *Intratumoral interleukin-2 immunotherapy: activation of tumor-infiltrating and splenic lymphocytes in vivo*, *Cancer Immunol Immunother.* 1993;36(3):156-62
127. Zhao X, Ye F, Chen L, Lu W, Xie X., *Human epithelial cells ovarian carcinoma cell-derived cytokines cooperatively induce activated CD4(+)CD25(-)CD45RA(+) naïve T cells to express forkhead box protein 3 and exhibit suppressive ability in vitro*, *Cancer Sci.*, 2009 Jul 10.
128. Kasprowicz FJ, Smallwood PF, Tyzik AJ, Ziegler SF, *Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function*, *J Immunol.* 2003 Aug 1;171(3):1216-23
129. Gounaris E, Blatner NR, Dennis K, Magnusson F, Gurish MF, Strom TB, Beckhove P, Gounari F, Khazale K., *T-regulatory cells shift from a protective anti-inflammatory to a cancer-promoting proinflammatory phenotype in polyposis*, *Cancer Res.* 2009 Jul 1;69(13):5490-7

Curriculum Vitae

Lebenslauf aus Gründen des
Datenschutzes gelöscht