
**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Großhadern
der Universität München
Direktor: Professor Dr. K.-W. Jauch**

**Untersuchungen zu Effektormechanismen tumorspezifischer T-Zellen aus
Tumorvakzin drainierenden Lymphknoten**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München**

**vorgelegt von
Jürgen Schmidt
aus Augsburg**

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. R. Hatz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Enders
Prof.. Dr. T. Haferlach

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. H. Winter

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09. 06. 2005

Erklärung:

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Doktorschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und dass die Doktorschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Neusäß, den 25.03.2005

Jürgen Schmidt

Die in dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden an der Klinischen Forschung Chirurgie der Universität München, Großhadern von mir eigenständig durchgeführt und ausgewertet.

Daten der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Rahmen vorgestellt und publiziert:

1. Doktorandenkolloquium der Klinischen Forschung Chirurgie, Klinikum Großhadern, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-W. Jauch, am 02.06.2003.
2. Schmidt J., Hu H-M, Hatz RA, Fox BA, Schildberg FW, v.d. Engel N., Winter H. Die Chemokine RANTES, KC und MCP-1 spielen eine mögliche Rolle bei T-zellvermittelter Tumorregression. 5-5-2003. 120. Kongress: Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, München.
3. Winter H., Schmidt J., v.d. Engel N., Schildberg FW, Hatz RA, Hu H-M, Fox BA. Dissecting the mechanisms of T-cell mediated tumor regression- A novel role for T-cell tumor interactions in the regulation of chemokines. 4-7-2002. Tegernsee Conference.
4. Schmidt J., Hu H-M, Otahal C., Hatz RA, Schildberg FW, Fox BA, Winter H. Apoptosis inhibitors expressed in murine melanoma may explain the resistance to TNF-receptor ligands. 4-6-2002. Strategies for Immune Therapy -Würzburg.
5. Winter H., Hu H-M, Schmidt J., v.d. Engel N., Otahal C., Hatz RA, Schildberg FW, Fox BA. Apoptosis inhibitors may explain the resistance of B16BL6 to immune mediated apoptosis. 8-4-2002. AACR American Association of Cancer Research.
6. Winter H., Schmidt J., Otahal C., Hu H-M, Hatz RA, Schildberg FW, Fox BA. 2001. Apoptosis inhibitors may explain the resistance of B16BL6 to immune mediated apoptosis (abstract). Immunology .54, Suppl.1, 12/2001 35.

Diese Arbeit widme ich mit Dank für die Unterstützung während meines Werdeganges
meinem Vater Werner Schmidt, meiner Mutter Margit Schmidt
und meinem Bruder Robert Schmidt

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1 <u>Einleitung</u>	1
2 <u>Material und Methoden</u>	10
2.1 Zellkultur.....	10
2.1.1 Tumorzelllinien	
2.1.2 Zellkulturbedingungen	
2.1.3 Substanzen zur Zellinkubation	
2.1.4 Herstellung von LT- α	
2.1.5 Gewinnung tumorspezifischer Effektor T-Zellen aus TVDLK	
2.2 Durchflusszytometrie.....	15
2.2.1 Grundzüge des Messverfahrens	
2.2.2 Nachweis von Apoptose	
2.2.3 Statistische Auswertung der Apoptoseversuche	
2.2.4 Detektion von Strukturen der Zelloberfläche	
2.2.5 Detektion intrazellulärer Apoptoseinhibitionsproteine	
2.3 mRNA-Nachweis mittels RT-PCR.....	23
2.3.1 Grundlagen des Messverfahrens	
2.3.2 mRNA-Gewinnung und Aufbereitung	
2.3.3 cDNA-Synthese	
2.3.4 PCR-Bedingungen	
2.3.5 Gelelektrophorese der PCR-Produkte	
2.3.6 Primersequenzen	
2.3.7 Kontrollen	
2.3.7.1 Housekeeping-Gen	
2.3.7.2 PCR-Kontrolle	
2.4 ELISA.....	28
2.4.1 Prinzip der Messmethode	
2.4.2 Gewinnung der Proben/Proteine (KC, MCP-1 und RANTES)	
2.4.3 Antikörper, Reagenzien und Bedingungen	
2.5 Chemotaxis-Assay.....	31

3 Ergebnisse	33
3.1 Expression der TNF-Rezeptoren I, II und Fas (Apo 95).....	33
3.2 MHC-Expression.....	35
3.2.1 MHC I-Expression	
3.2.2 MHC II-Expression	
3.3 Zytokininduzierte Apoptose.....	37
3.3.1 Experimentelle Ermittlung geeigneter Inkubationsbedingungen	
3.3.1.1 TNF- α	
3.3.1.2 LT- α	
3.3.1.3 Festlegung der Zytokindosen und Inkubationszeiträume	
3.3.1.4 IFN- γ /CHX Kontrollgruppen	
3.4 Messung der Apoptose nach Inkubation von FasAb, LT- α , TNF- α , IFN- γ , CHX und deren Kombinationen.....	40
3.4.1 Apoptoseraten der einzelnen Zytokine	
3.4.2 Apoptoseraten der Zytokine in Kombination	
3.5 Nachweis intrazellulärer Apoptoseinhibitionsproteine.....	43
3.5.1 mRNA Nachweis	
3.5.2 Proteinnachweis	
3.5.2.1 c-IAP I-Expression	
3.5.2.2 c-IAP II-Expression	
3.5.2.3 Survivin-Expression	
3.6 Untersuchung der Chemokinexpression von T _E und D5.....	46
3.6.1 Chemokinexpression in T _E	
3.6.1.1 Nachweis der tumorspezifischen Reaktion von T _E	
3.6.1.2 mRNA-Expression von Chemokinen	
3.6.1.3 Chemokinnachweis	
3.6.1.3.1 KC und MCP-1	
3.6.1.3.2 RANTES	
3.6.2 Chemokinexpression in D5	
3.6.2.1 mRNA-Nachweis	
3.6.2.2 Proteinnachweis	

3.6.3 Chemokin (-mRNA-) Expression in D5 nach Interaktion mit T_E

	Seite
3.7 Nachweis der Chemotaxis.....	57
4 <u>Diskussion</u>	59
5 <u>Zusammenfassung</u>	70
6 <u>Abkürzungsverzeichnis</u>	72
7 <u>Literaturverzeichnis</u>	75
8 <u>Lebenslauf</u>	96
9 <u>Danksagung</u>	97

1 Einleitung

Sowohl in tierexperimentellen Studien, als auch im Rahmen klinischer Studien konnte nachgewiesen werden, dass solide Tumore durch den Transfer tumorspezifischer T-Zellen aus Tumorstellen drainierenden Lymphknoten (TVDLK) erfolgreich behandelt werden können. Chang et al. konnten bereits 1993 die spezifische Lyse von humanen Nierenkarzinom- und Melanomzellen durch autologe Zellen aus TVDLK beobachten (Chang et al. 1993). In einer klinischen Studie zeigte sich nach dem Transfer tumorspezifischer T-Zellen, welche mit IL-2 stimuliert und zusätzlich mit anti-CD3 aktiviert wurden, eine komplette Regression fortgeschrittener Nierenzellkarzinome in zwei von zwölf behandelten Patienten. Bei weiteren zwei Patienten kam es nach der Therapie zu einer partiellen Tumorregression (Chang et al. 1997). Lange wurde angenommen, dass direkte, zellabhängige Zytotoxizität den Hauptmechanismus T-zellvermittelter Tumorregression darstellt (Kagi et al. 1996). Zur zytotoxischen Elimination ist die direkte Interaktion zwischen CD8⁺ T-Zelle und Tumorzelle von entscheidender Bedeutung. Dabei bindet die CD8⁺ T-Zelle mit ihrem T-Zellrezeptor an Antigenpeptide, welche von MHC I-Molekülen der Tumorzelle präsentiert werden. Nach Bindung an die MHC I-Moleküle verfügen die CD8⁺ T-Zellen über verschiedene Mechanismen, mit welchen sie Tumorzellen attackieren können. Sie setzen präformierte Vesikel aus dem Zytosol frei, in welchen Perforin und Granzyme-B gespeichert sind und können dadurch direkt in der Zielzelle den programmierten Zelltod, Apoptose, induzieren (Kagi et al. 1994a; Kagi et al. 1994b). Perforin, das antigenabhängig von CD8⁺ Zellen freigesetzt wird, führt zur Bildung von Poren in der Zielzellmembran, durch welche u.a. Granzyme-B in die Zelle sowie in den Nukleus gelangt (Kagi et al. 1994a; Kagi et al. 1994b; Lowin et al. 1994). Granzyme-B induziert Apoptose in der Zielzelle (Lowin et al. 1994; Shresta et al. 1999; Mullbacher et al. 1999). Es wird durch Proteinase-9 geblockt, wodurch T-Zellen vor Selbstdestruktion geschützt werden (Sun et al. 1996; Bird et al. 1998). Granzyme-B vermag sowohl kaspaseunabhängig (Sarin et al. 1997; Sarin et al. 1998; Thomas et al. 2000) als auch über mitochondriale Signalkaskaden Apoptose zu induzieren (Abb. 1), (Duan et al. 1996; Masztalerz et al. 2003; Quan et al. 1996; Medema et al. 1997; Talanian et al. 1997; Andrade et al. 1998).

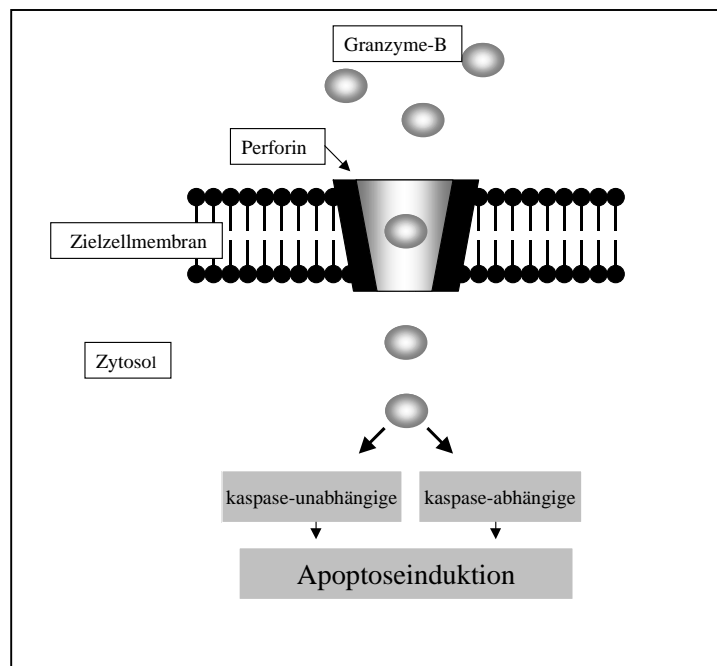


Abb. 1: Transmembranes Vordringen von Granzyme-B in das Zytosol mittels Perforin

Im Rahmen der Apoptoseinduktion werden in der Zelle DNAsen aktiviert, welche in den Zellkern eindringen und dort die DNA fragmentieren. Die Zelle zerfällt anschließend in viele kleine zellmembranumhüllte Teile (apoptotic bodies). Obwohl einige Studien zeigen konnten, dass Zellen Granzyme-B direkt binden und internalisieren können, ist Perforin unabdingbar für die Aufnahme von Granzyme-B in das Zytosol sowie für die weitere Translokation in den Zellkern (Froelich et al. 1996; Pinkoski et al. 2000).

T-Zellen sezernieren auch proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , welchem bei der Tumorregression eine Bedeutung beigemessen wird (Hu et al. 1998; Winter et al. 2001). Zudem exprimieren T-Zellen tumorspezifisch Liganden der TNF-Familie wie FasL, LT- α , LT- β , TRAIL, LIGHT und TNF- α , welche in einer Vielzahl von Tumorzelllinien Apoptose induzieren können. Die Mitglieder der TNF-Superfamilie und ihre Rezeptoren sind in Abb. 2 aufgeführt. Mit Ausnahme von LT- α zählen diese zu den Typ-II Membranproteinen, welche Homologien zu TNF- α im extrazellulären C-terminalen Bereich aufweisen. TNF- α und LT- α sind als Trimer biologisch aktiv (Eck and Sprang 1989; Jones et al. 1989; Karpusas et al. 1995). Die apoptoseinduzierenden Liganden binden an spezifischen Rezeptoren, welche nach

Aktivierung durch Kopplung an intrazelluläre „Death Domains“ über eine nachgeschaltete Kaspasekaskade Apoptose in der Zielzelle induzieren (Strasser et al. 2000).

Mit Hilfe von Gen-knock-out (k/o) Mäusen konnte gezeigt werden, dass T-zellvermittelte Tumorregression weder von FasL noch von Perforin abhängen. FasL und Perforin abhängige Zytotoxizität galten bislang als Haupt-Effektormechanismen CD8⁺ MHC Klasse I restringierter T-Zellen (Kagi et al. 1996; Kagi et al. 1994a; Kagi et al. 1994b).

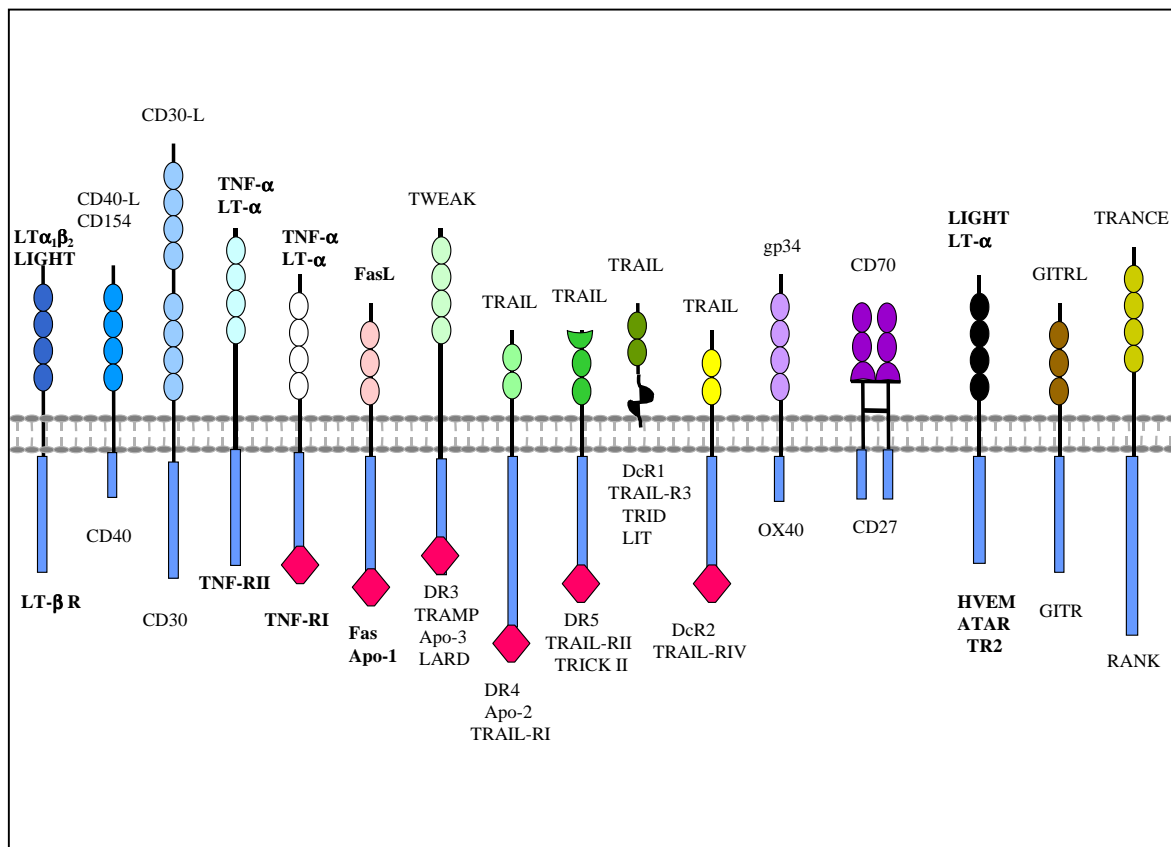
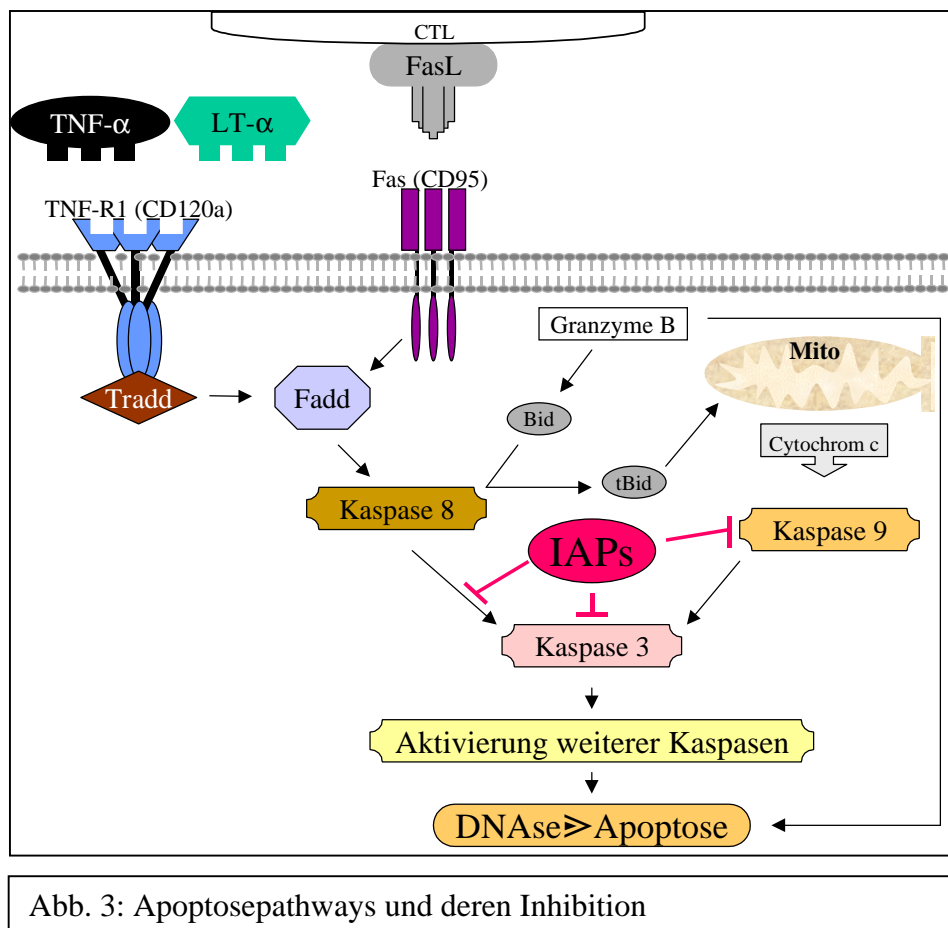


Abb. 2: Rezeptoren für Liganden/Zytokine der TNF-Familie

Bei der TNF-rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion spielen drei funktionelle Molekülgruppen eine entscheidende Rolle (Abb. 3):

- I. Die TNF-Rezeptoren (TNF-R I/ II, Fas, DR4/5, LT- β -R),
- II. die Kaspasen, welche sowohl Initiatoren als auch Exekutoren der Apoptose sind (v.a. Kaspase 9/8/7/6/3),
- III. die Apoptoseinhibitionsproteine (IAPs)



Der Hauptweg der Apoptoseinduktion verläuft über die Aktivierung des “Fas-associated death domain adaptor protein“ (FADD) mit anschließender Aktivierung der Kaspase-8 (Ashkenazi and Dixit 1998; Strasser et al. 2000), welche direkt und indirekt Kaspase-3 sowie weitere

Kaspasen aktiviert, welche die Endstrecke der Apoptosekaskade bilden (Muzio et al. 1998; Bodmer et al. 2000; Kischkel et al. 2000; Kuang et al. 2000; Sprick et al. 2000).

Die Gegenspieler dieser Enzyme sind Proteine, welche die Zelle vor dem Zelltod bewahren. Diese sind vor allem in embryonalem Gewebe sowie in Tumorzellen zu finden und werden Inhibitors of Apoptosis (IAPs) genannt. Die IAP-Proteinfamilie ist charakterisiert durch eine Domäne mit ca. 70 Aminosäuren, die als "baculoviral IAP repeat" (BIR) bezeichnet werden (Deveraux and Reed 1999; Miller 1999). Bislang konnten sechs IAP verwandte Proteine im Menschen identifiziert werden: NAIP, c-IAP I/HIAP-2, c-IAP II/HIAP-1, XIAP/hILP, Survivin und Bruce. Durch Überexpression von XIAP, c-IAP I, c-IAP II, NAIP und Survivin kann eine Apoptoseinduktion verhindert werden. Survivin wird stark in humanen Karzinomen und in embryonalem, nicht jedoch im normal differenzierten Gewebe exprimiert (Ambrosini et al. 1997). XIAP, c-IAP I, c-IAP II und Survivin hemmen Kaspase 3, 7 und 9 (Tamm et al. 1998; Deveraux and Reed 1999; Deveraux et al. 1998; Roy et al. 1997). In humanen Melanomen wurde kürzlich ML-IAP nachgewiesen, welches durch Chemotherapeutika und Aktivierung von „Death Rezeptoren“ induziert wird und als direkter Inhibitor der Kaspasekaskade fungiert (Vucic et al. 2000).

Neben direkten apoptoseinduzierenden Mechanismen spielen möglicherweise auch Makrophagen eine Rolle bei der T-zellvermittelten Tumorregression. Bei vielen Tumoren ist *in vivo* eine Infiltration von Makrophagen zu beobachten (Allen and Hogg 1985; Horny and Horst 1987; Horny and Horst 1986; Brocker et al. 1987; Evans 1972). Fidler et al. konnten eine wachstumshemmende Wirkung adoptiv transferierter, *in vitro* aktivierter Makrophagen auf Tumormetastasen nachweisen (Fidler 1974). In Analogie zu Typ-1/2 polarisierten Lymphozyten konnten Typ-1 und Typ-2 polarisierte Makrophagen (M1/M2) identifiziert werden, welche sich durch die Expression ihrer Rezeptoren, Effektor-Funktionen und Chemokin-/Zytokin-Expressionsmuster voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zu spontan tumorinfiltrierenden M2 Makrophagen, welche IL-10 und den IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) exprimieren und mit Tumorprogression korrelieren, wurden M1 Makrophagen identifiziert, welche sowohl direkt durch Sekretion zytotoxischer Moleküle wie NO (Nitric Oxide), Sauerstoffradikale (ROI, reactive oxygen intermediates) und TNF- α als auch indirekt durch Sekretion der CXC-Chemokine IP-10 und Mig das Tumorwachstum hemmen können (Mantovani et al. 2002). Die Chemokine IP-10 und Mig sind spezifisch chemotaktisch für Typ-1 polarisierte Lymphozyten und wirken zudem antiangiogenetisch (Mantovani et al. 2002). Diese Beobachtungen legen nahe, dass adoptiv transferierte T-Zellen tumorspezifisch

eine entzündliche Immunantwort induzieren und regulieren, welche die gezielte Rekrutierung von Makrophagen zu den Metastasen bewirkt sowie die spezifische Aktivierung dieser Zellen vermittelt. Eine solche integrierende Funktion könnte durch Chemokine vermittelt werden, welche im Gegensatz zu Zytokinen sowohl chemotaktisch als auch immunregulatorisch auf Leukozyten wirken. Chemokine sind kleine Polypeptid-Signal-Moleküle (8-14 kDa), welche durch spezifische Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ihre biologische Aktivität ausüben. Sie können von einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems sowie u.a. von Tumoren spezifisch gebildet und sezerniert werden (Vicari and Caux 2002; Murphy 2001; Balkwill 2003). Sie werden in Abhängigkeit der Position und Anzahl ihrer konservierten n-terminalen Cystein Aminosäuren in CXC, CX₃C, CC und C Chemokine unterteilt. Interessanterweise werden die CC-Chemokine MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α), MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β), MCP-1 (macrophage chemotactic protein-1) und RANTES (regulated upon activation, normally T-cell expressed and secreted) sowie die CXC Chemokine IP-10 (interferon inducible protein 10), KC (Keratinocyten Chemokin) und Mig (monokine induced by interferon- γ) mit einer Typ-1 Immunantwort korreliert (Gerber et al. 1997; D'Ambrosio et al. 1998; Sallusto et al. 1997; Zingoni et al. 1998; Bonocchi et al. 1998; Wood et al. 1997; Hardy et al. 2001). Luther et al. konnten zeigen, dass diese Chemokine die Differenzierung von T-Zellen in Richtung eines Typ-1 Phänotyps beeinflussen und die Expression und Sekretion von Typ-1 Zytokinen (IFN- γ) induzieren (Luther and Cyster 2001). Die gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkungen der Zytokine und Chemokine sind wichtig bei der immuntherapeutischen Behandlung bösartiger Erkrankungen.

Einer der Pioniere auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumoren war Ende des 19. Jahrhunderts der amerikanische Chirurg William B. Coley (1862-1936). Seine Untersuchungen gaben erste Hinweise auf die Bedeutung des Immunsystems bei der Tumorregression. Er infizierte Tumorpatienten mit lebenden Krankheitserregern unter der Vorstellung, dass die hervorgerufene unspezifische Immunantwort auch neoplastische Zellen eliminieren könnte. Mit diesem Verfahren, so wird berichtet, konnte Coley einige komplette Remissionen herbeiführen (Coley N. 1976).

Ein Jahrhundert nach Coleys Versuchen gelang es Rosenberg et al. T-Zellen aus Mäusen zu gewinnen, die sich in unmittelbarer Nähe zum Tumor aufhielten. Er isolierte Tumorinfiltrierende Killer-T-Zellen (TIL) aus Metastasen. Diese Zellen der spezifischen Immunantwort zeigten nach Expansion mit Interleukin-2 im Gegensatz zu unexpandierten TIL eine Expression der Zytokine TNF- α und LT- α . Expandierte TIL waren im Tiermodell

erfolgreich bei der Vermittlung von Tumorregression (Rosenberg et al. 1986; Spiess et al. 1987).

Yoshizawa et al. zeigten, dass T-Zellen aus TVDLK eine hohe tumorlytische Aktivität *in vitro* nach Coinkubation mit dem als Vakzin verwendeten Tumor entwickeln. T-Zellen aus TVDLK, welche in Abwesenheit des Tumors mit anti-CD3 stimuliert wurden, wiesen ebenso eine Spezifität für das verwendete Tumorstoff auf und waren in der Lage *in vivo* Tumorregression herbeizuführen (Yoshizawa et al. 1991).

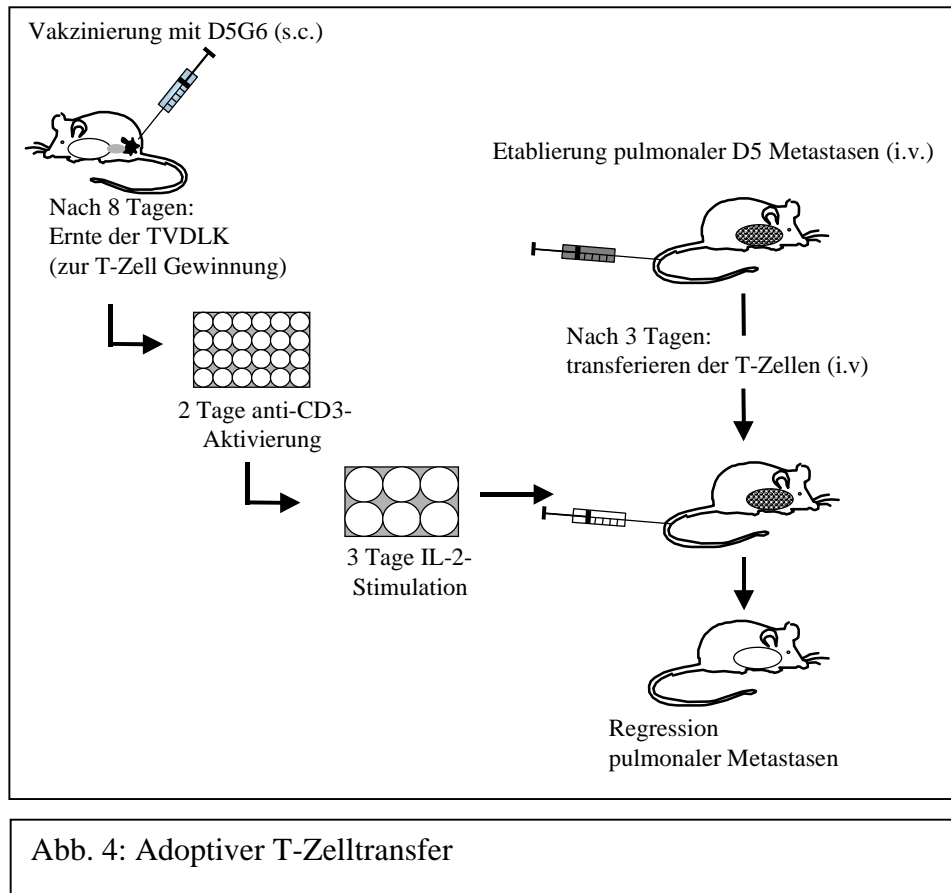
Ein entscheidender Durchbruch bei der Behandlung menschlicher Melanome gelang im Jahre 2002 Dudley et al. (Dudley et al. 2002). Sie entnahmen TIL und expandierten daraus die gewonnenen T-Zellen *in vitro*. Anschließend wurden die tumorreaktiven T-Zellen in Patienten infundiert, welche zuvor eine non-myeloablative chemotherapeutische Konditionierung erhielten. Durch dieses Vorgehen in Verbindung mit einer Hochdosis-Therapie mit IL-2 konnte eine persistierende Repopulation von funktionell aktiven T-Zellen gegen das Melanozytendifferenzierungs-Antigen MART-1 in den Patienten erreicht werden. Diese Zellen proliferierten *in vivo* und migrierten in die Tumorregionen. Mit dieser Behandlung konnte eine Tumorregression in Patienten mit fortgeschrittenen, metastasierten Melanomen nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen, welche nach autologem T-Zelltransfer zur Tumorregression führen, sind aber bis heute ungeklärt.

In Tierexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass Effektor T-Zellen aus Wildtyp (wt)- aber auch aus Perforin knock-out (k/o) (PKO), FasL-Mutanten (*gld*), IFN- γ k/o (GKO)- und PKO/GKO Doppel-k/o (PIG)-Mäusen Tiere mit systemischem Tumor heilen können. Deshalb muss angenommen werden, dass weitere Faktoren, als die der direkten zytokinabhängigen Apoptoseinduktion existieren, welche zur T-zellvermittelten Tumorregression führen (Winter et al. 1999; Winter et al. 2001; Poehlein et al. 2003).

Die Klärung dieser Mechanismen hat entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung neuer effektiver tumorimmunologischer Behandlungskonzepte.

Um diese Mechanismen genauer untersuchen zu können, zogen wir ein geeignetes murines Melanommodell heran, welches erstmals von Arca et al. etabliert wurde (Arca et al. 1996). Dabei werden zur Gewinnung tumorspezifischer T-Zellen Mäuse subkutan mit syngenem, GM-CSF-transduzierten Melanomzellen (D5G6) beimpft. Acht Tage später werden die T-Zellen aus den Tumorstoff drainierende Lymphknoten (TVDLK) geerntet. Nach Stimulation mit anti-CD3 und Expansion mit IL-2 sind diese tumorspezifischen Effektor T-

Zellen (T_E) in der Lage Mäuse mit etablierten pulmonalen Melanommetastasen zu heilen (Abb. 4).



Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es anhand des Melanommodells B16BL6-D5 zu untersuchen, ob eine direkte Interaktion der T_E mit den Tumorzellen nötig ist, um eine Tumorregression zu erreichen oder ob durch transferierte T_E eine Stimulation weiterer (Immun-) Zellen *in vivo* erfolgt, welche dann in der Lage sind Metastasen erfolgreich zu eliminieren.

Im Speziellen soll geprüft werden, ob

- I. die Liganden der TNF-Familie FasL, LT- α und TNF- α in D5 Apoptose induzieren.
- II. tumorspezifische T-Zellen tumorspezifisch Chemokine sezernieren, welche chemotaktisch auf Makrophagen wirken (Abb. 5).

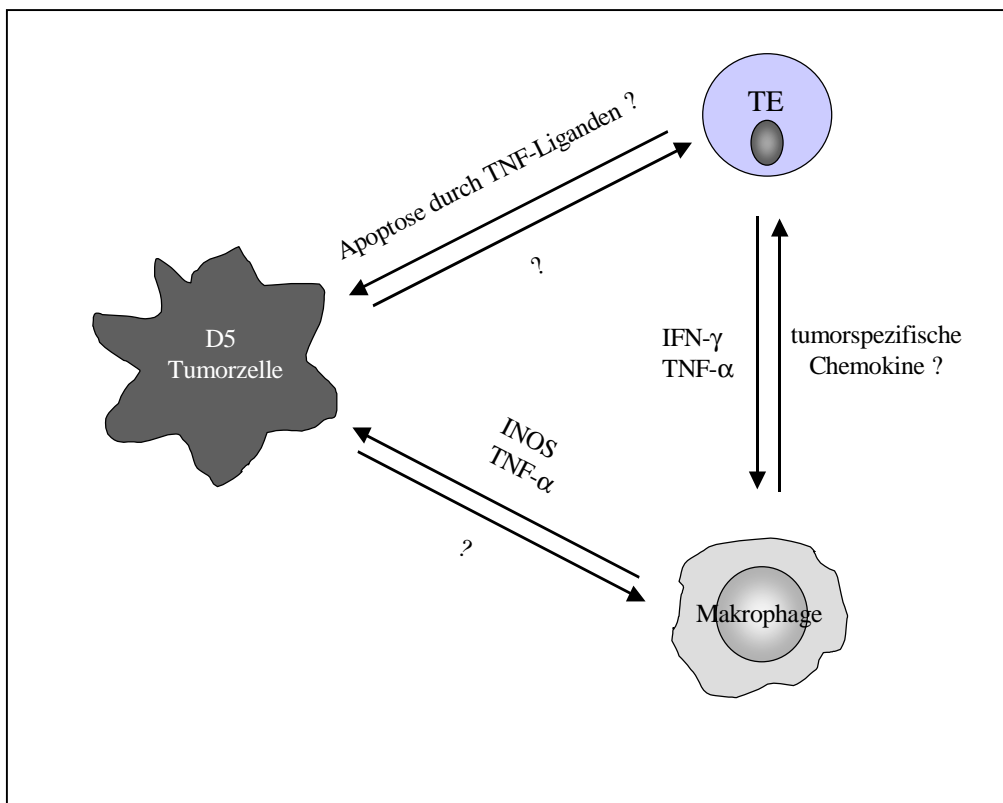


Abb. 5: Modell der zur Tumorregression führenden Interaktion zwischen D5-Tumorzelle, T_E und Makrophagen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Tumorzelllinien

D5 ist ein schwach immunogener Subklon der Tumorzelllinie B16BL6, eines spontan in einer C57BL/6J (wt) Maus entstandenen Melanoms (Hu et al. 1998). D5G6 ist ein Subklon von D5, welcher stabil mit einem murinen retroviralen GM-CSF-MFG-Vektor transduziert wurde. 10^6 D5G6 Zellen sezernieren ca. 200 ng/ml GM-CSF in 24 Stunden (Dr. M. Arca Univ. of Michigan, Ann Arbor, MI), (Arca et al. 1996; Winter et al. 2001). MCA-310 ist ein gering immunogenes methylcholanthren-induziertes Sarkom, welches in einer C57BL/6 Maus generiert wurde (Prof. B. Fox, Earle A. Chiles Research Institute, Portland, OR), (Winter et al. 1999). Die von uns verwendeten Zelllinien waren frei von Mycoplasmen, was im Institut für Chirurgische Forschung (Prof. Enders, LMU München) mittels RT-PCR nachgewiesen wurde.

2.1.2 Zellkulturbedingungen

Um eine sterile Zellkultur unter gleichbleibenden Bedingungen betreiben zu können, standen folgende Geräte, Materialien und Lösungen (Tabellen 1-3) zur Verfügung:

Tabelle 1: Geräte

Geräteart:	Herkunft/Firma:	Bemerkung/ Einstellung:
Brutschrank	US-AUTO-Flow [®] , NuAir, Plymouth, Minnesota, USA	37 °C/ 5% CO ₂ , mit internem Wasserbad *
Arbeitsbank	Gelaire [®] , BSB 6A, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim	
Mikroskop	IDO 3, Zeiss	
Zentrifuge	Rotixa/ PR, Hettich, Tuttlingen	1200 U/min (350 x g, fünf Minuten lang)
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg	10 000 U/min (= 10 000 x g)
Vortexgerät	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz	
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf	
Handpipetten 10µl, 100µl und 1000µl	Eppendorf	
Waagen, geeicht	Balance FX-40, A&D Elektronik, Frankfurt am Main und PL 1200, Mettler, Giessen	

* internes Wasserbad: gefüllt mit Aqua dest. (Fresenius, Bad Homburg) und Sigmaclean[®] (water bath treatment, Sigma, Steinheim)

Tabelle 2: Zellkulturmaterialien

Materialart:	Herkunft
50ml Zentrifugiergefäße	Blue Max [™] , Falcon, BD, Heidelberg
15ml Zentrifugiergefäße	TPP, Trasadingen, Schweiz
sterile Pipettenspitzen (5ml, 10ml, 25ml)	Costar [®] , Corning, NY, USA
sterile Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Rainin, Leiden, Niederlande
Kulturflaschen	Nunclon [™] Surface, Nunc [™] , Wiesbaden
Gewebekulturplatten (6-, 24-, 96 -Well)	Nunclon [™] Surface, Nunc [™] , Wiesbaden
Cryovials	Simport, Quebec, CA
Rundbodenröhrchen für FACS-Analyse	Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, Frankreich
Zellscraper	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 3: Medien, Puffer, Lösungen

Medien/Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung/ Bezeichnung	Herkunft
Nährmedium (CM) der Tumorzelllinien	RPMI 1640 : + 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren + 1 mM Pyruvat, + 2 mM L-Glutamin, +50 µg/ml Gentamicin +50 µM 2- Mercaptoethanol (2-MEOH) +10% FCS	Bio Whittaker, Verviers, Belgien Bio Whittaker Bio Whittaker Bio Whittaker Bio Whittaker Sigma Gibco, NY, United States
Trypsin		Bio Whittaker
HBSS		Bio Whittaker
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua. Dest. (pH 7,3)	Merck, Darmstadt
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid	Sigma
Bindungs-Puffer		BD PharMingen, Heidelberg
FACS-Puffer	0.2% NaN ₃ , 1% FCS in PBS	Sigma
Paraformaldehyd		Sigma
Saponin		Merck
RNAsefreies, destilliertes Wasser		Sigma

Die Tumorzellen wurden viermal pro Woche trypsinisiert, um die adhärennten Zellen abzulösen. Um eine mögliche Zellschädigung zu vermeiden, wurde nach fünfminütiger Inkubation mit Trypsin die proteolytische Aktivität mittels Nährmedium (CM, siehe Tabelle 3) geblockt.

Nach einmaligem Waschen in HBSS wurden die Zellen fünf Minuten ($350 \times g$) abzentrifugiert und in 150ml Kulturflaschen kultiviert (vier Passagen pro Woche).

Zur Kryokonservierung von Tumorzellen wurden 5×10^6 Zellen nach maximal zwei Passagen in FCS mit 10% DMSO resuspendiert, steril in 1,2ml Cryovials pipettiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Alle drei Wochen wurden von diesem Stock frische, wenig passagierte Zellen in Kultur genommen. Dies garantierte für die Experimente eine gleichmäßige Zellqualität. Die Apoptoseversuchen wurden in 24-Well Gewebekulturplatten durchgeführt. Pro Well wurden jeweils 1×10^5 Zellen (bzw. 2×10^5 Zellen unter Zugabe von CHX) in einem Gesamtvolumen von 400 μ l CM/Well inkubiert. Für die Messungen der Expression von Fas, TNF-Rezeptoren, MHC-Molekülen, der Apoptoseinhibitionsproteine sowie des mRNA-Gehaltes der D5-Zellen wurden die Zellen in 6-Well Gewebekulturplatten mit 1×10^6 Zellen/Well in einem Volumen von 1ml/Well inkubiert.

2.1.3 Substanzen zur Zellinkubation

Tabelle 4:

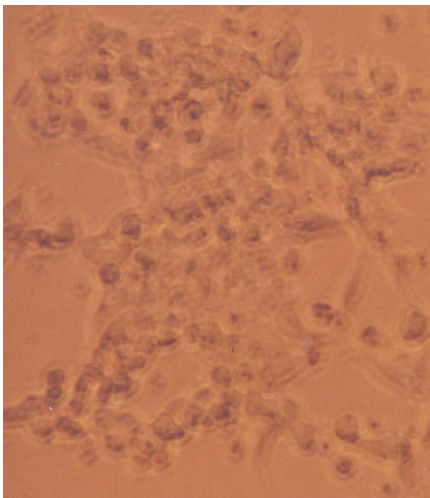
Substanz :	Anmerkung:	Herkunft :
TNF- α		B.Fox, Earle A. Chiles Research Institute, Portland, OR (Asher et al. 1987)
FasAb	Klon: Jo2	BD PharMingen, Heidelberg
Protein G	rekombinant, aus E.coli	Calbiochem, Schwalbach
LT- α		Hergestellt durch Transfektion (siehe 2.1.4)
IFN- γ	murines IFN- γ	PeptoTech [®] , London, England
CHX		Sigma, Steinheim
Anti-CD 3 (145 –2C11)		Dr. Bluestone (Univ. of Chicago, Chicago, IL)
IL-2	rekombinant	Chiron Corporation (Dr. S. Wilson, Emeryville, CA)

2.1.4 Herstellung von LT- α

LT- α wurde durch Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen der Linie 293 (HEK 293, DSMZ GmbH, Braunschweig) mit LT- α -insethaltigen Plasmiden (Dr. Hong-Ming Hu, Earle A. Chiles Research Institute, Portland, OR) hergestellt. Die LT- α -Inserts wurden mit „Flag Tag“ nach PCR-Amplifikation in pRK-Plasmide (Expressionsplasmid) kloniert. HEK 293 Zellen wurden gemäß der DSMZ-Empfehlung in 90% Dulbecco`s MEM (Gibco) mit 10% FCS bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm, NuncTM) in 8ml MEM kultiviert bis etwa 60% des Schalenbodens mit Zellen bedeckt war. Anschließend wurden 800 μ l Plasmid-Kalziumphosphat-

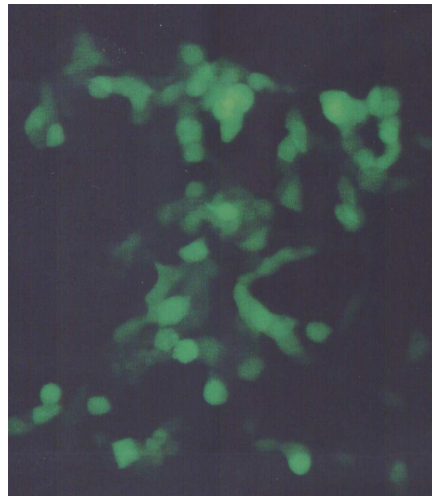
präzipitatlösung zum Medium titriert und die Zellen bei 3% CO₂ inkubiert (Chen and Okayama 1987). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 8 ml CM resuspendiert und für weitere 24 Stunden bei 5% CO₂ inkubiert. Der Zellüberstand wurde geerntet und mittels ELISA (Quantikine[®], R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) eine LT- α Konzentration von 50 ng/ml bestimmt. Aliquots des LT- α -haltigen Überstandes wurden bei -80°C eingefroren und für Apoptoseversuche verwendet. Um eine geeignete LT- α -Negativkontrolle zu erhalten wurden im gleichen Verfahren HEK 293 mit einem entsprechenden korrespondierenden pRK-Leervektor (Clontech, Palo Alto, USA) zum verwendeten Expressionsplasmid transfiziert. Im Überstand der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen fand sich kein LT- α . Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden HEK 293 in einem Parallelansatz mit einem EGFP-Reporterplasmid (Enhanced Green Fluorescent Protein, Living Colors[™], Clontech) transfiziert. Im Fluoreszenzmikroskop konnte das angeregte, grün leuchtende Protein (Exzitation 488nm/Emission 507nm) in ca. 60% der Zellen nachgewiesen werden (siehe Foto 1 und 2).

Foto 1



EGFP-transfizierte HEK 293 Zellen in der durchlichtmikroskopischen Fotografie

Foto 2



EGFP-transfizierte HEK 293 Zellen in der fluoreszenzmikroskopischen Fotografie

2.1.5 Gewinnung tumorspezifischer Effektor T-Zellen aus TVDLK

Weibliche acht bis zwölf Wochen alte Mäuse wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) bezogen und in spezieller pathogenfreier Umgebung nach den Richtlinien des National Research Council (USA) von 1996 gehalten. D5G6 Zellen wurden trypsiniert, gewaschen und mit 2×10^7 Zellen/ml in HBSS resuspendiert. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen s.c. pro Flanke einer wt Maus injiziert. Acht Tage nach der Vakzinierung wurden die TVDLK entnommen, die Lymphozyten geerntet und 2×10^6 Zellen/ml in 24-Well Gewebekulturplatten in CM resuspendiert. Danach wurden die Zellen zwei Tage mit anti-CD3 (50µl einer 1: 40 Verdünnung des 145-2C11 Aszites) polyklonal aktiviert. Anschließend wurden die Zellen in HBSS gewaschen und für drei Tage in CM (15×10^4 Zellen/ml) mit rh IL-2 (60 IU/ml) in 6-Well Platten stimuliert. Die aktivierten tumorspezifischen T-Zellen (T_E) wurden anschließend gewaschen und in CM mit rh IL-2 (60 IU/ml) resuspendiert. Um die tumorspezifische Sekretion von Zytokinen und Chemokinen aus T_E zu bestimmen, wurden 4×10^6 T_E / Well in einer 24-Well Gewebekulturplatte verteilt und in Medium mit rh IL-2 (60 IU/ml) ohne (Negativkontrolle) und mit anti-CD3 (Positivkontrolle) inkubiert. Zusätzlich wurden T-Zellen mit D5 (2×10^5 Zellen) oder MCA-310 (geeigneter syngener Kontrolltumor) stimuliert (Winter et al. 1999). Nach sechs Stunden wurde aus den so behandelten T-Zellen die mRNA isoliert, um die Chemokinexpression mittels RT-PCR zu bestimmen. Die Überstände von T-Zellen, welche 24 Stunden stimuliert wurden, wurden zum Nachweis des Chemokingehaltes verwendet (Abb. 6).

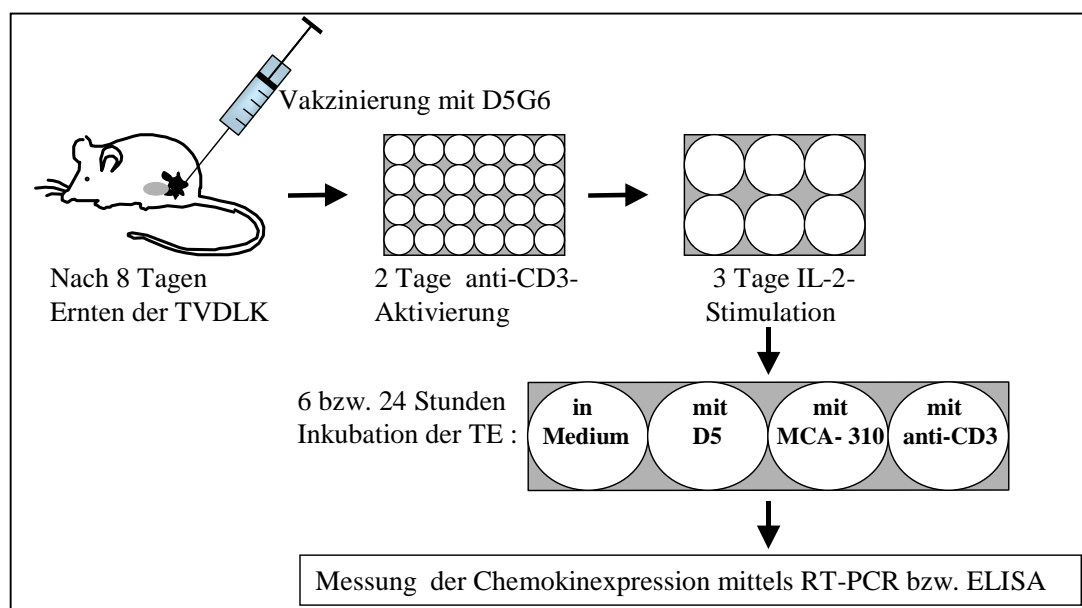


Abb. 6: Gewinnung von T_E

2.2 Durchflusszytometrie

2.2.1 Grundzüge des Messverfahrens

Die Apoptoserate, die Expression der TNF-Rezeptoren, die Fas-Expression, die Expression der Apoptoseinhibitionsproteine sowie die Expression von MHC-Molekülen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Messung wurde an einem FACSort[®] (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mit dazu passender Software (CELLQuest[™], Becton Dickinson) durchgeführt. Die Abkürzung FACS steht für „fluorescent activated cell sorter“. Um Messungen durchführen zu können, müssen Einzelzellsuspensionen mit einer Konzentration von ca. 0,5 bis 20×10^6 Zellen/ml bereit werden. Die Zellen der Suspension werden in eine Messkapillare gepumpt, auf die ein Laserstrahl gerichtet ist (15mw, 488nm-Argon-Ionen-Laser). Hinter der Kapillare befinden sich Fotometerzellen, welche die Fluoreszenzintensität (= Lichtintensität bei unterschiedlichen Wellenlängen) und die Streulichtintensität (= Lichtintensität bei definiertem Ablenkungsgrad) messen. Jede Ablenkung des gerade laufenden Laserstrahls wird registriert und als ein „Ereignis“ gezählt. Erfasst der Laser eine Zelle im Analysepunkt, so werden charakteristische Streuungs- und Fluoreszenzeffekte ausgelöst und von den Fotozellen als Analogpuls in Volt erfasst. Ein Analog-Digital-Wandler konvertiert diesen Puls in ein digitales Signal. Bei einer maximalen Impulshöhe von 10,24 Volt stehen 1024 verschiedene Intensitätsstufen zur Verfügung. Wird ein Ereignis mit bestimmter Voltzahl registriert, wird diesem eine entsprechende Intensität zugeordnet und kann somit graphisch (Anzahl der Ereignisse mit entsprechenden Intensitäten) dargestellt werden.

In Abb. 7 ist in einer Kurzübersicht dargestellt, wie im FACS-Gerät aus einem Ereignis vier Parameter (Forward-Scatter = FSC, Side-Scatter = SSC, Fluoreszenz 1 = FL-1, Fluoreszenz 2 = FL-2) gemessen werden können.

Gängigerweise wird die Lichtstreuung im Vorwärtsstreulicht von $0-10^\circ$ (FSC) gemessen, welches eine Aussage über die Zellgrößenrelation gibt. Das Seitwärtsstreulicht von 90° (SSC) liefert Informationen über die Zellstruktur (Zellmembran, Zellkern, Granularität). Durch die Verwendung von FSC/SSC ist es möglich, eine gewünschte Zellpopulation in einer Suspension zu definieren und mit Hilfe der Gate-Einstellung abzugrenzen (dargestellt in Dot blot A Abb. 8: Punktwolke innerhalb des Ringes). Diese Population kann anschließend mittels FL-1 und -2 gezielt ausgewertet werden. FL-1 bezeichnet in der hier vorliegenden Untersuchung die registrierte Lichtemission des FITC (Fluorescein Isothiocyanat). Dieser Farbstoff sendet nach Aktivierung durch den Laser eine stark grüne Fluoreszenz aus. Die

Maximale Emission (Peak Emission) wird bei 520nm detektiert. Im FL-2-Kanal wird hingegen die rote laser-aktivierte Lichtemission von PE (Phycoerythrin) und PI (Propidiumiodid) aufgenommen, die eine Peak Emission bei 575nm bzw. bei 620nm besitzen.

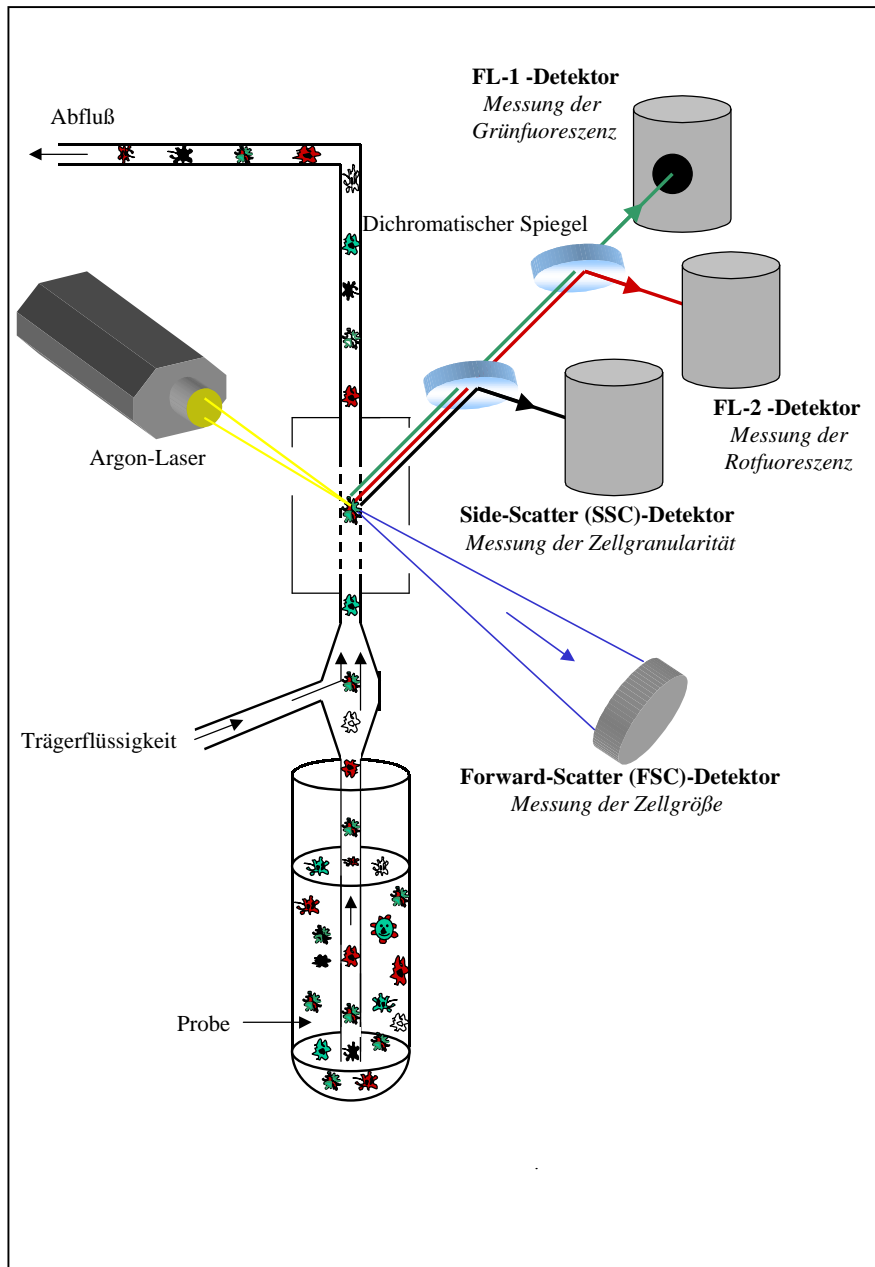


Abb. 7: Prinzip der Untersuchung mittels FACS-Analyse

Da das FACS nicht zwischen Zellen, Zelltrümmern und Verunreinigungen unterscheiden kann, müssen über die Einstellung der Empfindlichkeit elektronisch ungewollte Signale herausgefiltert werden. Mit der Einstellung der Detektoren optimiert man die elektronische Verstärkung eines Signals. FSC/SSC werden meist linear, Fluoreszenzen hingegen meist logarithmisch über vier Dekaden verstärkt, da diese einen breiten Bereich von Intensitätsabstufungen beanspruchen. Wenn zwei verschiedene Fluoreszenzfarben in einer Messung erfasst werden sollen, erfordert dies die Einstellung der Kompensation, da sich die Emissionen überlappen können (spectral overlap). Dabei werden ungewollte Fluoreszenzen in der Reichweite der Wellenlänge der anderen zu messenden Fluoreszenz reduziert und somit die Möglichkeit minimiert, dass sie von einem falschen Kanal erfasst werden.

Eine Messung bestand in unserem Fall aus 10.000 Ereignissen bei einer Messgeschwindigkeit von ca. 500 Ereignissen pro Sekunde. FSC/SSC- und Zweifarbenmessungen wurden in einem „Dot blot“ (siehe Dot blot A und B, Abb. 8) dargestellt. Dabei erhält jedes Ereignis je nach Größe bzw. Intensität einen Punkt in einem Diagramm, dessen Achsen den entsprechenden Parametern zugeordnet werden. Bei der Messung nur einer Fluoreszenz ist die Abbildung in einem Histogramm gängig. Hierbei werden die Intensitäten gegen die gezählten Ereignisse aufgetragen (Histogramm, Abb. 8).

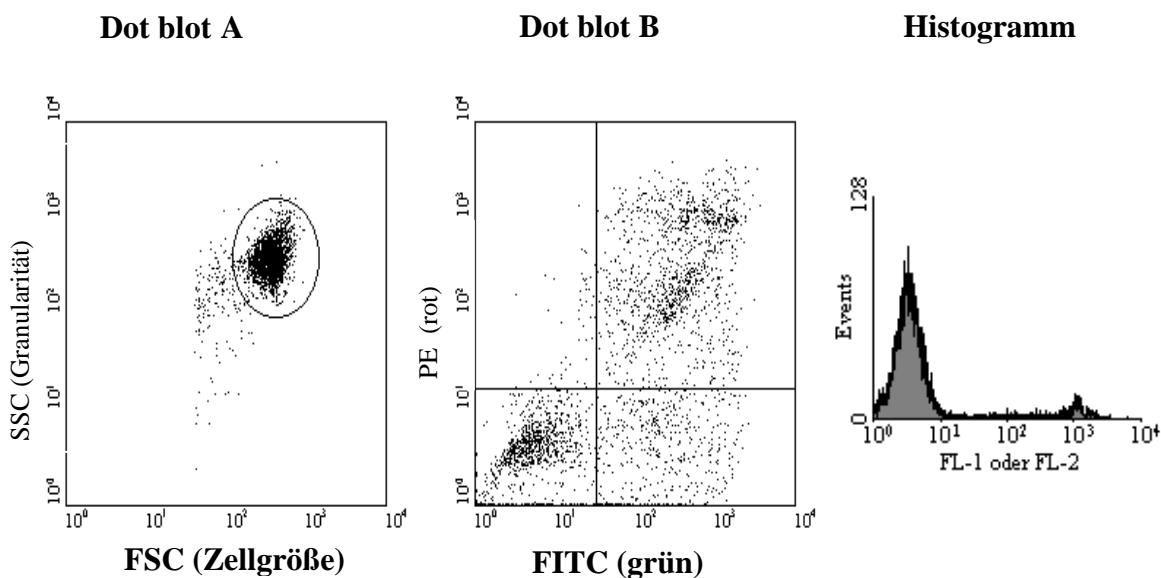


Abb. 8: Darstellungsformen von FSC/SSC (Dot blot A), Zweifarbenmessung (Dot blot B) und Einfarbenmessung (Histogramm)

2.2.2 Nachweis von Apoptose

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die Tumorzellen mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid (PI, PharMingen) gefärbt.

In der frühen Apoptosephase einer Zelle werden die negativ geladenen Phospholipide (Phosphatidylserine, PS), die normalerweise an der Innenseite der Zellmembran zu finden sind, an die Außenseite transloziert und sind somit für Anfärbungen zugänglich. Annexin-V ist ein 36 KD großes, phospholipidbindendes Protein, welches eine hohe Affinität zu PS besitzt (Raynal and Pollard 1994; Andree et al. 1990). Es kann mit FITC gekoppelt und mittels FACS-Analyse (FL-1) nachgewiesen werden, was wiederum den jeweiligen Apoptosegrad einer Zelle/Zellpopulation bestimmen lässt (Vermees et al. 1995; Martin et al. 1995; Koopman et al. 1994; Homburg et al. 1995). Um auch die Spätphase des Zelltodes erfassen zu können, kann eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI) durchgeführt werden. Fünf bis zwölf Stunden nach Apoptoseeinleitung verliert die Zellmembran ihre Integrität und wird durchlässig für PI. Dieses reichert sich in der Zelle an und kann im FL-2 Kanal detektiert werden. Annexin-V-FITC/PI-Färbungen wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die mit den unterschiedlichen Substanzen/Substanzkombinationen (siehe Tabelle 4) inkubierten Zellen wurden aus den 24-Well Gewebekulturplatten geerntet, in 4ml 4°C gekühltem HBSS resuspendiert und in 5ml Rundbodenröhrchen überführt (ca. $1,5 \times 10^5$ pro Röhrchen). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit HBSS gewaschen und in 100µl Bindungs-Puffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 5µl Annexin V-FITC (PharMingen) und 10µl PI (50 µg/ml in PBS) pipettiert. Nach 15 minütiger Inkubation mit Annexin-V-FITC/PI wurden die Zellen nach Zugabe von 400µl Bindungs-Puffer per FACS analysiert.

Die prozentuale Auswertung der Apoptoserate im FACS wurde folgendermaßen durchgeführt: Die grobe FACS-Einstellungen (Empfindlichkeit, Detektoren, Kompensation) wurde vor den Messungen anhand ungefärbter und gefärbter Zellen festgelegt. Mit jedem Apoptoseansatz (Zellen, welche mit Zytokinen inkubiert wurden) wurde ein Kontrollansatz (Zellen, welche ohne Zytokine inkubiert wurden) parallel kultiviert und gemessen. Im Dot blot wurde die Punktewolke der Kontrollansätze mit Hilfe der Detektoren in den linken unteren Quadranten (LL, erste log-Dekade der y- und x-Achse) feinjustiert und die Messung gestartet. Da die Zellen, welche sich im LL befinden, weder Annexin-V-FITC noch PI positiv sind, wurden sie als „lebend“ definiert und als Prozentsatz der Gesamtereignisse angegeben (Dot blot C, Abb. 9). Bei gleicher Einstellung wurden anschließend die Daten erhoben (Dot

blot D, Abb. 9). Die Subtraktion des Prozentsatzes der lebenden Zellen in der Probe vom Prozentsatz der lebenden Zellen im Kontrollansatz gab die Apoptoserate wieder.

Wurden Proben mit IFN- γ und/oder Cycloheximid (CHX) inkubiert, so erfolgte die Behandlung der Kontrollen parallel in gleicher Weise (LT- α Kontrollansätze, siehe 2.1.4).

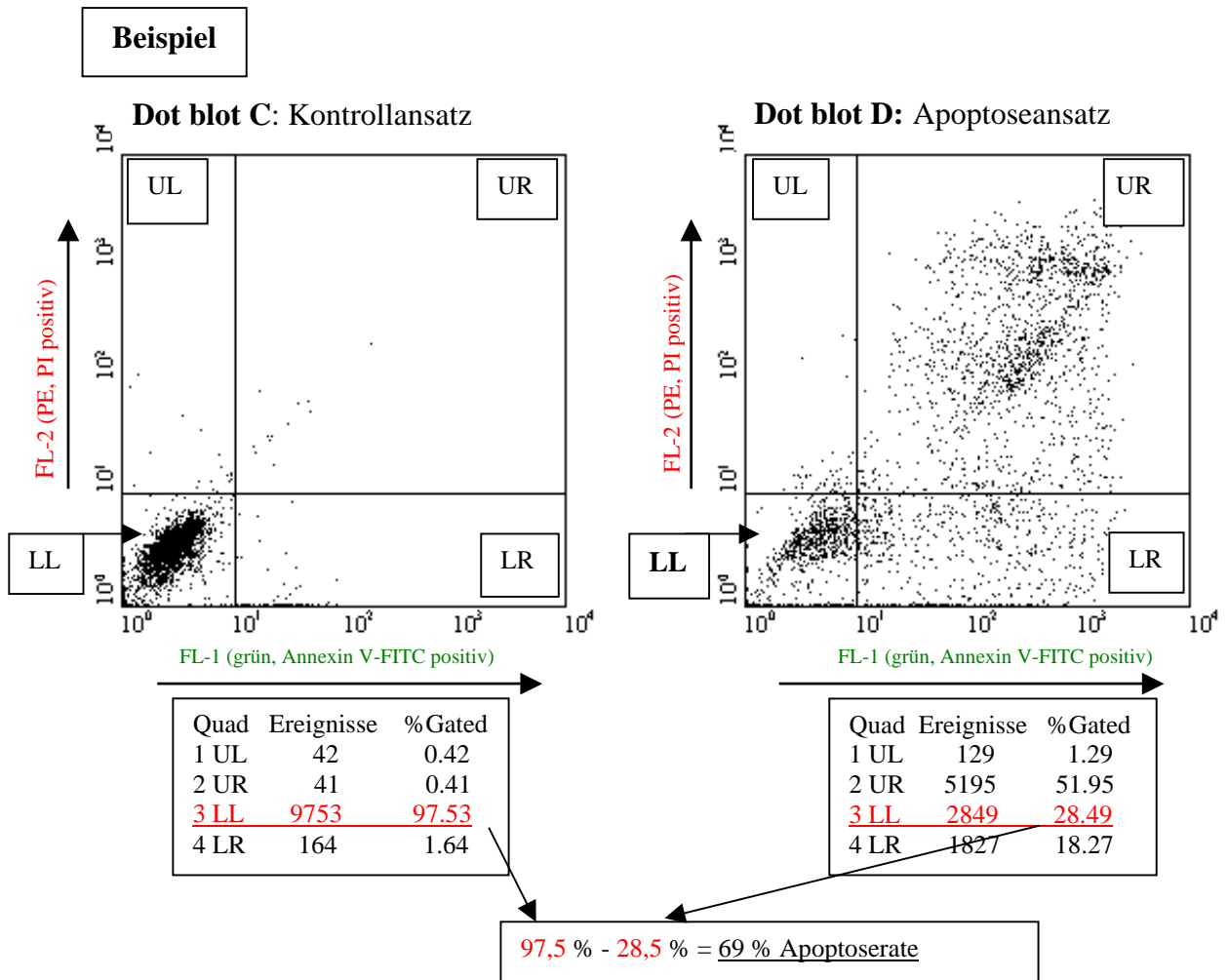


Abb. 9: Darstellung der Berechnung der Apoptoseraten nach durchflusszytometrischer Untersuchung von Kontroll- (Dot blot C) und Apoptoseansatz (Dot blot D) nach Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und PI.

2.2.3 Statistische Auswertung der Apoptoseversuche

Jede Messung wurde mindestens dreimal unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Ermittlung des Signifikanzniveaus der prozentualen Ergebnisse erfolgte bei Normalverteilung mit Hilfe des „Student paired *t*-test“ (siehe 3.4). Als signifikant wurde ein Wert von $p < 0,05$ erachtet.

2.2.4 Detektion von Strukturen der Zelloberfläche

Der Nachweis von TNF-Rezeptoren, Fas und MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von D5 wurde mit Fluorochrom (FITC/PE) konjugierten Antikörpern mittels FACS-Analyse durchgeführt. Je mehr konjugierte Antikörper auf einer Zelle binden, desto höher ist die von ihren Fluorochromen ausgehende und zu messende Intensität (Abb. 10).

Aus Gründen der Stabilität und Signalverstärkung wurden zur Bestimmung der Expression der TNF-Rezeptoren I und II zwei Antikörper eingesetzt (Abb.10). Ein unkonjugierter Antikörper (erster Antikörper), welcher gegen den TNF-Rezeptor gerichtet ist, wurde von einem polyklonalen PE-konjugierten AK (zweiter AK) detektiert, dessen Intensität wiederum flowzytometrisch bestimmt wurde. Da an jedem ersten AK mehrere zweite AK binden, kommt es zur Verstärkung des Signals.

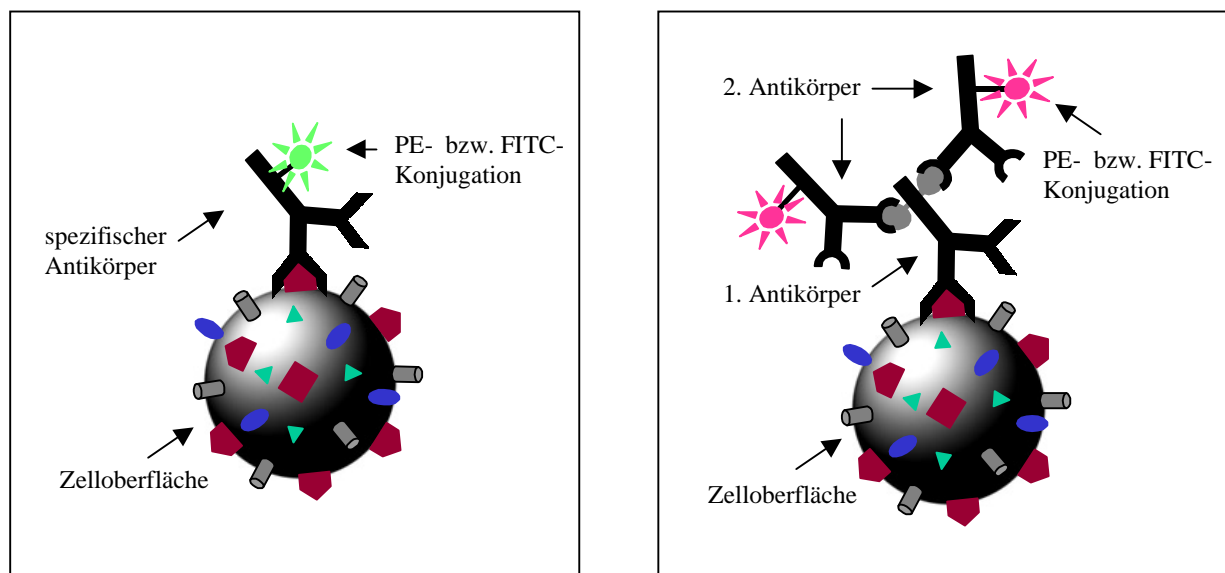


Abb. 10: Darstellung der Färbung von Zellen mittels konjugiertem (links) und unkonjugiertem Antikörper (1.AK) nach Binden mehrerer konjugierter AK (2.Ak, rechts).

Tabelle 5:

Antikörper: (*Immunogenität: C57BL/6)	Klon:	Konjugation:
Anti-IgG Isotypkontrolle (IgG _{2a})*	G 155-178	PE
Anti-IgG Isotypkontrolle (IgG _{2a})*	G 155-178	FITC
Anti-MHC I (K ^b)*	AF 6-88.5	PE
Anti-MHC I (D ^b)*	KH 95	PE
Anti-MHC II (I-A ^b)*	AF 6-120.1	FITC
Anti-Fas*	Kay-10	PE
Anti-TNF-R I (= 1.AK)* (Hamster)	55R-286	unkonj.
Anti-TNF-R II (= 1.AK)* (Hamster)	TR 75-32	unkonj.
Anti-Armenian Hamster-Ak / Anti-Syrian Hamster IgG (= 2.AK)	G 70-204, G94-90.5 (Cocktail)	PE

Alle in Tabelle 5 gelisteten AK wurden von der Firma PharMingen (Heidelberg) bezogen.

Die Anfärbung der zu untersuchenden Zelloberflächenstrukturen mittels konjugierter AK wurde wie im Folgenden beschrieben vorgenommen:

Die Zellen wurden trypsiniert, 1×10^6 Zellen in Rundbodenröhrchen überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit $1\mu\text{g}$ des jeweiligen, direkt konjugiertem bzw. ersten Antikörper (TNF-R I, II) 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden durch Waschen mit FACS-Puffer nicht gebundene Antikörper aus der Suspension entfernt. Bei der Bestimmung der TNF-R Expression wurde die Zellsuspension mit dem zweiten AK 30 Minuten inkubiert und gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit 1%-igem Paraformaldehyd fixiert und innerhalb von zwölf Stunden mittels FACS analysiert. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindungen und Autofluoreszenz wurde eine passende IgG-Isotypkontrolle durchgeführt. Das Intensitätsmaximum dieser Kontrolle wurde in die erste log-Dekade justiert und diese Einstellungen für die nachfolgenden Proben belassen. Als ein positives Ereignis galt jedes Intensitätssignal, welches höher als die Fluoreszenz der Isotypkontrolle/Vergleichsprobe lag. Die Auswertung erfolgt mittels „overlay-mode“, d.h. die Fluoreszenz der Proben wurde mit der Fluoreszenz der Isotypkontrolle/Vergleichsprobe in einem Histogramm (Intensität vs. Ereignisse, Events; Abb. 11) überlagert. Eine Vergleichbarkeit mehrerer Proben durch Überlagerung ihrer Messkurven ist hiermit ebenso möglich.

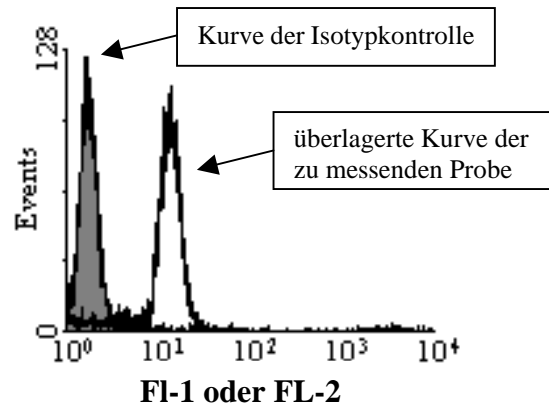


Abb. 11: Darstellung der Auswertung im „Overlay-mode“

2.2.5 Detektion intrazellulärer Apoptoseinhibitionsproteine

Da Apoptoseinhibitionsproteine (c-IAP I, c-IAP II, Survivin) sich intrazellulär befinden, können sie nicht ohne weiteres von passenden Antikörpern detektiert werden. Es ist nötig, die Zellmembran „aufzuweichen“, um die AK in die Zelle einschleusen zu können. Hierfür wurde dem FACS-Puffer das Detergenz Saponin (0,1%) zugesetzt.

Die Färbung von Apoptoseinhibitionsproteinen erfolgte analog der Färbung der TNF-Rezeptoren (2.2.4). Es wurden dazu spezifische Antikörper der Firma Santa Cruz (San Francisco, USA) verwendet, welche in Tabelle 6 und 7 aufgelistet sind.

Tabelle 6:

Antikörper: (*Immunogenität: C57BL/6)	Entstanden in :	Konjugation:
Anti-c-IAP I* (1.AK)	Rabbit	unkonjug.
Anti-c-IAP II* (1.AK)	Rabbit	unkonjug.
Anti-Rabbit-IgG (2.AK)	Goat	FITC

Tabelle 7:

Antikörper: (*Immunogenität: C57BL/6)	Entstanden in :	Konjugation:
Anti-Survivin *(1.AK)	Goat	unkonjug.
Anti-Goat-IgG (2.AK)	Rabbit	FITC

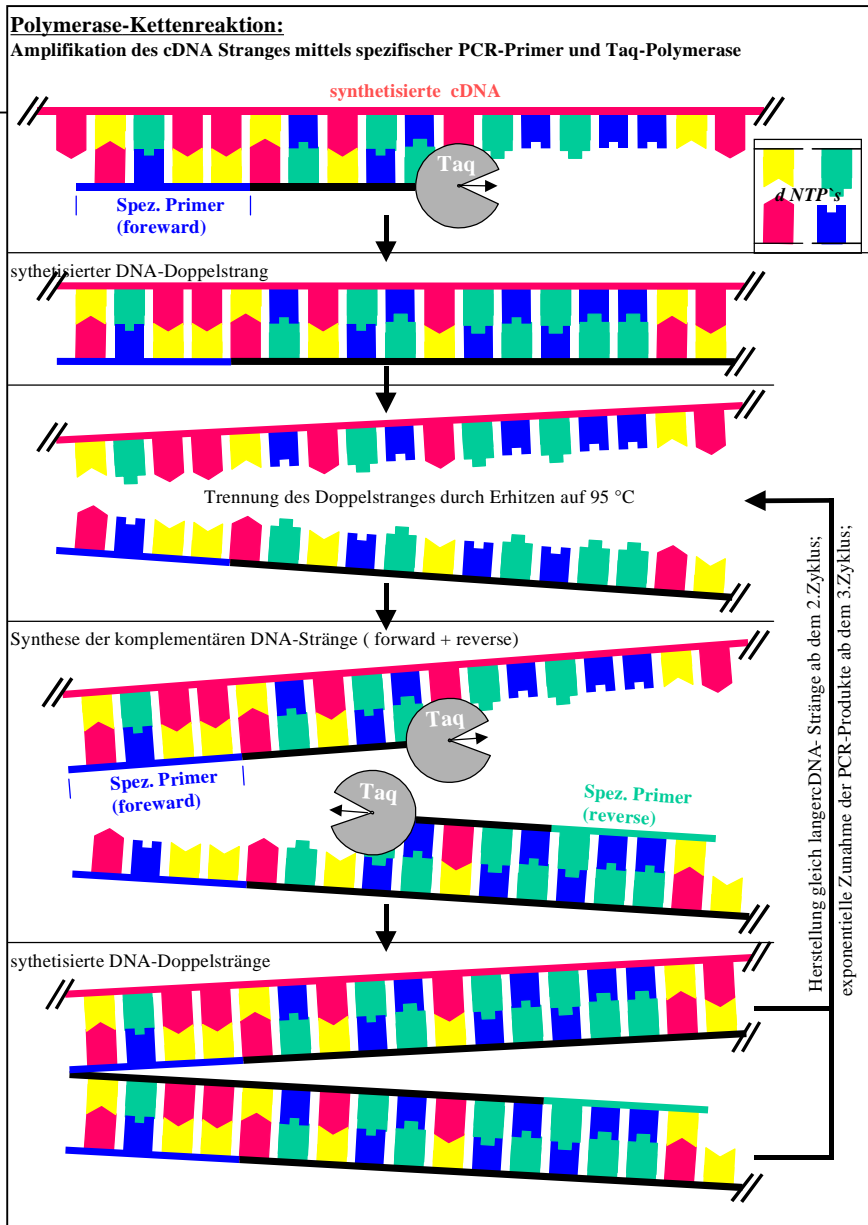
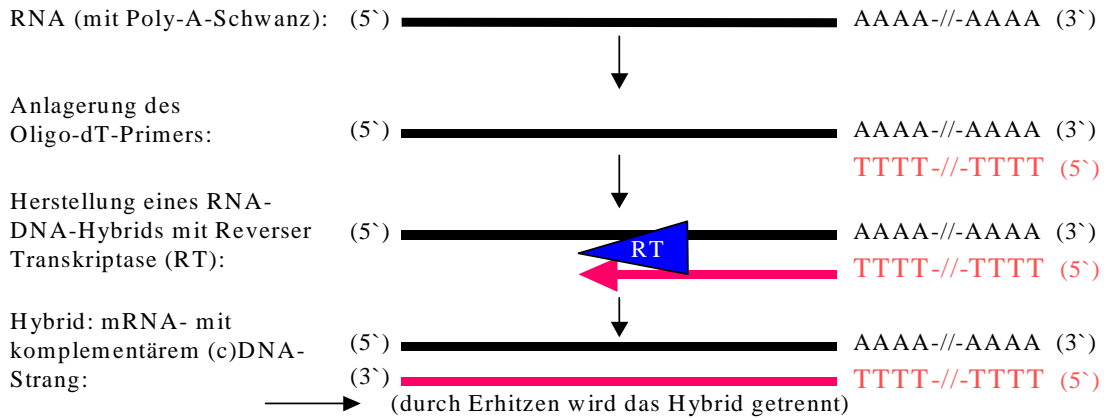
2.3 mRNA-Nachweis mittels RT-PCR

2.3.1 Grundlagen des Messverfahrens

Um den Grad der Genexpression innerhalb der Zellen nachweisen zu können, wurde die Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) herangezogen. Dazu werden sämtliche Gentranskripte (mRNA, messenger ribonucleic acid) in konzentrierter Form aus den Zellen gewonnen und mit Hilfe des Enzyms der retroviralen Reversen Transkriptase (\rightarrow RT-PCR) in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben (Seite 24). In der darauf folgenden PCR wird die cDNA mittels Taq-Polymerase, welche temperaturstabil und DNA-abhängig arbeitet, amplifiziert. Die Spezifität wird durch die Anlagerung (Hybridisierung) zweier ausgesuchter Starter-Oligonukleotide (Forward- und Reverse-Primer) an die denaturierten komplementären cDNA-Stränge erzielt. Der hintereinandergeschaltete zyklische Ablauf von cDNA-Denaturierung (Temperaturerhöhung \rightarrow Trennung der Doppelstränge), Hybridisierung der Primer und Synthese der komplementären DNA-Sequenzen ergibt eine exponentielle Zunahme von DNA-Strängen definierter Länge (Seite 24).

cDNA Synthese:

Hybridisierung sämtlicher Zell-mRNA (unterschiedlicher Sequenzen) mit Oligo(15)-dT-Primers und Reverser Transkriptase



Über eine Gelelektrophorese können diese spezifischen PCR-Produkte aufgetrennt werden. Da sie identische Längen und Ladungen besitzen, haben sie gleiche Laufeigenschaften und lagern sich daher zu einer Bande zusammen. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, können die Banden UV-transluminiert sichtbar gemacht werden.

2.3.2 mRNA –Gewinnung und Aufbereitung

Nach Abnahme des Mediumüberstandes wurden die (un-) stimulierten Zellen mittels Lysis-Puffer lysiert und mit einem Zellscraper aus der 6-Well Schale geerntet. Um die mRNA zu entspiralisieren enthielt der Lysis-Buffer 1% MeOH. Die mRNA-Extraktion erfolgte gemäß den Angaben des RNeasy[®]-Mini-Kits (Qiagen, Hilden). Die extrahierte mRNA-Konzentration jeder Probe wurde spektrophotometrisch bestimmt (RNA/DNA Calculator Gene Quant pro, Biochrom, Cambridge, England). Die Arbeit mit mRNA/cDNA erfolgte grundsätzlich auf Eis.

2.3.3 cDNA- Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 2µg RNA in 15,7µl RNasefreiem, destilliertem Wasser aufgenommen, zur Denaturierung erhitzt und sofort auf Eis gekühlt. Zum Erhitzen der 15,7 µl mRNA-Suspension sowie aller weiteren cDNA/PCR-Schritte auf definierte Wärmestufen wurde der Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet. Zur denaturierten mRNA-Suspension kamen folgende Substanzen (Tabelle 8) hinzu:

Tabelle 8:

Substanzen:	Volumen (Menge)	Herkunft:
Primer p(dT) ₁₅	1µl (1,5µM)	Roche
5x RT Mul Puffer	6µl	Life Technologie, Paisley, Schottland
dNTP`s	1,5µl *	Roche
Prime RNase Inhibitor TM	0,8µl (32U)	Eppendorf
MMLV-RTase (Moloney-Maus-Leukämie Virus Reverse Transcriptase)	2µl (400U)	Life Technologies
RNasefreies dest. Wasser	3µl	Sigma
Gesamtvolumen:	<u>14,3µl</u>	
cDNA-Ansatz:	<u>30 µl</u>	

* dNTP:(Dinukleotide) bestehend aus 0,6 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP

Die cDNA-Synthese wurde 60 Minuten lang bei 37°C durchgeführt, anschließend erfolgte eine zehnmünütige Hitzeinaktivierung bei 95°C (Assmann et al. 2001).

2.3.4 PCR-Bedingungen

Ein 3µl Aliquot aus dem 30µl cDNA-Ansatz wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Zum cDNA-Aliquot kamen die Substanzen hinzu, welche in Tabelle 9 aufgelistet sind:

Tabelle 9

Substanzen:	Volumen(Menge)	Herkunft:
10 x Puffer*(100mM Tris-HCl, 15mM MgCl ₂ , 500 mM KCl,ph 8,3)	5 µl	Roche, Mannheim
dNTP`s	1µl (10µM)	siehe Tabelle 8
spezifischer Primer, forward	1µl (20µM)	siehe Tabelle 11
spezifischer Primer, reverse	1µl (20µM)	siehe Tabelle 11
RNasefreies dest.Wasser	38,8µl.	Sigma
Taq-Polymerase	0,2µl (1U)	Roche
Gesamtvolumen:	<u>50µl</u>	

Zur Amplifizierung wurde das in Tabelle 10 aufgeführte Protokoll benutzt:

Tabelle 10:

Schritt	Zweck:	Zeit:	Temperatur:
1	Denaturierung, ein Zyklus	60 Sekunden	95°C
2 *	Denaturierung	30 Sekunden	95°C
3 *	Primer-Hybridisierung	30 Sekunden	60°C
4 *	Polymerisation (Synthese)	45 Sekunden	72°C
5	Polymerisation, ein Zyklus	7 Minuten	72°C
6	Lagerung		4°C

*Schritte 2 bis 4 wiederholten sich je nach spezifischem Primer (20 bis 30 Zyklen)

2.3.5 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

10µl des PCR-Produktes wurden mit 2µl der 6 x Loading Dye Solution (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Anschliessend wurden die PCR-Produkte über ein 1,2%-iges Agarosegel (peqGold Universal Agarose, peqlab, Erlangen) in der mit 1 x TAE-Puffer (Eppendorf) gefüllten Perfect Blue™ Gelkammer (peqlab) elektrophoretisch nach Anlegen einer Spannung von 90 V für 45 Minuten (Power Easy™ Novex, San Diego, Kalifornien, USA) horizontal aufgetrennt. Um die Größe der PCR-Produkte bestimmen zu können, lief bei jedem Gelansatz ein sog. Standard (Gene Ruler™, Fermentas) unter gleichen Bedingungen mit. Dieser trennt sich im Gel in elf definierte Banden in einer Größe zwischen 80 und 1031 Basenpaaren auf. Dem Gel wurde 5µl Ethidiumbromid (Sigma) zugesetzt, um die PCR-Produkte UV-belichtet

sichtbar werden zu lassen. Nach dieser Zeit wurde das Gel von einer Fotokamera (MP-4, Land Camera, Polaroid, Offenbach) über einem UV-Transluminator abgelichtet.

2.3.6 Primersequenzen

Die Sequenzen der spezifischen PCR-Primer (siehe Tabelle 11) wurden zum einen aus Veröffentlichungen, zum anderen aus der Gendatenbank des European Bioinformatics Institute (<http://srs.ebi.ac.uk>), welche die jeweilige komplette mRNA Sequenz ausfindig machte, entnommen. Die komplette Sequenz wurde in einen Primergenerator des Whitehead Institute Center for Genome Research (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) übertragen, um dort sowohl den Forward-, als auch den Reverse-Primer generieren zu lassen. Alle verwendeten Primer funktionieren optimal bei einer mittels Temperaturgradienten überprüften Hybridisierungstemperatur von 60°C.

Tabelle 11:

mRNA-Ziel des Primers:	Primersequenz:*	Zyklen:	Herkunft:
MIP-1 α	F: ATG AAG GTC TCC ACC ACT GCC CTT G R: GGC ATT CAG TCC AGG TCA GTG AT	25	B.Fox
MIP-1 β	F: GTT CTC AGC ACC AAT GGG CTC TGA R: CTC TCC TGA AGT GGC TCC TCC TG	25	B.Fox
KC	F: CGG AAT TCG CCA CCA GCC GCC TG R: CGT CTA GAC TTT CTC CGT TAC TTG G	25	(Yoshidome et al. 1999)
IP-10	F: CCT ATC CTG CCC ACG TGT TG R: CGC ACC TCC ACA TAG CTT ACA	25	(Neumann et al. 1998)
RANTES	F: CAT CCT CAC TGC AGC CGC CC R: CCA AGC TGG GTA GGA CTA GAG	25	(Neumann et al. 1998)
Mig	F: ATG AAG TCC GCT GTT CTT TTC C R: TTA TGT AGT CTT CCT TGA ACG AC	25	(Neumann et al. 1998)
MCP-1	F: CTC ACC TGC TGC TAC TCA TTC R: GCT TGA GGT GGT TGT GGA AAA	25	(Neumann et al. 1999)
TNF- α	F: GTT CTA TGG CCC AGA CCC TCA CA R: TAC CAG GGT TTG AGC TCA GC	25	(Reiner et al. 1994)
c-IAP I	F: ATT TGT GAG AAG AGC GAG CC R: ATG CAG AGA TCC TGG CAA GT	30	www
c-IAP II	F: CGC TCA CAC GAA GAT CTG AA R: CAG GTG GTC ATC AGC AAG AA	30	www
Survivin	F: AAC CCG ATA GAG GAG CAT AG R: CAT GTC ACT CAG GTC CAA GT	30	www
GP-100	F: AAA TGC CAA CCA CAG AGG TC R: CAA GCA TTA TGG TGT CGG TG	25	www
HPRT	F: GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G R: GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT	20	(Reiner et al. 1994)

*F = Forward = sense = 5'-, R = Reverse = antisense = 3'-Primersequenz

Die in Tabelle 11 aufgelisteten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

2.3.7 Kontrollen

2.3.7.1 „Housekeeping-Gen“

Die zur Aufrechterhaltung der basalen Funktion von Zellen benötigten Gene werden im Allgemeinen mit etwa gleichbleibender Geschwindigkeit transkribiert. Diese Gene werden als Housekeeping-Gen bezeichnet. Deren Transkripte sind immer in den Zellen vorhanden. Mit einem Primer für ein solches Housekeeping-Gen kann die komplette Probenaufbereitung auf Fehlerfreiheit kontrolliert werden. Als Housekeeping-Gen wurde bei jeder cDNA-Probe die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) nachgewiesen. Das HPRT-Gen kodiert für ein Enzym zur Wiederverwertung von Purin bei der Nukleinsäuresynthese.

2.3.7.2 PCR-Kontrolle

Um auszuschließen, dass bei der PCR keine unspezifische Amplifikation durch Verunreinigung stattfand, lief als Negativkontrolle eine Probe bei sonst normalen PCR-Bedingungen, aber ohne cDNA-Zugabe, parallel mit. Das Gesamtvolumen wurde dabei mit RNasefreiem Wasser korrigiert. Es durfte später in der Gelelektrophorese dieser Probe keine Bande sichtbar werden.

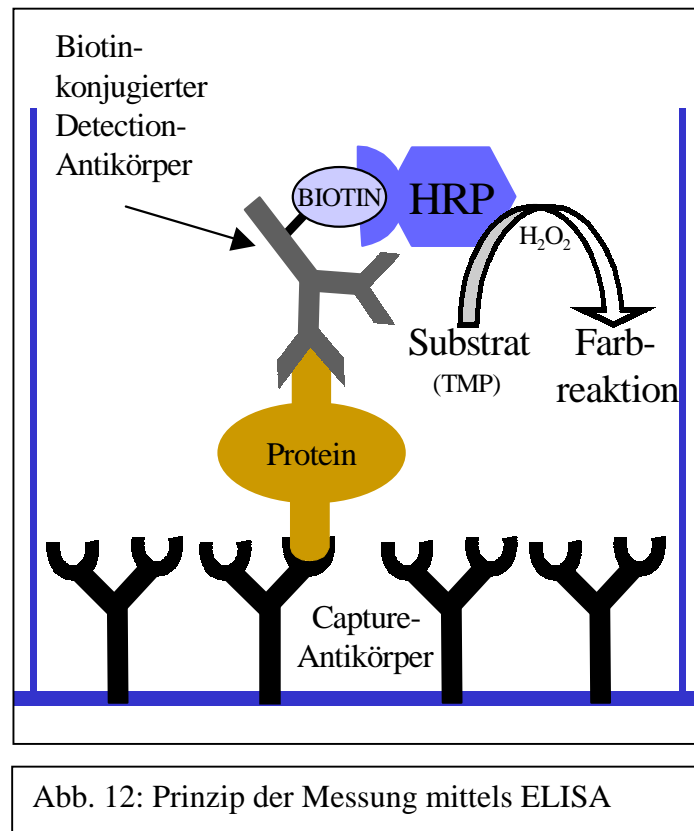
Zur Überprüfung der Gängigkeit der spezifischen Primer und der PCR-Bedingungen wurde zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse eine Positivkontrolle verwendet. Dazu eignete sich die synthetisierte cDNA von Makrophagen der Linie J 774 A₁ (DSMZ), welche vier Stunden mit IFN- γ (20 ng/ml) und LPS (10 μ g/ml) stimuliert wurden.

2.4 ELISA

2.4.1 Prinzip der Messmethode

Der Nachweis von Proteinen in einer Suspension kann mit Hilfe eines „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) erfolgen. Dabei binden die nachzuweisenden Proteine an spezifische Antikörper (Capture-AK), die zuvor am Boden einer 96-Well Platte fixiert wurden. Ein zweiter AK (Detection-AK) detektiert die vom Capture-AK gebundenen Proteine. Dieser Detection-AK ist an Biotin gekoppelt, woran sich Streptavidin anlagert. Das Streptavidin wiederum ist mit Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase, HRP) konjugiert. HRP ist in der Lage, das Substrat Tetramethylbenzidine in Anwesenheit von H₂O₂

umzusetzen, was eine Farbreaktion zur Folge hat (Abb. 12). Je mehr nachzuweisende Proteine in der Ausgangssuspension sind, desto intensiver fällt die Farbreaktion aus. Die Intensität kann photometrisch anhand einer Standardverdünnungsreihe quantifiziert werden.



2.4.2 Gewinnung der Proben/ Proteine (KC, MCP-1 und RANTES)

Um Tumorzellüberstände für den Proteinnachweis zu gewinnen, wurden in 6-Well Gewebekulturplatten über definierte Zeiträume hinweg D5-Zellen mit IFN- γ (20 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml) inkubiert. Als Negativkontrolle (Background) wurde der Überstand unstimulierter Zellen verwendet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C . Überstände der T_E wurden wie unter 2.1.5 beschrieben generiert.

2.4.3 Antikörper, Reagenzien und Bedingungen

Zur Bestimmung der KC-Sekretion von D5-Zellen wurden 96-Well Gewebekulturplatten mit monoklonalem anti-Maus-KC-Capture-Antikörper (R&D) in einer Konzentration von 1µl/ml in PBS (100µl/Well) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Precoating). Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß dem von R&D vorgeschlagenen Protokoll (Tabelle 12):

Tabelle 12:

Schritt:	Substanz/Lösung:	Herkunft:	Bemerkung:
1. Precoating			s.o
2. Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400µl, 3mal
3. Blocken	2% BSA in PBS	Gibco/ Merck	300µl, 1h
4. Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400µl, 3mal
5. Probenzugabe	Tumorzellüberstand (+Standard*)	(*R&D)	100µl, 2h
6. Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400µl, 3mal
7. Detection-Ak-Zugabe	biotinylierter anti-KC Ak 100ng/ml in PBS mit 2% BSA	PharMingen Gibco/ Merck	100µl, 2h
8. Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400µl, 3mal
9. Working Dilution Zugabe	Streptavidin-HRP in 1% BSA in PBS	PharMingen	100µl, 20 min lang
10. Substrat-Zugabe	TMB-Substrat-Set (H ₂ O ₂ + Tetramethylbenzidin)	PharMingen	100µl, 30 min
11. Stopplösung-Zugabe	1 M H ₂ SO ₄	Merck	50µl
12. Messen	Gerätschaft: s.u.		

Zum Nachweis von MCP-1 und RANTES, wurde ein anti-Maus-MCP-1-Capture-AK (PharMingen) bzw. ein anti-Maus-RANTES-Capture-AK (PharMingen) in 0,2M Natriumphosphatlösung verwendet. Als Detektion-AK wurde ein biotinylierter anti-Maus-MCP-1-AK (PharMingen) bzw. anti-Maus-RANTES-AK (PharMingen) eingesetzt, der direkt HRP-konjugiert ist. Das übrige Procedere entsprach dem Protokoll, welches in Tabelle 12 dargestellt ist.

Ausgewertet wurde mit dem ELISA-Reader "v max kinetic microplate reader" (Molecular Devices Cooperation, Menlo Park, USA) anhand der Software SOFTmaxTM for Macintosh. Die Messung erfolgte bei 450nm. Die gemessenen RANTES-Konzentrationen (n = 4) wurden wie in 2.2.3 dargestellt statistisch ausgewertet.

2.5 Chemotaxis-Assay

Die Wirkung chemotaktischer Substanzen auf ihre Zielzellen (hier Makrophagen) wurde mit Hilfe eines Chemotaxis-Assays untersucht. Dazu wurde ein System aus zwei Kammern, welche durch eine permeable Membran voneinander getrennt sind, verwendet (Abb. 13). Auf der einen Seite der Membran wurden stimulierte D5-Tumorzellen (Chemotaxinseite), auf der anderen Seite Makrophagen kultiviert. Wenn D5-Tumorzellen Substanzen bilden, welche chemotaktisch auf Makrophagen wirken, werden die Makrophagen aktiv durch die Membranporen zur Gegenseite migrieren.

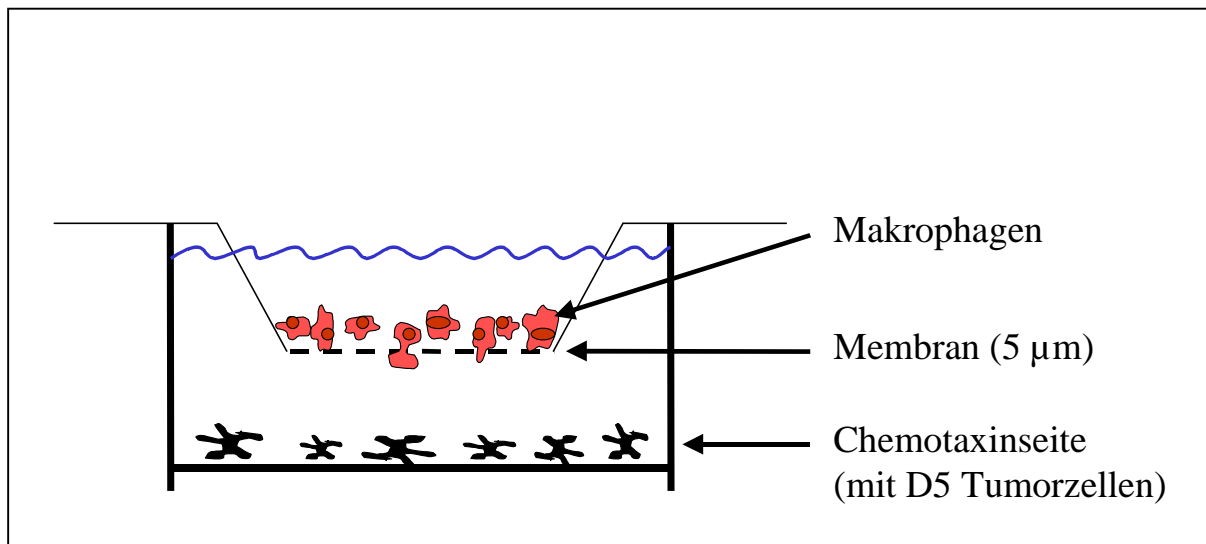


Abb. 13: Schematische Darstellung des chemotaktischen Assays

Zur Durchführung wurden 24-Well (Transwell-) Platten mit passenden 5µm-Pore-Inserts (Costar® Corning Corporation, Cambridge, MA) verwendet. In das untere Well wurden 2×10^5 D5-Tumorzellen pipettiert. Nach drei Stunden wurden die nicht adhärenen Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 750µl mit oder ohne Zytokine (Tabelle 4) über Nacht inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Anschließend wurden $3,5 \times 10^5$ Makrophagen der Zelllinie DJ 2pm in 250µl Medium auf die Membran gegeben und für vier Stunden (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Die Zellen der Chemotaxinseite wurden mit Trypsin abgelöst, gewaschen und mit einem makrophagen-spezifischen Antikörper (Rat-anti-Mouse CD11b, Klon:M1/70, PE-konjugiert, PharMingen)

gefärbt. Die Anzahl migrierter Makrophagen durch die permeable Membran wurde anschliessend durchflusszytometrisch bestimmt und die Ergebnisse wie in 2.2.3 dargestellt statistisch ausgewertet. Ein Schema der Inkubation von D5-Zellen und die dazugehörigen Kontrollansätze sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13:

Medium	D5 (2×10^5 Zellen)	IFN- γ (20 ng/ml)	TNF- α (350 U/ml)
+	+	+	
+	+		+
Kontrollen:			
+			
+	+		
+		+	
+			+

3 Ergebnisse

3.1 Expression der TNF-Rezeptoren I, II und Fas (Apo 95)

Die Expression der TNF-Rezeptoren I und II sowie von Fas wurde anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen mittels spezifischer AK bestimmt.

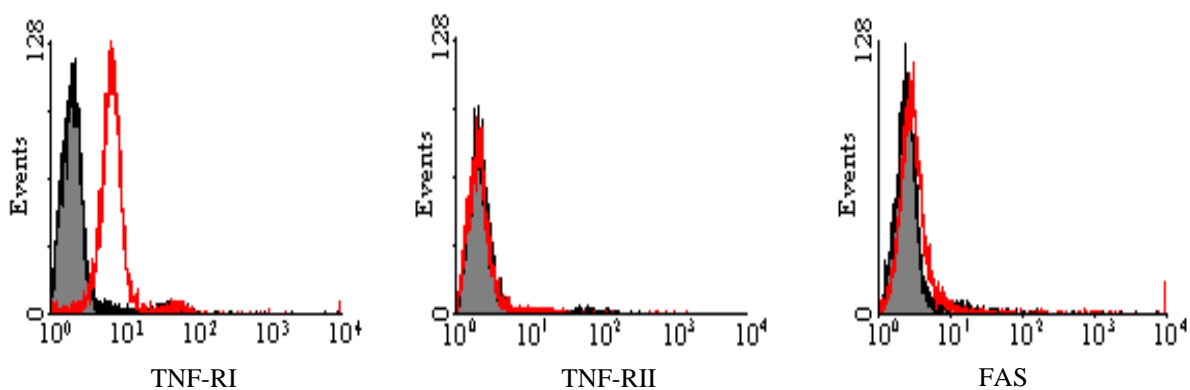


Abb. 14: Expression der TNF-Rezeptoren I, II und Fas unstimulierter D5-Tumorzellen; Die Fluoreszenzintensität der unspezifischen AK-Bindungen (IgG-Isotypkontrolle) ist als graue, die spezifische AK-Bindungen als rote Kurve dargestellt.

TNF-R I wird von D5 exprimiert. Im Gegensatz dazu findet sich keine Expression von TNF-R II und Fas auf D5 (Abb. 14).

Da Zheng et al. zeigen konnten, dass IFN- γ zur vermehrten Expression von Fas auf verschiedenen Tumorzelllinien führt (Zheng et al. 2002), untersuchten wir die Expression von Fas sowie von TNF- Rezeptor I und II nach 24-stündiger Inkubation mit IFN- γ (20 ng/ml).

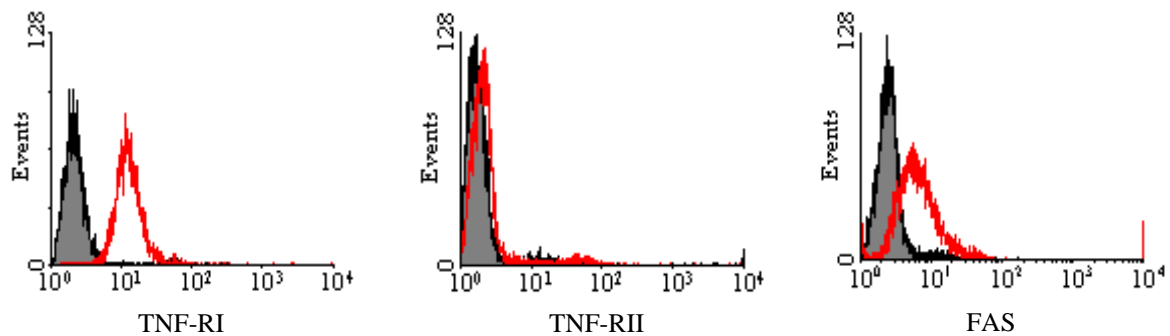


Abb. 15: Expression der TNF-Rezeptoren I, II und Fas auf D5-Tumorzellen nach Stimulation mit IFN- γ (20 ng/ml); Die Fluoreszenzintensität der unspezifischen AK-Bindungen (IgG-Isotypkontrolle) ist als graue, die spezifische AK-Bindungen als rote Kurve dargestellt.

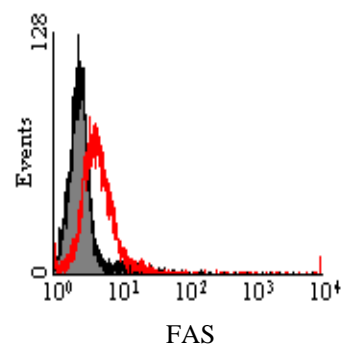


Abb. 16: Fas-Expression auf D5-Tumorzellen nach Stimulation mit TNF- α (350 U/ml); Die Fluoreszenzintensität der unspezifischen AK-Bindungen (IgG-Isotypkontrolle) ist als graue, die spezifische AK-Bindungen als rote Kurve dargestellt.

Durch Inkubation der Zelle mit IFN- γ (20 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml) wird die Expression von Fas induziert. IFN- γ (20 ng/ml) induziert jedoch nicht die Expression des TNF-R II (Abb. 15 und 16).

3.2 MHC-Expression

Mögliche tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene (Ag) werden an MHC I- und II-Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche exprimiert, wo sie mit spezifischen T-Zellrezeptoren interagieren können. MHC I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Körper- und von einigen Tumorzellen exprimiert, wohingegen MHC II-Moleküle nur von Makrophagen, Dendritischen und B-Zellen exprimiert werden. MHC I-Moleküle präsentieren Antigene aus dem Zellinneren, im Gegensatz dazu präsentieren MHC II-Moleküle Antigene, welche von phagozytosefähigen Zellen aufgenommen wurden. Die Expression von MHC I (D^b/K^b) und MHC II (IAb^β) von D5-Tumorzellen wurde durchflusszytometrisch vor und nach 24-stündiger Inkubation mit $IFN-\gamma$ (20 ng/ml) untersucht.

3.2.1 MHC I-Expression

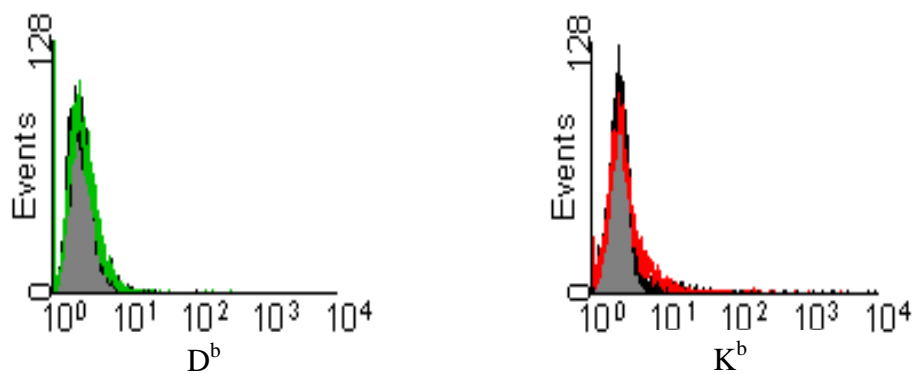


Abb. 17: MHC I-Expression unstimulierter D5-Tumorzellen; Die Fluoreszenzintensität der unspezifischen AK-Bindungen (IgG-Isotypkontrolle) ist als graue, die spezifische AK-Bindungen als grüne (D^b) und rote (K^b) Kurve dargestellt.

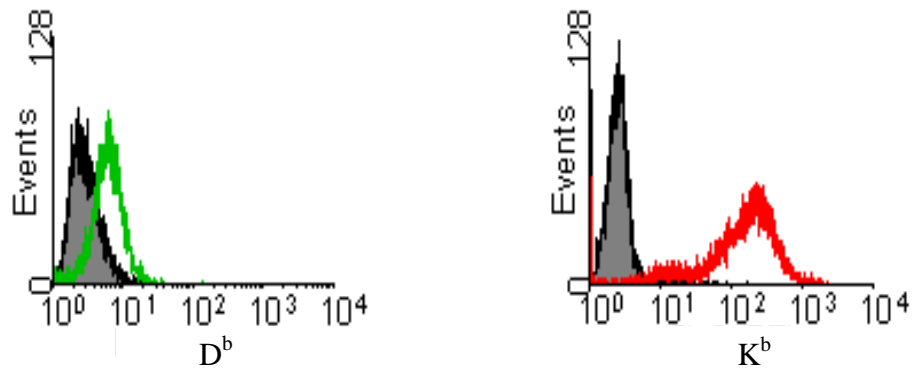


Abb. 18: MHC I-Expression auf D5-Tumorzellen nach Stimulation mit IFN- γ (20 ng/ml); Die Fluoreszenzintensität der unspezifischen AK-Bindungen (IgG-Isotypkontrolle) ist als graue, die spezifische AK-Bindungen als grüne (D^b) und rote (K^b) Kurve dargestellt.

3.2.2 MHC II-Expression

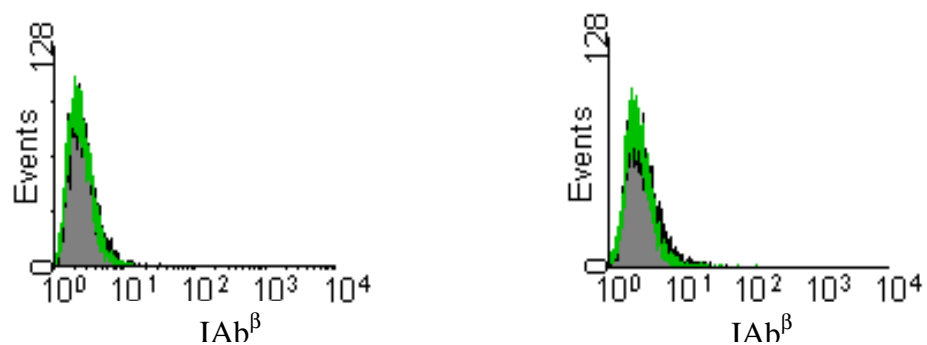


Abb. 19: MHC II-Expression unstimulierter (linkes Histogramm) und mit IFN- γ (20 ng/ml) stimulierter (rechtes Histogramm) D5-Tumorzellen; Die Fluoreszenzintensität der unspezifischen AK-Bindungen (IgG-Isotypkontrolle) ist als graue, die spezifische AK-Bindungen als grüne (IAb^β) Kurve dargestellt.

Sowohl MHC I (K^b/D^b) als auch MHC II (IAb^β) sind auf unstimulierten D5-Tumorzellen nicht nachweisbar. Nach 24-stündiger IFN- γ Stimulation (20 ng/ml) kommt es zur Expression von MHC I-, jedoch nicht von MHC II-Molekülen (Abb. 17, 18 und 19).

3.3 Zytokininduzierte Apoptose

Da D5 nach Inkubation mit IFN- γ und TNF- α Fas sowie TNF-R I exprimiert, untersuchten wir, ob *in vitro* durch den spezifisch aktivierenden Ak FasAb (Jo2) bzw. durch die Liganden LT- α und TNF- α Apoptose in D5 induziert werden kann.

3.3.1 Experimentelle Ermittlung geeigneter Inkubationsbedingungen

3.3.1.1 TNF- α

Um zu prüfen, ob TNF- α Apoptose in D5-Tumorzellen induziert, wurden die Tumorzellen für 12 Stunden (Abb. 20) und 24 Stunden (Abb. 21) mit TNF- α in steigender Konzentration von 0 bis 2500 U/ml sowie mit und ohne Cycloheximid, einem Proteinsyntheseblocker (Translationshemmer), inkubiert. Die Apoptose wurde durch Anfärbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und PI durchflusszytometrisch bestimmt.

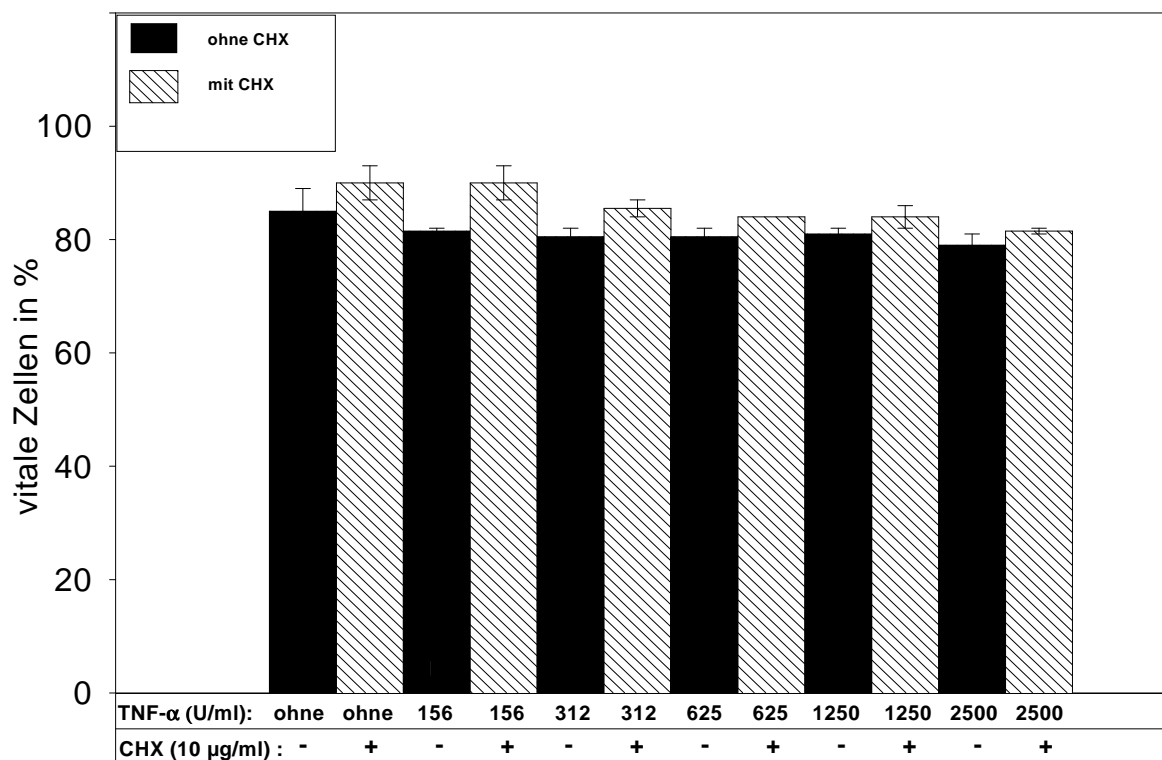


Abb. 20: Einfluss von TNF- α (0–2500 U/ml) auf die Apoptoseraten von D5 nach 12 Stunden Inkubation mit und ohne Koinkubation mit CHX (10 μ g/ml).
n = 2:

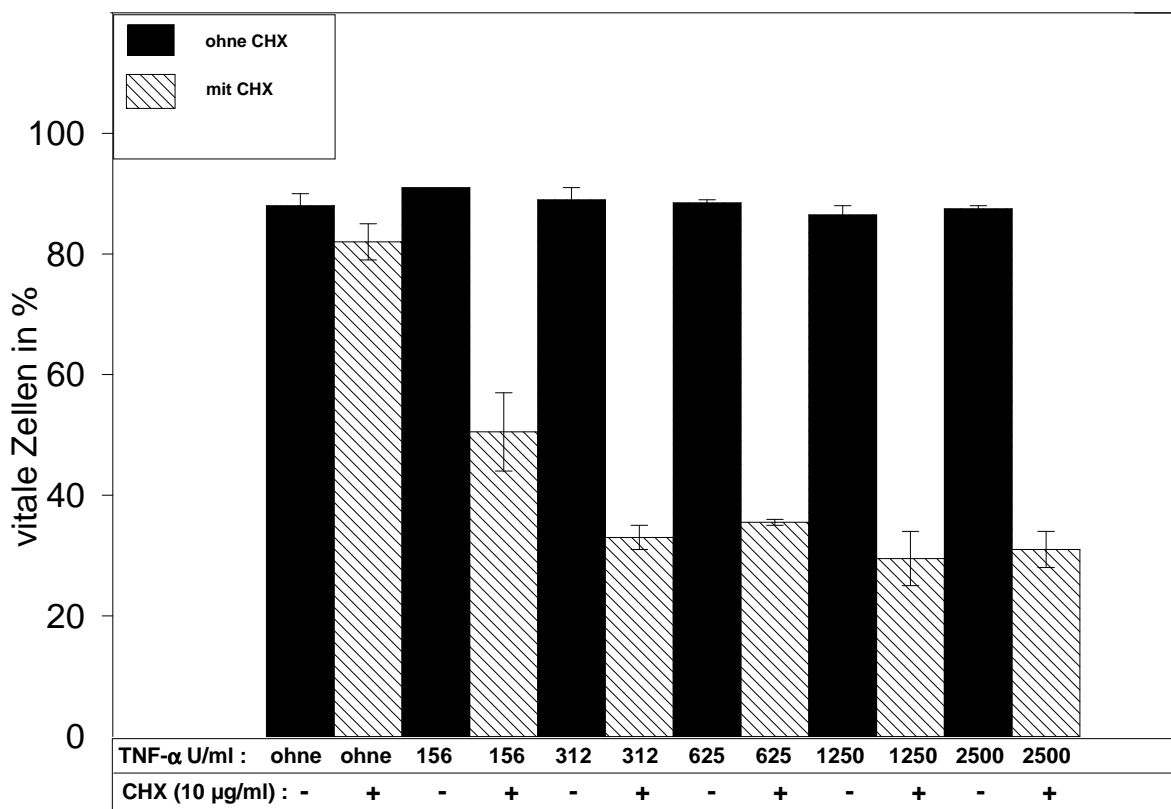


Abb. 21: Einfluss von TNF- α (0–2500 U/ml) auf die Apoptoseraten von D5 nach 24 Stunden Inkubation mit und ohne Koinkubation mit CHX (10 µg/ml). n = 2;

Weder nach 12- noch nach 24-stündiger Inkubation mit TNF- α (0-2500 U/ml) kommt es zur Apoptoseinduktion. Nach 12-stündiger TNF- α -Inkubation mit CHX (10 µg/ml) findet sich ein leichter Anstieg der Apoptoserate in D5 gegenüber der Kontrolle. Nach 24-stündiger Inkubation mit TNF- α und CHX ist eine dosisabhängige Steigerung der Apoptoserate in D5 von 12% auf 67% (bei 312 U/ml) zu beobachten. Eine weitere Steigerung der TNF- α Konzentration führt zu keiner Zunahme der Apoptoserate.

3.3.1.2 LT- α

Auch LT- α wurde auf seine apoptoseinduzierende Wirkung hin überprüft. Dabei wurden die D5-Tumorzellen für 24 Stunden mit LT- α in steigender Konzentration (0 bis 10 ng/ml) mit und ohne CHX (10 µg/ml) inkubiert (Abb. 22). Die Anfärbung der Zellen zur Bestimmung der Apoptose erfolgte durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-FITC und PI-Färbung.

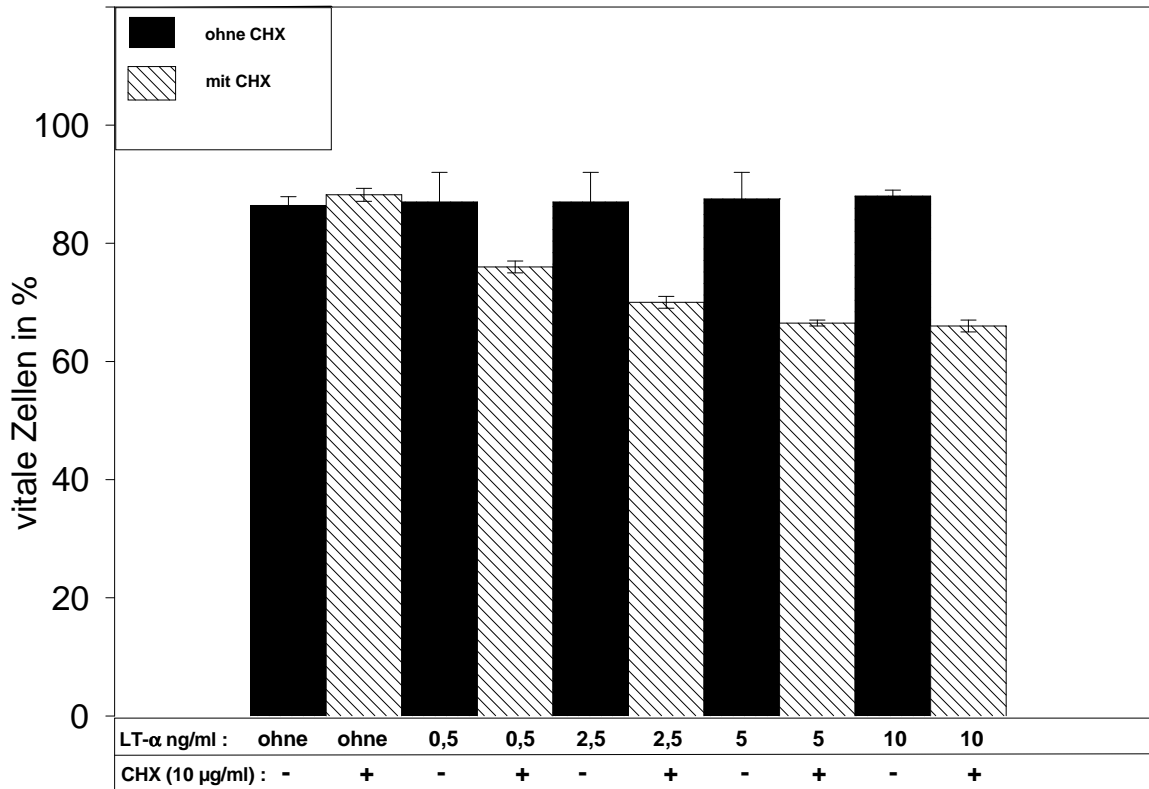


Abb. 22: Einfluss von LT- α (0–10 ng/ml) auf die Apoptoseraten von D5 nach 24 Stunden Inkubation mit und ohne Koinkubation mit CHX (10 μ g/ml).
n = 2;

Nach 24 Stunden Inkubation von D5 mit LT- α (0 bis 10ng/ml) kommt es zu keiner Apoptoseinduktion. Eine Koinkubation mit CHX bewirkt eine dosisabhängige Steigerung der Apoptoserate von 12% auf 34%, wobei die höchsten Apoptoseraten mit 5 ng/ml bzw. 10 ng/ml LT- α erzielt werden.

3.3.2 Festlegung der Zytokindosen und Inkubationszeiträume

Durch die Vorversuche wurde die Dosis-Wirkbeziehung von TNF- α und LT- α ermittelt. Hierbei fand sich die maximale apoptoseinduzierende Wirkung für TNF- α ab 312 U/ml und für LT- α ab 5 ng/ml in Verbindung mit CHX (10 μ g/ml). Die Inkubationsdauer wurde entsprechend der Ergebnisse, welche in Abb. 21 und 22 dargestellt sind, auf 24 Stunden festgelegt.

3.3.3 IFN- γ /CHX Kontrollgruppen

IFN- γ kann in Abhängigkeit des Tumormodells direkt zytotoxisch wirken. Um zu prüfen, ob IFN- γ in D5 Apoptose induziert, wurden die Tumorzellen mit IFN- γ (20 ng/ml) in An- bzw. Abwesenheit von CHX (10 μ g/ml) inkubiert.

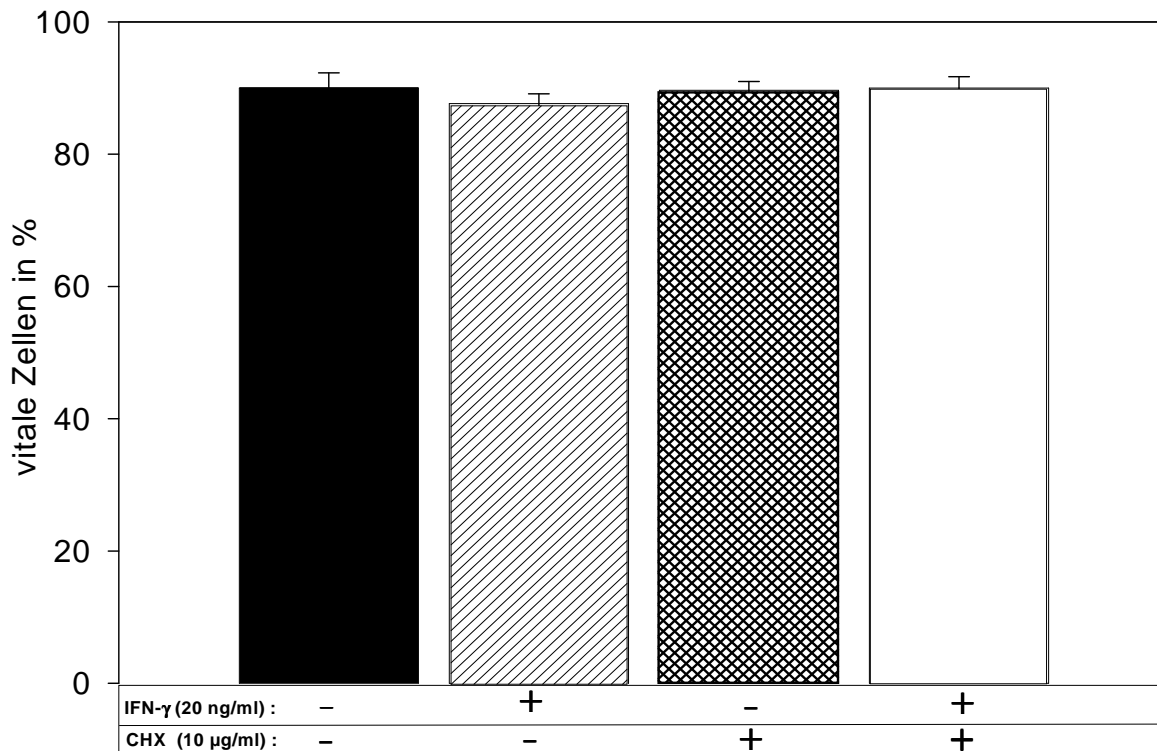


Abb. 23: Einfluss von IFN- γ (20 ng/ml) und CHX (10 μ g/ml) auf die Apoptoseinduktion in D5 nach 24 Stunden Inkubation. n = 3;

IFN- γ (20 ng/ml) alleine oder in Kombination mit CHX (10 μ g/ml) führt zu keiner Apoptoseinduktion in D5-Tumorzellen (Abb. 23).

3.4 Messung der Apoptose nach Inkubation von FasAb, LT- α , TNF- α , IFN- γ , CHX und deren Kombinationen

Da in Vorversuchen durch Inkubation der D5-Tumorzellen mit TNF- α und LT- α eine deutliche Apoptoseinduktion nur in Verbindung mit CHX erreicht werden konnte, und FasAb auch bei zusätzlicher Inkubation mit CHX nicht apoptotisch wirksam war, wollten wir

untersuchen, ob möglicherweise durch Kombination von zwei bzw. drei Liganden der TNF-Familie (FasAb, LT- α und TNF- α) Apoptose induziert werden kann.

Bekannt ist, dass der (p55-) LT/TNF-Rezeptor über andere Signalkaskaden Apoptose einleitet als Fas. Bei gleichzeitiger Aktivierung beider Rezeptorarten kann es so zu einem synergistischen apoptoseinduzierenden Effekt kommen (Wong et al. 1996). Bei der Durchführung der Versuche wurden Tumorzellen mit und ohne IFN- γ sowie CHX inkubiert und mit unterschiedlichen Kombinationen von Zytokinen (FasAb/LT- α /TNF- α) stimuliert. Die Apoptose wurde mittels Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und PI durchflusszytometrisch bestimmt. In den Abb. 24 und 25 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Zwischen den mit (*) verbundenen Säulen besteht ein signifikanter Unterschied im Sinne von $p < 0,05$ (siehe 2.2.3).

3.4.1 Apoptoseraten der einzelnen Zytokine

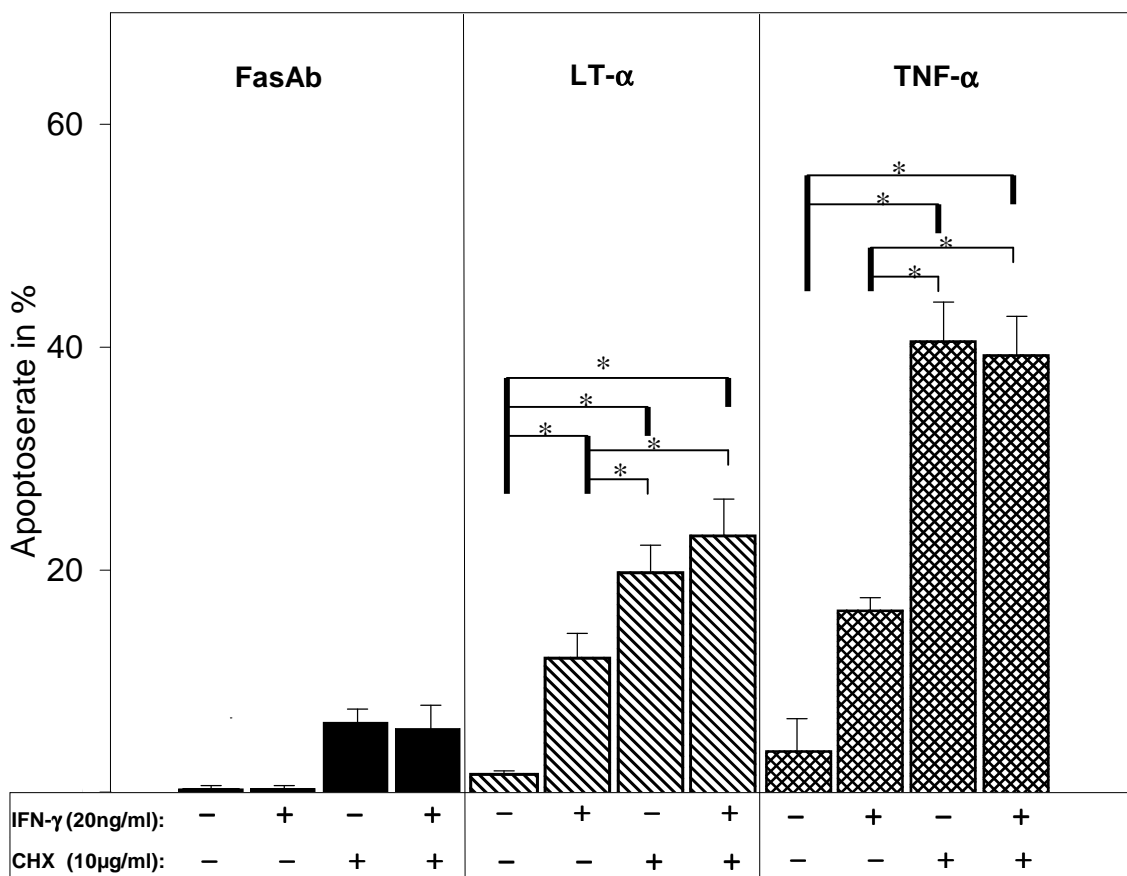


Abb. 24: Apoptoseraten nach 24 Stunden Inkubation von D5-Tumorzellen mit den Zytokinen FasAb (10 μ g/ml), LT- α (5 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml) sowie nach Koinkubation mit und ohne IFN- γ (20 ng/ml) und CHX (10 μ g/ml). n = 3;

Durch Präinkubation von D5 mit IFN- γ (20 ng/ml) kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate nach Inkubation mit LT- α auf 15%. Koinkubation der Zellen mit CHX (10 μ g/ml) sensibilisiert die Tumorzellen für zytokininduzierte Apoptose.

LT- α führt zu einer Steigerung der Apoptoserate auf 20% bei gleichzeitiger Anwesenheit von CHX. TNF- α steigert die Apoptoserate nach Präinkubation mit CHX auf 40%. IFN- γ (20 ng/ml) bewirkt keinen additiven Effekt auf die Apoptoseinduktion bei gleichzeitiger Inkubation mit Zytokinen (FasAb, LT- α oder TNF- α) und CHX.

3.4.2 Apoptoseraten der Zytokine in Kombination

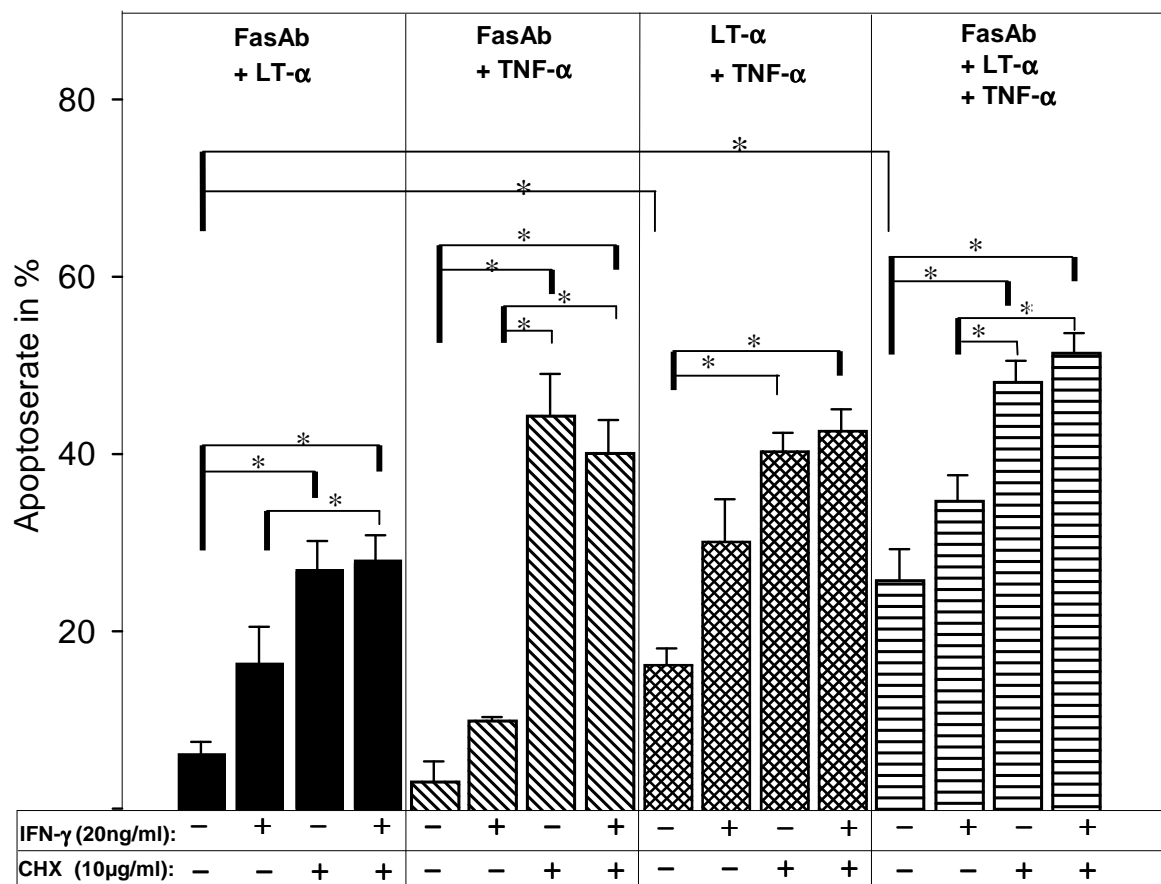


Abb. 25: Apoptoseraten nach 24 Stunden Inkubation von D5-Tumorzellen mit den Zytokinkombinationen aus FasAb (10 μ g/ml), LT- α (5 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml), sowie nach Koinkubation mit und ohne IFN- γ (20 ng/ml) und CHX (10 μ g/ml). n = 3;

Eine signifikante Zunahme der Apoptoserate gegenüber der Inkubation mit den Einzelsubstanzen (LT- α : 1% bzw. TNF- α : 3%) wird durch die Kombination der Zytokine LT- α und TNF- α (16%) beobachtet. Zusätzliche Inkubation mit FasAb führt zu keiner signifikanten Wirkungssteigerung. Eine weitere Steigerung der Apoptoseraten wird nach Inkubation mit CHX beobachtet. IFN- γ hat keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion. Die Inkubation mit einer Kombination aus drei Zytokinen (FasAb + LT- α + TNF- α) und CHX führt zu keiner weiteren Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zu den Zellen, welche mit zwei Zytokinen (TNF- α + FasAb bzw. LT- α) und CHX inkubiert werden (Abb. 25).

3.5 Nachweis intrazellulärer Apoptoseinhibitionsproteine

Wie unter 3.1 gezeigt, exprimieren D5-Tumorzellen die Rezeptoren für FasL, LT- α und TNF- α . Durch Inkubation mit FasAb, LT- α oder TNF- α kommt es zu keiner signifikanten Induktion der Apoptose in D5. Nach Stimulation von D5 mit IFN- γ , was zu einer Aufregulation von Fas bei vorhandenen TNF-R I führt, konnten wir eine geringe Steigerung der Apoptoserate von 1% auf 12% nach Inkubation mit LT- α erzielen. Eine Inkubation der Tumorzellen mit FasAb und TNF- α führte zu keiner Apoptoseinduktion. Da CHX die Zellen gegenüber LT- α und TNF- α sensibilisiert, deutet dies auf die Anwesenheit apoptoseinhibierender Faktoren in D5 hin, welche durch CHX blockiert werden können. Vucic und Grossman et al. konnten in Melanomzellen die Expression der Apoptoseinhibitionsproteinen ML-IAP und Survivin nachweisen (Vucic et al. 2002; Vucic et al. 2000; Grossman et al. 1999).

Mittels RT-PCR (Abb. 26) und FACS-Analyse (Abb. 27-29) wurde durch Färbung mit spezifischen Antikörpern in D5 die Expression der apoptoseinhibitorischen Proteine c-IAP I, II und Survivin untersucht.

3.5.1 mRNA Nachweis

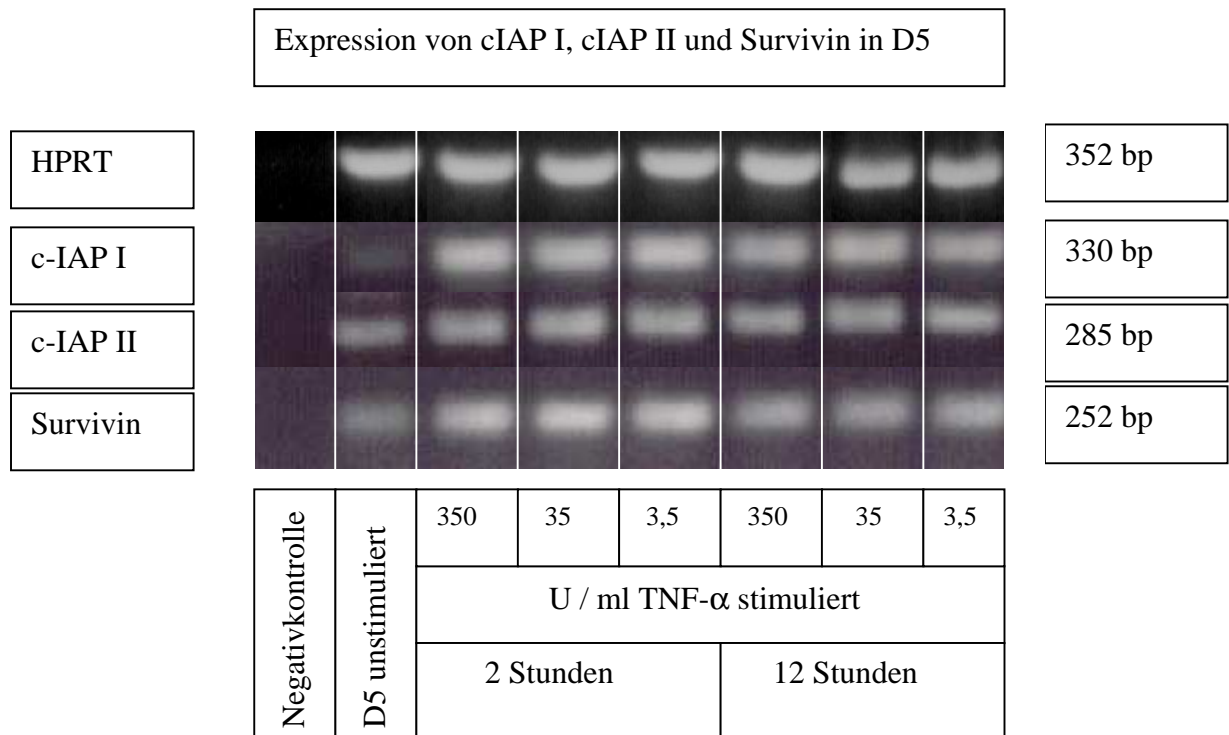


Abb. 26: mRNA-Expression von c-IAP I, II und Survivin in D5-Tumorzellen mittels RT-PCR-Nachweis nach zwei und zwölf Stunden Inkubation mit TNF- α (0; 3,5; 35; 350 U/ml); Als Housekeeping-Gen wurde die HPRT-Expression herangezogen.

c-IAP I, c-IAP II und Survivin werden in D5 exprimiert. Nach Stimulation von D5 mit TNF- α kommt es zu einer Aufregulation von c-IAP I und Survivin. c-IAP II scheint konstitutiv exprimiert zu werden (Abb. 26).

3.5.2 Proteinnachweis

3.5.2.1 c-IAP I-Expression

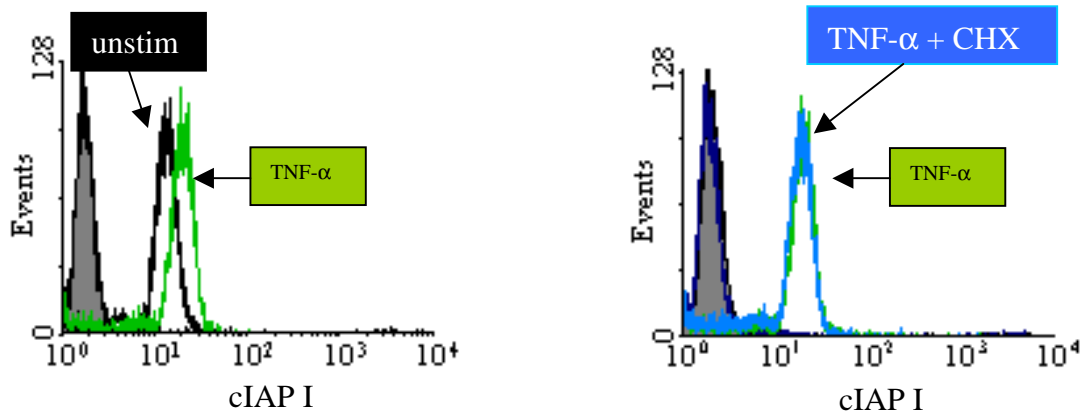


Abb. 27: c-IAP I-Expression von unstimulierten (schwarze Kurve) D5-Zellen, nach Stimulation mit TNF- α (350 U/ml, grüne Kurve) und nach Stimulation mit TNF- α bei gleichzeitiger CHX-Inkubation (10 μ g/ml, blaue Kurve).

3.5.2.2 c-IAP II-Expression

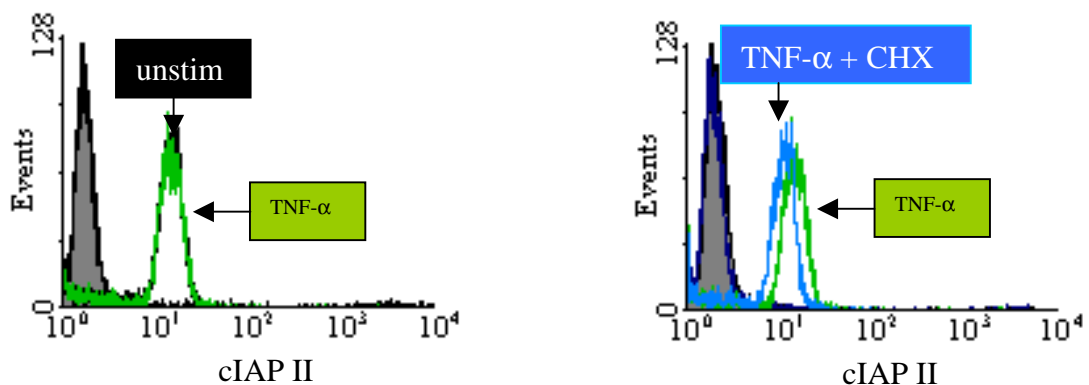


Abb. 28: c-IAP II-Expression von unstimulierten (schwarze Kurve) D5-Zellen, nach Stimulation mit TNF- α (350 U/ml, grüne Kurve) und nach Stimulation mit TNF- α bei gleichzeitiger CHX-Inkubation (10 μ g/ml, blaue Kurve).

3.5.2.3 Survivin-Expression

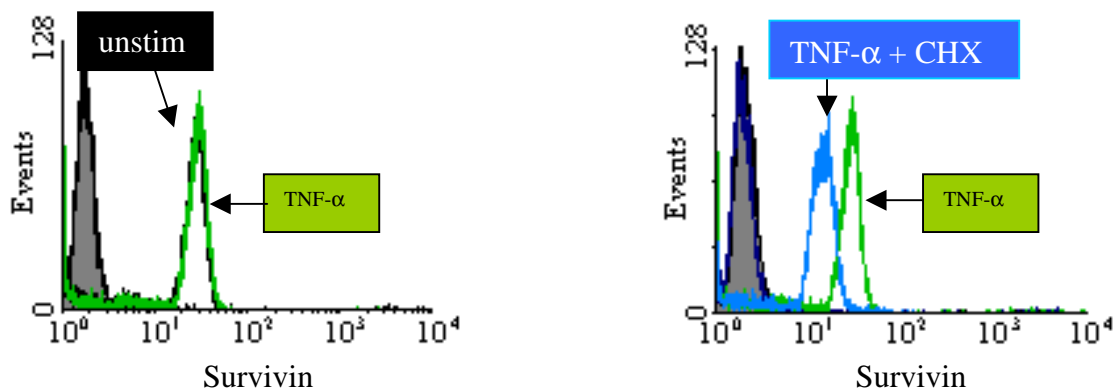


Abb. 29: Survivin-Expression von unstimulierten (schwarze Kurve) D5-Zellen, nach Stimulation mit TNF- α (350 U/ml, grüne Kurve) und nach Stimulation mit TNF- α bei gleichzeitiger CHX-Inkubation (10 μ g/ml, blaue Kurve).

c-IAP I, c-IAP II und Survivin werden konstitutiv in D5 exprimiert. Nach sechs-stündiger TNF- α -Inkubation kommt es zur vermehrten c-IAP I-Expression. Die Expression von c-IAP II und Survivin bleiben hingegen nach TNF- α -Inkubation unbeeinflusst. Durch Inkubation mit CHX und TNF- α kommt es zu einer verminderten Expression von c-IAP II und Survivin, wohingegen die c-IAP I-Expression unverändert bleibt (Abb. 27-29).

3.6 Untersuchung der Chemokinexpression von T_E und D5

Da durch Inkubation der D5-Tumorzellen mit IFN- γ , FasAb, LT- α und TNF- α nur geringe Apoptoseraten erzielt werden können, und die Anwesenheit von apoptoseinhibitorischen Proteinen in D5 nachgewiesen werden konnte, wollten wir untersuchen, ob im zugrundeliegenden Mausmodell (Abb. 4) andere Mechanismen als die der direkten T-zellabhängigen Zytotoxizität Einfluss auf die Tumorregression nehmen können.

Sonouchi et al. wiesen 1994 die mRNA-Expression von Makrophagen/Monozyten-Lockstoffen (Chemokinen) in murinen Nierenkarzinomzellen nach (Sonouchi et al. 1994). Um zu prüfen, ob nach adoptivem Transfer tumorspezifischer T-Zellen Faktoren freigesetzt werden, welche chemotaktisch auf phagozytosefähige Immunzellen wirken, untersuchten wir die Expression von Chemokinen sowohl in T_E, als auch in D5-Tumorzellen mittels ELISA und RT-PCR.

3.6.1 Chemokinexpression in T_E

3.6.1.1 Nachweis der tumorspezifischen Reaktion von T_E

Um zu prüfen, ob die Tumorzellvaksinierung mit D5G6 zur Induktion tumorspezifischer T-Zellen führt, wurden diese auf ihre tumorspezifische Expression von TNF- α (mittels RT-PCR, Abb. 30) und IFN- γ (mittels ELISA, Abb. 31) hin untersucht. Dieser Messung unterzogen wir T_E in Reinkultur und T_E, welche entweder zusammen mit D5, mit MCA-310 (einem syngenem Tumor) oder mit anti-CD3 inkubiert wurden. Anti-CD3 ist komplementär zum Antigen CD3, einer T-zellrezeptorassoziierten Polypeptidkette, welche eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion spielt. Die Bindung von anti-CD3 an CD3 bewirkt eine maximale T-Zellstimulation.

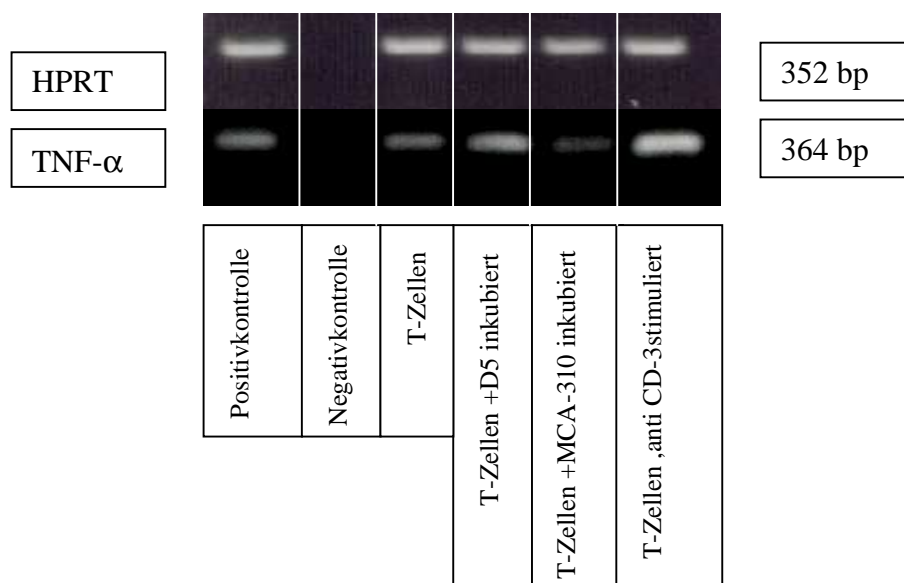


Abb. 30: Untersuchung der mRNA-Expression von TNF- α mittels RT-PCR in T_E nach Koinkubation mit D5- und MCA-310-Tumorzellen sowie nach anti-CD3 Stimulation; Der Inkubationszeitraum betrug sechs Stunden. Als Housekeeping-Gen wurde die HPRT-Expression herangezogen.

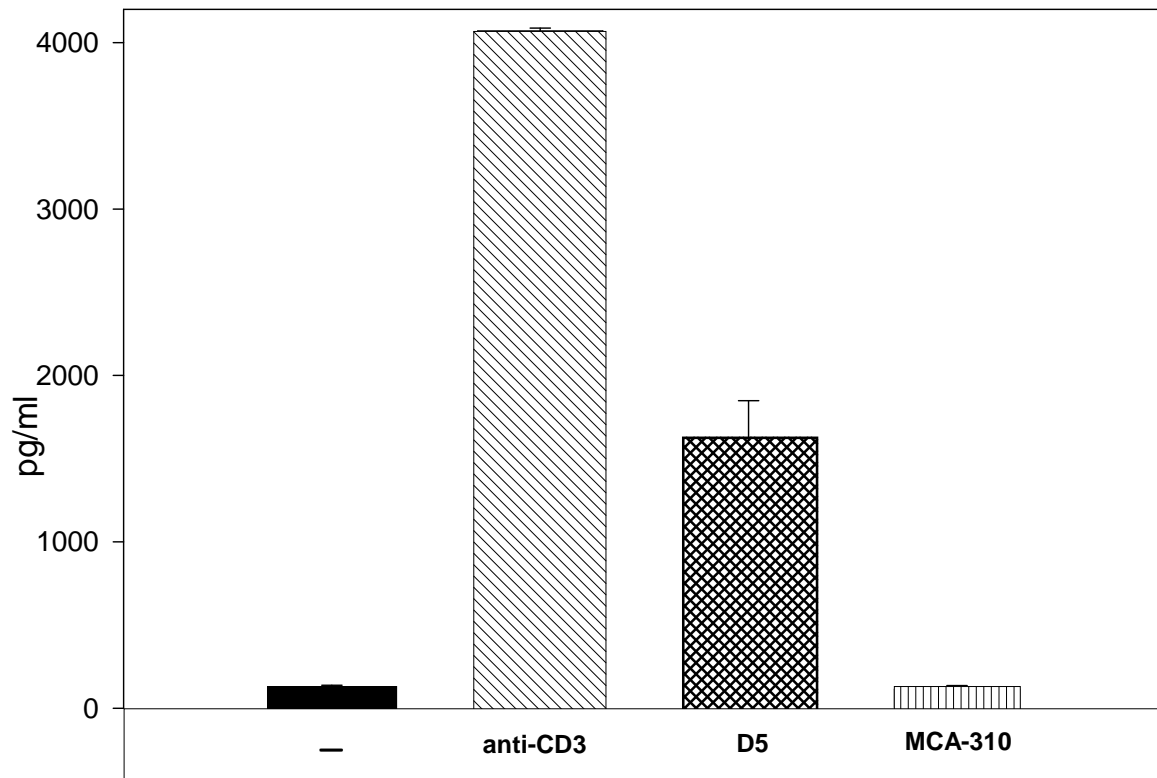


Abb. 31: Messung der IFN- γ Konzentration mittels ELISA im Überstand von T-Zellen aus TVDLK sowie nach anti-CD3 Stimulation und Koinkubation mit D5 und MCA-310. Der Inkubationszeitraum betrug 24 Stunden. n = 2;

Nach Koinkubation von T-Zellen mit D5 wurde eine im Vergleich zu den Kontrollen (Medium und Kontrolltumor MCA-310) ausgeprägte TNF- α -mRNA- und IFN- γ -Expression gemessen.

3.6.1.2 mRNA-Expression von Chemokinen

Die Chemokin-mRNA von T_E wurden sowohl ohne als auch nach Stimulation mit anti-CD3 gemessen.

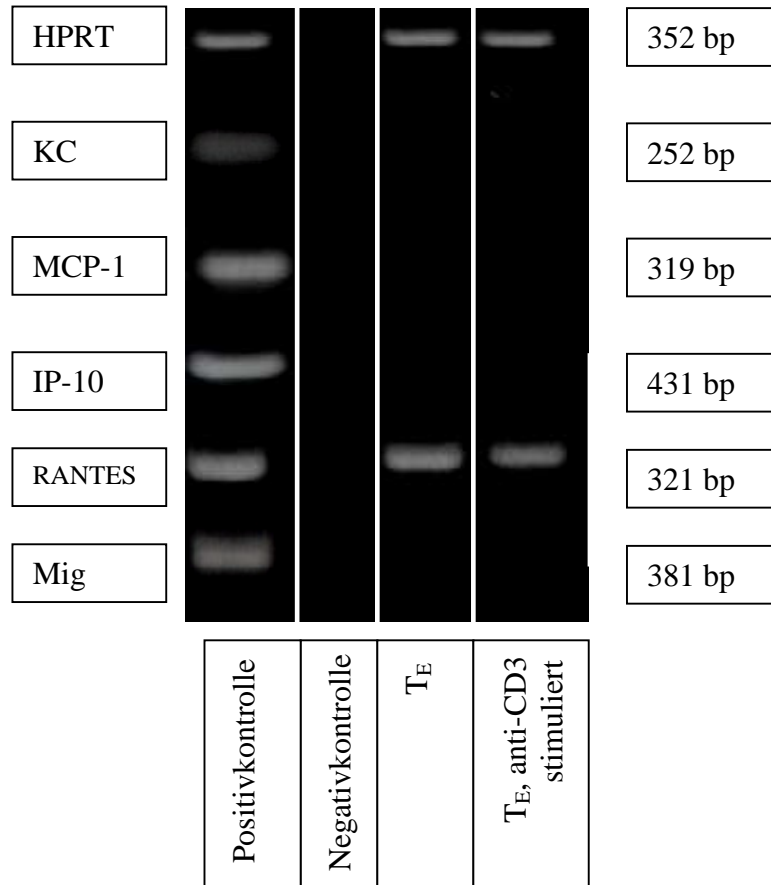


Abb. 32: Untersuchung der mRNA-Expression der Chemokin KC, MCP-1, IP-10, RANTES und Mig mittels RT-PCR in T_E und nach Stimulation mit anti-CD3; Der Inkubationszeitraum betrug sechs Stunden. Als House-keeping-Gen wurde die HPRT-Expression herangezogen.

mRNA von KC, MCP-1, IP-10, Mig wird weder von unstimulierten T_E noch nach anti-CD3 Stimulation exprimiert. RANTES ist auf mRNA-Ebene mit und ohne anti-CD3 Stimulation nachweisbar (Abb. 32).

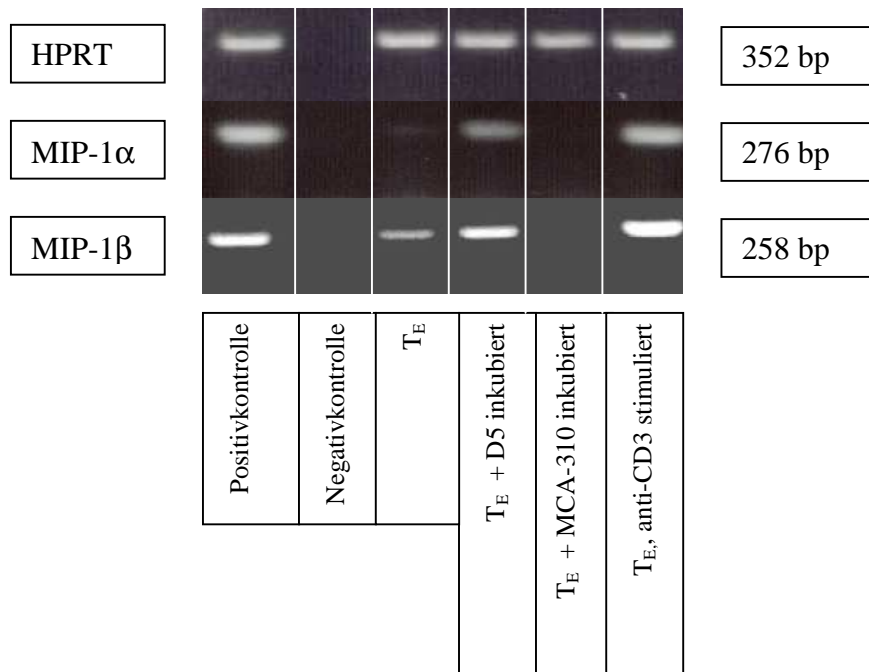


Abb. 33: Untersuchung der mRNA-Expression von MIP-1 α und MIP-1 β mittels RT-PCR in T_E, nach sechs Stunden Stimulation mit D5- und MCA-310-Tumorzellen sowie anti-CD3; Als Housekeeping-Gen wurde die HPRT-Expression herangezogen.

T_E exprimieren kein MIP-1 α und nur geringe Mengen MIP-1 β . Nach Stimulation von T_E mit D5 sowie mit anti-CD3, jedoch nicht nach Stimulation mit dem syngenem Kontrolltumor MCA-310, kommt es zur Expression von MIP-1 α - und zur Steigerung der Expression von MIP-1 β -mRNA (Abb. 33).

3.6.1.3 Chemokinnachweis

3.6.1.3.1 KC und MCP-1

Nachdem wir zeigen konnten, dass durch die Inkubation der T_E mit D5 KC- und MCP-1-mRNA nicht exprimiert wird, bestimmten wir zur Kontrolle dieser Ergebnisse den Gehalt an KC und MCP-1 im Überstand von T_E .

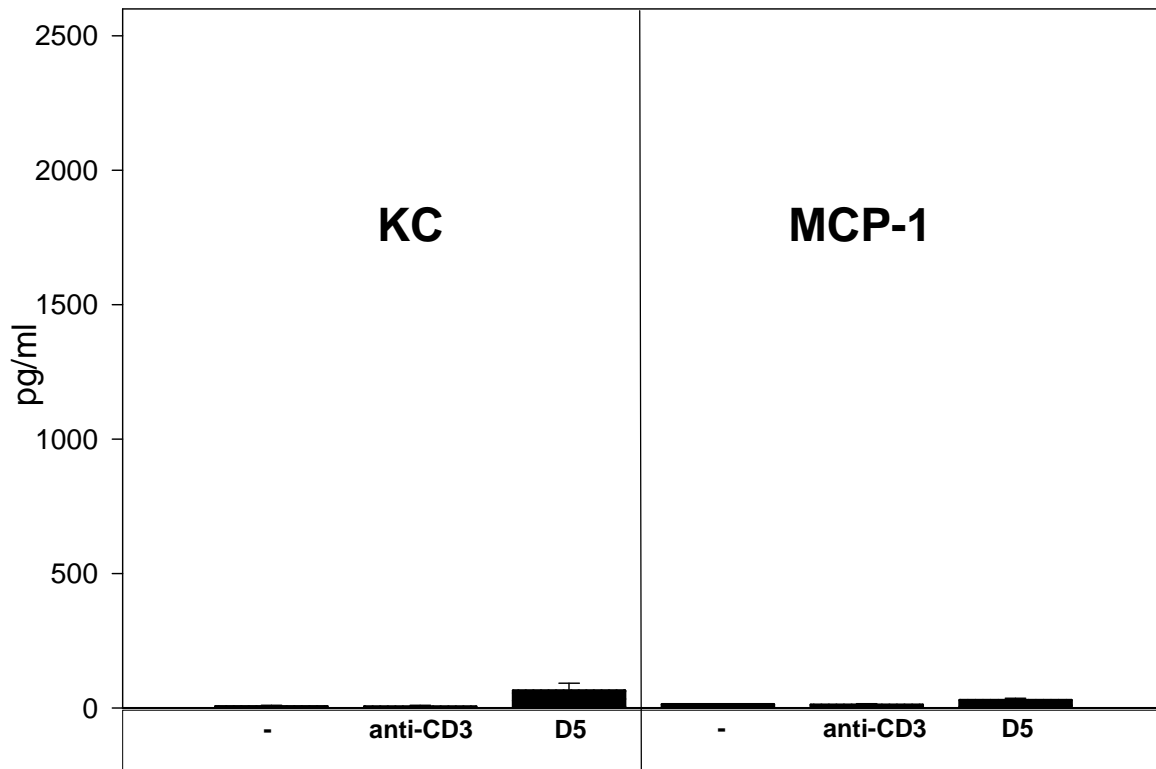


Abb. 34: Messung der KC und MCP-1 Konzentration im Überstand von T_E mittels ELISA sowie nach anti-CD3 Stimulation und Koinkubation mit D5. Der Inkubationszeitraum betrug 24 Stunden. $n = 2$;

Im Überstand von T_E befinden sich nur geringe Konzentrationen von KC und MCP-1 (6 und 14 pg/ml). Nach Stimulation der T_E mit anti-CD3 (3 und 12 pg/ml) und D5 (65 und 29 pg/ml) kommt es nur zu einer geringen Steigerung der Konzentration dieser Chemokine (Abb. 34).

3.6.1.3.2 RANTES

Da eine Expression von RANTES in T_E mittels PCR nachgewiesen wurde (Abb. 32), wollten wir eine mögliche tumorspezifische Sekretion untersuchen. Dazu wurden die RANTES-Konzentrationen im Überstand nach Inkubation der T_E mit anti-CD3, D5 und MCA-310 (über 24 Stunden) mittels ELISA gemessen (Abb. 35).

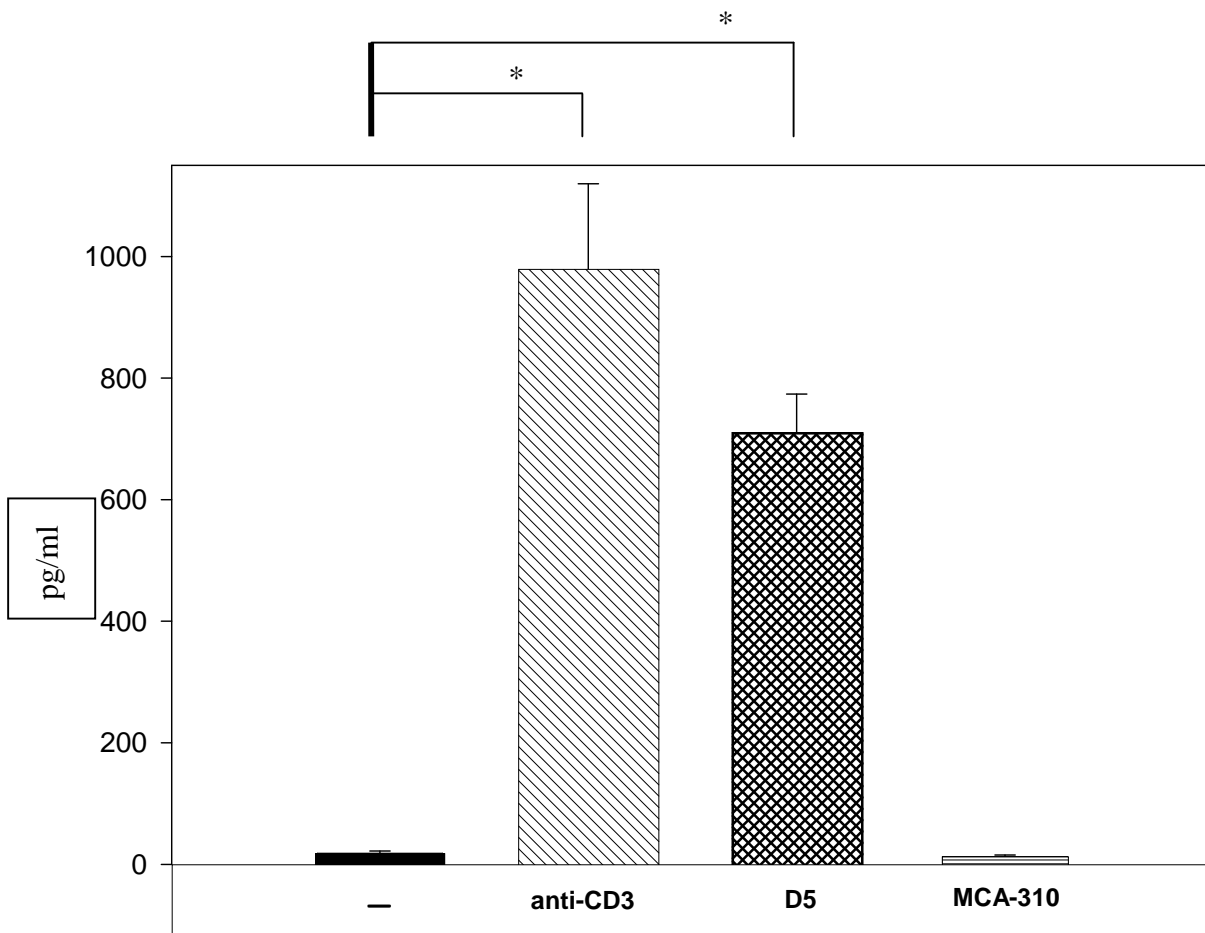


Abb. 35: Messung der RANTES Konzentration im Überstand von T_E mittels ELISA, sowie nach anti-CD3 Stimulation und Koinkubation mit D5 und MCA-310. Der Inkubationszeitraum betrug 24 Stunden. $n = 4$;

RANTES wird von T_E (D5-) tumorspezifisch sezerniert, da nach Koinkubation mit D5, nicht aber mit MCA-310, eine signifikante Zunahme von RANTES im Überstand nachweisbar ist.

3.6.2 Chemokinexpression in D5

3.6.2.1 mRNA-Nachweis

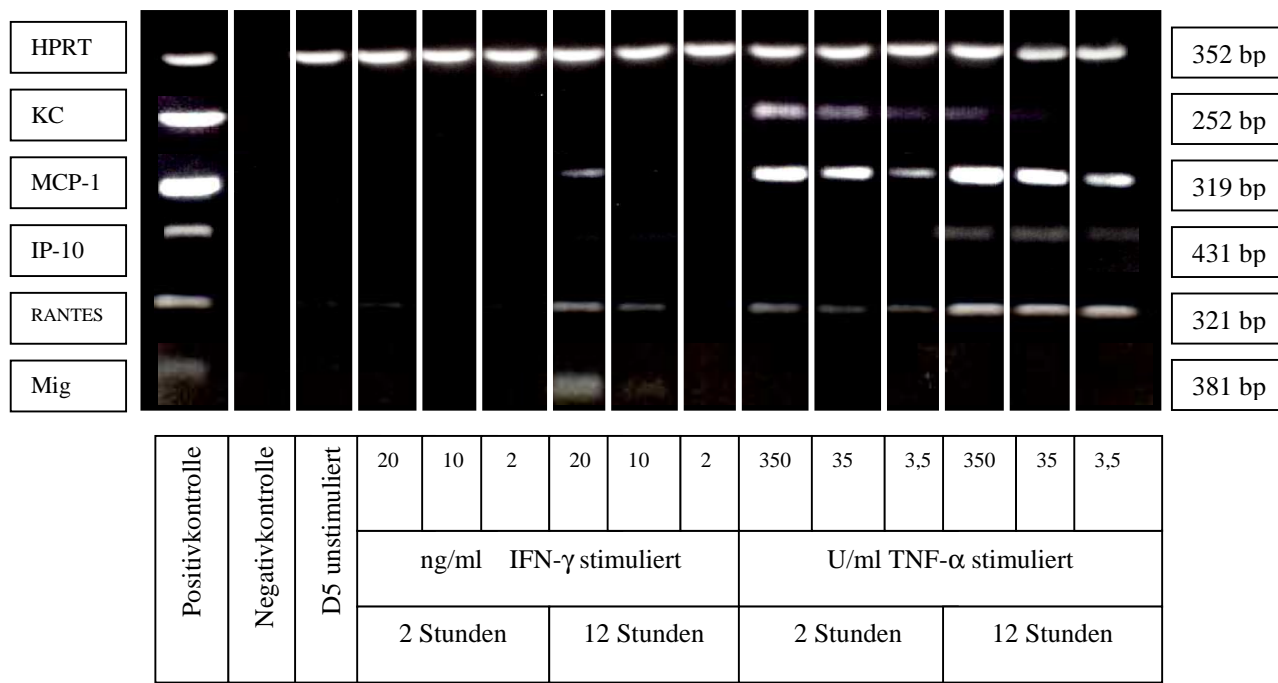


Abb. 36: Untersuchung der mRNA-Expression der Chemokine KC, MCP-1, IP-10, RANTES und Mig in D5-Tumorzellen mittels RT-PCR mit und ohne IFN- γ (2, 10, 20 ng/ml) und TNF- α (3.5, 35, 350 U/ml) Stimulation; Die Inkubationszeiträume betragen zwei und zwölf Stunden.

Die Chemokine KC, MCP-1, IP-10, RANTES und Mig können in unstimulierten D5-Zellen nicht nachgewiesen werden. Nach zwölfstündiger Inkubation mit IFN- γ (20 ng/ml) kommt es zur Expression der mRNA von MCP-1, RANTES und Mig. TNF- α stimuliert dosisabhängig (3.5, 35, 350 U/ml) die mRNA-Expression von KC, MCP-1, IP-10 und RANTES in D5 (Abb. 36).

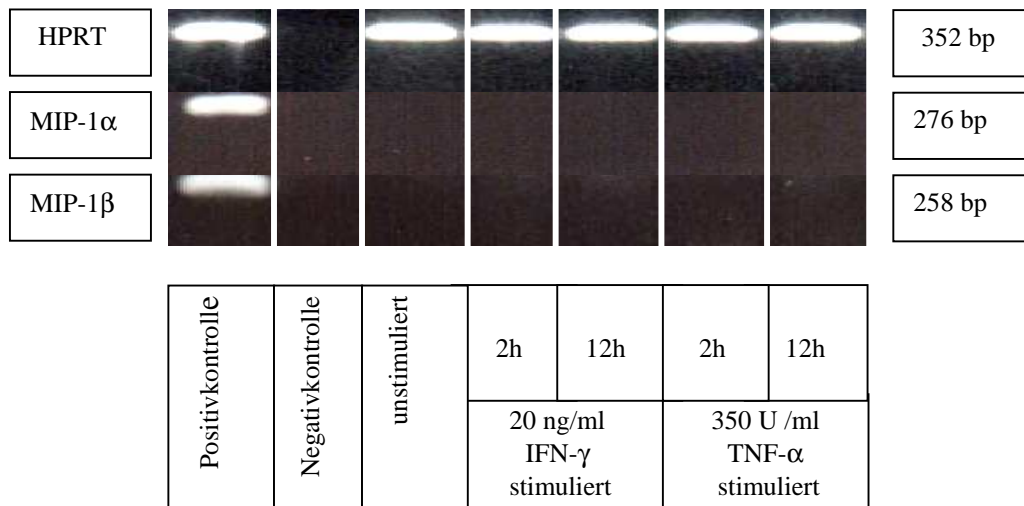


Abb. 37: Untersuchung der mRNA-Expression der Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β in D5-Tumorzellen mittels RT-PCR sowie in D5-Zellen nach IFN- γ (20 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml) Stimulation; Die Inkubationszeiträume betragen zwei und zwölf Stunden. Als Housekeeping-Gen wurde die HPRT-Expression herangezogen.

In D5 findet sich keine Expression der mRNA von MIP-1 α und MIP-1 β . Auch nach zwei- und zwölfstündiger Stimulation der Tumorzellen mit IFN- γ (20 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml) kommt es zu keiner Expression dieser Chemokine (Abb. 37).

3.6.2.2 Proteinnachweis

Um zu prüfen, ob KC und MCP-1 von D5 sezerniert werden, wurden diese Chemokine im Zellüberstand von D5 nach 24-stündiger Inkubation mit IFN- γ (20 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml) untersucht.

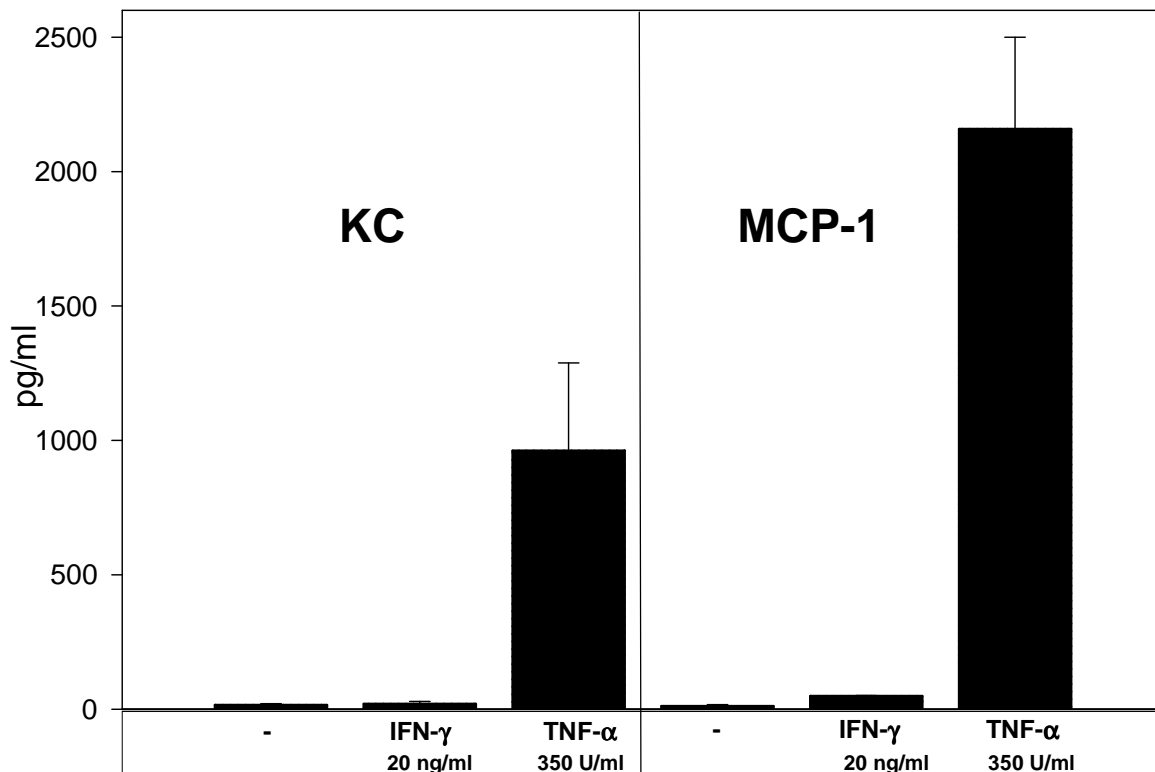


Abb. 38: Messung der KC und MCP-1 Konzentration mittels ELISA im Überstand von D5-Tumorzellen sowie in D5-Zellüberständen nach IFN- γ (20 ng/ml) und TNF- α (350 U/ml) Inkubation; Der Inkubationszeitraum betrug 24 Stunden. n = 2;

KC und MCP-1 werden im Überstand von unstimulierten D5-Zellen sowie nach 24-stündiger IFN- γ -Stimulation (20 ng/ml) in nur geringer (16 und 20 pg/ml bzw. 11 und 49 pg/ml) Konzentration sezerniert. Nach Inkubation mit TNF- α (350 U/ml, 24 Stunden) kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Sekretion von KC (962 pg/ml) und MCP-1 (2158 pg/ml) (Abb. 38).

3.6.3 Chemokin (-mRNA-) Expression in D5 nach Interaktion mit T_E

Desweiteren untersuchten wir, ob D5 die Chemokine KC-, MCP-1-, IP-10- und Mig-mRNA nicht nur nach Stimulation mit IFN- γ und TNF- α (3.6.2.1), sondern auch nach Interaktion mit T_E exprimieren. Dazu wurden D5-Tumorzellen gemeinsam mit T_E koinkubiert und die Chemokin-mRNA mittels RT-PCR bestimmt. Die Anwesenheit von D5-mRNA überprüften wir anhand des gp100 mRNA-Nachweises, einem für Melanom spezifischen Antigen.

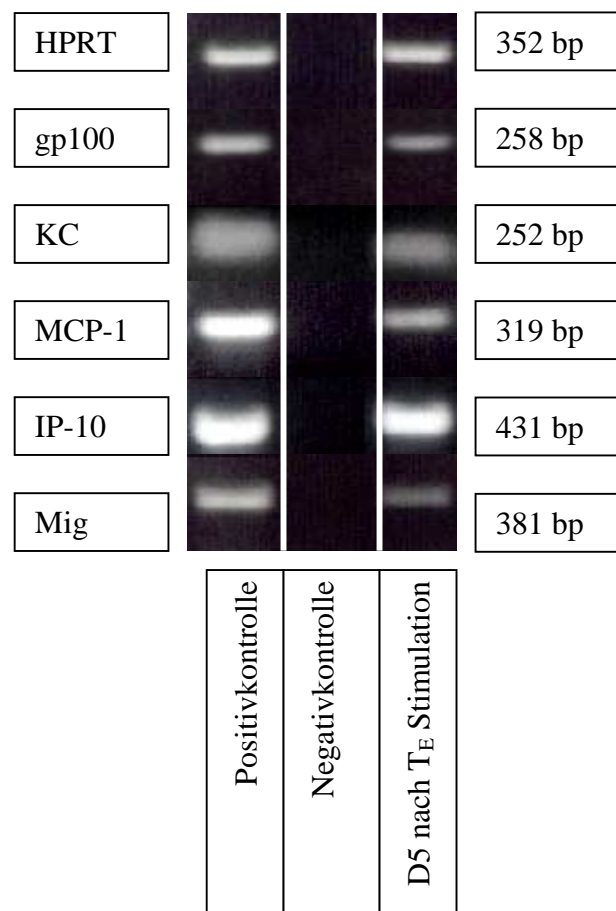


Abb. 39: Untersuchung der mRNA-Expression der Chemokine KC, MCP-1, IP-10 und Mig in D5-Tumorzellen mittels RT-PCR nach sechsständiger Inkubation mit T_E; Als D5 spezifischer mRNA-Nachweis wurde die Expression des Antigens gp 100, als Housekeeping-Gen die HPRT-Expression herangezogen.

KC-, MCP-1-, IP-10- und Mig-mRNA werden, wie zuvor nachgewiesen (3.6.1.2), nicht von T_E synthetisiert. Somit ist die nachgewiesene Chemokin-mRNA-Expression den D5-Zellen zuzuordnen (Abb. 39). Da D5-Zellen unstimuliert diese Chemokine nicht bilden (Abb. 36), ist anzunehmen, dass T_E die Expression von KC-, MCP-1-, IP-10- und Mig-mRNA in D5 induzieren.

3.7 Nachweis der Chemotaxis

Zum Nachweis der chemotaktischen Wirkung von Substanzen, welche von stimulierten D5-Tumorzellen sezerniert werden, wurde ein chemotaktischer Assay durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl von murinen Makrophagen der Linie DJ 2pm durchflusszytometrisch bestimmt, welche aktiv durch eine permeable Membran (Porengrösse 5 μm) in Richtung der stimulierten D5-Tumorzellen migrieren.

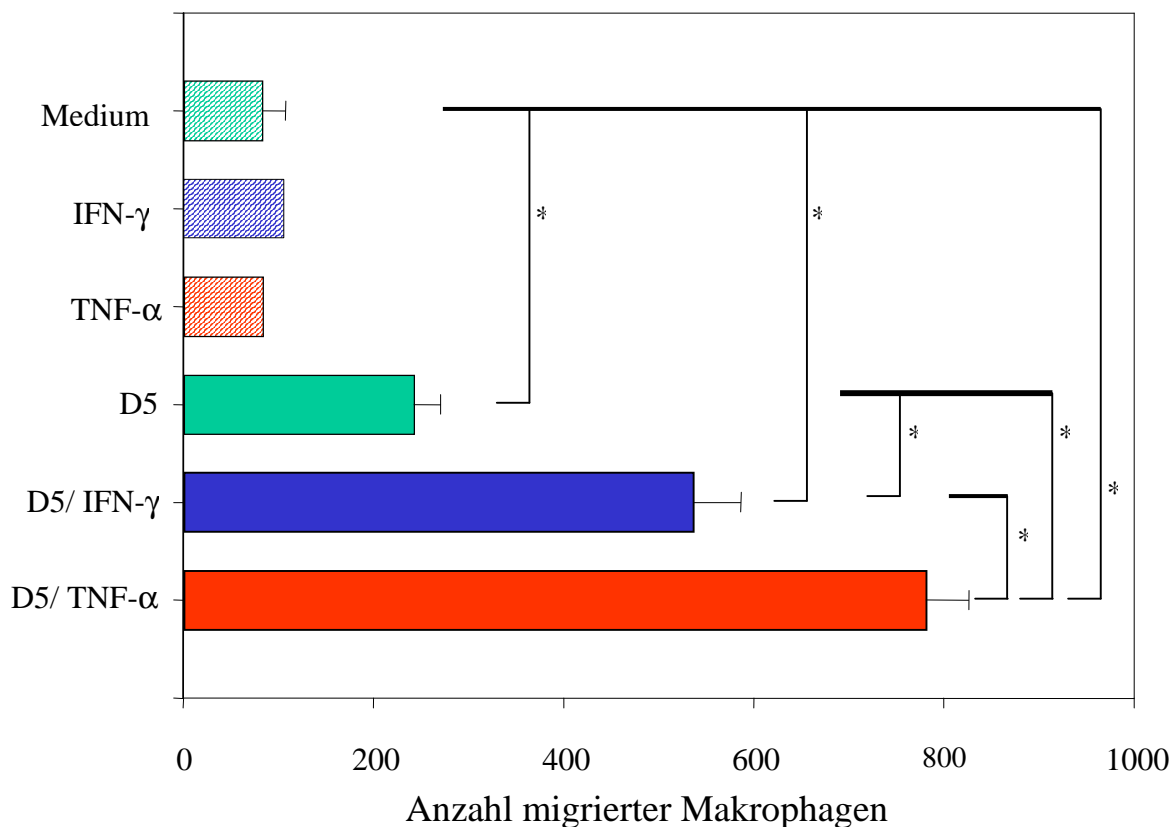


Abb. 40: Chemotaktischer-Assay; graphische Darstellung der Anzahl migrierter Makrophagen in Richtung Mediumkontrolle, IFN- γ (20 ng/ml), TNF- α (350 U/ml), D5 und IFN- γ - sowie TNF- α -stimulierter D5-Tumorzellen. n = 1-6:

Es kommt zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl migrierter Makrophagen in Richtung unstimulierter D5-Tumorzellen (Durchschnitt: 243) verglichen mit den Kontrollansätzen, in welchen auf der Chemotaxinseite reines Medium oder Medium mit IFN- γ (20 ng/ml) bzw. TNF- α (350 U/ml) inkubiert wurde (Durchschnitt: 106 bzw. 84).

Eine signifikante Zunahme der Chemotaxis findet sich gegenüber den Kontrollansätzen (Medium, IFN- γ , TNF- α und D5) in Richtung IFN- γ - (20 ng/ml) und TNF- α - (350 U/ml) stimulierter D5-Tumorzellen (Durchschnitt: 537 und 782).

Nach Stimulation von D5 mit TNF- α (350 U/ml) kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl migrierter Makrophagen im Vergleich zu IFN- γ (20 ng/ml) stimulierten D5-Zellen (Abb. 40).

4 Diskussion

Winter et al. konnten kürzlich zeigen, dass T_E aus D5G6 drainierenden Lymphknoten von Perforin-, IFN- γ -knock-out sowie aus FasL-mutanten Mäusen therapeutisch wirksam sind (Winter et al. 1999; Winter et al. 2001). Wir wollten deshalb die Bedeutung der apoptoseinduzierenden Liganden FasL, LT- α und TNF- α bei der T-zellvermittelten Tumorregression von murinen D5-Melanometastasen untersuchen.

TNF- α wird eine Vielzahl immunregulatorischer, proinflammatorischer und pathophysiologischer Wirkungen zugeschrieben. TNF- α wird von Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten sezerniert (Mannel et al. 1980; Higuchi et al. 1990). Je nach Aktivierungsgrad der Zelle und Zellart besitzt TNF- α ein variables Wirkspektrum (Grell et al. 1998; Beutler and Cerami 1988; Beutler and Cerami 1989). In Entzündungsreaktionen ist TNF- α ein starker Aktivator neutrophiler Granulozyten. Zwei verschiedene TNF-Rezeptoren, TNF-R I und TNF-R II wurden identifiziert, welche sowohl TNF- α als auch LT- α binden (Loetscher et al. 1990; Schall et al. 1990b; Himmler et al. 1990; Heller et al. 1990; Nophar et al. 1990; Goodwin et al. 1991). LT- α entfaltet ähnliche Wirkung an den TNF-Rezeptoren wie TNF- α . Es wurden aber unterschiedliche quantitative und qualitative Wirkungen hinsichtlich der Apoptoseinduktion beschrieben (Porter 1990).

Die Mehrzahl der TNF- α -Antworten werden über TNF-R I vermittelt, da lösliches TNF- α bei 37°C eine 20-fach höhere Affinität zu TNF-R I als zu TNF-R II aufweist (Grell et al. 1998). Während der TNF-R I durch lösliches und membranständiges TNF- α aktiviert werden kann, wird der TNF-R II vor allem durch membrangebundene TNF-Liganden aktiviert (Grell et al. 1995). Für die TNF-Rezeptoren I und II konnten intrazellulär mehrere nachgeschaltete Signalwege nachgewiesen werden, welche die vielen unterschiedlichen Wirkungen von TNF- α und LT- α erklären. FasL, welcher als membranständiges Trimer von zytotoxischen und T_H1 -Zellen exprimiert wird, bindet an einen proapoptotischen Fas-Rezeptor (Wallach et al. 1999). Nach Stimulation von TNF-R I und Fas wird Kaspase 8 (Muzio et al. 1996; Boldin et al. 1996) über Adapterproteine wie TRADD (TNF-R I-associated death domain (Hsu et al. 1995)) und FADD (Fas-associated death domain (Hsu et al. 1996; Chinnaiyan et al. 1995)) aktiviert, was eine zur Apoptose führende Kaspasekaskade in Gang setzt. Kaspase 8 hat somit sowohl eine Initiatorfunktion bei TNF-R I- wie auch bei Fas-vermittelter Apoptose. In einer Vielzahl von Tumorzelllinien wird durch TNF- α Apoptose induziert (Sugarman et al. 1985).

Um zu prüfen, ob die apoptoseinduzierenden Liganden bei der T-zellvermittelten Tumorregression eine Bedeutung haben, untersuchten wir zunächst die Expression von TNF- α und FasL auf T_E. Wir fanden, dass T_E diese untersuchten Liganden exprimieren (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Expression der entsprechenden Rezeptoren auf D5 untersucht. Hierbei konnten wir zeigen, dass TNF-R I auf D5 exprimiert wird. Da IFN- γ tumorspezifisch von T_E aus D5G6 drainierenden Lymphknoten sezerniert wird (Abb. 31), untersuchten wir die Wirkung von IFN- γ auf D5-Tumorzellen. Die Stimulation mit IFN- γ führte zu keiner Induktion der TNF-R I-Expression. Die Expression von Fas wird jedoch durch IFN- γ Inkubation induziert. Ähnliche Beobachtungen wurden von Zheng et al. gemacht. Sie fanden ebenfalls eine IFN- γ -abhängige Regulation von Fas in vier verschiedenen Tumorzelllinien (Zheng et al. 2002).

Die Inkubation von D5 mit FasAb, TNF- α oder LT- α induzierte in D5 keine Apoptose. Auch nach Präinkubation der Tumorzellen mit IFN- γ , welches, wie in Abb. 15 gezeigt, die Fas-Expression induziert, konnte FasAb keine Apoptose in D5 induzieren. LT- α führt nach Präinkubation mit IFN- γ zu einer signifikanten Apoptoseinduktion.

Wong et al. beschrieben einen synergistischen Effekt durch gleichzeitige Aktivierung der Rezeptoren für TNF- α /LT- α und FasL (Wong et al. 1996). Auch Yang et al. zeigten eine synergistische Wirkung der beiden TNF-Rezeptoren I und II bei der Induktion von Apoptose in naiven T-Zellen aus dem Rückenmark (Yang et al. 2001). In den von uns verwendeten D5-Zellen konnten wir nach Inkubation der Zytokinkombinationen aus TNF- α , LT- α und FasL ebenfalls einen synergistischen Effekt feststellen, wenngleich die Koinkubation der Zytokine (in Anwesenheit von IFN- γ) in D5 nur zu einer geringen Steigerung der Apoptoserate auf 25% führt.

Einige Liganden der TNF-Familie werden in löslicher Form sezerniert. Die Bioaktivität der löslichen Form ist im Vergleich zu der membranständigen Form stark vermindert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine geringere Vernetzung der apoptoseinduzierenden Rezeptoren. Um die Vernetzung der Fas-Rezeptoren zu induzieren, wurde bei den Versuchen mit löslichen FasAbs zusätzlich Protein G eingesetzt. Da jedoch auch die Verwendung von Protein G keine deutliche Steigerung der Apoptoseraten induziert, müssten zusätzliche Versuche mit membranständigen apoptoseinduzierenden Liganden durchgeführt werden. Desweiteren exprimieren T_E auch LT- β (Winter H. et al. 2000). Es besteht die Möglichkeit, dass dieses Zytokin im Zusammenspiel mit den von uns untersuchten Zytokinen zu einer stärkeren, synergistischen apoptoseinduzierenden Wirkung führt, da LT- β über einen eigenen

Rezeptor mit nachfolgend unabhängiger (eigenständiger) Signalkaskade verfügt. Ebenfalls werden die TRAIL-Rezeptoren DR4/5 von D5 exprimiert. Auf T_E von PKO- und GKO-Mäusen konnte TRAIL (tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand) identifiziert werden, nicht jedoch auf wt-T_E (Hu et al., personal communication). Dies impliziert eine redundante Regulation innerhalb der proapoptotischen Substanzen von T_E und zeigt deren komplexes Zusammenwirken.

Nach Aktivierung von TNF-R I kommt es oftmals nicht zur Apoptoseinduktion, obwohl dieser Rezeptor über TRADD/FADD den Ablauf der proapoptotischen Kaspasekaskade stimulieren kann. Dies ist dadurch erklärbar, dass durch TNF- α simultan die Induktion zytoprotektiver Proteine angeregt werden kann. So wird für einige Tumorzelllinien TNF- α erst dann toxisch, nachdem die Inhibierung der Proteinsynthese stattgefunden hat. CHX ist ein Proteinsyntheseblocker, welcher die Translation hemmt. Durch Inkubation der Zellen mit CHX konnte eine signifikante Steigerungen der Apoptoseraten in D5 nach Inkubation mit TNF- α und LT- α induziert werden (Abb. 24).

In vielen Zelllinien kann nur in Anwesenheit von CHX durch Inkubation mit Todesrezeptor-Liganden Apoptose induziert werden (Nio et al. 1990; Fang et al. 2001). Dies kann u.a. mit der Existenz anti-apoptotischer Faktoren erklärt werden, welche durch CHX inhibiert werden. Zu den apoptoseinhibitorischen Proteinen gehören Mangan-Superoxid-Dismutase (Wong and Goeddel 1988; Wong et al. 1989), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Type-2 (Pytel et al. 1990; Kumar and Baglioni 1991), Hitzeschock-Protein 27 (hsp27) (Mehlen et al. 1995; Mehlen et al. 1996), A20 (Dixit et al. 1990; Opipari, Jr. et al. 1992; Song et al. 1996), c-FLIP (I-FLICE/FLAME-1/Clarp) (Irmeler et al. 1997; Srinivasula et al. 1997; Inohara et al. 1997; Kreuz et al. 2001), cellular inhibitor of apoptosis proteins c-IAP I (Chu et al. 1997; Roy et al. 1997), c-IAP II (Roy et al. 1997), Survivin (Adida et al. 1998) und der TNF-Rezeptor assoziierte Faktor 1 (TRAF 1) und TRAF 2 (Wang et al. 1998; Schwenzer et al. 1999). Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass metabolische Inhibitoren wie CHX oder Actinomycin D die Bildung des apoptoseinhibitorischen Proteins cFLIP hemmen (Griffith et al. 1998; Kreuz et al. 2001; Leverkus et al. 2000; Wajant et al. 2000). Die Zunahme der zytokininduzierten Apoptoserate nach Koinkubation mit CHX lässt vermuten, dass D5-Tumorzellen Apoptoseinhibitoren exprimieren, welche die proapoptotische Signalkaskade blockieren, und diese verstärkt nach Aktivierung proapoptotischer Rezeptoren *de novo* synthetisiert werden. Verschiedene Apoptoseinhibitionsproteine konnten in einer Reihe von Tumorzellen nachgewiesen werden. Dazu zählen NAIP, c-IAP I/hiap-2, c-IAP II/hiap-1, XIAP/hILP und Survivin (Deveraux and Reed 1999). Die Proteine c-IAP I und II können durch TRAF1

und TRAF2 in den TNF-R I Komplex transloziert werden und hemmen die Aktivierung von Kaspase 8 (Wang et al. 1998). Die anti-apoptotische Wirkungsweisen des c-IAP I/c-IAP II/TRAF1/TRAF2 -Komplexes wurden von Wang et al. untersucht (Wang et al. 1998). Sie fanden, dass die Koexpression aller vier Proteine essentiell ist, um p65-defiziente Fibroblasten vor TNF- α -induzierter Apoptose zu schützen. Das apoptoseinhibitorische Protein Survivin wird in vielen embryonalen und malignen Zellarten, nicht aber in physiologisch differenzierten adulten Zellen exprimiert. Survivin wurde auch in Melanomzelllinien und Nävi, nicht jedoch in Melanozyten regulärer Hautbezirke nachgewiesen. Grossmann et al. konnten nach der Transfektion von Survivin-anti-sense-Strukturen in Melanomzellen eine erhöhte Apoptoserate feststellen und postulierten daher, dass Survivin bei der Entstehung und Progression von Melanomen eine entscheidende Rolle spielt (Grossman et al. 1999). Wie in Abb. 26-29 gezeigt, exprimieren D5-Zellen die Apoptoseinhibitoren c-IAP I, c-IAP II und Survivin, was sowohl mittels RT-PCR, als auch durchflusszytometrisch mittels spezifischer AK nachgewiesen werden konnte. X-IAP wird in D5 nicht exprimiert (Hu et al., personal communication). c-IAP I, c-IAP II und Survivin schützen Zellen sowohl vor TNF- α - als auch vor FasL-vermittelter Apoptose (Deveraux and Reed 1999). Deveraux und Roy et al. machen dafür die hemmende Wirkung dieser IAP beim proteolytischen Processing von Pro-Kaspase 3, 7 und 9 sowie die blockierenden Eigenschaften auf unprozessierte Kaspase 9 verantwortlich (Deveraux et al. 1997; Deveraux et al. 1998; Roy et al. 1997). Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Frage, ob sich die Tumorzellen auf einen Zytokinangriff mit einer vermehrten Expression von Apoptoseinhibitoren schützen. Unseren Beobachtungen nach wird die Expression der Proteine c-IAP II sowie Survivin in D5 durch TNF- α -Inkubation nicht stimuliert (Abb. 28 und 29). Durch TNF- α wird die c-IAP I-Expression gesteigert (Abb. 27). Dies ist möglicherweise als Escape-Mechanismus zu verstehen, mit dem die Tumorzelle einem TNF- α Angriff entgeht. Die RT-PCR Ergebnisse (Abb. 26), aus denen eine höhere basale mRNA-Expression von c-IAP II und Survivin im Gegensatz zu c-IAP I zu erkennen ist, legen die Vermutung nahe, dass c-IAP II und Survivin in D5 konstitutiv exprimiert werden, so dass es unter TNF- α -Stimulation zu keiner weiterer Expressionserhöhung kommt.

Im Gegensatz dazu berichten Messmer et al., dass in humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7) nach 24-stündiger TNF- α -Inkubation Apoptose induziert werden kann. Diese Zellen wiesen interessanterweise nach TNF- α -Inkubation eine erniedrigte c-IAP I und c-IAP II-Proteinkonzentration auf (Messmer et al. 2001). Micheau et al. zeigten an verschiedenen Zelllinien die intrazelluläre Konzentrationsminderung des Apoptoseinhibitors FLIP durch

CHX, wodurch FasL-resistente Zelllinien nach CHX-Behandlung FasL-sensitiv wurden (Micheau et al. 2001).

Unsere Untersuchungen zeigen, dass CHX nach TNF- α Inkubation zur Verringerung der Survivin- und c-IAP II-Proteinkonzentration in D5 führt, nicht aber zur Minderung von c-IAP I. Da D5-Zellen durch CHX-Inkubation TNF- α - und LT- α -sensibel werden, ist zu vermuten, dass die CHX-induzierte Survivin- und c-IAP II-Konzentrationsminderung der Grund für die Sensibilitätszunahme sein könnte.

Kürzlich wurde ein weiterer Apoptoseinhibitor, ML-IAP, in Melanomzellen identifiziert (Vucic et al. 2000). Nicht auszuschließen ist, dass noch weitere Apoptoseinhibitoren in D5-Melanomzellen exprimiert werden.

Da Effektor T-Zellen tumorspezifisch IFN- γ sezernieren, vermuteten wir, dass IFN- γ ein entscheidender Faktor für die T-zellvermittelte Tumorregression ist. IFN- γ kann direkt das Tumorwachstum hemmen (Hung et al. 1998; Fallarino and Gajewski 1999) sowie indirekt Neutrophile Granulozyten und Makrophagen aktivieren. Darüber hinaus induziert IFN- γ die Antigenverarbeitung und Antigenpräsentation sowie die Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen bei Tumorzellen und antigenpräsentierenden Zellen (Bohm et al. 1998; Boehm et al. 1997; Krasagakis et al. 1995). Winter et al. konnten zeigen, dass nach adoptivem Transfer tumorspezifischer T-Zellen Makrophagen in die Region der etablierten pulmonalen Metastasen wandern (Winter et al. 2001). Diese Beobachtung deckt sich mit der anderer Arbeitsgruppen, die im Bereich von Tumoren oft eine große Anzahl von T-Lymphozyten und Makrophagen finden (Allen and Hogg 1985; Hakansson et al. 1997). Dies führte zur Annahme, dass die T-zellvermittelte Tumorregression möglicherweise indirekt durch aktivierte Makrophagen vermittelt wird, welche durch die T-Zellen angelockt werden. Die Rekrutierung von Leukozyten in Bereiche entzündeten oder maligne entarteten Gewebes wird durch Chemokine vermittelt.

Um zu prüfen, ob tumorspezifische T-Zellen die Sekretion von Chemokinen induzieren, untersuchten wir die Freisetzung der inflammatorischen Typ I-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , KC, MCP-1, IP-10, RANTES und Mig aus T_E und D5-Tumorzellen. MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES haben eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen, basophile Granulozyten, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und auf T-Zellen (T_{H1} > T_{H2}) (Janeway Ch. et al. 1999). Die tumorspezifische mRNA-Expression von MIP-1 α und MIP-1 β konnten wir in T_E nachweisen (Abb. 33). Darüber hinaus konnten wir mittels ELISA zeigen, dass RANTES tumorspezifisch von T_E sezerniert wird (Abb. 35). Wir fanden keine mRNA-Expression der Chemokine KC, MCP-1, IP-10 und Mig in T_E.

MIP-1 β und RANTES wirken stark chemotaktisch auf T-Lymphozyten. MIP-1 β wirkt chemotaktisch auf aktivierte CD4⁺ T-Zellen, RANTES auf ruhende und auch auf aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Desweiteren wirkt RANTES chemotaktisch auf Memory-T-Zellen (Schall et al. 1990a; Taub et al. 1993). Mulé et al. transfizierten *in vitro* eine murine Fibrosarkomzelllinie mit RANTES, welche anschließend ausgeprägt chemotaktisch auf CD8⁺ tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) wirkten. Versuchstiere, welche die transfizierten Tumorzellen injiziert bekamen, entwickelten eine protektive Immunität (Mulé et al. 1996). Nach Gabe von Antikörper gegen CD8⁺ T-Zellen kam es zum Auswachsen des Tumors. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Entwicklung tumorspezifischer Memory-Zellen durch RANTES induziert wird. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mulé et al. fanden Azenshtein et al. Hinweise darauf, dass RANTES die Progression von Mammakarzinomen induziert (Azenshtein et al. 2002). Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von Chemokinen bei der Kontrolle des Tumorwachstums brachte die Arbeit von Yang et al. Sie wiesen an murinen Leberkarzinomzellen, welche durch Transfektion MIP-1 α exprimierten, eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums gegenüber nicht transfizierten Leberkarzinomzellen *in vivo* nach (Yang et al. 2002). Ein direkter Einfluss von RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β auf das Tumorwachstum von D5 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Nachdem wir zeigen konnten, dass T_E tumorspezifisch die Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β exprimieren sowie RANTES sezernieren, wollten wir prüfen, ob D5-Tumorzellen ebenfalls Chemokine exprimieren. Sonouchi et al. konnten nachweisen, dass Tumore Chemokine exprimieren. Nach Stimulation von murinen Nierenzellkarzinomzellen (RENCA) mit IFN- γ , IFN- α und/oder IL-2 fanden sie eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von KC, MCP-1 und IP-10 (Sonouchi et al. 1994). Zhang et al. wiesen nach, dass MCP-1 zu einer frühen Infiltration von Makrophagen in Tumorgewebe führt und dies negativ mit der Tumorgroße korreliert (Zhang et al. 1997).

Aufgrund der mRNA-Muster, welche anhand stimulierter T_E und D5-Tumorzellen gewonnen wurden, vermuteten wir, dass die Chemokine KC, MCP-1, IP-10 und Mig von der D5-Tumorzelle, nicht jedoch von den T-Zellen exprimiert werden (Abb. 32, 36 und 39). Um dies zu überprüfen untersuchten wir unstimulierte D5-Tumorzellen auf deren Chemokinexpression. Hierbei fand sich keine Expression der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , KC, MCP-1, IP-10, RANTES und Mig. Wir postulierten deshalb, dass die T-Zellen eine Chemokinexpression in D5-Tumorzellen induzieren. Da T_E tumorspezifisch die Typ I Zytokine IFN- γ und TNF- α exprimieren (Abb. 30 und 31), untersuchten wir, ob durch

Inkubation der D5-Tumorzellen mit diesen Zytokinen die Expression von Chemokinen induziert werden kann. Die Expression von KC-, MCP-1-, IP-10- und RANTES-mRNA wurde durch Inkubation mit TNF- α dosisabhängig stimuliert. IFN- γ induzierte die Expression von Mig, MCP-1 und RANTES. MIP-1 α und MIP-1 β konnten in D5 weder durch TNF- α , noch durch IFN- γ induziert werden. Deutlich erhöhte KC- und MCP-1-Konzentrationen wurden mittels ELISA im Überstand von D5-Tumorzellen nach TNF- α Stimulation nachgewiesen. Denkbar ist, dass andere, von uns nicht untersuchte Zytokine (LT- β , Trail etc.), die Expression von MIP-1 α und MIP-1 β in D5 induzieren können.

Um zu überprüfen, ob die von Tumorzellen sezernierten Chemokine chemotaktisch auf Makrophagen wirken, führten wir *in vitro* einen chemotaktischen Assay durch. Im Vergleich zur Mediumkontrolle fand sich eine gesteigerte Migration von Makrophagen in Richtung unstimulierter D5-Tumorzellen, was ein Hinweis darauf ist, dass D5 Chemokine sezerniert. Nach Stimulation von D5-Tumorzellen mit IFN- γ und TNF- α fand sich eine weitere Steigerung der Chemotaxis von Makrophagen. Dies unterstützt die Vermutung, dass die von stimulierten D5-Tumorzellen gebildeten Substanzen chemotaktisch auf Makrophagen wirken. Die Bedeutung der einzelnen Chemokine bei der Kontrolle des Tumorwachstums wird kontrovers diskutiert. Das CC-Chemokin MCP-1 wurde erstmals aus Überständen von Gliomzellen (Yoshimura et al. 1989) isoliert. *In vivo* und *in vitro* ließ sich MCP-1 in Glioblastomen und Astrozytomen (Desbaillets et al. 1994) sowie in malignen Melanomen (Graves et al. 1992) und Ovarialkarzinomen (Negus et al. 1995; Negus et al. 1997) nachweisen. Neumark et al. konnten im Tierversuch zeigen, dass murine Mammakarzinomzellen höherer Malignität größere Mengen an MCP-1 als Karzinomzellen niedrigerer Malignität produzieren. MCP-1 induziert die migratorische Aktivität der Tumorzellen (Neumark et al. 1999). Peng et al. wiesen nach, dass das Sarkom MCA 205 MCP-1 sezerniert. Wurde MCP-1 *in vivo* neutralisiert, fand sich eine deutlich gesteigerte therapeutische Wirkung der T_E gegen etablierte Lungenmetastasen. Daraus schlossen die Autoren, dass MCP-1 die Bildung tumorreaktiver T-Zellen hemmt (Peng et al. 1997). Ferrero et al. fanden, dass frisch explantierte humane Nierenzellkarzinomzellen MCP-1 sezernieren (Ferrero et al. 1998). TIL, welche aus dem Tumorgewebe isoliert wurden, exprimierten spezifische MCP-1 Rezeptoren. In Chemotaxis-Assays beobachteten sie eine gesteigerte Migration der TIL durch Zugabe von MCP-1, welche durch neutralisierende Antikörper gegen die Chemokine jeweils blockiert werden konnte. Außerdem beschrieben sie eine Aufregulation der α 1-Integrin-Domäne auf den explantierten TIL durch Stimulation von MCP-1. Integrine gehören zu den Zell-Adhäsionsmolekülen und spielen eine wichtige Rolle

bei der Infiltration von TIL in Karzinome (Melani et al. 1995). Zusätzlich scheint MCP-1 auch die Aktivität und Wirkung von Makrophagen zu beeinflussen. So konnten Zachariae et al. zeigen, dass MCP-1 die oxidative Freisetzung vesikulärer Enzyme aus aktivierten Makrophagen fördert und somit zytostatisch auf Tumorzellen wirkt (Zachariae et al. 1990). Im Tiermodell wirkt MCP-1 synergistisch mit Lipopolysaccharid (LPS) und induziert die antitumorale Zytotoxizität in Makrophagen. Diese Erkenntnis lieferten Untersuchungen an murinen Kolonkarzinomzellen (CT-26 Zellen). CT-26 Zellen, die mit dem MCP-1-Gen transfiziert wurden, konnten von Makrophagen viel wirkungsvoller lysiert werden, als nicht-transfizierte Zellen (Huang et al. 1994).

Auch die Bedeutung der Chemokine IP-10 und Mig wird für die Kontrolle von Tumoren und die Regulation der antitumoralen Immunität kontrovers diskutiert. Arenberg et al. zeigten, dass IP-10 und Mig das Tumorwachstum in einem SCID-Mausmodell hemmen. Sie postulieren, dass dies möglicherweise durch einen anti-angiogenetischen Effekt dieser Chemokine hervorgerufen wird. Interessanterweise konnte kein direkter Effekt von Chemokinen auf das Tumorzellwachstum von A549 Zellen (humane Lungenkarzinomzelllinie) und auf die Infiltrationsrate von Leukozyten in etablierte Tumore von SCID-Mäusen nachgewiesen werden (Arenberg et al. 2001). Tannenbaum et al. schreiben IP-10 und Mig eine wichtige Rolle bei der IL-12 abhängigen Regression des murinen Nierenadenokarzinoms RENCA zu. AK gegen IP-10 und Mig hemmten die durch IL-12 induzierbare Tumorregression im Mausmodell. Dieser Effekt korrelierte mit einem dramatischen Rückgang der T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe. Daraus zogen sie den Schluss, dass die IL-12 abhängige Tumorregression durch IP-10 und Mig vermittelt wird (Tannenbaum et al. 1998).

Die Bedeutung des Chemokins KC (Keratinozyten Chemokin = Growth Regulated Oncogene-alpha = Gro-alpha (Loukinova et al. 2000)) bei der T-zellvermittelten Tumorregression ist ebenfalls unklar. Viele Arbeitsgruppen berichten von einem aktivierenden, chemotaktischen Effekt auf neutrophile Granulozyten (Frevert et al. 1995; Bozic et al. 1995), auch wenn *in vitro* bislang die chemotaktische Wirkung auf PMN (kernpolymorphe Neutrophile Granulozyten) nicht nachzuweisen war (Bozic et al. 1995). Haghnegahdar et al. zeigten, dass KC möglicherweise ein autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzellen ist (Haghnegahdar et al. 2000). Zudem konnten Loukinova et al. nachweisen, dass Zellen einer murinen Plattenepithelkarzinomzelllinie, welche den für CXC Chemokine, wie KC, passenden Rezeptor CXCR-2 nicht exprimieren, ein schwächeres Wachstum aufweisen (Loukinova et al. 2000).

Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise darauf, dass KC das kapilläre Endothelzellwachstum hemmt, was die tumorinduzierte Gefäßneubildung blockieren könnte (Cao et al. 1995).

Trotz des Wissens um die komplexen Wirkungsweisen von immunkompetenten Zellen sowie von Zytokinen und Chemokinen ist es noch ein weiter Weg, die Immuntherapie von Tumoren zu einer Standardtherapie zu etablieren. In klinischen Studien konnten bis jetzt mit immunologischen Behandlungsmethoden Teilerfolge in der Therapie bösartiger Erkrankungen verbucht werden.

Wie eingangs bereits erwähnt, gelang Dudley et al. im Jahre 2002 ein entscheidender Schritt bei der Immuntherapie menschlicher Melanome. Sie gewannen aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) T-Zellen und expandierten diese *in vitro*, bevor sie die tumorreaktiven T-Zellen wieder autolog in Patienten transferierten. Vor dem Transfer wurde eine non-myeloablative chemotherapeutische Konditionierung durchgeführt, was in Kombination mit einer Hochdosis IL-2 Therapie zu einer persistierenden Repopulation führen konnte. Somit wurden funktionell aktive T-Zellen gegen das Melanozytendifferenzierungs-Antigen MART-1 in Patienten etabliert, welche *in vivo* stark proliferierten und in die Tumorregionen migrierten. In zwei von 13 Fällen konnte dadurch eine komplette Tumorregression erreicht werden. Einige Studien wiesen nach, dass transferierte T-Zellen, welche eine hohe Aktivität gegen den Tumor besitzen, im unvorbehandelten Organismus keine Persistenz zeigen (Rosenberg et al. 1994; Yee et al. 2000; Dudley et al. 2001). Warum die Lymphodepletion nach non-myeloablativer Konditionierung effektiv in der Tumorbehandlung mit aktivierten T-Zellen sein kann, könnte an der Eliminierung regulatorisch wirkender Immunzellen liegen. Diese Eliminierung führt möglicherweise zur Zerstörung der auf Homöostase beruhenden T-Zellregulation, was die sehr hohe Anzahl an nachgewiesenen CD8⁺ T-Zellen einige Tage nach T-Zelltransfer erklären würde.

Chang et al. berichteten kürzlich von Erfolgen bei der Therapie von fortgeschrittenen humanen Nierenzellkarzinomen in einer Phase-II-Studie (Chang et al. 2003). Dabei wurden 34 Patienten mit Calmette-Guérin Bacillus versetzten Tumorzellen vakziniert. Anschließend wurden aus den Lymphknoten der Vakzinierungsregion die T-Zellen geerntet und mit anti-CD3 stimuliert sowie mit IL-2 expandiert. Nach intravenöser autologer Applikation der vorwiegend CD8⁺ T-Zellen sprach die Therapie bei vier Patienten voll und bei fünf Patienten partiell an. Interessanterweise reagierten T-Zellen von Non-Respondern in Anwesenheit von autologen Tumorzellen mit einer verstärkten Freisetzung von IL-10 (immunologische Typ 2-Antwort). Hingegen zeigten T-Zellen aus Patienten, welche von der Behandlung profitierten,

nach Stimulation mit den Tumorzellen eine immunologische Typ 1 (INF- γ)- Antwort und nur eine geringe IL-10 Expression. Möglicherweise wird dadurch eine Interaktion zwischen immunkompetenten Zellen ermöglicht, welche essentiell bei der T-zellvermittelten Tumorregression ist. Welche Rolle weitere Immunzellen, insbesondere die Makrophagen, bei den beobachteten Tumorregressionen in den Untersuchungen sowohl von Chang als auch von Dudley et al. spielen und welche immunologischen Mechanismen letztendlich für den Erfolg der jeweiligen Therapie ausschlaggebend sind, wurde in diesen Studien nicht untersucht.

Einen Hinweis auf die Bedeutung der Makrophagenaktivität bei der Tumorregression fanden kürzlich Feinmesser et.al. (Feinmesser et al. 2003). Sie konnten mit einer Multikin-Therapie Erfolge bei der Therapie von Kopf- und Halstumoren erzielen. Dabei wurde eine Zytokin-/ Chemokinmischung aus IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, G-CSF, INF- α , TNF- α , LT- α und MIP-1 α peritumoral injiziert. Zusätzliche intravenöse Cyclophosphamidgabe wurde verwendet, um die Aktivität der Suppressor-T-Zellen zu mindern. Die orale Verabreichung von Indomethacin wurde zur Senkung der Prostaglandinausschüttung benutzt, die eine von Makrophagen induzierte Immunsuppression bewirken kann. Nach dieser Behandlung zeigte sich eine partielle bzw. komplette Tumorregression bei jeweils zwei von zwölf Patienten. Weitere Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass dafür nicht nur eine ungewöhnlich hohe Anzahl an aktivierten zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen verantwortlich zu sein scheint, sondern auch die histologisch nachgewiesene Infiltration von aktivierten peritumoralen mehrkernigen Makrophagen in den Tumor eine Rolle spielen könnte.

Wie aus den o.g. Ausführungen hervorgeht, beeinflussen *in vivo* eine Vielzahl von Faktoren das Wachstum des Tumors. In unseren *in vitro* Untersuchungen erhielten wir Einblicke in das komplexe Wechselspiel zwischen tumorspezifischen T-Zellen, Makrophagen und dem murinen Melanom D5. Bislang wurde angenommen, dass tumorspezifische T-Zellen direkt zytotoxisch auf den Tumor einwirken. Wir konnten hier erstmals zeigen, dass T-Zellen und Tumorzellen Chemokine sezernieren, welche möglicherweise Makrophagen aktivieren und so eine Rolle bei der T-zellvermittelten Tumorregression spielen. Ob die von uns untersuchten Chemokine tatsächlich im murinen Melanommodell B16BL6-D5 *in vivo* exprimiert werden und die ihnen zugeschriebenen Wirkungen (Makrophagen/Monozyten-Chemotaxis, Anti-angiogenese etc.) entfalten, ist noch unklar. Um die Funktion der Chemokine in Bezug auf die Tumorregression nach adoptivem T-Zelltransfer genauer charakterisieren zu können, sind weitere Untersuchungen z.B. mittels neutralisierender AK innerhalb eines Migrations-Assays oder mittels Gen-Cip-Verfahren nötig.

Diese Arbeit liefert einen Beitrag zur Klärung und zum Verständnis der Mechanismen T-zellvermittelter Tumorregression. Ein Verständnis, welches entscheidend sein wird, um zukünftig neue, effektive Behandlungsstrategien gegen solide Tumore entwickeln zu können.

5 Zusammenfassung

Durch den Transfer tumorspezifischer T-Zellen können solide Tumore nicht nur in Tieren, sondern auch im Menschen erfolgreich behandelt werden. Dudley et al. konnten kürzlich nach dem autologen Transfer stimulierter tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) nach vorheriger non-myeloablativer Konditionierung in zwei von zwölf Patienten mit Melanomen eine Tumorregression erreichen (Dudley et al. 2002). Ähnliche Erfolge konnten Chang et al. bei der Behandlung von fortgeschrittenen Nierenkarzinomzellen erzielen (Chang et al. 2003). Sie vakzinierten Patienten mit Calmette-Guérin Bacillus versetzten Tumorzellen und ernteten anschließend die T-Zellen aus den angrenzenden Lymphknoten der Vakzinierungsregion. Nach autologem Transfer der vorwiegend CD8⁺ T-Zellen, welche *in vitro* mit anti-CD3 stimuliert wurden, sprach die Therapie bei neun von 34 Patienten an.

Die Mechanismen der T-zellvermittelten Tumorregression sind aber bis heute noch unklar. Gegenstand dieser Arbeit war es daher Faktoren zu untersuchen, welche eine Rolle bei der Regression von D5-Melanomlungenmetastasen durch den adoptiven Transfer CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen aus Tumorkvakzin drainierenden Lymphknoten (TVDLN) nach Vakzinierung mit D5G6 (einem GM-CSF transduzierten D5-Subklon) spielen. Hierzu wurden D5-Zellen *in vitro* mit Zytokinen, welche von Effektor T-Zellen (T_E) produziert werden, stimuliert. Wir konnten zeigen, dass D5-Tumorzellen die als proapoptotisch geltenden Rezeptoren TNF-R I sowie Fas nach IFN- γ -Stimulation exprimieren. Die Inkubation mit den Liganden dieser Rezeptoren TNF- α , LT- α und FasAb bewirkt keine Apoptoseinduktion. Gleichzeitige Inkubation dieser Liganden führt nur zu einer Apoptoserate von 25% in D5. Mögliche Gründe der relativen Apoptoseresistenz von D5 könnten die intrazellulären Apoptoseinhibitionsproteine c-IAP I, c-IAP II und Survivin sein, welche wir in D5 nachweisen konnten.

Da nach adoptivem Transfer tumorspezifischer T_E Makrophagen die pulmonalen Tumormetastasen infiltrieren, untersuchten wir, ob T_E Chemokine exprimieren. Unsere Untersuchungen ergaben, dass T_E die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES tumorspezifisch exprimieren. Nach Stimulation von D5-Tumorzellen mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ , welche von T_E tumorspezifisch exprimiert werden, wird die Chemokin-mRNA von KC, MCP-1, IP-10 und Mig in D5 exprimiert. Auch die Koinkubation von D5 mit T_E induziert die Expression der mRNA von KC, MCP-1, IP-10 und Mig. Deutlich erhöhte KC und MCP-1 Proteinkonzentrationen wurden im Überstand von D5-Tumorzellen mittels

ELISA nach TNF- α Stimulation gegenüber unstimulierten und IFN- γ stimulierten D5-Zellen festgestellt.

Um zu prüfen, ob die von D5 gebildeten Substanzen auch tatsächlich chemotaktisch auf Makrophagen wirken, führten wir einen chemotaktischen Assay durch. Wir konnten zeigen, dass es zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl migrierter Makrophagen in Richtung D5-Tumorzellen nach deren Stimulation mit IFN- γ und TNF- α kommt. Da wir in T_E die Expression von TNF- α -mRNA und die Sekretion von IFN- γ tumorspezifisch nachweisen konnten, besteht Grund zur Annahme, dass in vivo T_E in der Lage sind Tumorzellen zur Chemokinbildung anzuregen, was zu einer Invasion von Makrophagen in die Tumorregionen führt. Dass Makrophagen möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Tumorregression spielen, deckt sich auch mit der Beobachtung von Feinmesser et. al., welche mit einer peritumorösen Injektion von Multikinen (Zytokin-/Chemokinmischung) Kopf und Halstumore behandelten (Feinmesser et al. 2003). Nach dieser Therapie zeigte sich in den Tumorregionen der erfolgreich behandelten Patienten im Gegensatz zu Non-Respondern eine hohe Anzahl migrierter und aktivierter Makrophagen.

Wir fanden mit den Ergebnissen unserer Studie erstmals Hinweise darauf, dass im murinen Melanommodell B16BL6-D5 nicht ausschließlich die direkte T-zellabhängige Zytotoxizität zur Tumorregression führt, sondern dabei weitere Zellarten wie Makrophagen/Monozyten involviert sind, welche mittels tumorspezifischer Chemokine rekrutiert werden.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Erforschung der Mechanismen T-zellvermittelter Tumorregression. Die Kenntnisse dieser Mechanismen haben entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung neuer, effektiver Behandlungskonzepte gegen solide Tumore.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ab: Antibody

Ag: Antigen

AK: Antikörper

BIR: baculoviral IAP repeat

bp: Basenpaare

BSA: bovines Serumalbumin

CD: Cluster of Differentiation

cDNA: Complementary DNA

CHX: Cycloheximid

c-IAP: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein

CM: Komplettmedium

CTL: zytotoxische T-Zelle

D5: Subklon der Tumorzelllinie B16BL6 (Melanom),
entstanden in einer C57BL/6J (wt) Maus

D5G6: GM-CSF sezernierender Subklon von D5

DMSO: Dimethyl-Sulfoxid

DNA: Desoxyribonucleinsäure

DNase: Desoxyribonuklease

DR: Death Receptor

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FACS: Fluorescent Activated Cell Sorter

FADD: Fas-associated Death Domain

FasAb: Fas-Antibody

FasL: Fas-Ligand

FCS: fetales Kälberserum

FITC: Fluorescein Isothiocyanat

FSC: Forward-Scatter

GKO: IFN- γ knock-out

GM-CSF: Granulo-/Monozyten-koloniestimulierender Faktor
HEK: humane embryonale Nierenzellen
HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP: Horseradish-Peroxidase
Hsp: Hitzeschock-Protein
IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
IFN: Interferon
Ig: Immunglobulin
IL: Interleukin
IP: Interferon Inducible Protein
k/o: knock-out
KC: Keratinozyten Chemokin
LIGHT: Homologous to Lymphotoxins, Inducible Expression, Binds to HVEM, a Receptor
on T-lymphocytes
LPS: Lipopolysaccharid
LT: Lymphotoxin
LT- β -R: Lymphotoxin-beta-Rezeptor
MCA: methylcholanthren-induzierter Tumor
MCP: Macrophage Chemotactic Protein
MHC: Major Histocompatibility Complex
Mig: Monokine Induced by Interferon
MIP: Macrophage Inflammatory Protein
mRNA: Messenger-Ribonucleinsäure
NO: Nitric Oxide
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Kettenreaktion
PE: Phycoerythrin
PI: Popidiumiodid
PIG: Perforin/Interferon- γ doppel-knock-out
PKO: Perforin knock-out
RANTES: Regulated upon Activation, Normally T-cell Expressed and Secreted
RNA: Ribonucleinsäure
ROI: Reactive Oxygen Intermediates
RT-PCR: Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion

SSC: Side-Scatter

Taq: Thermus Aquaticus

T_E: Effektor T-Zellen

TIL: tumorinfiltrierende Lymphozyten

TNF-R: Tumornekrosefaktor-Rezeptor

TNF: Tumornekrosefaktor

TRADD: TNF-RI-associated Death Domain Protein

TRAF: TNF-Receptor Associated Factor

TRAIL: Tumor-Necrosis-Factor-Related Apoptosis-inducing Ligand

TVDLK: Tumorkvakzin drainierende Lymphknoten

U/min: Umdrehungen pro Minute

wt: Wild-typ

7 Literaturverzeichnis

1. Adida, C., Crotty, P. L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., and Altieri, D. C. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am.J Pathol.* 152: 43-49, 1998.
2. Allen, C. and Hogg, N. Monocytes and other infiltrating cells in human colorectal tumours identified by monoclonal antibodies. *Immunology* 55: 289-299, 1985.
3. Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.* 3: 917-921, 1997.
4. Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity.* 8: 451-460, 1998.
5. Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T., and Willems, G. M. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol.Chem.* 265: 4923-4928, 1990.
6. Arca, M. J., Krauss, J. C., Aruga, A., Cameron, M. J., Shu, S., and Chang, A. E. Therapeutic efficacy of T cells derived from lymph nodes draining a poorly immunogenic tumor transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Gene Ther.* 3: 39-47, 1996.
7. Arenberg, D. A., Zlotnick, A., Strom, S. R., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. The murine CC chemokine, 6C-kine, inhibits tumor growth and angiogenesis in a human lung cancer SCID mouse model. *Cancer Immunol.Immunother.* 49: 587-592, 2001.
8. Asher, A., Mule, J. J., Reichert, C. M., Shiloni, E., and Rosenberg, S. A. Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. *J Immunol.* 138: 963-974, 1987.

9. Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308, 1998.
10. Assmann, I. A., Enders, G. A., Puls, J., Rieder, G., Haas, R., and Hatz, R. A. Role of virulence factors, cell components and adhesion in *Helicobacter pylori*-mediated iNOS induction in murine macrophages. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 30: 133-138, 2001.
11. Azenshtein, E., Luboshits, G., Shina, S., Neumark, E., Shahbazian, D., Weil, M., Wigler, N., Keydar, I., and Ben Baruch, A. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res.* 62: 1093-1102, 2002.
12. Balkwill, F. Chemokine biology in cancer. *Semin.Immunol.* 15: 49-55, 2003.
13. Beutler, B. and Cerami, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu.Rev.Biochem.* 57: 505-518, 1988.
14. Beutler, B. and Cerami, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu.Rev.Immunol.* 7: 625-655, 1989.
15. Bird, C. H., Sutton, V. R., Sun, J., Hirst, C. E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J. A., and Bird, P. I. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol.Cell Biol.* 18: 6387-6398, 1998.
16. Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat.Cell Biol.* 2: 241-243, 2000.
17. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 15: 749-795, 1997.

18. Bohm, W., Thoma, S., Leithauser, F., Moller, P., Schirmbeck, R., and Reimann, J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol.* 161: 897-908, 1998.
19. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815, 1996.
20. Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp.Med.* 187: 129-134, 1998.
21. Bozic, C. R., Kolakowski, L. F., Jr., Gerard, N. P., Garcia-Rodriguez, C., Uexkull-Guldenband, C., Conklyn, M. J., Breslow, R., Showell, H. J., and Gerard, C. Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *J Immunol.* 154: 6048-6057, 1995.
22. Brocker, E. B., Zwadlo, G., Suter, L., Brune, M., and Sorg, C. Infiltration of primary and metastatic melanomas with macrophages of the 25F9-positive phenotype. *Cancer Immunol.Immunother.* 25: 81-86, 1987.
23. Cao, Y., Chen, C., Weatherbee, J. A., Tsang, M., and Folkman, J. gro-beta, a -C-X-C-chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. *J Exp.Med.* 182: 2069-2077, 1995.
24. Chang, A. E., Aruga, A., Cameron, M. J., Sondak, V. K., Normolle, D. P., Fox, B. A., and Shu, S. Adoptive immunotherapy with vaccine-primed lymph node cells secondarily activated with anti-CD3 and interleukin-2. *J Clin.Oncol.* 15: 796-807, 1997.
25. Chang, A. E., Li, Q., Jiang, G., Sayre, D. M., Braun, T. M., and Redman, B. G. Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *J.Clin.Oncol.* 21: 884-890, 2003.

26. Chang, A. E., Yoshizawa, H., Sakai, K., Cameron, M. J., Sondak, V. K., and Shu, S. Clinical observations on adoptive immunotherapy with vaccine-primed T-lymphocytes secondarily sensitized to tumor in vitro. *Cancer Res.* 53: 1043-1050, 1993.
27. Chen, C. and Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.* 7: 2745-2752, 1987.
28. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512, 1995.
29. Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H., and Ballard, D. W. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 10057-10062, 1997.
30. Coley, N., Immunotherapy of Cancer By Bacterial Vaccines. Paper read at Internatinoal Symposium on Detection of Cancer. New York. 1976.
31. D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol.* 161: 5111-5115, 1998.
32. Desbaillets, I., Tada, M., de Tribolet, N., Diserens, A. C., Hamou, M. F., and Van Meir, E. G. Human astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in vivo and in vitro. *Int.J Cancer* 58: 240-247, 1994.
33. Deveraux, Q. L. and Reed, J. C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13: 239-252, 1999.
34. Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. IAPs block apoptotic events

- induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17: 2215-2223, 1998.
35. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388: 300-304, 1997.
 36. Dixit, V. M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L. B., Wolf, F. W., O'Rourke, K., Ward, P. A., Prochownik, E. V., and Marks, R. M. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J Biol.Chem.* 265: 2973-2978, 1990.
 37. Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Poirier, G. G., Froelich, C. J., He, W. W., and Dixit, V. M. ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol.Chem.* 271: 16720-16724, 1996.
 38. Dudley, M. E., Wunderlich, J., Nishimura, M. I., Yu, D., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Sherry, R., Leitman, S. F., and Rosenberg, S. A. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J.Immunother.* 24: 363-373, 2001.
 39. Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E., and Rosenberg, S. A. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850-854, 2002.
 40. Eck, M. J. and Sprang, S. R. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol.Chem.* 264: 17595-17605, 1989.
 41. Evans, R. Macrophages in syngeneic animal tumours. *Transplantation* 14: 468-473, 1972.
 42. Fallarino, F. and Gajewski, T. F. Cutting edge: differentiation of antitumor CTL in vivo requires host expression of Stat1. *J Immunol.* 163: 4109-4113, 1999.

43. Fang, Y., Jin, J. W., and Zha, X. L. Role of FAK in TNF- α /Cycloheximide-induced Apoptosis of SMMC-7721 Cells. *Sheng Wu Hua Xue.Yu Sheng Wu Wu Li Xue.Bao.(Shanghai)* 33: 53-58, 2001.
44. Feinmesser, R., Hardy, B., Sadov, R., Shwartz, A., Chretien, P., and Feinmesser, M. Report of a clinical trial in 12 patients with head and neck cancer treated intratumorally and peritumorally with multikine. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 129: 874-881, 2003.
45. Ferrero, E., Fabbri, M., Poggi, A., Galati, G., Bernasconi, S., and Zocchi, M. R. Tumor-driven matrix invasion by infiltrating lymphocytes: involvement of the α 1 integrin I-domain. *Eur.J Immunol.* 28: 2530-2536, 1998.
46. Fidler, I. J. Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. *Cancer Res.* 34: 1074-1078, 1974.
47. Frevert, C. W., Huang, S., Danaee, H., Paulauskis, J. D., and Kobzik, L. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. *J Immunol.* 154: 335-344, 1995.
48. Froelich, C. J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G. M., Bleackley, R. C., Dixit, V. M., and Hanna, W. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol.Chem.* 271: 29073-29079, 1996.
49. Gerber, B. O., Zanni, M. P., Ugucioni, M., Loetscher, M., Mackay, C. R., Pichler, W. J., Yawalkar, N., Baggiolini, M., and Moser, B. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr.Biol.* 7: 836-843, 1997.
50. Goodwin, R. G., Anderson, D., Jerzy, R., Davis, T., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Smith, C. A. Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol.Cell Biol.* 11: 3020-3026, 1991.

51. Graves, D. T., Barnhill, R., Galanopoulos, T., and Antoniadis, H. N. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo. *Am.J Pathol.* 140: 9-14, 1992.
52. Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., and . The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802, 1995.
53. Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 570-575, 1998.
54. Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H., and Kubin, M. Z. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol.* 161: 2833-2840, 1998.
55. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 113: 1076-1081, 1999.
56. Haghnegahdar, H., Du, J., Wang, D., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Nanney, L. B., Cardwell, N., Luan, J., Shattuck-Brandt, R., and Richmond, A. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc.Biol.* 67: 53-62, 2000.
57. Hakansson, L., Adell, G., Boeryd, B., Sjogren, F., and Sjodahl, R. Infiltration of mononuclear inflammatory cells into primary colorectal carcinomas: an immunohistological analysis. *Br.J Cancer* 75: 374-380, 1997.
58. Hardy, R. D., Jafri, H. S., Olsen, K., Wordemann, M., Hatfield, J., Rogers, B. B., Patel, P., Duffy, L., Cassell, G., McCracken, G. H., and Ramilo, O. Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia model: a microbiologic, histologic,

- immunologic, and respiratory plethysmographic profile. *Infect.Immun.* 69: 3869-3876, 2001.
59. Heller, R. A., Song, K., Onasch, M. A., Fischer, W. H., Chang, D., and Ringold, G. M. Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 6151-6155, 1990.
60. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol.* 144: 1425-1431, 1990.
61. Himmler, A., Maurer-Fogy, I., Kronke, M., Scheurich, P., Pfizenmaier, K., Lantz, M., Olsson, I., Hauptmann, R., Stratowa, C., and Adolf, G. R. Molecular cloning and expression of human and rat tumor necrosis factor receptor chain (p60) and its soluble derivative, tumor necrosis factor-binding protein. *DNA Cell Biol.* 9: 705-715, 1990.
62. Homburg, C. H., de Haas, M., dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P., and Roos, D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85: 532-540, 1995.
63. Horny, H. P. and Horst, H. A. Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunohistological study. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* 409: 275-286, 1986.
64. Horny, H. P. and Horst, H. A. Lymphoreticular infiltrates in adenocarcinoma of the large intestine. *Pathol.Res.Pract.* 182: 222-227, 1987.
65. Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., and Goeddel, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84: 299-308, 1996.
66. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504, 1995.

-
67. Hu, H. M., Urba, W. J., and Fox, B. A. Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile. *J Immunol.* 161: 3033-3041, 1998.
 68. Huang, S., Singh, R. K., Xie, K., Gutman, M., Berry, K. K., Bucana, C. D., Fidler, I. J., and Bar-Eli, M. Expression of the JE/MCP-1 gene suppresses metastatic potential in murine colon carcinoma cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 39: 231-238, 1994.
 69. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp.Med.* 188: 2357-2368, 1998.
 70. Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Nunez, G. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 10717-10722, 1997.
 71. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195, 1997.
 72. Janeway Ch., A., Travers P., Walport M., and Capra J., D. *Immunobiology-the immune system in health and disease.* Elsevier Science Ltd./Garland Publishing. 1999, 591.
 73. Jones, E. Y., Stuart, D. I., and Walker, N. P. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338: 225-228, 1989.
 74. Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369: 31-37, 1994a.
 75. Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in

- immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 14: 207-232, 1996.
76. Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., and Golstein, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265: 528-530, 1994b.
77. Karpusas, M., Hsu, Y. M., Wang, J. H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L., and Thomas, D. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure.* 3: 1426, 1995.
78. Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., and Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* 12: 611-620, 2000.
79. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420, 1994.
80. Krasagakis, K., Garbe, C., Zouboulis, C. C., and Orfanos, C. E. Growth control of melanoma cells and melanocytes by cytokines. *Recent Results Cancer Res.* 139: 169-182, 1995.
81. Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol.Cell Biol.* 21: 3964-3973, 2001.
82. Kuang, A. A., Diehl, G. E., Zhang, J., and Winoto, A. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol.Chem.* 275: 25065-25068, 2000.
83. Kumar, S. and Baglioni, C. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by overexpression of plasminogen activator inhibitor type-2. *J Biol.Chem.* 266: 20960-20964, 1991.

-
84. Leverkus, M., Neumann, M., Mengling, T., Rauch, C. T., Brocker, E. B., Krammer, P. H., and Walczak, H. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.* 60: 553-559, 2000.
 85. Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., and Lesslauer, W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61: 351-359, 1990.
 86. Loukinova, E., Dong, G., Enamorado-Ayalya, I., Thomas, G. R., Chen, Z., Schreiber, H., and Van Waes, C. Growth regulated oncogene-alpha expression by murine squamous cell carcinoma promotes tumor growth, metastasis, leukocyte infiltration and angiogenesis by a host CXC receptor-2 dependent mechanism. *Oncogene* 19: 3477-3486, 2000.
 87. Lowin, B., Beermann, F., Schmidt, A., and Tschopp, J. A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 11571-11575, 1994.
 88. Luther, S. A. and Cyster, J. G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat.Immunol.* 2: 102-107, 2001.
 89. Mannel, D. N., Moore, R. N., and Mergenhagen, S. E. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect.Immun.* 30: 523-530, 1980.
 90. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23: 549-555, 2002.
 91. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp.Med.* 182: 1545-1556, 1995.

92. Masztalerz, A., Van Rooijen, N., Den Otter, W., and Everse, L. A. Mechanisms of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12 mediated tumour regression. *Cancer Immunol.Immunother.* 52: 235-242, 2003.
93. Medema, J. P., Toes, R. E., Scaffidi, C., Zheng, T. S., Flavell, R. A., Melief, C. J., Peter, M. E., Offringa, R., and Krammer, P. H. Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur.J Immunol.* 27: 3492-3498, 1997.
94. Mehlen, P., Mehlen, A., Guillet, D., Preville, X., and Arrigo, A. P. Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J Cell Biochem.* 58: 248-259, 1995.
95. Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., and Arrigo, A. P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol.Chem.* 271: 16510-16514, 1996.
96. Melani, C., Pupa, S. M., Stoppacciaro, A., Menard, S., Colnaghi, M. I., Parmiani, G., and Colombo, M. P. An in vivo model to compare human leukocyte infiltration in carcinoma xenografts producing different chemokines. *Int.J Cancer* 62: 572-578, 1995.
97. Messmer, U. K., Pereda-Fernandez, C., Manderscheid, M., and Pfeilschifter, J. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br.J Pharmacol.* 133: 467-476, 2001.
98. Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol.Cell Biol.* 21: 5299-5305, 2001.
99. Miller, L. K. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* 9: 323-328, 1999.
100. Mule, J. J., Custer, M., Averbook, B., Yang, J. C., Weber, J. S., Goeddel, D. V., Rosenberg, S. A., and Schall, T. J. RANTES secretion by gene-modified tumor cells

- results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum.Gene Ther.* 7: 1545-1553, 1996.
101. Mullbacher, A., Waring, P., Tha, H. R., Tran, T., Chin, S., Stehle, T., Museteanu, C., and Simon, M. M. Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 13950-13955, 1999.
 102. Murphy, P. M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N.Engl.J Med.* 345: 833-835, 2001.
 103. Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827, 1996.
 104. Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol.Chem.* 273: 2926-2930, 1998.
 105. Negus, R. P., Stamp, G. W., Hadley, J., and Balkwill, F. R. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am.J Pathol.* 150: 1723-1734, 1997.
 106. Negus, R. P., Stamp, G. W., Relf, M. G., Burke, F., Malik, S. T., Bernasconi, S., Allavena, P., Sozzani, S., Mantovani, A., and Balkwill, F. R. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin.Invest* 95: 2391-2396, 1995.
 107. Neumann, B., Emmanuilidis, K., Stadler, M., and Holzmann, B. Distinct functions of interferon-gamma for chemokine expression in models of acute lung inflammation. *Immunology* 95: 512-521, 1998.

-
108. Neumann, B., Zantl, N., Veihelmann, A., Emmanuilidis, K., Pfeffer, K., Heidecke, C. D., and Holzmann, B. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int.Immunol.* 11: 217-227, 1999.
 109. Neumark, E., Anavi, R., Witz, I. P., and Ben Baruch, A. MCP-1 expression as a potential contributor to the high malignancy phenotype of murine mammary adenocarcinoma cells. *Immunol.Lett.* 68: 141-146, 1999.
 110. Nio, Y., Zigelboim, J., Berek, J., and Bonavida, B. Cycloheximide-induced modulation of TNF-mediated cytotoxicity in sensitive and resistant ovarian tumor cells. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 26: 1-8, 1990.
 111. Nophar, Y., Kemper, O., Brakebusch, C., Englemann, H., Zwang, R., Aderka, D., Holtmann, H., and Wallach, D. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* 9: 3269-3278, 1990.
 112. Opipari, A. W., Jr., Hu, H. M., Yabkowitz, R., and Dixit, V. M. The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol.Chem.* 267: 12424-12427, 1992.
 113. Peng, L., Shu, S., and Krauss, J. C. Monocyte chemoattractant protein inhibits the generation of tumor-reactive T cells. *Cancer Res.* 57: 4849-4854, 1997.
 114. Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Barry, M., and Bleackley, R. C. Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death.Differ.* 7: 17-24, 2000.
 115. Poehlein, C. H., Hu, H. M., Yamada, J., Assmann, I., Alvord, W. G., Urba, W. J., and Fox, B. A. TNF plays an essential role in tumor regression after adoptive transfer of perforin/IFN-gamma double knockout effector T cells. *J Immunol.* 170: 2004-2013, 2003.

-
116. Porter, A. G. Human tumour necrosis factors-alpha and -beta: differences in their structure, expression and biological properties. *FEMS Microbiol.Immunol.* 2: 193-199, 1990.
 117. Pytel, B. A., Peppel, K., and Baglioni, C. Plasminogen activator inhibitor type-2 is a major protein induced in human fibroblasts and SK-MEL-109 melanoma cells by tumor necrosis factor. *J Cell Physiol* 144: 416-422, 1990.
 118. Quan, L. T., Tewari, M., O'Rourke, K., Dixit, V., Snipas, S. J., Poirier, G. G., Ray, C., Pickup, D. J., and Salvesen, G. S. Proteolytic activation of the cell death protease Yama/ CPP32 by granzyme B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 1972-1976, 1996.
 119. Raynal, P. and Pollard, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1197: 63-93, 1994.
 120. Reiner, S. L., Zheng, S., Corry, D. B., and Locksley, R. M. Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR (*J. Immunol. Methods* 165 (1993) 37-46). *J Immunol.Methods* 173: 133, 1994.
 121. Rosenberg, S. A., Spiess, P., and Lafreniere, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233: 1318-1321, 1986.
 122. Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J.Natl.Cancer Inst.* 86: 1159-1166, 1994.
 123. Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16: 6914-6925, 1997.
 124. Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277: 2005-2007, 1997.

-
125. Sarin, A., Haddad, E. K., and Henkart, P. A. Caspase dependence of target cell damage induced by cytotoxic lymphocytes. *J Immunol.* 161: 2810-2816, 1998.
 126. Sarin, A., Williams, M. S., Alexander-Miller, M. A., Berzofsky, J. A., Zacharchuk, C. M., and Henkart, P. A. Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity.* 6: 209-215, 1997.
 127. Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J., and Goeddel, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347: 669-671, 1990a.
 128. Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H., and . Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61: 361-370, 1990b.
 129. Schwenzler, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R. M., and Wajant, H. The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol.Chem.* 274: 19368-19374, 1999.
 130. Shresta, S., Graubert, T. A., Thomas, D. A., Raptis, S. Z., and Ley, T. J. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity.* 10: 595-605, 1999.
 131. Song, H. Y., Rothe, M., and Goeddel, D. V. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 6721-6725, 1996.
 132. Sonouchi, K., Hamilton, T. A., Tannenbaum, C. S., Tubbs, R. R., Bukowski, R., and Finke, J. H. Chemokine gene expression in the murine renal cell carcinoma, RENCA, following treatment in vivo with interferon-alpha and interleukin-2. *Am.J Pathol.* 144: 747-755, 1994.

-
133. Spiess, P. J., Yang, J. C., and Rosenberg, S. A. In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl.Cancer Inst.* 79: 1067-1075, 1987.
134. Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., and Walczak, H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* 12: 599-609, 2000.
135. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J., Armstrong, R. C., and Alnemri, E. S. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol.Chem.* 272: 18542-18545, 1997.
136. Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. Apoptosis signaling. *Annu.Rev.Biochem.* 69: 217-245, 2000.
137. Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A., Jr., and Shepard, H. M. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943-945, 1985.
138. Sun, J., Bird, C. H., Sutton, V., McDonald, L., Coughlin, P. B., De Jong, T. A., Trapani, J. A., and Bird, P. I. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol.Chem.* 271: 27802-27809, 1996.
139. Talanian, R. V., Yang, X., Turbov, J., Seth, P., Ghayur, T., Casiano, C. A., Orth, K., and Froelich, C. J. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp.Med.* 186: 1323-1331, 1997.
140. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58: 5315-5320, 1998.

-
141. Tannenbaum, C. S., Tubbs, R., Armstrong, D., Finke, J. H., Bukowski, R. M., and Hamilton, T. A. The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol.* 161: 927-932, 1998.
 142. Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J., and Kelvin, D. J. Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260: 355-358, 1993.
 143. Thomas, D. A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T. J. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity.* 12: 621-632, 2000.
 144. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol.Methods* 184: 39-51, 1995.
 145. Vicari, A. P. and Caux, C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 143-154, 2002.
 146. Vucic, D., Deshayes, K., Ackerly, H., Pisabarro, M. T., Kadkhodayan, S., Fairbrother, W. J., and Dixit, V. M. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *J Biol.Chem.* 277: 12275-12279, 2002.
 147. Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr.Biol.* 10: 1359-1366, 2000.
 148. Wajant, H., Haas, E., Schwenzer, R., Muhlenbeck, F., Kreuz, S., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., and Scheurich, P. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol.Chem.* 275: 24357-24366, 2000.

-
149. Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., and Boldin, M. P. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu.Rev.Immunol.* 17: 331-367, 1999.
150. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683, 1998.
151. Winter H., Hu H.-M., Croft M., Ware C., Hatz R., Schildberg F.W., and Fox B. Lymphotoxin-beta spielt eine entscheidende Rolle in T-Zell vermittelter Tumorregression. *Chirurgisches Forum 2000 für experimentelle und klinische Forschung Band 29*, 35-39. 2000.
Ref Type: Abstract
152. Winter, H., Hu, H. M., McClain, K., Urba, W. J., and Fox, B. A. Immunotherapy of melanoma: a dichotomy in the requirement for IFN-gamma in vaccine-induced antitumor immunity versus adoptive immunotherapy. *J Immunol.* 166: 7370-7380, 2001.
153. Winter, H., Hu, H. M., Urba, W. J., and Fox, B. A. Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J Immunol.* 163: 4462-4472, 1999.
154. Wong, G. H., Elwell, J. H., Oberley, L. W., and Goeddel, D. V. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58: 923-931, 1989.
155. Wong, G. H. and Goeddel, D. V. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242: 941-944, 1988.
156. Wong, G. H., Kaspar, R. L., Zweiger, G., Carlson, C., Fong, S. E., Ehsani, N., and Vohar, G. Strategies for manipulating apoptosis for cancer therapy with tumor necrosis factor and lymphotoxin. *J Cell Biochem.* 60: 56-60, 1996.

-
157. Wood, G. W., Hausmann, E., and Choudhuri, R. Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol.Reprod.Dev.* 46: 62-69, 1997.
158. Yang, Q., Yang, G., Wei, L., Jia, F., Wang, W., Wu, M., and Guo, Y. The in vivo antitumor activity of murine liver tumor vaccine expressing MIP-1alpha. *Zhonghua Wai Ke.Za Zhi.* 40: 789-791, 2002.
159. Yang, Y. C., Hsu, T. Y., Chen, J. Y., Yang, C. S., and Lin, R. H. Tumour necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cord blood T lymphocytes: involvement of both tumour necrosis factor receptor types 1 and 2. *Br.J Haematol.* 115: 435-441, 2001.
160. Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R., and Greenberg, P. D. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J.Exp.Med.* 192: 1637-1644, 2000.
161. Yoshidome, H., Lentsch, A. B., Cheadle, W. G., Miller, F. N., and Edwards, M. J. Enhanced pulmonary expression of CXC chemokines during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in mice. *J Surg.Res.* 81: 33-37, 1999.
162. Yoshimura, T., Robinson, E. A., Tanaka, S., Appella, E., Kuratsu, J., and Leonard, E. J. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp.Med.* 169: 1449-1459, 1989.
163. Yoshizawa, H., Chang, A. E., and Shu, S. Specific adoptive immunotherapy mediated by tumor-draining lymph node cells sequentially activated with anti-CD3 and IL-2. *J Immunol.* 147: 729-737, 1991.
164. Zachariae, C. O., Anderson, A. O., Thompson, H. L., Appella, E., Mantovani, A., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J Exp.Med.* 171: 2177-2182, 1990.

165. Zhang, L., Khayat, A., Cheng, H., and Graves, D. T. The pattern of monocyte recruitment in tumors is modulated by MCP-1 expression and influences the rate of tumor growth. *Lab Invest* 76: 579-590, 1997.
166. Zheng, H., Luo, R. C., Zhang, L. S., and Mai, G. F. Interferon-gamma up-regulates Fas expression and increases Fas-mediated apoptosis in tumor cell lines. *Di Yi.Jun.Yi.Da.Xue.Xue.Bao.* 22: 1090-1092, 2002.
167. Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., Santoni, A., Zlotnik, A., and Napolitano, M. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol.* 161: 547-551, 1998.

8 Lebenslauf

Name	Jürgen Schmidt
Anschrift	Am Osthang 14 86356 Neusäß
Geburtsdatum / -ort	28.06.1974 in Augsburg
Familienstand	ledig
Schulabschluss	1994 Allgemeine Hochschulreife Justus-von-Liebig-Gymnasium Neusäß
Berufsausbildung	1994 - 1997 Ausbildung zum staatlich examinierten Krankenpfleger am Zentralklinikum Augsburg
Studium	1997 Immatrikulation im Fachgebiet Humanmedizin an der LMU München 1999 Ärztliche Vorprüfung 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung seit 1999 Doktorarbeit in der klinischen Forschung Chirurgie Großhadern bei PD Dr. Hatz, AG Dr. Winter (Direktor: Prof. Jauch)
Arzt im Praktikum	2003-2004 in der Gefäßchirurgie, Klinikum Augsburg
Assistenzarzt	seit 2004 im Chirurgischen Zentrum, Klinikum Augsburg
Wehrpflicht	1994 – 2002 Ersatzdienst beim BRK Katastrophenschutz und als Rettungssanitäter im Bereich Augsburg Land
Sprachkenntnisse	Englisch, Latein

Neusäß, 25.03.2005

9 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. K.-W. Jauch, Direktor der Klinischen Forschung Chirurgie im Klinikum der Universität München, Grosshadern, gilt mein besonderer Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn PD Dr. med. R. Hatz, Dr. med. H. Winter und Frau Dr. N. v. d. Engel aus der Klinischen Forschung Chirurgie im Klinikum der Universität München, Grosshadern.

Für die technische Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Dr. S. Eisenmenger, Frau I. Assmann, Frau T. Seher, Frau C. Otahal und bei der Arbeitsgruppe M.K. Angele aus der Klinischen Forschung Chirurgie im Klinikum der Universität München, Grosshadern.

Für die Überlassung von Tumorzelllinien und Substanzen gilt mein Dank Herrn Prof. B. Fox, Dr. Hong-Ming Hu und Dr. C. Pöhlein aus dem Earle A. Chiles Research Institute, Portland, OR, USA.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen bedanke ich mich bei Herrn Prof. G. Enders und bei Frau S. Münzing aus dem Institut für Chirurgische Forschung (ICF) München, Grosshadern.

Für die Hilfe bei der digitalen Datenverarbeitung und Formatierung gilt mein Dank Herrn A. Suchy, Frau S. Barth, Frau C. Ottlik und Frau B. Scholle.