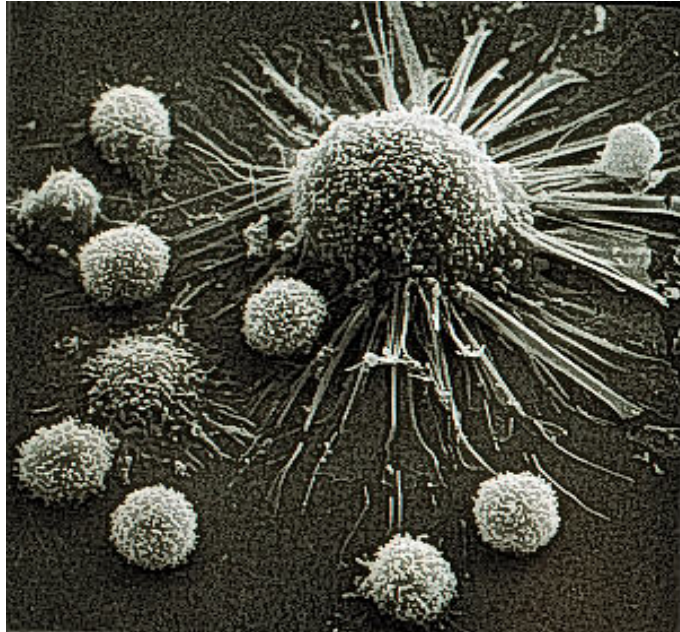

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
des Klinikums Großhaderns der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Pohl




Sequentielle Genanalyse in einem therapeutischen T-Zelltransfermodell der Maus

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Birgit Lieske
aus Stuttgart

2009




Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Georg A. Enders
2. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Thomas Brocker

Mitberichterstatter : Priv. Doz. Dr. Ursula Strobl
Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

Dekan : Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung : 10.12.2009



"DRUGS CAN ONLY REPRESS SYMPTOMS: THEY CANNOT ERADICATE DISEASE. THE TRUE REMEDY FOR ALL DISEASES IS NATURE'S REMEDY THERE IS AT BOTTOM ONLY ONE GENUINELY SCIENTIFIC TREATMENT FOR ALL DISEASES, AND THAT IS TO STIMULATE THE PHAGOCYTES. STIMULATE THE PHAGOCYTES. DRUGS ARE A DELUSION".

**SIR BLOOMFIELD BONINGTON
THE DOCTOR'S DILEMMA (1906)
GEORGE BERNARD SHAW**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis8

1 Einleitung11

1.1 HISTORISCHES11

1.2 IMMUNTHERAPIE ALS NEUER WEG12

1.3 KOMPONENTEN DES IMMUNSYSTEMS15

1.3.1 UNSPEZIFISCHE ABWEHR15

1.3.2 SPEZIFISCHE ABWEHR16

1.3.3 ZYTOKINE18

1.3.4 MODELL TUMORABWEHR.....19

1.3.5 ZYTOLYSE – MECHANISMEN20

1.4 VERSAGEN DER IMMUNANTWORT ?22

1.5 ANGRIFFSSTRATEGIEN25

1.6 BISHERIGE ERGEBNISSE26

1.7 UNTERSUCHUNG AM MODELL.....27

1.8 FRAGESTELLUNG29

2 Material und Methoden30

2.1 ÜBERBLICK30

2.2 MATERIAL31

2.2.1 TIERE31

2.2.2 ZELLEN31

2.2.3 SUBSTANZEN.....31

2.3 MÄUSEMODELL IM ÜBERBLICK34

2.3.1 VORBEREITUNG DER ZELLEN ZUR INJEKTION35

2.3.2 GENERIERUNG DER T-ZELLEN35

2.3.3 KULTIVIERUNG36

2.3.4 ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS DER T-ZELLEN36

2.3.5 THERAPIEMODELL.....37

2.4 GENEXPRESSIONSANALYSE37

2.4.1 RNA-ISOLIERUNG37

2.4.2	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION	38
2.4.2.1	cDNA-Synthese	39
2.4.2.2	PCR	39
2.4.2.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	41
2.4.2.4	Auswertung.....	41
2.4.3	PROGRAMMARRAYS	42
2.4.3.1	Übersicht	42
2.4.3.2	Synthese Biotin-markierter cDNA.....	43
2.4.3.3	Prüfung der Labelling-Effizienz	44
2.4.3.4	Prähybridisierung	44
2.4.3.5	Hybridisierung	44
2.4.3.6	Waschvorgänge.....	45
2.4.3.7	Chemolumineszenzdetektion	45
2.4.3.8	Analyse.....	45
2.4.4	AFFYMETRIX.....	47
2.4.4.1	Übersicht	47
2.4.4.2	Rohdaten des Affymetrix-Chips	48
2.4.4.3	Datenweiterverarbeitung	49
3	Ergebnisse.....	55
3.1	ETABLIERUNG DES MODELLS UND ÜBERPRÜFUNG DER EFFIZIENZ.....	55
3.1.1	MAKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	55
3.1.2	EINFLUSSGRÖSSEN	56
3.1.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE	56
3.1.4	AUSDEHNUNG DES THERAPEUTISCHEN FENSTERS.....	57
3.1.4.1	Verzögerte T-Zellgabe	57
3.1.4.2	Reduktion der Tumorzellanzahl bei verzögerter T-Zellgabe.....	59
3.2	ANALYSE DER ZYTOTOXISCHEN T-ZELLEN IN VITRO	60
3.2.1	CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN PER FACS	60
3.2.2	ZYTOTOXIZITÄTSASSAY ALS FUNKTIONSPRÜFUNG	61
3.2.3	AUSGEWÄHLTE PARAMETER DES IMMUNSYSTEMS	62
3.3	ANALYSE DER IMMUNANTWORT IN DER LUNGE	63
3.3.1	VERLAUF DER T-ZELLANTWORT	64
3.3.2	KLASSISCHE ZYTOTOXIZITÄTSMCHANISMEN.....	65
3.3.2.1	Perforin- / Granzym- System.....	65

3.3.2.2	Fas/ Fas-Ligand-System	67
3.3.3	SEZERNIERTES TNF-A	67
3.3.4	IL-6 ALS WACHSTUMSFAKTOR FÜR B-ZELLEN UND ALLGEMEINE ENTZÜNDUNG	68
3.3.5	UNSPECIFISCHE MECHANISMEN.....	69
3.3.5.1	NKG2D	69
3.3.5.2	TRANCE (TNFSF 11)	70
3.4	PROGRAMMARRAYS: CHEMOKINE UND DEREN REZEPTOREN	71
3.4.1	ZELLEN IN VITRO.....	72
3.4.2	LUNGEN	75
3.5	AFFYMETRIX-GENCHIP	81
3.5.1	ROHDATEN.....	82
3.5.2	FILTERPROZESSE	83
3.5.3	Globale Muster der Genexpression	84
3.5.4	PATHWAYANALYSEN AM BEISPIEL DER IFN-GAMMA-/ TNF-ALPHA-GENFAMILIE	85
4	Diskussion.....	87
4.1	MODELL.....	87
4.2	ANALYSE DER ZYTOTOXIZITÄTSMechanismen	89
4.2.1	ZYTOTOXIZITÄT DER CTLs	90
4.2.2	ANALYSE DER EINZELNEN MECHANISMEN	92
4.2.2.1	Direkte Zytotoxizität	92
4.2.2.2	Indirekte Mechanismen	98
5	Zusammenfassung.....	107
6	Literaturverzeichnis.....	109
7	Abbildungsverzeichnis	118
8	Tabellenverzeichnis.....	120
9	Anhang	122
9.1	ANALYSE DER PCR-DATEN – DESKRIPTIVE STATISTIK.....	122
9.2	ANALYSE DER PCR-DATEN – SIGNIFIKANZANALYSE	129

9.3	ANALYSE DER PROGRAMMARRAYS CHEMOKINE UND IHRE REZEPTOREN	132
9.4	IFN-GAMMA -PATHWAY-ANALYSE ANHAND DER AFFYMETRIXDATEN.....	132
9.5	TNF-ALPHA-PATHWAY- ANALYSE ANHAND DER AFFYMETRIX-DATEN.....	141
9.6	AUSGEWÄHLTE GENE MIT SCHLÜSSELBEGRIFFEN WIE CHEMOKINEN, ZYTOKINEN ODER MAKROPHAGEN.....	142
10	Danksagung.....	154
11	Lebenslauf	155

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
a	Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BAGE	B antigen (Melanom-assoziiertes Antigen)
bp	Basenpaare
CCD-Kamera	Charge Coupled Device - Kamera
CCL	C-Chemokin-Ligand
CCR	C-Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CD25	IL-2-Rezeptor
CD3	T-Zell-Rezeptor, T-Zelloberflächenprotein
CD4	Oberflächenrezeptor T-Helferzellen
CD8	Oberflächenrezeptor T-Killerzellen
cDNA	komplementäre DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA	CD 152, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein
CXCL	CX-Chemokin-Ligand
CXCR	CX-Chemokin-Rezeptor
DC	Dendritische Zelle
DMDC	Dimethyldikarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	dots per inch
dUTP	Desoxy-Uridin-5' -triphosphat
E/T	effector - to - target ratio
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa	Firma
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FasL	Fas-Ligand
FDA	Food and Drug Administration
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCOS	Gene Chip Operating Software
GM-CSF	granulocyte and makrophage - colony stimulating factor
gp 100	Glykoprotein 100

Abkürzungsverzeichnis

i.v.	intravenös
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN- α	Interferon α
IL	Interleukin
kbp	Kilobasenpaare
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1, CD 11A
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
MAGE	melanocyte antigen (Melanom - assoziiertes Antigen)
MART	Melanoma antigen recognized by T-cells
MCA	3-Methylcholanthren
MDB	Membrane Desalting Buffer
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGzma	murines Granzym a
MHC	Major Histocompatibility Complex
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mRNA	messenger RNA
NKG2D	C-Typ lektinähnlicher Rezeptor auf NK-Zellen, T-Zellen und Makrophagen
NKT Zelle	natural killer t cell
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCA	principal components analysis
Pmel	Melanocyte lineage-specific antigen (gp100)
PRF	Perforin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RANK	receptor-activation NF κ B
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	15mM Natriumchlorid / 1,5mM Natriumcitrat - Puffer
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris/Acetic acid/EDTA (Tris/Essigsäure/EDTA)
Taq	Thermus aquaticus
TGF- β	transforming growth factor β
Th1/2 Zellen	T-Helfer Zellen Typ 1/2

Abkürzungsverzeichnis

TNF	Tumornekrosefaktor
TRANCE	TNF related activation induced chemokine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-amino methan
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
UV	Ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule, CD 106
VLA-4	CD49D, Integrin alpha 4

1 Einleitung

1.1 Historisches

Die Krankheit Krebs war bereits in den **ältesten Kulturen** bekannt. Zeugnis davon geben schon frühe medizinische Berichte der Geschichte. Die erste schriftliche Beschreibung von Tumoren und von damals gängigen Therapieformen lässt sich in den sieben Papyri finden, die um 1600 v. Chr. von den Ägyptern verfasst wurden. Während das Smith – Papyrus chirurgische Methoden beschreibt, widmet sich das Ebers – Papyrus pharmakologischen, mechanischen und magischen Behandlungsformen. Auch die Unterscheidung zwischen gut- und bösartig wurde bereits getroffen. Basierend auf Galen's Lehre von den Säften wurde Krebs ab dem **Mittelalter** lange Zeit als die Folge eines Überschusses schwarzer Galle erklärt, und galt als unheilbar - trotz einer Vielzahl an arsenhaltigen Pasten, die zur Behandlung der Manifestationen eingesetzt wurden. Gaspare Aselli sah im 17. Jh. Abnormalitäten der Lymphe als Krebsursache an. Zwei französische Wissenschaftler des 18. Jh., der Arzt Jean Astruc und der Chemiker Bernard Peyrilhe begründeten mit ihren Versuchen, vorherrschende Hypothesen zum Ursprung von Tumoren zu bestätigen oder zu widerlegen, das Fach **experimentelle Onkologie**. Neue Technologien, im 19. Jh. das Lichtmikroskop zur genauen Zellbeobachtung und im 20. Jh. vor allem das breite Spektrum der **Molekularbiologie** brachten ein neues Verständnis der pathologischen Mechanismen und damit auch eine Vielzahl potentieller Therapieansätze mit sich.

Deren bedurfte es auch und bedarf es weiterhin, da mit zunehmendem Wissen die Liste der bekannten Tumorarten wuchs und das volle Ausmaß dieser Krankheitsgruppe auf die allgemeine Gesundheit deutlich wurde. Zwischen den einzelnen Tumorarten bestehen beträchtliche Unterschiede, was Verlauf, Prognose und vorhandene Therapiemöglichkeiten angeht. Im klinischen Alltag tut sich damit eine Spanne von unheilbar mit Überlebenszeiten von wenigen Monaten - Beispiel malignes Glioblastom⁸¹- bis überwiegend heilbar – Beispiel Hodgkin- Lymphom¹⁰⁵- auf, abhängig neben Tumorart auch von Differenzierungsgrad, Zeitpunkt der Diagnosestellung und damit Lymphknotenbefall und Metastasierungsstatus .

Das heutige Spektrum der Behandlungsformen ist groß, wobei jede einzelne ihre Daseinsberechtigung aus den verschiedenen Indikationen erhält. Bereits seit Jahrzehnten im Einsatz sind die klassischen Therapieformen Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Die **chirurgische Exzision** ist Mittel der Wahl vor allem bei klar abgegrenzten soliden und damit gut operablen Tumoren. Neben der althergebrachten offenen Chirurgie stehen nun endoskopische Techniken, Kryotherapie, Laser, photodynamische Therapie und das Gamma-

Messer zur Verfügung . Neben der Chirurgie besteht als weitere lokale Therapiestrategie die **Bestrahlung** - als externe Tele- oder interne Brachytherapie - die bei mehr als der Hälfte aller Krebspatienten eingesetzt wird. Durch die hohe Energieemission werden zelluläre Moleküle verändert und dadurch Zellen irreversibel geschädigt, ohne dabei zwischen normalem und Tumorgewebe zu unterscheiden. Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten lokal angreifenden Therapien ermöglicht die **Chemotherapie** eine systemische Wirkung bei disseminiertem Befall, Metastasierung oder Inoperabilität. Hierbei wird durch Pharmaka, die mit der DNA-Synthese oder Mitose interferieren, in den Zellzyklus eingegriffen. Prinzipiell unspezifisch sowohl gegen normale als auch entartete Zellen gerichtet, besteht bei der Chemotherapie zumindest ein gewisser Grad an Selektivität durch das Vorhandensein von DNA-Reparaturmechanismen in normalen Zellen.

Häufig werden verschiedene Therapieformen miteinander kombiniert, sodass sich die unterschiedlichen Wirkarten ergänzen.

Angesichts des Versagens dieser Therapien bei vielen Tumorarten sowie der teils massiven Nebenwirkungen durch die Zerstörung auch von normalem Gewebe wurde nach neuen Therapiestrategien Ausschau gehalten. Eine Methode bei bestimmten Tumoren wie Mamma- oder Prostata-CA ist die **Hormontherapie**, bei der durch Gabe oder Entzug von Hormonen hormonsensitiven Tumoren das nötige Wachstumssignal entzogen werden soll. Einen relativ neuen Ansatz stellt die **Biotherapie** dar, auch Immuntherapie oder biological response modifier therapy genannt. Grundidee ist hierbei die Anregung oder Verstärkung des körpereigenen Abwehrsystems zur Zerstörung des Tumorgewebes, basierend letztendlich auf der Erfindung der Immunisierung 1796 durch Edward Jenner gegen Pocken. Auf Entwicklungsgeschichte, Formen, Ergebnisse und Problematik wird nachfolgend eingegangen.

Als letztes wären noch die immer wieder wohlverheissenden alternativen Behandlungsformen zu nennen, die von der Schulmedizin enttäuschte Patienten anziehen, und die sich selten als allein heilend, manchmal als unterstützend und oft als finanzielle Bereicherungsmethode herausstellen. Trotz allen Fortschritts greifen in vielen Fällen die vorhandenen Methoden nicht.

1.2 Immuntherapie als neuer Weg

1891 lieferte ein junger New Yorker Chirurg, **William Coley**⁴⁶, mit einer Beobachtung erste Hinweise auf die Immunogenität von Tumoren. Ein Patient mit einem als unheilbar

eingestuften Sarkom zeigte eine Spontanremission nach schwerer Erysipelinfektion^{24, 25}. Coley entwickelte daraufhin aus abgetöteten Streptokokken und *Serratia marcescens* einen Impfstoff, das sogenannte Coley-Toxin, mit dem er unerwartete Erfolge erzielte. In den folgenden Jahren behandelte er Hunderte von Patienten mit verschiedenen Tumorleiden. Seine Tochter Helen Coley Nauts, die 1953 das National Cancer Institutes gründen sollte, listete die Ergebnisse auf^{23, 80, 85}. 1943 identifizierte NCI Forscher M.J. Shears LPS, ein Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien, als die biologisch wirksame Substanz des Coley-Toxins. 1970 schließlich wurde entdeckt, dass die aktive Komponente von LPS, Lipid A, die Produktion von TNF- α durch das Immunsystem stimuliert^{29, 71, 91}. Durch gegenteilige Studien einiger Zeitgenossen, die seine Ergebnisse zu replizieren versuchten, und vor allem auch durch den damaligen Siegeszug der neuen Technologien Radio- und Chemotherapie geriet das Konzept in Vergessenheit.

Die Debatte war jedoch eröffnet. Über Jahrzehnte bestand eine Kontroverse, ob Tumorzellen als körpereigene Zellen überhaupt vom Immunsystem erkannt werden können. Dagegen sprach das Konzept der erworbenen immunologischen Toleranz. Diesem zufolge werden Immunzellen, deren Rezeptoren körpereigene Proteine erkennen, im Thymus negativ selektiert und somit alle im Körper vorhandenen Proteine ignoriert. Bereits 1909 postulierte **Paul Ehrlich** jedoch, dass das Immunsystem das Wachstum von Tumoren unterdrückt³⁴. Fünfzig Jahre später griffen Lewis Thomas⁹⁹ und darauf aufbauend Sir MacFarlane Burnet¹³ diesen Gedanken wieder auf und formulierten die Hypothese der **Immunsurveillance**⁴⁹. Diese besagt, dass Effektorzellen des Immunsystems aktiv den Körper patrouillieren, um neu transformierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Diese Effektorzellen wurden in den 70er Jahren als T-Zellen identifiziert. Mangels experimenteller Nachweise wurde die Theorie jedoch schnell wieder verlassen.

Die prinzipielle Frage war, ob Immunzellen Tumorzellantigene erkennen können, obwohl diese Zellen sich von körpereigenem Gewebe ableiten („self“). Experimentell wurde eine Anti-Tumor-Antwort des Immunsystems erstmals in den fünfziger Jahren an Mäusen gezeigt: Nach der Resektion eines MCA-induzierten Tumors wurden aus dem Resektat Tumorzellen isoliert und diese sowohl der Ursprungsmaus als auch syngenen Mäusen verabreicht. In der ursprünglichen Tumor-tragenden Maus entstand kein Tumor, in den syngenen dagegen schon³⁸. Klinische Hinweise auf die Existenz einer Immunantwort gegen Tumoren fanden sich in der Beobachtung spontaner Regressionen bei Melanomen, GI-, Brust- und Lungentumoren¹⁷. Histopathologische Studien wiesen auf eine positive Korrelation zwischen lymphozytären Infiltraten im Tumorgebiet und Prognose bzw. klinischem Verlauf hin⁴¹. Bestätigung erhielt

die Theorie durch die **Identifizierung von Tumorantigenen** in den 80er Jahren ^{10, 88}. Dazu wurden cDNA - Bibliotheken von Tumoren angelegt und diese Transfektanten mit Serum (Antikörpern) bzw. T-Lymphozyten des Tumorwirtes zusammengebracht. Überraschenderweise wurden nicht nur durch Mutationen veränderte und damit fremde Antigene erkannt, sondern auch in normalem Gewebe vorkommende Antigene ⁴⁸. Ein Teil der Anti-Tumor-Immunzellen sind somit autoreaktive Lymphozyten. Dies führte zu einer Klassifizierung in nur im Tumor exprimierte Tumor - Spezifische Antigene (TSAs) und auch in normalen Zellen zu findende Tumor - Assoziierte Antigene (TAAs). Heute findet eine Einteilung nach Herkunft, Funktion und Molekularstruktur Verwendung:

Tabelle 1: Klassifizierung der Tumorantigene ⁹⁶

Antigene	Beispiel	Referenzen
einmalige Antigene (meist durch Mutationen, virale Gene)	p53, ras, β-catenin, CDK4, CDC27, α actinin-4	40, 47, 70, 86, 109, 114
Differenzierungsantigene	Tyrosinase, TRP1 / gp75, TRP2, gp100, Melan-A / MART1, Ganglioside, PSMA	2, 57, 58, 67, 87, 107, 108
überexprimierte Antigene	HER2, WT1, EphA3, EGFR, CD20	3, 21, 22, 102, 110
Cancer-testis Antigene	MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1	53, 104
universelle Antigene	Telomerase, Survivin	79, 121

Durch **Mutationen** oder **virale Transformation** entstehen neue Genprodukte mit oder ohne veränderter Funktion, die immunogene Epitope aufweisen können. Typische Beispiele sind Proto - Onkogene, die bei der Zellteilung sowie Differenzierung von Zellen beteiligt sind ^{40, 47, 70, 86, 109, 114}. Abgesehen von den einmaligen Antigenen sind alle weiteren Gruppen auch in normalem Gewebe exprimiert, sodass bei einer Abwehrreaktion gleichzeitig eine Autoimmunreaktion zu erwarten ist. **Differenzierungsantigene** sind Proteine, die ausser auf Tumorzellen auch auf deren Ursprungszellen exprimiert sind und für diesen Zelltyp charakteristisch sind ^{2, 57, 58, 67, 87, 107, 108}. Durch das Tumorwachstum wird die Toleranz gegen diese Eigenproteine durchbrochen und bei gegen diese Antigene gerichteten Immuntherapien kann es zu Autoimmunreaktionen kommen. Beispiele hierfür sind z.B. bei Melanomen auftretende Vitiligo durch Destruktion von Melanozyten. Bei in Tumoren **überexprimierten Genen** fällt die Autoimmunantwort schwächer aus, da die gegen diese Gene gerichteten Immunzellen vorwiegend die Tumorzellen attackieren ^{3, 21, 22, 102, 110}. **Cancer-testis - Antigene** werden ausschliesslich in den männlichen Keimzellen des Hodens sowie in einigen

Tumorzellen exprimiert, während sie auf normalen somatischen Zellen stumm sind ^{53, 104}. Damit ist potentiell eine noch spezifischer gegen das Tumorgewebe gerichtete Therapie zu erwarten. Tumor - assoziierte oder **universelle Antigene** treten bei verschiedenen Tumorentitäten auf und bieten damit die Möglichkeit, mit einer Vakzine mehrere Tumoren angehen zu können ^{79, 121}.

Durch die Identifizierung von Tumorantigenen und den Nachweis von für diese spezifischen Immunzellen in Tumor-tragenden Organismen ist eine Immunreaktion gegen Tumore als prinzipiell möglich anzusehen. Die Antigene liegen kryptisch, d.h. vor dem Immunsystem versteckt, oder in unterschwelligen Mengen und somit subdominant vor, oder werden durch Mutationen zu Fremdproteinen.

1.3 Komponenten des Immunsystems

Das Immunsystem ist ein komplexes und dynamisches Netzwerk. Es besteht aus verschiedenen Zelltypen und chemischen Botenstoffen, die in mehreren Subsystemen organisiert sind. Hauptfunktion ist die Eliminierung von Partikeln mit körperfremder Proteinstruktur (sog. Antigene). Zu diesen zählen körperfremde Zellen sowie deren Bestandteile wie zum Beispiel Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten oder Transplantatzellen und veränderte körperfremde Zellen (Tumorzellen).

Tabelle 2: Komponenten des Immunsystems

Abwehr	unspezifisch	spezifisch
humoral	Komplement-System Zytokine	Antikörper
zellulär	Makro- und Mikrophagen Natürliche Killerzellen	Lymphozyten

1.3.1 Unspezifische Abwehr

Die **unspezifische Abwehr** ist das phylogenetisch ältere System Es ist angeboren und wirkt damit bereits beim ersten Kontakt mit dem Antigen, entwickelt jedoch kein Gedächtnis. Neben physikalischen Barrieren wie Haut und Schleimhäuten und chemischer Protektion durch Magensäure und Lysozym verfügt das angeborene Immunsystem über zwei zelluläre

Komponenten. Das Phagozyten-System, bestehend aus Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen, phagozytiert und verdaut Mikroorganismen, während NK-Zellen neben Mikroorganismen auch bestimmte Tumoren und viral infizierte Zellen eliminieren. Als lösliche Komponenten sind Komplementsystem, Akut-Phasen-Proteine und Zytokine zu nennen. Zytokine werden von Monozyten und Lymphozyten nach Kontakt mit Antigenen oder anderen Stimuli sezerniert und beeinflussen die Entzündungsreaktion oder Immunantwort.

Die Zellen der unspezifischen Abwehr erkennen ihre Zielstrukturen über entsprechende Rezeptoren anhand charakteristischer molekularer Muster und unterscheiden diese somit von körpereigenen „harmlosen“ Proteinen⁷². Zur Unterscheidung werden drei Prinzipien eingesetzt, die Erkennung von „microbial nonself“, von „missing self“ und von „induced / altered self“.

Mikroben zum Beispiel werden über nur in diesen vorkommende sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ erkannt.

Normale Zellen sind mit einer Reihe von Molekülen ausgestattet, die sie als „Eigen“ markieren, unter anderem MHC-I, CD46, CD47, CD55 oder sialinierte Glykoproteine. Binden inhibitorische Rezeptoren von NK-Zellen oder Makrophagen an diese, wird deren zytotoxische Aktivität gehemmt. Auf transformierten, infizierten oder alternden Zellen sind diese Moleküle herunterreguliert oder fehlen („missing self“). Das macht sie einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität oder einer Phagozytose durch Makrophagen zugänglich.

Eine **Infektion oder Transformation** induziert in der betroffenen Zelle die Expression von Molekülen wie z.B. RAE oder H-60, die durch den aktivierenden Rezeptor NKG2D auf NK-Zellen, CD8-positiven T-Zellen und myeloiden Zellen erkannt werden und zur assistierten Apoptose führen („induced / altered self“)³¹.

1.3.2 Spezifische Abwehr

Neben der schnellen gegen ein vorgegebenes Repertoire an Antigenen gerichteten Antwort verfügt der Organismus über ein verzögert wirkendes **spezifisches Immunsystem**, das durch Lernen, Anpassungsfähigkeit und Gedächtnis charakterisiert ist. Die zellulären Bestandteile sind Lymphozyten, die sich in B- und T-Lymphozyten aufteilen. Erst nach Antigenkontakt werden diese Zellen aktiviert, expandieren und differenzieren zu den eigentlichen Effektorzellen. Je nach Antigenklasse wird auf das B- oder T – Zellsystem zurückgegriffen. Befinden sich die Antigene im Blut, als Mikroben, Fremdstoffe oder Tumorzellen, werden sie durch die für sie spezifischen **B-Zellen** bzw. deren Antikörper gebunden. Nach dem Kontakt

differenzieren die B-Zellen zu Antikörper - produzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen. Antikörper wirken als Opsonine, als Antitoxine, neutralisieren Viren, lysieren Bakterien und sind bei der Antikörper - gerichteten zellulären Abwehr (ADCC) beteiligt.

Viral infizierte oder transformierte körpereigene Zellen werden vom **T-Zellsystem** bekämpft. Während B-Zellen gelöste Antigene ohne weitere Bestandteile binden, erkennen T-Zellen ihr Antigen nur in Kooperation mit weiteren Kostimulatoren. Der T-Zellrezeptor-Komplex besteht aus dem spezifischen T-Zellrezeptor und der invariablen Komponente CD3. Er bindet Peptidfragmente von 8-20 Aminosäuren, die von der Zielzelle prozessiert und anschliessend über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Zytoplasmatische endogene Proteine werden in allen kernhaltigen Zellen in Proteasomen prozessiert und auf MHC-I-Molekülen an der Oberfläche präsentiert. Daneben existieren professionelle Antigen - präsentierende Zellen (APC), zu denen Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, B-Zellen und aktivierte T-Zellen zählen. Antigene werden von diesen APCs phagozytiert, lysosomal prozessiert und anschliessend sowohl auf MHC-I- als auch auf MHC-II- Molekülen präsentiert. Die Subtypen der T-Lymphozyten unterscheiden sich in ihren Oberflächenmarkern, auch cluster of differentiation (CD) genannt. Reife T-Zellen exprimieren als zusätzliche Adhäsionsmoleküle neben dem TCR entweder CD4 oder CD8, und binden dann respektive an MHC-II- bzw. MHC-I- Moleküle. CD4+-Zellen bilden die Gruppe der T-Helferzellen, CD8+-Zellen die der zytotoxischen T-Zellen. Als weiterer essentieller Kostimulator hat sich CD80 bzw. CD86 (B7.1 bzw. B7.2) auf der Zielzelle herausgestellt, welches an CD28 auf der T-Zelle bindet (sog. 2-Signal-Modell der T-Zellaktivierung, siehe Abb. 1). Bei Abwesenheit von CD28/CD80/CD86 wird die T-Zelle anergisch oder tolerant.

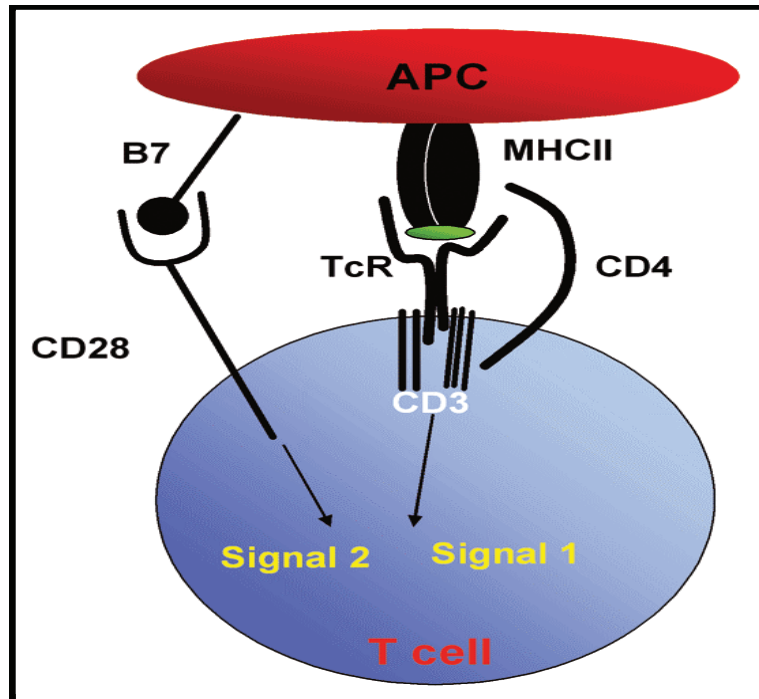


Abbildung 1: 2-Signal-Modell der T-Zellaktivierung

Quelle : Babraham Institute, K. Okkenhaug (www.babraham.ac.uk)

T-Zellen lassen sich je nach ihrer Zytokinexpression in **Subtypen** unterteilen. Vor allem für CD4⁺ - Zellen gezeigt, scheint auch für CD8⁺ - Zellen die gleiche Einteilung zu gelten. Der Theorie zufolge beginnen T-Zellen als precursor-Zellen, die IL-2 produzieren. Nach Aktivierung über Antigenkontakt werden diese zu Typ 0 - Zellen, die verschiedene Zytokine sezernieren können, unter anderem IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10. Je nach vorherrschendem Zytokin differenzieren die T-Zellen zu Typ-1- oder Typ-2- Zellen. Dominieren IFN- γ und IL-12 im umgebenden Milieu, entsteht Typ 1, der sich durch die Sekretion von IFN- γ charakterisiert und zu einer zellulären Immunantwort führt. Ein Überschuss an IL-4 und IL-10 fördert die Differenzierung zu Typ 2- Zellen, die IL-4 und IL-5 produzieren und eher eine humorale Immunantwort bedingen. Weiterhin gibt es eine Reihe von Zytokinen, die von beiden Typen produziert werden (IL-3, GM-CSF, TNF- α).

1.3.3 Zytokine

Zytokine sind sezernierte lösliche Faktoren, die den Ablauf der Immunantwort steuern bzw. modulieren, eine Zellyse auslösen sowie die Migration von Zellen steuern können. Sie können prinzipiell von allen Immunzellen und vielen weiteren Zellen produziert werden und werden in verschiedene Gruppen eingeteilt: Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren,

transformierende Wachstumsfaktoren, Kolonie-stimulierende Faktoren und Chemokine. Chemokine sind für die Chemotaxis und Leukozytenmigration verantwortlich und teilen sich in vier Gruppen, je nach Anzahl der zwischen den ersten Cysteinresten intervenierenden Aminosäuren, auf.

1.3.4 Modell Tumorabwehr

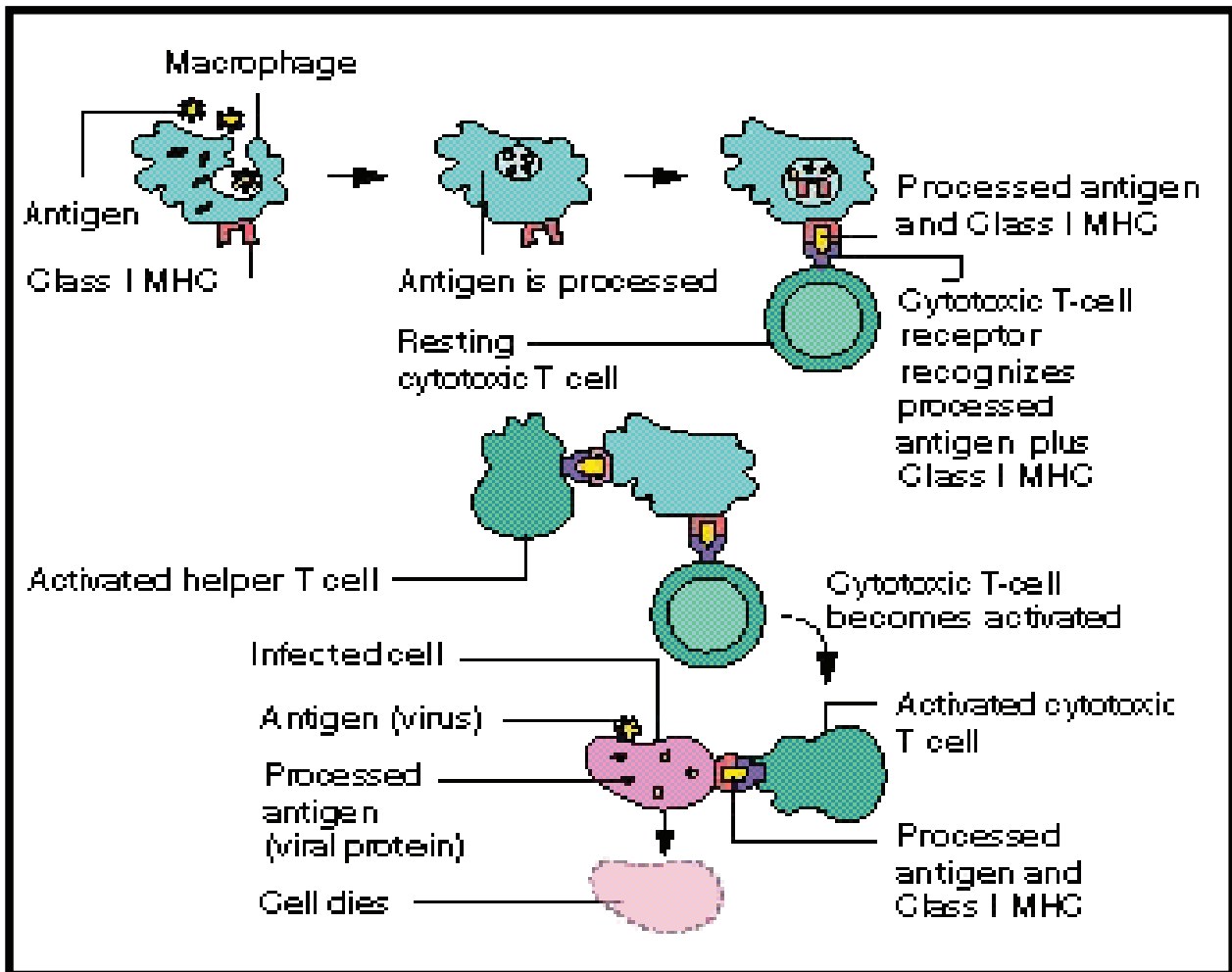


Abbildung 2: Immunantwort auf Tumorzellen (Quelle : <http://iba-go.com/streptamers>)

Durch Mechanismen wie MHC-I- Herunterregulierung sowie einem Mangel der Kostimulatoren B7.1 und B7.2 ist eine direkte Aktivierung von T-Zellen durch Tumorzellen nicht möglich, auch halten sich naive T-Zellen überwiegend in Lymphknoten auf. Somit muss eine Aktivierung über Cross-Priming erfolgen, was eine Interaktion von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und CD4+- / CD8+- Lymphozyten erfordert. Neben

Makrophagen sind dendritische Zellen die wichtigsten APCs, da sie eine hohe Dichte an MHC- und kostimulatorischen Molekülen, eine große Motilität und die Fähigkeit zur Produktion von immunstimulatorischen Zytokinen und Chemokinen aufweisen. Vor allem aber sind sie in der Lage, exogene Antigene über den MHC – I - Weg zu präsentieren und somit naive CD8+- T-Zellen zu stimulieren. Nach Aufnahme der Tumorzellen als Ganzes oder als apoptotische Körper präsentieren die APCs die prozessierten Tumorantigene auf MHC -I- und MHC -II- Molekülen und migrieren zum nächstgelegenen Lymphknoten. Dort treffen sie auf naive T-Zellen mit entsprechenden T-Zellrezeptoren und stimulieren diese zu klonaler Expansion und Differenzierung in Effektorzellen..

1.3.5 Zytolyse – Mechanismen

Nach Aktivierung der spezifischen T-Zellen wird in diesen die IL-2- und IL-2-Rezeptorexpression hochreguliert. Dies ist Voraussetzung für die weitere klonale Expansion, für Erhalt der Aktivierung und für die Differenzierung in zytotoxische T-Zellen (CTLs) und Gedächtniszellen.

Die **Migration** von sowohl tumorspezifischen T-Zellen als auch unspezifischen Immunzellen zu ihrem Wirkungsort ist zytokin- bzw. chemokinreguliert. Stimuliertes Endothel, Parenchym- und Tumorzellen können Zytokine / Chemokine sezernieren, welche einen Gradienten im Gefäßsystem bilden. Die Immunzellen migrieren entlang diesem Gradienten, werden anschliessend vom aktivierten Endothel über Adhäsionsmoleküle festgehalten und extravasieren durch das Endothel. Dieser Prozess ist antigen - unabhängig und unspezifisch.

Die **CTL - vermittelte Zytolyse** dagegen ist antigen-spezifisch und kontakt-abhängig. Die CTLs binden ihre Zielzelle über den gleichen Antigen-MHC-I-Komplex, der zu ihrer Aktivierung geführt hat, benötigen aber für die Zytolyse keine weiteren Kostimulatoren. Adhäsionsmoleküle wie CD2:LFA-3 oder LFA-1:ICAM-1 fördern aber die Konjugatbildung. Nach Bindung erfolgt der sogenannte „lethal hit“. Über eine Degranulierung werden Perforine und Granzyme, die sich in Granula im Zytoplasma der CTLs befinden, freigesetzt. Nach enzymatischer Polymerisierung der Perforinmoleküle formen diese Poren in der Membran der Zielzelle. Über die Poren gelangt die Serinprotease Granzym ins Zytoplasma der Zielzelle und triggert über Caspasen deren Apoptose. Außer über Perforin kann die Apoptose auch über den Fas / Fas – Liganden - pathway eingeleitet werden. Der Fas-Ligand (CD95L) ist ein Typ II - Membranprotein der TNF-Superfamilie auf aktivierten Lymphozyten, NK-Zellen, Plättchen u.a. und bindet die Zielzelle über den membranständigen Fas-Rezeptor (CD95).

Nach Erteilung des „lethal hits“ lösen sich die CTLs von der Zielzelle und stehen somit für weitere Lysen bereit. Beendet wird die Effektorreaktion durch Eliminierung des Antigens, da den CTLs damit der für das Überleben notwendige Stimulus fehlt. Die CTLs werden apoptotisch und nach deren Abbau wird auch die Zytokinproduktion und Entzündungsreaktion im Gewebe beendet.

Die CTLs sind neben diesen klassischen Effektormechanismen auch zur Sekretion von Zytokinen, vor allem TNF- α , Lymphotoxin und IFN- γ , fähig.

NK-Zellen sind, da sie fremde oder transformierte Zellen MHC - unabhängig erkennen, potentielle Kandidaten für die Vermittlung einer Tumorzellyse. Ihre Migration ist wie die der T-Zellen chemokin-abhängig, die Aktivierung jedoch nicht antigen-abhängig. Sie erfolgt auch nicht über einen Rezeptor allein, sondern als die Summe von aktivierenden und inhibierenden Signalen von mehreren Rezeptoren¹⁶. Aktivierende Rezeptoren sind Transmembranproteine mit kurzer intrazellulärer Domäne ohne intrinsische Aktivität, die über Adaptermoleküle an intrazelluläre Signaltransduktionswege gekoppelt sind und zu Zellüberleben, Zytokinproduktion und Zytotoxizität führen.

Es sind verschiedene **aktivierende** Rezeptoren beschrieben^{7,74}:

- NCRs (natural cytotoxicity receptors)
Bsp.: NKp30, NKp44 und NKp46
- IgG-Rezeptor CD16
- NKG2-Rezeptoren (Mensch) bzw. Ly49-Rezeptoren (Nagetiere)
- aktivierende MHC-I-spezifische Rezeptoren (p50/KIR2DS).

NKG2D (s.u.) tritt als Ausnahme sowohl beim Menschen als auch Nagetier auf

IL-2 fördert ebenfalls die zytolytische Aktivität von NK-Zellen¹¹⁸. **Inhibierend** wirken:

- KIRs (killer cell Ig-like receptors)
- KLRs (killer cell lectin-like receptors) beim Menschen
- ein Teil der Ly49-Gruppe bei der Maus.

Für die Antitumoraktivität von NK-Zellen spielt NKG2D eine besondere Rolle. Die Liganden MICA/MICB und ULBP (Mensch) bzw. RAE-1 und H60 (Maus) werden vermehrt von gestressten oder transformierten Zellen exprimiert. Analog zu den CTLs lysieren die NK-Zellen nach Ligandenbindung ihre Zielzellen entweder über das Perforin-Granzym-System oder über die Sekretion von Zytokinen, vornehmlich IFN- γ , TNF- α und GM-CSF.

Die Rolle von **Makrophagen** für die Tumorprogression oder -regression ist kontrovers⁸. Sie stellen als sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) den Hauptbestandteil des leukozytären Infiltrates von Tumoren dar und stammen von im peripheren Blut befindlichen

Monozyten ab. Die Migration der Monozyten zum Tumor ist vor allem durch von Tumoren produzierte Chemokine wie MCP-1, M-CSF sowie dem Faktor VEGF gesteuert. Klinische Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Korrelation zwischen Makrophageninfiltrat und klinischer Prognose. Zur Ausübung von Antitumorfunktionen müssen Makrophagen zunächst aktiviert werden, z. B. über Antikörper, IFN- γ oder LPS.

Nach Aktivierung können Makrophagen die Tumorzellen direkt lysieren oder aber andere Zellen über sezernierte Faktoren stimulieren. Die **direkte Zytotoxizität** teilt sich auf in „makrophage-mediated tumour cytotoxicity“ (MTC) und „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC). Der Lysemechanismus ist bei beiden ähnlich und wird über lytische Faktoren wie TNF- α , Serinproteasen und reaktive Stickstoffintermediates vermittelt. MTC ist ein langsamer, bis zu 3 Tage dauernder Prozess, während ADCC schneller abläuft, jedoch werden dazu Antitumor - Antikörper benötigt.

IFN- γ , z. B. von aktivierten T-Zellen sezerniert, regt Makrophagen zur Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies an.

Von den Makrophagen **sezernierte Faktoren**, die andere Zellen stimulieren können, sind die Matrixmetalloproteinasen MMP 7, 9, 12 und immunstimulatorische Chemokine wie GM-CSF, IL-12, IL-18 oder MIF.

Makrophagen tragen über pro-angiogenetische Effekte sowie die Sekretion diverser Wachstumsfaktoren auch zur **Tumorprogression** bei. Diese Funktionen werden überwiegend über Hypoxie vermittelt, welche ab einer bestimmten Größe von Tumoren durch den erhöhten Sauerstoffbedarf entsteht. Makrophagen werden besonders durch nekrotische Tumorzellen oder Makrophagen - Chemoattractants in diese Regionen gelockt und werden, vermittelt über Transkriptionsfaktoren wie HIF, zu verstärkter Expression bestimmter Gene wie VEGF oder TNF- α angeregt⁶⁵. Insgesamt scheinen aber in der Mehrzahl der Tumoren Tumorzellen und Makrophagen eine symbiontische Beziehung einzugehen.

1.4 Versagen der Immunantwort ?

Angesichts der verschiedenen möglichen Immunantworten wandte sich die Diskussion der Frage zu, warum keine davon effizient die Entstehung von Tumoren verhindern kann, obwohl prinzipiell eine Immunantwort gegen Tumoren möglich ist. Für die verschiedenen Zelltypen - T-Zellen, NK-Zellen sowie Makrophagen - bestehen dazu unterschiedliche Erklärungsansätze.

Was die spezifische Zytotoxizität über **T-Zellen** angeht, bestehen zwei Möglichkeiten. Entweder ist die generierte Immunantwort nicht stark genug, oder aber der Tumor entkommt

dieser. Es wurden deshalb die Theorien der Immunstimulation ⁴⁹ und des Immune-escape ⁵⁰ entwickelt.

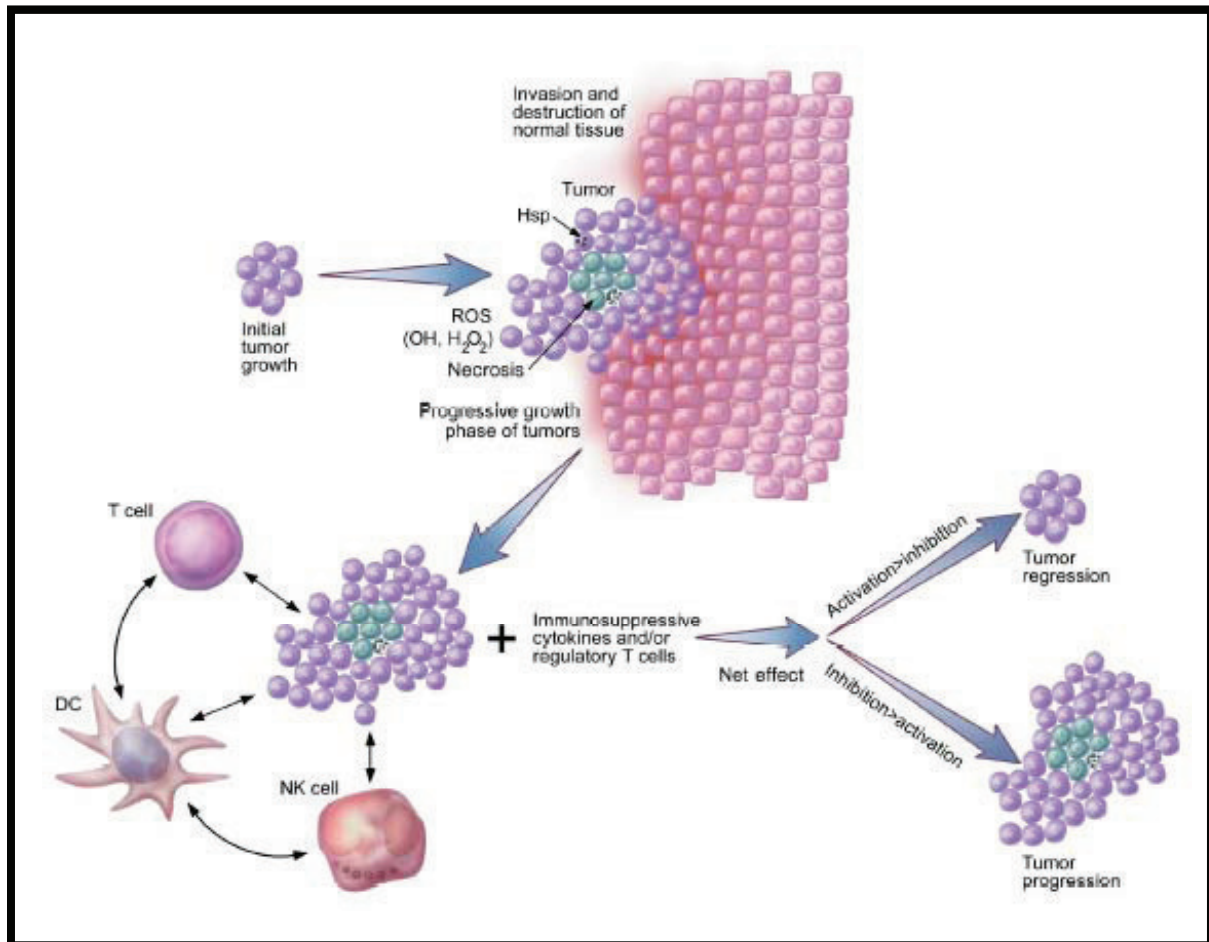


Abbildung 3: Immunstimulation (Immunaktivierung vs. Immunsuppression) (aus ⁶⁰)

Die Theorie der **Immunstimulation** besagt, dass eine zu schwache Immunantwort nicht nur nicht ausreicht, um den Tumor zu eliminieren, sondern dessen Wachstum sogar noch fördert. Bereits 1907 beobachteten Flexner und Jobling ein verstärktes Tumorstadium nach der Injektion von autologen abgetöteten Tumorzellen ³⁷. In den 50er Jahren wurden nicht-zytotoxische Antikörper für die Förderung des Tumorstadiums verantwortlich gemacht, indem sie an die Epitope binden und diese maskieren ⁵⁵. Mosmann und Coffman begründeten 1986 das Th1/Th2 - Paradigma, demzufolge zwei Typen von T-Helferzellen existieren. Typ 1 führt zu einer protektiven, zellvermittelten Immunantwort, Typ 2 dagegen zu einer nonprotektiven Antikörper-bestimmten Antwort ⁷⁶. Mit dem heutigen Wissensstand sind viele Mechanismen der Wachstumsförderung denkbar. Durch eine konstitutive Zytokin- und Chemokinexpression vieler Tumoren werden Leukozyten ins Tumorgebiet gelockt. Dort sezernieren die Leukozyten Wachstumsfaktoren, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies,

Proteasen, Prostaglandine und angiogenetische Wachstumsfaktoren. Die sezernierten Faktoren lösen ihrerseits wiederum verschiedene Reaktionen aus. Die Summe aller Reaktionen kann die Tumorprogression oder – regression zur Folge hat, je nachdem, ob aktivierende oder inhibierende Effekte auf das Immunsystem überwiegen. Nur bei ausreichender Aktivierung der T-Zellen sind deren Zytolysemechanismen stark genug, um die gleichzeitigen proliferativen Effekte zu überspielen.

Während bei der Immunstimulation die Ursache für das Scheitern auf Seiten des Immunsystems liegt, ist beim Konzept der **Immunescape** die Immunantwort zwar ausreichend, der Tumor verfügt aber über Mechanismen, dieser zu entkommen⁶⁰.

Folgende Mechanismen wurden schrittweise identifiziert:

- Natürliche Selektion von Tumorzellvarianten, die durch ihren Genotyp einen Überlebensvorteil besitzen. Durch die genetische Instabilität von Tumoren besteht ein grosser Pool an unterschiedlich ausgestatteten Tumorzellen, von denen die am wenigsten immunogenen überleben.
- Verlust oder Downregulierung von MHC -I- Molekülen (experimentell widersprüchlich)
- Verlust von Tumorantigenen und Immundominanz
- Mutationen im death receptor – Signalweg (Fas / Fasligand)
- Mangel an Kostimulatoren
- Immunsuppressive Zytokine
- Apoptose aktivierter T-Zellen
- T-Suppressor-Zellen
- T- regulatory Zellen (T_{reg} – Zellen)

Auch **NK-Zellen** können die Entstehung von Tumoren nicht effizient verhindern, obwohl viele Tumorarten den Rezeptor NKG2D exprimieren, über den Erkennung, Bindung und Zytolyse der Tumorzellen erfolgen kann. Hierfür sind verschiedene Ursachen denkbar¹⁶. Möglicherweise migrieren NK-Zellen gar nicht zu den Tumoren - in der Tat werden in histologischen Untersuchungen selten NK-Zellinfiltrate gefunden. Gelangen die NK-Zellen in die Tumorumgebung, können die Tumorzellen Abwehrmechanismen gegen diese entwickeln. Beispiele sind die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen (TGF- β , IL-10) oder die Expression von Fas-Ligand, was zur Apoptose von T- und NK-Zellen führt. Nicht alle Tumorzellen innerhalb eines Tumors exprimieren NKG2D-Liganden. Damit werden Liganden – negative Tumorzellen positiv selektiert. Ausserdem können Liganden – negative

Tumorzellen NK-Zellen über weitere Moleküle binden, ohne selbst lysiert zu werden, und blockieren so die NK-Zellen. Die NKG2D-Expression der NK-Zellen kann durch die Tumorzellinteraktion reguliert werden, sodass der Rezeptor moduliert, dysfunktionell oder desensitiviert wird. Oder aber es fehlen weitere kostimulatorische Signale, um eine effektive NK-Zellantwort zu generieren.

Die Rolle von **Makrophagen** wurde schon im vorherigen Kapitel erörtert. In der Mehrzahl der Tumoren scheinen Makrophagen eine symbiontische Beziehung mit dem Tumor einzugehen. Der Tumor lockt Makrophagen an, aktiviert diese und sichert deren Überleben über die Sekretion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Makrophagen ihrerseits sezernieren daraufhin proliferative und angiogenetische Faktoren und fördern so das Tumorstadium.

1.5 Angriffsstrategien

Zusammengefasst sind Tumoren immunogen und es bestehen verschiedene Antitumormechanismen. Diese sind jedoch nicht effizient, sonst würden keine Tumorerkrankungen auftreten. Aus dieser Situation entstand das Konzept, durch gezieltes therapeutisches Eingreifen eine effiziente Immunantwort gegen Tumore hervorzurufen. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene **Formen der Immuntherapie** entwickelt. Vom Wirkungsprinzip her lassen sich aktive von passiven Verfahren unterscheiden.

Ziel von **aktiver Immuntherapie** ist die Induktion einer intrinsischen Immunantwort gegen den Tumor. Dies kann spezifisch oder unspezifisch erfolgen.

Bei der **spezifischen Therapie** werden dem Immunsystem die entsprechenden Tumorantigene mit dem Ziel präsentiert, eine gegen sie direkt gerichtete lymphozytäre Immunreaktion zu generieren. Es wurden verschiedene Vakzineformen entwickelt ⁶. Tumorantigene als reine Peptide wurden oft in Kombination mit Adjuvantien wie LPS, IL-12 oder GM-CSF eingesetzt, um die chemotaktische Migration von Immunzellen zu fördern. Aus gleichem Grund wurden bestrahlte und damit proliferationsunfähige Tumorzellen viral infiziert bzw. mit Zytokinen transfiziert. Weiterhin können virale Vektoren oder auch nackte DNA in Form von Plasmiden als Vakzine eingesetzt werden. Ziel aller Verfahren ist die Aufnahme der Tumorantigene durch dendritische Zellen, die Antigenpräsentation auf deren Oberfläche und die anschließende Stimulation von T-Zellen (sog. Cross-Priming). Direkter sind daher Vakzinen aus gepulsten dendritischen Zellen.

Unter **einer unspezifischen aktiven Immuntherapie** versteht man die Gabe von Zytokinen wie z. B. IFN- α , IL-2, IL-12 und anti-CD3 oder Kostimulatoren wie GM-CSF mit dem Ziel,

das Immunsystem allgemein zu aktivieren. Da Zytokine nicht individuell, sondern im Verbund mit anderen Komponenten des Immunsystems wirken, ist der Einsatz einzelner Zytokine als Monotherapie nicht sinnvoll. Geeigneter sind Zytokine in Verbindung mit anderen Therapieformen zur Verstärkung der Antwort.

Bei der **passiven Immuntherapie** werden gegen den Tumor gerichtete Effektoren ausserhalb des tumor-tragenden Organismus generiert und diesem anschliessend verabreicht. Entsprechend der Einteilung des Immunsystems in zelluläres und humorales System können sowohl tumor-spezifische T-Zellen, als **adoptiver T-Zelltransfer** bezeichnet, als auch **Antikörper** als Produkte von B-Zellen eingesetzt werden. In Tiermodellen werden die tumor-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer in einem zum tumor-tragenden Tier syngenen Organismus generiert und in-vitro expandiert. Dazu werden dem Wirt Tumorzellen verabreicht und anschliessend aktivierte tumorspezifische T-Zellen z.B. aus regionalen Lymphknoten (TVDLN) geerntet. Nach entsprechender in-vitro- Expansion erhält das zu therapierende tumor-tragende Tier die Zellen mit dem Ziel einer direkten Tumorzelllyse. Im Menschen werden aus der Leukozytenfraktion des Blutes bzw. aus resezierten Lymphknoten tumorspezifische T-Zellen isoliert, ebenfalls expandiert und dem Wirt zurückgegeben.

Die Gabe von – meist monoklonalen - Antikörpern gegen Tumorantigene kann über verschiedene Aktionsmechanismen zur Tumorzelllyse führen. Neben direkten Effekten wie die Apoptoseinduktion oder die Blockade von Wachstumsfaktorrezeptoren treten auch indirekte Effekte auf, bei denen die eigentliche Zelllyse durch sekundär rekrutierte Immunkomponenten wie Monozyten / Makrophagen (ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) oder Komplementfaktoren (CDC = complement – dependent cytotoxicity) ausgelöst wird. Zusammengenommen führen passive Immuntherapien zu einer schnellen, starken und raschen, aber nicht nachhaltigen Immunantwort, da das Immunsystem des Organismus nicht involviert wird und so keine Gedächtniszellen gebildet werden.

Ziel aller bisher erprobter Ansätze war eine spezifisch gegen die Tumorzellen gerichtete und damit sowohl effektivere und schonendere Therapie als z.B. die Chemotherapie. Man erhoffte sich damit vor allem einen Durchbruch in der Behandlung von bisher als schwer oder unheilbar betrachteten metastasierten Tumorerkrankungen.

1.6 Bisherige Ergebnisse

Dies wurde bis heute nicht im gewünschten Ausmass erreicht. Zwar wurde teilweise eine Tumorreduktion, nicht aber komplette Remission erzielt. Statistisch belegt wurde dies durch Metaanalysen der bisher durchgeführten klinischen Studien ⁸⁹. Die summierten

Erfolgschancen liegen durchgehend im einstelligen Prozentbereich und sind damit statistisch nicht von den Wahrscheinlichkeiten für Spontanremissionen abzugrenzen. Tumorvakzinestudien des NCI mit 440 Patienten erbrachten eine Responderate von 2,6%, Ergebnisse weiterer Analysen lagen zwischen 1,9% und 3,8%. Zudem ist die Definition einer erfolgreichen Antwort problematisch. In der erwähnten Metaanalyse wurde eine „complete response“ als ein Rückgang der Summe der Produkte der Durchmesser aller Läsionen um 50 % bei nicht mehr als 25 %igem Wachstum jeder einzelnen Läsion sowie dem Nichtauftreten jeglicher neuen Läsion definiert. Dies war bereits strenger als der sonst verwendete 30%ige Rückgang der Tumormasse neben keinem Neuauftauchen und Wachstum anderer Läsionen. Klinisch reicht jedoch auch diese reduzierte Tumorlast aus, um nach Ende der Immuntherapie zu Progredienz des Tumorleidens zu führen, falls nicht eine Lyse der verbleibenden Zellen über andere Mechanismen erfolgt. Es ist damit keine durchschlagende Änderung betreffend des Gesamtüberlebens zu erwarten.

1.7 Untersuchung am Modell

Die genannten Formen der Immuntherapie wurden mithilfe von Tiermodellen entworfen und auf ihre Wirksamkeit getestet. Nachdem die Ergebnisse dabei vielversprechend ausfielen, wurden die Ansätze in die Klinik übertragen. Hierbei überraschte die große Diskrepanz hinsichtlich der Erfolgsraten, in den klinischen Studien konnten nicht annähernd gleiche Effekte erzielt werden.

Ein Weg zur Erklärung der beobachteten Diskrepanz ist eine genauere Analyse der Vorgänge im Tiermodell. Dazu ist ein Modell auszuwählen, welches insbesondere die Metastasierungsphase umfasst, und die eingesetzte Immuntherapie sollte effizient und reproduzierbar die Entstehung von Metastasen verhindern.

Bei den meisten soliden Tumoren sind T-Zellen hauptverantwortlich für die Immunreaktion. Ausnahme sind hämatologische Neoplasien, bei denen vor allem Antikörper beteiligt sind. Dies wurde durch den Nachweis von tumorspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten gezeigt, was auch die generelle Immunogenität von Tumoren bestätigt. Als Therapieform bietet sich damit ein adoptiver Transfer von T-Zellen an, Ziel ist die Steigerung der E/T-Ratio. Hintergedanke ist, dass das Scheitern primär quantitativ durch eine zu geringe Zahl an tumorspezifischen T-Zellen zu erklären ist.

Als konkretes Tiermodell bietet sich ein aggressiv wachsender Subtyp des B16-Melanoms in der Maus an. Dieser führt nach intravenöser Gabe über die Schwanzvene zur Entstehung von

Lungenmetastasen. Neben schnellem Wachstum und damit einfacher Handhabung ist die Pigmentierung und somit leichte Überprüfbarkeit des Tumorwachstums von Vorteil. Die für den adoptiven Transfer benötigten CTLs können durch die subkutane Injektion von GM-CSF-transformierten B16-Zellen in syngene Mäuse aus den tumorvakzine-drainierenden Lymphknoten (TVDLN) gewonnen werden. GM-CSF fördert die Immunogenität über eine Aktivierung von dendritischen Zellen. Nach Entnahme der tumorvakzine-drainierenden Lymphknoten werden aus diesen T-Zellen gewonnen und in-vitro mit anti-CD3 und IL-2 expandiert. Zum adoptiven Transfer werden die kultivierten tumorspezifischen T-Zellen anschliessend -B16 – Mäusen verabreicht, die nach i.v.- Injektion von B16-Melanomzellen Lungenmetastasen entwickelt haben.

Die meisten biologischen Prozesse beinhalten eine Änderung der Expression von beteiligten Genen. Daher ist ein Weg, um die Mechanismen während und nach einer Immuntherapie im Tier darzustellen, die Verwendung von Genexpressionsanalysen mittels PCR oder der Arraytechnologie. Mittels sequentieller Analysen können die Vorgänge über die Zeit verfolgt und so Anhalte für die nacheinander ablaufenden Schritte gewonnen werden. Im beschriebenen B16-Mausmodell sollen dazu die Lungen entnommen werden, aus diesen ein Zellysat hergestellt werden und nach der Isolierung von Gesamt-mRNA diese untersucht werden. Hieran sollten dann die folgenden Fragen beantwortet werde

1.8 Fragestellung

1. Wie verändert sich die Expression von Indikatormolekülen der Zytotoxizität in der Lunge nach Tumor- und T-Zellgabe?

Zur Orientierung über den zeitlichen Rahmen sollen Verlaufskurven erstellt werden, mithilfe derer Tumorwachstum (Pmel), T-Zellverhalten (IFN- γ), Zytotoxizitätsmechanismen (Fas-Ligand, Perforin, Granzym A), Beteiligung des angeborenen Immunsystems (NKG2D, TRANCE) und Sekretion von Zytokinen (IL-6, TNF- α) verfolgt werden.

2. Gibt es Hinweise auf die Stimulation einer sekundären Immunantwort durch die T-Zelltherapie ?

Zunächst soll das Chemokinmuster der Tumor- und tumorspezifischen T-Zellen bestimmt werden. Anschliessend erfolgt die Analyse der Chemokinexpression in den Lungen von sowohl nur tumortragenden als auch therapierten Mäusen. Ziel ist die Identifizierung von an der Migration von weiteren Zellen involvierten Chemokinen, die sowohl durch die Tumor- als auch durch tumorspezifischen T-Zellen und die erfolgte T-Zellantwort nach adoptivem Transfer sezerniert werden können.

3. Welche sequentiellen Veränderungen ergeben sich in der Gesamt-Genexpression nach adoptivem Transfer ?

Mithilfe der Affymetrixtechnologie soll neben den ausgewählten Parametern das gesamte Mäusegenom analysiert werden. Damit bietet sich die Möglichkeit, sowohl Pathwayanalysen durchzuführen als auch Gene zu identifizieren, deren Zusammenhang mit den genannten Prozessen bisher nicht gezeigt wurde, deren Funktion nicht bekannt war oder die bei der Auswahl nicht berücksichtigt wurden, aber sowohl für die T-Zellvermittelte Zytolyse als auch für Sekundärreaktionen inflammatorischer oder immunologischer Art eine Rolle spielen. Aufgrund der Datenmenge sind spezielle Datamining-Techniken sowie Analyseprogramme erforderlich.

2 Material und Methoden

2.1 Überblick

Reaktionen, die in einem Organismus ablaufen, können biochemisch über verschiedene Wege vermittelt sein. Beispiele sind Änderungen in der Transkription von beteiligten Genen, Änderungen in der Stabilität von Proteinen oder eine Mobilisierung von intrazellulären Molekülen an die Zelloberfläche. In dieser Studie wird als Methode eine Analyse der Genexpression gewählt, um Hinweise auf das Geschehen in der Lunge nach Tumor- und T-Zell-Injektion zu gewinnen. Dabei wird ein dreistufiger Versuchsaufbau verwendet. Zur Orientierung dienen Verlaufskurven von einigen ausgewählten Parametern, welche mithilfe der RT-PCR nach RNA-Isolierung aus der Lunge und semiquantitativer Auswertung über die Bandenintensität erstellt werden.

Tabelle 3: beobachtete Gene

mbACTIN als housekeeping gene

mPmel als Tumormarker

IFN- γ als ein von T-Zellen sezerniertes Zytokin

Fas-Ligand, Perforin und **Granzym** als mögliche Effektormoleküle der Zytolyse

IL-6 als Wachstumsfaktor für Antikörper-produzierende B-Lymphozyten

TNF- α als multifunktionales Zytokin:

Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten, Stimulation zur Sekretion von Chemokinen und zur Expression neuer Oberflächenrezeptoren am Endothel, Apoptoseinduktion

TRANCE als TNF related activation induced chemokine

NKG2D als Oberflächenmolekül der NK- und T-Zellen, welches geschädigte Zellen erkennt

Mithilfe der aus den Daten erstellten Verlaufskurven lassen sich die entscheidenden Zeitpunkte definieren, an denen sich die Expression der Gene und damit die zugrundeliegenden Reaktionen in den verschiedenen Gruppen unterscheiden. Durch Array-Analysen dieser Zeitpunkte lassen sich mehr Gene gleichzeitig darstellen und somit ein

umfassenderes Bild gewinnen, wobei zunächst mit einem Programmarray Chemokine und deren Rezeptoren und anschliessend das gesamte Mäusegenom mithilfe des Affymetrix-Genchips untersucht werden.

Durch Bildung von vier Gruppen, in denen die Mäuse a) nur Tumorzellen b) nur tumorspezifische T-Zellen, c) sowohl Tumor- als auch T-Zellen und d) als Sham-Gruppe keine Zellen erhalten, lassen sich die unterschiedlichen Entwicklungen anhand der exprimierten mRNA nachvollziehen.

2.2 Material

2.2.1 Tiere

Eingesetzt werden weibliche Mäuse des Stammes C57Bl6 mit einem mittleren Alter von 10-12 Wochen. Diese stammen zum Grossteil aus der Eigenzucht und teilweise von der Fa. Charles River (Sulzfeld).

2.2.2 Zellen

Für das Therapiemodell wird die Zelllinie B16BL6-D5 eingesetzt, ein wenig immunogener Subklon des spontan wachsenden murinen B16BL6 Melanoms. Da kaum MHC I und keinerlei MHC II auf der Zelloberfläche exprimiert wird, kann keine CD4+- und nur eine schwache CD8+- T-Zellantwort induziert werden.

Zur Immunisierung wird eine GM-CSF transfizierte B16BL6-D5-Variante (D5G6) verwendet. GM-CSF ist ein hämatologischer Wachstumsfaktor, der die Produktion von Neutrophilen und Monozyten im Knochenmark erhöht und die Reifung von dendritischen Zellen fördert und wird in den D5G6 Zellen konstitutiv sezerniert (~ 200ng GM-CSF/ml/10⁶ Zellen/24 h). Beide Zelllinien wurden von BA Fox vom Earle A. Chiles Research Institute, Portland, bezogen.

2.2.3 Substanzen

Die folgende Tabelle gibt eine Gesamtübersicht der verwendeten Substanzen nebst Bezugsquelle in alphabetischer Reihenfolge:

Tabelle 4: Liste der verwendeten Substanzen in alphabetischer Reihenfolge

Substanz	Quelle
2-Mercaptoethanol	Fa. Merck
Agarose	Fa. Promega
Agfa Curix 60 incl. Entwickler und Fixierer	
Anti-CD3 (Arbeitslösung 200mg/ml)	Earle A. Chiles Research Institute, Portland
Biotin-16-dUTP, 50nmol	Fa. Roche
Chemilumineszenz- Detektionskit	Superarray/ Fa. Biomol
<ul style="list-style-type: none"> • GEAblocking solution • Waschpuffer F und G • CDP-Star- Chemilumineszenzsubstrat 	
dNTP-Mix	Fa. Eppendorf
jeweils 10mM dATP, dCTP, dGTP,	
dTTP	
Ethanol 96%	Fa. Merck
Ethidiumbromid	Fa. Roth
First-Strand-Puffer	Fa. Gibco BRL
Gene Array Kit: Chemokine und Rezeptoren	SuperArray, Fa. Biomol
<ul style="list-style-type: none"> • GEArray Q Membranen • GEprimer mix A • GEhyb Hybridisierungslösung 	
Gene Ruler™ DNA Ladder 100 bp	Fa. MBI Fermentas
Gentamycin (40mg/ml)	Apotheke , GH
IL-2	Earle A. Chiles Research Institute, Portland
Lachssperma –DNA, 10mg/ml	Fa. Invitrogen
LoadingDye	Fa. MBI Fermentas
MgCl ₂	Fa. PAN-Systems GmbH
M-MLV-RT 200U/μl	Fa. Gibco BRL
Oligo p(dT)15-Primer	Fa. Roche
PAN-DNA-Polymerase 5U/μl	Fa. PAN-Systems GmbH
PAN-PCR-Puffer	Fa. PAN-Systems GmbH
PBS	gepufferte NaCl-Lösung
Primer, genspezifisch	von MWG synthetisiert
	mFasLigand: Inst. für Klinische Chemie
RNA later	Fa. Sigma

RNA-Isolierungskit	Nucleospin RNAII Fa. Macherey- Nagel
RNase-freies H ₂ O (DMDC-H ₂ O)	
RNase-Inhibitor , 30U/μl	Fa. Eppendorf
Robocycler 40 Gradient	Fa. Stratagene
RPMI 1640 Kulturmedium, 10% FCS (Fa. Gibco) zugesetzt	Fa. Gibco
RT-Labeling Puffer	Fa. biomol
<ul style="list-style-type: none"> • GEAlabeling buffer BN 5x • Stop solution C 10x 	
SDS 20%	(200g Natriumdodecylsulfat in 1l H ₂ O)
SSC 20x	(175,3g NaCl + 88,2g Natriumcitratdihydrat in 1l H ₂ O, pH 7)
TAE (Tris / Acetic acid /EDTA)	40mM Tris-Azetat, 1mM EDTA, pH8.0
Thermocycler	Fa. Perkin Elmer
TRIS-Puffer (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)	Fa. Serva
Trypsin/ EDTA	Fa. Gibco
WST	Fa. Roche

Tabelle 5: Primersequenzen

Gen	Primersequenzen	Temperatur	Zykluszahl
mTRANCE	f 5'-GGT GGT CTG CAG CAT CGC TC-3' r 5'- GTC TGT AGG TAC GCT TCC CG-3'	58	30-35
mIL-6	f 5'-GAG AGG AGA CTT CAC AGA GG-3' r 5'-ACT CCT TCT GTG ACT CCA GC-3'	58	25-30
IFN-g	f 5'-CAC ACT GCA TCT TGG CTT TGC-3' r 5'-CCT TTT TCG CCT TGC TGT TGC-3'	60	25-30
TNF a	f 5'-GTG CCT ATG TCT CAG CCT CT-3' r 5'- GCA AAT CGG CTG ACG GTG TG-3'	58	25-30
mFasLigand	f 5'-AAT TAC CCA TGT CCC CAG ATC-3' r 5'- GCT GCT GTG GGC CCA TAT CTG-3'	58	35-40
mbACTIN	f 5'-GGA CTC CTA TGT GGG TGA CGA GG-3' r 5'-GGG AGA GCA TAG CCC TCG TAG AT-3'	64	17-22
mPmel17	f 5'-CTG GAG TCG GGC TCA GTC AC-3'	60	30-35

	r 5'-CAG AAG GCC TTG TGG GTG TG-3'		
mNKG2D	f 5'-GAC CTC AAG CCA GCA AAG TG-3'	60	25-30
	r 5'-AGG AAG CTT GGC TCT GGT TG-3'		
mGzma	f 5'-GGT GGT GAC TGC TGC CCA CT-3'	62	30-35
	r 5'-GGT CCC CTG CAC AAA TCA TG-3'		
mPRF1	f 5'-CTG AAT GGG CTC ACA GCT GA-3'	64	25-30
	r 5'-CTC TGT CGT GGG CAG CAG TC-3'		

2.3 Mäusemodell im Überblick

Tabelle 6: Zeitplan Mäusemodell

A - Immunisierung	
Tag 1	subkutane Injektion von D5G6 an die Aussenseiten aller vier Extremitäten Wachstum eines subkutanen B16 Melanoms
Tag 9	Entnahme der tumordrainierenden Lymphknoten Isolierung der T-Zellen aus den Lymphknoten Stimulation in vitro durch anti-CD3
Tag 11	Expansion der T-Zellen in vitro mit IL-2
Tag 14	Ernte der T-Zellen
B - adoptiver Transfer	
Tag 1	i.v. Injektion von D5 in die Schwanzvene
Tag 4	i.v. Injektion der T-Zellen in die Schwanzvene
Tag 4-9	jeweils Entnahme der Lungen und Konservierung in RNA later
<p>Gruppen :</p> <p>A Kontrolle nur Tumor</p> <p>B Kontrolle nur T- Zellen</p> <p>C Tumor & T- Zellen</p>	

2.3.1 Vorbereitung der Zellen zur Injektion

Die Herstellung der Zelllösung für sowohl D5 als auch D5G6 - Zellen erfolgt nach gleichem Protokoll. Beide Zelllinien wachsen adhärent in der Kulturflasche. Durch Trypsinierung werden die Zellen abgelöst und in PBS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer und erneuter Zentrifugation wird die gewünschte Konzentration durch Resuspension der Zellen in der entsprechenden Menge Medium eingestellt (siehe Tabelle).

Tabelle 7: Vorbereitung der Zellen für die Injektion

- Entfernen des Mediums
- Waschen der Zellen mit 10 ml PBS
- Gabe von 2ml Trypsinlösung auf die Zellen
- 5 min Inkubation bei 37° C im Brutschrank
- Zusatz von 8ml PBS
- Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer
- Zentrifugation der Zelllösung bei 40' , 10 min
- Abgiessen des Überstandes
- Resuspension des Zellpellets in RPMI Medium

2.3.2 Generierung der T-Zellen

Zunächst müssen tumorspezifische T-Zellen für den adoptiven Transfer generiert werden. Dazu wird eine Tumorstoffimpfung mit D5G6 Melanomzellen der Konzentration von 2×10^7 Zellen / ml verwendet. Die Injektion erfolgt subkutan an den vier Extremitätenaussenseiten, pro Stelle werden 10^6 Zellen in 50 μ l gegeben. Es ist darauf zu achten, nicht in die Nähe der regionalen Lymphknoten zu gelangen. Nach achttägigem Wachstum haben sich an der Injektionsstelle sichtbare Tumoren gebildet. Die regionalen Lymphknoten (TVDLN) sind durch Aktivierung der entsprechenden T-Zellen deutlich vergrößert.

Die Lymphknotenentnahme hat steril zu erfolgen, dazu werden die Instrumente in Alkohollösung und die entnommenen Lymphknoten in mit Gentamycin zugesetztem PBS (50 μ g Gentamycin/ ml PBS) aufbewahrt. Nach kurzer Äthernarkose werden die Tiere durch Überstreckung des Genicks getötet und in Alkohollösung desinfiziert. Die gut sichtbaren Lymphknoten werden entnommen und bis zur weiteren Präparation in PBS/ Gentamycin gelagert.

2.3.3 Kultivierung

Tabelle 8: Kultivierung der T-Zellen

- Homogenisierung des Gewebes
- Waschen der Zellen mit PBS
- Zählung der Zellen und Einstellung der gewünschten Konzentration
- Zugabe von Gentamycin und anti-CD3
- Kultivierung über 2 Tage
- Zugabe von IL-2
- Injektion der T-Zellen nach drei Tagen

Zur *in vitro* - Kultivierung und Expansion der tumorspezifischen T-Zellen wird eine Einzelzellsuspension aus den Lymphknoten gewonnen. Dazu werden die Lymphknoten mit einer Pipette in einen Homogenisator überführt und etwa 5-10ml des PBS- / Gentamycin-Gemisches zugegeben. Der Abstand zwischen Kolben und Aussenwand des Homogenisators wird so gewählt, dass er dem Durchmesser einer T-Zelle entspricht und so bei Auf- und Abbewegen des Kolbens das Gewebe zerkleinert wird, ohne die T-Zellen zu beschädigen. Eventuell übrigbleibende Gewebereste können über ein Sieb mit einer Porengrösse von 90µl abgetrennt werden.

Nach einem Waschvorgang werden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und in mit Gentamycin versetztem Medium auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zur Expansion werden die Zellen über 3 Tage mit anti-CD3 (5µg/ml) und anschliessend über 2 Tage mit IL-2 (60U/ml) inkubiert und anschliessend als aktivierte CTLs für den adoptiven Transfer verwendet.

2.3.4 Zytotoxizitätsassays der T-Zellen

Mithilfe von Zytotoxizitätsassays wird die Fähigkeit der CTLs zur Tumorlyse getestet. Dazu wird den Tumorzellen WST-1 (Tetrazolium-Salz) gegeben, welches von vitalen Tumorzellen umgesetzt wird. Das Produkt emittiert ein optisches Signal, welches bei 450 / 690 nm densitometrisch detektiert werden kann.

Nach Anfertigung einer Eichkurve (OD bei 450/690 nm gegen die Konzentration der Tumorzellanzahl) wird eine unterschiedliche Zahl von CTLs zu Tumorzellen gegeben und nach jeweils gleicher Inkubationszeit die OD gemessen. Mithilfe der Eichkurve kann daraus

die Anzahl der überlebenden Tumorzellen bestimmt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Zählung der überlebenden Tumorzellen. Mit diesem Test kann in-vitro die Effizienz der CTLs getestet sowie die benötigte E/T-Ratio bestimmt werden.

2.3.5 Therapiemodell

Syngenen C57/B6 Mäusen werden 2×10^5 in 100 μ l RPMI Medium suspendierte Zellen in die Schwanzvene injiziert, zur Venendilatation werden die Tiere vorher unter Infrarotlicht gelagert. Bei Injektion ist auf Blasenfreiheit zu achten, da es sonst zu einer Luftembolie kommt. Drei Tage später erfolgt entsprechend die Gabe der T-Zellen, pro Tier $3,5 \times 10^7$ Zellen in 100 μ l RPMI.

Nach Injektion der T-Zellen erhalten die Therapie- und T-Zell- Kontrollgruppe zur Stimulation täglich 90.000 Einheiten IL-2 intraperitoneal.

Für die Lungenentnahme werden die Tiere wie für die Lymphknotenentnahme getötet und die Lungen steril entnommen. Die Lagerung erfolgt in RNA later bei 4°C.

2.4 Genexpressionsanalyse

2.4.1 RNA-Isolierung

Bei Arbeiten mit RNA muss zur Verhinderung einer Degradierung RNAsen-frei gearbeitet und RNase-Inhibitoren eingesetzt werden. Für die RNA-Isolierung wird das Kit Nucleospin RNA II der Fa. Macherey-Nagel verwendet, welches die folgenden Substanzen umfasst:

Tabelle 9: Inhalt Nucleospin RNA II (Fa. Macherey-Nagel)

RA1 - Lysepuffer
MDB-Puffer
DNaseI-Lösung
RA2 - DNase-Stopp-Lösung
RA3 - Waschpuffer
RNase-freies H ₂ O (DMDC-H ₂ O)

Die Isolierung erfolgt gemäss den Angaben des Herstellers. Vor dem eigentlichen Isolierungsprozess wird ein Zelllysate aus den Lungen hergestellt. Dazu wird ca. 25 mg Gewebe mit 600 μ l des Lysepuffers RA1 und 6 μ l % β -Mercaptoethanol versetzt und sofort für

15 Sekunden homogenisiert. Zwischen der Homogenisierung der verschiedenen Gewebeproben erfolgt eine Behandlung des Homogenisators mit RNA later sowie ein dreifacher Waschgang mit Aqua dest.

Nach Abtrennung der grösseren Partikel mittels des Nucleospin Filters wird das Zelllysate 1 min bei 11000xg zentrifugiert. Anschliessend wird das Filtrat mit 600 µl 70%ige Ethanol-Lösung versetzt und die Gesamtlösung in zwei Schritten auf die Säule überführt, mit je 30 Sek. Zentrifugation bei 8000 × g. Durch anschliessende Zugabe von 350ml MDB-Puffer und 1 Min. Zentrifugation mit 11000 × g werden alle Stoffe ausser DNA und RNA eluiert. Zum DNA - Verdau wird die Säule mit 95µl einer DNase-I-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wird durch 200µl DNase-Stopp-Lösung (RA2) die Reaktion beendet. Nach einem zweifachen Waschgang mit 600µl sowie 250 µl RA3 wird die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Konzentration der RNA wird über eine Messung der Lichtabsorption bei 260nm bestimmt, 1 AU (absorption unit) entspricht dabei einer Konzentration von 30µg/ml. Die Reinheit der RNA wird über eine Messung bei 280nm bestimmt, welches vor allem die Kontamination der RNA mit Proteinen wiedergibt. Aus den Werten wird der $^{260}/_{280}$ - Quotient bestimmt, Werte unter 1,6 sprechen für eine Kontamination mit Proteinen, Werte über 2,0 für eine Degradation der RNA. Die Integrität der RNA wird zusätzlich anhand der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wird jeweils 0,5µg RNA, mit DMDC-H₂O auf 10µl verdünnt, auf ein 1%iges Agarose-Gel gegeben. Nach einer Laufzeit von 30 min bei 120 V/80 A werden die Banden mithilfe von Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Eine intakte RNA weist zwei klar abgegrenzte Banden auf, was den 28S - und 18S - Einheiten der ribosomalen RNA entspricht. Aufgrund der geringen Menge ist mRNA nicht detektierbar.

RNA sollte stets bei -80°C aufbewahrt werden, bei Verwendung auf Eis gelagert sein und für den Pipettiervorgang selbst sollten eisgekühlte Eppendorffröhrchen eingesetzt werden.

2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Ziel der PCR ist die spezifische Amplifikation ausgewählter Gene mithilfe von genspezifischen Oligonukleotidprimern (Angabe siehe Tabelle) sowie den Enzymen Reverse Transkriptase für die cDNA-Synthese (RT-PCR) und einer hitzestabilen Polymerase für die PCR. Damit lässt sich die mRNA-Expression von Genen sehr sensibel quantifizieren.

2.4.2.1 cDNA-Synthese

Erster Schritt ist die Synthese von cDNA. Die isolierte RNA dient dabei als Matrize, zu der mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (aus murinem Leukämievirus bzw. Myeloblastosevirus vom Affen) ein komplementärer Strang erstellt wird. Als Primer wird hier ein Oligo(dT)-Primer eingesetzt, welcher an den poly-(A)-Schwanz, den alle mRNA-Transkripte aufweisen, bindet. Es entsteht ein RNA/cDNA-Strang, der anschliessend als Matrize für die eigentliche PCR dient.

Zur Herstellung von 30µl cDNA werden 2µg RNA mit DMDC-H₂O auf 19,5 µl verdünnt und anschliessend der Ansatz 3 min bei 75°C inkubiert, kurz zentrifugiert und sofort auf Eis gelagert. Zur Erstellung des Synthesemixes werden pro Probe benötigt:

Tabelle 10: Synthesemix für cDNA

- ◆ 1 µl Oligo(dT)-Primer,
- ◆ 6 µl First-Strand-Puffer (5x),
- ◆ 1,5 µl dNTP-Mix,
- ◆ 1 µl RNase-Inhibitor
- ◆ 1 µl M-MLV-RT.

Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wird jeweils 10,5 µl des Mixes zu jeder RNA-Probe gegeben, diese erneut gemischt und zentrifugiert. Zur eigentlichen cDNA-Synthese wird das Gemisch für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschliessend für 10 Minuten bei 95°C inaktiviert. Gelagert wird cDNA bei -80°C.

2.4.2.2 PCR

Als Matrize dient am Anfang der RNA/cDNA-Strang, im weiteren alle entstandenen Transkripte. Der Vorgang verläuft in Zyklen, aus denen jeweils die doppelte Zahl an Transkripten hervorgeht. Jeder Zyklus besteht aus den Phasen thermische Denaturierung, Annealing, Synthese und Kühlen. Durch die thermische Denaturierung bei 94°C entstehen einzelsträngige DNA-Matrizen. Während des Annealings hybridisieren die synthetischen Oligonukleotidprimer mit den komplementären Sequenzen; die Annealingtemperatur liegt je nach Primer zwischen 58°C und 64°C. Anschliessend wird der Genabschnitt amplifiziert, indem die Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase, an die Primer bindet und in 3'-Richtung komplementär zur Matrize einen Strang synthetisiert. Bei der Wahl der

Zykluszahl muss auf die Sättigungsgrenze geachtet werden. Oberhalb dieser ist eine Verdopplung der Transkripte je Zyklus nicht mehr gewährleistet. Auch bei der anschliessenden densitometrischen Konzentrationsmessung und Analyse per Agarosegel besteht eine Sättigungsgrenze. Zur Sicherung der Auswertbarkeit werden neben der Primeraustestung vor den eigentlichen Versuchsreihen stets zwei Zykluszahlen im Abstand von 5 gewählt.

Zur Herstellung werden pro Probe folgende Substanzen benötigt:

Tabelle 11: PCR-Ansatz

- ◆ 37,8µl DMDC-H₂O,
- ◆ 5 µl PAN-PCR-Puffer,
- ◆ 1,5 µl MgCl₂,
- ◆ 0,5 µl dNTP-Mix,
- ◆ je 1µl Primer f/r,
- ◆ 0,2 µl DNA-Polymerase

Nach Mischen und Zentrifugieren wird jeweils 47 µl vom Mix in die PCR-Tubes gegeben und 3 µl der cDNA-Lösung zugegeben. Nach erneutem Mischen und Zentrifugieren werden pro Tube 2 Tropfen RNase-freies Öl zugegeben, was das Verdampfen von Flüssigkeit in den Tubes bei den hohen Temperaturen verhindert.

Für die PCR wird ein Thermocycler der Fa. Stratagene verwendet, dieser umfasst vier Blöcke für die vier Phasen mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Das konkrete Programm lautet:

Tabelle 12: PCR-Zyklus

60 sec , 94°C	1× Prädenaturierung
45sec 94° C, 45sec T(Annealing), 60sec 72°C	Denaturierung, Annealing, Synthese
10min, 72°C	Elongation

Nach Erreichen der niedrigeren Zykluszahl wird von allen Proben 10 µl als 1. Abnahme entnommen; dabei ist auf eine ölfreie Entnahme zu achten. Anschliessend werden die restlichen fünf Zyklen durchgeführt.

2.4.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Nach der PCR wird das erhaltene Reaktionsgemisch im Agarosegel entlang eines Dichtegradienten aufgetrennt. Je nach Transkriptlänge und damit unterschiedlicher Masse wandern die Amplikate unterschiedlich weit und formen Banden. Diese werden mit Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Licht sichtbar gemacht.

Das Agarosegel wird aus 1% Agarose und TAE-Puffer 0,5 bzw. 1g Agarose auf 50 bzw. 100 ml TAE hergestellt. Hierbei entstehen Poren der Grösse 150 nm, womit Genfragmente zwischen 0,5 und 7 kb aufgetrennt werden. Nach Erhitzen unter ständigem Rühren bis zum Siedepunkt wird das Gemisch abgekühlt und 2 bzw. 5µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Der entstandene Agar wird blasenfrei in die Genkammer gegossen und die entsprechenden Kämme eingesteckt. Nach Abkühlung und Auspolymerisierung wird das Gel in TAE-Puffer gelagert. Zum Beladen der Taschen werden pro Probe 10µl des Reaktionsproduktes mit 2µl Loading Dye (75% Glycerol, 25% Bromphenol + Xylene cyanol FF) eingesetzt und abschliessend noch 2,5µl bzw. 5µl Ethidiumbromid in die Kammer gegeben. Anschliessend wird für zweimal 35 Minuten ein Strom von 90V und 70A (midi Gel) bzw. 80V und 60A (mini Gel) angelegt und zwischen den beiden Phasen die 1. Abnahme aufgetragen.

Die Darstellung der Banden und Auswertung erfolgt mit einer CCD-Kamera bei UV-Licht der Wellenlänge 254nm und dem Bildauswertungsprogramm BioCapt.

2.4.2.4 Auswertung

Zur Bestimmung der Bandenintensität wird das Programm Bio1D verwendet, welches die Banden in einzelne Pixel unterteilt und die Helligkeit jedes einzelnen in 256 Stufen misst. Nach Summation ergeben sich Zahlenwerte, die zwecks Vergleichbarkeit zwischen den Gelen zunächst auf den Marker bezogen und anschliessend für den zugehörigen ACTIN-Wert normalisiert werden.

Zur deskriptiven Beschreibung der Daten wird der Median als Lagemass sowie der Quartilsabstand als Streuungsmass verwendet. Vorteile dieser Parameter sind ihre relative Unempfindlichkeit gegenüber Ausreissern, die in biologischen Systemen, vor allem bei kleinen Fallzahlen, ein Problem darstellen. Aus Gründen der Übersicht sind in den Diagrammen des Ergebnisteiles nur die Mediane sowie Signifikanzen aufgetragen; im Anhang finden sich die Zahlenwerte für sowohl Mediane und Interquartilsabstände als auch die Standardmasse Mittelwert und Standardabweichung.

Zur Signifikanzanalyse wird der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney mit einer Signifikanzschranke von $p < 0,05$ verwendet. Dies ist ein nichtparametrischer Test für zwei unverbundene Stichproben, d.h. die Verteilung der Grundgesamtheiten kann beliebig sein.

2.4.3 Programmarrays

2.4.3.1 Übersicht

Die DNA-Array-Technologie ermöglicht mit einem Experiment die gleichzeitige Analyse vieler Gene. Programmarrays zeichnen sich durch eine Auswahl von Genen aus, welche mit einem bestimmten biologischen Prozess assoziiert sind, wie hier Chemokine und ihre Rezeptoren. Der Array selbst besteht aus einer Nylonmembran, auf der cDNA-Einzelstrang-Fragmente der jeweiligen Gene aufgetragen sind. Die Bindung zwischen den gespotteten Fragmenten und in der Probe vorhandener Biotin-markierter komplementärer cDNA erfolgt in der Hybridisierungsreaktion. Zur Kontrolle der Spezifität des gebundenen Genfragments ist jedes Gen vierfach aufgetragen. Der Nachweis erfolgt über die Bindung von alkalische Phosphatase- konjugiertem Streptavidin. Bei enzymatischer Umsetzung des zugegebenen Substrats entsteht sichtbares Licht, welches auf Röntgenfilmen aufgenommen wird.

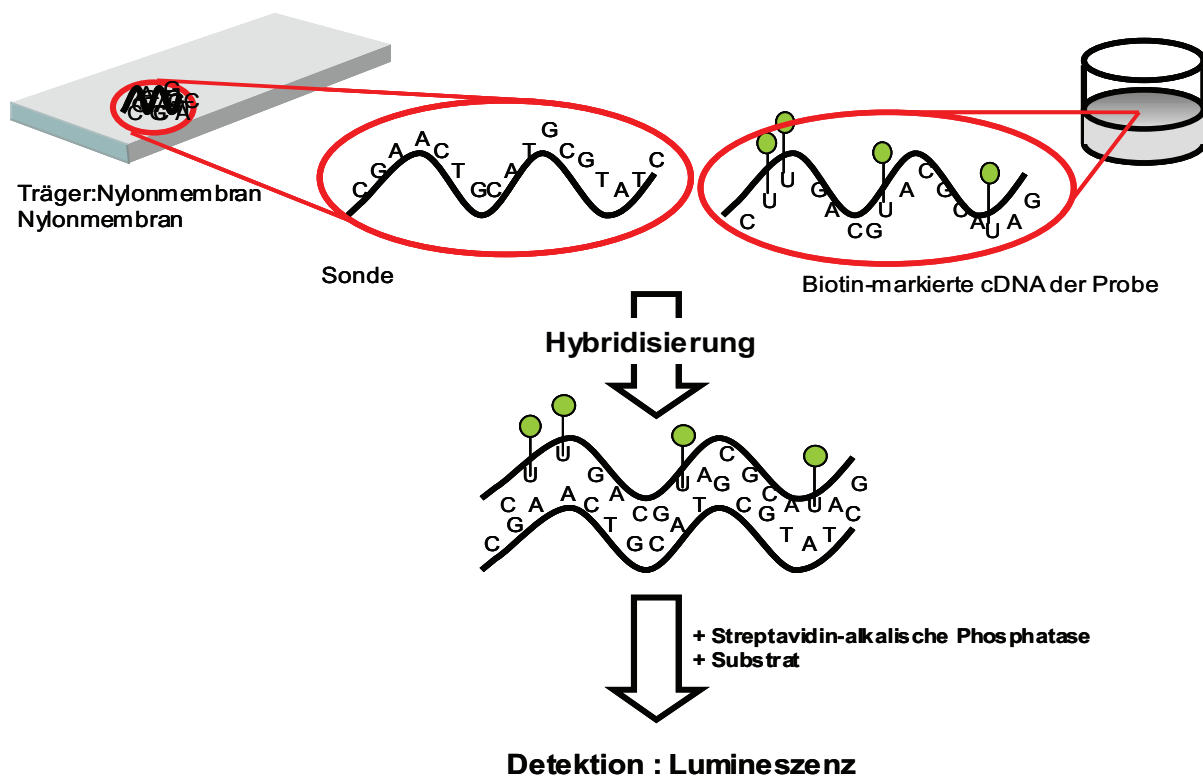


Abbildung 4: Prinzip Arraytechnologie

Tabelle 13: Übersicht Programmarray

- Synthese Biotin-markierter cDNA
- Prüfen der Labelling-Effizienz
- Prähybridisierung
- Hybridisierung über Nacht
- Waschvorgänge
- Chemilumineszenz-Detektion
- Analyse

2.4.3.2 Synthese Biotin-markierter cDNA

Um die statistische Aussagekraft der Arraydaten zu erhöhen, erfolgt die cDNA - Synthese an gepoolter RNA aus 6 Tieren pro Gruppe. Bei jeweils 0,35µg eingesetzter RNA pro Tier ergibt dies pro Zeitpunkt und Gruppe eine Gesamtmenge von 2,1µg RNA pro Array.

Die Synthese Biotin-markierter cDNA läuft ähnlich wie bei der PCR ab. Unterschiede sind der Einsatz von für den Array genspezifischen Primern zur Reduktion des Hintergrundes und die Zugabe von Biotin-dUTP zur Markierung neben den üblichen Nukleotiden.

Zur Denaturierung der RNA wird pro Array folgender Annealing –Mix angesetzt:

Tabelle 14: Annealing-Mix

- ◆ 2,1µg RNA in Konzentrations-abhängigem Volumen,
- ◆ 3µl Puffer A (genspezifische Primer)
- ◆ H₂O zum Auffüllen auf 10µl.

Nach 3minütiger Inkubation bei 70°C zur linearen Ausrichtung der RNA erfolgt die Anlagerung der Primer (2min, 42°C) und anschliessend die sofortige Lagerung auf Eis. Zur cDNA-Synthese bedarf es pro Probe:

Tabelle 15: Synthese-Mix

- ◆ 2µl DMDC-H₂O
- ◆ 4µl Puffer BN (Reaktionspuffer mit Sequenz-spezifischen Primern)
- ◆ 2µl Biotin-dUTP
- ◆ 1µl RNase-Inhibitor
- ◆ 1µl Reverse Transkriptase .

Nach Erwärmen des Synthese-Mixes auf 42°C wird dieser zum Annealing-Mix gegeben und das Gemisch 90min bei 42°C inkubiert. Nach Beenden der Reaktion durch 2µl Stopplösung erfolgt eine erneute Denaturierung bei 94 °C über 5min.

2.4.3.3 Prüfung der Labelling-Effizienz

Zur Kontrolle der Intaktheit der RNA sowie der Labelling-Effizienz wird eine geringe Menge an cDNA in einer Serienverdünnung auf eine Nylonmembran aufgetragen und anschliessend gemäss dem Protokoll zur Chemilumineszenzdetektion verfahren.

Für die Serienverdünnung werden 1µl cDNA in 19µl 1× Loading Dye gegeben und anschliessend 3µl dieser Stufe mit 9µl 1×Loading Dye vermischt. Der letzte Schritt ist insgesamt viermal durchzuführen, sodass sich Verdünnungen von 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280 und 1:5160 ergeben. Pro Verdünnungsstufe werden je zwei Spots von 1µl sowie eine Kontrolle auf eine Nylonmembran aufgetragen. Nach 10minütigem Trocknen wird die Membran mit 2×SSC angefeuchtet, auf ein ebenfalls mit 2×SSC getränktes Filterpapier gelegt und zur Quervernetzung mit UV-Licht der Stärke 1200J behandelt. Die anschliessenden Schritte finden sich unter Kapitel 2.4.3.7, Chemilumineszenzdetektion des Arrays, beschrieben, beginnend mit Zugabe der GEAblocking solution.

2.4.3.4 Prähybridisierung

Bei gut erhaltener und markierter cDNA kann der Array gestartet werden: nach Anfeuchtung mit DMDC-H₂O müssen unspezifische Bindungsstellen mit Lachssperma-DNA blockiert werden. Dazu wird die GEA - Hybridisierungslösung auf 60°C vorgewärmt sowie 30µl Lachssperma-DNA 5 Minuten bei 100°C gekocht und sofort auf Eis gelagert. Mischen der Lachssperma-DNA mit 3ml GEA - Hybridisierungslösung ergibt das GEApreehyb, welches bei 60°C gelagert wird. Nach Abgiessen von DMDC-H₂O und Zugabe von 2ml des GEApreehybs erfolgt die Prähybridisierung über 2 Stunden bei 60 °C.

2.4.3.5 Hybridisierung

Im Anschluss daran folgt die eigentliche Hybridisierung des Arrays mit der Hybridisierungslösung über Nacht. Hierzu wird die verbliebene cDNA zu 750µl vorgewärmtem GEApreehyb gegeben und das entstandene GEAhbyb in die Hybridisierungsröhre gefüllt. Wichtig ist eine gleichmässige Verteilung über die gesamte Membran, um ein Austrocknen der Membran und eine daraus resultierende starke Hintergrundfärbung zu vermeiden.

2.4.3.6 Waschvorgänge

Am nächsten Tag erfolgen die Waschschrirte: Nach Vorwärmen der Waschlösung 1 (100ml 20× SSC+100ml 10% SDS pro Liter) und Waschlösung 2 (5ml 20× SSC + 50ml 10% SDS pro Liter) auf 60°C wird das GEHyb entfernt und die Membran je zweimal mit 5ml der Waschlösungen für 15 Minuten bei 60°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

2.4.3.7 Chemolumineszenzdetektion

Für die folgenden Schritte wird der Hybridisierungssofen auf Raumtemperatur abgekühlt, die Substanzen GEAblocking solution und Puffer F auf 37°C erwärmt und folgende Inkubationsschritte durchgeführt:

Tabelle 16: Hybridisierung

- 40min mit 2ml GEAblocking solution (Vermeidung von unspezifischen Bindungen)
- 10min mit 2ml Streptavidin-AP
- 4 Waschschrirte mit 5x verdünntem Puffer F
- zweimaliges Ausschwenken mit Puffer G
- 5min Inkubation mit 1 ml Substrat

Nach Abgiessen des Substrates wird der Array in Plastikfolie verpackt. Die Visualisierung erfolgt mithilfe von Röntgenfilmen, initial wird dazu eine Expositionszeit von 2-3 Minuten gewählt, anschliessend folgen je nach Intensität des Blots weitere Aufnahmen bei unterschiedlichen Expositionszeiten.

2.4.3.8 Analyse

Die Röntgenfilme werden per Durchlichtscanner mit einer Auflösung von 600dpi digitalisiert. Zur Gewinnung der Rohdaten kommen die Programme ScanAnalyse sowie GEArray zum Einsatz. Mit ScanAnalyse werden aus den digitalisierten Bildern die Lichtintensitäten der einzelnen Gene bestimmt und anschliessend können mit der kommerziellen Software GEAnalyzer die Werte für die Hintergründe korrigiert sowie auf ein Housekeeping-Gen normalisiert werden. In unserem Fall wird die manuelle Weiterverarbeitung der Daten gewählt. Dazu wird für jedes Gen der einzelnen Arraybilder der individuelle Hintergrund bestimmt und so das Verfahren unabhängiger von ungleichmäßigen Hintergründen gemacht. Anschliessend erfolgt die Normalisierung für das Housekeeping - Gen GAPDH. GAPDH

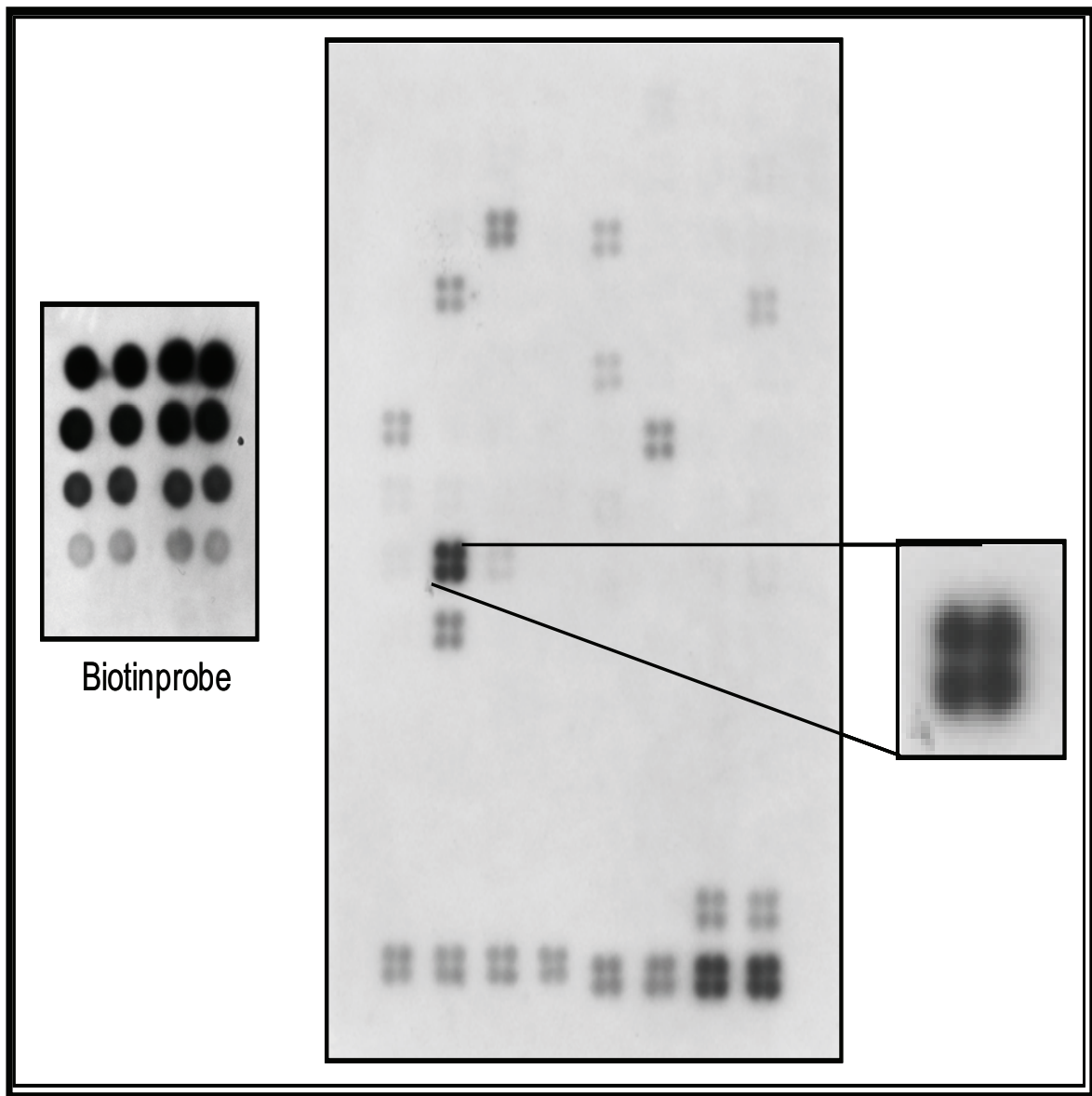


Abbildung 5: Beispiel Programmarray

weist bei den durchgeführten Probe-Arrays eine mittlere Expression auf und wird deswegen den anderen Housekeeping-Genen des Arrays vorgezogen. Um sicherzugehen, dass nur richtig-positive Werte berücksichtigt werden, werden nur die Gene mit in die Diskussion einbezogen, die zumindest auf einem Array ein sichtbares Signal mit allen vier Punkten aufweisen.

Tabelle 17: Analyse der Programmarrays

- Aufnahme des Bildes
- Einscannen des Bildes

- Analyse über ScanAlyse und GEAnalyzer → Gewinnung der Rohdaten
- Hintergrundanalyse
- Korrektur der Rohdaten bzgl. des Hintergrundes
- Normalisierung der korrigierten Rohdaten mit dem Median von GapDH
- Auswahl der auf den Arraybildern sichtbaren Gene (alle 4 Spots müssen vorhanden sein)
- Andere Werte werden gleich Null gesetzt

2.4.4 Affymetrix

2.4.4.1 Übersicht

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Programmarrays umfasst der Affymetrix-Chip das gesamte Mäusegenom. Zur Herstellung werden Oligonukleotidproben auf einer Glasplatte direkt mittels Photolithographie synthetisiert. Am Ende befinden sich in jeder Probenzelle mehrere Millionen Kopien des Oligonukleotids als Sonde für das jeweilige Gen. Grundsätzlich unterscheidet sich das weitere Verfahren nicht von dem der Programmarrays: Biotin-markierte cDNA wird mit dem Array hybridisiert, anschliessend der Chip mit Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugaten gefärbt und bei Exzitationswellenlängen von 488nm gescannt, wobei jede Probenzelle proportional zu der gebundenen Probenmenge Licht der Wellenlänge 570nm emittiert.

Für die geplante Verlaufsbeobachtung der Therapiegruppe wird aus den Lungen isolierte RNA der Tage 1 bis 5 nach T-Zell-Injektion verwendet. Die RNA wird hierzu jeweils aus 6 Tieren gepoolt (Gesamtmenge pro Array 3,0 µg).

Es folgt nur ein grober Überblick über das Verfahren, da nach dem Herstellermanual verfahren wird.

Tabelle 18: Übersicht Affymetrix

- Synthese von doppelsträngiger cDNA aus gesamter RNA
- In-vitro Transkription (IVT): Biotinmarkierung (ds-DNA → Biotinmarkierte cRNA)
- Fragmentierung der cRNA
- Hybridisierung über Nacht
- Fluidics Station: Wasch- und Färbevorgänge
- Scannen des Arrays und Auswertung

Nach Herstellung der Biotin-markierten cRNA werden die Proben in die Fluidics - Station gegeben, in der alle weiteren Schritte ablaufen. Der Fortschritt der Hybridisierung und Auswertung kann anhand des Programms GCOS verfolgt werden. Nach Einscannen des Arrays wird ein image file angelegt (.dat), aus dem die Intensitäten der einzelnen Zellen berechnet und als .cel file gespeichert werden. Die Analyse dieser Daten erfolgt in GCOS.

2.4.4.2 Rohdaten des Affymetrix-Chips

Für jedes Gen befinden sich auf dem Array eine Anzahl an Zellen, die die gleichen Transkripte des Gens enthalten. Zusätzlich befindet sich neben jeder als Perfectmatch bezeichneten Zelle eine zweite Zelle, die die gleichen Transkripte mit einer abgeänderten Base in der Mitte enthält, als sogenanntes Mismatch. Jeweils eine Zelle Perfectmatch (PM) und Mismatch (MM) ergeben ein probe pair. Bindung von DNA-Sequenzen an Perfectmatch - Transkripte entspricht einer spezifischen, Bindung an Mismatch - Transkripte einer unspezifischen Bindung. Für die einzelnen Zellen werden die Raw Cell Intensities bestimmt. Anschliessend wird einerseits zur Bestimmung des Signals jeder Zelle der Background des Arrays subtrahiert, dies ergibt die Background-adjusted Intensities. Der Detection Call gibt Antwort auf die Frage, ob ein Gen sich in der Probe befindet oder nicht. Dazu werden jeweils PM und MM eines probe pairs verglichen. Unterscheiden sich diese nicht, scheidet dieses probe pair für die Berechnung aus. Unterscheidet sich PM von MM (wobei $PM > MM$ einem Vorhandensein des zu interessierenden Gentranskripts entspricht), wird die statistische Signifikanz dieses Unterschiedes bestimmt. Dazu wird mittels Wilcoxon-Test der p-Wert des Unterschiedes zwischen PM und MM berechnet, hierzu wird α_1 als falsch positives und α_2 als falsch negatives Signal gewählt. Zur Klassifizierung als present (P), marginal (M) oder absent (A) gilt: $p < \alpha_1 = \text{present}$, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass ein als present klassifiziertes Gen nicht vorhanden ist, ist kleiner als α_1 . Für absent gilt $p > \alpha_2$, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass ein als absent klassifiziertes Gen doch vorhanden ist, ist kleiner als α_2 .

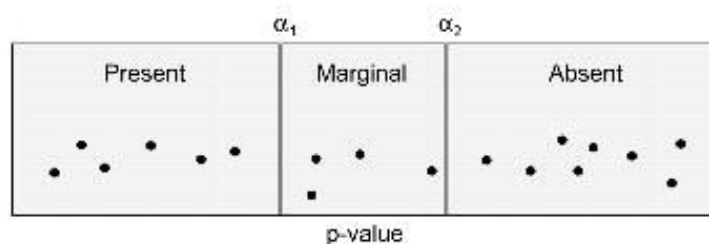


Abbildung 6: Bestimmung des Detection Calls

Der Detection Call wird für jedes Gen aus den sich diskriminant unterscheidenden probe pairs bestimmt. Mit den Werten Signal, Detection Call und p-Value sowie der Anzahl der verwendeten probe pairs sind alle Werte der Single- Array- Analysis bestimmt und die Generierung der Rohdaten abgeschlossen.

2.4.4.3 Datenweiterverarbeitung

Mit diesem Schritt ist die Generierung der Rohdaten abgeschlossen. Es muss nun die Auswertung, Analyse und Interpretation erfolgen, wofür angesichts der grossen Datenmenge weitere Tools benötigt werden.

Dieser Prozess wird data mining genannt, hier eine Definition:

Data mining sits at the interface between statistics, computer science, artificial intelligence, machine learning, database management and data visualization (to name some of the fields). Data mining is the process of identifying valid, novel, potentially useful, and ultimately comprehensible knowledge from data (bases).

The main part of data mining is concerned with the analysis of data and the use of software techniques for finding patterns and regularities in sets of data.

Folgende Schritte sind notwendig:

- Identifizierung von signifikant regulierten Genen (Filterung)
- Identifizierung von globalen Mustern der Genexpression
- Bestimmung der biologischen Bedeutung von sowohl einzelnen Genen als auch Gengruppen

2.4.4.3.1 Filterprozess

Nach Erhalt der Rohdaten bieten sich zwei weitere Vorgehensweisen an, entweder eine Single- Array- Analysis oder eine Comparison- Array- Analysis. Bei einer Single- Array- Analysis wird nur eine Probe für sich betrachtet; bei der Comparison- Array- Analysis hingegen eine Probe als Referenz definiert und die restlichen Proben auf diese bezogen. In GCOS werden zwei verschiedene Algorithmen verwendet, um die Signifikanz der Änderung zu bestimmen und diese zu quantifizieren. Für die Signifikanz wird ein Change - p - value bestimmt und die Veränderung in increase (I), minimal increase (MI), no change (NC), minimal decrease (MD) und decrease (D) eingeteilt. Ein zweiter Algorithmus ergibt eine quantitative Schätzung der Änderung in Form einer Signal Log Ratio.

Im vorliegenden Versuch werden die Gene in drei Schritten selektiert, zunächst nur jene mit increase (I) oder decrease (D), in einem zweiten strengeren Filterschritt alle Gene mit

einem mindestens 1,5fachen Anstieg gegenüber der Kontrollprobe an mindestens einem Tag. Als Kontrollprobe dient Tag 1 nach T-Zellinjektion. Im dritten Schritt wird der Detection Call berücksichtigt und nur die Gene einbezogen, die mindestens an einem Tag einen present call aufweisen.

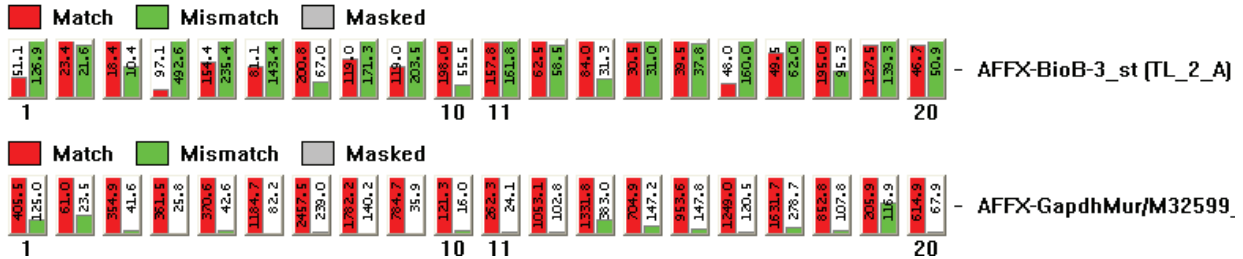


Abbildung 7: Skala Match-Mismatch zur Berechnung des Detection Calls

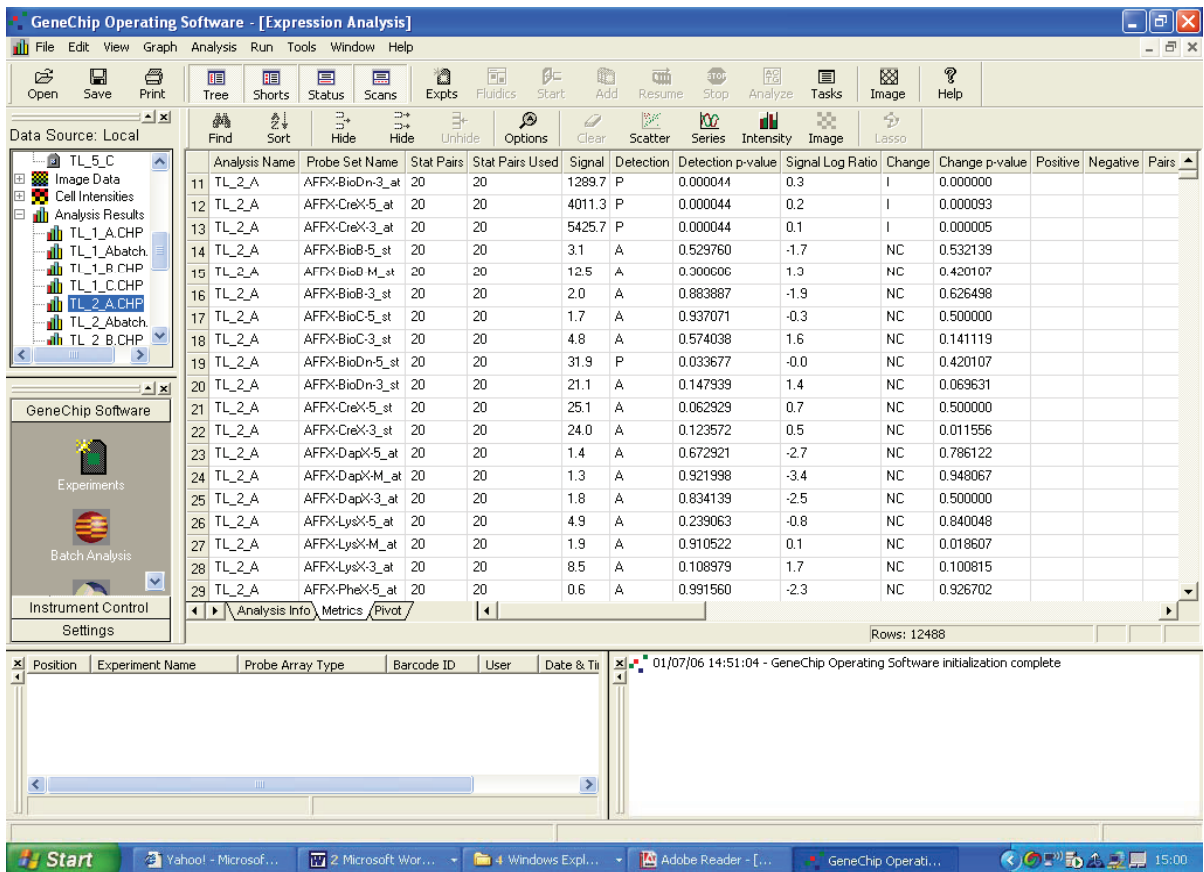


Abbildung 8: GCOS - Interface der Comparison – Array - Analysis

2.4.4.3.2 Globale Muster der Genexpression

Nach Selektion der signifikant veränderten Gene werden an diesen Analysen durchgeführt, um Muster von Genexpressionsveränderungen zu erkennen. Unterstützend hierbei sind angesichts der Datenmenge spezielle Auswertungsprogramme und graphische Darstellungen. Es gibt sowohl kommerzielle als auch nicht-kommerzielle Programme, Beispiele sind GCOS, Genesifter, GeneMaths XT, GenePattern, GeneSpring GX, Expression Profiler u.a. Verwendet wird das Affymetrix-eigene Programm GCOS sowie Genesifter. Es folgt ein kurze Darstellung der Grundprinzipien der weiteren Auswertung mithilfe von PCA und Clustering, Ziel ist vor allem die Gruppierung in Gene mit ähnlichen Verläufen.

2.4.4.3.2.1 PCA

Vor weiteren Analyseschritten ist die Reduzierung der Dimensionalität eines Datensatzes von Vorteil. Bei n herausgefilterten Genen und i Proben (= i Werten) kann durch die sogenannte PCA (principal components analysis) die Dimension i verringert werden. Grundlage des Verfahrens ist die Bildung von Kovarianzen der einzelnen Proben = Variablen und anschliessend die Anwendung von Eigenvektorenalgebra. Es werden nur die ersten Eigenvektoren = Hauptkomponenten verwendet; der Informationsverlust ist dabei gering. So lassen sich die Arraydaten in einem Diagramm darstellen. Jeder Datensatz sprich Gen ist durch zwei Koordinaten und damit einem Punkt repräsentiert.

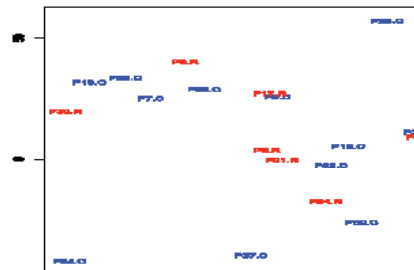


Abbildung 9: PCA-Analyse

2.4.4.3.2.2 Hierarchisches Clustern

Beim hierarchischen Clustern werden alle Gene in einem Cluster geordnet. Prinzip ist, je ähnlicher die Muster zweier Gene und damit je näher diese im Diagramm der PCA liegen, desto näher sind sie auch im Dendrogramm platziert. Mithilfe der Länge der Äste kann abgeschätzt werden, wieviele Gemeinsamkeiten Gene in ihrer Expression aufweisen

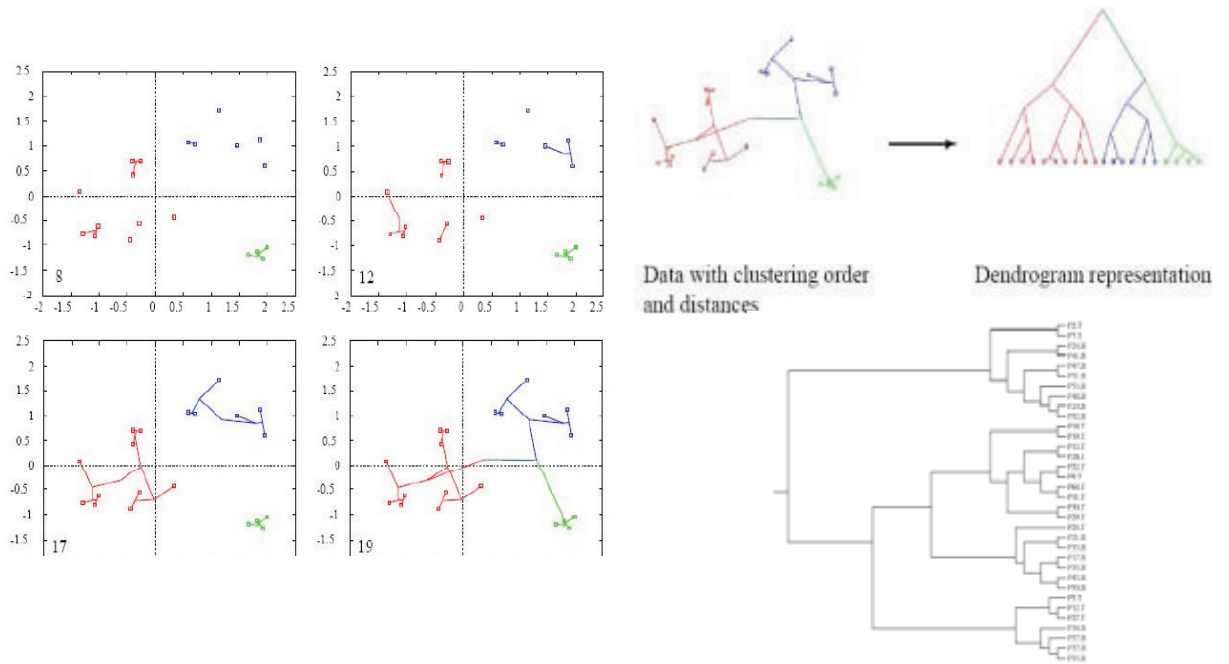


Abbildung 10: Erstellen eines hierarchischen Dendrogrammes nach PCA

2.4.4.3.2.3 *Partitionelles Clustern*

Bei der zweiten Art des Clusters, dem partitionellen oder k-mean Clustern, werden die Daten zunächst in k Cluster aufgeteilt. Dabei kann k geschätzt oder aus der PCA-Analyse bestimmt werden. Ziel ist, Gruppen mit mehr oder weniger ähnlichem Expressionsprofil zu bilden und die Gene der Gruppen aufzulisten.

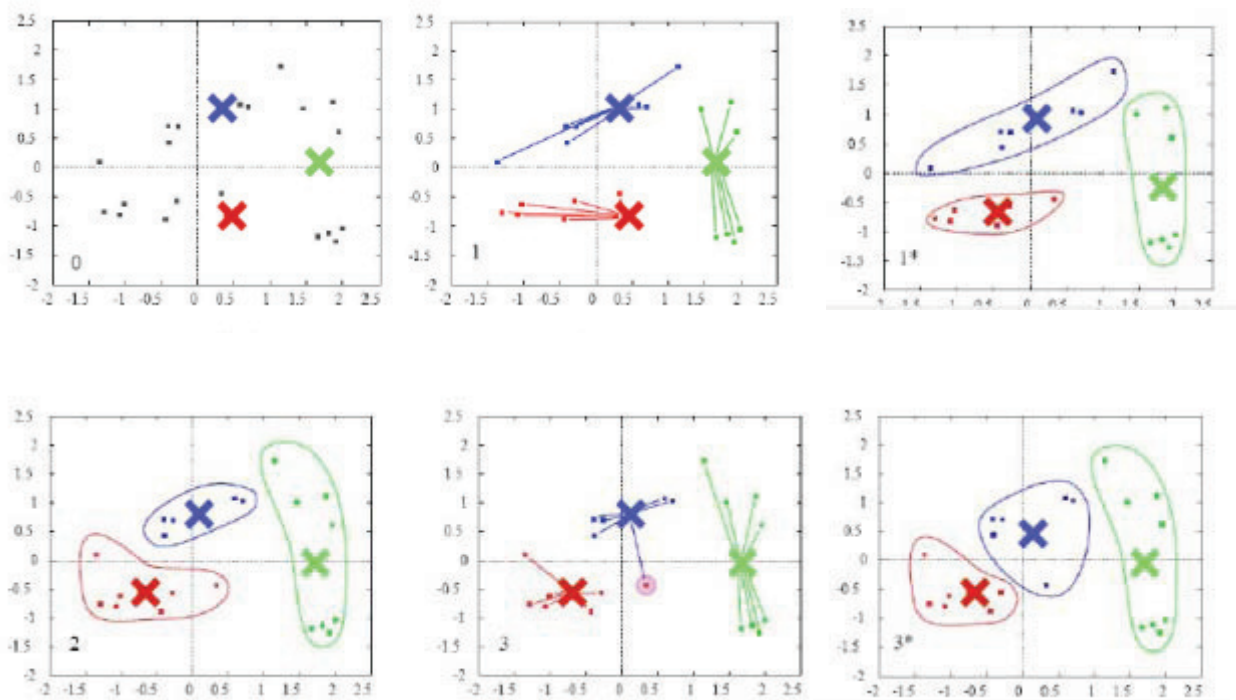


Abbildung 11: k-mean Clustering mit k=3

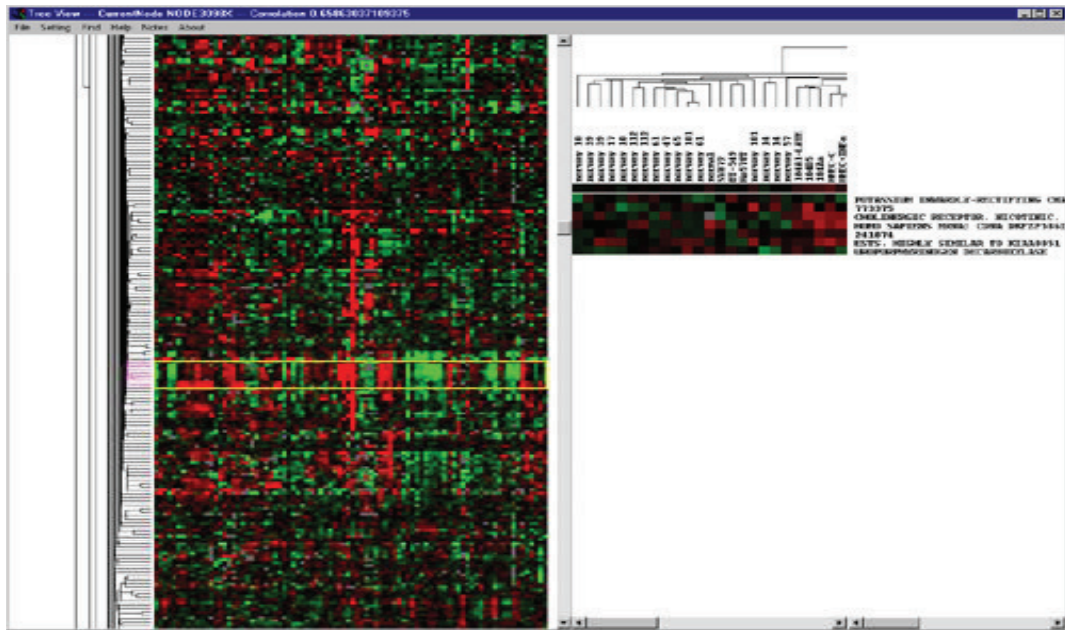


Abbildung 12: Programm "TreeView"

Basierend auf dem hierarchischen Clustering können die Daten stammbaumartig und farblich kodiert dargestellt werden. Diese Analyseformen sind besonders für Gesamtgenomanalysen ein sehr gängiges Verfahren und können mit Programmen wie zum Beispiel TreeView durchgeführt werden.

2.4.4.3.3 Biologische Bedeutung der unterschiedlich exprimierten Gene

2.4.4.3.3.1 *Ontologiereport*

Die selektierten und gruppierten Gene können anschliessend einzeln oder global mit Techniken wie der Genontologie auf ihre Funktionen untersucht werden. Unter Ontologie versteht man ein geordnetes Vokabularium für die Beschreibung von molekularer Funktion, biologischen Prozessen und zellulären Komponenten der Genprodukte. Ein Gen kann jeweils bestimmten Begriffen in dieser Aufstellung zugeordnet werden. Mithilfe von Programmen lassen sich alle Gene der erstellten Liste zu den einzelnen Begriffen zuordnen und so ein Überblick über die beteiligten Prozesse gegeben werden, indem die Anzahl der Gene bestimmt wird, die eine bestimmte Ontologie aufweisen. Diese Zusammenfassung wird ontology report genannt. Ein weiterer Schritt sind pathways reports, in denen die Gene aufgelistet werden, die einem bestimmten pathway angehören.

Condition 1 : 0hr
 Condition 2 : 1.5hr
 Condition 3 : 3hr
 Condition 4 : 6hr
 Condition 5 : 12hr

[Biological Process | Cellular Component | Molecular Function]

[Ontology Report | Z-score Report]
 Export Report

Ontology	Genes	GO	Totals		Z-score
			List	Array	
response to external stimulus	17	531	17	531	10.22
defense response	16	407	16	407	11.17
response to biotic stimulus	16	418	16	418	10.99
antibacterial humoral response (sensu Protostomia)	11	18	11	18	39.27
defense response to bacteria	11	43	11	43	25.21
response to bacteria	11	45	11	45	24.63
defense response to Gram-negative bacteria	7	12	7	12	30.58
defense response to Gram-positive bacteria	6	10	6	10	28.71
defense response to fungi	5	6	5	6	30.94
response to fungi	5	17	5	17	18.23
metabolism	4	3624	4	3624	-5.02
immune response	3	58	3	58	5.53

Abbildung 13: Ontology Report mit Z-Scores

2.4.4.3.3.2 Z-scores

Z-scores dienen dazu, Ontologien herauszufiltern, die im untersuchten Gewebe über- oder unterrepräsentiert sind. Zunächst wird bestimmt, wie viele Gene der Liste einerseits und des Arrays andererseits den einzelnen Ontologien zuzuordnen sind. Aus den beiden Werten wird für jede Ontologie der Quotient gebildet. Ist dieser größer 2, so ist die Ontologie in der Liste überrepräsentiert, ist er kleiner -2, unterrepräsentiert.

2.4.4.3.3.3 Betrachtung einzelner Gene

Trotz aller moderner Bioinformatikmethoden ist zu guter Letzt noch ein traditionelles Sichten der Gene mit Literaturrecherche notwendig, um interessante relevante Gene zu bestimmen. Zur (auch statistischen) Sicherung der Hypothesen sollten diese Gene anschliessend mit genaueren Methoden der Molekularbiologie wie PCR, Western Blot oder ähnlichen untersucht werden. Ein Array insbesondere wie Affymetrix selber dient, wie eingangs erwähnt, lediglich dem Screenen und Erstellen einer Übersicht, um neue Hypothesen zu entwickeln. Damit kann vor Durchführung von aufwändigen Studien das zu erwartende Ergebnis anhand der Array - Daten abgeschätzt und damit unnötige aufwändigere Studien vermieden werden. Problem hierbei ist jedoch die geringere statistische Aussagekraft der Arraydaten.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Modells und Überprüfung der Effizienz

3.1.1 Makroskopische Auswertung

Das verwendete Modell ist in der Literatur ausführlich beschrieben und seine Wirksamkeit gemäss des oben aufgeführten Protokolls nachgewiesen¹⁸. Nach der Etablierung in unserem Labor war zunächst das Funktionieren des Modells zu überprüfen. Dazu wurden zwei Gruppen mit je n=12 gebildet. Die Kontrollgruppe erhielt nur Tumorzellen, die Therapiegruppe Tumor- und T – Zellen.

Etwa ab dem fünften Tag nach Tumorzell-Injektion waren in den Lungen der Tumorgruppe flohstichartige schwarze Punkte sichtbar und ab Tag 7 eindeutig als bereits konfluierende Metastasen identifizierbar. Zur Auswertung wurden die Lungen an Tag 8 entnommen, als Therapieerfolg wurde die Abwesenheit jeglicher Metastasen definiert.

Keines der Tiere in der Therapiegruppe wies Metastasen auf, die Effizienz betrug somit 100%. In der Tumorgruppe wiesen alle Tiere sichtbare Metastasen auf, aufgrund der Konfluenz war eine genaue zählerische Auswertung nicht mehr möglich. Damit wurden die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bestätigt.

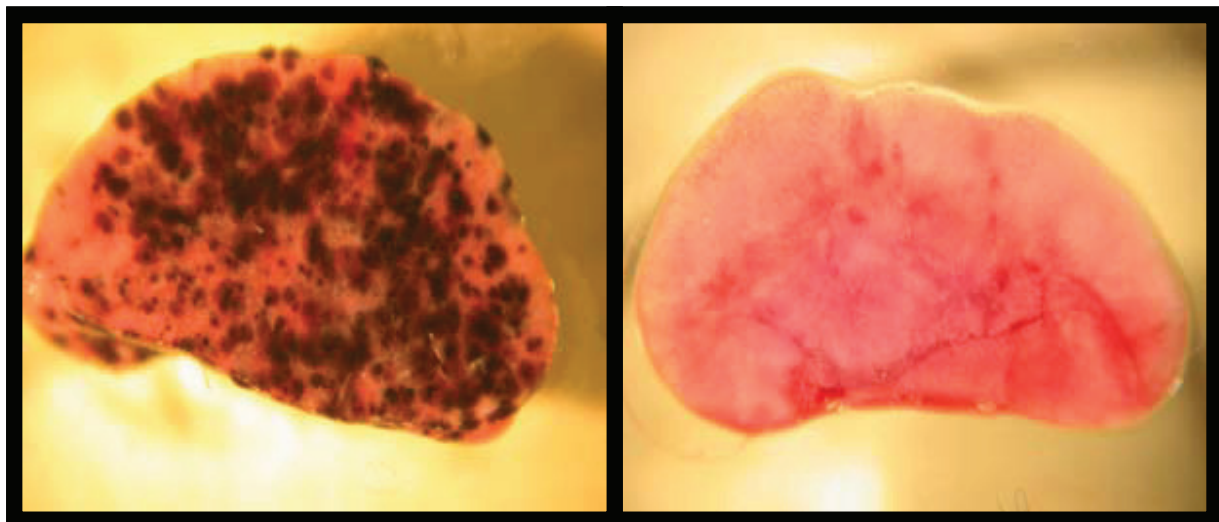


Abbildung 14: Lungen an Tag 8 nach D5-Injektion

(links: Tumorgruppe, rechts: Therapiegruppe)

3.1.2 Einflussgrößen

Im Laufe der Versuchsreihen konnten für den Erfolg der Therapie kritische Parameter bestimmt werden. Auf Seiten der T-Zellen war eine ausreichend hohe Vitalität ($> 80\%$) sowie eine mindestens fünffache Vervielfachung der T-Zellen während der Kultivierung Voraussetzung. Andernfalls war eine ausreichende Aktivierung der T-Zellen nicht gewährleistet und nicht mehr genügend zytotoxisches Potential vorhanden. Bei der D5-Injektion war auf häufiges und gründliches Resuspendieren der Zellen zu achten, um ein Absetzen und Verklumpen der Zellen zu verhindern. Der Zeitpunkt der T-Zellgabe musste exakt eingehalten werden und die IL-2 – Gabe regelmässig erfolgen.

3.1.3 Molekularbiologische Analyse

Mit der makroskopischen Analyse konnte der Therapieerfolg zu einem späten Zeitpunkt überprüft werden. Eine Aussage über die Geschehnisse zu früheren Zeitpunkten war nicht möglich, da noch keine Metastasen makroskopisch sichtbar waren. Um den Verlauf der Tumorzellansiedelung in der Tumorgruppe und die Wirkung der T-Zellen auf das Tumorstadium in der Therapiegruppe auch während dieser frühen Phase verfolgen zu können, wurde als Surrogatparameter die über PCR ermittelte Expression des Tumormarkers Pmel (gp100, silver, NM_021882) verwendet. Diese wurde ab Tumorzellgabe alle 24 Stunden bis einschliesslich Tag 8 bestimmt.

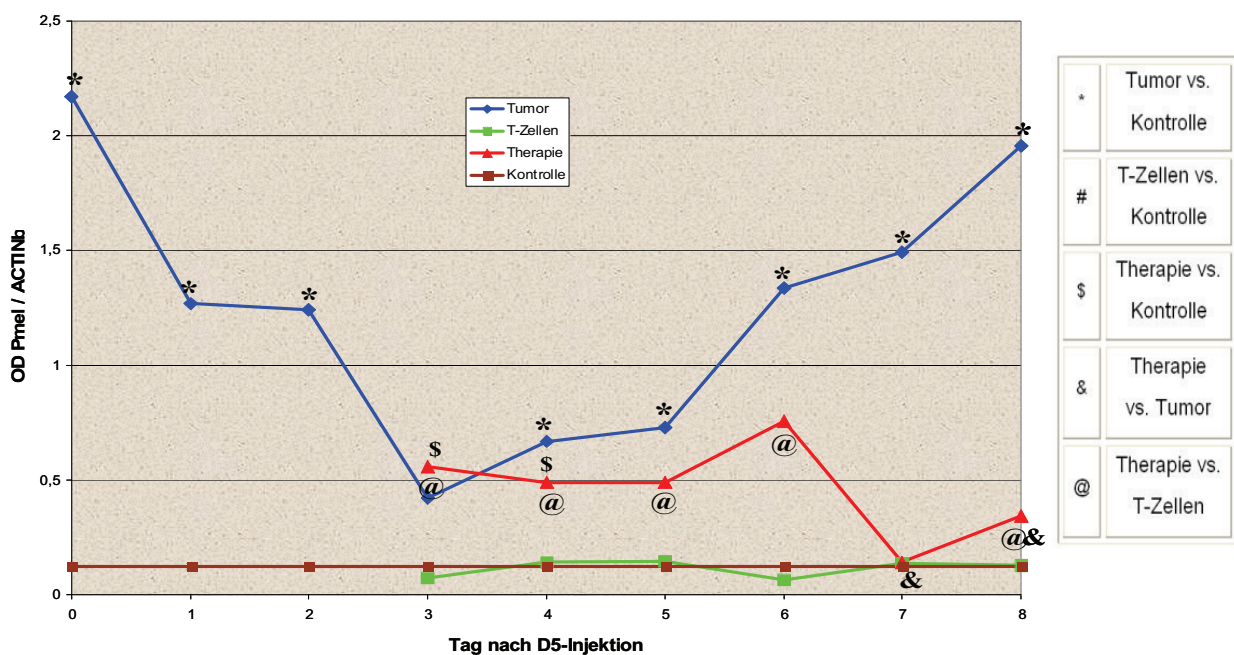


Abbildung 15: Verlauf des Tumormarkers Pmel in den Lungen (PCR)

Die Metastasierung ohne adoptiven Transfer verläuft in zwei Phasen. In der ersten zeigte sich ein Rückgang der Pmel-Expression von 2,17 an Tag 0 auf 0,42 an Tag 3 (alle Werte der PCR sind jeweils auf Aktin bezogen (OD Gen / OD Aktin). Anschliessend folgte ein Wiederanstieg, zunächst langsam von 0,42 an Tag 3 auf 0,73 an Tag 5, dann annähernd exponentiell bis auf 1,96 an Tag 8. Das initial hohe Signal entspricht der Ankunft der Tumorzellen in der Lunge 2 Stunden nach Injektion, das Absinken einem Absterben oder Abwandern aus der Lunge und der Wiederanstieg einem Ansiedeln im Lungenparenchym mit anschliessender Proliferation. An allen Tagen ausser Tag 3 unterschied sich das Signal signifikant ($\alpha=0,05$) von der Kontrollgruppe.

In der **Therapiegruppe** blieb der Wiederanstieg nach Phase 1 aus, das Signal sank von 0,56 an Tag 3 bis auf 0,34 an Tag 8 ab. Bereits ab dem 5. Tag unterschied sich die Therapiegruppe nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe, was als Tumorzellyse und damit als therapeutischer Effekt interpretiert werden kann. Erst ab Tag 7 bestand allerdings ein signifikanter Unterschied zur Tumorgruppe, Grund der Verzögerung ist die Zeitspanne von Extravasation und Migration vor einer Proliferation der Tumorzellen in der Tumorgruppe.

Erwartungsgemäss unterschied sich die T-Zellgruppe zu keinem Zeitpunkt von der Kontrollgruppe, da keine von beiden Tumorzellen erhalten hatten. Das dennoch vorhandene Signal für Pmel lässt sich auf eine unspezifische Amplifikation oder eine Hintergrundexpression durch normale Melanozyten erklären. Diese finden sich aber vor allem in der Haut.

3.1.4 Ausdehnung des therapeutischen Fensters

3.1.4.1 Verzögerte T-Zellgabe

Die Wirksamkeit der Therapie mit dem beschriebenen Protokoll konnte gezeigt werden. Anschliessend stellte sich die Frage, ob die Gabe der T-Zellen mit gleicher Effizienz auch zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen kann, was einer Ausdehnung des therapeutischen Fensters entspräche.

Dazu wurde die Gabe der T-Zellen um jeweils eine Generationszeit der Tumorzellen verzögert. Idee war, dass sich mit jeder Generationszeit die Tumorzellanzahl in den Lungen verdoppelt und sich damit die E/T-Ratio halbiert. Nach Kultivierung von B16-Melanomzellen und mehrfacher Auszählung ergab sich eine Generationszeit von 13 Stunden.

Die T-Zellen wurden neben dem Standardzeitpunkt (3 d nach Tumorzellgabe) ein bzw. zwei Generationszeiten später gegeben (3d 13h bzw. 4d 2h nach Tumorzellinjektion), Fallzahl in diesem Pilotversuch war n=3. Die Lungenentnahme erfolgte in allen Tieren 5 Tage nach T-

Zellgabe und die Wirkungszeit der Therapie wurde damit konstant gehalten. Zur Auswertung wurde die Tumorlast der dorsalen Fläche des linken Lungenoberlappens auf dreierlei Arten bestimmt:

- makroskopische Auszählung
- Quotient Metastasenfläche / Gesamtoberfläche mithilfe des Programmes KS 400
- Tumormarker Pmel (PCR)

Die Ergebnisse waren mit allen drei Methoden konsistent. Zur Interpretation wurden die Werte bei verzögerter T-Zellgabe (3 Tage 13 Std. bzw. 4 Tage 2 Std.) mit denen des Standardprotokolls (3 Tage), siehe Abb. 16 links, sowie mit der Metastasenzahl in untherapierten Tieren (Abb. 16 rechts) verglichen.

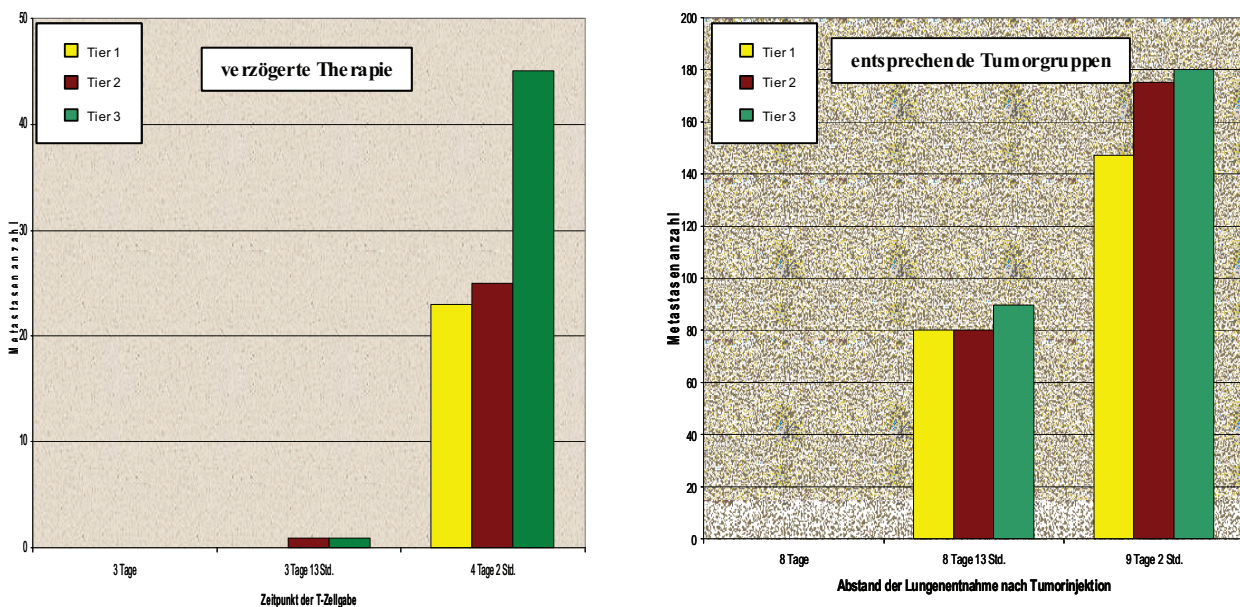


Abbildung 16: verzögerte T-Zellgabe (links Therapiegruppe, rechts Tumorgruppe)

In Abbildung 16 links ist auf der x-Achse der Abstand der T-Zellgabe nach Tumoringjektion, auf der y-Achse die Anzahl der Metastasen aufgetragen. Zum Vergleich zeigt Abb. 16 rechts die Anzahl der Lungenmetastasen bei gleichen Entnahmezeitpunkten ohne Therapie, zu beachten der Bezug der Lungenentnahmen auf die Tumorzellinjektion 5 Tage vor T-Zell-Injektion in der Therapiegruppe (x-Achse) sowie die unterschiedliche Skala der y-Achse. Bei Verwendung des Standardprotokolles traten erwartungsgemäss keine Metastasen auf. Bei Verzögerung der T-Zellgabe um eine Generationszeit war die Therapie noch annähernd gleich effizient, 2 Tiere zeigten eine, das dritte Tier keine Metastasen. Noch eine Generationszeit später stieg die Metastasenzahl jedoch bereits auf 23, 25 bzw. 45 Metastasen an. Zum Vergleich betrug der Median der Metastasenanzahl in untherapierten Tieren 45, 80 und 175

Metastasen nach 8d, 8d 13h und 9d 2h. Mit Ausdehnung des therapeutischen Fensters konnte die Metastasierung somit nicht mehr komplett verhindert werden, die T-Zellen zeigten aber weiterhin einen therapeutischen Effekt.

3.1.4.2 Reduktion der Tumorzellanzahl bei verzögerter T-Zellgabe

Die geringere Effizienz der Therapie bei verzögerter T-Zellgabe ist entweder durch ein ungünstiges Effektor - zu - Target - Verhältnis oder durch die schwerere Zugänglichkeit der Tumorzellen im Gewebe erklärbar. Bei der ersten Hypothese können zum späteren Zeitpunkt nicht mehr alle Tumorzellen von den T-Zellen lysiert werden. Die zweite beruht auf der Idee, dass zu einem späteren Zeitpunkt die Tumorzellen im Gewebe als Zellverbund versteckt sind und dort schwerer von den T-Zellen erreicht werden.

Zur Abklärung, welcher der beiden Ansätze eher zutrifft, wurde die injizierte Tumorzellzahl an die Verzögerung der T-Zellgabe angepasst, sodass rechnerisch in allen Gruppen am Tag der T-Zellgabe die gleiche Tumorzellanzahl vorliegen sollte. Ausgangspunkt war die Annahme, dass die Generationszeit der Tumorzellen in vivo der in vitro ähnelt. Pro Verzögerung der T-Zellgabe um eine Generationszeit wurde die injizierte Tumorzellzahl halbiert, dies entspricht 1×10^5 bzw. $0,5 \times 10^5$ injizierte Zellen für eine bzw. zwei Generationszeiten Verzögerung.

Auch hier wurde Therapie- gegen Tumorgruppe mit $n = 3$ getestet. Ausgangspunkt war die Gruppe mit der üblichen Tumorzellzahl von 2×10^5 Zellen, entnommen an Tag 8, welche wie oben beschrieben, 38, 45 und 50 Metastasen bei einem Median von 45 aufwies. Eine Generationszeit später lagen bei halbiertes Zellzahl 18, 37 und 37 Metastasen vor, Median war 37. Wiederum 13 Stunden später stieg bei Injektion von einem Viertel der Ausgangszellzahl die Metastasenlast auf 54, 60 und 77 mit einem Median von 60 an.

In der Therapiegruppe traten bei der um eine Generationszeit verspäteten T-Zell-Gabe bei keinem Tier Metastasen auf. Im Gegensatz zum vorherigen Versuch besaß die Therapie auch bei weiterem Herausschieben des Therapiebeginns annähernd die gewohnte Wirksamkeit, zwei Tiere wiesen keine, ein Tier zwei Metastasen auf. Dies spricht dafür, dass das Verhältnis von Effektor- zu Targetzellen der wichtigere Faktor für die Effizienz der T-Zelltherapie ist.

Entsprechend der Abbildungen für die Ausdehnung des therapeutischen Fenster ohne Tumorzellanpassung auch hier die gleiche Darstellungsform: links die Metastasenanzahl für die unterschiedlichen Zeitpunkte der T-Zellgabe in der Therapiegruppe, rechts zum Vergleich unbehandelte Tiere.

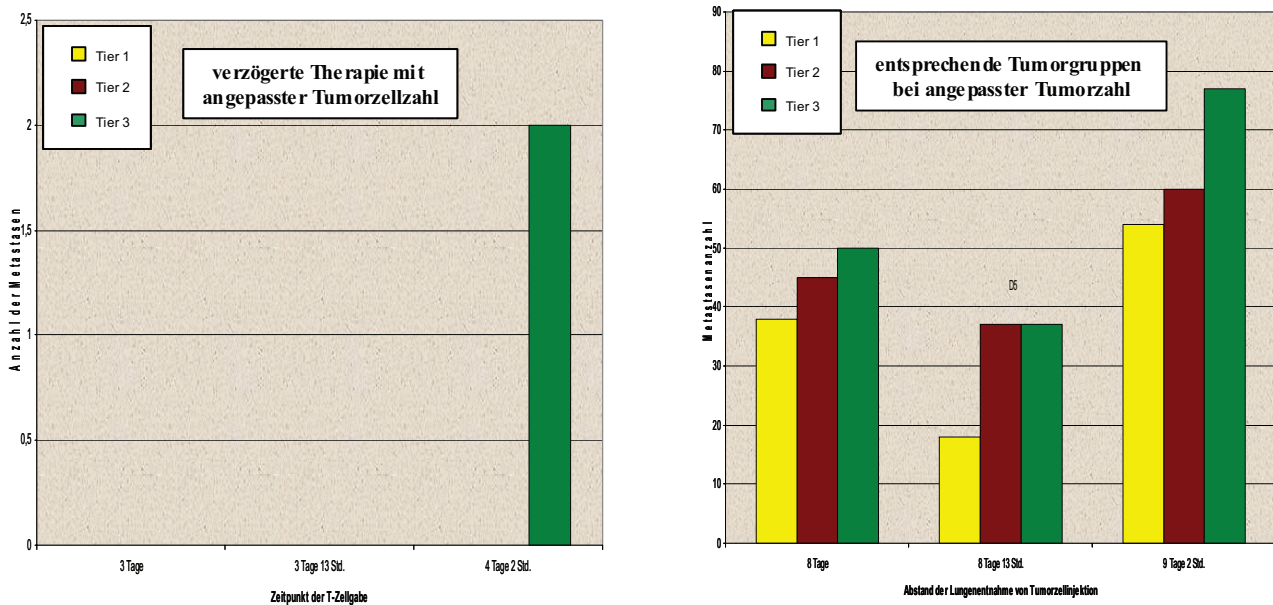


Abbildung 17: verzögerte T-Zellgabe mit entsprechender Anpassung der Tumorzellanzahl (links Therapiegruppe, rechts Tumorgruppe)

3.2 Analyse der zytotoxischen T-Zellen *in vitro*

Die Versuche zeigten, dass die T-Zellen unter entsprechenden Voraussetzungen fähig waren, die Tumorzellen komplett zu lysieren. Mit folgenden Untersuchungen sollten die Mechanismen näher beschrieben werden. Erster Schritt war eine Charakterisierung der T-Zellen und ihres zytotoxischen Potentials zum Zeitpunkt der Injektion, d.h. nach Durchlaufen der *in vitro* - Stimulierung und Expansion. Der vorliegende Zelltyp und Aktivierungszustand der Zellen wurde per FACS analysiert, die zytotoxische Funktion der Zellen in einem Zytotoxizitätsassay nachgewiesen und das zytotoxische Repertoire anhand von PCR-Analysen untersucht.

3.2.1 Charakterisierung der Zellen per FACS

Die FACS-Analyse zeigte, dass es sich bei den Lymphozyten um CD3⁺ T-Zellen handelte. Die Differenzierung zwischen T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen erfolgte über die Marker CD4 bzw. CD8. Ein Grossteil der Zellen war CD8⁺, wobei zwei Populationen mit unterschiedlich starker CD8 - Expression auftraten. Der überwiegende Anteil war stark CD8⁺.

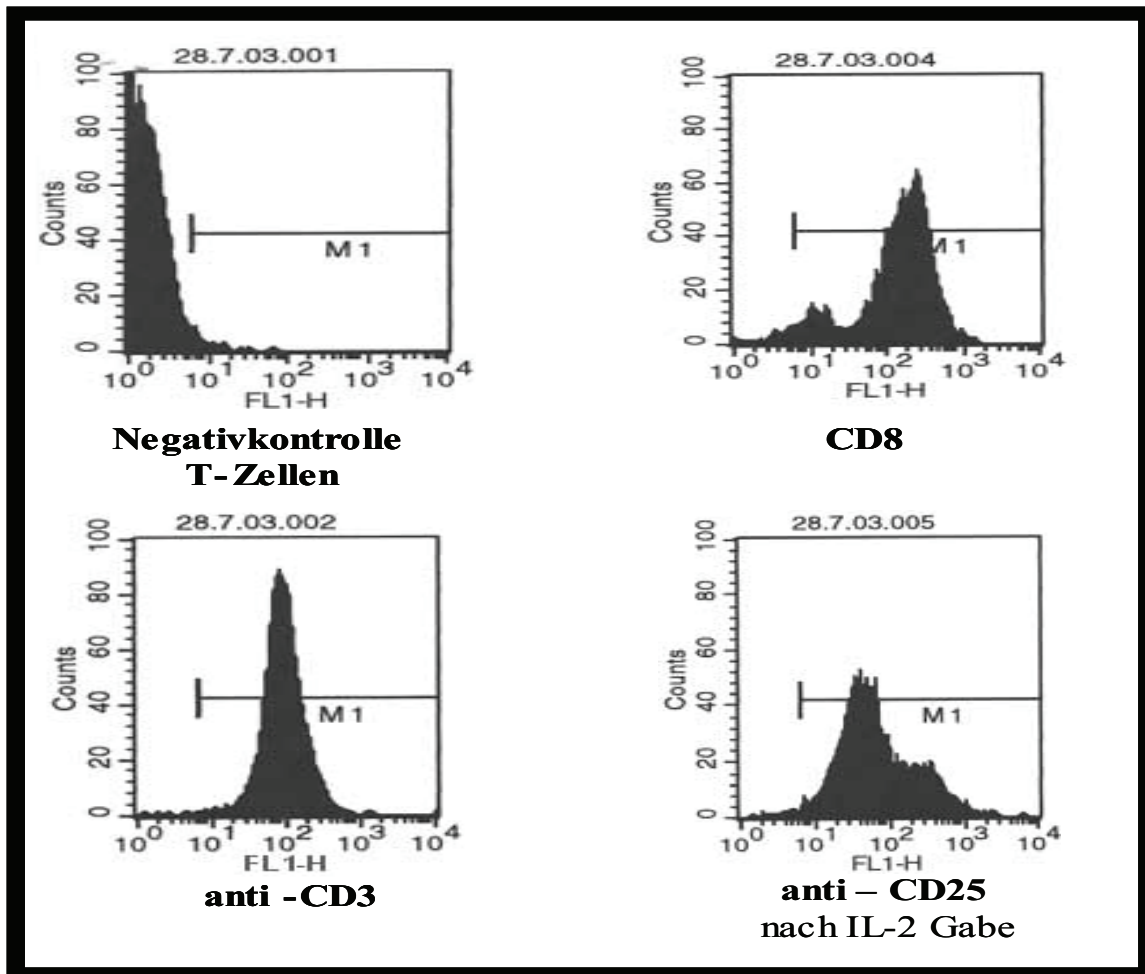


Abbildung 18: Charakterisierung der T-Zellen per FACS

Der Aktivierungszustand der CD8⁺- T-Zellen wurde mithilfe von anti-CD25 nachgewiesen. CD25 entspricht dem IL-2-Rezeptor, den nur aktivierte T-Zellen auf der Oberfläche exprimieren. Der Wert wurde zu zwei Zeitpunkten bestimmt, nach anti-CD3-Stimulierung an Tag 3 (in Abb. 17 nicht dargestellt) sowie nach Expansion mit IL-2 an Tag 5. An Tag 3 wiesen alle Zellen ein gleich starkes Signal auf. An Tag 5 trat neben einer Zellpopulation mit weiterhin deutlichem Signal eine Gruppe von Zellen auf, die eine um ungefähr den Faktor 10 verringerte CD25-Expression aufwiesen. Dieser Shift zu einer deutlich niedrigeren CD25-Expression spricht für die Herunterregulierung von CD25 und damit für eine zunehmende Inaktivierung durch fehlenden Antigenkontakt.

3.2.2 Zytotoxizitätsassay als Funktionsprüfung

Mithilfe der FACS-Analyse wurde nachgewiesen, dass es sich bei den T-Zellen um zytotoxische T-Zellen handelt. Ihre Fähigkeit, *in vitro* D5-Zellen zu lysieren, wurde mithilfe von Zytotoxizitätsassays nachgewiesen.

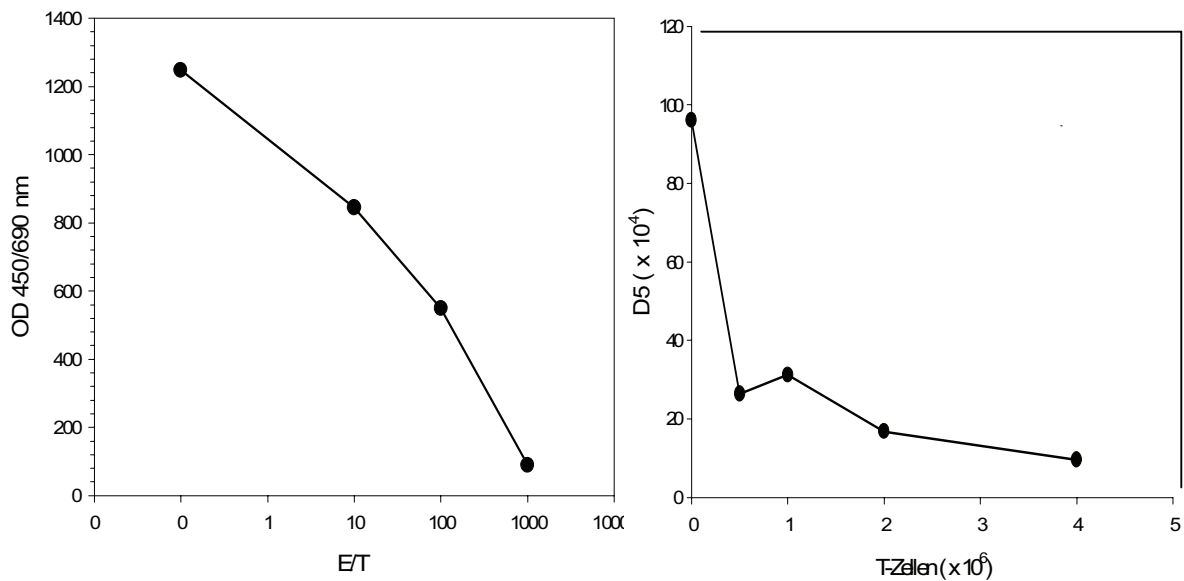


Abbildung 19: Zytotoxizitätsassay der T-Zellen

Dazu wurde eine definierte Menge von Tumorzellen 24 Stunden lang mit CTLs nach in-vitro-Expansion kokultiviert und anschliessend die Anzahl der überlebenden Tumorzellen bestimmt. Im ersten Diagramm ist das E/T-Verhältnis zu Beginn der Ko-Kultivierung gegen die OD nach 24 Stunden aufgetragen, die OD ist proportional zur Anzahl der überlebenden Tumorzellen. Im zweiten Versuch wurde die Anzahl der überlebenden Tumorzellen nach Ko-Kultivierung mit den T-Zellen direkt durch Zählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und gegen die Anzahl der eingesetzten T-Zellen aufgetragen. Der Kurvenverlauf war asymptotisch. Von 10^6 Tumorzellen ausgehend, waren 3×10^5 T-Zellen zur Halbierung der Tumorzellanzahl notwendig, und selbst bei Einsatz von 4×10^6 T-Zellen überlebte noch 10% der Tumorzellen. Hauptkenntnisse aus diesen Versuchsreihen waren a) dass die T-Zellen ohne weitere Zusatzfaktoren zytotoxisch sind, jedoch b) auch bei Einsatz einer grossen T-Zellzahl nicht alle Tumorzellen in-vitro lysiert werden können.

3.2.3 Ausgewählte Parameter des Immunsystems

Um die Mechanismen zu identifizieren, mit denen die T-Zellen die Tumorzellen lysieren, wurde zunächst das Ausgangsrepertoire der T-Zellen nach in-vitro-Kultivierung hinsichtlich ausgewählter zytotoxischer Mechanismen durch RT-PCR bestimmt. Dadurch sollte bei anschliessender Analyse der Gesamtlungen abgegrenzt werden, welcher Anteil der exprimierten Gene von den CTLs mitgebracht wurde und welche Signale durch Veränderungen der Genexpression der T- oder anderen Zellen in den Lungen entstanden.

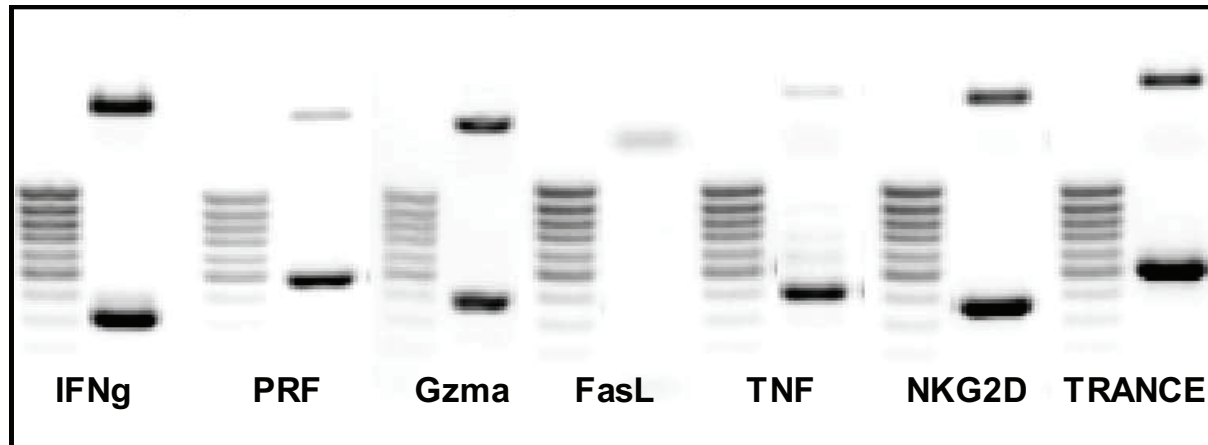


Abbildung 20: T-Zellen PCR-Ergebnisse

In Abb. 20 ist für jedes Gen links der Marker zur Bestimmung der Amplikonlänge aufgetragen, rechts das eigentliche Gen. Die untere Bande entspricht den Transkripten nach x Zyklen (siehe Kapitel 2.2.3., Tabelle 5), die obere Bande nach 5 Zyklen weniger (1. Abnahme). Die T-Zellen sind stark positiv für IFN- γ und stellen damit aktivierte zytotoxische T-Zellen des Subtyps 1 dar. Sie exprimieren eindeutig Perforin und Granzym, jedoch nur minimal Fas-Ligand. Damit weisen die CTLs zumindest zum Injektionszeitpunkt nur einen der beiden klassischen Zytotoxizitätsmechanismen auf. Neben IFN- γ werden als weitere lösliche Faktoren TNF- α und TRANCE und als weiterer Oberflächenrezeptor NKG2D produziert. Die Lyse der Tumorzellen in vitro kann demzufolge sowohl über das Perforin/Granzym-System, über die löslichen sezernierten Faktoren IFN- γ und TNF- α oder über alternative Mechanismen mit Beteiligung von TRANCE oder NKG2D ablaufen, ggf. auch über eine Kombination.

3.3 Analyse der Immunantwort in der Lunge

Als nächstes wurde die Expression der ausgewählten Parameter in den Lungen im Verlauf analysiert. Dazu wurden für alle Gene vier Gruppen gebildet:

1. Kontrollgruppe ohne Behandlung
2. Versuchsgruppe nur Tumorzellen
3. Versuchsgruppe nur T-Zellen
4. Versuchsgruppe Tumorzellen und T-Zellen

In der Tumorgruppe wurde die vom Organismus selbst generierte, aber für die Verhinderung der Metastasenentstehung nicht ausreichende Immunantwort untersucht. In der Therapiegruppe sollte die Veränderungen dargestellt werden, die durch die injizierten T-Zellen entstehen und für die Wirksamkeit des adoptiven Transfers verantwortlich sind. Mit den Daten der T-Zellgruppe sollten Effekte, die nur durch Injektion und Präsenz der T-Zellen in den Lungen ohne Bedeutung für die Immunantwort entstehen, abgegrenzt werden und durch Analyse von Kontrolltieren ohne Intervention wurde die basale Expression der Parameter in den Lungen bestimmt.

3.3.1 Verlauf der T-Zellantwort

Da IFN- γ nur von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, ist es ein guter Parameter, um die Anwesenheit der Zellen in der Lunge und ihren Aktivierungsstatus nachzuweisen.

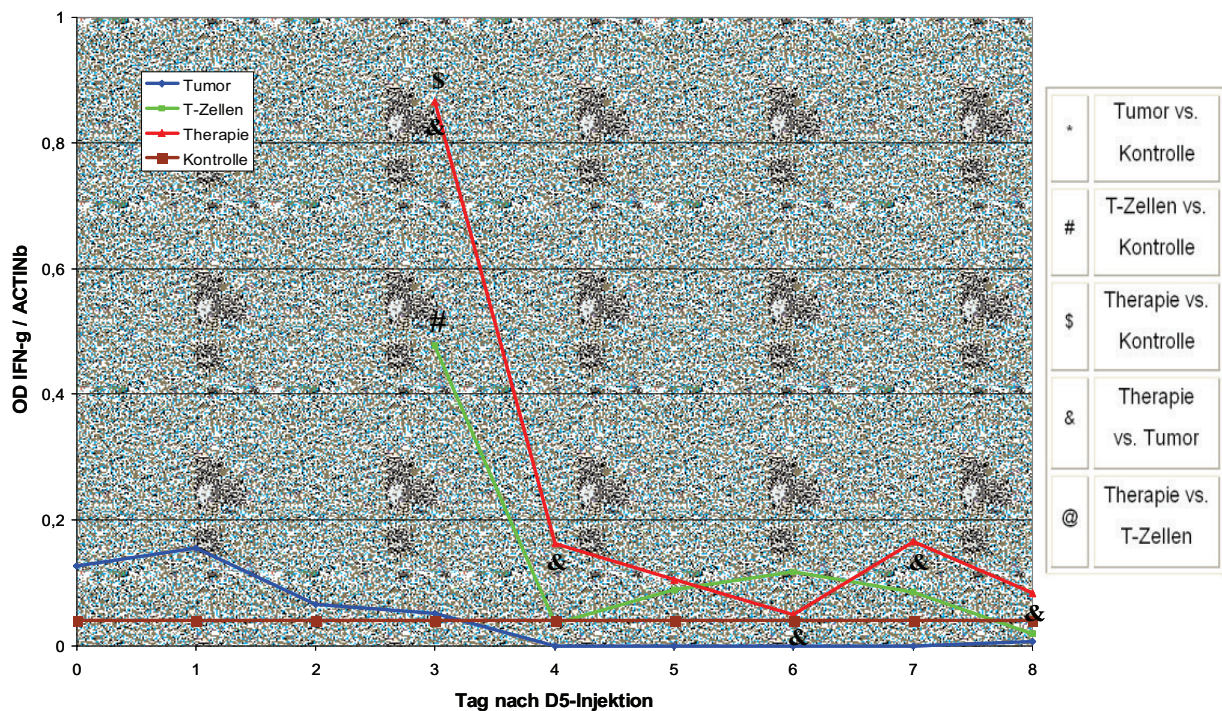


Abbildung 21: IFN - gamma Expression in der Lunge (PCR)

In der Tumorgruppe schwankte IFN- γ zwischen 0 und 0,156, unterschied sich aber an keinem Tag signifikant von den Kontrollmäusen ohne Intervention mit 0,041. Die Anwesenheit der Tumorzellen induzierte damit keine nachweisbare IFN- γ - Antwort und führte somit nicht zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Durch die Injektion von T-Zellen stieg das Signal erwartungsgemäss sprunghaft an, da die T-Zellen bereits nach in-vitro-Kultivierung IFN- γ exprimierten, und unterschied sich sowohl in der Therapiegruppe (0,866) als auch in der T-Zellgruppe (0,478) signifikant von den restlichen Gruppen. Der deutliche, aber nicht

signifikante Unterschied zwischen der Therapiegruppe und der T-Zellgruppe sprach dafür, dass durch die Anwesenheit des Tumors und damit durch den erneuten Antigenkontakt eine weitere IFN- γ -Produktion induziert wurde. Innerhalb von 24 Stunden fiel das Signal in beiden Gruppen jedoch deutlich auf 0,063 in der T-Zellgruppe bzw. 0,163 in der Therapiegruppe ab und unterschied sich an Tag 4, d.h. 24 Stunden nach T-Zellinjektion, bereits nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe mit 0,041. Es waren somit schon 1 Tag nach Injektion keine aktivierten T-Zellen mehr in der Lunge nachweisbar.

3.3.2 Klassische Zytotoxizitätsmechanismen

Die Lyse der Tumorzellen in den Lungen konnte auf drei mögliche Wege erfolgen, über:

1. die klassischen Zytotoxizitätsmechanismen von T-Zellen (Perforin / Granzym A oder Fas / Fas-Ligand)
2. lösliche Mediatoren wie IFN- γ oder TNF- α
3. sekundäre Immunantworten mit Beteiligung des angeborenen Immunsystems

Direkte Mechanismen, die einen T-Zell- / Tumorzellkontakt erforderten, mussten innerhalb von 24 Stunden ablaufen, da danach keine aktivierten T-Zellen mehr vorhanden waren.

3.3.2.1 Perforin- / Granzym- System

Perforin bildet Poren in der Zielzelle, sodass anschliessend die Serinprotease Granzym in das Zellinnere gelangen und die Lyse einleiten kann.

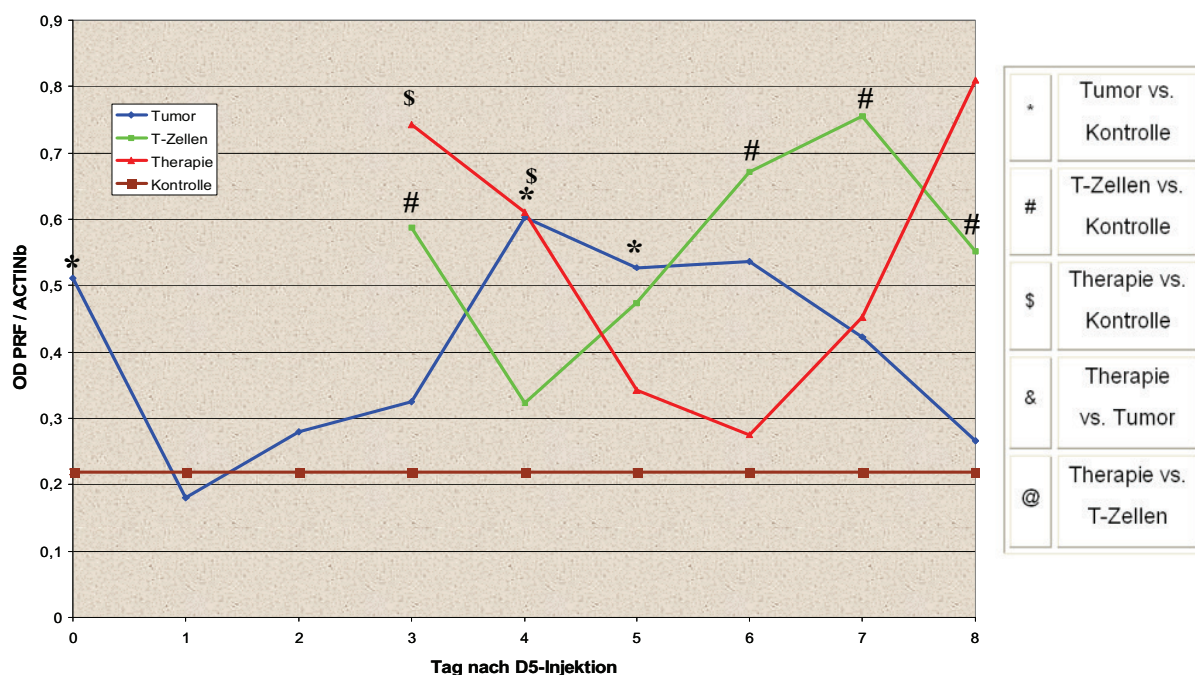


Abbildung 22: Perforin - Expression in der Lunge (PCR)

Perforin wies mit 0,219 bereits eine recht hohe basale Expression in den Lungen auf. In der Tumorgruppe stieg das Signal zweimal signifikant an, direkt nach Tumorzellinjektion auf 0,511 sowie an Tag 4 auf 0,603. Da gemäss den PCR-Daten von IFN- γ keine T-Zellantwort generiert wird, mussten andere Zellen wie z.B. NK-Zellen Perforin exprimieren.

Nach Gabe der T-Zellen stieg in beiden beteiligten Gruppen das Signal erwartungsgemäss signifikant an, in der Tumorgruppe auf 0,743, in der T-Zellgruppe auf 0,588. Wie bei IFN- γ führte die Anwesenheit des Tumors zu einer weiteren gegenüber der T-Zellgruppe nichtsignifikanten Induktion der Perforin-Expression. Anschliessend fiel auch hier in beiden Gruppen das Signal schnell ab. In der Therapiegruppe war das Signal ab Tag 5 mit 0,342 nicht mehr signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe, in der T-Zellgruppe bereits ab Tag 4 mit 0,324. Im Gegensatz zu IFN- γ stieg Perforin in beiden Gruppen jedoch erneut an, in der T-Zellgruppe bereits an Tag 6 auf ein signifikantes Niveau von 0,671, in der Therapiegruppe erst an Tag 8 auf 0,81 ohne Signifikanz. Dies sprach für Sekundärreaktionen z.B. durch die apoptotischen T-Zellen.

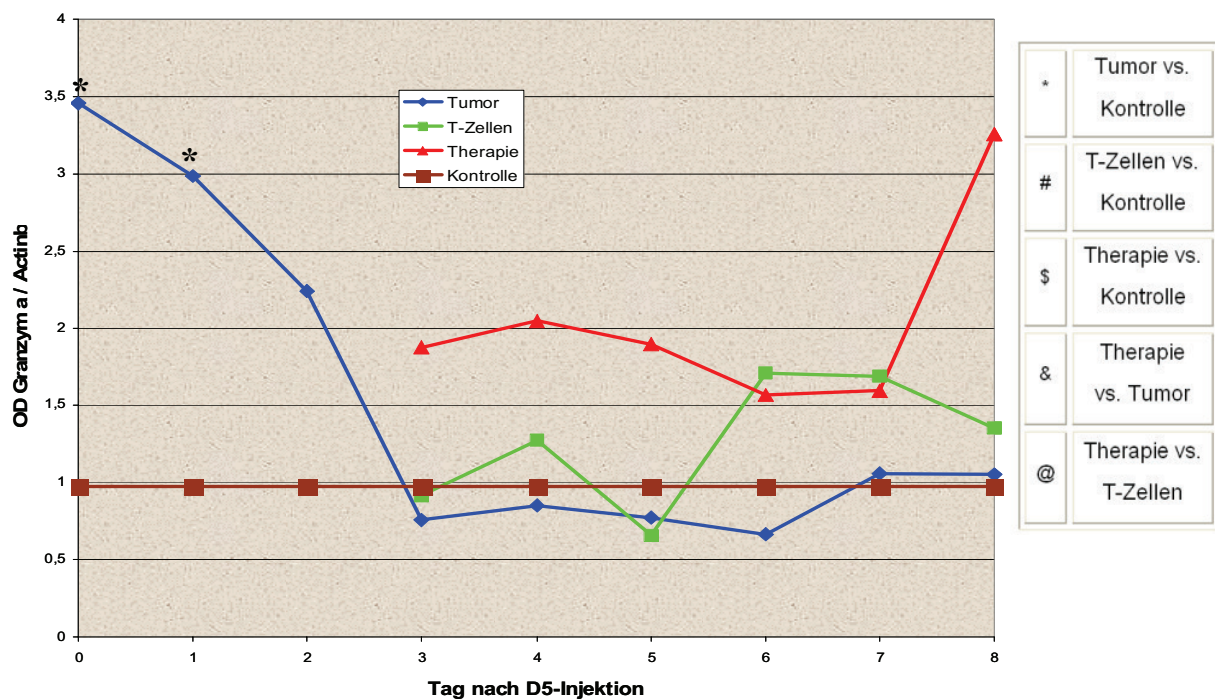


Abbildung 23: Granzym - Expression in der Lunge (PCR)

Granzym besass mit 0,975 ebenfalls eine hohe basale Expression. Nach Tumorzellinjektion stieg es innerhalb von zwei Stunden deutlich auf 3,455 an und fiel danach wieder stetig bis unter das Niveau der Kontrollgruppe an Tag 3 mit 0,762 ab. Bereits ab Tag 2 lag kein signifikanter

Unterschied zu dieser mehr vor. Im Gegensatz zu Perforin kam es nicht zu einem Wiederanstieg. Ein weiterer Unterschied zu Perforin bestand darin, dass sich die Gruppe mit T-Zell-Injektion nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied (0,914 nach T-Zellgabe), obwohl die T-Zellen nach in-vitro-Kultivierung Granzym exprimierten. In der Therapiegruppe stieg Granzym nach T-Zellgabe deutlich auf 1,875 an, blieb abweichend von Perforin an den folgenden Tagen ungefähr auf gleichem Niveau und stieg an Tag 8 weiter bis auf 3,252, ohne sich signifikant zu unterscheiden.

3.3.2.2 Fas/ Fas-Ligand-System

Nach in-vitro-Kultivierung wies nur eine der untersuchten Zellproben eine sehr schwache Expression des Fas - Liganden auf. Auch in den Lungen zeigte sich das gleiche Ergebnis, weder in der Kontrollgruppe noch in den Gruppen nach T - Zellgabe war der Fas-Ligand nachweisbar. Fas-Ligand spielte damit keine Rolle für die Tumorzellyse im Modell. Nur in der Tumorgruppe wurde der Fas-Ligand an den beiden ersten Tag minimal mit 0,005 und 0,004 exprimiert.

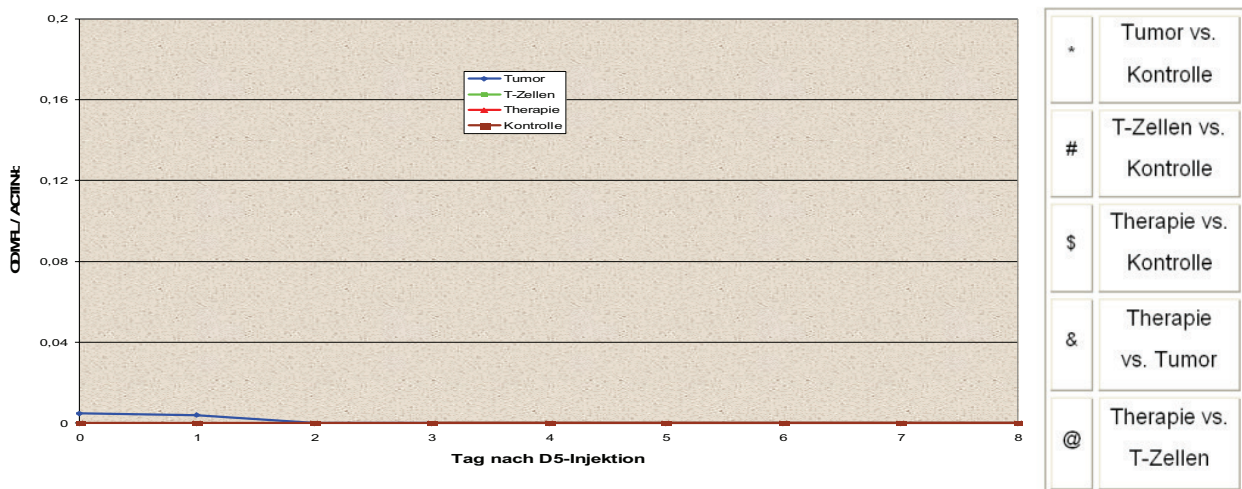


Abbildung 24: FasLigand - Expression in den Lungen (PCR)

3.3.3 Sezerniertes TNF-α

Auch TNF-α kann direkt oder indirekt die Tumorzellyse induzieren.

Die T-Zellen wiesen eine starke Expression von TNF-α auf. Entsprechend stieg nach T-Zellinjektion das Signal signifikant auf 0,202 in der Therapiegruppe und auf 0,35 in der T-Zellgruppe an, der Unterschied zwischen Therapie- und T-Zellgruppe war dagegen nicht

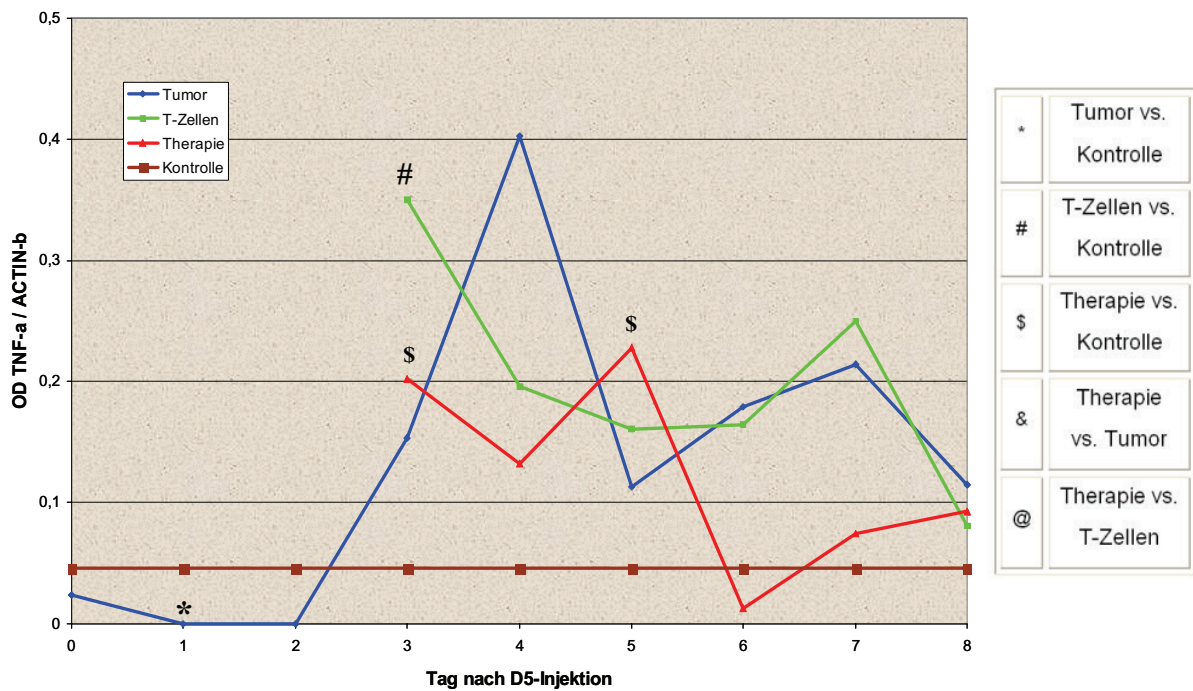


Abbildung 25: TNF- a -Expression in den Lungen (PCR)

signifikant. Interessanterweise führte hier die T-Zellinjektion allein ohne Tumorzellpräsenz zu einer zusätzlichen Induktion. Im weiteren Verlauf liess sich kein eindeutiger Trend erkennen und es unterschieden sich nur einzelne Werte signifikant vom basalen Signal mit 0,046. Möglicher Grund ist, dass TNF- α von mehreren Zellarten produziert werden und bei vielen Reaktionen involviert sein konnte, sodass sich in den Verlaufskurven verschiedene Effekte bzw. Reaktionen überlagert haben.

3.3.4 IL-6 als Wachstumsfaktor für B-Zellen und allgemeine Entzündung

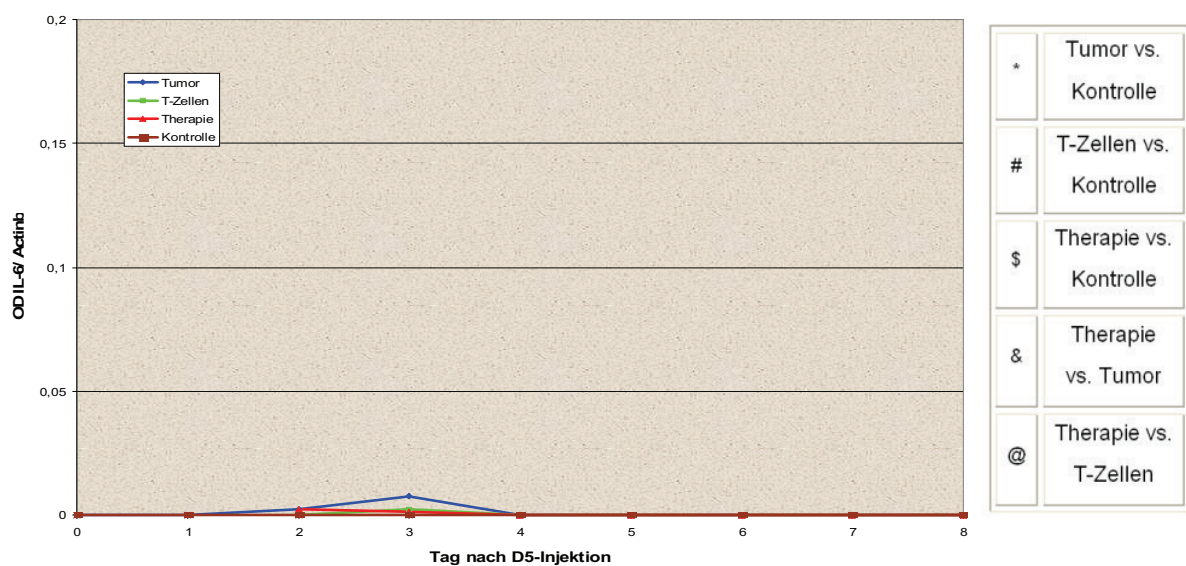


Abbildung 26: IL - 6 - Expression in der Lunge (PCR)

Das vor allem von aktivierten Makrophagen exprimierte IL-6 ist ein wichtiges proinflammatorisches und immunregulatorisches Zytokin und stimuliert unter anderem die B-Zell - Differenzierung und Antikörperproduktion. Die T- Zellen besaßen kein IL-6. Auch die Expression in der Lunge war durchgehend sehr gering mit einer maximalen nichtsignifikanten Signalstärke von 0,008 an Tag 3 in der Tumorgruppe und von 0,003 in der T-Zellgruppe. Diese Werte lagen im Bereich der Messungengenauigkeit der optischen Auswertung, sodass IL-6 keine Rolle für den Prozess zu spielen schien.

3.3.5 Unspezifische Mechanismen

Abgesehen von den klassischen T-Zellrezeptoren besaßen die T-Zellen weitere Faktoren, die antigen-unspezifisch an der Lyse beteiligt sein konnten. Der Oberflächenrezeptor NKG2D erkennt und lysiert MHC- unabhängig Zellen, TRANCE vermittelt Reaktionen über dendritische Zellen und weitere Zytokine.

3.3.5.1 NKG2D

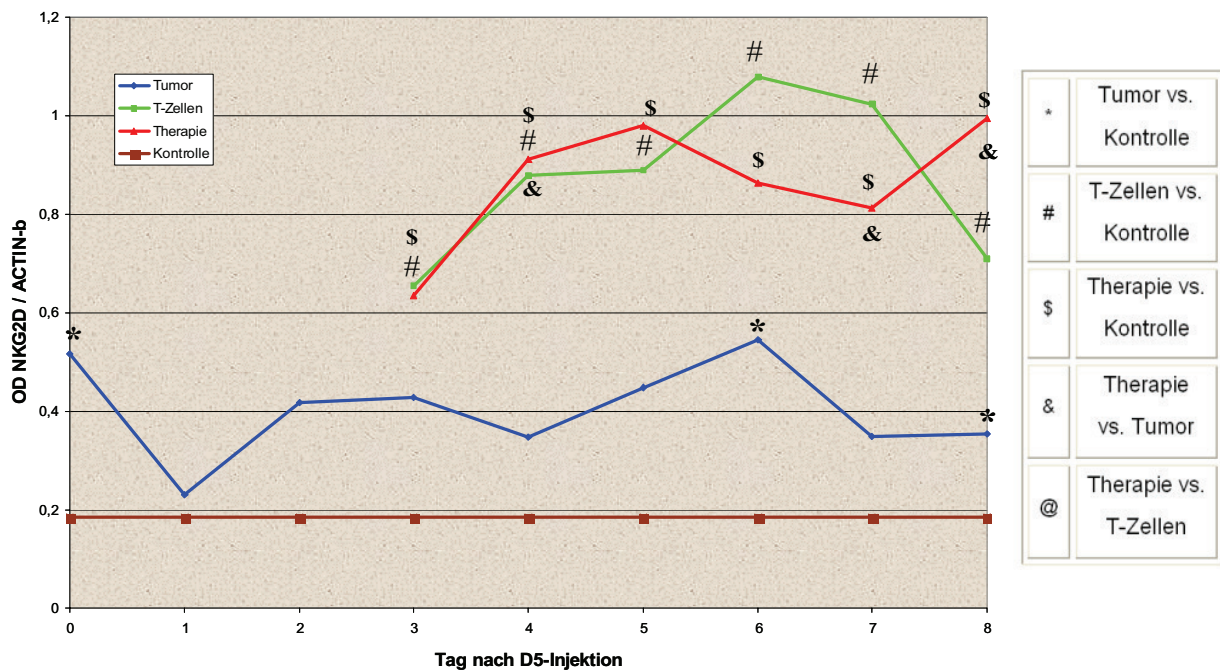


Abbildung 27: NKG2D - Expression in den Lungen (PCR)

Die Kontrolltiere besaßen eine basale NKG2D - Expression von 0,185. Durch die Tumorzellinfiltration stieg das Signal zwei Stunden nach Injektion auf 0,516 an, unterschied sich aber schon an den folgenden Tagen nicht mehr von der Kontrolle. Die T-Zellen exprimierten zum Zeitpunkt der Injektion deutlich NKG2D, entsprechend stieg auch das Signal in den Lungen signifikant auf 0,636 in der Therapiegruppe bzw. auf 0,655 in der T-

Zellgruppe an. In beiden Gruppen blieb das Signal bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und stieg gegenüber Tag 3 noch weiter auf Maximalwerte von 0,996 an Tag 8 in den therapierten Tieren bzw. von 1,079 an Tag 6 in der T - Zellgruppe an. Auffällig war, dass sich an keinem Tag die Ergebnisse signifikant zwischen therapierten und T - Zelltieren unterschieden. Die Anwesenheit des Tumors schien keine Rolle für die anhaltend hohe NKG2D - Expression zu spielen. An Tag 8 deutete sich als Trend ein Anstieg in den therapierten Tieren auf den Maximalwert von 0,996 bei gleichzeitigem Abfallen des NKG2D - Signals in der T-Zellgruppe an, der Unterschied war allerdings statistisch (noch) nicht signifikant.

3.3.5.2 TRANCE (TNFSF 11)

TRANCE ist wie NKG2D ein Faktor, der neben NK- Zellen auch von einigen T-Zellen exprimiert wird und wurde in den T-Zellen nachgewiesen. Die Verläufe in den Lungen zeigten Gemeinsamkeiten mit den Ergebnissen für NKG2D.

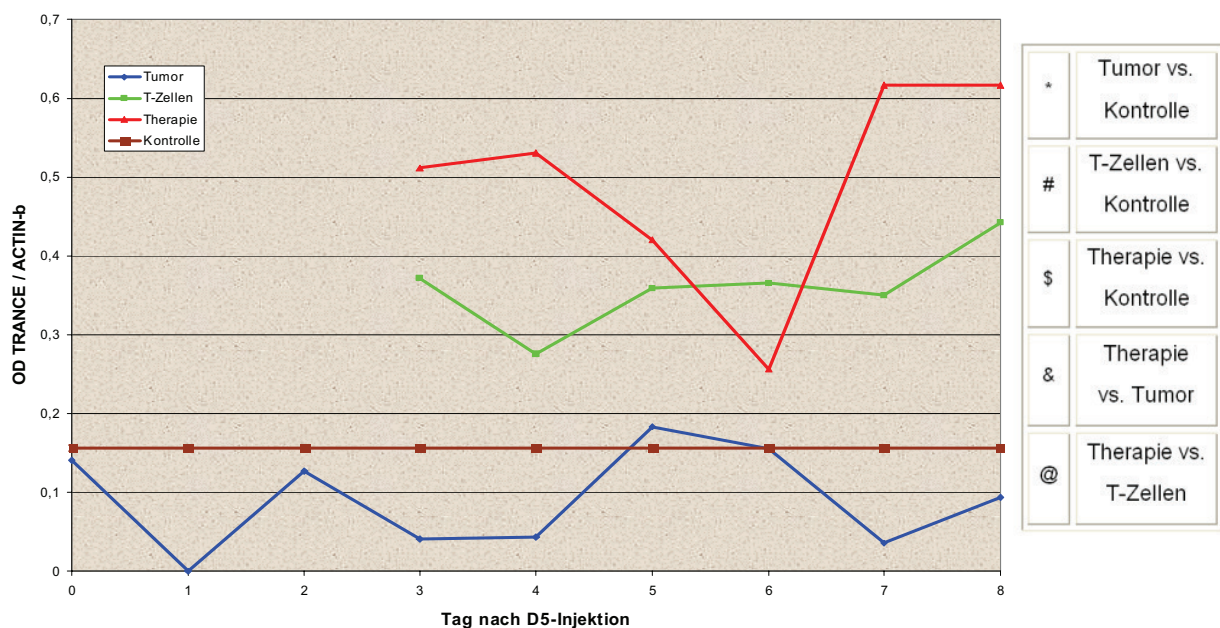


Abbildung 28: TRANCE - Expression in den Lungen (PCR)

Die basale Expression betrug 0,157, die Tumorgruppe lag überwiegend niedriger, ohne signifikant abzuweichen. Nach T-Zellinjektion stieg das Signal in den Gruppen sprunghaft auf 0,511 in der Therapiegruppe bzw. auf 0,371 in den T-Zelltieren an. Der Unterscheid zwischen beiden war nicht signifikant, jedoch führte die Tumorzellpräsenz wie bei IFN- γ und Perforin zu einer weiteren Induktion.

In der Therapiegruppe fiel das Signal nach dem Anstieg infolge der T-Zellinjektion auf 0,257 an Tag 6 ab und unterschied sich damit nicht mehr signifikant von den Kontrolltieren. Anschliessend erfolgte der Wiederanstieg bis auf 0,617 an Tag 8. In der T-Zellgruppe waren die Werte konstant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, jedoch war keiner der Unterschiede signifikant.

3.4 Programmarrays: Chemokine und deren Rezeptoren

Neben der direkten Tumorzelllyse könnten T-Zellen auch eine sekundäre Immunreaktion hervorrufen. Dies kann zum Beispiel durch die Expression oder Induktion von Chemokinen oder anderen Botenstoffen geschehen, durch die weitere Immunzellen in die Tumorzellumgebung gelangen. Chemokine werden von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert, so auch vom Tumor selbst, vom Endothel oder von Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Granulozyten oder anderen. Nach Expression und Sekretion dieser Mediatoren migrieren die Immunzellen entlang des aufgebauten Gradienten, die Bindung erfolgt zwischen den Chemokinen als Ligand und den entsprechenden Chemokinrezeptoren auf den Zellen.

Um zu bestimmen, welche Chemokine und Chemokinrezeptoren für die Migration weiterer Immunzellen in die Lunge im Modell in Frage kamen, wurde RNA aus den Lungen mit Hilfe von Programmarrays untersucht. Dazu wurde pro Zeitpunkt die RNA von jeweils sechs Tieren gepoolt. Die Arrays umfassten 44 Chemokine, 23 Chemokinrezeptoren sowie 4 Housekeeping-Gene (siehe Liste).

Tabelle 19: Liste der auf dem Array befindlichen Gene

Chemokin	Chemokinrezeptor
CXCL1	CXCR1
CXCL4 (PF 4)	CXCR2 (IL8Rb)
CXCL5	CXCR3
CXCL7	CXCR4
CXCL10	CXCR5 (BLR1)
CXCL11	CXCR7
CXCL12 (SDF-1)	CCR1 (MIP-1 α -R)
CXCL15	CCR2
CXCL16	CCR3
CCL1 (TCA-3)	CCR4
CCL2	CCR5

CCL5	CCR6
CCL6	CCR7
CCL7	CCR8
CCL8 (MCP-2)	CCR9
CCL11 (Eotaxin)	CX3CR1
CCL12	
CCL15	
CCL17 (TARC)	housekeeping genes
CCL19	GAPDH
CCL20 (MIP-3a)	Cyclophylin A
CCL21a	RPL13A
CCL22	beta-Actin
CCL25 (TECK)	
CCL27	
CCL28	
Human PRL Homolog	
D6-pending	
Darc	
Emap2	
Erythropoetin	
IFN- α	
Ltb4r2	
Pumag (IFN- γ inducible gene)	
Eotaxin-2	
MIP-1 α (SCYA3L1)	
MIP-1 β (Scya4)	
BLC/BCA-1	
BRAK	
MIP-2 (Scyb2)	
MIG (Scyb9)	
Lymphotactin	
Fraktalkine	
SDF-2	
Tapasin	
Tcp10	

3.4.1 Zellen in vitro

Um zu analysieren, welche Rezeptoren für die Migration und Adhäsion der Tumorzellen in den Lungengefäßen in Frage kamen und über welche Chemokine die Tumorzellen selber zur Migration von Immunzellen in die Lungen beitrugen, wurden die Tumorzellen zum Zeitpunkt

der Injektion untersucht. Die Tumorzellen zeigten nur für wenige der auf dem Array befindlichen Gene positive Signale:

Tabelle 20: Chemokine und Chemokinrezeptoren der D5

Chemokine <ul style="list-style-type: none">• CXCL2 (MIP-2 oder macrophage inflammatory protein-2)• CCL28• CCL17 (TARC oder thymus- and activation- regulated chemokine)• CXCL15 (Lungkine)
Rezeptoren <ul style="list-style-type: none">• CXCR7 (Rdc1)• CCR9

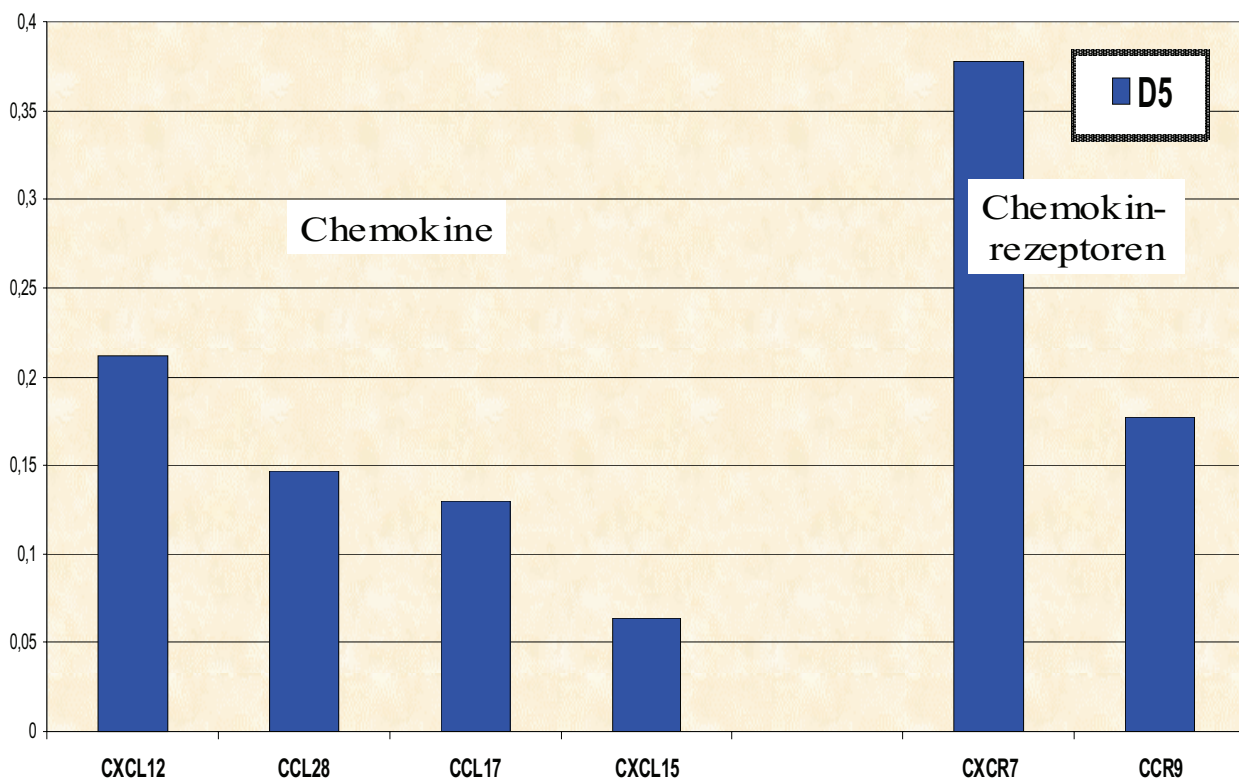


Abbildung 29: Chemokin - Array der D5-Zellen in vitro

Von den Rezeptoren fanden sich nur CXCR7 mit 0,378 und CCR9 mit 0,177. Unter den Chemokinen war CXCL2 mit 0,212 am stärksten exprimiert, gefolgt von CCL28 mit 0,147, CCL17 mit 0,129 und CXCL15 mit 0,063.

Auch die T-Zellen wurden auf ihr Repertoire zum Zeitpunkt des Therapiebeginns untersucht. Sie zeigten eine Expression von 4 Chemokinen und 3 Chemokinrezeptoren.

Tabelle 21: Chemokine und Chemokinrezeptoren der CTLs

Chemokine:

- CXCL 15 (Lungkine)
- CCL28
- Tapasin (Tap-bp oder Tapasin binding protein, Gene ID 21356)
- Erythropoetin in der Funktion als Chemokin

Chemokinrezeptoren:

- CXCR6
- CCR7
- CCR2

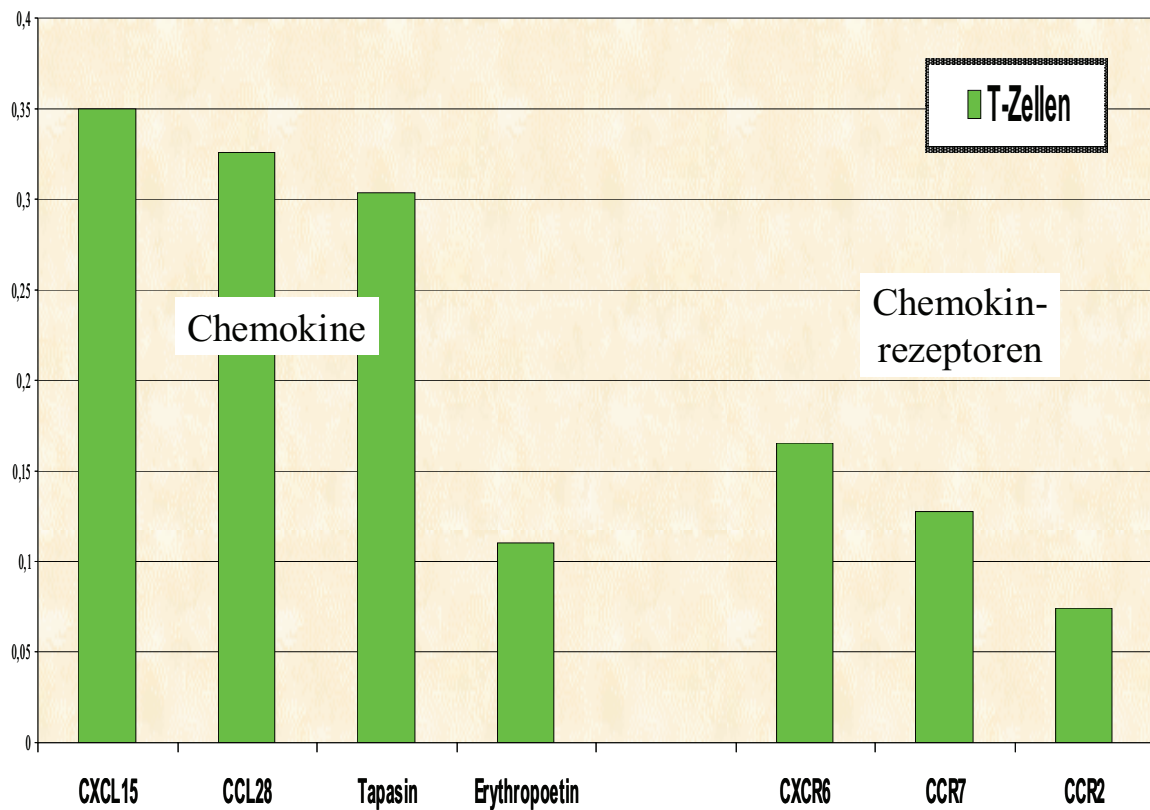


Abbildung 30: Chemokin-Array der T-Zellen in vitro

CXCL15 wurde unter den Chemokinen mit 0,35 am stärksten exprimiert, die weiteren Chemokine zeigten folgende Signale: CCL28 0,325, Tapasin 0,303 und Erythropoetin 0,11. Von den Chemokinrezeptoren wurde CXCR6 mit 0,165, CCR7 mit 0,128 und CCR2 mit 0,074 exprimiert. Die Rezeptoren können die Migration der T-Zellen in die Lungen steuern, die Chemokine weitere Sekundärreaktionen in den Lungen induzieren.

3.4.2 Lungen

Anschliessend wurde die Expression der Chemokine und Chemokinrezeptoren in den Lungen untersucht. Hierbei wurden die Tumorgruppe von Tag 1-7 nach Tumorzellinjektion, die Therapiegruppe von Tag 4-7 sowie Normalmäuse analysiert. Von den Genen des Arrays waren 12 nachweisbar und auf verschiedene Weisen darstellbar. Neben einer Auflistung der einzelnen Gene wurde sowohl die Tumor- als auch Therapiegruppe auf Trends untersucht und anhand ähnlicher Muster in entsprechende Gruppen unterteilt. In der Tumorgruppe konnten die Gene in die zwei Gruppen initiale Reaktion und Spätreaktion mit Maximum an Tag 4 oder 5 eingeteilt werden. Die Therapiegruppe wies drei Verlaufsformen auf, drei der in der Tumorgruppe gefundenen Gene wurden nicht exprimiert.

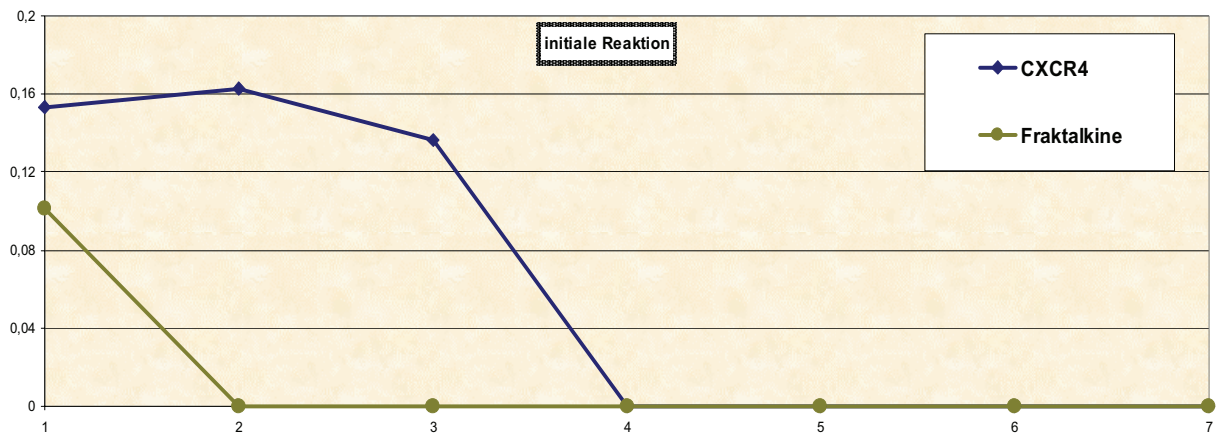


Abbildung 31: initiale Reaktion

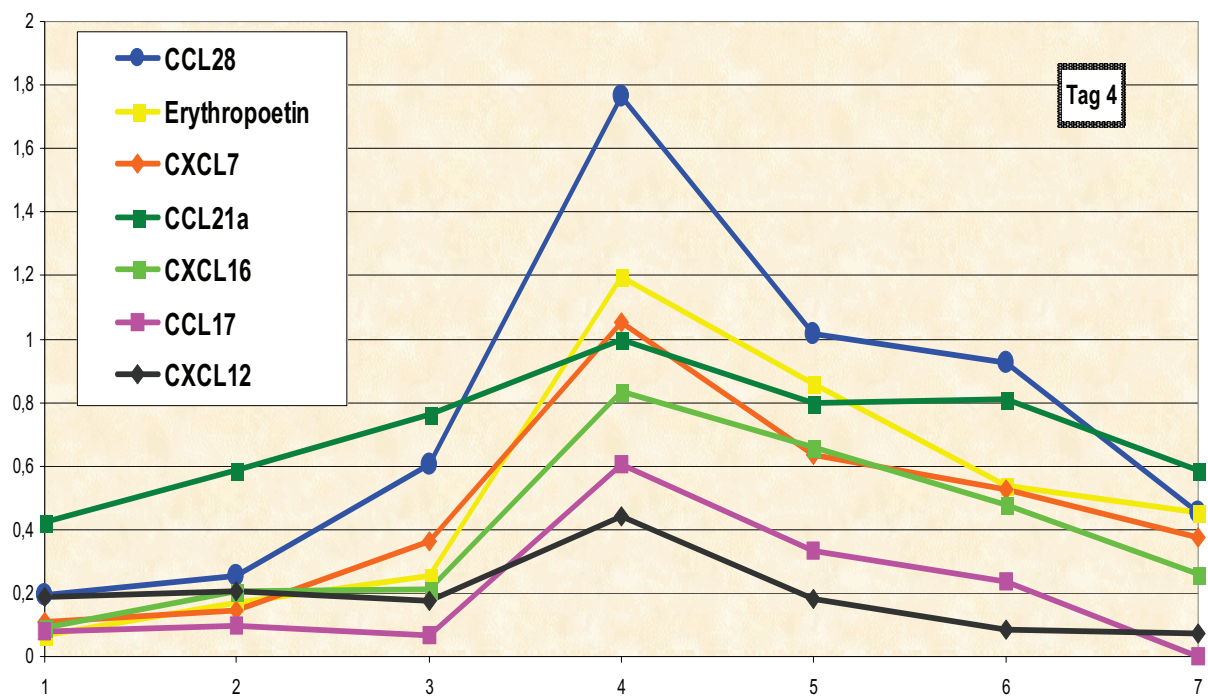


Abbildung 32: Späte Reaktion mit Maximum an Tag 4

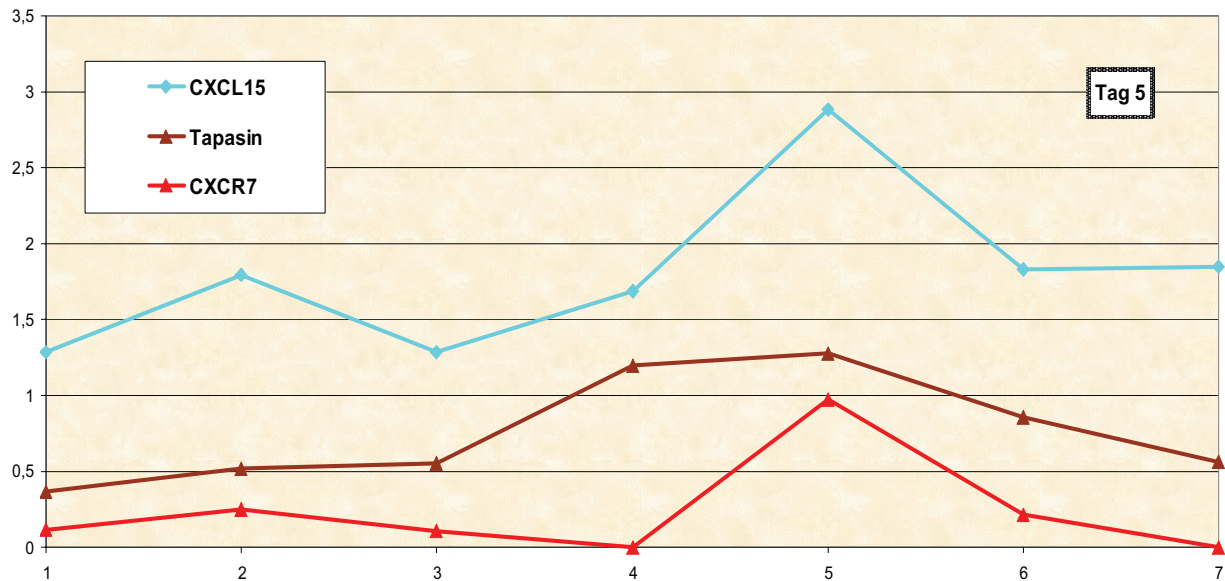


Abbildung 33: Späte Reaktion mit Maximum an Tag 5

Reaktion des Lungenparenchyms auf die Anwesenheit der Tumorzellen in den Folgetagen zusammen. Ein Maximum an Tag 4 zeigten die Chemokine CCL28, Erythropoetin, CXCL7, CCL21a, CXCL16, CCL17 und CXCL12.

Dabei zeigten alle Gene zunächst einen langsamen Anstieg bis Tag 3, um dann innerhalb von 24 Stunden auf ihr Maximum anzusteigen. Dieses betrug 1,762 (CCL28), 1,199 (Erythropoetin), 1,05 (CXCL7), 0,836 (CXCL16), 0,603 (CCL21a), 0,603 (CCL17) und 0,44 (CXCL12).

Maximale Expression an Tag 5 zeigten die Chemokine CXCL15 und Tapasin sowie der Rezeptor CXCR7. Bis Tag 4 blieb das Signal bei diesen drei Genen auf ungefähr gleichem Niveau, um dann innerhalb von 24 Stunden auf 2,88 (CXCL15), 1,28 (Tapasin) und 0,974 (CXCR7) anzusteigen und innerhalb von 24 Stunden wieder abzusinken.

Auch in der Therapiegruppe wurden die Verläufe der Chemokinexpression analysiert und die Gene in entsprechende Gruppen eingeteilt. Die in der Tumorgruppe exprimierten Gene CXCR4, Fraktalkine und CXCL12 lagen in den Therapietieren unterhalb der Nachweisgrenze des Arrays. Die verbleibenden 9 Gene konnten drei Gruppen mit ähnlichem Muster zugeordnet werden. Einen ansteigenden Verlauf besaßen CXCL15, CXCR7 und CCL17, wobei ersteres vom ersten zum zweiten Tag nach Injektion abfiel. Die Gene CCL28, CXCL16 und CXCL7 zeigten einen wechselhaften Verlauf. Tapasin, Erythropoetin und CCL21a sanken nach Injektion stetig ab, um erst am letzten Beobachtungszeitpunkt einen Anstieg zu verzeichnen.

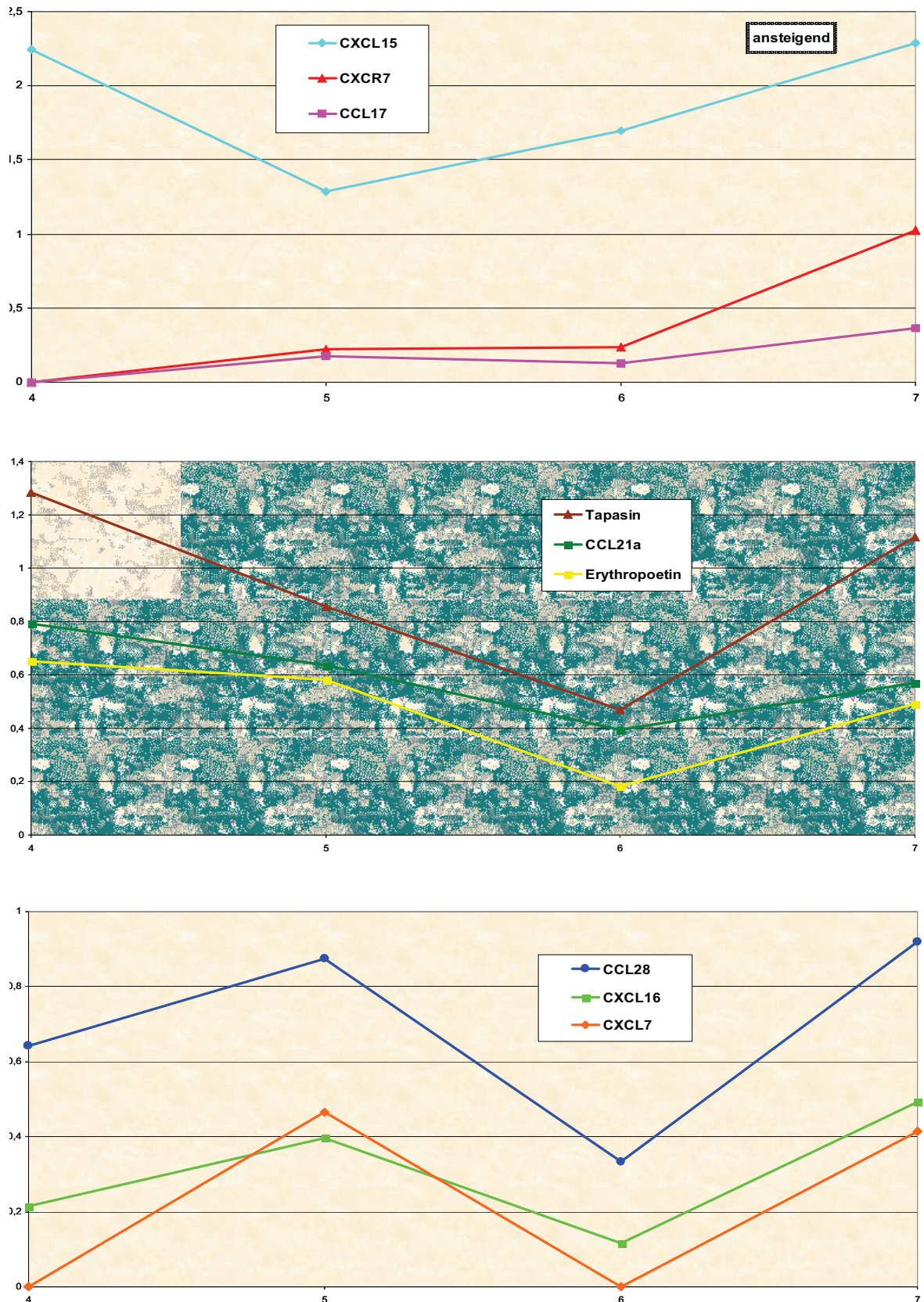
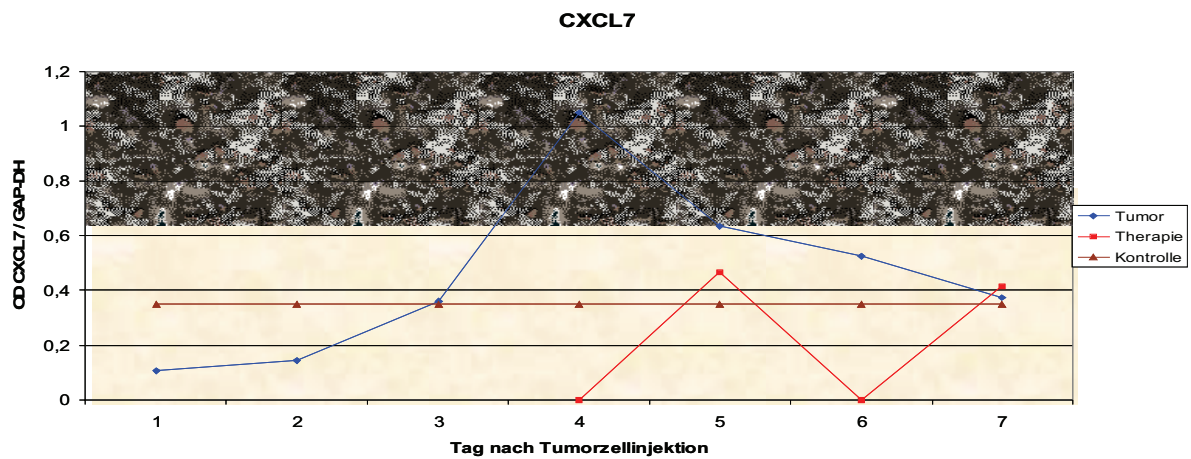
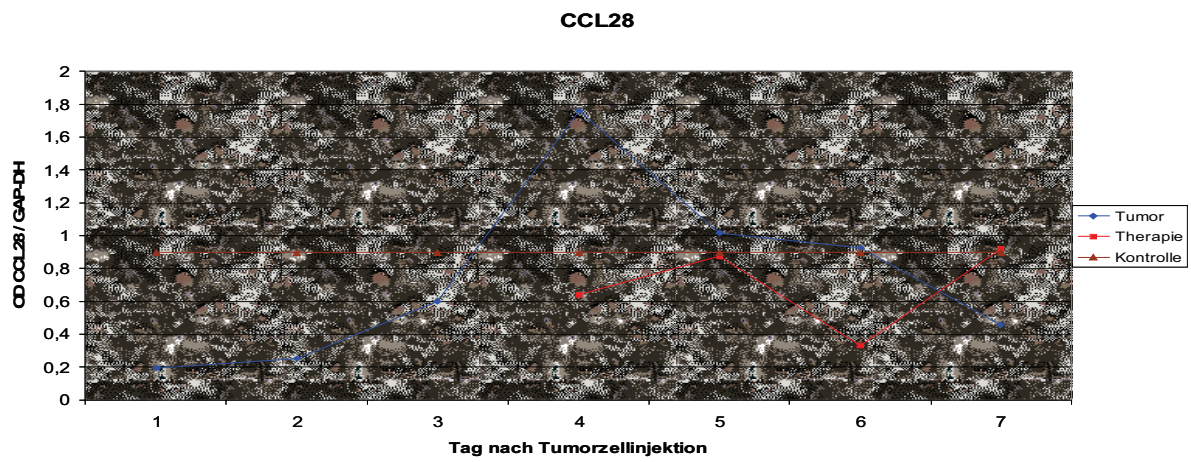
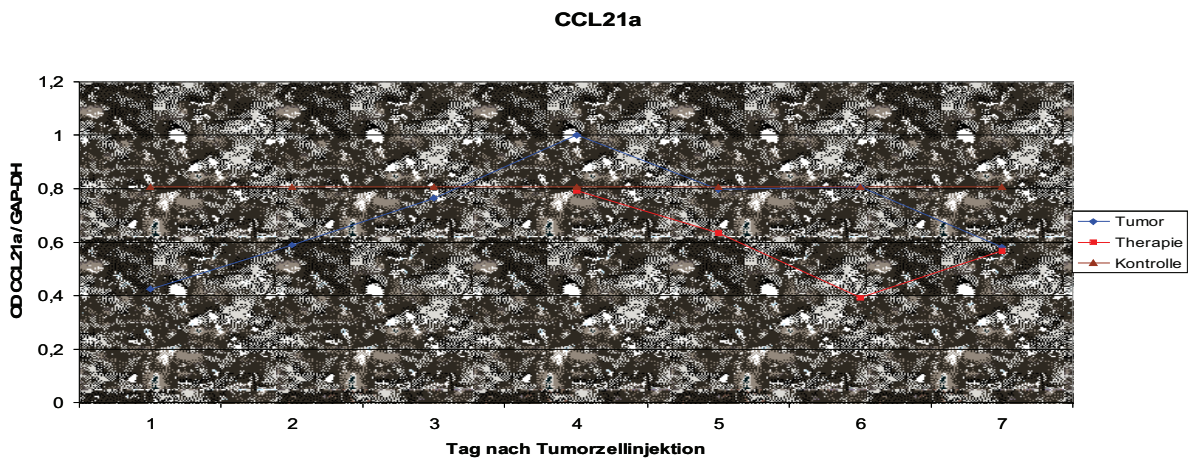
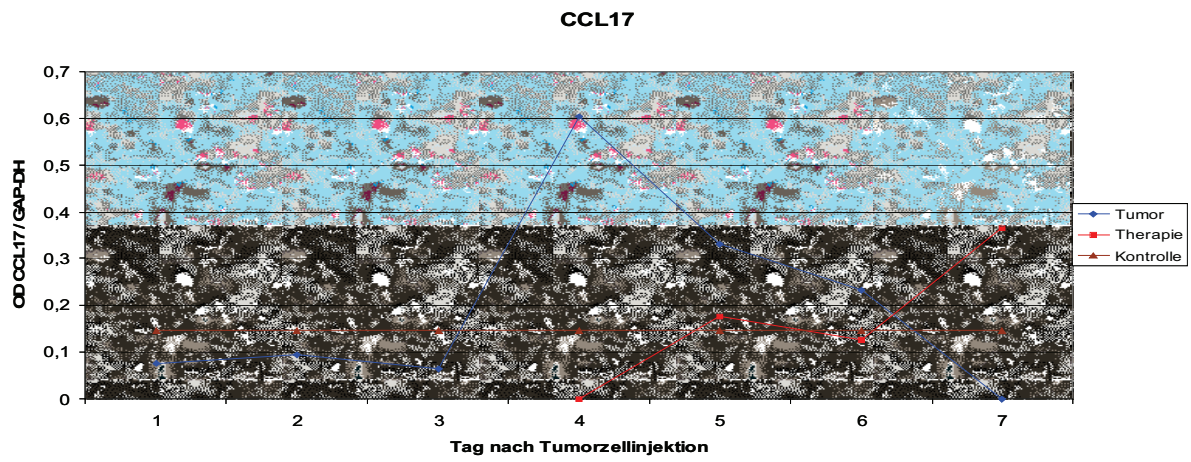


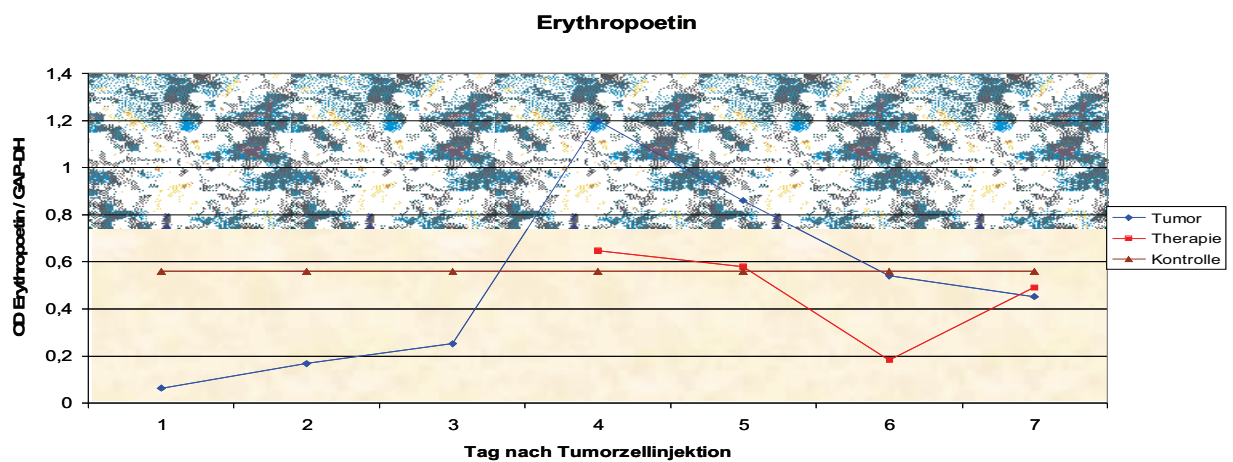
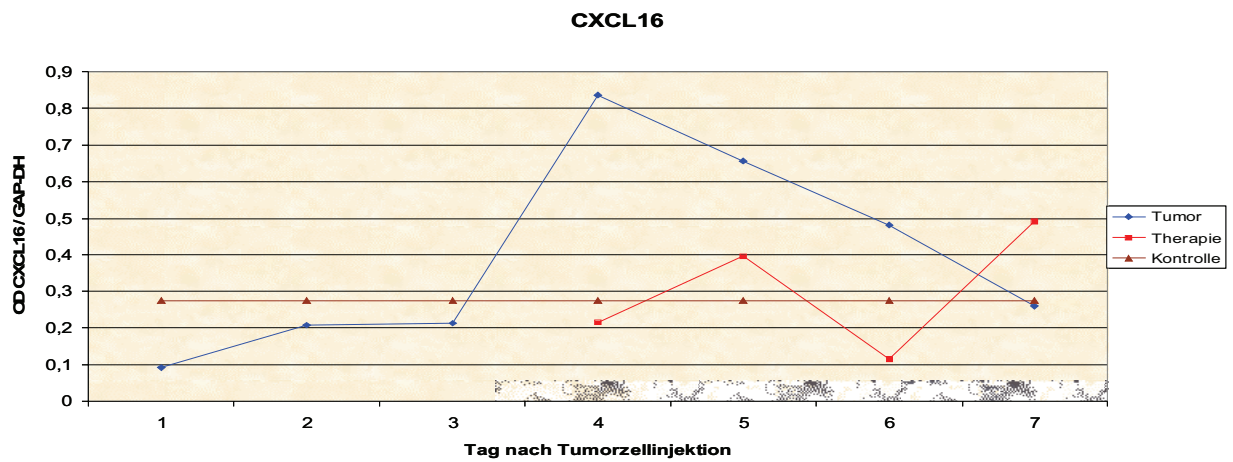
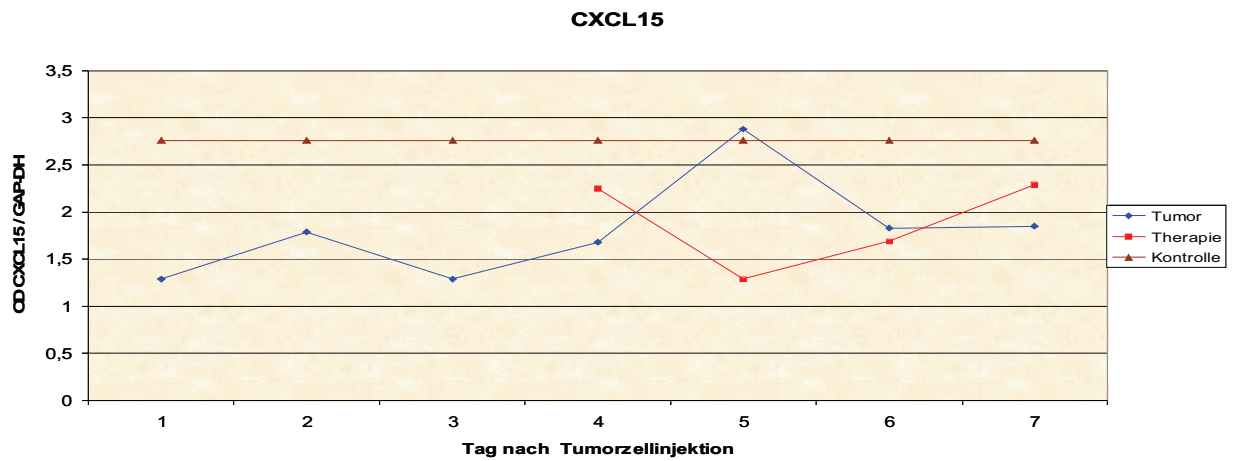
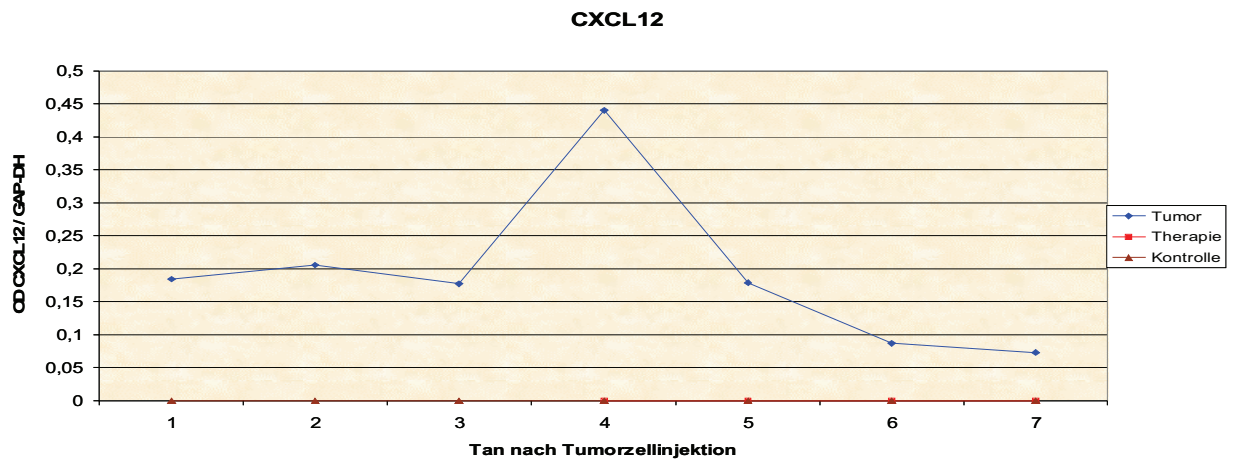
Abbildung 34: Gruppierungen in der Therapiegruppe

Im Anhang finden sich die exakten Werte der Signale (Tabelle 39), folgend die Diagramme der einzelnen Gene.

Ergebnisse



Ergebnisse



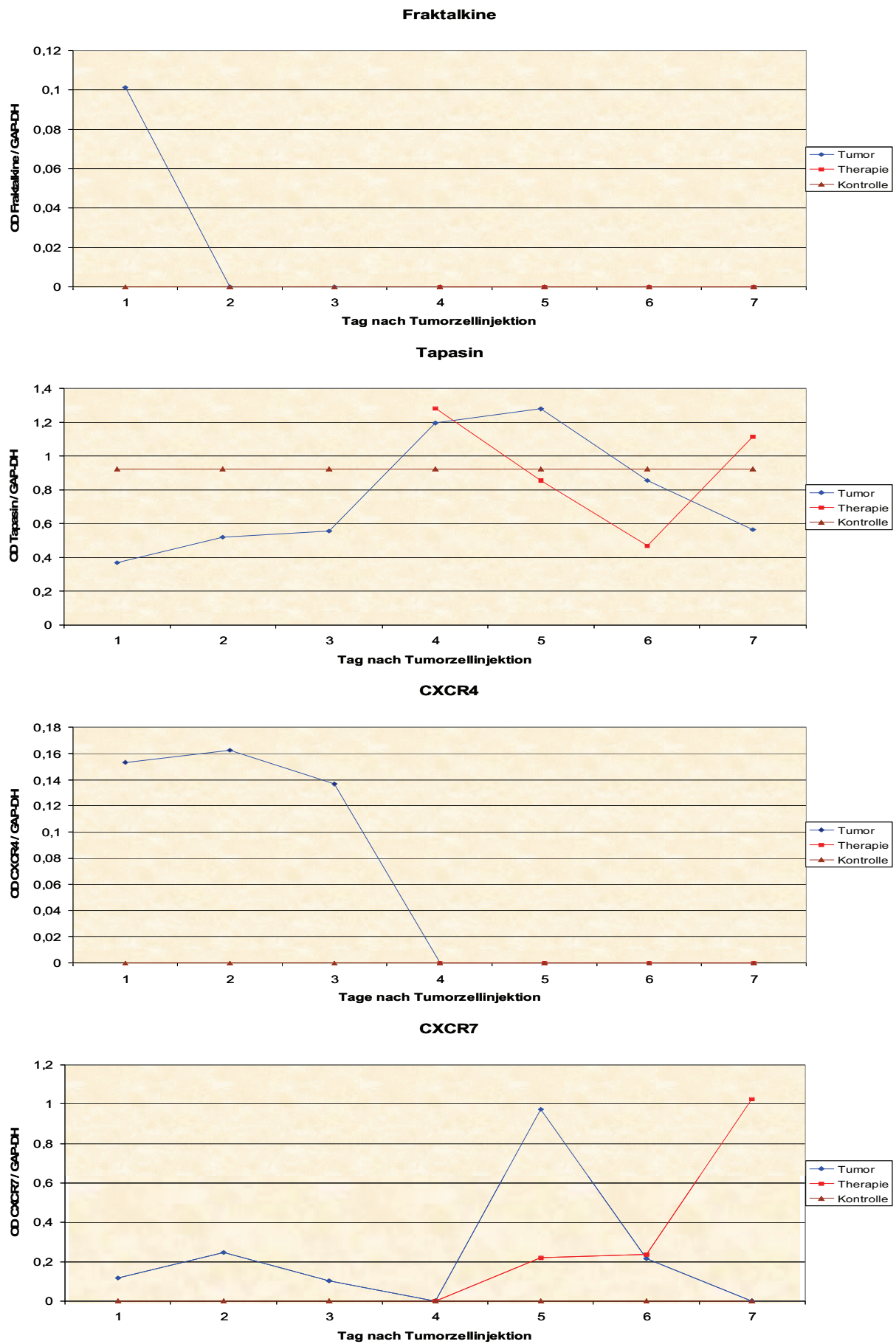


Abbildung 35: einzelne Gene der Programmarrays

3.5 Affymetrix-Genchip

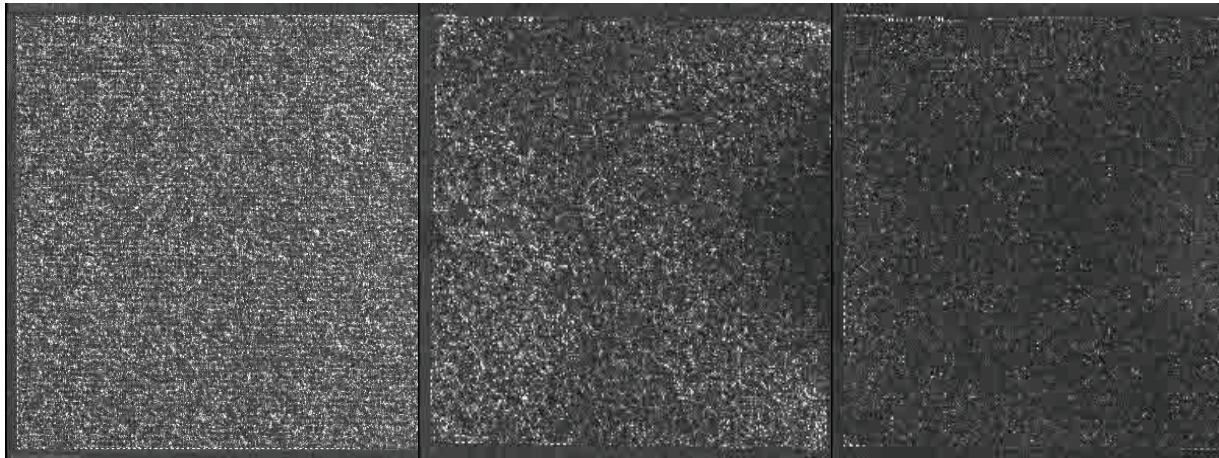


Abbildung 36: Affymetrix Chip A-C Tag 1 nach adoptivem Transfer

Ziel der Affymetrix - Analyse war, die Veränderungen der Genexpression des gesamten Mäusegenoms, die durch die T-Zell-Injektion in den Lungen tumortragender Mäuse verursacht wird, darzustellen. Mit diesem sehr generellen Ansatz sollten im Gegensatz zu den genaueren Analysen über PCR und Programmarrays weitere Kandidatengene identifiziert werden, die im Rahmen der Immunreaktion eine Rolle spielen. Der verwendete Affymetrix - Chip umfasste das gesamte Mäusegenom und damit alle bis dahin definierten Gene sowie unbekannte DNA-Sequenzen, sogenannte EST (expression sequence tags). Es wurden Arrays von der Therapiegruppe von Tag 1 bis 5 nach T-Zellgabe angefertigt, dabei wurde für die Analysen Gewebe der gleichen Versuchstiere wie für Programmarrays und PCRs verwendet. Wie bei den Programmarrays erfolgte ein Poolen der RNA von jeweils sechs Tieren, jedoch wurde pro Lunge 0,5µg und damit pro Array 3µg RNA eingesetzt. Nach Hybridisierung in der Affymetrix-eigenen „Fluidics Station“ wurden die Bilder der hybridisierten Chips digitalisiert, die Lichtintensitäten der Gene berechnet und die Rohdaten im Editor-Format gelistet. Zur weiteren Bearbeitung, d.h. Genzuordnung sowie Analysen, war das Programm GCOS erforderlich, welches beim Hersteller Affymetrix erworben wurde. Mit diesem konnten die Arrays sowie die Zellen und Intensitäten der einzelnen Gene abgebildet, die Daten als Single oder Comparison Analysis weiterbearbeitet sowie verschiedene graphische Darstellungen wie Scatter oder Serial Graphs erstellt werden. Über die Suchfunktion liessen sich gezielt Gene herausuchen und im Scatter Graph z. B. Gene selektionieren, die mindestens eine x-fache Veränderung zum Vergleichswert aufwiesen. Innerhalb von GCOS wurden die Daten in Form einer Comparison Analysis weiterbearbeitet, welche für sequentielle Analysen, d.h. Beobachtungen der Genexpressionsveränderung über

eine bestimmte Zeitspanne, geeignet ist. Anschliessend wurden die Daten in Excel-Tabellen umgewandelt und standen zur weiteren Analyse mit kommerziellen Programmen bereit.

3.5.1 Rohdaten

Es wurden alle drei Chips des Produktes Murine Genome Array U74v2 eingesetzt, wobei Array A 12488, Array B 12477 und Array C 11934 Gene / ESTs umfasste.

	TL_1_C_Signal	TL_1_C_Detection
128520_at	26.6	A
128523_at	9.6	A
128529_at	6.0	A
128550_at	16.8	A
128554_at	1.4	A
128577_s_at	8.1	A
128578_r_at	1.7	A
128579_r_at	16.6	A
128580_at	0.9	A
128582_at	5.1	A
128583_at	0.9	A
128590_at	1.2	A
128624_at	0.9	A
128643_r_at	3.3	A

Abbildung 37: Rohdaten im Editorformat

Die nach Hybridisierung in der Fluidics-Station generierten Rohdaten bestanden aus der Genbezeichnung (Gene-ID), aus dem Wert des Signals (Lichtintensität) sowie dem Detection Call (P steht für present, M für marginal und A für absent), siehe 2.4.4.2. Aufgrund des Umfangs der generierten Daten wurden die Ergebnisse als Excel-Dateien beigefügt.

Für eine Verlaufsdarstellung bot das Affymetrix-eigene Auswertungsprogramm GCOS die oben erwähnte „Comparison Analysis“ an. Die Signalwerte der Gene wurden dabei auf eine Referenzprobe bezogen, hier Tag 1 nach T-Zellinjektion, und neben dem absoluten Wert als relative Änderung zu dieser dargestellt. Die generierte Tabelle umfasste neben der Gene ID („Probe Set Name“) die Absolutwerte der Signale („Signal“), den „Detection Call“, den „Detection p-value“ als statistisches Mass für die Zuverlässigkeit des erhobenen Wertes, die „Signal Log Ratio“ als Mass für die Veränderung des Probenwertes gegenüber der Referenzprobe sowie den „Change“ als statistisch berechnete Klassifizierung in Increase (I), Minimal Increase (MI), No Change (NC), Minimal Decrease (MD) oder Decrease (D) mitsamt dem zugehörigen „Change p-value“.

	Analysis Name	Probe Set Name	Stat Pairs	Stat Pairs Used	Signal	Detection	Detection p-value	Signal Log Ratio	Change	Change p-value
87	TL_2_A	92560_g_at	16	16	32.3	P	0.000468	-0.5	NC	0.500000
88	TL_2_A	92561_at	16	16	12.6	A	0.479380	1.0	NC	0.500000
89	TL_2_A	92562_at	16	16	165.2	P	0.000219	-0.3	NC	0.500000
90	TL_2_A	92563_at	16	16	184.3	P	0.002228	-0.3	NC	0.500000
91	TL_2_A	92564_at	16	16	61.8	P	0.000468	-0.3	NC	0.581483
92	TL_2_A	92565_at	16	16	81.5	P	0.000468	-0.2	NC	0.500000
93	TL_2_A	92566_at	16	16	17.3	A	0.060419	-0.1	NC	0.500000
94	TL_2_A	92567_at	16	16	166.8	P	0.000805	0.2	NC	0.500000
95	TL_2_A	92568_at	16	16	43.1	P	0.003067	-0.6	NC	0.500000
96	TL_2_A	92569_f_at	16	16	22.9	P	0.013092	-0.8	NC	0.860937
97	TL_2_A	92570_at	16	16	1.1	A	0.945530	-3.2	NC	0.617600
98	TL_2_A	92571_at	16	16	73.3	P	0.000266	-0.1	NC	0.500000
99	TL_2_A	92572_at	16	16	23.6	P	0.035163	-0.1	NC	0.500000
100	TL_2_A	92573_at	16	16	452.0	P	0.000388	-0.3	NC	0.500000
101	TL_2_A	92574_at	16	16	221.9	P	0.000219	-0.1	NC	0.500000
102	TL_2_A	92575_at	16	16	107.3	P	0.001141	-0.1	NC	0.500000
103	TL_2_A	92577_f_at	16	16	5082.1	P	0.000219	-0.0	NC	0.500000
104	TL_2_A	92578_at	16	16	130.9	P	0.000673	-0.1	NC	0.500000
105	TL_2_A	92579_at	16	16	66.6	P	0.000266	-0.5	NC	0.974094

Analysis Info Metrics Pivot

Rows: 12488

Abbildung 38: Comparison - Analysis in GCOS

3.5.2 Filterprozesse

Neben der Gesamtauflistung aller Gene der drei Chips wurden gezielt Gene ausgewählt, die

- in der Comparison Analyse sowohl einen signifikanten Increase oder Decrease sowie mindestens an einem Tag den Detection Call P aufwiesen,
- mit den IFN- γ - und TNF- α -pathways in Verbindung standen und
- Schlüsselbegriffe wie Chemokine, Zytokine, Makrophagen, etc. enthielten, die vor allem an Sekundärreaktionen beteiligt sein konnten.

Die Daten von a), b) und c) sind jeweils als separate Excel-Dateien beigelegt. Dabei entspricht die Gene ID der Affymetrix-eigenen Notierung, der Gene Name (selektierte Gene) der gängigen Bezeichnung des zugeordneten Genes und die Description der von GCOS zugeordneten Bezeichnung (mitsamt Mm/Nummerierung).

Im einzelnen erfolgten für a) folgende Filterschritte. Zunächst wurden von jedem Array nur die Proben ausgewählt, die entweder als „Increase“ oder als „Decrease“ klassifiziert wurden. In einem zweiten Schritt wurden nur die Gene beibehalten, die den Detection Call „Present“ aufwiesen, wobei bei Genen mit „Increase“ die Probe selbst, bei Genen mit „Decrease“ die Referenzgruppe ausschlaggebend war. Die Auswahl wurde dabei zunächst für jeden Tag separat durchgeführt. Anschliessend wurde aus den Tabellen der einzelnen Tage eine Gesamtübersicht von Tag 1 bis 5 im Verlauf angefertigt und jedes Gen berücksichtigt,

welches an mindestens einem der fünf Tage exprimiert wurde. Für Tage, an denen ein Gen keine Expression zeigte bzw. nicht den Detection Call „Present“ aufwies, wurde der Wert gleich Null gesetzt. Dieses Verfahren wurde nur für Chip A angewendet, da dieser die 12.000 gängigsten bekannten Gene enthielt, während Chip B und C weitgehend undefinierte Genfragmente, die sog. ESTs, umfassten. Von den 12.000 Genen von Chip A waren 913 Gene differentiell gegenüber dem Ausgangswert exprimiert.

3.5.3 Globale Muster der Genexpression

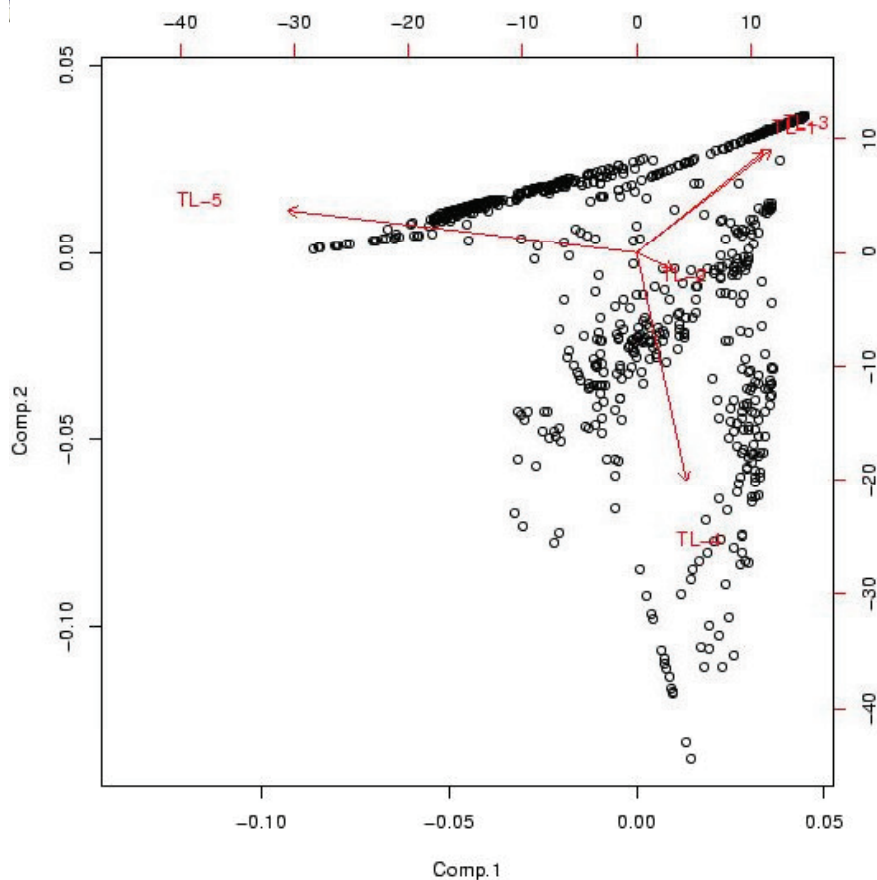


Abbildung 39: PCA-Analyse der 913 selektierten Gene von Chip A

(Programm: Genesifter)

Die ausgewählten Gene konnten mithilfe verschiedener Methoden gruppiert werden. Ein Verfahren war die PCA-Analyse, siehe 2.4.4.3.2.1. Die Gene wurden in unterschiedlichen Klassen zusammengefasst, die einen ähnlichen Verlauf der Genexpression aufwiesen. In der obigen Abbildung entspricht jeder Punkt jeweils einem der 913 selektierten Gene. Pro Gen wurden alle fünf bestimmten Werte (Tag 1 bis 5 nach T-Zell-Injektion) berücksichtigt. Gene mit ähnlichem Verlauf waren solche, deren Punkte im Diagramm nahe beieinander lagen.

3.5.4 Pathwayanalysen am Beispiel der IFN-gamma-/ TNF-alpha-Genfamilie

Abschliessend sollte beispielhaft die Analyse von möglicherweise relevanten Pathways erfolgen. Dazu wurde IFN- γ und TNF- α ausgewählt, da die T-Zellen diese exprimierten und beide Faktoren eine lokale Reaktion bewirken konnten. Bei der Auswahl wurde deutlich, dass viele der auf den Chips vorhandenen Gensequenzen noch nicht Genen zugeordnet oder identifiziert wurden und somit die Analyse nicht als umfassend angesehen werden konnte. Da jedoch kontinuierlich neue Gene identifiziert wurden und werden, kann mehr und mehr Information aus den Array-Daten gewonnen werden.

Die selektierten Gene zeigten mehrheitlich ein starkes Signal an Tag 1 nach T-Zellinjektion, sanken bis Tag 3 ab und stiegen bis Tag 5 wieder an. Dies entspricht von Tag 1 bis 3 dem Verlauf von IFN- γ , von Tag 3 bis 5 Genen einer Sekundärreaktion wie Perforin. Am stärksten exprimierte Gene des IFN- γ -pathways waren INOS und zwei Gene des MHC-Komplexes, die Bereiche u.a. für Fas und für Tapasin (MHC II) kodieren. Stärkste Gene des TNF- α -Pathways waren p38b sowie die Transkriptionsfaktoren PBX3b und 4a, die an der Aktivierung von Zellen beteiligt waren.

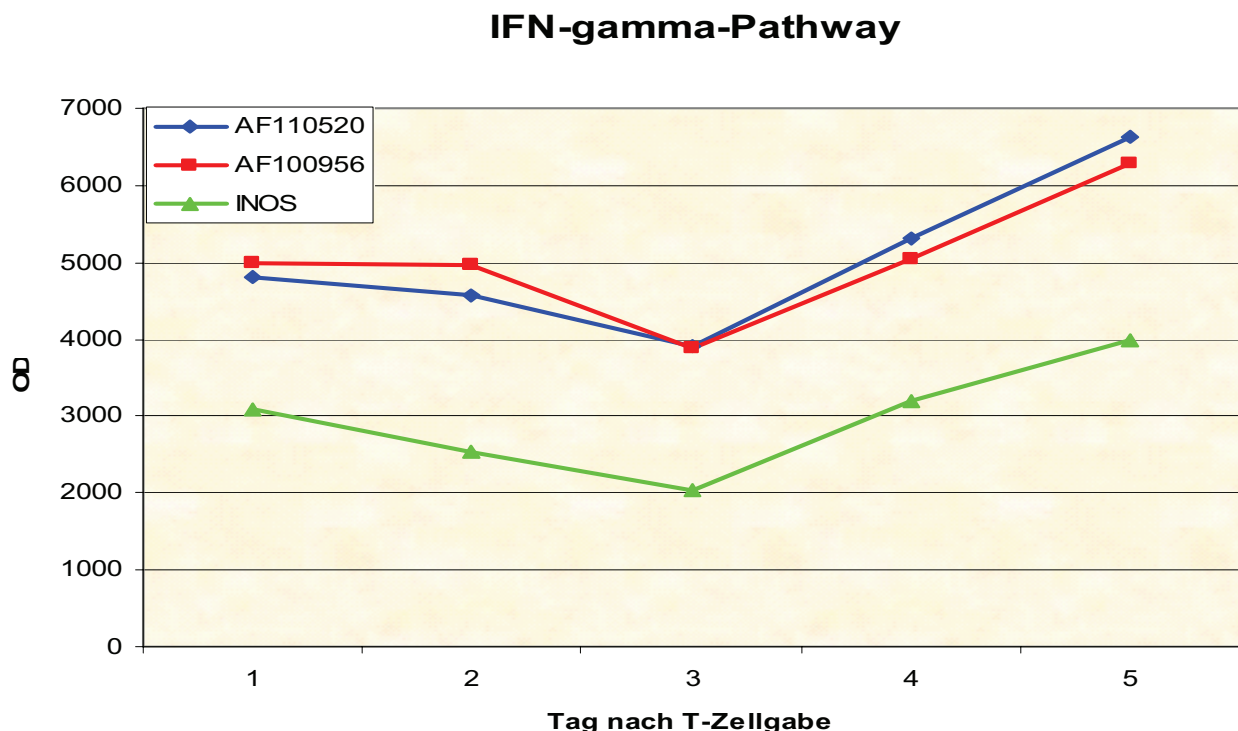


Abbildung 40: am stärksten exprimierte Gene des IFN –gamma- Pathways

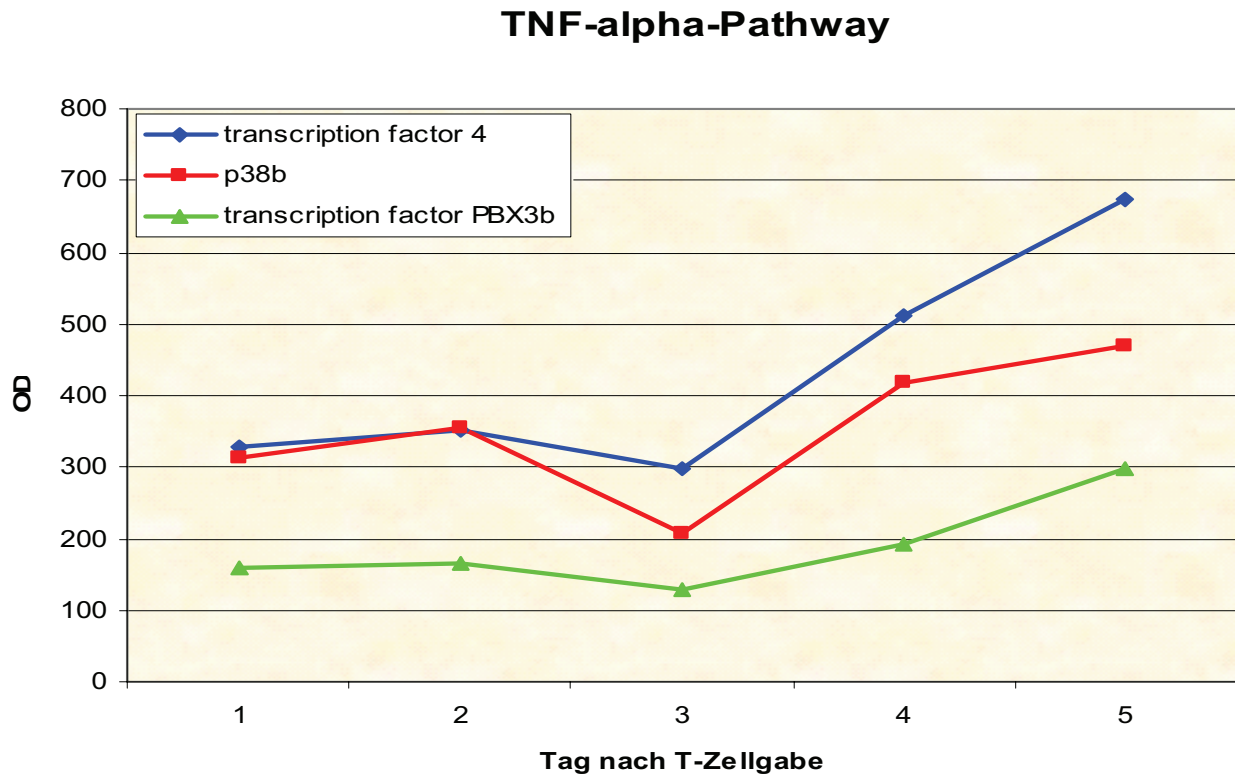


Abbildung 41: am stärksten exprimierte Gene des TNF-alpha -Pathways

4 Diskussion

4.1 Modell

Ein in der Literatur häufig beschriebener und in vielen Studien erforschter Tumor ist das **B16-Melanom**, welches ein aggressives Wachstum und hohes metastastisches Potential aufweist. Eine Injektion in die Schwanzvene führt zu makroskopisch sichtbaren Metastasen in der Lunge, was durch den adoptiven Transfer von zytotoxischen T-Zellen effektiv verhindert werden kann. Mehrere Studien z.B. von Winter et al belegen dies ¹¹¹.

Nach Injektion in die Schwanzvene erreichen die Tumorzellen innerhalb kurzer Zeit über den venösen Rückstrom das **Lungengefässsystem** und adhären hier. Langzeitstudien zeigten, dass nach i.v.- Injektion von B16BL6 in die Schwanzvene nur in der Lunge eine relevante Anzahl von Metastasen entsteht, in anderen Organen wie Leber oder Milz waren nur wenig und kurzzeitig Zellen zu finden ⁶². Auch konnten in Pilotversuchen unmittelbar nach Tumorzellinjektion keine Tumorzellen im arteriellen Blut der A. carotis bzw. Aorta nachgewiesen werden. Der überwiegende Anteil der Tumorzellen bleibt somit im Lungengefässsystem hängen, entweder mechanisch oder über Interaktion mit Adhäsionsmolekülen des Endothels.

Gemäss Studien von Cameron et al ¹⁴ und Luzzi et al ⁶⁹ findet die **Extravasation** erst nach ca. drei Tagen statt. Bis dahin verringert sich die Tumorzellzahl unseren Ergebnissen nach beträchtlich, gemäss dem starken Absinken des Tumormarkers Pmel bis Tag 3 auf weniger als ein Viertel. Die Studien von Cameron et al ¹⁴ und Luzzi et al ⁶⁹ beschreiben Metastasierung ebenfalls als ineffizienten Prozess. Auch die vergleichsweise geringe Anzahl von entstandenen Metastasen im Hunderterbereich (bei Injektion von 2×10^5 Tumorzellen) in der makroskopischen Analyse zeigt dies. Numerisch führt nur jede tausendste der injizierten Tumorzellen zur Bildung einer Metastase, was allerdings zum letalen Ausgang im Modell und in der Klinik ausreicht. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, denen zufolge ein Tumorzellverlust in der Lunge während der ersten drei Tage, also noch während der intravasalen Phase, stattfindet, fanden Cameron et al allerdings ein hohes initiales Zellüberleben (ca. 75%) und einen überwiegenden Zelluntergang nach Extravasation.

Für den Tumorzelluntergang sind mehrere Gründe denkbar, ein Mangel an für das Überleben der Tumorzellen wichtigen Faktoren oder Effekte des Immunsystems (über Immunzellen, Antikörper, Komplementfaktoren und Botenstoffen), des Blutstroms (Scherkräfte etc.) oder des Lungenparenchyms. Da im Versuch der adoptive Transfer erst an Tag 3 erfolgt und zu

diesem Zeitpunkt Pmel bereits auf das Minimum abgesunken ist, sind die CTLs an der initialen Tumorzellyse nicht beteiligt.

Zeitlich fallen im Therapiemodell Extravasation und Ansiedeln der Tumorzellen im Lungenparenchym ungefähr mit Ankunft der CTLs in der Lunge zusammen. Jedoch müssen auch die CTLs erst am Endothel adhären und zu den D5 migrieren, die das Gefässsystem bereits verlassen haben. Die Migration von Immunzellen ist hauptsächlich chemokingesteuert und die Adhäsion erfolgt über Adhäsionsmoleküle des Endothels. Für die Chemotaxis der CTLs im Modell ist eine chemokin-vermittelte Aktivierung des Endothels durch die D5 mit anschliessender Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen denkbar. Zur Charakterisierung der Reaktionen beim adoptiven Transfer wurden entsprechend neben Zytotoxizitätsmechanismen auch die Chemokinexpression und Pathways in den Lungen anhand von Arrayanalysen näher untersucht.

Der **Ort** des Kontaktes von CTLs und Tumorzellen ist nicht genau belegt. In Frage kommt das Gefässsystem oder nach erfolgter Extravasation das Lungenparenchym. Für den Ablauf der Immunantwort ist dies insofern relevant, da die T-Zellen schneller auf intravasale Tumorzellen treffen und diese leichter zugänglich als die in einem Zellverbund organisierten Zellen der Metastasen sind. Für die Wirksamkeit der Therapie ist dies von Bedeutung, da sich die T-Zellen gemäss den FACS-Analysen bereits am Ende der Aktivierungsphase befinden und bei Nichtkontakt mit ihrem Antigen apoptotisch werden. Bei späterer CTL-Gabe proliferieren die D5 bereits im Parenchym, die zu lysierende Tumorzellzahl ist entsprechend grösser und die einzelnen Zellen durch die Organisation im Zellverbund schwerer zugänglich. Die Wirksamkeit des adoptiven Transfers sinkt, was die Ergebnisse aus den Versuchen mit verzögerter T-Zellinjektion belegen.

Zusätzlich unterscheidet sich das **Umgebungsmilieu** im peripheren Blut bzw. Lungenparenchym hinsichtlich Zellen und Botenstoffen. Dies hat einen Einfluss auf die induzierten Sekundärreaktionen und möglicherweise den Therapieerfolg. Neben direkten Zytotoxizitätsmechanismen der CTLs kann die Lyse der D5 auch über lösliche Faktoren vermittelt werden, welche Reaktionskaskaden auslösen (z.B. TNF- α - oder IFN- γ -Pathways) oder weitere Immunzellen anlocken.

Ab Tag 3 steigt Pmel wieder an, zunächst langsam von Tag 3 bis 5, dann annähernd exponentiell. Während dieser Zeit migrieren die Tumorzellen durch das Lungenparenchym, etablieren sich und beginnen die **Proliferation**. Die Anwesenheit der Tumorzellen im Gewebe ruft eine inflammatorische Reaktion hervor, was aus der veränderten Expression von u.a. einigen Chemokinen hervorgeht. Neben den Tumorzellen können hierzu prinzipiell auch

Zellen des Parenchyms beitragen. Nach Beginn der Proliferation führt die massive Metastasenbildung ohne therapeutisches Eingreifen in kurzer Zeit zum Tod der Tiere.

Die Gabe von tumorspezifischen CTLs innerhalb von ca. 4 Tagen nach Tumorzellinjektion kann dies komplett verhindern. Zu einem späteren Zeitpunkt treten Metastasen auf, wenn auch weniger als in der untherapierten Gruppe. Einige Tumorzellen entkommen somit der Lyse. Grund kann ein numerischer Effekt sein, bedingt durch die Tumorzellproliferation. Die CTLs treffen auf eine grössere Anzahl von Tumorzellen, die im Parenchym „versteckt“ und als Zellverbund organisiert sind. Dies führt zu erschwerter Zugänglichkeit, damit einem verzögerten Tumor- / T- Zell - Kontakt und nebenbei zu einer Selektion hinsichtlich dem Vorhandensein von Tumor-Escape-Mechanismen.

Durch Reduktion der initial injizierten Tumorzellanzahl entsprechend der Generationszeit der Tumorzellen kann das therapeutische Fenster ausgedehnt werden. Dies spricht dafür, dass für die Wirksamkeit des adoptiven Transfers vor allem die E/T-Ratio ausschlaggebend ist.

Für die Lyse von Tumorzellen, die nicht durch direkte T-Zellmechanismen erfolgt, spielen Sekundärreaktionen eine entscheidende Rolle. Diese können chemokinvermittelt zur Einwanderung weiterer Immunzellen führen, die, sofern sie über Zytotoxizitätsmechanismen verfügen, die verbleibenden Tumorzellen lysieren. Der Verlauf der Tumor- und T-Zellreaktion zeigte, dass auch im ursprünglichen Modell einige Tumorzellen die T-zellvermittelte Lyse überleben und durch Sekundärreaktionen erfasst werden müssen. Die Gesamtreaktion im Sinn der Tumorzelllyse nach adoptivem Transfer setzt sich somit aus der Summe der einzelnen Reaktionskaskaden zusammen.

Die Studien zeigten somit, dass tumorspezifische T-Zellen prinzipiell zur Lyse von Tumorzellen fähig sind. Welche Mechanismen hierbei in vivo eine Rolle spielen, wurde mittels Genexpressionsanalysen untersucht, Ziel waren hierbei sowohl klassische als auch sekundäre Reaktionen. Die genaue Untersuchung erfolgte über PCR-Analysen, ein Screening auf beteiligte Gene über Programmarrays (Chemokine und Chemokinrezeptoren) sowie Affymetrixdaten.

4.2 Analyse der Zytotoxizitätsmechanismen

Die **Zytotoxizität** im B16-Melanom- Modell nach adoptivem Transfer der CTLs kann über verschiedene Wege vermittelt sein. In Frage kommen:

- Klassische T-Zelleffektormechanismen:
 - Perforin/Granzym-System
 - Fas/Fasligand-System
- Weitere Oberflächenmoleküle der CTLs
 - NKG2D
 - TRANCE/TNFSF11
- Direkte Effekte löslicher Faktoren
 - TNF- α
 - IFN- γ
 - Chemokine
- Sekundäre Mechanismen
 - Aktivierung über Faktoren wie z.B. TNF- α , IFN- γ oder Chemokine
 - Einwanderung weiterer Immunzellen

4.2.1 Zytotoxizität der CTLs

Gemäss der PCR-Analysen und Chemokinarrays verfügen die kultivierten CTLs über folgende Faktoren:

1. Perforin / Granzym
2. NKG2D und TRANCE
3. TNF- α
4. IFN- γ
5. Chemokine: CXCL15, CCL28, Tapasin, Erythropoetin
6. Chemokinrezeptoren: CXCR6, CCR7 und CCR2

Die folgende Tabelle fasst die Haupteffekte der genannten Faktoren zusammen. Das Vorhandensein der Faktoren alleine sagt jedoch noch nichts über deren Funktionalität und damit Beteiligung und Beitrag zur Lyse der Tumorzellen aus. Da auch in Knockoutmodellen der Transfer wirksam war, ist eine Beteiligung mehrerer der aufgelisteten Mechanismen wahrscheinlich.

Tabelle 22: Zytotoxizitätsmechanismen

Faktor	Ligand / Funktion
Perforin/Granzym	Porenbildung durch Perforin Apoptose durch Granzym über Caspasen-Pathways
NKG2D (Rezeptor)	RAE1, H60, Mult1 – direkte Zytotoxizität
TRANCE	RANK – Aktivierung von dendritischen Zellen Förderung der Leukozyten-Endothel-Interaktion
TNF	Direkt: TNF Signalling-Pathways – Apoptose oder Zellüberleben und -proliferation Indirekt: Rekrutment von Neutrophilen und Monozyten
IFN	Direkt: IFN- γ -Rezeptor - Zellyse Indirekt: u.a. Makrophagenaktivierung
CXCL15	Chemotaxis von Neutrophilen (Atemwegsepithel)
CCL28	CCR3, CCR10 angeborene/erworbene Immunantwort
Tapasin	Beladung von MHC-I-Molekülen mit Peptiden
Erythropoetin	CCR4, Funktion als Chemokin
CXCR6	NKT-Zell Trafficking, DC/ Makrophagen-Bindung
CCR2	Macrophagen/ Monocyten/ Leukocyten - Trafficking
CCR7	T-Lymphopoese in sekundären lymphoiden Organen

Für einen Teil der aufgeführten Mechanismen benötigen die CTLs keine weiteren Faktoren aus dem Umgebungsgewebe. Dafür sprechen auch die **Zytotoxizitätsassays**. Die Kokultivierung von D5 und CTLs führt ohne Zugabe weiterer Faktoren zur D5-Lyse. Allerdings zeigt der asymptotische Kurvenverlauf, dass auch bei sehr hoher E/T- Ratio nicht alle Tumorzellen lysiert werden können. Grund kann sein, dass die D5 eine inhomogene Zellkultur darstellen und einige Zellen über Tumor-Escape-Mechanismen verfügen und positiv selektiert werden. In-vivo sinkt die E/T-Ratio bei späterer CTL-Gabe durch das exponentielle Wachstum schnell ab. Wie in den in-vitro-Assays überleben ein Teil der Tumorzellen und führen zu Progredienz der Metastasierung.

In der Klinik ist es rein technisch schwer, eine dem Zytotoxizitätsassay entsprechende **E/T-Ratio** zu erreichen. Im Mäusemodell wurden 2×10^5 Tumorzellen und $3,5 \times 10^7$ CTLs eingesetzt, was rechnerisch einer E/T-Ratio von 175:1 entspricht. Durch die zeitversetzten Injektionszeitpunkte sowie das Absterben der Tumorzellen liegt die tatsächliche E/T-Ratio an Tag 3 im Bereich von 175.000:1 (ca. 0,1% der D5 bilden Metastasen, gemäss einer Metastasenanzahl im Hunderterbereich ¹¹³), verringert sich aber sowohl durch Tumorzellproliferation als auch Verschwinden der CTLs aus dem Lungengewebe innerhalb von 24 Stunden stark. In der Literatur schwankt der Prozentsatz der Tumorzellen, die nach Erreichen des Lungengefässsystems überleben und Metastasen bilden, beträchtlich, z.B 0,01% vs. 74% ins Parenchym einwandernde und metastasenbildende Zellen ^{13, 56}. Anders als in-vitro

in den Zytotoxizitätsassays ist die E/T-Ratio im Mausmodell unabhängig vom tatsächlichen Wert ausreichend, um alle Tumorzellen zu lysieren. Langzeitstudien der Literatur belegen, dass therapierte Mäuse auch dauerhaft keine Metastasen ausbilden^{32, 112}. Da auch in-vivo nicht alle Tumorzellen durch direkte Mechanismen lysiert werden, müssen Sekundärreaktionen hierfür verantwortlich sein und spielen damit für die langfristige Wirksamkeit der Therapie eine Rolle. Selbst wenige überlebende Tumorzellen führen zu Progredienz der Metastasierung, und somit ggf. zu einem Sterben der Mäuse.

Unter Sekundärreaktionen fallen Reaktionen, bei denen die CTLs durch Oberflächenmoleküle oder sezernierte Faktoren in der Tumorumgebung Reaktionskaskaden auslösen, die u.a. zytotoxisch wirken oder weitere Zellen wie Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen etc. anlocken.

4.2.2 Analyse der einzelnen Mechanismen

Für die Diskussion der Immunantwort ist von Bedeutung, dass aktivierte CTLs nur 24 Stunden lang nach Injektion in den Lungen vorhanden sind. Bereits an Tag 4 ist IFN- γ als Marker von aktivierten T-Zellen in den Lungen nicht mehr nachweisbar. Da Pmel jedoch nur langsam absinkt, ist davon auszugehen, dass auch noch nach Verschwinden der aktivierten T-Zellen aus den Lungen Tumorzellen vorhanden sind. Diese müssen durch indirekte oder Sekundärreaktionen lysiert werden, da das Abfallen von Pmel gegen eine Persistenz oder Proliferation spricht. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Proteinen kommen hierfür direkte T-Zell-Mechanismen über lösliche Faktoren ebenfalls nicht in Frage. Denkbar ist jedoch die Einleitung der Apoptose durch einen T-Zell-induzierten indirekten Pathway z.B. über TNF- α oder über Chemokine, die Reaktionskaskaden in der Tumorzellumgebung auslösen, mit oder ohne Beteiligung weiterer Immunzellen.

4.2.2.1 Direkte Zytotoxizität

Die Tumorzelllyse über die **direkten Mechanismen** Perforin/Granzym und NKG2D muss innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgen. Fasligand als weiterer klassischer T-Zellmechanismus wird weder von den CTLs noch in den Lungen exprimiert. Auch die direkten Effekte von sezernierten Faktoren wie IFN- γ über den IFN- γ -Rezeptor auf den Tumorzellen oder TNF- α müssen in dieser Zeitspanne ablaufen. Sind über Reaktionskaskaden weitere Faktoren der Tumorzellumgebung beteiligt, ist die gleichzeitige Anwesenheit von

Effektor- und Targetzelle nicht erforderlich, sodass auch noch nach Verschwinden der CTLs aus den Lungen eine Lyse stattfinden kann.

4.2.2.1.1 Das Perforin/Granzym-System

Nach CTL-Injektion steigt das Perforin - Signal erwartungsgemäss in beiden Gruppen an, da bereits nach in-vitro-Kultivierung die CTLs eine starke Expression aufweisen. Der grössere Anstieg in der Therapiegruppe spricht für eine zusätzliche Induktion der Perforinexpression in den CTLs durch den erneuten Kontakt mit dem Antigen. Anschliessend fällt in beiden Gruppen das Signal wie jenes von IFN- γ innerhalb von 24 Stunden ab. Granzym, das nach der Porenbildung durch Perforin in der Zielzelle als Protease für die Lyse verantwortlich ist, weist nur in der Therapiegruppe einen Anstieg unmittelbar nach CTL-Injektion auf, bleibt dann auf diesem Niveau und steigt gegen Tag 8 weiter an. Der initiale Anstieg kann durch die CTLs erklärt werden, diese exprimieren Granzym, was durch den erneuten Antigen-Kontakt weiter induziert werden kann. Das Ausbleiben des Anstiegs in der T-Zellgruppe lässt sich durch die relativ hohe basale Expression erklären, wofür z.B. permanent in der Lunge vorhandene marginierte Granulozyten verantwortlich sein können. Es zeigt auch, dass die erneute Induktion in der Therapiegruppe ausgeprägt sein muss. Über das Bronchialsystem findet in den Lungen ein vermehrter Kontakt mit Pathogenen und damit Aktivierung des Immunsystems statt. Während der initiale Anstieg in der Therapiegruppe durch die CTLs erklärbar ist, müssen für die Aufrechterhaltung des Signals über Tag 1 nach T-Zellgabe hinaus andere Zellen verantwortlich sein. Denkbar ist, dass die lysierten Tumorzellen und die allgemeine Entzündung zu einer Abräumreaktion durch Monozyten / Makrophagen oder Granulozyten führen, die ebenfalls Granzym exprimieren können.

Eine CTL-vermittelte Perforin- abhängige Zytolyse ist somit möglich. Studien von Winter H et al haben allerdings gezeigt, dass bei Verwendung von Perforin- Knockout-(PKO)-Mäusen die generierten CTLs in vivo ebenfalls effizient die Metastasenentstehung verhindern, und zwar sowohl bei Transfer in Wildtyp- als auch PKO - Mäuse. In-vitro zeigen die Perforin-defizienten CTLs allerdings keine zytotoxische Aktivität ¹¹³. In vivo kann somit der Anteil von Perforin und damit auch Granzym an der Tumorzelllyse durch weitere Mechanismen mit Beteiligung der Tumorzellumgebung ersetzt werden. Die Wirksamkeit des Transfers von Perforin-defizienten CTLs in PKO- Mäuse zeigt, dass auch die Induktion einer Perforinexpression in anderen Zellen des Umgebungsgewebes durch die CTLs nicht erforderlich ist. Sowohl der first lethal hit als auch eventuelle Sekundärreaktionen können somit Perforin-unabhängig über andere Mechanismen ablaufen.

4.2.2.1.2 NKG2D-Rezeptor

Ein weiterer direkter Weg ist über den Rezeptor NKG2D möglich, der ebenfalls von den CTLs exprimiert wird. Dieser sonst v.a. auf NK-Zellen vorhandene Rezeptor erkennt im Gegensatz zum T-Zellrezeptor nicht (Tumor-) Antigene, sondern unspezifisch bestimmte Liganden wie MICA, MICB, RAE-1, Mult-1 oder ULBP. Er verfügt auch nicht über Mechanismen der Rekombination oder Sequenzdiversifikation zur Generierung von tumorantigen-spezifischen Rezeptoren ⁸³. Vorteil dieses Mechanismus ist die MHC-unabhängige Erkennung von v.a. transformierten Zellen, die häufig als Tumor-Escape-Mechanismus die MHC – Expression herunterregulieren. Lysiert werden die Zielzellen entweder direkt über die Ligand-NKG2D-Bindung oder über eine Aktivierung des spezifischen Immunsystems z.B. über cross - priming von T-Zellen mittels dendritischer Zellen. Während NK-Zellen eher die Lyse der Zielzelle herbeiführen sowie Zytokine sezernieren, wirkt NKG2D in T-Zellen v.a. als Kostimulator. In unserem Modell liess sich allerdings keiner der bekannten NKG2D-Liganden nachweisen, weder in den D5 noch im Lungenparenchym. Eine Beteiligung von NKG2D an der Tumorzelllyse ist somit fraglich und müsste über andere Liganden erfolgen.

4.2.2.1.3 Weitere lösliche Faktoren

Neben Perforin und Granzym sezernieren die CTLs weitere Faktoren wie **IFN- γ** und **TNF- α** , die direkt oder indirekt wirken können.

4.2.2.1.3.1 *IFN- γ*

IFN- γ bindet an den IFN- γ -Rezeptorkomplex, der intrazellulär über Jak1 und Stat1 zur Transkription von Genen führt. Zumindest der IFN- γ - Rezeptor Typ 1 konnte mittels Affymetrix in den Lungen der therapierten Tiere nachgewiesen werden. Neben den Tumorzellen könnten aber auch andere Zellen des Lungengewebes diesen exprimieren und zu Sekundärreaktionen führen. Eine direkte Tumorzelllyse setzt die Expression in den Tumorzellen voraus.

Nach dem Absinken des IFN- γ -Signal bleibt dieses auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Es werden somit keine weiteren tumorspezifischen T-Zellen in den Lungen oder drainierenden Lymphknoten aktiviert. Auch in der Tumorgruppe kam es zu keiner messbaren T-Zellantwort, obwohl das B16-Melanom prinzipiell, wenn auch nur schwach, immunogen ist. Grund hierfür ist möglicherweise eine mangelnde Antigenpräsentation durch Tumor-Escape-Mechanismen wie zum Beispiel eine Downregulierung von MHC-Molekülen. Dadurch kann der Tumor nicht direkt von T- Zellen erkannt werden. Zur Generierung der tumorspezifischen CTLs wird

eine GM-CSF-exprimierende Variante verwendet, welches die Reifung von dendritischen Zellen beeinflusst. Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK - Zellen erkennen MHC - unabhängig die Tumorzellen, phagozytieren diese oder leiten eine Phagozytose über Granulozyten ein und präsentieren die Tumorantigene anschliessend den DCs ³⁰. Grund für ein Ausbleiben einer Immunantwort auf die Wildtyp-B16- Zellen kann somit auch eine fehlende Stimulation von dendritischen Zellen zu Reifung und Differenzierung durch die B16-Zellen sein. Die dendritischen Zellen können nach Migration in die regionären Lymphknoten anschliessend T-Zellen aktivieren, Cross-Priming genannt.

4.2.2.1.3.2 *TNF- α und seine verschiedenen intrazellulären Pathways*

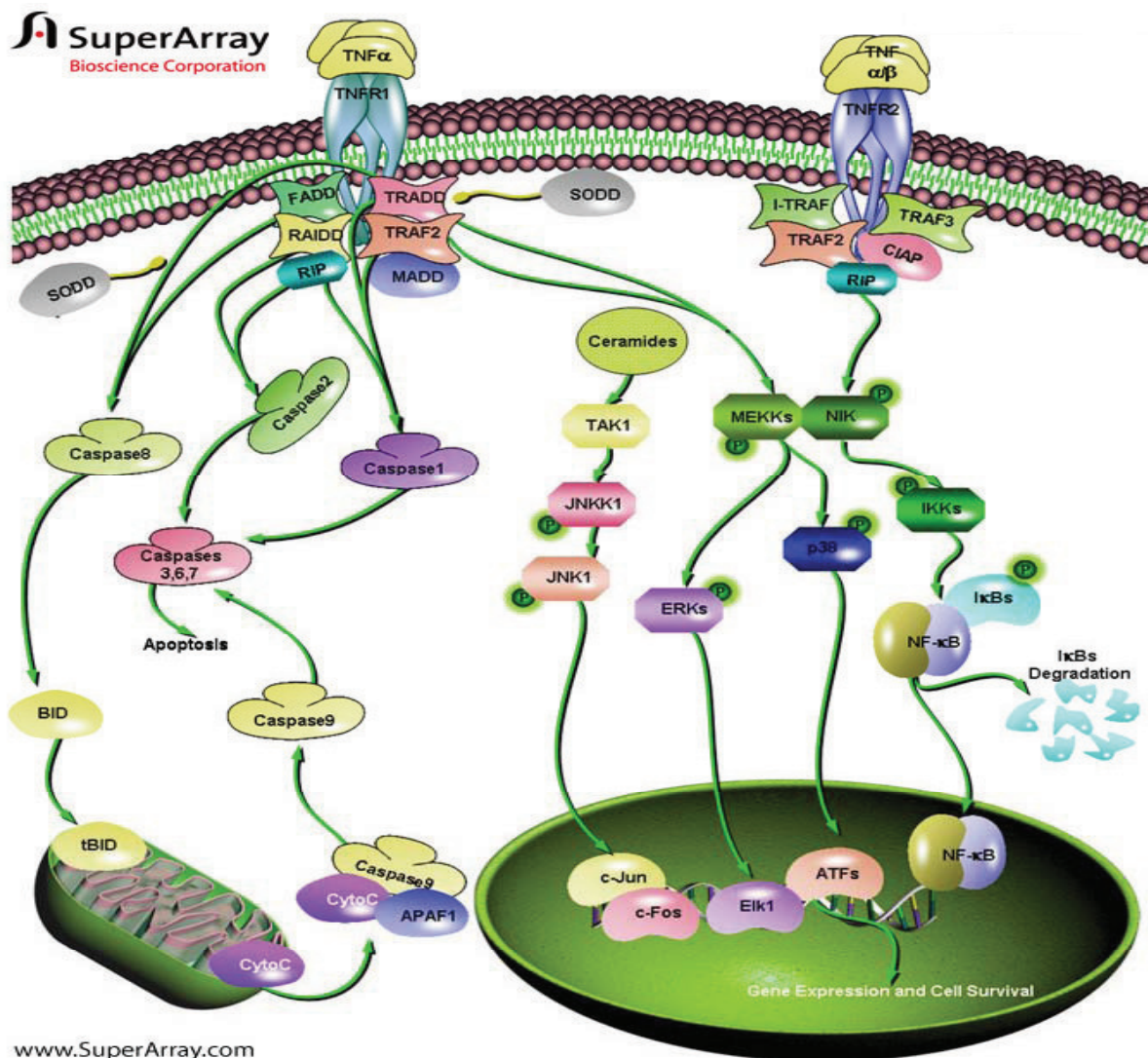
Neben IFN- γ kann auch **TNF- α** direkte Effekte ausüben. Der zunächst membranständige Faktor wird durch Hydrolyse freigesetzt und bindet als Homotrimer an den TNF-Rezeptor 1 oder 2 auf der Zielzelle. Je nachdem, welche intrazellulären Signalmoleküle vorhanden sind, wird über DNA - Fragmentation die Apoptose bzw. der programmierte Zelltod eingeleitet oder Zellüberleben und - proliferation gefördert ⁵⁹. Welcher Weg in den Lungen aktiviert wird, lässt sich anhand der Affymetrix-Daten untersuchen, indem die Expression der einzelnen Signalkettenelemente in den Lungen überprüft wird und so ein Hinweis auf aktivierte oder auszuschliessende Signaling Pathways gewonnen wird.

4.2.2.1.3.2.1 Analyse der intrazellulären TNF-alpha Signaling Pathways mittels Affymetrix

TNF- α wird ausser von den CTLs von weiteren Zellen wie Makrophagen, anderen Lymphozyten und Fibroblasten v.a. als Reaktion auf Zellstress exprimiert. Das TNF- α in den Lungen kann entsprechend von verschiedenen Zellen stammen. In allen drei Zell-erhaltenden Gruppen steigt die TNF- α - Expression, signifikant allerdings nur in den Gruppen, die T-Zellen erhalten.

Abb. 42 spiegelt die Komplexität der intrazellulären TNF Signaling Pathways wider.

TNF-Effekte werden über zwei Rezeptortypen vermittelt, TNF-R1 und TNF-R2 ⁹⁵. TNF- α bindet vorwiegend an TNF-R1, der von vielen Zelltypen exprimiert wird, und führt hauptsächlich zur Apoptose ¹²⁶. Pathway-Elemente sind hierbei u.a. TRADD, FADD, RAIDD, MADD, RIPP, Kaspasen und Cytochrom C. Letztere beiden lösen unmittelbar die Apoptose aus.



www.SuperArray.com

Abbildung 42: TNF Signaling Pathways (Quelle: www.superarray.com)

TNF-R2, an den vor allem TNF-β, aber auch TNF-α bindet, vermittelt Zellproliferation und Zellaktivierung über die Signaltransducer JNK, ERKs, p38 und NF-κB⁴. Da diese Rezeptoren auf vielen Zellen exprimiert sind, bleibt auch nach Identifizierung von aktivierten Pathways in den Lungen unklar, in welchen Zellen diese Signalketten ablaufen. Einfacher ist es, durch Negativausschluss die Pathways zu identifizieren, die nicht beteiligt sind. Bei diesen ist für die verschiedenen Signalkettenelemente keine Expression messbar bzw. liegt unter dem Detektionsniveau. Im Anhang befinden sich tabellarisch aufgelistet relevante Signaltransducer der TNF-Pathways. Mit dieser Vorgehensweise lassen sich je nach Fragestellung weitere Pathways überprüfen.

Die drei am stärksten exprimierten Gene waren p38 sowie die Transkriptionsfaktoren PBX3b und 4. Alle drei spielen für die Aktivierung von stress- und wachstumsbezogenen Signaltransduktionswegen eine Rolle und steigen im Verlauf der Therapie an. Da die Tumorzellen apoptotisch werden, sind diese als Zielzellen unwahrscheinlich. Der TNF-2-Rezeptor findet sich vor allem auf Lymphozyten, Neutrophilen, aber auch auf dem Endothel und bewirkt deren Aktivierung, die Hochregulierung von MHC - Molekülen sowie Adhäsionsmolekülen. P38, PBX3b und 4 stehen möglicherweise in Zusammenhang mit der sekundären Lyse- und Abräumreaktion der verbleibenden Tumorzellen durch eingewanderte Zellen wie Neutrophile oder Makrophagen.

Die Verläufe der übrigen Gene sind unterschiedlich. Einige zeigen nach initialem Anstieg einen Rückgang bis Tag 3. Dies gleicht dem Verlauf von IFN- γ , sodass diese Gene im Zusammenhang mit den aktivierten CTLs und deren direkten Effekten stehen können. Andere steigen wie p38 und die Transkriptionsfaktoren PBX3b und 4 im Verlauf der Therapie an und sind eher an inflammatorischen oder immunologischen Sekundärreaktionen beteiligt. Zur weiterführenden Untersuchung des TNF- α -Effektes auf die Tumorzellen bieten sich Expressionsanalysen der Tumorzellen hinsichtlich von TNF-R1/2 sowie der Signaltransducer an. Für letztere wäre eine vorhergehende Kokultivierung von D5 und TNF- α oder eine Isolation der D5 aus den Lungen sinnvoll.

Von den einzelnen Reaktionskaskaden waren nicht alle Elemente komplett nachweisbar. Ob dadurch der jeweilige Pathway auszuschliessen ist oder ob andere Faktoren die fehlenden ersetzen, bleibt zu klären. Weiter sind die Affymetrix- Ergebnisse z.T. widersprüchlich zu den PCR- und Programmarraydaten, wobei PCR und Programmarrays als genauere Verfahren mehr Gewicht gegeben werden sollte. Insgesamt zeigten die Analysen auch die Limitationen der Affymetrix-Array-Methode auf, die mehr im Sinne eines Screenings als für den abschliessenden Nachweis zu verwenden ist.

Kommerzielle Array-Analyseprogramme wie Genesifter o.a. bieten eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten, um aus der Datenmasse Gene zu selektieren und relevante Informationen zu gewinnen. Hierbei interessant sind vor allem Ontology-Reports, z-scores sowie Cluster-Analysen. Vorab ist eine statistische Analyse erforderlich. Im Versuch wurde diese durch das Poolen der RNA aus jeweils sechs Tieren erreicht. Die einzelnen Signalwerte entsprechen dadurch jeweils dem Mittelwert der Signale der einzelnen Tiere. Mit Oncology-Reports und z-scores lassen sich Pathways bestimmen, die über- oder unterrepräsentiert sind. Cluster-Analysen ordnen die Gene in Gruppen mit ähnlichen Verläufen der Genexpression ein.

Eine genauere Auswertung und Darstellung würde den Rahmen dieser Doktorarbeit sprengen. Die kompletten Daten sowie ausgewählte Analysen sind in elektronischer Form beigelegt.

4.2.2.1.4 Zusammenfassung direkte Zytotoxizitätsmechanismen

Es kann festgehalten werden, dass

- für die in-vitro Zytotoxizität Perforin notwendig ist
- die in-vivo Zytotoxizität ebenfalls über Perforin erfolgen kann, aber nicht muss
- die CTLs weitere Faktoren wie IFN- γ , TNF- α , NKG2D und TRANCE exprimieren, die ebenfalls an der Tumorzelllyse beteiligt sind
- Faktoren und Zellen aus dem Umgebungsgewebe an der Tumorzelllyse beteiligt sind
- ohne therapeutisches Eingreifen keine suffiziente (T-Zell-) Immunantwort generiert wird, weder direkt noch indirekt über das angeborene Immunsystem mittels Cross Priming
- für die komplette Lyse Sekundärreaktionen über das angeborene Immunsystem erforderlich sind

4.2.2.2 Indirekte Mechanismen

Bei indirekten Mechanismen binden die Effektormoleküle der CTLs nicht direkt an die Tumorzellen, sondern an weitere Faktoren oder Zellen aus der Tumorzellumgebung. Über Reaktionskaskaden wird die Lyse der Tumorzellen ausgelöst. Sind die Faktoren und Zellen nicht konstitutiv im Lungenparenchym vorhanden, muss die Expression der Faktoren induziert und die Zellen über Chemotaxis angezogen werden, wobei Chemokine sowie Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle spielen. Im Gegensatz zu den direkten erfordern indirekte Mechanismen keine Kopräsenz von CTLs und Tumorzellen. Die Lyse kann je nach für die Generierung der Reaktionen erforderlicher Zeit auch zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen. Somit kommen indirekte Mechanismen auch für die sekundäre Lyse in Frage. Von den mittels PCR untersuchten Faktoren kommen für die Aktivierung von indirekten Mechanismen vor allem IFN- γ , TNF- α und TRANCE in Frage.

4.2.2.2.1 Indirekte Effekte von IFN- γ

IFN- γ kann Makrophagen aktivieren, die Reifung von weiteren CTLs fördern, das Endothel zur Hochregulierung von ICAM-1, und MHC-I/ II- Molekülen stimulieren und damit die Adhäsion von Lymphozyten begünstigen sowie Effekte von TNF- α verstärken. Da keine

weiteren CTLs im Modell allerdings nicht generiert werden, könnte IFN- γ vor allem an der Einwanderung weiterer Immunzellen beteiligt sein.

4.2.2.2.2 Indirekte Effekte von TNF- α

TNF- α aktiviert über den TNF-R2 Immunzellen, vor allem Neutrophile, und aktiviert und induziert in Endothelzellen die Hochregulierung der MHC- Expression. Wie IFN- γ kann es damit Sekundärreaktionen hervorrufen. Die Affymetrixdaten der Therapiegruppe zeigten, dass TNF-R2 in den Lungen vorhanden ist. Von den mit dem TNF- α -Signaling verbundenen Genen sind p38 und die Transkriptionsfaktoren PBX3b und 4 am stärksten exprimiert, diese sind Elemente der aktivierenden und proliferationsfördernden Pathways. Studien an HUVECS zeigten, dass TNF- α im Endothel die Induktion der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1/INCAM-1, ELAM-1 und E-Selectin sowie die Stimulierung der Zytokinsekretion (v.a. IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF und G-CSF) bewirkt ^{26, 95}. Zhou et al zeigten, dass hierbei auch TNFR1 und NF-kappaB, nicht aber p38, ERK oder JNK-Kinase beteiligt sind ¹²⁶. Adhäsionsmoleküle und Zytokine sind an der Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten beteiligt. Liganden sind LFA-1 für ICAM-1 und VLA-4 (Integrin $\alpha 4\beta 1$) für VCAM-1; für die anderen sind die Liganden nicht genau bekannt.

Im einzelnen binden sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 Lymphozyten, zusätzlich adhären an ICAM-1 v.a. Neutrophile und an VCAM-1 Monozyten. E-Selectin (CD62E) bindet vorrangig Granulozyten.

4.2.2.2.3 TRANCE

TRANCE ist ein Transmembranmolekül der TNF- Superfamilie und wird von T-Zellen in Milz und Lymphknoten exprimiert, vor allem von Gedächtniszellen. Es bindet an den TRANCE-Rezeptor RANK, welcher sich vornehmlich auf dendritischen Zellen befindet und vermittelt damit Interaktionen zwischen T- und dendritischen Zellen. Aktivierte dendritische Zellen können über Cross-Priming T-Zellen, vor allem memory cells, aktivieren sowie Zytokine und Chemokine exprimieren. Damit ermöglicht TRANCE prinzipiell die Generierung von tumorspezifischen T-Zellen mittels Cross-Priming. Da keine weiteren aktivierten CTLs generiert werden ^{61, 116}, kann auch TRANCE im Modell vor allem Sekundärreaktionen über die Zyto- und Chemokinsekretion von dendritischen Zellen bewirken.

4.2.2.2.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die Lyse der Tumorzellen, die nicht durch den lethal hit der injizierten CTLs erreicht wurden, erfolgt durch sekundäre Reaktionen. Sind hierfür die im Lungenparenchym vorhandenen Zellen und ihre exprimierten Faktoren nicht ausreichend, müssen chemokinvermittelt weitere Immunzellen angelockt werden. Funktionell lassen sich Chemokine in inflammatorische und homöostatische einteilen ⁷⁵. Über inflammatorische Chemokine können CTLs und Tumorzellen bzw. Tumorzelldebris eine Entzündungsreaktion im Gewebe hervorrufen, homöostatische sind an der Steuerung der Immunantwort beteiligt. Untersucht wurden sowohl Tumor- und T-Zellen vor Injektion als auch Lungen tumortragenden, therapierter und Kontrolltiere. In den Lungen kann in den Zellen die Induktion weiterer Gene erfolgen. Die Tumorgruppe gibt Hinweise darauf, was die Anwesenheit der Tumorzellen im Lungenparenchym bewirkt. In der Therapiegruppe lassen sich Kandidaten für die Generierung von Sekundärreaktionen im Sinne von a) weiteren Immunantworten und b) Entzündungs- bzw. Abräumreaktionen identifizieren, besonders interessant sind hierfür Chemokine, die im Zusammenhang mit der Chemotaxis von (Immun-) Zellen stehen. Chemokine, die in der Therapie-, aber nicht in der Tumorgruppe oder differentiell zu dieser exprimiert werden, stehen mit dem adoptiven Transfer in Verbindung. Eine Übersicht über die wichtigsten Chemokine/ -rezeptoren und deren Funktionen siehe ^{27, 75, 127}.

Folgende Tabellen zeigen die nachgewiesenen Gene (Tab. 23 und 24) sowie deren Bindungspartner und Hauptfunktionen (Tab. 25 und 26):

Tabelle 23: Überblick exprimierte Chemokine

B16	CTLs	Tumorgruppe	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
CCL17		CCL17	CCL17	CCL17
		CCL21a	CCL21a	CCL21a
CCL28	CCL28	CCL28	CCL28	CCL28
CXCL2		CXCL7	CXCL7	CXCL7
		CXCL12		
CXCL15	CXCL15	CXCL15	CXCL15	CXCL15
		CXCL16	CXCL16	CXCL16
	Erythropoetin	Erythropoetin	Erythropoetin	Erythropoetin
		Fraktalkine		
	Tapasin	Tapasin	Tapasin	Tapasin

Tabelle 24: Überblick exprimierte Chemokinrezeptoren

B16	CTLs	Tumorgruppe	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
		CXCR4		
CXCR7	CXCR6	CXCR7	CXCR7	
	CCR2			
	CCR7			
CCR9				

Tabelle 25: Übersicht Bindungspartner und Funktion der exprimierten Chemokine

Gen	Aliases	Rezeptoren	Funktion
CCL17	TARC	CCR4	T-Lymphopoese, Chemotaxis von T-Zellen / Makrophagen ^{51, 52}
CCL21a	TCA4, SLC	CCR7	T-Lymphopoese, Kostimulation naiver T-Zellen ^{20, 36, 68, 98, 117, 125}
CCL28	MEC, CCK1	CCR3/10 (GPR2)	Epithel – IgA - Bindung ⁴⁵
CXCL2	MIP-2	CXCR2 (IL-8R)	Chemotaxis von PMNs / Neutrophilen, lokale Entzündungsreaktion ^{115, 28, 124}
CXCL7	Ppbb, TGB	IL-8Rb	Thrombozytopoese / Megakaryopoese ¹²²
CXCL12	SDF-1	CXCR4/7	transendotheliale Leukozytenmigration, Chemotaxis von Lymphozyten / Neutrophilen ^{5, 9, 12, 68, 97, 106}
CXCL15	Lungkine ?		Atemwegepithel, Chemotaxis von Neutrophilen ^{90, 19}
CXCL16	SR-PSOX	CXCR6	T-Zell-/ NKT-Zellinteraktion mit dendritischen Zellen ^{35, 43, 54, 93, 94}
Erythropoetin		EPO-R	JAK/STAT Signaling, (Neo-) Angiogenese ^{44, 63, 66, 73, 100}
Fraktalkine	CX3CL1	CX3CR1	Chemotaxis von Monozyten/ Makrophagen-/ NK-Zellen ^{35, 42, 43, 54, 56, 84, 93, 94}
Tapasin		TAP1/2, MHC I	Beladung von MHC-I- Molekülen mit prozessierten Antigenen ¹²⁵

Tabelle 26: Übersicht Bindungspartner und Funktion der exprimierten Chemokinrezeptoren

Gen	Aliases	Liganden	Funktion
CXCR4		CXCL12	transendotheliale Leukozytenmigration, Chemotaxis von Lymphozyten/ Neutrophilen ^{5, 9, 12, 68, 97, 106}
CXCR6		CXCL16	NKT-Zell Trafficking, DC/ Makrophagen-Bindung ⁵⁴
CXCR7	Rdc1	CXCL11, CXCL12 (SDF-1)	Chemotaxis von T-Zellen ¹
CCR2		CCL2/7/12/13	Macrophagen/ Monocyten/ Leukocyten - Trafficking (Chemotaxis, Adhäsion, Extravasation) ^{101, 11}
CCR7		CCL19/21	T-Lymphopoese in sekundären lymphoiden Organen ^{33, 39, 77, 82, 92, 103}
CCR9		CCL25 (TECK)	T Lymphopoese ^{119, 120}

Interessant für das Modell sind vor allem Chemokine, die an der Chemotaxis / Migration, Adhäsion und Extravasation von Zellen beteiligt sind. Dies sind insbesondere CCL17, CXCL2, CXCL12, CXCL16 und Fraktalkine. Von den jeweiligen Rezeptoren fanden sich nur CXCR4, CXCR6 und CXCR7. Allerdings müssen die Rezeptoren nicht in den Lungen vorhanden sein, denkbar ist die Herunterregulierung der Expression in den angelockten Zellen vor Erreichen des Parenchyms. Zu betrachten sind Migration von

- Tumorzellen in die Lungen
- Immunzellen in die Lungen tumortragender Mäuse
- CTLs des adoptiven Transfers in die Lungen tumortragender Mäuse
- Immunzellen in die Lungen nach adoptivem Transfer

4.2.2.2.4.1 Tumorzellen

Betreffend der **Tumorzellen** können von diesen exprimierte

- Chemokinrezeptoren an der Migration, Adhäsion am Lungenendothel und an der Extravasation und
- Chemokine an der Chemotaxis weiterer Immunzellen oder der später injizierten CTLs

beteiligt sein.

Für die Adhäsion der Tumorzellen am Lungenendothel kommt von den nach in-vitro-Kultivierung exprimierten Genen nur CXCR7 in Frage, oder es werden weitere Rezeptoren auf dem Weg zum Lungengefäßsystem induziert. Der spezifische Ligand von CXCR7, CXCL12, fehlt jedoch in den Lungen der Kontrolltiere. Für eine Beteiligung des Liganden-/Rezeptorpaars CXCL12/CXCR7 an der Adhäsion der Tumorzellen im Lungengefäßsystem müsste dieser konstitutiv exprimiert sein, da vor Erreichen der Tumorzellen in der Lunge ein Aktivierungsstimulus für das Endothel fehlt.

Die Chemokine CXCL2 und CCL17 sind an der Chemotaxis von Immunzellen des angeborenen Immunsystems, und CCL17 zudem an der Chemotaxis von T-Zellen beteiligt. Beide könnten somit an einer durch die Tumorzellen induzierten Einwanderung von Immunzellen in die Lungen mitbeteiligt sein. Allerdings lässt sich CXCL2 nicht in den Lungen tumortragender Tiere nachweisen, und ebenso fehlen die Rezeptoren CXCR2 (IL-8-Rezeptor) (für CXCL2) und CCR4 (für CCL17) sowohl auf den CTLs als auch in Lungen. Jedoch besteht, wie oben erwähnt, die Möglichkeit einer Downregulierung dieser Gene vor Ankunft der Zellen in den Lungen.

4.2.2.2.4.2 Lungen der Tumorgruppe

In diesen können die Auswirkungen der Tumorzellansiedelung im Lungenparenchym analysiert werden (vor allem hinsichtlich einer Entzündungsreaktion und Infiltration von weiteren Zellen) sowie Chemokine und Adhäsionsmoleküle identifiziert werden, die die Chemotaxis der später injizierten CTLs steuern könnten.

Teilt man alle nachgewiesenen Gene dem Verlauf nach ein, zeigt sich, dass es insgesamt zu zwei zeitlich versetzten Reaktionen kommt, einer initialen mit unmittelbarem Anstieg nach Tumorzellinjektion und raschem Absinken (Fraktalkine und CXCR4) sowie einer Spätreaktion mit Maximum an Tag 4 bzw. 5 (restliche 10 Gene). Während die initiale Reaktion mit Ankunft und Adhäsion der Tumorzellen im Lungengefäßsystem zusammenhängt, wird die Spätreaktion durch Extravasation, Migration und Proliferation der Tumorzellen im Lungenparenchym hervorgerufen.

Da Fraktalkine und CXCR4 nicht vorab von den Tumorzellen exprimiert werden, müssen sie in diesen oder im Lungengewebe induziert werden. Zum Zeitpunkt der späteren CTL-Injektion sind beide bereits wieder auf Normalniveau abgesunken. Fraktalkine ist chemotaktisch für Makrophagen, Monozyten und NK-Zellen und induziert damit eine unspezifische inflammatorische und immunologische Reaktion. Sein spezifischer Rezeptor CX3CR1 fehlt in den Lungen, könnte aber von den migrierenden Zellen bei Erreichen der Lungen bereits herunterreguliert worden sein.

CXCR4 ist nur kurzzeitig initial in den Lungen exprimiert, sein Ligand CXCL12 zeigt demhingegen einen Verlauf entsprechend der Spätreaktion. Prinzipiell sind CXCL12 und CXCR4 an der Chemotaxis und transendothelialen Migration von Leukozyten beteiligt. Studien von Challis et al ¹⁷ und Nair et al ⁷⁹ haben zudem gezeigt, dass CXCL12 / CXCR4 über VCAM-1 an der Adhäsion von humanen Melanomzellen am Lungenendothel beteiligt sind ^{4, 15, 78}. Die geringe basale Expression von CXCL12 in den Lungen könnte somit ausreichen, das Hängenbleiben der Tumorzellen (neben einem mechanischen Effekt) mit zu bewirken, sofern das Endothel VCAM-1 exprimiert.

Von den Genen der Spätreaktion werden CCL17, CCL28, CXCL15 und CXCR7 bereits von den D5 mitgebracht. Für den Anstieg an Tag 4 bzw. 5 über das initiale Signal an Tag 1 hinaus ist jedoch die zusätzliche Induktion entweder in den Tumorzellen oder Zellen des Lungenparenchyms erforderlich. Einen chemotaktischen Effekt haben vor allem CCL17, CXCL12 und CXCL15. An Rezeptoren finden sich nur CXCR7 in den Lungen, dieser wird von den Tumorzellen bereits nach in-vitro-Kultivierung exprimiert. Bezüglich CXCL12, welches von bestimmten B16-Tumorzellen, aber nicht der verwendeten Sublinie, exprimiert

wird, liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Studien von Lee et al und Zhang et al sprechen von einem chemotaktischen ^{64, 123}, Vianello et al. von einem chemorepulsiven Effekt auf tumorspezifische T-Zellen ¹⁰⁶. Da durch die B16-Zellen im Modell keine CD8+ T-Zellantwort generiert wird, spielt diese Funktion für die Tumorgruppe keine Rolle, möglicherweise aber für die Migration der CTLs in der Therapiegruppe. In der Tumorgruppe kann CXCL12 jedoch eine Rolle bei der Extravasation, Migration und Etablierung der Tumorzellen im Lungenparenchym spielen, da zudem die Tumorzellen einen der beiden spezifischen Rezeptoren, CXCR7, exprimieren.

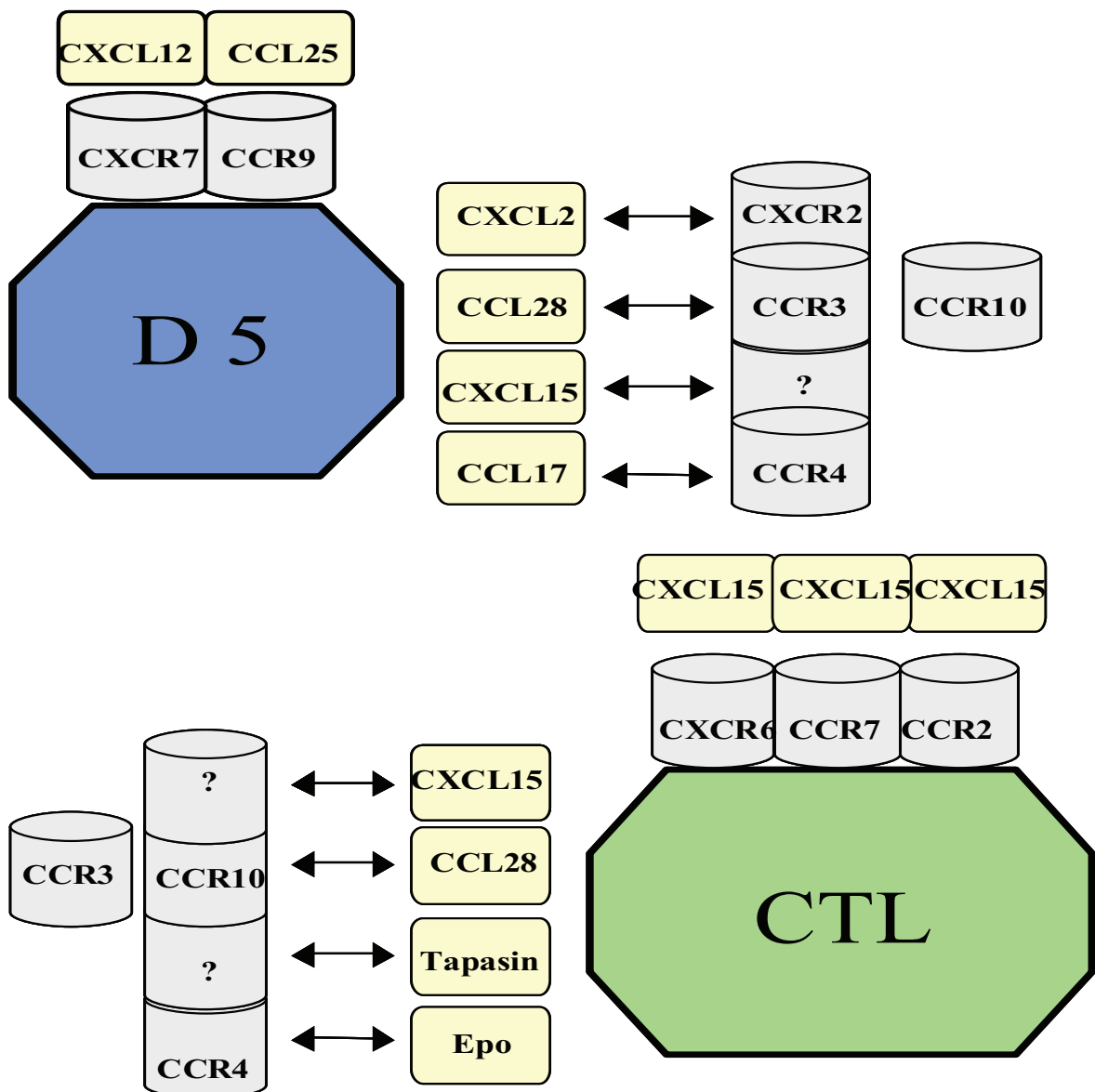


Abbildung 43: Übersicht der auf den Programmarrays exprimierten Gene sowie ihrer Bindungspartner.

Erythropoetin wird durch Hypoxie induziert und fördert die Proliferation und Migration von endothelialen Zellen und damit die Neoangiogenese. Im Modell kann zu dem frühen Zeitpunkt der Metastasierung eine Hypoxie nur durch den Verschluss von Kapillaren durch die Tumorzellen entstehen. Die Metastasen sind zu klein, um dem Restgewebe eine relevante Menge des mit dem Blut antransportierten Sauerstoffs zu entziehen.

4.2.2.2.4.3 CTLs und Lungen der Therapiegruppe

Interessant für das Modell sind, was die CTLs betrifft, hauptsächlich zwei Fragen:

- welche Faktoren wirken chemotaktisch auf die CTLs und bewirken die Migration zu den Tumorzellen und
- welche der durch die CTLs sezernierten Chemokine können sekundäre Immun-/ Zytotoxizitätsmechanismen bewirken.

Vor Injektion exprimieren die CTLs die Rezeptoren CCR2, CCR7 und CXCR6. Von den zugehörigen Liganden CCL2, 7, 12 und 13 (CCR2), CCL19 und 21a (CCR7) und CXCL16 (CXCR6) wird vor Injektion keiner von den B16 Zellen exprimiert, in den Lungen der Tumorgruppe findet sich jedoch CCL21a und CXCL16, die zudem beide ein Signalmaximum an Tag 4-5 aufweisen. Beide können entweder in den Tumorzellen induziert worden sein oder von Zellen des Lungenparenchyms exprimiert werden, als Antwort auf die Anwesenheit der Tumorzellen. Die Paare CCL21a / CCR7 und CXCL16 / CXCR6 könnten somit die Migration der CTLs zu den Tumorzellen steuern.

Von den bereits in-vitro in den CTLs nachweisbaren Chemokinen ist nur für CXCL15 ein chemotaktischer Effekt auf Neutrophile bekannt. CXCL15 wird jedoch hauptsächlich vom Atemwegsepithel sezerniert und ist damit eher an der Elimination von aerogenen Pathogenen beteiligt. In den Lungen der Therapiegruppe findet sich zusätzlich CCL17, CCL21a, CXCL7 und CXCL16. Nur für CCL17 und CXCL16 ist ein chemotaktischer Effekt bekannt, CCL17 kann Makrophagen anlocken, CXCL16 ermöglicht die Interaktion von CTLs mit dendritischen Zellen, die wiederum durch eine Zytokinproduktion weitere Reaktionen induzieren können. CCL21a ist an der Kostimulation naiver T-Zellen beteiligt. Da im Modell aber keine spezifische T-Zellantwort in den Lungen induziert wird, ist zumindest diese Funktion nicht relevant.

Betrachtet man die Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression in den therapierten Tieren, so sind neben Genen mit IFN- γ -Expressions-vergleichbaren Verläufen auch solche interessant, die einen Anstieg zum Ende des Beobachtungszeitrahmens hin aufweisen. Diese können die Lyse der Tumorzellen vermitteln, die dem initialen „lethal hit“ der CTLs entgehen

und sind somit für den nachhaltigen Therapieeffekt ausschlaggebend. Zu nennen an relevanten Genen sind CCL17 und CXCR7 mit einem stetigen Anstieg sowie CXCL16, Erythropoetin und ggf. CCL21a mit initialem Anstieg, Senke an Tag 6 und einem Wiederanstieg. Für CCL17 und CXCL16 ist ein klarer chemotaktischer Effekt bekannt. Die entsprechenden Rezeptoren fehlen in den Lungen, können aber wie oben erwähnt bereits herunterreguliert sein. CXCR7 ist an der Chemotaxis von T-Zellen beteiligt, jedoch fehlt sein Ligand CXCL12 in der Therapiegruppe.

Neben den untersuchten Genen des Programmarrays können eine Vielzahl weiterer Moleküle an der Vermittlung der Sekundärreaktionen beteiligt sein. Anhand der Affymetrixdaten lassen sich z.B. weitere Zytokine, Adhäsionsmoleküle, entsprechende Rezeptoren und die zugehörigen intrazellulären Signalwege screenen und im Rahmen von weiterführenden Studien deren Funktion untersuchen. Auf eine genauere Darstellung wird verzichtet, da diese den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.

5 Zusammenfassung

Die Immuntherapie stellt eine vielversprechende Methode zur Ergänzung etablierter Therapieverfahren bei Tumorerkrankungen dar. Da die Erfolge aus experimentellen Modellen bisher jedoch nicht in die Klinik übertragen werden konnten, sollte durch Analyse der Reaktionen nach einem adoptivem Transfer im Tiermodell nach Ursachen gesucht werden.

Als Modell kam ein B16 - Metastasenmodell der Maus zum Einsatz, der adoptive T-Zelltransfer erfolgte 3 Tage nach i.v. - Gabe der Tumorzellen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden an der Lunge als Zielorgan der Metastasierung Expressionsanalysen mittels RT-PCR und Arrays durchgeführt.

Mithilfe des adoptiven T-Zelltransfers war es möglich, 3 Tage nach Tumorzellgabe die Metastasierung komplett zu verhindern. Eine Verzögerung schon um eine Verdoppelungszeit der Tumorzellen führte bereits zu Metastasenwachstum. Damit war das therapeutische Fenster eng begrenzt. Bei entsprechender Reduktion der Tumorzellzahl entstanden weniger Metastasen, sodass am ehesten ein quantitativer Effekt im Sinne einer zu niedrigen E/T-Ratio vorlag.

Tumorzellen alleine generierten keine spezifische Immunreaktion mit T-Zellbeteiligung. Zur Generierung von tumorspezifischen T-Zellen für den Transfer war die Verwendung einer GM-CSF-produzierenden Variante erforderlich, wodurch die Tumorantigenpräsentation durch dendritische Zellen gefördert wurde.

Unmittelbar nach Gabe der T-Zellen kam es in der Lunge zu einem Anstieg der entsprechenden T-Zellparameter, was für ein Akkumulieren der Zellen in den Lungen sprach. Die Lyse durch direkte Mechanismen musste innerhalb von 24 Stunden erfolgen, da danach keine aktivierten T-Zellen mehr nachweisbar waren. Als beteiligte Mechanismen zeigten sich Perforin/Granzym, direkte Effekte von IFN- γ und TNF- α , der Oberflächenrezeptor NKG2D sowie indirekte Effekte über Pathways wie IFN- γ , TNF- α und TRANCE. Chemokine induzierten möglicherweise die Migration von weiteren Immunzellen ins Lungenparenchym.

Durch die T-Zellen selber wurden nicht alle Tumorzellen lysiert, sodass weitere Mechanismen z.B. des angeborenen Immunsystems über Monozyten/Makrophagen, Neutrophile und NK-Zellen erforderlich waren. Durch den adoptivem Transfer wurde keine weitere T-Zellantwort generiert, auch nicht im Sinne einer memory - Reaktion.

Die nicht durch die T-Zellen erreichten Tumorzellen mussten durch Sekundärreaktionen lysiert werden, für die Chemokine eine wichtige Rolle spielen. Mittels Programmarrays wurden sowohl die Zellen als auch die Lungen auf mögliche Liganden-Rezeptorpaare

untersucht, die für die Migration von einerseits den Tumor- und T-Zellen und andererseits Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen sowie Neutrophilen verantwortlich sein konnten. Hierfür konnten in der Lunge vor allem die Paare CXCL12 / CXCR4 sowie CXCL16 / CXCR6 nachgewiesen werden .

In der Therapiegruppe wurden zusätzlich Affymetrixdaten erstellt, um als Screening weitere Kandidaten definieren bzw. die einzelnen Pathways überprüfen zu können. Diese können mittels genauerer Verfahren wie der PCR oder Westernblot weiter untersucht werden.

Aus den Versuchen liessen sich folgende Erklärungen für die Unterschiede zwischen Tiermodell und Klinik ableiten.

Die Situation in der Klinik unterscheidet sich durch die oft späte Diagnosestellung dahingehend vom Tiermodell, dass ein bereits fortgeschrittenes Stadium der Metastasierung und damit mehr und in Zellverbunden organisierte Tumorzellen vorliegen. Für einen Erfolg des adoptiven Transfers ist jedoch sowohl eine ausreichend hohe E/T-Ratio als auch schnelle Zugänglichkeit erforderlich, da die T-Zellen schnell inaktiviert bzw. apoptotisch werden und nur einen einmaligen „lethal hit“ erteilen. Überleben zu viele Tumorzellen diesen, so können diese nicht mehr komplett über Sekundärreaktionen lysiert werden.

Ohne therapeutisches Eingreifen von aussen wird keine spezifische Immunreaktion initiiert, und auch nach adoptivem Transfer war keine weitere Reaktion wie z.B. eine Gedächtnisreaktion nachweisbar. Somit ist der adoptive Transfer keine nachhaltige Therapieform und eine spätere erneute Metastasenbildung z.B. durch ruhende Tumorzellen kann nicht verhindert werden. Die durch die Reaktionen generierten inflammatorischen Sekundärreaktionen können zudem proliferative oder protektive Effekte auf die Tumorzellen besitzen. Eine ineffiziente Therapie würde damit sogar einen konträren Effekt erzielen.

Der adoptive Transfer kommt als Tumorthherapie damit hauptsächlich in Kombination mit weiteren Methoden in Frage. Hauptnutzen ist eine Reduktion der Tumorzellanzahl vor allem bei disseminierter Metastasierung, Vorteil zudem die geringen Nebeneffekte aufgrund des antigenspezifischen gezielten Targettings. Verbleibende Tumorzellen müssen aber durch weitere Verfahren wie Chemotherapie, Bestrahlung oder Chirurgie lysiert bzw. entfernt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Balabanian K, Lagane B, Infantino S et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2005;280(42):35760-35766.
2. Bander NH, Nanus DM, Milowsky MI, Kostakoglu L, Vallabahajosula S, Goldsmith SJ. Targeted systemic therapy of prostate cancer with a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen. *Semin Oncol* 2003;30(5):667-676.
3. Baselga J, Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 1:S35-S41.
4. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11(9):372-377.
5. Bernardini G, Sciume G, Bosisio D, Morrone S, Sozzani S, Santoni A. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood* 2008;111(7):3626-3634.
6. Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol* 2001;1(3):209-219.
7. Biassoni R, Cantoni C, Pende D et al. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 2001;181:203-214.
8. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196(3):254-265.
9. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996;184(3):1101-1109.
10. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van PA. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994;12:337-365.
11. Boring L, Gosling J, Chensue SW et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 1997;100(10):2552-2561.
12. Broxmeyer HE, Cooper S, Kohli L et al. Transgenic expression of stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 enhances myeloid progenitor cell survival/antiapoptosis in vitro in response to growth factor withdrawal and enhances myelopoiesis in vivo. *J Immunol* 2003;170(1):421-429.
13. Burnet FM. Cancer - a biological approach 1. The process of control. *Br Med J* 1, 779-782. 1957.
14. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000;60(9):2541-2546.

15. Cardones AR, Murakami T, Hwang ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin. *Cancer Res* 2003;63(20):6751-6757.
16. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001;1(1):41-49.
17. Challis GB, Stam HJ. The spontaneous regression of cancer. A review of cases from 1900 to 1987. *Acta Oncol* 1990;29(5):545-550.
18. Chang AE, Aruga A, Cameron MJ et al. Adoptive immunotherapy with vaccine-primed lymph node cells secondarily activated with anti-CD3 and interleukin-2. *J Clin Oncol* 1997;15(2):796-807.
19. Chen SC, Mehrad B, Deng JC et al. Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CXC chemokine lungkine. *J Immunol* 2001;166(5):3362-3368.
20. Chen SC, Vassileva G, Kinsley D et al. Ectopic expression of the murine chemokines CCL21a and CCL21b induces the formation of lymph node-like structures in pancreas, but not skin, of transgenic mice. *J Immunol* 2002;168(3):1001-1008.
21. Chiari R, Hames G, Stroobant V et al. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res* 2000;60(17):4855-4863.
22. Cohen RB. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2003;2(4):246-251.
23. Coley WB. Further observations on the conservative treatment of sarcoma of the long bones. *Ann Surg* 1919;70(6):633-660.
24. Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 1891;14(3):199-220.
25. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 1991;(262):3-11.
26. Cotran RS, Pober JS. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. *J Am Soc Nephrol* 1990;1(3):225-235.
27. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286(5447):2098-2102.
28. De FK, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol* 2008;180(6):4308-4315.
29. Dentener MA, Bazil V, Von Asmuth EJ, Ceska M, Buurman WA. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1993;150(7):2885-2891.

30. Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ* 2008;15(1):39-50.
31. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001;413(6852):165-171.
32. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol* 2004;172(3):1380-1390.
33. Ebert LM, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 2005;42(7):799-809.
34. Ehrlich P. The collected papers of Paul Ehrlich, Vol. II: Immunology and cancer research. Pergamon Press, London and New York II. 1956.
35. Fahy OL, Townley SL, McColl SR. CXCL16 regulates cell-mediated immunity to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis via promotion of gamma interferon production. *Infect Immun* 2006;74(12):6885-6894.
36. Flanagan K, Moroziewicz D, Kwak H, Horig H, Kaufman HL. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells. *Cell Immunol* 2004;231(1-2):75-84.
37. Flexner S, Jobling JW. *Proc Soc Exp Biol Med* 4, 461. 1907.
38. Foley EJ. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 1953;13(12):835-837.
39. Forster R, Schubel A, Breitfeld D et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99(1):23-33.
40. Fossum B, Gedde-Dahl T, III, Breivik J et al. p21-ras-peptide-specific T-cell responses in a patient with colorectal cancer. CD4+ and CD8+ T cells recognize a peptide corresponding to a common mutation (13Gly-->Asp). *Int J Cancer* 1994;56(1):40-45.
41. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313(5795):1960-1964.
42. Gevrey JC, Isaac BM, Cox D. Syk is required for monocyte/macrophage chemotaxis to CX3CL1 (Fractalkine). *J Immunol* 2005;175(6):3737-3745.
43. Hara T, Katakai T, Lee JH et al. A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion. *Int Immunol* 2006;18(2):301-311.

44. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(2):332-339.
45. Hieshima K, Ohtani H, Shibano M et al. CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol* 2003;170(3):1452-1461.
46. Hoption Cann SA, van Netten JP, van NC. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 2003;79(938):672-680.
47. Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM et al. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995;72(3):637-641.
48. Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med* 1994;180(1):1-4.
49. Ichim CV. Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *J Transl Med* 2005;3(1):8.
50. Ioney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 2002;71(6):907-920.
51. Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 1997;272(23):15036-15042.
52. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem* 1996;271(35):21514-21521.
53. Jager E, Chen YT, Drijfhout JW et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 1998;187(2):265-270.
54. Jiang X, Shimaoka T, Kojo S et al. Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J Immunol* 2005;175(4):2051-2055.
55. Kaliss N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice: a review. *Cancer Res* 1958;18(9):992-1003.
56. Kanazawa N, Nakamura T, Tashiro K et al. Fractalkine and macrophage-derived chemokine: T cell-attracting chemokines expressed in T cell area dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29(6):1925-1932.
57. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994;180(1):347-352.
58. Kawakami Y, Robbins PF, Wang X et al. Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles. *J Immunol* 1998;161(12):6985-6992.

59. Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. Identification of genes that function in the TNF-alpha-mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nat Biotechnol* 2002;20(4):376-380.
60. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002;3(11):999-1005.
61. Kim D, Mebius RE, MacMicking JD et al. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* 2000;192(10):1467-1478.
62. Koike C, Watanabe M, Oku N, Tsukada H, Irimura T, Okada S. Tumor cells with organ-specific metastatic ability show distinctive trafficking in vivo: analyses by positron emission tomography and bioimaging. *Cancer Res* 1997;57(16):3612-3619.
63. Lai SY, Childs EE, Xi S et al. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24(27):4442-4449.
64. Lee CH, Kakinuma T, Wang J et al. Sensitization of B16 tumor cells with a CXCR4 antagonist increases the efficacy of immunotherapy for established lung metastases. *Mol Cancer Ther* 2006;5(10):2592-2599.
65. Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol* 1999;66(6):889-900.
66. Li M, Lu Y, Chen XQ. [Research advances in expression and functions of erythropoietin and erythropoietin receptor in cancers]. *Ai Zheng* 2008;27(6):667-672.
67. Livingston PO, Wong GY, Adluri S et al. Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol* 1994;12(5):1036-1044.
68. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 2002;169(1):424-433.
69. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998;153(3):865-873.
70. Mami-Chouaib F, Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Chouaib S. Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen. *Immunol Rev* 2002;188:114-121.
71. Martin M, Michalek SM, Katz J. Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect Immun* 2003;71(5):2498-2507.
72. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;296(5566):298-300.
73. Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C et al. Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2005;7(5):537-543.

74. Moretta L, Bottino C, Cantoni C, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(4):387-391.
75. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004;25(2):75-84.
76. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-2357.
77. Muller G, Lipp M. Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation* 2003;10(3-4):325-334.
78. Murakami T, Maki W, Cardones AR et al. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2002;62(24):7328-7334.
79. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* 1999;82(1):121-124.
80. Nauts HC, Fowler GA, Bogatko FH. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. *Acta Med Scand Suppl* 1953;276:1-103.
81. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64(6):479-489.
82. Ohl L, Henning G, Krautwald S et al. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med* 2003;197(9):1199-1204.
83. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004;5(10):996-1002.
84. Ren T, Chen Q, Tian Z, Wei H. Down-regulation of surface fractalkine by RNA interference in B16 melanoma reduced tumor growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364(4):978-984.
85. Richardson MA, Ramirez T, Russell NC, Moye LA. Coley toxins immunotherapy: a retrospective review. *Altern Ther Health Med* 1999;5(3):42-47.
86. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183(3):1185-1192.
87. Rosenberg SA. A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance. *CA Cancer J Clin* 1999;49(2):70-3, 65.

88. Rosenberg SA. The development of new cancer therapies based on the molecular identification of cancer regression antigens. *Cancer J Sci Am* 1995;1(2):90-100.
89. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10(9):909-915.
90. Rossi DL, Hurst SD, Xu Y et al. Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells. *J Immunol* 1999;162(9):5490-5497.
91. Royle MC, Totemeyer S, Alldridge LC, Maskell DJ, Bryant CE. Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live *Salmonella typhimurium* is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *J Immunol* 2003;170(11):5445-5454.
92. Schaerli P, Moser B. Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res* 2005;31(1):57-74.
93. Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N et al. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* 2004;75(2):267-274.
94. Shimaoka T, Seino K, Kume N et al. Critical role for CXC chemokine ligand 16 (SR-PSOX) in Th1 response mediated by NKT cells. *J Immunol* 2007;179(12):8172-8179.
95. 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.
96. Srinivasan R, Wolchok JD. Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *J Transl Med* 2004;2(1):12.
97. Suratt BT, Petty JM, Young SK et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* 2004;104(2):565-571.
98. Tanabe S, Lu Z, Luo Y et al. Identification of a new mouse beta-chemokine, thymus-derived chemotactic agent 4, with activity on T lymphocytes and mesangial cells. *J Immunol* 1997;159(11):5671-5679.
99. Thomas L. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive state. 529-532. 1959. HS Lawrence, New York, Hoebner- Harper.
100. Tovari J, Pirker R, Timar J, Ostoros G, Kovacs G, Dome B. Erythropoietin in cancer: an update. *Curr Mol Med* 2008;8(6):481-491.
101. Tsou CL, Peters W, Si Y et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007;117(4):902-909.
102. Tsuboi A, Oka Y, Ogawa H et al. Cytotoxic T-lymphocyte responses elicited to Wilms' tumor gene WT1 product by DNA vaccination. *J Clin Immunol* 2000;20(3):195-202.

103. Ueno T, Hara K, Willis MS et al. Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity* 2002;16(2):205-218.
104. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254(5038):1643-1647.
105. van Spronsen DJ, Veldhuis GJ. New developments in staging and follow-up of patients with Hodgkin's lymphoma. *Neth J Med* 2003;61(9):278-284.
106. Vianello F, Papeta N, Chen T et al. Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control. *J Immunol* 2006;176(5):2902-2914.
107. Wang RF, Appella E, Kawakami Y, Kang X, Rosenberg SA. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184(6):2207-2216.
108. Wang RF, Parkhurst MR, Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med* 1996;183(3):1131-1140.
109. Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 1999;284(5418):1351-1354.
110. Wannesson L, Ghielmini M. Overview of antibody therapy in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma* 2003;4 Suppl 1:S5-12.
111. Winter H, Fox BA. Adoptive cellular immunotherapy of cancer. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1(1):89-97.
112. Winter H, Hu HM, McClain K, Urba WJ, Fox BA. Immunotherapy of melanoma: a dichotomy in the requirement for IFN-gamma in vaccine-induced antitumor immunity versus adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2001;166(12):7370-7380.
113. Winter H, Hu HM, Urba WJ, Fox BA. Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J Immunol* 1999;163(8):4462-4472.
114. Wolfel T, Hauer M, Schneider J et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995;269(5228):1281-1284.
115. Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(2):612-616.
116. Wong BR, Josien R, Lee SY et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997;186(12):2075-2080.

117. Woolf E, Grigorova I, Sagiv A et al. Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol* 2007;8(10):1076-1085.
118. Yang Q, Goding SR, Hokland ME, Basse PH. Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res* 2006;36(1-3):13-25.
119. Youn BS, Kim CH, Smith FO, Broxmeyer HE. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* 1999;94(7):2533-2536.
120. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 1999;190(9):1241-1256.
121. Zeis M, Siegel S, Wagner A et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(11):5391-5397.
122. Zhang C, Thornton MA, Kowalska MA et al. Localization of distal regulatory domains in the megakaryocyte-specific platelet basic protein/platelet factor 4 gene locus. *Blood* 2001;98(3):610-617.
123. Zhang T, Somasundaram R, Berencsi K et al. CXC chemokine ligand 12 (stromal cell-derived factor 1 alpha) and CXCR4-dependent migration of CTLs toward melanoma cells in organotypic culture. *J Immunol* 2005;174(9):5856-5863.
124. Zhang XW, Liu Q, Wang Y, Thorlacius H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. *Br J Pharmacol* 2001;133(3):413-421.
125. Zhang Y, Williams DB. Assembly of MHC class I molecules within the endoplasmic reticulum. *Immunol Res* 2006;35(1-2):151-162.
126. Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal* 2007;19(6):1238-1248.
127. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-127.

7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: 2-SIGNAL-MODELL DER T-ZELLAKTIVIERUNG	18
ABBILDUNG 2: IMMUNANTWORT AUF TUMORZELLEN	19
ABBILDUNG 3: IMMUNSTIMULATION (IMMUNAKTIVIERUNG VS. IMMUNSUPPRESSION)	23
ABBILDUNG 4: PRINZIP ARRAYTECHNOLOGIE	42
ABBILDUNG 5: BEISPIEL PROGRAMMARRAY	46
ABBILDUNG 6: BESTIMMUNG DES DETECTION CALLS	48
ABBILDUNG 7: SKALA MATCH-MISMATCH ZUR BERECHNUNG DES DETECTION CALLS	50
ABBILDUNG 8: GCOS - INTERFACE DER COMPARISON – ARRAY - ANALYSIS.....	50
ABBILDUNG 9: PCA-ANALYSE	51
ABBILDUNG 10: ERSTELLEN EINES HIERARCHISCHEN DENDROGRAMMES NACH PCA	52
ABBILDUNG 11: K-MEAN CLUSTERING MIT K=3	52
ABBILDUNG 12: PROGRAMM "TREEVIEW"	53
ABBILDUNG 13: ONTOLOGY REPORT MIT Z-SCORES.....	54
ABBILDUNG 14: LUNGEN AN TAG 8 NACH D5-INJEKTION	55
ABBILDUNG 15: VERLAUF DES TUMORMARKERS PMEL IN DEN LUNGEN (PCR)	56
ABBILDUNG 16: VERZÖGERTE T-ZELLGABE	58
ABBILDUNG 17: VERZÖGERTE T-ZELLGABE MIT ENTSPRECHENDER ANPASSUNG DER TUMORZELLANZAHL.....	60
ABBILDUNG 18: CHARAKTERISIERUNG DER T-ZELLEN PER FACS	61
ABBILDUNG 19: ZYTOTOXIZITÄTSASSAY DER T-ZELLEN	62
ABBILDUNG 20: T-ZELLEN PCR-ERGEBNISSE	63
ABBILDUNG 21: IFN - GAMMA EXPRESSION IN DER LUNGE (PCR).....	64
ABBILDUNG 22: PERFORIN - EXPRESSION IN DER LUNGE (PCR).....	65
ABBILDUNG 23: GRANZYM - EXPRESSION IN DER LUNGE (PCR).....	66
ABBILDUNG 24: FASLIGAND - EXPRESSION IN DEN LUNGEN (PCR)	67
ABBILDUNG 25: TNF- ALPHA -EXPRESSION IN DEN LUNGEN (PCR).....	68
ABBILDUNG 26: IL - 6 - EXPRESSION IN DER LUNGE (PCR)	68
ABBILDUNG 27: NKG2D - EXPRESSION IN DEN LUNGEN (PCR)	69
ABBILDUNG 28: TRANCE - EXPRESSION IN DEN LUNGEN (PCR).....	70
ABBILDUNG 29: CHEMOKIN - ARRAY DER D5-ZELLEN IN VITRO	73
ABBILDUNG 30: CHEMOKIN-ARRAY DER T-ZELLEN IN VITRO	74
ABBILDUNG 31: INITIALE REAKTION.....	75

ABBILDUNG 32: SPÄTE REAKTION MIT MAXIMUM AN TAG 4	75
ABBILDUNG 33: SPÄTE REAKTION MIT MAXIMUM AN TAG 5	76
ABBILDUNG 34: GRUPPIERUNGEN IN DER THERAPIEGRUPPE	77
ABBILDUNG 35: EINZELNE GENE DER PROGRAMMARRAYS	80
ABBILDUNG 36: AFFYMETRIX CHIP A-C TAG 1 NACH ADOPTIVEM TRANSFER.....	81
ABBILDUNG 37: ROHDATEN IM EDITORFORMAT	82
ABBILDUNG 38: COMPARISON - ANALYSIS IN GCOS.....	83
ABBILDUNG 39: PCA-ANALYSE DER 913 SELEKTIONIERTEN GENE VON CHIP A.....	84
ABBILDUNG 40: AM STÄRKSTEN EXPRIMIERTER GENE DES IFN –GAMMA- PATHWAYS	85
ABBILDUNG 41: AM STÄRKSTEN EXPRIMIERTER GENE DES TNF-ALPHA -PATHWAYS.....	86
ABBILDUNG 42: TNF SIGNALING PATHWAYS	96
ABBILDUNG 43: ÜBERSICHT DER AUF DEN PROGRAMMARRAYS EXPRIMIERTEN GENE SOWIE IHRER BINDUNGSPARTNER.....	104

8 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: KLASSIFIZIERUNG DER TUMORANTIGENE	14
TABELLE 2: KOMPONENTEN DES IMMUNSYSTEMS	15
TABELLE 3: BEOBACHTETE GENE.....	30
TABELLE 4: LISTE DER VERWENDETEN SUBSTANZEN IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE	32
TABELLE 5: PRIMERSEQUENZEN	33
TABELLE 6: ZEITPLAN MÄUSEMODELL	34
TABELLE 7: VORBEREITUNG DER ZELLEN FÜR DIE INJEKTION	35
TABELLE 8: KULTIVIERUNG DER T-ZELLEN.....	36
TABELLE 9: INHALT NUCLEOSPIN RNA II (FA. MACHEREY-NAGEL)	37
TABELLE 10: SYNTHSEMIX FÜR CDNA	39
TABELLE 11: PCR-ANSATZ	40
TABELLE 12: PCR-ZYKLUS	40
TABELLE 13: ÜBERSICHT PROGRAMMARRAY	43
TABELLE 14: ANNEALING-MIX.....	43
TABELLE 15: SYNTHESE-MIX	43
TABELLE 16: HYBRIDISIERUNG.....	45
TABELLE 17: ANALYSE DER PROGRAMMARRAYS	46
TABELLE 18: ÜBERSICHT AFFYMETRIX.....	47
TABELLE 19: LISTE DER AUF DEM ARRAY BEFINDLICHEN GENE.....	71
TABELLE 20: CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN DER D5.....	73
TABELLE 21: CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN DER CTLs	74
TABELLE 22: ZYTOTOXIZITÄTSMCHANISMEN	91
TABELLE 23: ÜBERBLICK EXPRIMIERTER CHEMOKINE	100
TABELLE 24: ÜBERBLICK EXPRIMIERTER CHEMOKINREZEPTOREN	101
TABELLE 25: ÜBERSICHT BINDUNGSPARTNER UND FUNKTION DER EXPRIMIERTEN CHEMOKINE	101
TABELLE 26: ÜBERSICHT BINDUNGSPARTNER UND FUNKTION DER EXPRIMIERTEN CHEMOKINREZEPTOREN	101
TABELLE 27: STATISTISCHE DATEN PCR - ACTIN	122
TABELLE 28: STATISTISCHE DATEN PCR - PMEL-17.....	122
TABELLE 29: STATISTISCHE DATEN PCR - IFN-GAMMA.....	123
TABELLE 30: STATISTISCHE DATEN PCR - PERFORIN	124

TABELLE 31: STATISTISCHE DATEN PCR – GRANZYM A.....	125
TABELLE 32: STATISTISCHE DATEN PCR - MFL	125
TABELLE 33: STATISTISCHE DATEN PCR- TNF-ALPHA.....	126
TABELLE 34: STATISTISCHE DATEN PCR - IL-6.....	127
TABELLE 35: STATISTISCHE DATEN PCR - NKG2D	128
TABELLE 36: STATISTISCHE DATEN PCR - TRANCE	128
TABELLE 37: SIGNIFIKANZGRENZEN U-TEST BEI $\alpha = 0,05$	129
TABELLE 38: RANGSUMMEN.....	130
TABELLE 39: PROGRAMMARRAYS OD-WERTE NORMALISIERT FÜR GAP-DH	132
TABELLE 40: AFFYMETRIX DATEN - IFN-GAMMA-PATHWAY, CHIP A	132
TABELLE 41: AFFYMETRIX-DATEN - TNF-ALPHA- PATHWAY, CHIP A	141
TABELLE 42: AFFYMETRIX-DATEN – SCHLÜSSELBEGRIFFE WIE CHEMOKINE, ZYTOKINE, MAKROPHAGEN ETC., CHIP A.....	142

9 Anhang

Im folgenden findet sich eine Auswahl der gewonnenen Daten

9.1 Analyse der PCR-Daten – deskriptive Statistik

Tabelle 27: Statistische Daten PCR - mACTIN

ACTIN	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung	
Tumor	0	0,153	0,095	0,313	0,218	0,198	0,125	
	1	0,123	0,078	0,124	0,046	0,113	0,053	
	2	0,184	0,100	0,240	0,140	0,180	0,090	
	3	0,161	0,113	0,277	0,164	0,193	0,110	
	4	0,154	0,117	0,189	0,072	0,191	0,151	
	5	0,239	0,100	0,407	0,307	0,263	0,197	
	6	0,150	0,130	0,265	0,135	0,218	0,155	
	7	0,123	0,118	0,234	0,116	0,245	0,257	
	8	0,200	0,094	0,248	0,154	0,196	0,133	
T-Zellen	3	0,335	0,297	0,420	0,123	0,352	0,133	
	4	0,194	0,147	0,308	0,161	0,268	0,133	
	5	0,309	0,182	0,383	0,201	0,292	0,133	
	6	0,286	0,163	0,400	0,237	0,286	0,163	
	7	0,219	0,142	0,314	0,172	0,251	0,147	
	8	0,391	0,222	0,436	0,214	0,338	0,132	
	Therapie	3	0,275	0,247	0,329	0,082	0,307	0,105
		4	0,212	0,141	0,295	0,154	0,254	0,159
5		0,238	0,221	0,347	0,126	0,298	0,145	
6		0,146	0,111	0,199	0,088	0,163	0,071	
7		0,165	0,112	0,211	0,099	0,206	0,158	
8		0,189	0,130	0,261	0,131	0,220	0,127	
Kontrolle			0,305	0,211	0,378	0,168	0,301	0,131

Tabelle 28: statistische Daten PCR - mPmel-17

Pmel	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	2,172	1,459	2,298	0,838	1,958	0,687
	1	1,266	0,783	1,639	0,856	1,270	0,655

	2	1,239	0,933	2,874	1,941	1,832	1,209
	3	0,423	0,247	1,542	1,295	0,941	0,978
	4	0,668	0,490	2,050	1,560	1,173	1,078
	5	0,728	0,427	2,214	1,787	1,362	1,291
	6	1,336	0,623	1,576	0,953	1,275	0,832
	7	1,493	1,308	2,059	0,751	1,717	0,882
	8	1,956	1,419	2,824	1,405	2,783	2,391
T-Zellen	3	0,074	0,072	0,155	0,083	0,114	0,077
	4	0,144	0,067	0,214	0,146	0,189	0,186
	5	0,144	0,074	0,170	0,096	0,149	0,131
	6	0,065	0,041	0,226	0,186	0,163	0,195
	7	0,138	0,080	0,227	0,147	0,250	0,323
	8	0,127	0,106	0,159	0,054	0,150	0,120
Therapie	3	0,559	0,455	0,737	0,282	0,575	0,236
	4	0,490	0,358	0,642	0,284	0,486	0,218
	5	0,490	0,340	0,670	0,330	0,493	0,288
	6	0,757	0,371	0,981	0,610	0,664	0,400
	7	0,142	0,101	0,287	0,187	0,234	0,246
	8	0,343	0,193	0,434	0,241	0,435	0,381
Kontrolle		0,123	0,050	0,284	0,234	0,166	0,153

Tabelle 29: statistische Daten PCR - mIFN- γ

IFN- γ	Tag nach D5-Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartilsabstand	Mittelwert	Standardabweichung
Tumor	0	0,126	0,031	0,279	0,247	0,159	0,147
	1	0,156	0,083	0,195	0,112	0,170	0,133
	2	0,065	0,042	0,110	0,068	0,078	0,049
	3	0,052	0,001	0,111	0,110	0,064	0,072
	4	0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,014
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003
	6	0,000	0,000	0,006	0,006	0,004	0,007
	7	0,000	0,000	0,006	0,006	0,008	0,017
	8	0,007	0,000	0,019	0,019	0,011	0,014
T-Zellen	3	0,478	0,255	0,639	0,384	0,450	0,232

	4	0,036	0,030	0,114	0,085	0,125	0,180	
	5	0,089	0,015	0,218	0,203	0,132	0,148	
	6	0,118	0,026	0,199	0,174	0,195	0,267	
	7	0,085	0,004	0,208	0,204	0,111	0,123	
	8	0,021	0,005	0,058	0,053	0,034	0,038	
	Therapie	3	0,866	0,716	0,986	0,270	0,780	0,347
		4	0,163	0,116	0,333	0,217	0,256	0,237
		5	0,105	0,038	0,194	0,155	0,124	0,116
	6	0,050	0,027	0,062	0,035	0,042	0,026	
	7	0,166	0,060	0,228	0,168	0,165	0,139	
	8	0,085	0,057	0,140	0,084	0,111	0,087	
Kontrolle		0,041	0,016	0,044	0,028	0,055	0,071	

Tabelle 30: statistische Daten PCR - mPerforin

Perforin	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	0,511	0,438	0,633	0,196	0,618	0,407
	1	0,181	0,048	0,320	0,273	0,213	0,209
	2	0,280	0,261	0,323	0,062	0,302	0,187
	3	0,325	0,105	0,510	0,405	0,350	0,305
	4	0,603	0,434	0,720	0,287	0,618	0,263
	5	0,526	0,413	0,778	0,365	0,541	0,276
	6	0,537	0,210	1,036	0,826	0,772	0,742
	7	0,422	0,329	0,776	0,447	0,537	0,351
	8	0,266	0,182	0,463	0,281	0,314	0,221
T-Zellen	3	0,588	0,557	0,825	0,268	0,710	0,258
	4	0,324	0,215	0,411	0,196	0,442	0,382
	5	0,474	0,363	0,628	0,264	0,599	0,473
	6	0,671	0,563	1,116	0,553	0,886	0,600
	7	0,756	0,576	1,004	0,429	0,928	0,577
	8	0,552	0,456	0,746	0,289	0,583	0,196
Therapie	3	0,743	0,405	0,958	0,553	0,710	0,374
	4	0,612	0,338	1,039	0,701	0,980	1,042
	5	0,342	0,308	0,541	0,233	0,397	0,178
	6	0,276	0,237	0,445	0,208	0,306	0,200

	7	0,452	0,280	0,645	0,365	0,503	0,347
	8	0,810	0,603	1,307	0,705	1,006	0,832
Kontrolle		0,219	0,183	0,333	0,150	0,246	0,106

Tabelle 31: statistische Daten PCR – mGranzym a

Granzym	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	3,455	1,946	5,116	3,169	3,411	1,906
	1	2,987	2,730	3,810	1,080	3,270	1,395
	2	2,237	1,541	3,585	2,044	2,635	1,619
	3	0,762	0,417	2,066	1,648	1,427	1,480
	4	0,850	0,497	3,658	3,161	2,065	2,205
	5	0,771	0,560	4,134	3,574	2,566	3,281
	6	0,669	0,484	1,848	1,364	1,455	1,656
	7	1,060	0,657	3,034	2,376	1,746	1,677
	8	1,052	0,689	3,078	2,389	2,315	2,572
T-Zellen	3	0,914	0,491	1,715	1,224	1,075	0,770
	4	1,276	1,197	2,810	1,613	1,939	1,636
	5	0,656	0,642	1,404	0,762	1,311	1,471
	6	1,709	1,094	2,349	1,255	2,228	2,202
	7	1,687	1,213	2,792	1,579	2,274	1,653
	8	1,353	1,121	1,438	0,317	1,155	0,519
Therapie	3	1,875	1,041	2,036	0,995	1,487	0,887
	4	2,047	0,812	3,140	2,328	2,321	2,116
		1,894	0,971	2,680	1,709	1,747	1,169
	6	1,569	1,023	2,571	1,548	1,796	1,221
	7	1,593	1,006	2,522	1,516	2,223	2,149
	8	3,252	1,443	4,492	3,048	3,108	1,809
Kontrolle		0,975	0,860	1,277	0,417	0,989	0,313

Tabelle 32: statistische Daten PCR - MFL

MFL	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	0,005	0,000	0,011	0,011	0,016	0,030
	1	0,004	0,000	0,014	0,014	0,007	0,009

T-Zellen	2	0,000	0,000	0,004	0,004	0,003	0,005
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,014
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,063
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	8	0,000	0,000	0,010	0,010	0,006	0,009
	Therapie	3	0,000	0,000	0,005	0,005	0,005
4		0,000	0,000	0,000	0,000	0,090	0,220
5		0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,083
6		0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,042
7		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Kontrolle	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,290	0,710
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,084	0,207
	8	0,000	0,000	0,010	0,010	0,001	0,003
Kontrolle		0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,161

Tabelle 33: statistische Daten PCR- mTNF- α

TNF-α	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	0,024	0,000	0,053	0,053	0,072	0,128
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,008
	2	0,000	0,000	0,033	0,033	0,028	0,050
	3	0,153	0,000	0,322	0,322	0,186	0,212
	4	0,403	0,089	0,644	0,554	0,498	0,555
	5	0,113	0,017	0,536	0,519	0,281	0,355
	6	0,179	0,046	1,157	1,111	0,628	0,842
	7	0,215	0,058	0,437	0,379	0,338	0,408
8	0,115	0,002	0,511	0,509	0,307	0,416	
T-Zellen	3	0,350	0,242	0,426	0,184	0,313	0,163
	4	0,195	0,105	0,392	0,287	0,246	0,194

Therapie	5	0,161	0,071	0,241	0,170	0,186	0,174
	6	0,164	0,114	0,334	0,221	0,282	0,316
	7	0,250	0,056	0,322	0,267	0,265	0,277
	8	0,081	0,034	0,146	0,112	0,167	0,233
	3	0,202	0,137	0,344	0,207	0,273	0,184
	4	0,132	0,019	0,274	0,255	0,191	0,218
	5	0,228	0,126	0,316	0,190	0,235	0,143
	6	0,013	0,003	0,201	0,198	0,138	0,220
Kontrolle	7	0,075	0,008	0,150	0,142	0,114	0,144
	8	0,092	0,015	0,149	0,134	0,124	0,152
		0,046	0,012	0,106	0,094	0,084	0,104

Tabelle 34: statistische Daten PCR - mIL-6

IL-6	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	0,000	0,000	0,047	0,047	0,027	0,043
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,002	0,000	0,006	0,006	0,004	0,005
	3	0,008	0,002	0,012	0,010	0,027	0,052
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
	7	0,000	0,000	0,006	0,006	0,004	0,007
T-Zellen	8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002
	3	0,003	0,001	0,005	0,005	0,005	0,006
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,004
Therapie	8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	3	0,001	0,000	0,003	0,003	0,002	0,002
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

	8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,006
Kontrolle		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabelle 35: statistische Daten PCR - mNKG2D

NKG2D	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	0,516	0,424	0,535	0,110	0,490	0,126
	1	0,231	0,060	0,941	0,881	0,470	0,555
	2	0,418	0,243	0,768	0,526	0,490	0,316
	3	0,429	0,149	0,455	0,306	0,401	0,355
	4	0,347	0,294	0,436	0,142	0,354	0,190
	5	0,448	0,211	0,563	0,352	0,388	0,269
	6	0,544	0,315	0,637	0,321	0,499	0,220
	7	0,349	0,319	0,360	0,040	0,320	0,123
	8	0,354	0,299	0,409	0,110	0,377	0,145
T-Zellen	3	0,655	0,589	0,717	0,129	0,683	0,131
	4	0,878	0,848	1,134	0,286	1,006	0,327
	5	0,890	0,658	1,055	0,398	1,010	0,516
	6	1,079	0,999	1,124	0,126	1,264	0,762
	7	1,025	0,752	1,249	0,497	1,047	0,477
	8	0,709	0,555	0,838	0,283	0,684	0,194
Therapie	3	0,636	0,497	0,720	0,223	0,589	0,164
	4	0,911	0,721	1,293	0,572	1,019	0,517
	5	0,980	0,601	1,086	0,485	0,885	0,362
	6	0,865	0,714	1,083	0,369	0,895	0,321
	7	0,813	0,533	0,931	0,398	1,026	0,834
	8	0,996	0,805	1,550	0,745	1,208	0,596
Kontrolle		0,185	0,143	0,217	0,074	0,189	0,089

Tabelle 36: statistische Daten PCR - mTRANCE

TRANCE	Tag nach D5- Injektion	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartils- abstand	Mittelwert	Standard- abweichung
Tumor	0	0,141	0,013	0,275	0,262	0,164	0,176
	1	0,000	0,000	0,037	0,037	0,059	0,123
	2	0,127	0,096	0,161	0,065	0,198	0,241

	3	0,041	0,015	0,104	0,090	0,070	0,080
	4	0,044	0,021	0,161	0,139	0,092	0,101
	5	0,184	0,069	0,264	0,196	0,162	0,121
	6	0,155	0,097	0,177	0,081	0,148	0,102
	7	0,036	0,006	0,127	0,121	0,082	0,107
	8	0,093	0,052	0,194	0,141	0,119	0,088
T-Zellen	3	0,371	0,268	0,510	0,242	0,364	0,229
	4	0,275	0,093	0,428	0,335	0,383	0,427
	5	0,360	0,344	0,379	0,035	0,362	0,065
	6	0,365	0,265	0,449	0,184	0,468	0,356
	7	0,350	0,272	0,421	0,148	0,352	0,133
	8	0,443	0,224	0,671	0,447	0,449	0,268
Therapie	3	0,511	0,377	0,958	0,581	0,680	0,405
	4	0,530	0,297	0,741	0,444	0,583	0,448
	5	0,421	0,280	0,641	0,361	0,438	0,288
	6	0,257	0,141	0,488	0,347	0,591	0,840
	7	0,616	0,286	0,660	0,373	0,517	0,274
	8	0,617	0,466	0,651	0,185	0,895	0,955
Kontrolle		0,157	0,072	0,174	0,102	0,123	0,081

9.2 Analyse der PCR-Daten – Signifikanzanalyse

Es wurde der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney als nichtparametrischer Test gewählt. Die Signifikanzgrenzen liegen für die jeweiligen Gruppenstärken wie folgt:

Tabelle 37: Signifikanzgrenzen U-Test bei $\alpha = 0,05$

n_1	n_2	T_1	T_2
6	6	26	52
5	6	18	42
6	5	24	48
5	5	17	38

($n_{1/2}$ = Gruppe 1 / 2, $T_{1/2}$ = untere / obere Signifikanzgrenze)

Tabelle 38: RangsummenIn rot hervorgehoben: mit $\alpha = 0,05$ signifikant unterschiedliche Gruppen

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen						
ACTIN	0	29	49	3	42	36	3	40	38	3	49	29	3	33	45
	1	22	56	4	35	43	4	34	44	4	46	32	4	37	41
	2	30	48	5	38	40	5	39	39	5	42	36	5	39	39
	3	29	49	6	39	39	6	27	51	6	37	41	6	31	47
	4	28	50	7	34	44	7	31	47	7	39	39	7	34	44
	5	36	42	8	42	36	8	32	46	8	41	37	8	29	49
	6	32	46												
	7	30	48												
	8	38	40												

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen						
Pmel	0	57	21	3	37	41	3	55	23	3	41	37	3	56	22
	1	57	21	4	42	36	4	53	25	4	32	46	4	52	26
	2	57	21	5	40	38	5	51	27	5	31	47	5	52	26
	3	51	27	6	38	40	6	51	27	6	29	49	6	53	25
	4	55	23	7	41	37	7	39	39	7	22	56	7	39	39
	5	56	22	8	39	39	8	51	27	8	22	56	8	53	25
	6	56	22												
	7	57	21												
	8	57	21												

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen						
IFN-γ	0	45	33	3	56	22	3	56	22	3	56	22	3	50	28
	1	50	28	4	40	38	4	50	28	4	57	21	4	50	28
	2	45	33	5	42,5	35,5	5	44,5	33,5	5	53,5	24,5	5	40,5	37,5
	3	39	39	6	44	34	6	40,5	37,5	6	53	25	6	36	42
	4	27	51	7	40,5	37,5	7	46	32	7	54	24	7	45	33
	5	24,5	53,5	8	36	42	8	49	29	8	56	22	8	51	27
	6	27	51												
	7	29	49												
	8	28,5	49,5												

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen						
Perforin	0	54	24	3	57	21	3	43	23	3	38	28	3	30	36
	1	35	43	4	46	32	4	52	26	4	40	38	4	46	32
	2	43	35	5	50	28	5	46	32	5	31	47	5	34	44
	3	40	38	6	55	23	6	44	34	6	35	43	6	25	53
	4	55	23	7	57	21	7	48	30	7	37	41	7	31	47
	5	52	26	8	55	23	8	51	27	8	50	28	8	46	32
	6	47	31												
	7	49	29												
	8	41	37												

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen						
Granzym	0	49	17	3	35	31	3	33	22	3	34	32	3	32	34
	1	51	15	4	31	24	4	31	24	4	28	27	4	27	28
	2	47	19	5	34	32	5	42	24	5	41	37	5	44	34
	3	33	33	6	43	23	6	42	24	6	40	26	6	40	38
	4	31	24	7	45	21	7	41	25	7	43	35	7	36	42
	5	34	32	8	44	22	8	47	19	8	46	32	8	49	29
	6	26	29												
	7	37	29												

8 40 26

MFL

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen					
0	43,5	34,5	3	41	37	3	36	42	3	36	42	3	33	45
1	43,5	34,5	4	52	26	4	52	26	4	39,5	38,5	4	39,5	38,5
2	41	37	5	38,5	39,5	5	36	42	5	36	42	5	36	42
3	38,5	39,5	6	38,5	39,5	6	36	42	6	39	39	6	36	42
4	51	27	7	36	42	7	39,5	38,5	7	42	36	7	42	36
5	38,5	39,5	8	36	42	8	38,5	39,5	8	35	43	8	42	36
6	36	42												
7	36	42												
8	41	37												

TNF- α

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen					
0	33	45	3	53	25	3	53	25	3	44	34	3	35	43
1	23	55	4	50	28	4	45	33	4	33	45	4	34	44
2	29	49	5	45	33	5	52	26	5	43	35	5	43	35
3	39	39	6	46	32	6	36	42	6	32	46	6	33	45
4	47	31	7	44	34	7	39	39	7	32	46	7	36	42
5	42	36	8	44	34	8	40	38	8	38	40	8	36	42
6	46	32												
7	45	33												
8	38	40												

IL-6

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen					
0	45	33	3	51	27	3	48	30	3	30	48	3	36	42
1	39	39	4	42	36	4	42	36	4	42	36	4	38,5	39,5
2	48	30	5	42	36	5	39	39	5	36	42	5	36	42
3	51	27	6	39	39	6	39	39	6	36	42	6	39	39
4	39	39	7	42	36	7	39	39	7	33	45	7	36	42
5	42	36	8	39	39	8	42	36	8	39,5	38,5	8	42	36
6	42	36												
7	45	33												
8	42	36												

NKG2D

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen					
0	56	22	3	57	21	3	56	22	3	48	30	3	36	42
1	42	36	4	57	21	4	57	21	4	55	23	4	38	40
2	50	28	5	57	21	5	57	21	5	51	27	5	38	40
3	45	23	6	57	21	6	57	21	6	51	27	6	34	44
4	49	29	7	57	21	7	57	21	7	55	23	7	34	44
5	47	31	8	57	21	8	57	21	8	56	22	8	50	28
6	55	23												
7	51	27												
8	53	25												

TRANCE

	Tumor Kontrolle		T-Zellen Kontrolle		Therapie Kontrolle		Therapie Tumor		Therapie T-Zellen					
0	42	36	3	52	26	3	57	21	3	57	21	3	46	32
1	31	47	4	45	33	4	53	25	4	55	23	4	45	33
2	37,5	40,5	5	57	21	5	52	26	5	50	28	5	41	37
3	33,5	44	6	57	21	6	49	29	6	47	31	6	35	43
4	37	41	7	55	23	7	54	24	7	55	23	7	47	31
5	42,5	35,5	8	52	26	8	57	21	8	57	21	8	44	34
6	41	37												
7	34	44												
8	40	38												

9.3 Analyse der Programmarrays Chemokine und ihre Rezeptoren

Tabelle 39: Programmarrays OD-Werte normalisiert für Gap-DH

Gen	Tumor							Therapie					Kontrolle	D5	T-Zellen
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7				
CCL5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,323	0,000	0,000	0,000	0,000	
CCL17	0,076	0,094	0,064	0,603	0,331	0,233	0,000	0,000	0,177	0,126	0,365	0,147	0,129	0,000	
CCL21a	0,424	0,588	0,764	0,999	0,796	0,807	0,583	0,792	0,634	0,394	0,569	0,807	0,000	0,000	
CCL28	0,194	0,254	0,602	1,762	1,018	0,923	0,454	0,643	0,875	0,334	0,920	0,896	0,147	0,325	
CXCL2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,212	0,000	
CXCL7	0,106	0,143	0,360	1,050	0,634	0,525	0,375	0,000	0,465	0,000	0,414	0,349	0,000	0,000	
CXCL9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
CXCL12	0,185	0,206	0,177	0,440	0,178	0,087	0,073	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
CXCL15	1,285	1,793	1,288	1,684	2,880	1,833	1,845	2,246	1,286	1,695	2,292	2,757	0,063	0,350	
CXCL16	0,093	0,208	0,213	0,836	0,656	0,480	0,260	0,215	0,397	0,116	0,492	0,275	0,000	0,000	
Erythropoetin	0,065	0,168	0,253	1,199	0,861	0,541	0,453	0,650	0,581	0,184	0,491	0,562	0,000	0,110	
Fraktalkine	0,101	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Tapasin	0,368	0,521	0,558	1,197	1,280	0,856	0,563	1,285	0,855	0,468	1,117	0,924	0,000	0,303	
CCR2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,074	
CCR7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,128	
CCR9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,177	0,000	
CXCR4	0,153	0,163	0,137	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
CXCR6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,165	
CXCR7	0,117	0,248	0,104	0,000	0,974	0,216	0,000	0,000	0,221	0,238	1,026	0,000	0,378	0,000	

9.4 IFN-gamma -Pathway-Analyse anhand der Affymetrixdaten

Im folgenden eine Auswahl von am IFN- γ -Signaling-Pathway beteiligten Genen der Therapiegruppe, Tag 1 bis 5 nach T-Zellinjektion.

Tabelle 40: Affymetrix Daten - IFN- γ -Pathway, Chip A

Gene ID	Gene	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
IFN-related		Signal	DC Signal	DC Signal	DC Signal	DC Signal
Y09864	type I interferon receptor, IFNAR2b	105.1	P 111.4	P 92.4	P 158.2	P 209.5
AF013486	type I interferon receptor soluble isoform precursor (IFNAR2)	83.9	P 53.8	P 61.6	P 75.0	P 113.8
U15635	IFN-gamma induced (Mg11)	505.8	P 495.4	P 331.6	P 420.6	P 515.4
K01238	MuIFN-alpha-2 interferon-alpha-2	2.4	A 7.6	A 6.3	A 4.8	A 10.5
L38698	interferon alpha-B (IFN-alpha-B)	18.7	A 14.4	A 28.2	A 20.6	A 31.7
M55290	IFN-response	0.9	A 1.7	A 1.2	A 0.4	A 0.7

	binding factor 1										
M13660	interferon-alpha (IFN-alpha-1-9)	5.1	A	9.1	A	19.9	A	9.7	A	27.9	A
INOS											
U43428	Nitric oxide synthase 2, inducible	11.7	A	9.7	A	6.2	A	7.2	A	18.4	A
U53142	Nitric oxide synthase 3, endothelial	16.5	A	32.7	A	7.5	A	47.5	A	17.8	A
D14552	Nitric oxide synthase 1, neuronal	13.9	A	6.6	A	2.5	A	4.9	A	13.0	A
AF020185	inhibitor of nitric oxide synthase	3092.8	P	2531.6	P	2031.1	P	3185.3	P	3981.6	P
IL-12-related											
U64199	IL-12 receptor beta2	3.0	A	12.8	A	1.2	A	3.4	A	16.7	A
U23922	IL-12 receptor beta component precursor	19.2	A	23.6	M	16.9	A	24.5	A	28.4	A
Phox-related											
AB002664	p67phox	37.4	P	29.6	P	30.8	P	54.9	A	64.0	P
X75014	Phox2	2.0	A	4.8	A	4.3	A	3.6	A	3.5	A
AB002663	p47phox	33.4	A	37.9	A	41.4	A	18.5	A	45.6	A
Y14493	PHOX2b	16.3	A	4.2	A	8.4	A	16.7	A	17.9	A
M15593	Ig kappa chain 7B6 mRNA, V-region (VJ5) of monoclonal phOx-specific antibody	16.4	A	15.3	A	25.9	A	67.9	P	51.0	A
complement components											
M31039	complement receptor 3 beta subunit MAC-1	155.2	P	190.4	P	98.9	P	114.1	P	178.8	P
M17122	Complement component 4 binding protein	10.0	A	1.4	A	0.7	A	1.0	A	1.2	A
AF049850	MHC locus class III region- complement C4 (C4) and cytochrome P450 hydroxylase A	185.0	P	171.0	P	125.9	P	152.0	P	221.7	P
M57891	Complement component 2 (within H-2S)	79.8	P	52.7	P	50.9	P	66.3	P	38.7	P
M29010	complement factor H-related protein	21.2	P	19.9	P	12.1	A	14.6	A	32.6	P
M29007	complement factor H-related protein	3.9	A	5.8	A	2.3	A	2.4	A	1.8	A
AF049850	MHC locus class III region- complement C4 (C4) and cytochrome P450 hydroxylase A	134.6	P	126.8	P	80.4	M	134.9	A	169.8	P
AF049850	MHC locus class III	85.6	P	55.4	P	48.7	P	91.9	P	120.9	P

	region- complement C4 (C4) and cytochrome P450 hydroxylase A										
U47810	Complement component factor i	4.3	A	0.5	A	1.0	A	10.9	A	2.6	A
X12905	Properdin factor, complement	40.9	P	39.5	P	18.9	P	55.8	P	66.9	P
M12660	Complement component factor h	89.0	P	68.4	P	63.7	P	131.0	P	138.0	P
M23529	Complement receptor related protein	81.3	P	113.4	P	62.3	P	109.2	P	130.5	P
M29281	Complement receptor 2	0.3	A	1.9	A	3.6	A	7.2	A	8.1	A
M35525	Hemolytic complement	735.2	P	597.2	P	441.2	P	758.2	P	894.4	P
U77461	Complement component 3a receptor 1	18.7	P	14.5	A	7.6	A	40.8	P	20.8	P
X05475	complement component C9	13.1	A	10.2	A	1.4	A	13.0	A	6.7	A
X66295	Complement component 1, q subcomponent, c polypeptide	156.9	P	183.7	P	165.1	P	186.4	P	186.9	P
M29008	complement factor H-related protein	34.0	P	44.4	P	27.3	P	61.4	P	68.3	P
M29009	complement factor H-related protein	63.4	P	65.7	P	47.1	P	101.2	P	87.2	P
K02782	complement component C3	918.5	P	962.7	P	776.9	P	994.2	P	1299.3	P
M22531	complement C1q B chain	134.1	P	150.3	P	102.0	P	152.0	P	172.5	P
AJ001101	Complement component 1, q subcomponent binding protein	3.9	A	16.0	A	11.3	A	38.6	A	24.8	A
X58861	Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	203.7	P	175.3	P	182.4	P	320.1	P	230.2	P
AF010254	Complement component 1 inhibitor	1474.8	P	1280.7	P	719.8	P	1383.8	P	1681.5	P
AF049850	MHC class III region- complement C4 (C4) and cytochrome P450 hydroxylase A	8.5	A	16.5	A	4.1	A	12.5	A	0.6	A
GBP families											
AJ007970	mGBP-2 protein	489.3	P	462.5	P	242.7	P	350.1	P	254.2	P
M63630	predicted GTP binding protein (IRG-47)	326.2	P	320.0	P	147.6	P	281.8	P	258.1	P
U19119	G-protein-like LRG-	90.5	P	70.2	P	46.0	P	73.5	P	79.6	P

	47										
U53219	GTPase IGTP	577.0	P	395.2	P	209.1	P	320.7	P	240.2	P
GTPase-related											
U20238	GTPase-activating protein GAP111	185.3	P	214.1	P	205.9	P	345.1	P	305.5	P
U65313	ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein (G3BP)	92.5	P	57.0	P	49.8	P	95.6	P	100.4	P
U08110	RAN GTPase activating protein 1	201.9	P	144.8	P	106.3	P	171.1	P	199.1	P
U20857	RAN GTPase activating protein 1	28.0	A	19.9	A	20.3	A	31.4	A	29.3	A
L07924	guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase	200.0	P	169.6	P	158.8	P	167.9	P	244.1	P
AF014371	Rho family GTPase (ArhA)	16.5	A	29.1	P	14.4	A	18.6	A	53.6	M
AF014371	Rho family GTPase (ArhA)	437.3	P	420.8	P	323.3	P	553.4	P	700.3	P
L32752	GTPase (Ran)	799.7	P	696.5	P	350.9	P	576.7	P	671.7	P
AB001927	ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein	219.3	P	204.3	P	174.5	P	287.5	P	383.2	P
D49956	8-oxo-dGTPase	74.5	P	61.6	P	67.0	P	64.5	P	88.0	P
AF075461	ADP-ribosylation factor-directed GTPase activating protein isoform a (Shag1)	81.8	A	72.4	P	78.2	A	93.3	A	145.5	P
AF035646	small GTPase Rab10 (Rab10)	52.7	P	59.0	P	35.4	P	73.8	P	87.9	P
U53219	GTPase IGTP	577.0	P	395.2	P	209.1	P	320.7	P	240.2	P
IRF-related											
AF036341	interferon regulatory factor-3 (IRF3)	98.9	P	85.5	P	67.5	P	104.1	P	141.1	P
AF028725	interferon regulatory factor 5 (mirf5)	102.8	P	116.5	P	55.2	P	86.3	P	105.0	P
U20949	lymphoid-specific interferon regulatory factor (LSIRF)	34.5	P	36.6	P	29.0	A	64.7	P	49.8	P
U73029	interferon regulatory factor 6 (mirf6)	62.9	P	53.5	P	30.6	P	51.4	P	83.1	P
U73037	interferon regulatory factor 7 (mirf7)	88.0	P	84.6	P	49.4	P	67.7	A	54.2	A
STAT-related											
AF077950	inhibitor of activated STAT protein PIAS1	112.6	P	135.1	P	84.0	P	174.2	P	201.7	P
AJ237939	partial STAT5B	114.9	P	123.1	P	89.6	P	137.3	P	167.6	P
AJ237939	partial STAT5B	93.9	M	127.5	P	125.0	P	119.5	P	184.4	P
Mx-related											
M21038	interferon-induced	48.2	P	26.6	P	22.9	P	23.6	P	36.9	P

mutant Mx1											
AA397054	mx87h08.r1	196.2	P	246.0	P	184.7	P	321.8	P	325.0	P
AA244542	mx04g09.r1	32.0	A	6.6	A	6.2	A	35.6	A	32.4	A
AA242553	mx20c10.r1	0.8	A	0.9	A	2.8	A	11.2	A	1.8	A
CXCL16-related											
X13335	A disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) 8	109.6	P	102.0	P	78.9	P	118.7	P	154.6	P
U22059	A disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) 5	9.7	A	10.9	A	4.2	A	8.8	A	11.3	A
AB009673	ADAM23	32.4	A	8.3	A	15.3	A	6.8	A	54.1	A
U22058	A disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) 4	4.8	A	6.1	A	1.7	A	0.8	A	15.5	A
AB009676	ADAM11	25.4	A	4.2	A	5.3	A	8.1	A	21.2	A
AF011379	A disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) 10	15.1	M	22.4	A	17.4	A	19.8	A	25.8	A
AF013107	A disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) 7	3.1	A	12.3	A	2.7	A	3.4	A	14.2	A
AB021709	tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ADAM17)	19.7	A	20.5	A	4.3	A	41.3	A	6.4	A
AB009674	ADAM22	6.6	A	1.1	A	7.6	A	22.2	A	11.0	A
Mig-related											
Mig	monokine induced by IFNgamma										
U65747	Interleukin 13 receptor, alpha 2	1.9	A	11.0	A	2.1	A	3.4	A	4.4	A
M23504	Interleukin 13	10.0	A	5.3	A	5.9	A	4.6	A	5.8	A
M33266	macrophage interferon inducible protein 10 (IP-10)	41.6	P	36.1	P	24.5	P	15.7	M	13.8	A
p21 (WAF1)											
U39738	P21 activated kinase-3 (mPAK-3)	4.5	A	13.5	A	1.3	A	5.4	A	3.6	A
U09507	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	369.4	P	253.8	P	162.6	P	222.1	P	327.7	P
CCL17-related											
AJ242587	thymus and activation regulated chemokine (TARC gene)	145.0	P	118.7	P	101.0	P	159.1	P	150.9	P
MDC	macrophage derived chemokine										
NFkappa B-related											
AJ242778	ABINI, (A20-binding	132.7	P	111.9	P	77.4	P	147.0	P	152.7	P

	inhibitor of NF-kappa B activation										
AF069542	NF-kB essential modulator	21.5	A	9.8	A	12.9	A	45.5	A	41.8	A
Jak-related											
L16956	Janus kinase 2	86.3	P	88.6	P	61.6	P	112.7	P	111.5	P
L40172	Janus kinase 3	112.1	P	109.6	P	75.3	P	145.2	P	147.7	P
IP-10-related											
M33266	macrophage interferon inducible protein 10 (IP-10)	41.6	P	36.1	P	24.5	P	15.7	M	13.8	A
FAS-related											
U06948	Fas antigen ligand	39.5	A	33.6	A	25.1	M	15.8	A	36.5	A
AF100956	MHC II region; gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-galactosyl transferaseFas-binding protein Daxx (DAXX)	4980.1	P	4958.3	P	3879.3	P	5038.2	P	6287.9	P
AF110520	MHC complex region, NADH oxidoreductase, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18 genes	4805.5	P	4569.7	P	3907.3	P	5302.9	P	6634.0	P
M83649	Fas antigen	93.7	P	75.1	P	56.5	P	99.0	P	132.4	P
AF110520	MHC complex region, NADH oxidoreductase, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18	16.2	A	37.3	A	16.0	A	42.6	A	6.0	A
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-galactosyl transferase	151.9	P	99.9	P	106.7	P	159.5	P	183.9	P
AF110520	MHC complex region, NADH	1795.3	P	1449.3	P	1721.7	P	1612.2	P	2330.4	P

	oxidoreductase, NG29, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18										
AF110520	MHC complex region, NADH oxidoreductase, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18	69.5	P	31.4	A	25.4	P	47.1	A	51.4	P
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-galactosyl transferase	110.4	P	115.3	P	98.4	P	148.4	P	172.0	P
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-galactosyl transferase	341.4	P	288.7	P	248.6	P	293.9	P	527.3	P
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-galactosyl transferase	19.1	A	4.3	A	8.0	A	23.0	A	5.3	A
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4	99.4	P	78.8	P	85.2	P	105.6	P	126.1	P

	(BING4), beta1, 3-galactosyl transferase										
AF110520	MHC complex region, NADH oxidoreductase, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18	125.2	P	132.5	P	88.8	P	120.0	P	173.3	P
AF110520	MHC complex region, NADH oxidoreductase, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18	871.3	P	833.2	P	471.1	P	885.0	P	1204.4	P
U39643	Fas-associated factor 1	16.3	A	11.0	A	13.5	A	30.9	A	42.3	A
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-galactosyl transferase	292.4	P	208.4	P	177.4	P	310.1	P	327.0	P
U50406	Fas-associating protein with death domain	56.8	P	43.4	P	26.7	P	47.6	M	69.9	P
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-galactosyl transferase	24.6	P	8.2	A	12.0	P	27.1	A	30.9	P
AF100956	MHC locus class II region; Fas-binding protein Daxx (DAXX) gene, Bing1 (BING1), tapasin (tapasin), RalGDS-like factor (RLF), KE2 (KE2), BING4 (BING4), beta1, 3-	24.2	A	11.8	A	13.7	A	18.4	A	18.1	A

	galactosyl transferase										
AF110520	MHC complex region, NADH oxidoreductase, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18	31.4	A	16.2	A	10.3	A	48.2	A	40.1	A
AF110520	MHC complex region, NADH oxidoreductase, KIFC1, Fas-binding protein, BING1, tapasin, RalGDS-like, KE2, BING4, beta 1,3-galactosyl transferase, and RPS18	58.9	P	70.6	P	47.0	P	80.8	P	74.8	P
M83649	Fas antigen	81.7	P	53.2	P	41.3	P	71.6	P	112.3	P
Chaperones-related											
L16953	tumor cell dnaJ-like protein 1	108.5	P	84.5	P	80.0	P	152.5	P	178.9	P
AF055664	Heat shock protein, DNAJ-like 2	307.5	P	187.3	P	176.9	P	327.5	P	412.1	P
AF041060	co-chaperone mt-GrpE#2	69.4	P	42.3	P	48.0	P	84.9	P	114.4	P
Z37164	Cctq mRNA encoding cytosolic chaperone containing TCP-1, theta subunit (CCTtheta)	107.2	P	101.1	P	55.5	P	119.8	P	153.6	P
HSP70-related											
AF109906	MHC class III region RD gene, HSP70, HSC70t, and smRNP	76.4	P	78.2	P	88.1	P	128.5	P	91.2	P
AF109906	MHC class III region RD gene, HSP70, HSC70t, and smRNP	191.3	P	53.8	P	49.5	P	93.1	P	185.8	P
AF109906	MHC class III region RD gene, HSP70, HSC70t, and smRNP	8.9	A	6.9	A	5.2	A	5.9	A	9.4	A
AF109906	MHC class III region RD gene, HSP70, HSC70t, and smRNP	160.4	P	167.6	P	107.6	P	163.6	P	216.4	P
AF109906	MHC class III region RD gene, HSP70, HSC70t, and	70.5	P	46.1	P	32.4	P	78.7	P	47.0	P

smRNP											
U08215	Hsp70-related NST-1 (hsr.1)	39.0	P	37.1	P	25.0	P	38.1	P	56.7	P
Tax-related											
Z21674	Tax-transcriptionally activated glycoprotein 1	19.1	A	6.2	A	31.0	A	44.5	A	54.0	A
X81987	TAX responsive element binding protein 107	1859.0	P	1632.9	P	1215.2	P	1976.5	P	2136.1	P
U12763	Tax-transcriptionally activated glycoprotein 1 ligand	10.7	A	1.8	A	4.2	A	0.3	A	3.8	A
IL-10-related											
M37897	interleukin 10	11.9	A	0.7	A	3.8	A	1.2	A	1.9	A

9.5 TNF-alpha-Pathway- Analyse anhand der Affymetrix-Daten

Im folgenden eine Auswahl von an TNF- α -Signaling-Pathways beteiligten Genen der Therapiegruppe, Tag 1 bis 5 nach T-Zellinjektion.

Tabelle 41: Affymetrix-Daten - TNF- α - Pathway, Chip A

Gene ID	Gene	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5					
TNF-related		Signal	DC	Signal	DC	Signal	DC	Signal	DC	Signal	DC
U90926	putative TNF-resistance related protein	51.3	P	29.7	A	49.1	P	24.3	A	58.3	P
X87128	p75 TNF receptor	152.2	P	119.6	P	108.7	P	157.8	P	171.3	P
U21050	TNF-R associated factor 3	142.2	P	117.6	P	81.6	P	129.2	P	178.5	P
X92346	TNF-R associated factor 4	77.7	P	51.9	P	57.5	P	74.0	P	83.1	P
D84196	TNF-a	27.0	A	16.7	A	3.5	A	29.5	A	4.6	A
D78141	TNF-R associated factor 5	111.4	A	154.9	M	92.8	A	168.4	M	201.9	P
U82534	glucocorticoid induced TNF-R family related protein precursor	27.8	A	45.4	A	27.8	A	33.3	A	38.1	A
AF010600	TNF-response element binding protein	15.8	M	8.6	A	6.9	A	14.3	A	35.2	P
AF010600	TNF-response element binding protein	25.7	A	30.8	A	19.7	A	33.2	A	14.3	A
U37522	TRAIL	38.5	P	25.7	P	39.0	P	52.4	P	35.3	P
L35302	TNF-R associated factor 1	140.6	P	129.5	P	99.5	P	150.7	P	161.7	P
TRAF-related											
U59864	TRAF-interacting protein I	67.8	P	59.2	P	42.0	P	84.9	P	92.2	P
AF027570	TNF-R associated factor 2A	188.6	P	124.1	P	64.4	P	181.5	P	152.6	P
U91538	vesicle trafficking portein	49.9	P	42.4	P	32.3	P	53.4	P	66.3	P
U52461	lysosomal trafficking regulator	22.2	A	10.0	A	21.2	A	14.8	A	35.2	A
D84655	TRAF6	3.2	A	7.5	A	2.2	A	1.8	A	2.4	A
Sphingomyelin ase											

AJ222800	neutral sphingomyelinase	59.6	P	66.0	P	46.1	P	123.7	P	104.3	P
Ceramide											
D89866	ceramide glucosyltransferase	14.0	A	18.8	A	12.3	A	9.3	A	26.0	M
JNK											
AB005663	JNK1	0.9	A	2.1	A	3.3	A	1.6	A	1.1	A
AB029482	JNK binding protein 1	25.4	A	11.0	A	33.9	A	7.9	A	11.8	A
AB005662	JNK/SAPK-associated protein 1	83.9	P	107.0	P	80.4	P	106.8	P	100.4	P
AB005664	JNK2	14.6	P	9.4	A	12.0	P	24.9	A	14.1	P
SAPK											
U18310	SAPK/Erk/kinase 1	25.5	A	37.8	P	35.8	A	56.8	P	47.5	P
endonucleases											
L26320	Flap structure endonuclease 1	30.4	P	26.4	P	16.5	M	4.6	A	37.6	P
Y09688	endonuclease III NTH1	41.9	A	21.1	A	30.0	A	4.7	A	44.9	A
AB012108	endonuclease G	9.8	A	22.9	A	16.2	A	9.9	A	31.1	P
ERK											
AB019373	ERK5	68.1	A	48.7	A	11.1	A	82.8	A	97.2	M
U18310	SAPK/Erk/kinase 1	25.5	A	37.8	P	35.8	A	56.8	P	47.5	P
AF076681	PERK	14.8	P	26.0	P	28.8	P	34.4	P	68.4	P
U92885	LERK-3 (Epl3)	57.7	A	55.2	A	44.9	A	48.2	A	80.2	A
D87271	ERK2	41.0	P	57.6	P	56.1	P	101.4	P	59.3	P
U92890	LERK-4 (Epl4)	5.7	A	21.4	A	2.5	A	4.4	A	27.9	A
p38											
D83073	p38b	313.7	P	355.2	P	208.8	P	416.6	P	470.4	P
AA734817	p38c	109.4	P	103.6	P	85.2	P	162.2	P	207.3	P
U81823	p38delta MAP kinase	6.0	A	1.6	A	6.7	A	4.4	A	1.2	A
AA734806	p38b	96.5	P	84.8	P	65.2	P	94.1	P	119.5	P
RIP-related											
AF057287	RAB/Rip protein	83.1	P	81.6	P	42.9	P	82.7	P	101.2	P

9.6 Ausgewählte Gene mit Schlüsselbegriffen wie Chemokinen, Zytokinen oder Makrophagen

Im folgenden eine Auswahl von Genen, die Schlüsselbegriffe wie Chemokine, Zytokine, Makrophagen etc. Enthalten, und die v.a. an inflammatorischen oder immunologischen Sekundärreaktionen beteiligt sein können.

Tabelle 42: Affymetrix Daten – Schlüsselbegriffe wie Chemokine, Zytokine, Makrophagen etc., Chip A

Gene ID	Gene	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	DC				
		Signal	DC Signal	DC Signal	DC Signal	DC Signal					
NKG/Ly49											
AF095447	natural killer cell receptor NKG2A (Nkg2a)	10.0	A	24.8	P	6.0	A	57.4	P	27.8	P
U56404	natural killer cell receptor Ly-49C	28.9	P	31.7	P	34.9	P	66.4	P	69.3	P
U34891	natural killer cell receptor Ly49C	16.1	A	27.1	A	35.7	A	44.3	A	56.5	P
D64162	Rae-123 mRNA for cell surface protein	4.2	A	10.5	A	15.1	A	3.2	A	11.2	A
PRL											
U84411	protein tyrosine phosphatase (PRL-1)	794.5	P	719.6	P	563.4	P	975.7	P	1312.4	P
AF035644	potentially prenylated protein tyrosine phosphatase mPRL-2 (Pr12)	414.3	P	376.8	P	224.9	P	494.3	P	594.3	P
AF035645	potentially prenylated protein tyrosine phosphatase mPRL-3 (Pr13)	501.7	P	431.5	P	300.0	P	468.4	P	652.5	P
chemokines											
AF035684	beta chemokine TCA4	491.8	P	429.2	P	333.8	P	496.6	P	577.2	P
AF052505	CC chemokine ABCD-1	66.0	P	50.4	P	44.8	M	71.7	A	53.2	A
AJ242587	thymus and activation regulated chemokine (TARC gene)	145.0	P	118.7	P	101.0	P	159.1	P	150.9	P
AJ249480	thymus-expressed chemokine (TECK gene)	16.0	A	13.1	A	16.8	A	22.0	M	22.4	A
AF030636	CXC chemokine (angie2)	2.3	A	1.7	A	5.8	A	4.8	A	15.2	A
U29678	CCR1	17.7	A	17.4	A	10.3	A	11.9	A	30.5	P
U28405	Chemokine (C-C) receptor 1,-like 1	17.8	A	19.0	A	3.3	A	27.6	A	17.7	A
U29677	Chemokine (C-C) receptor 1,-like 2	13.8	A	11.2	A	3.7	A	10.2	A	11.2	A
U15208	CCR4	6.6	A	4.0	A	15.8	A	9.0	A	6.7	A
X94151	CCR5	6.0	A	10.2	A	8.2	A	3.0	A	1.0	A
AF022990	CCR5	23.6	P	16.5	P	9.1	A	30.1	A	26.3	P
AJ132336	CCR9	6.1	A	9.1	A	16.9	P	2.4	A	8.8	A
L13239	CXCR2	15.5	A	10.2	A	9.1	A	16.0	A	29.4	M
AF045146	CXCR3	80.8	P	120.2	P	84.0	M	130.6	P	105.9	M
AF000236	Cmkor1	105.4	P	99.2	P	57.5	P	137.3	P	135.6	P
AF030185	putative beta chemokine receptor (E01)	104.8	P	83.3	P	93.7	P	166.2	P	176.5	P
AF074912	CX3CR1	7.9	A	30.0	A	11.2	A	47.2	A	34.7	A
Y12879	beta-chemokine receptor D6	36.5	A	37.2	A	29.9	A	68.3	A	59.5	P
AF001277	putative CC-chemokine receptor (Ter1)	9.6	A	1.9	A	2.5	A	2.2	A	2.7	A

small inducible cytokines											
M23501	Small inducible cytokine A1	9.2	A	20.0	P	13.9	A	16.8	A	12.5	A
M23501	Small inducible cytokine A1	4.8	A	6.9	A	1.6	A	32.2	A	16.6	A
M19681	Small inducible cytokine A2	92.2	P	73.8	P	34.1	M	61.4	P	53.1	P
J04491	Small inducible cytokine A3	6.3	A	17.5	A	19.4	A	32.4	M	33.3	A
AF065947	small inducible cytokine A5 (ScyA5)	362.0	P	782.7	P	649.1	P	1081.6	P	1318.7	P
M58004	Small inducible cytokine A6	66.7	P	76.1	P	22.6	P	47.5	P	71.2	P
X70058	Small inducible cytokine A7	31.9	P	20.6	P	15.1	A	18.5	P	13.1	A
U49513	Small inducible cytokine A9	123.0	P	129.0	P	88.4	P	144.3	P	142.7	P
U77462	eotaxin precursor (Scya11)	5.8	A	1.8	A	9.3	A	15.9	A	8.3	A
U50712	Small inducible cytokine A12	33.6	A	13.5	A	12.3	A	4.2	A	2.0	A
U27267	Small inducible cytokine B subfamily, member 5	23.7	A	12.8	A	4.6	A	1.7	A	0.9	A
U92565	Small inducible cytokine subfamily D, 1	160.3	P	143.7	P	120.3	P	173.1	P	235.5	P
semaphorines											
X85990	semaphorin A	41.5	A	44.2	A	41.1	A	23.8	A	60.0	P
X85991	semaphorin B	179.3	P	209.4	P	124.2	P	164.4	P	170.1	P
X85992	semaphorin C	17.5	A	22.5	P	13.4	A	29.7	P	24.6	A
X85994	semaphorin E	36.3	P	38.3	P	30.4	P	58.7	P	74.2	P
X97817	Semaphorin F	10.4	P	4.3	A	6.3	A	17.0	A	22.4	P
X97818	semaphorin G	3.6	A	5.3	A	7.1	A	50.9	A	11.8	A
Z80941	semaphorin H	108.3	P	81.0	P	90.3	P	151.1	P	93.0	P
U69535	semaphorin M-sema G	133.7	P	217.2	P	99.6	P	137.1	P	183.3	P
AB022316	semaphorin w	129.2	P	117.6	P	89.0	P	147.5	P	146.9	P
AB013729	semaphorin Y	12.9	A	9.7	A	6.8	A	17.7	A	53.8	A
AF080090	semaphorin IV isoform b	90.9	P	82.0	P	47.6	P	83.7	P	102.8	P
AF030430	semaphorin VIa	4.4	A	1.8	A	2.4	A	6.0	A	4.0	A
AF036585	semaphorin VIb	20.9	A	19.7	A	25.5	A	22.1	A	4.2	A
macrophages											
U18424	bacteria binding macrophage receptor MARCO	3.8	A	31.6	A	20.8	A	23.4	A	4.4	A
AF032967	C3H/HeN preferentially expressed in LPS-normoresponsive macrophages	142.0	P	87.4	P	78.2	P	89.2	P	226.5	P
X86405	Cannabinoid receptor 2 (macrophage)	0.5	A	2.5	A	9.7	A	12.9	A	7.3	A
X03020	granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)	2.6	A	10.2	A	5.8	A	12.5	A	9.3	A
M85078	granulocyte-macrophage colony stimulating factor	59.6	P	56.7	P	53.2	P	98.7	P	81.9	P

	receptor low-affinity subunit										
Y18101	macrophage actin-associated-tyrosine-phosphorylated protein	1.1	A	1.5	A	0.8	A	8.6	A	1.4	A
M21952	macrophage colony-stimulating factor	156.0	P	149.0	P	106.7	P	191.4	P	205.3	P
AB024717	macrophage C-type lectin Mincle	1.7	A	18.0	A	4.2	A	3.0	A	2.1	A
D37837	macrophage cytosolic protein	817.9	P	795.3	P	533.6	P	767.2	P	884.8	P
X53798	Macrophage inflammatory protein 2	13.3	A	10.9	A	9.4	A	15.6	A	9.3	A
M33266	macrophage interferon inducible protein 10 (IP-10)	41.6	P	36.1	P	24.5	P	15.7	M	13.8	A
M82831	Macrophage metalloelastase	41.5	P	40.6	P	36.5	P	111.3	P	52.0	P
M82831	Macrophage metalloelastase	80.6	P	58.0	P	58.3	P	152.1	P	106.1	P
L39357	Macrophage migration inhibitory factor	2.3	A	2.1	A	5.7	A	0.7	A	1.3	A
X62502	MIP-1b gene for macrophage inflammatory protein 1b	9.6	A	4.4	A	3.2	A	8.9	A	4.9	A
L13732	Natural resistance-associated macrophage protein 1	53.9	P	53.3	P	33.7	P	80.6	M	51.5	P
L33415	Natural resistance-associated macrophage protein 2	102.8	P	80.9	P	108.8	P	138.1	P	157.4	P
U43428	Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage	11.7	A	9.7	A	6.2	A	7.2	A	18.4	A
neutrophiles											
U96696	neutrophil collagenase MNC	1.6	A	3.2	A	2.8	A	4.6	A	29.2	A
U04962	neutrophil elastase	27.0	A	31.2	A	11.0	A	39.4	A	14.3	A
U59488	Neutrophil cytosolic factor 4	71.6	P	84.7	P	64.8	P	66.3	P	117.7	P
Gro											
J04596	GRO1 oncogene	73.2	P	39.2	P	30.2	P	59.1	P	43.9	P
J04596	GRO1 oncogene	33.5	M	30.5	P	25.3	A	39.8	A	33.5	P
duffy											
AF016697	Duffy blood group	4.8	A	2.6	A	3.0	A	2.4	A	5.0	A
endothel											
M93428	endothelial ligand for L-selectin (GLYCAM1)	2.1	A	1.8	A	2.6	A	21.3	A	3.3	A
U41341	endothelial monocyte-activating polypeptide I	1848.8	P	1774.2	P	1376.1	P	1919.8	P	2486.0	P
U10118	endothelial-monocyte activating polypeptide II	154.3	P	130.9	P	88.0	P	172.5	P	178.2	P
X71426	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase	399.6	P	396.5	P	323.0	P	553.6	P	657.9	P
U35233	Endothelin 1	170.2	P	120.1	P	98.1	P	206.5	P	315.6	P
U07982	Endothelin 1	22.2	A	12.9	A	12.2	A	22.8	A	45.6	A

U32330	Endothelin 3	7.0	A	2.4	A	1.6	A	15.0	A	10.6	A
U32329	Endothelin receptor type B	31.5	P	16.0	P	21.8	P	51.7	P	74.7	P
U53142	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	16.5	A	32.7	A	7.5	A	47.5	A	17.8	A
L06039	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	14.4	A	6.0	A	6.9	A	36.4	A	6.5	A
L39017	Protein C receptor, endothelial	37.0	P	45.8	P	37.4	P	53.1	P	50.8	P
M80778	Selectin, endothelial cell	0.9	A	5.5	A	0.9	A	2.2	A	1.6	A
M95200	Vascular endothelial growth factor	156.8	P	166.7	P	113.8	P	217.4	P	214.3	P
U73620	Vascular endothelial growth factor C	50.4	P	45.2	P	33.0	P	49.9	P	76.3	P
erythropoietin											
M12482	erythropoietin	14.7	A	7.1	A	0.8	A	5.0	A	7.4	A
X53081	Erythropoietin receptor	53.2	A	33.3	P	19.4	A	42.5	A	35.1	A
leukotriene											
M63848	leukotriene A-4 hydrolase	261.4	P	236.7	P	158.2	P	245.5	P	278.2	P
AF044030	leukotriene B4 receptor	32.5	A	35.4	A	10.6	A	53.5	A	65.2	A
U27195	Leukotriene C4 synthase	45.6	P	42.2	P	34.0	P	56.7	P	70.4	P
platelets											
M29464	Platelet derived growth factor, alpha	488.4	P	405.8	P	323.0	P	506.7	P	633.8	P
M64849	Platelet derived growth factor, B polypeptide	35.7	P	17.6	A	19.3	P	18.0	A	52.4	A
M57683	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	573.4	P	560.8	P	509.8	P	808.5	P	942.2	P
X04367	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	107.6	P	81.7	P	65.0	P	102.0	P	143.4	P
AB017491	platelet factor 4	1.4	A	5.7	A	3.8	A	7.3	A	3.4	A
AB001419	platelet glycoprotein Ib beta	32.4	A	44.9	A	34.5	A	33.0	A	76.7	A
U91967	platelet glycoprotein Ib-alpha	6.5	A	14.2	A	17.6	A	36.0	P	25.5	P
AB007464	platelet glycoprotein IX	42.0	A	27.9	A	20.7	A	32.0	A	129.7	P
Z69595	platelet glycoprotein V	10.0	A	2.3	A	2.6	A	3.3	A	11.7	A
M72332	Selectin, platelet	64.8	A	54.9	P	27.9	A	49.7	A	54.0	A
X91144	Selectin, platelet (p-selectin) ligand	555.1	P	576.0	P	425.4	P	613.6	P	686.1	P
L18868	Thromboxane A synthase 1, platelet	53.1	A	47.7	M	24.1	A	86.2	M	84.7	A
monocyte chemoattractant protein											
U56819	mcp-1 receptor	100.3	P	63.3	P	57.8	P	85.6	P	90.5	P
X78545	MCP-8 mRNA for serine protease	3.8	A	1.9	A	1.1	A	11.3	A	4.7	A
X78543	MCP-Y1 mRNA, serine protease pseudogene	2.3	A	1.9	A	1.0	A	20.8	A	1.0	A
AB023418	monocyte chemoattractant protein-2 (MCP-2) precursor	64.5	P	51.9	P	47.3	P	97.2	P	59.3	A

TARC											
AJ242587	thymus and activation regulated chemokine (TARC gene)	145.0	P	118.7	P	101.0	P	159.1	P	150.9	P
granzymes											
M13226	Granzyme A	182.6	P	457.0	P	109.2	P	161.6	P	181.4	P
M12302	Granzyme B	323.5	P	496.4	P	74.2	P	90.5	P	124.4	P
X56990	Granzyme D	2.4	A	2.7	A	1.6	A	2.2	A	20.8	A
M36901	Granzyme E	2.1	A	9.4	A	3.8	A	6.2	A	10.8	A
J03257	Granzyme F	6.1	A	9.1	A	13.4	P	2.1	A	5.2	A
J02872	Granzyme G	10.6	A	10.0	P	7.3	A	8.3	A	24.9	P
AF011446	Granzyme K	3.0	A	21.8	A	1.3	A	4.2	A	18.4	A
AB015728	granzyme M	12.7	A	9.3	A	16.7	A	21.5	A	3.3	A
interleukins											
M14639	IL 1 alpha	13.5	A	12.7	M	22.9	P	23.9	A	27.7	P
M15131	IL 1 beta	80.0	P	63.5	P	68.7	P	100.1	P	128.3	P
X85999	IL 1 receptor accessory protein	10.8	A	2.5	A	7.8	A	6.2	A	12.6	A
M20658	IL 1 receptor, type I	86.6	P	66.6	P	51.0	P	108.8	P	98.0	P
X59769	IL1 receptor, type II	23.3	P	20.1	P	12.4	A	16.9	A	23.7	P
U56773	IL 1 receptor-associated kinase	149.2	P	189.9	P	122.0	P	208.9	P	348.8	P
L32838	germline IL 1 receptor antagonist (IL-1rn)	38.6	A	29.4	P	31.6	A	30.3	A	45.6	A
L28095	IL 1-beta converting enzyme	29.6	P	32.6	P	18.0	P	38.4	P	44.9	P
K02292	IL 2	1.1	A	0.9	A	0.6	A	0.8	A	0.8	A
M16762	IL 2, exon 4	19.7	A	2.8	A	3.2	A	5.6	A	12.1	A
M26271	IL 2 receptor	8.6	A	3.5	A	6.5	A	7.1	A	2.1	A
X75337	IL 2 receptor gamma	11.4	A	7.5	A	2.8	A	5.1	A	13.9	A
M28052	IL 2 receptor, beta chain	21.7	A	14.4	A	3.6	A	40.1	A	19.8	A
X64534	IL 3 receptor, alpha chain	117.4	A	106.1	P	101.5	P	132.6	P	173.7	P
M34397	IL 3 receptor, beta chain 1	57.3	A	37.5	A	50.7	M	13.9	A	48.1	A
M34397	IL 3 receptor, beta chain 1	34.4	A	10.6	A	5.8	A	34.5	A	71.6	A
M29855	IL 3 receptor, beta chain 2	23.2	P	35.1	P	21.3	M	43.7	P	28.3	P
X03532	IL 4	8.6	A	2.5	A	2.6	A	1.0	A	4.8	A
X03532	IL 4	4.6	A	4.9	A	7.4	A	1.3	A	0.4	A
M25892	IL 4	0.7	A	7.6	A	11.0	M	16.7	A	2.2	A
M27960	IL-4 receptor (secreted form)	185.0	P	222.2	P	149.9	P	220.4	P	297.1	P
U70430	IL-4 induced gene 1	20.1	A	17.1	A	22.7	A	3.0	A	7.1	A
X06271	IL 5	4.5	A	10.3	A	4.3	A	11.0	A	13.9	A
D90205	IL 5 receptor, alpha	2.5	A	0.4	A	0.9	A	1.4	A	0.7	A
X54542	IL 6	11.6	M	1.3	A	2.7	A	2.2	A	14.5	A
X51975	IL 6 receptor, alpha	137.8	P	114.2	P	117.6	P	172.9	P	208.0	P
X07962	IL 7	12.8	A	7.8	A	0.7	A	18.8	A	1.7	A
M29697	IL 7 receptor	85.0	P	111.0	P	104.0	P	96.0	P	152.6	P
M30136	IL 9	19.3	A	23.2	A	18.3	A	21.4	A	6.6	A
M84746	IL 9 receptor	2.6	A	17.9	A	2.3	A	1.7	A	5.3	A
M37897	IL 10	3.4	A	8.3	A	13.9	A	9.0	A	10.8	A
M37897	IL 10	2.8	A	0.7	A	0.9	A	9.1	A	1.2	A

L12120	IL 10 receptor, alpha	16.7	A	19.9	A	4.6	A	5.7	A	11.2	A
U53696	IL 10 receptor, beta	434.7	P	460.5	P	382.1	P	645.9	P	866.1	P
U03421	IL 11	2.9	A	2.9	A	3.8	A	3.4	A	2.6	A
U14412	IL 11 receptor, alpha chain 1	20.8	A	12.1	A	4.4	A	20.9	A	23.8	A
U69491	IL 11 receptor, alpha chain 2	196.7	P	155.0	P	152.9	P	214.6	P	328.2	P
M86672	IL 12a	3.8	A	9.4	A	2.6	A	17.9	A	7.2	A
M86671	IL 12b	5.5	A	19.1	A	16.9	A	10.2	A	31.7	A
M23504	IL 13	10.0	A	5.3	A	5.9	A	4.6	A	5.8	A
U65747	IL 13 receptor, alpha 2	1.9	A	11.0	A	2.1	A	3.4	A	4.4	A
U14332	IL 15	6.3	A	6.5	A	4.6	A	7.6	A	14.7	P
U22339	IL 15 receptor, alpha chain	60.9	A	80.6	P	63.6	P	86.0	A	78.3	P
AF017111	IL 16	37.5	P	43.5	P	37.3	P	51.9	P	76.0	P
L13839	IL 17	3.2	A	0.9	A	0.4	A	1.6	A	1.9	A
U35108	IL 17	2.3	A	6.3	A	12.1	A	11.1	A	10.0	A
U31993	IL 17 receptor	66.3	P	45.7	P	41.0	P	48.6	P	70.0	P
D49949	IL 18	28.8	A	41.7	A	11.7	A	41.2	A	27.8	A
AB019505	IL-18 binding protein	42.5	A	63.2	P	40.4	P	57.2	A	43.0	A
AF077347	IL-18 receptor accessory protein-like	20.7	A	18.9	A	21.3	A	38.4	A	42.3	P
lymphocyte											
AB023132	activation-inducible lymphocyte immunomediatory molecule AILIM	3.2	A	5.0	A	1.7	A	4.8	A	20.7	A
S38219	alpha 1-acid glycoprotein-3 C57BL/6, T lymphocytes,	12.6	A	10.4	A	3.8	A	18.6	A	21.0	A
U08185	B lymphocyte induced maturation protein	43.8	P	42.2	P	38.8	P	56.4	P	68.0	P
M30687	cytotoxic T lymphocyte lipase	12.3	A	17.2	A	10.5	P	39.0	M	28.1	A
X15591	Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	768.3	P	682.9	P	506.5	P	1111.0	P	1375.0	P
X15592	Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	107.9	P	127.3	P	85.4	P	94.7	P	181.5	P
M22527	cytotoxic T lymphocyte-specific serine protease CCP11 gene	12.9	A	10.8	A	1.4	A	26.6	M	2.2	A
X04770	Ig-related lambda(5) gene (exon 3) transcribed selectively in pre-B-lymphocytes	20.5	M	15.0	A	2.2	A	30.6	A	17.2	A
M77753	Lymphocyte antigen 55 complex, locus A	11.0	A	2.7	A	8.7	A	15.2	A	17.5	A
M77677	Lymphocyte antigen 55 complex, locus B	18.6	A	25.8	A	34.2	P	30.0	A	41.5	M
M77678	Lymphocyte antigen 55 complex, locus C	40.8	A	4.6	A	18.2	A	45.9	A	55.7	A
D86232	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C	2463.1	P	2653.8	P	1451.8	P	2510.4	P	2664.8	P
X63782	Lymphocyte antigen 6	71.6	M	55.0	M	63.4	P	93.9	A	100.6	P

	complex, locus D										
J04634	Lymphocyte antigen 64	10.6	A	15.9	A	4.0	A	8.4	A	5.7	A
D37797	Lymphocyte antigen 78	1.6	A	2.8	A	1.7	A	4.1	A	14.8	M
Y07519	Lymphocyte antigen 84	10.9	A	1.3	A	11.1	P	13.0	A	1.3	A
D13695	Lymphocyte antigen 84	7.8	A	12.6	A	15.7	P	36.8	P	38.0	P
M84412	Lymphocyte antigen 9	35.5	A	35.8	A	25.2	A	60.7	A	74.8	P
AF006466	lymphocyte specific formin related protein (Fr1)	35.4	P	33.3	P	21.2	M	51.5	A	36.0	A
AF006466	lymphocyte specific formin related protein (Fr1)	13.9	A	25.2	P	6.8	A	19.9	A	18.5	M
U72644	lymphocyte specific transcript (LST)	266.1	P	302.2	P	173.8	P	214.1	P	232.1	P
X98113	Lymphocyte-activation gene 3	52.8	P	28.6	P	19.8	A	32.1	M	6.8	A
U89993	lymphocyte-specific adaptor protein Lnk (Lnk)	46.2	P	40.1	P	40.6	P	71.4	P	73.1	P
X13450	Murine B lymphocyte lineage restricted mb-1	95.1	P	92.6	P	93.7	P	174.4	P	201.8	P
M12056	rearranged lck gene encoding lymphocyte- specific protein tyrosine kinase	203.8	P	241.8	P	132.5	P	203.7	P	203.9	P
J03776	Regulatory protein, T lymphocyte 1	46.6	P	41.5	P	29.7	P	57.1	P	46.6	P
	lymphotactin										
U15607	Lymphotactin	29.7	P	11.2	A	8.4	A	29.7	A	18.9	A
	SDF										
D50646	SDF2	22.8	A	9.6	A	22.5	P	36.5	A	41.8	M
	tapasin										
AB027520	TAP-like ABC transporter	30.8	A	39.3	P	38.5	P	46.9	A	26.2	A
AF093140	tip associating protein (Tap)	117.9	P	100.9	P	89.3	P	163.9	P	158.4	P
	TCP										
AB022156	chaperonin containing TCP-1 beta subunit	44.8	A	44.6	P	25.7	A	63.4	M	50.6	P
Z31555	CCT (chaperonin containing TCP-1) epsilon subunit	407.5	P	416.4	P	263.5	P	534.2	P	606.8	P
Z31399	CCT eta subunit (chaperonin containing TCP-1)	358.4	P	364.8	P	288.3	P	406.4	P	662.2	P
Z37164	Cctq cytosolic chaperone containing TCP-1, theta subunit (CCTtheta)	107.2	P	101.1	P	55.5	P	119.8	P	153.6	P
Z31557	Cctz mRNA for CCT (chaperonin containing TCP-1) zeta subunit	16.1	A	14.3	A	5.9	A	5.8	A	12.6	A
AB022086	Cctz-2 gene for chaperonin containing TCP-1 zeta-2 subunit	11.2	A	13.4	A	3.3	A	20.6	A	15.6	A
Z35294	MTCP-1	146.6	P	108.2	P	103.8	P	158.5	P	169.5	P
Z35294	MTCP-1	77.6	P	103.3	P	87.9	P	145.7	P	158.6	P
U32332	p13MTCP1 (MTCP1)	19.6	P	11.2	A	4.9	A	8.4	A	6.0	A

M20130	t complex polypeptide 1 (Tcp-1-a)	80.8	P	80.3	P	43.9	A	83.8	P	96.2	P
D00851	Tcp-1 pseudogene for t-complex polypeptide 1	13.7	A	3.0	A	4.7	A	0.9	A	6.3	A
selectins											
M93428	endothelial ligand for L-selectin (GLYCAM1)	2.1	A	1.8	A	2.6	A	21.3	A	3.3	A
X84037	E-selectin ligand-1	252.2	P	214.3	P	184.6	P	340.4	P	311.5	P
M80778	Selectin, endothelial cell	0.9	A	5.5	A	0.9	A	2.2	A	1.6	A
M72332	Selectin, platelet	64.8	A	54.9	P	27.9	A	49.7	A	54.0	A
X91144	Selectin, platelet (p-selectin) ligand	555.1	P	576.0	P	425.4	P	613.6	P	686.1	P
integrins											
Y11460	b4 integrin interactor, partial	117.6	P	97.3	P	43.9	P	108.9	P	153.9	P
Y11460	b4 integrin interactor, partial	117.6	P	97.3	P	43.9	P	108.9	P	153.9	P
AF001871	guanine nucleotide exchange factor and integrin binding protein homolog GRP1	10.1	A	13.9	A	8.1	A	2.9	A	23.2	M
X75427	Integrin alpha 2 (Cd49b)	9.0	A	11.1	A	11.2	A	21.5	A	9.3	A
X53177	Integrin alpha 4 (Cd49d)	4.6	A	3.7	A	10.5	M	15.9	A	8.2	A
X53176	Integrin alpha 4 (Cd49d)	17.5	P	14.2	A	14.2	A	7.8	A	15.6	P
X79003	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	22.8	A	21.2	A	19.6	A	5.5	A	29.4	A
X69902	Integrin alpha 6	93.5	P	83.9	P	67.8	P	164.1	P	163.8	P
M60778	Integrin alpha L (Cd11a)	23.5	A	43.5	P	32.5	M	39.3	P	31.6	A
U14135	Integrin alpha V (Cd51)	8.9	A	4.0	A	0.9	A	22.4	A	11.1	A
AF041409	integrin alpha8	2.6	A	14.9	P	2.7	A	1.6	A	19.1	P
AF026509	integrin beta 3 subunit	0.8	A	2.3	A	10.8	A	35.0	A	14.0	A
L04678	Integrin beta 4	139.5	P	89.9	P	73.6	P	103.9	P	106.8	P
AF022110	integrin beta 5	284.7	P	238.7	P	181.4	P	251.6	P	364.3	P
M68903	Integrin beta 7	308.8	P	332.2	P	177.7	P	253.6	P	334.1	P
U94479	integrin binding protein kinase	377.4	P	362.3	P	239.0	P	401.5	P	551.8	P
L20232	Integrin binding sialoprotein	1.1	A	1.9	A	4.7	A	20.5	A	0.5	A
U12236	Integrin, alpha E, epithelial-associated	16.4	A	15.2	A	15.9	A	26.7	A	30.5	M
D13867	VLA-3 alpha subunit	29.9	A	22.2	P	12.6	A	26.2	A	35.4	A
X15202	fibronectin receptor beta-chain (VLA5-homolog.)	2641.5	P	2816.1	P	2482.8	P	3577.1	P	4308.0	P
X15202	fibronectin receptor beta-chain (VLA5-homolog.)	389.9	P	332.5	P	272.5	P	424.5	P	621.5	P
CAM											
M84487	Vascular cell adhesion molecule 1	381.0	P	276.8	P	237.1	P	311.6	P	442.2	P
U12884	vascular cell adhesion molecule-1 truncated form T-VCAM-1 (VCAM-1)	87.5	P	80.0	P	49.4	P	74.5	P	82.0	P
U12884	vascular cell adhesion molecule-1 truncated form	48.8	P	32.3	P	6.6	A	34.0	P	28.4	A

T-VCAM-1 (VCAM-1)											
D50434	MAdCAM-1	11.5	A	18.3	A	6.0	A	12.2	A	27.3	A
D50434	MAdCAM-1	7.0	A	18.1	A	19.6	A	10.6	A	7.8	A
AF001286	OCAM-GPI protein precursor	0.8	A	2.6	A	1.0	A	3.4	A	1.1	A
AF001287	OCAM-TM protein precursor	4.5	A	2.0	A	1.1	A	14.8	A	2.2	A
adhesion											
U91513	adhesion molecule ninjurin	38.9	A	32.6	A	23.9	A	28.8	A	41.5	A
AB021966	adhesion protein RA175C	146.4	P	130.7	P	115.9	P	211.4	P	253.0	P
L06039	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	14.4	A	6.0	A	6.9	A	36.4	A	6.5	A
X15050	Neural cell adhesion molecule	9.6	A	8.4	A	2.3	A	13.2	A	1.2	A
X15052	Neural cell adhesion molecule	7.9	A	22.4	P	20.9	M	42.2	M	55.3	P
L57509	Cell adhesion kinase	154.7	P	167.7	P	121.2	P	194.2	P	224.0	P
U89915	junctional adhesion molecule (Jam)	1077.7	P	1173.0	P	981.1	P	1344.6	P	1645.6	P
M90551	Intercellular adhesion molecule	365.9	P	305.1	P	212.2	P	362.7	P	467.2	P
M95408	Focal adhesion kinase	139.3	P	102.5	P	103.0	P	189.9	P	275.9	P
X65493	Intercellular adhesion molecule 2	699.1	P	480.8	P	408.1	P	670.5	P	599.4	P
U33958	Sperm adhesion molecule	7.3	A	10.8	A	3.1	A	16.8	A	6.9	A
X16645	glial cell adhesion molecule (AMOG)	1.5	A	9.9	A	6.1	A	7.5	A	2.5	A
AF026465	Putative neuronal cell adhesion molecule	18.8	A	9.5	A	8.0	A	43.9	P	33.3	A
AF026465	Putative neuronal cell adhesion molecule	47.8	A	36.9	A	40.8	A	92.0	A	65.4	A
X12875	L1 cell adhesion molecule	10.3	A	0.7	A	12.2	A	4.2	A	3.5	A
Z50147	cell adhesion regulator	8.0	A	4.0	A	2.1	A	4.8	A	5.5	A
caspases											
D28492	Caspase 2	151.9	P	130.0	P	103.3	P	136.3	P	181.9	P
U54803	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	28.4	A	16.5	P	20.6	A	5.9	A	21.4	P
Y13087	caspase-6	47.7	P	52.5	P	28.5	P	89.3	P	75.3	P
U67321	Caspase 7	17.7	A	28.3	A	16.2	A	6.5	A	32.1	A
AJ007749	caspase-8	33.7	P	39.9	P	28.9	P	45.3	P	46.6	P
AB019600	caspase9	16.0	A	4.8	A	28.9	A	32.9	A	37.7	A
AB019600	caspase9	29.4	A	37.2	P	24.9	P	30.7	A	47.0	P
AB019601	caspase9S	6.2	A	12.4	A	7.8	A	15.8	A	2.9	A
Y13089	caspase-11	30.6	P	29.9	P	17.3	P	46.3	P	38.0	P
Y13090	caspase-12	15.1	P	6.3	A	12.5	A	2.6	A	11.6	P
AF092997	caspase-14	23.3	P	6.5	A	2.7	A	19.4	A	8.9	A
CD antigens											
M63695	CD1d1 antigen	46.9	P	36.6	P	34.3	P	47.5	P	99.1	P
M63697	CD1d2 antigen	2.1	A	4.2	A	4.0	A	6.3	A	9.3	A
M63697	CD1d2 antigen	58.8	P	80.2	P	49.0	P	88.8	P	90.4	P
X06143	CD2 antigen	169.2	P	224.1	P	136.3	P	182.5	P	170.3	P
X02339	CD3 antigen, delta	65.6	P	85.4	P	48.4	P	86.1	P	83.1	P

	polypeptide										
M23376	CD3 antigen, epsilon polypeptide	168.0	P	161.5	P	102.2	P	132.0	P	170.4	P
M18228	CD3 antigen, gamma polypeptide	97.1	P	146.6	P	94.5	P	117.1	P	121.6	P
J04967	CD3 antigen, zeta polypeptide	56.0	P	35.1	P	26.9	P	39.6	P	38.3	P
L03353	CD3-theta T-cell receptor subunit	0.9	A	12.3	A	9.6	A	4.2	A	3.1	A
M17080	CD4 (L3T4) T-cell differentiation antigen	18.8	A	6.1	A	29.5	A	37.1	A	23.8	A
M15177	CD5 antigen	39.8	P	39.9	P	29.4	P	32.3	A	52.1	M
U37543	CD6 antigen	63.0	P	39.0	P	25.4	P	53.0	P	72.6	P
U12434	CD6 antigen	19.9	A	60.1	A	34.7	A	43.6	A	23.2	A
D31956	CD7 antigen	40.2	M	35.9	P	34.1	A	57.6	P	52.3	A
U34881	CD8 antigen, alpha chain	97.6	P	101.0	P	53.4	M	112.7	P	66.5	P
U76371	CD8 beta opposite strand	4.1	A	15.6	A	6.9	A	15.4	A	6.0	A
U76372	CD8 beta opposite strand	7.8	A	14.7	A	7.0	A	2.9	A	5.5	A
X07698	CD8 molecule Ly-3 chain	35.3	P	39.6	P	31.7	P	75.6	P	73.9	P
L08115	CD9 antigen	922.3	P	652.2	P	619.5	P	1033.6	P	1365.6	P
M60778	CD11a Integrin alpha L	23.5	A	43.5	P	32.5	M	39.3	P	31.6	A
X13333	CD14 antigen	479.0	P	440.9	P	421.6	P	559.3	P	622.8	P
M28240	CD19 antigen	133.2	P	115.2	P	121.7	P	160.8	P	250.5	P
M62541	CD20 antigen	65.6	P	53.2	P	80.8	P	94.3	P	177.1	P
L02844	CD22 antigen	40.3	A	38.8	A	39.1	A	64.9	P	103.5	P
M58661	CD24a antigen	1657.0	P	1271.5	P	1418.6	P	2061.5	P	2556.3	P
M34563	CD28 glycoprotein	40.3	P	48.5	P	24.8	P	62.8	P	45.0	P
AF059615	CD30 gene	1.3	A	2.3	A	2.1	A	3.3	A	1.5	A
L23108	CD36 antigen	109.8	P	93.0	P	88.6	P	145.7	P	165.1	P
U18372	CD37 antigen	119.0	P	134.9	P	125.4	P	180.9	P	208.2	P
L11332	CD38 antigen	49.9	P	35.0	A	12.9	A	11.2	A	44.7	A
AF037366	CD39 antigen	119.8	P	93.9	P	64.3	P	137.9	P	162.5	P
U91511	CD39 antigen-like 1	75.1	A	61.0	A	52.3	A	42.9	A	101.7	A
U57611	CD44 antigen	1.6	A	2.8	A	0.2	A	1.9	A	5.1	A
X66084	CD44 antigen	21.9	A	16.7	A	27.9	P	2.8	A	7.7	A
U57611	CD44 antigen	1.0	A	1.1	A	2.4	A	0.5	A	6.3	A
AB012693	CD47	1331.8	P	1215.3	P	1140.9	P	1687.4	P	2224.9	P
X75427	CD49b Integrin alpha 2	9.0	A	11.1	A	11.2	A	21.5	A	9.3	A
X53176	CD49b Integrin alpha 4	17.5	P	14.2	A	14.2	A	7.8	A	15.6	P
X53177	CD49b Integrin alpha 4	4.6	A	3.7	A	10.5	M	15.9	A	8.2	A
U14135	CD51 Integrin alpha V	8.9	A	4.0	A	0.9	A	22.4	A	11.1	A
X97227	CD53 cell surface glycoprotein	261.0	P	501.9	P	221.4	P	333.1	P	516.6	P
U60473	CD59 antigen	179.7	P	183.6	P	166.9	P	185.6	P	303.9	P
D16432	Cd63 antigen	273.9	P	243.2	P	195.1	P	383.5	P	443.0	P
X68273	CD68 antigen	91.4	P	85.0	P	68.2	P	127.4	P	118.6	P
J04170	CD72 antigen	32.4	P	45.6	P	34.8	P	62.0	P	45.7	P
L12059	CD73 ecto-5-nucleotidase	8.6	A	12.6	A	2.3	A	12.1	A	8.9	A
L12589	CD80 antigen	0.5	A	6.4	A	1.9	A	9.1	A	3.8	A
D16220	CD80 antigen	6.4	A	13.5	A	12.6	A	21.8	A	9.1	A
M55561	CD80 antigen	712.8	P	822.9	P	419.9	P	750.3	P	879.5	P

D14883	CD82 antigen	199.5	P	199.5	P	152.9	P	203.1	P	331.3	P
AF001036	CD83 antigen	5.1	A	17.0	A	3.0	A	22.5	A	35.1	A
L25606	CD86 antigen	2.2	A	1.9	A	1.1	A	3.1	A	1.1	A
U39456	CD86 antigen	19.0	A	4.0	A	7.5	A	10.2	A	28.7	A
Y18365	CD97 antigen	27.8	A	2.8	A	13.9	A	23.1	A	23.9	A
AB017189	CD98 light chain/4F2	128.7	P	78.0	P	71.6	P	99.5	P	138.2	P
AF033620	CD151 antigen	466.8	P	468.5	P	354.4	P	549.0	P	742.8	P
D89290	CD151 antigen	1.3	A	1.9	A	0.7	A	2.5	A	0.8	A
D89290	CD151 antigen	457.3	P	468.6	P	296.5	P	462.3	P	756.0	P
CTLA											
X15591	CTLA-2 alpha Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	768.3	P	682.9	P	506.5	P	1111.0	P	1375.0	P
X15592	CTLA-2 beta Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	107.9	P	127.3	P	85.4	P	94.7	P	181.5	P
X05719	CTLA-4 immunoglobulin superfamily member	14.8	P	17.2	P	11.5	A	18.9	A	17.2	A
Rho (GTPase)											
U58513	Rho-associated, coiled-coil forming protein kinase p160 ROCK-2	54.7	P	56.1	P	52.7	P	63.8	P	101.7	P
U58512	Rho-associated, coiled-coil forming protein kinase p160 ROCK-1	33.9	P	35.3	P	30.6	P	63.0	P	67.9	P
AF014371	Rho family GTPase (ArhA)	16.5	A	29.1	P	14.4	A	18.6	A	53.6	M
X99963	rhoB	732.7	P	632.0	P	684.7	P	965.4	P	1436.8	P
X80638	rhoC	190.9	P	151.7	P	103.1	P	179.1	P	284.4	P
AJ010045	Rho guanine nucleotide-exchange factor	24.4	P	35.2	P	11.8	P	53.4	P	50.5	P
U39904	citron, putative rho/rac effector	7.4	A	3.5	A	3.0	A	5.7	A	6.7	A
AF086824	rho/rac-interacting citron kinase (Crik)	3.3	A	1.0	A	0.7	A	12.7	A	12.4	A
U73199	Rho-guanine nucleotide exchange factor	60.6	P	61.2	P	37.5	A	57.9	P	102.4	P
AF016482	rho7 (rho7)	8.6	A	3.5	A	7.1	A	24.2	A	11.6	A
U73198	Rho-GDI2 guanine nucleotide dissociation inhibitor	39.9	P	28.5	P	30.1	P	47.7	P	49.3	P
D89821	RhoM	67.2	A	63.7	P	52.6	A	102.9	P	79.8	M

10 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Menschen danken, ohne deren direkte oder indirekte Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Georg Enders für seine stets bereitwillige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit. Er hatte stets ein offenes Ohr für die großen und kleinen Probleme, die sich alltäglich bei der Durchführung einer solchen Arbeit präsentieren.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Baethmann und in der Fortsetzung bei Herrn Prof. Pohl für die freundliche Aufnahme ans Institut bedanken.

Ein weiterer Dank gebührt dem Förderprogramm Forschung und Lehre der LMU unter Leitung von Prof. Heesemann für die Mitfinanzierung der Studien.

Ein grosses Dankeschön möchte ich an Frau Bärbel Lorenz und Claudia Fahney richten, die mir mit ihrer grossen Erfahrung in den Momenten experimenteller Schwierigkeiten stets hilfsbereit zur Seite standen.

11 Lebenslauf

Name : Birgit Lieske
Anschrift : Löwensteiner Str. 71
70437 Stuttgart
Geburtsdatum : 01.03.1978
Geburtsort : Stuttgart - Bad Cannstatt
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit : Deutsch

Schule

1984 – 1988 Grundschule, Stuttgart
1988 – 1997 Gymnasium, Stuttgart
Juni 1997 Abitur

Studium

WS 97/98 Universität Strasbourg, Französisch
SS 98 – WS 99/00 Studium der VWL, Universität zu Köln
SS 00 – WS 06/07 Studium der Humanmedizin, LMU München
01/2003 – 2006 Promotion am Institut für Chirurgische Forschung der LMU München
02 - 11/2007 Assistenzärztin am Klinikum Mannheim, Chirurgie